

反转录—多聚酶链反应技术定量检测人外周血单个核白细胞低密度脂蛋白受体基因的表达

秦树存 王士雯 程云^①

(中国人民解放军总医院老年心内科, 北京 100853)

Expression Levels of Low Density Lipoprotein Receptor mRNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Hypercholesterolemia and Coronary Heart Disease by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Procedure

QIN Shu-Cun^①, WANG Shi-Wen^① and CHENG Yun^②
(^①General Hospital of the PLA, Beijing 100853; ^②No. 302 Hospital of the PLA, Beijing 100039, China)

ABSTRACT Low density lipoprotein receptor (LDLR) mRNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) belong to low abundance expression and is difficult to detect. This study found that using the reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) procedure for semiquantitative determining expression levels of LDLR gene is a highly sensitive and specific, and gives a convenient and necessary method for clinical studying expression levels of LDLR gene in PBMC from patients with hypercholesterolemia and coronary heart disease.

KEY WORDS Low density lipoprotein; Receptor; Gene expression; Peripheral blood mononuclear cells; Reverse transcription-polymerase chain reaction

摘要 人外周血单个核白细胞低密度脂蛋白受体的 mRNA 为低丰度表达, 不易检出, 本文应用反转录-多聚酶链反应技术建立的低密度脂蛋白受体基因表达定量检测法灵敏、简便、特异。为临床观察高胆固醇血症

患者和冠心病易患人群的低密度脂蛋白受体表达情况, 提供了方便必要的手段, 初步应用结果表明, 高胆固醇血症和冠心病患者的低密度脂蛋白受体 mRNA 水平明显降低。

关键词 低密度脂蛋白; 受体; 基因表达; 外周血单个核白细胞; 反转录-多聚酶链反应

低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)途径障碍是家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FHC)的病因, 也是其它高胆固醇血症的主要表现之一^[1]。近年, LDLR 活性的随年龄下降及其与老年冠心病(coronary heart disease, CHD)的关系日益受到重视。LDLR 活性下降的原因可以是 LDLR 基因发生突变(如 FHC), 也可以是 LDLR 转录或翻译水平上的改变^[2]。FHC 发生率在欧美占人群的 1/500 以上, 而普通型高胆固醇血症(hypercholesterolemia, HC)发生率远远高于这个水平。同样环境因素(包括饮食、生活习惯等)的人群, 血胆固醇水平不尽相同, 显然与遗传基因及影响基因转录和翻译的调控因素的改变有关^[3]。因此, 对高胆固醇血症人群、CHD 易感人群及 CHD 患者进行 LDLR 基因表达的检测分析, 对于指导降脂药物的使用、研究高胆固醇血症和 CHD 的病因、探讨衰老与 CHD 的关系等, 无疑具有重要意义。然而, 人外周血单个核白细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)的 LDLR mRNA 属低丰度表达, 采用核酸探针杂交的方法检测, 既费时费力又需要大量外周血(通常为 15~20 ml), 不适合临床应用, 本文应用反转录—多聚酶链反应

^①中国人民解放军第 302 医院免疫室, 北京 100039

(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)技术,建立起一种新的简捷特异的 LDLR mRNA 定量检测方法,用血量仅 5 ml,通过此方法研究 LDLR 基因在人体内表达情况,发现 HC 和 CHD 患者的 PBMC LDLR 基因表达明显降低。提示 LDLR 转录的严重抑制状态与 HC 和 CHD 的病因及发病机制密切相关。

1 材料和方法

1.1 试剂

AMV 反转录酶和 Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司;Random Primer 为华美公司产品,其它试剂均为 Sigma 公司产品。LDLR 引物根据文献[4]应用 DNA 合成仪合成,上游引物:5'-CAA, TGT, CTC, ACC, AAG, CTC, TG-3', 下游引物:5'-TCT, GTC, TCG, AGG, GGG, AGC, TG-3', cDNA 序列片段为 258 bp。 β_2 -微球蛋白(β_2 -microglobulin, β_2 -Mg)引物(北京医科大学病理室产品)为上游:5'-ACC, CCC, ACT, GAA, AAA, GAT, GA-3', 下游:5'-ATC, TTC, AAA, CCT, CCA, TGA, TG-3', cDNA 序列片段为 120 bp。

1.2 血细胞

采自本院血库健康献血员和住院 HC 及 CHD 患者,清晨空腹静脉血 5 ml,肝素抗凝,淋巴细胞分离液(军事医学科学院产品)分离 PBMC。

1.3 总 RNA 的制备

异硫氰酸胍/酚/氯仿一步法[2]提取总 RNA,甲醛变性电泳鉴定纯度,紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,重复测定 3 次,光密度值 260 nm/280 nm 比值在 1.8~2.0 之间,计算总 RNA 浓度。

1.4 反转录

取 2 μ g 总 RNA(约 10 μ l),依次加入 10 mmol/L dNTP 2 μ l, 0.25 g/L 随机引物 2 μ l, 5 \times buffer 5 μ l, 反转录酶(8 U/L) 2 ml, RNasin 1 μ l, 加入 DEPC 处理水使总体积达 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min。

1.5 多聚酶链反应

反转录产物 10 μ l, 10 mmol/L dNTP 2 μ l, LDLR 上游引物(50 μ mol/L) 2 μ l, 下游引物(52 μ mol/L) 2 μ l, β_2 -Mg 上游引物(20 μ mol/L) 2 μ l, 下游引物(22 μ mol/L) 2 μ l, 10 \times buffer 4 μ l, 氯化镁 4 μ l, Taq 酶(5 MIU/L) 0.5 μ l, 加 DEPC 处理水至 50 μ l, 变性 95 $^{\circ}$ C 50 s, 退火 54 $^{\circ}$ C 50 s, 延伸 73 $^{\circ}$ C 50 s, 循环 30 次, 首次变性 95 $^{\circ}$ C 2 min。

1.6 电泳

取 10 μ l PCR 反应产物,进行 2%琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)分析,以 ϕ 174/Hae III 为分子量标准,电泳缓冲液为 1 \times TBE,电泳完毕后,在紫外灯下照像,薄层扫描仪定量底片上 LDLR 带和 β_2 -Mg 带的光密度,用二者的比值表示 LDLR mRNA 水平。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白受体 mRNA 测量方法的建立

外周血单个核白细胞总 RNA 反转录后经 30 次 PCR 扩增,其 LDLR cDNA 片段约为 258 bp, β_2 -Mg 片段为 120 bp,分别与所设计的相应 cDNA 相同。其扩增量成指数增长,与扩增循环次数密切相关,但二者的比值保持相对稳定。取同一个体相同数量的 PBMC 提取总 RNA(约 2 μ g),分别经过 5 次 RT-PCR 后,其 LDLR cDNA 产率基本相同,具有良好的重复性(Table 1)。

Table 1. LDL-receptor and β_2 -M mRNA expression levels (OD values from negative film by density scanning) from the same number of PBMC of a normal individual.

PBMC	LDLR	β_2 -Mg
A	0.534	0.786
B	0.546	0.780
C	0.543	0.779
D	0.538	0.782
E	0.541	0.776

2.2 高胆固醇血症和冠心病患者低密度脂蛋白受体 mRNA 的改变

分别取 HC 患者、CHD 患者和健康对照者的 PBMC 提取总 RNA,测定 LDLR mRNA,其所测样品总 RNA 用量均为 2 μ g, HC 和 CHD 患者的 LDLR mRNA 低于健康对照者(Table 2 and Figure 1)。

3 讨论

低密度脂蛋白受体是血浆胆固醇代谢的主要途径,LDLR 活性下降可导致高胆固醇血症

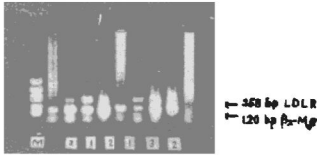


Figure 1. Agarose electrophoresis of PCR products. 1. control group, 2. CHD group, 3. hypercholesterolemic (HC) group, M, Marker $\phi \times 174/\text{Hae III}$, A, 258 bp LDLR mRNA; B, 120 bp $\beta_2\text{-Mg}$ mRNA.

Table 2. LDL receptor mRNA relative expression (LDL receptor/ $\beta_2\text{-Mg}$) levels in PBMC.

Group	case	LDLR	$\beta_2\text{Mg}$	LDLR/ $\beta_2\text{Mg}$
control	8	0.3313	0.3675	0.8957
HC	4	0.3650	0.7150*	0.4833*
CHD	6	0.3417	0.6550*	0.5219*

* $P < 0.01$, compared with control group

和早发冠心病。LDLR 基因多态性对血浆胆固醇的影响虽有不少研究报告,但众说纷纭^[4]。由于外周血白细胞 LDLR mRNA 属低丰度表达,使临床检测颇为困难,故迄今对 LDLR 转录水平的临床研究甚少,然而基因表达的调控多是在转录水平上进行的,因此其 mRNA 水平可以有很大变化,转录水平的调控异常很可能是众多普通型高胆固醇血症以及冠心病患者(包括老年和女性患者)的病因所在^[7]。在体观察 LDLR 基因表达情况是临床研究 LDLR 对高胆固醇血症及 CHD 影响、研究抗动脉粥样硬化药物对 LDLR 作用的必要手段,也是人们一直探索并试图用于临床的目标。以往对 LDLR 基因表达的研究多取材于实验动物肝细胞或人皮肤成纤维细胞,难以在临床推广。新鲜的 PBMC 表面具有 LDLR,其表达水平的高低代表人体内其它细胞尤其是肝细胞的 LDLR 状况^[8]。因此,可以取材 PBMC 观察人体 LDLR 基因表达情况。

mRNA 测定开始主要为固相的 slot/dot blot 和 Northern blot 等^[9,10]几种方法,但由于 mRNA 含量少,又极易分解,故对于只含极少量特异 mRNA 的组织测量颇为困难。近年来,不断有新方法问世,如 RNA-protective assay, 内含标化的 RT-PCR 法等^[4,11]。前者较灵敏准确,但操作复杂,价格昂贵,难以普及临床;后者较为简便、快捷且灵敏、特异。本文对 Noonan 等^[12]的方法略加改进,改测定掺入同位素的放射强度为测定照像底片的 cDNA 片段荧光光度,亦收到同样效果,并避免了放射性危害。同时与 RNA-protective assay 比较,用血量减少(由 15~20 ml 减少至 5 ml),总 RNA 量减少(由 10~20 μg 减少至 2 μg),因而大大方便了临床观察。

高胆固醇血症和 CHD 患者的血浆胆固醇水平很大程度上取决于 LDLR 基因表达水平的高低^[13]。FH 患者的 LDLR 基因突变导致纯合子 LDLR 完全不表达,杂合子表达很低,因此 FH 患者血中胆固醇不能通过 LDLR 途径代谢^[2]。作者曾报道普通型 HC 患者 LDLR 活性显著降低,且有随年龄下降的趋势,有报告认为 CHD 患者的 LDLR 活性亦明显降低。已知多数普通型 HC 患者和多数 CHD 患者并未发生 LDLR 基因突变,那么其 LDLR 活性下降的原因是发生在翻译水平抑或是转录水平,因此需做 LDLR mRNA 的测定。通过本研究发现,高胆固醇血症和 CHD 患者的 LDLR mRNA 表达比正常对照组明显下降。表明 HC 和 CHD 患者的 LDLR 转录已处于严重抑制状态。采取适当调控措施解除这种抑制,有可能成为 HC 和 CHD 防治的有效手段。

参考文献

- Portman RJ, Scott RC, Rogers DO, et al. Decreased low density lipoprotein receptor function and mRNA levels in lymphocytes from uremic patients. *Kidney International*, 1992, 42: 1 233~246.
- Jennifer AC, Russell DW, Lijsky PE. Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in human lymphocytes. *J Biol Chem*, 1989, 264 (2): 1 298~304.

3 Schmitz G, Bruning T, Kovacs E, et al. Fluorescence flow cytometry of human leukocytes in the detection of LDL receptor defects in the differential diagnosis of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13** ; 1 053~065.

4 Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**; 9 717~721.

5 Chomozynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyaate/phenol/chloroform/chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**; 156~159.

6 Klauen IBC, Hansen PS, Gerders LU, et al. APvu I polymorphism of the low density lipoprotein receptor gene is not associated with plasma concentrations of low density lipoproteins including Lp(a). *Hum Genet*, 1993, **91**; 193~195.

7 Owen CH, Sorci-Thomas M, Rudel LL. Dietary fat and cholesterol-induced modification of LDL receptor function and mRNA abundance in non-human primates. *Arteroscler Thromb*, 1991, **11**; 1 447(abstract).

8 Ho YK, Brown MS, Goldstein JL, et al. Regulation of low density lipoprotein receptor activity in freshly isolated human lymphocytes. *J Clin Invest*, 1986, **58** ;1 465~474.

9 Cuthbert JA, Russell DW, Lipsky PE. Regulation of low density lipoprotein receptor gene expression in human lymphocytes. *J Biol Chem*, 1989, **264**; 1 298~304.

10 Oin W, Innfante J, Wang SR, et al. Regulation of HMG-CoA reductase, apolipoprotein B and LDL receptor gene expression by hypercholesterlemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G2, human and rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1** 127; 57~66.

11 Le Cras TD, Gherardi E, Bowyer DE. A sensitive RA ase protection assay for the quantitation of the mRNAs for the LDL receptor and HMG-CoA reductase in human total RNA. *Atherosclerosis*, 1991, **90**; 81~90.

12 Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, et al. Quantitative analysis of MDR1(multidrug resistance) gene expression in human talmors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(18); 7 160~164.

(1995-08-13 收到,1996-04-10 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(VI)

免疫活性	immunological competence
免疫原性	immunogenicity
免疫排斥反应	immunological rejecting reaction
免疫母细胞	immunoblast
免疫铁蛋白	immunoferritin
免疫细胞化学	immunocytochemistry
免疫活性细胞	immunologically competent cell
免疫核糖核酸	immune ribonucleic acid, IRNA
完全抗原	complete antigen, CAg
补加基因	supplementary genes
补体结合点	complement combining site
补体血清激酶	complement serkinase
补体结合反应	complement fixation reaction

(胡必利编写)