

颅内动脉瘤信号传导相关基因的筛选

石忠松¹, 李明昌², 孙毅明¹, 朱永华¹, 戴华浩¹, 潘伟生¹, 黄正松¹

(1. 中山大学附属第一医院神经外科, 广东 广州 510080; 2. 广州医学院第二附属医院神经外科, 广东 广州 510260)

摘要:【目的】基因芯片技术建立颅内动脉瘤患者血液单核细胞基因表达谱, 筛选与信号传导相关的基因表达情况。【方法】50例颅内动脉瘤患者外周血, 10例正常成人作为对照组, 分离血液单核细胞, 提取总RNA, 与含22 215个人类基因的Affymetrix寡核苷酸基因芯片杂交、洗脱、染色和扫描, 分析检测的数据。荧光定量RT-PCR验证芯片结果。【结果】检测的22 215个基因中, 颅内动脉瘤共差异表达的基因有325个, 差异水平均达2倍以上的基因有35个, 生物信息学分析发现信号传导相关基因有7个, 其中上调基因5个, 下调基因2个。【结论】血液单核细胞基因表达谱是研究颅内动脉瘤发病机制的新策略, 多个信号传导相关基因参与颅内动脉瘤的形成和发展。

关键词: 颅内动脉瘤; 白细胞, 单核; 基因表达谱; 信号传导; 基因芯片

中图分类号 R43.35; R815

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0066-04

Identification of Signal Transduction-related Genes in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Intracranial Aneurysm Patients Using Gene Chip

SHI Zhong-song, LI Ming-chang, SUN Yi-ming, ZHU Yong-hua, DAI Hua-hao,
PAN Wei-sheng, HUANG Zheng-song

(Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080 China)

Abstract: 【Objective】 To identify signal transduction-related genes in peripheral blood mononuclear cells from intracranial aneurysm patients using oligo-microarrays. 【Methods】 Blood samples from 50 intracranial aneurysms and 10 healthy human donors were obtained after informed consent. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood using Ficoll method. The cDNA were retrotranscribed from the extracted RNA and the biotin-labeled cRNA derived from the transcription of cDNA were fragmented as probes. Then, the probes were hybridized with Affymetrix Human Genome U133A Array. Gene Array Scanner was used to screen the signals of hybridization and Microarray Suite software 5.0 was applied to analyze the expression of genes. 【Results】 There were 325 genes differently expressed in PBMCs from intracranial aneurysm patients compared to healthy human. Function analysis were confirmed from 21 upregulated genes and 14 downregulated genes above 2-fold level. Among these genes, there are 7 genes involved in signal transduction. 【Conclusions】 The methodologies of gene chip of PBMCs will provide a new powerful approach to identify the molecular mechanisms of intracranial aneurysm. Signal transduction may be the possible mechanism for the pathogenesis of intracranial aneurysms in Chinese.

Key words: intracranial aneurysm; leukocytes, peripheral blood mononuclear cell; gene expression profile; signal transduction; gene chip

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 66-69; 74]

近年基因芯片技术在人类疾病诊断、发病机制及疾病易感性研究中起到重要作用^[1], 在血管性疾病如主动脉瘤的发病机制研究中也逐渐有应用基因芯片技术的报道^[2]。颅内动脉瘤的发病机制目

前尚不明确, 我们前期对手术切除的颅内动脉瘤组织标本进行基因芯片研究, 初步建立国人颅内动脉瘤组织基因表达谱^[3]。本研究利用来源较充足的血液遗传信息库, 进一步探讨国人颅内动脉瘤

收稿日期: 2006-09-12

基金项目: 国家自然科学基金(30271328, 30370409); 广东省科技计划项目(C31201); 广东省自然科学基金资助项目(04009359)

作者简介: 石忠松(1971-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师; 黄正松, 通讯作者。E-mail: shizhongsong@yahoo.com.cn

患者外周血单核细胞(PBMC)基因表达谱,发现了一些颅内动脉瘤可能致病相关基因群,其中多个基因与信号传导机制密切相关,为阐明颅内动脉瘤的发生机制和寻求早期诊断分子标记物提供了新线索,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 颅内动脉瘤患者 PBMC 的分离

50 例患者均经数字减影脑血管造影诊断为颅内囊性动脉瘤,年龄 32~63 岁,男性 24 例,女性 26 例,分别采集其 2 mL 外周血。每 10 例患者随机组合为一组,另取 10 名体检正常的成人健康志愿者作为对照组,每组将已分离的 PBMC 混合后提取 RNA。Ficoll 密度梯度离心法分离 PBMC,简述如下:2 mL 外周血加入 EDTA 抗凝剂,用半径为 16 cm 的水平离心机以 1 500 r/min 离心 20 min,弃上清血浆,加入 2 mL 淋巴细胞分离液,1 500 r/min 离心 20 min,吸取中间层的单核细胞,1 500 r/min 离心 5 min,去上清后加入 0.3 mL RNA Later, -80 °C 保存用以抽提 RNA。

1.2 试剂、基因芯片及主要设备

TRIzol 试剂盒、RNeasy Mini Kit(Qiagen 公司,德国)、T7-(dT)₂₄ 引物、dNTP (Promega 公司,美国)、SuperScript 逆转录酶 (Invitrogen 公司,美国)、DNAligase、DNA 多聚酶、RNA 酶 H (Invitrogen 公司,美国);MEGAscript T7 In Vitro transcription Kit (Ambion 公司,美国);Human Genome U133A array (Affymetrix 公司,美国);GeneChip hybridization Oven 640(Affymetrix 公司,美国)、GeneChip Fluidics Station 400(Affymetrix 公司,美国)、GeneArray Scanner(Affymetrix 公司,美国)、Microarray Suite Version 5.0 分析软件(Affymetrix 公司,美国)等。

1.3 基因芯片的方法^[4,5]

Human Genome U133A array 芯片包含人类基因组中的 22 215 个已知或未知基因和 EST 片段。按 TRIzol 试剂盒说明从 PBMC 样本中抽提总 RNA, RNeasy Mini Kit 纯化, 1%DEPC 水溶解后在紫外分光光度仪下测定 RNA 的浓度和纯度,同时凝胶电泳检测 RNA 有无降解。按 SuperScript 试剂盒操作说明反转录成 cDNA, 并以 Affymetrix 公司的 RNA Transcript Labeling Kit 进行体外转录合

成 cRNA 探针及生物素标记。

合成后的 cRNA 探针经片段化处理加入基因芯片内,置入杂交炉 640 中 45 °C 杂交 16 h,然后在基因芯片流程工作站 400 中洗脱、染色。为了确保芯片检测结果的可靠性,片段化后的 cRNA 探针先与一张检测芯片(test chip)进行杂交,经 GeneArray Scanner 扫描和数据分析,确认所用 cRNA 探针质量可靠后再与 Human Genome U133A real chip 杂交。

1.4 基因芯片检测数据的处理

GeneArray Scanner 扫描杂交后的芯片,存为 *.DAT 图片文件,并经标准化存为 *.CEL 图片文件。Microarray Suite Version 5.0 软件进行杂交结果分析,将检测报告生成 *.CHP 报告文件,并将基因检测结果转换成 *.xls 文件。动脉瘤组基因表达谱与正常对照组进行比较,生产散点图和差异表达基因的 *.xls 文件,最后将 *.xls 文件中的基因探针号登陆 Affymetrix 网站(www.affymetrix.com)进行批处理查询(Batch Query),得出探针相对应的基因及相关信息。

1.5 荧光定量 RT-PCR

随机选取 3 个差异表达的基因,即 CDKN1C、MND4、MAPK14,以 β -actin 作为内参照,根据 Genebank 序列号获取全长 cDNA 序列,由上海生工生物技术有限公司合成,行荧光定量 RT-PCR 检测上述 3 个基因的表达情况,验证芯片结果的准确性。引物序列如下:CDKN1C: 5'-ACG GCT CAG GAA CCA TTT TA-3', 3'-act gaa cct gac cgt aca CTG CCA TAC ATG CCC ATC TA-5'; MAPK14: 5'-TGC CGA GCC AGT CCA AAA-3', 3'-act gaa cct gac cgt aca CCA AAT TCT CCG AGG TCT AAA-5'; MND4: 5'-TCC ACT CCC CAC TAC ATC CA-3', 3'-act gaa cct gac cgt aca GTC AAC TTT ACA AGC AAG CAT CT-5'; 探针为含 act gaa cct gac cgt aca(Z 序列)的 Amplifluor 引物特异性荧光标记探针(Intergen 公司)。

采用 Rotor Gene 3000 型荧光定量 PCR 仪(Corbett 公司)进行定量检测,总反应体系中,含逆转录产物 cDNA 3 μ L, 10 \times buffer 3 μ L, Hotstar Taq 酶(3 U/ μ L) 0.3 μ L, dNTPs 3 μ L, 含 Z 序列引物 3 μ L, 不含 Z 序列引物 1.5 μ L, Uniprimer 3 μ L, DH₂O 11.4 μ L。反应条件:95 °C 15 min 预变性,95 °C 20 s, 54 °C 30 s, 72 °C 30 s 共 55 次循环。

产物用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。梯度稀释后制作标准定量曲线, 计算机 Rotor Gene 6.0 分析软件自动地计算出最适合的标准曲线方程式, 并根据域值算出各样品 Ct 值与拷贝数。将各个样品中目的基因拷贝数与 β -actin 拷贝数比较, 得到校正值。各个样品的校正值与对照组样品比较得到实验结果。

2 结果

2.1 外周血 RNA 的浓度和纯度

采用 TRIzol 试剂盒从颅内动脉瘤患者和健康志愿者 PBMC 样本中抽提的总 RNA A_{260}/A_{280} 比值均在 1.9-2.1 之间, 电泳显示 28S 和 18S 两条清晰的条带(图 1), 后带荧光亮度大约是前带的 2 倍且无明显的拖尾现象, 两者比值约为 2:1, 证实提取的 RNA 无降解、完整性佳, 可用于下一步的基因芯片检测。

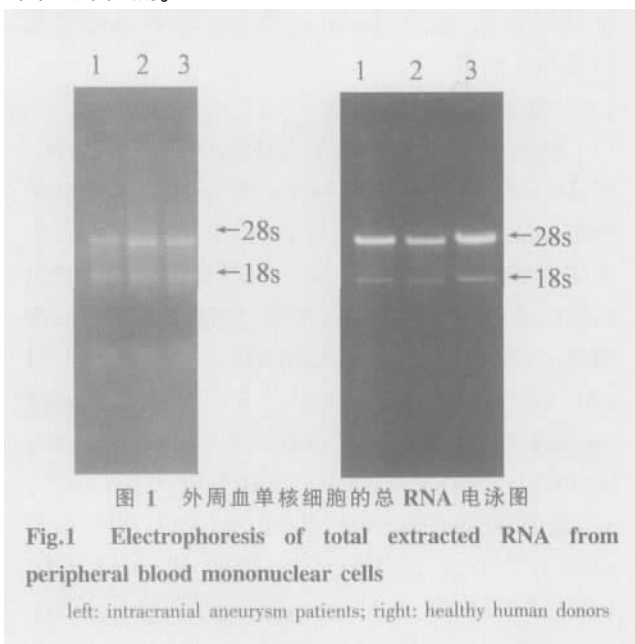


图 1 外周血单核细胞的总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis of total extracted RNA from peripheral blood mononuclear cells

left: intracranial aneurysm patients; right: healthy human donors

2.2 检测芯片的质量情况

颅内动脉瘤患者外周血和健康志愿者外周血中的 cRNA 与检测芯片(testchip)杂交后的扫描图检测报告表明, 杂交芯片的背景值(background)、噪音值(Noise)均匀, 管家基因对照(Housekeeping controls)中的 β -actin 和 GAPDH 的 3 端和 5 端的信号比值均低于 3.0 的标准; 外加的阳性对照信号值逐渐升高。这些情况说明, 基因芯片和样品 RNA 的质量良好, 杂交反应体系正常, 芯片检测的

结果可靠, 可依此进入 U133A 杂交检测流程。

2.3 芯片检测结果分析

Affymetrix 公司寡核苷酸芯片已得到国际权威学术界的公认, 在所检测的总共 22 215 个基因中, 与正常对照组相比 5 组颅内动脉瘤 PBMC 中同时差异表达的基因有 325 个, 约占 1.46%。差异表达水平均达 2 倍以上的基因有 35 个, 7 个基因与信号传导有关, 其中高表达的基因有 FPRL1、FRAT2、KCNJ15、MAPK14 和 MS4A4A, 明显低表达的基因有 DUSP8 和 RANBP2L1。另外也有多个基因呈下调状态, 如 ARHGAP4、ARHGAP8、GPR56、MAP4K1、PRKCH、RANBP9、RAP2C、RASGRP2、STAT4、CENTG2、DUSP5 和 EVL(表 1)。

表 1 颅内动脉瘤患者外周血单核细胞中差异表达水平达 2 倍以上的基因信息

Table 1 Genes up-regulated and down-regulated more than 2-fold in peripheral blood mononuclear cells from 50 patients of intracranial aneurysms compared with healthy human

Probe Set ID	Accession No.	Gene Title	Symbol
1.206374_at	NM_004420	dual specificity phosphatase 8	DUSP8
2.211324_s_at	AL136868	RAN binding protein 2-like 1	RANBP2L1
3.210772_at	M88107	formyl peptide receptor-like 1	FPRL1
4.209864_at	AB045118	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 2	FRAT2
5.210119_at	U73191	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	KCNJ15
6.211087_x_at	Z25432	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14
7.219607_s_at	NM_024021	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	MS4A4A

1,2: down-regulated genes; 3-7: up-regulated genes

2.4 荧光定量 RT-PCR 结果

荧光定量 RT-PCR 发现动脉瘤与正常对照组 PBMC 中, CDKN1C、MAPK14、MND A 3 个基因原始数据平均值根据看家基因 β -actin 校正起始量后计算相对于样本 A 的相对值, CDKN1C 与 β -actin 比值小于 1, MAPK14 与 β -ACTIN、MND A 与 β -actin 比值大于 1, 显示 3 个基因的变化倍数与基因芯片检测结果不完全相同, 但变化方向一致, 证明基因芯片结果是准确可靠的。

3 讨论

3.1 基因芯片技术在脑血管疾病研究中的应用

近年国外学者^[6]采用基因芯片技术探讨神经系统疾病血液白细胞的基因表达谱, 发现在鼠缺血性中风、出血性中风和癫痫动物模型同正常鼠相比, 血液白细胞中有许多差异表达的上调或下调基因, 认为不同疾病情况下血液基因组表达模式有差别。表明血液基因表达谱在脑血管病的诊断、机制研究和疗效判定中可能具有潜在的应用价值。我们以往通过基因芯片技术在颅内动脉瘤组织的基因表达谱研究中发现细胞外基质、信号传导分别是重要发病机制^[9], 故本研究拟从血液单核细胞 RNA 入手判断颅内动脉瘤的基因表达谱中是否存在与信号传导相关基因群的明显差异表达。

3.2 G 蛋白信号传导通路和颅内动脉瘤的关系

G 蛋白信号传导通路是一条重要的信号传导通路, 主要通过改变细胞内第二信使的浓度来影响血管平滑肌细胞生物学行为。G 蛋白对维持血管壁的完整性以及调节血管张力起着极为重要的作用。研究表明 G 蛋白含量异常及功能紊乱, 可能与高血压、动脉粥样硬化、冠心病和经皮冠脉腔内血管成形术后再狭窄等有极为重要的关系^[7]。类甲基胺受体 1(FPRL1) 是一种 G 蛋白耦联受体, 有研究表明其在炎性关节炎的滑膜组织中高表达^[8]。FPRL1 参与单核巨噬细胞的聚集和激活, 与 Alzheimer s 病也存在一定关系^[9]。本研究发现 FPRL1 在颅内动脉瘤血液 PBMC 中明显高表达, 而另一个 G 蛋白耦联受体 - GPR56 在颅内动脉瘤血液 PBMC 中低表达。Ras 蛋白、Rab 蛋白和 Rho 蛋白均作为小分子 G 蛋白参与细胞信号传导, ARHGAP4、ARHGAP8 为 Rho 蛋白, RANBP2L1、RANBP9、RAP2C 和 RASGRP2 为 Ras 蛋白, 它们在颅内动脉瘤血液 PBMC 均低表达。多种与 G 蛋白信号传导通路相关的基因在颅内动脉瘤血液 PBMC 中差异表达, 提示 G 蛋白信号传导通路可能是颅内动脉瘤的一种重要发病机制。

3.3 MAPK 信号通路和颅内动脉瘤的关系

MAPK 介导的信号转导途径是细胞内多种细胞增殖信息传递的共同通路, 可能是生长因子、细胞因子促增殖的一条主要途径。MAPK 主要由 3 个成员组成, 即细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)、应激活化蛋白激酶 (JNK) 和蛋白激酶 p38。JNK 和 p38MAPK 主要介导应激反应, 而 ERKs 主要介导生长因子和细胞因子所引起的细胞增殖反应, 其

中 ERK1 和 ERK2 是最重要的 MAPK 家族成员, 是 MAPK 传导通路中的重要枢纽, 是细胞因子、生长因子介导细胞增殖效应中最重要的途径。本研究发现在颅内动脉瘤血液 PBMC 中 MAPK14 明显高表达。而 Absi 等^[10]的主动脉瘤基因表达谱研究发现 MAPK9 在胸主动脉瘤和腹主动脉瘤中均高表达, 故我们预测 MAPK 信号通路可能与颅内动脉瘤有一定关系。

DUSP8 和 DUSP5 是双重特异性磷酸酶 (dual specificity phosphatase, DUSP) 超家族的两个成员。DUSP 对 MAPK 家族的成员 (MAPK/ERK、MAPK/JNK 和 p38) 进行负性调节作用, 该家族的不同成员对 MAPK 家族的不同成员表现各自的底物特异性。DUSP8 对 MAPK/JNK 和 p38 起灭活作用, 而 DUSP5 灭活 ERK1 的活性^[11]。本研究发现在颅内动脉瘤血液 PBMC 中 DUSP8 明显低表达, 且 DUSP5 也呈低表达, 表明 DUSP 家族可能与颅内动脉瘤的形成有一定关系。

此外颅内动脉瘤血液 PBMC 中参与 Wnt 信号通路的 FRAT2、钾离子通道膜蛋白 KCNJ15、蛋白激酶 C 成员 PRKCH、信号传导与转录激活因子 STAT4, 存在不同程度的差异表达。

参考文献:

- [1] LIU E T, KARUTURI K R. Microarrays and clinical investigations[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(16):1595-1597.
- [2] TUNG W S, LEE J K, THOMPSON R W. Simultaneous analysis of 1176 gene products in normal human aorta and abdominal aortic aneurysms using a membrane-based complementary DNA expression array[J]. *J Vasc Surg*, 2001, 34(1): 143- 150.
- [3] 李明昌, 石忠松, 夏之柏, 等. 国人颅内动脉瘤基因表达谱的初步研究 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2005, 28(1):16
- [4] 李明昌, 石忠松, 夏之柏, 等. 正常颅内动脉瘤基因表达谱的建立及临床意义 [J]. *中华显微外科杂志*, 2004, 27(2): 132- 133.
- [5] 李明昌, 石忠松, 夏之柏, 等. 颅内动脉瘤细胞外基质相关基因表达谱的基因芯片研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(7): 855- 857.
- [6] TANG Y, LU A G, ARONOW B J, et al. Blood genomic responses differ after stroke, seizures, hypoglycemia, and hypoxia: blood genomic fingerprints

(下转第 74 页 to page 74)

- cryopreservation in 1,2-propanediol [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14 (8):2061-2068.
- [6] SALEHNIYA M, ABBASIAN MOGHADAM E, REZAZADEH VELOJERDI M. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue[J]. *Fertil Steril*, 2002, 78 (3):644-645.
- [7] OKTAY K, NUGENT D, NEWTON H, et al. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue[J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(3):481-486.
- [8] ISACHENKO E, ISACHENKO V, RAHIMI G, et al. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 108(2):186-193.
- (编辑 张恩健)

(上接第 65 页 from page 65)

- [7] MOSAAD Y M, METWALLY S S, AUF F A, et al. Proinflammatory cytokines (IL-12 and IL-18) in immune rheumatic diseases: relation with disease activity and autoantibodies production[J]. *Egypt J Immunol*, 2003, 10 (2): 19-26.
- [8] CALVANI N, RICHARDS H B, TUCCI M, et al. Up-regulation of IL-18 and predominance of a Th1 immune response is a hallmark of lupus nephritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 138(1): 171-178.
- [9] WONG C K, HO C Y, LI E K, et al. Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 130(2): 345-351.
- [10] CALVANI N, TUCCI M, RICHARDS H B, et al. Th1 cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis: The role of IL-18 [J]. *Autoimmun Rev*, 2005, 4(8): 542-548.
- [11] BOSSU P, NEUMANN D, DEL GIUDICE E, et al. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(24): 14181-14186.
- (编辑 刘清海)

(上接第 69 页 from page 69)

- of disease[J]. *Ann Neurol*, 2001, 50(6): 699-707.
- [7] LI J, ADAMS L D, WANG X, et al. Regulator of G protein signaling 5 marks peripheral arterial smooth muscle cells and is downregulated in atherosclerotic plaque[J]. *J Vasc Surg*, 2004, 40(3):519-528.
- [8] OHARA R, MURPHY E P, WHITEHEAD A S, et al. Local expression of the serum amyloid A and formyl peptide receptor-like 1 genes in synovial tissue is associated with matrix metalloproteinase production in patients with inflammatory arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(6):1788-1799.
- [9] CUI Y, LE Y, YAZAWA H, et al. Potential role of the formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) in inflammatory aspects of Alzheimer's disease [J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(4): 628-635.
- [10] ABS T S, SUNDT T M 3rd, TUNG W S, et al. Altered patterns of gene expression distinguishing ascending aortic aneurysms from abdominal aortic aneurysms: complementary DNA expression profiling in the molecular characterization of aortic disease[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126(2):344-357.
- [11] UEDA K, ARAKAWA H, NAKAMURA Y. Dual-specificity phosphatase 5 (DUSP5) as a direct transcriptional target of tumor suppressor p53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22 (36):5586-5591.
- (编辑 刘清海)