

## 实时荧光聚合酶链反应定量检测大鼠视网膜中 转化生长因子 $\beta 1$ 和 $\beta 2$ 的表达

沈炜 柳林 满晓波 刘志勇 李慎菁

【关键词】 转化生长因子  $\beta$ ; 基因表达; 视网膜; 动物实验替代实验

中图分类号: R446-39

转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 是一种具有控制增生和分化等生物过程的自分泌或旁分泌生长因子<sup>[1]</sup>。TGF- $\beta$  及其受体、细胞内下游信号转导分子的突变在糖尿病视网膜病变的发生、发展中扮演了非常重要的角色<sup>[2, 3]</sup>。研究 TGF- $\beta$  的不同成员在视网膜中的表达, 有助于深入了解它们的来源和作用机制。我们以实时荧光定量聚合酶链反应 (QRT-PCR) 检测 TGF- $\beta 1$  和 TGF- $\beta 2$  在大鼠视网膜中的表达, 为研究 TGF- $\beta$  在视网膜病变中的作用机制提供依据。

### 1 材料和方法

10 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供) 14 只, 体重 (200 $\pm$ 25) g。在通风良好、室温 18~22 C 环境中适应饲养 2 周后, 用 2% 戊巴比妥钠按 5 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉大鼠后, 摘除眼球。在无菌条件下于角膜缘后 0.5 mm 处沿赤道方向剪开眼球, 剥离出视网膜, 立即放入液氮保存。Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司) 提取视网膜总 RNA, 紫外分光光度仪测定其纯度和含量, 1% 甲醛变性凝胶电泳检测其完整性。引物及 TaqMan 荧光探针由上海申友公司合成, PCR 试剂购自上海申能博彩公司, 荧光定量 PCR 仪为 Bio-Rad iCycler (美国 Bio-Rad 公司)。

引物设计按照标准 QRT-PCR 引物设计原则, TaqMan 荧光探针选择 6-羧基荧光素 (FAM) 作为荧光报告基团, 6-羧基-四甲基-罗丹明 (TAMRA) 作为淬灭基团。针对大鼠 TGF- $\beta 1$  和 TGF- $\beta 2$  及内参照  $\beta$ -actin (ACTB) cDNA 序列设计 PCR 引物和 TaqMan 探针, 合成引物序列如下:

TGF- $\beta 1$ -F: 5' AACTACTGCTTCAGCTCCAC  
TGF- $\beta 1$ -R: 5' TGTGTCCAGGCTCCAAATGTA  
TGF- $\beta 1$ -TM: 5' FAMCAGAAGTTGGCATGGTAGCCC-  
TTGGG TAMRA  
TGF- $\beta 2$ -F: 5' ATGTGCAGGATAATTGCTGCC  
TGF- $\beta 2$ -R: 5' TGGTGTGTACAGGCTGAGG  
TGF- $\beta 2$ -TM: 5' FAMTGTGTGTGTCTGAACTCCAC-  
AGATTAMRA

ACTB-F: 5' GCCAACACAGTGCTGTCTG  
ACTB-R: 5' CACATCTGCTGGAAGGTGG  
ACTB-TM: 5' FAMAGTACTTGCGCTCAGGAGGAGC-  
TAMRA

根据文献[4]的方法进行定量 PCR 检测和分析。用荧光值曲线和 CT 值计算 TGF- $\beta$  和  $\beta$ -actin 的比值, 再进行视网膜中 TGF- $\beta 1$  和 TGF- $\beta 2$  基因表达水平的比较。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用两样本均数 *t* 检验。

### 2 结果

1% 甲醛变性凝胶电泳鉴定 18S 与 28S 条带清晰, RNA 无明显降解。紫外分光光度仪检测 260/280 波长吸光度值的比值均为 1.8~2.0。视网膜组织中的每种基因的定量 PCR 基线循环荧光值曲线, 临界循环数 (CT) 值接近。即使经过超过 40 个循环, TGF- $\beta 1$  的 PCR 产量仍较低, 而且线性期时间较短。

大鼠视网膜中 TGF- $\beta 2$  相对于  $\beta$ -actin 的基因表达水平为 0.037 8 $\pm$ 0.009 0, TGF- $\beta 1$  为 0.000 8 $\pm$ 0.000 3, 前者明显高于后者, 差异有统计学意义 ( $t=12.37, P<0.001$ ); 在视网膜中 TGF- $\beta$  的表达以 TGF- $\beta 2$  为主, TGF- $\beta 2$  和 TGF- $\beta 1$  比值的平均值为 55.00 $\pm$ 26.61。

### 3 讨论

TGF- $\beta$  在人及哺乳动物表达其中的 3 个亚型, 即 TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 、TGF- $\beta 3$ 。一般认为, TGF- $\beta 1$  在内皮细胞、造血细胞和结缔组织细胞中表达, TGF- $\beta 2$  在上皮细胞和神经细胞中表达, 而 TGF- $\beta 3$  主要在间叶细胞中表达, 说明 3 种 TGF- $\beta$  的生物学功能是不同的和不可替代的<sup>[5]</sup>。在视网膜组织中可同时表达 TGF- $\beta 1$  和 TGF- $\beta 2$ , 但是谁在视网膜组织中起主导作用呢? 在以往进行的视网膜 TGF- $\beta$  表达的研究中, 大部分的工作采用了免疫组织化学、RT-PCR 和 Northern blotting 方法, 但都只能半定量分析, 对于极少量的样品均不能在 mRNA 水平准确检测。

QRT-PCR 技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 可以对 mRNA 水平进行实时定量分析, 目前已得到广泛应用<sup>[6, 7]</sup>。在 QRT-PCR 技术中待检测目的基因和作为参照的看家基因标记不同的荧光染料可以在同一 PCR 反应体系中扩增, 也可以将目的基因和看家基因分别 PCR 反应。鉴于同一反应体系中的

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271391), 上海市百人计划资助项目 (057)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学附属长征医院眼科 (沈炜、柳林、刘志勇); 第二军医大学附属东方肝胆医院信号转导实验室 (满晓波、李慎菁)

通讯作者: 柳林, Email: linliu@public6.sta.net.cn

竞争抑制作用,在模板量和复管稳定性能保证的情况下,在不同的反应体系中得到的结果更加可靠。

我们对大鼠视网膜成功地进行了 QRT-PCR 检测,同一样品中的同一基因在不同复管中的 PCR 反应扩增曲线拟合良好,说明方法可靠。利用 QRT-PCR 技术除了能够准确检测之外,还能实时动态地观察到相应基因的 PCR 反应变化趋势。本实验结果表明,在大鼠视网膜中 TGF- $\beta$ 2 的 mRNA 转录水平明显高于 TGF- $\beta$ 1,是 TGF- $\beta$ 1 的 55 倍左右,差异有统计学意义。说明在视网膜中 TGF- $\beta$  的表达以 TGF- $\beta$ 2 为主,TGF- $\beta$ 1 的表达非常弱,这在 TGF- $\beta$  与视网膜病变关系研究中以 TGF- $\beta$ 2 为主要研究对象提供了理论依据。

#### 4 参考文献

1 Massagu'e J. TGF- $\beta$  signal transduction. Annu. Rev. Biochem., 1998, 67:753-791.

- 2 Kon CH, Occeleston NL, Aylword GW, et al. Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999,40:705-712.
- 3 Bochaton-Piallat ML, Kajetanios AD, Donati G, et al. TGF-beta1, TGF-beta receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: 2336-2342.
- 4 满晓波,唐亮,邱秀华,等.激光显微切割结合实时荧光聚合酶链反应定量检测肝脏中转化生长因子- $\beta$ 1 和- $\beta$ 2 的表达.中华实验外科杂志,2003,20:890-892.
- 5 Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF, et al. Role of transforming growth factor  $\beta$  in human diseases. The New England Journal of Medicine, 2000, 4:1350-1358.
- 6 Giuletta A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods, 2001, 25:386-401.
- 7 Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol, 2002, 30:503-12.

(收稿日期:2004-02-04)

(本文编辑:朱敏)

### · 消息 ·

## 第九届全国眼病理暨基础与临床诊治学术研讨会征文通知

由中华医学会眼科学分会眼病理学组与中华眼科杂志编辑部联合主办的第九届全国眼病理暨基础与临床诊治学术研讨会定于 2005 年 5 月在湖南省大庸市举行。

会议主要内容:(1)各种常见眼病的应用基础研究;(2)眼肿瘤、眼眶病的临床病理、影像学诊断以及应用基础研究(特别欢迎有关 RB、脉络膜黑色素瘤、眼睑肿瘤、眼眶炎性假瘤以及甲状腺相关眼病的题目);(3)眼部肿瘤的治疗研究(常用治疗方法经验总结,引进新的治疗方法,如:TTT,CTT,巩膜表层敷贴器, $\gamma$ 刀等),特别欢迎对恶性肿瘤术后的辅助疗法;预示转移和预后的组织病理学指标以及提示预防转移和治疗措施;(4)少见病例及疑难病例临床病理讨论纪要以及误诊、误治经验介绍;(5)眼病理知识讲座。

应征论文要求 800 字左右的含“目的、方法、结果、结论”四要素的“结构式”摘要和全文各一份。摘要必须包括论文的主要数据,资料等实质信息;摘要的脚注项应包括第一作者的性别、年龄、职称、工作单位、邮政编码、详细的通信地址、联系电话、Email 地址等内容。摘要用另纸书写或打印并请另附一张存有摘要和全文的、Word 格式的软盘。欢迎通过电子邮件投稿。凡已在公开刊物上发表的论文请勿投寄。征文截稿日期为 2005 年 2 月 28 日。论文经评选后另发开会通知。未入选者不予退稿,也不另发通知,请作者自留底稿。凡入选论文将编入《第九届全国眼病理学术会议论文汇编》,并择优在《中华眼科杂志》刊出。会议期间交流的论文将颁发论文证书。

来稿请挂号邮寄至北京东四西大街 42 号《中华眼科杂志》编辑部收,邮政编码:100710。联系人:王桂珍,杨庆庆。电话(传真):010-65273360,Email:cjo@cma.org.cn。来稿请在信封下角注明“眼病理会议征文”。

中华医学会眼科学分会眼病理学组

## 《国际眼科杂志》第三届眼科学术大会暨防盲研讨会

为支持西部大开发,加速湘西革命老区的经济发展和医疗卫生事业的发展,本刊定于 2005 年 4 月在湖南湘西张家界召开《国际眼科杂志》第三届眼科学术大会。大会主题:创新、交流、合作、发展。会议期间,大会组委会将从特邀嘉宾和参会代表中选定 100 名优秀眼科专家与当地共同组织“百名眼科专家送光明,献爱心大型义诊活动”,为老区人民造福,促进革命老区眼科与防盲事业的快速发展。参加大会义诊的专家名单及所在单位将在本刊公布,有突出贡献者,本刊将重点宣传。这将对眼科学术会议的重大改革和创新,必将是我国眼科界的一次盛会。

我们真诚欢迎全国广大眼科同道踊跃参加,同时也希望有关医疗单位大力支持。大会组委会诚邀有实力的知名企事业单位作为联办单位、协办单位及支持单位。有合作意向者请尽早与本刊联系。会议征文:本次大会只接受论文摘要(500~1000 字),届时将出版大会论文汇编。截稿日期:2005 年 3 月 15 日。秘书处:(710054)中国西安市友谊东路 269 号《国际眼科杂志》编辑部。

电话:029-82245172/83085628,传真:029-82245172,Email:IJO.2000@163.com。