

· 毒理 ·

基因芯片技术研究环维黄杨星 D 对大鼠肾脏基因表达的研究

何苗^{1,2}, 梁晓雯^{1,2}, 蒋宝平^{1,2}, 余黎^{1,2}, 方泰惠^{1,2}, 许立^{1,2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210029)

[摘要] **目的:** 采用基因芯片技术研究环维黄杨星 D(CVB-D)对大鼠肾脏基因表达谱的影响, 初步探索其对肾脏毒性作用的机制。**方法:** 10 只 SD 大鼠随机分为正常组和 CVB-D 10 mg·kg⁻¹组, 连续腹腔给药 14 d, 分别从大鼠肾脏组织中提取总 RNA, 分离纯化后, 反转录合成掺入生物素标记的 cDNA 探针, 与基因芯片杂交, 扫描芯片荧光信号图像后, 统计处理并进行分析。选取 5 个差异表达基因, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法进行验证。**结果:** CVB-D 组与空白组比较, 共筛选出 309 条差异表达的基因, 其中表达上调基因有 147 条, 下调基因有 162 条, 涉及凋亡通路相关基因、细胞周期相关基因、Ca²⁺ 信号通路相关基因、MAPK 信号级联等。**结论:** CVB-D 的肾毒性可能与凋亡通路、MAPK 信号级联、细胞周期及 Ca²⁺ 信号通路异常调控相关。

[关键词] 环维黄杨星 D; 基因芯片; 肾脏; 逆转录-聚合酶链反应

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0286-05

[doi] 10.11653/syjf2013100286

Regulated Gene Expression Profile of Cyclovirobuxine-D in Rat Renal by Gen Chip Technique

HE Miao^{1,2}, LIANG Xiao-wen^{1,2}, JIANG Bao-ping^{1,2}, YU Li^{1,2}, FANG Tai-hui^{1,2}, XU Li^{1,2*}

(1. Nanjing University of China Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the regulated renal gene expression profile of cyclovirobuxine-D (CVB-D) in rats, and explore its mechanism of renal toxicity. **Method:** Ten SD rats were divided into 2 group randomly: normal group and CVB-D 10 mg·kg⁻¹ group. Rats were continuous gavaged 14 days. The total RNAs were isolated and purified from kidney of normal and CVB-D 10 mg·kg⁻¹ rats. Both the mRNAs from two kinds of tissues were reversely transcribed to cDNA with the incorporation of fluorescent labeled hybridization probes. The mixed probes were hybridized to cDNA chip, and then were screened through the analysis of fluorescent intensity. RT-PCR was used to confirmed the results of 4 choosing gene chip. **Result:** Compared with the control group, gene expression of 309 were changed, 147 gene expression up-regulated, and 162 gene expression down-regulated. All of the gene changes were related with apoptotic signal, MAP Kinase cascade, calcium-mediated signaling, and cell cycle proteins. **Conclusion:** The renal toxicity of CVB-D involved in regulating specific genes abnormal expression including apoptosis, MAP Kinase cascade, Calcium-mediated signaling and cell cycle protein, etc.

[Key words] cyclovirobuxine-D; gene chip; kidney; RT-PCR

[收稿日期] 20121201(010)

[第一作者] 何苗, 硕士研究生, E-mail: hemiao_622@163.com

[通讯作者] * 许立, 教授, 硕士生导师, 从事药理毒理学研究, E-mail: xuli64@163.com

基因芯片又称为 DNA 芯片或 DNA 微阵列,是 20 世纪末发展起来的一项新的生物学技术,它以人工合成或常规分子生物学技术获得的核酸片段作为探针,以特定的排列方式或手段固定在硅片、载玻片或塑料片上,然后与待测的标记样品的基因按碱基互补配对原理进行杂交。激光共聚焦荧光检测系统对芯片扫描,经计算机软件处理,从而获得大量基因表达信息^[1-2],它可以同一时刻对成千上万基因的表达进行研究分析,形成完整的基因表达谱,是一种高效的大通量技术。

环维黄杨星 D (cyclovirobuxine D, CVB-D)是从黄杨科植物小叶黄杨 (*Buxus microp hylla* Sieb et Zucc Var. *sinica* Rehd. et Wils) 及其同属植物提取的生物碱,是我国研制成功治疗心血管疾病的新药,具有行气活血、通络止痛的作用。文献报道中 CVB-D 的药理和药效较多,对毒理学研究较少。近些年研究发现,大鼠 ip CVB-D 8 mg·kg⁻¹ 3 个月 BUN 明显升高, CVB-D 4, 8 mg·kg⁻¹ 剂量组部分动物出现肾脏远曲小管上皮细胞变性、坏死和蛋白管型等病理学的改变^[3]。有实验证明长期 ip CVB-D 可引起肾脏毒性,具有一定的时间和剂量依赖关系,并且病变在停药后不能彻底恢复^[4]。本实验利用基因芯片技术,研究 CVB-D 对大鼠肾脏基因的影响,分析这些基因的功能,以进一步探讨其毒性作用的机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠(清洁级)10 只,体重 80~90 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.2 药品与试剂 CVB-D(南京小营药厂,纯度 ≥ 95%,批号 X091027); Trizol(Invitrogen 公司); RNA 提取试剂盒(德国, QIAGEN 公司); NimbleGen Hybridization Kit(Nimblegen); 水合氯醛(国药集团化学试剂公司,批号 20100111); cDNA 第一链合成试剂盒(KeyGen); Taq DNA Polymerase(Fermentas, Lithuania)。

1.3 仪器 Genepix 4000 B Scanner 芯片扫描仪(Axon), PCR 循环仪(美国, Labnet), 凝胶成像仪(美国, BIO-RAD), 核酸电泳仪(北京六一仪器厂), 高速冷冻离心机(德国, Eppendorf)。

2 方法

2.1 分组及给药 SD 大鼠随机分为空白对照组和 CVB-D 10 mg·kg⁻¹ 剂量组, 每组 5 只, CVB-D 组: 大鼠连续 ip 注射 CVB-D 10 mg·kg⁻¹ 14 d 后(给药体积为 4 mL·kg⁻¹), 10% 水合氯醛(300 mg·kg⁻¹, ip)

麻醉后在冰盒上取出肾脏,液氮速冻,然后置于 -70 °C 备用。空白对照组: 同等体积的溶媒溶液代替 CVB-D, 其余同 CVB-D 组。

2.2 RNA 抽提与质量检测 按体积 10:1 比加入预冷的 Trizol 裂解液,采用 Qiagen Rneasy minikit 抽提、纯化、DNA 酶消化,确保没有基因组 DNA 的污染,从而得到总 RNA, Nanodrop ND-1000 测定吸光度(A)₂₃₀A₂₆₀ 及 A₂₈₀ 的值,计算 RNA 的浓度和纯度,并用甲醇变性凝胶电泳检查其完整性。

2.3 探针标记及芯片杂交 每个样本取 1 mL 总 RNA 在反应体系中用反转录酶,合成第一链 cDNA 并用 DNA 聚合酶进一步合成双链 cDNA,合成的 cDNA 经过纯化后进行体外的扩增,转录合成 cRNA,用 Cy3 荧光分子标记。使用 Nanodrop 检测荧光标记的效率,从而保证后续试验的可靠性。

芯片杂交:标准条件下,将标记好的探针和高密度基因组芯片,在杂交盒内 65 °C 滚动杂交 17 h,依次使用相应洗涤液洗涤芯片,然后室温晾干。

2.4 图像扫描及数据处理 杂交后芯片通过 Axon GenePix 4000B Scanner 扫描获取图像, NimbleScan 软件读取原始数据,进行背景值修正及分位数标准化处理。处理后的数据导入 Agilent Gene Spring Software(version 11.0),比较两组样品的标准化值,计算差异倍数。基因显著性差异表达的判断标准是: Ratio ≥ 2 或 Ratio ≤ 0.5 (Ratio = Cy5/Cy3)。Ratio ≥ 2 表示该基因在给药组显著上调, Ratio ≤ 0.5 则表示该基因在给药组中显著下调。

2.5 RT-PCR 验证 选取 CVB-D 组与对照组差异表达的 5 个基因, GAPDH 作为管家基因。根据 GenBank 序列号获取全长 cDNA 序列,由南京金斯瑞科技有限公司设计并合成上下游引物。基因的名称和上、下游引物序列号、退火温度及产物长度见表 1。

3 结果

3.1 总 RNA 抽提 抽提的 RNA 用分光光度计检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值范围均在 1.8~2.1, A₂₆₀/A₂₃₀ 应该大于 1.8, 变性琼脂糖凝胶电泳结果显示 28S 和 18S 核糖体 RNA 的条带清晰,说明 RNA 纯度已达到要求,如图 1。

3.2 基因芯片扫描图 两组基因芯片扫描图(图 2),扫描图上的点饱满圆润,背景均一,没有出现明显半边亮或者半边暗的情况,芯片 4 个角上对照点和定位点清晰可见,符合数据分析的要求。图中每个亮点是结合在 cDNA 上的 Cy3 发出的荧光,将荧

表 1 RT-PCR 反应的引物和条件

基因名称	双向引物序列	退火温度/℃	产物长度/bp
GAPDH	上: 5-AAGTCGGTGTGAACGGATTT-3 下: 5-AGATGATGACCCTTTTGGCCC-3	56	352
Caspase-7	上: 5-CGGAAGACGGAGTTGACG-3 下: 5-CCGAAGCAGGCTGACTTG-3	54	361
MEKK4	上: 5-CCAACCTGGTCCGGTACTTT-3 下: 5-TGTCCATTCCCACCTTGTA-3	55	487
Calm1	上: 5-TGTGGCCTTCTTTGACTTCG-3 下: 5-CAGGTATGCACCCAGAGTGAT-3	54	437
MADD	上: 5-GGCAACAAAGCATCAAACCC-3 下: 5-CTACGAACTGGGCCACATA-3	56	304
Chek2	上: 5-ACCTCAAGCCTTCCAACCTC-3 下: 5-TGTTCACGGCACCTTATTT-3	55	384

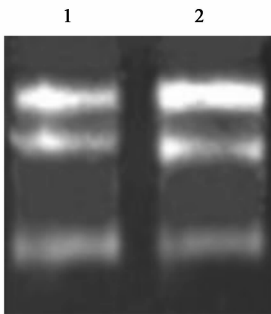
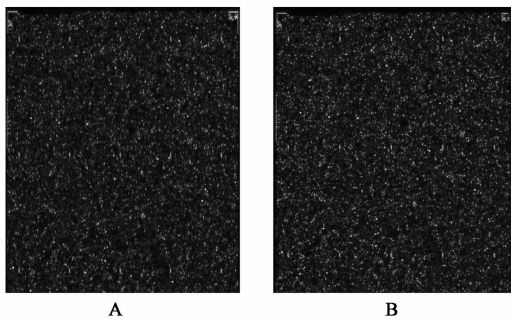


图 1 RNA 完整性检测

光强度进行一系列数据处理即可找出 2 个样品间的差异表达基因。



A. CVB-D 10 mg·kg⁻¹; B. 对照组

图 2 基因芯片扫描图

3.3 散点图 所有基因在两组样品中的表达差异可用散点图表示,见图 3。其中 X 轴和 Y 轴分别为 2 个样品的荧光信号强度值,图中每一个数据点代表芯片上一个基因的杂交信号,绝大多数无差异表达信号位于 3 条平行线之间,差异表达信号为平行线之外的数据点。平行线以外左侧数据点为 10 mg·kg⁻¹ CVB-D 组与对照组比较上调表达的基因,右侧数据点为两组比较下调表达的基因。

3.4 差异表达的通路和相关基因 10 mg·kg⁻¹ CVB-D 组与对照组比较有 309 条基因差异表达,其中上调基因有 147 条,下调基因有 162 条,涉及凋亡

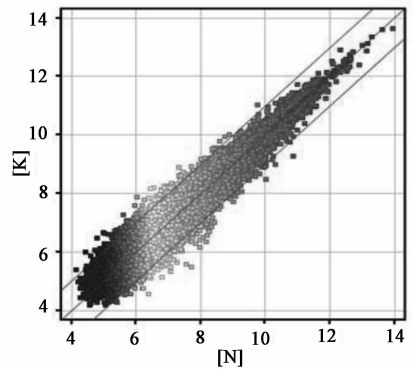


图 3 基因表达谱散点图

通路相关基因、细胞周期相关基因、Ca²⁺ 信号通路相关基因、MAPK 信号级联等。见表 2。

3.5 RT-PCR 验证 选择基因芯片结果提示有差异表达的基因进行 RT-PCR 实验,结果显示, Caspase-7, MEKK4, Calm1, Madd, chek2 的灰度变化倍数分别为 6.398, 3.974, 4.026, 3.300, 4.517, 与基因芯片表达趋势一致,说明芯片数据可靠且具有重复性。

4 讨论

肾脏作为重要的器官之一,具有特殊的组织结构,肾脏内有丰富的毛细血管,血流量大,药物及其衍生物随血液流经肾脏排出。肾脏的浓缩功能,使得流经肾脏的药物浓度较高,容易产生毒性作用。有些药物可以和体内的一些蛋白质结合形成抗原,通过免疫反应损害肾脏;有些可引起肾脏血管的收缩,引起肾脏组织缺血损伤。因此肾脏是体内对药物最敏感的器官。本实验通过基因芯片技术观察 CVB-D 对大鼠肾脏组织基因表达和相关通路的影响,结果显示 CVB-D 对肾脏基因表达的调控主要涉及凋亡相关通路、MAPK 信号通路、细胞周期调控、Ca²⁺ 相关信号通路。

表 2 相关通路及差异表达基因

相关通路	相关通路差异 表达基因	比值
Apoptosis	Caspase-7	8.78
	Caspase-8	2.14
	Tnfrsfla	2.54
	Madd	4.26
	Notch2	0.18
	Mapk1	0.43
MAP Kinase cascade	Madd	4.26
	MEKK4	5.04
	Arrb1	2.63
	Gps1	2.37
	MAPK1	0.08
	Map2k4	0.29
Calcium-mediated signaling	Calm1	3.50
	Dapk3	2.69
	Slc	2.06
	clmn	0.37
	Grm5	0.24
	Cfd	0.31
Cell cycle checkpoint	chek2	5.93
	Calm1	3.50
	Cdk5	4.17
	Cdc26	2.74
	app	2.40
	Pola1	0.05

Caspase 是一种天冬氨酸定向的半胱天冬酶,能够特异性地切割其底物的特定识别位点,并因此导致细胞的凋亡性破坏。其中 Caspase-8 和 Caspase-7 是 Caspase 家族的主要成员,在凋亡中起着重要的作用^[5]。一般情况下,Caspase-8 是死亡受体介导的凋亡途径中关键的启动子^[6]。CVB-D 上调大鼠肾脏 Caspase-8 的表达从而影响了死亡受体介导的凋亡通路。由此推断, CVB-D 可能诱导肾脏相关细胞的凋亡,通过激活 Caspase-8,继而活化下游的 caspase-7 进行凋亡程序。

TNFR1 信号途径是在 TNF 的作用下, TNF 的受体出现三聚体化,从而通过其死亡域 (death domain) 募集死亡受体域结合蛋白 (TRADD), TNFR1-TRADD 复合物可募集到三种蛋白:受体作用蛋白 (RIP), Fas 死亡域结合蛋白和 TNFR 相关蛋白 (TRAF2)。CVB-D 通过上调 MADD 和 Tnfrsfla 基因的表达介导 TNFR1。MADD 通过自身的 C 末端区域与肿瘤坏死因子 I 受体 (TNFR1) 相互作用,是 TNFR1 信号通路复合物中关键的成分^[7]。肿瘤坏死因子受体胞质内保守的死亡域是触发细胞凋亡通路的必要成分, MADD 通过这个结构域和活化的 TNFR1 结合^[8]。过表达时可激活丝裂原活化蛋白

激酶 (MAPK) 细胞外信号调节激酶,刺激 ERK 和 c-JUN 的 N 末端激酶,诱导细胞磷脂酶 A2 磷酸化,进而导致花生四烯酸的释放介导炎症的发生^[9]。综上所述, CVB-D 可通过 Caspase cascade 和 TNFR1 信号通路影响肾脏细胞的凋亡,上调 Caspase-8, Caspase-7, MADD, Tnfrsfla 等促凋亡基因,最终导致细胞的凋亡,从而引起肾脏毒性。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内,在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,并引起细胞生物学反应 (如细胞增殖、分化、转化及凋亡等) 的过程中具有至关重要的作用。分别为丝裂原激活的蛋白三级激酶 (MAPKKK 或 MKKK)、二级激酶 (MAPKK 或 MKK) 和丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK)。MAPKKK 又称 MEKK, 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶。MEKK4 在大鼠组织中广泛分布由于拼接方式不同存在两种同源异构体,称为 MEKK4 α 和 MEKK4 β 。MEKK4 能以不依赖于 G 蛋白活性状态的方式与 cdc42 和 Rac 结合^[10-11], Cdc42 和 Rac 是两个参与细胞骨架功能调控的 Rho 家族成员,它们调控了丝状伪足和 lamelliPodia 的形成,也对 IL-1 和侧 TNF- α 刺激诱导的 JNK 和 p38 信号通路有调节作用^[11-12]。MEKK4 与 cdc42 和 Rac 结合,激活 P21 激活激酶或 PAK 的激酶,从而激活 JNK。

细胞周期中 DNA 复制和染色体分配质量的检查机制,通常被称为细胞周期检查点 (checkpoint)。根据“质量控制”的内容,可将细胞周期检查点分为 3 种:第 1 种负责查看 DNA 有无损伤,称为 DNA 损伤检查点;第 2 种负责 DNA 复制的进度,称为 DNA 复制检查点;第 3 类是管理染色体的正确分配与否,称为纺锤体组装检查点^[13]。细胞周期检查点相关基因表达发生差异可能意味着 CVB-D 造成 DNA 损伤,需要细胞周期检查点控制对 DNA 损伤做出应答。由于 DNA 损伤可以发生在细胞周期的任一时,包括 G₁ 期, S 期, G₂/M 期中。CVB-D 组肾脏 G₂/M DNA damage checkpoint 通路中 Chek2 基因表达上调,说明 DNA 损伤可能发生在 G₂/M 期。DNA 损伤发生后激活 DNA 损伤检查点从而阻止细胞周期进程并改变 DNA 复制和修复状态,以保持基因组稳定性^[14]。通过这个机制,可诱导修复基因转录,或暂时阻断细胞周期,或诱导细胞凋亡。

钙离子作为人体内最普遍的信号转导因子,在

细胞分裂、生长、死亡过程中起着重要的作用。钙离子的升高参与了凋亡早期信号的转导和凋亡的执行阶段。有研究发现 CVB-D 能够提高心肌细胞中游离钙离子的浓度^[16]。Calm1, 钙调蛋白 1 是一种钙结合蛋白, 存在于几乎所有真核细胞中, 参与细胞中所有与 Ca^{2+} 依赖性相关的活动^[15]。Calm 只有在于 Ca^{2+} 结合后才有活性, Ca^{2+} 与 Calm1 结合后 Calm 的构型发生改变, 活化的 Calm 激活下游的多个信号通路, 如蛋白激酶 C (PKC)、促分离活化蛋白激酶 (MAPK1/2)、腺苷酸环化酶等, 对细胞增生、炎症反应、代谢、肌肉的收缩和放松、凋亡和信号转导方面均有重要的作用^[17]。实验结果显示 Calm1 的基因表达上调, 提示 CVB-D 可能使细胞中钙离子浓度增加, 从而产生毒性作用。

综上所述, 本实验采用基因芯片技术筛选出 CVB-D 组大鼠肾脏差异表达的基因, 其中凋亡通路相关基因、细胞周期相关基因、 Ca^{2+} 信号通路相关基因和 MAPK 信号级联相关基因, 可能与 CVB-D 对大鼠肾脏产生毒性作用有关。

[参考文献]

[1] Wu J, Smith L, Plass T C. Chip-chip comes of age for genome-wide functional analysis[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(14):6899.

[2] 许庆瑞, 张树明, 张俊威, 等. 复方青龙衣胶囊对胃癌细胞 SGC-7901 基因芯片表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 11(8):180.

[3] 许立, 梁涛, 徐立, 等. 环维黄杨星 D 对大鼠肾脏毒性的初步观察[J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(2):91.

[4] 梁晓雯, 周静, 黄艳, 等. 环维黄杨星 D 对大鼠的肾脏毒性[J]. *中国药理学与毒理学*, 2010, 24(6):505.

[5] Larisa L, Belyanskaya A, Algirdas Z. TRAIL-induced survival and proliferation of SCLC cells is mediated by ERK and dependent TRAIL-R2/DR5 expression in the absence of Caspase-8[J]. *Lang Cancer*, 2007, 11(5):1.

[6] Jin Z, El-Deiry W S. Overview of cell death signaling pathways [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(2):139.

[7] Andrea R, Jennifer H, James R, et al. MADD, a novel death domain protein that interact-s with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase [J]. *J Bio*, 1997, 272(18):12069.

[8] Miyoshi J, Takai Y. Dual role of DENN/MADD in neurotransmission and neuro-protecti on[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(10):476.

[9] Kurada B R, Li L C, Mherkar N, et al. Splice variant of IG20, is indispensable for MAPK activation and protection against apoptosis upon tumor necrosis factor-alpha treatment [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(20):13533.

[10] Gerwins P, Black C L, Johnson G L. Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272:8288.

[11] Coso O A, Chiariello M, Yu J C. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regu-late the activity of the JNK/SAPK signaling pathway[J]. *Cell*, 2005, 81:1137.

[12] Fanger G R, Johnson N L, Johnson G L. MEK kinases are regulated by EGF and select-ively interact with Rac/Cdc42[J]. *EMBO J*, 1997, 16:4961.

[13] 张新生, 左云飞, 任双义. tRNA 转运与细胞周期检查点[J]. *生命的化学*, 2009, 29(3):335.

[14] Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer [J]. *Nature*, 2004, 432(7015):316.

[15] Gifford J L, Walsh M P, Vogel HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix-loop-helix EF-hand motifs [J]. *Biochem*, 2007, 405(2):199.

[16] 梁涛, 方泰惠, 姚秀娟等. 环维黄杨星 D 对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用和对心肌细胞内游离钙浓度的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(12):94.

[17] Tomas M, Marin M P, Protoles M, et al. Ethanol affects calmodulin and the calmodulin-binding proteins neuronal nitric oxide synthase and all-spectrin (a-fodrin) in the nucleus of growing and differentiated rat astrocytes in primary culture [J]. *Toxicol Vitro*, 2007, 21:1039.

[责任编辑 聂淑琴]