

• 临床检验研究论著 •

AS 患者外周血单个核细胞 SCAMP2 基因表达检测及其临床意义

梁结玲¹, 陈立强¹, 李刚², 王洋洋¹, 李海珠¹

(1. 广东省肇庆市第一人民医院检验科 526021 ; 2. 广东吉赛生物科技有限公司, 广州 510663)

摘要:目的 研究 SCAMP2 在动脉粥样硬化(AS)患者外周血单个核细胞中的表达及其与疾病发生、发展的关系。方法 分别采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测 23 例 AS 患者和 23 例健康者 SCAMP2 mRNA 和蛋白表达。结果 AS 患者外周血单个核细胞 SCAMP2 mRNA 和蛋白表达均明显高于健康者, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 SCAMP2 表达与 AS 发生存在一定相关性, 在 AS 发病过程中可能起重要作用, 为 AS 的诊断和预防提供了新线索。
关键词:动脉粥样硬化; 载体蛋白质类; 脂质体; 胆固醇; SCAMP2
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.012 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)09-1051-02

Expression and clinical significance of secretory carrier-associated membrane protein 2 in peripheral blood mononuclear cells of patients with atherosclerosis

Liang Jieling¹, Chen Liqiang¹, Li Gang², Wang Yangyang¹, Li Haizhu¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Zhaoqing, Zhaoqing, Guangdong 526021, China; 2. Geneseeed Giotech Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of secretory carrier-associated membrane protein 2(SCAMP2) in the pathogenesis of atherosclerosis(AS). **Methods** mRNA and protein level of SCAMP2 were detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blotting respectively in peripheral blood mononuclear cells of 23 cases of patients with AS and 23 cases of healthy controls. **Results** mRNA and protein level of SCAMP2 in AS patients were statistically higher than those in healthy controls($P<0.05$). **Conclusion** SCAMP2 might be involved in the pathogenesis of AS and could be a potential therapy or prevention target involved in the regulatory mechanisms in the development of AS.
Key words: atherosclerosis; carrier proteins; liposomes; cholesterol; secretory carrier-associated membrane protein 2

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一组动脉硬化血管病中常见的、最重要的一种^[1], 其特点是受累动脉病变从内膜开始, 一般先有脂质和复合糖类积聚、出血及血栓形成, 纤维组织增生及钙质沉着, 并有动脉中层的逐渐蜕变和钙化^[2]等, 近年来随着人们生活水平的提高患病率有明显增加的趋势^[3]。有文献表明胆固醇以囊泡转运进行分泌, 而 SCAMP2(secretory carrier-associated membrane protein 2)转运蛋白参与囊泡分泌转运并发挥重要作用^[4], 因此, SCAMP2 可能在 AS 发生与发展过程中发挥重要作用, 本研究应用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测 SCAMP2 在 AS 患者中的表达变化, 旨在了解其在 AS 发病机制中的作用, 进一步探讨其在 AS 发生、发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 AS 组: 选择本院确诊的 AS 患者 23 例, 符合欧洲心脏病学会和美国心脏病联合委员会(ESC/ACC) AS 诊断标准^[5], 其中男 17 例, 女 6 例; 年龄(51.7±13.8)岁。对照组: 选择 23 名健康体检者, 其中男 17 例, 女 6 例; 年龄(52.9±7.6)岁, 冠状动脉造影正常, 无冠心病和心肌梗死相关临床症状, 血清肌钙蛋白 I(cTnI)阴性(<0.1 ng/mL)。

1.2 仪器与试剂 PCR 分析仪(ABI 9700)、人单个核细胞分

离液(上海沪峰生物科技有限公司)、RNA 提取试剂盒(in-vitrogen)、逆转录试剂盒(大连宝生物公司)、PCR 引物(上海生物工程公司)等。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及单个核细胞分离 无菌操作采静脉血 3 mL, 用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝, 使用人单个核细胞分离液密度梯度离心分离单个核细胞。加入 1 mL TRIzol, -80℃保存。

1.3.2 抽提单个核细胞总 RNA 取经 TRIzol 处理好的匀浆单个核细胞室温静置, 加入 0.2 mL 氯仿, 剧烈震动 15 s, 室温静置 2 min; 4℃、12 000×g 离心 15 min, 移上层水相至新 EP 管, 加 0.5 mL 异丙醇, 混匀后室温静置 10 min; 4℃、12 000×g 离心 10 min, 弃上清液, 用 75%乙醇洗涤沉淀, 4℃、7 500×g 离心 5 min, 弃上清液, 空气中干燥; 20 μL 无 RNA 酶水溶解总 RNA, 60℃、孵育 10 min。紫外分光光度仪检测提取的总 RNA 浓度, -80℃保存。

1.3.3 引物设计与合成 根据 SCAMP2 基因在 Pubmed 中查到的 GenBank 序列, 按照引物设计原则设计引物, 由上海生物工程公司合成, 见表 1。

表 1 引物设计与合成

基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')	最佳退火温度(℃)	产物长度(bp)
SCAMP2	上游引物(F)	CTGTAGCCAAGTTCATGTGAGA	56	453
	下游引物(R)	CCAGGGAATGATTATCCAGTGTAG		
β-actin	上游引物(F)	TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGT	56	267
	下游引物(R)	CTTAGAAGCATTTCGCGGTGCACGATG		

1.3.4 RT-PCR 检测 SCAMP2 mRNA 表达 以 RNA 为模板,利用大连宝生物公司逆转录反应试剂盒进行 RT-PCR 反应。反应条件为 50 ℃ 30 min,94 ℃ 2 min,然后 94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,30 个循环。RT-PCR 反应完成后取 3 μL RT-PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中于 80 V 恒压电泳 30 min,紫外透射仪观察并拍照。图片经图像分析软件 Band Scan 进行光密度值扫描分析,计算各泳道 SCAMP2 与内参照 β-actin 光密度之比作为 SCAMP2 相对含量值。

1.3.5 Western blot 检测 SCAMP2 蛋白表达 取单个核细胞 (1×10⁶) 裂解后以 Bradford 法测定蛋白浓度,BSA 为标准品;每个标本取 50 g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白电转至 PVDF 上,ECL 法显色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析。组间比较采用独立样本 *t* 检验,检验水准:α=0.05。

2 结 果

2.1 外周血单个核细胞 SCAMP2 mRNA 表达 AS 组 SCAMP2 和 β-actin 的光密度值分别为 0.276 6±0.082 9、0.573 1±0.183 2;对照组分别为 0.462 4±0.134 1、0.598 2±0.209 3。AS 组 SCAMP2 mRNA 表达量显著高于对照组,差异有统计学意义 (*P*<0.05)。

2.2 外周血单个核细胞 SCAMP2 蛋白表达 AS 组单个核细胞 SCAMP2 蛋白表达比对照组明显升高,差异有统计学意义 (*P*<0.05),见图 1。

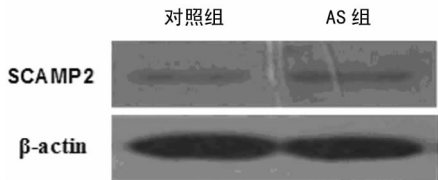


图 1 外周血单个核细胞 SCAMP2 蛋白表达

3 讨 论

SCAMP2 是由 SCAMP2 基因编码的一种蛋白,是 SCAMP 蛋白家族主要成员之一,在进化过程中相对保守,其分布于胞内具有循环作用的细胞器的膜及分泌囊泡中、高尔基体及胞膜等,主要功能是在后期高尔基体转运途径中作为携带者将细胞内物质运送到细胞表面,主要包括分选、囊泡转运体的形成及胞吞/胞吐作用等^[6-7]。

人类 SCAMP2 基因定位于 15q23-q25 染色体上,编码的蛋白与其他囊泡转运膜蛋白一样形成复合体,SCAMP 包括同源多聚体^[8]。SCAMPs 广泛存在于跨膜结构的整合蛋白中如胞内具有循环作用的细胞器的膜及分泌囊泡等,因此,其参与了细胞内囊泡转运过程^[9]。基因敲除 SCAMP2 会阻止起始阶段的囊泡转运途径^[10],从而严重影响囊泡转运体的转运活性,细胞功能会受到严重损害^[11-12]。本研究采用 RT-PCR 和 Western blot 比较 AS 患者和健康者外周血单个核细胞 SCAMP2 mRNA 表达水平的差异,发现 AS 患者 SCAMP2 mRNA 和蛋白水平均明显升高 (*P*<0.05),表明 SCAMP2 可能参与了 AS 发病机制。结合本研究结果,作者认为 AS 患者

外周血单个核细胞 SCAMP2 基因表达增高,是由于患者血液中胆固醇含量升高所产生的代偿反应,而 SCAMP2 基因表达高、低可能是 AS 发病机制的重要环节之一。

总之,本研究结果提示,SCAMP2 参与了 AS 的发生以及发展,可能是 AS 潜在的预防或治疗靶点,深入研究 SCAMP2 会为 AS 的预防和治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] 张艳波,王军.端粒、端粒保护蛋白与动脉粥样硬化的研究进展[J].国际检验医学杂志,2011,32(10):1078-1081.

[2] 林伟华,何艳,黄秀红,等.凝血纤溶系统标志物动态变化在冠状动脉粥样硬化性心脏病的应用研究[J].国际检验医学杂志,2011,32(12):1279-1280.

[3] Malygina NA,Kostomarov IV,Vodolagina NN.The genes of atherosclerosis and cardiovascular diseases[J].Klin Med (Mosk),2011,89(3):14-18.

[4] Singleton DR,Wu TT,Castle JD.Three mammalian SCAMPs(secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions[J].J Cell Sci,1997,110(17):2099-2107.

[5] Alpert JS,Thygesen K,Antman E,et al.Myocardial infarction redefined a co-sensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction[J].J Am Coll Cardiol,2000,36(3):959-969.

[6] McNew JA,Sogaard M,Lampen NM,et al.Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport[J].J Biol Chem,1997,272(28):17776-17783.

[7] Wu TT,Castle JD.Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kD isoforms of secretory carrier membrane proteins(SCAMPs)[J].J Cell Sci,1997,110(13):1533-1541.

[8] Wu TT,Castle JD.Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins(SCAMPs)[J].J Cell Sci,1997,110(13):1533-1541.

[9] Matthies HJ,Han Q,Shields A,et al.Subcellular localization of the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter[J].BMC Neurosci,2009,10:65.

[10] Liao H,Zhang J,Shestopal S,et al.Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis[J].Am J Physiol Cell Physiol,2008,294(3):C797-809.

[11] Diering GH,Church J,Numata M.Secretory Carrier Membrane Protein 2 Regulates Cell-surface Targeting of Brain-enriched Na⁺/H⁺ Exchanger NHE5[J].J Biol Chem,2009,284(20):13892-13903.

[12] Mota LJ,Ramsden AE,Liu M,et al.SCAMP3 is a component of the Salmonella-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-golgi trafficking[J].Cell Microbio,2009,11(8):1236-1253.

(收稿日期:2012-01-08)

(上接第 1050 页)

病房和门诊患者分离的表皮葡萄球菌耐药率比较分析[J].世界感染杂志,2003,2(3):24-27.

[9] 张培,王卫文,夏永祥.医院葡萄球菌的临床分布及其耐药性分析[J].国际检验医学杂志,2011,32(8):902-904.

[10] 刘昭升,谢素贞,闫蕾,等.福建地区真菌性角膜炎的流行病学研究[J].国际眼科杂志,2009,9(5):976-977.

[11] 王鸿利.实验诊断学[M].北京:人民卫生出版社,2010:394-395.

[12] 史伟云,谢立信,刘昭升,等.部分板层角膜移植术治疗真菌性角膜炎的初步报告[J].中国实用眼科杂志,2001,19(11):826-828.

[13] 夏季.分子生物学技术应用于病原微生物分子分型的研究进展[J].国际检验医学杂志,2010,31(11):1278-1279.

(收稿日期:2012-01-08)