

鸡血管活性肠肽 RNA 探针制备及其在 鸡肠 Remak 神经的原位杂交反应

柳金雄, 冯亚玫, 张晖, 陈秋生*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 应用 RT-PCR 方法从鸡脑中扩增血管活性肠肽 (VIP) 基因片段, 将其连接于 pGM-T easy。分别利用 pGM-T easy 中 T7 和 SP6 启动子及其 RNA 聚合酶, 以线性化的 VIP/pGM-T easy 为模板转录合成正、反义 DIG 标记 RNA 探针。通过原位杂交方法将合成的探针用于探查 VIP-mRNA 在鸡肠 Remak 神经 (INR) 中的分布情况。结果表明, INR 的神经元胞体中有 VIP-mRNA 的转录, 且这种神经元数量众多; 原位杂交阳性神经元胞体大部分是大型神经元细胞, 呈圆形或椭圆形; 阳性神经元胞体在 INR 神经节中呈层状或成群分布。INR 的神经纤维呈弱阳性。在节间束也有少量的阳性细胞分布。本研究从基因水平证明 INR 中有 VIP 神经元存在。

关键词: 鸡肠 Remak 神经; 血管活性肠肽 (VIP); 原位杂交; RNA 探针

中图分类号: S831.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 02-0111-05

Preparation of chicken vasoactive intestinal peptide RNA probe and its detection in intestinal nerve of Remak by *in situ* hybridization

LIU Jin-xiong, FENG Ya-mei, ZHANG Hui, CHEN Qiu-sheng*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: To study the distribution of vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA in chicken intestinal nerve of Remak (INR), the sense and anti-sense digoxigenin (DIG) labeled RNA probe were prepared and utilized. The fragment of VIP gene was obtained by RT-PCR through total RNA of chicken brains. Amplified cDNA fragment was subcloned into pGM-T easy vector, and the plasmid was transformed into *E. coli* DH5 α and chosen by "white-blue plaque selection". The recombinant plasmid was identified by *EcoR* I restriction enzyme digestion and sequencing, then VIP/pGM-T easy vector was linearized with the restriction enzyme of *Nco* I and *Sal* I respectively. The sense and anti-sense DIG labeled RNA probe were produced by SP6 and T7 RNA polymerase respectively and transcription *in vitro* according to the protocol of "DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)". Certificated by dot blot hybridization, the sense and anti-sense RNA probe were prepared successfully. The distribution of VIP-mRNA in chicken INR was examined by *in situ* hybridization histochemistry (ISHH). There were many labeled neurons distributing in ganglion and nerve trunk between ganglia, most of these labeled neurons were large size neurons and had round or oval shapes. Some the fibers of INR were weakly positive. In conclusion, the sense and anti-sense DIG labeled RNA probes for ISHH of VIP were prepared successfully in this experiment, which provided an approach to study further the location of VIP-mRNA in nerve tissue; the result of ISHH suggested the existence of VIP-mRNA in neurons of chicken INR.

Key words: chicken intestinal nerve of Remak; vasoactive intestinal peptide; *in situ* hybridization; RNA probe

禽类血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP) 是一个含有 28 个氨基酸残基的脑肠肽, 是自主神经系统中几种重要肽类神经递质之一, 在禽类消化道、生殖道、法氏囊等器官中有着广泛分布^[1-3]。VIP 在禽类和哺乳动物机体内的作用相似, 主要有促进催乳激素的释放, 引起平滑肌和血管扩张作用, 调节水盐代谢等。在消化道中, VIP 主要以神经递质的方式存在于肠壁内神经元中^[4]。

现在的观点认为肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 是自主神经系统的第 3 个组成部分, 肠壁中神经细胞的数量和脊髓中的数量相当, 其分布在肠壁中, 能独立完成各种反射活动。禽类肠道的

收稿日期: 2006-03-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270961, 30671513)

作者简介: 柳金雄, 博士研究生, E-mail: g_hero98@yahoo.com.cn。* 通讯作者: 陈秋生, 教授, 主要从事神经生物学研究, E-mail: chenqsh305@yahoo.com.cn。

ENS 由肠壁内神经元和壁外外来神经纤维共同组成。由于有肠 Remak 神经 (intestinal nerve of Remak, INR) 的存在, 禽类外来神经支配肠道的方式和哺乳动物明显不同。INR 是禽类特有的一根既含有交感神经, 又含有副交感神经的复合神经, 与肠道平行分布在肠道背侧肠系膜中, 从泄殖腔一直延伸到十二指肠, 并发出许多神经分支支配肠管壁、泄殖腔、法氏囊、睾丸、卵巢和输卵管^[5-11]。其中直肠段 INR 是最粗大的一段, 也是神经节和神经元数量最多的一段。随着 INR 向前延伸, INR 变得越来越细, 且神经节也变得更加稀少。从显微结构来看, INR 是一根由有髓神经纤维和无髓神经纤维组成的, 既含有胆碱能和非胆碱能的兴奋性神经纤维, 又含有肾上腺素能和非肾上腺素能抑制性神经纤维的神经干^[12-13]。

多年来, 关于 VIP 是否在鸡 INR 神经细胞中存在, 及肠壁中 VIP 神经纤维是否有一部分来自 INR 中的神经元一直有着不同的看法。本试验用体外转录方法合成鸡 VIP 地高辛 (Digoxigenin, DIG) 标记 RNA 探针, 并通过原位杂交 (*in situ* hybridization histochemistry, ISHH), 从基因水平研究 VIP 是否在鸡 INR 神经元胞体中存在, 为在基因水平上阐明禽类特殊的生理调节过程提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

10 只健康成年三黄鸡, 体质量 1.5 ~ 2.0 kg 左右, 购自南京市卫岗农贸中心。Trizol 试剂购于 Invitrogen 公司, *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶购于 TaKaRa 公司, pGM-T easy 质粒购于北京天为时代公司, 地高辛 RNA 标记试剂盒 (SP6/T7)、碱性磷酸酶标记的地高辛抗体及 NBT/BCIP 显色试剂购于 Roche 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 鸡 VIP/pGM-T easy 质粒的构建 因鸡的 VIP 前体蛋白 mRNA 有两种剪切方式, 其中长的一种同时编码 VIP 和组异肽 (PHI), 短的一种只编码 VIP, 后者占肠道中总 VIP-mRNA 的 98.5% 左右^[14]。以 GenBank 中序列号分别为 U09350 和 X80906 两种不同剪切方式的 VIP-mRNA 为参照设计引物, 使将合成的探针可以同时与两种不同剪切方式的 VIP-mRNA 结合。上游引物: 5'-GTC CTG TCA AAC GCC ACT CT-3' (分别对应于 U09350 (529-548)、X80906 (389-408)); 下游引物: 5'-AGG TGG CTC AGC AGT TCA TC-3' (分别对应于 U09350 (745-726)、X80906 (605-586)), 目的片段长度为 217 bp。

用 Trizol 从鸡脑中提取总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 获得长度为 217 bp 的 cDNA 目的片段。用 TA 克隆的方法将目的片段连接到 pGM-T easy 中。将此质粒转化大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞, 挑取阳性克隆进行扩增培养, 小量提取质粒, 再根据目的片段本身的酶切位点和 pGM-T easy 的多克隆酶切位点, 选用 *EcoR* I 酶进行酶切鉴定, 然后测序验证。

1.2.2 地高辛标记 VIP 正、反义 RNA 探针的合成 将阳性株扩增后提取的质粒分别用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sal* I 进行酶切, 使其完全线性化。回收酶切片段, 作为合成正、反义 RNA 探针的模板。按 Roche 地高辛标记试剂盒说明书分别用 Sp6 和 T7 转录酶进行体外转录, 合成地高辛标记的正、反义 RNA 探针。

合成好的 RNA 探针用变性琼脂糖电泳和紫外分光光度计进行初步鉴定。然后将标记的正、反义探针和标准探针 (试剂盒提供, 100 ng \cdot μ L⁻¹) 同时进行 10 倍梯度稀释, 即 10⁻¹ ~ 10⁻⁶ 个稀释度, 各取 1 μ L 点于尼龙膜上, 采用斑点杂交方法分析探针的浓度和标记效率。

1.2.3 原位杂交 (ISHH) 正常鸡经颈动脉放血处死, 迅速取全长 INR 于 4% 多聚甲醛中固定 3 h, 然后于含 200 g \cdot L⁻¹ 蔗糖的 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 过夜, 冰冻切片 (20 μ m) 并融裱于多聚赖氨酸预处理过的载玻片上。杂交前后的处理过程参考苏炳银等^[15]介绍的方法, 并稍加改进: 切片依次经 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 0.1 mol \cdot L⁻¹ 甘氨酸 PBS 5 min, 0.3% Triton X-100/PBS 漂洗 25 min, 蛋白酶 K (2 mg \cdot L⁻¹) 溶液 37 $^{\circ}$ C 消化 25 min, 4% 多聚甲醛漂洗 5 min, PBS 漂洗 3 次, 各 5 min, 0.25% 乙酸酐 (用 0.1 mol \cdot L⁻¹ 三乙醇胺新鲜配置) 中漂洗 5 min, 2 \times SSC 10 min; 预杂交液中 57 $^{\circ}$ C 预杂交 1.5 h, 杂交液中 (含地高辛标记 VIP 反义 RNA 探针 2 μ g \cdot mL⁻¹) 57 $^{\circ}$ C 杂交 18 h, 4 \times SSC 中 15 min, 2 \times SSC (含 20 μ g \cdot mL⁻¹ RNase A) 37 $^{\circ}$ C 30 min, 然后依次经 1 \times SSC 42 $^{\circ}$ C 10 min, 0.5 \times SSC 42 $^{\circ}$ C 10 min, 0.5 \times PBS

洗2次，各10 min，碱性磷酸酶标记抗地高辛抗体(1/1 000) 37 °C 孵育2 h，0.5 × PBS 漂洗3次，各10 min，TSM1、TSM2 中各漂洗2次，各10 min，然后于 NBT/BCIP 显色液中室温 1 ~ 1.5 h 显色，封片观察。

分别设计3个阴性对照：1. 将切片用 RNase A 预处理再进行杂交；2. 用地高辛标记的 VIP 正义探针代替反义探针进行杂交；3. 用普通羊血清代替羊抗地高辛抗体。其他步骤相同。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增目的片段和 VIP/pGM-T easy 质粒 *EcoR* I 酶切鉴定结果

从鸡脑中提取 RNA，用 RT-PCR 成功扩增出 217 bp 的目的片段(图1)。阳性克隆菌株扩增培养，提取质粒，用 *EcoR* I 进行酶切鉴定。所切出的片段因含有部分质粒片段而稍大于 RT-PCR 扩增的目的片段(图1)。

2.2 斑点杂交结果

斑点杂交的检测结果显示，正义和反义探针浓度与对照探针的浓度相近，约为 100 ng · μL⁻¹。可见 10 pg (1 × 10⁻⁴ μL × 100 ng · μL⁻¹) 探针即可显色，满足原位杂交的要求，即成功合成 VIP 的地高辛标记 RNA 探针。

2.3 ISHH 结果

VIP-mRNA 杂交阳性反应物为紫蓝色，主要定位于阳性神经元胞体及突起基部，核不着色，呈空泡状，位于胞体的中央，使阳性神经元胞体看上去呈戒指状(图3-A 至图3-E)。从图中可以看出，阳性神经元胞体大都为大型神经细胞，大都呈梭形或椭圆形(图3-D, E)。神经纤维为弱阳性(图3-C, D)。3个阴性对照结果全为阴性(正义探针杂交结果如图3-F)。

阳性神经元胞体在神经节的周边和中央都有分布，且在神经节周边呈比较有规律的层状分布(图3-A, B)。与用甲苯胺蓝对直肠段 INR 神经节神经元染色研究(另文发表)相比，神经节中 ISHH 染色阳性神经元胞体数量众多。

在 INR 的节间束中，少量阳性神经元胞体成簇分散存在(图3-C)。

3 讨论

随着分子生物学技术的迅速发展，探针标记技术和 ISHH 技术有了很大进步。本试验构建重组质粒 VIP/pGM-T easy 的目的是利用 pGM-T easy 质粒多克隆位点两端的 T7 和 SP6 RNA 聚合酶启动子在体外合成 DIG 标记的 RNA 探针，用此种探针检测 INR 神经元中其他组织中 VIP-mRNA 的存在或分布情况。探针合成后用斑点杂交的方法对标记的探针进行检测，结果显示杂交信号强，探针浓度适中，这在 INR 的 ISHH 试验中得到了验证。DIG 标记的 RNA 探针以其高的灵敏度和高的杂交稳定性而被人们所推崇，DIG 标记的探针灵敏度与放射性元素标记的探针相当，RNA-RNA 杂交比 DNA-DNA 和 RNA-DNA 杂交稳定性要高出很多，被认为是“最有前途”的核酸探针。但是，由于 DIG 标记的 RNA 探针灵敏度高及 RNA 容易被降解的特点，因而对于试验结果的判定要慎重。本试验中设立的3个阴性对照结果全为阴性，而 VIP 神经元呈典型阳性反应。证明本 ISHH 试验结果如实反映了 VIP-mRNA 在 Remak 神经神经元中的分布。

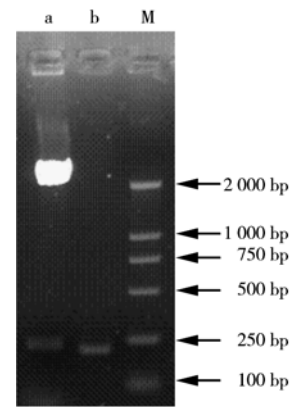


图1 RT-PCR 扩增及 VIP/pGM-T easy 质粒 *EcoR* I 酶切鉴定电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of the fragments from RT-PCR and VIP/pGM-T easy digested with *EcoR* I

a: VIP/pGM-T easy 质粒经 *EcoR* I 酶切 VIP/pGM-T easy digested with *EcoR* I; b: RT-PCR 扩增产物 RT-PCR production; M: DNA marker (DL2000)

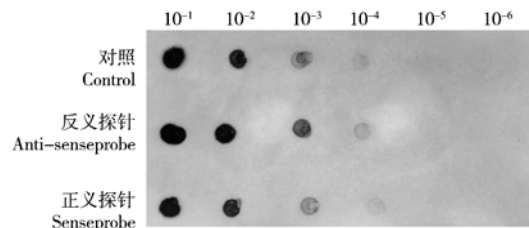


图2 DIG 标记 VIP-RNA 探针浓度检测

Fig. 2 Estimation of the yield DIG-labeled VIP-RNA probe

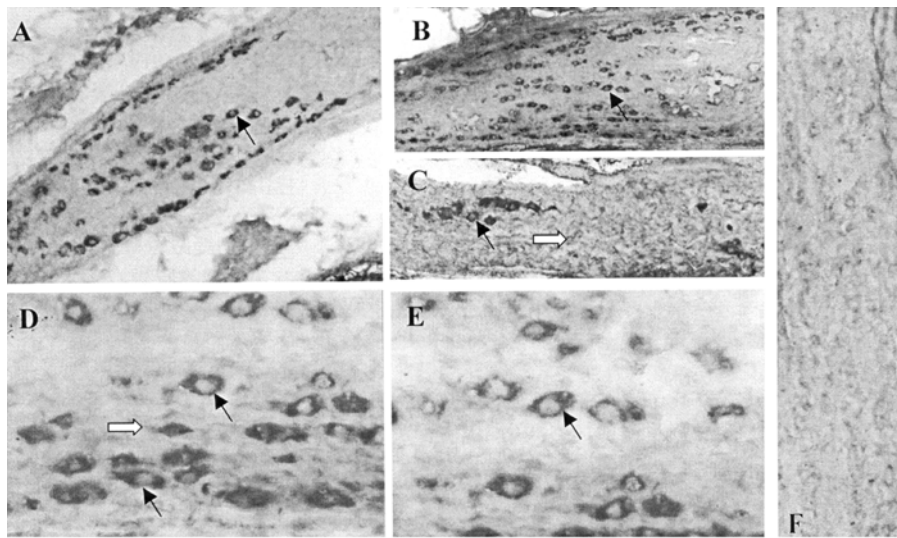


图 3 原位杂交结果

Fig. 3 Results of ISHH

A, B: 神经节, $\times 100$; C: 节间束, $\times 100$; D, E: 神经节, $\times 400$; F: 阴性对照, $\times 100$ (↑: 阳性神经元胞体; ⤴: 阳性神经纤维)

A, B: Ganglion, $\times 100$; C: Nerve fibers between ganglion, $\times 100$; D, E: Ganglion, $\times 400$; F: Negative control, $\times 100$ (↑: Positive perikaryons; ⤴: Positive nerve fibers)

INR 对肠道运动的调节与哺乳动物的椎前神经节对肠道的调节方式相似^[16], 但其中肽类递质的分部、释放及其怎样参与肠壁内神经丛的反射仍然存在许多疑问。VIP 是消化道中几种最主要的肽类递质之一。在禽肠壁中, VIP 分布在肌间神经丛的抑制性神经元中, 对肠道平滑肌起抑制作用; 在黏膜下神经丛的促分泌神经元中, VIP 直接作用于腺体或者间接作用于其他黏膜下神经元, 促进腺体的分泌^[1,11], 是主要的非胆碱非肾上腺素能神经的肽类递质, 对消化道运动起抑制性作用。近年来, 在霍乱弧菌、产毒性大肠杆菌引起腹泻的机制研究中, 发现 ENS 参与腹泻的发生, 且 VIP 在其中起到重要作用^[17]。

有关鸡 INR 中是否有 VIP 神经元胞体的分布存在两种截然不同的观点。Epstein 等^[1]用免疫组织化学方法, 未能在孵化末期鸡胚的 INR 中发现 VIP 神经元胞体的存在; Suzuki 等^[18]用兔抗人工合成 VIP 抗体进行免疫组织化学反应, 在成年鸡 INR 中只发现了 VIP 神经纤维的存在, 但未发现 VIP 神经胞体。与上述两者观点不同, Aisa 等^[19-20]用免疫荧光技术, 在 2 日龄雏鸡 INR 神经节及节间束中观察到 VIP 神经元胞体, 及 VIP 神经纤维对肠道的支配; 还发现在直肠和泄殖腔壁中只有 VIP 神经纤维的存在, 未见有神经元胞体, 并依此认为直肠和泄殖腔中 VIP 神经纤维来源于 INR 中的神经元。本试验用 DIG 标记的 RNA 探针通过 ISHH 的方法在成年鸡的 INR 神经元胞体中观察到了 VIP-mRNA 的存在, 且含有 VIP-mRNA 的神经元数量众多。从基因水平证实了 VIP 在 INR 神经元中的存在。关于鸡肠壁内 VIP 神经元的来源, 有两种观点: Fontaine-Perus 等^[16]将鸡胚消化道分段取出, 移植到没有外来神经纤维支配的受体胚尿囊膜中孵化, 结果在肠壁中观察到了 VIP 神经元胞体和神经纤维的存在, 证明肠壁的内 VIP 神经有一部分来自肠壁的内源性 VIP 神经元。其次, 以前的研究证实, 其他自主神经节中的 VIP 神经元也发出神经纤维, 经过 INR 而支配到肠壁。本试验结果显示 INR 中有 VIP 神经元胞体的存在, 且数量众多。结合其他相关研究结果, 笔者认为 INR 中的这些 VIP 神经元有一部分是支配鸡肠管 VIP 神经的第 3 种来源, 且这一神经支配在后段肠道所占比重更大一些。

除消化道外, 在鸡输卵管、法氏囊、卵巢和睾丸等器官组织中亦有大量 VIP 神经纤维的存在。在输卵管中, VIP 主要分布在漏斗部、膨大部、峡部和子宫部的肌间层和黏膜层中的血管周围, 调节其血流量; 在阴道部, VIP 神经纤维广泛分布在厚的环肌层中, 在产蛋时 VIP 直接作用于平滑肌, 保持阴道部平滑肌呈舒张状态^[3,21]。在法氏囊中, VIP 分布在各个不同的囊室壁中。VIP 在睾丸、卵巢中也有分布, 且其作用更加复杂。这些部位的 VIP 与生殖、免疫等生理功能密切相关。早先用辣根过氧化物酶 (HRP) 对输卵管、泄殖腔、法氏囊、卵巢和睾丸的神经支配进行逆行追踪研究表明, INR 发出神经纤

维支配到这些器官中^[5-8,10]。结合本试验结果,笔者推测这些器官组织中的VIP神经纤维有部分来源于INR中的VIP神经胞体。但这些神经元怎样参与反射以及怎样起到调节生殖、免疫等生理功能还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Epstein M L, Poulsen K T. Appearance of somatostatin and vasoactive intestinal peptide along the developing chicken gut [J]. *J Comp Neurol*, 1991, 311: 168-178
- [2] Epstein M L, Hudis J, Dahl J L. The development of peptidergic neurons in the foregut of the chick [J]. *J Neurosci*, 1983, 3(12): 2431-2447
- [3] Costagliola A, Mayer B, Vittoria A, et al. NADPH-diaphorase-, nitric oxide synthase-and VIP-containing nerve structures in the hen oviduct: a histochemical and immunohistochemical study [J]. *Arch Histol Cytol*, 1997, 60(3): 245-256
- [4] Sundeler F, Alumets J, Fahrenkrug J, et al. Cellular localization and ontogeny of immunoreactive vasointestinal polypeptide(VIP) in the chicken gut [J]. *Cell Tissue Res*, 1979, 196: 193-201
- [5] 崔燕, 谢铮铭. 鸡腔上囊传出神经元的分布——用CB-HRP法研究 [J]. *甘肃农业大学学报*, 1990, 25(3): 258-265
- [6] 王瑞中. 鸡睾丸的荐部副交感神经分布——HRP法研究 [J]. *莱阳农学院学报*, 1992, 9(3): 238-242
- [7] 董常生, 郭和以, 刘为民, 等. 鸡卵巢交感传出神经节后神经元的分布 [J]. *内蒙古农牧学院学报*, 1991, 12(3): 67-71
- [8] 陈秋生, 黄国庆, 刘仪. 肠神经对鸡输卵管支配的逆行追踪法研究 [J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(6): 585-587
- [9] Hodgkiss J P. Evidence that enteric cholinergic neurons project orally in the intestinal nerve of the chicken [J]. *Q J Exp Physiol*, 1984, 69: 797-807
- [10] 陈建新, 郭和以, 刘为民, 等. 鸡泄殖腔传入神经元的定位及其传入纤维在脊髓内的分布 [J]. *内蒙古农牧学院学报*, 1990, 11(1): 27-35
- [11] Suzuki M, Ohmori Y, Watanabe T. Projections of neurons in the intestinal nerve of Remak to the chicken intestine [J]. *J Auton Nerv Syst*, 1996, 61: 79-86
- [12] Komori S, Ohashi H. Some characteristics of transmission from non-adrenergic, non-cholinergic excitatory nerves to the smooth muscle of the chicken [J]. *J Auton Nerv Syst*, 1982, 6: 199-210
- [13] Ishizuka N, Komori S, Ohashi H. Evidence for adrenergic modulation of ganglionic transmission in the ganglia of the nerve of Remak of the chicken [J]. *J Auton Nerv Syst*, 1982, 6: 185-198
- [14] Talbot R T, Dunn I C, Wilson P W, et al. Evidence for alternative splicing of the chicken vasoactive intestinal polypeptide gene transcript [J]. *J Mol Endocrinol*, 1995, 15(1): 81-91
- [15] 苏炳银, 蔡文琴, 张成岗, 等. *nov* 基因在不同种属动物脊髓中的表达 [J]. *中国神经科学杂志*, 14(3): 237-241
- [16] Fontaine-Perus J, Chanconie M, Polak J M, et al. Origin and development of VIP and substance P containing neurons in the embryonic avian gut [J]. *Histochemistry*, 1981, 71: 313-323
- [17] 黄祖雄, 叶礼燕. 感染性腹泻与肠道神经系统 [J]. *国外医学: 儿科学分册*, 2004, 31(1): 4-6
- [18] Suzuki M, Ohmori Y, Watanabe T, et al. Immunohistochemical studies on the intestinal nerve of Remak in the male chicken [J]. *J Auton Nerv Syst*, 1994, 49: 207-216
- [19] Aisa J, Lahoz M, Serrano P J, et al. Histochemical, immunohistochemical, and electron microscopy study of the caudal portion of the chicken intestinal nerve of Remak [J]. *Neurochem Res*, 1998, 23(6): 845-853
- [20] Aisa J, Lahoz M, Serrano P J, et al. Intrinsic innervation of the chicken lower digestive tract [J]. *Neurochem Res*, 1997, 22(12): 1425-1435
- [21] Houvenaghel A, Wechsung E. Effects of prostaglandins, leukotrienes, VIP, carbachol and isopropylnoradrenaline on uterine and vaginal motility in the chicken [J]. *Verh K Acad Geneesk Belg*, 1989, 51(2): 153-174

责任编辑: 周广礼