

CD1 小鼠胃肠道快速延迟性整流性钾通道基因的分布

余英, 余保平, 汪福群

余英, 余保平, 汪福群, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
余英, 女, 1980-08-27 生, 湖北省武汉市人, 汉族, 2003 年武汉大学硕士生, 主要从事胃肠动力学的基础研究。

通讯作者: 余保平, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科。
yubaoping62@yahoo.com.cn

电话: 027-68759391

收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

Expression of ether-a-go-go-related gene in gastrointestinal tract of normal CD1 mice

Ying Yu, Bao-Ping Yu, Fu-Qun Wang

Ying Yu, Bao-Ping Yu, Fu-Qun Wang, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Bao-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubaoping62@yahoo.com.cn

Received: 2005-06-06 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To investigate the expression of ether-a-go-go-related gene (ERG) mRNA and protein and its different distributions in the gastrointestinal tract of CD1 mice.

METHODS: The expression of ERG K⁺ current related protein was examined by immunohistochemistry and the expression of ERG mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization in the tissues of stomach, jejunum, ileum and colon from adult CD1 mice. Then the distribution of ERG was analyzed.

RESULTS: ERG was positively expressed in all the tissues of stomach, jejunum, ileum and colon. The positive cells mainly distributed in the muscular layer. A small number of positive cells distributed in the mucosa and chorion. The levels of ERG expression in stomach and colon were significantly higher than those in jejunum and ileum (4.30 ± 0.95 , 3.60 ± 0.70 vs 2.70 ± 0.82 , 2.30 ± 1.06 ; $P < 0.05$).

CONCLUSION: ERG is expressed in the gastrointestinal tract of CD1 mice. Furthermore, the expression is differential at different sites.

Key Words: Ether-a-go-go-related gene; *In situ* hybridization;

Immunohistochemistry; Reverse transcription polymerase chain reaction; Gastrointestinal tract; Mice

Yu Y, Yu BP, Wang FQ. Expression of ether-a-go-go-related gene in gastrointestinal tract of normal CD1 mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(15):1842-1845

摘要

目的: 研究快速延迟性整流性钾通道基因 (ether-a-go-go-related gene, ERG)mRNA 及相关蛋白在正常小鼠胃肠道的表达及不同部位分布的差异性。

方法: 用原位杂交、RT-PCR 和免疫组化技术检测 CD1 小鼠胃、空肠、回肠和结肠组织 ERG mRNA 及相关蛋白的分布。

结果: 三种方法显示胃、空肠、回肠和结肠组织均有 ERG 阳性表达, 阳性细胞主要分布在肌层, 少量分布在黏膜、浆膜。胃和结肠 ERG 阳性表达明显高于回肠和空肠, 具有显著性差异 (4.30 ± 0.95 , 3.60 ± 0.70 vs 2.70 ± 0.82 , 2.30 ± 1.06 ; $P < 0.05$)。

结论: ERG 在 CD1 小鼠胃肠道有阳性表达, 并在胃肠道不同部位的表达存在差异性。

关键词: 快速延迟性整流性钾通道基因; 原位杂交; 免疫组化; 逆转录聚合酶链反应; 胃肠道; 小鼠

余英, 余保平, 汪福群. CD1 小鼠胃肠道快速延迟性整流性钾通道基因的分布. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1842-1845

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1842.asp>

0 引言

ERG (Ether-a-go-go-related gene) 编码快速延迟性整流性钾通道的 α 亚基, 该亚基参与构成快速延迟性整流性钾通道的电压感知功能区。该通道在心脏起搏细胞电流频率的调节及维持心肌细胞静息电位的稳定性中起着重要作用^[1-2], HERG (human-ether-a-go-go-related gene) 突变常导致长 QT 间期综合征^[3-6]。ERG 最初被认为只在心脏表达, 随着研究的深入, 人们发现他也存在于其他许多组织中 (如脑神经细胞), 并在不同组织中扮演着重要角色。目前有研究发现食管中也有 ERG 的表达, 但在胃肠道的表达罕有报道。我们首次用原位杂交技术来研究 ERG 在胃肠道中的存

在性, 并结合 RT-PCR 和免疫组化技术首次探讨 ERG 在胃肠道不同部位的分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料 成年 CD-1 小鼠 10 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 雌雄不限, 自由饮食饮水, 室温保持在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 12 h 昼夜交替. rabbit anti-mouse human erg polyanitbody (Santa Cruz 公司), ERG 原位杂交试剂盒 (博士德公司), 羊抗兔 IgG (中山公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), dNTP Mix, Rnasin (Takara 公司), M-MLV 逆转录酶及缓冲系统 (Promega 公司), Taq DNA 聚合酶及缓冲系统 (Biostar 公司), ERG 上下游引物、 β -actin 上下游引物由上海生工合成。

1.2 方法 禁食 12 h 后颈椎脱臼法处死, 取出胃, 空肠 (幽门后 2 cm), 回肠 (回盲瓣前 5 cm), 结肠 (盲肠后 2 cm), 在装有 Krebs 营养液的烧杯中去除胃肠内容物. (Krebs 营养液成分如下: NaCl 120.6 mmol/L, KCl 5.9 mmol/L, CaCl₂ 22.5 mmol/L, NaHCO₃ 15.4 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.2 mmol/L, C₆H₁₂O₆ 11.5 mmol/L, pH = 7.4)。

1.2.1 ERG mRNA 原位杂交 原位杂交试剂盒采用针对 ERG 的寡核苷酸探针, 经地高辛标记. 针对小鼠 ERG 靶基因的 mRNA 序列为: (1) 5' -GACAC CATCA TCCGC AAGTT TGAGG GCCAG AGCCG-3' (2) 5' -CATGA CACCA ACCAC AGGGG CCCCT CTACC AGCTG-3' (3) 5' -AACAG GCTGG AAACC CGGCT AAGTG CAGAC ATGGC-3'. 原位杂交实验步骤严格按照试剂盒说明书操作进行. 阳性信号以胞质及少量胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒判断。

1.2.2 RT-PCR 分析 按 Trizol RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, RNA 保存在 -70°C , 用紫外分光光度吸收法在 260 nm 处测定 RNA 的含量. 引物如下: ERG 上游引物: 5' -TCTCCATCTGTGTCATGCTC-3', ERG 下游引物: 5' -ACCAAGCATGCTGGAAGTAC-3'. β -actin 上游引物: 5' -TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3', β -actin 下游引物: 5' -TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'. 然后进行逆转录和 PCR 扩增反应。

1.2.3 免疫组化评分 免疫组化 SABC 法染色步骤严格按照试剂说明书进行, 阳性对照片为心脏组织, 以 PBS 代替一抗做阴性对照. 阳性信号以胞质及少量胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒判断. 免疫组化评分 (immunohistochemical scores IHS) 方法见参照 [7] 文献, 结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面评分: a 为阳性细胞百分比 (无阳性细胞 = 0, 阳性细胞占 1-10% = 1, 11-50% = 2, 51-80% = 3, 81-100% = 4), b 为阳性细胞染色强弱 (阴性 = 0, 弱阳性 = 1, 中度阳性 = 2, 强阳性 = 3), a, b 两项乘积即为该例组织的 IHS。

统计学处理 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 各组 ERG 的 IHS 的变化值运用统计软件 SPSS12.0 作单因素方差分析, 组间比较采用 SNK (q 检验), 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 ERG mRNA 原位杂交 胃、空肠、回肠、结肠均有阳性表达 (细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性). 着色主要在环肌层和纵肌层, 黏膜腺体、浆膜有少量着色 (图 1)。

2.2 RT-PCR 成年 CD1 小鼠 ($n = 10$) 胃体、空肠、

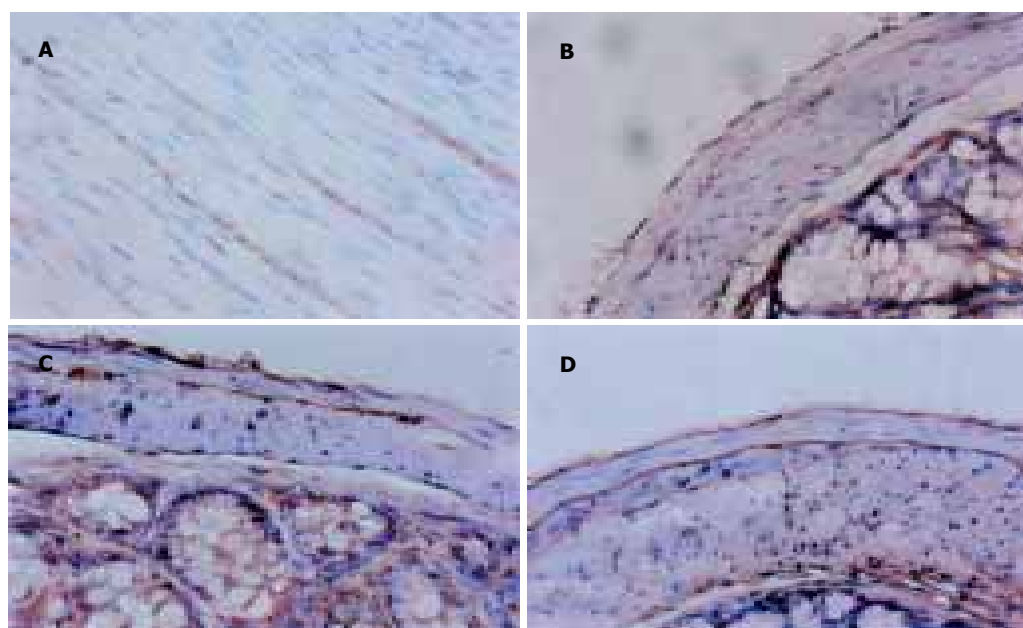


图1 小鼠胃肠道 ERG mRNA 阳性染色 ($\times 400$). A: 胃肌层; B: 空肠肌层; C: 回肠肌层; D: 结肠肌层。

回肠、结肠平滑肌中均表达 ERG mRNA. 所检测到的 ERG cDNA 片段大小为 198bp, 位于全系列(NM_013569) 的 2252-2449 间. 用同一只小鼠心肌组织作为阳性对照(图2).

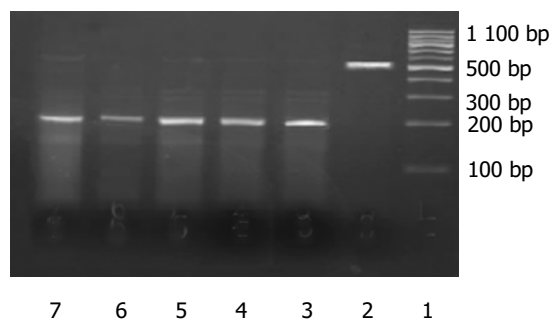


图2 PT-PCR结果. 1: Maker; 2: β -actin; 3: 心脏(阳性对照); 4: 胃体; 5: 空肠; 6: 回肠; 7: 结肠.

2.3 ERG 免疫组化 胃、空肠、回肠、结肠均有阳性表达(细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性), 着色主要在环肌层和纵肌层, 黏膜腺体及浆膜有少量着色. 胃、结肠ERG明显高于空肠和回肠(图3). 染色结果用免疫组化评分(IHS)表示, 结果:胃 4.30 ± 0.95 分, 空肠 2.70 ± 0.82 分, 回肠 2.30 ± 1.06 分, 结肠 3.60 ± 0.70 分. 各组ERG的IHS的变化值作单因素方差分析, 得出 $P < 0.01$ 有统计学意义. 证明至少有两组表达差异有统计学意义. 不同部位的ERG的IHS两两比较采用SNK(q 检验), 得出胃、结肠IHS明显高于空肠、回肠($P < 0.05$)有统计学意义. 胃与结肠比较无显著性差异($P > 0.05$), 空肠与回肠比较无显著性差异($P > 0.05$).

3 讨论

ERG基因是一种延迟整流性钾通道基因, 属电压门控性钾通道家族, 而后研究表明其在心脏表达最为强烈. 深入研究发现在大鼠脑小胶质细胞^[8]、大鼠脑垂体^[9]、大鼠颈动脉窦化学感受器细胞^[10]、大鼠肺小动脉平滑肌细胞^[11]、人胰腺 β 细胞^[12]、小鼠门静脉^[13]也都存在ERG通道基因. 但在消化道罕有类似报道, 1999年Akbarali *et al*^[14]在负鼠食管平滑肌细胞中发现ERG阳性表达. 本实验补充说明ERG在胃、空肠、回肠、结肠也有表达, 证明ERG在整个消化道广泛分布. 其次本实验用原位杂交检测ERG, 不仅从基因水平证明ERG的存在, 而且初步定位ERG存在于胃肠道平滑肌细胞. 另外我们首次证明了ERG在胃、空肠、回肠、结肠的表达存在不均一性, 在胃、结肠的表达量明显高于空肠、回肠; 胃和结肠之间, 空肠和回肠之间表达无明显差异性. 我们推测ERG在胃肠道的不均匀分布与胃肠道不同部位平滑肌收缩力及收缩节律差异性相关. 研究表明快速延迟性整流性钾通道参与调节平滑肌舒张和收缩功能, 主要是通过对平滑肌细胞膜钾通道的开放或抑制进行的. 当钾通道开放, 细胞钾离子外流增加, 细胞膜超极化, 一方面通过关闭电压门控钙通道, 使细胞外钙内流减少; 另一方面通过钠和钙交换及三磷酸肌醇途径使细胞内钙释放减少, 导致细胞内游离钙与钙调素结合下降, 肌球蛋白轻链激酶活性降低, 肌动与肌球蛋白相互作用产生的收缩力也减弱, 从而导致平滑肌舒张. 相反, 钾通道活性受抑制时, 则引起平滑肌细胞膜去极化, 从而导致平滑肌收缩^[15]. 胃肠道平滑肌快速延迟性整流性钾通道

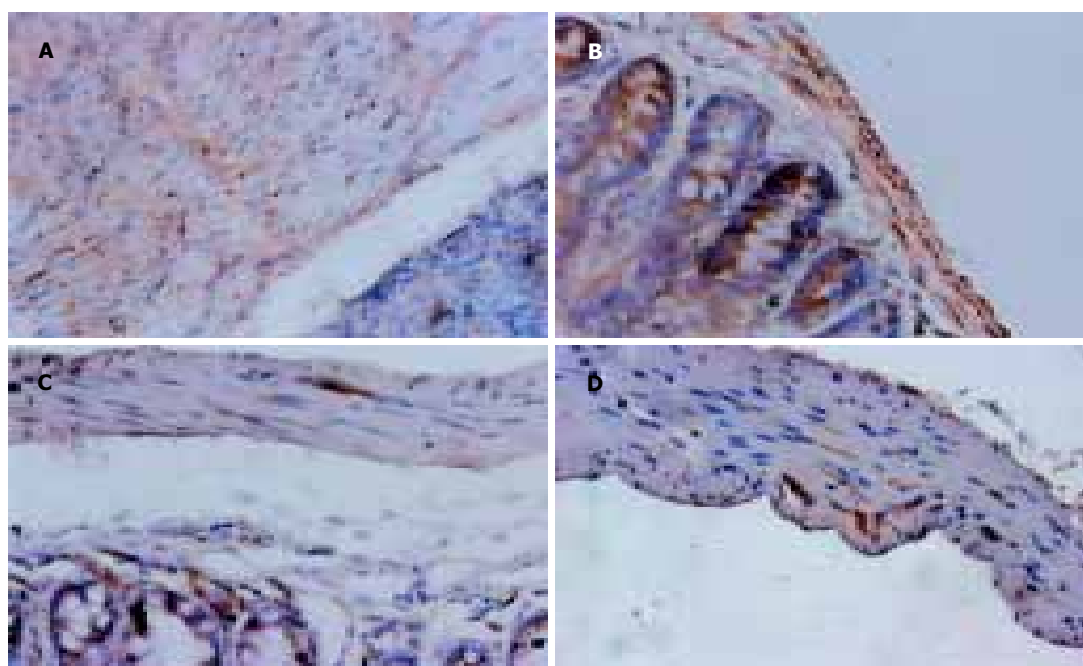


图3 免疫组化染色阳性($\times 400$). A: 胃肌层; B: 空肠肌层; C: 回肠肌层; D: 结肠肌层.

的活性受ERG表达多寡予以调控, 当ERG表达增多时, 该通道数量增多, 其活性增强^[16], 从而导致胃肠道平滑肌的收缩力减弱, 平滑肌舒张. 反之, ERG表达减弱时该通道数量减少, 活性减弱, 从而导致胃肠道平滑肌收缩力增强, 平滑肌收缩. 因此胃肠道不同部位ERG的表达多寡不同可能是导致胃肠道各段平滑肌收缩力和收缩节律不同的原因之一. 既往在研究ERG时, 研究动物多采用兔^[17], 大鼠^[9-11], 犬^[18-19], 豚鼠^[20], 而我们选用小鼠, 证明了ERG也存在于小鼠, 补充说明了ERG存在的物种多样性.

ERG的表达多寡及活性都会影响到胃肠道平滑肌的收缩和舒张功能, 我们推测先天性或后天病理情况导致的ERG在胃肠道表达和分布的异常或者ERGK⁺通道活性的改变, 都可能导致胃肠道运动的异常. 如今胃肠道动力疾病如功能性消化不良、肠易激综合征和慢性便秘等发病率日益增高, 已成为明显影响人们生活质量的常见病和多发病, 而该类疾病的发生与胃肠道平滑肌收缩力改变密切相关. 因此, 胃肠道动力疾病与ERG改变的相关性值得我们进一步研究. 另外在临床用药上, 某些药物引起胃肠道动力异常是否与ERG发生改变有关也值得我们进一步探讨.

4 参考文献

- Vandenberg JJ, Walker BD, Campbell TJ. HERG K⁺ channels: friend and foe. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:240-246
- Subbiah RN, Clarke CE, Smith DJ, Zhao J, Campbell TJ, Vandenberg JJ. Molecular basis of slow activation of the human ether-a-go-go related gene potassium channel. *J Physiol* 2004;558(Pt 2):417-431
- Shang YP, Xie XD, Wang XX, Chen JZ, Zhu JH, Tao QM, Zheng LR. A novel splice mutation of HERG in a Chinese family with long QT syndrome. *J Zhejiang Univ Sci* 2005;6:626-630
- Wolpert C, Schimpf R, Giustetto C, Antzelevitch C, Cordeiro J, Dumaine R, Brugada R, Hong K, Bauersfeld U, Gaita F, Borggrefe M. Further insights into the effect of quinidine in short QT syndrome caused by a mutation in HERG. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;16:54-58
- Viswanathan PC, Rudy Y. Cellular arrhythmogenic effects of congenital and acquired long-QT syndrome in the heterogeneous myocardium. *Circulation* 2000;101:1192-1198
- 桂乐, 杨钧国, 丁久平, 袁国会, 杜戎, 李伟, 任法鑫, 张守焰, 康彩练. QT延长综合征HERG基因新突变位点E505D的功能检测. *中华心血管病杂志* 2004;32:733-735
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000;89:2637-2645
- Eder C. Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* 1998;275(2 Pt 1):C327-342
- Schafer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR. The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *J Physiol* 1999;518(Pt 2):401-416
- Kim I, Boyle KM, Carroll JL. Postnatal development of E4031-sensitive potassium current in rat carotid chemoreceptor cells. *J Appl Physiol* 2005;98:1469-1477
- 陈文彬, 杜国清, 程德云. HERG基因在低氧性肺动脉高压大鼠肺小动脉平滑肌中的表达. *中华内科杂志* 1999;38:193
- Rosati B, Marchetti P, Crociani O, Lecchi M, Lupi R, Arcangeli A, Olivetto M, Wanke E. Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K(+) channels in firing and release. *FASEB J* 2000;14:2601-2610
- Ohya S, Horowitz B, Greenwood IA. Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C866-877
- Akbarali HI, Thatte H, He XD, Giles WR, Goyal RK. Role of HERG-like K(+) currents in opossum esophageal circular smooth muscle. *Am J Physiol* 1999;277(6 Pt 1):C1284-1290
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998;280:69-77
- Tseng GN. I (Kr): the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:835-849
- Masumiya H, Saito M, Ito M, Matsuda T, Noguchi K, Iida-Tanaka N, Tanaka H, Shigenobu K. Lack of action potential-prolonging effect of terfenadine on rabbit myocardial tissue preparations. *Biol Pharm Bull* 2004;27:131-135
- Wang J, Della Penna K, Wang H, Karczewski J, Connolly TM, Koblan KS, Bennett PB, Salata JJ. Functional and pharmacological properties of canine ERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H256-267
- Sugiyama A, Satoh Y, Takahara A, Ando K, Wang K, Honsho S, Nakamura Y, Hashimoto K. Electropharmacological effects of a spironolactone derivative, potassium canrenoate, assessed in the halothane-anesthetized canine model. *J Pharmacol Sci* 2004;96:436-443
- Choi SY, Koh YS, Jo SH. Inhibition of human ether-a-go-go-related gene K⁺ channel and IKr of guinea pig cardiomyocytes by antipsychotic drug trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:888-895

编辑 潘伯荣 审读 张海宁