

## 基因表达谱芯片筛选破裂性腹主动脉瘤组织中的差异表达基因

杨军<sup>1</sup>, 胡新华<sup>1</sup>, 张宏伟<sup>2</sup>, 刘程伟<sup>1</sup>, 张志深<sup>1</sup>, 张强<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学附属第一医院外科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 营口市中心医院普外科, 辽宁省营口市 115002)

[关键词] 生物医学工程学; 腹主动脉瘤; Northern blot 或 Western blot; 基因表达; 基因芯片; 基质金属蛋白酶; 金属蛋白酶组织抑制剂

[摘要] 目的 采用表达谱基因芯片技术筛选破裂性腹主动脉瘤组织中的差异表达基因。方法 选取破裂性腹主动脉瘤组织标本 6 例, 以年龄、性别构成、动脉瘤直径等相仿的 6 例未破裂腹主动脉瘤作对照。抽提总 RNA, 纯化 mRNA 后逆转录制备杂交探针, 采用含有 4 096 种人类基因全长 cDNA 的表达谱芯片进行差异表达谱分析, 通过 Northern blot 或 Western blot 反向验证部分差异表达基因。结果 在破裂性腹主动脉瘤组织中发现差异表达基因共有 124 条, 上调的基因 89 条, 下调的基因 35 条; 共存性基因有 42 条, 其中上调基因 29 条, 下调基因 13 条。差异表达的基因有与基质代谢、炎症因子及粘附分子、细胞凋亡、原癌基因或抑癌基因、细胞信号和传递蛋白、细胞骨架和运动蛋白相关基因表达密切相关的多种基因参与。通过 Northern blot 等方法反向验证基质金属蛋白酶 9 和金属蛋白酶组织抑制剂 2 基因, 证实腹主动脉瘤组织中存在基质金属蛋白酶 9 和金属蛋白酶组织抑制剂 2 的 mRNA 及蛋白产物的差异表达。结论 应用表达谱基因芯片筛选破裂性腹主动脉瘤中的差异表达基因, 可能为其发病机制及防治的研究提供新思路。

[中图分类号] O81

[文献标识码] A

### Study on Differently Expressed Genes in Ruptured Abdominal Aorta Aneurysm by cDNA Microarray

YANG Jun, HU Xin-Hua, ZHANG Hong-Wei, LIU Cheng-Wei, ZHANG Zhi-Shen, and ZHANG Qing

(Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Abdominal Aorta Aneurysm; Gene Expression; cDNA Microarray; Matrix Metalloproteinase; Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

[ABSTRACT] **Aim** To screen the differently expressed genes in ruptured abdominal aorta aneurysm (RAAA) using cDNA microarray. **Methods** 6 RAAA or abdominal aorta aneurysm (AAA) specimen were collected respectively, and total RNA was isolated from the tissues and purified to mRNA by oligotex. Both mRNA from AAA and normal aorta were reversely transcribed to cDNA with the incorporation of fluorescent dUTP to prepare the hybridization probes, then the mix probes were hybridized to cDNA microarray of 4 096 human genes. After washing, the cDNA microarray were scanned for the fluorescent signals and showed differences between 2 tissues. Northern and Western blot were used to identify the differently expression of some genes in RAAA. **Results** Among 4 096 target genes, 124 genes were showed in differential expressed profile with 89 upregulated and 35 downregulated genes, and all 6 AAA samples were 29 genes upregulated and 13 downregulated. The differential expressed genes involved in the functions of matrix metalloproteinases (MMP), inflammation, apoptosis, signal conduct, proto-oncogene and anti-oncogene, which meant that they had potential value in the pathogenesis of AAA. Then, Northern and Western blot were used to identify the different expression of MMP-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 2 (TIMP-2) in RAAA.

**Conclusion** The investigation based on cDNA microarray in researching related genes in RAAA afforded a new idea in studying pathogenesis, prevention and therapy of RAAA.

腹主动脉瘤(abdominal aorta aneurysm, AAA)破裂是腹主动脉瘤患者的主要死亡原因, 在欧美国家, AAA 位于成年男性疾病死亡原因的第 10 位, 仅美国

每年死于 AAA 破裂的病人就多达 15 000 例<sup>[1]</sup>。破裂性腹主动脉瘤(ruptured AAA, RAAA)的确切机制目前仍不清楚, 研究表明除了瘤体直径外, 多种因素包括许多分子水平改变可能参与了这一过程<sup>[2]</sup>。我们拟采用表达谱基因芯片技术检测 RAAA 组织中的差异表达基因, 全面了解并验证部分差异表达基因, 揭示 AAA 破裂的潜在分子机制并为寻找相应的干预手段提供理论依据。

[收稿日期] 2005-07-12 [修回日期] 2006-06-26

[基金项目] 国家自然科学基金(30400435, 30371401), 辽宁省教育厅科技项目(2004F076)

[作者简介] 杨军, 博士, 副教授, 主要从事血管外科疾病的基础研究, E-mail 为 yangjunemu@126.com。胡新华, 博士, 副教授, 主要从事血管外科方面的研究。张强, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血管外科疾病的基础和临床研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织来源

6例RAAA组织标本均取自我院住院并手术病人,以年龄、性别构成、动脉瘤直径等均相仿的6例未破裂AAA组织标本作对照。标本均取自动脉瘤前壁的扩张进展部位,切取瘤壁全层,但去除瘤腔内的粥样斑块及附壁血栓,迅速置于液氮中冻存。操作中注意无菌及无RNA酶条件。两组均为男4例、女2例。入选病例术前均未经特殊治疗。

### 1.2 基因表达谱芯片研究方法

HGEC-40S cDNA 表达谱芯片由上海博星基因芯片有限公司提供,含4 096种人类基因。用Trizol试剂抽提总RNA:将液氮保存的动脉瘤组织分别放在陶瓷研钵中液氮低温环境下碾碎成粉末,加入Trizol试剂匀浆,离心后取上清液经1:1酸性酚-氯仿两次抽提后再经醋酸钠和5:1酸性酚-氯仿抽提,等体积异丙醇沉淀,离心后用Milli-Q水溶解沉淀,紫外分光光度仪测定OD值(A260/A280),甲醛变性凝胶电泳检测28S、18S rRNA条带。④mRNA纯化及探针标记:Oligolex mRNA Midi Kits(Qiagen公司,美国)纯化mRNA,据RNA溶液的浓度取适量总RNA,用OligodT亲和柱纯化,得到纯mRNA。参照Schema等的方法逆转录标记cDNA探针并纯化。Cy3-dUTP标记AAA组织的mRNA,Cy5-dUTP标记RAAA组织的mRNA。乙醇沉淀后溶解在20 μL杂交液中。④杂交及洗涤:将基因芯片在含有0.5%变性鲑鱼精DNA的杂交液中,42℃下预杂交6h。荧光标记的混合探针分别在95℃水浴中变性5min后加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于42℃杂交15~17h。然后揭开盖玻片,洗涤10min,室温晾干。结果测定与分析:采用美国General Scanning公司的Scan Array 3000扫描芯片及ImaGene3.0软件对Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值进行分析。根据40个管家基因的光比率调整两种荧光的均衡。判定基因差异表达的标准为: Cy3和Cy5信号值其中之一必须>1 000; Cy5/Cy3值>2为高表达基因, Cy5/Cy3值<0.5为低表达基因。

### 1.3 验证部分差异基因在腹主动脉瘤组织的表达

选择基因芯片提示差异表达的基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和金属蛋白酶组织抑制剂2(tissue inhibitors of metalloproteinase-2, TIMP-2)为研究目标进行反向验证。

1.3.1 Northern blot检测基质金属蛋白酶9和金属蛋白酶组织抑制剂2的mRNA表达 采用Trizol

试剂盒抽提总RNA,并测定OD值(A260/A280),具体方法同前。制备cDNA探针:首先将mRNA逆转录为cDNA,根据GenBank序列设计引物, MMP-9(NM\_004994) F为5'-GGC GCT CAT GTA CCC TAT GT-3', R为5'-TCA AAG ACC GAG TCC AGC TT-3'(产物长度468 bp); TIMP-2(NM\_003255) F为5'-CCT TGT TTT CTG CAG CTT CG-3', R为5'-CAG CAA GAC CCA GCT TTT TG-3'(产物长度537 bp);进行PCR扩增,扩增产物测序后构建pBluescript<sup>+</sup>载体,扩增后采用Prime<sup>+</sup>Gene随机引物标记试剂盒(Promega公司)进行 $\alpha$ -32P-dCTP标记。④Northern杂交:取30 μg总RNA按《分子克隆》<sup>[3]</sup>中所述方法经1%琼脂糖-甲醛凝胶变性电泳分离,将凝胶上的RNA转移到硝酸纤维素滤膜,真空炉80℃干烤0.5h。42℃条件下,用含有50%甲酰胺、6×SSC、5×Denhardt溶液、0.5% SDS、100 g/L变性鲑精DNA的杂交液进行预杂交3h,再加入 $\alpha$ -32P-dCTP标记的cDNA探针进行杂交16~18h,杂交膜先后经2×SSC(0.5% SDS)、2×SSC(0.1% SDS)、0.1×SSC(0.5% SDS)、0.1×SSC分别漂洗,-70℃放射自显影48h后洗片。凝胶自动成像系统对X线片摄像,分析各条带吸光度值。

1.3.2 Western blot检测基质金属蛋白酶9和金属蛋白酶组织抑制剂2的蛋白产物表达 蛋白提取、电泳、转膜及检测参照文献[2]。配制细胞裂解液,剪碎组织后机械匀浆,4℃12 000 r/min离心10min。考马氏亮蓝R250染色测总蛋白浓度,将各组蛋白浓度调到同一水平。制备10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每孔加蛋白样品100 μg,电泳后通过半干式电转移仪(美国Bio-Rad公司)将蛋白转到硝酸纤维素滤膜。丽春红S染色确定转膜情况并标记蛋白Marker位置。5%脱脂奶粉TBS缓冲液封闭4℃冰箱过夜;一抗1:1 000稀释,室温下摇2h后TBS洗膜3次;按1:1 000加入过氧化物酶标记羊抗兔IgG-HRP 60min,TBS洗3次后加入ECL 2~3min,暗室显影2min后冲洗胶片。凝胶成像分析系统摄像分析。MMP-9及TIMP-2抗体为武汉博士德公司产品。

### 1.4 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用t检验。

## 2 结果

### 2.1 总RNA提取结果

破裂性腹主动脉瘤组织A260/A280达1.915~2.082,AAA组织A260/A280达1.892~2.122。电泳

结果也证实已经提取到高纯度的总 RNA。

## 2.2 芯片的质量标准控制

在芯片上,一共有 8 192 个 cDNA,每个基因随机点两点,共 4 096 个基因。为了监控芯片制备和杂交过程,设定了几个阴性对照:水稻 U2RNA 基因(8 点)、HCV 外壳蛋白基因(8 点)、空白点样液(32 点),经验证这些点都为阴性,从一方面证明数据的可靠性。

## 2.3 基因表达谱特征

破裂性腹主动脉瘤组织 cDNA 探针由呈红色的 Cy5 荧光素标记,AAA 的 cDNA 探针由呈绿色的 Cy3 荧光素标记,在双色荧光扫描叠加图像中红点和绿点分别代表瓣膜区组织高表达和低表达的基因,黄色的点表示该基因表达的差异不显著(图 1)。

## 2.4 破裂性腹主动脉瘤组织中的差异表达基因

被检测的 6 例 RAAA 组织中差异表达的基因共 124 条,其中上调基因 89 条,下调基因 35 条;有基质蛋白酶类基因、炎症因子及粘附分子类基因、细胞凋亡相关基因、原癌基因或抑癌基因、细胞信号和传递蛋白基因、细胞骨架和运动蛋白相关基因等多种基因。这些基因可能与 RAAA 发病机制有关。6 例标本中共存性差异表达基因有 42 条,其中下调的基因为 13 条(表 1);上调的基因有 29 条(表 2)。

## 2.5 验证部分差异表达基因

选择基因芯片提示差异表达的 MMP-9 和 TIMP-2 为研究目标进行反向验证。Northern blot 结果(图 2)提示:RAAA 组织的 MMP-9 mRNA 表达显著高于 AAA 组织,而 TIMP-2 mRNA 表达却显著低于 AAA

组织;Western blot 亦证实在 RAAA 组织中存在高表达 MMP-9 蛋白产物和低表达 TIMP-2 蛋白产物,差异有显著性(表 3)。

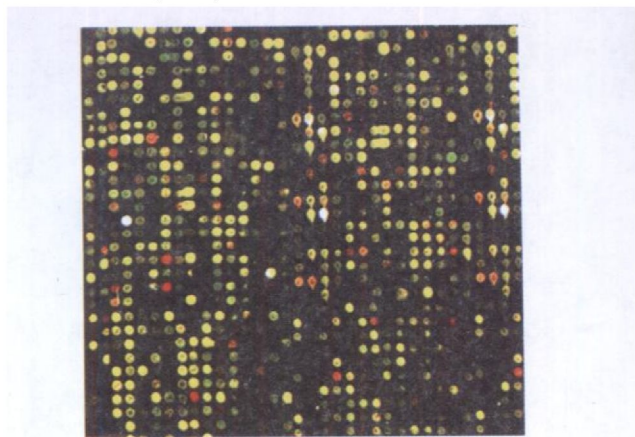


图 1. 基因表达谱双色荧光标记扫描叠加图

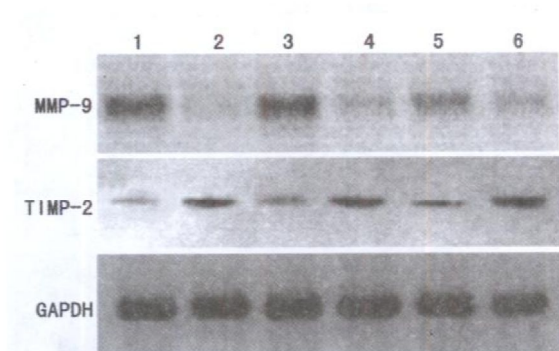


图 2. 基质金属蛋白酶 9 和金属蛋白酶组织抑制剂 2 的 Western blot 结果 1、3、5 为破裂性腹主动脉瘤标本,2、4、6 为腹主动脉瘤标本。

表 1. 破裂性腹主动脉瘤组织中表达下调的差异表达基因

基因序列号	基因名称	Cy5/Cy3
AF 036613	H. sapiens general transcription factor 2-I pseudogene 1 (GTF2IP-1)	0.428
NM_014239	H. sapiens eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 (EIF2B-2)	0.417
NM_005652	H. sapiens telomeric repeat binding factor 2 (TERF-2)	0.408
NM_022802	H. sapiens C-terminal binding protein 2 (CTBP-2)	0.402
NM_005370	H. sapiens mel transforming oncogene (MEL)	0.382
NM_000375	H. sapiens uroporphyrinogen III synthase (UROS)	0.336
M 37712	Human p58/GTA (galactosyltransferase associated protein kinase)	0.334
NM_002415	Homo sapiens macrophage migration inhibitory factor (MIF)	0.322
NM_003255	Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2)	0.310
AF 153419	Homo sapiens I kappa B kinase complex-associated protein (IKBKAP)	0.296
NM_000075	H. sapiens cyclin dependent kinase 4 (CDK-4)	0.282
AF 070674	H. sapiens inhibitor of apoptosis protein 1 (MIHC)	0.263
AJ 000503	H. sapiens tyrosinase related protein 2 (TRP-2)	0.255

表 2. 破裂性腹主动脉瘤组织中表达上调的差异表达基因

基因序列号	基因名称	Cy5/Cy3
NM_004994	Homo sapiens matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)	5.605
BC_000085	H. sapiens ribosomal protein S15	4.805
NM_004515	H. sapiens interleukin enhancer binding factor 2	4.542
NM_001530	Homo sapiens hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (HIF1A)	4.520
NM_002426	Homo sapiens matrix metalloproteinase 12 (MMP-12)	4.431
NM_000746	H. sapiens cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7 (CHRNA7)	4.178
X_57025	H. sapiens IGF-1	3.788
D_86550	H. sapiens serine/threonine protein kinase	3.748
U_86453	H. sapiens phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit p110delta	3.622
NM_006825	H. sapiens cytoskeleton associated protein 4 (CKAP4)	3.328
AJ_272050	H. sapiens transcription initiation factor IA protein (TIF-IA gene)	3.244
M_11952	Human T-cell receptor rearranged beta chain gene V-region (V-D-J) V-beta AT12-2	3.153
AJ_243706	H. sapiens RB-binding protein	3.110
NM_001229	H. sapiens caspase 9	3.102
NM_005438	H. sapiens FOS-like antigen 1 (FOSL1)	3.076
NM_003326	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (TNFSF4)	2.980
AF_016266	H. sapiens TRAIL receptor 2	2.832
NM_000201	Homo sapiens intercellular adhesion molecule 1 (CD54, ICAM1)	2.820
Z_24725	H. sapiens mitogen inducible gene mig-2	2.763
NM_001066	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B (TNFRSF1B)	2.715
AF_090693	H. sapiens apoptosis related RNA binding protein (NAPOR-3)	2.644
NM_005192	H. sapiens cyclin dependent kinase inhibitor-3 (CDKN-3)	2.592
AY_007239	H. sapiens monooxygenase X	2.579
NM_013232	H. sapiens programmed cell death-6 (PDCD-6)	2.364
NM_004394	H. sapiens death associated protein (DAP)	2.339
NM_004257	H. sapiens TGF beta receptor associated protein-1 (TRAP-1)	2.223
NM_007051	Homo sapiens Fas (TNFRSF6) associated factor-1 (FAF-1)	2.171
NM_002287	Homo sapiens leukocyte associated Ig-like receptor 1 (LAIR1), transcript variant a	2.128
NM_021970	H. sapiens MEK partner 1 (MP-1)	2.014

表 3. 破裂性腹主动脉瘤组织中基质金属蛋白酶 9 和金属蛋白酶组织抑制剂 2mRNA 及蛋白产物表达

指标	AAA	RAAA
MMP-9 mRNA	0.48 ± 0.18	1.28 ± 0.26 <sup>a</sup>
TIMP-2 mRNA	2.06 ± 0.34	0.64 ± 0.10 <sup>a</sup>
MMP-9	0.18 ± 0.06	0.92 ± 0.21 <sup>a</sup>
TIMP-2	0.40 ± 0.12	0.26 ± 0.15 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与 AAA 组比较。

### 3 讨论

腹主动脉瘤(AAA)的发病机制仍不很清楚。目

前普遍认为 AAA 是由解剖、遗传、免疫、生物化学、环境及血流动力学等多种因素综合作用的结果<sup>[4]</sup>。AAA 破裂的机制更是困扰国内外学者多年的重要课题。AAA 破裂通常被认为与瘤体的大小关系密切。根据 Laplace 定律, 瘤体直径越大, 则承受的压力亦越大, 破裂的机率就越大<sup>[5]</sup>。以往人们多认为瘤体直径 4.0~5.5 cm, 即小腹主动脉瘤破裂的机率非常小, 但是最近研究表明小腹主动脉瘤亦有相当高的破裂率。国外多中心大样本的临床研究表明, 小腹主动脉瘤的破裂率约为 1%~2.2%/年<sup>[6]</sup>。临床上常会遇到小腹主动脉瘤破裂, 相当一部分小腹主动脉瘤患者在没有明确诊断或及时治疗就发生破



裂而死亡。许多大腹主动脉瘤却可以稳定多年,往往死于其他系统疾病。表明瘤体大小可能并不是 AAA 破裂的根本原因。

关于 AAA 破裂的分子机制研究很少。Wilson 等<sup>[7]</sup>研究发现破裂性 AAA 绝大多数存在基质金属蛋白酶 9 的高表达。Vallabhaneni 等<sup>[1]</sup>发现 AAA 局部存在基质金属蛋白酶高表达、高活性的“热区”,瘤壁的抗张力因而降低,在瘤腔内压力正常时同样会导致 AAA 破裂。Ghilardi 等<sup>[8]</sup>研究了 AAA 中趋化因子受体 CCR5  $\Delta$ 32 的单核苷酸多态性,发现破裂性 AAA 中 CCR5  $\Delta$ 32 突变频率显著高于择期手术的未破裂 AAA 患者。所以,有人提出通过基质金属蛋白酶及 CCR5  $\Delta$ 32 突变监测小腹主动脉瘤破裂,防止 AAA 破裂,还可以作为选择 AAA 手术适应征的参考标准。可见,AAA 破裂伴有多种分子生物学改变,只有深入到分子领域才能揭示其发病机制。运用分子生物学技术特别是最近几年发展起来的生物芯片从基因水平、蛋白水平研究疾病的发病机制无疑是复杂疾病研究的新趋势<sup>[9]</sup>。

本研究中我们采用表达谱芯片筛选破裂性 AAA 中的差异表达基因,试图初步揭示 AAA 破裂的分子机制。结果表明:与未破裂 AAA 比较,破裂性 AAA 中有上百条基因发生了分子生物学改变。我们发现 124 条差异表达基因,包括参与基质代谢、炎症因子及粘附分子、细胞凋亡/增殖、细胞信号和传递蛋白、原癌基因和抑癌基因、细胞骨架运动的多种基因,其中 42 条基因在 6 例破裂性 AAA 组织中均有差异表达,提示破裂性 AAA 的发生是多基因参与的过程。我们注意到,在基因表达谱中有多个基质代谢和凋亡相关基因表达上调或下调,提示基质代谢或细胞凋亡功能的异常是 AAA 破裂的重要分子机制;破裂性 AAA 中炎症因子及其受体基因、粘附分子的高表达表明炎症反应与 AAA 破裂关系密切;破裂性 AAA 中原癌基因/抑癌基因表达的异常提示组织细胞的异常增殖也参与了 AAA 的破裂过程。

根据表达谱芯片的研究结果,我们选择了差异表达比较明显的基质金属蛋白酶 9 和金属蛋白酶组织抑制剂-2 基因为研究目标,结果表明破裂性 AAA 中基质金属蛋白酶 9 表达显著高于 AAA 组织,而其特异性抑制剂金属蛋白酶组织抑制剂-2 的基因及蛋白产物表达却明显减少,提示基质金属蛋白酶及其抑制因子之间的失衡与 AAA 的破裂关系非常密切。

基因芯片运用不同荧光标记及计算机扫描可提供大量有价值的生物学信息和鉴别所发现的未知基因,这是传统方法无法做到的。随着对基因及基因功能研究的不断深入,破裂性 AAA 产生的分子机制也会越来越明了,有可能筛选出特异的调控基因并发展相应的干预措施,为破裂性 AAA 的防治带来新的突破。

#### [参考文献]

- [1] Vallabhaneni SR, Gilling-Smith GL, How TV, Carter SD, Brennan JA, Harris PL. Heterogeneity of tensile strength and matrix metalloproteinase activity in the wall of abdominal aortic aneurysms [J]. *J Endovasc Ther*, 2004, **11** (4): 494-502
- [2] Alcorn HG, Wolfson SK Jr, Suttor-Tyrrell K, Kuller LH, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in the cardiovascular health study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (8): 963-970
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 克隆化基因所表达蛋白质的检测与分析[M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社,1992; 363-371
- [4] Ailawadi G, Eliason JL, Upchurch JR Jr. Current concepts in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm [J]. *J Vasc Surg*, 2003, **38** (3): 584-588
- [5] 段志泉,张强. 实用血管外科学[M]. 沈阳:辽宁科技出版社,1999; 67-89
- [6] Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Litooy FN, Acher CW, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms [J]. *N Engl J Med*, 2002, **346** (19): 1437-444
- [7] Wilson KA, Lee AJ, Lee AJ, Hoskins PR, Fowkes FG, Ruckley CV, et al. The relationship between aortic wall distensibility and rupture of infrarenal abdominal aortic aneurysm [J]. *J Vasc Surg*, 2003, **37** (1): 112-117
- [8] Ghilardi G, Biondi ML, Battaglioli L, Zamboni A, Guagnellini E, Scorza R. Genetic risk factor characterizes abdominal aortic aneurysm from arterial occlusive disease in human beings: CCR5 Delta 32 deletion [J]. *J Vasc Surg*, 2004, **40** (5): 995-1000
- [9] Schena M, Sharon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. *Science*, 1995, **270** (5235): 467-470

(此文编辑 许雪梅)