

Ghrelin 在驯鹿组织器官中的表达

张曼 金鑫 刘骄 杨银凤*

(内蒙古农业大学 兽医学院,呼和浩特 010018)

摘要 为检测生长素(*Ghrelin*)在驯鹿体内可能表达的器官,采用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和实时荧光定量 PCR(real-time PCR)技术,检测驯鹿的下丘脑、垂体、舌、食管、瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、心、肺、肝、脾、肾、膀胱、输尿管、睾丸、附睾、输精管、淋巴结、甲状腺、胰、肾上腺、胸腺、精囊腺和骨骼肌中 *Ghrelin* 的表达情况。*Ghrelin* 在上述器官中均有表达,且在皱胃内的表达量明显高于其他器官($P < 0.05$),其次是胰、十二指肠、睾丸和食管,与下丘脑、垂体和舌等其余器官内的表达量相比差异也显著($P < 0.05$),这些器官内的表达量相对较少。

关键词 *Ghrelin*;驯鹿;反转录-聚合酶链式反应;实时荧光定量 PCR

中图分类号 S 865.4⁺2

文章编号 1007-4333(2015)04-0147-05

文献标志码 A

Examining the expression of Ghrelin in reindeer organs

ZHANG Man, JIN Xin, LIU Jiao, YANG Yin-feng*

(College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agriculture University, Hohhot 010018, China)

Abstract In order to study the organs which expressing *Ghrelin* in reindeer, we examined the expression of *Ghrelin* by RT-PCR and real-time PCR in the organs of reindeer, including hypothalamus, hypophysis, tongue, oesophagus, rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, colon, heart, lung, liver, spleen, kidney, bladder, ureter, testis, epididymis, ductus deferens, lymphatic node, thyroid gland, pancreas, adrenal gland, thymus, seminal vesicle gland and skeletal muscle. The results showed that *Ghrelin* was expressed in all of the organs examined, where the expression in abomasum was significantly higher than in other organs ($P < 0.05$), and followed by pancreas, duodenum, testis and oesophagus. The expression of *Ghrelin* in the hypothalamus, hypophysis, tongue was remarkably higher, than the expression in other organs ($P < 0.05$).

Key words *Ghrelin*; reindeer; RT-PCR; real-time PCR

驯鹿的茸、肉、乳、鞭、生殖腺、皮和胎血等具有很高的经济价值,因此,驯鹿是一种珍贵的经济动物。驯鹿目前处于半野生状态,但由于生存环境和饲养条件无法满足驯鹿特殊要求,很容易产生多种疾病,甚至死亡。*Ghrelin* 是生长激素促分泌素受体 1a (Growth hormone secretagogue receptor 1a, GHS-R1a) 的一个内源性配体,研究发现 *Ghrelin* 不仅能够促进生长激素的释放^[1],还具有刺激食欲、调节能量代谢、促进胃蠕动、影响消化器官的发育和成熟等多种生物学效应,并且与临床上的多种疾病关

系密切。自首次从人和鼠的胃组织中分离提取得到 *Ghrelin* 以来^[1],随着研究的不断深入,Gnanapavan 等^[2]发现 *Ghrelin* 除了在人的消化系统中表达外,还在生殖系统、神经系统和内分泌系统也有表达。在禽类体内,Kaiya 等^[3]研究发现 *Ghrelin* 在鸡腺胃中有表达,之后许多研究者还发现 *Ghrelin* 在鸡的呼吸系统、泌尿系统和心血管系统中也有表达^[4-6]。在反刍动物体内,Miller 等^[7]研究显示在成年绵羊的消化系统、生殖系统和淋巴系统内 *Ghrelin* 均有表达。*Ghrelin* 分布的普遍性充分说明其具有广泛

收稿日期:2014-12-04

基金项目:内蒙古自然科学基金资助项目(2013MS0408)

第一作者:张曼,硕士研究生,E-mail:zhangman90514@163.com

通讯作者:杨银凤,教授,博士,主要从事动物解剖组织学和分子生物学研究,E-mail:julie1963@163.com

的生理作用。目前有关 *Ghrelin* 的研究大多都集中在鼠和人类,而关于反刍动物特别是驯鹿体内 *Ghrelin* 的研究资料报道较少,本课题组已完成了驯鹿生长素 *Ghrelin* 全长 cDNA 的克隆及序列分析^[8],但并未见有关 *Ghrelin* 在驯鹿不同器官内的表达情况的报道。本试验采用 RT-PCR 和 real-time PCR 方法,检测驯鹿体内可能表达 *Ghrelin* 的器官,以阐述 *Ghrelin* 在驯鹿体内的分布范围,了解分泌 *Ghrelin* 的主要器官,旨在为进一步研究 *Ghrelin* 在驯鹿体内各器官的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

1 头残疾雄性驯鹿(右后肢缺失)由内蒙古大兴安岭北敖鲁古雅民族自治乡提供。

1.1.2 试剂

DNA Marker 为 D2000, RNAiso Plus (Total RNA 提取试剂,日本 TaKaRa 公司), PrimerScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa 公司), Premix Taq™ (TaKaRa 公司), SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNase Plus, TaKaRa 公司), 氯仿, 异丙醇, 75% 乙醇, 琼脂糖。

1.2 试验方法

1.2.1 材料

残疾驯鹿屠宰后立即刮取舌、食管、瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠和膀胱等组织的黏膜,并切取适量的下丘脑、垂体、心、肝、肺、脾、肾、肾上腺、输精管、输尿管、淋巴结、精囊腺、睾丸、附睾、甲状腺、骨骼肌、胸腺和胰等组织,立即放入液氮中冷冻备用。

1.2.2 PCR 引物的设计及合成

根据本课题组呈送到 GenBank 中驯鹿 *Ghrelin* 部分 mRNA 序列和引物设计原则设计一对特异性 PCR 引物。另外根据驯鹿 18S rRNA 序列设计另外一对 PCR 引物 P3、P4。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

上游引物(Primer1)序列为:5'-AACGCCCC-TTTGACATTGG-3'

下游引物(Primer2)序列为:5'-TGAGGGTGG-GGAACGGACAG-3'

上游引物(Primer3)序列为:5'-CCCGGAGAA-

GGAGCCTGAGAAAC-3'

下游引物(Primer4)序列为:5'-TGATGCCCC-CGACTGTCCCTATTA-3'

1.2.3 总 RNA 的提取

采用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus Total RNA 提取试剂盒,将驯鹿的各个组织按照 100 mg/mL RNAiso Plus 加入 RNAiso Plus 试剂,按照试剂说明书操作。最后用无 RNase 去离子水溶解 RNA 沉淀,-80 °C 保存备用。

1.2.4 反转录反应(Reverse transcription, RT)

使用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒,反应液配制在冰上进行。将 6.5 μL 的 RNA 加入到 1.5 mL 离心管中进行去除基因组 DNA 反应。反应体系为 10 μL,其中 RNase Free dH₂O 0.5 μL, gDNA Eraser 1.0 μL, 5×gDNA Eraser Buffer 2.0 μL, 42 °C 水浴 2 min。将上述 10 μL 的反应液加入到反转录体系中合成 cDNA,反应体系为 20 μL,其中 RNase Free dH₂O 4.0 μL, 5×Prime Script Buffer 2(for Real Time)4.0 μL, RT Primer Mix 1.0 μL, Prime Script RT Enzyme Mix I 1.0 μL。于 PCR 仪进行反转录,反应条件为:37 °C 15 min, 85 °C s, 于 -20 °C 备用。

1.2.5 PCR 检测

将反转录得到的 cDNA 进行 PCR 反应,反应体系:Premix Taq (TaKaRa Taq™ Version 2.0 plus dye) 12.5 μL, cDNA 0.5 μL, 引物 1 (20 μmol/L) 0.5 μL, 引物 2 (20 μmol/L) 0.5 μL, 灭菌蒸馏水 11 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物用 1% 的琼脂凝胶电泳分离,然后用凝胶成像系统照相。

1.2.6 表达量的检测

以 cDNA 为模板,进行 real-time PCR 反应。反应体系为 20 μL: SYBR Premin Ex Taq (2×) 10 μL, Up primer (10 μmol/L) 0.8 μL, Down primer (10 μmol/L) 0.8 μL, 10 倍稀释的 cDNA 模板 2 μL, dH₂O 6.4 μL。反应程序为:扩增程序:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 63 °C 退火 34 s, 45 个循环; 熔解程序:95 °C 5 s; 60 °C 30 s; 95 °C 15 s, 每个样品的 18S rRNA 基因和 *Ghrelin* 基因分别做 3 个重复。*Ghrelin* 的相对表达量采用 2^{-ΔCT} 进行计算^[9], ΔCT = CT_{*Ghrelin*} - CT_{18S rRNA}。

1.2.7 统计分析

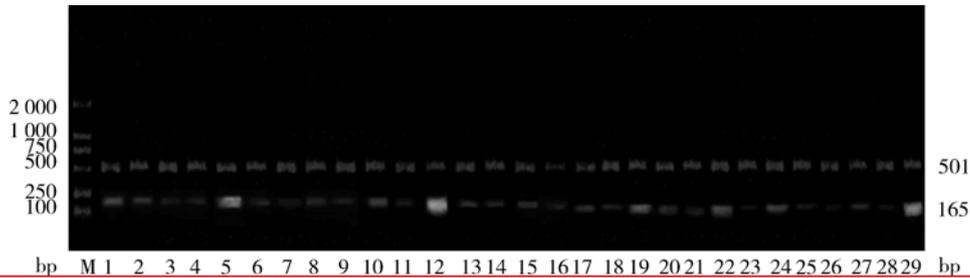
采用 Spss 20.0 软件进行单因素方差分析, 共分为 29 组, 每组做 3 个重复。

2 试验结果

2.1 表达检测

为检测 Ghrelin 在驯鹿体内可能表达的器官, 根据本课题组呈送到 GenBank 中驯鹿 Ghrelin 部分 mRNA 序列和引物设计原则设计一对预计扩增产物为 165 bp 的特异性 PCR 引物, 同时为检测所

提取的驯鹿各器官 RNA 的完整性, 根据驯鹿 18SrRNA 序列设计一对预计产物为 501 bp 的引物 P3 和 P4, 选用 29 种驯鹿器官总 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应后, 经 1% 的琼脂凝胶电泳进行检测, 在驯鹿下丘脑、垂体、舌、食管、瘤胃、网胃、瓣胃、皱胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、心、肺、肝、脾、肾、膀胱、输尿管、睾丸、附睾、输精管、淋巴结、甲状腺、胰、肾上腺、胸腺、精囊腺和骨骼肌内均有约 165 和 501 bp 的扩增带(图 1)。



1. 甲状腺;2. 心;3. 网胃;4. 胸腺;5. 十二指肠;6. 瘤胃;7. 肾;8. 膀胱;9. 肺;10. 结肠;11. 舌;12. 皱胃;13. 骨骼肌;14. 精囊腺;15. 瓣胃;16. 附睾;17. 脾;18. 输精管;19. 食管;20. 回肠;21. 肾上腺;22. 睾丸;23. 垂体;24. 下丘脑;25. 肝;26. 空肠;27. 淋巴结;28. 输尿管;29. 胰;M. D2 000 DNA Marker. 图 3 同。

1. thyroid;2. heart;3. reticulum;4. thymus;5. duodenum;6. rumen;7. kidney;8. bladder;9. lung;10. colon;11. tongue;12. abomasum;13. skeketak muscle;14. seminal vesicle gland;15. omasum;16. epididymis;17. spleen;18. ductusdefrens;19. oesophagus;20. ileum;21. adrenalgland;22. testis;23. hypophysis;24. hypothalamus;25. liver;26. jejunum;27. lymphaticnode;28. ureter;29. pancreas;M. D2 000 DNA Marker. Fig. 3 same as.

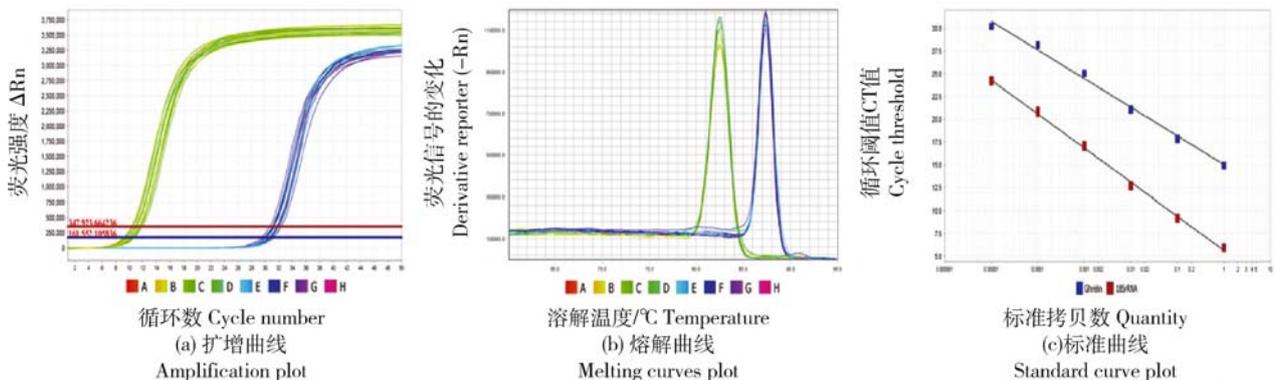
图 1 驯鹿组织 Ghrelin RT-PCR 的表达

Fig. 1 Expression of Ghrelin in the tissues of reindeer

2.2 表达量的检测

以驯鹿 18SrRNA 为内参基因, 驯鹿 Ghrelin 为目的基因, 将反转录得到的 cDNA 经 real-time

PCR 进一步研究, 各样品扩增曲线表明扩增效果好(图 2(a)), 经熔解曲线分析驯鹿 18SrRNA 和 Ghrelin 分别在 8.0 和 87.5 °C 出现单一产物峰, 均



A. 皱胃;B. 十二指肠;C. 睾丸;D. 食管;E. 下丘脑;F. 回肠
A. Abomasum; B. Duodenum; C. Testis; D. Oesophagus; E. Hypothalamus; F. Ileum

图 2 实时荧光定量 PCR

Fig. 2 Real-time PCR

与引物设计后预期产物 T_m 值相同(图 2(b))。将 18S r RNA 和 *Ghrelin* 基因 cDNA 以 10 倍浓度进行稀释,分别进行实时荧光定量 PCR 扩增。从扩增效率曲线图可以得出(图 2(c)),两组标准曲线的直线回归相关系数分别为 $R^2(18S_rRNA) = 0.998$ 、 $R^2(Ghrelin) = 0.992$;扩增效率(E)均接近理论扩增效率($E = 100\%$);标准曲线斜率介于 $-3.19 \sim -3.24$ 。表明可以用荧光定量 PCR 相对定量法检测 *Ghrelin* 基因的表达情况,并可以通过运用 $2^{-\Delta CT}$ 公式进行目的基因相对表达量的计算。

经 Spss 20.0 软件分析,*Ghrelin* 在以上检测的 29 种器官内均有表达且相对表达量差异显著,如图 3 所示 *Ghrelin* 在皱胃内的表达量显著高于其他器官($P < 0.05$),其次是胰、十二指肠、睾丸和食管,且与其他器官内表达量相比差异显著($P < 0.05$),肝、肺、瓣胃、回肠、精囊腺、输精管、脾、甲状腺、骨骼肌、结肠、心、附睾、下丘脑、膀胱和淋巴结表达量相对较低,空肠、垂体、胸腺、肾、输尿管、舌、肾上腺、瘤胃和网胃表达量最低。

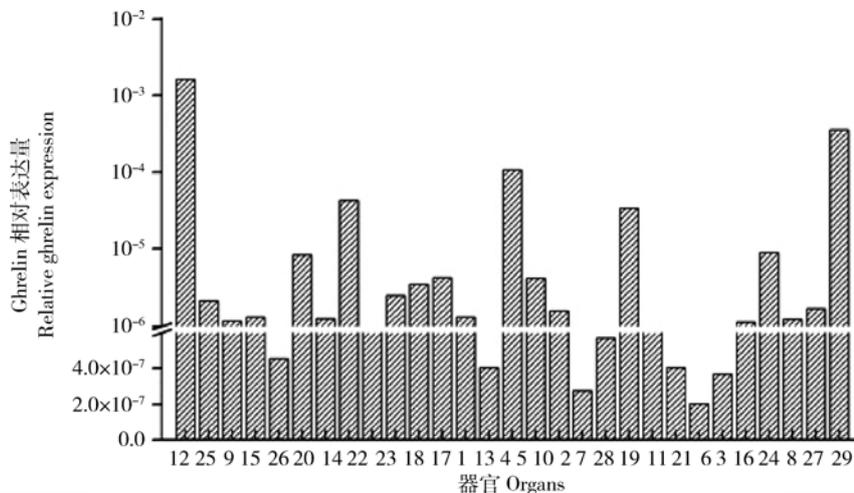


图 3 *Ghrelin* 相对表达量 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Relative *Ghrelin* expression levels ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 各器官内的表达

自从 1999 年 Kojima 等^[1]首次发现人和鼠胃内有 *Ghrelin* 表达以来,许多研究者采用多种生物学手段研究 *Ghrelin* 在不同动物组织器官内的表达情况。贾翠平^[10]采用 RT-PCR 方法对 *Ghrelin* 在兔体内多种器官的表达进行了研究,结果显示 *Ghrelin* 在兔大脑、下丘脑、垂体、脑干、脊髓、胃肠道、心、肝、脾、肺、肾、睾丸、卵巢和下颌腺中均有表达。杨连玉等^[11]采用 RT-PCR 技术,对初生仔猪和 90 日龄生长猪的下丘脑、胃肠道、胰、肝、肾和心等器官进行检测,结果表明这些器官中均有 *Ghrelin* 分布。Hayashida 等^[12]用免疫组织化学的方法研究猪、绵羊、马和牛的胃肠道内 *Ghrelin* 的表达情况,结果显示 *Ghrelin* 在猪、绵羊、马和牛的胃肠道内均有表达。本试验通过 RT-PCR 方法检测驯鹿体内可能

表达 *Ghrelin* 的器官,结果发现在所检测的器官内均有表达。由以上结果可知,在不同物种中 *Ghrelin* 分布的器官大致相同,即几乎在所有器官中都表达,说明 *Ghrelin* 在种系进化上可能存在一定的保守性。王家乡等^[13]采用 RT-PCR 方法研究 *Ghrelin* 在非洲雏鸵鸟胃肠道内的分布变化,结果表明 *Ghrelin* 除在空肠、结肠不表达外,在消化道的其他部位均有表达。而本试验显示 *Ghrelin* 在空肠、结肠同样表达,这些结果的不同可能是由于种间差异性,也可能与试验条件和试验动物的年龄有关,这一问题还有待于进一步研究。

3.2 各器官内的表达量

本试验采用 real-time PCR 方法进一步研究了 *Ghrelin* 在驯鹿体内不同器官的表达量,结果显示 *Ghrelin* 在所检测的 29 种器官内表达量之间存在显著差异,其中在皱胃内的表达量最高,胰、十二指肠、睾丸和食管内的表达量比皱胃低但显著高于其他器

官,剩余的24种器官内Ghrelin的表达量均比较低。黄治国等^[14]用RT-PCR和real-time PCR检测雄性哈萨克羊和新疆细毛羊体内Ghrelin的表达及组织分布,发现所检测的各组织中均有Ghrelin表达,并且在皱胃内的表达量远高于其他器官。Tonghui等^[15]研究发现Ghrelin主要在猪的胃和十二指肠内表达,胰内的表达量显著低于胃和十二指肠,但与其他组织相比较,在血脂、肝、肺、脑、肌肉、肾内Ghrelin的表达量低,在心、脾、睾丸和卵巢内Ghrelin的表达量最低。

本试验结果与黄治国等^[14]的试验结果均说明Ghrelin在皱胃内的表达量远高于其他器官,因此,笔者推测Ghrelin在反刍动物皱胃内的表达量最高,说明反刍动物在表达Ghrelin上具有种属特异性。然而,Miller等^[7]和Tonghui等^[15]的试验结果显示Ghrelin在十二指肠内的表达量仅次于皱胃,与本研究结果得出的胰内的表达量高于十二指肠的结果存在矛盾,这可能是由于种属差异引起的,但由于目前未见有关其他鹿种体内Ghrelin表达量的报道,所以现在很难断言是鹿属动物Ghrelin共有的特性,还是由于驯鹿由野生状态变为半野生状态Ghrelin发生了变异,这将有待于进一步研究证实。

4 结 论

本试验在印证了前人^[7,14-15]研究结果的同时,即Ghrelin在反刍动物胃肠道内均有表达,又进一步说明Ghrelin在驯鹿其他器官内也有表达,且表达量之间存在差异,但由于目前有关鹿属动物的研究比较少,因此,这些差异的原因及在体内的作用还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402 (6762): 656-660
- [2] Gnanapavan S, Kola B, Bustin S A, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans[J]. Clin Endocrinol Metab, 2002, 87: 2988-2991
- [3] Kaiya H, Van der Geysen S, Kojima M, et al. Chicken ghrelin: Purification, cDNA cloning, and biological activity [J]. Endocrinology, 2002, 143: 3454-3463
- [4] Richards M P, Poch S M, McMurtry J P. Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens [J]. Gen Comp Endocrinol, 2006, 145(3): 298-310
- [5] Wang J X, Li P, Peng K M, et al. cDNA cloning of ghrelin and ontogeny of ghrelin mRNA expression in the gastrointestinal tract of African ostrich chicks[J]. Regul Pept, 2011, 167: 50-55
- [6] Shao Y J, Liu S H Q, Tang X Y, et al. Ontogeny of ghrelin mRNA expression and identification of ghrelin immunopositive cells in the gastrointestinal tract of the Peking duck, *Anas platyrhynchos*[J]. Gene Comp Endocrinol, 2010, 166: 12-18
- [7] Miller D W, Harrison J L, Brown Y A, et al. Immunohistochemical evidence for an endocrine/Paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005 (3): 60
- [8] 杨银凤, 余兴邦, 王冠玉. 中国驯鹿生长素 Ghrelin 全长 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 10(34): 1647-1652
- [9] Schmittgen T D, Zakrajsek B A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR[J]. J Biochem Biophys Methods, 2000, 46(1/2): 69-81
- [10] 贾翠萍. 兔 Ghrelin 组织分布及其基因克隆的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007
- [11] 杨连玉, 杨文艳, 冀凤杰, 等. 猪 Ghrelin 的基因克隆及其组织中 mRNA 分布的研究[J]. 吉林农业大学学报, 2004, 26(1): 86-88
- [12] Kangawa K, Murakami N. Ghrelin in domestic animals distribution in stomach and its possible role[J]. Domest Anim Endocrinol, 2001; 21: 17-24
- [13] Wang J X, Li P, Peng K M, et al. cDNA cloning of ghrelin and ontogeny of ghrelin mRNA expression in the gastrointestinal tract of African ostrich chicks[J]. Regul Pept, 2011, 167: 50-55
- [14] Huang Zhiguo, Xiong Li, Liu Zhenshan, et al. The Tissue distribution and developmental changes of ghrelin mRNA expression in sheep[J]. 遗传学报, 2006, 33(9): 808-813
- [15] Lin Tonghui, Meng Qingyong, Sui Dandan, et al. Molecular cloning and expression analysis of porcine ghrelin o-acyltransferase[J]. Springer Science, Business Media, 2010, 49: 576-586

责任编辑: 苏燕