文章编号:1000-5404(2005)09-0841-03

论著

# 高密度 Oligo 基因芯片筛选小鼠嗅球发育相关基因的研究

宋业纯,杨 辉,刘仕勇,何家全,黄其林,邱克军,张治元 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

**提 要:目的** 研究小鼠嗅球发育相关基因表达谱,探讨嗅球(olfactory bulb, OB)在室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)神经干细胞的迁移及分化中的作用。**方法** 采用16 500点的小鼠高密度Oligo基因芯片对胚胎16 d(embryonic day 16, E16)、生后1 d(postnatal day 1, P1)、7 d(P7)、21 d(P21)OB的基因表达情况进行检测,以4个时相点全脑等量混合样品作为对照。**结果** 通过筛选基因表达谱,得到5 277条在E16、P1、P7及P21 OB中均有表达的基因,然后采用两两对比组合,得到6组数据,从中筛选出了581个差异在3倍以上的基因,分层聚类分析将其分为6大类,进一步分析了与SVZa区神经干细胞的迁移相关基因Slit2聚类同组的28个基因及与多巴胺神经元分化相关基因TH聚类同组的17个基因。**结论** 在小鼠嗅球发育中发现了581条表达差异≥3倍的基因,进一步通过对与Slit2相关的28个基因及与TH相关的17个基因的分析有助于揭示SVZa神经干细胞迁移及向多巴胺神经元分化的作用机制。

**关键词**:嗅球;神经干细胞;Oligo基因芯片
**中图法分类号**:R322.85; R394-33 **文献标识码**:A

# Screening the genes related to mouse olfactory bulb development by large-scale oligo microarray technique

SONG Ye-chun, YANG Hui, LIU Shi-yong, HE Jia-quan, HUANG Qi-lin, QIU Ke-jun, ZHANG Zhi-yuan (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To study the molecular programs of the mouse olfactory bulb (OB) development and a structure critical for migration and differentiation of neural stem cells derived from anterior subventricular zone (SVZa). **Methods** A large-scale oligo microarray of 16 500 genes were examined during olfactory bulb development from embryonic day 16 (E16) to postnatal day 21 (P1, P7, P21). The control sample obtained from a mixture of the whole brain tissues at four time points. **Results** A total of 581 differently expressed genes with differential ratio more than 3 were observed. Gene-cluster analysis was used to group these genes into 6 distinct clusters with striking patterns that appeared to correlate with major developmental hallmarks and cellular events. Twenty-eight genes associated with Slit2 and 17 genes associated with TH were found. **Conclusion** These data information should prove valuable in promoting our understanding of the molecular mechanisms underlying migration and differentiation of neural stem cells.

**Key words**: olfactory bulb; neural stem cells; oligo microarray

研究表明嗅球(olfactory bulb, OB)在室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)神经干细胞的迁移及分化中发挥重要作用[1],但其具体的分子机制还不十分清楚。我们应用小鼠高密度Oligo基因芯片研究发育过程中OB的基因表达情况,以对上述机制加以探讨,并为进一步研究OB的功能提供基础资料。

**基金项目**:国家自然科学基金资助项目(30130110)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30130110)
**作者简介**:宋业纯(1973-),男,山东省威海市人,博士研究生,主治医师,主要从事神经干细胞方面的研究。电话:(023)66183406
**通讯作者**:杨 辉,电话:(023)68755610, E-mail: yanghxqh@cta.cq.cn
**收稿日期**:2004-09-02;**修回日期**:2005-03-28

## 1 材料与方法

### 1.1 组织RNA抽提与标记

实验用昆明小鼠由第三军医大学实验动物中心提供,分别取胚胎16 d(embryonic day 16, E16)、生后1 d(postnatal day, P1)、7 d(P7)、21 d(P21)OB及全脑。实验组将来自不同动物同一时间点的OB混合,研为匀浆,用Tripure试剂(Roche公司)提取总RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩RNA,并进一步采用RNeasy mini spin column试剂盒(Qiagen公司)对总RNA进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检,对照组由各时间点全脑总RNA等量混合而成,用SuperScript Ⅱ逆转录酶将实验组和对照组总RNA分别转录为cDNA,转录过程中用标有Cy5、

Cy3的dNTP分别掺入实验组和对照组的cDNA，荧光交换实验则分别用Cy5、Cy3标记对照组和实验组。

### 1.2 芯片杂交与清洗

小鼠高密度Oligo基因芯片由北京博奥生物有限责任公司提供，共有16 500条70 mer长度的Oligo DNA，将标记的DNA溶于30 μl杂交液中(3×SSC，0.2% SDS，5×DDenhart's，25%甲酰胺)，于42 ℃杂交过液，杂交结束后，先在42 ℃左右含有0.2% SDS，2×SSC的溶液中洗5 min，而后在0.2×SSC中室温洗5 min，玻片甩开后即可用于扫描。

### 1.3 芯片扫描，图像采集与数据分析

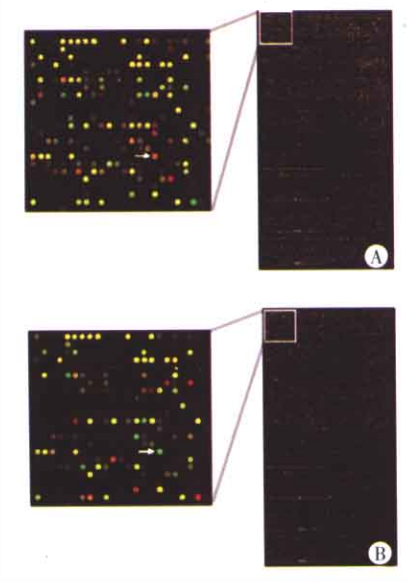
芯片用Scan array express双通道激光扫描仪(Packard Bioscience公司)进行扫描，采用Genepix pro 4.0图像分析软件(Axon Instruments公司)对芯片像进行分析，把图像转化为数字信号，然后对芯片的数据用Lowess方法进行归一化；利用Eisen的Cluster和Tree view软件作分层聚类分析。

## 2 结果

### 2.1 RNA抽提和Oligo芯片

从4个时间点OB及全脑中提取的总RNA，经紫外分光光度计$A_{260}$、$A_{280}$测定，$A_{260}/A_{280}$值为1.8～2.0；甲醛变性胶电泳检测出5、18 s和28 s条带，符合总RNA要求；进而对样品进行Oligo芯片检测，结果达到信号分析的质量要求。如图1所示，对于某一点的信号，如果Cy3信号较强，该点多显绿色，如果Cy5信号较强，该点多显红色，如果强度相似，即显黄色。

经扫描得到16 500个基因的表达数据。对同一样品中有表达的基因，通过对比荧光交换实验结果，只有在两次实验中变化趋势相同的基因才能被认为是真正有表达的基因(图1A、B)。




A and B are dye-swap images. White arrows in the two local enlargement of A and B show the same gene

**图1 P7OB芯片杂交假色重叠图**

**Fig 1 Overlapped scanning map of P7OB and common control**

### 2.2 分层聚类分析

通过筛选基因表达谱，得到5 277条在E16、P1、P7及P21 OB中均有表达的基因，然后采用两两对比组合，从中筛选出581条表达差异3倍以上的基因，基因种类主要有与转录、凋亡、细胞粘附、发育、代谢、应激反应、信号传导、转录调控因子、转运等功能相关的基因。用Cluster软件行分层聚类分析，用Tree view显示聚类后结果，从聚类的树状图看，581个基因根据各自的表达模式，可分成A、B、C、D、E、F共6类，A、B、C、D、E、F类分别包含基因182、132、68、13、138、48个。

### 2.3 与Slit2聚类同组的基因

与Slit2在同一组的基因共有28个，归于F类，将28个基因在各个时间点ratio值取平均值，作图显示其表达变化趋势(图2)。

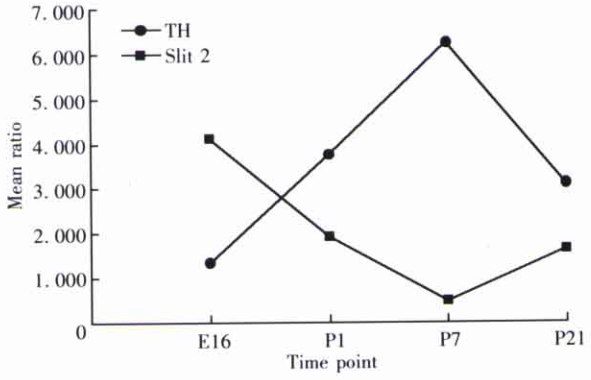



**图2 与TH和Slit2聚类同组基因变化趋势图**

**Fig 2 Changes of 28 genes in cluster Slit2 and 17 genes in cluster TH**

### 2.4 与TH基因聚类同组的基因

与TH基因在同一组的基因共有17个，归于C类，表1显示了基因的相关信息。将17个基因在各时间点ratio值取平均值，作图显示其表达变化趋势(图2)。

**表1 与TH聚类同组的基因列表**

**Tab 1 Genes in TH cluster group**

| Gene name | GB accession | Gene Function |
|---|---|---|
| Caena2dl | NM 009784 | Transport |
| 3110023K12Rik | NM 026523 | None |
| Mrgl | NM 010825 | Development, metabolism |
| Ca1-1 | NM 009799 | Metabolism |
| 4930555Fo3Rik | AK 016128 | Metabolism |
| Gria2 | NM 013540 | Transport |
| Ednrb | NM 007904 | Cell differentiation, development |
| Nfrg1 | NM 011858 | Cell differentiation, signal |
| Spp1 | NM 009263 | Apoptosis, cell differentiation |
| Ctgf | NM 010217 | Cell adhesion, cell motility |
| 2410012M21Rik | AK 010477 | None |
| TH | NM 009377 | Development, metabolism |
| I113raz | NM 008356 | None |
| Sphk1 | AK 068748 | Metabolism, signal |
| D230038D11Rik | AK 021284 | Metabolism |
| None | AF 022770 | None |
| Myh8 | M1 2289 | Cell motility, development |

## 3 讨论

基因芯片，又称 DNA 芯片，是指将许多特定的寡核苷酸片段或 cDNA 基因片段作为探针，有规律地排列在固定支持物上，然后与待测的标记样品的基因按碱基互补配对原则进行杂交，再通过激光共聚焦荧光检测系统对芯片进行扫描，并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作出比较和检测，从而迅速得出所要的信息[2]。表达谱基因芯片技术是生物芯片技术中应用最广泛，技术最成熟的一种，能对相关及大量信息实现同时，自动和快速的采集、传输、分析和处理，并作出相应检测，可在一个实验中大规模检测差异表达基因，从中筛选出感兴趣的基因，目前该技术正逐渐应用于中枢神经系统发育的基因表达分析中。本研究利用北京博奥生物有限责任公司16 500点的小鼠 Oligo 芯片，对发育期 OB 的基因表达情况进行了研究[3]，获得差异≥3 倍的基因 581 个，分层聚类分析得到 6 类与 OB 发育相关的基因(图 2)，通过对这些基因表达信息的进一步分析，将有助于我们了解 OB 在 SVZa 神经干细胞迁移及分化中的作用机制。

嗅球(OB)在嗅觉信息传递中发挥核心作用。研究发现 OB 的中间神经元有终生更新的能力，这些中间神经元主要是球周细胞和颗粒细胞，它们在胚胎期主要由外侧神经节突起区(LGE)的神经干细胞迁移、分化而来；出生后，则主要由位于室管膜前下区(SVZa)的神经干细胞迁移、分化而来[4~6]。

研究表明：OB 在 SVZa 区神经干细胞的迁移中发挥重要作用。但其具体的分子机制还不十分清楚。Liu 等[1]研究证实在 OB 中有一种吸引作用参与了神经干细胞的迁移，他们认为 OB 在这一迁移路径上发挥主导作用。目前已知有 5 种分子能介导轴突生长及神经元迁移，包括 Netrin、senmaphorin、Ephrin、slit 及 chemokine，其中 slit 被证实能介导 SVZa 神经干细胞向 OB 迁移，其在 SVZa 及其他区域的表达能驱使 SVZa 神经干细胞向 OB 迁移[7,8]。我们通过聚类分析发现，与 Slit2 聚类同组的基因有 28 个，这 28 个基因中，有 8 个基因功能已知，20 个基因功能未知。他们的表达模式是胚胎期较高，而生后逐渐降低，P7 达到最低峰值，后至 P21 表达又逐渐增高。对这些基因功能的进一步研究可能有助于揭示 OB 在 SVZa 区神经干细胞的迁移中的作用机制。

研究证实：SVZa 神经干细胞在迁移过程中保持其增殖状态和神经元特征而不进一步分化，到达 OB 中央区分别朝周边的颗粒细胞层和球周细胞层迁移而到达各自的终点，随之退出细胞周期，分化形成颗粒细胞和球周细胞。大约 30% 的球周细胞属于 γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid，GABA)能神经元，70% 的球周细胞属于多巴胺能神经元，它们构成了中枢神经系统中最大的多巴胺能神经元群[6]。目前研究 SVZa 神经干细胞向多巴胺能神经元的分子机制文献报道较多，bmp、pax、Dlx、Wnt 等家族基因被证实在这一分化中起重要作用。然而这一分化过程的调控十分复杂，需要多种因子适当的时空调控。目前，局部微环境因素受到学者们关注[9]。本实验通过基因芯片技术对 OB 发育中与 TH 相关的基因聚类分析发现有 17 个基因的表达模式与 TH 基因类似，分析其表达模式可知，胚胎期较低，生后逐渐升高，P7 达到高峰，而 P21 又开始下降，17 个基因中已知功能的基因有 13 个，4 个未知功能基因。对这些基因功能的进一步分析，将有助于我们理解 SVZa 神经元干细胞向多巴胺能神经元分化的分子机制。

我们比较 Slit2 与 TH 的表达模式发现，在分化高峰期(P7)，此时 Slit2 的表达最低，而 Slit2 表达峰期(E16)，TH 分化则最低。结合先前关于 Slit2 主要与神经干细胞迁移有关的文献报道，似乎可以说明：OB 以外脑区 Slit2 的高表达可驱使神经干细胞向 OB 迁移，而 OB 中 Slit2 的低表达则有助于神经元干细胞向多巴胺能神经元分化，其确切的机制需要进一步的生物学信息分析。

**参考文献：**


[1] Liu G, Rao Y. Neuronal Migration from the forebrain to the olfactory bulb requires a new attractant persistent in the olfactory bulb[J]. J Neurosci, 2003, 23(16): 6651 - 6659.

[2] Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al*. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 467 - 470.

[3] Mody M, Cao Y, Cui Z, *et al*. Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus[J]. Proc Natl Acaid Sci U S A, 2001, 98(15): 8862 - 8867.

[4] Lois C, Alvarez Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain[J]. Science, 1994, 264(5162): 1145 - 1148.

[5] Lois C, Garcia Verdugo J M, Alvarez Buylla A. Chain migration of neuronal precursors[J]. Science, 1996, 271(5251): 978 - 981.

[6] Luskin M B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone[J]. Neuron, 1993, 11(1): 173 - 189.

[7] Wu W, Wong K, Chen J, *et al*. Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit[J]. Nature, 1999, 400(6742): 331 - 336.

[8] Zhu Y, Li H, Zhou L, *et al*. Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration from an extracortical origin to the neocortex[J]. Neuron, 1999, 23(3): 473 - 485.

[9] Baker H, Liu N, Chun H S, *et al*. Phenotypic differentiation during migration of dopaminergic progenitor cells to the olfactory bulb[J]. J Neurosci, 2001, 21(21): 8505 - 8513.


(编辑　刘洪娥)