

## ·综述·

## 基因探针与表达序列标签微阵列技术在心血管疾病分子研究中的应用

文毅(综述) 谭端军 朱庆磊(审核)

DNA 微阵列(DNA microarray)是近 20 年来发展起来的一项多学科交叉、应用杂交原理进行分子分析的生物检测技术。虽然历史较短,但在生命科学的诸多领域已显示出巨大的潜力和诱人的前景<sup>[1,2]</sup>。目前广泛应用于基因的序列分析、基因组图谱分析、基因突变与基因多态性分析以及疾病的基因诊断等方面。自 20 世纪 90 年代中期以来,基因微阵列芯片主要应用于基础医学的研究,在临床应用方面利用表达谱基因微阵列研究病理状态下基因的差异表达及药物作用的靶基因正成为医学领域研究的热门课题,并表现出广阔的应用前景。自 1999 年基因微阵列技术应用于心血管系统的研究以来<sup>[3,4]</sup>,已经有多个实验组在该领域进行了多种组织、多个层次的研究,如在心血管病相关基因差异表达分析、疾病分子分型、基因突变检测和多态性分析等方面取得了一些进展,以下简要综述基因芯片技术在心血管系统研究中的应用。

## 1 基因微阵列技术的概念、原理、分类

**1.1 基本概念** DNA 微阵列也叫 DNA 芯片、基因芯片(genechip),是将数以万计的 DNA 探针固化于支持物表面上,产生二维 DNA 探针阵列,然后与标记的样品进行杂交,通过检测杂交信号来实现对生物样品快速、并行、高效的检测或医学诊断。由于常用硅芯片作为固相支持物,运用了计算机芯片的制备技术,所以称之为基因微阵列或基因芯片技术。高密度基因微阵列设计包括寡核苷酸探针设计、探针布局和芯片优化等。

**1.2 基因微阵列的工作原理** 基因微阵列技术的基本原理是分子杂交,类似于 Southern 和 Northern 印迹杂交技术,通过探针与固定于芯片上的大量 cDNA、EST(expressed sequence tags,表达序列标签)或

寡核苷酸的杂交来实现<sup>[5]</sup>。具体来讲,就是在芯片上按照特定的排列方式固定大量的靶基因,形成一种微阵列,将样品 DNA/RNA 通过 PCR/RT-PCR 扩增、体外反转录等技术掺入荧光或同位素标记分子后,与位于芯片上的靶基因杂交,最后通过荧光扫描仪及计算机综合分析后即可获得样品中大量基因序列及表达的信息。

**1.3 基因微阵列的分类与设计** 按照载体上所点 DNA 种类的不同,基因微阵列可分为寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片两种。寡核苷酸芯片一般以原位合成的方法固定到载体上,具有密集程度高、可合成任意序列的寡核苷酸的优点,主要用于点突变检测和测序,也可以用作表达谱研究<sup>[5,6]</sup>。cDNA 芯片则是将微量的 cDNA 片段在玻璃等载体上按矩阵密集排列并固化,其最大的优点是靶基因检测特异性非常好,主要用于表达谱研究。

基因表达谱芯片和基因诊断芯片是基因芯片的两种重要形式,前者可以提供待测组织的基因表达谱,即组织中基因整体的表达情况;后者则主要是通过检测疾病相关基因突变或者表达改变等信号来诊断疾病的发生。

EST 是长 150 ~ 500 bp 的基因表达序列片段,EST 技术是将 mRNA 反转录成 cDNA 并克隆到载体构建成 cDNA 文库后,大规模随机挑选 cDNA 克隆,对其 5' 或 3' 端进行一步法测序,所获序列与基因数据库已知序列比较,从而获得对生物体生长发育、繁殖分化、遗传变异、衰老死亡等一系列生命过程认识的信息。心血管系统基因组 DNA 数目庞大,含有重复序列和非编码序列,如完全采用克隆筛选和排列的方法获得其编码基因序列,大量的时间和精力将被消耗在模板 DNA 的制备上。因此采用此技术在短期内即得到大量来自 cDNA 文库的表达序列,即表达标签序列(ESTs),将其制备成 ESTs 微阵列是目前寻找和发现新基因及心血管疾病相关基因的快速有效方法<sup>[7]</sup>。

## 2 微阵列技术在心血管疾病中的应用

人类共有 35 000 多个基因,2001 年哈佛大学附

收稿日期:2003-08-21

基金项目:本课题受全军十五面上课题(01MA104)资助

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:文毅,男,1978 年 3 月生,辽宁省大连市人,学士学位,技师。Tel:010-86771152

属医院心血管研究中心用3种统计方法确定了26 000多个与人类心血管系统有关的基因,结果表明与人类心血管系统有关的基因占人体基因的3/4,这也是全世界第一次建立这样的基因库。并确定了200多个与心功能衰竭有关系的病态基因。心血管系统生理功能和病理改变的分子机制十分复杂,与心血管系统生理和病理过程相关的信号转导系统也是一个综合的调控网络,其状态的描述是传统的单因素研究理论和方法所不能承担的,需要借助复杂系统的研究理论和方法来完成。而以往对心血管疾病的研究,都是采取一种疾病用一个基因检测的传统方法,存在诸多不便,不能满足当前医学领域飞速发展的需求。而微阵列芯片利用高度集成的cDNA/EST片段或寡核苷酸微阵列,使大规模、高通量同时检测成千上万种组织或细胞内的基因的表达成为可能,达到了一定意义上的全基因表达谱的检测。

目前,在心脏的研究中,微阵列芯片技术主要用于检测心肌重塑模型(包括缺血损伤、拟神经递质/激素刺激造成的心肌重塑和不同发育阶段的心肌重塑等模型)的基因表达谱<sup>[10]</sup>、病毒性心肌炎的针对治疗<sup>[11]</sup>及心血管疾病的基因表达差异与病理状态下分子机制的研究等方面。

### 2.1 心肌缺血损伤与心肌重塑研究中的应用

Stanton等<sup>[8]</sup>和Sehl等<sup>[9]</sup>通过结扎冠状动脉引起局部心肌缺血损伤,导致明显的心肌重塑,然后利用7000个cDNA/EST微阵列和含4000多个已知基因基因微阵列对大鼠心室组织的基因表达谱进行了不同损伤时相的观察,并比较了心室不同部位的基因表达谱,发现心室游离壁中表达改变的基因数量要多于室间隔。并发现长时程(2~16周)缺血损伤引起的心肌重塑过程中有731个基因的表达发生了改变,其中多种细胞外基质(extracellular matrix, ECM),包括多种胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、微纤维蛋白、ECM2等的表达明显增高,能促进ECM沉积的金属蛋白酶抑制剂如基质金属蛋白酶组织抑制因子3的表达也发生上调。ECM表达的增强可引起细胞的粘附、迁移,并增加细胞间的信息交流,同时一定程度上可提示心力衰竭或心肌梗死的发生。伴随心力衰竭的出现,一些与脂肪酸代谢相关的酶类表达减弱,而一些与糖代谢相关的酶类则表现为表达增强,提示此时心脏的能量利用转为快捷而低效的方式。

另外,一些信号转导分子(如cardiac ankyrin repeat protein,即CARP转录因子、ryanodine受体、L

型钙通道、二酯酰甘油激酶、c-fos原癌基因等)的表达也多见增强。而与细胞分化/周期相关的基因,仅有少数发生了表达水平的改变。除了上述大鼠模型外,尚有小鼠和人心肌缺血损伤导致重塑的研究报道<sup>[10,11]</sup>。Lyn等<sup>[10]</sup>的研究表明短时程(24h)心肌缺血损伤导致的小鼠心肌重塑过程伴随谷胱甘肽转移酶(GST)和细胞周期调节蛋白p18ink4表达减少,即刻早期基因Egr 1/3、凋亡相关基因Bax及 $\alpha$ 肌球蛋白重链( $\alpha$ -MHC)表达增多。Lyn等的结果与Stanton等的结果不完全一致,这可能与心肌缺血时程及损伤程度的不同、大鼠和小鼠种属上的差异、所使用的微阵列中cDNA/EST种类的不同有关。

2.2 心肌肥厚与信号转导分子表达方面 用异丙肾上腺素(ISO)和血管紧张素II(ATII)持续注射可引起明显的心肌肥厚,而及时撤除这种刺激可以逆转心肌肥厚。Friddle等<sup>[12]</sup>以含4000个cDNA/EST微阵列检测经上述处理的小鼠心室基因表达,证实了以前发现的25个与心肌肥厚相关的基因和信号通路,同时还发现30个未报道的、与心肌肥厚密切相关的基因。在心肌肥厚的诱导过程中,共有55种基因的表达水平发生了改变,其中有32种基因的表达改变仅出现在心肌肥厚形成过程中,包括7种编码分泌因子的基因,如心钠素(ANP)、脑钠素(BNP)、PAI-2等;4个编码参与信号通路的蛋白质的基因,如内皮素转化酶(ECE)-2、儿茶酚胺甲基转移酶(COMT)、蛋白激酶C(PKC)-bp;2个结构基因,如 $\alpha$ -心肌肌动蛋白和 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的上调,肝细胞癌相关转录因子;一些能量代谢相关基因以及9种新基因。另有8种基因的表达改变仅出现在心肌肥厚逆转过程中,且大部分为新基因,还有15种基因的表达改变同时出现在心肌肥厚及其逆转过程中,包括酪氨酸激酶受体、胰岛素样生长因子-II、激酶JKA3和丝裂原活化的蛋白激酶的激酶(MEKK)、转录因子Id1以及3种新基因。这些在心肌肥厚诱导过程中特异基因的变化基本代表着该病功能分类基因谱,这包括分泌因子、受体、细胞内信号分子、中间代谢的蛋白质、结构蛋白、蛋白合成基因等诸多方面。通过该项研究提出一个重要的概念,即心肌肥厚的逆转涉及与诱导心肌肥厚不同的独立基因转录过程,与心肌肥厚诱导特异的基因相反,大部分心肌肥厚逆转特异的基因并不具备同源性。

2.3 疾病进程中的基因表达差异研究 病毒性心肌炎多由柯萨奇B族病毒感染后引起,由于缺乏针对性强的治疗措施,部分患者最终出现充血性心力

衰竭和扩张型心肌病,严重影响日后的生活质量。Taylor 等<sup>[13]</sup>利用 cDNA 表达谱芯片研究了病毒感染后第 3、9、30 天宿主心肌细胞基因表达谱的改变,在 7000 点表达谱芯片上,发现有 169 个基因在感染后 1 个或多个时间点发生了显著的差异表达,他们根据差异表达基因的功能对其进行分类,对病毒性心肌炎的病毒血症期、炎性反应期和愈合期基因表达的变化分别做出评估,为在病毒性心肌炎不同时期、随病理生理微环境变化而进行相应的治疗提供了依据。

Yang 等<sup>[14]</sup>对诊断为晚期缺血性和扩张型心肌病的非衰竭和已衰竭心脏进行了 7000 种基因的分析,发现下列基因的表达具有差异:(1)细胞骨骼和心肌纤维基因,如条纹肌 LIM 蛋白 1、肌球蛋白调节轻链-2(MLC-2)和 ss-肌动蛋白;(2)与心肌蛋白退化和分解有反应的基因,包括  $\alpha(1)$ -抗糜蛋白酶、泛素(ubiquitin)和凝溶蛋白(gelsolin);(3)涉及代谢的基因,如 ATP 合成酶亚单位、琥珀酸脱氢酶黄素蛋白(SDH Fp)亚单位、醛糖还原酶和 TIM17 前蛋白原转座酶(preprotein translocase);(4)蛋白合成相关基因,如延伸因子 2、真核起始因子 4AII 和转录因子同族体 HBZ17;(5)编码应激蛋白的基因,如  $\alpha$ -B 晶体蛋白和 mu 晶体蛋白。

**2.4 其他病理状态下分子机制研究** 陈刚等<sup>[15]</sup>通过从心肌组织中抽提 mRNA,经逆转录后分别用 Cy3、Cy5 荧光标记,获得两组动物来源的 cDNA 探针,并与基因表达谱芯片杂交,结果发现氧化应激相关基因和能量代谢相关基因的表达水平在糖尿病性心肌病时明显下调,S 腺苷蛋氨酸合成酶和精氨酸酶的表达水平则明显上调。田振军等<sup>[16]</sup>应用 cDNA 微矩阵基因芯片筛选运动性心肌肥大相关的 2201 个基因,分析比较运动组和安静对照组中基因表达谱的变化。结果显示两组小鼠心肌组织间基因表达存在差异,具有显著表达差异的基因有 71 条,其中上调基因有 37 条,下调基因有 34 条。

Chugh 等<sup>[17]</sup>检测了通过手术诱导的心肌梗死大鼠的 13 824 个基因序列的表达,结果显示在心肌梗死动物其左室和右室梗死心肌有 1158 种基因具有显著的表达差异,这些基因包括信号转导、细胞生长与支持以及凋亡基因等,包括电压依赖的  $Ca^{2+}$  通道  $\gamma$  亚单位、K 内向整流通道亚家族 J、缝隙连接膜通道蛋白  $\alpha 4$ 、心肌肌钙蛋白 I 等。Peng 等<sup>[18]</sup>利用微阵列技术分析了心肌细胞分化过程中的基因表达,发现该过程涉及多个信号通路,在心肌细胞分化早期

和刺激依赖期 16 个基因表达增强,可能是分化过程中的新调节因子。Haase 等<sup>[19]</sup>利用 DNA 微阵列和抑制性消杂交技术对先天性扩张型心肌病的病因学相关基因进行了检测,辨明了心室肌肌球蛋白轻链 2(MLC2V)、骨骼肌  $\alpha$  肌动蛋白、长链酰基 CoA 合成酶以及蛋白 KIAA0465 的 mRNA 是分化上调基因,并证实 MLC2V 的上调可作为先天性肥厚型心肌病的临床特异的指征。

Ohki 等<sup>[20]</sup>利用含 1056 个基因 DNA 微芯片分析了人类单核巨噬细胞 THP-1 细胞株应激过程中的基因转录特征,发现循环过程中机械性损伤仅诱导了前列腺凋亡反应物 4、白介素 8 和即刻早期反应基因的表达增加,这些变化反映了单核细胞的机械变形能力在动脉粥样硬化和冠状动脉斑块不稳定过程中扮演了重要的角色。

上述研究均显示 DNA 微阵列技术在筛选心血管病相关基因及其表达、分子靶向等方面具有高通量、高敏度、高效率、大规模和并行性等优点。总之,在过去的几年中 DNA 微阵列技术已经开始进入了心血管系统研究领域,但应用的还很少,其原因包括重复性不是很好、芯片的价格过高、整合数据的方法较为复杂等。另外 DNA 微阵列技术仍有一些关键问题亟待解决,如提高芯片的特异性、增加信号检测的灵敏度、简化样品制备和标记操作、高度集成化样品制备、基因扩增、核酸标记及检测仪器的研制和开发。上述问题不仅是当前和今后一段时期内国内外基因芯片技术研究的焦点,同时也是 DNA 微阵列能否从实验室研究推向临床应用的关键问题。虽然基因芯片技术尚存在许多问题,但我们相信如同中央处理单元(CPU)芯片在计算机的应用发展历程一样,随着技术研究的不断进步和广泛应用,DNA 微阵列技术将日臻完善,在不久的将来,基因微阵列技术将在很大程度上改变医学的研究方式,革新医学诊断和治疗,尤其是在促进心血管病的研究和诊断提高方面将扮演重要的角色。

#### 参考文献

- 1 Van HN, Vorst O, Van HA, et al. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *J Biotechnol*, 2000, 78:271-280.
- 2 Abdellatif M. Leading the way using microarray: a more comprehensive approach for discovery of gene expression patterns. *Circ Res*, 2000,86: 919-920.
- 3 Feng Y, Yang J, Huang H, et al. Transcriptional profile of mechanically induced genes in human vascular smooth muscle

- cells. *Circ Res*, 1999,85:1118-1123.
- 4 Shimket R, Lowe D, Tai J, et al. Gene expression analysis by transcript profiling coupled to gene database query. *Nat Biotechnol*, 1999,17: 798-803.
- 5 Schena M, Shalon D, Davis R, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995,270:467-470.
- 6 Watson MA, Perry A, Budhja V, et al. Gene expression profiling with oligonucleotide microarray distinguished World Health Organization grade of oligodendrogliomas. *Cancer Res*, 2001,61: 1825-1829.
- 7 Chen HG, Jia XC. Expressed sequence tags and their applications. *Lett Biotechnol*, 2003, 14:82-84.
- 8 Stanton L, Garrard L, Dann D, et al. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circ Res*, 2000, 86:939-945.
- 9 Sehl P, Hillan K, Brown L, et al. Application of cDNA microarrays in determining molecular phenotype in cardiac growth, development, and response to injury. *Circulation*, 2000, 101:1990-1999.
- 10 Lyn D, Liu X, Nicole A, et al. Gene expression profile in mouse myocardium after ischemia. *Physiol Genomics*, 2000,2:93-100.
- 11 Barrans JD, Stamatiou D, Liew C, et al. Construction of a human cardiovascular cDNA microarray: portrait of the failing heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001,280:964-969.
- 12 Friddle CJ, Koga T, Rubin EM, et al. Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000,97:6745-6750.
- 13 Taylor LA, Carthy CM, Decheng Y, et al. Host gene regulation during Coxsackie virus B3 infection in mice: assessment by microarrays. *Circ Res*, 2000,87:328-334.
- 14 Yang J, Moravec CS, Sussman MA, et al. Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation*, 2000, 102:3046-3052.
- 15 陈刚,林丽香,庄维特,等.用基因芯片技术研究糖尿病性心肌病大鼠心肌组织的部分基因表达谱. *中华心血管病杂志*, 2002,30:493-495.
- 16 田振军,张志琪,唐量,等.应用 cDNA 微矩阵基因芯片筛选运动性心肌肥大相关基因的初步研究. *中国运动医学杂志*,2002,21:122-126.
- 17 Chugh SS, Whitesel S, Turner M, et al. Genetic basic for chamber-specific ventricular phenotypes in the rat infarct model. *Cardiovasc Res*, 2003,57:477-485.
- 18 Peng CF, Wei Y, Levsky JM, et al. Microarray analysis of global changes in gene expression during cardiac myocyte differentiation. *Physiol Genomics*, 2002,9:145-155.
- 19 Haase D, Lehmann MH, Korner MM, et al. Identification and validation of selective upregulation of ventricular myosin light chain type 2 mRNA in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 2002, 4:23-31.
- 20 Ohki R, Yamamoto K, Mano H, et al. Identification of mechanically induced genes in human monocytic cells by DNA microarrays. *J Hypertens*, 2000, 20:685-691.

## · 消 息 ·

## 第十五届长城国际心脏病学大会 & ACC2004 心脏病学进展论坛 老年心脏病学分会征文通知

第十五届长城国际心脏病学大会 & ACC2004 心脏病学进展论坛定于 2004 年 10 月 15 ~ 19 日在北京中国大饭店召开。老年心脏病学分会暨第三届老年心脏病学论坛将于 10 月 18 ~ 19 日举行。该分会由美国心脏病学院、中华医学会继续教育部、中国人民解放军总医院老年心血管病研究所、《中华老年多器官疾病杂志》编委会、《Journal of Geriatric Cardiology》杂志编委会及长城国际心脏病学会议组委会主办。国内外著名专家将在会议上做报告,内容有“老年心血管病研究进展”,“老年心血管相关性疾病研究进展”,“老年多病因心衰综合防治”,及“老年人多器官功能衰竭的诊治”。此外还有老年心血管介入手术演示等。

欢迎就老年心脏病学及其相关学科的基础研究、临床防治、护理康复、介入手术及上述专题投稿,优秀稿件将在《Clinical Cardiology》(美国)、《中华老年多器官疾病杂志》及《Journal of Geriatric Cardiology》上优先发表。其它稿件将编入长城心脏病会议论文集老年心脏病学专题中。征文要求:稿件采用中文或英文摘要形式,800 ~ 1000 字以内,字号为中文五号,英文 11 ~ 12 号,注明作者的联系方式;文章电子版以纯文本或 word 97/2000 格式发送或寄至老年心脏病学分会组委会,并在邮件主题或信封上注明“GW-ICC 老年分会投稿”字样。请自留底稿,不退稿。截止日期:2004 年 8 月 10 日(以邮戳为准);稿件寄至:北京市复兴路 28 号解放军总医院老年心血管病研究所 张文莉收;联系电话:010-66936762,010-68244952,010-68244940;会议网站:<http://www.gw-icc.org>;电子邮件:zhangela@263.net。