

## 基因表达谱芯片在免疫高敏相关基因筛选中的应用

陈海, 郑军华\*, 闵志廉, 朱有华(第二军医大学长征医院泌尿外科, 上海 200003)

**[摘要]** **目的:**探讨基因表达谱芯片技术在高通量筛查肾移植免疫高敏相关基因群中的应用价值,初步筛选肾移植免疫高敏的相关基因。**方法:**应用含有4 096条人类基因的cDNA表达谱芯片,对免疫高敏即群体反应性抗体(PRA)≥50%的尿毒症患者和PRA阴性的尿症患者外周血淋巴细胞的基因表达谱进行分析。**结果:**免疫高敏患者外周血淋巴细胞中差异表达的基因有17个,其中下调基因9个,上调基因8个。其中部分基因可能与免疫高敏的发生有关。**结论:**免疫高敏的发生机制涉及多个基因,应用基因芯片技术能够有效筛选出免疫高敏的相关基因。

**[关键词]** 群体反应性抗体;肾移植;基因芯片;基因表达

**[中图分类号]** R 699.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0075-05

### cDNA microarray in screening sensitization-associated genes of peripheral lymphocytes in highly sensitized patients

CHEN Hai, ZHENG Jun-hua\*, MIN Zhi-lian, ZHU You-hua (Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To scan sensitization-associated genes of lymphocytes in highly sensitized patients and to explore molecular mechanisms of high sensitization (panel reactive antibody [PRA] ≥ 50%). **Methods:** The mRNA of peripheral lymphocytes from highly sensitized patients and non-sensitized patients (PRA = 0) awaiting kidney transplantation was analyzed for the expression of 4 096 human genes using cDNA microarray. The results were analyzed by bioinformatics. **Results:** The expression of 8 genes were up-regulated and 9 genes down-regulated (>2 folds) in highly sensitized patients. Among these genes, some were related with immune, cell division, cell apoptosis and cell proliferation, signal transduction, etc., and others were undefined. **Conclusion:** Many various genes are involved in the pathogenesis of high sensitization. cDNA microarray technology is useful for screening differentially expressed genes of lymphocytes and sensitization-associated genes.

**[KEY WORDS]** panel reactive antibody; kidney transplantation; DNA microarray; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 75-79]

肾脏移植目前已成为治疗终末期肾病(ESRD)的最有效的方法。在等待移植的患者中,有25%~30%的患者由于多次输血、妊娠或曾经移植等原因,受到同种HLA免疫致敏而产生高水平群体反应性抗体(panel reactive antibody, PRA)。PRA高水平的标准不一,目前根据PRA值将患者分为非致敏(<5%)、致敏(5%~84%)及高敏患者(>85%),或者把PRA阳性患者分为轻度致敏(<10%)、中度致敏(10%~50%)和高度致敏(>50%),或者把PRA<40%作为可接受移植范围。HLA是介导器官移植排斥反应的主要分子,PRA增高的患者移植危险性较高,术中或术后超急性、加速性、急性、慢性排斥反应的发生率较高,是造成超急性排斥反应和移植物丢失的主要原因,因而往往成为移植的禁忌<sup>[1~3]</sup>。如何准确判断和适当处理这类患者术前的免疫致敏状态,对于减少移植后排斥反应、提高移植成功率和移植物存活率具有重要意义。目前对免疫高致敏患者的治疗虽有多种方法,但治疗效果仍不

尽人意<sup>[4,5]</sup>。由于免疫高敏的发生机制尚不明确,病因学研究同时也很重要。本实验应用基因芯片技术对免疫高敏受者外周血淋巴细胞进行研究,筛选、分析差异表达的基因,以期了解免疫高敏相关基因及其调控网络,从基因水平揭示淋巴细胞在免疫高敏发生中的分子机制。

### 1 材料和方法

1.1 临床资料和实验分组 (1)实验组(免疫高敏组):选择16例等待肾移植的高敏患者(PRA≥50%),其中男性5例,女性11例,平均年龄40岁(24~55岁),平均PRA值73.1%(56.4%~100%)。原发病均为慢性肾小球肾炎,血液透析治

**[基金项目]** 全军医药卫生科研“十五”规划重点攻关课题(01Z061);上海市科学技术发展基金(014119042)。

**[作者简介]** 陈海(1972-),男(汉族),博士,主治医师。

E-mail: chenhaich@hotmail.com

\* Corresponding author. E-mail: Zhengjh0471@sina.com

疗时间平均 3.5 年(2~6 年)。其中 5 例男性患者均接受过 1 次肾移植手术,因慢性排斥反应导致移植肾功能丧失。11 例女性患者中,除 2 例外,其余均有 1 次肾移植史或生育史,1 例曾有超急性排斥反应发生史。实验组随机分为实验 I 组和实验 II 组,每组 8 例。(2)对照组(PRA 阴性组):选择 16 例 PRA 阴性的等待首次肾移植的患者,其中男性 5 例,女性 11 例,平均年龄 37.9 岁(24~52 岁)。原发病均为慢性肾小球肾炎,血液透析治疗时间平均 0.5 年(1 个月至 2 年)。采用共同对照:实验 I 组和实验 II 组分别与该对照组进行比较。

1.2 主要仪器和试剂 淋巴细胞分离液购于上海试剂二厂,总 RNA 抽提试剂 TRIzol、dNTPs 购于 Life Technologies 公司,mRNA 纯化试剂盒购于 Qiagen 公司,BiostarH-40s 表达谱芯片和探针标记杂交试剂盒、ScanArray4000 芯片扫描仪均来源于上海市联合基因科技集团。

1.3 方法

1.3.1 淋巴细胞分离 每位患者抽取外周血 10 ml,肝素抗凝,以密度梯度离心法分离外周血淋巴细胞。将抗凝血缓慢转入等量淋巴细胞分离液上层,于冷冻离心机中 3 000 r/min 离心 30 min,分离出淋巴细胞。同组患者的淋巴细胞混合,加入 TRIzol 试剂于 -70℃ 保存。

1.3.2 总 RNA 抽提和测定 采用一步法以 TRIzol 试剂分别提取实验组和共同对照组的外周血淋巴细胞总 RNA<sup>[6]</sup>。紫外分光光度计检测总 RNA  $D_{260}$  和  $D_{280}$ ,并进行热稳定试验,在 -20℃ 和 70℃ 保温 1 h 后琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。按照 Qiagen 公司操作说明书采用 Oligotex mRNA Mini Kit 提取纯化 mRNA。

1.3.3 芯片制备 BiostarH-40s 表达谱芯片包含 4 096 个靶基因 cDNA 克隆,均以通用引物进行 PCR 扩增制备。

1.3.4 表达谱探针制备 参照 Schena 等<sup>[7]</sup>的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。实验组和对照组总 RNA 取用量各为 25 μg。用 Cy3-dUTP 标记对照组细胞,用 Cy5-dUTP 标记实验组细胞。

1.3.5 芯片杂交和洗涤 探针溶解在 20 μl 5×SSC+0.2%SDS 杂交液中。将芯片和杂交探针分别于 95℃ 水浴变性后置于杂交舱内,加入混合探针,排除气泡后用杂交密封舱加以密闭,在 60℃ 恒温杂交箱内杂交 16 h。然后按顺序用 2×SSC+0.2%SDS 溶液、0.1%SSC+0.2%SDS 溶液及 0.1%SSC 溶液各洗涤 10 min,室温晾干。2 组实验

组分别与共同对照组进行实验。

1.3.6 荧光扫描和结果分析 以 ScanArray4000 芯片扫描仪扫描芯片,以 40 个管家基因对原始数据进行标化处理,采用 GenePix Pro 3.0 图像处理软件分析 Cy3、Cy5 荧光信号强度,计算 Cy5/Cy3 值。用以下 3 个条件作为判定基因差异表达的标准(阳性结果判断):(1)Cy3、Cy5 值均 >200 或者其一 >800;(2)Cy5/Cy3 信号比值 >2.0 或 <0.5 (Cy3 和 Cy5 信号值相差 2 倍以上);(3)两次实验结果一致才被采用,否则被剔除。

1.3.7 差异表达基因生物信息学分析 对筛选出的差异表达基因,参考 NCBI 网上公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查阅相应的基因信息,并参考相关文献对部分基因进行分析、研究。

2 结果

2.1 总 RNA 提取结果 从免疫高敏组(实验 I 组、实验 II 组)和共同对照的 PRA 阴性组外周血淋巴细胞提取总 RNA,经电泳质检,在 -20℃ 和 70℃,18S 和 28S 条带清晰(图 1),分别为 70.0、62.8 和 149.2 μg,  $D_{260}/D_{280}$  值分别为 2.088、2.033 和 1.992。证实已提取高纯度总 RNA。

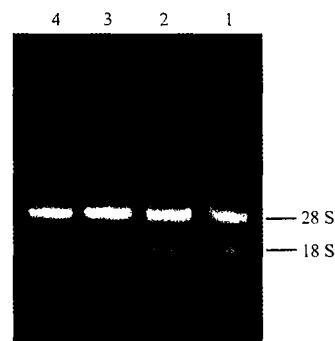


图 1 高敏患者和 PRA 阴性患者外周血淋巴细胞总 RNA 凝胶电泳图  
Fig 1 Results of total RNA on agarose gel electrophoresis in highly sensitized patients and non-sensitized patients

1: Highly sensitized group I; 2: Highly sensitized group I at 70℃ for 1 h; 3: Control group; 4: Control group at 70℃ for 1 h

2.2 芯片杂交结果

2.2.1 基因芯片杂交扫描图 图 2 为高敏患者(I 组)和 PRA 阴性患者外周血淋巴细胞样本双色荧光标记叠加图。对于某一点的两种叠加荧光信号,如果 Cy3 信号较强,该点多显绿色(基因表达下调);如果 Cy5 信号较强,该点多显红色(基因表达上调);如果强度相似,即显黄色。

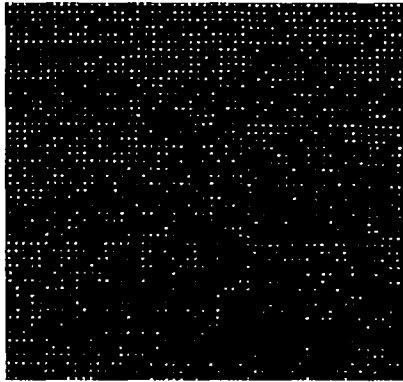


图 2 高敏患者 (I 组) 和 PRA 阴性患者外周血淋巴细胞样本双色荧光标记叠加图

Fig 2 Two fluorescent-labelled overlay map of lymphocytes in highly sensitized patients (group I) and non-sensitized patients

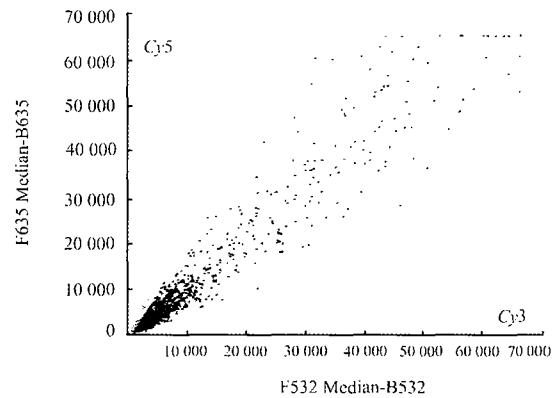


图 3 高敏患者 (I 组) 和 PRA 阴性患者外周血淋巴细胞样本杂交信号强度散点图

Fig 3 Scatter maps of blotting signals of lymphocytes in highly sensitized patients (group I) and non-sensitized patients

2.2.2 杂交信号强度散点图 图 3 为高敏患者 (I 组) 和 PRA 阴性患者外周血淋巴细胞样本杂交信号强度散点图。Cy3、Cy5 分别为为 PRA 阴性患者和高敏患者外周血淋巴细胞的荧光强度。X 轴、Y 轴分别以 Cy3 荧光强度值和 Cy5 荧光强度值为坐标, 每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号; 数据点若为红色, 则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 至 2.0 之间, 基本属非差异表达, 其中 45° 直线上的数据点  $Cy5/Cy3=1$ ; 数据点若为黄色, 则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 到 2.0 范围之外, 该点属于表达差异。

2.3 免疫高敏可能的相关基因分析 见表 1。2 组免疫高敏患者与共同对照的 PRA 阴性患者比较, 分别有 76 个和 107 个差异表达基因, 其中相同的基因有 17 个, 9 个下调, 8 个上调。其中免疫相关的基因 4 个, 原癌基因和抑癌基因 5 个, 离子通道和运输蛋白类 1 个, 细胞周期蛋白类 1 个, 细胞骨架和运动蛋白类 1 个, 细胞凋亡相关的蛋白 1 个, 细胞信号和传递蛋白 1 个, 代谢类 2 个, 蛋白翻译合成类 2 个, 发育相关 1 个, 功能尚未明确者 6 个 (部分基因的参考功能分类多于 1 种)。

表 1 免疫高敏患者与 PRA 阴性患者外周血淋巴细胞差异表达的基因

Tab 1 Differentially expressed genes of lymphocytes between highly sensitized patients and non-sensitized patients

GenBank ID	Ratio 1	Ratio 2	Definition
NM-002430	0.204	0.179	Meningioma(disrupted in balanced translocation) 1(MN1)
NM-001650	0.245	0.276	Aquaporin 4(AQP4), transcript variant a
AB020676	0.367	0.344	mRNA for KIAA0869 protein, partial cds
NM-030878	0.343	0.387	Cytochrome P450, subfamily II C(mephenytoin 4-hydroxylase), polypeptide 8(CYP2C8), transcript variant Hp1-2
NM-002599	0.312	0.496	Phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated(PDE2A)
NM-002500	0.445	0.423	Neurogenic differentiation 1(NEUROD1)
NM-001709	0.445	0.436	Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)
NM-000499	0.419	0.475	Cytochrome P450, subfamily I (aromatic compound-inducible), polypeptide 1(CYP1A1)
NM-001354	0.452	0.461	Aldo-keto reductase family 1, member C2(dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)(AKR1C2)
NM-032986	2.028	2.057	Sec23(S. cerevisiae) homolog B(SEC23B), transcript variant 3
NM-005335	2.052	2.066	Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1(HCLS1)
NM-030666	2.094	2.057	Serine(or cysteine) proteinase inhibitor, clade B(ovalbumin), member 1(SERPINB1)
NM-006330	2.171	2.003	Lysophospholipase I (LYPLA1), mRNA
NM-002087	2.139	2.410	Granulin(GRN)
NM-001316	2.513	2.091	Chromosome segregation 1(yeast homolog)-like(CSE1L)
NM-006417	2.855	2.956	Interferon-induced, hepatitis C-associated microtubular aggregate protein(44 000)(MTAP44)
NM-015907	2.535	3.372	Leucine aminopeptidase(LOC51056)

### 3 讨论

3.1 免疫高敏的发病机制有待进一步揭示 等待肾移植的患者体内可能会产生各种抗体,主要是抗HLA-A、B、DR等抗原的抗体。致敏的分子机制尚不明确,其中可能涉及淋巴细胞多种基因的表达变化与调控,确切的作用机制尚需深入研究。由于传统的分子生物学方法大多局限于单个或几个基因的分析,无法阐明某一病理生理过程中多个基因的复杂作用及其相互调控关系。近年发展起来的基因芯片技术则可以满足此要求。本实验采用cDNA微矩阵基因芯片,对免疫高敏患者外周血淋巴细胞基因表达差异进行大规模扫描和分析,以期发现未知的致敏相关基因,从基因水平研究免疫高敏的发生机制,为下一步在基因水平对免疫高敏进行诊断和处理打下基础。

3.2 采用混合细胞标本进行淋巴细胞基因组分析的原因 由于免疫高敏为同种HLA免疫致敏而产生,目前国内外尚未能建立相关的动物模型。因此只能在人体进行研究。本研究即为体内研究。但研究对象无法取得器官标本,而是外周血。为了从尽量多的基因中筛选出未知的目的基因(即高敏相关基因),我们选用包含4 096个靶基因的芯片试剂盒,所需的血液标本量较大(实验组和对照组一般各需要200~300 ml),而尿毒症患者通常伴有中度到重度贫血,血液标本极为珍贵,单个患者不易提供足够的血液标本以进行个体化研究。为了进行该项探索性研究,我们采用多个患者的混合标本进行研究。为了降低生物学误差和实验的组间误差,减少个体差异的影响,我们把实验组分为I组和II组,采用共同对照。

本研究采用混合的细胞标本进行淋巴细胞基因组分析,有范例。已有研究者把各实验组和对照组中每个患者的血清标本进行同组混合,进行二维凝胶分析,得到混合的凝胶谱,从而有助于集中分析在背景差异之上的蛋白水平的有意义的变化。这种比较分析血清蛋白组的方法可用于鉴定肝癌及其他肝病血清生物标记物<sup>[8]</sup>。随着基因芯片在预测疾病发生、发展过程中的研究应用,采用混合的细胞标本进行淋巴细胞基因组分析将作为一种研究方法被逐渐采纳。

3.3 免疫高敏患者差异表达基因可能的有关功能

提示 本研究结果发现,2组高敏患者差异表达的基因分别多达76个和107个,反映出高敏患者体内多种抗体的产生可能受到多个基因调控的复杂过程。初步分析其中共同的17个基因,尤其是部分免疫相关功能已初步明确的基因,发现免疫高敏相关基因可能涉及多种类、多个基因,共同参与调控免疫高敏的发生。这些基因的表达变化与淋巴细胞的活化、增殖、凋亡等相关,从而影响高敏患者的免疫性,导致高敏的发生,并可进一步影响高敏患者接受移植后的反应。

在表达上调的基因(ratio>2.0)中,NM\_00633编码的溶血磷脂酶I是作用于生物膜调节多功能溶血磷脂的酶。NM\_002087编码的颗粒体蛋白与人上皮素1、2相似。上皮素诱导上皮细胞分泌中性粒细胞吸引剂IL-8,而上皮素前体通过TNF阻断中性粒细胞激活,防止氧化剂和蛋白酶释放<sup>[9]</sup>。NM\_005335编码造血细胞特异性Lyn底物1(HCLS1),即造血特异性蛋白(HS1)。HS1基因编码蛋白酪氨酸激酶的主要底物。该蛋白参与在B和T细胞抗原受体开始的信号转导通道<sup>[10]</sup>。这些基因的高表达可能增加了高敏患者的致敏性,但还需深入研究。NM\_030666编码丝氨酸蛋白酶抑制因子,即单核细胞/中性白细胞弹性蛋白酶抑制因子(MNEI)。MNEI对细胞和体液免疫有强大的抑制作用,延长大鼠移植肝存活,显著降低TNF- $\alpha$  mRNA水平<sup>[11]</sup>,但MNEI可快速抑制中性白细胞弹性蛋白酶以及有弹性蛋白酶样和糜蛋白酶样特性的蛋白酶,是一个双重特异性的抑制因子,促进快速有效的抑制细胞蛋白酶反应,包括3种中性粒细胞颗粒蛋白酶<sup>[12]</sup>。可见其在致敏中的可能作用较为复杂,有待进一步研究。NM\_001316编码酵母菌染色体分离基因产物类似物(CSE1L),即人细胞凋亡易感(CAS)蛋白,属于细胞周期蛋白和细胞凋亡相关蛋白,在细胞凋亡和增殖均起重要作用。CAS蛋白是细胞核运输几种增生激活蛋白、转录因子、癌基因和抑癌基因产物所必需的<sup>[13]</sup>,其水平在增生细胞高,在非增生细胞低<sup>[14]</sup>。淋巴细胞内环境稳定是淋巴细胞增生和死亡的平衡。凋亡的严密调控对免疫功能是必需的,调控改变能导致自体免疫<sup>[15]</sup>。

在表达下调的基因(ratio<0.5)中,NM\_030878和NM\_000499编码细胞色素P450酶超家族成员CYP2C8和CYP1A1,分别属于离子通道和

运输蛋白类与免疫相关类基因,细胞色素 P450 蛋白是催化许多反应的单氧酶。NM\_001354 编码醛/酮还原酶超家族成员,属于代谢和免疫相关类基因。NM\_001709 编码的脑源性神经营养因子(BDNF)属于细胞信号和传递蛋白。免疫细胞(PBMC、B细胞、Th1细胞)分泌 BDNF 并表达其特异性受体 trkB。Th1 细胞因子 IL-2 刺激 trkB mRNA 的产物<sup>[16]</sup>。激活的人 T、B 细胞和单核细胞在体外分泌活性 BDNF,其中 Th1 和 Th2 CD4<sup>+</sup> T 细胞在特异性抗原刺激下 BDNF 产物增加<sup>[17]</sup>。而 BDNF 也能调节免疫细胞的细胞因子 mRNA 表达,影响 Th1 和 Th2 细胞因子以及 PBMC 或抗原特异性 T 细胞的细胞因子表达谱。在髓磷脂碱蛋白特异性 T 细胞株,BDNF 适当增加 INF- $\gamma$  mRNA<sup>[18]</sup>。这些基因对免疫状态的影响以及与致敏的关系有待进一步研究。

本实验中芯片所包含的基因数以及芯片杂交次数有限,初步探讨了免疫高敏的分子发生机制,为进一步研究提供了有益的线索。本实验为初步研究,更大规模的筛选和验证必将有助于揭示复杂的基因调控网络在免疫高敏发生中的作用。

#### [参考文献]

- [1] 郑军华, 闵志廉, 朱有华, 等. 肾移植超急性排斥反应的病理学机制及其临床对策[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(10): 709-712.
- [2] 郑军华, 李玉莉, 闵志廉, 等. 同种肾移植后超急性排斥反应的发生机制及临床对策: 附 66 例报道[J]. 中华器官移植杂志, 2000, 21(2): 114-116.
- [3] Kerman RH, Orosz CG, Lorber MI. Clinical relevance of anti-HLA antibodies pre and post transplantat[J]. *Am J Med Sci*, 1997, 313(5): 275-278.
- [4] 张爱民, 郑军华, 闵志廉. 群体反应性抗体的影响因素及高群体反应性抗体的临床对策[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(4): 381-384.
- [5] 唐孝达. 同种肾移植进展[J]. 中华器官移植杂志, 2002, 23(6): 323-324.
- [6] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156-159.
- [7] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1 000 genes

[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 10614-10619.

- [8] Steel LF, Shumpert D, Trotter M, et al. A strategy for the comparative analysis of serum proteoms for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma[J]. *Proteomics*, 2003, 3(5): 601-609.
- [9] Zhu J, Nathan C, Jin W, et al. Conversion of proepithelin to epithelins; roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair[J]. *Cell*, 2002, 111(6): 867-878.
- [10] Egashira M, Kitamura D, Watanabe T, et al. The human HCLS1 gene maps to chromosome 3q13 by fluorescence *in situ* hybridization[J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 72(2-3): 175-176.
- [11] Zhang JL, Yamaguchi Y, Mori K, et al. A serine protease inhibitor, N-alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, prolongs rat hepatic allograft survival[J]. *J Surg Res*, 2001, 96(2): 296-303.
- [12] Cooley J, Takayama TK, Shapiro SD, et al. The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(51): 15762-15770.
- [13] Behrens P, Brinkmann U, Wellmann A. CSE1L/CAS: its role in proliferation and apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 39-44.
- [14] Scherf U, Pastan I, Willingham MC, et al. The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(7): 2670-2674.
- [15] Thome M, Tschopp J. Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP[J]. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(1): 50-58.
- [16] Besser M, Wank R. Cutting edge: clonally restricted production of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA by human immune cells and Th1/Th2-polarized expression of their receptors[J]. *J Immunol*, 1999, 162(11): 6303-6306.
- [17] Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, et al. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor *in vitro* and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation[J]? *J Exp Med*, 1999, 189(5): 865-870.
- [18] Bayas A, Kruse N, Moriabadi NF, et al. Modulation of cytokine mRNA expression by brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in human immune cells[J]. *Neurosci Lett*, 2003, 335(3): 155-158.

[收稿日期] 2004-05-25

[修回日期] 2004-09-10

[本文编辑] 孙岩