

文章编号:1673-5501(2008)05-0374-07

新生大鼠脑缺血后脑室下区基因表达谱的生物信息学分析

高燕燕^{1,2} 孙金岍¹ 沙 彬¹ 杨 毅¹ 姚明珠^{1,2} 邵肖梅¹ 周文浩¹

摘要 目的 建立3日龄大鼠脑缺血模型,采用基因芯片分析新生大鼠未成熟脑缺血损伤后脑室下区(SVZ)基因表达谱的变化。**方法** 同窝3日龄大鼠随机分为实验组和对照组,采用双侧颈总动脉结扎法制备缺血性脑损伤模型,于不同时点取SVZ组织,采用Affymetrix Rat230 2.0基因表达谱芯片观察SVZ基因表达变化,芯片数据分别用3种不同方法分析,并用实时PCR方法验证芯片结果。**结果** ①通过差异基因筛选,发现3日龄大鼠脑缺血损伤后SVZ有17个基因发生表达变化,其中上调基因10个,下调基因7个,这些基因参与多种功能的调节。②基于基因功能的表达趋势分析显示,在所有参与增殖、凋亡功能的基因中,转化生长因子- β (TGF- β)在3日龄大鼠脑缺血损伤后SVZ微环境基因表达变化中起枢纽作用。实时PCR验证结果显示,TGF- β_1 及Smad2于缺血后1、4和7d表达均上升,7d达高峰。③在参与Wnt、TGF、BMP和血管内皮生长因子(VEGF)通路所有基因组成的基因功能相似性网络中,有13个基因在网络中起核心调控作用,构成信号通路串话节点。**结论** 新生大鼠在脑缺血损伤后SVZ微环境中,参与神经新生的BMP、TGF、VEGF和Wnt通路间的串话可发生于信号转导通路中多个水平,TGF- β_1 对神经新生的调控起重要作用。

关键词 早产; 大鼠; 缺血; 脑; 脑室下区; 基因芯片

Genomic and bioinformatics analysis of the subventricular zone in 3-day old rats after ischemia

GAO Yan-yan^{1,2}, SUN Jin-qiao¹, SHA Bin¹, YANG Yi¹, YAO Ming-zhu^{1,2}, SHAO Xiao-mei¹, ZHOU Wen-hao¹ (1 Children's Hospital, Fudan University, Shanghai 201102, China; 2 Now at Shanghai First Maternity and Infant Health Hospital, Shanghai 200040, China)

Corresponding Author: ZHOU Wen-hao, E-mail: zhou_wenhao@yahoo.com.cn

Abstract Objective As the largest pool of neural stem cells in mammalian animals, the subventricular zone (SVZ) persists through lifetime and retains the potency of self-renewing, cell proliferation and differentiation. After brain ischemia, this potency can be recaptured and neurogenesis be accomplished, which provides a potentially significant therapeutic strategy for ischemic injury not only in adult brain but also in premature brain. A specialized milieu supports neurogenesis and regeneration after injury in SVZ. Stem cells frequently reside in niches that regulate their selfrenewal, activation and differentiation. Understanding the molecular component changes after ischemia in neural stem cell niche is crucial to delineating the function of neural stem cells and ultimately their therapeutic potential. **Methods** To investigate the effect of brain ischemia on premature SVZ, 3-day old Sprague-Dawley rats were employed, both bilateral carotid arteries were occluded for experimental group and rats with unoccluded arteries were used as the control group and animals were killed at the chosen time point: 1 day, 4 days and 7 days after surgery. After SVZ culture was isolated, RNA was extracted and processed, microarrays containing approximately 28 000 known genes were applied to get the data about gene expression changes, and three methods were used to analyze this data bulk: differential expression analysis, cluster analysis based on time series and gene regulatory network based on function similarity. The expression of TGF- β_1 and its downstream protein Smad2 were certificated by Real-Time PCR. **Results** ① By differential expression analysis, 17 genes were found to be changed in SVZ niche after ischemia, among them, 10 were up-regulated and 7 were down-regulated. These genes were associated with multiple functions including signal transduction, inflammation and cellular structure, etc. ② By cluster analysis based on time series, TGF- β among all the genes participating in cell proliferation and apoptosis, was found to take an important role in the gene expression changes. It was found that both TGF- β_1 and Smad2 mRNA

基金项目 国家自然科学基金:30571963

作者单位 1 复旦大学附属儿科医院 上海,201102; 2 现工作于上海市第一妇婴保健院 上海,200040

通讯作者 周文浩, E-mail: zhou_wenhao@yahoo.com.cn

increased at each of three time points, and the peak increase occurred at 7 days after the ischemic injury. ③In the gene network based on function similarity composed of all the genes in Wnt, TGF, BMP and VEGF pathways, 13 were found to act as the hinges.

Conclusions The cross-talk of Wnt, TGF, BMP and VEGF pathways was likely to constitute a part of the key regulators among all the genes participated in the premature SVZ niche change after ischemic injury, these genes functioned at different levels in signal pathways in synergism or antagonism. TGF- β_1 may play an important role in immature brain after ischemia through activating neural stem cell proliferation and differentiation.

Key words Preterm; Rat; Brain; Ischemia; Subventricular zone; Microarray

随着围生医学的发展,早产儿、低出生体重儿存活率不断上升,但由此伴发的各种问题也逐渐凸显,其中,以缺血性脑损伤尤为受到关注。国外数据显示,在体重低于1 500 g的极低出生体重儿中,25%~50%后期存在行为和认知功能缺陷,10%发生脑性瘫痪^[1];中国也开始呈现相同趋势^[2]。缺血性脑损伤严重影响早产儿生存质量,目前缺乏有效治疗方法。大量文献表明,神经干细胞能被诱导增殖和分化,促进神经新生以修复损伤^[3],早产儿大脑尚处于发育未成熟阶段,如何激活早产儿大脑内源性神经干细胞修复损伤,已成为早产儿缺血性脑损伤治疗策略中最具潜能的发展方向。

在未成熟脑以及成熟脑内,脑室下区(subventricular zone, SVZ)是最大的神经干细胞库,即使到成年,SVZ仍持续保持着神经干细胞增殖分化的潜能,能够不断更新产生神经细胞,通过吻侧迁移流,迁移到嗅球,替代嗅球中不断更新的神经元^[4]。该区包含4种细胞:成神经细胞(A型细胞)、星形胶质细胞(B型细胞)、未成熟前体细胞(C型细胞)和室管膜细胞,多种细胞通过大量的信号传导、反馈而相互作用,构成影响干细胞的自我更新、激活及分化的微环境(niche)^[4]。最近研究发现,干细胞的自我更新及增殖分化主要依赖于周围特殊的微环境,如果微环境不复存在,干细胞自我更新及增殖分化的能力也极大地降低^[5]。微环境的内容包括:细胞间的相互作用、生长因子信号、血管微环境及细胞外基质等,微环境构成复杂,同时研究多条信号通路存在很大的困难。既往研究表明,大量因子存在于干细胞微环境中^[6~10],包括Notch、Wnt;多种生长因子如骨形成蛋白(BMP)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、胰岛素样生长因子(IGF)和血小板衍生生长因子(PDGF)等;炎性细胞因子如TNF、IL-6等,它们依赖于各自的信号转导通路,在微环境中同时发挥作用,从而影响干细胞的自我更新和增殖分化。

鉴于SVZ微环境信号构成的复杂性,传统的以描述单个信号通道或生长因子的生物学方法受到挑战,20世纪90年代以来,基因芯片(microarray)技术的应用提供了解决这一问题的方法,实现了对生物基因组表达的快速、平行及高通量检测,而多种数学方法应用于芯片数据的分析,也使芯片海量数据信息的筛选成为可能。本研究通过采用基因芯片分析3日龄大鼠脑缺血损伤后神经干细胞微环境中基因

表达谱的变化,探讨缺血后影响神经干细胞增殖分化的分子机制,从而为发育期脑损伤的干预提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制作 3日龄SD大鼠,体重8~10 g,雌雄不限,由中国科学院上海实验动物中心提供。同窝大鼠随机分成实验(I)组和对照(C)组,I组结扎双侧颈总动脉,建立脑缺血模型,C组仅分离双侧颈总动脉,不结扎。实验组有30%不能耐受手术,在术中和术后死亡。两组大鼠分别于术后1、4和7 d处死,断头取脑。将完整脑组织取出后,在冠状面上用手术刀片切除视交叉平面前和海马平面后的脑组织;在水平面上切除胼胝体平面上脑组织,在垂直面上切除侧脑室外侧脑组织,剩下的即为SVZ组织(图1)。实验过程大鼠死亡,则进行补做,保证每组每时点取到6只。

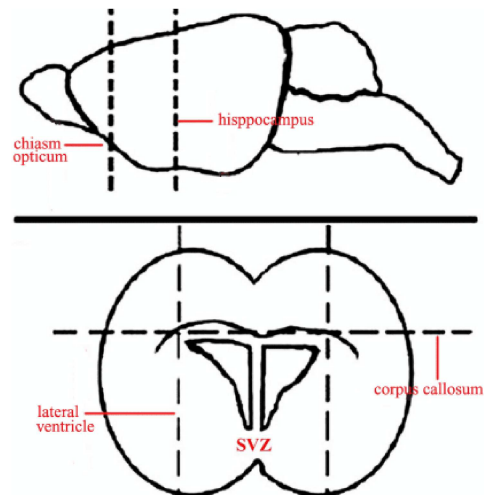


图1 SVZ组织分离示意图

Fig 1 Dissection of the SVZ

1.2 基因芯片检测 选择Affymetrix Rat230 2.0基因表达谱芯片(包含有31 000个探针位点,代表28 000个功能明确的大鼠基因),取SVZ组织进行实验。实验步骤:①RNA抽提:采用TRIzol法抽提总RNA,琼脂糖凝胶电泳法检测RNA质量;②cRNA合成与纯化:取3 μ g总RNA首先逆转

录为 cDNA,再扩增为 cRNA,采用 Superarray ArrayGrade cRNA 纯化试剂盒(Catalog No. GA-012)进行纯化,紫外分光光度计测定纯化 cRNA 的 A_{260} 、 A_{280} 和 A_{230} 值, A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 比值 >2 ,认为质量合格,进行下一步实验;③芯片杂交:每组每时点取 $7 \mu\text{g}$ cRNA 进行芯片杂交,化学发光检测试剂盒(Superarray, Catalog No. D-01)检测;④图像采集和数据分析:化学发光的芯片图像通过 X 线胶片和台式扫描仪获得,采用 GEArray 表达分析配套软件进行基因芯片数据分析。

1.3 基因芯片数据分析

1.3.1 差异基因筛选 取同一基因于 6 张芯片上的信号值,将所有数据的前景值与背景值相减,得到 Cy3 标记的强度值,减去背景值后得到有效表达值。利用 GCOS 软件,设 $P < 0.05$,取每个基因在 6 张芯片上的标准化信号值,求几何均数,做组间对比(1 组/ C 组),筛选差异基因。将各组芯片进行比较,一般组间比值上调或下调 2 倍以内(0.5 ~ 2.0)的基因不存在显著表达差异,该范围之外则认为基因的表达出现显著改变,上调 2 倍以上(>2.0)认为表达上调,下调 2 倍以内(<0.5)认为表达下调^[1]。

1.3.2 基于基因功能的表达趋势分析 计算单个基因表达趋势:取参与细胞增殖、凋亡功能基因于 6 张芯片上的信号值(Gene Ontology, GO 分类, <http://www.geneontology.org/>),每个基因信号值各时间点两组比较,并对比值行对数转换(Log_2),在 3 个时间点前添加辅助 0 点(作为标准化的起点)。

构建表达趋势模型:为构建一批趋势模型,可以定义参数 C 来控制基因在时间点之间变化幅度的数量。由于方法依赖于相关性,“一个单位”对于不同的基因有不同的定义。对于 n 个时间点,就可以得到 $(2C + 1)^{n-1}$ 个不同的趋势。本实验定义参数 $C = 2$ 控制基因在时间点间变化幅度的数量,本实验设 3 个时间点($n = 3$),得到 25 个不同的趋势模型,将需处理基因分配到 25 个趋势模型中。

将单个基因的表达趋势分配到相应模型,并确定趋势的显著性,为了找出在实验中具有显著性的趋势模型,定义零假设为任一个时间点上的值与过去和将来的时间点的值都是独立的。因此,根据零假设,任何趋势都是分配到这个趋势的基因的测量值随机变化形成的,如果实际分配的基因比预测分配的基因还多,则表明代表生物功能的趋势模型显然偏离了零假设。

为了计算预期分配到趋势模型的数目及每个趋势模型的显著性。本研究用前述分配基因的方法和基于置换的检测。数据是随机生成的,在这种情况下,用置换的方法来量化本来要分配到趋势模型中的预测数目。由于在零假设下,每个值的次序是随机的,也就是说每一个时间的值与其他时间点的值是独立的,因此通过置换,就可以产生类似于在零假设下的概率分布的趋势,在所有模型中, P 值较小者

能代表基因表达变化趋势。

1.3.3 基因功能相似性网络分析 构建功能和基因矩阵:取参与转化生长因子- β (TGF- β)、BMP、Wnt 和 VEGF 通路的基因在 6 张芯片上的信号值,参考 GO 分类和京都基因与基因组百科全书(KEGG 分类, www.genome.ad.jp/kegg),将以上基因的基因功能属性作为矩阵列,将基因在 6 个样本中的信号值作为矩阵行,构建矩阵 A,该矩阵体现基因间信号值和功能的相关性。

(1)构建基因间关系矩阵 将 A 矩阵转置为 A'矩阵,构建新矩阵 $M = A \times A'$ ($M(i, j)$),代表基因 i 和 j 同时参与某种功能的数量。 $M(i, j)$ 的值代表从基因 i 至 j 的关系。

(2)构建网络 将 $M(i, j)$ 的值用图形表示,使用圆圈表示基因,使用连接圆圈之间的箭头线段表示基因间的关系。网络中心点用基因的特征中心度代表,特征中心度提供了如下的衡量标准:即待测基因在网络中的重要程度与其相邻基因密切相关,若其相邻基因比较在网络中的地位较重要,那么待测基因在网络中的作用也较为重要。通过特征中心度寻找网络中心点的意义在于:在网络总体结构基础上,找到最居于核心的基因。首先进行因子分析,找出各个基因之间距离的特征值,该特征值就是基因 i 对基因 j 在网络中地位(解决中心地位)的贡献程度, x 代表中心度向量,中心度是与某点 i 相邻(直接相连)的所有点的数量。每个基因的特征值由高至低排序,最高值为网络的最中心基因,该基因对网络总体的结构以及对其他基因间关系影响最大。节点大小表示基因的度,节点大的基因表示此基因在整个基因群中与其他基因联系更紧密,因而越重要。

(3)计算网络子群 将关系数量相同或相近的基因标为相同的颜色,以此作为网络中的子群。颜色的不同根据特征中心度的大小分类,把网络图分割成若干个子图,使得每个子图中基因的度都属于一个度的区间。

1.4 实时 PCR 反应 取 SVZ 组织,Trizol 一步抽提法抽提总 RNA,取 $2 \mu\text{g}$ 总 RNA 进行逆转录反应合成 cDNA, Sybergreen 染料法进行实时 PCR 反应。以 GAPDH 为内参照并扩增。引物参照 GenBank 数据库基因序列进行设计。

TGF- β_1 (NM_021578)引物序列为:

F: tggaaatcaatgggatcagtc

R: ggagctgtgcaggtgttgag

Smad2(NM_019191)引物序列为:

F: gggtttgaggcgtttatc

R: gcttgagcatgcactgac

采用 Eppendorf Mastercycler○Rep realplex (Eppendorf, Germany) PCR 扩增仪进行扩增,取其拷贝数的对数进行比较分析。验证芯片结果。

1.5 统计学方法 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 差异基因筛选 利用差异基因筛选方法对3日龄大鼠脑缺血后 SVZ 微环境基因表达变化的研究发现,有 17

个基因及 1 个序列表达标签(expressed sequence tag, EST) 呈差异表达,其中上调和下调基因各为 10 个和 7 个(表 1, 2)。

表 1 3 日龄大鼠脑缺血损伤后 SVZ 表达上调的基因

Tab 1 Up-regulated genes in SVZ after brain ischemia in 3 days old rats

Gene symbol	Geometric mean of intensities(I/C)	Probe set	Description	P value
Gdf11	1.111	1393697 at	Growth differentiation factor 11	0.006
Notch4	1.111	1378533 at	Notch homolog 4	0.031
Flt1	1.250	1395197 at	FMS-like tyrosine kinase 1	0.004
Igf1r	1.250	1390671 at	Insulin-like growth factor 1 receptor	0.008
Fgf10	1.429	1369604 at	Fibroblast growth factor 10	0.009
F2r1	1.429	1387596 at	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0.011
Pten	1.429	1370112 at	Phosphatase and tensin homolog	0.027
IL-10	1.429	1387711 at	Interleukin 10	0.032
Nudt6	1.667	1370435 at	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	0.057
IL-6st	1.667	1373140 at	Interleukin 6 signal transducer	0.036

表 2 3 日龄大鼠脑缺血损伤后 SVZ 表达下调的基因和序列表达标签

Tab 2 Down-regulated genes and expressed sequence tag in SVZ after brain ischemia in 3 days old rats

Gene symbol	Geometric mean of intensities(I/C)	Probe set	Description	P value
Tnfrsf	0.435	1368635 at	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8	0.013
Gjb 1	0.454	1387145 at	Gap junction membrane channel protein beta 1	0.003
Dvl	0.476	1369997 at	Dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)	0.002
Hgf	0.500	1387701 at	Hepatocyte growth factor	0.044
Pdgfra	0.667	1393494 at	Platelet derived growth factor, alpha	0.018
Serpinf1	0.714	1381012 at	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade F, member 1	0.004
Thy1	0.769	1369651 at	Thymus cell antigen 1, theta	0.016
	0.769	1377655 at		0.050
Ucpl	0.769	1377655 at		0.050

2.2 基于基因功能的表达趋势分析 通过对表达趋势模型显著性分析,发现在所有参与凋亡功能的基因表达趋势中,P 值最小的趋势分配入 6 个基因,分别为 TCF-β₂、IGF-1R、Casp3、Tnfsf6、Akt1 和 Birc4;在所有参与增殖功能的基因表达趋势中,P 值最小的趋势分配入 5 个基因,分别为 FGF7、CXCL10、PLK1、IL18 和 FGF10。取这些基因在 6 张基因芯片的标准化信号值,通过动态贝叶斯网络学习算法,构建凋亡与增殖相关基因调控的相互作用网络(图 2)。

差异表达基因按其基本功能大致可分为 4 类:①信号通路和生长因子: Notch4、Dvl、Igf1r、Fgf10、Flt1、Gdf11、Pdgfra、Hgf;②细胞因子: Tnfsf8、IL6st;③细胞结构蛋白: Gjb1;④其他:Pten、IL-10、F2r1、Nudt6、Serpinf1 和 Thy1 等。

每个节点是一个基因,图 2 箭头所示为基因的作用方向。从调控网络图上寻找发出箭头最多的节点是 Tgfb2,即该基因在基因表达变化过程中占枢纽性作用,改变该基因在实验分组中的表达,可能会起到干预实验表型的作用。

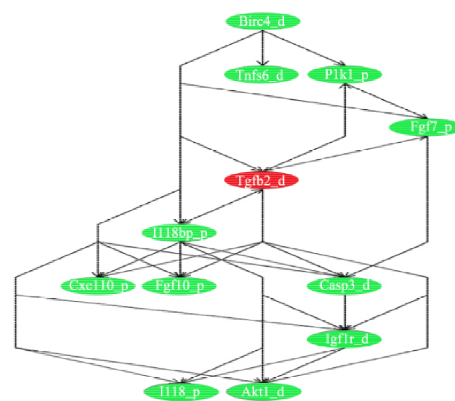


图 2 凋亡与增殖相关基因调控网络

Fig 2 Regulating network of apoptosis and proliferation associated genes

Notes: i: ischemia associated gene; p: proliferation associated gene, d: apoptosis associated gene

2.3 基因功能相似性网络分析 利用 BMP、TGF-β、VEGF 及 Wnt 通路所有基因可组成完整的基因功能相似性网络(图3),提示4条通路间存在串话;该网络中,梅红色的基因群具最大的特征中心度,在整个基因功能相似性网络中

起核心调控作用。该群基因在信号转导通路中位于多个水平,包括:①配体: BMP6、Wnt2b、Agpt2;②受体或胞膜蛋白: Flt1、Fzd5;③胞内信号蛋白: Smad1、Mapk10 和 Prkch;④转录因子: Runx3。

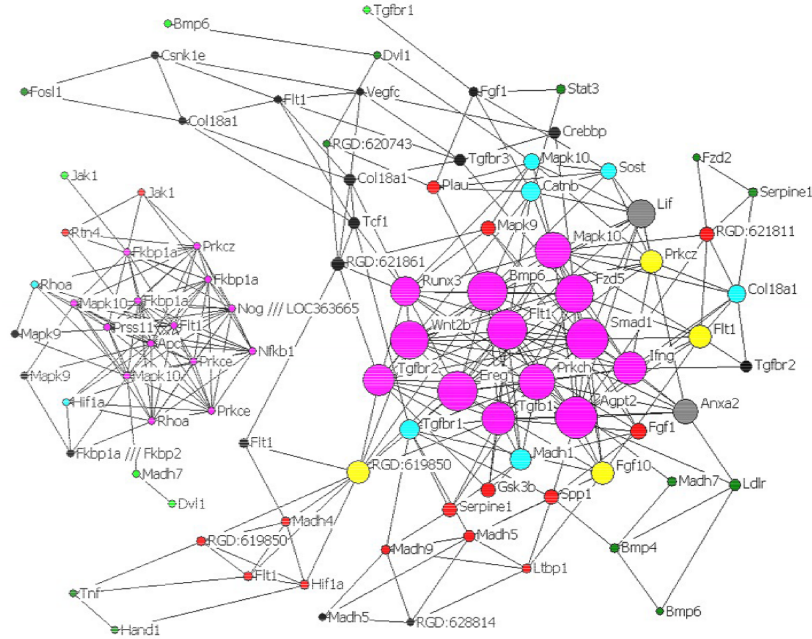


图3 BMP、TGF-β、VEGF 和 Wnt 类基因间相互作用网络(基因功能相似性网络)

Fig 3 Interaction network of BMP、TGF-β、VEGF and Wnt genes(network of genes with similar function)

Notes: Circle: gene, lines connecting circles represented the relation between genes; the special values were ordered from high to low, the highest value represented the most important gene affecting network structure and other genes, different size nodal points represented the degrees of gene speciality; the genes with same or similar degree relationship were marked with same colour, the colours were classified according to the different degrees

2.4 实时 PCR 结果 3 日龄大鼠脑缺血损伤发生后, SVZ TGF-β₁ mRNA 于 1、4 和 7 d 均有上升趋势, 7 d 达高峰, 其中 1 和 7 d 变化趋势有统计学意义($P < 0.01$) (表 3)。SVZ

Smad2 mRNA 于 1、4 和 7 d 均有上升趋势, 7 d 达高峰, 且 3 个时间点的变化趋势差异均具显著统计学意义($P < 0.01$) (表 3)。

表 3 3 日龄大鼠脑缺血损伤后 SVZ TGF-β₁ 和 Smad2 mRNA 表达的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Changes of TGF-β₁ and Smad2 mRNA expression in SVZ after brain ischemia in 3 days old rats($\bar{x} \pm s$)

d	n	Control (TGF-β/GAPDH)	Ischemia (TGF-β/GAPDH)	Control (Smad2/GAPDH)	Ischemia (Smad2/GAPDH)
1	6	1.004 ± 1.108	1.702 ± 0.184	0.300 ± 0.073	1.002 ± 0.086
4	6	1.294 ± 0.591	2.146 ± 0.294	0.372 ± 0.066	1.537 ± 0.231
7	6	1.551 ± 0.336	3.366 ± 0.563	0.515 ± 0.075	1.626 ± 0.360

3 讨论

基因表达分析包括 3 个层次: 首先为单基因水平, 即比较对照组与实验组的每个基因是否存在表达差异, 主要指差异基因表达分析; 其次为多基因水平, 即按照基因的共同功能、相互作用和共同表达等进行的聚类分析; 最后为

系统水平, 即以基因网络形式解释和理解生命现象。在生物体系中, 基因并非单独起作用, 他们相互作用呈网状, 因此从多个层次分析基因表达谱数据可实现对生物系统的更高层次的理解。本实验利用差异基因筛选、基于基因功能的表达趋势分析以及基因功能相似性网络实现了在单基

因、多基因及系统水平对于未成熟脑缺血后 SVZ 微环境基因表达谱变化的研究。

本文选择的 Affymetrix 基因表达谱芯片探针的设计特点为:覆盖基因 3'端独特的完全匹配(perfect match, PM)和错误匹配(mismatch, MM)探针。在独特的 PM-MM 探针设计中,设计一对 25-mer 探针,其中一个是 PM,另一个为 MM 探针。MM 探针是有效的内参照,因为其像 PM 探针一样,与非特异性序列结合。同时那些不同来源的样品中非特异性的背景信号可以被有效地定量和扣除。同时,每个基因将有 11~16 个不同的多个短的探针片段代表。可将这两个基因的差异区分开,并可提高探针检测的特异度,降低探针与样本 cRNA 的非特异性结合。但可能会将某些任意打断的 cRNA 片段误认为是非特异性序列而不能结合。同样基于此原因,对低丰度表达产物检测的可能性降低。由于 25 bp 序列中有一个错配将会使得杂交复合物不稳定,因而将降低检测出特定基因 cRNA 的概率,从而进一步降低其在基因芯片中的检出率。Affymetrix 芯片采用群体分配的方式进行杂交检测结果的监测。理论上假设认为:PM 的序列与 PM 探针的杂交效率要高于 MM 探针,则在芯片上的 PM 探针位置上的荧光强度要高于 MM 探针。经过系统综合调试,可以将假阳性率降至最低,将那些真正与探针的靶序列检测出,但这将不可避免地遗漏可能真正与探针结合的靶向序列。从多个探针位点检测的荧光信号,经过综合评估、统计和分析,获得的数据比单个探针判断样品是否存在某一靶序列的数据更为可靠。Affymetrix 基因表达谱芯片显著降低了检测样本的假阳性率,但同时也减弱了检测的灵敏度,增加了特异度。

本实验采用差异基因筛选、基于基因功能的表达趋势分析以及基因功能相似性网络,选择 Affymetrix Rat230 2.0 基因表达谱芯片实现了在单基因、多基因及系统水平对于大鼠未成熟脑缺血后 SVZ 微环境基因表达谱变化的研究^[12]。因为 2~4 日龄大鼠脑的成熟度相当于 28~31 周胎儿的脑成熟度,3 日龄大鼠可以更好地模拟早产儿脑发育情况^[13]。

3.1 差异表达基因 Liu 等^[14]利用基因芯片研究大脑中动脉阻塞(MCAO)对成年小鼠 SVZ 基因表达的影响,发现缺血发生后 SVZ 大量基因被激活而表达上调,这些基因在胚胎发育期参与了多条信号通路,包括 BMP、Notch 及 Wnt 信号通路,与本实验结果相比,除上述 3 条通道外,还有大部分差异表达基因重合,包括 FGF、HGF、IGF、Cjb、IL-6、Thy 和 Pten^[15]。但本研究基因表达差异倍数及差异方向与既往研究结果不同,可能是由成熟脑和发育期脑的差异所致,此外,实验设计及采用芯片种类的不同也可能造成基因差异表达倍数的区别:既往研究中采用缺血发生 7 d 后 SVZ 组织与对照组相比,有文献证实脑缺血发生后,神经新生作用于缺血发生后 7 d 达高峰^[16],本研究采用缺血

发生后 1、4 和 7 d 的 3 个时间点,取几何均数与对照组比较,差异倍数会有所不同;本研究所采用 Affymetrix230 2.0 表达谱芯片为大鼠全基因组芯片,在全基因组中,参与神经系统功能的基因表达丰度可能不高,也造成差异基因检出较少及差异倍数较小,差异基因的减少可能与应用 Affymetrix 芯片增加了检测特异度及降低灵敏度有关。

3.2 TGF- β 在基因表达变化趋势中的作用 差异基因筛选是芯片数据分析中出现最早的方法,该方法优点在于数据直接、清晰,但仅靠差异基因筛选得出的结论往往过于简单,不能反映基因表达在不同时点的变化趋势,也不能反映功能相关基因间相互作用的特点,因此很难得到探索高层次功能的线索,为弥补不足,本研究采用基于基因功能的表达趋势分析和基因功能相似性网络分析方法进一步对芯片数据进行挖掘,发现在参与增殖和凋亡功能的基因变化中,TGF- β_2 处于枢纽地位,而在由 BMP、TGF- β 、VEGF 和 Wnt 通路基因组成的基因功能相似性网络中,TGF- β_1 也作为网络中的核心调控基因之一,且实时 PCR 证实 TGF- β_1 及其信号转导通路中关键分子 Smad2 在缺血发生后 1、4 和 7 d 表达均有上升,7 d 达高峰。

TGF- β 分为:TGF- β_1 、TGF- β_2 和 TGF- β_3 ,近年研究热点集中于 TGF- β_1 ,认为该细胞因子在星形胶质细胞的增殖和分化平衡中发挥作用,而星形胶质细胞作为潜在的神经干细胞,是 SVZ 微环境的重要组成部分。在哺乳动物神经系统,星形胶质细胞分化成熟的标志为胞内 GFAP 取代波形蛋白,de Sampaio 等^[17]发现 TGF- β_1 可促进 GFAP 增强子的活化,使星形胶质细胞增殖终止而胶质分化被诱导。Zhang 等^[15]报道,缺血发生后,SVZ 神经新生作用于缺血后 7 d 达高峰,该高峰时点与本实验实时 PCR 结果中 TGF- β_1 及 Smad2 表达高峰时点一致,提示 TGF- β_1 作为 3 日龄大鼠脑缺血损伤后 SVZ 微环境变化的组成成分,可能参与了缺血损伤后的神经发生作用。

3.3 基因功能相似性网络 构成干细胞微环境的多种因子间往往存在交互作用,形成信号通路串话,本研究发现在 BMP、TGF- β 、VEGF 和 Wnt 通路所有基因组成的功能相似性网络中,有 13 个基因处核心调控地位,该群基因在信号转导通路中存在多个水平,包括配体、受体或胞膜蛋白、胞内信号蛋白及转录因子,提示 BMP、TGF- β 、VEGF 和 Wnt 通路串话发生于多个水平,既往研究也提供了该类核心调控基因参与信号通路串话的依据,如:①配体受体结合水平:BMP 与 Wnt 在动物胚胎发育过程存在大量串话,最常见的是这两个基因间相互对抗^[18],在动物胚胎期肺发育过程中 VEGF 通路有可能通过改变 BMP4 的表达水平而在上皮-间充质组织的发育中发挥调节作用^[19];②胞内信号蛋白/酶水平:丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)级联反应通路中,p38 通路可被 VEGF-FH1 通路激活^[20],而 MAPK/ERK 通路可被 HGF 和 EGF 激活,

且在 HGF 和 EGF 介导的 MAPK 信号通路中, Smad1 作为 MAPK/ERK 的底物而存在;③转录水平:Runx 家族成员在干细胞发育过程中,可作为 BMP 或 Notch 信号通路的下游转录因子发挥作用^[21]。

结合本实验结果, BMP、TGF- β 、VEGF 和 Wnt 通路间的串话可发生于多个水平,作用方式为协同或拮抗。在 13 个起核心调控作用的基因中,部分基因可参与转录 BMP、TGF- β 、VEGF 和 Wnt 通路以外的信号如 Notch、FGF 等,而部分基因本身即是 BMP、TGF- β 、VEGF 和 Wnt 以外信号通路的配体,如 Agpt2,提示在整个缺血后 SVZ 微环境基因网络中,该群基因也作为核心调控基因的一部分而存在。

本研究不足之处:利用基因芯片技术,每次实验都可产生海量数据,但不同数据分析方法可能会得到不同的结果,单纯一种方法所得到的结论并不全面,为了实现对生命现象的全面阐释,仍有待于更多的数学方法应用于芯片数据分析,依赖于分析水平逐步从单基因走向多基因,走向系统及整体层次。

致谢 感谢上海其明信息技术公司李奇博士提供的生物信息学分析技术支持。

参考文献

- [1] Taupin P. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C R Biol*, 2006, 329(7): 465-475
- [2] Chen HJ (陈惠金). 努力提高我国早产儿脑损伤的诊断和防止水平. *Chin J Pediatr* (临床儿科杂志), 2006, 24(2): 163-165
- [3] Romanko MJ, Rola R, Fike JR, et al. Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. *Prog Neurobiol*, 2004, 74(2): 77-99
- [4] Taupin P. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C R Biol*, 2006, 329(7): 465-475
- [5] Watts C, McConkey H, Anderson L, et al. Anatomical perspectives on adult neural stem cells. *J Anat*, 2005, 207(3): 197-208
- [6] Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, et al. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature*, 2002, 417(6886): 295-299
- [7] Otero JJ, Fu W, Kan L, Cuadra AE, et al. Beta-catenin signaling is required for neural differentiation of embryonic stem cells. *Development*, 2004, 131(15): 3545-3557
- [8] Farkas LM, Dünker N, Roussa E, et al. Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 2003, 23(12): 5178-5186
- [9] Gossrau G, Thiele J, Konang R, et al. Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25(4): 939-949
- [10] Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates neurogenesis via vascular endothelial growth factor with STAT activation. *Brain Res*, 2006, 16(1073-1074): 190-201
- [11] Gerhold D, Lu M, Xu J, et al. Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiol Genomics*, 2001, 5(4): 161-170
- [12] Slonim DK. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nat Genet*, 2002, 32(S): 502-508
- [13] Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, et al. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*, 1999, 19(11): 4462-4471
- [14] Liu XS, Zhang ZG, Zhang RL, et al. Comparison of in vivo and in vitro gene expression profiles in subventricular zone neural progenitor cells from the adult mouse after middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience*, 2007, 146(3): 1053-1061
- [15] Zhang R, Zhang Z, Wang L, et al. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004(4), 24: 441-448
- [16] Roussa E, Farkas LM, Kriegstein K. TGF-beta promotes survival on mesencephalic dopaminergic neurons in cooperation with Shh and FGF-8. *Neurobiol Dis*, 2004, 16(2): 300-310
- [17] de Sampaio e Spohr TC, Martinez R, da Silva EF, et al. Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor- β 1. *Eur J Neurosci*, 2002, 16(11): 2059-2069
- [18] Ille F, Atanasoski S, Falk S, et al. Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev Biol*, 2007, 304(1): 394-408
- [19] Del Moral PM, Sala FG, Tefft D, et al. VEGF-A signaling through Flk-1 is a critical facilitator of early embryonic lung epithelial to endothelial crosstalk and branching morphogenesis. *Dev Biol*, 2006, 299(1): 177-188
- [20] Lutun A, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*, 2002, 8(8): 831-840
- [21] Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, et al. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(3): 902-908

(收稿日期: 2008-08-02 修回日期: 2008-08-20)

(本文编辑: 陈贞华)