

用 cDNA 表达阵列分析遗传性癫痫易感大鼠 海马和大脑皮质的基因表达*

吴志国 肖波** 杨晓苏 李国良 谢光洁

(中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008)

摘要 采用 AtlasTM Rat cDNA Expression Array 建立遗传性癫痫易感性 P77PMC 大鼠和正常对照 Wistar 大鼠的海马与大脑皮质基因表达谱, 用 Eagle Eye II Still Video System (Stratagene) 图象分析仪分析两者基因表达谱差异. 结果发现海马和大脑皮质中各有 15 个差异表达基因. 海马组织中, 12 个基因在 P77PMC 大鼠中高表达而在正常对照 Wistar 大鼠中低表达, 3 个基因在正常对照 Wistar 大鼠中高表达, 而在 P77PMC 大鼠中低表达; 大脑皮质中, 13 个基因在 P77PMC 大鼠中高表达, 而在正常对照 Wistar 大鼠中低表达, 2 个基因在正常对照 Wistar 大鼠中高表达, 而在 P77PMC 大鼠中低表达. 结果说明, P77PMC 大鼠与正常对照 Wistar 大鼠海马和大脑皮质存在多个差异表达基因, 这些差异表达基因可能在癫痫的发生中扮演了重要角色.

关键词 cDNA 阵列, 基因表达谱, P77PMC 大鼠

学科分类号 Q189, R742.1

癫痫是常见神经系统疾病, 严重地影响患者的生活质量. 长期以来, 有关癫痫的发病机制已有大量研究, 但其发病分子机制目前仍不十分清楚. 本研究采用目前国际上最新的 cDNA 表达阵列技术, 比较研究了遗传性癫痫易感性 P77PMC 大鼠^[1]和正常 Wistar 大鼠海马与大脑皮质的基因表达谱, 旨在寻找其中的差异表达基因, 为从基因水平阐明癫痫的发病机制打下基础.

1 材料和方法

1.1 标本及阵列来源

遗传性癫痫易感大鼠是由北京医科大学药理教研室于 1977 年从 Wistar 大鼠封闭群中筛选出的“听源”阳性大鼠, 命名为 P77PMC, 进行兄妹交配第 7 代后移交北京医科大学实验动物学部于一级环境中近交繁殖饲养. 本实验选用的 8 例 5 周龄 P77PMC 大鼠和 9 例对照组 5 周龄 Wistar 大鼠均由北京医科大学实验动物学部提供. 大鼠在麻醉下断头取脑, 分离海马和大脑皮质, 并即刻液氮冻存.

AtlasTM Rat cDNA Expression Array 购自美国 CLONTECH 公司, 一套两张膜. 膜分 A, B, C, D, E 和 F 6 个区, 包括离子通道、转录因子、DNA 结合蛋白、细胞间通讯因子、受体、细胞表面抗原、细胞粘附、细胞内信号传导等 16 大类共 588 个基因 cDNA 阵列. 膜底部设有阴性对照、空白对照和 9 个看家基因组成的阳性对照, 为 G 区.

1.2 总 RNA 提取及去 DNA 消化处理

用 TRIzol (GIBCO BRL) 抽提组织总 RNA. DNase I 消化去除 gDNA 后再抽提总 RNA. 紫外分光光度计测浓度和纯度, 以看家基因 β -生物素 (β -actin) 设计引物, PCR 扩增检测有无 gDNA 污染. 取 RNA 2 μ g 于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 图象分析仪检测摄象.

1.3 海马与大脑皮质基因表达谱的建立

按照 CLONTECH 用户手册进行. 每样品各取 4 μ g RNA, 用 α -³²P-dATP 逆转录标记合成 cDNA 探针, 探针过柱纯化后分别与 AtlasTM Rat cDNA Expression Array 杂交过夜, 然后洗膜并用 Kodak 胶片于 -70℃ 放射自显影 48 h. 对所有实验杂交结果重复两次以确定实验的可靠性.

1.4 用半定量 RT-PCR 考证基因表达谱的结果

随机选取 5 个差异表达基因, 根据 Genbank 序列号获取序列, 并设计引物. 基因名称、引物序列 (上游, 下游)、产物大小如下. CALM: 5' acagegaggaggagataga 3', 5' gtttgctagaaccgggtacg 3'; 300 bp;

* 教育部高校骨干教师基金资助项目 [教技司 (2000) No. 65] 和湖南省科委课题 (99SSY1010).

** 通讯联系人. 中南大学湘雅医院神经病学研究所, 长沙 410008

Tel: 0731-4327236, E-mail: yanxia@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2001-10-12, 接受日期: 2001-12-29

IGFBP-1: 5' ctgccaaactgcaacaagaa 3', 5' cagccaatag-gcatcagaca 3'; 597 bp; RPL21: 5' atgggcactgttcaaa-aagg 3', 5' tcttcacaaagtgggcttct 3', 295 bp; KCIP-1: 5' ctaccgctacttggtgagg 3', 5' ccgatgtccacaatgtcaag 3'; 317 bp; NHE-2: 5' ttgtccagaacctgctctt 3', 5' tctgg-gacacgtttctctcc 3'; 451 bp; β -actin: 5' gtgtcgacaac-ggctccgg 3', 5' gccacacgcagctcattgtagaaggtg 3'; 351 bp. 半定量 RT-PCR 设计: 减少循环数至 30, 即于平台期前结束反应; 控制模板量一致; 加入内对照 β -actin 引物于反应体系中同时扩增. PCR 反应条件为: 94 °C, 30 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 1 min.

1.5 结果分析

放射自显影基因表达谱及 RT-PCR 的凝胶电泳结果均经 Eagle Eye II Still Video System (Stratagene) 图象分析仪测定各点累积光密度值 (integrated density, ID). 基因表达谱中设所有看家基因 ID 值之和的平均值为 10, 得出其他基因表达的相对 ID 值. 遗传鼠与正常鼠相比 ID 值相差超过 30% 的基因则被认为是表达有差异的基因^[2].

2 结 果

2.1 组织总 RNA

提取各组织总 RNA, 经 DNase I 消化后, PCR 检测无 gDNA 污染, A_{260}/A_{280} 值均在 1.9~2.0 之间, 电泳检测无降解 (图 1).

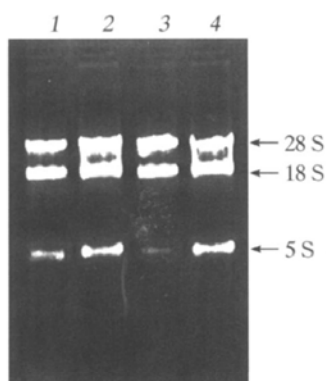


Fig 1 Electrophoresis of tissue total RNA on 1.2% agarose gel

1: the hippocampi of normal Wistar rats. 2: the cerebral cortex of normal Wistar rats. 3: the cerebral cortex of genetical epilepsy-prone P77PMC rats. 4: the hippocampi of genetical epilepsy-prone P77PMC rats.

2.2 组织基因表达谱

成功建立了遗传性癫痫易感性 P77PMC 大鼠

和正常对照 Wistar 大鼠海马与大脑皮质的 588 个基因表达阵列. 重复两次实验结果相同, 表达谱中阳性、阴性、及空白对照均证实所建立的基因表达谱具有相当的可靠性 (图 2~ 图 5).

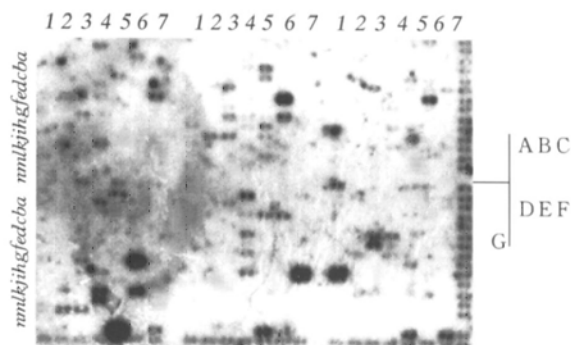


Fig. 2 Gene expression profiling of the hippocampi of normal Wistar rats

1~7: means line; a~n: means row; A~G: means domain.

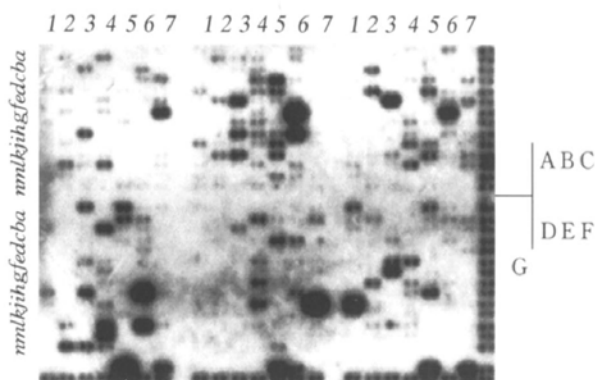


Fig. 3 Gene expression profiling of the hippocampi of genetic epilepsy-prone P77PMC rats

1~7: means line; a~n: means row; A~G: means domain.

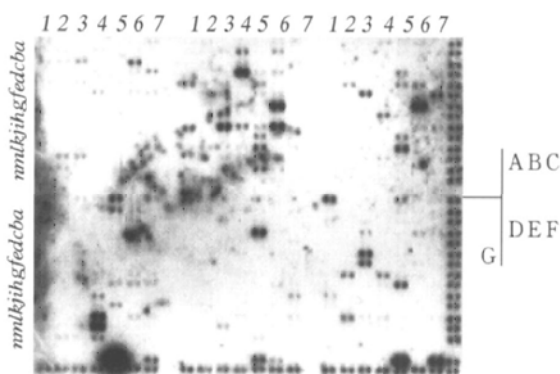


Fig. 4 Gene expression profiling of the cerebral cortex of normal Wistar rats

1~7: means line; a~n: means row; A~G: means domain.

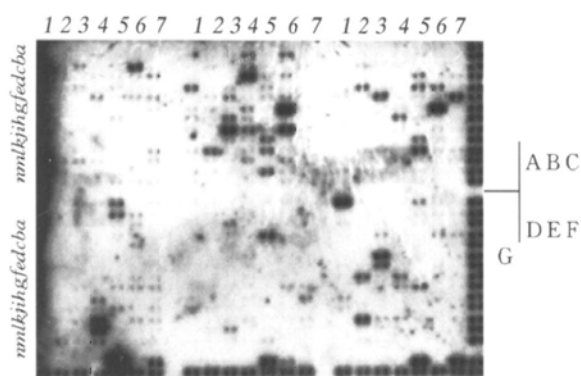


Fig. 5 Gene expression profiling of the cerebral cortex of genetic epilepsy-prone P77PMC rats

1~7: means line; a~n: means row; A~G: means domain.

2.3 组织基因表达谱的差异

从基因表达谱图中可以看出, 遗传大鼠 P77PMC 与正常对照大鼠 Wistar 两者的基因表达谱相似, 均存在有大量低表达的基因. 在海马和大脑皮质中各发现有 15 个差异表达基因 (表 1 和表 2). 海马组织中, 12 个基因在 P77PMC 大鼠中高表达而在正常 Wistar 大鼠中低表达, 3 个基因在正常 Wistar 大鼠中高表达, 而在 P77PMC 大鼠中低表达; 大脑皮质中, 13 个基因在 P77PMC 大鼠中高表达, 而在正常 Wistar 大鼠中低表达, 2 个基因在正常 Wistar 大鼠中高表达, 而在 P77PMC 大鼠中低表达.

Table 1 The differential expression genes of hippocampi in Atlas™ cDNA Expression Array

Coordinate	Gene		Relative integrated density (ID)	
	Name	Genbank No.	Normal Wistar rat	P77PMC rat
B3f ¹⁾	JNK2	L27112	3.573	5.730
B3i	ERK2, MAPK1	M61177	3.312	4.699
B4d	PKC-beta	M19007	2.032	3.486
B4e	PKC-delta	M18330	1.636	2.470
B5d	PLCdelta 1	M20637	3.805	5.654
B6g	CALM	X13817	8.701	16.665
B6i	KCIP-1	D17615	5.603	13.367
C3f	PLP	M11185	3.735	9.510
C6g	PMCA	J03754	6.026	9.736
E4b	GIP-R	L19660	5.929	4.417
E4f	GP-K+ inward rectifier	L77929	4.775	3.417
E6d	NHE-2	L11004	5.254	3.598
E7j	GABA transport 3	M95738	15.104	23.677
F5a	DPP6	M76426	2.957	4.202
F5i	carboxypeptidase	M31602	3.389	5.029

¹⁾ B3f: means domain B, line 3 and row f.

Table 2 The differential expression genes of cerebral cortex in Atlas™ cDNA Expression Array

Coordinate	Gene		Relative integrated density (ID)	
	Name	Genbank No.	Normal Wistar rat	P77PMC rat
A6c ¹⁾	PTMA	M20035; M86564	2.952	4.627
B1i	RLIF1	X63594	2.771	0.763
B2k	GMRP	X67241	1.751	3.830
B3i	ERK2, MAPK1	M61177	5.602	7.981
B4i	PKC-zeta	M18332	2.433	4.215
B5j	GNB1	U34958	2.231	3.680
C2e	TRPM2	M64723	1.146	2.370
C3f	PLP	M11185	3.035	4.063
D4l	RPL21	M27905	6.812	8.798
D4m	RPL19	J02650	7.295	9.070
F1a	IGFBP-1	M89791	4.437	8.270
F2h	HGAP	M55601	2.621	4.713
F2l	Sst	M25890	2.755	5.279
F3f	PDGF-AP	U41744	4.841	5.893
F5a	DPP6	M76426	2.606	1.763

¹⁾ A6c: means domain A, line 6 and row c.

2.4 半定量 RT-PCR 分析

5 个基因的半定量 RT-PCR 结果经密度分析计算 (未显示), 只有个别基因在个别大鼠组织中的表达水平不完全相符, 绝大多数基因在各大鼠中的表达水平与阵列检测出的相符, 符合率达 93% 左右, 进一步说明用 cDNA 表达阵列所建立的基因表达谱具有相当的可靠性。

3 讨 论

cDNA 阵列是 20 世纪 90 年代后期发展起来的研究基因表达的新技术, 克服了传统方法对基因表达水平检测敏感度不够高 (如 RNA 印迹), 一次只能检测一个或几个基因表达 (如 RT-PCR) 或需要大规模测序 (如 SAGE) 的局限性, 并可以高敏感地定性、定量检测基因表达水平, 以及可同时研究同一组织或不同组织中成千上万个基因的表达, 是一种高产出现而又快速有效的新的基因表达分析方法^[3,4]。cDNA 阵列技术以及随后发展起来的 DNA 微阵列 (microarray) 或 DNA 芯片技术, 目前正广泛应用于分子生物学的各个领域, 显示出强大的生命力。

本课题采用美国 CLONTECH 公司最新生产的含 588 个基因的 AtlasTM Rat cDNA Expression Array, 研究了正常对照组 Wistar 大鼠和遗传性癫痫易感性 P77PMC 大鼠海马与大脑皮质中的基因表达谱。结果在海马和大脑皮质中各发现有 15 个差异表达基因, 这些差异表达基因以 B 区细胞内信号转导因子、E 区离子通道基因和 F 区细胞间通讯因子为主 (占 76.7%)。已有研究表明, 这些基因主要在神经系统的发育与分化、神经元损伤后的保护、信号传导、神经系统肿瘤的发生中起作用, 其中类胰岛素生长因子结合蛋白 1 前体 (insulin-like growth factor binding protein 1 precursor, IGFBP-1) 属胞外蛋白, 在不同的组织中表达不同, 尤以神经系统中表达最高, Monk 等^[5]研究发现 IGFBP-1 的过表达可导致 Silver-Russell syndrome (SRS); 肝磷脂结合生长关联蛋白 (heparin-binding growth associated protein, HGAP) 是神经营养因子成员, 能刺激细胞有丝分裂发生, 在神经系统的发生、肿瘤如神经细胞瘤、急性脑缺血损伤、多发性硬化 (MS)、化学诱导癫痫^[6]中表达上调; PDGF 关联蛋白 (PDGF-associated protein, PDGF-AP) 则通过诱导细胞内 Ca^{2+} 动员和细胞外 Ca^{2+} 流入而使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度增高, 其在 P77PMC 大鼠中表达增高

与癫痫发生中离子通道功能紊乱、持续的钙内流相一致。

本研究发现, 蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 在海马和大脑皮质中均有差异表达 (高表达)。PKC 广泛分布于哺乳动物组织细胞中, 具有多种生理功能, 包括介导细胞生长和增殖的信息传递, 调节核基因表达和功能, 影响细胞周期和程序性死亡等。PKC- β 、- δ 在多种组织中均有表达, 但在脑组织中表达较高。PKC- δ 在 mRNA 和蛋白质水平被来自不同的细胞通路刺激所诱导, 因此推测其在遗传性癫痫中的表达增高可能与癫痫 (刺激) 有关, 但其深入机制尚不清楚。而 PKC- ζ 也在 NF- κ B 的调节中起决定性作用^[7]。在所发现的这些差异表达基因中, 钙调蛋白 (calmodulin, CALM/CAM) 与癫痫关系的研究目前最多, Yechikhov 等^[8]研究发现, CAMK II 和 PKA 活性的改变可能与遗传性听觉易感性癫痫 (GPAS) 的发病机制有关。因此, 本研究发现的 CALM 在 P77PMC 大鼠海马中表达上调, 进一步证实了钙调蛋白可能参与了癫痫的发病。除 CALM 和 HGAP 外, 至今尚无其他差异表达基因与癫痫发生直接相关的报道, 它们在癫痫发生中的作用还有待进一步研究。另外, 如果对基因表达谱用 AtlasImageTM 1.0 软件包进行计算机分析, 一定还可发现更多有意义的表达差异基因。

cDNA 阵列技术自问世以来, 得到了迅速发展, 已广泛应用于基因表达水平检测、基因克隆、基因突变与多态性检测、DNA 测序、药物筛选、生长发育研究等方面^[4,9]。本实验结果表明, 采用该技术在较大范围内筛选癫痫差异表达基因非常有效, 这些差异表达基因为随后研究癫痫的发病机制和癫痫相关基因的克隆奠定了坚实的基础。

参 考 文 献

- 1 Zhao D Y, Wu X R, Pei Y Q, *et al.* Long-term effects of febrile convulsion on seizure susceptibility in P77PMC rat-resistant to acoustic stimuli but susceptible to kainate-induced seizures. *Exp Neurol*, 1985, **88** (3): 688~695
- 2 谢 鹭, 许亮国, 何志巍, 等. 用肿瘤 cDNA 阵列分析鼻咽癌组织的基因表达. *自然科学进展*, 2000, **10** (4): 378~382
Xie L, Xu L G, He Z W, *et al.* *Prog Nat Sci*, 2000, **10** (4): 378~382
- 3 Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, *et al.* Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotech*, 1996, **14** (13): 1675~1680
- 4 Ramsay G. DNA chips: state-of-the-art. *Nature Biotech*, 1998, **16** (1): 40~44
- 5 Monk D, Wakeling E L, Proud V, *et al.* Duplication of 7p11.2

- p13, including GRB10, in Silver-Russell syndrome. *Am J Hum Genet*, 2000, **66** (1): 36~ 46
- 6 Wanaka A, Carroll S L, Milbrandt J. Developmentally regulated expression of pleiotrophin, a novel heparin binding growth factor, in the nervous system of the rat. *Brain Res Dev Brain Res*, 1993, **72** (1): 133~ 144
 - 7 Diaz Meco M T, Berra E, Municio M M, *et al.* A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol*, 1993, **13** (8): 4770~ 4775
 - 8 Yechikhov S, Morenkov E, Chulanova T, *et al.* Involvement of cAMP and Ca²⁺/calmodulin-dependent neuronal protein phosphorylation in mechanisms underlying genetic predisposition to audiogenic seizures in rats. *Epilepsy Res*, 2001, **46** (1): 15~ 25
 - 9 Wilgenbus K K, Lichter P. DNA chip technology ante portas. *J Mol Med*, 1999, **77** (11): 761~ 768

Analysis of Gene Expression in The Hippocampus and The Cerebral Cortex of Genetical Epilepsy-prone Rats Using cDNA Expression Array^{*}

WU Zhi-Guo, XIAO Bo^{**}, YANG Xiao-Su, LI Guo-Liang, XIE Guang-Jie

(Department of Neurology of Xiangya Hospital, The Xiangya Medical College of Centre South University, Changsha 410008, China)

Abstract Gene expression profiles of hippocampi and cerebral cortex of genetical epilepsy-prone P77PMC rats and normal Wistar rats were established by using AtlasTM Rat cDNA Expression Array. The difference of gene expression profiles was analyzed using image analysis instrument. And 15 differential expression genes were discovered each in hippocampi and cerebral cortex. In the hippocampi, 12 genes were high expression in the P77PMC rats but low expression in the normal Wistar rats, 3 genes were high expression in the Wistar rats but low expression in the P77PMC rats. In the cerebral cortex, 13 genes were high expression in the P77PMC rats but low expression in the normal Wistar rats, 2 genes were high expression in the Wistar rats but low expression in the P77PMC rats. Thus, there are several differential expression genes between P77PMC rat and Wistar rat. All these differentially expressed genes may play important roles in the pathogenesis of epilepsy.

Key words cDNA array, gene expression profile, P77PMC rat

^{*} This work was supported by grants from the Cadreman Teacher's Fund of the Ministry of Education (2000. 65) and Scientific Research Fund of Hunan Province (99SSY1010).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-731-4327236, E-mail: yanxia@public.cs.hn.cn

Received: October 12, 2001 Accepted: December 29, 2001