

16A₃F) and human monocytoid leukemic cells by oral administration at one dose of 100 mg/kg. The CGS and DGS were more effective than Ge-132 in enhancing MTC effect at the above dose, and CGS had the strongest effect. The MΦs activated *in vivo* by CGS, DGS and Ge-132 at one dose of 100 mg/kg showed increased incorporation of [³H] choline into phosphatidylcholine (PC), and the most significant increase was observed when MΦs were activated by DGS. MΦs activated *in vivo* by Ge-132 also showed increased incorporation of [³²P]

Pi and [³H] choline into PC, and decreased incorporation of [³²P] Pi and [³H] inositol into PI when compared with resident peritoneal MΦs. No significant difference was observed on the incorporation of [³²P] Pi and [³H] inositol into polyphosphoinositide (PIP and PIP₂) between the Ge-132 activated MΦs and the resident peritoneal MΦs. The enhanced PC turnover of MΦs might be necessary for the expression of MTC in activated MΦs.

Key words organogermanium, macrophage activation, phospholipid turnover

氯喹导致大鼠肌组织载脂蛋白 E 大量表达*

顾拥军¹⁾

(上海医科大学神经生物学教研室, 医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

马加宝

(山东菏泽医学专科学校小儿科, 菏泽 274030)

小山文隆 井原康夫

(东京大学医学部脑研究施設脑病理部门, 东京 113)

摘要 载脂蛋白 E (ApoE) 与迟发的家族性及散发性阿尔茨海默 (Alzheimer) 病密切相关. 氯喹慢性中毒可诱发某些肌病理改变, 出现 β 淀粉样蛋白 (βAP) 与 tau 蛋白等的沉积, 与 Alzheimer 脑中见到的病理改变类似. 为分析这一改变的机制, 用逆转录结合多聚酶链反应技术 (RT-PCR) 对氯喹处理的大鼠肌肉中 ApoE 表达的改变进行了研究. 在 PCR 定量中采用了一种稳定表达的内源性甘油醛-3-磷酸脱氢酶 mRNA 作为内部参照. PCR 扩增在很宽的循环数范围内成线性, 且靶 mRNA 与参照 mRNA 的扩增效率相当. 氯喹处理后大鼠肌肉中 ApoE mRNA 的表达从第 6 周开始增加, 第 8 周后超过对照组的 20 多倍. 结果提示, ApoE 在氯喹慢性中毒所致的大鼠肌病理改变中发挥某些作用.

关键词 载脂蛋白 E, 氯喹, 阿尔茨海默 (Alzheimer) 病, mRNA 定量, RT-PCR

载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 是一种分子质量为 34 ku 的糖蛋白, 在多种组织中表达, 除了参与脂质运输功能外, 可能在多种细胞和神经、免疫等多个系统发挥作用^[1], 尤其是近年来发现其与 Alzheimer 病 (Alzheimer disease, AD) 的发生有密切关系, 引起了广泛的兴趣. ApoE 在人类有遗传多态性, 存在 3 种异型体, 即 ApoE2、ApoE3、ApoE4, 分别来源于等位基因 ε2、ε3、ε4, 其

中 ε4 等位基因与迟发性 (无论是家族性还是散发性) AD 密切相关, 被称为 AD 发病的危险因子^[2, 3], 因此 ApoE 分子在 AD 发生过程中发挥着某种作用.

氯喹为一种抗疟药. 长期使用导致肌纤维空泡样变性, 类似于一种慢性进行性萎缩性肌

* 日中医学会 Sasakawa 医学奖学金资助.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1996-02-12, 修回日期: 1996-10-27

疾病——包含体肌炎 (inclusion body myositis, IBM) 中见到的病理改变. 在 IBM 及氯喹慢性中毒肌病理模型上, 用免疫组化方法均观察到 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, β AP)、tau 蛋白等的免疫样沉积, 类似 AD 脑的主要病理改变^[4-6]. 已知 ApoE 在体外与 β AP 及 tau 蛋白之间具有相互作用^[7, 8], 观察 ApoE 在氯喹肌病理模型上的表达情况, 可为研究上述沉积产生的机制提供某些线索.

PCR 是一种简便、灵敏的用于分析基因及基因产物的工具, 已有多个用于 mRNA 定量分析的报道^[9, 10]. 本工作要求 mRNA 的测定方法具有较高灵敏度, 并能准确反映不同样品之间含量的变化情况, 因此选用一种稳定、丰富表达的内源性 mRNA-甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, G3PD) 作为内部参照, 来校正 ApoE 的测定结果.

1 材料与方法

1.1 动物处理及总 RNA 的提取

雄性成年 Wistar 大鼠, 腹腔注射二磷酸氯喹 50 mg/kg, 每日一次至所需周数, 断头处死后取比目鱼肌置-80℃备用.

总 RNA 用 Trizol 试剂 (Gibco-BRL) 纯化, 以分光光度法测定含量并监测纯度.

1.2 PCR 引物

为避免基因组 DNA 干扰测定结果, 引物对选择位于不同的外显子上. 用于扩增 ApoE 的上行引物为 5'-GAGCAGGCCCT-GAACCGCTT-3', 下行引物为 5'-AGCCTG-GCCCGTGTCTCCTG-3', 分别对应于大鼠 ApoE cDNA 的第 132~151 及 312~331 位碱基; 用于扩增 G3PD 的上行引物为 5'-GGT-GAAGGTCGGTGTCAAG-3', 下行引物为 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3', 分别对应于大鼠 G3PD cDNA 的 33~51 及 114~132 位碱基. 上行引物均用 [γ -³²P] ATP (Amersham, 185 PCi/mol) 由 T4 多核苷酸激酶 (Toyobo, Osaka) 进行末端标记^[11], 以便扩增产物的

定量.

1.3 逆转录

反应液总体积 15 μ l, 含酶促反应缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂), 2 μ g 总 RNA, 100 ng 随机六聚体, 10 mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 及 0.5 mmol/L dNTPs, 反应液经 65℃加热 5 min 及 37℃保温 30 min 后, 加入鼠白血病病毒 (MLV) 逆转录酶 200 单位 (Gibco-BRL), 再经 37℃保温 30 min 后, 以 95℃加热 3 min 中止反应.

1.4 定量 PCR

10 μ l PCR 反应液中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L MgCl₂, 0.001% 明胶, 300 μ mol/L dNTPs, 0.4 μ mol/L 每种引物 (含 5' 末端标记引物), 由 4 ng 总 RNA 逆转录而来的模板 cDNA, 0.35 单位 Taq DNA 多聚酶 (Takara Shuzo, Kyoto). PCR 每个循环含变性条件 94℃, 45 s; 退火 45℃, 3 min; 延伸 72℃, 2 min. 最后一个循环结束后 72℃保温 5 min. 扩增结束, 取 2.5 μ l 反应液在变性聚丙烯酰胺凝胶 (6%) 分离, 凝胶经干燥, 用成像板 (imaging plate, Fuji film, Tokyo) 曝光, 并以激光图像分析仪 (Fujix BAS 2000) 进行分析, 通过测定条带的激发光 (photostimulated luminescence, PSL) 强度对产物定量^[10].

2 结果

2.1 PCR 扩增的线性

放射性条带在成像板上引起激发光, 用激光图像分析仪可测定该激发光的强度 (单位 PSL), 该强度与放射性强度成正比. 同时还可得到放射自显影图^[10].

以上述条件进行 PCR 扩增后, 得到两条长度为 100 bp 及 200 bp 的主要条带, 分别为 G3PD 及 ApoE 的扩增片断. 以 10 倍量未经逆转录的 RNA 作阴性对照, 未见扩增条带.

PCR 作为定量手段的首要条件是产物必须随循环数增加成线性积累. 使 PCR 反应分别终止于一系列循环数, 将扩增产物量对 PCR

循环数作图, 得到扩增曲线. 图 1 和图 2 表明, 在较宽的范围内 PCR 扩增成线性. G3PD 在 21 个循环后渐渐趋向饱和, 而 ApoE 在 25 个循环后扩增效率才开始下降. 在线性范围内, PCR 成指数扩增, 两条曲线平行, 提示二者扩增效率相当.

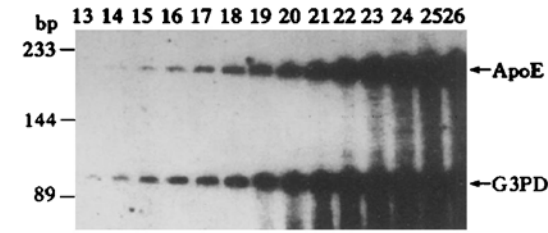


图 1 扩增产物的放射自显影图

箭头指示的扩增片段, 循环数显示在电泳道上方, 核酸长度标准在左侧.

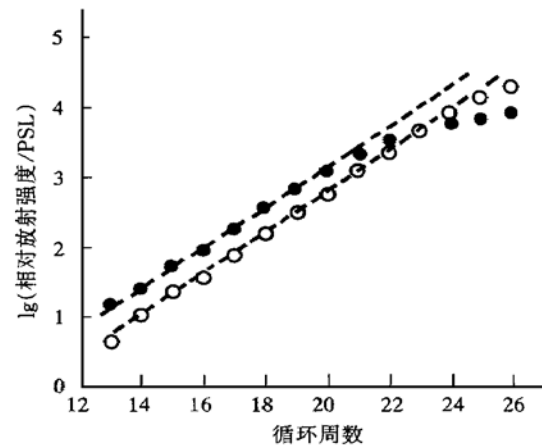


图 2 PCR 扩增的线性范围

扩增曲线由图 1 的测定结果以产物相对放射强度对循环周期数半对数作图所得, 虚线表示线性范围内的数值所得的回归曲线. ●—●: G3PD; ○—○: ApoE.

2.2 PCR 的重复性

将起始反应液分 6 管, 加入相同的 RNA (0.4 mg/L), 扩增 20 个循环, 测定结果, G3PD 的产物相对放射强度为 2761 ± 56.1 ($\bar{x} \pm s$, 单位 PSL), $CV = 2.0\%$; ApoE 为 242 ± 22.5 , $CV = 9.3\%$, 提示组内实验变异较小, 但不同日期重复实验, 尽管条件一致, 结果显示组内实验变异较大.

2.3 氯喹慢性中毒对 ApoE 表达的影响

预初实验表明, 氯喹慢性中毒对 G3PD 的表达无明显的影响, 由于上述结果显示 G3PD 与 ApoE 的扩增效率相当, 因此可以 G3PD 作为内部参照, 来校正 ApoE 的测定结果, 即以 ApoE/G3PD 的比值来表示更能准确地反映氯喹中毒前后 ApoE 的表达情况. 图 3 显示氯喹慢性中毒可大大促进 ApoE 的表达, 在第 6 周已明显, 在第 8 周后达到未用药对照组的 20 多倍.

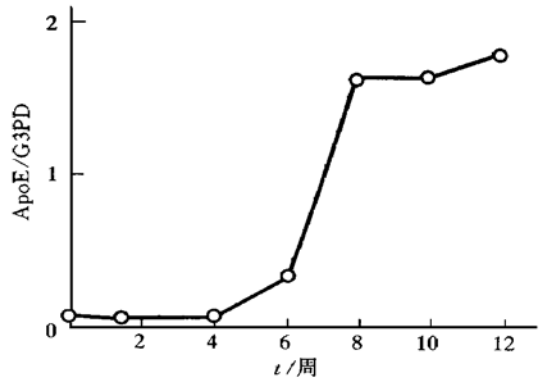


图 3 氯喹对大鼠肌肉中 ApoE 表达影响的时间过程
纵坐标以 ApoE/G3PD 的比值表示 (对照组为 5 只大鼠测定的平均值, 用药组均为 3 只大鼠的平均值); 横坐标为氯喹注射时间.

3 讨 论

PCR 是一种高灵敏、简便的分析基因表达产物的方法, 但其用于定量分析受到一定的限制, 主要问题在于, PCR 成指数扩增, 扩增效率的微小改变经数十个循环的放大, 使最终扩增产物量出现大的偏差, 导致测定结果不可靠^[9, 10]. 通常选用一个内源性或外源性的内部参照, 来校正测定结果. 内源性参照的缺点是其本身的表达可能受到某些因素的干扰, 其绝对含量也需通过其他方法测定, 但 RNA 实验操作中带来的误差对其影响较小. 本研究的目的是比较用药前后 ApoE 的表达情况, 因而正确反映这种变化情况比知道绝对含量更为重要. 预初实验证明大鼠肌肉组织中 G3PD 的表

达不受氯喹的影响,而另一种常用的内参 β -肌动蛋白则在氯喹的作用下表达增加。肌肉组织因匀浆困难而造成 RNA 回收率较低和不稳,选用 G3PD 作为内参可避免由此造成的误差。

PCR 定量应在线性扩增范围内进行,而线性范围可用两种方法获得,一是选用固定量的模板 cDNA,观察产物的增加是否与扩增循环数成线性;二是选择固定的扩增循环数,观察产物量是否与投入的模板 cDNA 含量成线性。本实验选用前法,观察到 PCR 的扩增在很宽的范围内成线性(指数扩增),目标 mRNA (ApoE) 与内标 mRNA (G3PD) 的扩增效率相当,因而可用 G3PD 来校正 ApoE 的测定结果。该方法的重复性也较好,特别是同一样品使用同一酶促反应液,测定结果较可靠。

大量证据表明 $\epsilon 4$ 等位基因与迟发性 Alzheimer 病的发病率成量效关系;在 AD 脑中,老年斑(senile plaque, SP)和神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)这两种主要病理变化上均发现有 ApoE 的免疫样沉积^[12, 13];ApoE mRNA 在 AD 脑中的表达也比正常老年对照组高^[14];体外实验证实,ApoE 与 β -淀粉样蛋白及 tau 蛋白均有结合活性^[7, 8]。这些证据都提示 ApoE 参与了 AD 的发病过程。

在氯喹慢性中毒肌病理模型上,发现了 β AP, C 端及 N 端 APP, tau 蛋白等的免疫样沉积物,机理尚不清楚,一种假设认为氯喹升高了溶酶体内的 pH 值,从而抑制了多种水解酶的活性,导致了某些蛋白质的堆积。我们曾对这一模型中 APP 及 tau 的基因表达进行观察,发现氯喹注射到第 4 周时,APP 与 tau mRNA 的表达略增加,但随后呈抑制作用,所以上述沉积并非其表达量的增加引起。ApoE 为一种糖蛋白,可能发挥固定物的作用,氯喹促使其大量表达后(mRNA 量增加了 20 多倍),APP 和 tau 蛋白等与 ApoE 结合,从而导致沉积物的形成。神经损伤可导致局部 ApoE 合成增加,据认为与释放脂质的清除及神经再生区域脂质的再分配有关^[1]。多种因素可引起神经元

损伤,从而导致了 ApoE 表达增加,引起 β AP 及 tau 蛋白的沉积,使我们见到 AD 脑中最常见的病理改变。

参 考 文 献

- 1 Mahley R W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, **240**: 622 ~ 628
- 2 Corder E H, Saunders A M, Strittmatter W J *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 1993, **261**: 921~ 923
- 3 Saunders A M, Strittmatter W J, Schmechel D *et al.* Association of apolipoprotein E allele $\epsilon 4$ with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 1993, **43**: 1467~ 1472
- 4 Murakami N, Ihara Y, Nonaka I. Chloroquine treated rat: a possible model for Alzheimer's disease. *Muscle Nerve*, 1995, **18**: 123~ 125
- 5 Askanas V, Engel W K, Alvarez R B. Light and electron microscopic localization of β -amyloid protein in muscle biopsies of patients with inclusion-body myositis. *Am J Pathol*, 1992, **141**: 31~ 36
- 6 Askanas V, Engel W K, Bilak M *et al.* Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau. *Am J Pathol*, 1994, **144**: 177~ 187
- 7 Strittmatter W J, Saunders A M, Schmechel D *et al.* Apolipoprotein E: high-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 1977~ 1981
- 8 Strittmatter W J, Weisgraber K H, Huang D Y *et al.* Binding of human apolipoprotein E to synthetic β peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 8098~ 8102
- 9 Guiffre A, Atkinson K, Kearney P. A quantitative polymerase chain reaction assay for interleukin 5 messenger RNA. *Anal Biochem*, 1993, **212**: 50~ 57
- 10 Kinoshita T, Imamura J, Nagai H *et al.* Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 1992, **206**: 231~ 235
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 10. 60~ 10. 61
- 12 Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H *et al.* Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res*, 1991, **541**: 163~ 166
- 13 Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological

- chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*, 1992, **135**: 235~ 238
- 14 Diedrich J F, Minnigan J, Carp R I *et al.* Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J Virol*, 1991, **65**: 4759~ 4768

Strong Induction of Apolipoprotein E Expression in Rat Muscle by Chronic Intoxication with Chloroquine GU Yongjun (*Department of Neurobiology and State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*); MA Jiabao (*Heze Professional Medical College, Heze 274030, China*); Fumitaka Oyama, Yasuo Ihara (*Department of Neuropathology, Institute for Brain Research, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-Ku, Tokyo 113, Japan*).

Abstract Apolipoprotein E (ApoE) is strongly associated with late-onset familial and sporadic forms of Alzheimer's disease. Some myopathic changes which are similar to those seen in

Alzheimer brain, that is, deposits of β AP and tau protein, could be induced by chronic intoxication with chloroquine. The influence of chloroquine treatment on ApoE expression in rat muscle was examined using reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). A steadily expressed endogenous mRNA, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PD) was served as an internal standard in PCR quantification. Amplification was found to be linear over a wide range of cycle number, and the efficiency was identical for target and control mRNA in RT-PCR. The expression of ApoE mRNA in rat muscle began to increase after 6 weeks of chloroquine treatment, and became 20-fold more than that in untreated control later on. The results suggest that ApoE may play roles in the pathologic changes in rat muscle caused by chronic intoxication with chloroquine.

Key words apolipoprotein E, chloroquine, Alzheimer's disease, mRNA quantification, RT-PCR

Mn-SOD 对 CHO 细胞电离辐射敏感性的影响

孙 娟 陈 媛 周 玫 葛忠良¹⁾ 黎明涛²⁾
(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 近年来的研究发现, IL-1 和 TNF 是重要的辐射防护因子, 因 IL-1 和 TNF 都能选择性诱导 Mn-SOD 的高度表达, 因此认为 Mn-SOD 可能有辐射防护作用. 通过转染有义和反义 Mn-SOD cDNA 于 CHO 细胞, 进一步说明了 Mn-SOD 在抗电离辐射损伤中的作用. 研究表明, 转染有义 Mn-SOD cDNA 可降低细胞对电离辐射的敏感性, 而转染反义 Mn-SOD cDNA 的细胞克隆对电离辐射的敏感性升高.

关键词 Mn-SOD, 基因转染, 电离辐射

所有需氧生物总是不断处于活性氧 (ROS) 导致的氧损伤的危险之中, 电离辐射、高氧和化疗药物都能增加细胞 ROS 如 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ 的产生而损伤生物大分子. 为免受氧损伤的威胁, 需氧生物在进化过程中产生

¹⁾ 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850.
²⁾ 中山医科大学药理教研室, 广州 510089.
收稿日期: 1996-02-14, 修回日期: 1996-06-06