

PDVI患者曲张大隐静脉组织中DMN水平的表达

殷恒讳¹, 王深明¹, 张 革², 银 巍², 王劲松¹

(中山大学 1. 附属第一医院血管外科, 2. 分子医学中心实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨 Desmuslin (DMN) 及其基因表达水平在原发性下肢深静脉瓣膜功能不全(primary deep vein valve insufficiency, PDVI)引起的大隐静脉曲张组织中的变化。【方法】分别用逆转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和 Western blotting 检测 PDVI 病人曲张大隐静脉以及正常人大隐静脉组织中 DMN 基因和 DMN 蛋白的表达水平,用图像分析软件分析电泳照片,比较两组标本条带积分光密度的差异。【结果】RT-PCR 中,病例组扩增的条带积分光密度为 $20\ 225.3 \pm 1\ 573.6$, 对照组为 $117\ 327.9 \pm 9\ 183.5$ ($P < 0.01$); Western blotting 中,病例组条带积分光密度为 $16\ 786.9 \pm 3\ 169.3$, 对照组为 $93\ 739.3 \pm 8\ 614.8$ ($P < 0.01$)。【结论】DMN 蛋白和 desmuslin 基因表达的下调可能与 PDVI 引起的大隐静脉曲张有关。

关键词: 静脉曲张; 逆转录; 聚合酶链式反应; desmuslin

中图分类号: R

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)03-217-04

DMN Expressing Level in the Varicose Great Saphenous Veins of Patients with Primary Deep Vein Valve Insufficiency

YIN Heng-hui¹, WANG Shen-ming¹, ZHANG Ge², YIN Wei², WANG Jin-song¹

(1. Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital, 2. Laboratory of Molecular Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the alteration of desmuslin (DMN) and the expressing level of its encoding gene in the tissues of varicose great saphenous vein of patients with primary deep vein valve insufficiency (PDVI). 【Methods】The desmuslin mRNA level was detected by the method of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The DMN protein was detected by Western blotting. 【Results】In RT-PCR, the average integrating optimal density of PCR products in patient group was $20\ 225.3 \pm 1\ 573.6$, comparing with $117\ 327.9 \pm 9\ 183.5$ of the control group. Statistical analysis by *t* examination indicated significant difference ($P < 0.01$). In Western blotting, the average integrating optimal density of the protein bands in the patient group was $16\ 786.9 \pm 3\ 169.3$, while that of the control group was $93\ 739.3 \pm 8\ 614.8$. Statistical analysis by *t* test examination indicated significant difference ($P < 0.01$). 【Conclusion】Down-regulation of the expressing level of DMN protein and its encoding gene may be a necessary role in the occurrence and development of great saphenous vein varicosity of patients with PDVI.

Key words: varicose vein; reverse transcriptase polymerase chain reaction; desmuslin

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(3): 217 ~ 220]

Desmuslin (DMN) 一种新确定的蛋白质, 属于 第 6 型间质丝蛋白 (intermediate filament protein,

收稿日期: 2002-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870800)

作者简介: 殷恒讳 (1973-), 男, 山东龙口人, 博士, 住院医师; 王深明, 教授, 博士生导师, 中华医学会广东外科学会血管外科学组主任委员, 本课题负责人。

IF)家族,广泛分布于各种肌细胞,对于维持肌细胞的完整性和肌肉组织的张力起着重要作用。原发性下肢深静脉瓣膜功能不全(primary deep vein valve insufficiency, PDVI)是血管外科的常见疾病,主要表现之一就是大隐静脉曲张^[1],曲张的大隐静脉和功能不全的股浅静脉中静脉管壁平滑肌组织薄弱、张力减退,管壁扩张松弛。我们对PDVI病人曲张大隐静脉管壁组织中DMN及其基因表达水平进行检测,发现DMN在曲张大隐静脉管壁组织中表达量显著降低,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本 12例病例组标本取自伴有大大隐静脉曲张的PDVI病人手术中切除的大隐静脉组织,12例对照组标本取自非血管疾病意外死亡的正常人大隐静脉组织。所有标本均在热缺血20 min内剪取隐-股瓣膜区组织,生理盐水漂洗后立即冻存于液氮中。

1.1.2 试剂 TRIzol Reagent和SUPERSCRIP TTM One-Step RT-PCR kit购自GIBCO BRL公司,PCR引物由上海申友公司合成,Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent购自Santa Cruz公司,兔抗人单克隆IgG由Yuji Mizuno教授惠赠。其余常用试剂主要购自上海生物工程公司以及北京中山试剂公司等。

1.2 PCR寡核苷酸引物

根据GenBank收录的desmuslin cDNA和 β -actin碱基序列,用primer premier 5.0软件设计desmuslin及 β -actin引物各一对,分别用于扩增desmuslin及 β -actin。 β -actin正向引物(forward):5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3',反向引物(reverse):5'-ATCATGTT TGAGACCTTCAACA-3'; desmuslin正向引物(forward):5'-CTTGCCAGG ATGAAATAG-3',反向引物(reverse):5'-AACCCAGG GTCAACGGAAGT-3'。合成片段的长度分别为300 bp和410 bp。

1.3 组织中desmuslin基因表达的检测

用TRIzol Reagent按厂家提供的方法提取组织总RNA,紫外分光光度仪上准确定量,将各例样品的浓度调节一致。然后使用SUPERSCRIP TTM One-Step RT-PCR kit进行一步法RT-PCR检测desmuslin mRNA的量,同时检测各例样品中

β -actin的表达量作为内参照。PCR反应条件为:逆转录42℃ 1 h;变性94℃ 45 s,退火54℃ 45 s,延伸72℃ 1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。反应产物在含溴化乙锭的10 g/L琼脂糖凝胶中电泳,用uvp-GDS 8000凝胶成像仪观察结果并拍照。

1.4 组织中DMN蛋白含量的检测

取冻存的组织标本,在冰冷的含1 mg/L胰蛋白酶抑制剂(aprotinin)和100 mg/L苯甲基磺酰氟(PMSF)的蛋白抽提缓冲液中冰上快速匀浆,4℃ 10 000 r/min(CS-15R台式低温离心机, $r=7.3$ cm)离心10 min,取上清迅速冻存于-70℃备用。用30 g/L牛血清白蛋白溶液作为标准蛋白质溶液,按照不同比例稀释后测量 A_{595} 值,以不同的标准蛋白浓度对 A_{595} 值作图,绘制蛋白质浓度标准曲线。测量各管样品上清液的 A_{595} 值,从曲线上查知蛋白浓度,将各管蛋白浓度调整一致。加入含40 g/L十二烷基硫酸钠(SDS)和0.2 mol/L二巯苏糖醇(DTT)的蛋白质上样缓冲液,冰上混匀后于100℃孵育10 min,每管样品取20 μ L在80 g/L聚丙烯酰胺分离胶中以120 V稳压电泳45 min。随即以恒流70 mA 3 h将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。30 g/L牛血清白蛋白(BSA)封闭1 h,用兔抗人的单克隆IgG按1:2 000的稀释度与膜一起4℃轻摇孵育过夜。次日用山羊抗兔并结合辣根过氧化物酶的IgG按照1:5 000的稀释度与膜孵育1 h以结合膜上的一抗,然后用Western Blotting Chemiluminescence Luminol Reagent发光试剂与膜孵育1 min,于暗室内曝光显影。

1.5 统计学分析

用图像分析软件分析照片,用SPSS 10.0软件包对各个条带的积分光密度值进行独立样本的 t 检验,检验水准, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Desmuslin基因在病例组与对照组中的表达水平

RT-PCR检测显示,从所有病例组标本中扩增出的条带亮度均明显弱于对照组的扩增产物条带(图1A)。图像分析所得的各个条带的积分光密度值,病例组为 $20\ 225.3 \pm 1\ 573.6$,对照组为 $117\ 327.9 \pm 9\ 183.5$ ($P < 0.01$);而两组之间 β -actin条带差异无统计学意义(积分光密度值分别

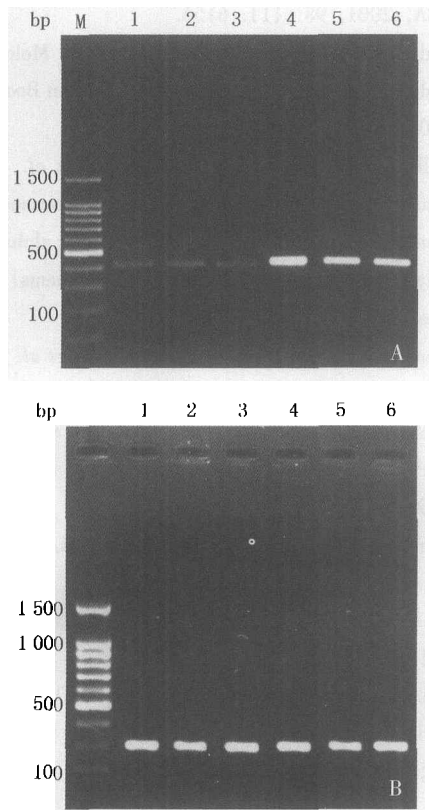


图1 PCR扩增病例组和对照组中 desmuslin 表达序列的 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 PCR amplification of desmuslin in the study and the control groups in 10 g/L agarose gel electrophoresis

A. PCR amplification of desmuslin M: DNA molecular size standards with unit of base pair(bp); Lane 1~3: PCR products of patient group; Lane 4~6: PCR products of control group. **B. PCR amplification of β -actin** M: DNA molecular size standards with unit of base pair (bp); Lane 1~3: PCR products of patient group. Lane 4~6: PCR products of control group. The result indicates that the expression of desmuslin gene in patients group are obviously down-regulated, while expression levels of the β -actin in the two groups are equal

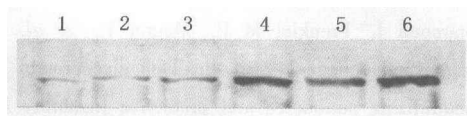


图2 Western blotting 检测 DMN 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of DMN protein in the patient and control groups evaluated by Western blotting

Lane 1~3: patient group; Lane 4~6: control group. The result indicates that DMN expression in the patient group is significantly lower than in normal people

为 $110\ 975.8 \pm 5\ 091.7$ 和 $111\ 055 \pm 5\ 194.5$, $P > 0.05$)(图 1B)。

2.2 Western blotting 检测 DMN 蛋白的表达

Western blotting 结果显示, 对照组中 DMN 的表达量明显高于病例组(图 2)。得到各个条带的积分光密度值, 病例组为 $9\ 3739.3 \pm 8\ 614.8$, 对照组为 $16\ 786.9 \pm 3\ 169.3$, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

PDVI 是血管外科的常见疾病, 由 PDVI 引起的大隐静脉曲张约占所有大隐静脉曲张病例的 70%~75%^[2]。在 PDVI 病人中, 曲张的大隐静脉与深部的股浅静脉一样存在着管壁平滑肌薄弱、张力减退, 静脉管壁的松弛、扩张等形态学的变化, 而这些变化是全身支持组织薄弱的的一个具体表现, 有其遗传学基础。详细了解这一变化背后的分子生物学事件是明确 PDVI 引起的大隐静脉曲张的发病机理、指导临床治疗的有效手段。

DMN 是一种新发现的 $M_r = 160 \times 10^3$ 大小的蛋白质分子^[3], 它广泛存在于骨骼肌、心肌以及平滑肌组织中。免疫荧光显微镜下观察发现在肌细胞的纵切面上, DMN 呈条纹状排列, 而在横切面上则呈以嵌合体形式存在。电子显微镜观察发现 DMN 与支架蛋白(desmin)一起位于骨骼肌的 Z 线附近。对 DMN 进行序列分析表明它具有间质丝蛋白(intermittent protein, IF)的信息^[4], 与第 6 型 IF 家族中的 synemin^[5], paranemin^[6], tanabin^[7] 以及 nestin^[8] 在空间结构上最为相似, 都有一个短的 N 端、一个保守的棒状区和一个长的 C 端, 因此 DMN 可能是第六型 IF 家族中的一员。IF 蛋白(包括 DMN 和支架蛋白)能够通过机械性地加强蛋白质分子之间的连接来帮助维持组织结构的完整。体外共免疫沉淀实验发现 DMN 能够通过它的棒状结构与支架蛋白以及一种膜蛋白 α -dystrobrevin 相互联系^[1], 而 α -dystrobrevin 是肌细胞增强蛋白相关蛋白复合体(the dystrophin-associated protein complex)的组分之一, 支架蛋白则是 Z 带的组分之一。支架蛋白环绕肌细胞的 Z 带, 并且在相邻的 Z 带之间建立丝蛋白桥梁, 而 DMN 则通过 α -dystrobrevin 和支架蛋白形成了细胞外基质和 Z 带之间的蛋白质连接。这些蛋白连接对肌肉组织的结构完整性来讲至关重要, 任何环节遭到破坏都可能影响到肌肉组织的完整性。

本实验表明在 PDVI 引起的曲张大隐静脉中, DMN 的含量明显少于正常静脉组织, 同时其编码基因的表达水平也显著下调。虽然 DMN 的具体功能和在此所起的作用还不清楚, 但是这一结果至少说明 DMN 与该疾病的发生发展过程有关。鉴于 PDVI 的原发部位 - 股浅静脉也存在着与曲张大隐静脉相似的形态学改变, 所以 DMN 可能在 PDVI 的发生发展中也起着一定的作用。

对于 DMN 与曲张大隐静脉乃至 PDVI 本身的确切关系, 我们将继续进行深入研究。

参考文献:

- [1] 张柏根. 原发性下肢深静脉瓣膜关闭不全 [A]. 见: 吴在德. 外科学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 687 ~ 689.
- [2] 王深明, 胡作军, 黄雪玲. 下肢深静脉瓣膜重建术的疗效评价 [J]. 中国实用外科杂志, 2001, 21(5): 273.
- [3] Mizuno Y, Thompson T G, Guyon J R, *et al.* Desmulin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin[J]. Proc Natl Acad Sci

USA, 2001, 98 (11): 6156.

- [4] Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al.* Molecular cell biology[M]. New York: Scientific American Books, 1995. 1106 ~ 1116.
- [5] Bellin R M, Sernett S W, Becker B, *et al.* Molecular characteristics and interactions of the intermediate filament protein synemin. Interactions with alpha -actinin may anchor synemin-containing heterofilaments[J]. J Biol Chem, 1999, 274(41): 29493.
- [6] Hemken P M, Bellin R M, Sernett S W, *et al.* Molecular characteristics of the novel intermediate filament protein paranemin. Sequence reveals EAP-300 and IFAPa-400 are highly homologous to paranemin[J]. J Biol Chem, 1997, 272(51): 32489.
- [7] Hemmati B A, Mann R W, Harland R M. A protein expressed in the growth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein [J]. Neuron, 1992, 9(3): 417.
- [8] Lendahl U, Zimmerman L B, McKay R D G. CNS stem cells express: a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990, 60(4): 585.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 216 页 from page 216)

组 E 蛋白保留了其生物学活性, 为今后重组 E 蛋白的大规模生产及其亚单位疫苗的研制提供了有利条件。

用针对 N- 联甘露糖链的内糖苷酶 H 处理重组 E 蛋白显示, 其相对分子质量减小 $(5 \sim 6) \times 10^3$, 提示该重组 E 蛋白被添加的高甘露糖残基修饰, 与 *P. pastoris* 正常加工糖基化的 E 蛋白相符^[6]。另一方面, 动物免疫试验显示, 纯化的重组 E 蛋白可诱导鼠产生 D2V 型特异的高滴度抗体, 其作用类似于灭活的 D2V 疫苗, 表明该重组 E 蛋白具有免疫原性, 但对同型病毒攻击的保护作用有待验证。

由于该酵母系统表达产物无超糖基化现象^[7], 分泌的重组 E 蛋白纯化方法简便, 获得的全长蛋白具有较完整的生物学特性, 对于发展 DV 亚单位疫苗具有诱人的前景。

参考文献:

- [1] Leclerc C, Derlaud E, Megret E, *et al.* Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein [J]. Molec Immunol, 1993, 30(7): 613.

- [2] 闻玉梅. 现代医学微生物学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999. 1117 ~ 1143.
- [3] 魏惠永, 江丽芳, 薛耀华, 等. 登革 2 型病毒 E 蛋白在酵母菌中的分泌表达 [J]. 中国病毒学, 2002, 17(3): 198.
- [4] Simmons M, Nelson W M, Wu S J, *et al.* Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice [J]. Am J Trop Med Hye, 1998, 58(5): 655.
- [5] Staropoli I, Frenkiel M P, Megret F, *et al.* Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice [J]. Vaccine, 1997, 15(19): 1946.
- [6] Sugrue R J, Cui T, Xu Q, *et al.* The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [J]. J Virol Methods, 1997, 69(1-2): 159.
- [7] Grinna L S, Tshopp J F. Size distribution and general structural features of N-linker oligosaccharides from the methylotropic yeast *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1989, 5(1): 107.

(编辑 张敏瑞)