

双龙方有效成分诱导干细胞分化过程中 差异表达基因的筛选和聚类分析^{*}

□王金津 钱夕元^{**} (华东理工大学理学院 上海 200237)

李 雪 杨辉华 梁琼麟 王义明 罗国安^{**}

(清华大学中药现代化研究中心 北京 100084)

摘 要:目的:利用基因芯片筛选双龙方主要成分(人参皂苷 Rb1, 丹参酚酸 B)诱导大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)分化过程中的差异表达基因,并对差异表达基因进行聚类分析,研究双龙方主要有效成分对大鼠 MSCs 增殖及分化的影响。方法:用含 5705 条大鼠基因的博奥大鼠全基因组 Oligo 芯片,以不同给药情况、不同时间点的细胞总 RNA 制备的探针杂交芯片,用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪(CapitaBio 公司)进行扫描,筛选 MSCs 变化过程中的差异表达基因并进行生物信息分析, hierarchical 聚类提取差异表达的特征基因。结果:在 MSCs 的分化过程中,筛选出 128 条(2.24%)差异表达基因,经分析发现它们与能量代谢,信号传导等多类基因密切相关,对样本进行聚类发现 MSCs 在 20-30 天之间发生了显著的改变。结论:基因芯片是研究中药作用机理的有效平台,双龙方主要成分可诱导 MSCs 向心肌样细胞分化。

关键词: 双龙方 基因芯片 差异基因表达 hierarchical 聚类分析

心肌梗塞作为一种常见的疾病,严重危害着人类健康。有研究表明传统中药双龙方对于心肌梗塞具有明确的治疗作用^[1]。近年来随着基因芯片技术的成熟,微阵列 DNA 芯片技术可以一次并行检测成千上万

基因的表达情况,并在药物研发方面得到了广泛的应用^[2-4]。对于基因芯片产生的表达谱,进行有效的数据筛选找到其中的差异表达基因并进行相关的聚类能够发现基因的表达谱和功能之间存在的联系。我们提出了采用整体系统生物学(Global Systems Biology)^[5-6]开展中药复方配伍和作用机理的研究。本文尝试利用基因芯片来研究双龙方主要有效成分对 MSCs

收稿日期:2007-06-23

修回日期:2007-06-26

^{*} 科学技术部“十·五”科技支撑计划项目(2006BA108B04-01):中药复方作用和配伍评价研究,负责人:罗国安;科学技术部 973 计划专项课题(2005CB523503):中医临床防治慢性肾功能衰竭的系统生物学研究,负责人:李平,罗国安。

^{**} 联系人:钱夕元,副教授,主要研究方向:计算数学与数值软件,信息安全, Tel 021-64253147, E-mail xiyuan@ecust.edu.cn; 罗国安,本刊编委,教授,博士生导师,主要研究方向:中药方剂化学,电话:010-62781688, E-mail luogan@tsinghua.edu.cn

分化的影响。

一、材料与方法

1 细胞标本

(1) 大鼠 MSCs 的提取与培养。

选用雄性 Wistar 大鼠, 肝素钠注射液腹腔注射抗凝, 20 min 后处死, 于无菌条件下取出股骨和胫骨, 剪去骨髓端, 用无血清 DMEM/F12 培养基冲洗四肢骨髓腔, 将冲洗获得的溶液转入无菌离心管中, 以 200g 的速度离心 10 min 弃上清液, 再用培养基重悬沉淀, 加入到梯度 Percoll 液中, 以 800g 的速度离心 20 min 吸取界面处云雾状层, 用含质量分数为 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基重新悬浮, 以 800g/min 的速度离心 10 min 弃上清液, 置于培养瓶内接种。将接种细胞置于 37℃, 用体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。72 h 后更换培养液, 弃去未贴壁细胞。此后每 3 d 更换培养液 1 次, 约 14 d 左右, 细胞达到融合, 消化分瓶传代培养。

(2) 实验分组。

实验分为 3 组, 分别为诱导组、成分组、成分诱导组。诱导组将 2~3 代的 MSCs 制成细胞悬浮液, 加入培养液, 3d 后吸出培养液, 加入含 10 μmol/L 的 5-氮杂胞苷 (5-aza) 的完全培养液, 24 h 后吸出培养液, 清洗 2 次后再加入不含 5-aza 的完全培养液继续培养。成分组不加 5-aza 诱导, 只用加入双龙方成分 (人参皂苷 Rb1, 丹参酚酸 B) 培养基培养; 成分诱导组用 5-aza 诱导后用加入双龙方成分培养基培养。每隔 3~4 d 更换培养液 1 次。分别在第 10、20、30、40 天时取出部分细胞 (约 1×10^6) 作为实验样品。

2 数据库及软件

博奥大鼠全基因组 Oligo 芯片共有 5705 条 70 mer 长度的 Oligo DNA, 每条 Oligo DNA 代表了大鼠的一个基因。关于此 Oligo 库的详情, 参见 Qiagen 公司的网站: http://www.qiagen.com/catalog/auto/cget.asp?pm=micarray_products cluster3.0 以及 Treeview 软件参见 standford 大学网站: <http://www.genom.stanford.edu>

3 基因芯片的质量控制

所有制备表达谱芯片靶基因的 PCR 产物均进行电泳分析, 质量符合表达谱芯片实验要求。从 Qiagen 公司买来的 Oligo 库中设置了 12 条阴性对照序列, 在芯片上的描述都是 Randomized negative control。阴性对照预期的杂交信号是很弱的, 没有进入到所筛选的基因。

4 探针杂交

制备探针的空白和给药样本的 RNA 样品电泳条带清晰, 28S 比 18S RNA 条带亮度大于或接近 2:1, RNA 完好无降解, 质量符合实验要求。

5 芯片的扫描及差异基因的提取和分析

芯片用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪 (CapitaBio 公司) 进行扫描, 采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件 (Axon Instruments 公司) 对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号; 然后对芯片上的数据用 Lowess 方法进行归一化; 分析 cy3、cy5 的信号强度和比值, 判断差异基因的标准: ①在 12 个不同时期诱导组、成分组、成分诱导组样本中有 6 例杂交的 cy3、cy5 的比值大于 2 或者小于 0.5 (基因表达变化在 2 倍以上), ② cy3 和 cy5 信号值大于 400。

6 hierarchical 聚类分析

首先采用 GenePix Pro 4.0 图像分析软件 (Axon Instruments 公司) 对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号; 对于所得的数字信号, 以 ratio 的方式输出。

然后用 cluster3.0 软件进行数据过虑和处理。这里的聚类算法采用的是众多微阵列 DNA 芯片分析方法^[7-8]中最常用的 hierarchical 聚类算法, 它的思想是把芯片上的每一个基因作一个独立的类, 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, 新的类为这两类的平均值; 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, 使数据形成一个树状, 数枝的长度表示两组数据的相似程度。

最后用 Treeview 将芯片中每个基因表达 ratio 用

不同的色彩方块表示输出。

通过 hierarchical 聚类分析对不同时期的诱导组、成分组、成分诱导组的表达基因图谱进行相关性分析, 将表达谱相近的样本和基因放到相邻的类中, 以期发现不同时间, 不同条件下 MSCs 的变化, 并得到与 MSCs 分化最相关的基因群。

二、结 果

1 表达谱芯片和数据分析结果

根据基因芯片的结果, 按标准 (一、材料与方法中的第 6 点) 筛选出 128 条 (2.24%) 差异表达基因, 如图 1 所示。

经生物信息分析, 其中细胞凋亡 (Apoptosis) 3 条, 细胞粘连 (Cell Adhesion) 5 条, 细胞周期 (Cell cycle) 3 条, 分化 (Differentiation) 5 条, 细胞运动 (Cell Motility) 4 条, 细胞组织与生物发生 (Cell organization and biogenesis) 3 条, 发育 (Development) 15 条, 能量代谢 (Metabolism) 26 条, 逆境反应 (Response to stress) 9 条, 信号转导 (Signal) 11 条, 转录调控 (Transcription regulator)

3 条, 物质运输 (Transport) 6 条等 12 类功能, 如图 2 所示, 以及其它一些未知 (Other) 功能密切相关, 说明干细胞向心肌样细胞的转化有着明确的分子生物学基础。

另外还列出了基因差异表达变化最显著的 4 个基因 (杂交的 12 例样本中, 大于等于 6 例样本的 *cy3*, *cy5* 的比值大于 8 或者小于 0.125) (GB accession D1731Q NM_022175 NM_031688 Z18877)。

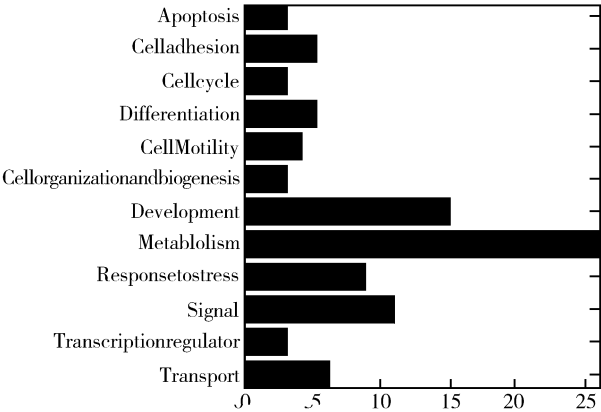


图 2 博奥大鼠全基因组 Oligo 芯片谱芯片扫描及数据分析结果。X 轴表示每类的基因个数, Y 轴表示差异基因类别。

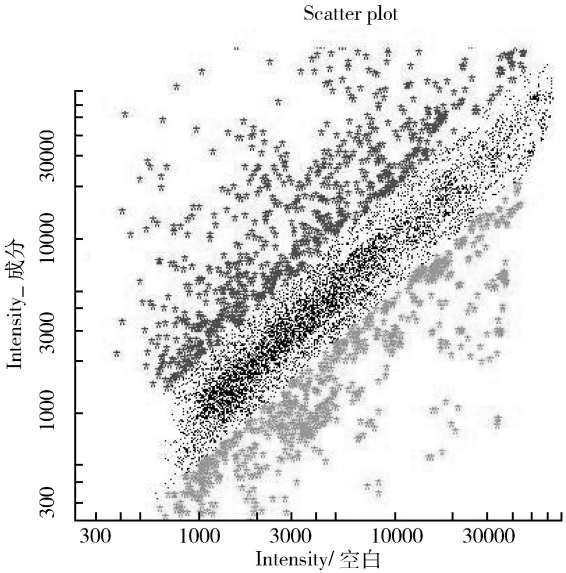


图 1 博奥大鼠全基因组 Oligo 芯片散点图红色的点和绿色的点用来表示差异表达的基因, 黑色的点用来表示差异表达不明显的基因。

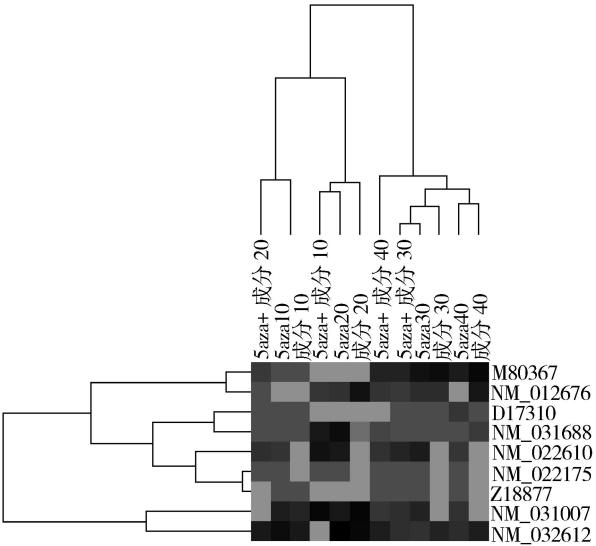


图 3 不同时期诱导组、成分组、成分诱导组的聚类图及相关的特征基因

2 hierarchical聚类结果

通过 hierarchical聚类可以发现样本基本上按用药时间分别聚到了一起(见图 3);尤其是 10天、20天的样本聚到了一大类;30天、40天的样本聚到了一大类,这说明给药的样本在 20-30天之间,发生了明显的变化。

同时在样本的聚类中,30天的诱导组和 30天的成分组样本聚在了一类,40天的诱导组和 40天的成分组样本聚在了一类,这说明双龙方成分和 5-aza对于 MSCs的分化有着相似的作用。

此外,挑出的 4条差异表达最明显的基因,和另外 5条基因聚到了同一类中,从图 3可以看到这些基因的表达在药物的作用下基本为上调。

三、讨论

近年来,MSCs被诱导分化为心肌细胞及其在治疗心肌梗塞方面的作用受到极大的重视。有文献表明中药双龙方对心肌梗塞具有明确的治疗作用^[1]。

为了进一步研究双龙方在 MSCs向心肌样细胞的分化过程中所起的作用,我们引入了大规模、高通量的基因芯片,希望通过对芯片数据的分析找到该过程中基因水平的变化规律。

郭启仓等^[9]研究表明经 5-aza诱导的 MSCs在 3到 4周后,分化为心肌样细胞。通过对样本的聚类发现:20-30天之间,诱导组、成分组和成分诱导组的样本均发生了明显的变化;30天的诱导组和成分组聚到了一类,40天的诱导组和成分组聚到了一类。

由此可以推测 5-aza和中药双龙方主要成分在促进 MSCs向心肌样细胞分化的过程中可能存在相似的作用,考虑中药双龙方主要成分能够诱导 MSCs向心肌样细胞的分化,进而证明了中药双龙方对于心肌梗塞的治疗作用。

贾敏等^[10]发现 MSCs经 5-aza诱导后在 3周左右的时间定向分化为心肌细胞,并推测这可能是由于 5-aza激活了 MSCs携带的决定肌细胞表达的基因位点。

通过对基因的聚类可以发现,4个差异表达最显著的基因 D1731Q NM_022175 NM_031688 Z18877和它的 5个基因聚到的同一类中,并且在诱导组,成分组和成分诱导组中这些基因的表达基本上为上调。MSCs向心肌细胞的转化是一系列基因表达的结果,这些差异表达最显著基因很可能是 MSCs分化为心肌细胞的过程中起到及其重要作用的基因。

中药复方双龙方,具有益气养血、活血通脉的功能,在治疗心肌梗塞方面有显著的作用。本研究初步探讨了其主要成分诱导 MSCs分化为心肌样细胞的基因变化,结果发现其与 5-aza在诱导其变化方面有相似的作用。这为 MSCs体外定向分化为心肌样细胞以及细胞移植治疗心肌梗塞提供了理论基础,为细胞工程治疗有关疾病提供了一种新思路,为今后进一步探讨双龙方的诱导机制提供了理论依据。

参考文献

- 1 李连达,张荣利,刘成源,等.双龙方对大鼠心肌梗塞的治疗作用.中国临床药理学与治疗学,2004,15(3):1~3
- 2 Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nature Genetic (Suppl)*, 1999 21: 48~50
- 3 刘英,李雅杰,朱丽影.用基因芯片研究桃仁蛋白 A 对小鼠纤维肉瘤基因表达的影响.中成药,2004,26(5):56~59.
- 4 任敏,王兴,徐思,等.糖肾平对糖尿病小鼠基因表达的调控作用.中草药,2004,35(10):83~86
- 5 罗国安,梁琼麟,刘清飞,等.整合化学物质组学的整体系统生物学-中药复方配伍和作用研究的整体方法论.世界科学技术-中医药现代化,2007,9(1):10~15,24.
- 6 罗国安,梁琼麟,张荣利,等.化学物质组学与中药方剂研究.世界科学技术-中医药现代化,2006,8(1):6~15,8(2):131
- 7 贺宪民,贺佳,吴聘,等.微阵列数据中常用的分类分析方法.国外医学:生物医学工程分册,2004,27(3):136~140.
- 8 吴筱青,马文丽,郑文岭.基因芯片数据的监督聚类分析.生命的化学,2005,26(2):79~81.
- 9 郭启仓,李占清,张宇.骨髓间充质干细胞分化为心肌细胞的实验研究.中华胸心血管外科杂志,2005,2(21):97~100.
- 10 贾敏,曾秋棠,王永奎,等.5-氮胞苷诱导间质干细胞为心肌细胞的实验研究.山东医药,2005,46(13):25~26.

(Continued on Page 66)

Hierarchy Evaluation of Pharmacological Effects of Chinese Herbal Complex

Shen Ji, Tao Jialin, Zhao Yunan, Xing Dongming, Lin Han, Du Lijun

(Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Biotechnology,
Tsinghua University, Beijing 100084)

Compared with Western medicines that are mostly based on a single target with a single function, a Chinese herbal complex makes itself unique with a combined strength of multiple sites, and hence multiple functionalities. As a result, it is difficult to evaluate the pharmacological effects of a Chinese herbal complex, though it is easier to work out an accurate pharmacological effect of Western medicines using the proven and well-established mathematical methods. Many previous studies have tried to make better out of the evaluation of pharmacological effects of a Chinese herbal complex. Unfortunately, they are still distant from a point where the problem can be properly addressed. In this research, a new mathematical model, or Hierarchy Evaluation, has been created to better understand the multi-site and combined effects of a Chinese herbal complex. It improves evaluation results.

Keywords Chinese herbal complex, evaluation of pharmacological effects, mathematical method

(责任编辑:张述庆, 责任译审:邹春申)

(Continued from Page 42)

Screening and Cluster of Differentially Expressed MSC's Genes Induced by Shuanglong Prescription

Wang Jinjin, Qian Xiyuan*

School of science, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237

Li Xue, Yang Huohua, Liang Qionglin, Wang Yining, Luo Guoan*

Modern Research center of TCM, Tsinghua University, Beijing 100084

To investigate the effect of Shuanglong prescription components on MSCs by using gene chips to screening and cluster the differentially expressed MSC's genes induced by Shuanglong Prescription. **METHODS** BOAO rat microarrays (include 5705 rat genes) were used to prepare gene chips hybridized by cell total RNA of different conditions. The chips were scanned with LuxScan 10KA dual channels laser scanner of CapitaBio Company to look for the information of differently expressed genes. **RESULTS** 128 differentially expressed genes (2.24%) were screened out from the 5705 target genes, which were found to be correlated with energy metabolism and signal transduction. Bioinformatics analysis suggests that MSCs changed remarkably in the period of 20 to 30 days. **CONCLUSIONS** DNA microarray is an effective platform for the study and analysis of mechanisms of TCM. It can be concluded that Shuanglong Prescription components can induce MSCs to differentiate into cardiomyocytes.

Keywords Shuanglong Prescription, Gene chip, differentially expressed gene, hierarchical cluster method

(责任编辑:王 瑀, 郭 屹)