

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0473-04

·方法学研究·

人周围血单核细胞载脂蛋白 E 基因表达的竞争性 逆转录-聚合酶链反应定量分析

向伟¹, 马燕琳², 符生苗¹, 赵水平³, 赵迪成², 杨进福³, 陈焱¹, 王福利¹, 王果², 聂赛³

(1. 海南省人民医院, 海南省海口市 570311; 2. 中南大学遗传学国家重点实验室, 湖南省长沙市 410078;

3. 中南大学湘雅二医院, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 分子生物学; 载脂蛋白 E 基因表达的定量分析; 逆转录-聚合酶链反应, 竞争性; 周围血单核细胞; 儿童

[摘要] 为建立人周围血单核细胞载脂蛋白 E 基因表达检测方法, 研究载脂蛋白 E 基因与儿童健康的关系, 我们抽取 26 例健康儿童外周静脉血, 分离血单核细胞, 抽提 RNA, 采用逆转录-聚合酶链式反应检测载脂蛋白 E 基因表达, 并以正常人 cDNA 作定量标准物, 待测样品与定量标准物共扩增, 计算出待测样品的个体的 mRNA 量。研究发现载脂蛋白 E 基因能在健康儿童周围血单核细胞表达, 健康儿童载脂蛋白 E 基因表达量为 0.37 ± 0.15 mol/mol mRNA。表明采用竞争性逆转录-聚合酶链反应方法来检测人周围血单核细胞载脂蛋白 E 基因表达的分析方法快速、简便、灵敏、实用、可靠, 且能准确定量, 值得推广应用。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

A Competitive Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction to Study Quantification of Apolipoprotein E Gene Expression in Human Monocyte-derived Macrophages

XIANG Wei¹, MA Yar-Ling², FU Sheng-Miao¹, ZHAO Shui-Ping³, ZHAO Di-Cheng², YANG Jir-Fu³, CHEN Chi¹, WANG Fu-Li¹, Wang Guo², and NIE Sai³

(1. Department of Pediatrics, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311; 2. National Laboratory of Medical Genetics, Central South University, Changsha 410078; 3. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

[KEY WORDS] Apolipoprotein E; Gene Expression; Quantitative Analysis; Reverse Transcription; Polymerase Chain Reaction; Monocyte-Derived Macrophages; Blood/human

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between the expression status of apolipoprotein E gene and children health, developed a new method for the quantification of apolipoprotein E mRNA in human monocyte-derived macrophages. **Methods**10 mL venous blood was obtained from 26 health children. The mononuclear cells were isolated. Total RNA from the monocytes was extracted. Apolipoprotein E gene express were determined by reverse transcription polymerase chain reaction. After synthesis of the internal apolipoprotein E DNA standard, we amplified internal standard DNA and cDNA of samples studied. Quantification of apolipoprotein E gene express was calculated. **Results** Apolipoprotein E mRNA was 0.37 ± 0.15 mol/mol GAPDH mRNA in health children. **Conclusions** The competitive reverse transcription polymerase chain reaction was a rapid, simple, sensitive method to study expression of apolipoprotein E gene. This method might be a valuable tool to assess apolipoprotein E gene expression in human disease.

载脂蛋白 (apolipoprotein) 是一类能与脂质结合并构成血浆脂蛋白的蛋白质, 载脂蛋白 E 是其中重要的一种。载脂蛋白 E 是维持脂蛋白结构不可缺少的成份, 能调节与脂蛋白代谢有关酶类活性, 并能

与细胞表面特异受体结合, 介导细胞对脂蛋白的摄取和降解。载脂蛋白 E 结构与功能异常能导致脂蛋白代谢紊乱, 促进动脉粥样硬化的发生发展^[1-3]。动脉粥样硬化、冠心病起源于儿童青少年时期, 我们既往研究发现儿童载脂蛋白 E 基因多态性分布有其特点, 是影响儿童血浆脂类水平的重要因素之一^[4], 但目前国内外尚未见儿童载脂蛋白 E 基因表达的研究报道。本文采用竞争性逆转录-聚合酶链反应 (competitive reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法分析正常健康儿童周围血单核细胞的载脂蛋白 E 基因表达, 旨在建立一种快速、简便、敏感、可靠的载脂蛋白 E 基因表达方法。

[收稿日期] 2002-11-27 [修回日期] 2003-06-19

[基金项目] 海南省自然科学基金 (80084) 资助

[作者简介] 向伟, 男, 土家族, 1964 年出生, 湖南省永顺县人, 1998 年获儿科学博士学位, 现从事儿科临床与科研工作, 主任医师, 研究员, 教授, 硕士研究生导师, 任海南省人民医院儿科副主任, 儿科研究室副主任。马燕琳, 女, 汉族, 1975 年出生, 湖北省鄂州市人, 为遗传学国家重点实验室博士研究生。符生苗, 男, 汉族, 1958 年出生, 海南省琼海市人, 从事医学检验及医学遗传研究工作, 医学遗传学研究员, 硕士研究生导师, 任海南省医学研究中心副主任, 海南省人民医院中心实验室主任。

1 对象与方法

1.1 对象及标本来源

研究对象来源于到海南省人民医院和中南大学湘雅二医院进行体格检查的健康儿童。经病史询问、物理检查、心电图、X线胸片、超声心动图、肝肾功能、空腹血糖和血脂等检测,排除可引起血脂异常的全身性疾病和心血管疾病者26例,其中男16例,女10例,年龄 9 ± 6 岁。禁食12 h后抽取外周静脉血10 mL,肝素抗凝。

1.2 单核细胞分离及RNA 抽提

采血后4 h内,将全血与5 mL PBS混合,将混合液沿管壁慢速注入到含有15 mL淋巴细胞分离液(Sigma公司)的离心管中,400 g离心15 min,离心后可见分为4层,用尖吸管吸取白细胞层(即第二层),注入离心管,加10 mL PBS轻轻混匀,进行洗涤,250 g离心5 min,将单核细胞沉积于管底,轻弃上清,采用RNA提取试剂盒(Promega公司)提取细胞的总RNA,贮存于 -80°C 备用。

1.3 逆转录

采用Promega公司的逆转录试剂盒,分别取每个样品的1 μg 的总RNA,在20 μL 反应体系中,用逆转录酶进行cDNA合成,反应条件为 45°C 1 h, 99°C 5 min。

1.4 载脂蛋白E 基因表达检测

1.4.1 扩增引物 5'端引物为5'-TTCCTG-GCAGGATGCCAGGG-3', 3'端引物为5'-GGTCAGTTGTTCCCTCCAGTTC-3',均由上海生物研究所合成。

1.4.2 聚合酶链反应体系 反应体系为50 μL ,其中 $10\times$ 缓冲剂5.0 μL , 10 mmol/L dNTP 1.0 μL , 20 mmol/L 5'引物1.5 μL , 20 mmol/L 3'引物1.5 μL , Taq酶2 u, cDNA模板1.0 μL , 双蒸水39.5 μL 。

1.4.3 扩增条件 首先加热至 94°C 变性5 min,然后进行 94°C 45 s \rightarrow 55°C 45 s \rightarrow 72°C 90 s共35个循环,最后 72°C 延伸10 min。6%中性聚丙烯酰胺凝胶电泳,紫外灯下观察。

1.4.4 酶切鉴定产物带的特异性 取载脂蛋白E PCR产物10 μL 加入Dde I内切酶(Promega公司)10 u,混匀后置 37°C 4 h。

1.5 载脂蛋白E 基因表达定量检测:

1.5.1 制作定量标准物 以正常人cDNA为模板制作定量标准物。在该过程中引入了一条33 bp的3'-连接引物,其中引物3'端开始的18个碱基与

270 bp产物片段的184~201段序列相匹配,引物5'端开始的21个碱基与原始的3'端引物相同,连接引物长度应为39 bp,但由于与270 bp产物片段匹配的最后6个碱基恰与原始的3'端引物的3'端的起始的6个碱基相同,因此3'-连接引物仅需33 bp就够了。用270 bp的产物片段作为模板,以3'-连接引物与5'端引物行PCR扩增,产生的216 bp片段即为定量标准物。待测样品与定量标准物共扩增,通过竞争,即能对靶转录进行准确定量。定量标准物的制作分为三个步骤:第一步,以载脂蛋白E 5'引物与3'引物扩正常人cDNA,回收270 bp片段,并进行纯化;第二步,以第一步回收纯化模板为样本,以5'引物及3'连接引物扩增,PCR产物电泳检测,回收216 bp条带,并进行纯化;第三步,以第二步回收样品为模板,以5'引物与3'引物扩增,PCR产物电泳检测,回收216 bp条带,即为定量标准物,纯化后用260 nm波长测吸光度。

1.5.2 待测样品与定量标准物共扩增 将定量标准物稀释,分别取0.07、0.1、0.3、0.6、1.0、 1.6×10^{-3} mol与待测样品0.25 μg RNA逆转录得到的cDNA混合,以载脂蛋白E 5'端引物与3'端引物为引物进行共扩增(图1)。

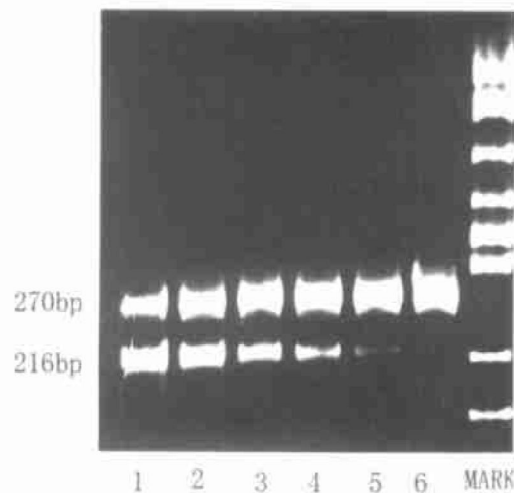


图1. 载脂蛋白E cDNA的竞争性聚合酶链反应定量电泳图

1~6道分别为 1.6 、 1.0 、 0.6 、 0.3 、 0.1 、 0.07×10^{-3} mol的216 bp定量标准物与同一个体的4 μg 的cDNA混合竞争,以原始的3'引物和5'引物为扩增产物。

1.5.3 凝胶电泳及结果观察 扩增后的产物用2%琼脂糖凝胶电泳,得到的PCR产物在0.25 mg/L的EB水溶液中染色10~15 min,紫外透射灯下观察。产物带的密度用凝胶扫描系统记录,EASY plus软件分析结果,数据处理后得到点图(图2)。根据点图计算出待测样本个体的mRNA量。

1.5.4 磷酸甘油醛脱氢酶竞争聚合酶链反应

为避免管与管之间的 cDNA 合成效率的差异, 保证来自不同样本 cDNA 的载脂蛋白 E mRNA 数据的可比性, 所有样本都额外做了磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因的表达分析, 扩增引物为 5'-TGAAGGTCGGAGT-CAACGGATTTGGT-3' (5' 引物) 和 5'-CATGTGGCC-CATGAGTCCACCAC-3' (3' 引物)。反应体系及反应条件同载脂蛋白 E 扩增: 将 cDNA 稀释 25 倍, 样本的准备类似于载脂蛋白 E, GAPDH 的特异产物为 983 bp, DNA 内对照 (Clontech) 的产物长为 630 bp。

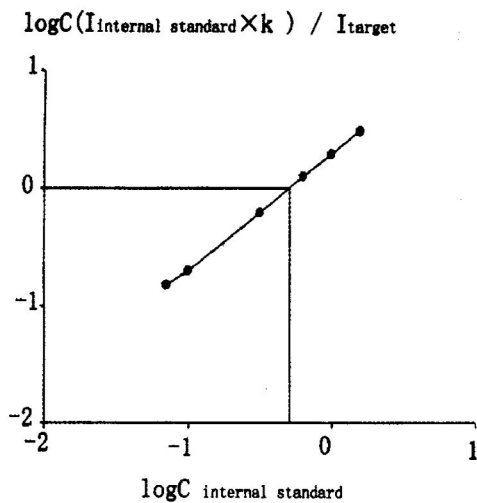


图 2. 载脂蛋白 E cDNA 的竞争性聚合酶链反应定量计算图

以 $\log C$ 为横坐标, 以 $\log(I_i \times k) / I_t$ 为纵坐标作图, 其中 I 为产物带的密度, k 为相关系数, 此处 $k = 270 \text{ bp} / 216 \text{ bp} = 1.25$ 。当 216 bp 与 270 bp 的产物量相等时, 即 $\log(I_i \times k) / I_t = 0$ 时, 相应的 $\log C$ 值即为载脂蛋白 E cDNA 的相对量, 其绝对量可进一步根据定量标准物的浓度算出。

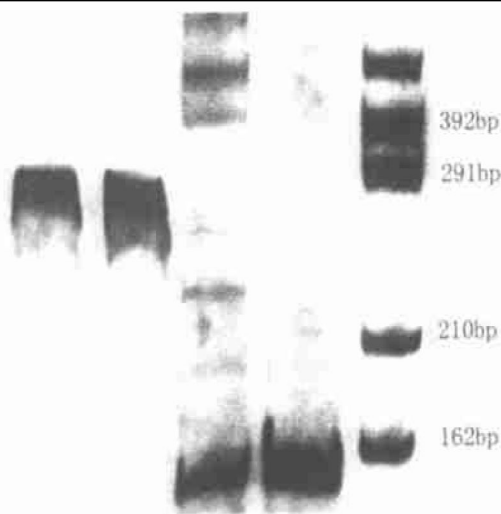


图 3. 周围血单核细胞载脂蛋白 E 基因表达产物及其酶切电泳图 1 和 2 为酶切前 270 bp 产物, 3 和 4 为酶切后 152 bp 产物。

2 结果

2.1 健康儿童周围血单核细胞载脂蛋白 E 基因的表达

在紫外线下可观察到 270 bp 的特异性条带, 经 DdeIv 酶切后形成 152 bp 片段和 71 bp、17 bp、24 bp 的短片段, 证实为载脂蛋白 E 基因。说明健康儿童周围血单核细胞能表达载脂蛋白 E 基因 (图 3)。

2.2 健康儿童周围血单核细胞载脂蛋白 E 基因表达量的检测

26 名健康儿童周围血单核细胞载脂蛋白 E 基因表达水平为 $0.37 \pm 0.15 \text{ mol/mol GAPDH mRNA}$ 。

3 讨论

大量研究表明载脂蛋白 E 不仅在脂质代谢中扮演重要的角色, 而且有重要的细胞生物学的作用, 因此载脂蛋白 E 基因表达的分子生物学调节引起了人们越来越多的兴趣。

研究载脂蛋白 E 基因表达的方法很多, 常用的分子生物学方法如 Northern blot 或斑点杂交等方法复杂、耗时长, 采用放射性探针, 需要大量的细胞与 RNA, 甚至需进行细胞培养, Northern blot 需要的 RNA 量大约 10~20 μg , 需要 $(10 \sim 20) \times 10^6$ 单核细胞, 而且只能粗略定量^[5,6]。RT-PCR 方法是近年来研究基因表达新的方法, 由于基于 PCR 技术, 因此只需要微量的 RNA, 总 RNA 量小于 1 μg , 大约从 3×10^5 单核细胞中即可获得, 特别是采用内对照定量标准物竞争 PCR, 因此能准确定量^[7,8]。

载脂蛋白 E 基因定位于 19 号染色体上 p13-q13 区, 全长 3 597 bp, 含有 4 个外显子和 3 个内含子, 载脂蛋白 E 主要由第 4 个外显子编码^[9]。为了检测载脂蛋白 E 基因表达, 我们设计了一对引物, 5' 引物含 1 号外显子的最后 10 个碱基与 2 号外显子的前 10 个碱基 (核苷酸序列分别为 1 717~1 726 和 2 920~2 929), 3' 原始引物位于 4 号外显子 (核苷酸序列为 3 640~3 660), 因而仅当 mRNA 正确剪切时才可扩增出, 因此极大减少了非特异性扩增。

为了准确定量载脂蛋白 E mRNA, 我们制作定量标准物, 待测样品与定量标准物共扩增, 通过竞争, 即能对靶转录进行准确定量。在竞争性扩增中我们采用同一对引物, 避免引物相互作用对 PCR 效率的影响, 减少了 PCR 过程中因引物差异、片段结构差异对扩增产量的影响, 从而达到准确定量的目的。而且由于此竞争性设计, 靶序列与标准序列的克分子比率在扩增中保持恒定, 因此能排除诸如反应的指数期与非指数期、循环数及所谓的管间差异等因

素的影响。并且所有样本都额外做了看家基因 GAPDH 基因的表达分析,以避免管与管之间的 cDNA 合成效率的差异,保证来自不同样本 cDNA 的载脂蛋白 E mRNA 数据的可比性,使结果更可靠。

载脂蛋白 E 可以在很多组织和细胞中合成,我们研究表明载脂蛋白 E 基因能在正常健康人周围血单核细胞中表达,此为进一步研究载脂蛋白 E 基因提供了一个简便的手段。在动脉粥样硬化早期病理改变过程中,脂质和单核-巨噬细胞起着关键性作用,单核-巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块形成过程中最重要的细胞,多种因素导致血管内皮的损伤,循环血液中的脂蛋白尤其是低密度脂蛋白向内皮下入侵,周围出现单核细胞、平滑肌细胞增生并进入内膜,同时有蛋白聚糖增多,增生的单核细胞及平滑肌细胞在内皮下吞噬脂质形成泡沫样细胞,局部形成脂点,随着脂质入侵的增多,脂点扩展成脂纹、粥样斑块。在动脉壁内单核细胞分化衍变为胆固醇负荷的泡沫细胞是动脉粥样硬化的特征^[9]。载脂蛋白 E 基因能在人周围血单核细胞中表达,提示载脂蛋白 E 基因可能参与循环血单核细胞的功能调节。

载脂蛋白 E 具有重要的生理作用: ①构成脂蛋白,是乳糜微粒和极低密度脂蛋白以及中间密度脂蛋白和某些高密度脂蛋白亚型的结构蛋白; ②作为配体与低密度脂蛋白受体和载脂蛋白 E 受体结合,通过受体介导途径参与机体脂质代谢调节; ③具有某种免疫调节作用; ④参与神经细胞的修复^[9]。因

此载脂蛋白 E 不仅对于成人而且对于儿童健康也具有重要意义,我们研究表明采用竞争性 RT-PCR 方法能检测到人周围血单核细胞的载脂蛋白 E 基因表达,且能准确定量,特别适用于细胞数量少或 mRNA 含量很低时,其方法快速、简便、灵敏、实用、可靠,对微量表达也能检测,因此对于进一步了解载脂蛋白 E 基因的功能、调控及在儿科疾病的临床意义具有值得重要的意义,值得推荐。

[参考文献]

- [1] 向伟,李毅夫. 载脂蛋白 E 基因与心脑血管疾病. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (1): 85-86
 - [2] 张国兵,陈灏珠,江智文,温沁竹,顾青,王丰,等. 巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中载脂蛋白 E 基因表达的变化. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (5): 441-442
 - [3] 陈培利,冯友梅,从容,王淳本,宗义强,邓耀祖. 极低密度脂蛋白对小鼠腹腔巨噬细胞载脂蛋白 E 基因表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (2): 95-98
 - [4] 向伟,赵水平,彭道泉,游学科,张宝林,熊正东,等. 长沙地区小儿载脂蛋白 E 基因多态性及其对血脂的影响. 湖南医科大学学报, 1999, 24 (3): 232-236
 - [5] Raffai RL, Weisgraber KH. Hypomorphic apolipoprotein E mice: a new model of conditional gene repair to examine apolipoprotein E-mediated metabolism. *J Biol Chem*, 2002, 277 (13): 11 064-068
 - [6] Basheeruddin K, Rechter C, Mazzone T. Transcriptional and post-transcriptional control of apolipoprotein E gene expression in differentiating human monocytes. *J Biol Chem*, 1992, 267 (2): 1 219-224
 - [7] Siebert PD, Larrick JW. PCR MIMICS: competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques*, 1993, 14: 244-249
 - [8] Cottrez F, Aurialt C, Capron A, Groux H. Quantitative PCR: validation of the use of a multispecific internal control. *Nucleic Acid Res*, 1994, 22: 2 712-713
 - [9] 向伟,赵水平. 血脂代谢及小儿特点. 见: 向伟主编. 小儿血脂异常-基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2001; 22-42
- (此文编辑 胡必利)