

脾肾两虚型脑瘫差异表达基因筛选与初步验证^{*}

杨红亚¹, 张天娥^{1△}, 鲁法庭¹, 刘伟伟¹, 陈晓玲¹, 董小丽², 王米渠¹

(1. 成都中医药大学, 四川成都 610075; 2. 成都市第一人民医院, 四川成都 610016)

摘要: **目的** 筛选并验证与脾肾两虚型脑瘫相关的差异表达基因。**方法** 从前期正常-脾肾两虚型脑瘫双生子基因芯片中获得的差异表达基因中筛选 15 个病证相关特征基因, 选取 11 例脾肾两虚型脑瘫患儿与 10 例健康者分别为实验组和对照组, 采用 RT-PCR 对筛选到的特征基因的表达情况进行研究。**结果** FIGN 和 PTGER2 在实验组和对照组的表达水平存在明显差异。其中, FIGN 在脾肾两虚型脑瘫患儿中的表达低于对照组 ($P<0.01$), PTGER2 的表达高于对照组 ($P<0.01$)。**结论** FIGN 和 PTGER2 的异常表达与脾肾两虚型脑瘫的发生有相关性, 提示其可能为该病证的候选标志分子。

关键词: 脾肾两虚; 脑瘫; 差异表达基因; RT-PCR

中图分类号: R272 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)01-0008-04

脑性瘫痪(Cerebral Palsy, CP)是指出生前到生后 1 个月内各种原因所引起的脑损伤或发育缺陷所致的运动障碍及姿势异常^[1], 为小儿常见致残性疾病。本病临床上以四肢肌肉僵硬、屈伸不利或肌肉痿软不用、发育迟缓、行动困难为主要表现, 可伴有智力低下、反应迟钝、视力障碍、癫痫等^[2]。脑瘫属中医“胎怯”“胎弱”“五迟”“五软”“痴呆”“瘫痪”等病证范畴, 发病涉及复杂的先天与后天因素, 其病位在脑、肾、脾、肝, 尤与先天之本肾和后天之本脾关系密切^[3]。

该病证目前在国内主要侧重于临床功能康复治疗, 基础研究尤其是基于生物学层面的基础研究相对较少。课题组前期以典型的“正常-脑瘫”脾肾两虚型双生子为对象, 利用基因芯片技术在分子水平对其基因表达情况进行研究, 以期在整体上把握脾肾两虚型脑瘫患儿与正常对照之间存在的微观差异^[4]。通过对内双生子比较, 课题组筛选出与脾肾两虚型脑瘫相关差异表达基因 2000 多条, 利用 GO、KEGG 等数据库分析发现这些差异基因多参与神经-内分泌-免疫系统调节, 且大部分下调表达^[4]。按照从特殊到普遍的研究思路, 进一步验证脾肾两

虚型脑瘫的发生与这些基因之间普遍的联系, 课题组纳入了新的随机脾肾两虚型脑瘫患儿, 采用 RT-PCR 对筛选的反映该病证特征的 15 条基因进行验证研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

根据脑瘫及脾肾两虚证的诊断标准^[5], 课题组在成都市第一人民医院脑瘫儿童康复中心, 筛选到同时满足脑瘫及脾肾两虚证诊断标准的患儿 11 例作为实验组, 其中男性 6 例, 女性 5 例, 患者年龄在 1 岁至 12 岁之间 (5.91 ± 3.10 岁)。同期在成都市选取 10 名年龄 (5.36 ± 3.38 岁) 性别与脑瘫组差异无统计学意义的健康儿童作为正常对照组。

1.2 仪器与设备

常温和低温离心机、微量移液器为德国 Eppendorf 公司产品; 紫外分光光度计为日本岛津公司产品; 电泳仪、凝胶成像系统为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.3 外周血总 RNA 的提取

分别采集实验组和正常组空腹静脉血 3mL, 加入 10mL 红细胞裂解液, 收集白细胞, 应用 TRIzol

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金(NO:30672579; NO:81072727); 四川省教育厅项目(NO:09ZA031; NO:08ZA120)

收稿日期: 2012-12-19 修回日期: 2013-01-17

作者简介: 杨红亚(1982~), 女, 河南邓州人, 讲师, 主要从事证候的分子生物学基础研究工作。

△通信作者: 张天娥, E-mail: zhte2003@yahoo.com.cn

抽提试剂盒提取总 RNA,置于 -80°C 储存。

1.4 RT-PCR 反应

提取的总 RNA 利用反转录试剂盒(Ferment 产品)进行 cDNA 合成,进一步进行 PCR 扩增。反转录合成 cDNA 后,将对照组 10 个 cDNA 样品每个取 $5\mu\text{L}$ 混合,作为对照组;患者的 cDNA 样品每个人单独一份,均为实验组。先用 cDNA 扩增内参基因 β -actin,根据其电泳条带的亮度将各组 cDNA 的浓度调整到一致,再用来扩增待检测的基因。

PTGER2 上游引物:5' -GGCCGGGGT-GCTGGGGAACCTCATA -3', 下游引物:5' -CTCTCGGGCGCCAGTGCCACCAG -3';FIGN 上游引物:5' - TCGGGGGAATGGCTTTGACAGAAAGT -3',下游引物:5' - GTCCAGGGCCTTGCAATTGGGT-GAGA -3'; β -actin 上游引物:5' - CTCACC-GAGCGCGGCTACA -3', 下游引物:5' - CTCCT-GCTTGCTGATCCACAT -3'。PCR 反应均采用 $25\mu\text{L}$ 体系,体系组成为:PCR buffer ($10\times$) $2.5\mu\text{L}$;MgCl₂ (25 m mol/L) $1.5\mu\text{L}$;dNTP (2.5 m mol/L) $2.0\mu\text{L}$;Primer F&R ($10\mu\text{ mol/L}$) $0.3\mu\text{L}$;cDNA $1.0\mu\text{L}$;Taq DNA Pol. ($2.5\text{U}/\mu\text{L}$) $0.2\mu\text{L}$;ddH₂O $17.5\mu\text{L}$ 。反应参数为:预变性 95°C 1min;变性 94°C 30sec;退火 $X^{\circ}\text{C}$ 30sec;延伸 72°C 30sec,共 30 个循环;终末延伸 72°C 2min。其中 PTGER2 和 FIGN 的退火温度分别为 66°C 和 60°C 。

1.5 电泳与半定量分析

琼脂糖凝胶电泳检测各基因 PCR 产物并观察结果。用软件 Image J1.37v 检测各基因 PCR 扩增产物的电泳条带的灰度值。

1.6 统计学分析

所有数据采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,结果以均数和标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用 t 检验。

2 结果

2.1 各样本 RNA 质控图

提取的总 RNA 如图 1 所示。电泳显示 3 条特征带明显,28S 和 18S 条带的亮度比例正常,紫外分光光度计测定的 A260 和 A280 的比值在 1.9~2.1 之间,表明 RNA 质量合格。

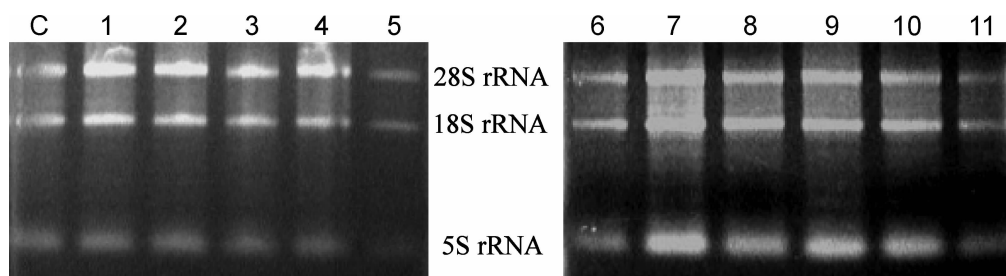
2.2 各样本中验证基因 PCR 结果

各基因 PCR 扩增产物电泳条带的灰度值对比结果表明 PTGER2 在实验组所有样本的表达均高于健康对照组,FIGN 在实验组所有样本的表达均低于对照组,且差异均有统计学意义($P<0.01$)。其他 13 条基因的表达差异不显著($P>0.05$),结果见表 1。

表 1 各基因 RT-PCR 扩增产物电泳条带的灰度值

编号	基因名称	实验组灰度值($\bar{x} \pm s$)	对照组灰度值
1	HOXD1	79.65 $\pm$ 19.36	87.10
2	GHRH	61.15 $\pm$ 13.99	63.20
3	FGF22	71.26 $\pm$ 15.79	64.08
4	FIGN	62.06 $\pm$ 13.06*	98.51
5	LAMC3	91.53 $\pm$ 21.43	88.55
6	GDF10	69.58 $\pm$ 12.63	60.78
7	DBN1	98.73 $\pm$ 23.11	91.47
8	FGF14	58.69 $\pm$ 11.42	50.83
9	ZIC1	76.36 $\pm$ 16.65	91.85
10	NTRK3	93.59 $\pm$ 22.19	85.53
11	MYOG	66.31 $\pm$ 13.89	55.76
12	CLDN3	64.18 $\pm$ 13.10	51.12
13	ADCY8	66.12 $\pm$ 11.58	75.97
14	PTGER2	67.11 $\pm$ 11.40*	39.43
15	HOXD13	49.09 $\pm$ 10.08	41.83

注:与对照组比较,* $P<0.01$



注:C: 对照组 RNA 样品;1-11: 实验组 RNA 样品。

图 1 RNA 电泳图

3 讨论

在筛选的 15 条基因中,FIGN 和 PTGER2 在实验组和对照组之间有明显的差异表达水平,PCR 验证结果初步论证了基因 FIGN、PTGER2 与脾肾两虚型脑瘫的关系。

3.1 FIGN 与脾肾两虚型脑瘫

FIGN(Fidgetin)属于 AAA(ATPases associated with diverse cellular activities)ATP 酶家族成员,该基因编码产物属于 AAA 家族蛋白质,参与膜融合、蛋白质水解、囊泡介导的运输、蛋白酶体功能、过氧化物酶生物合成、微管调节、减数分裂纺锤体形成等多种细胞生理活动^[6-7]。FIGN 是第一个被发现的其突变导致哺乳动物发育异常的 AAA 家族成员^[8]。Cox 等^[9]研究发现 FIGN 基因突变小鼠出现边侧摇头和转圈等异常行为;与正常小鼠相比,突变鼠易感染且有骨盆发育不全、颅骨融合及多趾现象等骨骼畸形症状。Yang^[6]等研究发现 FIGN 编码的蛋白利用 ATP 水解释放的能量通过参与种系和胚胎发育早期的有丝分裂而控制机体的发育。Park 等^[9]研究结果表明 Fidgetin 具有一定的成骨细胞增殖和分化调节作用。因此 FIGN 基因参与机体的胚胎发育调控、成骨细胞增殖和分化等多种重要的生理过程。

肾藏精,肾精,尤其是先天之精为个体之初,是生长发育的决定因素。FIGN 基因异常引起的骨盆发育不全、颅骨融合及多趾等异常发育症状与中医肾功能异常导致的临床表现一致(肾主生长发育),提示 FIGN 基因与肾虚证有一定的内在联系。

3.2 PTGER2 与脾肾两虚型脑瘫

PTGER2(prostaglandin E receptor 2,EP2)即前列腺素 E 受体 2,其编码产物属于 G 蛋白偶联受体家族。研究发现不少癌组织前列腺素 E 受体表达上调。Rasmuson 等^[10]检测发现神经母细胞瘤组织前列腺素 E2(PGE2)受体 EP1,EP2,EP3 和 EP4 呈高表达,PGE2 通过其受体的高表达以自分泌或旁分泌的方式促进肿瘤的生长和扩散。此外,PGE2 在骨的发育与代谢中发挥重要作用,Brochhausen 等^[11]检测发现在体内软骨组织中 EP2 呈阳性表达,当细胞处于分裂状态,其表达最强,提示 EP2 受体所介导的信号途径参与了细胞的生长过程。研究还显示 EP2 介导的信号通路能通过增强炎症反应参与神经系

统疾病的发展,如 Liang 等^[12]发现在肌萎缩侧索硬化症(ALS)患者的腹侧脊髓星形胶质细胞内 EP2 介导的炎症反应强烈,若敲除 G93A SOD 鼠的 EP2 基因,则动物运动能力增强且生存时间延长,这种基因敲除能显著减少炎症效应分子水平,包括 COX-1 和 COX-2 等引起炎症反应的关键酶。

可见 PTGER2 参与肿瘤生长、骨发育与代谢、神经系统炎性损伤等生理病理反应。本研究发现脾肾两虚型脑瘫组 PTGER2 表达均显著高于正常对照组,其高表达与脑瘫的脑损伤有何关系,是否通过这种脑损伤机制参与脑瘫的发生及发展过程,这需要进行深入研究。

综上,本次 RT-PCR 实验结果显示 FIGN 和 PTGER2 与脾肾两虚型脑瘫关系最密切,其表达方向与芯片结果一致,一个呈下调表达,一个呈上调表达。本次研究的候选基因直接筛选于课题组前期对一对脑瘫同卵双生子所做的表达谱基因芯片,该对双生子中的脑瘫患者经辨证为脾肾两虚证^[5],另一位为健康儿。这些差异表达基因体现的是双生子间患儿与正常儿的差异,它们的差异表达具体是脑瘫所致还是脾肾两虚证所致,还是跟脑瘫及脾肾两虚证都有关系?这需要课题组在进一步研究中加入非脾肾两虚证脑瘫患者组及脾肾两虚证非脑瘫疾病组,通过比较则可明确 FIGN 和 PTGER2 异常表达的原因。本研究结果提示 FIGN 和 PTGER2 是脾肾两虚型脑瘫的特征性分子之一,若能扩大样本继续深入研究,并与其它证型脑瘫对比,以及对这些基因通过何种确切机制参与脾肾两虚型脑瘫的发生与发展进行深层次的探索,如表观遗传变异的影响等,将有助于阐释该病证的发生机制,为临床的早期诊断和治疗提供实验依据。

参考文献

- [1]《中华儿科杂志》编辑委员会,中华医学会儿科学分会神经学组.小儿脑性瘫痪的定义、诊断条件及分型[J].中华儿科杂志,2005,43(4):262.
- [2]董小丽,张天娥,王米渠,等.11 对脑性瘫痪双生子病证结合观察[J].现代临床医学,2007,33(4):285-286.
- [3]杨红亚,张天娥,鲁法庭,等.“正常-脑瘫”脾肾两虚型双生子的基因表达谱研究[J].时珍国医国药,2012,23(7):1793-1795.
- [4]张天娥,董小丽,王米渠.正常-脑瘫双生子基因表达谱差

- 异研究[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(11):1836-1838.
- [5] 王米渠, 张天娥, 董小丽, 等. 脑瘫-正常双生子卵型鉴定与病证调查分析 [J]. 辽宁中医杂志,2006, 33(6): 657-659.
- [6] Yang Y, Mahaffey CL, Bérubé N, et al. Functional characterization of fidgetin, an AAA-family protein mutated in fidget mice[J]. *Exp Cell Res*,2005,304(1):50-58.
- [7] David J. Sharp, Jennifer L. Ross. Microtubule-severing enzymes at the cutting edge[J]. *J Cell Sci*,2012, 125(Pt 11): 2561-2569.
- [8] Cox GA, Mahaffey CL, Nystuen A, et al. The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development[J]. *Nat Genet*,2000,26(2):198-202.
- [9] Park SJ, Kim SJ, Rhee Y, et al. Fidgetin-like 1 gene inhibited by basic fibroblast growth factor regulates the proliferation and differentiation of osteoblasts [J]. *J Bone Miner Res*,2007,22(6):889-896.
- [10] Rasmuson A, Kock A, Fuskevåg OM, et al. Autocrine Prostaglandin E2 Signaling Promotes Tumor Cell Survival and Proliferation in Childhood Neuroblastoma [J]. *PLoS One*,2012, 7(1): e29331.
- [11] Brochhausen C, Neuland P, Kirkpatrick CJ, et al. Cyclooxygenases and prostaglandin E2 receptors in growth plate chondrocytes in vitro and in situ-prostaglandin E2 dependent proliferation of growth plate chondrocytes [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(3):R78.
- [12] Liang X, Wang Q, Shi J, et al. The prostaglandin E2 EP2 receptor accelerates disease progression and inflammation in a model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Ann Neurol*, 2008, 64(3):304-314.

(编辑:迟 越)

Screening and Preliminary Verification to Differentially Expressed Genes from Cerebral Palsy with Spleen and Kidney Deficiency Syndrome

YANG Hong-ya¹, ZHANG Tian-e¹, LU Fa-ting¹, LIU Wei-wei¹, CHEN Xiao-ling¹,
DONG Xiao-li², WANG Mi-qu¹

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan 610075;
2. Chengdu First People's Hospital, Chengdu Sichuan 610016)

ABSTRACT: **Objective** To screen and verify differentially expressed genes from Cerebral Palsy with spleen and kidney deficiency syndrome. **Methods** 15 characteristic genes related with the disease and syndrome were chosen to be verified from the differentially expressed genes screened from earlier cDNA microarray of "normal-CP" twin with spleen and kidney deficiency syndrome. 11 Cerebral Palsy with spleen and kidney deficiency syndrome children were selected as experimental group, and 10 healthy children were selected as control group. The expression of screened differential genes was compared between two groups through RT-PCR test. **Results** The expressed level of FIGN and PTGER2 had the significant differences between experimental group and control group. FIGN was significantly low expressed, and PTGER2 was significantly high expressed in experimental group compared to that of the control group ($P<0.01$). **Conclusion** There is correlation between the abnormal expression of FIGN and PTGER2 and Cerebral Palsy with spleen and kidney deficiency syndrome. It can be inferred that the two genes may be the candidate marker-gene of Cerebral Palsy with spleen and kidney deficiency syndrome.

KEY WORDS: spleen and kidney deficiency; cerebral Palsy; differentially expressed genes; RT-PCR

欢迎订阅, 欢迎投稿!