

形觉剥夺性近视猴视皮质中基因表达谱的变化

吴君舒, 聂昊辉

基金项目: 中国广东省医学科研基金资助项目(No. B2008053)
作者单位: (510060) 中国广东省广州市, 中山大学中山眼科中心
中山大学眼科学国家重点实验室
作者简介: 吴君舒, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 屈光不正。
通讯作者: 吴君舒. wujsh78@126. com
收稿日期: 2011-07-19 修回日期: 2011-09-06

Preliminary study of gene expression chip microarray analysis on the visual cortex of form-deprivation myopic monkeys

Jun-Shu Wu, Hao-Hui Nie

Foundation item: Guangdong Medical Research Foundation, China (No. B2008053)

Zhongshan Ophthalmic Center, State Key Laboratory of Ophthalmology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Jun-Shu Wu. Zhongshan Ophthalmic Center, State Key Laboratory of Ophthalmology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. wujsh78@126. com
Received: 2011-07-19 Accepted: 2011-09-06

Abstract

• AIM: To investigate the gene expression changes in the visual cortex of form-deprivation myopic monkeys using gene expression chip microarray techniques.

• METHODS: Eight healthy infant rhesus monkeys, between 20 and 40 days of age, were divided into form-deprivation group ($n = 4$) and control group ($n = 4$). Monkeys from form-deprivation group wore diffuser spectacle lens over their right eyes, and 0D lens over their left eyes. Monkeys from control group wore 0D lens over both of their eyes. After 12 weeks, gene expression changes in the visual cortex of form-deprivation and control monkeys were analyzed using gene expression chip microarray techniques.

• RESULTS: In comparison with control group, genes that were down-regulated were significantly more than those that were up-regulated in form-deprivation group, including Egr-1, NMDA and GABA genes which had been proved to be myopia related genes.

• CONCLUSION: Gene expression is significantly inhibited in the visual cortex of form-deprivation myopic monkeys. And gene expression chip microarray technique is a useful tool to screen the possible myopia-related candidate genes.

• KEYWORDS: form deprivation; myopia; rhesus monkey; visual cortex; gene expression chip

Wu JS, Nie HH. Preliminary study of gene expression chip microarray analysis on the visual cortex of form-deprivation myopic monkeys. *Gujie Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(11):1896-1898

摘要

目的: 采用基因表达谱芯片技术研究形觉剥夺近视猴视皮质中基因表达的变化。

方法: 将 8 只 20 ~ 40 天龄的健康幼恒河猴分为形觉剥夺组和对照组。形觉剥夺组 4 只猴右眼配戴散射镜片, 另 1 眼配戴 0D 镜片; 对照组 4 只猴双眼均配戴 0D 镜片。戴镜 12wk 后, 形觉剥夺组和对照组猴取视皮质, 用基因表达谱芯片技术对形觉剥夺猴视皮质基因表达的变化进行分析。

结果: 与对照组相比, 形觉剥夺组中表达下调的基因明显多于表达上调的基因, 其中包括 Egr-1, NMDA 和 GABA 等基因。

结论: 形觉剥夺性近视猴视皮质中存在基因表达被抑制的趋势。

关键词: 形觉剥夺; 近视; 恒河猴; 视皮质; 基因表达谱芯片
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2011. 11. 008

吴君舒, 聂昊辉. 形觉剥夺性近视猴视皮质中基因表达谱的变化. 国际眼科杂志 2011;11(11):1896-1898

0 引言

近视给人们的生活、工作带来诸多不便, 对近视发病机制的研究已经成为一大热点。我们以恒河猴为研究对象, 成功创建了形觉剥夺近视模型^[1]。目前, 已有的对近视机制的研究绝大多数是对眼球本身——巩膜、脉络膜、视网膜进行的^[2,3], 而对于视觉传导通路的高级中枢——视皮质在近视发生发展中的作用的研究则少有涉足。我们采用基因表达谱芯片技术, 对形觉剥夺近视猴视皮质中基因表达的变化进行了初步探索。

1 材料和方法

1.1 材料 实验动物为 8 只 20 ~ 40 天龄的健康幼恒河猴, 分为两组: 形觉剥夺组和对照组。形觉剥夺组 4 只猴右眼配戴散射镜片, 造成该眼的形觉剥夺, 另 1 眼配戴 0D 镜片; 对照组 4 只猴双眼均配戴 0D 镜片。两组动物的饲养方法及检查项目见文献^[1]。

1.2 方法 戴镜满 12wk 后, 形觉剥夺组和对照组幼猴取视皮质: 用 50g/L 氯胺酮按 4mg/kg 进行肌肉注射, 全身深度麻醉, 头置于冰上, 迅速开胸, 暴露心脏, 分离心包膜, 用 12 号粗针头经左心室插管至升主动脉, 快速灌注预冷的生理盐水约 500mL。迅速剪开头部皮肤, 开颅, 暴露枕叶, 钝性剥离枕叶视皮层。后下方由皮质同白质交界处开始, 前上方到顶枕沟。应用基因芯片技术(由上海晶泰生物技术有限公司提供)研究形觉剥夺猴视皮质基因表达谱的变化。具体步骤包括总 RNA 的提取与纯化, cDNA 的合成与纯化, IVT 合成 cRNA 和 cRNA 的纯化, cRNA 片段

化、配制杂交液,芯片杂交,洗脱芯片,扫描芯片,得到原始数据,应用 GCOS 1.1 进行单张芯片数据分析,采用 Affymetrix 公司设计的 100 个相对稳定表达的基因作为内参照,将其平均信号值调整到 2000,得到每样品相应的 Scaling Factor(均一化因子),利用 Scaling Factor 将其它基因的信号值进行校正。应用 GCOS 1.1 进行两张芯片的比较分析(004 vs 026),并找出表达上调两倍或以上并且在 004 中表达检测值为“Present”的探针组,表达下调两倍或以上,并且在 026 中表达检测值为“Present”的探针组。按照功能不同,将第 4 步得到的探针分类。所用到的芯片包括 Affymetrix[®] Test 3 Array 及 Affymetrix[®] GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays。用到的其它软件还包括:Affymetrix[®] Microarray Suite Version 5.0, Affymetrix[®] MicroDB Version 2.0, Affymetrix[®] Data Mining Tool Version 2.0。根据在 260nm 和 280nm 处的吸光值,检测 RNA 的纯度,纯 RNA 的 OD260/OD280,比值应接近 2.0(比值最好在 1.9~2.1 之间)。图 1 显示形觉剥夺组中 004 号猴和对照组中 026 号猴的 OD260/OD280 值,分别为 1.97 和 2.06,表明总 RNA 纯度较高,能用于芯片的杂交。

2 结果

对于数据的筛选常用的标准是基因表达信号达到一定强度以上,实验组相对于对照组上调或下调倍数达到 2 倍或 2 倍以上者为有显著性表达变化的基因点,其中选取 004 号猴和 026 号猴视皮质样本的基因表达谱芯片扫描的实时图像(图 2,3)。在芯片结果中有 1353 个基因存在显著性表达变化,其中与对照组相比,形觉剥夺组中有 134 个基因发生了上调 2 倍或以上的表达变化,有 1219 个基因发生了下调 2 倍或以上的表达变化。从总体上看,与对照组相比,在形觉剥夺组中表达下调的基因明显多于表达上调的基因,提示形觉剥夺组中存在基因表达被抑制的趋势。按照基因功能分类标准对芯片结果进行初步分析发现,发生表达变化的基因功能涉及许多方面(表 1)。在芯片结果中,值得注意的是 Egr-1 在形觉剥夺组动物的视皮质样本中的表达较对照组动物下调了 2 倍,此外 Egr 家族中的 Egr-3 也在形觉剥夺组中下调了 2^{1.4} 倍。蛋白激酶 C 家族的相关基因如 PKC β_1 , PKC δ , PKC 结合蛋白等都在形觉剥夺组动物的视皮质中下调 2 倍或以上。GAD₆₅ 催化生成的 GABA 相关受体如 GABA A 受体 β_1 , GABA A 受体 α_4 , GABA A 受体 β_3 等在形觉剥夺组动物的视皮质中下调了 2 倍或以上。

3 讨论

基因芯片(gene chip)又称 DNA 芯片、DNA 微阵列(DNA microarray)、cDNA 微阵列、寡核苷酸微阵列(oligonucleotides microarray),是近几年发展起来的一项生物前沿技术^[4]。基因芯片的概念来源于计算机芯片,其产生可追溯到 Southern 印迹杂交技术,即 DNA-DNA 之间通过碱基互补配对机制形成互补链。早在 1980 年代, Bains 等就将短的 DNA 片段固定到支持物上,借助杂交方式进行序列测定。1991 年, Fodor 等建立了原位光刻合成技术,为寡核苷酸载体原位合成制作高密度基因芯片奠定了基础。美国 Affymetrix 公司率先开展了这方面的研究,1991 年该公司生产了世界上第一个核苷酸基因芯片。随着探针的荧光标记、激光共聚焦扫描和计算机分析技术的发展,1995 年,第一块以玻璃为载体的基因芯片在美国 Stanford 大学诞生。同年 Stanford 大学的 Schena 等发表第一篇基因微阵列论文,标志着基因芯片技术步入了广泛研究和应用的时代。

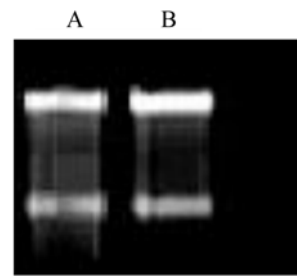


图 1 变性胶电泳质检图 A:形觉剥夺组 004 号猴;B:对照组 026 号猴。

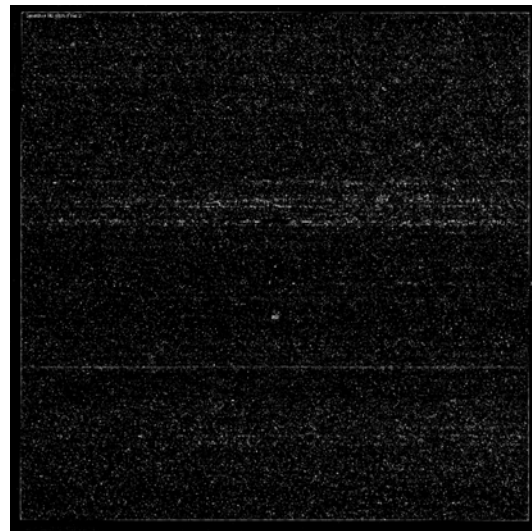


图 2 对照组幼恒河猴 026 视皮质 GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays 基因表达谱芯片结果实时扫描图。

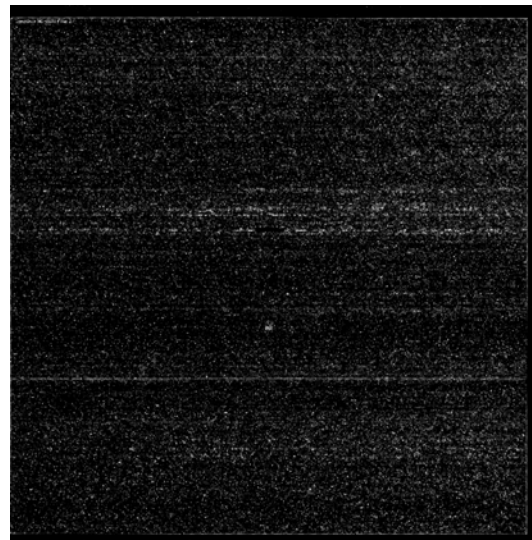


图 3 形觉剥夺组幼恒河猴 004 视皮质 GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays 基因表达谱芯片结果实时扫描图。

基因表达谱芯片是将几千个基因特异的探针或其 cDNA 片段固定在一块基因芯片上,对来源于不同个体、不同组织、不同细胞周期、不同发育阶段、不同病变、不同刺激(包括不同诱导方法、不同治疗手段)下的 mRNA 或逆转录产物 cDNA 进行检测,从而大规模对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育特异性、分化阶段特异性、病变特异性、刺激特异性进行综合的分析和判断。基因表达谱芯片研究基因在不同组织或细胞、不同发育阶段中基因表达的改变,通过基因表达的改变进而阐明基因的功能,是一种快速研究基因表达差异的高通量工具。基因

表1 形觉剥夺组样本基因表达谱中上调和下调的基因及其功能

功能	探针组数目		总数
	上调两倍	下调两倍	
细胞通讯	8	141	149
细胞生长和/或维持	27	212	239
细胞死亡	1	7	8
发育	12	74	86
病毒生活周期	1	8	9
细胞凋亡的调节活动	1	7	8
结合	19	237	256
代谢活力	18	130	148
细胞黏附分子活性	0	17	17
伴侣活性	0	7	7
伴侣调节活性	0	1	1
免疫防御蛋白活性	3	16	19
酶调节活性	1	0	1
运动活性	2	9	11
蛋白稳定活性	0	1	1
信号转导活性	11	118	129
结构分子活性	3	23	26
转录调控活动	3	31	34
翻译调控	0	4	4
转运活性	5	98	103
未分类	19	78	97

表达谱芯片的检测原理实质上是碱基互补配对。用不同的荧光染料通过逆转录反应将不同组织和细胞的 mRNA 分别标记成不同的探针,将探针混合后与芯片上的基因进行杂交、洗涤,用特有的荧光波长扫描芯片,得到这些基因在不同组织或细胞中的表达谱图片,再通过计算机分析出这些基因在不同组织中表达差异的重要信息。

目前还未研发出恒河猴的基因表达谱芯片,由于恒河猴与人类的基因同源性达 98% 以上,因此现在一般都用人的基因表达谱芯片来检测猴组织的基因表达情况^[5-7]。我们用基因表达谱芯片高通量筛选形觉剥夺性近视可能相关的基因。结果表明,形觉剥夺组幼猴视皮质与对照组相比表达下调的基因明显多于表达上调的基因,说明形觉剥夺性近视组动物视皮质中存在基因表达被抑制的趋势。

从芯片结果中,我们还发现 Egr 基因家族中的 Egr-1 和 Egr-3 的表达在形觉剥夺猴的视皮质中明显较对照猴下调;PKC 家族某些相关基因的表达在形觉剥夺猴视皮质中出现明显下调;GAD₆₅ 催化生成的 GABA 相关受体如 GABA A 受体 β_1 、GABA A 受体 α_4 、GABA A 受体 β_3 等在形觉剥夺组也下调了 2 倍或以上,这个结果是最值得关注的,因为这些基因已经被证明与近视的发生发展有着重要的联系^[8-10]。当然,在基因芯片的结果中,我们观察到大量的基因表达发生了变化,但其中必然有一些基因的表达变化与近视的发病过程无关,包括实验中样品的选用、实验本身的误差及个体差异等都会影响其代表性。因此,如何缩小近视相关候选基因的范围,以及如何作更加精确的定位,还有待在今后的实验中得到进一步分析和验证。

参考文献

- 1 吴君舒,钟兴武,葛坚,等. 光学离焦和形觉剥夺对幼恒河猴正视化过程的影响. 眼科学报 2004; 20(2):118-122
- 2 Summers Rada JA, Hollaway LR. Regulation of the biphasic decline in scleral proteoglycan synthesis during the recovery from induced myopia. *Exp Eye Res* 2011;92(5):394-400
- 3 王悦,李俊. 视黄酸与实验性近视关系的研究进展. 国际眼科杂志 2008;8(8):1654-1656
- 4 Ramsay G. DNA chips: state-of-the art. *Nat Biotechnol* 1998;16(1):40-44
- 5 George MD, Sankaran S, Reay E, et al. High-throughput gene expression profiling indicates dysregulation of intestinal cell cycle mediators and growth factors during primary simian immunodeficiency virus infection. *Virology* 2003;312(1):84-94
- 6 Frazer KA, Chen X, Hinds DA, et al. Genomic DNA insertion and deletions occur frequently between humans and nonhuman primates. *Genome Res* 2003;13(3):341-346
- 7 Kayo T, Allison DB, Weindruch R, et al. Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(9):5093-5098
- 8 Fischer AJ, Seltner RL, Stell WK. Opiate and N-methyl-D-aspartate receptors in form-deprivation myopia. *Vis Neurosci* 1998;15(6):1089-1096
- 9 Stone RA, Liu J, Sugimoto R, et al. GABA, experimental myopia, and ocular growth in chick. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(9):3933-3946
- 10 Zhong X, Ge J, Smith EL III, et al. Image defocus modulates activity of bipolar and amacrine cells in macaque retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(7):2065-2074