

证的研究

基因表达谱芯片与中医寒证的7类相关基因

王米渠¹ 冯 初¹ 严石林¹ 王 刚² 李 琰² 吴 斌¹ 丁维俊¹ 林 乔³ 刘绍唐¹ 张义正² 许锦文⁴

摘要 目的:用基因芯片的前沿方法筛选寒证服用热药有疗效者的基因表达谱,探索寒证所涉及的相关基因类别。方法:精选典型寒证病例,对其治疗有明显疗效者,在治疗前后分别采外周血,提取血液中的 mRNA,再逆转录为 cDNA 以备检测。采用 2 035 条人的靶基因 cDNA 制备成基因表达谱芯片。用 Cy3 和 Cy5 两种荧光物质分别标记治疗前与治疗后 cDNA,用其制备成探针与表达谱芯片进行杂交,通过计算机扫描后获得分子生物学信息,并进行数据分析。结果:初步筛选出了差异表达基因 59 条,涉及到与能量代谢、糖代谢、脂类代谢、蛋白质代谢、核酸代谢、免疫和内分泌等 7 类基因,并举例说明。结论:以疗效为科研起点,可将基因芯片切入寒证的整体辨证研究。

主题词 寒证/遗传学 寡核苷酸排列序列分析

基因芯片是当今生命科技最先进的方法,它可将成千上万个靶基因或寡核苷酸片段高密度地排列在玻璃等载体上,然后与标记了的待检样品进行杂交,通过芯片进行扫描^[1],同时高通量平行地检测成千上万基因表达谱。我们引入基因芯片的方法^[2],对典型寒证,而且用热药有明显疗效者,尝试用基因芯片,筛选出 59 条差异表达基因表达谱,涉及到 7 类基因,试作如下初步报道。

1 临床资料

在成都附近的山区,先由当地医生推荐 15 例寒证病人,然后由中医诊断学教授逐一辨证论治,选择积分最高的 5 例为典型寒证病例作观察对象。病例选择参考国家寒证相关诊断标准和相关文献制定:恶风、恶寒、畏寒、喜暖、形寒、肢冷、背冷、倦卧、面色淡白、脉迟等 44 个症状为寒证诊断因子,每一因子以无、轻、中、重分别评分^[3]。患者男 1 例,女 4 例,年龄 30~62 岁,属寒痹 2 例,脾胃虚寒 3 例。由中医诊断学教授分别辨证处方,均以附子为君药,用汤剂治疗 4 周,同样以 44

个因子评分,其平均积分减少约 1/2(具体过程与数据省略)。对此 5 例治疗前后分别采用外周血 10ml,提取 mRNA,并将治疗前后 5 例患者的 mRNA 分别混合,作基因芯片检测。

2 方法

2.1 探针与芯片的制备:探针制备用 Piotr Chomczynski 一步法抽提总 RNA^[4]。用 Oligotex mRNA Midi Kit(Quagen 公司)纯化 mRNA。用 Cy3-dUTP 标记治疗前患者血液 mRNA,用 Cy5-dUTP 标记治疗后患者血液 mRNA。乙醇沉淀后溶解在 20μl 5×SSC 加 0.2%SDS 杂交液中。芯片所用的 2 305 个靶基因 cDNA 克隆由博星基因芯片有限公司提供,用通用引物进行 PCR 扩增,PCR 产物长度为 1 000~3 000bp(少数例外),PCR 反应及产物纯化用标准方法进行^[5],通过琼脂糖电泳监控 PCR 质量。靶基因以 0.5g/L 溶解于 3×SSC 溶液中,用 Cartesian 公司的 Cartesian7 500 点样仪及 Telechem 公司的硅烷化玻片进行点样。点样后玻片进水合(2h)、室温干燥(0.5h)、UV 交连(能量值设定 65mj/cm),再分别用 0.2%SDS、水及 0.2%硼氢化钠溶液处理 10min,晾干备用。

2.2 基因芯片的杂交和检测:将基因芯片和杂交探针分别于 95℃水浴中变性 5min,将探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于 60℃杂交 15~17h。然后揭开盖玻片,分别用 2×SSC+0.2%SDS、0.1%SSC+0.2%SDS、0.1%SSC 洗涤 10min,室温干燥。用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 扫描芯片,用 ImageGene3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。

3 结果

根据总数为 n 的内参基因(select 值=1 或 cy3、cy5 值两者皆大于 200,或其一大于 800)的 Cy5/Cy3 的自然对数值 $\ln Ri = \ln Cy5/Cy3$,以 Ri 值在 0.1~10 之间的内参基因作为均一化依据,算出这些基因 Cy5/Cy3 自然对数平均值 $\ln(R')$,即均一化(Normalization)系数。将所有数据项的 Cy3 标记强度乘以 Normalize 系数,得出调整后的 Cy3*。算出所有基因调整后的 Ratio 值(Cy5/Cy3*)。筛选出 Ratio 大

基金项目:国家自然科学基金项目(30171126)

1 成都中医药大学中医遗传学研究室,成都市十二桥街 37 号(610075)

2 四川大学生命科学院四川分子生物技术重点实验室

3 成都市第二农科所遗传育种研究室

4 新加坡国立癌症中心细胞与分子生物研究所

收稿日期:2002-08-20

附表 表达差异最显著的前 20 条基因

表达下调的前 10 条基因		表达下调的前 10 条基因	
Genbank ID	Ratio 值	Genbank ID	Ratio 值
X03557. 干扰素诱导 56Kda 蛋白	0.079	176790. 甲状腺激素结合蛋白	2.110
D28915. 丙肝微管束结合蛋白 P44	0.117	A1832029. Wj99c05×13'端	2.111
AF061738. 亮氨酸氨基多态酶	0.220	Y07596. GP18蛋白	2.112
AB014604. KIAA0704蛋白	0.290	A1110263. 从 DKFXP586G0221克隆	2.146
L42025. 细胞辅助因子 RAB 基因	0.349	D87461. KIA0271基因	2.274
NM-002600. 磷酸二酯酶 4B	0.372	176390. 特异性孕酮蛋白 β-1 糖蛋白	2.332
X62534. 高迁移率蛋白-2	0.373	NM-002848. 酪氨酸磷酸酶受体型 O	2.345
J03077. 葡萄糖苷酶(括括因子)	0.387	AL035071. 从 20q11.1-11.23 克隆 1085F17 DNA 序列	2.389
M59465. 肿瘤坏死因子 α 诱导 A20 蛋白	0.389	X17098. 特异性孕酮蛋白 10	2.467
L38951. 诱导蛋白 β 亚基	0.396	X72308 单核细胞向化(骨髓)蛋白-3	7.662

于 2 或小于 0.5 的数据共 59 项,见附表。

凡 Ratio 值在 0.5 以下者,为因治疗而明显下调的基因,在形成寒证时则为高表达基因;Ratio 值在 2.0 以上者,为因治疗而明显上调的基因,在形成寒证时则为低表达基因。有差异表达基因占芯片基因总数的 2.9%,经热药治疗后,表达下调的基因是 43 条,表达上调的基因是 16 条,其中 51 条能在 OMIM 登陆。本文初步分析它涉及 7 类功能基因。

3.1 与能量代谢相关的基因:与能量代谢相关的 5 条基因都为表达下调,如 Genbank ID 为 NM-004888(泡细胞 H⁺ ATP 酶亚基),它的功能主要是运输 ATP 酶,可理解为寒证服了姜附等温热药后能量代谢增高,患者畏寒、喜暖等症状缓解,其高表达的基因即下调,而呈现为热药疗寒的作用。

3.2 与糖代谢有关的基因:与糖代谢有关的 2 条基因也表现为下调,如 L29008L(艾杜糖醇脱氢酶糖醇还原酶)。在 NAD 存在下,催化 L-或 D-艾杜糖醇氧化成 L-或 D-山梨醇,作用于葡萄糖醇生成果糖,也可作用于其他关系密切的糖醇类。

3.3 与脂及酯类代谢相关的基因:该组基因 2 条均下调,如 NM-002600(磷酸二酯酶 4B)是催化寡核苷酸及多核苷酸中双重酯化的磷酸分子进行水解的酶类。

3.4 与核酸代谢相关的基因:与核酸代谢相关的基因 10 条。核酸在生命活动中起着极其重要的作用,贮存和调控生物的遗传性信息,直接影响生物体的生物学含义,是分子水平生命活动的基础。在本实验中同核酸代谢相关的基因以下调为主,上调为辅。如 AF069668(戊二醛素),它与谷胱甘肽配合在由核苷酸形成脱氧核苷酸过程中起作用。

3.5 与蛋白质代谢有关的 16 条基因:除少数上调外,其余都表达下调,如下调基因 L11284(细胞外信号调节性激酶激活因子)是受细胞外信号调节的蛋白激酶,

具有丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶活性以及在酪氨酸残基上催化自身磷酸化的活性。

3.6 与免疫机制有关的 15 条基因:其中大部分为表达下调,少数为表达上调。如 M59465(肿瘤坏死因子 α 诱导的蛋白),它通过影响内皮细胞功能,如促进或诱导与白细胞的作用,参与体内外肿瘤细胞的杀伤,能使肿瘤产生缺血性坏死,并且有的可完全退化。

3.7 与内分泌代谢有关的基因:与内分泌代谢有关的基因 1 条,176790(甲状腺结合蛋白),是调节冷热反应的促进剂,具有促进能量代谢的功能。其在寒证时为高表达基因,治疗后表达下降。可理解为寒证患者服温热药以后,提高了患者对寒冷环境的适应能力。

4 讨论

分子生物学是当今科学的带头学科,基因芯片技术又是分子生物学领域最先进的技术。它高密度地显微排阵,大批量的基因筛选和巨大的功能信息处理能力,为中医寒证的研究提供了一个强有力的武器。从本实验可见,我们用 2 035 条基因高通量地平行监测,得到 59 条差异表达基因,涉及到 7 类以上与寒证有关系的基因,显然充分利用基因芯片的微观整体优势。

参考文献

- Welsh JB, Zarrinkar PP, Sapinoso LM, et al. Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3):1176-1181.
- 王米渠,张敬远,丁维俊,等.寒证基因芯片数据库纵横分合的聚类分析. *中国中医基础医学杂志*, 2002, (7):31.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1):156-159.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 1999, 286(5439):531-537.
- 王米渠,林乔,温万芬,等.冷热激蛋白与寒热相关基因研究. *国际中医*, 2002, (2):21-25.