

大鼠胃粘膜 EGF 受体基因表达的原位杂交定位*

赵培林** 庄惠歆^① 李肇特

(北京医科大学组织胚胎学教研室, ①细胞生物学教研室, 北京 100083)

关键词 胃粘膜、EGF 受体基因定位、原位杂交、大鼠

表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)与胃粘膜的关系十分密切^[1], 对胃粘膜主要的生物效应是刺激细胞增殖和抑制胃酸分泌^[2]. 已从分离的胃腺检测到 EGF 受体的存在^[3], 揭示 EGF 可能通过结合胃粘膜腺细胞上的 EGF 受体而发挥其生物效应. 本文首次用核酸杂交组织化学放射自显影法在胃粘膜原位证实了 EGF 受体基因的表达. 活性表达主要在胃腺颈部细胞, 并可见壁细胞内呈现 EGF 受体基因表达活性. 研究结果表明, 胃粘膜腺细胞具有合体 EGF 受体的功能. 本实验为 EGF 对胃粘膜的效应提供了可靠而直接的证据.

1 材料和方法

1.1 标本制备

雄性 Wistar 大鼠 5 只, 体重 200 g. 禁食 24 h 后, 用 3% 戊巴比妥钠, 以 1 ml/kg 体重的剂量经腹腔注射麻醉. 然后剖开胸腔, 经左心室向升主动脉插管, 先灌注 100 ml 37°C 生理盐水, 再灌入 4°C 含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 300 ml. 灌注固定后取胃, 铺平于软木托上, 置入同样的固定液中固定 20 h. 再移入 4°C 20% 蔗糖溶液(用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制, pH 7.4)内, 待将固定液置换完全(48 h)后浸入正己烷(-60°C)中骤冷. 恒冷箱冰冻切片, 片厚 15 μ m, 间隔 45 μ m 保留 3 片, 裱贴在预先经铬矾明胶处理的载玻片上, 冷风吹干, 置 -70°C 冰箱中备用.

1.2 原位杂交组织化学方法^[4-6]

(1) 杂交前处理: 从 -70°C 冰箱中取出切片, 冷风吹干; 经 1 μ g/ml 的蛋白酶 K(用 50 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液配制, pH 8.0)孵育 20 min; 以 PBS 缓冲液洗 2 次, 每次 3 min; 用 0.25% 醋酸酐, 0.1 mol/L 三乙醇胺(pH 7.8)室温孵育 10 min; 三蒸水彻底冲洗; 37—42°C 干燥.

(2) 杂交: 滴加杂交液, 覆加盖玻片, 在湿盒中 30°C 孵育 20 h. 杂交液的组成为: 50% 甲酰胺, 6 $\times$ SSC, 1 $\times$ denhardt 溶液, 10% 硫酸葡聚糖, 0.25 μ g/ml 酵母 tRNA, 0.5 μ g/ml 鱼精 DNA, 10 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 5 $\times$ 10⁶ cpm/片 ³²P-EGF 受体 cDNA 探针.

1993-04-20 收稿, 1993-09-02 收修改稿.

* 国家自然科学基金资助项目.

** 现在上海医科大学组织胚胎学教研室(上海 200032).

(3) 杂交后处理: 先用 $2\times\text{SSC}$ 漂去盖玻片, 再以 $2\times\text{SSC}+50\%$ 甲酰胺 50°C 振荡洗 5min; $2\times\text{SSC}$ 37°C 振荡洗 20min; $1\times\text{SSC}$ 37°C 振荡洗 30min; $0.5\times\text{SSC}$ 37°C 振荡洗 30min; 梯度酒精脱水 (70%, 90%, 100% $\times 2$, 内均含 0.3ml/L 乙酸胺), 室温各 10min, 冷风吹干。

1.3 方法对照

(1) 用 $25\mu\text{g/ml}$ RNA 酶 (以 0.5mol/L NaCl, 10mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA 配制, pH 8.0) 预处理切片 30min, 使组织中的 mRNA 预先被 RNA 酶水解, 然后再进行杂交。

(2) 无探针杂交: 用不含 ^{32}P -EGF 受体 cDNA 探针的杂交液孵育切片, 其它步骤同实验片。

1.4 放射自显影

在暗室内安全红灯下, 将杂交后的切片经水化后置乳胶涂布箱内。箱内温度为 25°C , 乳胶融化水浴温度为 40°C , 相对湿度 $>90\%$, 晾干箱温度为 $4-6^\circ\text{C}$ 。待温度稳定后, 在 1:1(V/V) 双蒸水稀释的核乳胶 (NTB₂, 为 Kodak 公司产品) 中按浸膜法涂布乳胶, 于晾干箱中干燥 4h, 最后放在黑色小载片盒内, 双层黑纸包裹, 加干燥剂, 用塑料袋封装, 4°C 冰箱中曝光。

1.5 曝光、显影、定影及染色

以试验曝光法确定最佳曝光时间为 10 天。曝光结束后, 在暗室内用 Kodak D-19b 显影液显影, 19°C 3min; Kodak F-5 定影液定影 10min, 流水洗 20min。经 4% 甲醛后固定 20min, HE 染色, 常规脱水和透明, 树胶封片。

2 实验结果

EGF 受体原位杂交组织化学放射自显影方法显示, 基因表达的阳性部位呈较密的黑色银粒。银粒主要分布在胃腺颈部细胞, 可辨出壁细胞内有银粒定位。银粒位于细胞质内, 细胞核附近的部位较多, 有些细胞核内也见有少数银粒。不同细胞内其银粒的数量和密度不同 (图 1, 2)。

方法对照结果: 用不含 ^{32}P 标记的 EGF 受体 cRNA 探针的杂交液进行孵育的切片和杂交前经 RNA 酶预处理的切片, 无银粒标记。这表明本实验的杂交自显影像是由于 ^{32}P -EGF 受

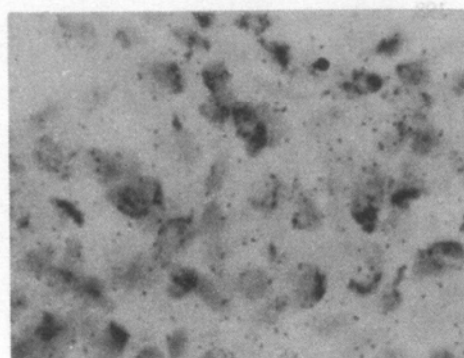


图1 应用 ^{32}P -EGF 受体 cDNA 探针进行原位杂交, 结果显示, 胃粘膜有较强的 EGF 受体基因表达活性, 银粒主要标记在胃腺颈部细胞, 不同细胞内银粒的数量和密度不同 (原位杂交组织化学放射自显影法, HE 染色, $\times 280$)

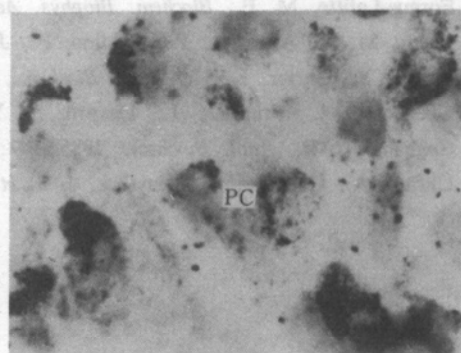


图2 原位杂交阳性细胞, 银粒标记在细胞质内, 核附近的部位较多, 可见壁细胞 (PC) 内有银粒标记 (原位杂交组织化学放射自显影法, HE 染色, $\times 700$)

体 cDNA 探针特异地与 EGF 受体 mRNA 杂交的结果。

3 讨 论

原位杂交组织化学是利用核酸碱基互补的原理,在组织和细胞切片上对 mRNA 进行原位定性、定位、定量分析的方法^[7],也是目前组织化学技术中最先进的一种方法。在组织和细胞中,基因的存在与表达体现为 mRNA 的转录,转录出的 mRNA 直接参与蛋白质的翻译与合成。故可以用 DNA-RNA 或 RNA-RNA 杂交的方法,检测细胞内 mRNA 的含量,以推测基因在转录水平上的活动,借以反映特定蛋白质的合成状态。

本实验应用原位杂交法研究 EGF 受体基因的表达,是形态与功能结合的研究方法,较其它方法特异性更强,准确性更高。1984 年, Ullrich 等^[8]首次报道了人 EGF 受体的 cDNA 序列,并观察了 EGF 受体基因在 A431 细胞内的异常表达。晚近 Guellec 等^[6]报道了 EGF 受体 mRNA 在人乳腺癌细胞系 (BT20) 的表达。但目前尚未见到原位杂交法研究胃粘膜 EGF 受体的报道。本实验应用 EGF 受体 cDNA 探针,在大鼠胃粘膜组织切片上进行了原位杂交组织化学观察,方法对照呈阴性,说明本实验结果是特异的。实验结果显示,胃粘膜有较强的 EGF 受体基因表达活性。银粒标记主要在胃腺颈部细胞,壁细胞胞质内也有银粒标记。这证明了这些细胞具有合成 EGF 受体的功能,也表明胃粘膜是 EGF 作用的靶组织,并且 EGF 可能通过胃粘膜腺细胞的 EGF 受体这一途径,直接作用于胃粘膜。本研究表明,胃腺颈部细胞 EGF 受体基因表达活性强,而此处恰是胃粘膜上皮细胞增殖的部位,因此这为 EGF 促进胃粘膜生长和更新提供了有力的证据。作者关于 EGF 受体免疫组织化学研究(待发表)也显示与此一致的结果。EGF 受体基因在壁细胞内的表达,也为 EGF 具有抑制胃酸分泌作用提供了直接的证据。

参 考 文 献

- [1] 赵培林、李肇特, 国外医学内分泌分册, 1991, 11(4): 194—197.
- [2] Konturek, S. J., *Gastroenterol. Clin. Nor. Am.*, 1990, 19(1): 41—65.
- [3] Forgue-Lafitte, M. E., *Biochem. Biophys. Acta*, 1984, 798: 192—198.
- [4] Lewis, M. E., Arentzen, R., Baldino, F., *J. Neurosci. Res.*, 1986, 16: 117—124.
- [5] Taneja, K., Singer, K. H., *Anal. Biochem.*, 1987, 166: 389—398.
- [6] Guellec, D. L., Frappart, L., Desprez, P. Y., *J. Histochem. Cytochem.*, 1991, 39(1): 1—6.
- [7] Coghland, J. P., *Anal. Biochem.*, 1985, 149: 1—28.
- [8] Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S. et al., *Nature*, 1984, 309: 418—425.