

• 综 述 •

基于基因芯片技术探讨脑缺血病理分子基础及其药物
作用机制的研究进展

曹水娟, 朱海波*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 基因组学是随分子生物学发展应运而生的一门重要学科, 是从整体水平对基因组高通量、高集成、高平行性、微型化和自动化的综合分析。脑卒中是危害人类健康的重要脑血管疾病之一。应用基因芯片技术对脑卒中进行研究, 不仅可在基因水平上揭示疾病的本质, 还有助于全面探讨脑卒中的病理分子机制, 发现药物治疗靶点, 开发治疗新药。本文以基因芯片技术运用于实验性脑缺血的体内研究成果为重点, 并结合本实验室的工作探讨脑缺血病理分子基础及其药物作用机制的研究进展。

关键词: 基因芯片; 脑缺血; 血管新生; 药物作用机制; 功能分类基因

中图分类号: R962.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)08 - 0803 - 07

Advances in the study of gene chip technology for the investigation of the
mechanisms underlying cerebral ischemia and anti-cerebral ischemia agents

CAO Shui-juan, ZHU Hai-bo*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: With the development of molecular biology, genome science becomes an important subject currently. Characterized by high-throughput, high-integration, high-parallelism, miniaturization and automation, it is the integrated study of gene properties on a large scale. Stroke, an important cerebral vascular disease, is one of the threats to human health. The utilization of microarray study for the pathogenesis of stroke, not only reveals the essentials of the disease in the overall level of genes, but also contributes to the detection of the therapeutic targets and the development of novel drugs for stroke. Referring to our own work, this discussion focuses on the progress of the mechanisms underlying experimental cerebral ischemia investigation *in vivo* as well as anti-cerebral ischemia agents by gene chip technology.

Key words: gene chip; cerebral ischemia; angiogenesis; drug action mechanism; functional classification gene

缺血性脑卒中已成为严重影响人类健康的疾病, 其死亡率和致残率呈逐年递增的趋势。以往的研究技术手段难以对脑缺血多基因多通路的发病机制进行全面研究。基因芯片是近年出现的可以同时观察整个组织基因表达变化的新技术, 但鉴于体外

单一的细胞模型很难模拟脑缺血复杂的发病机制, 目前基因芯片研究还主要集中在实验性脑缺血的体内实验上。基因芯片在揭示脑缺血的病理分子基础、探索抗脑缺血药物作用机制等方面显示出巨大的优势, 本文将结合笔者实验室的工作, 对上述两个方面做一综述。

1 基因芯片技术概述

基因芯片 (gene chip), 又称 DNA 芯片 (DNA chip) 或 DNA 微阵列 (DNA microarray), 属于生物芯

收稿日期: 2006-12-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370720, 30572343).

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63188106, Fax: 86 - 10 - 63017757,

E-mail: zhuhaibo@imm.ac.cn

片 (biochip) 中技术最为成熟的一种,是集材料学、传感器技术、基因分子识别、计算机图像及分子生物学信息处理等为一体的集成化前沿分析识别技术。其原理是将大量探针分子有序而高密度地固定于支持物上后与标记的样品分子进行杂交,通过检测杂交信号强度从而获取样品分子的数量和序列信息。因固相载体常用硅玻片或硅芯片,故称之为基因芯片,它的突出特点是高通量、高集成、高平行性、微型化及自动化。

基因芯片技术强调各基因间以相互联系、相互作用的网络共同协调生物体的功能,打破以往只关注一个或单独几个基因的研究模式,以系统生物学的思维方式来研究生命现象,被广泛地应用于诸多领域。但传统的基因芯片由于成本高、信息量过大,且大量无关基因可能掩盖有意义的基因变化,其应用受到一定的限制。近几年应运而生的功能分类基因芯片则克服了以上缺点,已成为基因水平研究的有效工具。所谓功能分类基因芯片,系指剔除基因芯片上对研究对象毫无意义的基因,把针对某一生物学通路的基因集合制成的芯片。功能分类基因芯片的结果是对整个基因表达谱进行局部“放大”而得到的分子图像,可以根据研究者的需要“量身定做”,将感兴趣的基因整合在一张或若干张芯片上。在药物研究领域,尤其是在药物新靶标的寻找和新药分子作用机制的研究方面,基因芯片可以快速发现给药前后组织(细胞)的基因表达变化,进而有选择性地锁定感兴趣的靶标和通路进行后续的研究。

2 基因芯片在脑缺血病理分子机制研究中的应用

开发抗脑缺血药物的前提是充分认识脑缺血的病理分子机制。采用基因芯片可同时高敏感定量检测脑组织中成千上万个基因的表达,主要提供两方面的信息:①已证实与脑缺血密切相关的基因;②已发现的但未被证实与脑缺血复杂病程相关的基因。这些“新关联基因”的发现是采用基因芯片技术的最大益处所在,由此可提供研究者新的视野和研究思路。

近年,基因芯片技术已在缺血性脑卒中^[1-4]、脑缺血再灌注损伤^[5,6]、脑缺血预适应和脑缺血耐受^[7]、脑缺血后的血管新生^[8]等脑缺血病理分子机制的研究中得到了广泛的应用^[9]。

2.1 缺血性脑卒中 Tang等^[10]采用基因芯片对低糖性脑缺血、低氧性脑缺血与线栓性脑缺血大鼠模型的病理分子机制进行比较,发现在脑组织中有表达的4000个基因中有5%~10%在造模后24h内

上调,其中线栓性脑缺血模型上调的基因总数最多(415个),且其中的炎症相关基因如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)等所占比例最大,提示炎症反应在线栓性脑缺血模型发病机制中扮演着重要角色。而低糖性脑缺血模型的上调基因为302个,如金属蛋白酶组织抑制剂-1、神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)等;低氧性脑缺血模型上调基因为15个,主要是缺氧诱导因子(hypoxia inducing factor, HIF)。在各个模型中均显著上调的有热休克蛋白70(heat shock protein 70, HSP70)和DNA损伤修复蛋白等相关基因,可作为严重神经损伤最可靠的预测基因。

在上述的线栓性脑缺血模型中,缺氧敏感基因家族的上调尤其引人注目,主要有HIF、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素、肾上腺髓质素等。其中的HIF是在缺氧应答中起重要作用的核转录因子,对葡萄糖代谢、血管发生、红细胞生成、细胞存活等过程均有调节作用,一直是缺氧领域的研究焦点。HIF由 α 、 β 两个亚基组成,根据 α 亚基可分为HIF-1 α 、HIF-2 α 和HIF-3 α 。早期研究表明HIF-1 α 介导了在缺血中具有神经保护作用的VEGF、红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的转录激活,而对HIF-2 α 的研究较少。近期有研究者用质粒过表达HIF-1 α 和HIF-2 α ,采用基因芯片研究发现了将近50个由HIF特异性调节的基因,除已知基因外,更发现磷酸果糖激酶等“新关联基因”。研究还显示,HIF-2 α 过表达情况下,对缺氧极度敏感的趋化因子孤儿受体1基因以及很多细胞表面蛋白基因、与细胞死亡途径和神经保护密切相关的基因都上调^[11],从而推测除HIF-1 α 外,HIF-2 α 在缺氧诱导基因的转录激活中亦发挥重要作用。

根据缺血程度可将缺血后的脑组织分为缺血区、非缺血区以及半暗带等。采用基因芯片扫描脑缺血不同区域的基因在不同时间点的“分子图像”,可高效、快捷而平行地得到多个基因的表达模式。缺血后4h,双侧脑组织中明显上调的基因有细胞骨架活性调节关联蛋白(activity-regulated cytoskeletal-associated protein, Arc)、单核细胞炎性蛋白-1 α (monocyte inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)等。而缺血3d后,基因表达的差异逐渐明显,非缺血区仅有部分基因如脑酸性凝结蛋白显著上调,而缺血区涉及细胞周期、蛋白水解、凋亡、抗炎调节等过程的

基因均表现出特异性上调^[12]。Kim等^[13]研究持续性脑缺血6h后脑组织中1174个基因的表达,发现缺血侧皮层有71个基因发生明显变化,与代谢、信息交流及细胞间信号转导相关的基因显著下调,与应激反应相关的基因显著上调。同时发现几个“新关联基因”,如干扰素诱导蛋白(interferon induced protein, IFN-IP)、神经退行性关联蛋白、烟胺比林受体蛋白基因等,进一步阐明这些基因在脑缺血中的作用,则有希望发现抗脑缺血药物的潜在靶标。

缺血半暗带是1981年由Astup首先提出的,主要是指局灶性脑缺血中心坏死区以外,发生可逆性损伤的脑组织,如及时采取措施则有可能被挽救,否则将发展成为中心坏死区的一部分。研究半暗带损伤的分子机制,并开发药物以挽救半暗带,使其皮层结构和组织功能得到一定程度的恢复和重建,这是近年来抗脑缺血药物研究的热点。Keyvani等^[14]比较大鼠实验性脑缺血的缺血侧皮层及半暗带与对侧皮层的基因表达,发现在缺血侧半暗带下调的基因多与离子通道、运输蛋白、代谢通路、胞内信使相关,主要是细胞代谢酶类以及与神经信号转导相关的钠钾通道、突触囊泡蛋白2、突触结合蛋白1、蛋白质磷酸酶2c等基因。另有研究显示,在半暗带中GFAP、弹性蛋白(vimentin)等基因表达较强,可能与半暗带的功能重建有关,也可能是药物作用的潜在靶点^[15]。

值得一提的是,以上多为以表达谱芯片进行的研究,而近年来国内外利用功能分类基因芯片进行脑缺血病理分子机制的研究也有少量报道,且在研究信号转导通路方面显示出一定的优越性。Yakubov等^[16]首先用表达谱芯片研究血容量减少、血压过低致大鼠局部脑缺血的海马组织基因表达,找到对局部缺血最敏感的海马CA1区过表达的124个基因,如孤儿细胞核受体基因(NUR77)、半胱天冬酶3(Caspase 3)、HSP70以及一些未知功能的序列片段,从中挑选最感兴趣的56个基因设计成一张功能分类基因芯片,进一步研究显示p53、BAX、Caspase 3等凋亡基因表现为协同性的持续上调,从而推测缺血后的海马CA1区细胞主要通过Caspase 3通路发生凋亡。

笔者实验室采用功能分类基因芯片观察线栓法所致局灶性脑缺血模型中炎症因子基因表达的动态变化,发现缺血后1.5~24h,缺血侧脑组织中IL-1 β 、MCP-1等炎症和趋化因子基因上调2倍以上,12h达高峰。IL-6则在3~12h表达显著升高。还发现

抗炎细胞因子IL-10在3~6h和12h有两个下调的时间相。以上结果提示炎症反应是线栓法致大鼠脑缺血模型损害的重要因素,其确切机制还有待进一步探讨。

2.2 脑缺血再灌注损伤 脑缺血可导致脑细胞受损,恢复缺血区的血供后,在一定程度上反而更加重缺血性脑损伤,这一病理过程称为脑缺血再灌注损伤,已成为近年来脑缺血疾病和药物治疗研究中的重要内容。

急性脑缺血发生后,在缺血中心发生了脑细胞急性坏死,而一过性脑缺血或恢复足够血供后的半暗带区域,主要经历迟发性神经元死亡。有基因芯片的研究表明,再灌后1~3h,皮层和纹状体的基因表达发生急剧变化,此后一段时间,上调的基因数目逐渐增加,直至12h至1d趋于稳定;而下调的基因数目逐渐减少,直至再灌1d趋于平稳,2d时又有一个迟发性的下调高峰。这些受到调节的基因可分为以下几类,一类是持续上调的,如凝血酶、IL-6受体、钙结合蛋白;另一类是短暂性在12h~1d上调的,如FGF受体激活蛋白、B型单胺氧化酶;第三类是在再灌后2~4d才上调的,如弹性蛋白、组织蛋白酶B^[17,18]。研究还发现再灌2d后纹状体中的基因表达大量下调,提示纹状体经历了急性损伤和延迟性损伤两个时相,且发现与皮层相比,纹状体对后一过程更敏感,受到的损伤更大^[19,20]。

再灌注损伤是一个随时间进行性加重的病理过程,因此采用基因芯片对脑缺血再灌注进行研究,取材部位和时间点的选择至关重要,Rickhag的实验设计很值得借鉴,主要有①将缺血侧脑组织根据缺血程度不同分为3个部分:额部扣带回皮质区(非缺血区)、接近扣带回皮质区(半暗带区)及接近缺血中心皮质区(缺血区);②依据再灌注过程中受到调节的基因会持续表达几个小时的原理,选取缺血2h再灌24h内的8个时间点(每3h取材1次);③专门从缺血组织的不同cDNA文库中选取cDNA阵列,从而确保捕捉到与缺血密切相关但在缺血组织中含量极低的基因^[15]。对其研究结果进行聚类分析,发现在存活组织中存在一条双相性信号转导通路:BDNF(脑源性神经营养因子)-GPCR(G蛋白偶联受体)-MAP(有丝分裂原激活蛋白激酶),通路中的Arc, GPCR5B和Cystatin B(半胱氨酸蛋白酶内源性抑制剂)基因表达在再灌45min时即有一个大幅度的上调高峰,在3~6h时明显下降,9~12h时再次回升,后又回复至基础水平。此通路主要包

含细胞信号转导和细胞可塑性等方面的 44 个基因, 在细胞增殖和组织重建中发挥重要作用。研究证实, 再灌后首个基因上调时间相为 0 ~ 3 h, 在此过程中早期即刻反应基因如 *c-fos*, *c-jun* 等就可被检测到。而第二个时间相为 9 ~ 15 h, 其间所发生的基因变化, 既可能是急性脑损伤的结果, 也可能是继发性损伤的原因, 因此对基因芯片所提供的大量信息数据的科学分析尤为重要。

2.3 脑缺血预适应和缺血耐受 脑缺血耐受 (brain ischemic tolerance, BIT) 或称脑缺血预适应 (brain ischemic precondition, BIP), 是指脑组织一次或多次短暂性缺血再灌注后, 大脑对以后较长时间的缺血性损伤产生显著的耐受性。BIT 研究的重要临床进展之一已扩展到药理性预适应, 即用药物替代缺血刺激可产生缺血预适应样保护作用。2002 年 Bemaudin 等^[21] 较早地采用基因芯片对缺氧预处理 (8% O₂, 3 h) 后不同时间点再灌的新生鼠脑组织基因表达进行研究。结果发现在缺氧诱导的众多基因中, 介导 BIT 的主要是 HIF-1 α , 并且证实, HIF-1 α 下游的肾上腺髓质素、褪黑激素-1 以及 VEGF 表达上调最为显著。

另有基因芯片研究显示, 预处理后 3 ~ 72 h, 40 多个具有神经保护作用的基因表达上调, 如热休克蛋白、亚铁血红素(加)氧酶、金属硫蛋白等基因。一些内源性蛋白的基因表达上调也可能是介导 BIT 的因素, 尤其突出的是在皮质锥体细胞中高表达的 6 个热休克蛋白 (HSP70, HSP27, HSP90, HSP60, HSP10, HSP32)。研究还发现, MIP-1 α , HSP70b, *c-fos* 等在缺血状态下上调明显的基因, 在预适应状态下表达有所抑制, 此结果无疑将为药理性预适应的研究提供新的思路^[22]。

2.4 脑缺血后的血管新生 脑缺血后的血管新生正逐渐受到研究者的重视。Sun 等^[23] 将人微血管内皮细胞包被于微载体, 三维培养构建体外血管新生模型, 从全基因组水平动态观察血管新生过程中不同时间点内皮细胞的基因表达。发现受调节的趋化因子及其受体基因多达 20 余种, MCP-1, CCL5, CX3CL1 在“出芽”期高表达, 3 d 时的表达又回复到基础水平, 提示这些基因很可能在血管新生的早期具有重要的作用。

笔者实验室近期采用包括与血管新生密切相关的生长因子、生长因子受体、粘附分子、转录因子等 113 个基因的血管生成功能分类基因芯片进行线栓法所致大鼠局灶性脑缺血模型研究。结果发现, 大

部分血管新生基因如血管生成素、酸性成纤维细胞生长因子 (acid fibroblast growth factor, aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR-1 或 flt-1)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor, IGF1)、血管源性因子等在缺血后 3 ~ 6 h 均有不同程度的表达下调, 12 ~ 24 h 逐渐恢复表达至与假手术组动物在同一时间点上的水平; 血管生成素样蛋白 4 等血管新生负性因子基因在 3 ~ 6 h 明显上调, 12 h 达到高峰, 24 h 则显著下降。结果提示, 内源性的促血管新生机制在脑缺血后 24 h 内经历了一个先下降后上调的动态过程, 因此寻找早期能上调这些血管新生基因的药物可能是今后工作的重点。

3 基因芯片在抗脑缺血药物分子作用机制研究中的应用

通过比较给药前后脑组织的基因表达谱, 可发现与药物作用途径密切相关的基因, 其结果可部分解释药物的分子作用机制, 这方面的应用虽然才刚刚起步, 但取得的成果令人鼓舞。

神经调节蛋白 (neuregulin-1, NRG-1) 是神经细胞存活和功能保持的重要生长因子, 有阻断脑缺血迟发性损伤的作用。近来采用基因芯片研究发现, NRG-1 可使脑缺血 1.5 h 再灌 24 h 后 IL-1 β 、MCP-1 等炎症因子基因的上调降低 50%, 推测 NRG-1 抑制缺血后白细胞迁移和浸润的作用可能与其抑制炎症反应基因有关, 同时 NRG-1 可使神经元保护基因表达上调, 提示其抑制炎症介导的迟发性损伤以及保持神经功能的作用可能是其抗脑缺血作用机制的重要组成部分^[24]。脑缺血再灌注的损伤主要来自于大量自由基的产生。C57BL/6J 小鼠脑缺血再灌注后给予 AEOL 10150 (一种自由基清除剂), 可明显抑制与应激和炎症相关的 HSP70、IL-6、MIP-2 等基因的上调, 变化的基因按功能进行聚类分析主要为炎症因子及其受体基因、应激反应基因、抗氧化基因, 从而提示其保护作用部分与抗炎、抑制缺血再灌注中的免疫反应有关^[25]。另外, 有芯片结果显示异丙酚对全脑缺血再灌注损伤大鼠的神经细胞凋亡相关基因表达影响较大, 其脑保护作用机制可能与下调凋亡蛋白酶激活因子 (APAF1)、死亡受体决定基因 (DEFT) 和 STM-2 有关^[26]。

中药的作用方式普遍具有多成分、多环节、多靶点的特性, 基因芯片是寻找其作用靶点、阐明其分子作用机制的有力工具, 此方面的研究业已成为热点。

溶栓胶囊是从传统中药特种地龙(双胸蚯蚓)中分离提取的新型抗血栓药,临床抗脑缺血作用疗效显著,但其分子机制研究报道较少。Qiu等^[27]采用基因芯片研究发现,溶栓胶囊对缺血侧脑组织炎症细胞因子 IL-18、MCP-1、IL-6受体、TNF受体等基因过表达具有不同程度的抑制作用。此外,溶栓胶囊还可降低钙通道、金属蛋白酶、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、凝血酶敏感素受体基因表达,从而提示溶栓胶囊治疗脑卒中的分子机制可能是多靶点、多环节的。另有芯片研究显示,补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤的保护作用与其调控兴奋性氨基酸及氧自由基损伤、钙超载、炎症反应等相关过程的基因表达有关^[28]。Li等^[29]制备包含87个心血管疾病相关基因探针的寡核苷酸芯片,研究发现知母皂苷作用于血管内皮细胞后,血管紧张素酶原(AGT)基因、肾上腺素 α 2A受体(ADRA2R)基因和内皮素转换酶-1基因的表达均有不同程度的下降。从而推测知母皂苷调控血管内皮细胞功能的作用可能是其治疗心血管疾病的机制之一。

近年来,采用基因芯片技术探讨中药单体成分促体内外实验性血管新生,治疗实验性脑缺血分子作用机制的报道逐渐增多。英国剑桥大学樊太平教授实验室采用基因芯片技术对人参皂苷 Rg1 促体外实验性血管新生的分子机制进行了研究。培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),构建体外血管生长和迁移的模型并给予 Rg1 处理,发现显著上调的基因包括层粘连蛋白- α 4(LAMA4)、IQ基序包含的GTP酶活化蛋白1(IQGAP1)、致癌基因同系物(Vav2)、钙调节蛋白2(CALM2)以及网状激活系统家族蛋白(RhoA, RhoB)等,从而推测 Rg1 的促体外血管新生作用主要通过上调与细胞黏附、迁移、骨架构建等过程密切相关的基因表达来实现^[8,30,31]。

羟基红花黄色素 A(HSYA)是传统活血化瘀药物红花中含量最高的水溶性有效成分,本实验室前期研究显示其有较强的抗脑缺血活性^[32],但机制不明。采用血管生成功能分类基因芯片在线栓致局灶性脑缺血大鼠模型上研究其抗脑缺血作用的分子基础,初步结果发现多次静脉注射 HSYA 治疗后,缺血侧脑组织血管新生相关基因表达在多个时间点均有不同程度的上调,主要集中在两个时相:3 h 和 24 h。3 h 时, HIF-1 α 、flt1、aFGF、bFGF、EGF、IGF-1 和 IL-10 等基因表达明显上调;24 h 时,芯片上 35% 的血管新生相关基因表达均显著上调,主要

有 HIF-1 α 、flt1、bFGF、VEGF 和 IGF-1 等,其中 VEGF 是已知最强的促血管内皮细胞有丝分裂因子。上述结果为 HSYA 在整体动物模型上促进治疗性血管生成提供部分分子水平的实验依据。

4 围绕基因芯片技术应用于脑缺血研究的若干问题

首先,不可否认基因芯片技术自身还存在着不足之处。①探针的特异性:错误核酸掺入或杂质混入导致某些原位合成的 cDNA 探针特异性降低。②灵敏度:相比 Q-RT-PCR,基因芯片对于低丰度的基因表达变化的检测还有一定困难;且荧光标记不均一也可能造成灵敏度差异。故目前多数芯片的结果需要选取特殊的点进行 Q-RT-PCR 的复证。③数据分析:有研究比较目前常用的两种芯片分析方法,即“配对比较(pairwise comparison)”和“均值比较(sample average comparison)”,发现前者的分析结果可靠性较高,但易出现假阴性;而后者容易获得显著性结果但需要附加的分析方法来加强其可靠性。且指出在数据分析时阈值(threshold)的选取与分析方法的选择对于结果的可靠性同等重要^[33]。④可比性:目前很多芯片研究的实验设计都参照前期经验而来,尚缺乏可供研究人员共同参照的客观标准,这也加大了在不同实验室报告的类似结果中寻找共同点的难度。但是,可以看到,芯片制作及杂交条件正不断升级换代,其技术正日趋成熟和完善。改进探针合成技术所得的 Oligo 基因芯片,其使用的寡核苷酸序列较之 cDNA 探针提高了杂交的特异性,实验结果重复性更高;新近发展起来的固相 PCR 技术和大规模平行固相克隆,更突破了检测灵敏度的限制,使得从活组织中获取的 DNA/mRNA 样品无须扩增即可直接标记;质谱法、化学发光法、光导纤维法等更灵敏、快速的方法有望取代荧光法,使检测更加方便快捷。目前已有很多商品化的功能基因芯片可供采用,近期出现的第二代功能分类基因芯片可达到实时定量 PCR 的精度,实验结果无须再进行 PCR 复证。

其次,基因芯片观察基因表达差异最好在细胞水平上,而在组织水平上有多种不同的细胞表现出不同的变化,可能掩盖一些本应检测出的差异。但鉴于脑缺血复杂的病理机制,目前大部分的研究还集中在整体动物水平上。脑组织的异质性较大,不同脑组织及不同细胞类型对于同一刺激的反应不尽相同,因此实验取材的精确把握对芯片结果显得至关重要。当前大部分实验室都使用组织解剖的取材

方法来获得整个海马或皮层的组织匀浆,事实上,这种方法可能太粗糙,已有报道指出海马中只有 30% 的基因能被 Affymetrix 的芯片稳定检测到^[34,35]。激光显微切割技术的应用有望克服以上取材难度大的问题,使结果更有代表性和重现性。

再次,一方面,在脑缺血后基因表达的数据分析中,管家基因的选择至关重要;另一方面,正是基因芯片技术的出现提供了寻找更稳定更可靠管家基因的可能,这对于脑缺血科研体系的完善也不无裨益。磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)及 β -肌动蛋白(β -actin)在目前的研究中较为常用,但有报道指出两者在大鼠脑缺血早期表达有所变化^[36]。Kobayashi 等^[37]发现在大鼠脑缺血再灌注早期(1~4 h)的海马和纹状体中有 28 个基因表达较稳定。其中肽酰-脯氨酰异构酶基因(peptidylprolyl isomerase A),一种脑组织中普遍存在且含量丰富的胞溶质蛋白,在前 4 h 比 GAPDH 及 β -actin 表达更稳定,可作为管家基因使用。而在 C57BL/6 小鼠中研究结果又有所不同,Nishida 等^[38]对其缺血再灌注后 2~24 h 内基因表达研究发现 GAPDH 及 β -actin 的表达并不稳定,有 10 个如 Aes(amino-terminal enhancer of split) 基因符合管家基因的条件。以上实验结果提示基因表达易受到实验动物种属、种系,实验模型和不同观察时间点等因素的影响,同时也提示基因表达是极其微妙和灵敏的细胞内事件,任何实验条件和因素的改变都可能对其产生影响。因此在选择管家基因时也要具体实验具体选择,因为没有一直不变的管家基因。

5 结语与展望

基因芯片的运用为寻找药物的作用靶标提供了便利,扩大了研究视野,缩短了研究周期,为进一步探讨脑缺血病理分子机制和信号转导通路提供新的思路和研究手段。但不可忽视基因芯片自身的局限性:其一,基因芯片技术只能对存在于芯片上的筛选基因进行扫描式检测,必须结合传统的分子生物学方法才能精细了解信号转导通路中关键靶点分子的作用和药理学意义;其二,它只是在基因水平上对病理生理过程和药物分子作用机制进行初步探讨,需要结合蛋白、细胞、组织和整体水平多层次的研究手段,才能对疾病的发生发展过程以及药物的作用机制有全面清晰的认识。我们相信,随着基因芯片技术的广泛应用,以及与日益成熟的蛋白质芯片技术、组织芯片技术和微阵列探测与共聚焦扫描等技术的紧密结合,基因芯片技术必将成为探讨脑缺血病理

分子基础及其药物作用机制的有力武器。

References

- [1] Vikman P, Edvinsson L. Gene expression profiling in the human middle cerebral artery after cerebral ischemia [J]. *Eur J Neurol*, 2006, 13: 1324 - 1332.
- [2] Abo M, Yamauchi H, Suzuki M, et al. Facilitated beam-walking recovery during acute phase by kynurenic acid treatment in a rat model of photochemically induced thrombosis causing focal cerebral ischemia [J]. *Neurosignals*, 2006, 15: 102 - 110.
- [3] Tang Y, Xu H, Du X, et al. Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26: 1089 - 1102.
- [4] Moore DF, Li H, Jeffries N, et al. Using peripheral blood mononuclear cells to determine a gene expression profile of acute ischemic stroke: a pilot investigation [J]. *Circulation*, 2005, 111: 212 - 221.
- [5] Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK, et al. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia [J]. *J Neurochem*, 2006, 98: 1718 - 1731.
- [6] Lu XC, Williams AJ, Yao C, et al. Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion [J]. *J Neurosci Res*, 2004, 77: 843 - 857.
- [7] Yoshida E, Atkinson TG, Chakravarthy B. Neuroprotective gene expression profiles in ischemic cortical cultures preconditioned with IGF-1 or BDNF [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 131: 33 - 50.
- [8] Fan TP, Yeh JC, Leung KW, et al. Angiogenesis: from plants to blood vessels [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27: 297 - 309.
- [9] Cai QS, Feng MQ, Huang H, et al. Application of biochip, genomics and proteomics in drug research and development [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2003, 38: 795 - 800.
- [10] Tang Y, Lu A, Aronow BJ, et al. Genomic responses of the brain to ischemic stroke, intracerebral haemorrhage, kainate seizures, hypoglycemia, and hypoxia [J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 15: 1937 - 1952.
- [11] Ralph GS, Parham S, Lee SR, et al. Identification of potential stroke targets by lentiviral vector mediated overexpression of HIF-1 alpha and HIF-2 alpha in a primary neuronal model of hypoxia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24: 245 - 258.
- [12] Kury P, Schroeter M, Jander S. Transcriptional response to circumscribed cortical brain ischemia: spatiotemporal patterns in ischemic vs remote non-ischemic cortex [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19: 1708 - 1720.
- [13] Kim YD, Sohn NW, Kang C, et al. DNA array reveals altered gene expression in response to focal cerebral

- ischemia [J]. Brain Res Bull, 2002, 58: 491 - 498.
- [14] Keyvani K, Witte OW, Paulus W. Gene expression profiling in perilesional and contralateral areas after ischemia in rat brain [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22: 153 - 160.
- [15] Rickhag M, Wieloch T, Gido G, et al. Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue [J]. J Neurochem, 2006, 96: 14 - 29.
- [16] Yakubov E, Gottlieb M, Gil S, et al. Overexpression of genes in the CA1 hippocampus region of adult rat following episodes of global ischemia [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2004, 127: 10 - 26.
- [17] Schmidt-Kastner R, Zhang B, Belayev L, et al. DNA microarray analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 108: 81 - 93.
- [18] Lu XC, Williams AJ, Yao C, et al. Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion [J]. J Neurosci Res, 2004, 77: 843 - 857.
- [19] Kim JB, Piao CS, Lee KW, et al. Delayed genomic responses to transient middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. J Neurochem, 2004, 89: 1271 - 1282.
- [20] Nishi T, Maier CM, Hayashi T, et al. Superoxide dismutase 1 overexpression reduces MCP-1 and MIP-1 alpha expression after transient focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25: 1312 - 1324.
- [21] Bernaudin M, Tang Y, Reilly M, et al. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat. Identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 39728 - 39738.
- [22] Dhodda VK, Sailor KA, Bowen KK, et al. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis [J]. J Neurochem, 2004, 89: 73 - 89.
- [23] Sun XT, Ding YT, Wu LY, et al. Gene expression profiling of microvascular endothelial cells during capillary morphogenesis in an *in vitro* model of angiogenesis [J]. Chin J Surg (中华外科杂志), 2005, 43: 37 - 41.
- [24] Xu Z, Ford GD, Croslan DR, et al. Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression [J]. Neurobiol Dis, 2005, 19: 461 - 470.
- [25] Bowler RP, Sheng H, Enghild JJ, et al. A catalytic antioxidant (AEOL 10150) attenuates expression of inflammatory genes in stroke [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33: 1141 - 1152.
- [26] Wang T, Hou YZ, Zhao JZ. Gene chip technique for assessing effects of disoprofol on expression of apoptosis-associated gene in rats with global ischemia and reperfusion [J]. Chin J Clin Rehabil (中国临床康复), 2005, 9: 230 - 231.
- [27] Qiu Y, Li TJ, Rui YC. DNA microarray analysis of protective mechanism of Rong Shuan Capsules on focal cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. Acad J Second Mil Med Univ (第二军医大学学报), 2005, 26: 709 - 710.
- [28] Li TJ, Qiu Y, Rui YC, et al. DNA microarray analysis of protective mechanism of buyang huanwu decoction on focal cerebral ischemia/reperfusion in rats [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2004, 29: 559 - 563.
- [29] Li ZS, Li DL, Huang J. Investigations on the molecular mechanisms of saponins from *Anemarrhena asphodeloides* Bunge using oligonucleotide microarrays [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2003, 38: 496 - 500.
- [30] Sengupta S, Toh SA, Sellers LA, et al. Modulating angiogenesis: the yin and the yang in ginseng [J]. Circulation, 2004, 110: 1219 - 1225.
- [31] Yue PY, Wong DY, Ha WY, et al. Elucidation of the mechanisms underlying the angiogenic effects of ginsenoside Rg (1) *in vivo* and *in vitro* [J]. Angiogenesis, 2005, 8: 205 - 216.
- [32] Zhu H, Wang Z, Ma C, et al. Neuroprotective effects of hydroxysafflower yellow A: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Planta Med, 2003, 69: 429 - 433.
- [33] Kobayashi MS, Takahashi Y, Nagata T, et al. Statistical validation of two sample comparison methods for oligonucleotide microarray in rat ischemia model [J]. Neurochem Res, 2006, 31: 735 - 740.
- [34] Evans SJ, Datson NA, Kabbaj M, et al. Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. Serial Analysis of Gene Expression [J]. Eur J Neurosci, 2002, 16: 409 - 413.
- [35] Ronnback A, Dahlqvist P, Svensson PA, et al. Gene expression profiling of the rat hippocampus one month after focal cerebral ischemia followed by enriched environment [J]. Neurosci Lett, 2005, 385: 173 - 178.
- [36] Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC, et al. The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia—caspase-3 as a case study [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000, 75: 143 - 149.
- [37] Kobayashi MS, Takahashi Y, Nagata T, et al. Screening for control genes in rat global cerebral ischemia using high-density oligonucleotide array [J]. J Neurosci Res, 2004, 76: 512 - 518.
- [38] Nishida Y, Sugahara-Kobayashi M, Takahashi Y, et al. Screening for control genes in mouse hippocampus after transient forebrain ischemia using high-density oligonucleotide array [J]. J Pharmacol Sci, 2006, 101: 52 - 57.