

青海家牦牛 HIF-1 基因组织特异性表达

王德朋^{1,2}, 李红阁^{1,2}, 郭松长¹, 杨洁^{1,2}, 祁得林^{1,2}, 赵新全^{1*}

(1.中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 [目的] 探究青海家牦牛 HIF-1 基因组织的特异性表达[方法] 应用半定量反转录 PCR 和实时定量反转录 PCR (SYBR Green) 技术对青海家牦牛 HIF-1 基因的组织特异性表达进行检测。通过提取不同组织总 RNA, 经 DNase I 消化后, 用随机引物进行反转录合成 cDNA, 采用特异性引物分别对 HIF-1 和 β -actin 基因进行 RT-PCR 和 Real Time RT-PCR 扩增[结果] 结果表明, HIF-1 基因在心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸组织中均有表达, 其中以睾丸和脾中 HIF-1 基因表达量最高, 肌肉的表达量最低[结论] 该研究为进一步揭示 HIF-1 在高原土著动物低氧适应过程中的分子机制有着重要的意义。

关键词 青海家牦牛; HIF-1 ; 半定量反转录 PCR; 实时定量反转录 PCR; 组织分布
中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517- 6611(2007) 29- 09173- 03

Tissue Specific Expression of HIF-1 Gene in Qinghai Domestic Yak

WANG De-peng et al (Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001)

Abstract [Objective] The experiment was conducted to study the tissue specific expression of HIF-1 gene in Qinghai domestic yak. [Method] Tissue specific expression of HIF-1 gene in Qinghai domestic yak was detected using the methods of Semi-quantitative RT-PCR and Real Time RT-PCR. RNA was extracted from different tissues. After treated with DNase I, the total RNA was reverse transcribed with random primer to synthesize cDNA. Then the HIF-1 gene and β -actin gene were amplified with specific primers by RT-PCR and Real Time RT-PCR. [Result] Result showed that HIF-1 gene was expressed in tissues including heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, muscle and testis. Among them, HIF-1 gene showed the highest expression amount in testis and spleen and lowest in muscle. [Conclusion] This study was of significant importance for the study on the molecular mechanism of HIF-1 in plateau native animals during the process of hypoxia adaptation.

Key words Qinghai domestic yak; HIF-1 ; Semi-quantitative RT-PCR; Real Time RT-PCR; Tissue distribution

牦牛是青藏高原上体型最大的哺乳动物, 已经在它上面生活了至少 200 万年, 是世界上十分宝贵的一种稀有畜种, 我国是世界上拥有牦牛数量最多的国家, 约有 1 400 万头左右, 占世界牦牛总数的 90% 以上。青藏高原的主要特征是高寒缺氧, 关于牦牛如何适应低氧环境这方面的研究已经很多, 但大都集中在牦牛低氧适应的生理特征方面, 关于其低氧适应分子机制方面的研究目前还是空白。为此, 笔者以低氧调控的核心因子 HIF-1 作为研究对象, 研究了 HIF-1 基因在牦牛不同组织中的表达情况, 旨在为进一步揭示 HIF-1 在高原土著动物低氧适应过程中的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 中国科学院海北高寒草甸生态系统试验站 (101°23'E, 37°40'N, 海拔 3 200 m) 附近的雄性家牦牛 3 只, 割断气管处死后就地解剖, 迅速取部分各组织器官投入液氮中, 带回实验室置于 -70℃ 低温冰箱中长期保存备用。

大肠杆菌菌株 DH5⁺, 由中国科学院西北高原生物研究所实验室保存; 载体 pGEM-T, 为 Promega 公司产品; One-Step RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶、DNase I (RNase free)、Taq DNA 聚合酶, 为 TaKaRa 公司产品; Trizol RNA 提取试剂、SuperScript First-Strand cDNA Synthesis System for RT-PCR, 为 Invitrogen 公司产品; SYBR Green PCR Master Mix, 为 Applied Biosystems 公司产品, 胶回收试剂盒购自 Vegen 公司; 其他试剂均为国产或进口产品; 含有 HIF-1 基因以及 β -actin 基因的重组质粒为中国科学院西北高原生物研究所实验室自行克隆。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。Semi-Quantitative RT-PCR 使用的引物通过同源比对, 使用软件 Primer Premier 5 进行设计; Real Time RT-PCR 使用的引物由 Applied Biosystems 公司开发的 Primer Express 2 软件设计。引物序列见表 1。

1.2.2 青海家牦牛不同组织 RNA 提取。青海家牦牛不同组

表 1 Semi-Quantitative RT-PCR 和 Real Time RT-PCR 中使用的引物

目的基因	引物名称	引物类型	引物序列	预期片段长度 bp
HIF-1	H1 1.5K S	forward	GGA CAA GTC ACC/A ACA GGA CAG	1 495
	H1 1.5K AS	reverse	CA/GT AAC TGG TCA GC/TT GTG G	
	H1 real S	forward	GATAAACTTAAGAAGGAGCCTGATGCT	91
	H1 real AS	reverse	TGTCATTGCTGCCAAAAATCTAAAG	
β -actin	bactin 1.1K S	forward	ATG GAT GAT GAT ATT/C GCT/C GCG CTC G	1 128
	bactin 1.1K AS	reverse	CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT G	
	bactin real S	forward	TCACGAAACTACCTTCAATTCCATC	124
	bactin real AS	reverse	TTTCTGCATCCTGTTTGCGAT	

织 (心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸) 总 RNA 提取采用 Trizol reagent 一步抽提法进行。用无 RNase 的 DNase I 处理总 RNA, 去除总 RNA 中残存的基因组 DNA。紫外分光光度

计测其波长分别为 260、280 nm 处的浓度和纯度; 各取 20 μ g 不同组织总 RNA, 经无 RNase 的 DNase I 处理后, 再各取 1 μ g 处理后的总 RNA 跑 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。

1.2.3 cDNA 的合成。取不同组织总 RNA 各 5 μ g 分别与 1 μ l 10 mmol/L dNTP mix, 1 μ l Oligo (dT)₁₂₋₁₈, 1 μ l 2 μ mol/L GSP, 补 DEPC-treated water 至 10 μ l 混匀后, 65℃ 温育 5

基金项目 国家基础研究规划项目课题资助 (20005CB422005)。
作者简介 王德朋 (1980-), 男, 山东济宁人, 博士, 从事动物生理生态学研究。* 通讯作者, E-mail: xqzhao@nwi.pb.ac.cn。

收稿日期 2007-05-31

min, 立即放至冰上至少 1 min, 加入 2 μ l 10 \times RT buffer, 4 μ l 25 mmol/L MgCl₂, 2 μ l 0.1 mol/L DTT, 1 μ l RNase Inhibitor, 混匀后 42 $^{\circ}$ C 温育 2 min; 加 1 μ l 的 Super Script RT, 42 $^{\circ}$ C 温育 50 min; 70 $^{\circ}$ C 保温 15 min 终止反应; 各加入 1 μ l RNase H, 37 $^{\circ}$ C 温育 20 min, 消化掉未反应的 RNA。

1.2.4 Semi-Quantitive RT-PCR 检测 HIF-1 mRNA 表达。建立表 2 所示反应体系, 每个反应体系中总 RNA 的量为 1 μ g, 溶于 5 μ l RNase free water 中。HIF-1 基因片段的扩增参数为: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 hold。 β -actin 基因的扩增参数为: 50 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 hold。PCR 反应结束后, 各取 5 μ l 跑琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后紫外灯下拍照检测扩增产物。

表 2 Semi-Quantitive RT-PCR 反应体系

组分	体积 μ l
10 \times One Step RNA PCR Buffer	5
MgCl ₂ (25 mmol/L)	10
dNTP Mixture (10 mmol/L)	5
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	1
AMV RTase XL (5 U/ μ l)	1
AMV-Optimized Taq (5 U/ μ l)	1
Forward Primer (20 μ mol/L)	1
Reverse Primer (20 μ mol/L)	1
RNA (1 μ g total RNA)	5
RNase free water	20

1.2.5 Real Time RT-PCR 相对定量 (Ct 方法) 检测 HIF-1 mRNA 表达。该方法是在同一组织中两个基因 (HIF-1 和 β -actin) 扩增效率近似的情况下对不同基因的相对表达水平进行定量的一种简单方法。Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因} (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因}), 2^{- Δ Ct} 表示目的基因的表达相对于管家基因的变化倍数, 使用这一方法可以直接得到目的基因相对于管家基因的含量。对 HIF-1 基因在肾、脑、睾丸、肝、脾中的表达进行相对定量的检测和分析, 在这 5 种组织中, cDNA 各设置 5 个梯度稀释 10⁻¹ 2 \times 10⁻² 4 \times 10⁻³ 8 \times 10⁻⁴ 1.6 \times 10⁻⁴, 即得到的 HIF-1 和 β -actin 的不同浓度梯度的 Ct 值, 通过 cDNA 浓度梯度的 log 值对 Ct 值作图。如果所得直线斜率绝对值接近于 0, 说明目的基因和管家基因的扩增效率相同, 可以通过 Ct 方法进行相对定量。建立表 3 所示反应体系, 每一种模板的扩增重复 3 管。PCR 扩增参数为: 50 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环。Real Time RT-PCR 在 Applied Biosystems 公司生产的 SDS 7000 上进行。

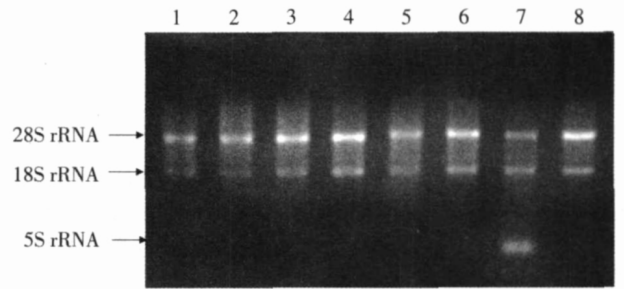
表 3 Real Time RT-PCR 反应体系

组分	体积 μ l
ddH ₂ O	1.5
Forward Primer (1.67 μ mol/L)	3.0
Reverse Primer (1.67 μ mol/L)	3.0
Template	5.0
SYBR Green PCR Master Mix	12.5

2 结果与分析

2.1 青海家牦牛不同组织总 RNA 提取结果 紫外分光光度计测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.9~2.0, 说明所提取的总 RNA 纯度高, 无基因组、蛋白质或其他杂质污染。1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外照射下显示, 28S rRNA 亮度大约是 18 S rRNA 亮度的 1~2 倍, 说明所提取的总 RNA 完整,

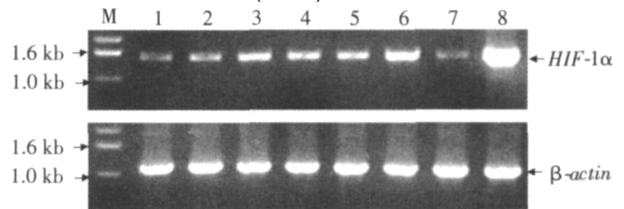
没有或很少有降解, 可以作为逆转录模板用于 cDNA 合成 (图 1)。



注: 1 为心脏; 2 为肝; 3 为脾; 4 为肺; 5 为肾; 6 为脑; 7 为肌肉; 8 为睾丸。

图 1 琼脂糖凝胶电泳分析青海家牦牛不同组织 1 μ g DNase I 处理后的总 RNA 结果

2.2 Semi-Quantitive RT-PCR 检测结果 从 One-Step RT-PCR 产物电泳结果可以看出, HIF-1 基因片段的扩增产物大小为 1.5 kb, β -actin 基因的扩增产物大小为 1.1 kb; 管家基因 β -actin 的扩增亮度基本一致, 但 HIF-1 基因片段的扩增产物亮度每种组织中均不一致, 有明显的组织特异性。HIF-1 基因在睾丸中的表达量最高, 其次是脑和脾, 在心脏和肌肉中的表达量较少 (图 2)。



注: 1 为心脏; 2 为肝; 3 为脾; 4 为肺; 5 为肾; 6 为脑; 7 为肌肉; 8 为睾丸。

图 2 Semi-Quantitive RT-PCR 检测青海家牦牛 HIF-1 α 基因表达结果

2.3 Real Time RT-PCR (Ct 方法) 检测结果 通过对绝对定量的分析, 发现 HIF-1 和 β -actin 在肾、脑、睾丸、肝、脾中扩增效率近似。对 HIF-1 基因在这 5 种组织中的表达进行相对定量的检测和分析, 各以 cDNA 5 种浓度梯度的 log 值对 Ct 值作图, 发现斜率均接近于 0, 说明目的基因 HIF-1 和管家基因 β -actin 的扩增效率相同, 可以通过

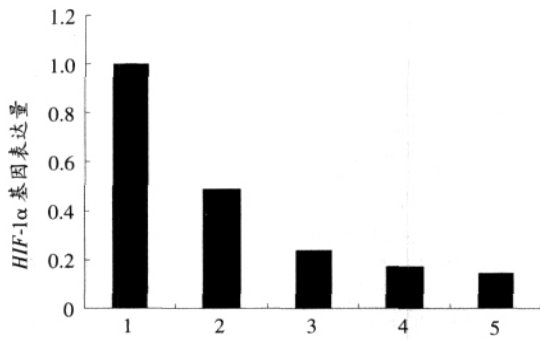
Ct 方法进行相对定量。由绝对定量的结果可知, HIF-1 基因在睾丸中的表达量最高, 以睾丸中 Ct 平均值为基准, 其余 4 种组织中的 Ct 平均值分别与睾丸中 Ct 平均值作差, 即得到 Δ Ct, 其他组织中 HIF-1 基因的表达量相对于睾丸中 HIF-1 基因的表达量即为 2^{- Δ Ct}。从表 4、图 3 可以看出, HIF-1 基因在睾丸中的表达量, 约是在脾中表达量的 2.0 倍, 是在脑中表达量的 4.3 倍, 约是在肾中表达量的 5.8 倍, 约是在肝中表达量的 7.0 倍, 与 Semi-Quantitive RT-PCR 的结果基本吻合。

表 4 青海家牦牛 HIF-1 基因表达 Real-Time RT-PCR 结果

组织名称	Ct	Δ Ct	2 ^{-ΔCt}
睾丸	2.292 \pm 0.151	0	1.000
脾	3.323 \pm 0.106	1.031 \pm 0.102	0.490 \pm 0.034
脑	4.401 \pm 0.138	2.086 \pm 0.192	0.236 \pm 0.031
肾	4.844 \pm 0.294	2.535 \pm 0.175	0.173 \pm 0.021
肝	5.090 \pm 0.054	2.799 \pm 0.141	0.144 \pm 0.014

3 结论与讨论

牦牛为牛家族中的稀有牛种, 隶属于偶蹄目、牛科、牦



注:1 为睾丸;2 为脾;3 为脑;4 为肾;5 为肝。

图3 Real-Time RT-PCR 检测 HIF-1 α 基因在牦牛不同组织中的表达结果

牦牛,因能充分利用高寒草地牧草资源及对高寒缺氧生态条件有极强的适应性,素有“高原之舟”之称。牦牛是青藏高原及周边地区特有的家畜遗传资源,分布于西起帕米尔、东至岷山、南至喜马拉雅山南坡、北抵阿尔泰山麓,海拔 3 000~5 000 m 的高原、高山、亚高山的高寒半湿润气候区域。牦牛生活的地区具有海拔高(2 500~6 000 m)、气温低(年均温 0 $^{\circ}$ C)、昼夜温差大(15 $^{\circ}$ C 以上)、牧草生长季短(110~135 d)、太阳辐射强(年辐射量 586~816 kJ/cm 2)、氧分压低(14.8 kPa 以下)的特点,草场以高山及亚高山草场为主。由于这种特殊的生态环境和严酷的自然选择,牦牛具有很强的生活能力,对高海拔缺氧环境有独特的适应能力,在生理、生化和形态学上已获得稳定的适应高原低氧的遗传学特征,如没有肺动脉高压和右心肥厚,心肺发育良好,心肺指数高等。氧的动态平衡被严格地控制以维持细胞内的氧的水平,一方面在许多生理过程中严密地控制氧的需求;另一方面氧也对细胞有高度的毒性。和单个细胞的水平一样,这个控制也发生在系统水平,它包括许多调控机制以适应氧的浓度的变化。在细胞水平下减少的氧的浓度(缺氧)激活了不需要分子氧的有选择的新陈代谢途径。从有氧代谢到无氧代谢的开关被激活,诱导糖分解的酶,介导葡萄糖的传送。另外,表达不同的压力蛋白,负责细胞凋亡或生存的基因被上调。它们包括诱导红细胞生成,血管新生和强力呼吸,在这些不同的上调的蛋白中,促红细胞生成素(EPO)是诱导红细胞生成的主要生长因子,血管内皮细胞生长因子(VEGF)是血管新生和血管渗透的主要的调控者。缺氧依赖调控的这些蛋白发生在转录水平,被低氧诱导因子(HIF-1)控制。

HIF-1 基因的表达一直是研究的热点,其在转录水平表达的研究结果不完全相同。Wenger 等的研究认为 HIF-1 mRNA 在细胞中是组成型表达,不受氧浓度的调节^[1];Yu 等发现雪貂经过无氧(0% O $_2$)处理 8 h 时,其肺中的 HIF-1 mRNA 表达量逐渐升高,在第 6 h 时达到最高点,然而随时间延长其表达量逐渐降低,在第 8 h 时几乎检测不到 HIF-1 mRNA 的表达^[2]。Palmer 等在低氧处理的小鼠的肺动脉

内皮细胞中检测 HIF-1 基因的表达升高了 2.0 倍,导致 HIF-1 与型 NOS 启动子的结合效率增强了 2.7 倍,因而增强了型 NOS 基因的转录^[3]。Zhao 等在高原鼠兔中检测了 HIF-1 mRNA 的表达,这是第一次在高原土著动物中研究 HIF-1 基因的转录活性。他发现高原鼠兔 HIF-1 mRNA 在脑和肾中的表达量较高,而在其他组织中的表达量较低,有明显的组织特异性;同时他以常氧下生活的小鼠作为对照,发现小鼠 HIF-1 mRNA 在组织中广谱性表达,没有明显的组织特异性^[4]。对于 HIF-1 基因在高原鼠兔脑中的高表达,他推测可能为脑如何高效率利用氧提供了思路,并为从分子水平阐释高原鼠兔低氧适应机制提供了线索。Zhao 等也研究了高原鼠兔在常氧处理 7 d 后 HIF-1 mRNA 的表达,同样也呈现明显的组织特异性表达。Shams 等首次在盲鼯鼠中研究了 HIF-1 mRNA 的表达,在低氧(3% O $_2$)处理 4 h 后,其 mRNA 表达量达到最高,比常氧下 HIF-1 mRNA 的表达量增加了 2.0 倍;同时,他们检测了经过 10%、6% 和 3% O $_2$ 处理的挪威鼠中 HIF-1 mRNA 的表达量并没有改变。因此 Imad 等认为 HIF-1 基因在地下生活的盲鼯鼠中的这种表达特征可能与它们低氧耐受的适应策略相关,这也是盲鼯鼠在近 4 000 万年的进化过程面对缺氧压力的一种适应^[5]。

该研究探讨了青海家牦牛 HIF-1 基因的组织表达特征,结果表明:青海家牦牛 HIF-1 基因可在心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸组织中表达,其中睾丸中的表达量最多,这与别人的研究有所不同。目前关于高原动物的低氧适应的分子机制的研究仍然较少,不同高原土著动物中 HIF-1 基因的组织差异性表达的机制还有待于进一步研究。但高原动物的 HIF-1 基因的这种组织特异性表达特征对于维持体内 HIF-1 的高水平可能起到调节作用,对于青海家牦牛适应高寒缺氧的青藏高原的特殊环境具有重要的生态学意义。

参考文献

- [1] WENGER R H, ROLFS A, MARTI H H, et al. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 223(1): 54-59.
- [2] YU A Y, FRID M G, SHIMODA L A, et al. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(4): 1818-1826.
- [3] PALMER L A, SEMENZA G L, STOLER M H, et al. Hypoxia induces type NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(18): 212-L219.
- [4] ZHAO T B, NING H X, ZHU S S, et al. Cloning of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) cDNA from a high hypoxia tolerant mammal plateau pika (*Ochotona curzonis*) [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316: 565-572.
- [5] SHAMS I, AVIVI A, NEVO E. Hypoxic stress tolerance of the blind subterranean mole rat: Expression of erythropoietin and hypoxia inducible factor 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 9698-9703.

GB/T 7714-2005

著录信息源

文后参考文献的著录信息源是被著录的文献本身。专著、论文集、学位论文、科技报告、专利文献等可依据书名页、版本记录页、封面等主要信息源著录各个著录项目;专著、论文集中析出的篇章与报刊上的文献本身著录析出文献的信息,并依据主要信息源著录析出文献的出处;缩微制品可依据题名页、片头、容器上的标签、附件等著录;光盘依据标签、附件著录;网络信息依据特定网址中的信息著录。