

## · 实验研究 ·

大鼠视神经部分损伤后基因表达谱的  
基因芯片研究

黄厚斌 马志中 张卯年

**【摘要】 目的** 探讨视神经部分损伤后视网膜、视神经基因表达谱的变化。 **方法** 60 只 SD 大鼠随机分成 4 组,反向镊夹持大鼠右眼视神经 6 s,分别于伤后 3、7、14、21 d 取手术眼及对侧假手术眼(仅暴露但不夹持视神经)的视神经和视网膜,利用高密度基因芯片技术检测基因表达谱的变化。 **结果** 视神经损伤后有大量基因表达发生改变,伤后 3、7、14、21 d 的阳性基因表达率分别为 2.35%、6.48%、3.82% 和 4.09%,总阳性表达率为 11.77%,阳性表达基因的功能包括细胞生长和存活、细胞骨架、细胞外基质和细胞粘附、自由基和氧化损伤、能量和代谢、炎症、神经传递和离子转运、细胞信号转导、结构蛋白、转录和翻译等。修复基因的表达上调或下调是基因表达变化的主体,破坏基因的变化占的比例较小,其中伤后 7 d 表达上调的修复基因占表达改变的基因的 13.98%,表达下调的修复基因占 24.73%,伤后 14 d 表达下调的修复基因占 17.20%。 **结论** 视神经损伤后有大量的基因表达发生改变,全面了解视神经损伤后基因表达的变化对于深入研究损伤后反应特别是再生反应的机制具有重要意义。

**【关键词】** 视神经损伤; 视网膜; 聚类分析; 基因表达; 疾病模型,动物

**中图分类号:** R774.6 R446-39

**The expression spectrum of gene after partial injury of optic nerves** HU'ANG Hou-bin\*, MA Zhi-zhong, ZHANG Mao-nian. \* Department of Ophthalmology, General Hospital of PLA, Eye Center of PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: MA Zhi-zhong, Email: mazz@public.bta.net.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the gene expression spectrum of retina and optic nerve after partial injury of optic nerve. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into 4 groups. The optic nerves of the right eyes were clipped for 6 seconds with a pair of cross-action forceps. The retinae and optic nerves in the operation eye and contralateral sham operation eye were removed 3, 7, 14, and 21 days after the injury to detect gene expression patterns with high-density DNA microarrays. **Results** Changes of a mass of gene expressions were found after the optic nerve injury, and the positive rate of gene expression was 2.35%, 6.48%, 3.82% and 4.09% after 3, 7, 14, 21 days, respectively, and the total positive rate was 11.77%. The functions of positive expression of the gene involved cell survival, cytoskeleton, extracellular matrix and cell adhesion, free radicals and oxidative damage, energy and metabolism, inflammation, neurotransmission and ion transport, signal transduction, structural protein, transcription and translation. Up- or down-regulation of repaired genes was the main part of the changes of gene expression, while the altered-expression destroy genes was the minor part in the whole gene expression spectrum, in which the up- and down-regulation of expression of repaired genes accounted for 13.98% and 24.73% respectively 7 days after the injury, and the down-regulation of expression of repaired genes accounted for 17.20% 14 days after the injury. **Conclusions** A mass of gene expression changes occurs after the optic nerve injury, and the comprehensive view on the gene expression pattern following the optic nerve injury is crucial to discover the mechanism of post-injury reaction and regeneration.

**【Key words】** Optic nerve injuries; Retina; Cluster analysis; Gene expression; Disease models, animal

视神经(ON)损伤后伴随着不利的继发损伤反应,同时又存在着积极的再生修复过程,这些反应都有其

基因表达变化的分子基础。鉴定这些过程中涉及到的基因特别是参与损伤后组织修复和重塑的基因,对于深入了解 ON 部分损伤后反应的分子生物学机制、探索新的治疗方法非常重要。我们采用高密度微阵列技术对 ON 部分损伤后 ON 视网膜的基因表达随时间的变化进行综合的、整体的分析,以期从总体上了解 ON

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271384);全军“十五”计划重点课题资助项目(01Z039)

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院眼科、全军眼科中心(黄厚斌、张卯年);北京大学眼科中心(马志中)

通讯作者:马志中,Email:mazz@public.bta.net.cn

损伤后有利于损伤后修复和再生的基因,以及与继发性损伤有关的基因,并可能为 ON 损伤修复再生的基因治疗提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的制作

成年雌性清洁级 SD 大鼠 60 只,体重 150~250 g,随机分成 4 组,每组 15 只大鼠。水合氯醛麻醉后,用夹持力为 148.0 g 的反向镊<sup>[1]</sup>于球后 2 mm 处夹持大鼠右眼 ON 6 s;左眼为假手术对照,即仅分离结膜、眶内组织等暴露 ON,但不夹持 ON。4 组大鼠分别在损伤后 3、7、14、21 d 麻醉大鼠后,经心脏用 4℃ 平衡盐溶液(BSS)灌注去除组织中的血液,灌注结束后立即将大鼠置于冰台上,分离眼球周围组织,自睫状体后去除眼前节及玻璃体,取出视网膜及眶部 ON,立即置于冻存管中液氮冻存待检。自灌注结束至取出标本液氮冻存之间的时间约为 5~10 min。

### 1.2 总 RNA 提取

用 Trizol 试剂分别抽提损伤组织和对照标本的总 RNA,分光光度计测量浓度和纯度。

### 1.3 探针标记与杂交

参照文献<sup>[2]</sup>的方法,用逆转录聚合酶链反应技术将荧光素(cy5, cy3)标记的脱氧胞嘧啶核苷三磷酸(dCTP)掺入,合成 cDNA 标记探针并纯化。其中用 cy3-dCTP 标记对照的 ON 组织标本,用 cy5-dCTP 标记损伤的 ON 组织标本,将两种标记好的 cDNA 探针等量混合。

### 1.4 芯片杂交与检测

选用上海博星基因芯片有限责任公司的 BioStarR-20S 型芯片,其点样面积为 18 mm×18 mm,共 2 304 点,其中空白对照 16 点,阴性对照 16 点,内参基因 20 点,因此共有 2 252 个基因,其中已知基因 833 个,表达序列标签(EST)1 419 个。用无探针的杂交缓冲液对芯片进行预杂交。将标记好的混合探针溶解在杂交缓冲液中,芯片和探针分别在 95℃ 变性,然后再将标记的探针加到芯片上,置 42℃ 杂交 17 h。用 ScanArray4000 芯片扫描仪(美国 General Scanning 公司)对洗涤、晾干的芯片进行扫描,过滤背景噪声,提取每个基因点结合的 cy3 和 cy5 荧光强度值。实验重复 3 次,分别记录结果。

### 1.5 基因差异性表达的确定

用预先选定的内参基因原始信号作为依据,应用 GenePix Pro 3.0 软件(美国 Biodiscovery 公司)对扫描仪上检测到的荧光信号强度和比值进行处理,算出

均一化系数,对每个点的荧光信号强度进行均衡和修正,计算经修正后每个基因点的 cy5/cy3 比率。同时满足以下 3 个条件作为判定基因有差异表达的标准:用微矩阵显著性分析软件 SAM(significance analysis of microarrays) 1.21 软件(<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html>)分析基因芯片表达结果,调节  $\Delta$  参数使错误发现率(FDR)<5%,确定有意义基因<sup>[3]</sup>;基因的表达变化在 1.5 倍以上<sup>[4]</sup>;cy5 和 cy3 信号值皆>200 或其中之一>800。

### 1.6 基因的功能分类及分层聚类分析

根据基因的 GenBank 号在美国国立生物技术信息中心(NCBI)的网上数据库鉴定每个阳性表达基因,并根据其可能的主要功能分为 10 类:细胞的生长和存活、细胞骨架、细胞外基质和细胞粘附、自由基和氧化损伤、能量和代谢、炎症、神经传递和离子转运、细胞信号转导、结构蛋白、转录和翻译等。未知基因即 EST 以及功能不明确或不易归类的少数基因未列入其中分析,对每一类中的不同基因根据其表达水平的相似程度用 Cluster 2.20 软件(<http://www.med.uio.no/dnr/Inst/TumBiol/Ola/kjb492/stanford/cluster/>)进行分层聚类分析<sup>[5]</sup>,结果用 TreeView 1.60 软件(<http://genetics.stanford.edu/~alok/TreeView/>)输出,根据每一类中各个基因表达的相似程度排列基因。分析各基因与修复再生、细胞存活及细胞损伤、死亡的关系,观察视神经损伤后有利再生的基因的变化情况和不利再生的基因的变化情况。

## 2 结果

### 2.1 芯片杂交技术体系验证结果

4 组芯片空白和阴性对照点的杂交信号均很低。

### 2.2 总 RNA 提取结果

所提各组织总 RNA 的 260 nm 波长的吸光度[A, 旧称光密度(OD)]值与 280 nm 波长 A 值的比值为 1.893~2.021,1%琼脂糖凝胶电泳 28S 和 18S 条带清晰,无 DNA 杂带,保温实验前后无差异。

### 2.3 基因表达谱概况

伤后 3、7、14 和 21 d,分别有 2.35%、6.48%、3.82%和 4.09%的基因表达发生改变,总的阳性基因表达率为 11.77%,其中已知基因的阳性表达率为 6.39%,EST 的阳性表达率为 5.37%。

### 2.4 ON 损伤后基因表达的变化

与转录和翻译有关的基因主要在伤后 7 d 表达上调,结构蛋白基因和信号转导基因主要在伤后 7 d 表达下降,与炎症有关的基因主要在伤后 3 d 和 7 d 表达

上调, 自由基损伤的基因主要在伤后 7 d 表达上调, 与细胞外基质有关的基因主要在伤后 21 d 表达上调, 与细胞骨架有关的基因主要在伤后 7 d 表达下降, 与细胞存活有关的基因主要在伤后 7 d 和 14 d 表达下降(表 1)。

表 1 各功能组在各时间点表达改变的基因的数目(个)

基因组功能 [基因总数(个)]	时间(d)							
	3		7		14		21	
	上调	下调	上调	下调	上调	下调	上调	下调
细胞生长和存活 (10)	0	3	2	7	0	5	2	0
细胞骨架(13)	1	0	3	6	2	4	2	1
细胞外基质和细胞 粘附(10)	0	0	4	2	1	0	7	1
自由基和氧化损伤 (6)	0	0	5	0	2	0	0	1
能量和代谢(31)	2	3	6	13	4	9	1	5
炎症(18)	6	0	9	1	1	2	5	2
神经传递和离子转 运(16)	2	3	2	7	1	4	2	1
信号转导(7)	0	1	0	6	0	3	1	0
结构蛋白(8)	1	1	2	4	0	2	0	1
转录和翻译(13)	1	0	6	2	2	1	1	2

## 2.5 基因的聚类分析

对各功能组基因进行聚类分析排列出表达相似的基因, 以细胞骨架相关基因的聚类分析结果为例, 生长相关蛋白-43(GAP-43)和波形蛋白的表达较相似, 微管蛋白 $\alpha$ 和微管蛋白 $\beta$ 、微管相关蛋白 1A/1B 的表达型式较相似(图 1)。

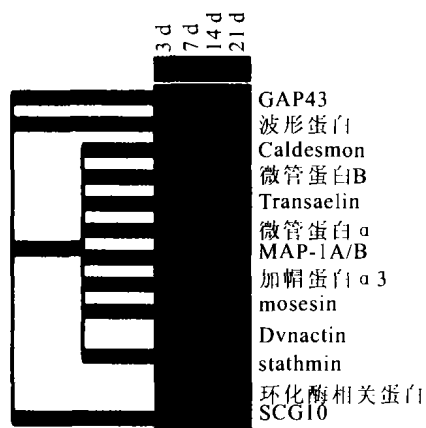


图 1 细胞骨架相关基因的聚类分析图。亮红色为表达上调, 亮绿色为表达下调

Fig. 1 Cluster analysis of cytoskeleton-related genes. Bright red denotes up-regulation, with bright green down-regulation

## 2.6 不同时期基因表达情况与 ON 损伤修复关系

ON 损伤后, 表达上调的有利修复的基因和表达下调的有利修复的基因均明显增多, 特别是在伤后 7 d 和 14 d, 其中伤后 7 d 表达上调的有利修复的基因占表达改变的基因的 13.98%, 表达下调的有利修复的基因占 24.73%, 伤后 14 d 表达下调的有利修复的基

因占 17.20%(表 2)。

## 3 讨论

以往的分子生物学实验大多是一次实验只能研究一个特定基因, 基因芯片技术的出现使得可以在一次实验中在完全均衡的条件下同时检测成千上万个基因<sup>[6,7]</sup>, 但利用基因芯片技术检测 ON 损伤后基因表达谱的变化目前尚未见报道。Wang 等<sup>[8]</sup>用减法杂交方法研究了 ON 损伤后 8 h 和 24 h 视网膜基因表达谱的变化。但 Fan 等<sup>[9]</sup>的研究表明, 周围神经损伤后 1 周细胞体才开始恢复, 脊髓损伤 3 d 后, 核酸和蛋白的密度才显著增加, 说明神经损伤后基因表达和蛋白水平在 3 d 后才发生显著的改变, 而且临床所见的 ON 损伤患者大部分是在损伤 2~3 d 后才求治。因此, 了解 ON 损伤 3 d 以后基因表达谱的动态变化更有意义。基于以上的研究和观察, 我们研究了 ON 损伤后 3、7、14、21 d 基因表达谱的动态变化。

我们在实验中所提取的 RNA 合格, 无降解及蛋白质或其他杂质污染, 所用各芯片的空白对照和阴性对照点的杂交信号均很低, 说明杂交结果数据可靠。

ON 损伤涉及到许多功能基因表达水平的变化, 聚类分析表明许多基因的表达型式相似, 如 GAP-43 和波形蛋白。GAP-43 是神经再生的标记物, 而波形蛋白是 Müller 细胞的标记物, 波形蛋白的表达上升说明胶质细胞的反应增强。GAP-43 和波形蛋白的表达比较一致, 可能意味着视神经损伤后神经再生的力量和胶质细胞增生力量的激烈抗争。

ON 损伤后 3 d 主要是细胞的破坏和炎症反应; 7 d 时基因的变化倾向于细胞的破坏和死亡, 这为文献报道的原发损伤后视网膜节细胞将大部分在 4~7 d 后死亡提供了分子生物学依据<sup>[10,11]</sup>; 伤后 14 d, 基因的变化虽仍以细胞的损伤为主, 但损伤力度在下降, 趋向修复增生; 伤后 21 d 是组织修复增生旺盛的时期, 细胞周围环境修复重建、胶质瘢痕形成。损伤后的炎症反应主要在伤后 1 周内, 但自由基损伤一直持续到 2 周后, 说明 ON 损伤后数周细胞的凋亡在持续发生。ON 损伤后 3 d 没有细胞外基质有关基因表达改变, 而伤后 2 周神经的修复和胶质细胞反应已经开始。说明继发损伤在损伤初期就已启动, 而修复过程主要表现在 1~2 周以后。ON 损伤后初期信号蛋白表达下降, 细胞内信号转导受阻、细胞活性降低。损伤组织进行重塑和修复后, 生物信号的转导也趋于恢复和增强。

ON 损伤后早期就有大量有利于损伤修复和再生的基因表达上调, 构成了机体与损伤抗争的主要力量;

表 2 不同时期修复与损害基因的表达情况

时间(d)	利于细胞存活、修复的基因表达		促进继发损伤、抑制生长的基因表达	
	上调的保护基因	下调的损害基因	上调的损害基因	下调的保护基因
3	GAP43 S100A9 蛋白酶体 $\alpha 1$ 溶菌酶	HAAO	Lyn	API2 Cyclin D2 Na <sup>+</sup> ·K <sup>+</sup> -ATPase $\beta 1$ SAT1
7	ACAP1 BiP/GRP78 GAP43 GST-p GST- $\alpha$ peroxiredoxin-1 蛋白酶体 $\alpha 1$ 蛋白酶体 $\alpha 6$ 核蛋白 B23 核心蛋白多糖 溶菌酶 血浆铜蓝蛋白 组织蛋白酶 S	HAAO KAI1/CD82 明胶酶 A	CD81 (TAPA) Transgelin 波形蛋白 骨连接素 晶状体球蛋白 $\alpha$ 赖氨酰氧化酶	IL-6 信号转导子 MAP-1A/1B Na <sup>+</sup> ·K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha 1$ Prosaposin Slc29a1 stathmin 丙酮酸激酶 3 谷氨酰胺合成酶 加帽蛋白 $\alpha 3$ 解偶联蛋白 4 天冬氨酸转氨酶
14	GAP43 GST-p GST- $\alpha$ 核心蛋白多糖 组织蛋白酶 S	KAI1/CD82	波形蛋白	endostatin alpha MAP-1A/1B Na <sup>+</sup> ·K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha 1$ Prosaposin 丙酮酸激酶 3 附加蛋白 V1 微管蛋白 $\beta$ 载脂蛋白 A1
21	Prosaposin Syndecan 核心蛋白多糖 溶菌酶 组织蛋白酶 S	解离素	fibulin 5 波形蛋白 骨连接素 赖氨酰氧化酶 明胶酶 A	API2 c-met Cyclin D2 MOBP NSE 羧肽酶 B 微管蛋白 $\alpha$ 烯醇酶 $\alpha$ 原胶原 1 $\alpha$

注:ACAP,腺苷酸环化酶活化多肽;API,凋亡抑制因子;BiP/GRP78,免疫球蛋白结合蛋白-葡萄糖调节蛋白 78;TAPA,抗增生抗体靶分子;D2p29,脱碘酶 II 底物结合亚单位;GAP-43,生长相关蛋白;Gnb1,G 蛋白  $\beta 1$ ;Grb2,生长因子受体结合蛋白 2;GST,谷胱甘肽-S-转移酶;HAAO,3-羟基邻氨基苯甲酸酯-3,4-加双氧酶;MAP,微管相关蛋白;MOBP,髓磷脂相关少突胶质细胞碱性蛋白;NSE,神经元特异性烯醇酶;S100A9,S100 钙结合蛋白;SAT,硫酸阴离子转运子;Slc29a1,可溶性载体(核苷转运子);SVCT,钠偶联抗坏血酸转运子;

而损伤后的破坏效应主要是由于修复基因的表达下调导致的,损害基因的表达上调起的作用较小。这进一步说明,ON 损伤后的反应是以修复再生为动机启动的,但由于这种修复反应往往是以胶质细胞增生为主<sup>12</sup>,因此可能客观上反而会对再生造成障碍,而成为一种矫枉过正反应。

伤后 7 d 是基因表达的高峰期,此时有大量的修复基因表达上调或下调,说明修复与破坏的力量在进行积极的抗争,此时可能是影响伤后修复进程和转归的重要时期,因此,临床上对于 ON 损伤的治疗干预应尽可能在伤后 7 d 内进行,可能会取得更好的疗效。

#### 4 参考文献

- 1 黄厚斌,张卯年,马志中.大鼠视神经不同程度量化损伤模型的建立和评价.中华创伤杂志,2004,20:748-751.
- 2 Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 1995, 270: 467-470.
- 3 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 5116-5121.

- 4 Nestic O, Svrakic NM, Xu GY, et al. DNA microarray analysis of the contused spinal cord; effect of NMDA receptor inhibition. J Neurosci Res, 2002, 68: 406-423.
- 5 Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. PNAS, 1998, 95: 14863-14868.
- 6 Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat Genet, 1999, 21: 33-37.
- 7 Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, et al. Systematic determination of genetic network architecture. Nat Genet, 1999, 22: 281-285.
- 8 Wang AG, Chen CH, Yang CW, et al. Change of gene expression profiles in the retina following optic nerve injury. Mol Brain Res, 2002, 101: 82-92.
- 9 Fan M, Mi R, Yew DT, et al. Analysis of gene expression following sciatic nerve crush and spinal cord hemisection in the mouse by microarray expression profiling. Cell Mol Neurobiol, 2001, 21: 497-508.
- 10 Cheung ZH, So KF, Lu Qiang, et al. Enhanced survival and regeneration of axotomized retinal ganglion cells by a mixture of herbal extracts. J Neurotrauma, 2002, 19: 369-378.
- 11 Yoles E, Schwartz M. Degeneration of spared axons following partial white matter lesion: implications for optic nerve neuropathies. Exp Neurol, 1998, 153: 1-7.
- 12 Fitch MT, Silver J. Beyond the glial scar. In: Tuszyński MH, Kordower JH, eds. CNS regeneration: basic science and clinical advances. California: Academic Press, 1999. 55-88.

(收稿日期:2004-01-09)

(本文编辑:朱敏)