

·论 著 ·

# 基因芯片技术筛选 2 型糖尿病伴远端对称性多神经病变患者外周血单个核细胞差异表达基因

李 翔,刘志民\*,石勇铨,邹俊杰,李文桐,刘 岩

(第二军医大学长征医院内分泌科,上海 200003)

[摘要] 目的:应用基因芯片技术筛选 2 型糖尿病伴远端对称性多神经病变患者外周血单个核细胞(PBMC)与不伴远端对称性多神经病变糖尿病患者以及正常个体相比的差异表达基因。方法:采用包含 5 075 个功能已知人类基因的 cDNA 芯片检测 2 名 2 型糖尿病并发远端对称性多神经病变患者(DSPN 组),2 名 2 型糖尿病不伴远端对称性多神经病变患者(DM 组)以及 2 名年龄和性别匹配的正常个体(C 组)PBMC 基因表达谱,分析差异表达基因,并选择其中有差异表达的部分基因进行实时定量 RT-PCR 验证。结果:基因芯片技术筛选出 22 条差异表达基因,涉及细胞代谢与信号转导基因,原癌与抑癌基因,DNA 合成和修复基因,离子通道与运输蛋白基因,DNA 结合、转录和转录因子基因,细胞骨架组成基因等。其中上调基因 4 条,下调基因 18 条。实时定量 RT-PCR 测定下调基因中的 AK1 和 FBXO7,与基因芯片技术结果一致。结论:2 型糖尿病伴 DSPN 患者 PBMC 基因表达谱存在差异;DSPN 可能涉及细胞代谢,信号转导和 DNA 合成等多个方面。

[关键词] 糖尿病,2 型;远端对称性多发神经病变;基因芯片;多聚酶链反应;外周血单个核细胞

[中图分类号] R 587.1 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1072-04

## Gene microarray analysis of peripheral blood mononuclear cells in type 2 diabetes patients with distal symmetric polyneuropathy

LI Xiang, LIU Zhi-min\*, SHI Yong-quan, ZOU Jur-jie, LI Wen-tong, LIU Yan(Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] Objective: To screen for the differentially expressed genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from type 2 diabetes patients with distal symmetric polyneuropathy (DSPN) by gene microarray. Methods: A 5 075 gene cDNA microarray was used to examine gene expression in PBMCs of 2 type 2 diabetes patients with DSPN (group 1), 2 type 2 diabetes patients without DSPN (group 2), and 2 age- and sex-matched controls (control group). The differentially expressed genes were identified and subjected to real-time RT-PCR analysis. Results: Twenty-two genes were found to be differentially expressed, including cell metabolism and signal transduction genes, oncogenes and anti-oncogenes, DNA synthesis and repair genes, ion channel and transport protein genes, DNA-binding, transcription and transcription factor genes, and cytoskeleton genes. There were 4 genes up-regulated and 18 down-regulated. Real-time RT-PCR results of AK1 and FBXO7 were consistent with that of microarray analysis. Conclusion: Microarray expression profile of PBMC in type 2 diabetes patients with DSPN is differential. DSPN may be involved in cell metabolism, signal transduction, DNA synthesis, etc.

[KEY WORDS] diabetes mellitus, type 2; distal symmetric polyneuropathy; cDNA microarray; polymerase chain reaction; peripheral blood mononuclear cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1072-1075]

糖尿病远端对称性多神经病变是 2 型糖尿病常见的慢性并发症之一,其可以影响周围神经系统的感觉、运动神经进而使患者出现不同的临床表现。虽然目前对糖尿病远端对称性多神经病变的临床表现有一定的认识,但对于其发病机制还知之甚少。近来的研究表明许多基因参与了糖尿病远端对称性多发神经病变的发病过程,其中包括 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶基因<sup>[1]</sup>、醛糖还原酶(aldoase reductase, AR)基因<sup>[2]</sup>、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)基因<sup>[3]</sup>、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )基因<sup>[4]</sup>以及血管紧张素转化酶(angiotensin-

converting enzyme, ACE)基因<sup>[5]</sup>等。

基因芯片技术作为一种全新的能够对微量样品中核酸序列进行检测和分析的技术,以其高通量、快速、并行化采集生物信息的特点优于其他传统的技

[基金项目] 上海市科委重大科技攻关项目(04DZ19053). Supported by grants from Science and Technology Committee of Shanghai Municipality(04DZ19053).

[作者简介] 李 翔,博士.现在解放军第 306 医院内分泌科,北京 100101. E-mail: chnlx2102@yahoo.com.cn

\*Corresponding author. E-mail: liuzhimind@yahoo.com.cn

术方法。外周血在人类免疫反应和代谢过程中起重要作用,同时因其标本采集方便被广泛用作生物学和临床研究的标本,因此本研究采用基因芯片技术筛选2型糖尿病并发远端对称性多神经病变(distal symmetric polyneuropathy, DSPN)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)与正常个体以及2型糖尿病无DSPN患者相比的差异表达基因,分析与其发病相关的可能基因,从分子水平探讨其可能的发病机制。

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 6名受试者被纳入本研究。2名为2型糖尿病并发DSPN患者(DSPN组,分别为DSPN1和DSPN2),平均年龄为(52.0 ± 7.1)岁, BMI为(23.6 ± 1.1) kg/m<sup>2</sup>; 2名为2型糖尿病不伴DSPN患者(DM组,分别为DM1和DM2),平均年龄为(51.0 ± 5.7)岁, BMI为(22.3 ± 0.7) kg/m<sup>2</sup>; 2名为年龄和性别匹配的正常对照(C组,分别为C1和C2),平均年龄为(48.5 ± 5.0)岁, BMI为(23.3 ± 1.0) kg/m<sup>2</sup>。2型糖尿病的诊断符合WHO 1999诊断标准, DSPN的诊断依据密歇根糖尿病神经病变积分<sup>[6]</sup>及神经电生理检查结果。

1.2 基因芯片的制备及杂交 抽取每名受试者10 ml全血置于0.5 mmol/L EDTA抗凝管中,采用Ficoll密度梯度离心法分离PBMC,用TRIzol试剂抽提PBMC RNA并用RNeasy Mini Kit (QIAGEN)纯化,采用分光光度计(DU640, Bechman Coulter)和1%琼脂糖凝胶电泳评价RNA的质量和完整性。随后采用基于T7扩增方法取1 μg RNA进行线性扩增(MessageAmp aRNA kit, Ambion),其余存放于-80℃冰箱中以备后续实验。反转录过程中进一步用Cy3或Cy5(Amersham)标记aRNA,标记后的aRNA纯化后与芯片[上海生物芯片有限公司人5 K基因表达谱cDNA芯片(V1.0)]杂交,42杂交箱中避光杂交18 h后用1 × SSC/0.2% SDS洗涤10 min, 0.1 × SSC/0.2% SDS洗涤10 min,重复2次, 0.1 × SSC洗片5 min,重复2次。最后使用Agilent扫描仪获取图像, GeneSpring进行数据分析和标准化处理, Cluster分析软件进行层级聚类分析。

1.3 扫描和分析 采用Agilent Scanner来获取图

像,扫描像素值:10 μm。随后将Cy3和Cy5的原始提取信号数据导入分析软件GeneSpring进行标准化。由于每张芯片内重复1次,因此采用单样本Student's *t*检验判断标准化后的平均ratio值与1是否存在统计学差异。采用标准化后的Cy3和Cy5值,计算Cy3/Cy5比值。两次比值的平均值1.5, Flags为P,信噪比>2, *P* < 0.05为该基因在2型糖尿病并发DSPN患者PBMC中表达减弱,两次比值的平均值0.67, Flags为P, S/N > 2, *t*检验 *P* < 0.05为该基因在2型糖尿病并发DSPN患者PBMC中表达增强。

1.4 实时定量多聚酶链反应(real-time PCR) 由上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)合成AK1、FBXO7以及内参照物磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的引物。以将RNA反转录为cDNA,随后将cDNA、SYBR Green多聚酶链反应试剂(TaKaRa)、正向和反向引物加入PCR反应的96孔板中,孔板置于ABI Prism 7000 Sequence Detection System中,反应条件为50℃ 孵育2 min,然后95℃ 预变性2 min;随后进入循环。95℃ 变性15 s;59℃ 退火1 min;72℃ 延伸50 s进行45个循环。采用Sequence Detector 1.1软件进行数据分析,用2<sup>-C<sub>t</sub></sup>法<sup>[7]</sup>计算2型糖尿病患者伴DSPN患者与2型糖尿病不伴DSPN患者以及正常对照个体之间基因表达的差异倍数。

## 2 结果

2.1 基因芯片结果 6名受试者完成4组基因芯片,01号芯片发现与正常个体相比,DPSN患者PBMC中上调基因236条,下调基因258条;02号芯片发现与DM患者相比,DPSN患者PBMC中上调基因242条,下调基因272条;03号芯片发现与正常个体相比,DPSN患者PBMC中上调基因109条,下调基因112条;04号芯片发现与DM患者相比,DPSN患者PBMC中上调基因176条,下调基因219条。22条基因在4张芯片中均出现差异表达,其中共同上调基因4条,共同下调基因18条。将其按功能分析并进行大体归类,包括细胞代谢与信号转导,原癌与抑癌基因,DNA合成和修复基因,离子通道与运输蛋白基因,DNA结合、转录和转录因子基因,细胞骨架组成等多种基因。详见表1。

表 1 DSPN 患者 PBMC 差异表达基因及分类

Tab 1 Classification of differentially expressed genes in PBMC of DSPN patients

Symbol	Accession number	Discription	Chromosomal location
HIST1H2AC *	NM_003512	Histone 1, H2ac	6p21.3
MUCDHL *	NM_021924	Mucin and cadherin-like	11p15.5
LOC83693 *	A K025626	Steroid dehydrogenase-like	
DA TF1 *	XM_015645	Death associated transcription factor 1	
E2-230 K	AB051521	Likely ortholog of mouse ubiquitin-conjugating enzyme E2-230 K	17q25.1
COX5A	NM_004255	Cytochrome c oxidase subunit a	15q25
STOML2	NM_013442	Stomatin (EPB72)-like 2	9p13.1
FBXO7	NM_012179	F-box only protein 7	22q12-q13
AKI	NM_000476	Adenylate kinase 1	9q34.1
MAP2K3	D87116	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	17q11.2
SLC4A1	NM_000342	Solute carrier family 4, anion exchanger, member 1	17q21-q22

\* :Up-regulated ,others are down-regulated

2.2 Real-time PCR 结果 为进一步验证基因芯片的发现,本研究选择 AKI 和 FBXO7 基因应用 real-time PCR 的方法检测基因表达水平,分别得到 AKI 和 FBXO7 基因扩增曲线(图 1A ,1B)。AKI 基因在 4 张芯片中的 ratio 分别为 1.860、2.893、6.415、2.313,与之相对应的经 real-time PCR 验证的 ratio

分别为 2.083、3.342、3.115、3.355;FBXO7 基因在 4 张芯片中的 ratio 分别为 2.362、4.038、1.64、1.974,与之相对应的经 real-time PCR 验证的 ratio 分别为 3.123、28.443、2.699、1.851。Real-time PCR 与基因芯片检测结果所显示的基因差异表达趋势基本一致。

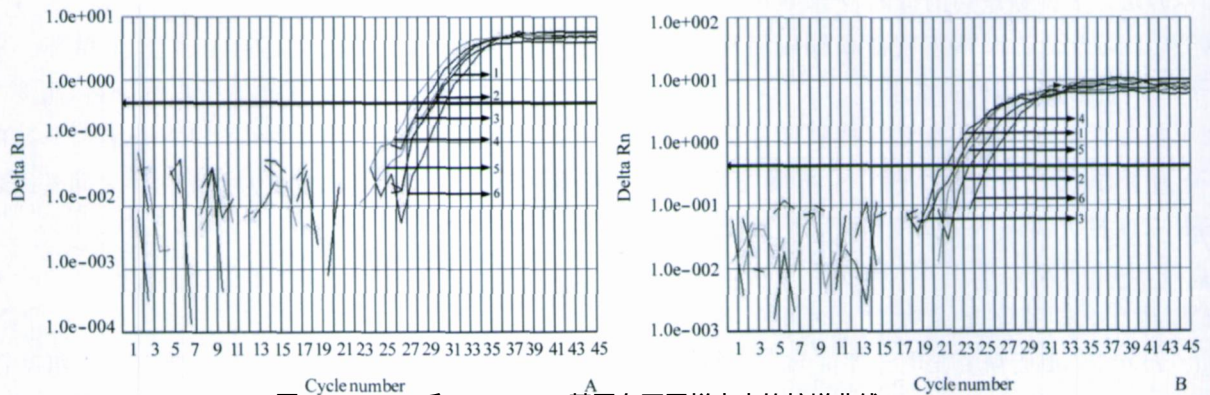


图 1 AKI(A)和 FBXO7(B)基因在不同样本中的扩增曲线

Fig 1 Amplification curves of gene AKI(A)and FBXO7(B) in different samples

1: DM1; 2: C1; 3: DM2; 4: C2; 5: DSPN2; 6: DSPN1

### 3 讨论

糖尿病慢性并发症的首要病因被认为是高血糖,强化血糖控制能明显降低 1 型和 2 型糖尿病患者慢性并发症的发生率,然而某些血糖控制理想的患者仍然出现慢性并发症。另外,流行病学研究表明仅部分糖尿病患者存在出现糖尿病慢性并发症的风险。为了探讨糖尿病慢性并发症的遗传标记和候选基因,人们进行了多方面、多方式的动物实验和临床研究。本研究应用基因芯片技术发现 22 条差异表达基因,其中腺苷酸激酶 1 (adenylate kinase-1,

AKI)和 FBXO7 在 2 型糖尿病伴 DSPN 患者 PBMC 中表达下调。

3.1 AKI 基因下调与 DSPN AKI 为磷酸转移酶 AK 家族成员之一,能够可逆性催化高能磷酸基在 ATP(或 GTP)和 AMP 之间发生转移。ATP 敏感的  $K^+$  ( $K_{ATP}^+$ )通道参与了胰岛素分泌的过程。有研究<sup>[8]</sup>表明  $K_{ATP}^+$ 通道开放/关闭的状态并非与 ATP 和(或)ADP 浓度有关,而与 AK 催化的磷酸转移密切相关。AK 与  $K_{ATP}^+$ 通道邻近可以通过将 ATP 转变成 ADP 和 AMP 来调节胰岛 B 细胞膜上  $K_{ATP}^+$ 通道;也可能影响 ATP 向 ADP 和 AMP 的转化,从而

使  $K_{ATP}^+$  通道与 ATP 和/或 ADP 结合的时间也受到影响,进而对  $K_{ATP}^+$  通道开放和关闭、细胞膜去极化、钙离子内流以及胰岛素释放等一系列后续反应都产生影响。心肌细胞、血管和其他平滑肌细胞、神经元细胞膜以及神经滋养血管中也发现有  $K_{ATP}^+$  通道<sup>[9]</sup>,因而 AK 基因的下调可能还通过调节血管平滑肌、神经内膜细胞膜上的  $K_{ATP}^+$  通道,进一步影响微血管血流从而参与糖尿病周围神经病变的发病。

另外,  $K_{ATP}^+$  通道开放剂还能够明显改善糖尿病引起的  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶活性降低。红细胞膜上的  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶活性降低将导致红细胞内钠潴留,从而增加红细胞的体积影响其变形性,最终导致神经血流供应受阻,周围神经  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶活性降低也将导致轴突内钠浓度升高,从而阻止神经膜去极化,导致神经传导速度减慢。

由此可以看出, AK1 基因的下调可能通过影响 ATP 向 ADP 和 AMP 的转化对多种过程产生影响。其不仅能通过调节胰岛 B 细胞膜上的  $K_{ATP}^+$  通道影响胰岛素的分泌,还能调节神经滋养血管的  $K_{ATP}^+$  通道影响神经的血流供应,同时通过改善红细胞和周围神经的  $Na^+ - K^+ - ATP$  酶活性进一步影响神经血流供应以及神经传导速度,而这些改变都与糖尿病周围神经病变有关,因此 AK1 基因的下调可能通过多种途径参与了糖尿病神经病变的发病过程。

### 3.2 FBXO7 基因下调与 DSPN

FBXO7 为 F-盒蛋白家族成员之一, F-盒蛋白为泛肽蛋白连接酶(被称为 SCF 复合物)四个亚单位之一。虽然目前对 F-盒蛋白 7 的功能尚不明确,但有研究表明 FBXO7 也可能参与 SCF 复合物<sup>[10]</sup>,同时其结构中还具有亮氨酸拉链结构和富含脯氨酸区域,因此其可能通过形成 SCF 复合物与特异性的底物结合后将其降解从而调节多种生理过程。本研究中发现 FBXO7 基因表达下调,推测其对某些蛋白底物的降解作用可能受到影响,从而影响多种生理过程,最终参与了糖尿病周围神经病变的发病。但糖尿病周围神经病变的发病过程复杂,包括 MAPK、炎性介质、生长因子在内的多种蛋白都参与其中, FBXO7 通过调节哪些特异性底物参与糖尿病周围神经病变的发病还需进一步的研究证实。

综上所述,采用基因芯片技术及 real-time PCR 的方法都表明在 2 型糖尿病伴 DSPN 患者 PBMC 中存在差异表达的基因,它们可能通过不同的途径参与糖尿病周围神经病变的发病,对其功能的进一步研究,将更好地揭示糖尿病周围神经病变的发病机制,为其诊断、治疗提供新的方向。

#### [参考文献]

- [1] Vague P, Dufayet D, Coste T, et al. Association of diabetic neuropathy with Na/ K ATPase gene polymorphism[J]. *Diabetologia*, 1997, 40: 506-511.
- [2] Ichikawa F, Yamada K, Ishiyama-Shigemoto S, et al. Association of an (A-C)<sub>n</sub> dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5'-region of the aldose reductase gene with retinopathy but not with nephropathy or neuropathy in Japanese patients with Type 2 diabetes mellitus[J]. *Diabet Med*, 1999, 16: 744-748.
- [3] Chistyakov DA, Savost'yanov KV, Zotova EV, et al. Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type 1 diabetes mellitus[J]. *BMC Med Genet*, 2001, 2: 4.
- [4] Benjafeld AV, Glenn CL, Wang XL, et al. TNFRSF1B in genetic predisposition to clinical neuropathy and effect on HDL-cholesterol and glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24: 753-757.
- [5] Ito H, Tsukui S, Kanda T, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and polyneuropathy in type 2 diabetes without macroalbuminuria[J]. *J Int Med Res*, 2002, 30: 476-482.
- [6] Fedele D, Comi G, Coscilli C, et al. A multicenter study on the prevalence of diabetic neuropathy in Italy. Italian Diabetic Neuropathy Committee[J]. *Diabetes Care*, 1997, 20: 836-843.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-CT</sup> Method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [8] Olson L K, Schroeder W, Robertson RP, et al. Suppression of adenylate kinase catalyzed phosphotransfer precedes and is associated with glucose-induced insulin secretion in intact HIT-T15 cells[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 16544-16552.
- [9] Hohman TC, Cotter MS, Cameron NE. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel effects on nerve function, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase, and glutathione in diabetic rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 397(2-3): 335-341.
- [10] Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavacaro D, et al. Identification of a family of human F-box proteins[J]. *Curr Biol*, 1999, 9: 1177-1179.

[收稿日期] 2006-04-17

[修回日期] 2006-09-18

[本文编辑] 贾泽军