



基因芯片筛选门静脉高压症脾亢脾和正常脾巨噬细胞中差异表达基因

研究表明,同正常脾脏相比,门静脉高压症(portal hypertension, PHT)脾脏巨噬细胞(M ϕ)内酸性磷酸酶含量增多, M ϕ 表面伪足增多、增长,胞内溶酶体数量增多, M ϕ 吞噬破坏红细胞、血小板的数量明显增多。这些都说明M ϕ 在PHT脾亢发生中起着重要作用[1][2]。但是, M ϕ 的吞噬功能为何会增强,其吞噬功能受哪些基因调控等问题都需要进一步的深入研究。只有解决了这些关键问题,才能采用基因治疗方法来调控M ϕ 的吞噬功能,以期从根本上治疗PHT脾亢。我们利用基因芯片技术把PHT脾亢M ϕ 的基因谱与正常脾M ϕ 进行对照,探讨差异的基因在PHT脾亢发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验组为PHT脾亢患者(均为慢性乙型肝炎患者)的手术切除脾脏(3例),正常对照组为外伤脾破裂患者的手术切除脾脏(2例)。

1.2 主要试剂

杂交试剂1、杂交试剂2、标记试剂I、标记试剂II、标记试剂III、洗片试剂1、洗片试剂2、洗片试剂3、二硫苏糖醇(1,4-Dithiothreitol, DTT)等均为上海博星基因芯片有限公司芯片杂交试剂盒中的组分; Cy3/cy5染料为美国Amersham Pharmacia Biotech公司产品; 逆转录酶-Superscript II为美国Gibco公司产品; Oligo(dt)18为中国上海生工生物工程公司产品; dNTP为美国Promega公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 脾脏组织M ϕ 的分离与纯化及总RNA的提取 脾脏组织M ϕ 的分离纯化按照贴壁培养法进行[3]。采用TRIzol试剂一步法抽提脾脏M ϕ 总RNA[4]。

1.3.2 芯片制备 Biostar-H140s cDNA表达谱芯片由上海博星基因芯片有限公司提供,含14 112种人类基因。芯片所用的靶基因cDNA克隆由联合基因科技(集团)有限公司提供,用通用引物进行聚合酶链反应(PCR)扩增,PCR反应产物长度多为1000~3000 bp。PCR反应及产物纯化按标准方法进行,通过琼脂糖电泳监控PCR质量。将靶基因溶于点样液中,用Cartesian公司(美国)的prosys-5510A点样仪及TeleChem公司(美国)的硅烷化玻片进行点样。点样后玻片进行2 h水合、30 min室温干燥,并置于紫外交联仪中交联,再分别用0.2%十二烷基硫酸钠(SDS)、水和0.2%硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用。

1.3.3 探针标记 参照Schena方法反转录标记cDNA探针并纯化。将2例正常脾脏组织M ϕ 总RNA混合后,以Cy3-dCTP标记其cDNA,3例PHT脾亢脾脏组织M ϕ 总RNA分别以Cy5-dCTP标记其各自的cDNA。将两种探针等量混合,使用DNA纯化柱(或乙醇沉淀)纯化DNA后,溶解于杂交液中。

1.3.4 芯片杂交及洗涤 芯片置于含0.5 mg/ml变性鲑鱼精DNA的杂交液中,42 °C预杂交6 h。将基因芯片和杂交探针分别置于95 °C水浴中变性5 min,再立即将探针加在基因芯片上,盖玻片封片,并置于密封

舱内42 °C杂交16~18 h。用0.5%洗涤液1冲洗玻片，去除盖玻片。准备两个染色缸，分别装有0.5%洗片试剂1+2%洗片试剂2、5%洗片试剂3，放入60 °C水浴锅中。将玻片依次浸入以上两个染色缸中洗涤10 min。用0.5%洗涤液1 冲洗玻片，晾干后扫描(该步骤所使用试剂均为上海博星基因芯片有限公司芯片杂交试剂盒中的组分)。

1.3.5 检测与分析 采用ScanArray4000扫描仪(Packard Biochip Technologies 公司, 美国)两种波长扫描芯片，提取两种染料(Cy3和Cy5)荧光信号的强度值。用芯片上选定的96个管家基因修正每一点的原始提取信号值。QuantArray软件(Packard Biochip Technologies 公司, 美国)分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度，计算每个基因点在本次实验中的表达差异值， $Ratio=Cy5/Cy3*(Cy3*$ 为Cy3信号值与均一化系数的乘积)。两种荧光信号的强度分别代表被标记的两种探针的含量，芯片上某一点的Ratio值代表PHT脾亢脾脏组织M ϕ 与正常脾脏组织M ϕ 基因mRNA表达丰度之比。检测结果以杂交信号强度散点图和双色荧光标记叠加图表示。

2 结果

2.1 双色荧光标记叠加图

图1为一张杂交芯片各自的双色荧光标记叠加图。图中红点代表与正常脾脏M ϕ 相比在PHT脾亢脾脏组织M ϕ 中上调的基因，绿点代表PHT脾亢脾脏组织M ϕ 中下调的基因，黄点代表在正常脾脏M ϕ 和PHT脾亢脾脏组织M ϕ 中表达水平相同的基因。图中可见芯片杂交信号清晰、均衡，结果可靠。实验结果显示，PHT脾亢脾脏组织M ϕ 与正常脾脏组织M ϕ 相比较，部分基因表达差异呈上调趋势，也有部分基因表达差异呈下调趋势，大部分基因表达无显著差异。



图1 基因芯片的杂交信号

Fig.1 Scanning results of hybridization signals on the gene chip
Red: High expression; Green: Low expression; Yellow: Unchanged expression

2.2 杂交信号强度散点图

图2为一张杂交芯片的杂交信号强度散点图。实验结果显示，大部分基因点聚集在几乎为45度对角线的周围，为红点，与正常脾脏组织M ϕ 相比其强度差异在0.5~2.0之间，表示在PHT脾亢脾脏组织M ϕ 与正常脾脏组织M ϕ 中，这些基因的表达没有差异。而一些基因点分布在45度对角线外，远离对角线，为黄点，其信号差异在0.5~2.0范围之外，表示PHT脾亢脾脏组织M ϕ 中表达发生显著改变(上调或下调)的基因。

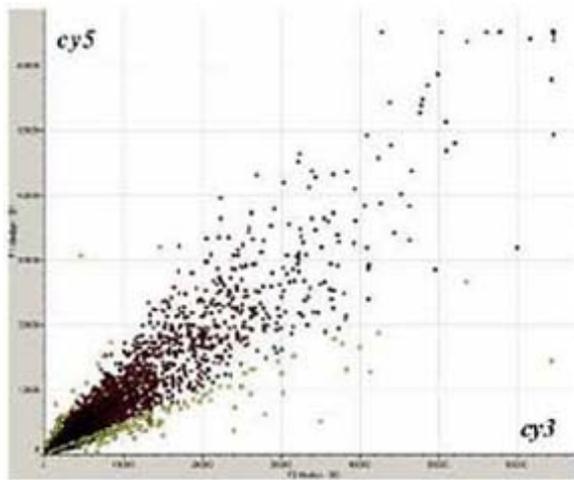


图2 基因芯片杂交信号的强度散点图
Fig.2 Scatter plots of the hybridization signals on the gene chip

2.3 检测到的差异表达基因

3张芯片分别检测到896、1330和898个差异表达基因。在3张芯片均出现同样改变的基因被认为是恒定的差异表达基因，共有121个基因，占总基因数的0.86%。其中95个基因能在GenBank中登陆，其余26个未见报道，可能为新基因。检索Medline，95个已报道基因中有一个与乙型肝炎相关(GenBank号为：NM_012218)，其余94个基因则可能为PHT脾亢脾脏组织M ϕ 与正常脾脏组织M ϕ 间的差异表达基因。其中表达上调的已知基因有21个，表达下调的已知基因有73个。表1列出了已经明确功能分类的表达上调的基因10个，表2列出了已经明确功能分类的表达下调的基因18个。

表 1 PHT 脾亢脾 M ϕ 中表达上调的差异表达基因
Tab.1 Differentially expressed genes up-regulated in the macrophages in the spleen of patients with portal hypertension

| GenBank No. | Genes and description | Average ratio |
|-------------|--|---------------|
| AF189009 | UBQLN2, ubiquitin 2 | 2.117 |
| BX537509 | NET1, neuroepithelial cell transforming gene 1 | 2.270 |
| NM_004830 | CRSP3, cofactor required for Sp1 transcriptional activation | 2.334 |
| AF025771 | ZNF189, zinc finger protein 189 | 2.453 |
| AK090727 | Homo sapiens cDNA FLJ3408 fis, clone BRACE2010550 | 2.511 |
| BX537955 | TRIM37, tripartite motif-containing 37 | 2.553 |
| NM_006716 | ASK, activator of S phase kinase | 2.620 |
| NM_181523 | PIK3R1, phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 | 2.755 |
| XM_376537 | Homo sapiens BCL2-associated transcription factor 1 (BCLAF1), mRNA | 2.993 |
| NM_004416 | DTX1, deltex homolog 1 (Drosophila) | 3.553 |

表 2 PHT 脾亢脾 M ϕ 中表达下调的差异表达基因

Tab.2 Differentially expressed genes down-regulated in macrophages in the spleen of patients with portal hypertension

| GenBank No. | Genes and description | Average ratio |
|-------------|---|---------------|
| BC068441 | IL1RN, interleukin 1 receptor antagonist | 0.179 |
| NM_014909 | KIAA1036 | 0.268 |
| BU732296 | Homo sapiens cDNA clone UI-E-CIL-af0-e-04-0-UI3', mRNA sequence | 0.275 |
| AK092248 | Homo sapiens cDNA FLJ34929 fis, clone NT2RP7004728 | 0.293 |
| NM_006254 | PRKCD, protein kinase C, delta | 0.298 |
| BX648172 | OAZ2, ornithine decarboxylase antizyme 2 | 0.302 |
| BM542499 | Homo sapiens cDNA clone IMAGE5521023 5', mRNA sequence | 0.311 |
| BF240734 | Homo sapiens cDNA clone IMAGE4091885 5', mRNA sequence | 0.324 |
| NM_003902 | FUBP1, far upstream element (FUSE) binding protein 1 | 0.338 |
| BM993772 | Homo sapiens cDNA clone IMAGE5869020 3', mRNA sequence | 0.344 |
| NM_005373 | MPL, myeloproliferative leukemia virus oncogene | 0.359 |
| BX647757 | SCML1, sex comb on midleg-like 1 (Drosophila) | 0.370 |
| NM_005781 | ACK1, activated Cdc42-associated kinase 1 | 0.381 |
| AL832249 | Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686P1077 | 0.390 |
| AK092130 | LOC285378, hypothetical protein LOC285378 | 0.406 |
| AF466367 | Homo sapiens clone KU011197 unknown mRNA | 0.434 |
| NM_001067 | TOP2A, topoisomerase (DNA) IIalpha | 0.437 |
| AF051151 | TLR5, toll-like receptor 5 | 0.452 |

3 讨论

基因芯片是将大量的靶基因片段有序地、高密度地固定在玻璃、硅等载体上的一项技术。自1995年Schena等[5]首次报道基因表达谱芯片以来,基因芯片已广泛地用于基因功能的研究。本实验结果充分体现了基因芯片技术能够低消耗、高灵敏度、高通量地分析细胞内基因表达谱的特点。通过比较分析PHT脾亢脾M ϕ 与正常脾M ϕ 之间的差异表达基因,从中发现PHT脾亢发生的相关基因群,为研究PHT脾亢的发病机制提供新线索与新思路。目前国内外尚未见相同报道。我们通过合并2例正常脾脏M ϕ 的RNA组成一个样本池作为对照组,分别与3例PHT脾亢脾M ϕ 的RNA连续比较3次,以达到取得足够用于芯片分析的RNA和消除个体差异的目的。分析发现PHT脾亢脾M ϕ 与正常脾M ϕ 之间存在的差异表达基因涉及离子通道和运输蛋白、细胞周期蛋白类、细胞骨架和运动、DNA合成和修复及重组蛋白、DNA结合及转录和转录因子、细胞受体、细胞信号和传递蛋白、代谢、免疫相关以及一些功能尚未明确的基因等多个方面。

表达下调的基因中,有PRKCD(protein kinase C, delta),它编码 δ -蛋白激酶C。许多炎症反应是由15-脂肪加氧酶作用的产物所介导的, δ -蛋白激酶C能够调节人单核细胞内IL-13介导的15-脂肪加氧酶的基因表达,从而可以调整其炎症反应的发生[6]。此外,PRKCD还与单核细胞的分化有关[7]。这些研究表明PRKCD与人体内单核细胞(包括M ϕ)的功能密切相关。成熟的树突状细胞是人体内最为重要的抗原提呈细胞之一,因而其活性的调节尤为重要。Bertho等[8]发现,激活PRKCD同工酶能够诱导成熟树突状细胞发生II型人类组织相容性复合物所介导的细胞凋亡。纤维蛋白酶可以刺激内皮细胞生成血管细胞粘附分子-1(VCAM-1),而这一过程是由PRKCD参与的信号传导通路所调节的[9]。以上研究表明,PRKCD在诱导细胞凋亡、生成细胞因子等方面发挥着重要作用。但PRKCD表达减少对于PHT脾亢脾M ϕ 的影响尚需进一步研究。动物实验和人体疾病研究均

表明, IL-1作为炎性介质, 在多种脏器的组织损伤和反应过程中起着重要作用。局部组织内IL-1与IL-1受体拮抗剂(IL-1Ra)之间的平衡, 与许多疾病的发生及其严重程度密切相关。研究表明, 每日皮下注射重组IL-1Ra对于风湿性关节炎有很好的疗效, 现在正在尝试应用IL-1Ra对多种疾病进行基因治疗[10]。PHT脾亢脾M ϕ 较之正常脾M ϕ , 其IL1RN(编码IL-1Ra)明显下调(平均Ratio值为0.179), 导致了IL-1与IL-1Ra间的失衡, 可能与PHT脾亢的发生相关, 具体机制尚需探讨。

表达上调的基因中, 有ASK(activator of S phase kinase), 它编码DNA合成期激酶活性因子。Cdc7-Dbf4激酶复合物广泛存在于真核生物内, 在DNA合成期的启动和进展过程中均发挥着重要作用。在细胞周期内, Cdc7激酶的活性也存在有周期性的变化, 这是由于其亚单位Dbf4表达水平变动所引起的。Yamada等[11]研究了人ASK基因编码的Cdc7激酶的活性调节基因(与Dbf4相关), 分离鉴定了对应的ASK启动子区域, 证实这一ASK启动子能够有效地刺激细胞生长。PHT脾亢脾M ϕ 内ASK明显上调, 可能导致M ϕ 活性增强(包括其吞噬功能的增强), 这或许是PHT脾亢发生的机制之一。磷脂酰肌醇激酶(PIK3)在胰岛素的代谢中起着重要作用。PIK3R1(phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1)编码PIK3中的一个调节亚基(相对分子质量为85 000)。研究表明, PIK3R1的表达与葡萄糖-胰岛素内稳态的改变有关[12]。M ϕ 内PIK3R1明显上调, PIK3活性增强, 表明M ϕ 内存在有高水平的胰岛素, 反映M ϕ 内糖代谢活动增强。而糖代谢的增强是反映细胞功能增强的指标之一, 因而PHT脾亢M ϕ 内PIK3R1明显上调, 表明M ϕ 的各项功能较正常脾脏M ϕ 可能是增强的。至于PIK3R1在PHT脾亢发生中的确切作用机制尚需进一步研究。

利用cDNA芯片研究PHT脾亢M ϕ 与正常脾M ϕ 的差异表达基因, 能够发现一些进一步研究的线索和靶基因, 这些基因表达的意义有待今后的工作证实。

参考文献:

- [1]Wang YX, Li ZF, Li GW, et al. Effect of splenomegaly and splenic macrophage activity in hypersplenism due to cirrhosis[J]. Am J Med, 2002, 113(5): 428-31.
- [2]李宗芳, 张煜, 高君, 等. 门静脉高压症脾功能亢进患者巨噬细胞Toll样受体4的表达及其意义[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(13): 1088-91.
- [3]闫峰, 李宗芳, 张澍, 等. 人脾脏巨噬细胞的分离与纯化[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2004, 25(5): 452-5.
- [4]闫峰, 李宗芳, 苏清华, 等. 人脾脏巨噬细胞总RNA的提取和产率研究[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 22(2): 176-7.
- [5]Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 467-70.
- [6]Xu B, Bhattacharjee A, Roy B, et al. Role of protein kinase C iso-forms in the regulation of interleukin-13-induced 15-lipoxygenase gene expression in human monocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(16): 15954-60.
- [7]Liu H, Keefer JR, Wang QF, et al. Reciprocal effects of C/EBPalpha and PKCdelta on JunB expression and monocytic differentiation depend upon the C/EBPalpha basic region[J]. Blood, 2003, 101(10): 3885-92.
- [8]Bertho N, Blancheteau VM, Setterblad N, et al. MHC class II-mediated apoptosis of mature dendritic cells proceeds by activation of the protein kinase C-delta isoenzyme[J]. Int Immunol, 2002, 14(8): 935-42.
- [9]Minami T, Abid MR, Zhang J, et al. Thrombin stimulation of vascular adhesion molecule-1 in endothelial cells is mediated by protein kinase C (PKC)-delta-NF-kappa B and PKC-zeta-GATA signaling pathways[J]. J Biol Chem, 2003, 278(9): 6976-84.
- [10]Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(4-5): 323-40.

[11]Yamada M, Sato N, Taniyama C, et al. A 63-base pair DNA segment containing an Sp1 site but not a canonical E2F site can confer growth-dependent and E2F-mediated transcriptional stimulation of the human ASK gene encoding the regulatory subunit for human Cdc7-related kinase[J]. J Biol Chem, 2002, 277(31): 27668-81.

[12]Almind K, Delahaye L, Hansen T, et al. Characterization of the Met326Ile variant of phosphatidylinositol 3-kinase p85alpha[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2124-8.

[回结果列表](#)