

微矩阵基因芯片筛选抗抑郁剂地昔帕明相关基因的研究

李云峰*, 赵楠, 袁本利, 罗质璞
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: **目的** 研究抗抑郁剂相关基因,探讨其可能作用机制。**方法与结果** 以高浓度皮质酮(Cort)10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 Cort 与三环类经典抗抑郁剂地昔帕明(DIM)5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 共同处理 PC12 细胞 3 d 分别作为对照组和实验组,按 Trizol 一步法提取细胞总 RNA 并纯化 mRNA,将等量的对照组与实验组 mRNA 以逆转录法分别标记荧光素 cy3 和 cy5,合成 cDNA 探针并等量混合,与小鼠 2048 点微矩阵基因芯片杂交,扫描荧光信号图像并分析比较二组差异表达基因,发现 DIM 与 Cort 共孵 PC12 细胞 3 d 可以诱导 259 个基因表达水平发生改变。其中 163 个基因表达降低,如葡萄糖调节蛋白 78 ku、葡萄糖激酶(GA)、细胞骨架蛋白、转化性生长因子 β 受体结合蛋白、细胞色素 C 氧化酶、锂盐敏感性内消旋肌醇一磷酸酯酶等;有 96 个基因表达水平升高,如神经元生长分化因子-9(GDF-9)、锌指蛋白 216、细胞色素 P450、睾丸特异基因-1 等。随机选取二个差异表达基因——GA 和 GDF-9,以细胞原位杂交方法验证,取得与基因芯片评价一致的结果。**结论** 抗抑郁剂 DIM 作用可能与能量代谢、细胞骨架、营养因子、酶等多层次、多水平的基因表达改变有关。本研究利用基因芯片技术对抗抑郁剂相关基因进行了初步探索,为深入研究抗抑郁剂作用机制和药物筛选芯片的研发提供了线索与依据。

关键词: 抗抑郁剂; 地昔帕明; 基因表达; 基因芯片; 细胞, PC12; 皮质酮

中图分类号: R971.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)03-0184-08

收稿日期: 2002-08-28 接受日期: 2002-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870876)

作者简介: 李云峰(1972-),男,北京大兴人,助理研究员,医学博士,主要从事神经精神药理学研究。

* 联系作者 E-mail: LYF619@yahoo.com.cn Tel: (010)66874606-5 Fax: (010)68211656

经典三环类抗抑郁剂用于临床已半个世纪,疗效明确,但作用机制不明。尽管陆续有不同层次的假说被提出,如“单胺假说”、“受体假说”、“第二信使失衡假说”、“神经元营养假说”、“下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA)负反馈失调与亢进假说”,总体发展趋势是从递质到受体乃至受体后信号转导水平,但这些假说均不能令人满意地解释抗抑郁剂的作用(如为何服用抗抑郁剂 2~6 周方能起效等)。因此,在基因水平的探索成为大势所趋。

基因芯片技术是将一组基因集成在一张玻璃片上,用两种不同的荧光素(如 cy3 和 cy5)分别逆转录标记两种组织(细胞)的 mRNA,形成 cDNA 探针。将探针混合后与基因芯片杂交并以相应的两种荧光波长扫描芯片,通过软件处理分析出基因在不同组织中的表达差异,是研究疾病与药物相关基因的重要手段。目前,利用基因芯片对抗抑郁剂相关基因的研究国内外尚鲜有报道。

研究表明,抑郁病人左右侧海马较之正常人显著减小,且减小程度与抑郁持续时间呈正相关,这可能是由于抑郁病人 HPA 轴功能亢进,血中糖皮质激素(glucocorticoids, GC)显著持续性升高造成的^[1,2]。Murphy^[3]报道抗糖皮质激素治疗对重症抑郁效果很好,提示 GC 在抑郁的发生中作用很关键。人的脑神经细胞上存在介导 GC 作用的受体,其中海马上表达水平最高^[4],抑郁病人海马 GC 受体由于血中 GC 水平持续升高而下调,从而使海马对 HPA 轴负反馈障碍,血中 GC 水平得到维持^[5]。抑郁症的发生可能与 GC 对海马的选择性损伤有关^[1~5],如果反复制动应激或腹腔注射皮质酮(corticosterone, Cort)确可引起大鼠海马 CA3 神经元萎缩、变性、死亡^[2,6],而抗抑郁剂提高大鼠脑内神经营养因子的表达水平^[7]。本室前期研究发现,现有三类经典抗抑郁剂及在研抗抑郁新药对 Cort 损伤的 PC12 细胞或原代培养的大鼠海马细胞均有显著的保护作用,而抗精神病药氯丙嗪和抗焦虑药地西洋无此作用,

提示尽管各类抗抑郁剂结构迥异,但神经元保护作用可能是它们的共同作用通路。进一步研究发现,三环类抗抑郁剂地昔帕明(desipramine, DIM)对Cort $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (5 d)诱导的PC12细胞凋亡也有显著的保护作用^[8]。PC12细胞株为小鼠嗜铬细胞克隆化细胞株,分化的PC12细胞有典型的神经细胞特征,GC受体表达丰富^[9]。本研究以高浓度Cort模拟抑郁症神经细胞损伤状态,利用基因芯片技术对DIM的相关基因进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

嗜铬细胞瘤株PC12细胞由北京大学万有博士惠赠。Cort及DIM均购自Sigma公司(美国);DMEM培养基及Trizol为Gibco BRL(美国)产品;小鼠2048点基因芯片及检测试剂盒购自上海联合基因公司;mRNA分离纯化试剂盒购自Promega公司(美国);原位杂交探针及检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 细胞培养及mRNA提取

用含5%胎牛血清及5%马血清的DMEM培养液(含青霉素钠 $200 \text{ kU}\cdot\text{L}^{-1}$,链霉素 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4)将细胞稀释为每毫升悬液含 2×10^5 个细胞,接种于50 mL塑料培养瓶中,置CO₂孵箱(美国Napco公司),在37℃,5% CO₂条件下培养3~4 d,待细胞长满孔底后即可用于实验。以含Cort $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或Cort + DIM $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DMEM处理细胞3 d,Trizol一步法分别提取总RNA,紫外分析及电泳检测显示其质量可靠($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} > 1.8$)。用mRNA分离纯化试剂盒提取mRNA($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} > 1.9$)。

1.3 探针制备与芯片杂交

按基因芯片检测试剂盒说明进行。50 μL 逆转录反应体系中加入3 μg mRNA反转录为cDNA探针,荧光染料cy3或cy5接于dUTP上,在反转录同时掺入进行标记。其中,cy3-dUTP标记Cort组mRNA,cy5-dUTP标记Cort + DIM组mRNA,乙醇沉淀后将cy3-dUTP和cy5-dUTP标记的cDNA探针混合溶解在20 μL $5 \times \text{SSC} + 0.2\%$ 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)杂交液中。将基因芯片与杂交探针分别做95℃变性5 min后,将杂交探针加在芯片上,以盖玻片封片后置60℃杂交15~17 h。用SSC和SDS溶液洗涤10 min,室温晾干。

1.4 图像扫描与数据处理

用ScanArray 3000扫描仪扫描杂交后芯片,得到cy3/cy5图像文件通过划格确定杂交点范围,过滤背景噪声,提取基因表达的荧光信号强度值。用预先选定的内参照基因(管家基因)对cy3和cy5的原始信号进行均衡和修正,剔除cy3和cy5信号强度小于400的基因表达数据。用ImaGene 3.0软件分析cy3和cy5两种荧光信号比值。基因显著性差异表达判定标准为 $\text{cy5}/\text{cy3} > 2$ (表达升高)或 $\text{cy5}/\text{cy3} < 0.5$ (表达降低), $\text{cy5}/\text{cy3}$ 比值为二次实验的均值。

1.5 原位杂交检测

以原位杂交法对基因芯片筛选得到二个差异表达基因葡萄糖激酶(glucokinase, GA)和生长分化因子-9(growth differentiation factor-9, GDF-9)进行检测,观察和验证三环抗抑郁剂(如DIM)及另一类经典抗抑郁剂选择性5-羟色胺(5-HT)重摄取抑制剂如氟西汀(flouxetine, Flu)对其表达的影响。将0.1%多聚赖氨酸处理过的20 mm × 20 mm盖玻片平置于3.5 cm的塑料培养皿底部,在皿中接种PC12细胞培养3~4 d后用于实验。分别以含Cort $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Cort + DIM $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或Cort + Flu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DMEM培养基处理PC12细胞48 h(对照组不含任何药品)。原位杂交实验按试剂盒说明书进行。药物处理后的细胞玻片以0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH 7.4)洗涤2次,立即用4%多聚甲醛固定30 min,蒸馏水洗涤后以含0.5% H₂O₂的甲醇处理30 min,以灭活内源性过氧化物酶。每张玻片洗涤后以20 μL 预杂交液37℃恒温孵育2 h,随后以杂交液20 μL 恒温(40℃)杂交过夜。洗涤后滴加封闭液37℃孵育30 min。然后依次滴加生物素化鼠抗地高辛、SABC-POD和生物素化过氧化物酶,并用0.5 mol·L⁻¹ PBS依次洗涤,以显色剂显色后常规方法封片并照相。

2 结果

2.1 芯片杂交结果分析

芯片杂交所用两种探针分别以Cort $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理PC12细胞及Cort + DIM $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理PC12细胞的mRNA为模板合成,前者标以cy3荧光素,后者标以cy5荧光素,杂交后分别以相应的荧光波长对杂交信号扫描。以532 nm扫描cy3,635 nm扫描cy5分别得到如图1A和图1B所示扫描图像,白色点为高表达而信号达饱和状态,其他点由橙红

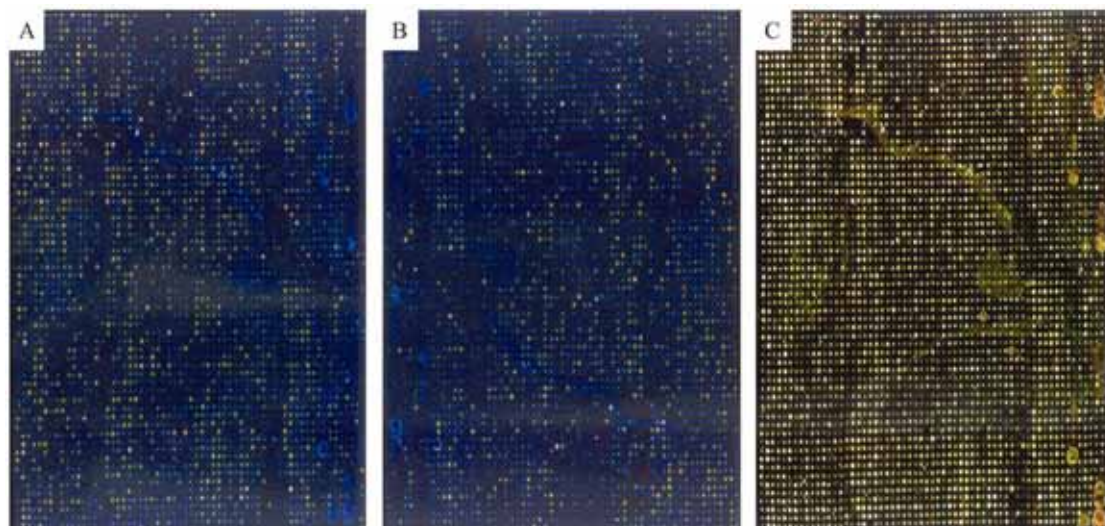


Fig 1. Scanning results of hybridizing signals on gene chip. The mRNA of corticosterone(Cort) $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or Cort + desipramine(DIM) $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ treated PC12 cells was labeled with cy3 or cy5 respectively by reverse transcription and these two probes were mixed and hybridized with the gene chip. (A): cy3-image, (B): cy5-image, (C): merged image of A and B.

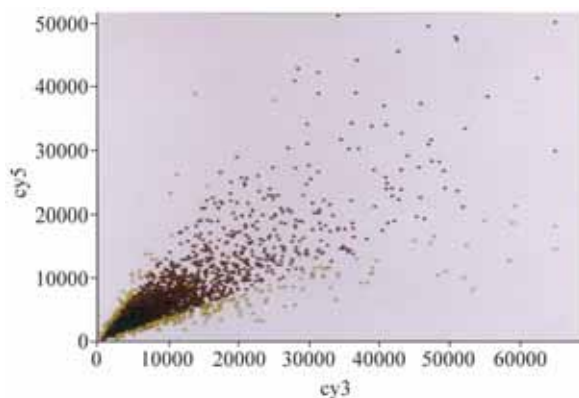


Fig 2. Scatter-plot of the differentially expressed genes induced by desipramine in corticosterone-treated PC12 cells. The cy3 or cy5 labeled probes were mixed and hybridized with the gene chip, and then the scanning images were analyzed. Red dots: non-differentially expressed genes; yellow dots: differentially expressed genes.

色向蓝黑色表示信号由强至弱。图 1C 为 cy3 和 cy5 扫描图像的叠加图像,即双探针杂交图。图 2 为基

因芯片杂交信号散点图,每个基因点 X 轴和 Y 轴分别为 cy3 和 cy5 的杂交信号相对强度,45°角直线上的点的 cy5/cy3 比率为 1,表示无表达差异。远离 45°角直线的点为差异表达基因,其中 cy5/cy3 < 0.5 的基因点表达水平降低, cy5/cy3 > 2 的基因点表达水平升高,如图 2 中所示黄色点。经过数据分析,发现三环类抗抑郁剂 DIM 可以诱导 Cort 处理 PC12 细胞中 259 个基因表达发生改变,其中 163 个表达水平降低,如: GA、葡萄糖调节蛋白 78 ku (glucose-regulated protein 78 ku, GRP78)、细胞骨架微管和微丝蛋白、细胞色素氧化酶、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)受体结合蛋白等;96 个基因表达水平升高,如: 睾丸特异基因-1、GDF-9、锌指蛋白 216 等。结合文献调研,表 1 和表 2 分别列举出可能与情感疾患关系较为密切的部分表达水平升高和降低的基因。

2.2 原位杂交结果分析

以 GA 或 GDF-9 的特异性探针进行原位杂交实验,检验基因芯片杂交结果。正常 PC12 细胞表达 GDF-9, Cort $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 2 d 后,显色明显变浅, DIM 和 Flu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可明显提高 Cort 处理的

Tab 1. Part of the down-regulated genes in corticosterone-treated PC12 cells induced by desipramine

GeneBank No.	cy5/cy3	Gene name
D78645	0.196	Glucose regulated protein, 78 ku
AF029792	0.198	<i>Mus musculus</i> UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase-III (b3GT3) gene
J04632	0.201	Mouse glutathione S-transferase class mu (GSTI-1) mRNA, complete cds
AF188297	0.256	<i>Mus musculus</i> TGF-beta receptor binding protein (Trip1) mRNA, complete cds
L34214	0.257	Glucocorticoid regulated endocrineprotein(RESPI8) mRNA, complete cds
J02870	0.259	Mouse laminin receptor mRNA, complete cds
M15501	0.262	Actin, alpha, cardiac
AC002397	0.272	Mouse chromosome 6 BAC-284H12 (Research Genetics mouse BAC library)
M29881	0.273	Mouse MHC class I Q8/9 d cell surface antigen mRNA, complete cds
L41631	0.273	Glucokinase activity
J03953	0.288	Mouse, glutathion transferase GT9.3 mRNA, 3' end
M13446	0.288	Tubulin alpha 2
U73744	0.297	<i>Mus musculus</i> heat shock 70 protein (Hsc70) gene, complete cds
X04663	0.319	Mouse mRNA for beta-tubulin (isotype Mbeta 5)
M13445	0.321	Tubulin alpha 1
M15668	0.339	<i>Mus musculus</i> X chromosome-linked phosphoglycerate kinase(pgk-1) mRNA, complete cds
D17666	0.372	Mouse gene for mitochondrial stress-70 protein (PBP74/CSA)
AJ223782	0.373	<i>Mus musculus</i> CDC10 gene, promoter, exon 1 and joined CDS
J05261	0.374	Protective protein for beta-galactosidase
M32599	0.378	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
U12922	0.388	RAB geranylgeranyl transferase, b subunit
AF111107	0.399	<i>Mus musculus</i> transient receptor potential 2 (TRP2) mRNA, complete cds
AF057286	0.406	<i>Mus musculus</i> intersectin-EH binding protein Ibp2mRNA, partial cds
U05809	0.411	Transketolase
M64298	0.418	ATPase-like vacuolar proton channel
X54691	0.420	Cytochrome C oxidase, subunit IV
X03491	0.431	Keratin complex 2, basic, gene 4
K02927	0.435	Ribonucleotide reductase M1
AF042730	0.442	<i>Mus musculus</i> lithium-sensitive myo-inositol monophosphatase A1(IMPA1) mRNA, complete cds
L24554	0.450	<i>Mus musculus</i> adenylosuccinate synthetase mRNA, complete cds
AF030559	0.462	<i>Mus musculus</i> ATP synthase beta-subunit (beta-F1ATPase)mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds
D10576	0.489	Ubiquitin-activating enzyme E1, Chr X
AB018575	0.495	Cell division cycle 7-like 1
L09562	0.479	Protein tyrosine phosphatase, receptor type G

Tab 2. Part of the up-regulated genes in corticosterone-treated PC12 cells induced by desipramine

GeneBank No.	cy5/cy3	Gene name
D38046	2.078	Mouse mRNA for type II DNA topoisomerase beta isoform, complete cds
M29855	2.080	Interleukin 3 receptor, beta chain 2
AJ001418	2.089	<i>Mus musculus</i> mRNA for pyruvate dehydrogenase kinase-like protein
X99347	2.107	<i>M. musculus</i> mRNA for LPS-binding protein
AJ132616	2.139	<i>Mus musculus</i> mRNA for HIRA-interacting protein 5 (HIRIP5)
AF090190	2.146	<i>Mus musculus</i> kinesin-like protein KIF1B (Kif1b) mRNA, complete cds
U70538	2.157	<i>Mus musculus</i> UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3 mRNA, complete cds
D50834	2.169	Cytochrome P450, subfamily IV B, polypeptide 1
L06444	2.190	Growth differentiation factor 9
D84436	2.194	<i>Mus musculus</i> mRNA for Pig-b, complete cds
AB013819	2.239	<i>Mus musculus</i> mRNA for TIAP, complete cds
M25533	2.245	Testis specific gene 1
U88539	2.254	<i>Mus musculus</i> chromatin structural protein homolog Supt5hp (Supt5h) mRNA, complete cds
M94350	2.290	<i>Mus musculus</i> immunoglobulin lambda chain (IgL) mRNA, complete cds
Z49204	2.438	Nicotinamide nucleotide transhydrogenase
X56690	2.535	Chromobox homolog (<i>Drosophila</i> HP1 beta)
U63146	2.997	<i>Mus musculus</i> retinol binding protein (RBP) mRNA, complete cds
AF062071	3.094	Zinc finger protein 216

PC12 细胞内 GDF-9 mRNA 的表达, 表现为着色变深, 与芯片杂交结果一致(图 3)。同样, 正常 PC12 细胞胞浆内显著存在 GA mRNA 的表达, 着色浅棕, 提示表达量较低。Cort 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 2 d 后, 着色明显变深, 提示 GA mRNA 表达量升高, Flu 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 DIM 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可以降低 Cort 处理的 PC12 细胞内 GA mRNA 的表达, 与基因芯片杂交结果一致(图 4)。同时提示基因芯片是一种较为简便、可靠的药物相关基因评筛技术。

3 讨论

现代社会由于竞争日益激烈, 抑郁症发生率逐年提高。根据在北京召开的世界精神病学协会年会上发表的数字, 目前全球抑郁症患者每年以 113% 的增长率逐年递增, 抑郁症已成为“21 世纪的流行病”。1996 年在香港召开的“情感疾病会议”预言 21 世纪将是“抑郁症世纪”。现在临床常用的三类经典药物(三环类、5-HT 重摄取抑制剂、单胺氧化酶抑制

剂)尽管疗效确切, 但毒副作用也很明显, 起效时间长(2~6 周)。精细作用机制及共同作用通路不明, 在很大程度上限制了新药的发展。

本研究以 Cort 处理 PC12 细胞模拟抑郁症病人脑神经元损伤状态, 首次利用小鼠 2048 点表达谱芯片对三环抗抑郁剂 DIM 的相关基因进行了初步探索。发现 DIM 可以诱导 Cort 处理的 PC12 细胞内 259 个基因表达发生改变, 其中 163 个基因表达水平降低, 例如 GRP78, GA、细胞骨架蛋白、TGF- β 受体结合蛋白、细胞色素 C 氧化酶、酪氨酸磷酸酶等; 另外有 96 个基因表达水平升高, 如 GDF-9、锌指蛋白 216、细胞色素 P450 的 IV B 亚型(cytochrome P450 sub-family IV B, CYP4B)、睾丸特异基因-1 等。此研究为抗抑郁剂作用机制及新药评筛研究提供了线索。比如: ① GRP78, Wang 等^[10]利用基因差别显示技术发现, 抑郁躁狂双相情感疾患治疗药物锂盐和丙戊酸慢性给药对大鼠脑皮层 GRP78 有显著调节作用, GRP78 被认为是双相情感疾患治疗药物的新靶点。② GA, 据报道, 健康大鼠口服锂盐显著降低肝脏 GA

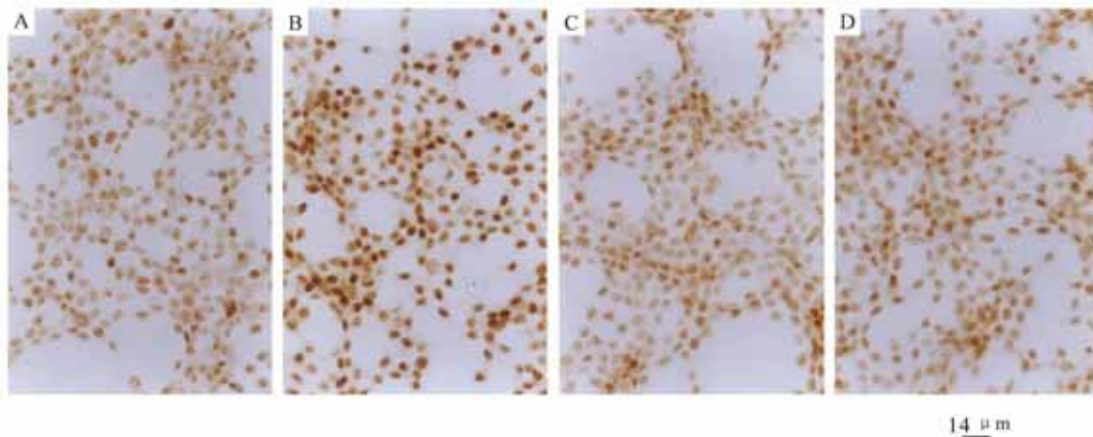


Fig 3. Effect of desipramine on the GDF-9 mRNA expression in corticosterone-treated PC12 cells. PC12 cells were treated with Cort $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h in the absence or presence of DIM or fluoxetine(Flu) $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the GDF-9 mRNA expressions were detected by hybridization *in situ*. (A): normal control, (B): Cort treated group, (C): Cort + DIM $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (D): Cort + Flu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

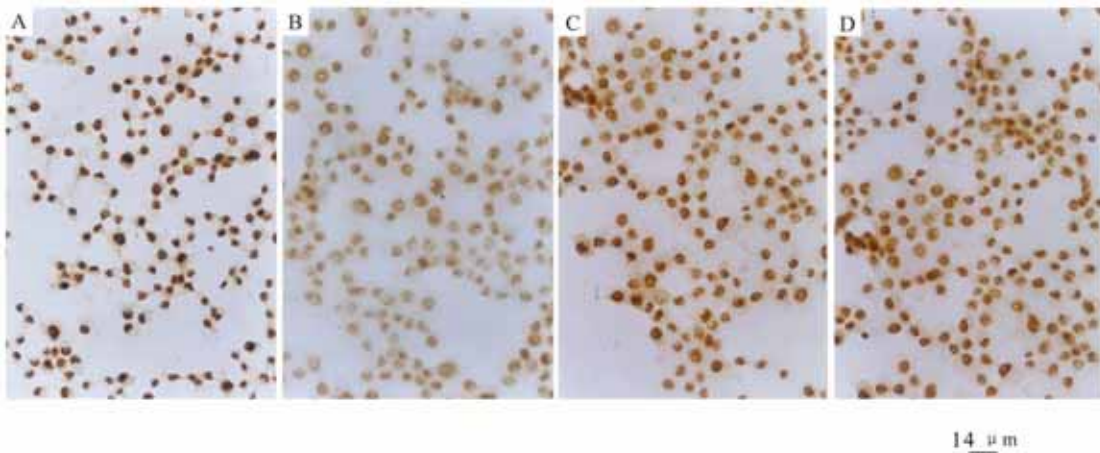


Fig 4. Effect of desipramine on the glucokinase(GA) mRNA expression in corticosterone-treated PC12 cells. PC12 cells were treated with Cort $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h in the absence or presence of DIM or Flu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the GA mRNA expressions were detected by hybridization *in situ*. (A): normal control, (B): Cort treated group, (C): Cort + DIM $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (D): Cort + Flu $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

的活性和糖原浓度^[11]。本研究发现 DIM 对 Cort 处理的 PC12 细胞 GA 有类似调节作用,暗示它可以提高神经元内葡萄糖水平,改善营养与代谢状态。③ 细胞色素 C 氧化酶被认为是神经元活性的标志酶,口服锂盐 21 d 降低大鼠扣带皮层等脑区此酶活性,并被认为是其改善情绪的机制之一^[12]。本研究发现 DIM 对 PC12 细胞中此酶有类似调节作用。④ 锂

盐敏感性内消旋肌醇一磷酸酯酶(lithium-sensitive myo-inositol monophosphatase A1, IMPA1)在磷脂酰肌醇信号转导系统中催化各种内消旋肌醇一磷酸合成为内消旋肌醇,IMPA1 活性可被锂盐所抑制并被认为是锂盐治疗抑郁躁狂双相情感疾患的生物靶^[13,14]。本研究发现 DIM 同样抑制 Cort 处理的 PC12 细胞 IMPA1 的表达。⑤ 细胞骨架蛋白中,微

管或微丝蛋白可能参与了抑郁等精神疾患的发生^[15],本研究中 DIM 对细胞骨架蛋白表达有抑制作用。⑥ GDF-9 是 TGF- β 超家族成员,可促进卵巢中卵泡的早期发育、生长、分化及存活性^[16]。它在人或鼠的非卵巢组织也有表达(如睾丸、下丘脑、垂体等),但作用不明^[17]。本研究中, DIM 提高 Cort 处理的 PC12 细胞 GDF-9 的表达,暗示 GDF-9 可能参与了 DIM 的神经元保护与营养作用。⑦ CYP4B,据报道, CYP(如 CYP1A2, CYP2D6 等亚型)是抗抑郁剂在人体中的代谢酶之一^[18,19]。经典抗抑郁剂对大鼠肝内 CYP 的某些亚型(如 CYP1A2, CYP3A, CYP2B 等)活性有显著抑制作用^[20]。CYP4 在大鼠海马、皮层等脑区有特异性表达并可能参与神经血管功能调节^[21]。本研究中, DIM 诱导此酶表达升高,可能与 DIM 代谢增强,对此酶抑制作用减弱相关。⑧ 睾丸特异基因-1、DIM 等抗抑郁剂均可改善抑郁病人性功能低状态,提高睾酮水平^[22],此基因表达升高,可能参与或介导了这一效应。本研究中 DIM 诱导的许多基因表达改变可以在一定程度上解释或为深层次研究提供依据。抗抑郁剂的作用可能与能量代谢、营养因子、递质与激素调节、细胞骨架、氧应激等多层次的基因表达改变有关,但哪些基因是共同的特异性药物相关基因还需要更广范围和更深层次的筛选与探索。

以基因芯片技术筛选药物相关基因具有简便、快捷、高通量、高灵敏度等特点,代表着一个新的研究领域与方向,为药物特异性相关基因的发掘与新药筛选展示了诱人的前景,本研究为更大范围的相关基因的筛选研究及更深层次的机制探讨奠定了一定基础。

4 参考文献:

- [1] Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death [J]. *Biol Psychiatry*, 2000, **48**(8):755 - 765.
- [2] Sapolsky RM. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders[J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2000, **57**(10):925 - 935.
- [3] Murphy BE. Antiglucocorticoid therapies in major depression: a review [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 1997, **22** (Suppl 1):S125 - S132.
- [4] Lucassen PJ, Muller MB, Holsboer F, Bauer J, Holtrop A, Wouda J, *et al.* Hippocampal apoptosis in major depression is a minor event and absent from subareas at risk for glucocorticoid overexposure[J]. *Am J Pathol*, 2001, **158**(2): 453 - 468.
- [5] Heuser I. The hypothalamic-pituitary-adrenal system in depression[J]. *Pharmacopsychiatry*, 1998, **31**(1):10 - 13.
- [6] Magarinos AM, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews [J]. *J Neurosci*, 1996, **16**(10):3534 - 3540.
- [7] Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein(CREB) in rat hippocampus[J]. *J Neurosci*, 1996, **16**(7):2365 - 2372.
- [8] Li YF, Luo ZP. Desipramine antagonized corticosterone-induced apoptosis in cultured PC12 cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 2002, **23**(4):311 - 314.
- [9] Anderson DJ, Michelsohn A. Role of glucocorticoids in the chromaffin-neuron developmental decision [J]. *Int J Dev Neurosci*, 1989, **7**(5):475 - 487.
- [10] Wang JF, Bown CD, Chen B, Young LT. Identification of mood stabilizer-regulated genes by differential-display PCR [J]. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2001, **4**(1):65 - 74.
- [11] Rodriguez-Gil JE, Fernandez-Novell JM, Barbera A, Guinovart JJ. Lithium's effects on rat liver glucose metabolism *in vivo* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **375** (2):377 - 384.
- [12] Lambert PD, McGirr KM, Ely TD, Kilts CD, Kuhar MJ. Chronic lithium treatment decreases neuronal activity in the nucleus accumbens and cingulate cortex of the rat [J]. *Neuropsychopharmacology*, 1999, **21**(2):229 - 237.
- [13] Shamir A, Sjholt G, Ebstein RP, Agam G, Steen VM. Characterization of two genes, Impa1 and Impa2 encoding mouse myo-inositol monophosphatases [J]. *Gene*, 2001, **271**(2):285 - 291.
- [14] Sjholt G, Gulbrandsen AK, Lovlie R, Berle JO, Molven A, Steen VM. A human myo-inositol monophosphatase gene (IMPA2) localized in a putative susceptibility region for bipolar disorder on chromosome 18p11.2: genomic structure and polymorphism screening in manic-depressive patients [J]. *Mol Psychiatry*, 2000, **5**(2):172 - 180.
- [15] Li YF, Zhang HT, Luo ZP. Cytoskeleton and signal transduction[J]. *Foreign Med Sci Sect Pharm*(国外医学药学分册), 1998, **25**(5):261 - 266.
- [16] Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, *et al.* Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles[J]. *Endocrinology*, 1999, **140**(3):

- 1236 - 1244.
- [17] Fitzpatrick SL, Sindoni DM, Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler IJ, Frail DE. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues [J]. *Endocrinology*, 1998, **139**(5):2571 - 2578.
- [18] Spigset O, Axelsson S, Norstrom A, Hagg S, Dahlqvist R. The major fluvoxamine metabolite in urine is formed by CYP2D6 [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2001, **57**(9):653 - 658.
- [19] Yokono A, Morita S, Someya T, Hirokane G, Okawa M, Shimoda K. The effect of CYP2C19 and CYP2D6 genotypes on the metabolism of clomipramine in Japanese psychiatric patients [J]. *J Clin Psychopharmacol*, 2001, **21**(6): 549 - 555.
- [20] Danie WA, Syrek M, Rylko Z, Wojcikowski J. Effects of antidepressant drugs on the activity of cytochrome P-450 measured by caffeine oxidation in rat liver microsomes [J]. *Pol J Pharmacol*, 2001, **53**(4):351 - 357.
- [21] Bylund J, Zhang C, Harder DR. Identification of a novel cytochrome P450, CYP4X1, with unique localization specific to the brain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **296**(3):677 - 684.
- [22] Li YF, Yuan L, Xu YK, Yang M, Zhao YM, Luo ZP. Antistress effect of oligosaccharides extracted from *Morinda officinalis* in mice and rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2001, **22**(12):1084 - 1088.

Screening studies on the antidepressant desipramine related genes using microarray gene chip

LI Yun-Feng, ZHAO Nan, YUAN Ben-Li, LUO Zhi-Pu

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: **AIM** To study the antidepressant related genes and explore the possible action mechanism of antidepressants. **METHODS and RESULTS** PC12 cells were treated with corticosterone (Cort) $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 3 d in the absence or presence of desipramine (DIM) $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and the mRNA was extracted, and then labeled with fluorescein cy3 or cy5 respectively using reverse transcription. The labeled probes were mixed equally and hybridized with the mouse 2048-gene dot microarray gene chip. After scanning and analysis, it was found that DIM induced 259 gene expression changes in Cort treated PC12 cells, in which 163 gene expression down-regulated [for example, glucose regulated protein 78 ku, glucokinase (GA), cytoskeleton tubulin or actin, transforming growth factor- β receptor binding protein, cytochrome C oxidase, lithium-sensitive myo-inositol monophosphatase A1, *etc.*] and 96 gene expression up-regulated [for example, growth differentiation factor-9 (GDF-9), zinc fin-

ger protein 216, cytochrome P450 subfamily IV B, testis specific gene-1, *etc.*]. Using hybridization *in situ*, the effect of DIM on the GA or GDF-9 expression in Cort treated PC12 cells was also detected and the gene expression changes were consistent with results of gene chip detection. **CONCLUSION** It was indicated that the effect of DIM is associated with the gene expression changes at the levels of energy metabolism, cytoskeleton, neurotrophic factors, enzyme, *etc.*. The antidepressant related genes were elementarily studied with microarray gene chip and clues for further studies were provided.

Key words: antidepressive agents; desipramine; gene expression; gene chip; cells, PC12; corticosterone

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China(39870876)

(本文编辑 董立春)