

· 论 著 ·

伴有高血压的糖尿病大鼠大血管病变 SMC 增殖早期基因表达谱的研究

叶 勇¹, 张传森^{1*}, 吴 骋², 李西林³, 吴淑梅⁴, 张 喜¹

(1. 第二军医大学基础医学部人体解剖学教研室, 上海 200433; 2. 卫生勤务学系卫生统计学教研室, 上海 200433; 3. 解放军第 85 医院心内科, 上海 200052; 4. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 建立糖尿病大血管病变平滑肌细胞(SMC)增殖早期基因表达谱。**方法:** 以自发性高血压大鼠(SHR)为对照, 以 STZ 诱导 SHR 构建伴有高血压的糖尿病大鼠模型为实验组, 分别在 1 周、2 周、4 周时抽提胸主动脉中膜的总 RNA, 获得两组 cDNA 的探针, 与含有 4 096 条大鼠全长基因的 cDNA 表达谱芯片杂交, 扫描芯片荧光信号图像, 对差异表达基因数据进行生物信息学分析。**结果:** 1 周时有差异表达的基因 321 条, 160 条基因表达下降(ratio<0.5), 161 条基因表达上升(ratio>2)。2 周、4 周时上述数据分别为 414、238、176 和 403、202、201。分级聚类分析归为 8 类, 3 期全部高表达已知基因 13 条, 其中 4 条持续升高的基因(*CD74*, *Irf1*, *GAP43*, *CD36*)都与细胞增殖有关。*CYP2E1* 基因的表达大幅上调(ratio 1 w=34.54; ratio 2 w=24.82; ratio 4 w=33.57)。**结论:** 糖尿病大血管病变 SMC 增殖是多基因综合改变的结果, 细胞增殖相关基因高表达是主要病理基础, *CYP2E1* 基因可能是糖尿病大血管病变 SMC 增殖较重要或关键的基因。

[关键词] 糖尿病; 高血压; 肌细胞, 平滑肌; 基因表达谱

[中图分类号] R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0036-05

Gene expression profile during early period of smooth muscle cell proliferation in macroangiopathy in diabetic rats with spontaneous hypertension

YE Yong¹, ZHANG Chuan-sen^{1*}, WU Cheng², LI Xi-lin³, WU Shu-mei⁴, ZHANG Xi¹ (1. Department of Human Anatomy, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Statistics, Faculty of Medical Services, Shanghai 200433; 3. Department of Cardiology, No. 85 Hospital of PLA, Shanghai 200052; 4. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish the gene expression profile during early period of smooth muscle cell(SMC) proliferation in macroangiopathy in diabetic rats with spontaneous hypertension. **Methods:** Spontaneously hypertensive rats (SHR) were taken as control and a hypertensive diabetic rat model was established by streptozotocin (STZ) injection in SHR. The total RNAs were obtained from intima-media of thoracic aortas in 1-week, 2-week and 4-week hypertensive diabetic rats separately. The mRNAs from SHR and hypertensive diabetic rats were reversely transcribed into the cDNAs. The 2 probes were then hybridized to the cDNA microarray containing 4 096 full length genes from rats. After high-stringent washing, the cDNA microarray was scanned and analyzed by computer image analysis. Bioinformatic analysis of altered gene expression was performed to find out the possible genes related to diabetic macroangiopathy. **Results:** A total of 321 genes were screened out in 1-week hypertensive diabetic rats, with 160 genes down-regulated (ratio<0.5-fold) and 161 up-regulated (ratio>2-fold); 414 genes were screened out in 2-week hypertensive diabetic rats with 128 down-regulated and 176 up-regulated; and 403 genes were screened out in 4-week hypertensive diabetic rats with 202 down-regulated and 201 upregulated. The effective genes were divided into 8 groups by cluster analysis. Thirteen known genes were up-regulated in all 3 kinds of hypertensive diabetic rats, among which *CD74*, *Irf1*, *GAP43* and *CD36* had a steady increase and were related to cell proliferation. Furthermore, *CYP2E1* gene was obviously up-regulated (ratio for the 1-week rats was 34.54, 2-week was 24.82, and 3-week was 33.57). **Conclusion:** The gene expression profile based on cDNA microarray can be used for screening genes related with diabetic macroangiopathy. It is found that *CYP2E1* might be an important gene responsible for proliferation of SMC in diabetic macroangiopathy.

[KEY WORDS] diabetes; hypertension; myocytes, smooth muscle; gene expression profiling

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(1):36-40]

糖尿病大血管病变是糖尿病患者致死致残的主要原因之一。我们在前期的研究工作^[1]中发现, 糖尿病早期即有血管平滑肌细胞(VSMC)增殖等改变, 在 STZ (streptozotocin) 诱导的糖尿病大鼠胸主动脉中, 1 周时 VSMC 已有形态学的改变, 到 4 周时

[基金项目] 上海市自然科学基金(03ZR14101); 国家自然科学基金(30570760). Supported by Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government (03ZR14101) and National Natural Science Foundation of China(30570760).

[作者简介] 叶 勇, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: chuansen@yahoo.com

VSMC 的个数和平滑肌相对含量即与对照组有显著差异($P < 0.01$)。临床研究也表明糖尿病患者为首诊时已有大血管壁和血流动力学等病理改变,提示在糖尿病早期即有大血管病变发生。研究糖尿病病理条件下 VSMC 增殖的机制,以及与高血压时大血管病变的异同,对于深入认识糖尿病大血管病变具有重要意义。各种病理条件下 VSMC 增殖的机制十分复杂,分子生物学观点认为细胞的任何生物学行为都是源于基因的选择性表达,VSMC 增殖也是增殖相关基因选择性表达的结果,研究病理条件下基因水平表达方面的变化是阐明 VSMC 增殖机制的关键。以往关于糖尿病大血管病变 VSMC 增殖相关基因的研究多集中于单个基因或几个基因,难以从基因表达整体水平全面观察糖尿病大血管病变时基因的反应模式,亦很难保证这些基因包含了糖尿病大血管病 VSMC 增殖的关键或重要基因。

本实验采用 4 096 条大鼠全长基因的 cDNA 表达谱芯片,研究高血压大鼠(SHR)大鼠和 STZ 诱导的 SHR 大鼠胸主动脉的早期基因表达水平变化,筛选和分析高糖或高糖高血压双重因素作用下,糖尿病早期血管 VSMC 基因表达的改变,为临床防治糖尿病大血管病变提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 选择尾动脉血压在 150~180 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),10 周龄雄性 SHR 大鼠(由本校药理学教研室提供)。随机分为 3 组:1 周、2 周、4 周组,每组分设实验鼠 10 只和对照鼠 10 只。实验鼠按 1% 浓度 STZ(Sigma 公司)溶于 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 4.0),迅速以 60 mg/kg STZ 剂量注入大鼠腹腔,48 h、72 h 两次测定空腹血糖(京都血糖仪 II-1640)大于 16.7 mmol/L 为模型建立成功。

1.2 主要试剂 水饱和酚,氯仿-异戊醇(49:1),10% 十二烷基肌氨酸钠,0.75 mol/L 柠檬酸钠(pH 7.0),溶液 D(上海联合基因公司提供),3 mol/L NaAc,10% SDS,1 mol/L Tris-HCl, dUTP (Promega 公司提供); uerScript I 逆转录酶(Gibco BRL 公司提供); Taq 酶(上海生物工程技术有限公司提供); Cy3-dUTP, Cy5-dUTP(Amersham Pharmacia 公司提供); Oligotex mRNA Midi Kit(Qiagen 公司提供)。

1.3 RNA 抽提及探针制备 分别在 1 周、2 周、4 周组随机选取实验鼠和对照鼠各 5 只,断头处死,迅速取出胸主动脉,在 4℃ 生理盐水中迅速漂洗去除

血渍,快速剔除血管外膜及周围结缔组织,延血管纵轴剪开,立即置于冻存管中,投至液氮备用。将液氮冻存的组织放在 100 ml 陶瓷碾钵(RNase free)中彻底碾碎成粉末状,加入溶液 D 和 1% 巯基乙醇,匀浆液离心后,上清液经 1:1 的酚-氯仿两次抽提后再经 NaAc(pH 4.5)和 5:1 酸性酚-氯仿抽提;等体积异丙醇-20℃ 沉淀 1.5 h;于 4℃,12 000×g,离心 10 min 后,75% 乙醇洗涤沉淀,用 Milli-Q 水溶解沉淀,紫外分析;LiCl 沉淀纯化后用 Milli-Q 水彻底溶解沉淀,紫外分析及电泳检测显示获得高质量的总 RNA。采用 Oligotex mRNA Midi Kit(Qiagen 公司)分离纯化为 mRNA。每份探针取 4 μg mRNA,逆转录标记 cDNA 探针并纯化。在一链合成中掺入荧光标记 dUTP,用 Cy3-dUTP 标记对照组 mRNA,用 Cy5-dUTP 标记实验组 mRNA。

1.4 表达谱芯片制备 BiostarR-40s 基因芯片由上海联合基因公司提供并提供。用通用 PCR 引物扩增,PCR 长度为 1 000~3 000 bp,PCR 反应及产物纯化用标准方法进行,通过琼脂糖凝胶电泳监控 PCR 质量。将上述制备的靶基因溶解于 3×SSC 溶液中,用 Cartesian Pixsys 7500 点样仪进行点样。点样后玻片经水合、室温干燥、UV 交联,再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 硼氢化钠溶液处理 10 min,晾干备用。

1.5 杂交和洗涤 将基因芯片和杂交探针分别作 95℃ 变性后置于杂交舱内,加入混合探针,用杂交密封舱加以密闭。恒温杂交箱内 60℃ 杂交 16 h。按顺序用 2×SSC+0.2% SDS,0.1%×SSC+0.2% SDS,0.1%×SSC 洗涤 10 min,室温晾干。

1.6 荧光扫描和结果分析 用 General Scanning 公司 ScanArray4000 扫描仪扫描芯片,获取基因表达的荧光信号强度值,用预先选定的内参照基因(40 个管家基因)对 Cy3 和 Cy5 的原始获取信号进行均衡和修正。用 ImaGene3.0 软件对扫描图像进行数字化处理,计算 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值,并对两次重复点进行平均。判断基因差异表达的标准:(1)Cy3 和 Cy5 信号的比值在 0.1~10 之间;(2)Cy3 和 Cy5 信号值均 >200,或者其中之一 >800;(3)PCR 结果良好。

1.7 生物信息学分析 去除基因点样坏点、植物基因、管家基因后得到 3 349 条有效基因数据,K-MEANS 法填充缺失值($K = 8$),CLUSTER 和 TREEVIEW 软件对芯片数据进行分级聚类分析。

2 结果

2.1 芯片的质量标准控制 BiostarR-40s 芯片上共 4 096 个 cDNA。有 40 个管家基因必须阳性,32 个植物基因(阴性对照)必须阴性,42 个空白点样点必须为阴性。2 次芯片杂交这些点的杂交信号均很低,证实了数据的可靠性。3 组芯片之间上述基因信号无显著差异($P>0.05$),说明操作及芯片组间误差无统计学意义。

2.2 总 RNA 抽提及 mRNA 纯化 1 周、2 周、4 周时,实验组与对照组的总 RNA 中 D_{260}/D_{280} 值分别为 1.932, 2.011; 1.731, 1.808; 1.842, 1.960。1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果,18S rRNA 和 28S rRNA 条带清晰,说明均已获得高纯度的总 RNA。

2.3 基因芯片杂交结果 三期基因表达谱芯片双色荧光扫描结果(图 1),黄色点代表该基因表达丰度在两种组织中接近;红色点代表该基因在正常组中高表达,绿色点代表该基因在处理组中高表达。不同组织样本(实验组/对照组)杂交信号强度散点图(图 2),每个点的 X 轴示 Cy3 荧光强度值(前景值-背景值),Y 轴示 Cy5 荧光强度值,45°角直线上的点 Cy5/Cy3 比率为 1,表示无表达差异。远离 45°角直线的点为差异表达基因。越靠近 X 轴或 Y 轴表明该店基因差异表达越显著。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 0.5~2.0 之间,基本属非差异表达;数据点若为黄色,则代表 Y 值与 X 值的比值在 0.5~2.0 范围之外(该点很可能属于表达差异)。

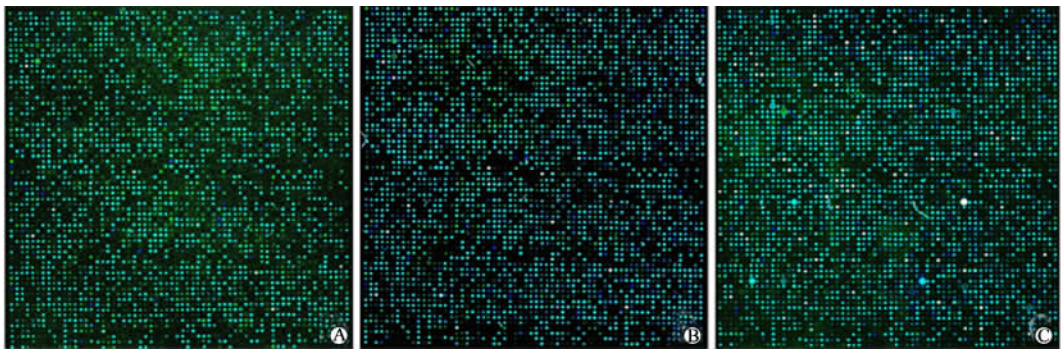


图 1 基因表达谱芯片双色荧光扫描图像

Fig 1 Scanning results of hybridizing signals on gene chip in hypertensive-diabetic rats and spontaneously hypertensive rats

A: In 1 week hypertensive-diabetic rats; B: In 2 weeks hypertensive-diabetic rats; C: In 4 weeks hypertensive-diabetic rats

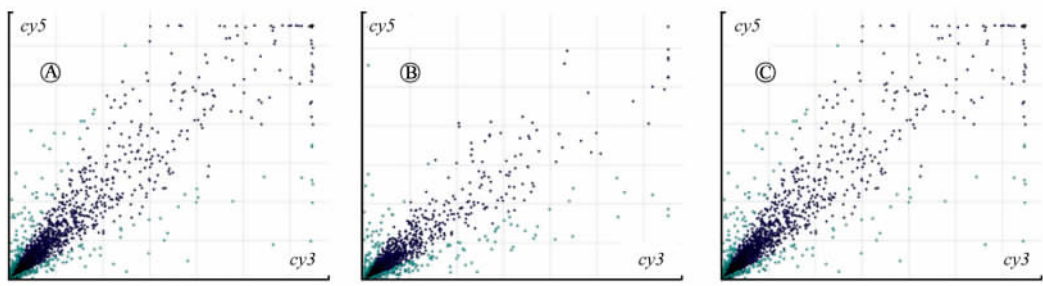


图 2 基因表达谱散点图

Fig 2 Scatter-plot of differentially expressed genes in hypertensive-diabetic rats and spontaneously hypertensive rats

A: In 1 week hypertensive-diabetic rats; B: In 2 weeks hypertensive-diabetic rats; C: In 4 weeks hypertensive-diabetic rats

2.4 生物信息学分析 在 4 096 条基因中,1 周时有差异表达的基因 321 条,160 条基因表达下降($ratio<0.5$),161 条基因表达上升($ratio>2$)。2 周、4 周时,上述数据分别为 414、238、176 和 403、202、201。根据功能分类将筛选出的基因分为原癌基因

和抑癌基因、离子通道和运输蛋白、细胞周期类蛋白、细胞骨架和运动类蛋白、细胞凋亡相关类蛋白、细胞信号和传递类、免疫相关类、蛋白质翻译合成类、DNA 结合转录和转录因子、DNA 合成和修复重组蛋白等 10 大类,基因数据通过分级聚类分析归为

8 类(表 1), 并获得三期全部高表达已知基因 13 条(位于第 7 类别), 其中持续升高 4 条。在三期全部高表达的基因中细胞色素 P4502E1 (cytochrome P450, subfamily 2e1, CYP2E1) 基因的表达上调明显(表 2)。

表 1 3 349 条基因 8 分类表

Tab 1 Eight cluster models of 3 349 genes

Cluster	Non-diabetic	Logratio 1	Logratio 2	Logratio 3	Clusters size	Ratio (%)
1	0	-0.065 6	-0.848 1	-0.173 4	449	13
2	0	0.376 2	0.584 0	0.378 5	717	21
3	0	-1.387 1	-1.001 9	-0.508 8	189	6
4	0	0.117 5	0.152 0	-0.765 1	533	16
5	0	-0.042 8	-0.041 8	0.156 9	1108	33
6	0	-0.315 0	-0.998 1	1.923 8	73	2
7	0	1.129 2	2.878 4	1.797 4	52	2
8	0	1.423 4	0.359 8	0.174 1	228	7

表 2 三期全部高表达 (ratio>2) 的已知基因

Tab 2 Up-regulated known genes in all 3 time-phase rats

GenBank_ID	Ratio 1 w	Ratio 2 w	Ratio 4 w	Definition
NM_013069	2.01	2.18	3.3	Rattus norvegicus CD74 antigen(CD74), mRNA
U30789	2.08	3.73	2.07	Rattus norvegicus clone N27 mRNA
NM_012591	2.52	2.65	7.11	Rattus norvegicus interferon regulatory factor 1(Irf-1), mRNA
NM_031834	2.54	2.44	7.03	Rattus norvegicus minoxidil sulfotransferase, mRNA
NM_022393	2.75	3.23	2.55	Rattus norvegicus Gal/GalNAc-specific lectin, mRNA
NM_017073	2.98	4.29	4.02	Rattus norvegicus glutamine synthetase, mRNA
NM_017195	3.19	3.51	7.69	Rattus norvegicus growth accentuating protein 43(GAP43), mRNA
NM_031561	3.31	3.42	4.63	Rattus norvegicus CD36 antigen(CD36), mRNA
D88250	3.34	3.28	2.93	Rattus norvegicus mRNA for serine protease, complete cds
NM_017320	3.39	2.67	2.72	Rattus norvegicus cathepsin S, mRNA
NM_012792	3.47	2.74	2.93	Rattus norvegicus Flavin-containing monooxygenase 1, mRNA
NM_031531	7.35	12.72	3.52	Rattus norvegicus Serine protease inhibitor, mRNA
NM_031543	34.54	24.82	33.57	Rattus norvegicus cytochrome P450, subfamily 2e1(CYP2E1), mRNA

3 讨论

3.1 糖尿病大血管病变 SMC 增殖基因表达谱的变化 根据基因芯片分析结果和相关文献提示, 三期全部高表达的基因多集中于代谢酶类。我们的结果见, 在 1 周时, 差异表达的基因主要集中在凋亡相关基因、热休克蛋白、抗氧化酶 SOD、组织蛋白酶 S、急性炎症反应蛋白等表达上调, 糖原合成酶、葡萄糖转运体、载脂蛋白、苹果酸酶、醛糖还原酶等亦表达增加, 提示 VSMC 中糖、脂代谢出现紊乱, 细胞处于氧化和抗氧化, 凋亡和抗凋亡的应激反应状态, 以维持细胞的结构和功能稳定性。4 周时, 差异表达基因突出表现在细胞黏附分子、细胞周期蛋白、增殖相关核抗原 PCNA 以及细胞骨架蛋白、肌钙蛋白等表达明显上调, 说明 VSMC 处于功能型向合成型转变阶

段, 细胞增殖。这与我们前期在形态学上观测的结果一致。

3.2 增殖相关基因在糖尿病大血管病变中的作用 通过对单个基因表达的时相性分析, 动态观测单个基因在调节 VSMC 生物学行为改变中的作用, 发现 CD74、Irf-1、GAP43、CD36、CYP2E1 等 5 条基因在糖尿病大血管 VSMC 中持续高表达或超高表达, 这些基因均与细胞增殖等生物学改变相关。

CD74 (MHC class II-associated invariant chain) 属于 2 型跨膜表面受体, 对巨噬细胞迁移抑制因子 MIF 具有高亲和力。Leng 等^[2]认为 MIF 能结合 CD74 膜外结构域, 激活胞外信号-调节激酶-MAPK 信号途径, 进而促进细胞增殖。抗 CD74 抗体能显著抑制多发性骨髓瘤肿瘤细胞的增殖^[3]。Irf1 (interferon regulatory factor-1) 是一类 DNA 依

赖性转录调节因子,除了调节干扰素诱导的生长抑制基因的转录,还可能对细胞增殖具有促进作用^[4]。Romeo等^[5]认为 *Irf1* 在胞内许多基因的上游均有其调控元件的结合位点,属于多功能基因,在不同类型的细胞,以及不同刺激下激活不同的靶基因发挥作用,并认为 *Irf1* 的结构重排是构成临床多种疾病类型的关键。GAP43(growth associated protein 43)属膜锚定结构蛋白亚单位,在神经元轴突生长和突触可塑性方面发挥重要作用^[6]。Gutmann等^[7]应用基因芯片构建了胶质瘤细胞系基因表达谱,发现 GAP43 表达下调能抑制胶质瘤细胞系的增殖能力。CD36 (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)是一种在单核巨噬细胞、平滑肌细胞以及脂肪细胞高度表达的清道夫受体,对氧化低密度脂蛋白(oxLDL)具有高亲和力,oxLDL 通过 PPAR γ -CD36 途径被单核巨噬细胞摄取并转化为泡沫细胞。后者促进动脉粥样硬化的形成。高糖能促进体外培养单核巨噬细胞高表达 CD36^[8]。Lamharzi等^[9]发现在 CD36 缺陷型大鼠中,高糖、高脂对单核细胞增殖没有显著影响,提示糖化 LDL 促细胞有丝分裂的能力是通过 CD36 受体及其下游信号途径介导的。

3.3 CYP2E1 可能是糖尿病大血管病变 SMC 增殖的较关键基因 CYP2E1 是一类存在于细胞线粒体及微粒体中的起始限速酶,属于细胞色素 P450 亚家族,相对分子质量为 57 000,编码基因位于第 10 号染色体,含 11 413 个碱基对,占细胞色素 P450 总量的 7%^[10]。CYP2E1 是肝脏中重要的氧化代谢酶,Graham等^[11]认为肝细胞中 CYP2E1 即使在无底物条件下,亦能经过“无效循环”产生超氧阴离子,氢氧基及过氧化物等。Raza等^[12]在 STZ 诱导构建的糖尿病大鼠及其子代乳鼠中均发现 ROS 生成量与 CYP2E1 表达及活性在肝、肾、脑、皮肤等组织中明显增加。ROS 在糖尿病时被公认为是高糖促进 VSMC 增殖的重要因素。我们在基因芯片筛选结果中同样发现 CYP2E1 在糖尿病大血管 SMC 中三期均显著高表达,提示其可能是早期糖尿病大血管病变 SMC 增殖的较关键基因,但是否是关键基因或重要基因,以及促进 SMC 增殖的机制目前尚不清楚。

总之,早期基因表达谱的建立和研究为揭示糖尿病血管并发症的病理机制,为寻找药物筛选的靶

点以及疾病进程的标记物奠定了重要基础。对上述 5 条基因,特别是 CYP2E1 在 VSMC 增殖中的作用深入研究,将为临床诊治糖尿病大血管病变提供重要理论依据。

[参考文献]

- [1] 张传森,陈尔瑜,姜宗来,等.伴有高血压的糖尿病大鼠主动脉的结构重建[J].解剖学杂志,2002,25:394-398.
- [2] Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74[J]. J Exp Med, 2003, 197: 1467-1476.
- [3] Burton JD, Ely S, Reddy PK, et al. CD74 is expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 6606-6611.
- [4] Yu-Lee LY, Hrachovy JA, Stevens AM, et al. Interferon-regulatory factor 1 is an immediate-early gene under transcriptional regulation by prolactin in Nb2 T cells[J]. Mol Cell Biol, 1990, 10: 3087-3094.
- [5] Romeo G, Fiorucci G, Chiantore MV, et al. IRF-1 as a negative regulator of cell proliferation[J]. Interferon Cytokine Res, 2002, 22: 39-47.
- [6] Verze L, Viglietti-Panzica C, Maurizo S, et al. Distribution of GAP-43 nerve fibers in the skin of the adult human hand[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2003, 272: 467-473.
- [7] Gutmann DH, Huang ZY, Hedrick NM, et al. Mouse glioma gene expression profiling identifies novel human glioma-associated genes[J]. Ann Neurol, 2002, 51: 393-405.
- [8] Griffin E, Re A, Hamel N, et al. A link between diabetes and atherosclerosis: glucose regulates expression of CD36 at the level of translation[J]. Nat Med, 2001, 7: 840-846.
- [9] Lamharzi N, Renard CB, Kramer F, et al. Hyperlipidemia in concert with hyperglycemia stimulates the proliferation of macrophages in atherosclerotic lesions: potential role of glucose-oxidized LDL[J]. Diabetes, 2004, 53: 3217-3225.
- [10] Srivastava AK. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: A potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes[J]. Int J Mol Med, 2002, 9: 85-89.
- [11] Graham RA, Downey A, Mudra D, et al. In vivo and in vitro induction of cytochrome P450 enzymes in beagle dogs[J]. Drug Metab Dispos, 2002, 30: 1206-1213.
- [12] Raza H, John A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2004, 20: 72-78.

[收稿日期] 2005-06-17

[修回日期] 2005-10-19

[本文编辑] 尹 茶