

研究简报

应用高通量实时荧光定量 PCR 方法筛选 FL 细胞 对低剂量微囊藻毒素 LR 暴露的应答基因

王秀敏¹ 邵敏华² 卢大儒² 徐立红¹ 余应年³

(1. 浙江大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 杭州 310031; 2. 复旦大学遗传学研究所, 上海 200433;
3. 浙江大学医学院病理生理学教研室, 杭州 310031)

USING HIGH THROUGHPUT REAL TIME FLUORESCENCE QUANTITATIVE PCR TO SELECT RESPONSE GENES OF FL CELL EXPOSED TO MICROCYSTIN LR

WANG Xiu-Min¹, SHAO Min-Hua², LU Da-Ru², XU Li-Hong¹ and YU Ying-Nian³

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031; 2. Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433; 3. Department of Pathophysiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031)

关键词: 微囊藻毒素 LR; 应答基因; 高通量; 实时荧光定量 PCR

Key words: Microcystin LR; Response gene; High-throughput; Real time fluorescence quantitative PCR

中图分类号: Q3-3; Q343.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)06-0909-03

微囊藻毒素是蓝藻的一些属产生的单环七肽,在发生水华的水体中普遍存在^[1]。含有微囊藻毒素的水华能引起野生动物、鱼类、家畜、家禽等中毒和死亡,也对人类健康构成严重威胁^[2,3]。流行病学调查发现,人群原发性肝癌、大肠癌发病率与饮用水中的微囊藻毒素有关^[4]。其中微囊藻毒素 LR 是微囊藻毒素中最常见的一种,因其高急性毒性,强促癌活性而受到广泛的关注。有研究结果表明微囊藻毒素 LR 可引起多种细胞发生凋亡^[5],本实验室先前的研究也发现微囊藻毒素 LR 能激活在凋亡过程中起重要作用的酶 Caspase-3^[6],及引起 P53、Bax、Bcl-2 等凋亡相关蛋白表达变化^[7,8],但其详细的致毒机制仍知之甚少。从预防和早期检测角度出发,毒素的低剂量效应引起人们越来越广泛的关注,低浓度微囊藻毒素 LR 暴露后细胞特异的应答基因方面的文献国内外报道很少。近年来,随着高通量基因芯片技术的发展和广泛运用,使得高通量的目的基因筛选成为可能。因此,本研究应用高通量实时荧光定量 PCR 方法研究细胞在低浓度微囊藻毒素 LR 暴露后其基因在 mRNA 水平上的改变,进而筛选其特异的应答基因。这不仅能为研究微囊藻毒

素的毒性机理研究提供新的方向,也可以得到一些更有效的指标来指示和检测早期低浓度的微囊藻毒素暴露。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 微囊藻毒素 LR 购自 Merck 公司; Eagle's MEM 干粉培养基和新生牛血清购自 Gibco 公司; 焦炭酸二乙酯 (DEPC) 购自 Sigma 公司; TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; 去除 DNA 污染的 DNA-freeTM 试剂盒购自 Ambion 公司; TaqMan 基因表达试剂盒含微流卡 (Micro fluidic card, P/N 4342259, 样式 7), TaqMan 通用 PCR 混合液 (TaqMan universal PCR master mix, P/N 4304437) 及 RNA 反转录试剂盒 (High Capacity cDNA archive kit, P/N 4322171) 购自 ABI 公司。每张微流卡上含有 384 个基因 (96 个基因 ×4 次重复), 96 个基因包括 1 个 18s 内对照和 95 个目的基因, 这些目的基因由本实验室的基因芯片实验筛选所得。

1.2 细胞培养和处理 人胚胎羊膜上皮 FL 细胞株由本实验室保存, 培养液包含 MEM、10% 新生牛血清、100 U/mL 青霉素钠和 100 U/mL 硫酸链霉素。细胞处理使用不加血清的

收稿日期: 2006-01-20; 修订日期: 2006-12-15

基金项目: 国家重大基础研究规划 (2002CB512901); 国家自然科学基金重点项目 (20137010); 教育部博士点基金 (20020335078); 国家重大基础研究规划 (2002CB512902) 资助

作者简介: 王秀敏 (1981—), 男, 浙江台州人; 硕士; 研究方向为生化毒理学。E-mail: xlhlab1@zju.edu.cn

通讯作者: 徐立红, E-mail: xulihong@zju.edu.cn; 余应年, E-mail: ynyu@mail.hz.zj.cn

培养液,对照组含 0.1 %的 DMSO,处理组含 0.1 %DMSO 和 0.2 μmol/L 的微囊藻毒素 LR (浓度的选择参照先前的基因芯片实验时使用的浓度),培养环境为 37 ℃,5 % CO₂,饱和湿度。细胞传代培养至对数生长期,换上处理液培养 2h,然后用 Hanks 液洗细胞两次,换上新鲜的培养液,恢复培养 4h。细胞复苏、传代、处理严格按照无菌操作。

1.3 细胞总 RNA 提取和纯化 细胞恢复培养 4h 后,倒去培养液,以磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,加入 TRIzol 试剂完全裂解细胞,收集细胞裂解液,分装贮存于 - 70 ℃。取 1 mL 裂解液,氯仿抽提,异丙醇沉淀回收总 RNA。以 1 %琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计 OD260/280 鉴定 RNA 纯度和浓度。取 10 μg 总 RNA,用 DNA-freeTM试剂盒纯化回收 RNA,去除 RNA 中可能存在的 DNA 污染。纯化后总 RNA 以相同方法鉴定 RNA 纯度和浓度后贮存于 - 70 ℃备用。RNA 提取和纯化过程使用的枪头,EP 管和去离子水等都经 DEPC 处理,容器经高温干烤,以防止 RNase 的污染。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 取 1 μg 纯化后总 RNA,用 High Capacity cDNA archive kit 反转录试剂盒合成单链 cDNA 模板,保存于 - 20 ℃备用。PCR 反应及数据采集在 ABI Prism 7900HT Sequence Detection System 系统上进行。微流卡每孔已分别含有 18s RNA 或目的基因的上下游引物和 TaqMan MGB 探针 (5'-G-FAM 标记)。将适量的 cDNA 模板 (每孔大约含有从 1 ng 总 RNA 反转录而来的 cDNA 模板)、TaqMan PCR Master Mix 和去离子水按比例混合液后,加到微流卡上,短暂离心后,封闭反应孔,PCR 扩增。PCR 循环参数为:50 ℃,2min;94.5 ℃,10min;然后 97 ℃,15s,59.7 ℃,30s,循环 40 次。PCR 完成后,在 ABI Prism SDS 2.1 软件上,经自动分析,查看每个基因的扩增情况,导出相应的阈值循环数值 (Threshold cycle value, 简写 C_t 值,定义为荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数,目的基因的拷贝数与 C_t 值呈负相关)。以 18s rRNA 为阳性内对照基因来校正 PCR 模板的细胞拷贝数 (ΔC_t 目标基因 = C_t 目标基因 - C_t 同样本 18s),从而消除组间的加样量误差,重复 3 次。处理组的 ΔC_t 平均值减去其对照组的 ΔC_t 平均值得到每个目的基因相对循环数 ($\Delta\Delta C_t$ 值) 即 $\Delta\Delta C_t$ 目标基因 = 处理组 ΔC_t 目标基因 - 对照组 ΔC_t 目标基因,相对量 (表达变化倍数) 计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法。

1.5 统计分析 每个目的基因得到对照组三个 C_t 值和处理组三个 C_t 值,采用 Student's t-test 做统计检验。p < 0.05, 认为有显著性差异。

2 结果和讨论

所有基因的扩增曲线见图 1 (校正荧光信号值的对数 (ΔR_n) 相对于循环数作图)。18s 内对照扩增良好,95 个目的基因除 5 个在三次重复中均没有检测到扩增 (第三次重复还有另一目的基因未检测到扩增),其他的 90 个基因均检测到扩增。最先出现的是 18S 的扩增曲线,其 C_t 值在 10 左右,大部分目的基因的 C_t 值在 20—35 之间。图右下角的 5 条曲线是未检测到扩增的基因。本次实验共检测到

17 条目的基因表达有变化 (p < 0.05),这些基因的表达均上调了,详见表 1。

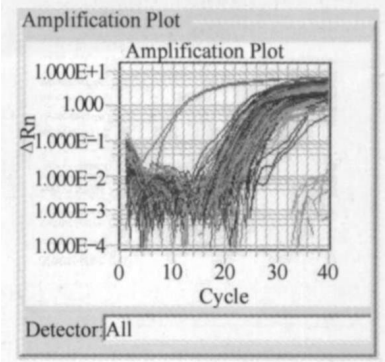


图 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线
Fig. 1 Amplification curve of real time fluorescence quantitative PCR

表 1 0.2 μmol/L 的微囊藻毒素 LR 处理后 FL 细胞表达上调的基因

Tab. 1 Up-regulated genes of FL cell exposed to 0.2 μmol/L microcystin LR		
Gene Symbol	Gene name	Average fold change
ASPM	asp (abnormalspindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	2.51 *
CCNE2	cyclin E2	1.65 *
CDK6	cyclin-dependent kinase 6	1.86 *
HNRPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	1.77 *
IRS1	insulin receptor substrate 1	1.67 *
ITPR1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1	1.97 *
KIAA0276	KIAA0276 protein	1.57 *
MASK	Mst 3 and SOK1-related kinase	1.72 *
MBNL1	Muscleblind-like (Drosophila)	1.83 *
MBNL2	Muscleblind-like 2 (Drosophila)	1.95 *
MIB1	mindbomb homolog 1 (Drosophila)	1.76 *
NNT	nicotinamide nucleotide transhydrogenase	1.68 *
PEG10	paternally expressed 10	2.23 **
RANBP2	RAN binding protein 2	2.41 *
RPS20	ribosomal protein S20	1.40 *
SCYL2	SCYL-like 2 (S. cerevisiae)	2.06 *
TRIM33	tripartite motif-containing 33	1.73 *

* p < 0.05, ** p < 0.01

实时荧光定量 PCR 是目前最可靠的检测基因在转录水平上表达变化的一种手段。本研究应用 ABI 公司的实时荧光定量 PCR 微流卡来高通量检测低浓度微囊藻毒素暴露后 FL 细胞基因表达的变化,这在国内外文献中尚无报道。高通量实时荧光定量 PCR 技术和基因芯片的联合应用可为大规模的筛选应答基因提供更快速、可靠的手段。

本次实验检测到的有变化的目的基因涉及细胞功能的

多个方面。有细胞周期调节相关基因:CCNE2、CDK6;信号通路相关的受体及激酶:IRS1、ITPR1、MASK;与 RNA 转录和蛋白合成相关的:HNRPH1、RANBP2、TRIM33;能量代谢相关的:NNT;发育相关的基因:MBNL1、MBNL2;还有一些未知功能的基因:ASPM、KIAA0276、MIB1、PEG10、SCYL2。

周期蛋白 E2 (Cyclin E2) 是周期蛋白 E 家族中新发现的一个成员^[9-11],编码一个与周期蛋白 E1 高度同源的 404 个氨基酸残基的蛋白质。与周期蛋白 E1 相似,Cyclin E2 结合 Cdk2 形成功能性的激酶复合物,磷酸化组蛋白 H1 和 Rb 等一些细胞周期相关蛋白,促进细胞 G₁ 期到 S 期的转化。Cyclin E2 的过表达会导致 G₁ 期的缩短和 S 期细胞的增多^[9],在很多人源恶性肿瘤中检测到 cyclin E2 的表达异常^[12]。周期蛋白依赖激酶 6 (CDK6) 通过与 cyclin D1 结合而被活化,继而促进细胞通过 G₁ 期^[13]。以周期蛋白/CDKs/CKI/pRb 为核心的 G₁/S 期细胞周期网络的调控系统,是肿瘤发生、发展中最常改变的共同通路^[14]。低浓度的微囊藻毒素处理后 H₂O₂ 细胞 cyclin E2 和 CDK6 的表达均上调了,提示 G₁/S 期细胞周期调控可能是毒素作用的一个靶点。

1,4,5-三磷酸肌醇受体 1 (Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor) 是 1,4,5-三磷酸肌醇受体 3 个家族成员中最先发现的一个^[15]。1,4,5-三磷酸肌醇受体是存在于内质网、肌浆网及核膜上的一种配体门控 Ca²⁺ 释放通道蛋白,精确地调控胞浆内 Ca²⁺ 浓度的变化,从而通过钙信号对细胞内许多生理过程如细胞分裂、增殖、生长、凋亡、功能发挥调节作用^[16,17]。本实验中毒素处理后 H₂O₂ 细胞的 1,4,5-三磷酸肌醇受体 1 基因上调了将近 2 倍,提示其可能是微囊藻毒素的一个应答基因。

MASK (Mst3 and SOK1-related kinase) 是最近发现的人 GCK 激酶家族的成员,和家族的其他成员一样 MASK 不激活任何 MAPK 通路。MASK 在各个器官组织广泛表达,但其过表达可诱导细胞的凋亡^[18]。研究已显示微囊藻毒素 LR 可引起多种细胞发生凋亡,激活 caspase,引起凋亡相关蛋白表达改变等^[5-7],在本实验中微囊藻毒素处理后 MASK 表达上调,提示 MASK 可能参与微囊藻毒素 LR 介导的凋亡过程。

从本研究结果可以推断周期蛋白 E2、周期蛋白依赖激酶 6、1,4,5-三磷酸肌醇受体 1、MASK 等 4 个基因可能是低剂量微囊藻毒素 LR 暴露后细胞的应答基因,其具体的转录调节机制还有待于进一步的研究。而其他表达上调的基因,由于涉及的细胞生物学过程非常复杂,缺乏特异性,可能不适合作为微囊藻毒素作用的特异应答基因。

参考文献:

- [1] Carmichael W W. The toxins of cyanobacteria [J]. *Sci Am*, 1994, 270:64—72
- [2] Hallegraff G M. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase [J]. *Phycologia*, 1993, 32:79—99
- [3] Pouria S, D E Andrade A, Barbosa J, et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil [J]. *Lancet*, 1998, 352:21—26
- [4] Zhou L, Yu D, Yu H, et al. Drinking water types, microcystins and colorectal cancer [J]. *Chin J Prev Med*, 2000, 34(4):37—39 [周伦, 鱼达, 余海, 等. 饮用水源中的微囊藻毒素与大肠癌发病的关系. 中华预防医学杂志, 2000, 34(4):37—39]
- [5] McDermott C M, Nho C W, Howard W, et al. The cyanobacteria toxin, microcystin-LR can induce apoptosis in a variety of cell types [J]. *Toxicon*, 1998, 36:1981—1996
- [6] Fu W Y, Chen J P, Xu L H. Effect of microcystin-LR on caspase-3 in rat hepatocytes [J]. *China Environment Science*, 2004, 28(4):452—453 [傅文宇, 陈加平, 徐立红. Caspase-3 在微囊藻毒素诱导的细胞凋亡中的作用. 中国环境科学, 2004, 28(4):452—453]
- [7] Chen J P, Fu W Y, Wang X M, et al. Influence of microcystin-LR on the expression of apoptosis-related proteins in BRL-3A [J]. *China Environment Science*, 2004, 24(4):460—463 [陈加平, 傅文宇, 王秀敏, 等. 微囊藻毒素 LR 对 BRL-3A 凋亡相关蛋白表达的影响. 中国环境科学, 2004, 24(4):460—463]
- [8] Wang X M, Chen J P, Fu W Y, et al. Expression of P53 and Bax in rat liver induced by microcystin LR in vivo [J]. *Journal of Zhejiang University (Medical Science)*, 2005, 34(3):220—222 [王秀敏, 陈加平, 傅文宇, 等. 活体染毒时藻毒素 LR 诱导大鼠肝脏 P53 和 Bax 蛋白的表达. 浙江大学学报(医学版), 2005, 34(3):220—222]
- [9] Gudas J M, Payton M, Thukral S, et al. Cyclin E2, a novel G₁ cyclin that binds CDK2 and is aberrantly expressed in human cancers [J]. *Mol. Cell. Biol*, 1999, 19:612—622
- [10] Zariwala M, Liu J, Xiong Y M. Cyclin E2, a novel human G₁ cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins [J]. *Oncogene*, 1998, 17:2787—2798
- [11] Lauper N, Beck A R, Cariou S, et al. Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G₁ and S phases of the mammalian cell cycle [J]. *Oncogene*, 1998, 17:637—2643
- [12] Payton M, Scully S, Chung G, et al. Deregulation of Cyclin E2 expression and associated kinase activity in primary breast tumors [J]. *Oncogene*, 2002, 21:8529—8534
- [13] Meyerson M, Harlow E. Identification of G₁ kinase activity for cdk6, a Novel Cyclin D partner [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14:2077—2086
- [14] Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: defects in cell cyclin control and cancer [J]. *J. Pathol*, 1999, 187:95—99
- [15] Bezprozvanny I, Watras J, Ehrlich B E. Bell-shaped calcium response curves of Ins (1,4,5) P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum [J]. *Nature*, 1991, 351:751—754
- [16] Patterson R L, van Rossum D B, Kaplin A I, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, 73:437—465
- [17] Hanson C J, Bootman M D, Roderick H L. Cell signalling: IP₃ receptors channel calcium into cell death [J]. *Current Biology*, 2004, 14:933—935
- [18] Dan I, Ong S E, Watanabe N M, et al. Cloning of MASK, a novel member of the mammalian germinal center kinase III subfamily, with apoptosis-inducing properties [J]. *J. Biol. Chem*, 2002, 277:5929—5939