

# 栀子苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织 基因表达谱的影响

张小燕<sup>1</sup> 张占军<sup>2</sup> 王 忠<sup>3</sup> 应 康<sup>4</sup> 左明雪<sup>1</sup>

**摘要 目的** 研究栀子苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织基因表达谱的影响,探索栀子苷治疗脑缺血的药理学作用机制。**方法** 分别从局灶性脑缺血组、栀子苷治疗组 SD 大鼠的脑组织中抽提总 RNA, Cy3、Cy5 荧光标记,反转录分别合成 cDNA 探针后,与含有 4 096 条大鼠基因的 BioStar 基因表达谱芯片杂交, Axon Genepix 4000B 扫描仪扫描, GenePixPro 3.0 软件分析表达信号。**结果** 栀子苷治疗后差异表达的基因有 70 条,其中有 68 条基因上调, 2 条基因下调。**结论** 栀子苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织基因表达具有调控作用,从分子水平阐释了中药清开灵注射液成分栀子苷的药理作用机制。

**关键词** 栀子苷;清开灵注射液;局灶性脑缺血;基因表达谱

Effect of Gardenin on Gene Expression Profile in Brain of Rats with Focal Cerebral Ischemia ZHANG Xiao-yan, ZHANG Zhan-jun, WANG Zhong, et al *Institute of Life Science, Beijing Normal University, Beijing (100875)*

**Objective** To explore the pharmacologic mechanism of gardenin in treating cerebral ischemia, by studying its effect on gene expression profile in brain of rats with focal cerebral ischemia (FCI). **Methods** Total RNAs were isolated from rats with FCI and those treated with gardenin. The mRNAs were reversely transcribed to cDNA with incorporation of fluorescent Cy5- or Cy3-dUTP to prepare hybridization probes. The PCR products of 4096 genes were spotted on the chip after a serial treatment. The mixed probes were hybridized to the cDNA microarray. Axon Genepix 4000B and GenePixPro 3.0 software were used to scan and analyze the fluorescent signals. **Results** In the group treated with gardenin, there were 70 genes had expression profiles different to that in the model group in the focal cerebral ischemic brain tissue, in which 68 were up-regulated and 2 down-regulated. **Conclusion** Gardenin has regulatory effect on the gene expression in rats with focal cerebral ischemia, which elucidates part of the pharmacologic mechanism of Qingkailing in molecular level.

**Key words** gardenin; Qingkailing; focal cerebral ischemia; gene expression profile

局灶性脑缺血病严重危害人类健康,中药清开灵注射液对脑血管病具有较好的临床疗效,因此对其作用机制的研究具有重要意义。但由于清开灵注射液成分复杂,所以对其单一组分及配伍的研究是阐释其作用机制的重要环节。本实验从清开灵注射液重要组分栀子苷入手,应用基因表达谱芯片,从分子机制对局灶性脑缺血大鼠脑组织基因表达进行研究,从而为阐明中药作用机制提供新思路。

## 材料与方法

### 1 动物分组及给药 SD 雄性大鼠 10 只(北京维

基金项目:国家 973 重点基础研究发展规划项目——方剂关键科学问题的基础研究(No. G19990554)

作者单位:1. 北京师范大学生命科学院(北京 100875);2. 北京中医药大学临床医学院;3. 中国中医研究院西苑医院;4. 上海联合基因集团

通讯作者:张小燕, Tel: 010 - 62875599 转 6114, E-mail: xiaoy-anzhang@hotmail.com

通利华实验动物中心提供),体重( $240 \pm 20$ )g,随机分为两组,局灶性脑缺血模型组与栀子苷治疗组。造模前动物禁食 12 h。栀子苷(中国药品生物制品鉴定所提供)用 1%羧甲基纤维素钠配制(100 mg/kg),造模后 1.5 h 给药(40 mg/kg)。模型组给予同体积的 1%羧甲基纤维素钠。

2 局灶性脑缺血模型的建立 按 Longa 等法<sup>[1]</sup>,建立局灶性脑缺血动物模型。SD 大鼠 3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉后,经颞下入颅,打开颅窗,剥开软脑膜,暴露右侧大脑中动脉,电凝嗅束与大脑下静脉之间的一段大脑中动脉,伤口缝合后回笼饲养,24 h 后断头取脑。

3 总 RNA 抽提和测定 按一步法<sup>[2]</sup>抽提大鼠右侧脑组织总 RNA,紫外分析及电泳检测总 RNA 的纯度、浓度及完整性。

4 芯片制备 芯片包含 4 096 个 cDNA 克隆(上海联合基因博星公司提供),包括癌基因及抑癌基因、

细胞因子及受体编码基因、细胞凋亡相关蛋白编码基因、看家基因、阴性对照、空白对照等。用通用测序引物进行 PCR 扩增制备靶基因,PCR 反应及产物纯化用标准方法<sup>[3]</sup>进行。将制备的靶基因溶解于 3×SSC 溶液中,用 Cartesian Pixsys 7 500 点样仪点样于硅烷化玻片。玻片经水合、交连后,再分别用 0.2% 十二烷基磺酸钠(SDS)、水及 0.2% 硼氢化钠溶液处理、晾干备用。

5 探针制备 参照 Schena 的方法逆转录标记 RNA<sup>[4]</sup>,用 Cy3-dUTP 标记模型组脑组织 RNA, Cy5-dUTP 标记栀子苷治疗组脑组织 RNA,利用逆转录酶合成探针,乙醇沉淀后将 Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 标记的探针混合溶解在 20 μl 5×SSC + 0.2% SDS 杂交液中。

6 杂交及洗涤 将芯片和杂交探针分别于 95℃ 变性后置于杂交舱内,加入混合探针,用杂交密封舱加以密闭。恒温杂交箱内 42℃ 杂交 18h。按顺序用洗涤液 2×SSC + 0.2%、0.1%×SSC + 0.2%、0.1%×SSC 分别洗涤 10min,室温晾干备扫描。

7 荧光扫描和结果分析 用 Axon Genepix 4000B 基因芯片扫描仪扫描芯片,观察杂交结果。扫描后所得所有芯片数据均进行整体校正,数据校正方法参考 Yang 等<sup>[5]</sup>提出的整体校正法。整体校正后的数据采用容许区间法计算各信号 Ratio 值,确定差异表达阈值;计算各信号 Ratio 值的 CV 值,对芯片的准确性和重复性进行评价。根据差异表达阈值,观察差异基因的 Ratio 值分析,分析实验差异的可能因素。所有数据经过筛选,筛选由图像分析软件自动完成。相关系数 *r* 的计算采用 pearson 相关系数<sup>[6]</sup>。GenePixPro 3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度,计算 Cy5/Cy3 值。基因差异表达的标准是: Cy3/Cy5 信号比值(以 R 值表示)的自然对数的绝对值应>0.69(即基因的差异表达变化在 2 倍以上); Cy3 或 Cy5 的荧光信号值均应>600。本研究中,若 R<sub>1</sub> 或 R<sub>2</sub> 值>2,表示该基因在模型组和用药组的表达量明显上调;若 R<sub>1</sub> 或 R<sub>2</sub> 值<0.5,说明该基因在模型组和用药组中的表达水平显著下调。

结 果

1 总 RNA 提取结果 分别抽提模型组和栀子苷治疗组大鼠脑组织的总 RNA,电泳结果显示,不管在 20℃ 状态还是在 70℃ 水浴 1h 后,其 18S 和 28S 条带都很清晰,28S 条带的亮度大约是 18S 条带亮度的 2 倍,总 RNA 吸光值 A260/A280>1.9,证实得到高纯

度的总 RNA。

2 芯片质量标准控制 基因表达谱芯片的质量标准:其中包含植物基因作为阴性对照,未加 DNA 的点样液作为空白对照。20 个看家基因必须阳性,18 个植物基因必须阴性,20 个空白对照也必须阴性。本实验结果完全符合上述条件。说明实验无污染,且检测体系正常。

3 差异表达基因 差异表达基因有 70 条,其中 68 个基因表达上调,2 个基因下调(见表 1)。

表 1 栀子苷治疗组部分差异表达基因

| 基因号       | 平均值   | 定义                                                   |
|-----------|-------|------------------------------------------------------|
| NM_024151 | 2.369 | ADP-ribosylation factor 4                            |
| NM_012898 | 2.293 | alpha-2-HS-glycoprotein                              |
| NM_012576 | 2.313 | nuclear receptor subfamily 3                         |
| AF335277  | 2.371 | centrosomal protein centrin 3 mRNA                   |
| NM_053440 | 2.908 | superiorcervical ganglia, neural specific 10         |
| BE113312  | 2.127 | adapter-related protein complex 3 beta 1 subunit     |
| AW918082  | 3.201 | deoxyribose-phosphate aldolase                       |
| AW915152  | 4.633 | hypothetical protein C32E8.9                         |
| X79328    | 2.153 | caBP1 mRNA                                           |
| NM_031797 | 2.591 | suppression of tumorigenicity                        |
| NM_017082 | 2.327 | urmodulin (Tamm-Horsfall protein)                    |
| AW918198  | 2.295 | myosin heavy chain mRNA                              |
| A1407932  | 3.301 | retinoid-inducible serine carboxypeptidase precursor |
| AW918368  | 3.391 | hypothetical protein Y                               |
| L24897    | 3.528 | tropomyosin beta chain                               |
| NM_030826 | 3.157 | glutathione peroxidase 1                             |
| AA892234  | 0.364 | microsomal glutathione S-transferase 2               |

讨 论

栀子苷治疗后差异表达基因有 70 个,其中有 68 个基因上调,2 个基因下调。这些基因可能是药物作用的靶点或者是药物信号传导通路上的重要环节。这些基因涉及神经细胞结构、信息传导、能量代谢、氧化应激、细胞凋亡等,以其中的谷胱甘肽过氧化物酶和钙结合蛋白这两个基因为例予以讨论。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase-1, GSH-Px)是脑组织自由基反应的重要生化指标,据有关文献报道<sup>[7-9]</sup>,脑组织缺血后使得抗氧化酶,如 GSH-Px 等的活性降低,破坏组织结构,加重组织损伤。在脑缺血后栀子苷进一步上调 GSH-Px 的表达,说明栀子苷对缺血性脑神经损伤中的自由基损伤具有很好的拮抗作用。

钙结合蛋白以多拷贝形式存在并选择性地与钙离子高亲合性结合。局灶性脑缺血导致能量代谢障碍,ATP 合成减少,大量钙离子通过电压依赖性钙通道涌入胞内。本实验研究结果和文献所报道一致<sup>[10,11]</sup>。局灶性脑缺血模型组钙结合蛋白在半影区表达上调,可

能是神经元自我保护机制之一。栀子苷上调钙结合蛋白表达,说明栀子苷对缺血性脑神经损伤具有一定的保护作用。

栀子苷对局灶性脑缺血的调控可能是多方面的,尽管目前我们尚不能完全解释这些基因群的生物学功能与生理病理机制及基因群之间的相互作用,但是本研究表明,栀子苷可影响模型组大鼠基因表达,从基因水平上阐释了栀子苷的药理作用,同时为基因芯片技术高通量、并行性研究疾病相关基因,探索药物作用的机制和作用靶点提供了思路与借鉴。

### 参 考 文 献

- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20(1):84—91.
- Quesnoy RJ. Clinical significance of humoral allo-sensitization on of HLA antigens. New York: Springer Verlag, 1990;27:57.
- Kemoto SK. HLA amino acid residue matching. In: Cecka JM, Terasa KiPI eds. Clinical transplants 1996. Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratory, 1997:397.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(25):14863—14868.
- Yang P, Otto CM, Sheehan FH. The effect of normalization in reducing variability in regional wall thickening. *J Am Soc Echocardiogr* 1997;10(3):197—204.
- Martin delaVega C, Burda J, Nemethova M, et al. Possible mechanisms involved in the down-regulation of translation during transient global ischaemia in the rat brain. *Biochem J* 2001;357(Pt 3):819—826.
- Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Perry B, et al. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;53(1—2):333—338.
- Crack PJ, Taylor JM, de Haan JB, et al. Glutathione peroxidase-1 contributes to the neuroprotection seen in the superoxide dismutase-1 transgenic mouse in response to ischemia/reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(1):19—22.
- Keller JN, Huang FF, Zhu H, et al. Oxidative stress-associated impairment of proteasome activity during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20(10):1467—1473.
- Freund TF, Buzsaki G, Leon A, et al. Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Exp Brain Res* 1990;83(1):55—66.
- Yenari MA, Minami M, Sun GH, et al. Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 2001;32(4):1028—1035.

(收稿:2004-07-02 修回:2004-10-08)

### 第四届国际传统医学美容学术大会征文通知

经国家中医药管理局批准,由中华中医药学会主办的“第四届国际传统医学美容学术大会”将于 2005 年 6 月在中国召开。

承办单位:中国·中华中医药学会中医美容分会;《中国医药学报》杂志社。大会主题:天·地·人·美。

大会除专题报告与论文交流外,还有特色美容新技术现场展示、天然美容养颜产品研发技术研究进展交流(企业专场学术研讨会)及展览(天然化妆品、美容药物、美容保健食品、美容保健用品、美容器械、美容材料、美容图书音像制品展示)。

征文内容:(1)传统医学美容的研究现状及发展前景。(2)各个历史时期的医学美学美容研究、文献研究。(3)不同民族、地域间传统美学的诊疗技术、操作方法比较研究。(4)藏医、维医、蒙医、壮医等各民族传统美容医学的整理研究。(5)时间美容医学。(6)中西医结合美容学的理论与临床研究。(7)各种损美性疾病(黄褐斑、雀斑、黑痣、痤疮、酒渣鼻、扁平疣、化妆品皮炎、斑秃、枯发、肥胖症等)的基础和临床研究。(8)驻颜、增白、润肤、乌发、生发、固齿、隆胸、香身、减肥的基础和临床研究。(9)针灸(手针、头针、耳针、梅花针等)、按摩(面部、头部、整脊、足底)、药膳、香熏、面膜、药浴、药物外敷、穴位埋线、穴位放血、刮痧、情志疗法、音乐疗法等中医方法在美容上的应用。(10)中医与现代美容手段相结合的探讨和经验。(11)具有传统医学特色的美容仪器的开发与应用。(12)天然动植物化妆品的研制、开发与应用。(13)中医美容保健食品、药品、仪器及用品的研制、开发与应用。(14)美容气功、瑜伽、太极拳等健身功法的研究与实践。(15)中医美容教育与学科建设的探讨。(16)中医美容院的管理。(17)其他与中医美容有关的研究。

论文限 3 000 字以内,并附 200 字中、日、英文摘要。论文打印或用 400 字稿纸书写,加盖公章,文末请注明作者姓名、单位全称、详细通讯地址、邮编、电话、传真或 E-mail。稿件一律不退稿。国内论文收审稿费、版面费、外文(英日双语)摘要翻译费 330 元人民币。国际及台港澳论文收审稿费、版面费 50 美元。截稿日期:2005 年 4 月 8 日。

来稿地址:北京市和平街北口樱花路甲 4 号 100029,中华中医药学会《中国医药学报》杂志社,邮编 100029。

电话:010-64216650,传真:010-64216650, E-mail: chinatmc@163.com,联系人:闫志安(资料备案,来电来函即寄)。