

# 动脉粥样硬化基因表达谱研究概况

曾德星 综述, 易光辉 审校

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 基因芯片; DNA 芯片; 微阵列; 基因表达谱

[摘要] 基因芯片又称 DNA 芯片或微阵列, 为近些年发展起来的一项前沿技术—生物芯片中的一种(广义的生物芯片还包括蛋白芯片、组织芯片等)。基因表达芯片是用于基因表达谱研究的一种应用型基因芯片。本文主要综述了基因表达芯片在炎症、氧化低密度脂蛋白、感染、同型半胱氨酸、血流动力学、吸烟等与动脉粥样硬化关系上的研究概况。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)性疾病是严重危害人类健康的一大类疾病, 发病机制极为复杂, 确切病因尚未完全阐明, 一般认为系多个遗传因素与环境因素相互作用所致。基因表达谱不仅可同时比较成千上万条基因的表达变化, 全面筛选某一表型或某一疾病的所有相关基因, 还可揭示不同基因表达变化之间的相互关系, 从而为研究基因与基因之间的内在联系提供线索。因此研究 As 发生发展过程中基因表达谱的改变, 对全面、系统、综合认识 As 发生发展机制具有重要意义。

## 1 基因芯片、基因表达芯片及基因表达谱简介

### 1.1 基因芯片

基因芯片又称 DNA 芯片(DNA chip)、微阵列(microarray), 为近些年发展起来的一项前沿技术—生物芯片中的一种(广义的生物芯片还包括蛋白芯片、组织芯片等)。基因芯片的基本工作原理与经典的核酸分子杂交方法(Southern blot、Northern blot)是一致的, 它将大量特定的 cDNA 或寡核苷酸片段有规律地排列固定于经过特殊处理的固相支持物如玻片、硅片、硝酸纤维素膜、尼龙膜等上, 而后与荧光标记的待测样本基因序列按碱基配对原理进行杂交, 再通过激光共聚焦荧光扫描系统及相应软件对每个探针分子的杂交信号强度进行检测与分析, 从而获得待测样本基因的定性和定量信息。

### 1.2 基因表达芯片

根据功能不同, 基因芯片大致可分为测定基因序列的测序芯片、检测基因表达水平的表达芯片、用于疾病诊断的诊断芯片以及用于药物筛选的筛选芯片。基因表达芯片(gene expression chip)是目前应用最广泛的一种基因芯片, 其基本

部件和工作原理与其它芯片相似, 所不同的是样本标记和检测系统, 它通过双色荧光标记, 即对不同细胞或组织来源的 mRNA 在逆转录反应中分别用不同颜色的荧光标记, 混合后与芯片上的基因进行严格杂交, 而后通过不同波长的激光扫描芯片, 将扫描所得每一点荧光信号值自动输入计算机并进行信息处理, 给出每个点在不同波长下的荧光强度值及其比值, 同时计算机还给出直观的显色图, 这些信号就代表了样本中基因的转录表达情况。

### 1.3 基因表达谱

基因表达芯片主要用于基因表达谱(gene expression profile)研究。基因表达谱又称为基因表达矩阵, 是指特定情况下组织、细胞所表达的全部基因及其丰度。将生物不同时期或疾病发展不同阶段的样本在基因表达芯片上杂交, 则可得到生物各个时期或疾病各个发展阶段的表达谱, 通过比较、分析这些图谱, 就可以得出病变的基因信息。此外, 基因表达芯片还可同时对两组样本中的基因表达水平进行平行检测, 若用同一参照, 可对多组样本间的基因表达水平进行比较, 从而可对来源于不同个体(正常人与患者)、不同组织、不同发育阶段、不同分化阶段、不同病变、不同刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)下细胞内的 mRNA 或逆转录产物 cDNA 进行大规模检测和分析, 迅速将某个或某些基因与疾病联系起来, 这不仅为从整体上分析细胞表达状况提供了信息, 而且为了解与某些特殊生命现象相关的基因表达提供了有力的工具, 对于基因调控以及基因相互作用机理的探讨有重要作用。

## 2 动脉粥样硬化基因表达谱研究现状

当前基因表达芯片大多应用于肿瘤发病机制及病理分型研究, 应用于 As 的报道较少, 而且主要集中于病因发病学方面的研究。

### 2.1 炎症与动脉粥样硬化

早在 1976 年 Ross 教授就提出了 As 的损伤反应学说, 认为各种危险因素造成的内膜损伤是 As 病变发生的始动环节, 随后, 经过多次修正, 于 1999 年在《Science》发表文章综合

[收稿日期] 2005-09-21 [修回日期] 2006-10-18

[基金项目] 国家自然科学基金(30570958); 湖南省卫生厅科研课题(WS-Y02-065)。

[作者简介] 曾德星, 硕士研究生, E-mail 为 ydxyzk@163.com, 通讯作者易光辉, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化分子病理研究, 联系电话为 0734-8282938, 13974778329, E-mail 为 ghyi@hotmail.com。

论述了炎症在 As 中的作用, 提出 As 的炎症学说, 自那以来, 炎症学说在 As 的病因发病学中占据了主导地位。Zhao 等<sup>[1]</sup>分别用白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和 TNF- $\alpha$  刺激人脐静脉内皮细胞, 随后用约含 4 000 个基因的微阵列检测不同时间点 mRNA 的表达改变, 发现各有 33 个和 58 个基因表达发生了变化。在这两组差异表达基因中, 相同者高达 25 个, 其编码产物包括 PAI-1、VCAM-1、IL-8、内皮素和基质金属蛋白酶等。Blaschke 等<sup>[2]</sup>用 C 反应蛋白刺激人冠状动脉血管平滑肌细胞, 随后用 DNA 微阵列检测其基因表达变化, 发现一种参与血管和非血管细胞生长停滞与凋亡的生长停滞及诱导 DNA 损伤基因 153 (GADD153) 表达显著上调, 并且经 Northern blot 证实, C 反应蛋白对 GADD153 的调节呈时间剂量依赖性增强, 这为 As 提供了一个新的治疗靶点。Satterthwaite 等<sup>[3]</sup>用含 9206 个人基因的 DNA 微阵列检测人冠状动脉样本的基因表达变化, 发现信号传导子及转录激活子 6 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT6) 及白细胞介素 1 受体相关激酶 (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK) 的表达与 As 关系极其密切。

## 2.2 氧化型低密度脂蛋白与动脉粥样硬化

在 As 病因发病学中, 脂质浸润学说是得到了众多学者认可的, 而氧化学说实际上是对脂质浸润学说的完善。该学说认为, 低密度脂蛋白 (LDL) 氧化产生氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 是 As 病变发生的中心环节。Shiffman 等<sup>[4]</sup>用佛波酯孵育 THP-1 细胞, 使之分化为巨噬细胞样表型, 随后在不同时期用 ox-LDL 刺激, 并用含 9808 个人基因的微阵列检测巨噬细胞向泡沫细胞转化过程中基因的表达变化, 发现 268 个基因与对照组相比在一个和多个时间点表达增加至少 2 倍。这些基因涉及细胞的生长、存活、迁移、炎症反应、基质重构等功能, 其表达改变有利于泡沫细胞的成熟和 As 斑块的稳定形成。我国学者卢次勇等<sup>[5]</sup>用含 4 000 个已知全长的人基因 cDNA 以及 96 条参照基因 cDNA 克隆制作的基因表达芯片, 筛查 ox-LDL 对人脐静脉血管内皮细胞基因表达谱的影响。首次发现 ox-LDL 可诱导内皮细胞泛肽激活酶、血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶、KDRF (KM-102-derived reductase-like factor) 基因表达改变 (泛肽激活酶表达下调, 血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶、KDRF 表达上调)。Hagg 等<sup>[6]</sup>用 ox-LDL 刺激人巨噬细胞, 随后用 DNA 芯片检测其基因表达变化, 发现谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统的一些基因被激活, 其中 3 种表达上调的基因 (编码产物分别为硫氧还蛋白、硫氧还蛋白还原酶 1、谷胱甘肽还原酶) 已被实时 RT-PCR 所证实。为了进一步研究谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统在 As 发生发展中的作用, Hagg 还用 DNA 芯片检测了 15 个 As 患者及 15 个对照人群的外周血巨噬细胞, 发现这两组人群谷胱甘肽系统的两个基因 (编码产物为过氧化物歧化酶及过氧化氢酶) 表达存在显著差异。以上结果提示谷胱甘肽和硫氧还蛋白系统可能参与了体内抗 ox-LDL 反应及 As 进程调控。

## 2.3 感染与动脉粥样硬化

越来越多的证据表明 As 发生发展过程有感染的参与, 近年来特别受关注的感染性病原体主要有: 肺炎衣原体、巨

细胞病毒、柯萨奇 B 病毒和单纯疱疹病毒等。Shi 等<sup>[7]</sup>用肺炎衣原体感染人脐静脉内皮细胞, 随后用免疫荧光染色、电子显微镜、含 588 个人心血管基因的 cDNA 芯片、逆转录聚合酶链反应和免疫印迹等方法检测, 发现许多表达上调的基因具有促 As 作用。其典型编码产物有热休克蛋白 60、巨噬细胞清道夫受体、细胞色素 P450、血管内皮生长因子 165R 等, 提示肺炎衣原体可能与 As 病变相关。Burnett 等<sup>[8]</sup>用鼠巨细胞病毒感染 C57BL/6J 载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 及野生型 C57BL/6J 鼠, 随后用 Affymetrix 公司生产的鼠芯片检测其主动脉样本, 发现巨细胞病毒感染不仅能显著增大 As 病变面积, 还能上调促 As 基因的表达, 这再次证实了感染确实在 As 病变的发生发展中起着重要作用。

## 2.4 同型半胱氨酸与动脉粥样硬化

在 As 病因发病学中, 同型半胱氨酸学说是近年来新发现和确认的。该学说认为, 血浆同型半胱氨酸水平升高是引发 As 病变发生的重要原因, 而同型半胱氨酸对内皮细胞的功能影响则是引发 As 病变的关键。Li 等<sup>[9]</sup>用高同型半胱氨酸孵育人脐静脉内皮细胞, 随后用 cDNA 微阵列筛选所引起的基因表达改变, 发现编码 3-羟基 3-甲基戊二酸辅酶 A 还原酶的基因表达上调, 这一效应经定量 RT-PCR 证实, 提示高同型半胱氨酸可能通过诱导胆固醇合成促进 As 的形成。我国学者顾菲菲等<sup>[10]</sup>用含 1152 个人基因的表达芯片检测 3 例无冠心病传统危险因素住院患者的外周血淋巴细胞, 其中 1 例为血同型半胱氨酸正常且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。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 个, 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 个, 二者共同的差异表达基因 48 个, 其中上调基因 23 个, 下调基因 25 个。在差异表达的基因中, 有些是凋亡、信号传导、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 As 发生有关。

## 2.5 血流动力学与动脉粥样硬化

在 As 病因发病学中, 剪切应力学说占据了一定的地位。该学说认为, 血流动力学异常是促使 As 病变发生的重要原因。Dekker 等<sup>[11]</sup>用约含 300 个血管内皮细胞相关基因片段的微阵列筛选血管内皮细胞的血流反应性基因, 发现大多数血流诱导表达的基因也受 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、转化生长因子  $\beta$ 、血管内皮生长因子等的诱导表达, 提示这可能仅是内皮细胞对应力的适应性反应; 不过同时也发现少数几个基因仅受血流应力诱导表达, 包括编码肺 Kruppel 样因子 (LKLf) 与细胞色素 P450 1B1 (CYP1B1) 的基因, 其中 LKLf 可用原位杂交方法在健康人主动脉血管内皮细胞中检测到, 是目前第一个被发现在内皮细胞特异表达并且由层流剪切诱导的基因。Sorescu 等<sup>[12]</sup>用 cDNA 微阵列技术发现, 在紊流的情况下, 成骨蛋白 4 (bone morphogenic protein 4, BMP4) 的表达上调, 而在层流的情况下, BMP4 的表达下调。进一步研究发现, BMP4 是一个力敏感性因子, 具有促炎作用。

## 2.6 吸烟与动脉粥样硬化

吸烟是 As 的主要危险因素之一。英国学者 Zhang 等<sup>[13]</sup>用 cDNA 微阵列对尼古丁诱导血管内皮细胞基因表达的改变进行了分析,发现了许多受调于尼古丁的基因,这些基因编码的蛋白质与信号传导和转录调控相关。Nordskog 等<sup>[14]</sup>分别用香烟烟雾冷凝液和尼古丁刺激人主动脉及冠状动脉内皮细胞,随后综合利用基因表达谱、蛋白分析、细胞因子测定、细胞毒性测定等方法研究抽烟促 As 的分子机制,发现用香烟烟雾冷凝液处理的内皮细胞中涉及基质降解的基因表达上调,如 MMP-1、MMP-8、MMP-9;涉及外源性物质代谢的酶,如 HO-1、CYP1A2 表达也上调;而涉及细胞周期调节的基因如 TOP2A、CCNB1、CCNA、CDKN3 则表达下调;而用高生理浓度尼古丁处理的内皮细胞中差异表达基因数目较少。蛋白免疫印迹的结果也与此类似。此外,在前者培养基中还检测到大量的炎症因子,以上结果提示吸烟可能通过细胞因子介导的粒细胞募集反应引发其促炎症效应。

## 2.7 其它

上世纪末,就有人通过芯片来检测载脂蛋白 E 及其突变型的存在与否来判断患 As 性疾病的可能性及程度。随着聚类、判别、回归等高级统计方法在基因表达谱分析上的应用,基因表达芯片在疾病预测、预后判断上的应用登上了一个台阶。David 等<sup>[15]</sup>用 Affimetrix 公司的 U95Av2 微阵列检测几十个取自不同部位、不同粥样病变程度的人主动脉样本,通过巧妙的分组和统计分析,从众多差异表达基因中鉴定出具有高度预测病变发生部位与病变程度能力的元基因 (metagene),将元基因用于一未知样本病变发生部位及病变程度预测时,其准确率可高达 93% 以上。这些具有预测能力的基因中,有些是首次被发现与 As 相关,但它们所具有的预测能力强烈提示了其在 As 中所扮演的角色,为 As 研究提供了新的线索。King 等<sup>[16]</sup>用寡核苷酸微阵列检测 51 条取自 22 个心脏移植病人病变心脏的冠状动脉,随后进行微阵列显著性及基因本体论分析,发现平滑肌细胞基因表达差异为动脉粥样病变进展的主要表达信号。更为重要的是,King 建立了一种通路分析方法 (pathway analysis),通过这种方法,鉴定出具有高度相关性的连接基因 (nexus genes),这些基因对于 As 治疗靶点选择及进一步研究极具参考价值。

## 3 问题与展望

对于纷繁复杂的生命系统,以往大都采用只研究其中一个或几个因素的研究方法,但各因素之间网络化的相互作用使这一模式越来越难以适应现代生命科学研究的需要。As 基因表达谱筛选出了与疾病发生发展相关的基因,为 As 研究提供了一些新的思路,但在实际应用中还存在如下问题: (1) 样本来自不同种属、不同年龄、不同病变发展状态和不同处理因素的模型,不利于对来自不同研究的表达谱数据进行比较。(2) 待测样本大多仍需作 PCR 扩增以产生足够量的模板,检测灵敏度尚有待提高。(3) 如何对基因表达芯片所提供的海量信息进行正确分析、归纳、总结,而不是单纯将一些信息进行堆砌,是研究者所面临的一大难题。(4) 基因表达

芯片仅仅只是筛选出了疾病的相关基因,如何进一步阐明每个基因在这些生命过程中的作用,是研究者所面临的另一大难题。但尽管基因芯片技术目前还存在这样那样的问题,其在序列分析、表达谱分析、基因诊断、药物筛选等诸多领域已呈现出广阔的应用前景,相信随着基因芯片技术的不断改进、实验方案的标准化以及研究者与数学家、信息学家间更为广泛的合作,该技术将在 As 研究中体现出越来越大的应用价值。

## [参考文献]

- [1] Zhao B, Stavchansky SA, Bowden RA, Bowman PD. Effect of interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha on gene expression in human endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 2003, **284** (6): C1 577-583
- [2] Blaschke F, Bruemmer D, Yin F, Takata Y, Wang W, Fishbein MC, et al. C-reactive protein induces apoptosis in human coronary vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2004, **110** (5): 579-587
- [3] Satterthwaite G, Francis SE, Suvana K, Blakemore S, Ward C, Wallace D, et al. Differential gene expression in coronary arteries from patients presenting with ischemic heart disease: further evidence for the inflammatory basis of atherosclerosis [J]. *Am Heart J*, 2005, **150** (3): 488-499
- [4] Shiffman D, Mikita T, Tai JT, Wade DP, Porter JG, Seilhamer, et al. Large scale gene expression analysis of cholesterol loaded macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (48): 37 324-332
- [5] 卢次勇, 凌文华, 马静, 吴聪娥. 氧化型低密度脂蛋白诱导血管内皮细胞基因表达谱的改变[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 483-486
- [6] Hagg D, Englund MC, Jernas M, Schmidt C, Wiklund O, Hulten LM, et al. Oxidized LDL induces a coordinated upregulation of the glutathione and thioredoxin systems in human macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **185** (2): 282-289
- [7] Shi Y, Tokunaga O. Chlamydia pneumoniae (C. pneumoniae) infection upregulates atherosclerosis-related gene expression in human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) [J]. *Atherosclerosis*, 2004, **177** (2): 245-253
- [8] Burnett MS, Durrani S, Stabile E, Saji M, Lee CW, Kinnaird TD, et al. Murine cytomegalovirus infection increases aortic expression of proatherosclerotic genes [J]. *Circulation*, 2004, **109** (7): 893-897
- [9] Li H, Lewis A, Brodsky S, Rieger R, Iden C, Goligorsky MS. Homocysteine induces 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vascular endothelial cells: a mechanism for development of atherosclerosis [J]? *Circulation*, 2002, **105** (9): 1 037-043
- [10] 顾菲菲, 高炜, 蒋捷, 卜定方, 柳景华. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (4): 433-437
- [11] Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, de Groot PG, VanBavel E, et al. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2) [J]. *Blood*, 2002, **100** (5): 1 689-698
- [12] Sorescu GP, Sykes M, Weiss D, Platt MO, Saha A, Hwang J, et al. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (33): 31 128-135
- [13] Zhang S, Day IN, Ye S. Microarray analysis of nicotine induced changes in gene expression in endothelial cells [J]. *Physiol Gen*, 2001, **5** (4): 187-192
- [14] Nordskog BK, Blixt AD, Morgan WT, Fields WR, Hellmann GM. Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2003, **3** (2): 101-117
- [15] David Seo, Tao Wang, Holly Dressman, Edward E Herderick, Edwina S Iversen. Gene expression phenotypes of atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (10): 1 922-927
- [16] King JY, Ferrara R, Tabibiazar R, Spin JM, Chen MM, Kuchinsky A, et al. Pathway analysis of coronary atherosclerosis [J]. *Physiol Gen*, 2005, **23** (1): 103-118

(此文编辑 胡必利)