

·技术交流·

## 以地高辛标记探针检测瘦素基因的表达

徐明彤<sup>1</sup>, 钟光恕<sup>1</sup>, 程桦<sup>1</sup>, 黎锋<sup>1</sup>, 邓庆丽<sup>2</sup>, 傅祖值<sup>1</sup>

(中山医科大学孙逸仙纪念医院 1. 内分泌研究室, 2. 分子医学研究中心, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】以地高辛(DIG)标记探针检测汉族肥胖者瘦素(leptin)基因的表达。【方法】以 DIG 用随机引物法标记瘦素 cDNA 片段, 以此探针, 采用斑点杂交方法检测 11 例汉族正常体重者(体重指数, BMI 为  $21.0 \text{ kg/m}^2 \pm 1.5 \text{ kg/m}^2$ ) 和 12 例汉族肥胖者(BMI 为  $28.5 \text{ kg/m}^2 \pm 2.3 \text{ kg/m}^2$ ) 腹部皮下脂肪组织瘦素 mRNA 的表达水平。【结果】DIG leptin cDNA 探针可检出 5  $\mu\text{g}$  的 pUC-leptin DNA, 与 pUC19 DNA 无杂交信号。肥胖组腹部皮下脂肪组织瘦素 mRNA 相对含量明显高于对照组( $312.8 \pm 108.9$  vs  $175.9 \pm 81.5$ ,  $P < 0.05$ ); 且与 BMI 呈正相关( $r = 0.56$ ,  $P < 0.05$ )。【结论】肥胖者脂肪组织瘦素 mRNA 水平明显增高, 且与 BMI 呈正相关。

关键词: 肥胖; 瘦素; 基因表达; 地高辛配基

中图分类号: R589.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2001)01-0079-02

## Detection of Leptin mRNA Expression Obese Subjects with Digoxigenin Labeled Probe

XU Ming-tong<sup>1</sup>, ZHONG Guang-shu<sup>1</sup>, CHENG Hua<sup>1</sup>, LI Feng<sup>1</sup>, DENG Qing-li<sup>2</sup>, FU Zu-zhi<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrinology, 2 Molecular Medical Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To study the expression of leptin mRNA in Chinese obese subjects using dot blot hybridization with a digoxigenin labeled probe. 【Methods】11 Chinese nonobese subjects (body mass index, BMI  $21.0 \text{ kg/m}^2 \pm 1.5 \text{ kg/m}^2$ ) and 12 Chinese obese subjects (BMI  $28.5 \text{ kg/m}^2 \pm 2.3 \text{ kg/m}^2$ ) participated in the study. The human leptin cDNA probe was labeled with digoxigenin (DIG) by the random priming method. Expression of leptin mRNA in abdominal adipose tissue has been examined using dot blot hybridization with this probe. 【Results】The expression of leptin mRNA was significantly higher in obese subjects than in non-obese ones ( $312.8 \pm 108.9$  vs  $175.9 \pm 81.5$ , relative units,  $P < 0.05$ ), and correlated with BMI ( $r = 0.56$ ,  $P < 0.05$ ). 【Conclusions】Leptin mRNA level is high in obese subjects, and correlated with BMI.

**Key words:** obesity; leptin; gene expression; digoxigenin

瘦素(leptin)基因(旧称肥胖基因, obese gene)是近年发现的参与体重调节的重要基因之一<sup>[1]</sup>。国外研究表明人类肥胖由于瘦素基因突变所致者少见, 而主要表现为瘦素基因表达增强<sup>[2~4]</sup>。我们以地高辛(digoxigenin, DIG)标记探针, 采用 RNA 斑点印迹杂交技术, 检测汉族人肥胖者脂肪组织瘦

素基因 mRNA 的表达水平, 以了解汉族肥胖者瘦素基因的表达规律, 为肥胖症的防治提供指导。

## 1 研究对象和方法

## 1.1 研究对象

收稿日期: 2000-03-15

基金项目: 广东省自然科学基金(950364); 华南生物科学与技术研究中心资助项目

作者简介: 徐明彤(1967-), 女, 广东广州人, 硕士, 主治医师

肥胖组 12 例, 男 4 例, 女 8 例, 年龄(51.8 ± 9.3)岁, 体重指数(BMI)为(28.49 ± 2.32) kg/m<sup>2</sup>。肥胖以 BMI ≥ 25 kg/m<sup>2</sup> 为标准。正常体重对照组 11 例, 男 6 例, 女 5 例, 年龄(51.0 ± 10.2)岁, BMI(21.04 ± 1.51) kg/m<sup>2</sup>。研究对象均为需腹部手术的住院病人, 两组年龄和性别构成无差异。术中取腹部皮下脂肪组织, 液氮中冻存。

### 1.2 脂肪组织总 RNA 的制备<sup>[5]</sup>

以异硫氰酸胍一步法制备脂肪组织总 RNA。保证各样本 RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.8 ~ 2.0 之间, RNA 保存于 -70 °C 冰箱。

### 1.3 瘦素基因 cDNA 探针的制备

以 BamHI 和 EcoRI 酶切重组质粒 pUC-leptin(本研究室构建)<sup>[5]</sup>, 经低熔点琼脂糖回收、酚仿醇抽提纯化后得到瘦素基因 cDNA 片段(约 640 bp), 以随机引物法<sup>[6]</sup> 标记上 DIG(宝灵曼试剂盒)。

### 1.4 探针标记效率的检测

DIG 标记产物的系列稀释溶液和已标记的标准浓度对照 DNA(分别是 300、100、30、10、3 pg)同时点在检测试条上进行免疫显色。

### 1.5 探针灵敏度和特异性的检测

制备重组质粒 pUC-leptin 的系列稀释溶液, 与阴性对照 pUC19 质粒 DNA 同时进行斑点杂交, DIG-leptin cDNA 探针浓度与检测样本时一致, 25 μg/L。

### 1.6 RNA 斑点印迹杂交

每份 RNA 样本取 15 μg 转印到带正电荷的尼龙膜上, 120 °C 烘烤 30 min 固定。经过 50 °C 预杂交 2 h(杂交缓冲液为: 0.7 g/L SDS、5 g/L 甲酰胺、5×SSC、2% 封闭液、50 mmol/L 磷酸钠、0.01 g/L 十二烷基肌氨酸钠)后, 膜与变性的 DIG-leptin cDNA 探针(25 μg/L)在 50 °C 杂交 16 h。分别置 2×SSC+0.01 g/L SDS 及 0.1×SSC+0.01 g/L SDS 溶液中洗膜 2 次。然后进行免疫显色反应: 用封闭液封闭 60 min, 与新鲜制备的 DIG 抗体溶液结合, 加入显色液(NBT 和 BCIP)反应约 12 h。

### 1.7 光密度扫描和统计学处理

以计算机全自动图象分析系统扫描杂交斑点的平均光密度和面积, 两者乘积表示瘦素 mRNA 的相对含量, 以均数 ± 标准差表示, 使用 SPSS 统计软件进行 t 检验及简单相关分析。

## 2 结果

### 2.1 DIG-leptin cDNA 探针的标记效率

检测结果表明 DIG-leptin cDNA 探针与对照的显色程度大致相同, 即其浓度与标准浓度基本一致, 约 115 mg/L(图 1)。

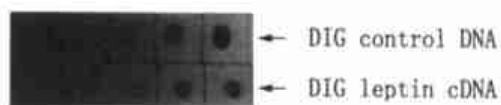


图 1 DIG 标记瘦素 cDNA 探针定量

Fig. 1 Efficiency of DIG-leptin cDNA

### 2.2 DIG-leptin cDNA 探针的灵敏度和特异性

图 2 示 DIG-leptin cDNA 探针可检出 5 pg 的 pUC-leptin DNA, 与 pUC19 DNA 无阳性杂交信号, 表明此探针具有良好的特异性和灵敏度。



图 2 DIG-leptin cDNA 探针灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity of DIG-leptin cDNA

Blots representing different amount of pUC-leptin DNA (0.2 μg, 50 ng, 15 ng, 5 ng, 100 pg, 20 pg, 5 pg, 1 pg, 0.5 pg, 0.1 pg, 0.01 pg) and negative control pUC19 DNA were shown from left to right

### 2.3 RNA 斑点印迹杂交结果

RNA 斑点印迹杂交如图 3 所示, 经统计分析可见肥胖组腹部皮下脂肪组织瘦素 mRNA 相对含量明显高于正常体重对照组(312.8 ± 108.9 vs 175.9 ± 81.5, relative units, P < 0.05), 约增高 78%。相关分析表明腹部皮下脂肪组织瘦素 mRNA 表达水平与 BMI 呈正相关(r = 0.56, P < 0.05)。



图 3 RNA 斑点印迹杂交

Fig. 3 Leptin mRNA dot blot

Upper line, obese group; Lower line, non-obese group

## 3 讨论

本研究所标记的 DIG-leptin cDNA 能检出微量的瘦素基因, 具有高的灵敏度。同时 DIG-leptin cDNA 与不含瘦素基因序列的阴性对照 pUC19 质粒 DNA 无阳性杂交信号, 证明此探针有良好的特异性。

(上接插页 2)

- [ 3 ] Martin R H. Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13; 14 Robertsonian translocation [ J ] . Hum Genet, 1988 80(3): 357.
- [ 4 ] Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, *et al.* Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(914q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes [ J ] . Hum Genet,

1995, 96(4): 655.

- [ 5 ] Martini E, von Bergh ARM, Coonen E, *et al.* Detection of structural abnormalities in spermatozoa of a translocation carrier t(3; 11)(q27. 3; q24. 3) by triple FISH [ J ] . Hum Genet, 1998, 102(2): 157.

(编辑 关淡庄)

(上接第 80 页)

利用 DIG 标记的瘦素 cDNA 探针进行的 RNA 斑点杂交结果显示汉族肥胖症患者腹部皮下脂肪组织瘦素 mRNA 水平明显高于正常体重者, 且与 BMI 呈正相关关系。我们的结果与 Vidal<sup>[6]</sup> 和 Considine<sup>[7]</sup> 等在不同肥胖人群中检测到的结果一致, 可见在不同人群中大多数肥胖个体脂肪组织中瘦素 mRNA 表达均呈异常增高, 此异常增高无种族差异性。BMI 可作为肥胖程度的粗略指标, 脂肪组织瘦素 mRNA 水平与 BMI 呈正相关, 提示瘦素基因表达水平与个体肥胖程度相关。目前多项研究提示人类肥胖者中瘦素基因突变罕见<sup>[3]</sup>, 结合本组结果说明大多数肥胖患者脂肪细胞表达瘦素基因产物的功能是正常的, 推测多数的肥胖缺陷并不是由于瘦素基因产物绝对不足, 而可能是机体对内源性瘦素基因信号敏感性下降所致。

参考文献:

- [ 1 ] Halaas J L, Gajiwala K S, Maffei M, *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese

gene [ J ] . Science, 1995, 269(5223): 543.

- [ 2 ] Maffei M, Stoffel M, Barone M, *et al.* Absence of mutations in the human ob gene in obese/ diabetic subjects [ J ] . Diabetes, 1996, 45(5): 679.
- [ 3 ] Strobel A, Issad T, Camoin L, *et al.* A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity [ J ] . Nature Gene, 1998, 18(3): 213.
- [ 4 ] Maffei M, Halaas J, Ravussin E, *et al.* Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects [ J ] . Nature Med, 1995, 1(11): 1155.
- [ 5 ] 徐明彤, 吕 凌, 钟光恕, 等. 人瘦素基因克隆与序列测定 [ J ] . 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 104.
- [ 6 ] Vidal H, Auboeuf D, Vos P D, *et al.* The expression of ob gene is not acutely regulated by insulin and fasting in human abdominal subcutaneous adipose tissue [ J ] . J Clin Invest, 1996, 98(2): 251.
- [ 7 ] Considine R V, Sinha M K, Heiman M L, *et al.* Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans [ J ] . New Engl J Med, 1996, 334(5): 292.

(编辑 黄小延)

· 简 讯 ·

## 中国高等学校自然科学学报研究会 第 8 次学术年会报道

中国高校自然科学学报研究会第 8 次学术年会于 2000 年 11 月 26~30 日在河南省开封市召开。会议中心议题是:“21 世纪初我国高校自然科学学报面临的形势和对策”。参加会议来自全国高校自然科学学报的主编、编辑及有关人员约百余人, 提供大会学术研讨的论文约 80~90 篇。其内容均围绕着新经济时代需要建立什么样的编辑人才理念与传统编辑人才观有何不同; 网络将怎样影响传统的高校学报的属性、地位、作用和办刊模式; 高校学报深化改革的方向和集团化的前景; 合并后的高校如何进一步办好学报; 高校学报英文版的作用、地位和前景; 影响我国高校进入国际著名检索系统的因素是什么; 有关编辑学理论与编辑工程问题……等。

会上发言、分组讨论热烈, 会后评出优秀论文 1、2、3 等奖共 87 篇, 我校学报也参与会议论文也获了奖励。

(学 讯)