

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01307

· 论 著 ·

定量 RT-PCR 测定冠心病患者外周血 Siglec-1 (CD169) 的基因表达水平

熊怡淞, 王 皓, 吴炜霖, 周运恒, 梁 艳, 杨再兴, 荣光华, 仲人前*

第二军医大学长征医院实验诊断科, 全军医学免疫诊断中心, 全军临床免疫重点实验室, 上海 200003

[摘要] **目的:** 建立检测人 Siglec-1 (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins, 唾液酸结合的免疫球蛋白样凝集素 1, CD169) mRNA 含量的实时荧光定量 RT-PCR 的方法, 并用来测定冠心病患者外周血单个核细胞 (PBMCs) 中 Siglec-1 的基因表达水平, 探讨 Siglec-1 基因表达水平与冠状动脉粥样硬化发生发展的关系。 **方法:** 基于 SYBR Green 荧光标记技术, 建立实时荧光相对定量 RT-PCR 方法, 在 ABI PRISM 7000 荧光定量 PCR 仪上测定了 57 例冠状动脉粥样硬化性心脏病患者和 38 例健康对照者外周血中 Siglec-1 mRNA 的含量。生化常规测定所有入选者血脂水平。 **结果:** 冠心病组 Siglec-1 mRNA 的平均拷贝数显著高于健康对照组, 为健康对照组的 3.23 (1.28~8.11) 倍 ($P < 0.01$); 其中急性心肌梗死组 (AMI)、稳定型心绞痛组 (SA) 和不稳定型心绞痛组 (UA) 分别为对照组的 3.32 (1.38~7.97)、2.56 (0.88~7.42)、3.35 (1.25~8.96) 倍, 而三组之间差异无统计学意义; 冠心病血脂正常组和血脂异常组的 Siglec-1 mRNA 平均拷贝数无显著差异。 **结论:** 成功建立了人 Siglec-1 基因表达含量的实时荧光定量 RT-PCR 检测方法; 冠心病患者 Siglec-1 mRNA 的含量显著高于健康对照组, 且其含量高低与血脂无关; Siglec-1 mRNA 含量在冠心病患者外周血单核细胞上表达显著升高, 说明冠心病患者外周血单核细胞已经发生巨噬细胞化, 单核巨噬细胞介导的免疫炎症反应在冠心病发生发展过程中起重要作用。

[关键词] 冠状动脉硬化; Siglec-1; 逆转录聚合酶链反应

[中图分类号] R 541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1307-04

Real-time quantitative RT-PCR in measuring Siglec-1 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease

XIONG Yi-song, WANG Hao, WU Wei-lin, ZHOU Yun-heng, LIANG Yan, YANG Zai-xing, RONG Guang-hua, ZHONG Ren-qian*

Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University & Key Lab and Clinical Immunology Center of PLA, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method for examining the expression of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-one (Siglec-1) gene in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in patients with coronary heart disease (CHD), so as to explore the relationship between Siglec-1 mRNA expression and the development/progression of CHD. **Methods:** Based on the fluorescent SYBR Green method, a real-time quantitative RT-PCR was set up. The expression of Siglec-1 gene in the PBMCs of 57 patients with CHD and 38 healthy controls were measured by ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systems. The blood lipid levels were determined in all the subjects by routine biochemical examination. **Results:** The mean Siglec-1 mRNA copy was significantly higher in the CHD group than that in the healthy control group (mean 3.23 folds, ranging 1.28-8.11 folds, $P < 0.01$). The expression in the acute myocardial infarction group, stable angina and unstable angina group were 3.32 (1.38-7.97), 2.56 (0.88-7.42), and 3.35 (1.25-8.96) folds that of the control group, respectively. No significant difference was observed in the normalized Siglec-1 mRNA copy number between CHD group with normal level of serum lipids and abnormal level of serum lipids. **Conclusion:** A real-time quantitative RT-PCR method for detecting the expression of Siglec-1 gene in PBMCs has been successfully established. The expression of Siglec-1 is dramatically increased in PBMCs in CHD patients.

[KEY WORDS] coronary arteriosclerosis; Siglec-1; reverse transcription-polymerase chain reaction

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1307-1310]

[收稿日期] 2008-04-27 **[接受日期]** 2008-06-17

[基金项目] 国家高科技研究发展计划 (“863”计划, 2006AA02Z496); 上海市科学技术委员会优秀学科带头人基金 (07XD14013). Supported by National High-tech R & D Program (“863” Program, 2006AA02Z496) and Funds for Leading Scientist of Science and Technology Committee of Shanghai Municipality (07XD14013).

[作者简介] 熊怡淞, 硕士生, E-mail: xys10@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63610109, E-mail: rqzhong@yahoo.com

Siglecs 家族是特异性表达于各种免疫和造血细胞表面的一类黏附分子,属免疫球蛋白超家族成员,通过识别含有唾液酸的糖链结构而促进细胞与细胞间结合和相互作用,在介导细胞信号转导,调节造血细胞和免疫细胞功能等方面起重要作用^[1]。人 Siglec-1 由 Paul R. Crocker 小组于 2001 年克隆^[2],它组成性表达于特定组织巨噬细胞上,而正常人外周血单核细胞上并不表达。当单核巨噬细胞受到炎症刺激时,Siglec-1 表达迅速上调,说明 Siglec-1 在巨噬细胞促炎症反应中起重要作用。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管疾病的病理基础,其发病机制备受关注,但至今尚未阐明。近年来认为免疫炎症特别是由巨噬细胞介导的天然免疫在 AS 的发生发展中起重要作用^[3]。Siglec-1 作为单核巨噬细胞激活的重要标志,是否可以通过与血管内皮细胞表面含唾液酸结构的糖链结合而参与 AS 的发病过程,至今未见相关报道。本研究主要是利用实时荧光定量 RT-PCR 技术,从基因转录水平观察 Siglec-1 在冠心病患者外周血单个核细胞(PBMCs)的表达变化,并探讨其在冠状动脉粥样硬化发生发展中的意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象 2007 年 9 月至 12 月本院心内科住院患者,共入选 57 例,经临床诊断为冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart disease, CHD)。其诊断根据典型的临床表现、肌钙蛋白及心肌酶学、心电图等指标,符合 WHO 关于冠心病的诊断标准。其中急性心肌梗死(AMI)组 31 例,男 28 例,女 3 例,平均年龄(68.6±17.3)岁;稳定性心绞痛(SA)组 7 例,男 5 例,女 2 例,平均年龄(71.1±11.9)岁;不稳定性心绞痛(UA)组 19 例,男 14 例,女 5 例,平均年龄(73.6±11.4)岁。正常对照组:共入选 38 例健康体检者,既往无冠心病史,血常规、血脂、肝肾功能指标均正常,无其他自身免疫性疾病及急、慢性炎症,其中男 20 例,女 18 例,平均年龄(42.0±10.7)岁。以上入选者均空腹采集静脉血 10 ml,其中 5 ml 用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,用于 PBMCs 提取,5 ml 不抗凝用于血脂及肝肾功能测定等。

1.2 主要仪器和试剂 主要试剂:柱式小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒、RNAGuard Reagent(上海华舜生物试剂公司)、淋巴细胞分离液(上海国药集

团化学试剂有限公司),ReverTra Ace™逆转录试剂盒(ToYoBo,Japan),SYBR Green Realtime PCR Master Mix(ToYoBo,Japan),DL2000 DNA Marker、10×loading buffer(TaKaRa,Japan),Siglec-1 及内参 GAPDH 引物合成(上海生工生物技术公司)。主要仪器:KuBoTa 5420 台式高速离心机(KuBoTa,Japan),Backman 721 型紫外分光光度仪(Backman,USA),全自动生化分析仪(Beckman,USA),ABI PRISM 7000 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems,USA),水平电泳仪(Bio-Rad,Sweden)。

1.3 引物的设计与合成 根据 GenBank 中人 Siglec-1(gi:89142743)和 GAPDH(gi:33871196)的 mRNA 序列,利用 Primer Express 2.0 软件设计基因专一性的引物。Siglec-1 的上游引物 5'-GGC TGT TAC GAT GGT TTA TGA TGT-3',下游引物 5'-AAT CAA AGG CAT CAT TTT AGG GAT A-3',扩增子 82 bp;GAPDH 的上游引物 5'-CCA TCA ATG ACC CCT TCA TTG-3',下游引物 5'-CAT GGG TGG AAT CAT ATT GGA AC-3',扩增子 66 bp。引物设计完成后交上海生工生物技术公司合成。

1.4 实验方法

1.4.1 血脂水平的测定 采用 BECKMAN CX4 全自动生化分析仪。按生化常规测定各组 CHD 患者和健康对照者血脂水平,包括酶法测定总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),抗体阻碍法测高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),免疫比浊法测定脂蛋白 a(Lip a)。结果判定:TC、TG、HDL-C、LDL-C 和 Lip a 等,均在正常参考值范围内的即为 CHD 血脂正常者,上述指标有任何一项超出正常参考值范围者,即为 CHD 血脂异常组。

1.4.2 分离 PBMCs 和提取细胞总 RNA 取 3 ml EDTA-K₂ 抗凝的全血,加入等体积生理盐水稀释后,以 5 ml 的淋巴细胞分离液按密度梯度离心法分离单个核细胞,1 000×g 离心 30 min,收集单个核细胞层,用 pH 7.2 PBS 缓冲液 160×g 离心 10 min 洗涤细胞 2 次,收集细胞沉淀,加入 1.5 ml RNA-guard Reagent 吹打混匀后保存于-20℃备用。提取细胞总 RNA,操作严格按照上海华舜生物试剂公司的柱式小量组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒的说明书进行。分别通过 1.2%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪,检测所得总 RNA 的质量和浓度。

1.4.3 cDNA 的合成和荧光定量 PCR 检测 Siglec-1 的表达 cDNA 的合成:采用 ReverTra Ace™ 反转录试剂盒, RNase free water 3 μl , 5 \times RT buffer 4 μl , dNTP mix(各 10 mmol/L) 2 μl , RNase Inhibitor (10 U/L) 1 μl , Oligo dT20 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μl , 总 RNA 8 μl , ReverTra Ace 1 μl , 共 20 μl 的反应体系。42 $^{\circ}\text{C}$ 20 min, 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 瞬时离心。所得 cDNA -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存储备用。PCR 扩增目的 DNA 片段: SYBR Green Realtime PCR Master Mix 25 μl , 双蒸水 13 μl , 上下游引物各 1 μl (用 Siglec-1 和 GAPDH 的特异性引物分别扩增 Siglec-1 和 GAPDH 的目的 DNA 片段), cDNA(用双蒸水稀释 10 倍) 10 μl , 共 50 μl 的反应体系, 每个样本做 3 复孔, 同时设不加模板 cDNA 的阴性对照。在 ABI PRISM 7000 荧光定量 PCR 仪上进行扩增, 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 循环 40 次。扩增完成后从 60 $^{\circ}\text{C}$ 开始升温作溶解曲线验证扩增产物的特异性。反应完成后设定基线值(baseline)和阈值(threshold), 读取阈循环(C_t)值。根据公式 $\Delta C_t = [C_t(\text{目的基因})] - [C_t(\text{内参基因})]$ 和 $\Delta\Delta C_t = [\Delta C_t(\text{冠心病组})] - [\Delta C_t(\text{对照组})]$, 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 即为冠心病组 Siglec-1 表达量相对于正常组的倍数。

1.4.4 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳 收集 PCR 扩增产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶在 1 \times TAE 缓冲液中电泳检测 PCR 扩增产物。

1.5 统计学处理 标本平行重复检测 3 次取均值, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组资料之间比较用方差分析, 两组之间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 的纯度与浓度鉴定 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度仪检测 RNA 的纯度和浓度, RNA 标本均显示 28S、18S 和 5S 三个条带, 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的 2 倍, 说明抽提 RNA 完整性较好。选取 D_{260}/D_{280} 比值 1.8~2.2 为合格标本进行下一步实验。

2.2 Siglec-1 PCR 扩增产物鉴定 PCR 扩增曲线如图 1 所示, 扩增曲线呈平滑 S 型。Siglec-1 扩增产物溶解曲线如图 2 所示, 曲线呈单峰状, 说明扩增特异性较好。收集 Siglec-1 PCR 扩增产物, 取 10 μl 用

1.5% 琼脂糖凝胶在 1 \times TAE 电泳缓冲液中电泳检测 PCR 扩增产物, 结果如图 3 所示。电泳结果显示, PCR 扩增产物呈单一亮带, 大小约为 82 bp, 与预期片段大小一致, 说明 PCR 反应成功, 扩增特异性较好。

2.3 Siglec-1 mRNA 在 CHD 患者各组和健康对照者中的表达量 AMI 组、SA 组和 UA 组 Siglec-1 mRNA 的表达量均显著高于健康对照组 ($P < 0.01$), 分别为对照组的 3.32(1.38~7.97)、2.56(0.88~7.42)、3.35(1.25~8.96) 倍。而 3 组之间的 Siglec-1 mRNA 表达量无显著差异。

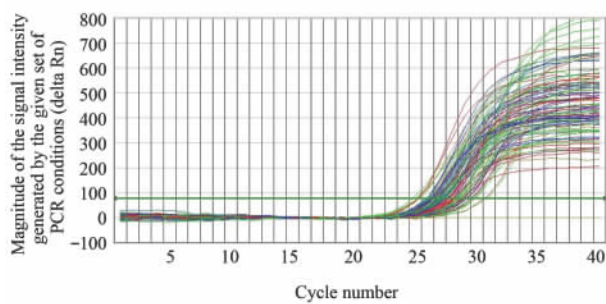


图 1 Siglec-1 PCR 扩增曲线图

Fig 1 PCR amplification curve of Siglec-1

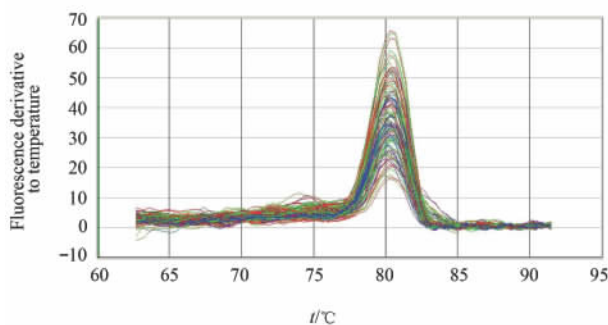


图 2 Siglec-1 扩增产物溶解曲线图

Fig 2 Dissociation Curve of PCR products

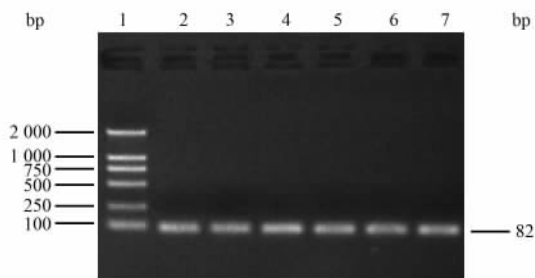


图 3 RT-PCR 扩增 Siglec-1 目的片段电泳图

Fig 3 Agarose gel electrophoresis of Siglec-1 RT-PCR products

1: DL2000 DNA ladder marker; 2-7: Siglec-1 RT-PCR products

2.4 Siglec-1 mRNA 的表达量与血脂水平 57 例 CHD 患者血脂正常者共 31 例,异常者共 26 例。CHD 血脂正常组、异常组的 Siglec-1 mRNA 均高于正常对照组,分别为对照组的 3.64(1.62~8.18)和 2.79(0.99~7.89)倍,差异具有统计学意义($P < 0.01$);而 CHD 血脂异常组与正常组之间无显著差异。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线或 ΔC_t 值对未知模板进行定量分析的方法。可分为绝对定量和相对定量,本实验采用的是比较 ΔC_t 值的相对定量 PCR 方法,避免了标准曲线的绘制,既简单快捷,又达到了比较疾病相关基因的目的^[4]。

在类风湿性关节炎患者中,可以观察到炎症部位表达 Siglec-1 的巨噬细胞含量增加^[2];HIV 感染并具有高病毒载量的患者中,其外周血单核细胞上 Siglec-1 基因表达比正常人高 10 倍^[5];在增殖性肾小球肾炎中,Siglec-1 的表达与蛋白尿水平呈正相关^[6];系统性硬化患者外周血单核细胞上 Siglec-1 表达增加,IFN- α 和 TLR 能刺激其表达上调^[7];在抗原肽诱导的实验性自身免疫性葡萄膜视网膜炎中,Siglec-1 基因敲除小鼠表现为视网膜炎减轻,从引流淋巴结分离出的 T 细胞显示出体外低增殖活性^[8]。上述发现证实了 Siglec-1 在炎症反应时参与 T 细胞活化中起重要作用。

虽然 AS 确切的发病机制至今尚未阐明,近些年的研究已经将免疫炎症与 AS 形成和斑块破裂联系在一起,包括天然免疫和获得性免疫在内的免疫机制在 AS 的发生发展中起重要作用^[9]。本实验利用实时荧光定量 RT-PCR 技术,检测 57 例 CHD 患者及 38 例健康对照者外周血细胞 Siglec-1 的表达,从基因水平探讨了 Siglec-1 在冠心病患者外周血细胞的表达变化。实验结果表明 CHD 组 Siglec-1 mRNA 的表达量显著高于健康对照组,但不同的 CHD 患者组,包括 AMI 组、SA 组和 UA 组之间的

Siglec-1 表达量无显著差异,并且在 CHD 血脂异常组与正常组之间无显著差异,说明 Siglec-1 的表达量在 CHD 患者中的上调与血脂正常与否无明显相关性。

本研究结果初步提示外周血单核细胞 Siglec-1 激活及其介导的炎症反应与动脉粥样硬化的发生发展存在一定相关性。但是 Siglec-1 在动脉粥样硬化发病过程中究竟起到什么作用,是否通过黏附血管内皮及吞噬脂质而参与动脉粥样硬化发生发展,仍需要进一步研究探索。

[参考文献]

- [1] Crocker P R, Paulson J C, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 255-266.
- [2] Hartnell A, Steel J, Turley H, Jones M, Jackson D G, Crocker P R. Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations[J]. *Blood*, 2001, 97: 288-296.
- [3] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340: 115-126.
- [4] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression[J]. *Methods*, 2001, 25: 386-401.
- [5] Pulliam L, Sun B, Rempel H. Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load [J]. *J Neuroimmunol*, 2004, 157: 93-98.
- [6] Ikezumi Y, Suzuki T, Hayafuji S, Okubo S, Nikolic-Paterson D J, Kawachi H, et al. The sialoadhesin (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20: 2704-2713.
- [7] York M R, Nagai T, Mangini A J, Lemaire R, van Seventer J M, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and Toll-like receptor agonists [J]. *Arth Rheum*, 2007, 56: 1010-1020.
- [8] Jiang H R, Hwenda L, Makinen K, Oetke C, Crocker P R, Forrester J V. Sialoadhesin promotes the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *J Immunol*, 2006, 177: 2258-2264.
- [9] Hansson G K, Libby P, Schönbeck U, Yan Z Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2002, 91: 281-291.

[本文编辑] 尹 茶