

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000827

大鼠溺死内参基因筛选和水通道蛋白 5 的表达

汤呈怀, 余崇阳, 万立华

(重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:在溺死尸体不同时间点模型中, 筛选大鼠稳定表达的内参基因和探讨水通道蛋白 5 mRNA(AQP-5 mRNA) 的表达。**方法:**先建立溺死尸体不同时间点模型(0 min, $n=6$; 15 min, $n=6$; 4h, $n=6$; 16h, $n=6$; 48 h, $n=6$; 72 h, $n=6$), 提取样本总的 RNA, 逆转录合成 cDNA, qRT-PCR 定量候选内参基因, geNorm 和 NormFinder 排序各候选内参基因的表达, 筛选出最稳定的内参基因, 最后定量目的基因 AQP-5 mRNA 的表达。**结果:**该模型中筛选出 ACTB 为最稳定的内参基因, 除 72 h 时间点, AQP-5 mRNA 的表达均显著下调(15 min/0 min=0.51, $P<0.05$; 4 h/0 min=0.53, $P<0.05$; 16 h/0 min=0.63, $P<0.05$; 48 h/0 min=0.81, $P<0.05$; 72 h/0 min=0.89, $P>0.05$)。**结论:**本研究 AQP-5 mRNA 在大鼠溺死表达有一定阳性意义, 有助于法医溺死鉴定。

【关键词】溺死; 水通道蛋白 5; qRT-PCR; 内参筛选**【中图分类号】**R44**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-08-01

Reference genes selection and expression of water channel protein 5 for drowning rats

Tang Chenghuai, She Chongyang, Wan Lihua

(Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To select stable expression of reference gene and to explore the water channel protein 5 mRNA expression for drowning rat model in different time points. **Methods:** Drowning rat was modeled in different time points(0 min, $n=6$; 15 min, $n=6$; 4 h, $n=6$; 16 h, $n=6$; 48 h, $n=6$; 72 h, $n=6$). Total RNA was extracted from samples and reversed transcription was conducted for cDNA synthesis. Candidate reference genes were detected by real-time PCR. In order to screen out the most stable reference gene, geNorm and NormFinder was used to rank the expression of each gene. Then, AQP-5 mRNA expression was detected by qRT-PCR. **Results:** ACTB was the most stable reference gene. Our study showed that the expression of AQP-5 mRNA was downloaded except 72 h in this model (15 min/0 min=0.51, $P<0.001$; 4 h/0 min=0.53, $P<0.001$; 16 h/0 min=0.63, $P<0.001$; 48 h/0 min=0.81, $P<0.05$; 72 h/0 min=0.89, $P>0.05$). **Conclusion:** AQP-5 mRNA expression has some positive meaning and improves forensic identification in drowning model.

【Key words】drowning; water channel protein 5; qRT-PCR; reference gene selection

溺死尸体典型征象出现率低, 易受腐败影响, 分子生物学成为法医溺死诊断新途径^[1]。水通道蛋白 5(AQP-5) 是一种跨膜蛋白, 在肺泡内液快速清除中起重要作用, 因此, 正确定量 AQP-5 mRNA 的表达, 在溺死诊断中具有潜在价值。然而, PCR 的定量需要内参基因进行校正和标准化, 但是大量研究

表明, 一些内参基因在不同阶段、不同组织或细胞、不同实验条件下会发生很大变化。本研究通过大鼠溺死尸体模型筛选稳定的内参基因, 建立荧光定量 PCR(qRT-PCR) 方法, 定量不同时间点 AQP-5 mRNA 的表达, 为法医溺死诊断提供依据。

1 材料和方法

1.1 建立大鼠溺死尸体不同时间点模型

动物分组: 选取健康成年 SD 大鼠 36 只, 体质量(300 ± 15) g(由重庆医科大学动物中心提供), 随机分为 6 组, 每组 6 只; 在室温 25 °C 常规淡水建立模型, 包括大鼠脱颈处死组, 溺死 15 min 组(记录溺死时间平均 15 min), 溺死 4 h 组(溺

作者介绍: 汤呈怀, Email: 36072299@qq.com,

研究方向: 法医病理学法医物证。

通信作者: 万立华, Email: ccfw@cqmu.edu.cn

基金项目: 重庆市委攻关计划项目自助项目(项目编号: CSTC.2007AA0007(9))。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20160105.1552.002.html>
(2016-01-05)

死尸体于水 4 h), 溺死 16 h 组(溺死尸体于水 16 h), 溺死 48 h 组(溺死尸体于水 48 h)和溺死 72 h 组(溺死尸体于水 72 h)。

1.2 提取样本总的 RNA

统一取大鼠左肺上叶组织, 称重后采用 TRIzol[®] Reagent (Life technologies, 美国) 试剂盒, 并遵照说明书提取样本总 RNA。RNA 纯度测定: 样本在 Nanodrop 核酸蛋白分析仪测定 OD 值, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值在 1.80~2.00 之间为合格。RNA 完整性评估: 总 RNA 在 1% 的琼脂糖凝胶电泳实验判断 RNA 完整性, 28 s 条带亮度为 18 s 将近 2 倍为合格。本实验所提取的总 RNA 均符合实验要求。

1.3 逆转录合成 cDNA

反转录试剂(Prime Script[™] RT reagent Kit)盒购自大连宝生物, 遵照说明冰上操作, 体系: 5x Prime Script Buffer 5 μL , Prime Script RT Enzyme Mix I 1 μL , OligodT Primer(50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Random 6 mers(100 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 模板 RNA 500 ng, 补充去酶水至 20 μL 体系。反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 合成的 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.4 荧光定量 PCR 定量候选内参基因

荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II) 购自大连宝生物。体系扩增效率评价: 逆转录 cDNA 按 10 倍梯度稀释, 制备 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 梯度稀释液进行定量 PCR 实验, PCR 反应体系: SYBR[®] Primer Ex Taq II 10 μL , Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Reverse Primer(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , cDNA template 2 μL , 去酶水 7 μL 。PCR 反应条件: 第 1 阶段, 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 第 2 阶段, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 退火和延伸 60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 40 个循环; 第 3 阶段, 溶解曲线 55 $^{\circ}\text{C}$ ~99 $^{\circ}\text{C}$, 90 s。基因的扩增效率 E 值在 91%~107%、 R^2 值>0.98 和溶解曲线为单峰, 可认为定量 PCR 结果可靠。

在 6 组实验样本中, 定量各候选内参基因的表达, 设置

无 cDNA 模板对照组, PCR 实验独立重复 3 次以确保结果可靠性。

1.5 geNorm 和 NormFinder 排序候选内参基因

各候选内参基因的 Ct 值按公式 $RQ = E^{-\Delta C_t} = E^{(\text{mean}C_t - \text{sample}C_t)}$ 进行线性转换, 得到的 Cq 导入 geNorm 和 NormFinder 程序, 排序最稳定表达的基因。geNorm² 软件是一款用于微软 Excel 平台的 VBA 宏程序, 是目前最常用的内参基因筛选软件之一, 通过计算基因表达稳定度平均值 M (单个内参基因与其他所有基因表达水平的两两比值经对数变换, 计算其平均标准差), 根据 M 值的大小进行排序, M 值越小说明基因越稳定。另外, 最合适的内参基因数目由标准化因子配对差异分析(Vn/n+1) 决定, GeNorm 程序默认 y 值为 0.15, 如果 $V2/3 < 0.15$, 则没必要加入另外内参基因。NormFinder 程序^[3] 由 Andersen(2004) 编写的程序, 运行原理与 geNorm 程序类似, 产生基因表达稳定值, 对基因生成的稳定生成值, 生成值越小, 代表基因的表达越稳定。

1.6 定量不同时间点目的基因 AQP-5 mRNA 的表达

在不同时间点的样本中, 以最稳定的内参基因为, 定量 AQP-5 mRNA 的表达。

1.7 数据统计和处理

采用统计软件 SPSS 21.0 处理实验数据, 应用单因素方差分析数据, 两两比较采用 LSD。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 基因引物及标曲信息

见表 1。

2.2 geNorm 和 NormFinder 筛选内参基因结果

geNorm 程序默认 ACTB 和 18s rRNA 为最佳内参基因

表 1 基因名称, 引物序列, 产物长度, R^2 和扩增效率所示

Tab.1 Genes full names, primer sequences, amplicon lengths, R^2 and amplification efficiencies

名称	编号	全称	引物序列 5'-3'	产物大小	扩增效率	R^2
GAPDH	NM017008	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA GGCATGGACTGTGGTCATGA	118	101	0.999
ACTB	NM031144	Beta-actin	CAGGGTGTGATGCTGGGTATGG AGTTGCTGACAATGCCCTGTTC	115	103	0.998
PPIA	NM017101	peptidylprolyl isomerase A	GTCAACCCACCGTGTTCCTTC ATCCTTTCTCCCAGTGCTCAG	133	94	0.992
ARBP	NM022402	Acidic ribosomal phospho protein P0	TAGAGGGTGTCCGCAATGTG CAGTGGGAAGGTGTAGTCAGTC	137	102	0.994
B2M	NM012512	Beta-2 microglobulin	CGAGACCGATGTATATGCTTGC GTCCAGATGATTGAGAGCTCCA	114	93	0.991
18s rRNA	M11188	18s subunit ribosomal RNA	ACGGACCAGAGCGAAAGCAT TGTC AATCCTGTCCGTCTCC	310	103	0.995
AQP-5	NM012497	aquaporin 5(Aqp5)	CTCTGCATCTTCTCCTCCAC TCCTCTCGATGATCTTCCCAG	335	104	0.994

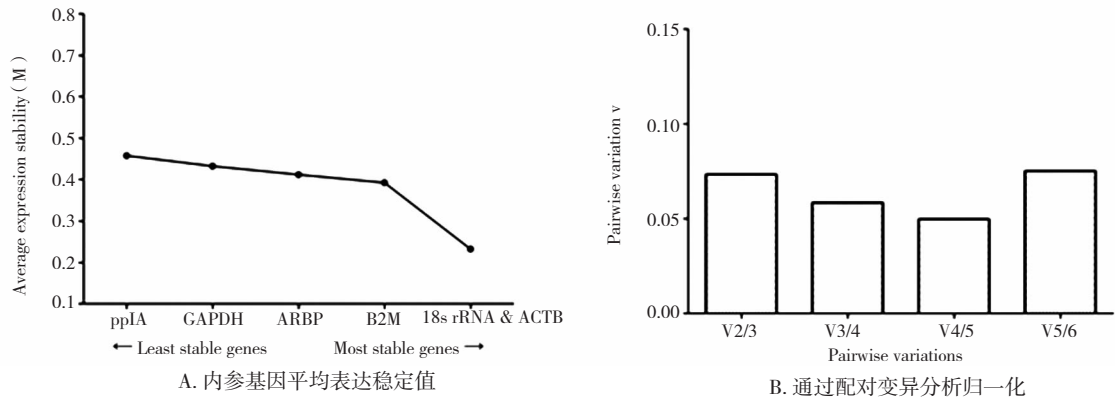


图 1 内参基因的平均表达及变异分析

Fig.1 Average expression and variation analysis of reference genes

表 2 geNorm 和 NormFinder 排序内参基因

Tab.2 Ranking of reference genes by geNorm and NormFinder

排序	Genorm		NormFinder	
	基因	M值	基因	稳定值
1	ACTB	0.232 6	ACTB	0.060 6
2	18s rRNA	0.232 6	ARBP	0.089 9
3	ARBP	0.392 7	B2M	0.116 3
4	B2M	0.411 9	18s rRNA	0.132 5
5	GAPDH	0.432 5	GAPDH	0.163 0
6	pp1A	0.457 8	pp1A	0.255 3

组合(图 1A),另外,配对归一化因子 $V_{n/n+1} < 1.5$,没有必要引入另外基因为内参(图 1B)。NormFinder 根据 RQ 值生成排序结果(表 2),排序 ACTB 为最稳定内参基因。

2.3 不同时间点 AQP-5 mRNA 的表达

在 6 组样本中,以 ACTB 为内参基因,定量 AQP-5mRNA 表达(图 2),溺死 15 min 和 4 h 和 16 h 组 AQP-5 的表达下调,48 h 组下调降低,而 72 h 无统计学差异。

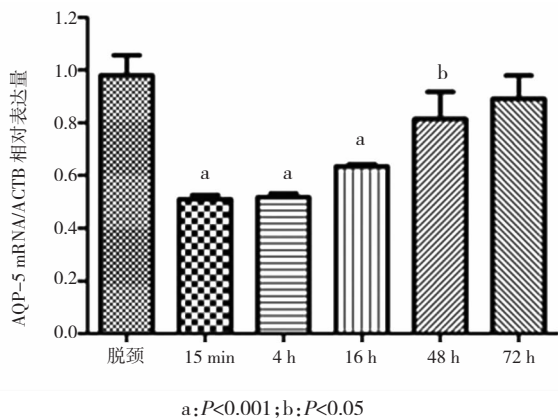


图 2 与脱颈组比较,各组不同时间点 AQP-5 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.2 Expression of AQP-5 mRNA compared with the first group in each group at different time points ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是参与糖酵解的一种关键酶; β -肌动蛋白(β -actin, ACTB)是细胞的一种重要骨架蛋白,在细胞分泌、吞噬、移动、胞质流动和胞质分离等过程中起重要作用;亲环素 A (PPIA),具有肽基脯氨酰顺反异构酶活性,可以催化蛋白折叠和构象变化时肽基脯氨酰键的顺反异构化;酸性核糖体磷蛋白 P0(ARBP),位于核糖体大亚基上,与蛋白质翻译密切相关的酸性核糖体磷酸化蛋白; β -微球蛋白(B2M),编码一种血清蛋白,与细胞表面主要组织相容性复合体(MHC)而发挥免疫作用;真核生物第三类 rRNA(18s rRNA),作为核糖体的一部分,其功能是作为 mRNA 的支架,使 mRNA 分子在其上展开,形成肽链。geNorm 排序 6 个候选内参基因得出 ACTB 和 18s rRNA 为最佳组合,表明当进行 qRT-PCR,选用 ACTB 和 18s rRNA 一起作为内参时,PCR 定量的结果最为准确; NormFinder 程序排序 ACTB 为最稳定的内参基因

(变异系数 0.060 6, 最小), 而 18 s rRNA 变异系数较大(变异系数 0.060 6, 0.132 5)。另外, ACTB 作为内参是得到了公认的, 它广泛分布于细胞浆内, 表达量非常丰富。因此, 综合以上结果, 选出 ACTB 为最稳定的内参基因。

AQP-5 是鉴别肺泡上皮 I 型细胞标志之一, 与淡水溺死和高原肺水肿有关^[4]。研究者在 AQP-5 基因敲除小鼠中发现肺泡-毛细血管间水的渗透通透性降低 10 倍^[5]。在内毒素致急性肺损伤模型中, AQP-5 的表达下调, 这与早期肺水肿的形成相一致^[6]。谭利平在高氧肺损伤大鼠中采用 RT-PCR 测得 AQP-5 表达降低, 并推测这可能是高氧肺损伤肺水肿形成的原因之一^[7]。这些证据表明 AQP-5 的异常表达可能与肺部液体转运异常有关, 提示 AQP-5 的功能在肺泡液体快速清除起重要作用。

溺死的机制主要为溺液通过破裂肺泡壁进入血循环, 致血容量升高发生溶血^[8], 在此过程中引起机体一些应激反应。本实验通过建立大鼠溺死尸体不同时间模型, 采用分子生物学 RT-qPCR 来检测 AQP-5 mRNA 的表达, 探讨其在溺死诊断中价值。然而精确的 qRT-PCR 的方法对 mRNA 的定量至关重要, 选择不同的内参基因可能产生不同的定量结果。因此, 本实验以筛选出的 ACTB 为内参, 采用实时 qRT-PCR 检测 AQP-5 mRNA 在 15 min 组、4 h 组、16 h 组和 48 h 组中表达明显下调, 且趋势减弱, 而 72 h 组中 AQP-5 mRNA 的变化无统计学意义。从 AQP-5 mRNA 的功能和实验结果考虑, 本研究推测溺死抑制了 AQP-5 mRNA 的表达, 减弱肺部液泡液体转运功能, 加速了溺死过程, 但是随着尸体于水中存放时间的延长, AQP-5 mRNA 的下调表达趋势降低, 甚至无差异, 这可能是尸体 RNA 降解所致。所以本研究认为 AQP-5 mRNA 在溺死一段时间内(48 h)具有一定诊断价值。

溺死诊断是法医鉴定常见案件, 而溺死尸体往往由于浸泡水中时间过长给鉴定带来困难。随着分

子生物学的高速发展, 分子诊断在法医诊断中越来越多的得到应用, 其灵敏度高, 特异性好, 给法医学研究实践提供了更准确客观的依据。目前关于溺死鉴定, 虽然通过对浮游生物的理化特性和分子生物学标记, 但这些方法并没有决定性的意义^[9]。本研究通过对生物体本身 AQP-5 mRNA 的表达趋势来探讨其在溺死诊断中价值, 供法医鉴定和研究中参考。

参 考 文 献

- [1] 赵贵森, 黄代新, 杨庆恩. 溺死诊断中的浮游生物检测法[J]. 中国法医学杂志, 2005, 20(2): 89-91.
- [2] Vesentini N, Barsanti C, Martino A, et al. Selection of reference genes in different myocardial regions of an in vivo ischemia/reperfusion rat model for normalization of antioxidant gene expression[J]. BMC Res Notes, 2012(5): 124.
- [3] Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets[J]. Cancer Res, 2004, 64(15): 5245-5250.
- [4] Chen Z, Jin N, Narasaraaju T, et al. Identification of two novel markers for alveolar epithelial type I and II cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 319(3): 774-780.
- [5] Krane CM, Fortner CN, Hand AR, et al. Aquaporin 5-deficient mouse lungs are hyperresponsive to cholinergic stimulation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2001, 98(24): 14114-14119.
- [6] 焦光宇, 李尔然, 于润江. 水通道蛋白 1 和 5 在急性肺损伤大鼠的表达[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(6): 427-428.
- [7] 谭利平, 许峰, 匡凤梧. 水通道蛋白 5 在高氧肺损伤中的表达及调节机制[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(8): 462-465+514.
- [8] Locali RF, Md A, Oliveira-Junior IS. Use of the histopathology in the differential diagnosis of drowning in fresh and salty water: an experimental model establishment in rats[J]. Acta Cir Bras, 2006, 21(4): 203-206.
- [9] Piette MH, De Letter EA. Drowning: still a difficult autopsy diagnosis[J]. Forensic Sci Int, 2006, 163(1-2): 1-9.

(责任编辑: 张辉洁)