

用聚类法分析受抗真菌物质处理后的 酵母细胞全基因表达谱*

张亮^{1,3)} 张岩^{1,3)} 周一鸣^{1,3)} 安爽³⁾

果德安⁵⁾ 周玉祥^{1,2,3)} 曾令文³⁾ 程京^{1,2,3,4)}**

(¹⁾清华大学生物科学与技术系, ²⁾清华大学生物膜与膜工程国家重点实验室, ³⁾生物芯片北京国家工程研究中心,

⁴⁾清华大学医学院药理学系, 北京 100084; ⁵⁾北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 微阵列 DNA 芯片技术可以并行分析成千上万个基因的表达情况, 它为研究药物的作用机制提供了一个新的高效技术平台。用 9 种已知和未知作用机理的抗真菌化合物处理酵母细胞, 并得到酵母细胞的全基因表达谱, 然后对其进行聚类分析。结果表明作用机制类似的化合物具有相近的聚类关系。两性霉素 B 和制霉菌素、酮康唑和克霉唑都是已知的作用机制类似的抗真菌药物。通过对基因表达谱进行聚类分析, 发现前一组和后一组分别被聚类在一起。另外已知澳洲茄胺抑制的是细胞膜上麦角固醇的合成, 聚类分析表明它与酮康唑、克霉唑的聚类很靠近。对微阵列 DNA 芯片产生的基因表达谱进行聚类分析, 由于作用机制相似的药物会被聚类在一起, 因此根据未知药物和已知药物的聚类关系, 可以了解未知药物的作用机制, 这对于加速新药开发的步伐具有十分重要的意义。

关键词 微阵列 DNA 芯片, 抗真菌药物, 聚类分析

学科分类号 Q78

微阵列 DNA 芯片技术可以一次并行检测成千上万个基因的表达情况, 已在药物研发中得到应用^[1]。随着大规模基因测序工作的进展, 有超过 40 种微生物的基因组已经完成了测序工作^[2], 因而可以利用这些信息构建相应生物的全基因组微阵列 DNA 芯片, 用于细胞生命代谢^[3]、菌株基因组差异^[4]、药物作用机理^[5]等方面的研究。酿酒酵母作为一种模式真核生物, 在其 6 000 多个基因中, 已有 56.6% 的基因功能已知或与已知基因高度同源 (参见网页: <http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/yeast>), 因而酵母的全基因组微阵列 DNA 芯片是研究抗真菌物质的作用机理的理想技术平台^[6]。对于微阵列 DNA 芯片研究所产生的海量数据, 需要结合统计数学的方法才能探究其中蕴含的奥妙关系。系统聚类法 (hierarchical cluster analysis) 是对微阵列 DNA 芯片数据进行分析的众多方法中应用最为广泛的一种^[7,8]。它是把微阵列 DNA 芯片上的每个基因看作一个独立的类, 然后根据多次芯片所产生的实验数据, 计算出每两个类之间的距离, 把最为接近的两个类合并, 用一个新的类替换, 该新类的值为此两类的平均值, 如此对其他基因作相同处理, 然后用同样的方法进行下级处理, 直至最终形成一个类, 这样就能够使这些数据点形

成一个家谱的树状结构, 其中树枝的长度所表示的是两组数据的相似程度。在构建酿酒酵母全基因组微阵列 DNA 芯片的基础上, 我们用 9 个具有抗真菌活性的物质处理酵母细胞得到各自的基因表达谱, 然后对基因表达谱的数据进行聚类分析。聚类分析的结果表明, a. 有类似调控序列的基因其表达方式是相似的, 因而会被聚类在一起, 给我们寻找这些共同的调控序列提供依据; b. 功能相似的基因聚类关系接近, 可以使我们通过那些已知功能的基因推测出未知基因的功能; c. 不同化合物处理酵母细胞后, 化合物的聚类关系也可以使我们了解其作用机制是否有相似之处。

1 材料和方法

1.1 材料

两性霉素 B (amphotericin B)、制霉菌素 (nystatin)、盐酸小檗碱 (berberine chloride)、5-氟胞嘧啶 (5-fluorocytosine)、克霉唑 (clotrimazole)、澳洲茄胺 (slasodine) 购自 Sigma 公司, 酮康唑

* 国家自然科学基金 (39889001, 39825108, 30070917) 及国家重点基础研究 (G19990116) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62773059, E-mail: jcheng@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2002-01-25, 接受日期: 2002-03-28

(ketoconazole) 购自 ICN Biomedicals Inc., 大蒜新素 (allitridi) 购自上海禾丰制药有限公司, 土槿皮酸 B (psudolaric acid B) 由北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室提取获得. 除大蒜新素外, 其余药品都溶于二甲基亚砷 (DMSO) 中.

培养酵母菌的 YPD 培养基成分: 1% 酵母提取粉, 2% 蛋白胨及 2% 葡萄糖, pH = 6.0 ± 0.2, 108 °C 灭菌 20 min.

接受药物处理的 L1190 酿酒酵母菌株为双倍体菌株.

1.2 微阵列 DNA 芯片实验步骤

酵母微阵列 DNA 芯片的构建, 酵母菌 RNA 的抽提, 反转录标记 cDNA, 杂交以及数据处理方法与我们以前的报道相同^[9]. 利用 DNA 芯片上的内标系统对分析数据进行归一化. 同时为了消除荧光素 cy3 和 cy5 在标记 cDNA 和扫描过程中的差异, 化合物处理和对照的酵母细胞 RNA 样在反转录过程中进行荧光交换实验, 即 cy3 标记处理细胞的 RNA, cy5 标记对照细胞的 RNA 样为一组; cy5 标记处理细胞的 RNA, cy3 标记对照细胞的 RNA 样为荧光交换的一组, 基因变化的数值取两组数据的平均值. 而对于每个化合物处理, 都作两次独立性的实验, 分析两次实验中表达变化趋势一样的基因. 这样一个化合物处理需要 4 张 DNA 芯片来得到基因表达谱数据.

1.3 化合物处理酵母细胞

各化合物对酿酒酵母菌株 L1190 的最小抑制浓度 (MIC 值) 测定方法参照文献 [6]. 酵母菌在 YPD 液体培养基中 30 °C 培养至对数早期 (A_{600}

≈ 0.8), 分成若干等份, 加入各化合物至其 MIC 值的 1/2 浓度. 具体的终浓度是: 两性霉素 B 和制霉菌素为 2.5 mg/L、盐酸小檗碱 100 mg/L、5-氟胞嘧啶 25 mg/L、酮康唑和澳洲茄胺为 50 mg/L、克霉唑 2.5 mg/L, 土槿皮酸 B 6.0 mg/L、大蒜新素 9.0 mg/L. 大蒜新素的对照样加等量体积的水, 其余样品的对照加入等体积的 DMSO, 加入 DMSO 的体积小于培养基总体积的 0.1%, 以避免由 DMSO 带来的对基因表达的影响. 继续培养 90 min (酵母细胞的倍增时间), 测定处理的及对照样品的 A_{600} 值. 化合物处理样品的生长率是对照菌的 65% ~ 85%. 5 000 r/min 离心回收细胞, 于液氮中速冻, 转移至 -85 °C 冰箱保存抽提 RNA 备用.

1.4 系统聚类分析

系统聚类分析软件 Cluster 及其分析结果可视化软件 TreeView 都从 Stanford 大学下载 (<http://rana.stanford.edu/clustering>).

2 结果和讨论

利用酵母基因组规模的微阵列 DNA 芯片, 可以高通量地研究酵母细胞在基因表达水平上对不同化合物的反应. 对所获得的全基因表达谱分析表明, 作用机理不同的化合物处理后, 细胞的基因表达变化差异很大, 例如两性霉素 B 处理后有 1 455 个基因的表达变化在 2 倍以上, 酮康唑处理有 253 个基因的表达变化在 2 倍以上, 而土槿皮酸 B 处理只有 24 个基因的表达变化在 2 倍以上. 本研究所用化合物的抗真菌作用机理列于表 1 中.

Table 1 The pharmacological mechanisms of nine antifungal agents

Antifungal agents	The known antifungal mechanisms
amphotericin B	Bind to ergosterol in the fungi cellular membrane and cause the formation of cell membrane pores, leading to leakage of cell components.
nystatin	Act the same mechanisms as amphotericin B
ketoconazole	Inhibition of the lanosterol C-14 demethylase in the ergosterol synthesis.
clotrimazole	Act the same mechanisms as ketoconazole.
slasodine	Inhibition of the sterol C-24 methyltransferase ^[10] .
5-fluorocytosine	Inhibition of DNA synthesis, as well as incorporation into RNA, which is then aberrant and results in the faulty protein synthesis.
allitridi	Its antifungal mechanisms are mostly inferred from allicin. The antifungal mechanisms are related to inhibition of thiol-containing enzymes. In addition, its antioxidant properties ^[11] , stimulating the produce of NO ^[12] and inhibiting platelet aggregation ^[13] are also observed.
berberine chloride	Its antifungal mechanisms may relate to the inhibition of carbohydrate and toxicity to cellular membrane ^[14] . In addition, it can stimulate the produce of NO ^[15] and inhibit platelet aggregation ^[16] .
pseudolaric acid B	Still unknown

单独分析每种药物作用后获得的基因表达谱(图 1), 可以获得相应的与化合物作用机制相关的信

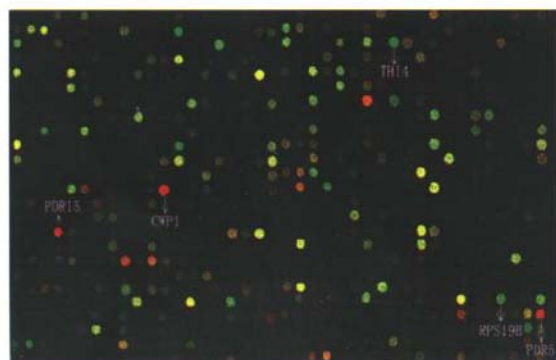


Fig. 1 The pseudo color image (partial) of hybridization on the cDNA microarray obtained from the yeast cells after being treated with 50 mg/L slasodine for 90 min

red: induced; green: repressed; yellow: no change.

息。例如分析已知作用靶点在细胞膜上的抗真菌药物(两性霉素 B, 制霉菌素)所对应的基因表达谱可以发现, 与膜上营养物质吸收有关的协助运输蛋白的编码基因受到诱导, 这样细胞可以缓解药物所造成的伤害。而通过聚类方法分析多个化合物的基因表达谱, 可使我们获知各种化合物之间的聚类关系。

用从 Stanford 大学下载的 Cluster 及 TreeView 分析软件^[7], 选择 Cluster 方法中的 Average Linkage Clustering 算法, 然后用 TreeView 软件把计算结果作可视化展现, 结果见图 2。

图 2 中的聚类关系表明, 两性霉素 B 和制霉菌素、酮康唑和克霉唑作用于酵母细胞后的基因表达谱的聚类关系是最接近的, 这与它们已知的药理机制相近是相吻合的。从澳洲茄胺、酮康唑以及克霉

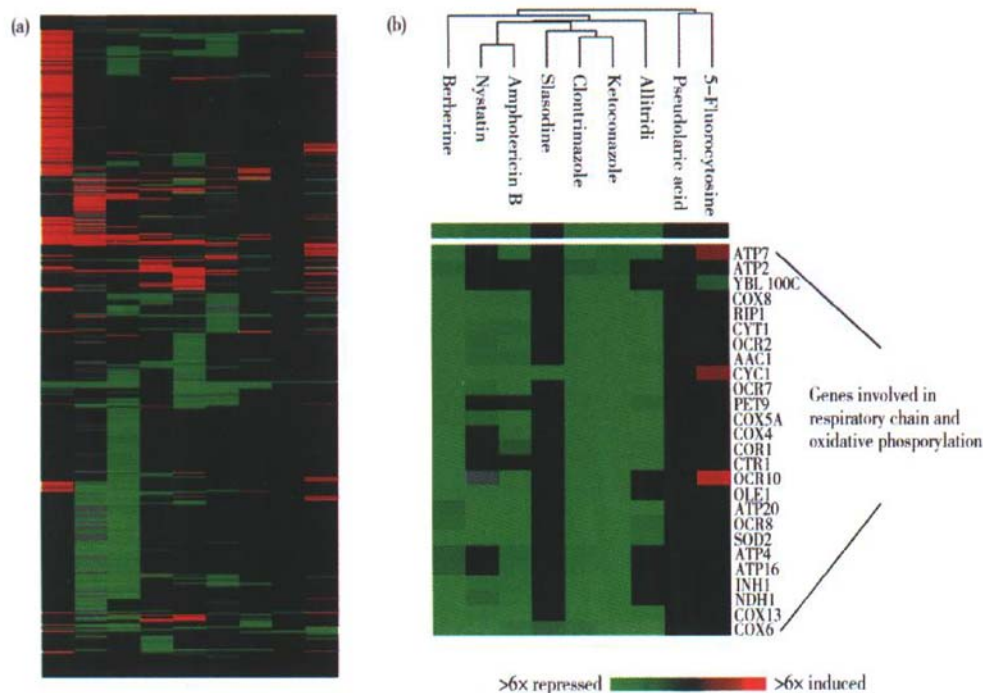


Fig. 2 Clustered display of genome-wide DNA microarray data from nine antifungal agent-treated yeast cells

Rows represent genes and columns represent individual array experiment (antifungal agents treatment). (a) the thumbnail cluster image of 6 000 genes; (b) the zoomed image of gene cluster related to respiratory chain and oxidative phosphorylation. red: induced; green: repressed; black: no change; gray: no detection.

唑已知的抗真菌机制来看, 三者的作用都是抑制细胞膜上麦角固醇的合成, 因而三者的聚类关系是相近的。对土槿皮酸 B 作用于酵母细胞后的基因表达谱进行分析可推测它的作用是使细胞的 DNA 受损, 并且抑制细胞分裂时子细胞从母细胞的分离。分析酵母细胞受 5- 氟胞嘧啶处理后的表达谱, 发

现除了 DNA 损伤修复相关的基因被诱导外, 细胞分裂时子细胞从母细胞上分离的相关基因也受到了抑制, 推测其可能也抑制了细胞分裂时子细胞从母细胞上的分离, 因而土槿皮酸 B 和 5- 氟胞嘧啶在聚类分析时被聚类在一起。盐酸小檗碱和大蒜新素的药理机制比较复杂, 它们和上述抗真菌活性化合

物的聚类关系比较远. 可以扩大已知和未知的化合物种类, 聚类分析其处理酵母细胞后得到的基因表达谱, 通过聚类关系, 从已知作用机理的化合物来推测未知化合物的作用机理.

从纵向来看基因的聚类, 功能相似的基因被聚类在一起, 图 2 表明了呼吸链和氧化磷酸化的有关基因是被聚类在一起的, 其中一些未知功能的基因, 例如 YBL100C, 它所处的聚类位置可以给它的功能研究提供线索. 由于目前对真菌致病性相关基因还了解比较少, 因而挑出此类基因还比较困难. 随着医学分子微生物和其他领域研究的进展, 初步弄清了与真菌致病性的相关基因后, 也可以根据基因表达谱的聚类关系把此类基因挑出来. 我们的研究表明基于生物芯片的药物筛选是一种快速、高效、低耗的大规模药物初筛方法.

参 考 文 献

- 1 Dehouck C, Goodfellow P N. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet*, 1999, **21** (1 Suppl): 48~ 50
- 2 Read T D, Gill S R, Tettelin H, *et al.* Finding drug targets in microbial genomes. *Drug Discov Today*, 2001, **6** (17): 887~ 892
- 3 DeRisi J L, Iyer V R, Brown P O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997, **278** (5338): 680~ 686
- 4 Behr M A, Wilson M A, Gill W P, *et al.* Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 1999, **284** (5419): 1520~ 1523
- 5 Wilson M, DeRisi J, Kristensen H H, *et al.* Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (22): 12833~ 12838
- 6 Bammert G F, Fostel J M. Genomewide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, **44** (5): 1255~ 1265
- 7 Eisen M B, Spellman P T, Brown P O, *et al.* Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (25): 14863~ 14868
- 8 Gasch A P, Spellman P T, Kao C M, *et al.* Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, 2000, **11** (12): 4241~ 4257
- 9 Zhang L, Zhang Y, Zhou Y M, *et al.* Response of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* to amphotericin B and nystatin measured by microarrays. *J Antimicrob Chemother*, 2002, **49** (6): 905~ 915
- 10 王理达. 四种抗真菌生药活性成分的作用机理研究: [学位论文]. 北京: 北京医科大学, 1999
Wang L D. Antifungal mechanisms of four chemical constituents from crude drugs: [Ph. D dissertation]. Beijing: Beijing Medical University, 1999
- 11 Rabinkov A, Miron T, Mirelman D, *et al.* S-allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1499** (1-2): 144~ 153
- 12 Dirsch V M, Kierner A K, Wagner H, *et al.* Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis*, 1998, **139** (2): 333~ 339
- 13 Qi R, Liao F, Inoue K, *et al.* Inhibition by diallyl trisulfide, a garlic component, of intracellular Ca^{2+} mobilization without affecting inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP (3)) formation in activated platelets. *Biochem Pharmacol*, 2000, **60** (10): 1475~ 1483
- 14 季宇彬, 张广美 主编. 中药抗肿瘤有效成分药理与应用. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1998. 56~ 68
Ji Y B, Zhang G M. Pharmacological action and application of available antitumor composition of traditional Chinese medicine. Haerbin: Heilongjiang Scientific Press, 1998. 56~ 68
- 15 Ko W H, Yao X Q, Lau C W, *et al.* Vasorelaxant and antiproliferative effects of berberine. *Eur J Pharmacol*, 2000, **399** (2-3): 187~ 196
- 16 储钟禄, 黄国才, 徐志平. 小檗碱的抗血小板作用机制. 中国中西医结合杂志, 1994, **14** (8): 510~ 512
Chu Z L, Huang G X, Xu Z P. *Chin J Integr Med*, 1994, **14** (8): 510~ 512

Cluster Analysis of Yeast Genome-wide Expression Patterns Obtained by Treating With Different Antifungal Agents*

ZHANG Liang^{1,3)}, ZHANG Yan^{1,3)}, ZHOU Yu-Ming^{1,3)}, AN Shuang³⁾,
GUO De-An⁵⁾, ZHOU Yu-Xiang^{1,2,3)}, ZENG Ling-Wen³⁾, CHENG Jing^{1,2,3,4)**}

(¹⁾Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, (²)The State Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, (³)National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, (⁴)Department of Pharmacology, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China; (⁵)The State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract To examine the application of DNA microarray in drug discovery and development, cluster analysis for genome-wide expression data was tested after *Saccharomyces cerevisiae* was treated with nine antifungal agents with known and unknown pharmacological mechanisms. The results indicated that antifungal agents with

similar action mode were clustered together. Amphotericin B and nystatin, ketoconazole and clotrimazole have been known to have similar antifungal mechanism respectively. Consistent with their known mechanisms, amphotericin B and nystatin were clustered together; also ketoconazole and clotrimazole were clustered together based on their expression patterns. Solasodine, which was known to inhibit the synthesis of ergosterol, had a close clustering position with ketoconazole and clotrimazole group. Analyzing the relationship among the known and unknown drugs using cluster approach, It can be inferred that the pharmacological mechanisms of unknown drugs from their clustering positions relating to the known drugs.

Key words DNA microarray, cluster analysis, antifungal agents

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39889001, 39825108, 30070917) and The Special Funds for Major State Basic Research of China (G19990116).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62773059, E-mail: jcheng@tsinghua.edu.cn

Received: January 25, 2002 Accepted: March 28, 2002

BIO CHINA 2002
中国国际生物创新项目成果交易洽谈会
京伦饭店 北京
2002 年 8 月 28~ 31 日

为进一步加快生物科技成果项目转化的步伐, 我们于 2002 年 8 月 28~ 31 日在北京京伦饭店举办中国国际生物创新项目成果交易洽谈会。

本次洽谈会集展览、论坛、项目发布、成果交易、新产品演示于一体, 涉及生物技术产业及其在农业、医疗、工业与环境等方面。大会将设生物产业洽谈专场、生物技术洽谈专场、生物发展洽谈专场、生物资源洽谈专场、生物信息洽谈专场、药厂 CEO 论坛、投资机构 CEO 论坛 ...

通过参加此次洽谈会可以深入了解目前生物技术领域的最新科研成果和投资机会, 并有机会和该领域内的专家进行面对面的交流, 找到适合自己的投资机会和商机。这无论对于寻找项目或是对具体项目进行融资都是一个很好的途径, 并且通过参加此次洽谈会可迅速提高贵公司(机构)在行业内的知名度。在本次会议上发布的报告经审核后将在《遗传》杂志上全文刊登, 药类报告、文章、科研成果、项目经审核后将在《中国新药》杂志上全文刊登。

因此, 我们诚邀您参加本次洽谈会。

中国国际生物创新项目成果交易洽谈会组委会

联系电话: 010-51026291, 51026292, 51026293

传真: 010-51026290

E-mail: genefax@263.net

网址: www.genefax.com

地址: 北京市东城区东滨河路 3 号院 6 号楼 208 室

邮编: 100013