论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1044-04

基因表达谱芯片筛选强直性脊柱炎差异表达基因的研究

张 莹,初同伟 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

【摘要】 **目的** 应用表达谱芯片比较人强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis,AS)组织与正常骶髂关节组织的基因表达差异,筛选AS疾病相关基因。**方法** 选取本室采集的3例活动期AS标本为实验组,1例骨折标本为对照组。分别提取标本骶髂关节的滑膜组织与椎旁组织的RNA,制备探针后用于表达谱芯片杂交,筛选AS组织差异表达基因,并采用半定量RT-PCR法验证芯片结果。**结果** 与正常组织样本相比,在AS组织中筛选获得差异表达基因237条,表达上调的已知基因91条,表达下调的已知基因78条;对其中20条基因进行半定量RT-PCR检测,结果与表达谱芯片结果一致。**结论** 筛选出与AS相关的多个差异表达基因。

【关键词】 强直性脊柱炎;基因表达谱芯片;差异表达基因

【中图法分类号】 R593.23;R394-33;R394.23 【文献标志码】 A

Screening of differentially expressed genes in ankylosing spondylitis by cDNA microarray

Zhang Ying, Chu Tongwei (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To compare the gene expression difference between human ankylosing spondylitis (AS) and normal sacroiliac joint tissues, and to screen AS-associated genes *via* cDNA microarray. **Methods** Three AS samples in active phase were collected and used as a test group, and a fracture sample was used as a control group. Total RNA was isolated from synovial and paravertebral tissues of both AS and normal sacroiliac joints, and used to construct hybridization probes. The probes were hybridized to cDNA microarray GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. The differentially expressed genes in AS tissues were identified. Finally, semi-quantitative RT-PCR was used to confirm the results of the cDNA microarray. **Results** Compared with the normal tissue sample, 237 differentially expressed genes were detected in AS group, including 91 up-regulated and 78 down-regulated known genes. The semi-quantitative RT-PCR test revealed that the expression patterns of 20 candidate differentially expressed genes were consistent with the results of cDNA microarray. **Conclusion** A number of AS-associated differentially expressed genes are detected, and the present study will be helpful to unveil the molecular mechanism of AS.

【**Key words**】 ankylosing spondylitis; cDNA microarray; differentially expressed genes

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81071523). Corresponding author: Chu Tongwei, Tel: 83-23-68774080, E-mail: chtw@sina.com

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种主要累及脊椎等中轴关节和肌腱、韧带骨附着点的慢性炎性疾病[1-2],可引起脊柱骨性强直甚至中轴关节的活动功能丧失,导致严重的残疾。AS在中国人群中的发病率约为0.2%,患者多为青壮年,给患者及家庭带来沉重负担[3-4]。AS发病的具体分子机制尚不清楚,因此现有的治疗措施难以获得满意的疗效[5]。本研究拟采用表达谱芯片技术,研究AS组织的基因表达谱变化,筛选AS相关差异表达基因,为解析AS发病的分子机制和开展治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本获得 选取本科室2010年1-8月收治的AS患者3例为试验组,男性2例,女性1例,平均年龄30.2岁,均为活动期(有炎性腰背痛,X线骨盆平片提示:骶髂关节有明显骨化线,C-反应蛋白、ESR水平升高,HLA-B27阳性)[6],符合

【基金项目】 国家自然科学基金(81071523)

【通信作者】 初同伟,电话:(023) 68774080,E-mail:chtw@sina.com

1984年美国风湿病协会修订的纽约标准。选取本科室2010年3月收治的脊柱骨折患者1例为对照组,男性,32岁。试验组脊柱韧带和滑膜组织自脊柱桥形术中取得,对照组脊柱韧带和滑膜组织自脊柱矫形术中取得。取样后用生理盐水迅速洗净组织表面,液氮保存。本实验采用程序严格遵循本院人体试验委员会制定的伦理学标准,同时获得该委员会批准,并征得全部患者的知情同意。

1.1.2 芯片和主要试剂 人基因表达谱芯片GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array购自Affymetrix公司,含47 000个转录本和变异体,其中包括约39 000个已知基因和6 500个新基因。RNA提取试剂Plant RNAout购自Tiandz公司,One-step RNA PCR Kit购自TaKaRa公司,RNeasy Micro Kit购自Qiagen公司,one-cycle cDNA Synthesis Kit、Sample Cleanup Module、IVT Labeling Kit、Gengchip Hybridization、Wash and Strain Kit购自Affymetrix公司,引物由Invitrogen公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取 实验按试剂说明书操作,实验流程作如下调整:组织块进行液氮研磨后,混合提取缓冲液转移到匀浆器中匀浆;匀浆产物进行两次氯仿抽提,加大离心转数、延长离心时间以去净沉淀;RNA沉淀用75%乙醇洗涤2次。提取的RNA首先测定$D(260)$、$D(280)$值以检测浓度及纯度,再进行甲醛变性胶电泳检测完整性。

1.2.2 探针制备及杂交 RNeasy Micro Kit纯化总RNA。采用one-cycle cDNA Synthesis Kit将纯化获得的mRNA合成为双链cDNA,再采用Sample Cleanup Module进行纯化。纯化的双链cDNA用IVT Labeling Kit合成cRNA。按照Gengchip Hybridization、Wash and Strain Kit进行杂交:首先将cRNA进行片段化,作为探针与芯片进行杂交(AS试验组进行3个生物学重复),最后依次洗脱芯片并染色。

1.2.3 数据分析 芯片扫描采用Affymetrix专用的Gene array Scanner 3000进行,应用GCOS软件进行数据分析。比较AS试验组与对照组芯片结果前,先将芯片所有探针组的信号进行"Normalize"(均一化)处理,处理后的数据用于计算SLR值(signal log ratio,试验组与对照组取log2后比值)。差异表达基因筛选严格按照如下标准:上调组SLR≥1(对应的比值为2),下调组SLR≤-1(对应的比值为0.5)。

1.2.4 RT-PCR验证芯片结果 根据芯片分析结果,选取差异表达基因并设计引物。以对照组和AS试验组总RNA为模板,按照one-step RNA PCR Kit方法对芯片筛选结果进行RT-PCR验证,实验重复3次。PCR产物电泳后进行灰度扫描并统计。对照组和AS组灰度值进行t检验以判断其有无统计学差异。

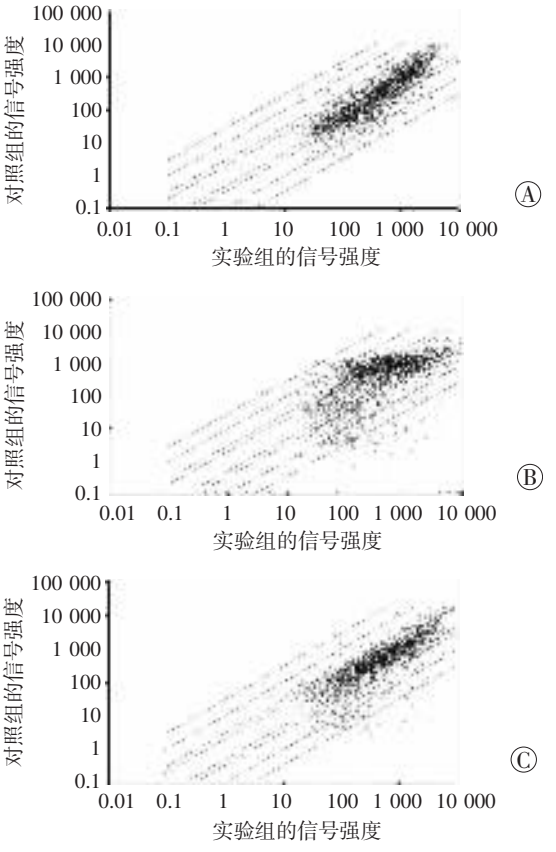
2 结果

2.1 RNA电泳及纯度检测

样品RNA的$D(260)/D(280)$值均在2.0左右,纯度高。经甲醛变性胶电泳检测可见清晰的28S、18S及5S条带,完整性较好,符合芯片检测要求。

2.2 芯片分析

3组芯片杂交结果扫描后获得3张杂交信号散点图(图1)。按照设定的差异表达基因筛选标准,从3组芯片杂交结果筛选出在AS组织中的共同差异表达基因237条,其中明确基因功能的基因169条,功能不明确的序列68条。169条已知基因中,表达上调的91条(表1),表达下调的78条(表2)。



A:实验组1号样本与对照组;B:实验组2号样本与对照组;C:实验组3号样本与对照组

图1 实验组与对照组的杂交信号散点图

表1 10条在AS组织中表达上调的基因

基因	基因全称	SLR
CRP	C-reaction protein	2.2
TNF-α	tumor necrosis factor alpha	2.1
IL-1	interleukin 1	1.3
IL-6	interleukin 6	2.0
BMP-2	bone marphogenic protein 2	2.4
VEGF	vascular endothelial growth factor	1.7
bFGF	basic fibroblast growth factor	1.4
Cbfa1	core binding factor αl	2.2
MMP3	matrix metalloprotelnase 3	1.6
HIF1α	hypoxia inducible factor 1 alpha	1.8

表2　10条在AS组织中表达下调的基因

基因	基因全称	SLR
HBD	hemoglobin, delta	-1.6
IGF-1	insulin-like growth factors 1	-1.7
sTNFR	soluble tumor necrosis factor receptor	-1.4
IL-Ra	interleukin-1 receptor antagonist	-1.0
CB	calgranulin B	-1.8
PDGF	platelet-derived growth factor	-1.2
CTGF	connective tissue growth factor	-1.8
FN	fibronectin	-3.0
Collagen I	type I collagen	-2.6
Collagen II	type II collagen	-2.3

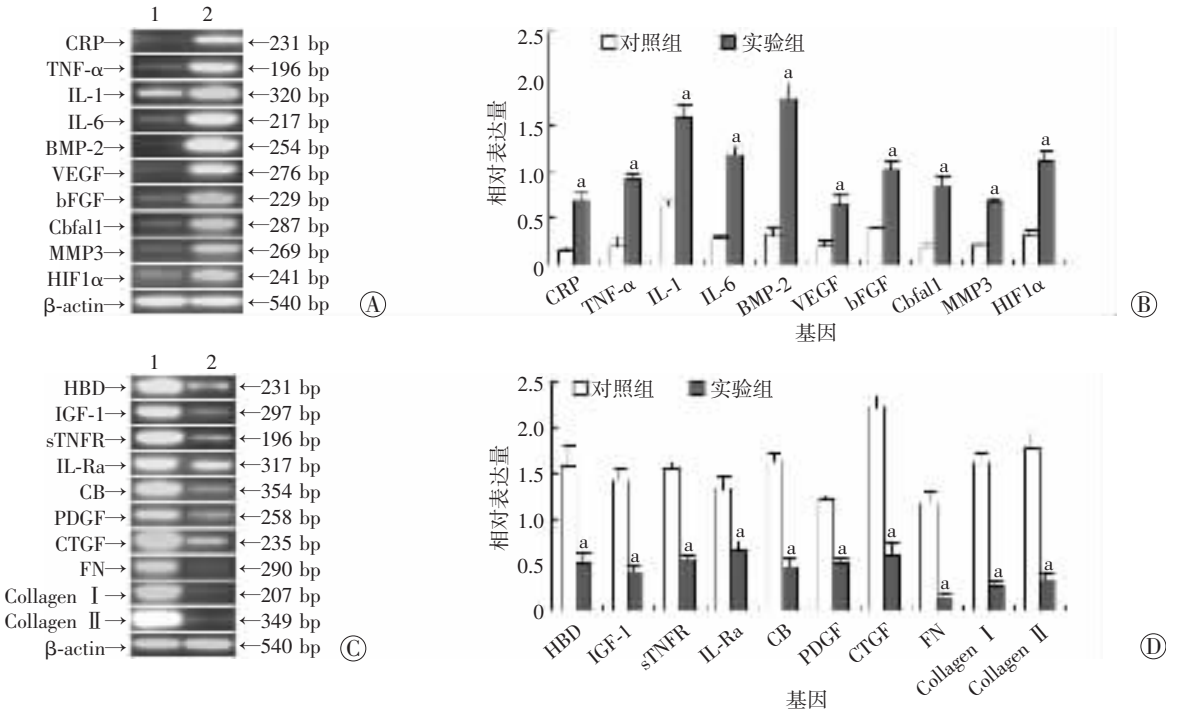
2.3　芯片结果的半定量RT-PCR验证

从GenBank检索表1和表2中列出的20条基因序列，设计引物进行半定量RT-PCR检测，发现待测基因上调或下调趋势与芯片结果吻合。图2为其中1组实验结果。

3　讨论

本研究对于RNA质量要求较高，而脊柱韧带和滑膜组织中含有大量的蛋白和多糖，尤其是多糖对分离RNA影响极大。采用常规动物组织RNA提取方法，难以获得高质量的总RNA。本实验采用提取植物组织总RNA的Plant RNAout试剂提取标本RNA，试剂盒基于改良CTAB法构建，可有效去除多糖，获得的RNA可以满足实验要求。本研究采用的表达谱芯片涵盖信息量丰富的人基因组转录本信息，可以对差异表达基因进行高通量筛选。由于基因表达的个体差异，单个样本杂交的结果假阳性率较高，不利于对芯片结果进行科学判断。本研究采用3个不同的活动期AS标本，最后选取在3个样本中均有明显差异表达的基因进行RT-PCR验证以进一步排除假阳性，结果可靠，对后续研究有较大参考价值。

AS组织中表达上调的91条已知基因中，我们认为AS相关基因有3类：炎症免疫相关基因、关节骨化相关基因及代谢相关基因。我们检测到多个炎症因子如TNF-α、IL-1、IL-6等的高表达，这与标本组织特性一致[7]。TNF-α是重要的早期炎症因子，可诱导其他炎症因子如IL-1、IL-6的表达，激活多种炎性反应。目前临床上采用拮抗TNF-α策略开展AS治疗，可显著降低患者CRP、MMP3、VEGF水平，缓解患者的炎性疼痛。IL-1、IL-6与类风湿关节炎、AS等疾病密切相关[8]。芯片结果还显示AS组织中VEGF、BMP-2、bFGF、Cbfa1等成骨基因的高表达。VEGF可特异性促进血管内皮细胞增生和血管生成。本室已报道VEGF有明显成骨作用[9]。BMP-2是唯一可单独诱导成骨的因子，具有强大的成骨作用[10]。bFGF具有促进成骨细胞增殖作用，同时也是与骨化密切相关的毛细血管



A：AS组织中表达上调的基因　1：对照组，2：实验组1号样本；B：上调基因的灰度扫描统计　a：$P<0.05$，与对照组比较；C：AS组织中表达下调的基因　1：对照组，2：实验组1号样本；D：下调基因的灰度扫描统计　a：$P<0.05$，与对照组比较

图2　差异表达基因在实验组和对照组标本中的表达水平比较

增殖刺激因子[11]。Cbfa1是成骨分化的关键转录因子,具有明确的成骨效应[12]。由于AS发病的最终结果为中轴关节的骨性融合,我们认为可导致中轴关节骨化的上述成骨基因与AS发病密切相关。

AS组织表达下调的78条已知基因中,我们认为AS相关基因有4类:炎症因子拮抗剂、软骨组成蛋白、软骨生长因子及代谢相关基因。sTNFR和IL-Ra分别是TNF和IL-1的拮抗剂,可以中和炎症因子对椎间、椎旁组织的刺激和破坏作用[13]。CB、FN、Ⅰ/Ⅱ型胶原均为软骨细胞和基质的重要组成蛋白,其低表达导致软骨细胞、基质的形态难以维持,同时AS组织中MMP3的高表达(表1)也能促使软骨基质降解[14],上述基因的表达变化可能参与了椎间软骨骨化过程。芯片结果还显示IGF-1、PDGF、CTGF 3个生长因子表达显著降低。IGF-1和CTGF均具有促进软骨细胞增殖、调节其分泌胶原和蛋白多糖的作用[15],PDGF则具有促进软骨细胞分裂增殖、脱钙形成软骨作用[16]。3个与软骨细胞增殖发育相关的生长因子的低表达可能也与AS发病中椎间软骨骨化和脊柱融合有关。

芯片结果还显示AS组织中氧代谢相关基因的表达发生变化:血氧蛋白HBD基因表达下调和低氧诱导因子HIF1α基因表达上调。我们认为HBD表达下调导致AS组织中氧分压较低,而AS组织的低氧状态诱导了低氧诱导因子HIF1α的高表达。Trebec-Reynolds等[17-18]报道生长板软骨细胞在低氧条件下激活HIF1α表达,从而诱导VEGF的表达,抑制HIF1α表达可完全阻止低氧诱导的软骨细胞表达VEGF。HIF1α是VEGF在低氧条件下表达的重要条件,因此我们认为HIF1α及HBD在AS发病过程中发挥重要作用。

总之,本研究应用基因表达谱芯片筛选得到237条差异表达基因,表明可能有多个基因参与了AS发病过程。对差异表达基因特别是未知基因进行深入探讨,将有助于从分子水平理解AS的病理生理过程,为最终解析AS的发病机制提供依据。

参考文献:

[1] Kim T H, Uhm W S, Inman R D. Pathogenesis of ankylosing spondylitis and reactive arthritis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2005, 17(4): 400-405.

[2] 郭章留. 强直性脊柱炎48例骶髂关节影像学分析[J]. 郑州大学学报:医学版, 2009, 44(4): 889-890.

[3] 顾鸣敏, 袁文涛, 杨珏琴, 等. 全基因组扫描寻找强直性脊柱炎的易感基因位点[J]. 遗传学报, 2004, 31(3): 217-220.

[4] 钱奕铭, 初同伟, 周跃, 等. 强直性脊柱炎滑膜细胞破骨表型及分化因素的研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2207-2210.

[5] Reveile J D. The genetic basis of ankylosing spondylitis[J]. Curr Opin Rheumatol, 2006, 18(4): 332-341.

[6] 肖敬, 尹智功, 蒋耀平, 等. 类风湿关节炎合并强直性脊柱炎1例[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(15): 1494-1497.

[7] Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, *et al*. Immunohistologic analysis of zygapophyseal joints in patients with ankylosing spondylitis[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(9): 2845-2851.

[8] Sims A M, Timms A E, Bruges-Armas J, *et al*. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis[J]. Ann Rheum Dis, 2008, 67(9): 1305-1309.

[9] 初同伟, 王正国, 朱佩芳, 等. 血管内皮生长因子在骨折愈合中的作用[J]. 中国修复重建外科杂志, 2002, 16(2): 75-78.

[10] Ye L, Mason M D, Jiang W G. Bone morphogenetic protein and bone metastasis, implication and therapeutic potential[J]. Front Biosci, 2011, 16: 865-897.

[11] Higuchi Y, Kabasawa Y, Sato M, *et al*. Effect of recombinant human fibroblast growth factor-2 on bone formation in rabbit mandibular distraction models using beta-tricalcium phosphate[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2010, 50(2): 95-104.

[12] Yang Y, Yang Y, Li X, *et al*. Functional analysis of core binding factor a1 and its relationship with related genes expressed by human periodontal ligament cells exposed to mechanical stress[J]. Eur J Orthod, 2010, 32(6): 698-705.

[13] Thomas G P, Brown M A. Genomics of ankylosing spondylitis[J]. Discov Med, 2010, 10(52): 263-271.

[14] Galliera E, Randelli P, Dogliotti G, *et al*. Matrix metalloproteases MMP-2 and MMP-9: are they early biomarkers of bone remodelling and healing after arthroscopic acromioplasty?[J]. Injury, 2010, 41(11): 1204-1207.

[15] Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Stadmeyer L, *et al*. Skeletal overexpression of connective tissue growth factor impairs bone formation and causes osteopenia[J]. Endocrinology, 2008, 149(9): 4374-4381.

[16] Ranly D M, McMillan J, Keller T, *et al*. Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A Study of Immunocompromised mice[J]. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87(9): 2052-2064.

[17] Trebec-Reynolds D P, Voronov I, Heersche J N, *et al*. VEGF-A expression in osteoclasts is regulated by NF-kappaB induction of HIF-1alpha[J]. J Cell Biochem, 2010, 110(2): 343-351.

[18] Shomento S H, Wan C, Cao X, *et al*. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha exert both distinct and overlapping functions in long bone development[J]. J Cell Biochem, 2010, 109(1): 196-204.

(收稿:2010-12-25 修回:2011-01-19)

(编辑 栾 嘉)