

常染色体显性遗传多囊肾差异表达基因的研究

崔心刚*, 王立明, 朱有华 (第二军医大学长征医院全军器官移植研究所, 上海 200003)

[摘要] **目的:**应用表达谱芯片研究常染色体显性遗传多囊肾病(ADPKD)与正常肾组织基因表达的差异,探讨此病的致病因素及可能的治疗途径。**方法:**等量的人正常肾和ADPKD肾组织的mRNA分别用Cy3和Cy5逆转录荧光标记,制作cDNA探针,混合后与4 096点人cDNA表达谱芯片进行杂交,ScanArray4000扫描仪扫描芯片荧光信号图像,数字化处理和分析后比较两种组织基因表达谱的差异。RT-PCR法验证其中4条基因表达水平。**结果:**在ADPKD肾组织与正常肾组织中存在463条差异表达基因,其中206条基因在多囊肾组织中高表达,特别是细胞周期素D₂(cyclin D₂)、基质金属蛋白酶1(MMP1)、组织金属蛋白酶抑制因子1(TIMP1)、成纤维细胞活化蛋白基因等;257条基因在多囊肾组织中低表达,特别是蛋白磷酸酶1A、酸性磷酸酶1基因等。RT-PCR法验证的4条基因表达水平与芯片结果相一致。**结论:**ADPKD病理改变可能与细胞周期蛋白、MMPs以及各种生长因子相关基因的上调有关,钙调素抑制剂和MMPs抑制剂可能会对其有一定的治疗作用。

[关键词] 多囊肾,常染色体显性;肾;基因表达谱

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0182-04

Differential gene expression pattern between autosomal dominant polycystic kidney tissue and normal kidney tissue: a DNA microarray study

CUI Xin-gang*, WANG Li-ming, ZHU You-hua (Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the differential gene expression pattern between autosomal dominant polycystic and normal kidney tissue, and to deduce the etiological factor and treatment for autosomal dominant polycystic kidney disease(ADPKD). **Methods:** The cDNA probes were prepared by labelling normal kidney tissue mRNA and ADPKD tissue mRNA with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP separately through reverse transcription. The probes were then hybridized with the DNA microarrays (PCR products of 4 096 human cDNAs onto specially treated glass slides) and the fluorescent signals were scanned with ScanArray 4000 scanner. Semi-quantitative RT-PCR was performed to test the expression level of 4 related genes. **Results:** Of the 4 096 genes screened, 463 genes showed obvious changes. Expression of 206 genes was upregulated in the polycystic kidney tissue, especially cyclin D₂, MMPs, TIMP1 and fibroblast activation protein; expression of 257 genes was downregulated, especially phosphatase 1A and acid phosphatase 1. The expression of genes tested by RT-PCR was in accordance with those detected by cDNA microarray. **Conclusion:** ADPKD may be related to the upregulation of cyclin, MMPs, and various kinds of growth factors, and drugs like inhibitors of CaM and MMPs might have therapeutical effects on ADPKD.

[KEY WORDS] polycystic kidney, autosomal dominant; kidney; gene expression profiling

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 182-185]

常染色体显性遗传多囊肾病(ADPKD)是一种系统性疾病,约占终末期肾病的8%~12%,多数患者需肾脏移植。目前对ADPKD发病机制方面的研究虽取得了一定的进展,但具体机制仍不确切,因此一直提不出有效的针对性治疗方法。本研究通过表达谱芯片一次性、高通量地综合研究正常肾和ADPKD肾组织差异表达的基因,观察众多基因在正常及ADPKD肾组织中的表达差异,探讨ADPKD的致病因素以及可能的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 组织来源 6例正常肾组织和6例ADPKD组织取自长征医院泌尿外科2002年经病理确诊的

手术切除标本,均经病理确诊。患者平均年龄分别为(48±4)岁和(51±4)岁。ADPKD患者病程平均(12.7±4.3)年,均有典型的病史和家族史。

1.2 RNA抽提 mRNA纯化及探针制备 改良酚氯仿一步法抽提总RNA,样品经分光光度计检测光密度(D)。Oligotex mRNA Midi Kit(Quagen公司)纯化mRNA,按说明书进行操作,电泳检测。参照Schena等^[1]的方法反转录标记cDNA探针并纯化,用Cy3-dUTP标记正常组织mRNA,Cy5-dUTP标记ADPKD组织的mRNA各5 μg,乙醇沉淀后溶

[作者简介] 崔心刚,博士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: cuixingang@163.com

解在 $20 \mu\text{l } 5\times\text{SSC}+0.2\%\text{SDS}$ 杂交液中。

1.3 杂交和洗涤 按芯片杂交试剂盒(上海联合基因公司提供)操作说明,将芯片和杂交探针分别在 95°C 水浴中变性 5 min,与预热的杂交液混合起来,置杂交密封仓内加以密闭。恒温杂交箱内 60°C 杂交 15~17 h,依次以 $2\times\text{SSC}$ 、 $0.2\%\text{SDS}$ 、 $0.1\%\text{SSC}$ 洗涤 10 min,室温避光晾干。

1.4 荧光扫描和结果分析 ScanArray4000(General Scanning 公司)扫描芯片, Gene Pix Pro3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度,计算 Cy5/Cy3 的值,以下述 3 个条件判断基因差异表达的标准:(1)Cy5 和 Cy3 比值的自然对数的绝对值 >0.69 (基因的表达变化差异在 2 倍以上);(2)Cy3、Cy5 的值皆 >200 或两者之一 >800 ;(3)重复实验 1 次后仍符合上述条件。对入选的 4 096 点基因进行分析,取两张芯片上均差异表达的基因作为研究对象,分析两者均一化系数。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(下调趋势);如果 Cy5 信号较强,该点多显红色(上调趋势);如果强度相似,则显黄色。取黄色数据点即代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5 到 2.0 范围之外的点(很可能属于表达差异基因)为研究对象。两张芯片的均一化系数分别为 1.056 和 0.944,芯片效果良好,且误差控制满意。

1.5 RT-PCR 选定其中 4 条可能有实际意义的基因(根据 GenBank 及文献报道结果)进行了 RT-PCR 验证,4 条基因分别为细胞周期素 D_2 (Cyclin D_2)、lumican、基质金属蛋白酶 1(MMP1)、组织抑制因子(TIMP1)。

1.5.1 引物 4 条基因的引物和退火温度分别为: cyclin D_2 : $5'$ -GCA GAA GGA CAT CCA ACC- $3'$, $5'$ -CAT CAC AAG TGA GCG AGC- $3'$,退火温度 56°C ; lumican: $5'$ -GCA TAT AAA CCA CAA CAA CC- $3'$, $5'$ -GAC AGA TCC AGC TCA ACC- $3'$,退火温度 53°C ; MMP1: $5'$ -TGC TCA TGC TTT TCA ACC- $3'$, $5'$ -GAA CAG CCC AGT ACT TAT TCC- $3'$,退火温度 55°C ; TIMP1: $5'$ -CCC CAG AAA TC ATC GAG AC- $3'$, $5'$ -GAT TAT GCC AGG GAA CCA G- $3'$,退火温度 55°C ; β -actin: $5'$ -GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG- $3'$; $5'$ -AGC ACT TGC GGT CCA CGA TG- $3'$ 。

1.5.2 反应步骤 主要步骤包括 RNA 抽提、鉴定,从总 RNA 合成 cDNA,PCR 扩增(反应体系 $50 \mu\text{l}$)。反应体系包括:灭菌水 $39.4 \mu\text{l}$ 、 $10\times$ buffer $5 \mu\text{l}$ 、dNTP $1 \mu\text{l}$ 、引物 $2 \mu\text{l}$ 、模板 $2 \mu\text{l}$ 、Taq 酶 $0.6 \mu\text{l}$

(所需试剂均购自上海博亚生物技术有限公司)。温度条件:变性 94°C 2 min,29 个扩增循环(94°C 变性 30 s,退火温度 45 s, 72°C 延伸 1 min),最后 72°C 延伸 6 min。产物和同一样品的 β -actin 的 RT-PCR 产物在 1% 的琼脂糖中电泳,紫外线观察并摄片。图像分析系统测定信号面积和灰度,计算各条带的灰度值,以同一样品的 β -actin 信号值作校正。

1.6 统计学处理 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 总 RNA 抽提和 mRNA 纯化 ADPKD 组织的 RNA 浓度为 $2.852 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D_{260}/D_{280} 为 $0.724/0.366$;正常肾组织 RNA 浓度为 $4.656 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, D_{260}/D_{280} 为 $1.175/0.609$ 。抽提的 RNA 和 mRNA 与预期结果相符, D_{260}/D_{280} 均在 1.8~2.0 间。

2.2 杂交结果 图 1 为对照组(正常肾)/实验组(ADPKD)双色荧光标记叠加图。相应的杂交信号强度散点见图 2。

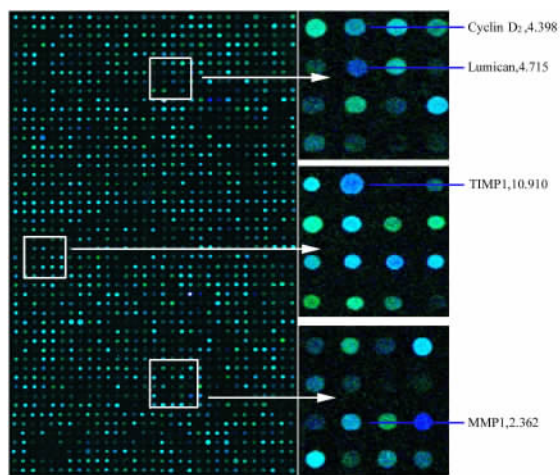


图 1 部分差异表达的基因示意图

Fig 1 Several differentially expressed genes

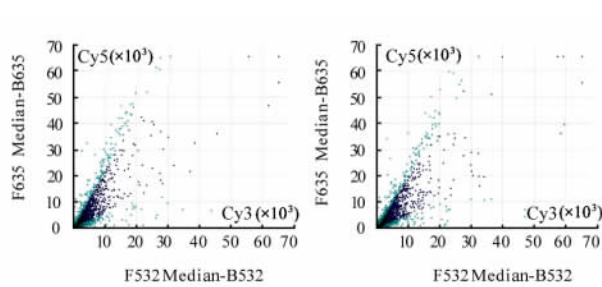


图 2 两张芯片的杂交信号强度散点图

Fig 2 Scatter maps of blotting signals

2.3 正常肾和 ADPKD 组织差异表达基因 入选的 4 096 条基因中,463 条有差异表达,其中两张芯

片上都明显上调的基因有 206 条,都下调的有 257 条。两种组织对比,发现的差异基因主要有:代谢类相关基因 133 条;细胞信号传递蛋白相关基因 72 条;蛋白翻译合成相关基因 62 条;免疫相关基因 41 条;DNA 结合、转录因子相关基因 29 条,细胞受体相关基因 14 条;发育相关基因 13 条;原癌基因和抑癌基因 11 条;细胞凋亡相关基因 6 条。

将这些基因进行详细分类并结合实验所得结果,得到部分有价值基因(表 1),约 22 条,包括:(1) 调节细胞周期、细胞分裂的基因如 cyclin D₂、protein

phosphatase 1A、acid phosphatase 1、ACPI 等。(2)细胞因子、趋化因子、生长因子类基因如 TNFSF1B、TNFRSF 10A、IGF-binding protein 3 gene,chemokine receptor 4,EGFR 等。(3)与纤维粘连蛋白、胶原纤维形成有关的基因。如 ficolin 1、fibroblast activation protein、laminin alpha4、collagen type 1、alpha1、collagen type VI alpha3 等。(4)其他对细胞外基质重塑有重要作用的基因。如 MMP/TIMP 基因:MMP1,TIMP1。

表 1 两种组织中的部分差异表达基因

Tab 1 Data of differential expression profiles in 2 kinds of tissues

Row	Column	Gene ID	GenBank ID	Average ratio	Definition
30	5	2360f10	NM_021003	0.337	Protein phosphatase 1A
55	52	1130h06	NM_004300	0.445	Acid phosphatase 1, ACPI
35	59	1566d06	NM_005941	0.473	Matrix metalloproteinase 16, MMP16
53	1	0315c04	NM_005228	2.166	EGFR
36	55	3623f10	NM_001066	2.189	Tumor necrosis factor receptor, TNFSF1B
20	24	0928a02	M74161	2.301	Human inositol polyphosphate 5ptase
21	2	4436a11	NM_003844	2.320	Tumor necrosis factor receptor, TNFRSF 10A
53	7	x05231	NM_002421	2.362	Matrix metalloproteinase 1, MMP1
60	51	1462b09	NM_002775	2.384	Protease,serine 11 IGF binding
52	9	3969d10	NM_003467	2.777	Chemokine receptor 4
34	30	1462g04	NM_001558	3.072	Interleukin 10 receptor alpha (IL10RA)
32	26	3645d11	M35878	3.562	IGF-binding protein 3 gene
53	2	0475d09	NM_000089	3.733	Collagen type 1, alpha1
18	21	3809g09	NM_004369	4.256	Collagen type VI alpha3
12	20	1286e07	NM_001759	4.398	Cyclin D ₂
19	4	1679d07	NM_002345	4.715	Lumican, mRNA
63	62	3890c08	X52015	5.782	mRNA for interleukin-1 receptor antagonist
51	25	2276a01	NM_002290	5.876	Laminin alpha 4
21	36	1236c07	NM_000090	5.920	Collagen type III alpha2
15	23	3485g05	NM_002003	9.078	Ficolin 1
21	5	2028d05	NM_003254	10.910	TIMP 1
36	21	3894b03	NM_004460	12.767	Fibroblast activation protein

2.4 差异基因 RT-PCR 结果 选取 22 条中 4 条可能有实际应用意义的基因: cyclin D₂、lumican、MMP1、TIMP1。

RT-PCR 结果与荧光扫描结果相似,4 种基因的表达明显上调,两组间表达有显著差异($P < 0.05$,表 2)。

表 2 正常及 ADPKD 肾组织中 4 条基因的 RT-PCR 表达结果

Tab 2 RT-PCR results of 4 genes in normal and ADPKD kidney

(n=3, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	Cyclin D ₂	Lumican	MMP1	TIMP1
Normal kidney	8.20 ± 1.20	5.17 ± 1.00	11.00 ± 2.11	3.89 ± 1.62
ADPKD	22.13 ± 3.25*	12.24 ± 3.83*	26.53 ± 8.50*	7.72 ± 2.03*

* $P < 0.05$ vs normal kidney group

3 讨论

ADPKD 的发病机制有很多假说,目前越来越多

的研究集中在其病理生理学改变上。本研究发现在众多差异基因表达中有 4 条基因: cyclin D₂、lumican、MMP1、TIMP1 可能有实际意义,现对其分析

如下。

细胞周期蛋白相关基因的差异表达:ADPKD组织中,cyclin D₂明显上调。周期素是一种细胞周期的正调控蛋白^[2],有A~H 8种亚型,当促分裂增殖信号传到胞核后,周期素合成增加,激活DNA合成所需基因,细胞即可通过G₁期依次完成整个周期,而周期素D₂在细胞周期调控中占有非常重要的地位,过度表达可以缩短G₁期,使细胞体积变小,并降低细胞对有丝分裂原的依赖性。因此ADPKD组织细胞周期素基因表达升高提示ADPKD组织细胞分裂、增殖活动旺盛。

ECM降解有关基因:在过去的十多年里,对诸多因素导致的肾脏组织ECM产生增多研究较多,但对ECM的降解的研究却很少,而多囊肾形成是由ECM异常合成与降解同时共同作用的结果^[3]。近年来发现MMPs及TIMPs功能紊乱与ECM过多堆积、异常降解关系密切^[4]。MMPs的主要功能包括:降解除多糖以外的全部ECM成分;激活其他的MMPs,形成“瀑布”效应。进一步研究显示,凡是有ECM增多的肾脏疾病都有TIMP的高表达或MMPs/TIMPs比例降低。ADPKD动物模型囊肾组织中MMPs、TIMPs均发现有高表达,而且MMPs/TIMPs对ADPKD囊壁细胞增生与组织内血管形成也有明显作用^[5]。本实验证实ECM降解失常的确存在,且十分显著,RT-PCR扩增后MMP1、TIMP1在两种组织也有明显的表达差异,进一步验证了上述结果。

Lumican基因表达上调明显:lumican基因编码的蛋白和成纤维细胞有关,具有小分子蛋白多糖的所有性质,主要存在于结缔组织,在眼角膜和关节软骨组织细胞外基质中最先发现,与纤维调节素、核心蛋白多糖属于同一家族,在结缔组织内lumican和纤维调节素可以使胶原聚集为原纤维。尽管目前对于lumican在ADPKD组织的表达很少研究,但ADPKD肾脏的高度纤维化可能和lumican表达过量有关系,肾移植后囊肾组织lumican表达显著下降可能是囊肾纤维化程度下降的一种表现^[6]。Lumican的表达程度是否和囊肾进展程度一致尚需要进一步研究。

上述差异表达基因不仅可以用来监测ADPKD细胞增生、分化、纤维化等病理学改变程度,而且也提示这些可能是ADPKD形成的关键性因素,采取控制上述类型基因改变的措施可能对ADPKD有治疗作用。目前对ADPKD的临床治疗集中在对并发

症的治疗和肾功能不全时的替代治疗方面。普遍观点认为防止基因突变、维持肾脏组织稳定可以避免多囊肾的发生,但应用抗突变剂和抗氧化剂等药物尚无确切证据,有待证实。本研究结果显示差异表达的基因中和细胞代谢有关基因133条、蛋白翻译合成相关基因62条、DNA结合与转录因子相关基因29条,提示ADPKD的形成、进展和上述改变密切相关,因此可以尝试应用诸如代谢干扰剂、信号转导调节剂可能对病变有治疗作用;另外还发现免疫相关基因41条,提示ADPKD可能是和免疫有关的一种遗传性疾病。

未来可以考虑ADPKD的治疗方向有:(1)细胞周期调控剂,如钙调素抑制剂^[7];(2)生长因子受体抑制剂。目前应用针对EGFR外区的中和性抗体、抗体螯合物、可溶性受体结合片段、反义寡核苷酸、融合蛋白及小分子RTK抑制物(tyrosine kinase inhibitor,TKI)能有效阻断异常信号的转导途径,并在动物实验中取得了良好的疗效^[8]。

[参考文献]

- [1] Schena M,Shalon D,Davis RW,et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science,1995,270:467-470.
- [2] Saadi Kheddouci S,Berrebi D,Romagnolo B,et al. Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene[J]. Oncogene, 2001,20: 5972-5981.
- [3] Nakamura T,Ushiyama C,Suzuki S,et al. Elevation of serum levels of metalloproteinase-1,tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen,and plasma levels of metalloproteinase-9 in polycystic kidney disease[J]. Am J Nephrol,2000,20: 32-36.
- [4] Sullivan LP,Wallace DP,Grantham JJ. Chloride and fluid secretion in polycystic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol,1998, 9:903-916.
- [5] Bello-Reuss E,Holubec K,Rajaraman S,et al. Angiogenesis in autosomal-dominant polycystic kidney disease[J]. Kidney Int, 2001,60: 37-45.
- [6] Jepsen KJ,Wu F,Peragallo JH,et al. A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice[J]. J Biol Chem,2002,277: 35532-35540.
- [7] 王立明,王 炜,闵志廉,等. 免疫抑制药物对多囊肾病治疗作用的探讨[J]. 第二军医大学学报,1999,20:541-543.
- [8] 梅长林,李 林. 常染色体显性遗传性多囊肾病分子遗传发病机制及治疗进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2001,10:454-460.

[收稿日期] 2005-06-09

[修回日期] 2005-07-14

[本文编辑] 贾泽军