

人白介素 10 荧光定量 PCR 检测方法的建立 及其在糖尿病肾病中的表达研究*

岳芳芳^a,倪文娟^a,冷小敏^b,刘云^a,师晶晶^a,曹东东^a,郭明好^a,马东红^a

(新乡医学院第一附属医院 a. 肾脏病医院肾脏免疫研究所; b. 生命科学研究中心, 河南卫辉 453100)

摘要:目的 建立一种稳定、灵敏的人白介素-10(IL-10)荧光定量 PCR 的检测方法,比较白介素 10 在糖尿病肾病组和对照组中的表达差异。方法 取糖尿病肾病Ⅳ期患者的外周静脉血淋巴细胞 RNA 标本,主要从模板浓度、引物筛选两方面进行探索,建立稳定、灵敏的实验方法;将建立的实验方法用于比较 33 例糖尿病肾病患者和 35 例正常健康组中血液白介素 10 的表达差异。结果 ①将 475ng 的总 RNA 逆转录成 cDNA 模板进行稀释,当模板浓度稀释范围在 10^3 倍以内,扩增引物为 F:5'-GTGATGCCCCAAGCTGAGA-3', R:5'-CACGGCCTTGCTCTTGT TTT-3' 时可以获得白介素 10 荧光定量 PCR 检测的最佳条件。②与对照组相比,糖尿病肾病组患者外周血白介素 10 的表达水平明显下调(糖尿病肾病组 16.21 ± 1.84 vs 对照组 14.39 ± 1.14),差异有统计学意义($t=7.049, P<0.01$)。结论 该研究建立了检测白介素 10 的稳定的荧光定量 PCR 方法;应用该检测方法发现,白介素 10 在糖尿病肾病组中的表达明显下降,为白介素 10 在糖尿病肾病中的功能研究和临床检测提供参考和借鉴。

关键词:白介素 10;实时荧光定量 PCR;糖尿病肾病

中图分类号:Q503;R587.2 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)04-011-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.04.003

Establishment of Real-Time Quantitative PCR Assay for Human IL-10 and Its Expression in Diabetic Nephropathy

YUE Fang-fang^a, NI Wen-juan^a, LENG Xiao-min^b, LIU Yun^a, SHI Jing-jing^a,
CAO Dong-dong^a, GUO Ming-hao^a, MA Dong-hong^a (a. Institute of Nephrology
and Immunology, the Hospital of Nephrology; b. Life Science Research Center,
the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Weihui 453100, China)

Abstract: Objective A stable and sensitive method for the detection of human interleukin-10 (IL-10) real-time fluorescence quantitative PCR was established to compare the expression differences of IL-10 in diabetic nephropathy group and control group. **Methods** The peripheral venous blood lymphocyte RNA samples were obtained from patients with stage IV diabetic nephropathy. The expression level of IL-10 was detected by real-time quantitative PCR. This experiment mainly explored both template concentration and primer screening to establish a stable and sensitive experimental method for comparing the expression levels of IL-10 in 33 patients with diabetic nephropathy and 35 normal healthy groups. **Results** ①After reversing transcription of 475 ng of total RNA into cDNA, diluting the template, and when the template concentration dilution range was within 10^3 times, and the amplification primers were F: 5'-GTGATGCCCCAAGCTGAGA-3', R: 5'-CACGGCCTTGCTCTTGT TTT-3', it could obtain the optimal conditions for the detection of IL-10 fluorescence quantitative PCR. ②Compared with the control group, the expression level of IL-10 in peripheral blood of patients with diabetic nephropathy was significantly down-regulated (diabetic nephropathy group 16.21 ± 1.84 vs control group 14.39 ± 1.14), and the difference was statistically significant ($t=7.049, P<0.01$). **Conclusion** The study established a stable real-time quantitative PCR method for the detection of IL-10. By this method, it was found that the expression of IL-10 was significantly decreased in the diabetic nephropathy group. It will provide reference for the functional research and clinical detection of IL-10 in diabetic nephropathy.

Keywords: interleukin-10; real-time quantitative PCR; diabetic nephropathy

白介素 10(interleukin-10, IL-10)是目前公认的性 T 细胞和单核/巨噬细胞产生,在炎症疾病、自身的抗炎与免疫抑制因子,它主要由 Th2 细胞、调节自身免疫性疾病、器官移植、血液疾病及癌症中具有

* 基金项目:河南省科技厅重点研发与推广项目(182102310585);河南省高等学校重点科研项目(17A320026);河南省卫生厅科技攻关省部共建备选项项目(2018010013)。

作者简介:岳芳芳(1991—),女,硕士,住院医师,研究方向:糖尿病肾病, E-mail:1010208531@qq.com。

通讯作者:郭明好(1964—),男,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:肾小球疾病, E-mail:guomh@163.com。

马东红(1980—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:糖尿病肾病, E-mail:dhmaxmu@163.com。

重要价值,参与炎症反应和免疫反应^[1]。研究表明 IL-10 参与糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN) 的发生,其可能成为 DN 治疗的新靶点之一。而既往关于 IL-10 在 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)或 DN 中表达水平的研究得出了相矛盾的结论^[2-5],为进一步明确 IL-10 在 DN 患者中的表达水平,我们有必要建立一种稳定、灵敏的检测方法。本研究主要从模板浓度、引物筛选两方面优化 IL-10 RNA 荧光定量技术,并进一步对 IL-10 在 DN 组及对照组中的表达水平进行批量对比,为 DN 发病机制的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象 DN 组:选取 2017 年 8 月~2018 年 5 月于新乡医学院第一附属医院肾病科及内分泌科住院的 33 例 DN 患者,其中 DNⅢ期患者 11 例,平均年龄 58.91 ± 10.50 岁;DNⅣ期患者 22 例,平均年龄 57.55 ± 10.43 岁。对照组:健康体检人员 35 例,平均年龄 53.66 ± 5.80 岁。其中, DN 组 T2DM 的诊断符合中国 2 型糖尿病防治指南(2017 年版)^[6]中 T2DM 的诊断标准;根据 Mogensen 分期,达到 DNⅢ期、Ⅳ期标准。所有入

组研究对象均知情同意并签署知情同意书。由新乡医学院第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器 人外周血淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司, RNAiso Plus(Total RNA 提取试剂), PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time), TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)[原名为 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus)]试剂盒均购自宝日生物技术(北京)有限公司。实时荧光定量 PCR 仪、梯度 PCR 仪均产于新加坡 Life Technologies。超微量分光光度计产于英国 JENWAY。高速离心机来自美国 Thermo。DYY-6C 型电泳仪购自北京市六一仪器厂,凝胶成像系统来自英国 UVI。

1.3 方法

1.3.1 引物的设计与合成:根据 Genbank 中人 IL-10, β -actin 的基因序列信息,使用 Primer 5.0 软件设计 3 对引物(分别简称 P1, P2, P3)。由北京六合华大基因科技有限公司合成。IL-10 的荧光定量 PCR 扩增引物信息见表 1。

表 1

IL-10 的荧光定量 PCR 扩增引物

引物名称	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	GC 含量(%)	产物长度(bp)
P1	F: TGAGAACCAAGACCCAGACATCA	58.42	47	142
	R: GGCATTCTTCACCTGCTCCAC	59.76	57	
P2	F: GAGGTGATGCCCCAAGCTG	62.00	63	141
	R: CACGGCCTTGCTCTTGT TTT	55.40	50	
P3	F: GTGATGCCCCAAGCTGAGA	60.00	57	138
	R: CACGGCCTTGCTCTTGT TTT	55.40	50	
β -actin	F: GAAACTACCTTCAACTCCATC	53.90	42	219
	R: CGAGGCCAGGATGGAGCCGCC	67.57	76	

1.3.2 血液样本处理:抽取外周静脉血 3 ml 置于抗凝管中, 4℃ 保存, 24 h 内进行处理。

分离淋巴细胞: 3ml 人外周血淋巴细胞分离液加 3ml 的全血离心, 600 g 20 min。吸取环状乳白色淋巴细胞层到另一离心管中; 加入同体积的生理盐水清洗淋巴细胞, 250 g 离心 10 min 后弃上清; 重复清洗 2 次; 弃上清后得细胞, 加入 500 μ l 的 RNAiso Plus 裂解细胞。

1.3.3 RNA 的提取及 cDNA 的合成: 提取 RNA: 向上述匀浆裂解液中加入三氯甲烷(RNAiso Plus 的 1/5 体积量), 混匀, 室温静置 5 min。4℃ 12 000 g 离心 15 min, 吸取上清液至另一离心管中。向上清中加入 0.5 倍 RNAiso Plus 体积的异丙醇, 混匀, 室温静置 10 min。4℃ 12 000 g 离心 10 min, 弃上清, 加入与 RNAiso Plus 等量的 75%(v/

v) 乙醇, 上下颠倒洗涤离心管管壁; 4℃ 7 500 g 离心 5 min 后弃上清。室温沉淀干燥 5 min, 沉淀干燥后, 加入 20 μ l 的 RNase-free 水溶解沉淀。经超微量分光光度计测定其浓度, 并取 2 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

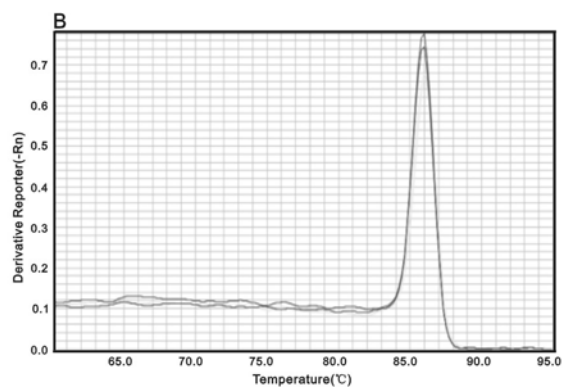
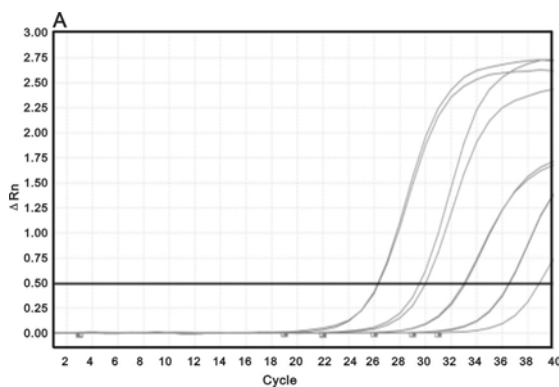
PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)进行基因组 DNA 的去除并进行反转录反应。

1.3.4 荧光定量 PCR 反应条件的优化: 20 μ l 反应体系: TB GreenTM Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 10 μ l, ROX Reference Dye II 0.4 μ l, PCR Forward Primer(10 μ mol/L) 0.8 μ l, PCR Reverse Primer(10 μ mol/L) 0.8 μ l, cDNA 模板 1 μ l(在原液的基础上稀释不同的倍数: 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4), 灭菌水 7 μ l。程序设置: 预变性 95℃

30s, 变性 95℃ 5s, 延伸 60℃ 34s, 共 40 个循环; 熔解曲线阶段 95℃ 15s, 60℃ 60s, 95℃ 15s。在反应体系基础上, 使用 3 对不同的引物(P1, P2, P3)进行 PCR 扩增。

1.3.5 特异性检测: 荧光定量 PCR 结果熔解曲线分析查看是否有特异型单峰, 并进一步将荧光定量 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析, 验证扩增产物的特异性。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism6, SPSS 21.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两独立样本比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

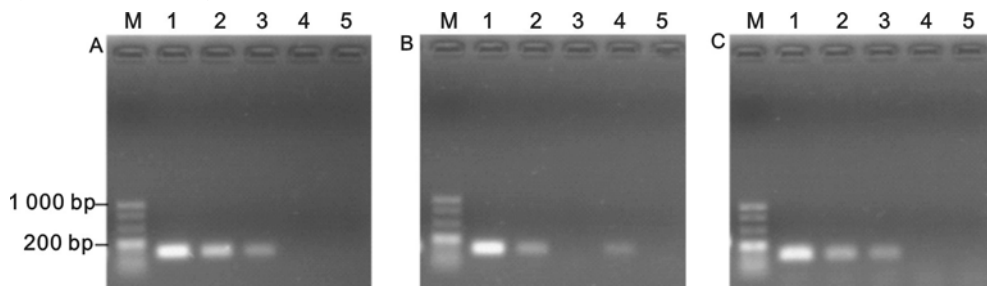


A: cDNA 模板在 $10^0, 10^1, 10^2, 10^3$ 稀释倍数下, 引物为 P3 时获得的扩增曲线; B: 引物为 P3 时获得的熔解曲线。

图1 扩增曲线和熔解曲线

2.3 琼脂糖凝胶电泳 应用 P1, P3 扩增的产物基本稳定, 在 cDNA 模板稀释倍数为 10^0 时, 条带清晰、稳定, 分辨率高; 电泳仅观察到一个预测大小

的单条带, 说明特异性扩增无明显的副产物; 当 cDNA 模板稀释倍数为 $10^3, 10^4$ 时, 在 P1, P3 未见扩增产物, 见图 2。



M: 分子量标准 DL2000; 1~5: 荧光定量 cDNA 模板稀释倍数依次为: $10^0, 10^1, 10^2, 10^3, 10^4$; A, B, C 分别为 P1, P2, P3 在不同 cDNA 模板稀释倍数下扩增的电泳成像结果。

图2 PCR 产物凝胶电泳图像

2.4 DN 组与对照组 IL-10 RNA 表达水平 将建立的实验条件用于检测两组 IL-10 RNA 的表达, 结果显示: 与对照组 (14.39 ± 1.14) 相比, DN 组 (16.21 ± 1.84) 的 RNA 表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 7.049, P < 0.01$)。考虑到 DN III 期、DN IV 期的临床表现不同, 其 IL-10 RNA 表达可能存在差异。因此, 我们又进行了组间对比, 结果显示: DN IV 期患者的 RNA 水平较 DN III 期患者稍有升高, 差异无统计学意义 ($t = 1.537, P = 0.129$); 但与对照组相比, DN III 期 (16.69 ± 1.06) 与 DN IV 期 (15.96 ± 2.09) 患者 IL-10 RNA 的表达水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($t = 8.452,$

2 结果

2.1 标准曲线 P1 的相关系数为 0.976 7, 斜率为 -2.474 6; P2 的相关系数为 0.782 2, 斜率为 -1.902 3; P3 的相关系数为 0.999 6, 斜率为 -3.272 2。在 P3 扩增体系下可以得到最优的标准曲线, 使起始模板浓度与循环数有良好的线性关系。

2.2 扩增曲线、熔解曲线 P3 的扩增曲线符合标准的“S”形荧光扩增曲线, 曲线拐点清楚, 基线平而无明显上扬趋势; 熔解曲线呈单一的主峰, 说明扩增产物特异, 没有非特异性产物出现, 见图 1。

5.248, 均 $P < 0.01$)。

3 讨论 以往研究表明, 炎症在 DN 的进展中起着重要作用^[7]。IL-10 作为目前公认的抗炎与免疫抑制因子, 在 DN 的发生发展过程中具有重要价值。关于在 T2DM 或 DN 中 IL-10 表达水平的检测, 目前的研究大部分都采用 ELISA 法, 但得出了相矛盾的研究结果^[2-5]。ELISA 的检测方法需要特异的抗体和一定量的蛋白, 在进行抗原或抗体检测时可能会出现假阳性或假阴性, 灵敏度不高^[8]; 对分析低水平表达的细胞因子不够敏感, 且只能从单个样本中分析有限的细胞因子。而实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技术具

有操作方法简单、灵敏度高、特异度强的优点,即使是对低水平的细胞因子基因表达,也是一种有效的定量方法。近年来,qPCR被广泛用于定量细胞、体液、组织或组织活检中RNA的表达水平。该技术不仅在分子生物学的各个领域得到了充分利用,在许多疾病的诊断方面,特别是肿瘤的早期诊断、疗效观察以及癌基因与肿瘤的关系方面也有涉及^[9-10]。但qPCR对反应条件的变化相当敏感,一旦条件不合适便得不到理想的结果,所以优化反应条件是qPCR获得可靠结果的前提^[11]。

本研究利用qPCR来检测IL-10RNA表达,从模板浓度、引物筛选两方面进行探索,当20 μ l反应体系475 ng RNA逆转录成cDNA后取1 μ l,引物为F:5'-GTGATGCCCCAAGCTGAGA-3',R:5'-CACGGCCTTGCTCTTGT-3'时,能够得到较为稳定灵敏的扩增效果。我们前期通过ELISA法对比两组IL-10表达水平,结果显示DN组IL-10表达水平明显低于对照组($P<0.01$)。该结果与本实验研究结果是一致的,进一步证实IL-10是参与DN发病机制的一个重要环节,其在DN患者中表达下调。

在关于IL-10在T2DM或DN中表达水平的研究中,本研究结果与YUAN等^[4-5]一致,但与AL-SHUKAILI等^[2-3]相反,考虑有以下原因:与以往研究不同,在关于DN患者的研究中我们首次参考了Mogensen分期,本研究中病例组主要以DNⅢ期、Ⅳ期为研究对象。WONG等^[3]的研究未对入组标本进行分期;AL-SHUKAILI等^[2]的研究中其研究对象为T2DM患者,尚未发展至DN阶段。因此研究结果不一致可能与入组标准不一致、入组患者结构、年龄及病程存在差异有关。另外,本研究中DNⅢ期、Ⅳ期患者的IL-10RNA表达无统计学意义,考虑可能受样本量小的影响。综上,本研究优化的实验条件操作简单、结果稳定,利于临床推广应用;该检测方法可为DN抗炎机制的研究提供技术支持。

参考文献:

- [1] 杨颖涛. 白细胞介素10基因多态性与食管癌的关系及其机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
YANG Yingtao. The relationship between IL-10 gene polymorphisms and esophageal cancer and its preliminary molecular mechanisms [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.
- [2] AL-SHUKAILI A, AL-GHAFRI S, AL-MARHOUBI S, et al. Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients[J]. International Journal of Endocrinology, 2013, 2013: 976810.
- [3] WONG C K, HO A W, TONG P C, et al. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 149(1): 123-131.
- [4] YUAN Ning, ZHANG Haifeng, WEI Qi, et al. Expression of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells, interleukin 10 and transforming growth factor β in newly diagnosed type 2 diabetic patients[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2018, 126(2): 96-101.
- [5] YAGHINI N, MAHMOODI M, ASADIKARAM G R, et al. Serum levels of interleukin 10(IL-10) in patients with type 2 diabetes[J]. Iran Red Crescent Med J, 2011, 13(10): 752.
- [6] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(4): 292-344.
Chinese Diabetes Society. Guidelines for the prevention and control of type 2 diabetes in China (2017 Edition)[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 2018, 38(4): 292-344.
- [7] WADA J, MAKINO H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Clin Sci, 2013, 124(3): 139-152.
- [8] 陈显, 朱绍汶, 黄成垠, 等. ELISA法检测抗-HCV灰区设置探讨[J]. 临床输血与检验, 2013, 15(3): 243-244.
CHEN Xian, ZHU Shaowen, HUANG Chengyin, et al. Discussion on the detection of anti-HCV gray zone by ELISA[J]. Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine, 2013, 15(3): 243-244.
- [9] ORRÙ G, OCCHINEGRO A, RATTO D, et al. MiRNA-155 and colorectal cancer, the role of real time PCR in laboratory diagnosis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(6): 1521-1524.
- [10] PENG Juan, XIE Zhengyong, CHENG Liyang, et al. Paired design study by real-time PCR: miR-378* and miR-145 are potent early diagnostic biomarkers of human colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 158.
- [11] 曹锡梅, 梁俊红, 张潮, 等. 均匀设计在候选内参基因RT-qPCR实验条件优化中的应用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2012, 21(6): 522-527.
CAO Ximei, LIANG Junhong, ZHANG Chao, et al. Application of uniform design to optimize quantitative real-time RT-qPCR conditions in potential internal control genes[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2012, 21(6): 522-527.

收稿日期: 2019-03-14

修回日期: 2019-04-23