

不同区域晶状体上皮细胞基因表达差异分析

马璇, 吴明星, 张艳莉, 黄强, 吴开力

(中山大学 中山眼科中心//眼科学教育部重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】比较不同区域猪晶状体上皮细胞的基因表达在转录组水平上的差异。【方法】解剖显微镜下分离晶状体前囊膜, 将附着于其上的上皮细胞分为中央(直径为 10.56 mm)和周边两部分。分别提取两个样本的总 RNAs 并经 PCR 扩增, 以 Cy3 和 Cy5 分别标记扩增的中央与周边部分的 cDNA, 与含 7548 个基因的表达谱芯片杂交, 经图像分析, 生物信息学处理获得基因表达在转录水平差异的相关信息。【结果】中央与周边区域的猪晶状体上皮细胞在转录组水平共鉴定出 952 个有效表达的基因点, 其中差异表达基因 261 个, 以中央区域为参照, 周边上皮细胞 mRNA 上调 137 个, 下调 124 个。差异表达基因主要涉及的功能有: 细胞周期与凋亡、细胞骨架蛋白及细胞外基质、转录、细胞信号分子等。【结论】中央与周边区域猪晶状体上皮细胞基因表达在转录组水平上差异明显。这类差异呈明显的功能聚类。

关键词: 基因组学; 基因芯片; 晶状体上皮细胞

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0553-04

Different Gene Expression Between Central and Peripheral Epithelial Cells in Porcine Lens

MA Xuan, WU Ming-xing, ZHANG Yan-li, HUANG Qiang, WU Kai-li

(Zhongshan Ophthalmic Center // Key Laboratory of Ophthalmology of Ministry of Education,
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To compare the gene expression between the central and the peripheral epithelial cells in the porcine lens. 【Methods】 The anterior sub-capsular epithelial cells adherent to the porcine lens capsule were dissected into the central (6 mm, diameter) and the peripheral regions. Total RNAs were extracted from epithelia of both parts and amplified by PCR. The products were incorporated with fluorescent markers to prepare the hybridization probes. The mixed probes were hybridized to a microarray containing 7548 ESTs. After high stringent washing, the chip was scanned for the fluorescent signals and the differences between two tissues were analyzed by software (Imagequant 5.0; Array Vision 6.0). 【Results】 Totally 952 transcripts with efficient hybridization were found on the gene microarray. The ratio of fluorescent intensities between two samples displayed obvious alteration in 261 genes, including 137 up-regulated and 124 down-regulated in peripheral area as compared with central parts. According to the functional classification, the genes differently expressed mainly include signal transduction, cell cycle, apoptosis, transcription factor, extracellular matrix and cytoskeleton. 【Conclusion】 There were different genome activities during lens epithelial differentiation from central area to periphery. The results of regional alteration of gene expression provide clues for further study.

Key words: genomics; microarray; lens epithelia cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):553-556, 561]

晶状体上皮细胞是晶状体中唯一有分裂活性的细胞, 能分化出晶状体纤维细胞并产生晶状体蛋白, 同时又是晶状体与外界相隔的屏障, 在保护维护整个晶状体的透明性和内环境的稳定上起着

重要作用。从解剖学上讲, 晶状体上皮可分为前极部、中间部、赤道部。其中, 周边区域的赤道部和赤道前部为生发区(germinative zone), 其上皮细胞会不断分裂增生, 而中央区域的前极部相对为静止

收稿日期: 2005-12-10

基金项目: 广东省社会发展计划重大专项(2004A30801001); 广东省自然科学基金资助项目(031724)

作者简介: 马璇(1978-), 女, 云南昆明人, 硕士生, 现在云南省第二人民医院眼科工作; 吴开力, 教授, 通讯作者. E-mail: wukai@mail.sysu.edu.cn

区, 上皮细胞在一般生理状态下没有有丝分裂^[1,2]。既往研究表明, 无论在生理状态、白内障实验模型、以及体内白内障, 中央与周边区域的晶状体上皮细胞存在明显不同的生物学特性^[3,4]。对晶状体上皮细胞基因表达的分析有助于阐明上述不同区域差异的分子机制。基因芯片技术具有高通量、高灵敏度的特点, 近年已有将其应用到研究白内障机制和晶状体上皮细胞的分化等的研究。如应用表达谱芯片技术, 发现了白内障晶状体上皮细胞中有三个基因[filensin、钾离子内流通道(IRPC)和色素上皮衍生因子(PEPF)]明显下调^[5]; 大鼠糖性白内障的形成与氧化和 TGR- β 介导的生物过程相关^[6]。Hawse^[7]和 Ivanov^[8]等应用基因芯片分别比较了人晶状体上皮细胞和皮质纤维细胞, 以及小鼠晶状体近赤道的新纤维和成熟纤维之间的基因表达差异, 观察到多种功能类别的相关基因的表达变化。本文将基因芯片技术应用于比较猪晶状体中央区 and 周边区上皮细胞的基因表达差异, 寻找控制晶状体上皮细胞早期分化的相关基因, 为深入研究晶状体上皮细胞的生物学特性及其在白内障形成中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 取材和预处理

正常成年猪眼, 于猪屠宰后 12 h 内完成取材。解剖显微镜下分离晶状体前囊膜, 平铺于载玻片上以甲醇固定, 行常规 HE 染色。另解剖显微镜下解剖取正常猪眼 30 只, 解剖显微镜下分离晶状体前囊膜, 并用直径为 6 mm 的环钻将其分为中央和周边两部分(经测定, 平铺片上猪晶状体前囊上皮细胞附着区的直径 10.5 mm)。分别将两部分组织剪碎, 置于 RNAin 液中。

1.2 探针制备

以 TRIzol 法提取总 RNAs (Invitrogen Life Technologies 公司), 提取的 RNAs 的在琼脂糖电泳可见两组样品都有较清晰的 28S 和 18S 条带, 紫外线吸光度分析显示中央与周边 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 的比值分别为 1.87 和 1.98, 说明样本质量符合要求。将提取的 RNAs 进行 PCR 扩增和样本纯化 (RNeasy mini kit, PCR Purification kit, QIAGEN, Inc.), 并以荧光素反转录标记 cDNA 探针(RNA Transcript Labeling Kit, Amersham)。

1.3 基因芯片杂交

标记探针与基因芯片在 37 °C 孵育 16 h 进行杂交。实验使用芯片为深圳微芯生物公司生产的 CSC-GE-80 人类基因表达谱芯片, 采用玻璃基质, cDNA 直接点样, 共有 8064 个基因点。包括: 7458 个表达序列标签(EST), 长度在 500 bp 以上(平均长度为 1.4 kb); 384 个对照基因, 其中有 120 个外参照标准基因、132 个内参照标准基因以及其他阴性和阳性对照基因(内外参照标准基因样品由 Amersham Pharmacia 公司提供); 132 个管家基因(housekeeping gene); 120 个酵母基因; 其他为空白载体片段。

1.4 基因芯片检测及数据分析

芯片扫描后将图像转化为基于荧光强度的数字信号(Imagequant 5.0, Array Vision 6.0, Imaging Research, Ltd.)。通过对芯片上设置的各种参照标准基因(用于监控探针标记以及随后的芯片杂交过程)的综合评估, 芯片杂交结果符合重复性和可靠性的要求。用 MIDAS 软件(Chipscreen Biosciences, Ltd.)对图像进行分析和数据筛选, 本次芯片实验的样品来源与所用芯片类型间存在种属差异, 考虑到可能存在的实验误差和个体差异性的影响, 筛选标准为芯片中密度值(Density)在 5×10^8 以上, 同时 Ratio 大于 2 或小于 0.5 的数据点。将筛选出来的有效数据通过网络进行生物信息学分析, 以对基因进行鉴定和功能分类(参照 CLONTECH 公司的基因分类标准、<http://www.geneontology.org/GO.site.map.shtml> 和 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=gene>)。

2 结果

2.1 猪晶状体上皮细胞铺片 HE 染色观察

光镜下见上皮细胞形态规则, 分布均匀, 大小一致, 胞质染色均匀, 胞核圆形, 染色质清晰(图 1)。赤道部细胞排列紧密, 有较多有丝分裂细胞, 赤道前部细胞密度降低, 而在中央前极部细胞相对稀疏散在分布, 未见明显有丝分裂。经比较分析, 以赤道前区域的中部为间隔, 将猪晶状体上皮细胞分为中央和周边两部分(中央区的半径为 3 mm), 以利本文的下一步分析研究。

2.2 中央与周边区域晶状体上皮细胞的差异表达基因

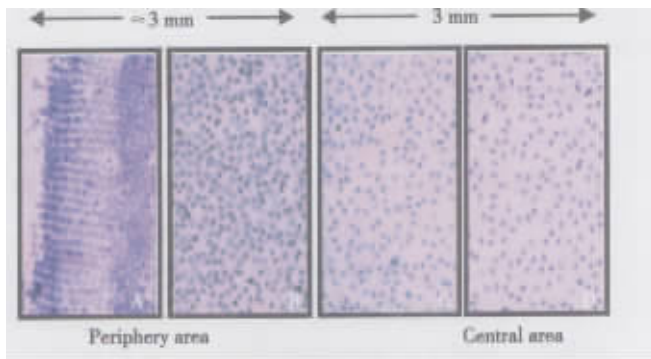


图 1 猪晶状体上皮细胞铺片 HE 染色

Fig.1 Epithelial cells of porcine lens stained with hematoxylin and eosin ($\times 200$)

A~D show cells from equator to anterior pole. There are linear arrangement of cells at the border of equator (A), where there are high density of cells as compared with that in central area (D). The lens cells are sectioned into two parts, i.e. the central part includes cells located in the center with 6 mm in diameter, the remainder cells belongs to periphery part.

杂交后芯片荧光信号强度较高, 背景比较均匀, 没有明显缺陷, 符合芯片结果分析的标准(图 2)。在杂交后的芯片上共找到并鉴定了 952 个有效表达的基因点。按照前述差异表达数据筛选标准, 筛选出中央与周边区域晶状体上皮细胞差异表达基因共有 261 个, 其中以中央组为参照, 周边组上调表达的基因有 137 个, 下调表达的基因有 124 个。

按照基因功能分类对数据进行初步分析, 在表达变化的基因中涉及各种不同的细胞功能。不同区域晶状体上皮细胞差异表达基因主要涉及转录因子(transcription factor)、细胞周期与凋亡(cell



图 2 不同区域猪晶状体上皮细胞的表达谱芯片杂交结果

Fig.2 Microarray image generated from the hybridization of total RNAs of epithelial cells in porcine lens to the cDNA microarray

The central epithelial RNA was labeled with Cy3 (green spots) and the peripheral, with Cy5 (red spots)

cycle and apoptosis)、信号转导(signal transduction)和细胞骨架及细胞外基质 (cytoskeleton and extracellular matrix)等(表 1)。

表 1 差异表达最显著的部分基因及其功能分类

Table 1 up/down-regulated transcripts characterized with function

Gene Name	Gene Tag	Ratio
Transcription		
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H ¹)	HNRPH2	35.7
myogenin (myogenic factor 4)	MYOG	22.7
member of MYST family histone acetyl transferases	MOF	9.7
zinc finger protein 144 (Mel-18)	ZNF144	4.9
SMC (mouse) homolog, X chromosome	SMCX	4.2
homeo box B3	HOXB3	3.2
ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2	UBE2V2	3.2
activating transcription factor 3	ATF3	-12.3
forkhead box F1	FOXF1	-3.7
Cell cycle and apoptosis		
inhibitor of DNA binding 1, negative helix-loop-helix protein	ID1	11.2
cyclin-dependent kinase 6	CDK6	7.6
programmed cell death 4	PDCD4	4.4
fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	FXR1	4.2
myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	4.1
death-associated protein 6	DAXX	-4.8
cyclin I	CCNI	-4.1
Signal transduction		
RAN binding protein 7	RANBP7	11.2
transducer of ERBB2, 1	TOB1	8.7
protein kinase C, beta 1	PRKCB1	6.7
spectrin SH3 domain binding protein 1	SSH3BP1	6.3
CD9 antigen (p24)	CD9	4.5
neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)	NRGN	4.9
jagged 1 (Alagille syndrome)	JAG1	4.1
cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	ARPP-19	4.3
transforming growth factor, beta 3	TGFB3	-18.3
cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	CYR61	-10.1
phospholipase A2 receptor 1, 180kD	PLA2R1	-6.8
calcitonin receptor-like	CALCRL	-5.2
Cytoskeleton and extracellular matrix		
kinesin family member 5A	KIF5A	17.2
annexin A1	ANXA1	6.9
cartilage linking protein 1	CRTL1	-10.0
matrix Gla protein	MGP	-4.2
fibromodulin	FMOD	-4.8
laminin, beta 2 (laminin S)	LAMB2	-4.9
tropomyosin 1 (alpha)	TPM1	-4.1
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	MYH9	-4.2
Others		
minichromosome maintenance deficient (mif5, S. pombe) 6	MCM6	66.7
glutamate decarboxylase 1 (brain, 67kD)	GAD1	6.8
stromal cell-derived factor 2	SDF2	5.8
HMT1 (hnRNP methyltransferase, S. cerevisiae)-like 2	HRMT1L2	5.5
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3	DNAJC3	5.1
serine proteinase inhibitor, clade H(heat shock protein 47), member 2	SERPINH2	4.9
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	ATPIA1	4.9
gp25L2 protein	HSGP25L2G	4.8
solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1	SLC23A1	4.1
CGI-81 protein	DREV1	4.1
apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)	APOB	-10.7
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	ABCA1	-10.2
plexin B3	PLXNB3	-9.2
U6 snRNA-associated Sm-like protein	LSM2	-7.6
serine/cysteine proteinase inhibitor, clade G(C1 inhibitor), member 1	SERPING1	-6.7
very low density lipoprotein receptor	VLDLR	-5.7
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	-5.2
ribopharin II	RPN2	-4.9
monoamine oxidase A	MAOA	-4.2

ratio: multiple of up- (positive) or down- (negative) regulated periphery area over central area.

3 讨 论

既往研究表明,在不同的生理病理状态下,晶状体上皮细胞为晶状体的生长、分化和损伤修复提供物质基础和代谢能量,其改变在白内障的形成发病中有重要意义。从前极部到赤道部,晶状体上皮细胞有丝分裂由相对静止逐渐过渡到活跃,并在生发区赤道部生成新的晶状体纤维,维持生理状态下的晶状体终生持续生长^[1,2];而在白内障晶状体上皮细胞的超微结构观察发现,各种损伤因子可损害晶状体上皮细胞的正常结构和功能,导致晶状体上皮细胞超微结构发生改变^[5,6],晶状体上皮细胞变性,最终导致皮质和核混浊^[9,10]。目前对于晶状体上皮细胞的区域分化特性的分子调控机制,以及不同区域的上皮细胞在白内障形成时的作用差异尚需进一步研究和探讨。

晶状体上皮细胞在赤道部分化成皮质纤维时,出现明显的细胞拉长和细胞器丢失,最终成为无细胞器的纤维细胞。在成年晶状体,大多数的有丝分裂发生在近赤道中间部,中央前极部的细胞多处于细胞周期的相对静止期(G_0 期)^[1,2]。Hawse^[7]等最近用基因芯片比较了人晶状体上皮细胞和皮质纤维细胞的基因表达差异,主要表现在 mRNA 加工、细胞增殖和黏附、蛋白质翻译和折叠、氧化磷酸化以及凋亡等相关功能的基因变化。Ivanov^[8]等比较了小鼠晶状体近赤道的新纤维和成熟纤维之间的基因表达差异,出现差异的基因主要涉及到信号转导、细胞周期、转录调控、骨架蛋白、细胞黏附、细胞基质、发育和细胞分化、代谢和转运等生物过程。相对他们的工作是关注上皮细胞分化晚期(已形成晶状体纤维)的基因表达变化来说,而本文将猪晶状体上皮细胞分为中央和周边部分,以观察在晶状体上皮细胞从静止期(中央区细胞)到分化早期(周边区细胞)所出现的基因表达差异,结果观察到二区域差异表达的基因与细胞周期与凋亡、细胞骨架蛋白及细胞外基质、转录、细胞信号分子等有关。

为了研究纤维成熟过程中的基因表达的差异,激光显微切割技术曾被用来精确选取小鼠晶状体的新纤维和成熟纤维^[8]。本实验中,通过观察猪晶状体上皮细胞从前极向赤道的形态衍变(图 1),参考对人类晶状体上皮细胞生物学特性,将猪晶状

体上皮细胞分割为直径为 6 mm 中央区 and 周边区(剩余外围区域)二部分,中央区细胞应不含分裂细胞,以其作为对照,与含有分裂和分化状态的周边细胞的比较,更能检测到与晶状体上皮细胞分化相关的基因。我们完成一次芯片检测用了 30 只猪眼,若要取相同数量的年龄匹配的人眼进行分析,则很难实现。故本实验进行的是采用跨种属的杂交,即将来源于猪的生物样品与人的基因表达谱芯片杂交。从哺乳动物的基因同源性较高的角度讲,以人的芯片检测猪的基因是可行的。Moody^[11]等将人和猪的骨骼肌 RNA 分别与人的 cDNA 芯片杂交,并重复了三次实验,统计学检验得出两种杂交的 Pearson 和 Spearman 相关系数均为 0.96 到 0.97, Kappa 值为 0.80 到 0.86,说明这种跨种属检测可以得到一致性好、重复性高的结果。本实验的跨种属杂交最后在芯片结果中找到并鉴定了 952 个有效表达的基因点,亦说明了实验的可行性。另外,虽然现在已有猪的芯片面世,但总的来讲,猪的芯片由于使用频率不高,在制作上仍欠佳。同时,在本实验中,进行一次芯片检测至少需要 30 只猪眼,人眼晶状体前囊膜面积更小,若检测人眼的生物样本,为获得足够的样本量,需要一次性获得更多的人眼,而这在现实中是很难实现的。

基因表达谱芯片可同时对大量基因,甚至整个基因组的表达差异进行对比分析,自动、快速的直接测到 mRNA 的种类及丰度,对寻找较低丰度的转录产物,最大限度地收集转录组信息很有帮助。这也使之成为从总体上全面研究基因表达、构建基因表达图谱、甚至在此基础上发现新基因的首选策略。本实验正是充分利用其高通量、高灵敏度的优点,对比了不同区域的上皮细胞在核酸水平上的差异,发现数百个差异表达基因,并发现差异表达基因有一定的功能趋向性,提示中央与周边区域的上皮细胞形态、功能的不同可能主要与这几类基因相关。进一步的工作尚需在此基础上,对这几百个基因进行筛选,确认与晶状体生理病理状态密切相关的重要目的基因,进一步在多样本中研究目的基因的差异表达、晶状体上皮细胞内定位、疾病与正常组织差异表达等。

参考文献:

- [1] 李风鸣. 中华眼科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, (下转第 561 页 to page 561)

方法证实了冷冻温度、原料浓度和配比影响着制成材料的孔径,为下一步测定不同支架材料的理化性质和对细胞因子释放的影响,以便为研制较为理想的不同要求的壳聚糖-型胶原复合支架提供更详尽资料。

参考文献:

- [1] RAO S B, SHARMA C P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential[J]. *J Biomed Mater Res*, 1997, 34(1): 21- 28.
- [2] WAHL D A, CZERNUSZKA J T. Collagen - hydroxyapatite composites for hard tissue repair[J]. *Eur Cell Mater*, 2006, 28(11): 43- 56.
- [3] LEE J Y, KIM K H, SHIN S Y, et al. Enhanced bone formation by transforming growth factor- beta1- releasing collagen/chitosan microgranules[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 76(3): 530- 539.
- [4] ZHANG Y, CHENG X, WANG J, et al. Novel chitosan/ collagen scaffold containing transforming growth factor- beta1 DNA for periodontal tissue engineering [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(1): 362- 369.

- [5] ZHANG R, MA P X. Poly (alpha- hydroxyl acids)/ hydroxyapatite porous composites for bone -tissue engineering I preparation and morphology[J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44 (4): 446- 455.
- [6] 曾春,蔡道章,全大萍,等. TGF- 1 壳聚糖缓释微球的制备和体外检测[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(3): 347- 350.
- [7] 冉炜,郭冰,李轶,等. 可降解骨组织工程支架材料修复兔下颌骨缺损的实验研究 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(3S): 18- 20.
- [8] BRAYE F, HAUTIER A, BOUEZ C, et al. Skin substitutes reconstructed in the laboratory: application in burn treatment[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2005, 53(10): 613- 617.
- [9] SHIN S Y, PARK H N, KIM K H, et al. Biological evaluation of chitosan nanofiber membrane for guided bone regeneration [J]. *J Periodontol*, 2005, 76 (10): 1778- 1784.
- [10] ZKINIC G, SENEL S, AKINCIBAY H, et al. Effect of chitosan on a periodontal pathogen porphyromonas gingivalis[J]. *Int J Pharm*, 2002, 235(1- 2): 121- 127.

(编辑 刘清海)

(上接第 556 页 from page 556)

2005:121- 123.

- [2] KARINE A K, JACOB T J, THOMPSON G M. The human anterior lens capsule: cell density, morphology and mitotic index in normal and cataractous lenses [J]. *Exp Eye Res*, 1987, 45(6):865- 874.
- [3] REDDAN J R. GIBLIN F J, DZIEDZIC D C, et al. Hydrogen peroxide affects specific epithelia sub populations in cultured rabbit lenses [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995,36(2):289- 299.
- [4] WU K, KOJIMA M, SHUI Y B, et al. Ultraviolet B- induced corneal and lens damage in guinea pigs on low- ascorbic acid diet[J]. *Ophthalmic Res*, 2004,36(5): 277- 283.
- [5] SEGEV F, MOR O, SEGEV A, et al. Downregulation of gene expression in the ageing lens: a possible contributory factor in senile cataract[J]. *Eye*, 2005,19 (1):80- 85.
- [6] KUBO E, SINGH DP, AKAGI Y. Gene expression profiling of diabetic and galactosaemic cataractous rat lens by microarray analysis[J]. *Diabetologia*, 2005,48

(4):790- 798.

- [7] HAWSE J R, DEAMICIS- TRESS C, COWELL T, et al. Identification of global gene expression differences between human lens epithelial and cortical fiber cells reveals specific genes and their associated pathways important for specialized lens cell functions[J]. *Mol Vis*, 2005,11:274- 83.
- [8] IVANOV D, DVORIANCHIKOVA G, PESTOVA A, et al. Microarray analysis of fiber cell maturation in the lens[J]. *FEBS Lett*, 2005,579(5):1213- 1229.
- [9] VRENSSEN G, KAPPHOF J, WILLEKENS B, et al. Morphology of the aging human lens [J].*Lens Eye Toxic Res*,1990,7(1):1- 30.
- [10] COSTELLO M J, OLIVER T N, COBO L M, et al. Cellular architecture in age -related human nuclear cataract [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992,33(11): 3209- 3227.
- [11] MOODY DE, ZOU Z, MCINTYRE L. Cross- species hybridisation of pig RNA to human nylon microarrays [J]. *BMC Genomics* 2002, 3(1):27- 30.

(编辑 刘清海)