

维生素 A 对视黄素 X 受体 β 基因的诱导表达研究

张冬杰

(黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 采用 RT-PCR 技术检测分析了不同浓度的维生素 A 在猪的成纤维细胞内分别作用 12、24 和 48 h 后, 视黄素 X 受体 β 基因(RXR β)的表达变化情况。结果表明: 不同浓度的维生素 A 对 RXR β 基因的作用效果不同, 12 h 时, 30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组可显著诱导 RXR β 基因的表达, 24 h 时, 10.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组可显著诱导 RXR β 基因的表达, 48 h 时, 各组与对照组之间不存在差异。

关键词: 猪; 视黄酸受体 β 基因; 成纤维细胞; RT-PCR

中图分类号: S858 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)03-0001-02

Study of Vitamin A on the Expression of Retinoid X Receptor β Gene

ZHANG Dong-jie

(Animal Husbandry Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In the present study, RXR β expression level was detected by RT-PCR in fibroblast cells cultured in different concentration vitamin A media and cultured 12, 24, 48 h respectively. The results showed that different concentration of vitamin A had different induced effect. 30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ group could significantly induce RXR β expression on 12 h but 10.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ group was on 24 h every group had no difference compared with the control group on 48 h.

Key words: pig; RXR β ; fibroblast cells; RT-PCR

维甲酸已被证明在脊椎动物的发育和调节体平衡方面有着重要作用。它的效应是通过专门的核受体蛋白介导的, 这些受体属于维甲酸/甲状腺激素受体超家族。除了已被命名的 RAR α , β , γ 外, Mangelsdorf 等^[1]又发现了另外一种核受体称为 RXR(retinoid X receptor), 这个受体在配体结合区不同于其他 3 种 RARs。目前关于 RARs 的研究报道较多, 但是关于 RXRs 的研究较少, 主要是因为它自身不具备与维甲酸的高亲和力。用一个维甲酸反应元件和 RAR 对表达库进行顺序筛选, 发现了一个与编码 RXR α 共同调节器非常相似的 cDNA, 这个蛋白被称为 RXR β , 它可以与 RAR 形成异二聚体, 启动子区包含维甲酸结合位点, 可以优先增加与它的 DNA 结合和转录活性。比较人和鼠的 RXR β 基因, 发现在氨基酸水平上有 97.6% 的一致性, 在核酸水平上有 91.6% 的一致性^[2]。Fitzgibbon 等^[3]将 RXR β 基因定位在 6p21.3-p21.1 上。

本研究以猪的成纤维细胞为实验材料, 以 RXR β

基因为目的基因, 研究了该基因在终浓度为 0.5、5.0、10.0、30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 维生素 A 的作用下的表达变化情况。

1 材料与方法

1.1 成纤维细胞体外培养

在超净台上, 用 PBS 液将所取的耳组织块漂洗 3~5 次, 剪成 1 mm³ 左右的小块, 加入微量的含 20% 胎牛血清的 D-MEM/F-12(Gibco) 培养液, 于 39℃ 饱和湿度 CO₂ 培养箱中培养 5 h 左右, 补加培养液, 之后隔天换液 1 次。待细胞基本汇合后, 吸去培养液, PBS 清洗, 加 2 mL 消化液消化 2~3 min, 终止消化后, 1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 制成细胞悬液, 接种于直径 60 mm 的培养皿中培养, 每 2 d 更换 1 次培养液。待细胞传至第 3 代后, 加入维生素 A (Sigma), 使其终浓度分别依次为 0.5、5.0、10.0、30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 待生长到 12、24 和 48 h 的时候, 分浓度收获细胞, 同时设 1 个阴性对照。

1.2 RT-PCR 检测 RXR β

1.2.1 总 RNA 抽提 使用 TRIzol 试剂盒 (Invitrogen) 提取制备总 RNA, -80℃ 保存。

1.2.2 引物设计 根据 GenBank 上已提交的 RXR β (AF053922) 和 β -actin 基因(内标基因)(U07786) 的序列

收稿日期: 2008-12-26

作者简介: 张冬杰(1980-), 女, 黑龙江省佳木斯市人, 博士, 助理研究员, 主要从事猪的分子遗传育种研究。Tel: 13845091493; E-mail: djzhang8109@163.com.

设计引物 引物序列如下: F1: CACTTCTCCTCCTT-GCCTCTG, R1: AGAGCAGGAAGACGCAGCAG; F2: CGGGACCTGACCGACATCCA, R2: GGGCCGT-GATCTCCTTCTG。引物由上海英骏公司合成。

1.2.3 RT-PCR 使用 BcaBEST™ RNA (TaKaRa)试剂盒将所提取的总 RNA 反转录成 cDNA, 并以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。因为退火温度不同, 所以 RXRβ 和 β-actin 基因的 PCR 扩增均在单管中进行。每样品 2 次重复, 同时用 ddH₂O 分别取代 RNA 样品和 RT 产物作为对照, 以检验是否有基因组和外源 DNA 污染, 并用混合样品(待测样品等比例混合)来建立最佳反应条件(处于指数增长期的循环参数)和校正不同批次间的差异。

1.3 结果分析与显著性检验

采用 Bio-Rad 公司生产的凝胶电泳成像系统自带的分析软件 Quantity-One 对电泳凝胶中的 PCR 产物条带进行定量分析, 结果用 SAS6.12 进行显著性检验。

表 1 不同维生素 A 浓度的显著性检验

时间/h	维生素 A 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$				
	0	0.5	5.0	10.0	30.0
12	0.8018±0.1048b	0.8102±0.1616b	0.8834±0.1056b	1.2657±0.1364ab	1.4605±0.1354a
24	0.7865±0.0920b	0.1226±0.0262c	0.3777±0.0446c	1.3569±0.1399a	0.8181±0.0967b
48	0.8018±0.1048ab	1.0380±0.0749a	0.9886±0.1248a	0.6799±0.0883ab	0.4777±0.0395b

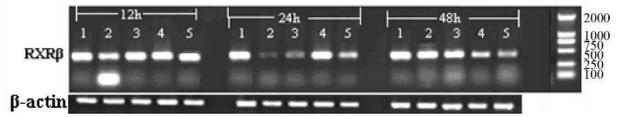
注: 同一行字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

RARs 和 RXRs 的表达和转录调控机制非常复杂。有研究表明, all-trans-RA 和 9-cis-RA 均可调节 RARs 的转录, 而 RXRs 只受 9-cis-RA 的调节, 并且 RARβ 在转录水平上受 RA 诱导效果最明显, 本实验中所用的 VA 为 all-trans-RA。本研究结果表明高浓度的 VA 对 RXRβ 的作用效果较为明显(10.0 和 30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 理论上讲, atRA 不能与 RXRβ 直接作用, 而需要 RARs 的介导, 但在本实验中, 添加了不同浓度的 atRA 后, RXRβ mRNA 的转录水平发生了变化, 这是因为 RXRβ 和 RARs 之间形成了异源二聚体, 当 RARs 发生变化时, RXRβ 也会随之发生变化。同时由于每个 RXR 和 RAR 又都各有 3 个亚型, 所以又会有 9 种不同的组合, 由于

2 结果

分别添加终浓度为 0.5、5.0、10.0 和 30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的维生素 A 后, RXRβ 基因的表达变化见图 1。



1~5 的浓度分别为 0、0.5、5.0、10.0、30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$

图 1 RXRβ 基因表达变化情况

从图 1 可以看出, 维生素 A 作用 12 h 后, 30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组要高于其他组和空白对照组 ($P < 0.05$), 其他组间差异不显著; 24 h 时, 10.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组要明显高于其他组, 30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 与对照组表达水平一致, 而其他两组均低于对照组 ($P < 0.05$); 48 h 时, 30.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组低于 0.5 和 5.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组 ($P < 0.05$), 与对照组和 10.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 组表达水平相同(见表 1)。

各自结合的配体不同, 又会对 atRA 的反应不同, 这也说明了为什么 RXRβ 表现出不规律的转录变化, 同时说明 RARs 和 RXRs 的转录调节机制非常复杂。

参考文献:

[1] Mangelsdorf D J, Ong E S, Dyck J A, et al. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway[J]. Nature, 1990, 345(6272): 224-229.
 [2] Fleischhauer K, McBride O W, DiSanto J P, et al. Cloning and chromosome mapping of human retinoid X receptor beta: selective amino acid sequence conservation of a nuclear hormone receptor in mammals[J]. Hum Genet, 1993, 90(5): 505-510.
 [3] Fitzgibbon J, Gillett G T, Woodward K J, et al. Mapping of RXRB to human chromosome 6p21.3[J]. Ann Hum Genet, 1993, 57(3): 203-209.

2009 年水稻高峰论坛在黑龙江省农业科学院举行。