DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.01.012
第25卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 1
2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

文章编号:1000-5404(2003)01-0029-04

论著

神经干细胞分化前后基因表达变化的DNA微阵列分析

李 巍[1],杨 忠[1],Lowrence[2],蔡文琴[1],李成仁[1],周德山[1] ([1]第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038;[2]香港城市大学分子生物学教研室,香港)

提 要:目的 了解神经干细胞分化前后的差异表达基因,为神经干细胞的分化调控提供基础研究资料。方法 利用细胞培养、DNA微阵列技术等,检测了神经干细胞分化前后的差异表达基因。结果 检测到了1 000多个差异表达基因,其中明显上调的基因138个,明显下调的基因179个,基因种类很多如细胞周期相关基因、发育与分化相关基因、受体与通道相关基因、细胞骨架相关基因、生长因子相关基因、原癌基因和抑癌基因、转录和翻译调节基因、ESTs、代谢调节、蛋白运输相关基因等。结论 大量基因参与了神经干细胞的分化调控,其确切调控机制,还有待于进一步深入研究。

关键词:神经干细胞;分化调控;DNA微阵列
中图法分类号:R322.8;R329.21;R394.2 文献标识码:A

DNA microarray analysis of gene expression of differentiated human neural stem cells

LI Wei, YANG Zhong, Lowrence, CAI Wen-qin, LI Cheng-ren, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the differential gene expression of neural stem cells (NSCs) in their neurosphere state with differentiation, so as to provide basic research data for differentiation regulation of NSCs. Methods Differential gene expression before and after the differentiation of neural stem cells was investigated by cell culture, DNA microarray, etc. Results More than 1000 genes (138 up-regulation genes and 179 down-regulation genes) of differential expression were detected. They were related with cell cycle genes, development and differentiation genes, receptor and signal channel genes, cellular skeleton genes, cell signal genes, growth factor genes, oncogenes and anti-oncogenes, transcription and translation genes, ESTs genes, metabolic regulation and protein traffic genes, etc. Conclusion A lot of genes are involved in differentiation regulation of neural stem cells, but further studies of the mechanism are needed.

Key words: neural stem cell; differentiation regulation; DNA microarray

随着神经干细胞的分离、培养成功,探索神经干细胞的增殖、分化机制,成为人们关注的焦点。首先,它将为阐明神经系统发育机制提供有力证据;其次,能促进神经干细胞向着应用的目的定向分化,为神经退行性疾病、中枢神经系统损伤等提供新的治疗途径,具有广泛的应用前景。目前已知,神经干细胞的分化受内在的遗传信息和外在的多种因素调控。外在因素如细胞因子、神经营养因子等对神经干细胞分化的影响已有一些了解;但内在的遗传信息如何调控,目前所知甚少。因此,本实验利用分离培养第5代的人胚胎神经干细胞及其被胎牛血清诱导分化7 d后细胞,用高密度DNA微阵列(9 984个基因)技术,初步探查了神经干细胞分化前后基因表达变化情况,为进一步研究神经干细胞的分化调控提供基础资料。

1 材料和方法

收集培养第5代的人神经干细胞和同代人神经干细胞经不同浓度胎牛血清诱导分化后细胞(人神经干细胞的分离培养及鉴定方法见文献[1]),用Tripure试剂(宝灵曼公司)裂解细胞,根据说明分离总RNA。用SuperScript Ⅱ逆转录酶将对照组(人NSCs)和实验组(人NSCs分化后细胞)的150 μg总RNA分别逆转录为cDNA,转录过程中用标有Cy3、Cy5的dUTP分别参入对照组和实验组的cDNA,在高密度DNA微阵列(9 984 genes,6 cm×2 cm杂交面积.由香港城市大学提供)上杂交,杂交后用ScanArray 4000扫描仪扫描获取微阵列图像,扫描的图像经斯坦福大学的ScanAlyze软件分析(由香港城市大学完成)。

2 结果

2.1 总RNA的分离收集

用Tripure直接分离神经干细胞和各诱导分化细胞的总RNA,经0.1%凝胶电泳,结果见图1;分光光度计检测,各组分别获得约500 μg总RNA。

作者简介:李 巍(1964-),女,四川省双流县人,博士,实验师,主要从事神经发育和再生方面的研究。电话:(023)68752229
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail:wenqin@public.cta.cq.cn
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-12-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

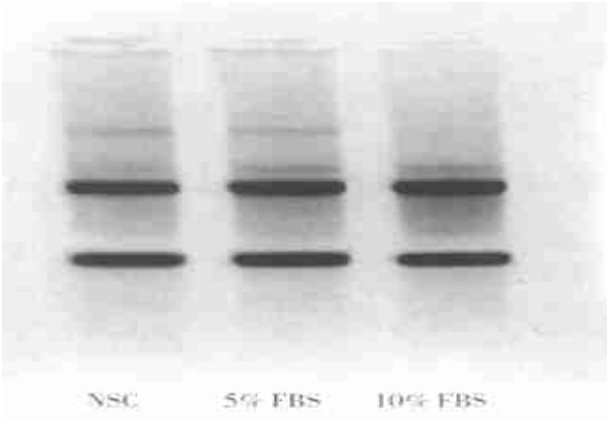
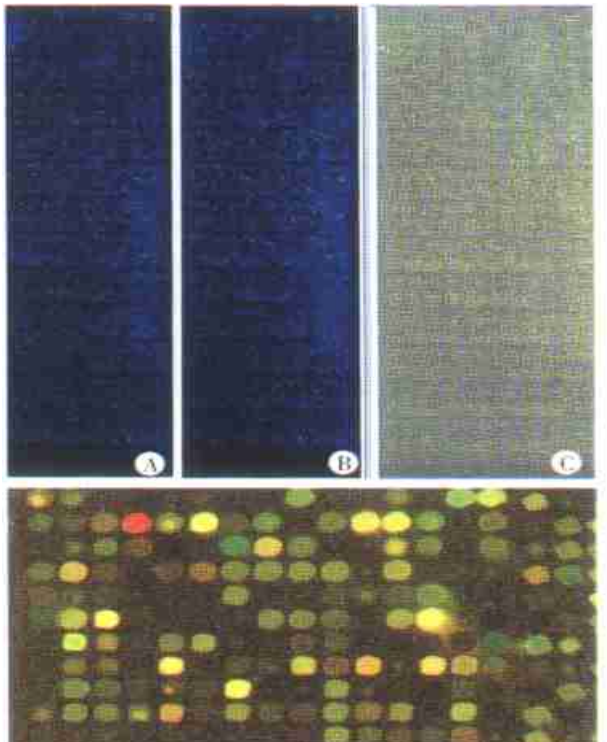


图 1 NSC 分化前后细胞内 RNA 电泳图

Fig 1 Electrophoresis of total RNA in NSCs and NSC differentiated cells on 0.1% agarose gel

2.2 ScanArray 4000 扫描仪扫描获取微阵列图像

本实验只扫描了神经干细胞与 10% 胎牛血清诱导分化后 7 d 的 DNA 微阵列图像，结果见图 2。



A: Cy-3 channel scanning map; B: Cy-5 channel scanning map; C: scanning map after the conjugation of Cy-3 and Cy-5; D: The local enlargement of C, Red: up regulation genes; Green: down-regulation genes; Yellow: genes with no significant difference of expression

图 2 NSC 分化前后 DNA 微阵列扫描图

Fig 2 The DNA microarray scanning map of NSCs and NSC differentiated cells

2.3 DNA 微阵列图像分析

扫描的图像经斯坦福大学的 ScanAlyze 软件分析，获得了神经干细胞与诱导分化后细胞的差异基因共 1 000 多个，其中明显上调的基因有 138 个，明显下调的基因有 179 个。基因种类很多，如与细胞周期相关基因、发育与分化相关基因、受体与通道相关基因、细胞骨架相关基因、生长因子相关基因、原癌基因和抑癌基因、转录和翻译调节基因、EST 基因、代谢调节、蛋白运输相关基因等。现就一些功能相关基因作统计并列表，如细胞周期相关基因共 17 个，上调基因只有 2 个，下调基因 15 个，见表 1；发育与分化相关基因共 24 个，上调基因 10 个，下调基因 14 个，见表 2；受体与通道相关基因共 25 个，上调基因 13 个，下调基因 12 个；转录与翻译相关基因共 27 个，上调基因 6 个，下调基因 21 个等。

表 1 细胞周期相关基因(部分)

Tab 1 Cell cycle-related genes(Part)

Accession	Description	Ratio(cluster)
AV714320	defender against cell death 1	6.843 28 (1)※
BE268611	cell division cycle 2-like 2	3.402 99 (1)※
BE797921	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	0.049 13 (1)
AL576523	cyclin G2	0.118 11 (1)
Z23022	cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)	0.14067 (1)
NM-001241	cyclin T2	0.143 67 (1)
N87720	cyclin B2	0.149 94 (1)
AA523378	proliferating cell nuclear antigen	0.157 41 (1)
NM-001759	cyclin D2	0.189 08 (1)
AA419596	CDC28 protein kinase 2	0.208 10 (1)
NM-004702	cyclin E2	0.240 93 (1)
AI819476	cyclin C	0.275 14 (1)
AV722422	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kD)	0.293 48 (1)
BF968871	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	0.313 71 (1)
NM-004642	CDK2-associated protein 1	0.369 59 (1)

※: up regulation gene, other is down regulation gene

表 2 发育与分化相关基因(部分)

Tab 2 Development-or differentiation-related genes(Part)

Accession	Description	Ratio(cluster)
AU121926	cysteine and glycine-rich protein 1	9.589 55 (2)※
NM-000615	neural cell adhesion molecule 1	7.337 69 (2)※
NM-006129	bone morphogenetic protein 1	7.223 88 (2)※
NM-000240	monoamine oxidase A	6.561 57 (2)※
AU135898	Norrie disease (pseudoglioma)	5.455 22 (2)※
AL543480	developmentally regulated GTP binding protein 2	4.893 66 (2)※
AK002120	doublecortex; lissencephaly, X-linked (doublecortin)	0.039 59 (2)
AI540344	glycoprotein M6B	0.043 46 (2)
AA436624	fatty acid binding protein 7, brain	0.050 81 (2)
NM-014848	synaptic vesicle protein 2B homolog	0.080 92 (2)

※: up regulation gene, other is down regulation gene

3 讨论

基因芯片(Gene chip)，又称 DNA 芯片，是指将许

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

多特定的寡核苷酸片段或 cDNA 基因片段作为探针, 有规律地排列固定于支持物上, 然后与待测的标记样品的基因按碱基配对原理进行杂交, 再通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描, 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。利用 DNA 芯片技术研究中枢神经系统发育及疾病时的基因表达差异, 有一些文献报道, 但数目极少。如 2002 年, Zhao 等[2] 利用寡核苷酸微阵列技术, 研究了小鼠不同发育期大脑皮层颗粒细胞前体细胞的基因表达差异, 结果发现, 80%的基因在生后 7 d 时, 高表达, 但在生后 15 d 时明显下调。提示在大脑皮层前体细胞的发育过程中, 基因表达有时间和空间的限制性。2001 年, Zhou 等[3] 用 DNA 芯片技术分析了保存 6 年的大鼠纹状体神经前体细胞分化早期(诱导分化后 24 h)的差异基因, 结果显示, 分化后, 81 种基因表达上调, 细胞生长、轴突生长、突触生长等相关基因被激活等。

本研究利用高密度 cDNA(9984 genes)微阵列, 检测了神经干细胞分化 7 d 后的表达差异基因, 获得了 1 000多个差异基因, 其中显著上调基因 138 个和显著下调基因 179 个。从所获资料简要分析如下:

从表 1 可得知, 在 17 个细胞周期相关基因中, 上调基因仅有 2 个(Defender against cell death 1, cell division cycle 2-like 2), 而下调基因有 15 个, 在显著下调的基因中, 大部分与神经元相关。在显著下调基因中有 CDK5[Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)], 此基因位于 17 号染色体上(17q11.2), 其功能蛋白含 307 个氨基酸, 分子量为 34×10^3, 是神经元所特异的蛋白。CDK5 是近 10 年才发现的 CDK 家族的又一成员, 在神经系统发育分化中有很大的特异性。CDK5 可存在于非分裂的神经元, 其特异的激动剂为一种分子量为 35×10^3 的神经特异蛋白 P35。已有的研究表明: CDK5/P35 是通过调节神经细胞微管相关蛋白 MAPs 如 Tau 蛋白的活性及细胞骨架蛋白如 nestin 的磷酸化而促进发育中神经细胞的迁移、轴突生长、粘连和细胞骨架动力学等[4]。对 CDK5(-/-)小鼠的研究表现其中枢神经系统从大脑皮质到脑干的发育异常, 颗粒细胞保持在分子层, 不迁移到颗粒细胞层[5]; 而单纯 P35(-/-)小鼠出现严重的皮质分层缺陷, 部分小鼠患癫痫等症。故认为 CDK5/P35 共同参与皮质发育中的神经元迁移、轴突生长和神经退行性变, 并调节神经元的粘连和细胞骨架动力学[6]。

CDC2 (Cell division cycle 2), 为显著上调的基因, 此基因位于 10 号染色体上(10q21.1, 功能蛋白含有 297 个氨基酸, 分子量为 34×10^3 ($P34cdc_2$), 在控制真核细胞细胞周期中起重要作用, 在细胞内它构成了 M 期促进因子 MPF(即 M 期特异性的组蛋白 H_2 激酶)活性亚单位, cdc2 对细胞周期中 G_1/S 和 G_2/M 的转变非常重要。P34cdc2 是一个细胞周期蛋白(Cyclin)依赖性蛋白激酶(Cdk), 它由周期蛋白 A 激活。异构型的 CDC2 在乳腺癌中被发现, 它不能与周期素 b1(Cyclin b1)和 cdk 抑制剂 p21 结合[7]。

从表 2 中可以看出, 参与神经干细胞分化的神经系统早期发育分化相关基因无论是上调基因还是下调基因均很多。其中 X-连锁双皮质基因(X-linked (doublecortin))显著下调, DCX 或称 XLIS 位于 X 染色体上(Xq22.3-q23), 功能蛋白含 402 个氨基酸, 分子量为 44×10^3, 目前尚未发现结构类似物, 是大脑皮层发育期, 皮质板形成和神经元分散初期所需要的蛋白, 与神经元蛋白激酶 dcamkl 1 竞争结合目的蛋白, 并参与迁移前和迁移中神经元间的信号传导通路, 可能是钙离子-依赖的信号传导通道的一部分, 放弃重叠的 lis-1, 此信号传导通路促进神经元迁移[8]。

诱导神经干细胞分化后, 所获得的转录和翻译相关基因中, 大部分明显下调。我们知道, 细胞命运最终是由可刺激或抑制特异基因表达的转录因子决定的, 神经元分化的时间、位点、数量等问题都可用转录因子的时、空调控来解释。这种调控很复杂, 目前对其机制虽有一些了解, 但其确切机制还知之甚少。另外, 同源框阅读相关基因、细胞粘附分子相关基因和生长因子相关基因等, 在神经干细胞分化中, 它们的基因表达均发生了不同程度的变化, 它们如何参与、怎样调控神经干细胞的分化等, 有待于进一步分析、研究。

总之, DNA 微阵列对于获得不同组织、不同器官的、不同分化发育阶段的差异基因是一种快捷、方便的优异手段。本研究所获得的绝大多数功能相关基因还未进行分析、处理、证实, 目前只是初步地对极个别功能基因进行简要分析, 大量的工作如重要基因功能的研究等还在继续进行中。

参考文献:

[1] 李　巍, 蔡文琴, 吴　康. 人胚胎大脑皮层神经干细胞分离培养[J]. 解剖学报, 2002, 33(3): 241－243.

[2] Zhao Q, Kho A, Kenney A M, *et al*. Identification of genes expressed with temporal-spatial restriction to developing cerebellar neuron precursors by a functional genomic approach[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(8): 5704－5709.

[3] Zhou F C, Duguid J R, Edeberg H J, McClintick J, *et al*. DNA microarray analysis of differential gene expression of 6-year-old rat neural stratial progenitor cells during early differentiation[J]. Restor Neurosci, 2001, 18(2－3): 95－104.

[4] Munoz J P, Alvarez A, Maccioni R B. Increase in the expression of the

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

neuronal cyclin-dependent protein kinase cdk5 during differentiation of N2A neuroblastoma cells[J]. Neuroreport, 2000, 21, 11(12): 2733—2738.
[5] Ohshima T, Gilmore EC, Longenecker G, *et al*. Migration defects of cdk5 (-/-) neurons in the developing cerebellum is cell autonomous[J]. J Neurosci, 1999, 19(14): 6017—6026.
[6] Paglini G, Caceres A. The role of the Cdk5-p35 kinase in neuronal development[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(6): 1528—1533.
[7] Deshimaru S, Miyake Y, Ohmiya I, *et al*. Heterologous expression and catalytic properties of the C-terminal domain of starfish cdc25 dual—specificity phosphatase, a cell cycle regulator[J]. J Biochem (Tokyo), 2002, 131(5): 705—712.
[8] Sossey-Alaoui K, Hartung A J, Guerrini R, *et al*. Human doublecortin (DCX) and the homologous gene in mouse encode a putative Ca^{2+}-dependent signaling protein which is mutated in human X-linked neuronal migration defects[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(8): 1327—1332.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)01-0032-01

爱疗素软膏治疗伤口愈合不良的临床观察

Clinical observation of the treatment of chronic wounds with Iruxol mono

刘俊红, 许民辉, 李 霞 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所门诊部, 重庆 400042)

坏死组织紧密附着于伤口的基底部, 是影响其愈合的重要因素之一, 有效清除坏死组织是伤口愈合的前提。爱疗素(Iruxol mono 德国基诺药厂)是近年来用于临床的一种酶学清创剂, 具有清除坏死组织、促进伤口愈合的作用[1]。本研究观察了15例愈合不良伤口采用爱疗素治疗的疗效, 并与凡士林油纱布治疗相对照, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1999-04至2000-01门诊观察了31例慢性愈合不良伤口, 其中1例因面积过大(40 cm×9 cm)予剔除, 随机分成爱疗素软膏治疗组15例, 凡士林油纱对照组15例。治疗前创面存在时间: 治疗组18~180 d, 平均40.8 d; 对照组14~60 d, 平均30.9 d。创面面积: 治疗组6.25~66 cm^2, 平均14.9 cm^2; 对照组4.5~30 cm^2, 平均12 cm^2。致伤原因包括外伤、皮肤感染、烫伤、褥疮和放射线损伤, 创面部位在头、足、上下肢、肛周及躯干等。

1.2 治疗方法

治疗组: 将创面消毒清洗后以0.9%生理盐水湿润, 再在创面上涂一层约2 mm厚的爱疗素软膏, 外以凡士林油纱布与透气的干纱布覆盖包扎。若创面有干痂应先用0.9%生理盐水敷料湿润。隔日换药1次。

对照组: 将创面局部消毒清洗后, 不用爱疗素及其它药物而以凡士林油纱布作内层敷料, 其它同治疗组。

1.3 观察方法

两组病人均于换药后第0、4、7、11、14、18、21、25、28天由专人用统一配发的直角尺测量伤口大小及坏死组织所占面积, 并于第0、7、14、28天拍照, 且对全过程详细记录。

2 结果

2.1 创面愈合情况

治疗组创面完全愈合时间7~28 d, 平均21.7 d, 共14例, 占93.3%; 对照组创面完全愈合时间207~28 d, 平均26 d, 共8例, 占53.3%, 经χ^2检验, $P<0.05$, 差异显著。

2.2 不良反应

治疗组有3例患者主诉换药后前3 d感可以耐受的针刺样疼痛, 随后消失。

3 讨论

通过本组病例观察, 发现: ①使用爱疗素软膏后坏死组织可自行脱落或容易被清除; ②对创面伴有感染者, 与1∶5 000呋喃西林湿纱布并用可提高疗效; ③使用爱疗素后肉芽组织呈鲜红色, 利于创面愈合。

由于爱疗素软膏具有无痛性、不流血、无需麻醉就能清除坏死组织等作用, 且能促进伤口愈合, 使用安全、方便(可以家庭应用)[2]。

关键词: 愈合不良伤口; 酶学清创; 爱疗素软膏
中图法分类号: R641.05 文献标识码: B

参考文献:

[1] Palmier B, Magri M. A new formulation of collagenase ointment in the treatment of ulcers of the lower extremities: A randomised, placebo-controlled, double-blind study[J]. Clin Drug Invest, 1998, 15(5): 381—387.
[2] Jung W, Winter H. Considerations for the use of clostridial collagenase in clinical practice[J]. Clin Drug Invest, 1998, 15(3): 245—252.

(编辑 潘式文)

作者简介: 刘俊红(1962—), 女, 四川省盐亭县人, 主管护师, 主要从事创伤愈合方面的研究, 发表论文5篇。电话: (023)68757293

收稿日期: 2002-10-30; 修回日期: 2002-12-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net