

血根碱致钉螺肝脏差异表达基因的鉴定

杨 双, 彭 飞, 刘年猛, 孙 慧, 杨盛清, 袁仕善*

湖南师范大学医学院 医学检验系, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 鉴定血根碱致钉螺肝脏差异表达的基因。方法 浓度梯度法测定血根碱浸杀钉螺的半数致死浓度 (LC₅₀); 以 80% LC₅₀ 血根碱浸泡钉螺, 分离血根碱组和清水组活钉螺肝脏; 提取 mRNA, 逆转录为 cDNA, 进行抑制消减杂交; 巢式 PCR 扩增差异 cDNA, 克隆至 pMD-18T 载体, PCR 和测序鉴定, NCBI 中 blastx 比对分析表达序列标签 (expressed sequence tag, EST)。结果 血根碱浸杀钉螺 LC₅₀ 为 7.5 mg/L。获得的 EST 序列大小在 150~450 bp, 经 blastx 比对, 表达上调的基因有 α -4 (VI) 胶原链、 α -5 (VI) 胶原链、40 S 核糖体蛋白 S19、假定蛋白 (WP_009787 197.1)、kelch 样蛋白、颗粒体样蛋白; 表达下调的基因有 β -微管蛋白、 α -淀粉酶 1、大亚基核糖体蛋白 L23e、几丁质酶-1、捷蛋白-3、假定蛋白 (EKC34 262.1)、线粒体乙醛脱氢酶、肽聚糖识别蛋白、真核转录延长因子 1A、铁蛋白、去整合素金属蛋白酶、溶菌酶 1、1, 3 (4)- β -葡聚糖酶 1、血蓝蛋白 α -4D 亚基, 这些基因编码蛋白的功能涉及物质转运、蛋白合成、增殖诱导、营养、抗氧化、抗炎、呼吸、信号转导等。结论 血根碱处理导致钉螺肝脏基因表达发生改变。

关键词: 血根碱; 钉螺; 肝脏; 基因表达; 抑制消减杂交

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2958-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.017

Identification of differentially expressed genes in *Oncomelania hupensis* liver induced by sanguinarine

YANG Shuang, PENG Fei, LIU Nian-meng, SUN Hui, YANG Sheng-qing, YUAN Shi-shan

Department of Clinic Laboratory, Medical College in Hunan Normal University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To identify the differentially expressed genes in *Oncomelania hupensis* liver induced by sanguinarine. **Methods** The median lethal concentration (LC₅₀) of sanguinarine for *O. hupensis* was determined by concentration gradient method. Livers were isolated from live *O. hupensis* after being treated by 80% LC₅₀ of sanguinarine or clean water. Then the mRNA of livers was purified and used for RT-PCR. The differentially expressed genes were acquired by suppression subtractive hybridization (SSH) and amplified by nested PCR before cloned into pMD-18T vector. Positive clones were identified using PCR and DNA sequencing analyses. Then the further study was accomplished by bioinformatic analysis with blastx in NCBI. **Results** The LC₅₀ of sanguinarine for *O. hupensis* was 7.5 mg/L. The differentially expressed sequences were between 150 and 450 bp. After blastx homological analysis, the up-regulated genes were obtained as collagen α -4 (VI) chain, collagen α -5 (VI) chain, 40S ribosomal protein S19, hypothetical protein, kelch-like protein, and granulins-like protein. The down-regulated genes were obtained as β -tubulin, α -amylase 1, large subunit ribosomal protein L23e, chitinase-1, Chit3 protein, hypothetical protein, mitochondrial aldehyde dehydrogenase, peptidoglycan recognition protein, eukaryotic translation elongation factor 1A, ferritin, disintegrin, and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3, lysozyme 1, endo-1, 2 (4)- β -glucanase 1, and hemocyanin α -4D-subunit. The functions of these genes encoding proteins were related to material transportation, protein synthesis, proliferation induction, nutrition, anti-oxidation, anti-inflammation, respiration, signal transduction, and so on. **Conclusion** Sanguinarine could cause the significant changes of gene expression in *O. hupensis* liver.

Key words: sanguinarine; *Oncomelania hupensis*; liver; gene expression; suppression subtractive hybridization

血吸虫病是血吸虫尾蚴感染所致的人兽共患寄生虫病。钉螺是血吸虫唯一中间宿主, 杀灭钉螺是控制血吸虫病的有效途径。血根碱是一种苜蓿基异喹

啉类生物碱, 主要存在于博落回、血水草等多种罂粟科植物根、茎、叶或果实中, 已报道其具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种作用^[1]。Yao 等^[2]研究证明, 血

收稿日期: 2013-12-06

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (11JJ3121)

作者简介: 杨 双 (1987—), 女, 硕士在读, 研究方向为病原分子生物学。Tel: 13627486604 E-mail: shuang20924@163.com

*通信作者 袁仕善, 男, 博士, 教授, 硕士生导师。Tel: (0731)88912458 E-mail: yuanshishan@aliyun.com

根碱可杀灭指环虫和多子小瓜虫，抑制水产致病菌生长；刘铭等^[3-4]发现血根碱是血水草杀螺的有效成分，能引起钉螺肝脏蛋白质表达的变化。为进一步探讨血根碱杀螺机制，本实验利用抑制消减杂交技术分析血根碱浸泡钉螺所致钉螺肝脏基因表达的变化，以期血根碱作为植物杀螺剂的开发应用提供实验依据。

1 仪器与材料

5804 (R) 型台式冷冻离心机为德国 Eppendorf 公司产品；PCR 仪系德国 Biometra 公司产品；凝胶成像系统为美国 UVP 公司产品；电泳仪和电泳槽系北京六一仪器厂产品。pMD-18T 载体、DNA 胶纯化试剂盒购自大连宝生物工程公司；氨苄青霉素 (Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal)、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生工生物工程公司；mRNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司；抑制消减杂交试剂盒购自美国 Clontech 公司；血根碱 (经 HPLC 分析质量分数为 99.505 7%) 购自成都思科华生物技术有限公司；氯硝柳胺购自安徽亚华医药化工有限公司。钉螺采自湖南省岳阳市君山区洞庭湖草洲中，由湖南省血吸虫病防治研究所罗新松医师鉴定，亚种为湖北钉螺，系 7~8 旋的成螺，逸蚴法去除阳性螺也由罗新松医师完成。

2 方法与结果

2.1 血根碱浸杀钉螺半数致死浓度 (LC₅₀) 的测定

称取血根碱，配制成 10.0、5.0、2.5、1.25、0.625 mg/L 的血根碱溶液各 500 mL，分别倒入 1 000 mL 烧杯中，每烧杯投入 50 只钉螺，并设清水对照组和 1.0 mg/L 氯硝柳胺阳性对照组，25 °C 浸泡钉螺 48 h，水养法和敲击法鉴别钉螺存活与否，重复测定 3 次，采用加权概率单位法计算 LC₅₀。3 组重复实验显示，1.0 mg/L 氯硝柳胺阳性对照组钉螺均全部死亡，清水对照组钉螺均全部存活，血根碱组随药物质量浓度增加钉螺死亡数上升。加权概率单位法 (SPSS 13.0 软件) 计算，血根碱杀钉螺 LC₅₀ 为 7.5 mg/L，80% LC₅₀ 为 6.0 mg/L。

2.2 钉螺肝脏的分离及钉螺 mRNA 的提取

以 80% LC₅₀ 的血根碱作为给药质量浓度，设血根碱组和清水对照组，同“2.1”项方法浸泡钉螺。各组钉螺经水养法检测存活与否后，取活螺，按文献方法^[5]钉螺解剖法快速分离各组肝脏，分装于无 RNA 酶的小离心管中，低温冻存。分别取冷冻钉螺

肝脏组织 50~100 mg 置于液氮中，快速彻底研磨，按 Oligotex Direct mRNA Mini Kit (QIAGEN) 说明快速提取 mRNA，同法提取清水对照组钉螺肝脏 mRNA。1% 琼脂糖凝胶电泳快速鉴定纯化的 mRNA，结果见图 1。可知，在 100~1 000 bp 见雾状 mRNA 分布，提示经提纯获得了 mRNA。提取的 mRNA 加入 RNA 酶抑制剂，低温冻存储存。

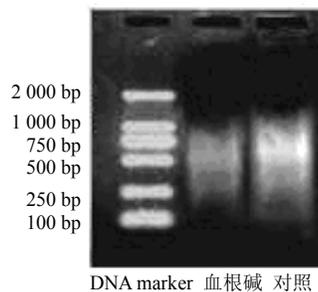


图 1 纯化 mRNA 的电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of purified mRNA

2.3 抑制消减杂交

按照 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 说明操作，分别取血根碱组和清水对照组钉螺 mRNA 作为正向抑制消减杂交试验子、驱动子和反向抑制消减杂交驱动子、试验子，反转录合成 cDNA；Rsa I 消化；正向和反向消减杂交的试验子分别连接接头 1 和接头 2；2 组试验子和过量驱动子分别于 68 °C 孵育 8 h，分别进行 2 轮杂交，富集差异表达序列，巢式 PCR 扩增，2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，结果见图 2。由图 2 可知，在 150~450 bp 处见小片段 cDNA，由此说明差异表达基因经抑制消减杂交得到有效富集。切胶回收 cDNA，胶回收纯化试剂盒纯化 cDNA。

2.4 差异表达基因的筛选和鉴定

分别将正向和反向消减杂交获得的 cDNA 克隆

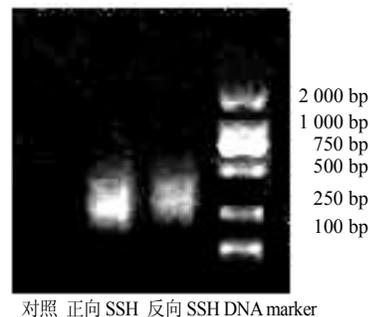


图 2 正向和反向抑制消减杂交电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram for forward and reverse SSH

至 pMD-18T 载体；转化至 JM109 感受态细胞，在含 X-gal、IPTG、Amp 的 LB-琼脂平板培养基上培养过夜，形成单菌落；利用巢式内引物进行菌落 PCR，2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆。鉴定结果

见图 3。可知，阳性克隆片段在 150~450 bp 处，与上述抑制消减杂交富集差异表达片段大小一致。将阳性克隆送至长沙铂尚生物技术有限公司测序鉴定。

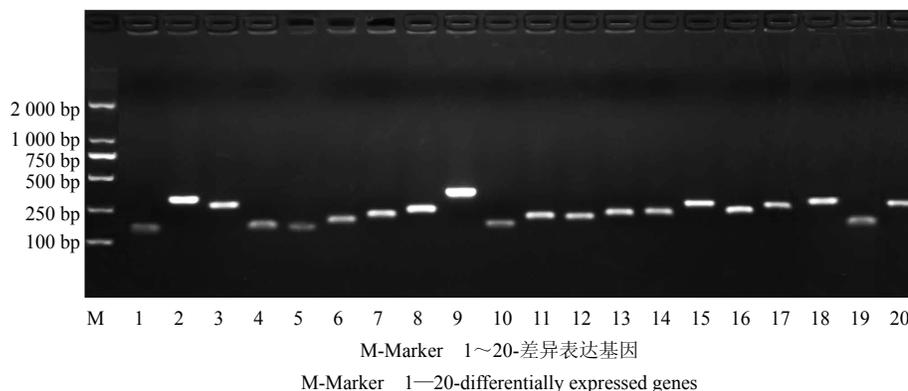


图 3 巢式 PCR 扩增的电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretogram for nested PCR

2.5 差异表达基因的分析

将测定的序列经 NCBI 的 nucleotide blast 进行两两比对，排除重复序列。参照 Alonso 等^[6]方法将 Score>65 和 E-value<1×10⁻¹⁰ 作为显著同源性判断标准 blastx 比对的依据，为提高同源性判别水平，本研究以 Score>70 和 E-value<1×10⁻¹⁰ 作为同源性判断标准，对测序结果以 NCBI 的 blastx 进行基因同源性比对，从 NCBI 的 blastx 比对结果中获得 Score 值和 E-value 值，Score 值最高者相应的蛋白即为同源性编码蛋白，并分析基因编码蛋白的功能。比对获得 20 种显著同源基因，比对结果见表 1。其中正向抑制消减杂交获得 6 个表达上调基因： α -4 (VI) 胶原链、 α -5 (VI) 胶原链、40 S 核糖体蛋白 S19、假定蛋白、kelch 样蛋白、颗粒体样蛋白；反向抑制消减杂交获得 14 个表达下调基因： β -微管蛋白、 α -淀粉酶 1、大亚基核糖体蛋白 L23e、几丁质酶-1、捷蛋白-3、假定蛋白、线粒体乙醛脱氢酶、肽聚糖识别蛋白、真核转录延长因子 1A、铁蛋白、去整合素金属蛋白酶、溶菌酶 1、1, 3 (4)- β -葡聚糖酶 1、血蓝蛋白 α -4D 亚基。

3 讨论

血根碱作为一种植物源性杀螺剂具有杀灭钉螺而对鱼类毒性小的特点，研究表明血根碱具有较强的体外抑菌能力，能清除多种产毒细菌的生物被膜^[7]，血根碱作为杀螺剂在一定程度上有益于鱼类的生长繁殖。血根碱的杀螺机制仍在研究中，孙文霞等^[8]和彭玲等^[9]观察了血根碱对钉螺肝脏糖原、

重要酶活性的影响，发现血根碱可引起钉螺肝脏糖原的量明显降低，丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、酸性磷酸酶 (ACP)、碱性磷酸酶 (AKP)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 活性均升高。刘铭等^[4]鉴定出血根碱诱导钉螺 2 个差异表达下调的蛋白质和 9 个差异表达上调的蛋白质。由此表明，血根碱可使钉螺蛋白质表达及酶的活性发生改变。

本研究利用抑制消减杂交探索血根碱引起钉螺肝脏基因差异表达的上调和下调，经 blastx 比对获得 6 个表达上调和 14 个表达下调的基因。在获得的上调基因编码蛋白中， α -4 (VI) 胶原具有对抗细胞凋亡的作用，有报道表明如缺乏该胶原链可引起物质在细胞内外的双向自由转运^[10]；核糖体蛋白是细胞内蛋白质合成的关键蛋白，并可辅助修复 DNA 损伤，有研究认为 40 S 核糖体蛋白 S19 是一种潜在的抗炎药物，可阻断移行抑制因子信号 (MIF)^[11]；kelch 样蛋白可调节下游编码去毒功能蛋白和抗氧化功能蛋白的表达，Heiss 等^[12]研究表明，kelch 样蛋白还能调节转录因子 Nrf2 通过完整磷酸戊糖途径发挥抗氧化损伤作用；颗粒样蛋白是一组高度保守生长因子，克隆到金鱼的重组颗粒样蛋白分子具有诱导 Aa23 胚胎细胞和初期血细胞增殖的功能^[13]。综上所述，表达上调的蛋白功能多以抗细胞死亡促进细胞生长为主，可能为钉螺肝脏在损伤因素刺激下代偿性表达升高的保护机制。

表 1 钉螺肝脏差异表达基因的 blastx 同源性比对

Table 1 Homology comparison on blastx of differentially expressed genes in liver of *O. hupensis*

登录号	同源性基因	Score 值	E-value	基因表达变化
EKC40 282.1	α -4 (VI) 胶原链	94.7	8×10^{-20}	上调
EKC40 283.1	α -5 (VI) 胶原链	72.0	2×10^{-12}	上调
XP_005093 544.1	40 S 核糖体蛋白 S19	113.0	1×10^{-29}	上调
WP_009787 197.1	假定蛋白	96.3	2×10^{-21}	上调
XP_005092 148.1	kelch 样蛋白	99.8	8×10^{-23}	上调
ADX33 287.1	颗粒体样蛋白	96.3	5×10^{-22}	上调
AAR39 410.1	β -微管蛋白	89.7	3×10^{-20}	下调
ABO26 610.1	α -淀粉酶 1	88.2	1×10^{-18}	下调
EKX41 335.1	大亚基核糖体蛋白 L23e	88.2	6×10^{-20}	下调
EKC38 802.1	几丁质酶-1	97.1	4×10^{-21}	下调
CAI96 027.1	捷蛋白-3	85.1	4×10^{-18}	下调
EKC34 262.1	假定蛋白	148.0	2×10^{-37}	下调
AGV54 428.1	线粒体乙醛脱氢酶	103.0	5×10^{-24}	下调
AET43 945.1	肽聚糖识别蛋白	79.7	2×10^{-16}	下调
DAA05 870.1	真核转录延长因子 1A	83.6	8×10^{-17}	下调
ADC80 508.1	铁蛋白	123.0	1×10^{-33}	下调
EKC21 467.1	去整合素金属蛋白酶	100.0	5×10^{-22}	下调
EKC19 239.1	溶菌酶 1	90.1	1×10^{-18}	下调
EKC37 342.1	1, 3 (4)- β -葡聚糖酶 1	105.0	5×10^{-24}	下调
AEP51 767.1	血蓝蛋白 α -4D 亚基	151.0	2×10^{-39}	下调

β -微管蛋白是表达下调的基因编码蛋白之一,具有保持细胞形态、维持运动、协助胞内物质运输的功能,研究表明进入细胞的血根碱能通过结合微管蛋白而扰乱其组装使其量下降。淀粉酶和几丁质酶是一种重要的营养酶类; β -葡聚糖酶也被认为可能是一种营养酶, Owusu-Asiedu 等^[14]以能量缺乏食物喂养保育猪时发现含 β -葡聚糖酶的产品能促使幼猪摄取更多的营养和能量。铁蛋白不仅是一种贮铁载体,有研究认为铁蛋白能诱导氧化反应在其围成的腔内进行,这个过程将消耗毒性自由基而发挥抗氧化活性^[15];线粒体乙醛脱氢酶表达的减低可能作为氧化应激和炎症损伤的一种指标, Wang 等^[16]在研究线粒体乙醛脱氢酶活性变化与糖尿病大鼠氧化应激和炎症损伤之间的关联时发现随着糖尿病的进展大鼠心脏线粒体乙醛脱氢酶活性显著下降,可能与氧化应激、炎症损伤和细胞凋亡的增加相关;肽聚糖识别蛋白是宿主自然免疫中抗感染的重要成分,血蓝蛋白是一种含铜呼吸蛋白,具有输氧功能,去整合素金属蛋白酶参与蛋白水解、细胞信号转导、生物因

子释放等过程,其表达降低引起机体生理功能紊乱细胞坏死。综上,这些差异表达基因编码蛋白的功能涉及物质转运、蛋白合成、增殖诱导、营养、抗氧化、抗炎、呼吸、信号转导等方面,由此提示,血根碱作用于钉螺,引起钉螺肝脏上述多种营养酶及功能蛋白表达下降,从而加速细胞感染、溶解、死亡,尽管有部分保护性蛋白代偿性表达上调,但仍不能抵消肝受损直接导致的活性蛋白表达降低,这可能是血根碱致钉螺死亡的主要机制之一。假定蛋白是经基因测序后由信息系统预测出来的、尚未标注功能的一类蛋白质序列。此外,血根碱作用于钉螺后,在上调与下调基因编码蛋白中各存在一种假定蛋白,两者序列不同,具体的功能也尚未阐明。

本研究以抑制消减杂交获得钉螺经血根碱浸泡后其肝脏基因表达上调及下调的同源序列并分析了同源性蛋白功能,为进一步阐明血根碱杀灭钉螺的机制奠定了基础。

志谢: 本实验研究得到湖南省“十二五”重点学科“基础医学”的经费资助。

参考文献

- [1] 杨舒, 刘岩, 杨千帆, 等. 博落回抗肿瘤作用及诱导人体端粒DNA形成G-四链体分子机制研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 738-742.
- [2] Yao J Y, Shen J Y, Li X L, *et al.* Effect of sanguinarine from the leaves of *Macleaya cordata* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. *Parasitol Res*, 2010, 107(5): 1035-1042.
- [3] 刘铭, 彭飞, 刘年猛, 等. 血水草血根碱杀灭钉螺作用的研究 [J]. 实用预防医学, 2009, 16(3): 658-660.
- [4] 刘铭, 彭玲, 刘建军, 等. 血水草血根碱致钉螺肝脏差异表达蛋白质的鉴定 [J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(6): 490-494.
- [5] 李赋京. 钉螺解剖与比较解剖 [M]. 武汉: 湖北人民出版社, 1956.
- [6] Alonso P, Cortizo M, Cantón F R, *et al.* Identification of genes differentially expressed during adventitious shoot induction in *Pinus pinea* cotyledons by subtractive hybridization and quantitative PCR [J]. *Tree Physiol*, 2007, 27(12): 1721-1730.
- [7] 王静慧, 韩剑众, 曲道峰. 血根碱体外抑菌作用及其对细菌生物被膜的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(19): 67-70.
- [8] 孙文霞, 袁仕善, 黄琼瑶, 等. 血水草血根碱对钉螺肝脏损伤的研究 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(1): 82-84.
- [9] 彭玲, 黄琼瑶, 刘建军, 等. 血水草生物碱致钉螺肝脏蛋白质差异表达分析 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 431-435.
- [10] Poduval P, Sillat T, Beklen A, *et al.* Type IV collagen alpha-chain composition in synovial lining from trauma patients and patients with rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(12): 3959-3967.
- [11] Lv J, Huang X R, Klug J, *et al.* Ribosomal protein S19 is a novel therapeutic agent in inflammatory kidney disease [J]. *Clin Sci*, 2013, 124(10): 627-637.
- [12] Heiss E H, Schachner D, Zimmermann K, *et al.* Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression [J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 359-365.
- [13] Hanington P C, Brennan L J, Belosevic M, *et al.* Molecular and functional characterization of granulin-like molecules of insects [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38(5): 596-603.
- [14] Owusu-Asiedu A, Kiarie E, Péron A, *et al.* Growth performance and nutrient digestibilities in nursery pigs receiving varying doses of xylanase and β -glucanase blend in pelleted wheat-and barley-based diets [J]. *J Anim Sci*, 2012, 90(4): 92-94.
- [15] Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(7): 589-599.
- [16] Wang H J, Kang P F, Wu W J, *et al.* Changes in cardiac mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 activity in relation to oxidative stress and inflammatory injury in diabetic rats [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8(2): 686-690.