



基因芯片技术在免疫学研究中的应用 及其对中医药研究的启发

马宇滢, 张新民

(复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海 200040)

[摘要] 基因芯片技术是一种高通量的研究手段,可以在同一时刻对成千上万个基因的表达情况进行分析,形成完整的细胞基因表达谱。目前该技术已应用于免疫学研究中,如免疫细胞发育、成熟、活化、分化及其免疫应答的调控机制,变态反应的分子基础,疾病的临床表型和基因表达谱的关系,免疫药理学等,加深了人们对免疫系统的认识。同样,它也将有助于中医药对免疫细胞和免疫应答的调控机制研究、中医药治疗变态反应性疾病机制的研究、中医辨证的标准化以及中药药理研究等。基因芯片实验结果的数据分析一是比较不同种类样本基因表达量的差异,二是为了获得特征性的基因表达谱,但关于样本量的多少、统计方法的使用尚没有统一的认识,研究人员正努力制定关于基因芯片实验的标准。

[关键词] 基因表达芯片; 免疫学试验; 中医药学

[中图分类号] R349.64; R392.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)02-0090-04

Application of DNA microarray technology in immunological research and its inspiration to researches on traditional Chinese medicine

MA Yu-Ying, ZHANG Xin-Min

(Institute of Chinese Integrative Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

ABSTRACT DNA microarray technology is a high throughput method that can analyze the expression of thousands of genes at the same time to form a complete cellular gene expression profile. It has been applied in immunological researches such as the development, maturation, activation and differentiation of immune cells, the regulation of immune responses, the molecular mechanism of allergy, the relation between phenotype and gene expression, and immunological pharmacology, etc. It has deepened our perception of the immune system. It will as well be helpful in the research of the regulative mechanism of traditional Chinese medicine (TCM) toward immune cells and immune responses, the therapeutic mechanisms of TCM toward allergy, the standardization of differentiation of syndrome and herbal pharmacology, etc. The data analysis of the results of DNA microarray experiments is aimed to compare the difference of gene expression levels of different samples and obtain diagnostic gene expression profiles. But there are controversies about the number of samples and choices of statistical methods. Researchers are striving in setting standards of DNA microarray experiments.

KEY WORDS gene expression chips; immunologic tests; traditional Chinese medicine

J Chin Integr Med, 2004, 2(2): 90-93

基因芯片是采用光导原位合成或微量点样的方法,将寡核苷酸或 cDNA 有序地固化于支持物的表面,与已标记的待测生物样品的 cDNA 或 cRNA 杂交,通过激光共聚焦扫描等特殊设备对杂交信号的强度进行检测分析,从而判断样品中靶分子的数量。它可以在同一时刻对成千上万个基因的表达情况进行分析,形成完整的细胞基因表达谱,是一种高效的高通量技术^[1]。

基因芯片技术在免疫学研究中的应用十分广泛。免疫系统疾病是人类常见疾病,许多其他严重危害人类的疾病如肿瘤、糖尿病、艾滋病等也与免疫系统息息相关。现代西方医学对这些疾病往往没有很有效的治疗手段,中医药则在长期的临床实践中

显示出治疗这些疾病的良好前景,中医药领域的免疫学研究也越来越为人重视。这些研究包括中医药的免疫生物化学、分子生物学、免疫生理学、免疫病理学、免疫遗传学、临床免疫学等各个方面。中医理论、思维方式与免疫学有许多相通之处,最基本的是两者都强调整体观念,即人与环境是一个整体,人体内部各部分也是一个互相作用的整体。免疫系统与免疫应答是一个非常复杂的调控网络,中医药对机体的作用也是一个多靶点、多层次的调控过程;传统的单靶标式的研究方法已经显得有些捉襟见肘,需

[基金项目] 上海市科委攻关项目(No. 02DZ19128)

[作者简介] 马宇滢(1971-),女,主治医师,在读博士研究生。

Correspondence to: Dr. MA Yu-Ying. E-mail: kmyyct@163.com

要有能够从整体上把握生命活动的新的研究手段, 基因芯片的出现正顺应了这种要求^[2]。

1 免疫细胞与免疫应答

免疫细胞的发育、成熟、活化、分化及其免疫应答过程是受基因调控的, 涉及到多种基因表达的开/关或上调/下调, 构成一个非常复杂的调控网络, 用基因芯片技术对处于不同生理、病理状态下的细胞的基因表达谱进行检测, 有助于从整体上了解这一复杂过程。

为了解树突细胞分化成熟过程的基因调控机制, Naour 等^[3]用带有 6 300 个人类基因的寡核苷酸芯片来分析不同分化阶段树突细胞的基因表达谱, 在差异表达的 255 个基因中, 既有主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) 类分子、CC 家族趋化因子受体 7(CC chemokine receptor 7, CCR7)、Fc RII 等一些已知与树突细胞分化成熟有关的基因, 也有基因技术之前许多并不知道与此有关的基因。

T 辅助细胞(T-helper, Th) 亚群的分化在免疫应答中占有关键地位, 基因芯片可用于研究其分化的机制, 以及亚群的实质和功能。Rogge 等^[4]用寡核苷酸芯片比较人 Th1 和 Th2 细胞的基因表达谱, 在约 6 000 个基因中发现 215 个在 Th1 和 Th2 之间有差异表达, 包括转录因子、细胞因子、细胞黏附分子、趋化蛋白, 以及与凋亡、代谢等有关的基因。

T 细胞活化过程有明显的时间性, 利用基因芯片也揭示出活化 T 细胞在不同时间点的不同的分子状态。Teague 等^[5]对小鼠静止 T 细胞与活化后 8 h、48 h 的 T 细胞的基因表达谱作了芯片检测, Ellisen 等^[6]分别对人外周血淋巴细胞在受到刀豆球蛋白 A (concanavalin A, ConA) 刺激后 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、36 h、48 h 的基因表达谱进行了芯片检测, 发现静止 T 细胞、不同时相的活化 T 细胞基因表达有显著差异。

B 细胞是专职的抗原呈递细胞, 其表达 MHC 类分子的机制十分复杂。Nagarajan 等^[7]对野生型 B 细胞与 C₁TA(调节 MHC 类分子表达的重要因子) 突变的 B 细胞作了芯片检测, 从基因表达谱中找到了明显差异表达的基因。

为研究 B 细胞自身耐受的分子机制, Glynn 等^[8]对耐受 B 细胞、活化 B 细胞与未活化 B 细胞的芯片检测结果作了比较, 指出在耐受 B 细胞中, B 细胞受外来抗原刺激所应产生的反应几乎完全被阻断, 却诱导了一些对信号转导和转录活化具有负调控作用的基因的表达。

基因芯片分析的结果必须进行验证, 一般多用 Northern blot、实时定量 RT-PCR 等方法, 或用 Southern blot、蛋白质双向电泳、质谱分析进行蛋白质水平的分析和验证。但是在解释这些结果的时候, 必须认识到有差异表达的基因是否与免疫细胞的分化成熟和免疫应答有真实的联系, 或仅仅是一种无意义的共生现象。要能正确回答这一问题, 必须在芯片检测的基础上作进一步的深入研究。

中医药学领域的免疫学研究必然会涉及中医药对免疫细胞和免疫应答过程的作用。中药成分复杂, 有效成分含量极微, 其对各种免疫细胞的分化、成熟和活化及免疫应答过程的作用往往不是单一、线性的, 而是多层次、非线性的网状调控。应用基因芯片技术可以检测各种免疫细胞在中医药的不同条件、不同时间作用后的基因表达谱, 从而可以从基因水平了解中医药对免疫细胞和免疫应答复杂的调控机制, 有助于阐明中医药的作用机制。同样, 对检测结果的解释也必须严谨, 需要通过大量细致深入的研究找出中医药调节作用的真正靶点。

2 变态反应

变态反应是免疫应答失衡的表现, 涉及许多因素的相互作用, 用基因芯片这种高通量的技术来探索变态反应发生的分子基础和预防、诊断、治疗的新措施, 可能更符合这类疾病的特点。

Zou 等^[9]用人的 cDNA 芯片对猴接受变应原刺激哮喘发作后不同时相的肺组织进行了检测, 并与正常猴的肺组织对比, 发现了 149 个差异表达的基因, 用系统聚类法可将这些基因分成 5 个具有不同表达模式的类别, 这些类别与功能和时相高度相关, 这对于探究疾病的基因调控机制很有作用。

Wandinger 等^[10]用芯片技术研究干扰素- β (interferon-beta, IFN- β) 治疗多发性硬化的作用机制, 经 IFN- β 处理后, 患者和健康对照者的外周血单个核细胞的基因表达谱均有了变化, 包括许多细胞因子及其受体、趋化蛋白、黏附分子、凋亡、抗原呈递等相关基因, 提示 IFN- β 的作用机制并不仅仅是抗炎。他们还发现白细胞介素-12 受体 β 链及 CCR5 表达上升, 说明 IFN- β 的作用并不是过去认为的那样, 是抑制 Th1 应答、促进 Th2 应答, 其中的过程要复杂得多, 同时也从一个侧面反映了多发性硬化的发病机制并不能用简单的 Th1/Th2 二分法解释。

可见基因芯片技术通过它产生的大量信息, 为研究变态反应性疾病提供了新的视角、新的线索和新的切入点。中医药治疗变态反应性疾病往往有较好的效果, 芯片技术可以用来反映中医药作用于变

态反应性疾病后,相应细胞基因表达谱的变化,以此为基础探究中医药治疗变态反应性疾病的作用机制,或许能从中药的药理作用入手,揭示更多有关这类疾病的奥秘。

3 临床应用的探索

许多研究都试图在基因芯片的数据中寻找与疾病的诊断、病情判断、预后评估、分型的联系,也即找出疾病的临床表型与基因表达谱之间的相关性。

临床上常常可以见到有相同病理诊断的不同肿瘤患者具有截然不同的临床病程和对治疗的反应,这意味着目前认为是同一类型的肿瘤,可能在分子水平上具有完全不同的表现形式。Alizadeh 等^[11]用自制的基因芯片“Lymphochip”作了 242 个样本的检测,发现同样诊断为弥漫性大 B 细胞淋巴瘤的肿瘤细胞具有不同的基因表达谱。系统聚类法提示弥漫性大 B 细胞淋巴瘤具有两种亚型:一种的基因表达谱与生发中心 B 细胞类似;另一种与活化的外周血 B 细胞相近,表明这两种亚型可能是由于 B 细胞不同分化阶段所致。而且两种亚型的预后差异明显,故此建议根据芯片检测结果对弥漫性大 B 细胞淋巴瘤进行重新分型。也许基因芯片的深入应用,将使人们对肿瘤的认识发生突破性的改变,但系统聚类法具有很大的主观性,有人将上述芯片检测结果进行重新聚类,结果分出了完全不同的两种类型,可见用基因芯片检测建立新的肿瘤诊断标准还很成熟,还完全不能应用于临床实践。

Brutsche 等^[12]则尝试建立一种基于基因表达的评分系统,对哮喘和特应性体质作出评价。他们通过对哮喘患者、无哮喘的特应性体质患者和正常人的外周血单个核细胞进行芯片检测,筛选出 10 个异常表达的基因,以此对样本进行评分,发现患者的评分与正常人有显著差别,且与哮喘的严重程度有趋势关系。此评分系统的特异性和敏感性分别达到 92% 和 96%, 优于以 IgE 评分的结果,且与 IgE 相关性良好,所以 Brutsche 提出此评分系统可用于评估发生哮喘的危险度或评价治疗的效果。但这又牵涉到样本量的问题,一个评分或诊断标准的建立是基于极大量样本的数据,而基因芯片由于价格昂贵,不可能进行大样本量的调查,往往只有几个或几十个样本,那么其可靠性就大受疑问。

目前这些研究还仅是初步的探索,离建立起可用于临床操作的明确的原则还有距离。而中医的证是否也可以用基因芯片找出对应的表达谱,使辨证论治标准化?国内学者赵晓山等^[13]从单一病证入手,对肾虚证的相关基因进行了研究,做了可喜的尝

试。但基因研究,首先要保证有足够的样本量,而多少算是足够了呢?其次要有稳健科学的数据处理方法,避免主观因素的干扰;另外,不同的证型确实有特定细胞的特征性的基因表达谱,才能在此基础上考虑利用基因芯片技术建立中医辨证标准化的可行性。

4 免疫药理学

基因芯片在药理学方面的应用主要在于阐明药物作用机制,确定药物作用靶标,开发新药。Glynn 等^[8]检测了免疫抑制剂 FK506 作用后的活化 B 细胞基因表达谱的改变,惊讶地发现 FK506 仅仅抑制了一小部分活化诱导表达的基因,且与自身耐受 B 细胞的表达谱有明显的差异,FK506 还抑制了自身耐受的基因,所以 Glynn 建议以自身耐受的基因表达谱为参照来开发新的免疫抑制剂。联系到中药的研发,单味中药的成分就已十分复杂,遑论复方?为提高中医药疗效,创制一类新药,实现中药现代化,需要找到单味或复方的有效部位或有效成分,利用高通量的基因芯片技术筛选中药有效部位和成分,研究中药药理和毒理,将大大提高中药研发的效率。

5 数据分析

在分析芯片数据时,如果研究目的是为了获得特征性的基因表达谱,目前应用较广的一种统计方法是系统聚类法^[14~16]。该方法是将 K 个样本中的 N 个基因视为 K 维空间中的 N 个点,按一定的规则将相近的点聚为一类,重复此过程,最终将大量的基因按相似的表达模式分成若干类。系统聚类法可以不需要有关基因功能的背景知识,就可将成千上万的基因分成不同的功能类型,即相同类别中的基因具有相似的功能,这将有助于从整体上理解生命活动的基因调控方式,也可以探索未知基因的功能。但系统聚类法随意性大,无法进行统计学检验,对芯片类的数据不够稳健,且对于聚类结果的解释也非常复杂,所以 Tamayo 等^[17]采用了另一种聚类分析的方法——自组织映射(self-organizing maps, SOM)来处理芯片数据。SOM 是将一张二维坐标上的一组节点随机映射到 K 维空间中,通过多次叠代,调整节点的映射位置,最终将相近的数据点聚成一类。Tamayo 认为 SOM 比系统聚类更灵活、直观、易解释。Brown 等^[18]则应用支持向量核心(support vector machines, SVM)法则来处理数据。SVM 是一种指导性的聚类方法,即根据已知的功能将基因分成几类,根据基因的表达模式判断其他的基因是否属于某个特定类别,并不断学习这种聚类模式,验证已归类的基

因是否正确, 最终建立起各类别的表达特征, 并能预测任何的基因属于何种类别。Brown 认为 SVM 比前两种方法更适合于基因表达谱的分析, 因为它的分类更准确, 预测性也较好。但 SOM 和 SVM 仍不能解决统计检验的问题, 而无法进行统计检验, 就无法判断实验所获结论是否有意义。基因芯片研究的另一目的是为了比较不同种类样本基因表达量的差异, 不论是用何种统计方法, 都需要一定的样本量。然而, 基因芯片要研究成千上万个变量(基因), 但限于价格只能进行很少的重复, 这使统计学陷入了困境。所以 Tilstone^[19] 指出一定要非常谨慎地对待芯片应用中的统计学问题, 要与优秀的统计学家紧密合作。目前各国科学家和研发人员成立了一个国际微阵列基因表达社团, 制定了一份被称为 MIAME (minimum information about a microarray experiment) 的指南, 包括了芯片实验设计, 重复次数(样本量), 数据分析等方面的内容, 力图使基因芯片的研究工作有章可循。许多杂志在接受有关基因芯片实验的文章时, 也要求作者填写 MIAME 清单。

综上所述, 基因芯片技术在免疫学研究领域正在发挥越来越大的作用。尽管人类受目前认识水平的限制, 无法从整体上把握基因调控的网状模式, 但随着研究的深入, 相关统计和数学模型的完善和应用, 利用芯片技术所获得的巨大生物信息能量将逐步被人类所利用。而芯片技术可以从基因水平上研究中医药治疗免疫相关疾病的机制, 有助于阐明中药复方作用的复杂机制, 可以建立起中药筛选的靶标, 甚至有可能根据不同的基因表达谱为特定中药或复方选择合适的病人, 使辨证论治得到质的飞跃。

从基因芯片技术在免疫学领域的应用中, 我们得到启发, 那就是中医药研究的其他领域也需要这样的技术手段。中医是从宏观上来阐述生理和病理过程的, 以整体性、综合性为特征, 而目前中医药研究所做的主要工作就是寻找相对应的微观(物质)基础。传统的单靶标式的方法根本无法适应中医的整体观念, 这也是中西医结合研究难有突破的根源之一。芯片技术可以展示完整的基因表达谱, 再结合其他高通量方法去找出规律性的东西, 就有可能建立与中医理论和实践相对应的微观表达模式, 从而发展和完善中医药学。

[参考文献]

1 Jain KK. Biochip for gene spotting[J]. Science, 2001, 294(5542): 621-623.
2 沈自尹. 中医药在调节基因平衡上的优势[J]. 中西医结合学报,

2003, 1(1): 3-4.
3 Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, et al. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics[J]. J Biol Chem, 2001, 276(21): 17920-17931.
4 Rogge L, Bianchi E, Biffi M, et al. Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays[J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 96-101.
5 Teague TK, Hildeman D, Kedl RM, et al. Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(22): 12691-12696.
6 Ellisen LW, Palmer RE, Maki RG, et al. Cascades of transcriptional induction during human lymphocyte activation[J]. Eur J Cell Biol, 2001, 80(5): 321-328.
7 Nagarajan UM, Lochamy J, Chen X, et al. Class II transactivator is required for maximal expression of HLA-DOB in B cells[J]. J Immunol, 2002, 168(4): 1780-1786.
8 Glynne R, Akkaraju S, Healy JJ, et al. How self-tolerance and the immunosuppressive drug FK506 prevent B cell mitogenesis[J]. Nature, 2000, 403(6770): 672-676. Erratum in: Nature, 2000, 407(6802): 413.
9 Zou J, Young S, Zhu F, et al. Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma[J]. Genome Biol, 2002, 3(5): research0020.1-0020.13.
10 Wandinger KP, Sturzebecher CS, Bielekova B, et al. Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes[J]. Ann Neurol, 2001, 50(3): 349-357.
11 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling[J]. Nature, 2000, 403(6769): 503-511.
12 Brutsche MH, Joos L, Carlen Brutsche IE, et al. Array-based diagnostic gene-expression score for atopy and asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2002, 109(2): 271-273.
13 赵晓山, 罗仁. 肾虚证相关基因的研究[J]. 中西医结合学报, 2003, 1(1): 18-20.
14 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(25): 14863-14868.
15 Li H, Hong F. Cluster-Rasch models for microarray gene expression data[J]. Genome Biol, 2001, 2(8): research0031.1-0031.13.
16 Sherlock G. Analysis of large-scale gene expression data[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(2): 201-205.
17 Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, et al. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(6): 2907-2912.
18 Brown MP, Grundy WN, Lin D, et al. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(1): 262-267.
19 Tilstone C. DNA microarrays: vital statistics[J]. Nature, 2003, 424(6949): 610-612.