

西藏小型猪 *IGF-1* 基因在不同生长发育阶段和不同组织器官中的差异表达

田雨光, 王玉珏, 庞炜, 岳敏*

(南方医科大学实验动物中心暨比较医学研究所, 广州 510515)

【摘要】 目的 测定西藏小型猪的 *IGF-1* 基因在不同年龄阶段、不同组织中的表达分布情况, 为未来的研究提供基础数据。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 技术, 以 GAPDH 基因为内参照, 检测了 *IGF-1* 基因在西藏小型猪不同组织和不同生长阶段间的表达变化。**结果** (1) *IGF-1* 基因表达的时序性研究表明在 0、0.25、0.5、1、2 岁时肌肉组织的表达量最低, 在 0、0.25、0.5 岁时皮肤组织中表达量最高, 在 0.1、2、3 岁时肝组织的表达量最高。(2) *IGF-1* 基因在 7 个不同组织中均有表达, 0.25 岁时其在表达丰度由高到低依次为: 皮肤、肺、肝、肾、脾、心脏和肌肉。且在皮肤中的表达量最高且极显著高于其他各组织 ($P < 0.01$)。同时在不同年龄阶段的表达中, *IGF-1* 基因 0.25 岁时在各组织中的表达均达到峰值。**结论** 西藏小型猪的 *IGF-1* 基因的表达呈现出明显的时空特异性。

【关键词】 *IGF-1* 基因; 西藏小型猪; 实时荧光定量 PCR

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0628-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.014

Differential *IGF-1* gene expression in various tissues at different developmental stages in Tibet minipigs

TIAN Yu-guang, WANG Yu-jue, PANG Wei, YUE Min*

(Center of Laboratory Animal and Institute of Comparative Medicine of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To determine the expression and distribution of *IGF-1* gene in different tissues of Tibet minipigs at different ages. **Methods** The changes of *IGF-1* gene expression in different tissues and different growth stages of Tibet minipigs were detected by quantitative real-time fluorescence PCR technology and GAPDH gene was used as the reference. **Results** (1) The study of sequential expression of *IGF-1* gene showed that the lowest expression of *IGF-1* gene in muscle tissue was at 0, 0.25, 0.5, 1, and 2 years of age, whereas the highest expression of *IGF-1* gene in skin tissue was at 0, 0.25, 0.5 years of age and the highest expression of *IGF-1* gene in liver tissue was at 0.1, 2, 3 years of age. (2) *IGF-1* gene was expressed in all the 7 examined tissues, and its expression level was in the following decreasing order: skin, lung, liver, kidney, spleen, heart and muscle at 0.25 years of age. The expression of *IGF-1* gene in the skin was significantly higher than in other organ tissues ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of *IGF-1* gene of Tibet minipigs showed obvious temporal and spatial specificity.

【Key words】 *IGF-1* gene; Tibet minipigs; Quantitative real-time PCR

Corresponding author: Yue Min. E-mail: 343779791@qq.com

胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, *IGF-1*) 又名生长介素, 是一种多肽生长因子, 在神经系统成熟和正常生长发育过程中发挥重要作用

用^[1]。其多效性包括抑制凋亡, 维持神经元生长, 调节脑屏障通透性及神经元兴奋性, 促进细胞分化, 促神经生成, 参与脑血管发生等^[2]。*IGF-1* 是一种

[基金项目] 2015 科研助手项目 (C1032246); 广东省医学科研基金 (编号: A2016255); 广东省科技计划项目 (编号 2016A030303008)。

[作者简介] 田雨光 (1987 -), 男, 实验师, 研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 471977663@qq.com

[通讯作者] 岳敏 (1982 -), 女, 实验师。研究方向: 比较医学和人类疾病动物模型。E-mail: 343779791@qq.com

单链碱性多肽分子,它是由 70 个氨基酸组成,分子量是 7649。*IGF-1* 可以由体内多种细胞分泌,常常通过旁分泌、自分泌和内分泌等多种机制发挥作用,并且可与 *IGF-1* 受体 (*IGF-1R*) 结合^[3]。2008 年窦全林等^[4]建立了快速检测 *IGF-1* 基因表达量的方法,该方法采用实时荧光定量 PCR SYBR Green I 荧光染料法,选取藏系绵羊皮肤细胞中 *IGF-1* 基因作为研究对象,对其基因表达水平进行了相对定量分析。通过该方法检测出了 *IGF-1* 基因在藏系绵羊皮肤细胞中的相对表达量。2011 年呼正祥等^[5]为了探讨 *IGF-I* 基因对于雄性动物睾丸组织发育的影响,采用 real-time RT-PCR 方法研究了 *IGF-I* 基因在军牧 1 号白猪不同发育阶段睾丸组织的表达规律。研究结果显示在不同发育阶段的睾丸组织中 *IGF-I* 均可表达,但是不同发育时期 *IGF-1* 的表达量有显著差异,6 月龄时(性成熟阶段)表达量最高。2012 年,刘海英等^[6]采用实时荧光定量 PCR 技术对产绒期辽宁绒山羊和非产绒期皮肤中 *IGF-1* 基因的表达进行了测定。结果发现在辽宁绒山羊皮肤中 *IGF-1* mRNA 的表达量在产绒期均明显高于非产绒期。2013 年,常明雪等^[7]采用实时荧光定量 PCR 法检测 *IGF-1* 基因的发育性变化,并进行品种间比较。结果发现 0~56 日龄期间,金定鸭和高邮鸭肝脏 *IGF-1* 基因表达量均呈先升后降的趋势,56 日龄时高邮鸭肝脏 *IGF-1* 基因表达量极显著高于金定鸭、高邮鸭和金定鸭肝脏。

实时荧光定量 PCR 是在普通 PCR 定性技术基础上发展起来的核酸定量技术。它可以利用荧光信号的变化实时检测 PCR 扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化,通过 *Ct* 值和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析^[8]。本实验是通过实时的荧光定量 PCR 技术,对西藏小型猪 0 岁(1 日龄)、0.1 岁(36 日龄)、0.25 岁(90 日龄)、0.5 岁(180 日龄)、1 岁(360 日龄)、2 岁(720 日龄)、3 岁(1080 日龄)不同组织的 *IGF-1* 基因进行表达测定分析,从而明确 *IGF-1* 基因在西藏小型猪随着年龄增长在不同部位的表达趋势。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 0 岁(1 日龄)、0.1 岁(36 日龄)、0.25 岁(90 日龄)、0.5 岁(180 日龄)、1 岁(360 日龄)、2 岁

(720 日龄)、3 岁(1080 日龄)的西藏小型猪各 3 只,均购于南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0015】。常规屠宰后,立即取其心脏、肝、脾、肺、肾、肌肉、皮肤组织,立即放入去除 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中,迅速投入液氮中备用。组织取自南方医科大学实验动物中心西藏小型猪【SYXK(粤)2011-0074】。

1.1.2 主要试剂和仪器

PrimeScript RT-PCR Kit、SYBR Premix Dimer-Eraser (Perfect Real Time) 购自 Takara 公司。无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇,购自广东省化学试剂工程技术研究开发中心。引物由 Invitrogen 广州分公司合成。DEPC 处理水:1000 mL ddH₂O 中加入 0.1 mL DEPC,于 37℃ 过夜温育后高压灭菌。TRIZOL reagent,购自 Invitrogen 公司。水平电泳仪(美国伯乐),凝胶成像系统(杭州朗基科学仪器有限公司),高温烤箱(上海一恒科学仪器有限公司),荧光定量 PCR 仪(美国伯乐),紫外分光光度计(美国热电),恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及质量测定

采用酚-氯仿一步法提取提取各组织中的 RNA,紫外分光光度计测定浓度。

1.2.2 反转录

使用 Takara SYBR Premix DimerEraser (Perfect Real Time) 试剂盒进行 RT-PCR 反应。反应体系为 20 μL:包括 5 × PrimeScript Buffer 4 μL, PrimeScript RT Enzyme Mix1 1 μL, Oligo Dt Primer(50 μmol/L) 1 μL, Random 6 mers(100 μmol/L) 1 μL, Total RNA 1 μg,加 RNase Free H₂O 到 20 μL。反应液配制在冰上进行。反转录反应条件为:37℃ 15 min(反转录反应),85℃ 5 s(反转录酶的失活反应)。

1.2.3 引物设计及 PCR 扩增条件

根据 GenBank 上猪的 *IGF-1* 基因(NM_214256.1)、*GAPDH* 基因(AF017079)设计引物,以样品的 cDNA 第一链为模版,扩增 *IGF-1* 基因(F: 5'-AAGGCTCAGAAGGAAGTA-3'; R: 5'-CACTGGCAT-GTCATTCTT-3'),以 *GAPDH* (F: 5'-TTGGCTACAG-CAACAGGG-3'; R: 5'-CTGGGATGGAACTGGAAGT-3')作为内参。于冰上避光加样操作,混匀,瞬时离心进行 PCR 扩增。荧光定量 PCR 反应步骤见表 1。

表 1 西藏小型猪 *IGF-1* 基因荧光定量 PCR 反应步骤

Tab. 1 The real-time PCR reaction program of Tibet mini-pigs *IGF-1* gene

反应步骤 Cycling Steps	温度/℃ Temperature	时间/ s Time	循环次数 Cycles
激活 Enzyme activation	95	30	1
变性 Denaturation	95	1 ~ 5	30 ~ 40
退火/延伸 Annealing/extension	55 ~ 60	1 ~ 5	
溶解 Melt curve	65 ~ 95 (in 0.5 inc.)	2 ~ 5 sec/step	1

1.3 荧光定量数据处理及统计学分析

分别在不同的时间点选择样本,每个样本 3 个复孔。利用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行重复测量数据的方差分析。

2 结果

2.1 组织样品中总 RNA 的提取

采用琼脂糖凝胶电泳分析鉴定所取各样本,图 1 结果显示 18S 和 28S 条带清晰,可见 RNA 具有较好的完整性。

2.2 西藏小型猪 *IGF-1* 基因的实时荧光定量 PCR 检测分析

IGF-1 和 *GAPDH* 基因的扩增曲线及融解曲线如图 2。扩增曲线标准,基线期、对数期和平台期三阶段分期明显,融解曲线均在一条直线上,图形为平滑的单峰

曲线,且 T_m 温度附近无杂峰,表明引物特异性较好。

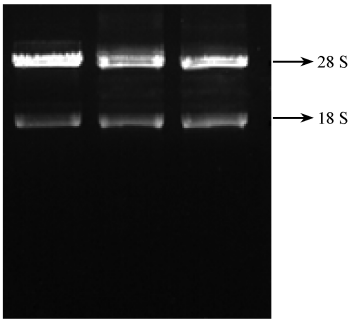


图 1 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram showing the detection of total RNA

2.3 *IGF-1* 基因在不同脏器及不同年龄阶段的组织表达分析

以 *GAPDH* 为内参,根据组织内基因扩增的域值

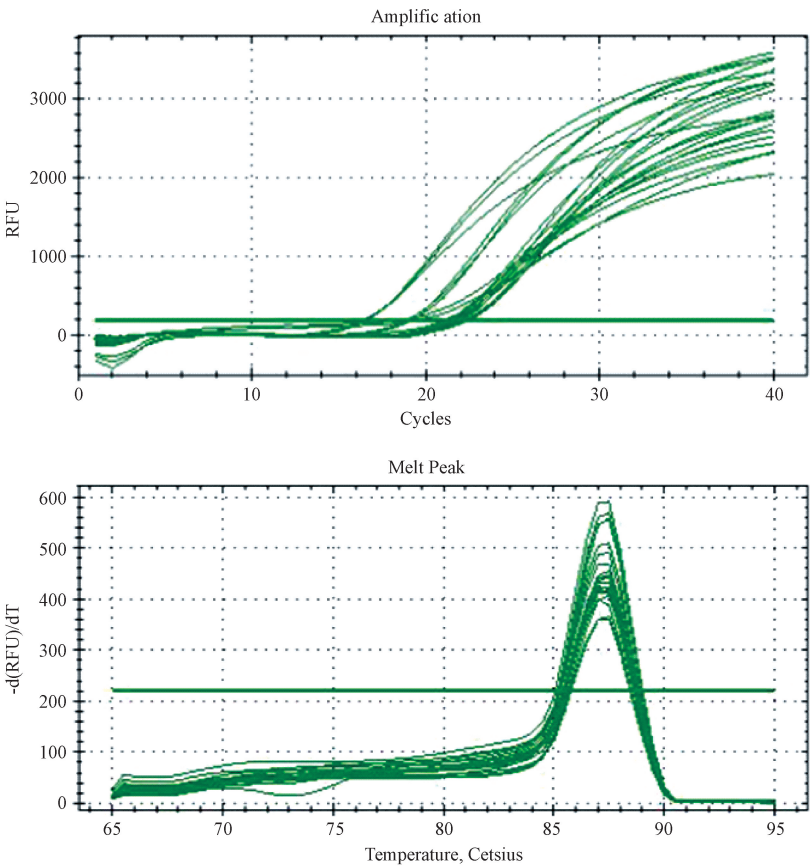


图 2 西藏小型猪 *IGF-1* 基因片段实时定量扩增曲线和融解曲线

Fig. 2 Amplification plots and dissociation curves of Tibet mini-pig *IGF-1* gene

循环数(Ct 值), 计算三种基因的 mRNA 相对表达水平。从表 2 中可以看出, 在不同脏器的表达中, *IGF-1* 基因在 0、0.25、0.5、1、2 岁时肌肉组织的表达量最低, 在 0、0.25、0.5 岁时皮肤组织中表达量最高, 在 0.1、2、3 岁时肝脏组织的表达量最高。从表 3 中可以

看出, 在不同年龄阶段的表达中, *IGF-1* 基因在 0.25 岁时达到峰值。所以西藏小型猪的生长相关基因的表达呈现出明显的时空特异性。经统计学分析发现西藏小型猪 *IGF-1* 基因在不同脏器中的表达差异有显著性($P < 0.05$), 在不同年龄阶段差异均有显著性($P < 0.05$)。

表 2 西藏小型猪胰岛素样生长因子-1 在不同脏器中的 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Relative expression of *IGF-1* mRNA in different organs of the Tibet mini-pigs

脏器 Organs	年龄(岁) Age (years)						
	0	0.1	0.25	0.5	1	2	3
心脏 Heart	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
肝 Liver	1.51 ± 0.37	17.26 ± 2.19	6.68 ± 2.49	10.94 ± 1.24	2.44 ± 0.33	41.50 ± 10.00	30.13 ± 6.53
脾 Spleen	1.42 ± 0.38	0.41 ± 0.14	5.38 ± 0.76	1.93 ± 0.30	0.74 ± 0.20	2.41 ± 0.15	4.15 ± 0.65
肺 Lung	0.82 ± 0.05	0.36 ± 0.17	26.44 ± 3.45	12.71 ± 1.79	6.10 ± 0.99	4.38 ± 0.64	9.01 ± 5.45
肾 Kidney	1.40 ± 0.39	0.18 ± 0.05	5.48 ± 0.71	1.02 ± 0.17	0.79 ± 0.32	2.45 ± 0.53	1.67 ± 0.24
肌肉 Muscle	0.21 ± 0.13	0.57 ± 0.25	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.10	0.13 ± 0.11	0.17 ± 0.07	5.44 ± 1.22
皮肤 Skin	3.99 ± 0.95	0.95 ± 0.27	76.63 ± 3.99	24.43 ± 7.71	2.38 ± 0.29	19.43 ± 3.35	0.41 ± 0.38

表 3 西藏小型猪胰岛素样生长因子-1 在不同年龄阶段中的 mRNA 相对表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Relative expression of *IGF-1* mRNA in various organ tissues of the Tibet mini-pigs in different ages

脏器 Organs	年龄(岁) Age (years)						
	0	0.1	0.25	0.5	1	2	3
心脏 Heart	1.00 ± 0.00	8.82 ± 0.42	93.62 ± 3.91	1.92 ± 0.62	1.38 ± 0.33	1.58 ± 0.11	0.26 ± 0.09
肝 Liver	1.00 ± 0.00	153.82 ± 12.65	1239.35 ± 61.96	27.23 ± 2.00	4.09 ± 0.38	13.30 ± 0.90	7.65 ± 0.72
脾 Spleen	1.00 ± 0.00	3.39 ± 0.06	236.68 ± 24.15	2.44 ± 0.41	0.73 ± 0.19	0.74 ± 0.13	0.81 ± 0.10
肺 Lung	1.00 ± 0.00	4.42 ± 0.86	1294.42 ± 222.69	28.50 ± 1.18	15.13 ± 1.40	2.97 ± 0.09	3.59 ± 0.40
肾 Kidney	1.00 ± 0.00	3.73 ± 0.79	2578.03 ± 209.91	2.63 ± 0.65	1.75 ± 0.55	2.74 ± 0.28	0.24 ± 0.09
肌肉 Muscle	1.00 ± 0.00	18.36 ± 0.85	121.20 ± 6.00	2.04 ± 0.12	1.22 ± 0.49	0.37 ± 0.06	0.32 ± 0.02
皮肤 Skin	1.00 ± 0.00	2.27 ± 0.16	1220.25 ± 59.39	11.50 ± 1.39	0.91 ± 0.15	0.37 ± 0.08	0.69 ± 0.11

3 讨论

本研究通过实时荧光定量 PCR 测定了西藏小型猪的 *IGF-1* 基因在不同年龄阶段不同组织中的表达分布情况。*IGF-1* 基因在动物体内的表达受到了各种因素的影响, 包括生长发育的阶段, 体内多种激素的调控等。邓景致在 2012 年利用了实时荧光定量的方法, 对 6 月龄版纳猪的 *IGF-1* 基因在肝组织、肌肉组织中的表达情况进行了研究, 发现 *IGF-1* 基因在肝组织中的表达要高于肌肉组织中的表达。我们的研究发现: (1) *IGF-1* 基因表达的时序性在 0、0.25、0.5、1、2 岁时肌肉组织的表达量最低, 在 0、0.25、0.5 岁时皮肤组织中表达量最高, 在 0.1、2、3 岁时肝组织的表达量最高。(2) *IGF-1* 基因在 7 个不同组织中均有表达, 0.25 岁时其在表达丰度由高到低依次为: 皮肤、肺、肝、肾、脾、心脏和肌肉。且在皮肤中的表达量最高且极显著高于其他各组织($P < 0.01$)。同时在不同年龄阶段的表达中, *IGF-1* 基因 0.25 岁时在各组织中的表达均达到峰值。综上所述, 西藏小型猪的 *IGF-1* 基因的表达呈现出明显的时空特异性, 可以为未来的研究提供基础数据。

参 考 文 献

[1] Wang TT, Jing AH, Luo XY, et al. Neural stem cells isolation

and differentiation into cholinergic neurons [J]. Neuroreport, 2006, 17(13): 1433–1436.

[2] Kishaba Y, Matsubara D, Niki T. Heterogeneous expression of nestin in myofibroblasts of various human tissues [J]. Pathol Int. 2010, 60(5): 378–385.

[3] 王玉珏, 田雨光, 顾为望, 等. 西藏小型猪 *IGF-1* 基因的克隆测序分析 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 46–48.

[4] 窦全林, 杨发龙, 王杰, 等. 藏系绵羊 *IGF-1* 基因表达水平的实时荧光定量 PCR 检测 [J]. 动物医学进展, 2008, 29(7): 27–30.

[5] 呼正祥, 张金玉, 孙博兴, 等. 军牧 1 号公猪睾丸组织不同发育时期 *IGF-1* 基因表达量研究 [J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2011, 32(2): 6–10.

[6] 刘海英, 宋先忱, 姚玉园, 等. *IGF-1* 和 *IGF-1R* 基因在辽宁绒山羊皮肤组织中的表达 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012 年专辑, (11): 156–158.

[7] 常明雪, 朱文奇, 章玲玲等. 不同日龄鸭肝脏中 *IGF-1* 及 *IGF-1R* 基因表达规律的研究 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2013, 34(1): 23–27.

[8] Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, et al. Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies [J]. Methods, 2001, 25(4): 443–451.

[9] 岳敏, 田雨光, 万斌, 等. 生长激素受体基因突变对西藏藏猪生长迟缓的影响 [J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(5): 882–887.

[收稿日期] 2016–04–26