

· 临床论著 ·

致死性家族失眠症脑组织基因表达谱特点分析

田婵 刘翟 孙清岚 王荟 范学宇 许尹 董小平

【摘要】目的 研究致死性家族失眠症(FFI)脑组织基因表达谱特点。**方法** 取3例FFI患者丘脑组织按照标准流程制备生物素标记的互补RNA,以正常人丘脑RNA为对照,利用人类基因组芯片U133 + 2.0检测FFI患者丘脑中差异表达基因,并分析差异基因表达特点。**结果** 共有1 314个差异表达基因,其中254个上调,1 060个下调。主要受影响的分子功能是转录、转录调节和电子转移链。改变最显著的信号通路是阿尔茨海默病、帕金森病和氧化磷酸化。**结论** FFI改变了丘脑大量基因表达,其中受影响最显著的信号通路与其他神经退行性疾病相关。

【关键词】 致死性家族失眠症; FFI; 基因芯片; 信号通路

Analysis for the features of gene expression in brain tissues from fatal familial insomnia TIAN Chan*, LIU Di, SUN Qinglan, WANG Hui, FAN Xueyu, XU Yin, DONG Xiaoping. *State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Viral Diseases Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding authors: TIAN Chan, Email: tianchan_cdc@126.com

【Abstract】 Objective To study the features of gene expression in brain tissues of fatal familial insomnia (FFI). **Methods** The gene expression differences of thalamus from three patients with FFI were analyzed by Human Genome U133 + 2.0 chip, with normal thalamus as control. The characteristics of differentially expressed genes (DEGs) were analyzed by CAS 3.0 software. **Results** A total of 1 314 DEGs were identified in the thalamus of FFI. Among them, 254 genes were up-regulated and 1 060 ones were down-regulated. There were 1 152 biological processes affected and the most significantly changed molecular functions included transcription and DNA-dependent regulation of transcription, electron transport chain, etc. According to KEGG classification, there were 167 pathways changed, the top 3 changed pathways in the three groups mentioned above were oxidative phosphorylation, Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD). **Conclusions** A large amount of genes changed their expression level. The most severely changed pathways were associated with other neurodegenerative diseases.

【Key words】 Fatal familial insomnia (FFI); Gene chip; Signaling pathway

可传播性海绵状脑病, 又称朊病毒病, 是一类可引起人畜共患的致死性神经退行性疾病。人类朊病毒病包括库鲁病、克雅病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)、GSS综合征(Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease)及致死性家族失眠症(fatal familial insomnia, FFI)。其病因是由于机体内朊蛋白(PrP^C)发生构象改变, 变为异常折叠的朊病毒(PrP^{Sc})所致。虽然发病机制相同, 但这

些不同类型的朊病毒病在临床和病理上表现各异, 如发病年龄段不同、病程长短不一、有些有家族史而有的不明显, 主要症状不同等; 神经病理分析也显示出不同的特点, 如侵犯脑组织部位不同, PrP^{Sc}沉积部位和特点不同, 带型也不同等^[1]。FFI是一类遗传型朊病毒病, 由于PrP蛋白的编码基因PRNP在178位氨基酸由天冬氨酸突变为天冬酰胺(D178N)造成^[2-3], 主要表现为快速进行性失眠, 显著的自主行为异常, 行动困难等^[4-5]。与典型的CJD不同, FFI主要损伤丘脑和下橄榄核, 而PrP^{Sc}的沉积也不常见^[6-7]。根据我国的流行病学监测, FFI是我国发病率最高的遗传型朊病毒病。自2006年正式建立克雅病全国监测网络以来, 已发现20例以上FFI病例, 几乎占遗传型朊病毒病的一

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.005

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No. 81101302); 国家自然科学基金面上项目(No. 31270185)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所朊病毒病室, 传染病预防控制国家重点实验室, 传染病诊断和治疗协同创新中心(田婵、王荟、范学宇、许尹、董小平); 中国科学院微生物研究所网络信息中心(刘翟、孙清岚)

通讯作者: 田婵, Email: tianchan_cdc@126.com

半。为研究 FFI 患者神经损伤的分子机制, 本研究采用了近年来技术成熟及广泛应用的微阵列芯片 (microarray) 技术, 以商品化的多个正常人丘脑 RNA 库为对照, 检测了 3 例 FFI 患者受损最严重的丘脑组织全基因组转录谱, 找到差异表达基因, 并分析了受损的细胞功能及信号通路, 为深入了解 FFI 的分子病理机制, 寻找可能的诊断和治疗靶标提供了研究基础。

资料与方法

一、样本的收集

本研究通过中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所伦理委员会批准, 采用了 3 例确诊 FFI 的患者死后所取丘脑组织。3 例患者发病年龄分别为 48 岁男性 (FFI-1)、26 岁女性 (FFI-2) 和 55 岁男性 (FFI-3), 其中 FFI-1 和 FFI-2 来自于同一家族^[8-9]。所有 3 个患者的首发症状均为睡眠障碍, 然后出现进行性失眠, 过度出汗和流涎, 并过度紧张, 在疾病终末期出现明显的体重减轻。FFI-1、FFI-2 和 FFI-3 的病程分别是 10 个月、14 个月和 8 个月, MRI 检查未发现特殊的变化。神经病理检测发现这 3 例患者脑组织中出现严重的神经元丢失及星形胶质细胞增生, 尤其以丘脑更为显著。FFI-2 和 FFI-3 脑中有 PrP^{Sc} 沉积, 但是其抵抗蛋白酶 K 消化的能力较弱, 构象不够稳定。PRNP 基因测序确

定 D178N 突变, 129 位氨基酸为 M/M。本研究以 Clontech 购置的正常人丘脑 polyA⁺ 的 RNA 为对照进行研究。

二、微阵列分析

按照操作手册利用 RNeasy 迷你试剂盒 (Qiagen) 提取 FFI 患者丘脑组织总 RNA, 并经 1.2% 甲醛琼脂糖电泳鉴定。每个样本取 200 ng 总 RNA, 用第一链 RNA 扩增试剂盒 (Ambion) 合成并扩增第一链互补 DNA, 双链互补 RNA, 制备生物素标记的反义 RNA。检测浓度后取 15 μg 进行片段化, 用 1.2% 甲醛变性琼脂糖电泳鉴定, 然后生物素标记的反义 RNA 与人类基因组 U133 + 2.0 芯片 (Affymetrix) 于 45 °C 杂交 16 h, 并保持 60 r/min 的持续旋转。用杂交、清洗和染色试剂盒 (Affymetrix) 在 Affymetrix 流动站 450 与芯片自动清洗和染色后, 然后在 Affymetrix 3000 7G 扫描仪 (Affymetrix) 上进行扫描。所得到的 CEL 图像在 dChip 软件上进行标准化和基因过滤。本研究随机使用了 T-FFI-2 作为基线以标准化其他芯片, 基因过滤参数为 0.7 < 标准差 / 平均值 < 500, 芯片中可检测信号百分比 > 20%。

通过比较丘脑与正常对照的数据得到了差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 并进一步用 CapitalBio[®] 分子注释系统 (MAS 3.0) (<http://bioinfo.capitalbio.com/mas3/>) 进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 和 KEGG 信号通路分析,

表 1 上调最多的前 20 个基因信息

序号	基因符号	基因名称	变化倍数
1	FUT9	Fucosyltransferase 9, 岩藻糖基转移酶 9	31.59
2	ZDHHC18	Zinc finger, DHHC domain containing 18, 锌指蛋白, DHHC 区包含的 18	18.40
3	DTNA	Dystrobrevin, 肌营养蛋白	14.69
4	SLC5A3	Solute carrier family 5 (inositol transporters), 溶质载体家族 5 (肌醇转运子)	14.23
5	PTAR1	Protein prenyltransferase alpha subunit repeat containing 1, 蛋白异戊烯转移酶 α 亚基重复内容物 1	14.09
6	SLC2A9	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9, 可溶载体家族 (促葡萄糖转运子), 成员 9	13.93
7	VPS13C	Vacuolar protein sorting 13 homolog C, 空泡分选蛋白 13 同源物 C	13.38
8	YAP1	Yes-associated protein, Yes 相关蛋白	13.34
9	SGPP2	Sphingosine-1-phosphate phosphatase 2, 鞘氨醇-1-磷酸盐磷酸酶 2	12.60
10	C21orf81	Chromosome 21 open reading frame 81, 21 号染色体开放阅读框 81	11.44
11	ANKRD12	Ankyrin repeat domain 12, 锚蛋白重复域 12	10.65
12	PDZD8	PDZ domain containing 8, PDZ 区域包含的 8	10.65
13	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A, 空泡内皮生长因子 A	10.57
14	DYNC1H1	Dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1, 动力蛋白, 胞浆 1, 重链 1	10.37
15	ESCO1	Establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 1, 建立姐妹染色单体连接的 N-乙酰基转移酶 1	10.13
16	ANKRD36	Ankyrin repeat domain 36, 锚蛋白重复结构域 36	10.07
17	LOC100132181	Hypothetical protein LOC100132181, 假定蛋白 LOC100132181	9.97
18	CHD9	Chromodomain helicase DNA binding protein 9, 染色质解旋酶 DNA 结合蛋白 9	9.72
19	CCDC88A	Coiled-coil domain containing 88A, 含 88A 卷曲螺旋结构域	9.69
20	PHF3	PHD finger protein 3, PHD 锌指蛋白 3	9.54

其中GO包括了生物过程(biological processes)、细胞成分(cellular components)和分子功能(molecular functions)。对于得到的每个受影响的GO或KEGG信号通路,分别计算了相应的 P 和 Q 值表示受影响显著程度及可信性,并根据 P 值排序。设 $1E-03$ 作为 P 和 Q 值的临界值。原始数据、处理过的数据以及样本的相关信息已提交到NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)的基因表达库(gene expression omnibus, GEO),获准号为GSE40562。

结 果

一、鉴定 FFI 中差异表达基因

经过本课题组前期的神经病理检测,丘脑是这3个FFI患者中PrP^{Sc}沉积最多,胶质细胞增生最严重的脑区,为了更准确地了解FFI的脑损伤分子机制,本研究选择丘脑进行基因微阵列分析。对检测数据进行标准化处理和统计学分析后,FFI和正常对照相比差异大于2倍的作为DEGs。在去除针对相同基因的多余探针后,有1314个DEGs,其中254个基因表达上调,占总DEGs的19.3%,1060个基因表达下调,占总DEGs的80.7%。下调的基因占DEGs的绝大多数,反映了疾病终末期FFI患者的丘脑中严重的神经损伤,与散发型克雅病受损最严重的大脑皮层基因表达特点一致^[10]。

FFI病例丘脑中上调最明显的差异表达基因有酶类(FUT9、PTAR1、ESCO1、CHD9和

SGPP2),转运分子(SLC5A3、SLC2A9),锌指成分(ZDHC18、PHF3)和一些生物学活性成分(DTNA、VPS13C、YAP1和VEGFA),见表1。而下降最明显的基因涉及酶类及受体(DHRS7B、OGT、MTPAP、PRPS2)神经系统的发育(GAP43、EFNA5),细胞生长的调节(SOSTDC1、TOB1),信号转导(ARHGEF7),蛋白酶形成(PSMB4)等,见表2。

二、FFI 患者丘脑中差异表达基因和其功能分类

为鉴定FFI丘脑中受影响的GO,本研究使用GO分析工具来确定差异表达基因所属的这些生物学过程、细胞成分以及分子功能。前20个受影响最显著的生物学过程、细胞成分和分子功能及每项涉及的基因数量,见表3。

FFI病例丘脑组织中,差异表达基因中改变最显著的生物过程涉及转录和DNA依赖的转录调节,各包括34个和32个差异表达基因。其他值得一提的功能改变涉及电子传递链,蛋白转运, RNA 剪切,氧化还原,蛋白折叠,蛋白生物合成,蛋白转运,离子转运。一个数量极高的差异表达基因下调,特别是涉及电子传递链的所有基因都下调。一些差异表达的基因是丘脑特异性的,如NADH脱氢酶(辅酶Q)亚复合体(NDUFA11、NDUFA12、NDUFV1、NDUFC2和NDUFB11),细胞色素亚基(CYB5A),辅酶Q-细胞色素C还原酶相关的蛋白质(UQCRCQ和UQCRC1)和TXN硫氧还原蛋白(TXN)。许多涉及蛋白折叠的基

表2 下调最多的前20个基因信息

序号	基因符号	基因名称	变化倍数
1	AIF1	Allograft inflammatory factor 1, 同种异体移植炎症因子1	-218.68
2	GAP43	Growth associated protein 43, 生长相关蛋白43	-63.12
3	DHRS7B	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7B, 脱氢酶/还原酶(SDR家族)成员7B	-37.99
4	SOSTDC1	Sclerostin domain containing 1, 硬化蛋白域包含的1	-37.12
5	EFNA5	Ephrin-A5, 酪氨酸蛋白激酶受体A5	-35.86
6	ARHGEF7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7, Rho鸟嘌呤核苷酸交换因子7	-32.94
7	RWDD2B	RWD domain containing 2B, RWD域包含的2B	-27.26
8	TOB1	Transducer of ERBB21, ERBB2转导子1	-27.03
9	PSMB4	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 4, 蛋白酶体亚基, β 型, 4	-26.54
10	RPA3	Replication protein A3, 复制蛋白A3	-24.16
11	OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase, O-连接的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)转移酶	-23.89
12	SEL1L	Sel-1 suppressor of lin-12-like, lin-12样Sel抑制子	-22.54
13	CADPS	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator, Ca离子依赖分泌激活子	-21.71
14	MTPAP	Mitochondrial poly(A) polymerase, 线粒体的poly(A)聚合酶	-21.02
15	GABRA1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1, γ -氨基丁酸(GABA)A受体, α 1	-18.94
16	SST	Somatostatin, 生长抑素	-18.87
17	NME7	NME/NM23 family member 7, NME/NM23家族成员7	-17.83
18	PRPS2	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2, 磷酸核糖焦磷酸合成酶2	-17.75
19	SLC32A1	Solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1, 溶质载体家族32(GABA囊泡转运子), 成员1	-16.98
20	RAB3B	Member RAS oncogene family, ras癌基因家族成员	-16.80

因也发生了改变,如 HSP40 同类物(DNAJB14 和 DNAJC19),分子伴侣(TCP1、CCT4 和 MKKS),异构酶(PPIA、PDF 和 PDIA6),内质网蛋白(ERP29)。

同时,多种细胞成分也受到影响,如胞膜、胞浆、膜及完整性、内质网、高尔基体、线粒体等细胞器以及细胞外区。尤其引人注意的是,胞核、胞浆及膜的改变均涉及 300 个以上差异表达基因,内质网、核糖体和高尔基体等有关蛋白合成的细胞器也均有大量基因受影响,反映了错误折叠蛋白对细胞不同部位的损伤程度。受影响的分子功能有:蛋白结合、离子结合、核苷酸结合、酶活性等,以蛋白质结合受影响最为显著。PrP 可以结合多种蛋白,有细胞骨架蛋白、激酶,还有一些金属离子,尤其是二价金属离子等,其构象改变势必影响这些分子的结合。

三、FFI 患者脑组织中受影响的信号通路

本研究将丘脑中所有差异表达基因用 KEGG 通路和 CapitalBio[®] 分子标记系统(MAS 3.0)分析(KEGG website: <http://www.genome.jp/kegg/>),发现 167 条信号通路明显受到影响($P < 0.05$),在这些通路中 81 个涉及代谢,29 个涉及人类疾病,19 个涉及有机系统,17 个涉及环境信息加工,28 个涉及细胞加工。其中代谢通路的改变几乎占整个信号通路的 50% (48.5%),支持了近年来有些认为朊病毒病是代谢病的观点。这一点也与 G114V 遗传型克雅病脑顶叶的基因表达一致。

丘脑中改变最明显的前 20 条通路总结,见表 4,包括神经退行性疾病(帕金森疾病(PD)),阿尔兹海默症(AD),氧化磷酸化,代谢(嘌呤、丙酮酸、嘧啶代谢和柠檬酸循环),核苷酸切除修复,蛋白

酶和类固醇的合成等。除了很少一些差异表达基因在 AD 通路和嘌呤代谢通路中是上调的,所有相关的差异表达基因是下调的。本研究发现一部分氧化磷酸化的差异表达基因也在 AD 和 PD 通路中,提示线粒体损伤是神经退行性疾病的一个普遍特征。信号通路中还涉及到哮喘、抗原处理和提呈,均与免疫相关,在散发型 CJD 也观察到免疫反应的基因上调,说明这些神经退行性疾病都涉及到免疫系统的基因变化。

讨 论

本研究分析了 3 个中国 FFI 患者受损最严重脑区——丘脑的基因表达谱,共鉴定出 1 314 个差

表 4 丘脑中变化的前 20 个信号通路

序号	信号通路	变化基因数
1	氧化磷酸化	47
2	帕金森病	45
3	阿尔茨海默病	47
4	嘌呤代谢	21
5	核苷酸切除修复	12
6	丙酮酸盐代谢	11
7	三羧酸循环	10
8	蛋白酶体	11
9	类固醇生物合成	9
10	嘧啶代谢	14
11	泛素介导的蛋白裂解	15
12	RNA 多聚酶	7
13	哮喘	7
14	霍乱-感染	9
15	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	8
16	谷氨酰胺代谢	6
17	乙醛酸二羧基代谢	5
18	幽门螺杆菌感染的上皮细胞信号	9
19	抗原处理和提呈	10
20	致病性大肠埃希菌感染-EHEC	8

表 3 受影响最显著的前 20 个生物学过程、细胞成分及分子功能和基因数量

序号	GO-生物学过程	基因数量	GO-细胞成分	基因数量	GO-分子功能	基因数量
1	转录	99	细胞核	375	蛋白结合	472
2	DNA 依赖的转录调节	92	细胞浆	367	核苷酸结合	150
3	电子转移链	33	膜	351	锌离子结合	136
4	蛋白转运	56	线粒体	184	金属离子结合	161
5	RNA 剪接	40	膜完整性	280	ATP 结合	98
6	氧化还原	47	细胞质	102	RNA 结合	73
7	蛋白折叠	30	内质网	98	转移酶活性	89
8	蛋白生物合成	38	浆膜	138	钙离子结合	71
9	转运	75	浆膜完整性	80	水解酶活性	95
10	离子转运	39	线粒体内膜	50	GTP 结合	41
11	细胞黏附	39	高尔基体	66	DNA 结合	77
12	核 mRNA 剪切	23	内质网膜	53	镁离子结合	42
13	神经系统发育	39	核质	52	GTP 酶活性	32
14	抗原处理并通过 II 类 MHC 提呈肽或多糖抗原	16	核糖体	33	氧化还原酶活性	42
15	线粒体电子转运, NADH 到辅酶 Q	16	细胞外区	68	核糖体结构组分	25
16	分裂后期促进的复合物依赖的蛋白酶泛素依赖的蛋白分解	16	核仁	40	NADH 脱氢酶(辅酶 Q)活性	17
17	有丝分裂细胞周期中泛素连接酶活性的负调节	16	线粒体基质	27	电子载体活性	24
18	有丝分裂细胞周期中泛素连接酶活性的正调节	16	II 类 MHC 蛋白复合物	16	连接酶活性	28
19	亲同种抗原的细胞黏附	19	微管	26	未折叠蛋白结合	19
20	转录	99	剪接体复合物	22	肽酶活性	30

异表达基因,与FFI患者脑组织中观察到的异常病理特征一致,涉及胶质增生的GFAP基因转录水平增高,一系列神经元相关基因表达下调。PrP基因PRNP的表达相对于正常对照并无明显改变,这与sCJD, G114V遗传型CJD患者和感染羊瘙痒因子和CJD成分的小鼠,感染BSE的牛中观察到的结果一致^[10]。

Xiang等^[10]报道的sCJD脑组织表达谱使用了一个探针量相对低的基因芯片,仅287个差异表达基因,明显少于本研究之前G114V遗传型CJD的研究。通过KEGG通路分析(KEGG website <http://www.genome.jp/kegg/>),本研究发现在丘脑中改变最明显的前3条通路是PD、AD和氧化磷酸化,与本课题组之前使用相同方法检测的G114V遗传型CJD发现一致,同时许多涉及氧化磷酸化的差异表达基因也在AD和PD中发现。这显示在人类朊病毒疾病的终末期严重的线粒体损伤有重要意义。此外,MAPK信号通路在2例FFI病例中也受到严重影响,而此通路在G114V遗传型CJD病例的皮质中也有明显改变,显示出这条通路在这两个亚类的人遗传性朊病毒疾病中的重要作用。许多相似的信号通路出现在FFI、G114V遗传型CJD甚至sCJD中,反应了在疾病终末期不同亚类相似的病理变化。

在GO和信号通路分析中,均显示免疫相关的基因变化较大,在sCJD中上调变化最明显的就是免疫反应相关基因,虽然FFI与sCJD在临床表现及神经病理特点上均有较大差异,但朊病毒病为一

种感染性疾病,均可在脑组织中引起免疫系统的反应。本研究已通过定量RT-PCR验证(数据未显示),大量的特异性变化的基因可为寻找CJD的诊断标志物提供线索。

参考文献

- 1 Imran M, Mahmood S. An overview of human prion diseases[J]. Virol J, 2011, 8: 559.
- 2 Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism[J]. Science, 1992, 258(5083): 806-808.
- 3 Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene[J]. N Engl J Med, 1992, 326(7): 444-449.
- 4 Lugaresi E, Medori R, Montagna P, et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei[J]. N Engl J Med, 1986, 315(16): 997-1003.
- 5 Manetto V, Medori R, Cortelli P, et al. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases[J]. Neurology, 1992, 42(2): 312-319.
- 6 Medori R, Montagna P, Tritschler HJ, et al. Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178[J]. Neurology, 1992, 42(3): 669-670.
- 7 Zarranz JJ, Digen A, Atares B, et al. Phenotypic variability in familial prion diseases due to the D178N mutation[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005, 76(11): 1491-1496.
- 8 Shi XH, Han J, Zhang J, et al. Clinical, histopathological and genetic studies in a family with fatal familial insomnia[J]. Infect Genet Evol, 2010, 10(2): 292-297.
- 9 Xie WL, Shi Q, Xia SL, et al. Comparison of the pathologic and pathogenic features in six different regions of postmortem brains of three patients with fatal familial insomnia[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1): 81-90.
- 10 Xiang W, Windl O, Westner IM, et al. Cerebral gene expression profiles in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. Ann Neurol, 2005, 58(2): 242-257.

(收稿日期: 2014-02-20)

(本文编辑: 孙荣华)

田婵, 刘翟, 孙清岚, 等. 致死性家族失眠症脑组织基因表达谱特点分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(3): 321-325.