

·方法技术·

血单个核白细胞中 CD36 抗原基因表达的测定方法及其意义

王拥军 张力群 于凯 刘璐 杨静芳 董秀敏 温玫 卫华 魏岗之

(首都医科大学宣武医院神经内科, 北京 100053)

主题词 白细胞, 单个核; 血细胞; 抗原, CD36; 肌动蛋白; 基因表达; 转录, 遗传; 聚合酶链反应; 人

摘要 为建立外周血单个核白细胞 CD36 抗原基因表达的测定方法, 本文采用反转录聚合酶链反应技术定量测定 CD36 抗原基因的表达, 用 β -肌动蛋白作为内标物, 用凝胶扫描技术进行定量。结果发现, 反转录聚合酶链反应后电泳发现 CD36 抗原 cDNA 片段为 390 碱基对, β -肌动蛋白 cDNA 片段为 540 碱基对, 以 CD36 抗原/ β -肌动蛋白表示 CD36 抗原基因表达量是一个稳定的方法, 颈动脉粥样硬化病人 CD36 抗原基因表达增加。结果提示, 反转录聚合酶链反应是测定 CD36 抗原基因表达的理想方法, 可以用于动脉粥样硬化的研究。

The Determination and Significance of CD36 Antigen Gene Expression in Periphery Blood Mononuclear Leukocytes

WANG Yong-Jun, ZHANG Li-Qun, YU Kai, LIU Lu, YANG Jing-Fang, DONG Xiu-Min, WEN Mei, WEI Hua and WEI Gang-Zhi

(Department of Neurology, Xuanwu Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China)

MeSH Leukocytes, Mononuclear; Blood Cells; Antigen, CD36; Actinin; Gene Expression; Transcription, Genetic; Polymerase Chain Reaction; Human Body

ABSTRACT **Aim** A method to determining CD36 antigen gene expression in periphery blood mononuclear leukocytes (PBMNL) is established. **Methods** The expression of CD36 antigen gene was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with β -actin as the internal standard. RT-PCR products were quantified by gel scanning.

Results The gel electrophoresis revealed that the molecular weight of CD36 antigen RT-PCR products was 390bp, that of β -actin was 540bp. It is a stable method that CD36 antigen gene expression was expressed by CD36 antigen/ β -actin. The gene expression was significantly enhanced in the patients with carotid atherosclerosis. **Conclusion** RT-PCR is an ideal method to determine expression of CD36 antigen gene, which might be used in the study of atherosclerosis.

Kabylka 等发现在哺乳类动物表皮细胞表面有一种膜蛋白能够抵抗蛋白的分解, Greenwalt 等^[1]证实为 CD36 抗原, Endemann 等^[2]在巨噬细胞表面发现一类可与氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 结合的受体, 克隆分析证实也为 CD36 抗原, 此后通过细胞模型和病理学研究发现 CD36 抗原可能在巨噬细胞与 ox-LDL 结合中起关键作用, 从而奠定了 CD36 抗原在动脉粥样硬化性疾病中的重要位置。Pietsch 等^[3]在细胞培养研究中建立了 CD36 抗原基因表达的测定方法, 为探讨 CD36 抗原在动脉粥样硬化性疾病中的作用提供了手段。目前, 有关 CD36 抗原的研究都停留在细胞培养的研究上, 未进行在体研究, 我们首次建立

了人外周血单个核白细胞 (periphery blood mononuclear leukocytes, PBMNL) CD36 抗原基因表达的测定方法, 以期能在整体水平观察研究 CD36 抗原在动脉粥样硬化中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

mmlv 反转录酶购自 Gibco 公司, 随机引物 Oligo(dT)15、重组 RNA 抑制剂 (RNAsin)、Taq DNA 聚合酶、总 RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司。美国 PE 公司 2400 基因扩增仪, 美国 GENE 公司 GDS8000 凝胶分析仪, 分析软件为 Gelworks ID advanced 3.0。

1.2 引物

根据 Pietsch 等^[3]设计合成 CD 36 和内标物 β -

肌动蛋白的扩增引物,CD 36的引物顺序为:5'-GAGAAGTGTATGGGGCTAT-3', 5'-TTC ACTGGAGAGGCAAACG-3',扩增产物389 bp。 β -肌动蛋白的引物顺序为:5'-GTGGGGCGCC-CCAGGCACCA-3', 5'-CTCCTTAATGT-CACGCACGATTC-3',扩增产物540 bp。

1.3 外周血单个核白细胞

受检者于晨8~9时空腹采静脉血5 mL,0.2% EDTA 抗凝,用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)提取 PBMNL。选择颈动脉粥样硬化组35例,其中男性19例,女性16例,平均年龄 62.1 ± 10.4 岁。对照组31例,其中男性17例,女性14例,平均年龄 59.9 ± 6.5 岁。两组间性别和年龄无统计学差异。

1.4 测定方法

用异硫氰酸胍/酚/氯仿一步法^[4]提取总 RNA,短时普通电泳鉴定 RNA 降解程度,紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度和纯度。取2 μ g 总 RNA,依次加入5 \times 缓冲液4 μ L,2.5 mmol/L dNTP 3 μ L,0.5 g/L 随机引物 Oligo(dT)1 μ L,40 Mu/L RNasin 1 μ L,0.1 mol/L DTT 2 μ L,200 Mu/L mmlv 反转录酶1 μ L,加入去 RNA 酶水使总体积达20 μ L。

37 $^{\circ}$ C 1 h,95 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应。获得 cDNA。

取反转录 cDNA 10 μ L,依次加入10 \times 缓冲液 5 μ L,25 mmol/L MgCl₂5 μ L,2.5 mmol/L dNTP 4 μ L,CD36抗原引物(20 pmol/L)各2 μ L, β -肌动蛋白引物(20 pmol/L)各2 μ L,5 Mu/L Taq DNA 聚合酶1 μ L,加双蒸水至50 μ L。在 PCR 仪中进行扩增,条件是变性95 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 退火58 $^{\circ}$ C 1 min \rightarrow 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min,30个循环,终止于延伸72 $^{\circ}$ C 10 min。

取10 μ L PCR 产物与2 μ L 6 \times 装载缓冲液混合,上样于2%琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L 溴化乙锭),在1 \times TBE 缓冲液中电泳,以 $\Phi \times 174$ /Hae III 作为分子量标准。电泳完毕后,在凝胶分析仪上扫描,测定每条带上 CD36 抗原和 β -肌动蛋白的光密度,以 CD36 抗原/ β -肌动蛋白光密度的比值表示 CD36 抗原基因表达水平。

2 结果

2.1 反转录聚合酶链反应扩增产物

电泳定性,CD36抗原 cDNA 片段为390 bp, β -肌动蛋白 cDNA 片段为540 bp,分别与所设计的相应的 cDNA 片段相同(图1, Figure 1)

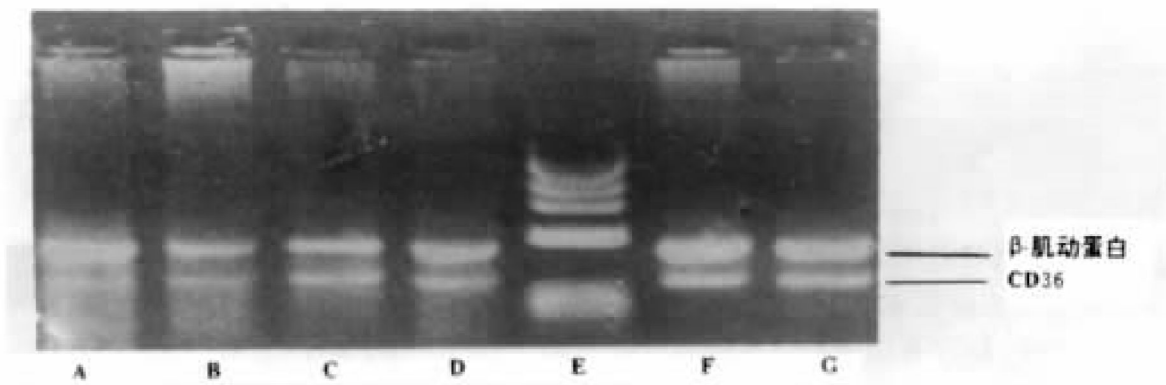


图1. 反转录聚合酶链反应扩增 CD36 抗原和 β -肌动蛋白基因片段琼脂糖凝胶电泳

Figure 1. Atlas of agarose gel electrophoresis of CD36 antigen and β -actin

2.2 方法的稳定性

批内变异:取3例颈动脉粥样硬化患者和3例正常人等量总 RNA 同时测定 CD36 抗原基因的表达量,显示 β -肌动蛋白表达较稳定(光密度值较接近),证实 β -肌动蛋白在不同个体中表达相对恒定。但两组 CD36 抗原基因的表达量和 CD36 抗原/ β -肌动蛋白比值差距较大(表1, Table 1)。同一个体3份等量总 RNA 反转录聚合酶链反应显示 CD36 抗原基因的表达量基本相同(表2, Table 2)。提示在同一批反应中反转录聚合酶链反应技术比较稳定。

批间变异:取同一个体的定量总 RNA,分三次作反转录聚合酶链反应后,其 CD36 抗原和 β -肌动蛋白基因表达量均有较大变化,即批间变化较大。但 CD36 抗原/ β -肌动蛋白比值相对稳定(表3, Table 3),表明设立内对照组可以清除批间变异所导致的误差。

2.3 颈动脉粥样硬化组和对照组外周血单个核细胞中 CD36 抗原基因表达的比较

以 CD36 抗原/ β -肌动蛋白光密度比值表示 CD36 抗原基因表达水平,颈动脉粥样硬化组 CD36 抗原基因表达量为 0.64 ± 0.23 ,对照组为 $0.30 \pm 0.$

13. 两组间存在非常显著的差异 ($P < 0.001$)。

表1. 不同人群批内 CD36 抗原和 β -肌动蛋白的光密度值

Table 1. Comparison of OD of PCR products of CD36 and β -actin in same test

Groups	n	CD36	β -actin	CD36/ β -actin
Control	31	82.19 \pm 16.33	186.71 \pm 1.15	0.862 \pm 0.105
Atherosclerosis	35	160.94 \pm 19.13 ^a	185.49 \pm 0.69	0.443 \pm 0.089 ^a

a: $P < 0.05$, compared with control group.

表2. 同一个体等量总 RNA 同时进行的反转录聚合酶链反应结果

Table 2. OD of PCR products from the same amount of RNA in same subject

	A	B	C
CD36	196.62	193.88	197.79
β -actin	184.41	190.44	187.47
CD36/ β -actin	0.938	0.982	0.948

表3. 同一个体的总 RNA 三次反转录聚合酶链反应结果

Table 3. OD of PCR products from three tests of same subject

	CD36	β -actin	CD36/ β -actin
I	62.50	188.29	0.3319
II	30.79	89.91	0.3425
III	16.47	50.44	0.3265

3 讨论

CD36 抗原是 ox-LDL 的受体, 与细胞内胆固醇堆积直接相关。基因表达的调控多在转录水平上进行, 这种受体转录水平的异常可能是 As 形成的影响因素。在体观察 CD36 抗原基因表达状况是临床研究 As 形成及抗 As 药物作用的必要手段。CD36 抗原属于低丰度表达, 临床检测很困难。由于分子生物学技术发展, 一些检测 mRNA 水平的方法应运而生, 如各种核酸分子杂交技术^[5]。固相杂交法待测物结合到固相支持物变化过程较大, 条件难以控制, 且其反应空间有限, 灵敏性较低。液相法虽然灵敏度提高, 但操作费时长, 且检测低丰度表达的 mRNA, 如在本研究中未诱导的单个核上的 LDLR 和 CD36 抗原, 需要较大量的组织细胞样品。PCR 技术的问世, 使 mRNA 检测的特异性和灵敏性大大提高, 且简便快捷。

Reyes-Engel 等^[6]研究不同人的待测序列和在人体有稳定表达的序列^[6], Nooman 等^[7]在 PCR 反应中增加一对引物, 以扩增体内外各种组织中都能稳定表达的 β -肌动蛋白作为内标准, 与靶基因在同

一管内扩增, 以两者的比值作为标准, 便能较准确地定量靶基因的表达。本研究采用 GDS8000 凝胶分析仪直接在紫外灯下对琼脂糖凝胶电泳结果扫描成像, 使用计算机进行定量分析。这样不仅简化了操作, 使结果获得更迅速, 且避免了因照相技术不稳定引起的信号丢失所造成的误差, 使结果更精确。

本实验建立的检测 CD36 抗原和 LDLR 基因表达水平的方法, 通过设立内对照, 使定量精确, 简便快捷, 且适合临床收集样本, 分期分批进行检测, 可用于临床对 CD36 抗原在体表达的研究。研究发现, 在颈 As 病人的外周血单个核白细胞 CD36 抗原基因表达量明显高于同期年龄、性别匹配的对照组。CD36 抗原在单核细胞中即有表达, 它是一种粘附分子, 参与启动细胞的粘附^[8]。推测颈 As 病人血中单个核白细胞更易于粘附血管损伤后炎症反应的部位, 促进细胞转化, 其表达量进一步增加, 使得 LDL 的氧化和摄取速度加快, 进而启动和加速颈 As 的形成过程。

参考文献

- Greenwalt DE, Watt KWK, So OY. PAS IV, a integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV). *Biochemistry*, 1990, **29**: 7054-7060
- Endemann G, Stanton LW. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 11811-11816
- Pitsech A, Eri W. Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Biochem Pharmacol*, 1996, **52**: 433-439
- Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate/phenol/chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156-159
- Qin W, Infante J, Wang SR, et al. Regulation of HMG-CoA reductase, apolipoprotein B and LDL receptor gene expression by the hypocholesterolemic drugs simvastatin and ciprofibrate in Hep G₂, human and rat hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*, 1992, **1127**: 57-66
- Reyes-Engel A, Carcia-Villanova J, Diegues-Lucena JL, et al. New approach to mRNA quantification: additive RT-PCR. *Bio Techn*, 1996, **21**: 202-204
- Nooman KE, Beck C, Holzmayer TA, et al. Quantitative analysis of MDR1 gene expression in human tumors by Polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 160-164
- Greenwalt DE, Robert HL. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*, 1992, **80**: 1105-1115

(此文1998-08-03收到, 1999-02-15修回)

(此文编辑 文玉珊)