

## 基因芯片在同型半胱氨酸诱导 动脉粥样硬化基因表达谱变化中的应用

顾菲菲, 高 炜<sup>1</sup>, 蒋 捷<sup>2</sup>, 卜定方<sup>3</sup>, 柳景华

(煤炭总医院心脏中心, 北京市 100028; 北京大学 1. 第三医院心内科, 北京市 100083;

2. 第一医院心内科, 3. 第一医院中心实验室, 北京市 100034)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化基因表达谱变化; 基因芯片; 同型半胱氨酸; 差异表达基因; 冠心病; 动脉粥样硬化

[摘要] 应用基因芯片技术研究同型半胱氨酸诱导动脉粥样硬化的基因表达谱变化。选取 3 例无冠心病传统危险因素的患者, 其中 1 例为血同型半胱氨酸正常的冠状动脉造影正常者, 1 例为血同型半胱氨酸正常的冠心病患者, 1 例为高同型半胱氨酸血症的冠心病患者。分离外周血淋巴细胞并抽提总 RNA, 逆转录制备杂交探针, 应用含有 1152 条基因的人类表达谱芯片进行差异表达谱分析。结果发现, 高同型半胱氨酸血症的冠心病患者与血同型半胱氨酸正常的冠状动脉造影正常者比较差异表达的基因 177 条(组一), 高同型半胱氨酸血症的冠心病患者与血同型半胱氨酸正常的冠心病患者比较差异表达的基因有 151 条(组三)。组一与组三基因芯片平行比较, 二者共同的差异表达基因 48 条, 其中上调基因 23 条, 下调基因 25 条。结果提示, 在差异表达的基因中, 有些是凋亡、信号转导、免疫、蛋白质合成及原癌基因等的相关基因, 这些基因可能与同型半胱氨酸致动脉粥样硬化发生有关。应用基因芯片技术研究同型半胱氨酸诱导动脉粥样硬化差异表达谱, 可能为动脉粥样硬化发病机制研究提供新的思路。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Analysis of Gene Expression Patterns in Atherosclerosis Induced by Homocysteine Using cDNA Microarray

GU Fei-Fei, GAO Wei<sup>1</sup>, JIANG Jie<sup>2</sup>, BU Ding-Fang<sup>3</sup>, and LIU Jing-Hua

(Heart Center, Coal General Hospital, Beijing 100028; 1. Department of Cardiology, Third Hospital of Beijing University, Beijing 100083; 2. Department of Cardiology, 3. Central Laboratory, First Hospital of Beijing University, Beijing 100034; China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Differentially Expressed Genes; Coronary Heart Disease; Atherosclerosis; Gene Chip; Pathogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate gene expression patterns of atherosclerosis (As) induced by homocysteine (Hcy).

**Methods** Total RNA were isolated from peripheral blood lymphocytes of 3 inpatients who had no traditional risk factors of coronary heart disease (CHD). They were one with normal coronary angiography and plasma Hcy level, one CHD patient with normal plasma Hcy level, and one CHD patient with high plasma homocysteine level. The RNAs were reversely transcribed to the cDNAs to prepare the hybridization probes. The probes were hybridized to the gene chip with 1152 genes to study gene expression patterns.

**Results** There were 177 differentially expressed genes between the CHD patient with high plasma homocysteine level and the patient with normal coronary angiography and plasma Hcy level (group 1). There were 151 differentially expressed genes between the CHD patient with high plasma homocysteine level and the CHD patient with normal plasma Hcy level (group 3). A parallel comparison between group 1 and group 3 gene chips showed that there were 48 differentially expressed genes in common, of which there were 25 down regulated and 23 up regulated genes.

**Conclusion** Among the differentially expressed genes, some are involved in the functions of apoptosis, signal transduction, immunology, translation of protein and proto-oncogene, etc. They had potential values in genesis of As induced by Hcy. The study based on gene chip in researching the differentially expressed genes of As induced by Hcy will provide new clues for finding out the pathogenesis of As.

[收稿日期] 2003-11-10 [修回日期] 2004-04-12

[基金项目] 北京市自然科学基金(7992040)资助

[作者简介] 顾菲菲, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事心血管内科及动脉粥样硬化的分子生物学研究, E-mail 为 guffdr@etang.com。高炜, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事内外科及动脉粥样硬化疾病的基础和临床研究及冠心病的介入治疗, 本文通讯作者。蒋捷, 博士研究生, 主治医师, 主要从事心血管病的基因治疗。

冠心病(coronary heart disease, CHD)是危害人类生命最严重的疾病之一, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是其主要的病理基础。研究证实, 高同型半胱氨酸血症是冠心病的一个新的独立危险因素<sup>[1]</sup>, 但其致病的分子机制还不清楚。基因芯片技术为研究心血管病发病机制及基因表达谱提供了一种多基

因检测方法。本文应用该技术研究 As 多基因表达谱,筛选出 Hcy 诱导 As 基因表达谱变化的相关基因,以更深入了解高 Hcy 诱发冠心病的分子机理。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

外周血液样本来源于 3 例已行冠状动脉造影并测定血 Hcy 的男性住院患者,其中 1 例为血 Hcy 正常的冠状动脉造影正常者,1 例为血 Hcy 正常的冠心病患者,1 例为高 Hcy 血症的冠心病患者。3 个入选者均无明确的冠心病传统危险因素,无脑血管病史、肾动脉狭窄及周围血管病,眼底检查正常。

### 1.2 主要试剂及芯片类型

dNTPs 购自大连宝生物工程有限公司, Super-Script<sup>®</sup> 逆转录酶及缓冲液购自 Gibco BRL, Cy3-dCTP、Cy5-dCTP 购自 Amersham Pharmacia 公司, TRIzol 购自 Life Technologies, 芯片类型为 BioStarH-1, 购自上海联合基因公司, 含有 1152 条基因。

### 1.3 总 RNA 抽提、测定

常温下应用淋巴细胞分离液提取新鲜外周血淋巴细胞,然后按照一步法<sup>[2]</sup>用 TRIzol 试剂分别抽提三个细胞样本的总 RNA,于 -80℃ 冰箱保存。

### 1.4 探针制备

参照 Schena 等<sup>[3]</sup>方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化,在组一芯片中, Cy3-dCTP 标记血 Hcy 正常的冠状动脉造影正常样本 RNA, Cy5-dCTP 标记高 Hcy 血症的冠心病患者样本 RNA; 在组二芯片中, Cy3-dCTP 标记血 Hcy 正常的冠状动脉造影正常样本 RNA, Cy5-dCTP 标记血 Hcy 正常的冠心病患者样本 RNA; 在组三芯片中, Cy3-dCTP 标记血 Hcy 正常的冠

心病患者样本 RNA, Cy5-dCTP 标记高 Hcy 血症的冠心病患者样本 RNA。探针经乙醇沉淀后溶解在 20  $\mu$ L 杂交液中。

### 1.5 芯片预杂交

芯片置 95℃ 水浴锅内变性 2 min, 取出后即放入无水乙醇中 30 s, 室温晾干。已变性的预杂交液加到玻片点样区域内, 加盖玻片, 杂交箱内 42℃ 水平放置 5~6 h。

### 1.6 杂交与洗涤

将探针置 95℃ 水浴中变性 2 min。将探针加在已预杂交的基因芯片上, 加玻片覆盖, 置于杂交舱中, 42℃ 杂交过夜 (16~18 h)。用洗片试剂 60℃ 洗涤 10 min, 室温晾干。

### 1.7 检测与分析

用 ScanArray 4000 (Packard 公司) 扫描芯片, QuantArray 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。判定基因差异表达的标准为 Cy3 和 Cy5 信号比值的自然对数的绝对值 > 0.69 (基因的表达变化在 2 倍以上); Cy3、Cy5 信号值两者皆大于 200 或其一大于 800; PCR 结果良好。

## 2 结果

### 2.1 基因芯片杂交信号散点图

在基因表达谱的散点图上, 每一个点代表一个基因, X 轴、Y 轴分别代表 Cy3 和 Cy5 信号强度, 大部分集中在一个几乎为 45° 的对角线周围的红点, 则代表信号差异在 0.5~2.0 倍区间, 基本属非差异表达基因; 而一些黄点分布在 45° 的对角线外, 有些远离对角线, 则代表信号差异大于 2 倍, 该点很可能属于差异表达基因 (图 1, Figure 1)。

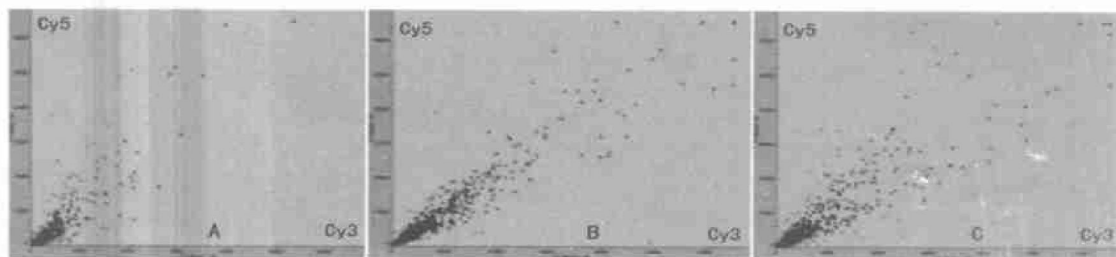


图 1. 基因表达谱的散点图 A 为组一, B 为组二, C 为组三。

Figure 1. Scattering plots of the gene expression pattern

### 2.2 基因表达谱扫描分析

组一芯片通过高 Hcy 血症的冠心病患者与血

Hcy 正常的冠状动脉造影正常者进行比较, 差异表达基因 177 条, 其中表达增高的基因 85 条, 表达降低的基因 92 条。组二芯片通过血 Hcy 正常的冠心病患者与血 Hcy 正常的冠状动脉造影正常者进行比较, 差异表达基因 43 条, 其中表达增高的基因 23 条, 表达降低的基因 20 条。组三芯片通过高 Hcy 血

症的冠心病患者与血 Hcy 正常的冠心病患者进行比较, 差异表达基因 151 条, 其中表达增高的基因 71 条, 表达降低的基因 80 条。这些差异基因按功能分成 16 大类(表 1, Table 1)。基因表达谱芯片扫描结果见图 2(Figure 2)。

表 1. 三张芯片差异表达基因功能分类

Table 1. Classification of the differentially expressed genes on the three gene chips

序号	基因功能分类	组一芯片			组二芯片			组三芯片		
		个数	上调	下调	个数	上调	下调	个数	上调	下调
1	原癌基因和抑癌基因	30	18	12	4	2	2	17	8	9
2	离子通道和运输蛋白	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	细胞周期蛋白类	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4	外压反应蛋白	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	细胞骨架和运动	4	2	2	0	0	0	1	1	0
6	细胞凋亡相关蛋白	11	5	6	1	1	0	9	7	2
7	DNA 合成和修复蛋白	2	1	1	0	0	0	2	0	2
8	DNA 结合和转录因子	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	细胞受体	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	免疫相关	44	22	22	10	6	4	38	17	21
11	细胞信号和传递蛋白	17	10	7	4	2	2	16	6	10
12	代谢	15	3	12	4	2	2	19	8	11
13	蛋白翻译合成	19	9	10	5	4	1	15	7	8
14	发育相关	0	0	0	0	0	0	1	0	1
15	其它	20	6	14	6	1	5	18	8	10
16	未分类	14	8	6	9	5	4	15	9	6
合计		177	85	92	43	23	20	151	71	80

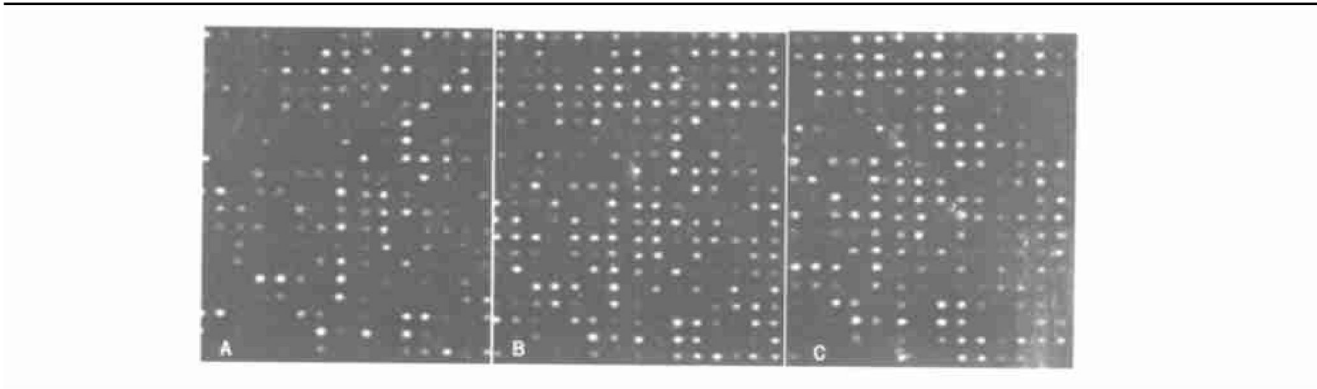


图 2. 基因表达谱芯片扫描结果 A 为组一, B 为组二, C 为组三。

Figure 2. Scanning results of the gene expression pattern

组一芯片与组三芯片平行比较显示共同的差异 2 倍以上基因 48 条, 均下调的为 25 条, 均上调的为 23 条。其中细胞凋亡相关基因 3 条; 细胞信号转导相关基因 5 条; 免疫相关基因 11 条; 5 条涉及原癌基因和抑癌基因; 细胞骨架和运动相关基因 2 条; 代谢相关基因 6 条; 蛋白质合成相关基因 6 条; 其他类基因 6 条; 4 条基因未予分类(表 2 和 3, Table 2 and 3)。

3 讨论

基因芯片技术能大规模平行检测不同样品基因表达差异, 改变了传统的一次实验仅能对少数基因的表达进行研究。目前尚未发现关于与 Hcy 相关的 As 基因表达谱研究的报道。本研究通过对差异基因进行分析, 以了解在 Hcy 作用下 As 基因表达谱的变化。

表 2. 组一与组三芯片中表达均下调的基因

Table 2. Common down-regulated genes in group 1 and group 3 gene chips

基因 序号	基因库 序号	基因名称 (Homo sapiens)	基因功能 分类	Cy5/Cy3	
				组一芯片	组三芯片
X79683	NM_002292	laminin, beta 2 (LAMP2)	16	0.088	0.184
1433g10	NM_005717	actin related protein 2/3 complex, subunit 5 (ARPC 5)	15	0.108	0.114
3897h11	BF129650	601811318R1 cDNA, 3' end	10	0.126	0.249
3618 e 08	NM_004074	cytochrome c oxidase subunit VIII(COX 8)	1	0.129	0.375
1133a11	NM_006815	coated vesicle membrane protein (RNP 24)	10	0.184	0.364
3216 e 08	NM_006595	apoptosis inhibitor 5 (API 5)	6	0.203	0.320
0870f09	NM_001350	death associated protein 6 (DAXX)	6, 15	0.210	0.293
1484b10	NM_006472	thioredoxin interacting protein (TXNIP)	15	0.212	0.166
0909d09	NM_004559	nuclease sensitive element binding protein 1 (NSEP 1)	13	0.218	0.455
0600g01	AK056875	cDNA FLJ32313 fis, clone PROST2003232, (EC 3.2.1.31)	10	0.219	0.303
3754b03	NM_005620	S100 calcium binding protein A11 (S100A11)	1	0.283	0.436
1645g01	NM_006407	vitamin A responsive; cytoskeleton related (JWA)	15	0.308	0.444
3485b07	AK057174	cDNA FLJ32612 fis, clone STOMA2000088,	15	0.316	0.493
1397d05	NM_003754	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 (EIF3S5)	13	0.344	0.465
2323c08	NM_002004	farnesyl diphosphate synthase (FDPS)	12	0.359	0.492
0950b09	BE899190	601681990F1 cDNA, 5' end	12, 10	0.359	0.369
3838h01	NM_002124	major histocompatibility complex, (HLA-DRB 1)	10	0.362	0.474
0951d11	BC008952	lactate dehydrogenase B	12	0.366	0.393
2381f05	NM_003313	tissue specific transplantation antigen P35B (TSTA 3)	13	0.402	0.444
1262 e 08	NM_000895	leukotriene A4 hydrolase (LTA4H)	12, 10	0.415	0.495
0944d09	NM_006087	tubulin, beta, 5 (TUBB 5)	10	0.427	0.381
1623c06	NM_016227	chromosome 1 open reading frame 9	1	0.432	0.246
1258g12	NM_005962	MAX interacting protein 1 (MXI 1)	13, 1	0.439	0.411
1429b07	NM_001268	chromosome condensation 1-like	15	0.452	0.485
1140 e 04	NM_002738	protein kinase C, beta 1 (PKC $\beta$ 1)	11, 5	0.456	0.461

表 3. 组一与组三芯片中表达均上调的基因

Table 3. Common up-regulated genes in group 1 and group 3 gene chips

基因 序号	基因库 序号	基因名称 (Homo sapiens)	基因功能 分类	Cy5/Cy3	
				组一芯片	组三芯片
2974g10	NM_000027	aspartylglucosaminidase (AGA)	12, 1	2.015	2.007
1627a06	BM018425	603646124F1 cDNA, 5' end	10	2.071	2.561
2987d12	NM_000817	glutamate decarboxylase 1 (GAD 1)	12, 11	2.140	2.901
0900d12	NM_033380	collagen, type IV, alpha 5	5	2.166	2.011
0977a12	NM_002140	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRPK)	10, 13	2.254	2.625
0422g01	NM_002879	RAD52 homolog (RAD52)	10	2.267	2.588
0768d05	NM_000747	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 1 (CHRNA1)	11	2.395	2.155
1489 e08	NM_002659	plasminogen activator, urokinase receptor (PLAUR)	11, 10	2.402	2.959
1233a02	NM_006020	Tax1 binding protein 1 (TAX1BP1)	10	2.585	2.063
0907d12	NM_019087	hypothetical protein FLJ20051	15	2.872	3.191
2028d05	NM_003254	tissue inhibitor of metalloproteinase 1(TIMP 1)	16	2.884	2.210
4499g11	AJ251595	mRNA for transmembrane glycoprotein (CD44 gene)	16	2.886	2.618
0908 e12	AF110908	TNF $\alpha$ -receptor associated factor-3 (TRAF-3)	1, 6, 13	2.919	4.036
1065b12	NM_033625	ribosomal protein L34 (RPL34)	13	3.020	2.488
1300 e05	NM_001951	E2F transcription factor 5, p130-binding (E2F5)	13	3.046	4.020
1258b07	NM_016093	ribosomal protein L26-like 1	10	3.704	4.420
2411 e 11	NM_003821	receptor-interacting serine-threonine kinase 2 (RIPK 2)	11, 6	3.772	2.274
2511g04	NM_003796	RPB5 mediating protein (RMP)	1, 15	3.803	3.030
1016d12	NM_003617	regulator of G-protein signalling 5 (RGS5)	11, 1	3.827	2.439
4552g07	NM_000584	Interleukin 8 (IL-8)	10	4.926	2.330
2640 e10	NM_001168	baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5)	6	5.475	3.335
1513f05	NM_002298	lymphocyte cytosolic protein 1 (LCP-1)	5, 11	5.520	2.968
X05231	NM002421	Matrix metalloproteinase-1 (interstitial collagenase) (MMP-1)	16	10.663	6.213

本研究发现,促进凋亡的相关基因如 TRAF-3、TRAF-2、RIPK 2、PIC 8 和 EMP 1 等表达上调及抑制凋亡的相关基因如 API5 等表达下调。As 发生发展的全过程都与细胞凋亡有关,细胞凋亡可以引发、加剧 As<sup>[4]</sup>。Hcy 是一种主要的促进细胞凋亡的因素<sup>[5]</sup>。TRAF-3 介导传递抑制信号导致细胞凋亡,TRAF-2 介导活化 NF- $\kappa$ B,发挥促 As 的作用<sup>[6]</sup>。本研究中高 Hcy 的冠心病患者 TRAF-3 及 TRAF-2 表达上调促进 As 发生,与文献报道是一致的。与细胞信号转导相关的基因 ARPC5、MAPK12 等表达下调,RCG5、PLAUR 等表达上调。纤溶系统与 Hcy 致 As 发生的机制密切相关,Hcy 破坏机体凝血和纤溶之间的平衡,使机体处于血栓前状态。PLAUR 基因表达产物为血浆纤溶酶原激活物尿激酶受体,在炎症与血栓形成中有重要作用,促进 As 的形成<sup>[7]</sup>。本研究结果提示高 Hcy 可能通过引起 PLAUR 表达上调导致 As 发生,但具体机制尚不清楚。As 是动脉壁的一种过度的慢性增生性炎症反应过程。与免疫相关的差异表达基因 RNP24 等表达下调;IL-8、PDGF-B、TAX1BP1、LCP1 等表达上调。Dudman 等<sup>[8,9]</sup>报道 Hcy 通过刺激血管内皮细胞分泌 IL-8 从而增强中性粒细胞的粘附及迁移能力。已有研究证实 As 部位的血管内皮细胞 IL-8 表达增强。临床发现 As 斑块好发于低切应力区,低切应力作用通过诱导血管内皮细胞表达 IL-8 参与 As 的发生、发展过程。因此我们认为高 Hcy 可能通过使 IL-8 表达增加促进 As 发生。差异基因中在高 Hcy 的冠心病患者 MDH1 表达下调,CYP1A1 表达上调。众多研究表明,Hcy 可通过提高内皮细胞氧自由基含量,使 DNA 合成明显减少,内皮细胞活力下降,促进 As 的发生<sup>[10]</sup>。这些基因的差异表达可能与 Hcy 的作用相关,但具体的作用机制尚需进一步研究。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是一族可降解细胞外基质胶原的重要蛋白酶类,在

As 发生期可促进血管平滑肌细胞向内皮的移位。TIMP-1 不可逆地抑制所有 MMP、特别是 MMP-1 对细胞外基质的降解活性。正常情况下, MMP 与 TIMP-1 二者处于平衡状态。我们的研究发现,高 Hcy 的冠心病患者 MMP-1 表达显著上调,从而促进 As 发生,与文献报道是一致的。但本结果中 TIMP-1 表达也上调,与文献报道不相符。我们认为,虽然 TIMP-1 表达上调,但 MMP-1 表达上调更显著,TIMP-1 不能完全抑制 MMP-1 活性,总的结果是细胞外基质降解大于合成,促进 As 发生,也可能由于基因芯片的成本较高,我们研究的病例数少,患者的个体差异不能完全反映总体情况。本研究为初步实验结果,可为进一步研究 Hcy 诱发 As 的确切分子机制提供线索,并为 As 疾病的早期基因治疗提供靶点。

#### [参考文献]

- [1] Susan C, Louis M, Vivian F. Hyperhomocysteinemia: an emerging and important risk factor for thromboembolic and cardiovascular disease. *Clin Chem*, 1996, **106** (5): 709-722
- [2] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156-159
- [3] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (5235): 467-470
- [4] 李冬宝, 沈璐华, 谢苗荣. 动脉粥样硬化和再狭窄中平滑肌细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 276-278
- [5] Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res*, 1997, **81** (6): 970-976
- [6] 朱迅 (主编). 免疫学进展. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 432-434
- [7] Annu K, Donald SH. Induction of monocyte tissue factor expression by homocysteine: a possible mechanism for thrombosis. *Blood*, 2000, **96** (6): 966-972
- [8] Dudman NP, Temple SE, Guo XW, Fu W, Perry MA. Homocysteine enhances neutrophil-endothelial interactions in both culture cells and rats in vivo. *Circ Res*, 1999, **84** (4): 409-416
- [9] 刘建民, 胡燕燕, 李金珉, 李秀昌. 同型半胱氨酸诱导培养的人脐静脉内皮细胞分泌白细胞介素 8. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 319-321
- [10] Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1995, **270** (1): 319-324

(此文编辑 文玉珊)