

心血管相关基因芯片的制备及其在知母皂苷作用机理研究中的应用

李泽松^{1,2}, 李德良¹, 黄 坚², 丁 雨², 马百平¹, 王升启^{1*}

(1. 军事医学科学院 放射研究所, 北京 100850; 2. 深圳益生堂生物企业公司, 广东深圳 518026)

摘要: 目的 研究知母皂苷活血化瘀作用的分子机制。方法 制备了包含 87 个心血管疾病相关基因探针的寡核苷酸芯片。将 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 知母皂苷作用 8 h 及未作用的培养人血管内皮细胞提取总 RNA, 通过逆转录分别标记 Cy 5 和 Cy 3 荧光染料, 然后与芯片杂交, 检测知母皂苷对血管内皮细胞中心血管疾病相关基因表达的影响。结果 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(ECE-1)基因的表达均有不同程度的下调。结论 知母皂苷有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。

关键词: 知母; 皂苷; 基因芯片; 基因表达

中图分类号: R282.71; Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2003)07 - 0496 - 05

Investigations on the molecular mechanisms of saponins from *Ane marrhena asphodeloides* Bunge using oligonucleotide microarrays

LI Ze-song^{1,2}, LI De-liang¹, HUANG Jian², DING Yu², MA Bai-ping¹, WANG Sheng-qi^{1*}

(1. Institute of Radiation Medicine Science, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. Shenzhen Yi Sheng Tang Biological Products Co. Ltd, Shenzhen 518026, China)

Abstract: **Aim** To investigate the molecular mechanisms of saponins from the rhizome of *Ane marrhena asphodeloides* Bunge. **Methods** Oligonucleotide microarrays consisting of 87 probes representing 87 human cardiovascular disease-related genes were constructed. Effects of saponins on gene expression in human umbilical vein endothelial cells were analyzed by comparing hybridization of Cy 5-labeled cDNAs from saponins-treated human umbilical vein endothelial cells and Cy 3-labeled cDNAs from untreated human umbilical vein endothelial cells. **Results** The results indicate that angiotensinogen gene, α_{2A} -adrenoceptor gene and endothelin-converting enzyme 1 gene were downregulated 2.8, 1.9 and 3.1 folds respectively after human umbilical vein endothelial cells were incubated in medium containing $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ saponins. **Conclusion** These results suggest that saponins may have beneficial effect on cardiovascular diseases by modulating the function of vein endothelial cells and microarray can be used to investigate the biological action of extracts from traditional Chinese medicine.

Key words: *Ane marrhena asphodeloides*; saponins; microarrays; gene expression

知母皂苷是中药知母的主要活性成分, 有抗病毒、抗血小板聚集^[1], 清除自由基^[2], 降血糖^[3]等作用, 对其作用的分子机制研究较少。近年来, 国内外

已开展了大量以探索中药作用机理为主的实验研究, 其中以中药对心血管疾病基因表达影响的研究较为系统和深入。以往的研究多限于一个或几个基因, 难以从基因网络水平研究中药的机理, 而基因芯片有高通量、多靶点的特点, 有利于克服此局限。随着基因芯片技术的日益成熟, 该技术已应用于中药机理的研究^[4,5]。本文用自制的基因芯片检测了中药知母皂苷对培养人血管内皮细胞基因表达的影

收稿日期: 2002-08-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39889001); 军队“十五”重点项目资助(01Z019)。

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 66932211, Fax: 86 - 10 - 66932211, E-mail: sqwang@nic.bmi.ac.cn

响,以进一步探索中药知母皂苷的分子机制。

材料与amp;方法

基因的选择根据文献^[6,7]选择了一些常见的与冠心病、心肌梗死、心力衰竭、动脉粥样硬化和高血压等疾病相关的基因。

寡核苷酸探针的设计从 GenBank 中查询所选心血管疾病相关基因 mRNA 序列,用本室设计的寡核苷酸探针设计软件 MProbe 进行探针设计^[8],探针长度约 40 nt,GC 含量 45%~55%,自身无二级结构,选取编码区近 3' 末端的探针进行 BLAST 分析,筛选与其他序列同源性小于 50%的探针 1~2 条作为基因特异的寡核苷酸探针^[9,10]。

寡核苷酸合成采用标准亚磷酰胺化学方法^[12]在 ABI8909 DNA 合成仪上进行寡核苷酸的合成,5' 或 3' 氨基修饰用 N-MMTTr-6-氨基-2-氰乙基-N',N'-二异丙基亚磷酰胺(自制)在合成后的最后一步引入^[10]。合成完毕后浓氨水 55℃ 脱保护/切割 15 h,OPC 柱纯化。

芯片的制备与后处理寡核苷酸探针用 3×SSC 稀释成 0.5 g·L⁻¹。用 Pix sys 5500 芯片制备仪将寡核苷酸点到醛基片上,斑点间距为 0.5 mm。点样完毕后,室温下放置过夜,0.2% SDS 洗 2 次,水洗 2 次,室温干燥。凉干备用。

知母总皂苷的提取知母药材(产于河北安国)100 g,用 80%乙醇 400 mL 回流提取,重复 4 次,合并滤液,浓缩得浸膏(250 mL)。浸膏用乙醚萃取脱脂 2 次,水液用正丁醇萃取 6 次。合并正丁醇萃取液,浓缩至干,得知母总皂苷 13 g。

血管内皮细胞的培养及给药人脐静脉内皮细胞(Ecv-304)培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中,置 37℃,5% CO₂ 恒温箱培养。当细胞达到 80%饱和度时,换成含 80 mg·L⁻¹知母总皂苷的新培养液,阴性对照则不加知母皂苷,继续培养 8 h 后,收获细胞备用。

总 RNA 的提取用 Trizol 试剂按说明书推荐的操作步骤提取细胞总 RNA,具体方法如下:细胞用冰冷的磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.2)洗涤 2 次,加 Trizol 裂解细胞 1 mL,氯仿抽提 1 次,异丙醇沉淀 RNA,75%乙醇洗 2 次,空气干燥,DEPC 处理水溶解,紫外和电泳分析。

荧光标记 cDNA 的合成总 RNA 的逆转录荧光标记参照 Schena 等^[10,13]的方法进行。具体方法如下:总 RNA 60 μg,荧光素酶体外转录 mRNA 0.1

μg, Oligo dT(17) 1 μg,混匀,70℃ 10 min,冰上冷却。加入第一链缓冲液 3 μL, DIT 1.5 μL, dNTP 1.5 μL, Cy3-dUTP 或 Cy5-dUTP 1.5 μL,混匀,42℃, 2 min,加入逆转录酶 1.5 μL,42℃ 2 h。65℃ NaOH 降解 RNA,乙醇沉淀标记 cDNA。

杂交和洗涤用杂交液 10 μL 溶解标记的 cDNA,96℃ 水浴 3 min,将样品加在基因芯片上,盖上盖玻片,置于杂交盒中,42℃ 杂交 3~5 h。杂交完毕后,分别用 2×SSC+0.2% SDS, 0.1% SSC+0.2% SDS, 0.1% SSC 洗涤 5 min,室温凉干。

检测和分析用 ScanArray 4000 扫描芯片,用 ImaGene 4.2 软件进行数据分析和归一化处理。使用看家基因和阳性对照对 Cy3 和 Cy5 扫描结果进行校正。

结果

1 芯片检测的灵敏度

将萤火虫荧光素酶基因体外转录 mRNA^[11] 0.1 μg,分别稀释 10, 1×10², 1×10³, 1×10⁴, 1×10⁵ 倍,并分别参入到人内皮细胞总 RNA 反转录体系中。杂交结果表明,随稀释倍数的增加,信号强度减弱(图 1)。当稀释 1×10⁴ 倍时,信号强度已很弱;而稀释到 1×10⁵ 倍时,已检测不到信号。说明芯片的检测极限是 1×10⁻⁴ μg,即相当于约 1×10⁸ 个分子。

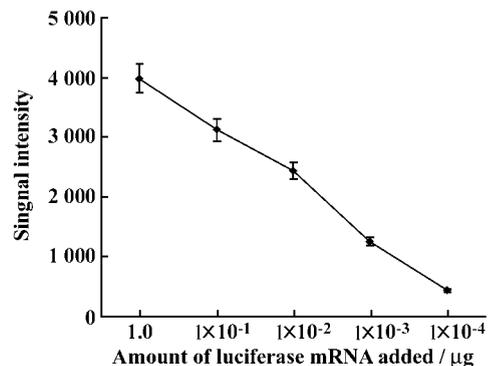


Figure 1 Detection sensitivity of microarray. Different amounts of luciferase mRNA was spiked into HUVEC total RNA, then cDNAs were labeled with Cy3 by reverse transcription. The labeled cDNAs were hybridized to microarray containing probe of luciferase (positive control)

2 探针浓度对杂交信号的影响

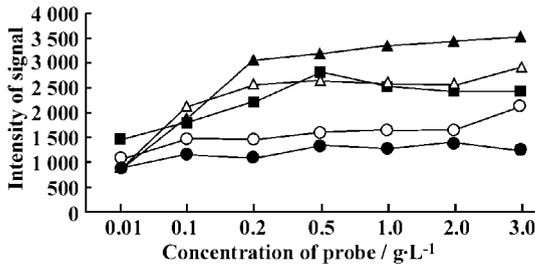
以 5 个不同表达丰度的基因为研究对象,检测了探针质量浓度(0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g·L⁻¹)对杂交信号的影响(图 2, 3)。在低质量浓度

范围内(0.01 ~ 0.5 g·L⁻¹),杂交信号强度随探针浓度的增加而增加;在较高浓度范围,探针浓度对杂交

信号影响无明显差异。因此,选用了质量浓度为 0.5 g·L⁻¹的探针制作芯片。



Figure 2 Fluorescence image of an array containing different concentrations of probes (0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g·L⁻¹)



(△ POTCH, ■ ACTC, ▲ MYBPC, ● CaATP2, ○ iNOS) on the fluorescent signal intensities

3 芯片杂交的特异性

为了考察芯片杂交的特异性,制备了含有 5 个人基因,3 个阴性对照(2 个水稻基因, *rpoB*)及 2 个阳性对照(荧光素酶基因)探针的微阵列。来源于人内皮细胞总 RNA 的 Cy3 标记 cDNA,荧光素酶基因体外转录 mRNA 的 Cy3 标记的 cDNA 和混合 cDNA 分别与芯片杂交。结果如图 4 所示,所有阴性探针都没有可检测到的杂交信号,在来源于人的 cDNA 和阳性对照探针,阳性对照 cDNA 和人基因探针之间均无交叉杂交(图 4 A,B)。说明芯片具有很好的杂交专一性。

Figure 3 Effects of different concentrations of probes

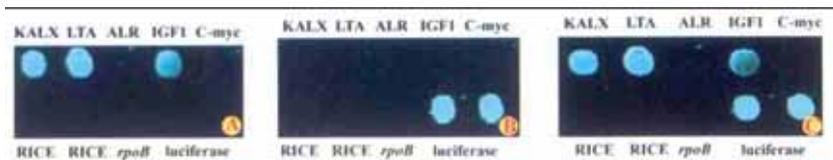


Figure 4 Detection specificity of microarray. The labeled cDNAs from HUVEC total RNA(A), luciferase mRNA (B), and HUVEC total RNA and luciferase mRNA(C) were hybridized to an array including rice gene, *rpoB* gene, luciferase gene and human gene(KALX, LTA, ALR, IGF-1, C-myc)

4 芯片检测的重复性

等量的 RNA 分别用 Cy3 和 Cy5 反转录标记并与芯片杂交,对 3 次实验结果进行了比较分析。在 3 次实验中 Cy3/Cy5 或 Cy5/Cy3 的比值都大于 1.2 的

基因仅有 5 个,占总基因数的 7%;Cy3/Cy5 或 Cy5/Cy3 的比值都大于 1.4 的仅 1 个,占总基因数的 1.5%;在 3 次实验中没有基因 Cy3/Cy5 或 Cy5/Cy3 比值都大于 1.6(图 5)。

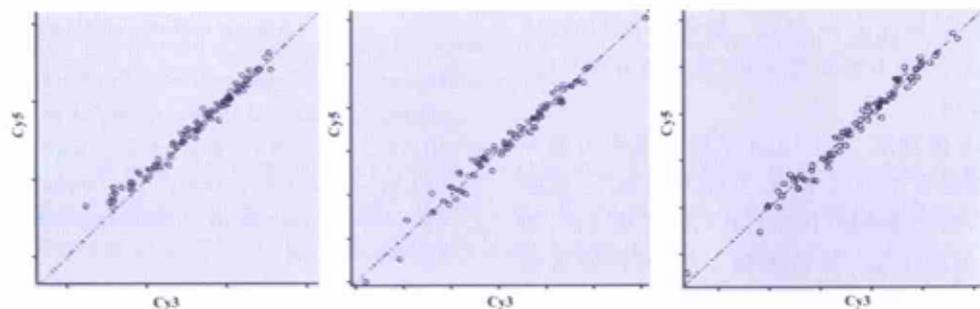


Figure 5 Comparison of three different experiments

5 知母皂苷对基因表达的影响

未用药处理的内皮细胞总 RNA 的反转录用

Cy3-dUTP 标记,知母皂苷处理内皮细胞总 RNA 的反转录用 Cy5-dUTP 标记。图 6 显示了 Cy3-dUTP 和

Cy5-dUTP 标记 cDNA 与芯片杂交的结果,黄色的表示用药后表达水平无变化,绿色的表示用药后表达水平下调。

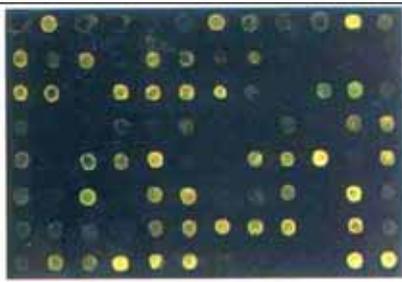


Figure 6 Pseudocolor image of fluorescent signal intensity from hybridization to oligonucleotide microarrays of untreated and saponin-treated labeled with Cy 3 and Cy 5. Human umbilical vein endothelial cells (Ecv-304) were grown in DMEM supplemented with 10% calf bovine serum in an atmosphere of 5% CO₂. At about 80% confluence, the medium was replaced and the cells were incubated in fresh medium containing 80 mg·L⁻¹ saponins for 8 hours at 37 °C. Isolation of total RNA was achieved by using TRIzol Reagent. The cDNAs derived from untreated (labelled with Cy 3) and saponins-treated (labelled with Cy 5) HUVEC total RNA were hybridized to an array. The two channels were pseudocolored according to the fluorescence intensity

用 4 个看家基因和阳性内标对 Cy3 和 Cy5 的信号值进行了归一化处理,并确定 Cy3 和 Cy5 的比值大于 2.0 或小于 0.5 为差异表达的标准。据此标准,80 mg·L⁻¹ 知母总皂苷作用于人血管内皮细胞后,血管紧张素酶原 (AGT)、肾上腺素 α_{2A} 受体 (ADRA2R) 和内皮素转换酶-1 (ECE-1) 的表达都下调 (表 1)。

Table 1 Transcriptional effects of saponin on genes in HUVEC

Gene	Gene bank accession No.	Fluorescent ratio
Angiotensinogen	K 02215	0.36
Adenosine α _{2A} receptor	XM009882	0.52
Endothelin converting enzyme 1	Z35307	0.32

Note: Data are expressed as means

讨论

血管内皮具有一系列重要的生理功能,参与机体的血压调节、血小板和白细胞间的相互作用、纤维蛋白溶解、血管生长、血液凝集、炎症介质和细胞因

子的释放等。正常生理状态下,血管内皮细胞可通过分泌多种血管活性物质维持血管张力。血管紧张素原是血管内皮分泌的调节血压的重要活性物质之一。血管紧张素原的表达是组织专一性的,有人在血管中层诱导出血管紧张素原的表达^[14]。研究结果显示,知母皂苷作用于内皮细胞后,血管紧张素原基因的表达明显下调。血管紧张素原基因表达的改变可能与高血压的形成有关^[15]。自发性高血压大鼠给予血管紧张素酶抑制剂后血压降低与此局部组织肾素、血管紧张素的抑制相关性更好。梗死外围心肌中 AGT、ACE 和 AT₁ 受体表达增加,ACE 及 Ang II 活性增强^[16]。因此,知母皂苷可能通过干预血管紧张素原基因的表达,从而有降低血压的作用。



与血管紧张素原相似,知母皂苷作用于内皮细胞后,内皮素转化酶的表达也下调。内皮素转化酶的主要功能是将低活力的内皮素前体转变为有很强血管收缩作用的内皮素。内皮素与血管紧张度的维持有关。研究发现,内皮素表达过高与动脉粥样硬化、原发性肺高血压、冠脉痉挛和充血性心力衰竭有关^[17,18]。因此,知母皂苷通过对内皮素产生途径的抑制,对心血管疾病有治疗作用,尤其是有降低血压的功效。

肾上腺素 α_{2A} 受体 (ADRA2R) 主要存在于神经细胞,也存在于不同的培养细胞,包括隐静脉,ADRA2R 主要调节血管收缩。目前的研究结果显示,ADRA2R 在内皮细胞中也有表达,并且知母皂苷使其表达有明显下调。因此,通过干预 ADRA2R 的表达来调节血压可能是知母皂苷的作用途径之一。

由以上结果可以看出,知母皂苷的分子机理并非单一途径,体现了中药作用的多靶向性。而且,也说明用基因芯片研究中药的作用机理和作用靶标是可行的。随着基因芯片技术的日益成熟,基因芯片技术必将加速对药物特别是中药的研究和开发,这将极大地促进中药基因组学与中药化学组学的发展^[19]。此外,它在药学领域对于药物靶标的发现、

药物作用的分子机理、药物活性及毒性评价等将有进一步促进作用。

References :

- [1] Dong JX, Han GY. Studies on the active constituents of *Anearrhena asphodeloides* [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1992, **27**(1) : 26 - 32 .
- [2] Ma BP, Dong JX, Wang BJ, *et al* . Studies on the furostanol saponins from *Anearrhena asphodeloides* [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1996, **31**(4) : 271 - 277 .
- [3] Nkashima N, Kimura I, Kimura M. Isolation of pseudoprototimosaponin A III from rhizomes of *Anearrhena asphodeloides* and its hypoglycemic activity in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *J Nat Prod*, 1993, **56**(3) : 345 - 350 .
- [4] Watanabe C, Wolfram S, Ader P, *et al* . The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(12) : 6577 - 6580 .
- [5] Carles M, Lee T, Moganti S, *et al* . Chips and Qi : microcomponent-based analysis in traditional Chinese medicine [J]. *Fresenius' J Anal Chem*, 2001, **371**(2) : 190 - 194 .
- [6] Topper JN, Cai J, Falb D, *et al* . Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli : cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(19) : 10417 - 10422 .
- [7] Li XY. *The molecular biology of cardiovascular disease* (心 血 管 疾 病 分 子 生 物 学) [M], Beijing : People's Military Medical Publisher, 1996. 25 - 133 .
- [8] Li WJ, Huang J, Fan M, *et al* . Mprobe : computer aided probe design for oligonucleotide microarray [J]. *Appl Bioinformatics*, 2002, **1**(3) : 103 - 106 .
- [9] Hughes, TR, Mao M, Allan RJ, *et al* . Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(4) : 342 - 347 .
- [10] Huang J, Chen SH, Tong L, *et al* . Preparation and analysis of oligonucleotide microarray for expression detection of mouse cytokine-associated gene [J]. *Chin J Biotechnol* (生 物 工 程 学 报), 2002, **18**(4) : 501 - 504 .
- [11] Chen ZB, Yang J, Wang SQ. Preparation of an universe normalization control for cDNA microarray and its application in the sensitivity analysis of cDNA microarray [J]. *Letl Biotechnol* (生 物 技 术 通 讯), 2002, **13**(5) : 334 - 337 .
- [12] Southern EM, Case-Green SC, Elder JK, *et al* . Arrays of complementary oligonucleotides for analyzing the hybridization behavior of nucleic acids [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**(8) : 1368 - 1373 .
- [13] Schena M, Shalon D, Davis RD, *et al* . Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarrays [J]. *Science*, 1995, **270**(20) : 467 - 470 .
- [14] Zhao JL, Froomes P, Casley D, *et al* . Perindopril chronically inhibits angiotensin converting enzyme in both the endothelium and adventitia of the internal mammary artery in patients with ischemic heart disease [J]. *Circulation*, 1997, **96**(1) : 174 - 182 .
- [15] Nobuo N, Kouichi T, Satoshi Y, *et al* . Tissue angiotensinogen gene expression induced by lipopolysaccharide in hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 1997, **30**(4) : 859 - 867 .
- [16] Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, *et al* . The angiotensin II type (AT2) receptor antagonizes the growth of the AT1 receptor : gain-of-function study using gene transfer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(23) : 10663 - 10667 .
- [17] Bacon CR, Cary NRB, Davenport AP. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta [J]. *Circ Res*, 1996, **79**(4) : 794 - 801 .
- [18] Cohn JN. Is there a role for endothelin in the natural history of heart failure ? [J]. *Circulation*, 1996, **94**(4) : 604 - 606 .
- [19] Wang SQ. TCM genomics and TCM chemics . *World Sci Technol* [J], 2000, **1** : 28 - 31 .