

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00280

胚胎神经管缺陷大鼠模型差异基因的表达

马向东¹, 马兴², 吴小明³, 陈必良¹, 王德堂¹

1. 第四军医大学西京医院妇产科, 西安 710032;

2. 第四军医大学西京医院骨科, 西安 710032;

3. 第四军医大学生物医学工程系, 西安 710032

摘要: 通过构建妊娠合并糖尿病诱发先天性神经管缺陷的 SD 大鼠模型, 与胚胎不伴有先天性神经管缺陷组大鼠和正常对照组大鼠胚胎进行研究, 提取卵黄囊细胞的 mRNA, cDNA 基因芯片技术对表达差异基因进行检测, 应用特异性抗磷酸化抗体进行免疫共沉淀及 Western blotting, 对卵黄囊细胞 MAP Kinase 信号途径蛋白激酶活性进行分析。在神经管缺陷大鼠胚胎卵黄囊细胞和对照组 1 200 个基因中, 共筛选出表达差异基因 79 个, 其中 42 个基因表达上调、37 个基因表达下调。同时发现神经管缺陷胚胎卵黄囊细胞出现细胞凋亡特征性的 DNA ladder(梯状电泳), 凋亡相关基因 *caspase-3*、*Bax* 高表达, 凋亡抑制基因 *AKT* 活性明显受抑; 与正常对照组相比 ERK1/2 蛋白激酶活性显著下降、JNK1/2 活性明显升高。因此, 认为妊娠合并糖尿病诱发胚胎先天性神经管缺陷的发生存在多种差异基因表达, 以及 MAP Kinase、凋亡信号传导机制的共同作用。

关键词: 神经管缺陷; 糖尿病; MAP Kinase; 细胞凋亡

Differentially expressed genes in diabetes-induced embryopathy

MA Xiang-Dong¹, MA Xing², WU Xiao-Ming³, CHEN Bi-Liang¹, WANG De-Tang¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

2. Department of Orthopaedic Surgery, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

3. Department of Biomedical Engineering, Xijing Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

Abstract: To determine molecular mechanism in hyperglycemia induced congenital neural tube defects, yolk sac cells were harvested at gestational day 12 from streptozotocin (STZ) -induced diabetic rats with congenital neural tube defects in offspring, STZ-induced diabetic rats without neural tube defects and normal control group. We analyzed gene expression profiles in yolk sac cells using a DNA microarray technique. Changes in apoptotic and MAP Kinase signaling pathways were detected by Western blotting analyses. Comparison of genes in yolk sac cells with a total of 1 200 genes in the control cells, 79 genes differently expressed between the two groups were detected. Forty-two of them were up-regulated and 37 were down-regulated. There was strong characteristic apoptotic DNA ladder in yolk sac cells in embryopathic offspring from experimentally-induced diabetic rats. The activity of ERK1/2 was dramatically decreased and the activity of JNK1/2 was significantly increased. Differentially expressed genes, MAP Kinase, and apoptotic signal pathways play very impor-

收稿日期: 2008-02-27; 修回日期: 2008-06-26

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(编号: 30200297)资助

作者简介: 马向东(1969-), 女, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 围产医学。Tel: 029-84775429; E-mail: maxiang01@fmmu.edu.cn;

马兴(1975-), 男, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 外科学。Tel: 029-84773760; E-mail: maping@fmmu.edu.cn

通讯作者: 吴小明(1968-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向: 生物医学工程学。Tel: 029-84774851; E-mail: wxming@fmmu.edu.cn

tant roles in hyperglycemia induced neural tube defects. We hope that these could provide useful hallmark to rapid identification of early diabetic embryopathy.

Keywords: neural tube defect; diabetes; MAP Kinase; apoptosis

妊娠合并糖尿病孕妇的胎儿 (Infants of diabetic mothers, IDM), 其重要器官包括神经系统、心血管系统等先天性畸形的发生率高达 6%~10%^[1], 并直接导致 50% 的围产儿死亡率。糖尿病诱发胚胎神经管缺陷的发生是多因素的共同作用的结果, 包括能量代谢紊乱、脂质和蛋白质代谢失调以及卵黄囊细胞膜损伤等^[2]。但参与卵黄囊细胞膜损伤的表达差异基因以及可能的信号传导途径尚未完全阐明。本文通过构建妊娠合并糖尿病胚胎先天性神经管缺陷的SD大鼠模型, 应用cDNA基因芯片技术, 同时对 1 200 个基因进行筛选, 对胚胎卵黄囊细胞表达差异基因进行检测, 同时对参与糖尿病胚胎神经管缺陷 MAP Kinase 和细胞凋亡信号传导机制进行研究, 为深入阐明妊娠合并糖尿病诱发胚胎先天性神经管缺陷的分子机制提供理论和实验基础。

1 材料和方法

1.1 动物模型构建

70~90 d、250~300 g SD 雌性大鼠, 与同种系的无糖尿病的雄性大鼠交配, 次日清晨阴道涂片发现精子的确定为受孕 0 d。

将雌性大鼠分为 3 组: 第 1 组为常规饲养的正常对照组大鼠 9 只; 第 2 组为 streptozotocin (STZ) (Sigma) 构建的妊娠合并糖尿病诱发先天性神经管缺陷组大鼠 11 只, 即于受孕第 6 d 每天尾静脉注射 65 mg/kg STZ; 第 3 组为 STZ 注射组大鼠 6 只, 但胚胎未发生先天性神经管缺陷。

每日采各组大鼠尾静脉血测血糖, 250 mg/dl 符合妊娠合并糖尿病标准, 否则从实验组中排除。于受孕第 12 d 取出各组胚胎储存-80 备用。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 探针标记

应用总 RNA 纯化与标记试剂盒 (Clontech, #K1038) 提取并纯化卵黄囊细胞中总 RNA。电泳检

测 RNA 产量并储存-80 备用。

以纯化的 5 μ g 总 RNA 为模板、CDS primer 混合物为引物合成 cDNA 探针 (AtlasTM cDNA Expression Arrays, Clontech, #PT3140-1), 经反转录酶和 [α -³²P] dATP 于 50 标记探针 25 min。洗脱未标记探针, 测定探针放射性同位素含量。

1.2.2 核酸杂交和 cDNA 基因芯片分析

基因芯片试剂盒 (AtlasTM Rat 1.2 Array, Clontech, #7854-1), 尼龙杂交膜包括 1 200 个基因的 cDNA 杂交点, 包括 9 个看家基因作为阳性对照。探针于 68 预杂交 30 min, ExpressHyb 和 鲑精 DNA 在尼龙膜上 68 杂交过夜, 严格洗涤, -80 Kodak X-ray 胶片压片 3~7 d, 扫描杂交信号后经专用 AtlasImage 1.01 软件 (Clontech) 分析结果。

1.2.3 Western blotting

匀浆并提取各组胚胎卵黄囊细胞蛋白质, 将 20 μ g 蛋白在 15~20 mA 条件下进行 10% SDS-PAGE 电泳 2 h, 利用蛋白转印装置, 在含 20% 甲醇的 10 mmol/L CAPS (pH 11) 中, 以 500 mA 电流作用 30 min 将蛋白转印至 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜上, 转印后蛋白用 Ponceau S 蛋白染色证实。

含 5% 干奶粉和 1% BSA 的 TBST 液室温封闭膜 1 h, 充分洗涤后分别与抗磷酸化的一抗 (phospho-p44/42 ERK、phospho-JNK/SAPK、phospho-AKT、Bax、caspase-3) 4 孵育过夜, 充分洗涤后与过氧化物酶胶联二抗室温反应 1 h, 洗涤后与化学发光剂反应, 曝光于 Kodak 胶片, 图像扫描后 NIH Image 软件处理, *t* 检验分析。

1.2.4 DNA 片段提取

匀浆各组卵黄囊细胞, 加入 10 倍体积的裂解缓冲液, 离心提取含 DNA 上清液, 酚、氯仿抽提 2 次, 100% 乙醇于 -20 沉淀过夜, 70% 乙醇洗涤 DNA 沉淀, 重悬于 TE (pH 8.0), 100 μ g/mL RNase 37 孵育

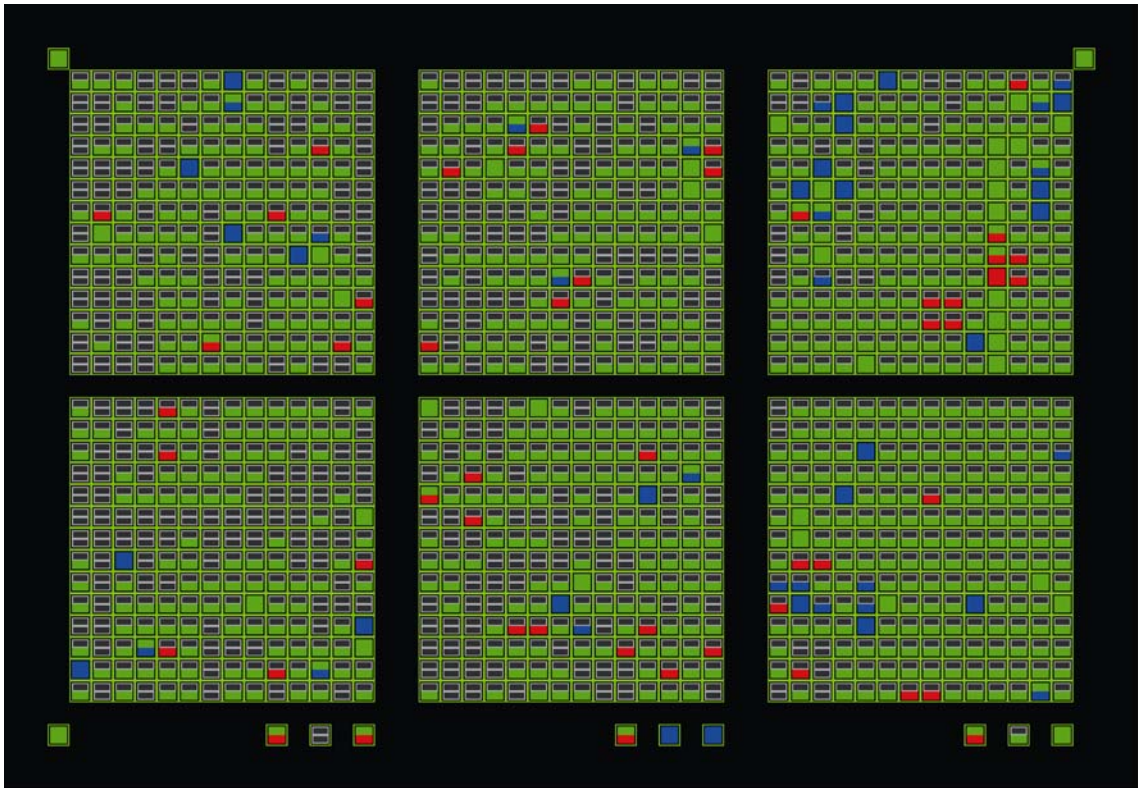


图 1 先天性神经管缺陷组胚胎卵黄囊细胞与正常胚胎表达差异基因

30 min 去除 RNA。20 μ g DNA 于 TAE 缓冲液中进行凝胶电泳, 紫外灯下观察 DNA 片段。

2 结果与分析

2.1 表达差异基因

经cDNA基因芯片技术, 对先天性神经管缺陷大鼠卵黄囊细胞的mRNA与正常对照组大鼠卵黄囊细胞中 1 200 个基因同时进行检测, 共筛选出表达差异基因 79 个: 其中 42 个基因表达上调, 包括凋亡相关基因*BAX*、*bcl-2*、*heat shock 70*、*GLOT3* (*Glucose transporter 3*)等, 37 个基因表达下调, 包括*phospholipase A₂*、*IGFR₂* (*Insulin-like growth factor II receptor*)等, 见图 1 所示。

2.2 MAP Kinases 蛋白激酶活性

应用特异性抗磷酸化蛋白激酶 ERK1/2 抗体、JNK1/2 抗体蛋白激酶, 检测卵黄囊细胞中 ERK1/2、JNK1/2 活性, 结果发现 ERK1/2 在神经管缺陷组胚胎卵黄囊细胞中显著性降低, 与之相反 JNK1/2 蛋白激酶活性显著升高($P < 0.05$) (图 2)。

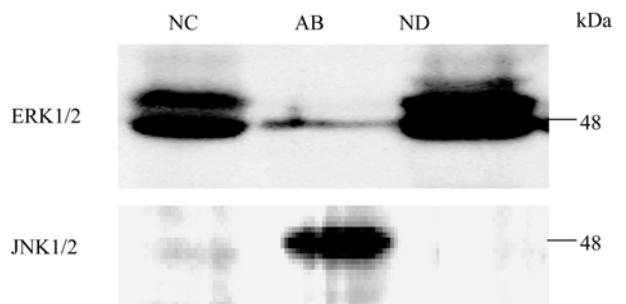


图 2 ERK1/2、JNK1/2 活性分析

M2: DNA Marker; NC: 正常对照组; AB: 糖尿病诱发神经管缺陷组; ND: 糖尿病无神经管缺陷组。

2.3 卵黄囊细胞凋亡

2.3.1 DNA 片段分析

DNA 凝胶电泳证实, 神经管缺陷胚胎卵黄囊细胞基因组中, 出现凋亡特征性 DNA 梯状电泳, 正常对照组、糖尿病无神经管缺陷组无此特征(图 3)。

2.3.2 凋亡相关蛋白表达

Western blotting 分析发现, 神经管缺陷胚胎的卵黄囊细胞中, 细胞凋亡抑制因子 AKT 蛋白磷酸化明

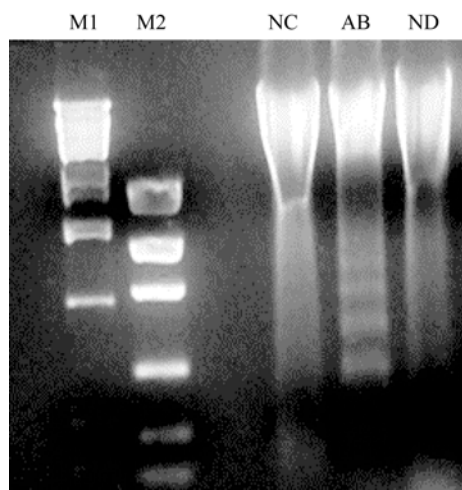


图3 DNA 凝胶电泳分析

M1: 1 kb Marker; M2: λ DNA Marker; NC: 正常对照组; AB: 糖尿病诱发神经管缺陷组; ND: 糖尿病无神经管缺陷组。

显降低, 较高水平磷酸化 AKT 存在于对照组卵黄囊细胞中。与之相反, 神经管缺陷组中, 细胞凋亡相关基因 caspase-3、Bax 蛋白表达较对照组明显升高 ($P<0.05$)(图 4)。

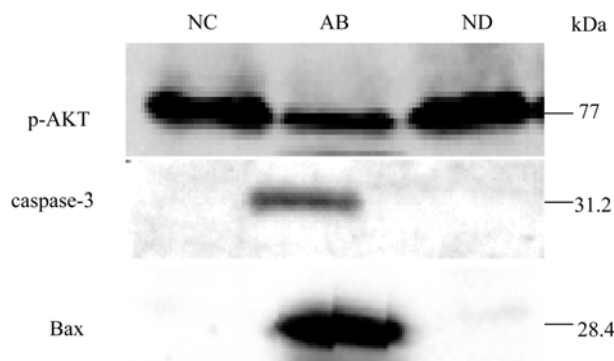


图4 凋亡相关蛋白表达

NC: 正常对照组; AB: 糖尿病诱发神经管缺陷组; ND: 糖尿病无神经管缺陷组

3 讨论

妊娠合并糖尿病诱发的胚胎先天性神经管缺陷, 其发生机制是多种因素共同参与的结果, 但具体分子机制仍在探索中。目前已知高血糖使卵黄囊细胞膜主要脂质成分出现代谢失衡, 超氧阴离子自由基释放, 对卵黄囊细胞膜造成损伤^[2], 但参与该

过程的表达差异基因和分子机制尚待研究^[3]。

本文应用cDNA 基因芯片技术, 筛查妊娠合并糖尿病诱发胚胎先天性神经管缺陷卵黄囊细胞表达差异基因^[4, 5], 与正常胚胎卵黄囊细胞 1 200 个基因进行比较, 两组中共筛选出表达差异基因 79 个, 42 个基因表达上调, 包括凋亡相关基因*BAX*、热休克蛋白 70(Heat shock 70)、*GLUT3*(Glucose transporter 3)等mRNA水平明显上调; 37 个基因表达下调, 包括*phospholipase A2*、*IGFR2*(Insulin-like growth factor II receptor)等mRNA水平显著下调。

cDNA 基因芯片杂交信号显示, *ET-1*(Endothelin-1)基因表达上调, 支持神经管缺陷的发生可能与卵黄囊细胞膜的损伤有关。研究已证实, 高血糖引起的卵黄囊细胞膜损伤, 与基本脂质成分的代谢异常密切相关, 包括花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)、肌脂 (Myo-insitol MI)等^[2]。花生四烯酸水平与前列腺素酶*PLA₂* (Phospholipase *A₂*) 活性改变直接相关^[6], cDNA 基因芯片技术同样发现, 神经管缺陷组胚胎卵黄囊细胞基因组中*PLA₂* mRNA信号明显减弱, 这将直接影响花生四烯酸合成细胞脂质, 参与神经管缺陷的发生。

此外, 神经管缺陷常伴随多种生长因子的参与, 我们检测出 β -*NGF*(β -nerve growth factor)表达上调, *Lim-2*、*HGF*(Hepatocyte growth factor)、*PDGF* (Platelet-derived growth factor) mRNA水平下调^[7], 神经生长因子水平反应性升高, 可能是对高糖和超氧阴离子自由基引起的神经损伤的反应性调节。

在神经管缺陷的胚胎卵黄囊细胞中, 磷酸化 ERK1/2 活性明显降低^[8]; 与此相反, 磷酸化JNK1/2 活性显著升高^[9, 10], 这种发现提示, 高血糖引起的卵黄囊细胞的损伤, 同时启动MAP Kinase信号级联反应, 对胚胎神经管发育产生影响^[11]。胚胎先天性神经管缺陷卵黄囊细胞中, 筛选出表达上调的凋亡相关基因, 包括*Bax* mRNA, 这一结果提示, 神经管缺陷可能启动卵黄囊细胞的细胞凋亡信号转导途径、阻断细胞存活途径, 与胚胎神经管缺陷有关^[12]。在此研究的基础上, 我们进一步对凋亡相关蛋白进行分析, 得到一致的研究结论, 即神经管缺陷胚胎卵黄囊细胞基因组中, 出现明显的细胞凋亡特征性DNA 梯状电泳, 凋亡相关基因*caspase-3*、*Bax*明显

高表达, *caspase-3* 协同激活下游的 *Bax* 基因表达参与细胞程序化死亡。凋亡抑制蛋白 AKT 激酶有促进细胞存活的作用, 神经管缺陷胚胎卵黄囊细胞中 AKT 激酶活性明显受抑, 它们共同作用, 促进细胞凋亡程序化死亡^[13]。因此, 妊娠合并糖尿病诱发胚胎先天性神经管缺陷的发生, 是多种差异基因表达, 同时启动 MAP Kinase、凋亡信号传导机制共同发挥作用的结果, 深入阐明其分子机制对探讨有效的预防和治疗具有重要意义。

参考文献(References):

- [1] Reece EA, Homko CJ. Why do diabetic women deliver malformed infants? *Clin Obstet Gynecol*, 2000, 43(1): 32–45.
- [2] Reece EA, Homko CJ. Prepregnancy care and the prevention of fetal malformations in the pregnancy complicated by diabetes. *Clin Obstet Gynecol*, 2007, 50(4): 990–997.[\[DOI\]](#)
- [3] Reece EA. In the search for genes responsible for neural tube defects, glucose metabolism matters. *Reprod Sci*, 2008, 15(1): 7–8.[\[DOI\]](#)
- [4] Reece EA, Ji I, Wu YK. Characterization of differential gene expression profiles in diabetic embryopathy using DNA microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 195(4): 1075–1080.[\[DOI\]](#)
- [5] Sato N, Sugimura Y, Hayashi Y, Murase T, Kanou Y, Kik-kawa F, Murata Y. Identification of genes differentially expressed in mouse fetuses from streptozotocin-induced diabetic pregnancy by cDNA subtraction. *Endocr J*, 2008, 55(2): 317–323. [\[DOI\]](#)
- [6] Zhao ZY, Wu YK, Reece EA. Demonstration of the essential role of protein kinase C isoforms in hyperglycemia-induced embryonic malformations. *Reprod Sci*, 2008, 15(4): 349–356.[\[DOI\]](#)
- [7] Trovato M, D'Armiento M, Lavra L. Expression of p53/HGF/c-met/STAT3 signal in fetuses with neural tube defects. *Virchows Arch*, 2007, 450(2): 203–210.[\[DOI\]](#)
- [8] Reece EA, Ma XD, Wu YK. Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy I: Membrane signaling. *J Mater Fetal Med*, 2002, 11(4): 249–253.
- [9] Yang P, Zhao Z, Reece EA. Blockade of c-Jun N-terminal kinase activation abrogates hyperglycemia-induced yolk sac vasculopathy in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 198(3): 321–327.
- [10] Yang P, Zhao Z, Reece EA. Involvement of c-Jun N-terminal kinases activation in diabetic embryopathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(3): 749–754.[\[DOI\]](#)
- [11] 陈必良, 马向东, 辛晓燕. 妊娠合并糖尿病诱发胚胎先天性神经管缺陷的 MAP 激酶及细胞凋亡信号传导机制. 现代妇产科研究进展, 2003, 12(5): 324–326.
- [12] 陈必良, 马向东, 马兴. 妊娠合并糖尿病诱发胚胎先天性神经管缺陷细胞凋亡信号转导的初步研究. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2005, 12(5): 304–307.
- [13] Reece EA, Ma XD, Zhao ZY. Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy II: Apoptotic pathways. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 192(3): 967–972.[\[DOI\]](#)

• 综合信息 •

欢迎订阅 2009 年《生物技术通报》

《生物技术通报》(月刊)创刊于 1985 年, 是我国生物技术领域的国家级综合性科技期刊和中国农业核心期刊以及中国核心期刊遴选数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国科学引文数据库来源期刊等。

主要报道国内外农、林、牧、渔及医学等领域中生物技术研究的新进展、新技术、新成果与发展趋势, 内容包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程、蛋白质工程以及生物工程的应用、新的实验技术与方法等。本刊内容丰富详实。欢迎广大读者到当地邮局订阅或直接与编辑部联系订阅(免邮费), 我们将按期及时邮寄。

本刊从 2009 年起将双月刊改为月刊、大 16 开本、页码从 80 页增加至 128 页, 每期定价 25 元, 全年定价 300 元, 邮发代号为 18–92, 国外发行代号为 BM5607。

欢迎新老读者踊跃订阅!

联系地址: 100081 北京中关村南大街 12 号信息所

《生物技术通报》编辑部

电话: 010-82109925

E-mail: biotech@mail.caas.net.cn