

· 论 著 ·

利用寡核苷酸芯片诊断 α -地中海贫血无创方法的探讨*高 天¹, 梁志清^{1△}, 聂艳丽², 朱虹琳², 吴伟静², 胡 华¹

(1. 第三军医大学西南医院妇产科, 重庆 400038; 2. 生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206)

摘要:目的 通过比较地中海贫血脐血与正常脐血和外周血的全基因组表达差异, 进一步探讨早期诊断地中海贫血的无创方法。方法 利用含有人约 22 000 条 Oligo DNA 的人类全基因组寡核苷酸芯片, 对 1 例 α 地中海贫血患儿脐血与 1 例正常脐血及 1 例外周血分别配对检测差异基因表达, 并用 real-time PCR 验证差异基因 HBA2 在脐血和外周血中的差异性。采用分层聚类分析等显著性检验方法发现统计学意义上差异表达的基因。结果 两组芯片结果显示, 检测到的基因共 4 205 条, 其中两者差异的基因共 822 条 (ratio ≥ 2 或 ≤ 0.5); 通过间接比较两组差异率为 19.5%, 即重复率为 81.5%。实时定量 PCR (RT-PCR) 的 Ct (threshold cycle) 值结果亦显示 HBA2 在脐血和外周血中表达无差异。结论 高通量的基因芯片技术能够筛选出大量的地中海贫血差异表达基因, 直接与 α -地中海贫血相关的 HBA2 蛋白在脐血和外周血中的表达无差异。预示着利用微阵列分析法对地中海贫血进行早期诊断时, 可以采用无创技术制备芯片样本。

关键词:地中海贫血; HBA2; 基因表达; 脐血; 外周血; 寡核苷酸芯片

中图分类号: R556.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)22-2827-04

Study of prenatal diagnosis in α -thalassemia by non-invasive method based on oligonucleotide microarrayGAO Tian¹, LIANG Zhi-qing^{1△}, NIE Yan-li², et al.

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To analyze differentially expressed genes between thalassemia and normal one and peripheral blood and to study the minimally invasive method for prenatal diagnosis. **Methods** Gene-expression profiles of 1 sample of α -thalassemia and 1 sample of normal cord blood and peripheral blood were analyzed by unsupervised Hierarchical clustering in order to get the specifically differentially expressed genes. The gene expression presence of HBA2 was verified by real-time PCR. **Results** A total of 4 205 genes of thalassemia were checked. Of them, 822 genes were the differential genes in both groups (ratio ≥ 2.0 or ≤ 0.05). The differential rate was 19.5%, i. e., their recurrence rate was 81.5%. There were no significant differences between cord blood and peripheral blood by the value of Ct in HBA2. **Conclusion** These data are helpful for a better understanding of thalassemia and contribute to the development of diagnostic and therapeutic strategies. There were no significant differences between cord blood and peripheral blood in the expressions of α -thalassemia by the gene of HBA2. It is prognosticated we can use the non-invasive method for prenatal diagnosis in thalassemia by the method of microarray.

Key words: thalassemia; HBA2; genes expression; cord blood; peripheral blood; oligo nucleotide microarray

地中海贫血是一组遗传性慢性溶血性疾病。传统诊断地中海贫血的方法一般是采用患儿脐带血或者孕妇羊水。常规的基因和蛋白质组学研究技术已不能满足临床的需要, 因为对于反复妊娠发病的或者轻型的地中海贫血患者而言, 传统的分子诊断方法不能检测到基因突变或片段缺失。目前, 在应用于这种高度异质性遗传疾病的各种分子诊断方法中, 快速简便的基因芯片技术引人注目。以分子杂交为基础的芯片技术是基于杂交的寡核苷酸微阵列^[1], 是一种在基因组中寻找新位点的方法。本研究拟通过微阵列分析法利用已知与 α -地中海贫血相关的基因 HBA2 在脐血和外周血中的表达差异进行间接比较, 以期指导临床上采用无创技术对地中海贫血进行早期诊断。

1 材料与方

1.1 标本来源 选择第三军医大学西南医院已明确诊断的 α -地中海贫血患儿的脐带血。对照正常血样取自正常产前体检胎儿脐带血和外周血。患者无任何基础疾病及免疫抑制剂治

疗史, 取材均征得患者和院方同意。所取样本未经任何药物处理, 立即提取总 RNA。采用 Trizol (北京百泰克生物公司) 提取样本中总 RNA; 进一步采用 NucleoSpin RNA clean-up 试剂盒 (MACHEREY-NAGEL, Germany) 对总 RNA 进行过柱纯化; 用双通道激光扫描仪进行扫描 (LuxScan TM, 北京博奥生物芯片公司); 得到的扫描图片用 SpotData 基因芯片数据分析软件 (北京博奥生物芯片公司) 把图片信号转化为数字信号。RNA 提取所用试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司; 氯仿、异丙醇和无水乙醇购自北京化学试剂公司; DEPC 购自 Sigma 公司; SSII 和 M-MLV 逆转录酶购自 Invitrogen 公司; DNA 酶 I、r-Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 购自 TaKaRa 公司; Oligo dT15 购自 Promega 公司; RNA 纯化试剂盒购自 MN 公司; 实时定量 PCR 引物均由 Invitrogen 公司合成。

1.2 总 RNA 提取 采用 Trizol 提取样本中总 RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA, 进一步采用 NucleoSpin RNA clean-up 试剂盒对总 RNA 进行过柱纯化, 测定浓度和 OD260/280, 并

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901619)。△ 通讯作者, 电话: (023) 68754409。

电泳检测其完整性。分光光度计进行 RNA 定量时,OD260/280 在 1.8~2.0,0.8% 琼脂糖甲醛变性胶电泳,28S 和 18SRNA 亮度比值在 2.0 左右。

1.3 样本 RNA 荧光标记 取 5μg 总 RNA,作为模板反转录合成双链 DNA,进一步体外扩增合成 cRNA,随机引物反转录并掺入 dCTP-Cy3 和 dCTP-Cy5(GE healthcare)进行标记。采用荧光交换的方法:即在 1 张芯片上,地中海贫血脐血样本标记 cy5 荧光素,正常脐血样本标记 cy3 荧光素;在第 2 张荧光交换的芯片上,正常脐血样本标记 cy5 荧光素,而地中海贫血样本标记 cy3 荧光素。作者认为只有在两张芯片上变化趋势都一致的基因才是真正生物学意义上变化的基因。

1.4 杂交、清洗及扫描 标记好的探针与杂交缓冲液充分混合,配制成 80μL 的杂交液(终浓度:3×SSC,0.2% SDS,5×Denhart's,25%甲酰胺),95℃变性 3min,冰浴 3min。42℃杂交过夜。杂交结束后,先在 42℃左右含 0.2% SDS,2×SSC 的溶液中洗 4min,然后在 0.2×SSC 中洗 4min。离心干燥,用晶芯 LuxScan10K 微阵列芯片扫描仪双通道扫描仪扫描获得芯片杂交图^[2]。

1.5 生物信息分析 芯片杂交结束后经过清洗,用双通道激光扫描仪进行扫描,得到的扫描图片用 SpotData 基因芯片数据分析软件(北京博奥生物芯片公司)把图像数据文件转化为数字数据文件。用 LOWESS 方法对双通道芯片的信号比值进行归一化^[3]。在本研究中以地中海贫血脐血样本/正常脐血样本(外周血样本)比值大于或等于 2 和小于或等于 0.5 分别作为显著性上调或显著性下调的筛选标准,找出配对样本的差异表达基因,对 α-地中海贫血脐血样本和两类正常对照的差异表达基因取交集。对差异基因进行 CLUSTER 分析。

1.6 实时定量 PCR 检测 HBA2 在地中海贫血中的表达 实时定量 PCR(Real-time PCR, RT-PCR)采用晶芯® SuperGreen 荧光定量 PCR 通用试剂盒(北京博奥生物芯片公司),实验方法按试剂说明。HBA2 引物采用 Oligo6.0 软件设计:上游引物 5'GTT CTT TGA GTC CTT TGG GG3',下游引物 5ATT TGT GGG GTG-AAT TCC TT3',β-ACTIN 引物:上游引物 5'CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT3',下游引物上游引物 5'GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC3'。反应条件:65℃ 5min,冰浴 5min,50℃ 30min 合成 cDNA;PCR 反应 95℃ 3min,95℃ 30s,60℃ 1min,40 个循环,72℃ 45s。结果分析方法:CP (Crossing Point)表示反应的实时荧光强度显著大于背景值时的循环数,也称作 Ct(threshold cycle)值。比较两个样本中检测基因表达情况的差异,通过下面公式 1 进行计算。公式中 E 为实时 PCR 反应的扩增效率;ref 是校准基因,一般用表达丰度在不同样本中都相对稳定的看家基因;target 表示靶基因;ΔCP(control-sample)是对照样本的 CP 值减去检测样本的 CP 值得到的差值。

$$\text{公式 1 } \text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

2 结 果

2.1 地中海贫血表达谱变化 通过分层聚类分析并使用 TREEVIEW 软件查看^[4],检测到的基因共 4 205 条,其中两者差异的基因共 822 条,分别位于 A 与 D 部分,相同表达趋势的基因分别位于 B 与 C 部分(图 1);经间接比较结果显示差异率为 19.5%。通过 t 检验来挑选差异表达基因(图 2)。

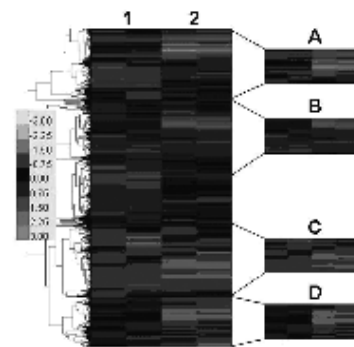
2.2 实时定量 PCR 分析 HBA2 基因 RT-PCR 验证结果显

示,与正常脐血和外周血比,该基因在地中海贫血中呈低表达,且差异有统计学意义(ratio=0.44, ratio<0.50)(图 3~6,表 1);同时结果显示,HBA2 在脐血和外周血中表达差异无统计学意义(ratio=1.34, 0.5<ratio<2.0)(图 3~6,表 2)。

表 1 HBA2 基因地贫与正常血样 RT-PCR 结果

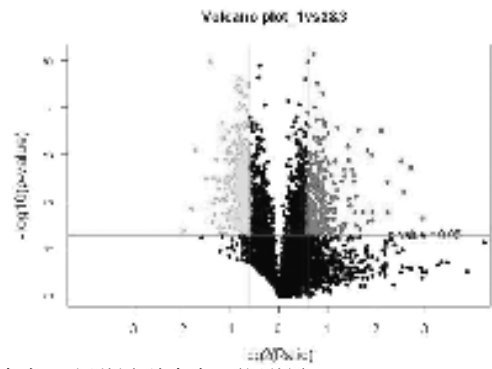
样本/内参	Ct 值	ΔCt	归一化前 ratio	比率(ratio)
actin-地贫	20.75	—	—	—
actin-脐血	20.44	-0.31	0.81	—
actin-外周血	20.29	-0.46	0.73	—
HBA2-地贫	21.27	—	—	—
HBA2-脐血	19.76	-1.51	0.35	0.43
HBA2-外周血	20.04	-1.23	0.43	0.59

—:无数据。



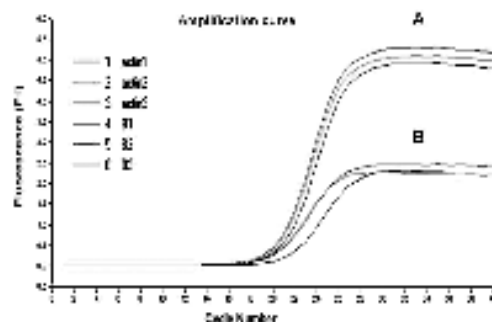
1:地中海贫血与脐血;2:地中海贫血与外周血;A:脐血与外周血差异基因部分,且相对于外周血下调的基因;B:两组共同上调基因部分;C:两组共同下调基因部分;D:脐血与外周血差异基因部分,且相对于外周血上调的基因。

图 1 分层聚类分析结果



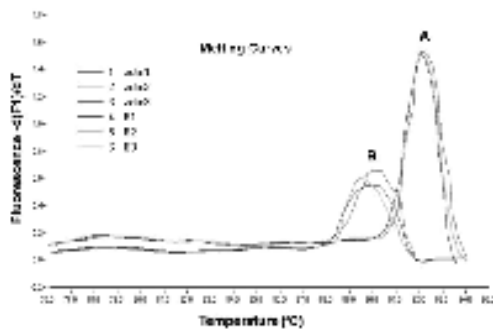
深色点:上调基因;浅色点:下调基因

图 2 T-test 火山图



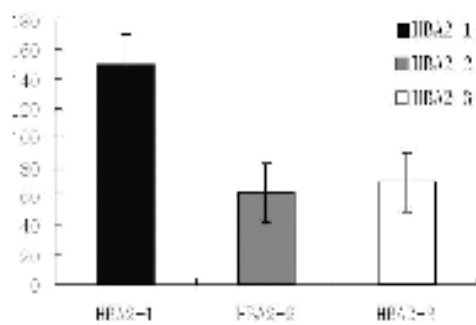
A 为 β-ACTIN 曲线,B 为 HBA2 曲线;1、2、3、4、5、6 分别为地中海贫血、脐血、外周血中 β-ACTIN 和 HBA2 的扩增曲线。

图 3 HBA2 扩增曲线



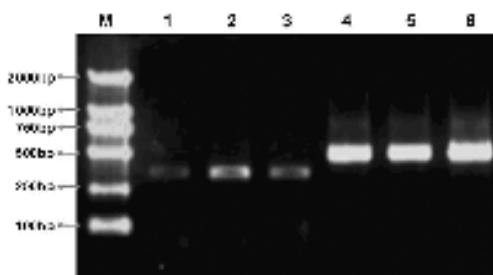
A 为 β -ACTIN 曲线, B 为 HBA2 曲线; 1、2、3、4、5、6 分别为地中海贫血、脐血、外周血中 β -ACTIN 和 HBA2 基因的溶解曲线。

图 4 HBA2 溶解曲线



HBA2-1、HBA2-2、HBA2-3 分别为地中海贫血、脐血、外周血中 HBA2 表达情况, 纵坐标为归一化前 ratio 值

图 5 HBA2 的 RT-PCR 验证



M: Marker, DL2000; 1-3 为 HBA2; 4-6 为 β -ACTIN; 1、4 为地中海贫血; 2、5 为脐血; 3、6 为外周血

图 6 HBA2 与 β -ACTIN RT-PCR 鉴定

表 2 HBA2 基因脐血与外周血 RT-PCR 结果

样品/内参	Ct 值	Δ Ct	归一化前 ratio	比率(ratio)
ACTIN-脐血	20.44	—	—	—
ACTIN-外周血	20.29	-0.15	0.9	—
HBA2-脐血	19.76	—	—	—
HBA2-外周血	20.04	0.28	1.21	1.35

—: 无数据。

3 讨 论

地中海贫血的基因诊断和产前诊断先后经历了 DNA 点杂交、限制性内切酶酶谱分析^[5]、限制性片段长度多态性(RFLP)连锁分析^[6]、寡核苷酸(ASO)探针杂交^[7]及 PCR 体外基因扩增^[8-9]等阶段,特别是 PCR 技术的不断发展和改进,使地中海贫血基因诊断检测技术日趋成熟。但是,迄今大部分患

者并未直接受益于此,原因是多方面的,费用昂贵是重要因素之一。此外,操作较繁杂、费时,对操作者技术水平要求较高等也限制了这些方法的普及,因此费用低廉、结果可靠、使用方便、安全省时的基因诊断技术的开发仍然是人们翘首以待的事情。

目前,在应用于这种高度异质性遗传病的各种分子诊断方法中,快速简便的基因芯片技术引人注目。应用该技术能够同时检测中国地区最常见的(23.7)、(24.2)和(22SEA)3种缺失型2种非缺失型突变 α 珠蛋白^[10],以及21种 β 珠蛋白基因突变点^[11]。因此,迫切需要在利用微阵列分析法对地中海贫血进行早期诊断时,采用无创技术制备芯片样本的方法,为地中海贫血寻求和发现新的更简便、更精确、易于推广的诊断方法提供可能。本实验发现: α 地中海贫血与正常脐血及地中海贫血与正常外周血两组芯片数据结果显示,检测到的基因共4205条,其中两者共同的差异基因822条(ratio \geq 1.50或 \leq 0.67),通过间接比较两组差异率为19.5%,即重复率为81.5%,提示利用表达谱芯片筛查地中海贫血中差异基因时,与该疾病相关的基因在脐血和外周血中表达无差异。

α 地中海贫血是一组遗传性疾病,它是因血红蛋白的珠蛋白肽链 α 的合成抑制、失衡,引起无效造血和溶血性贫血。传统诊断 α 地中海贫血的方法一般是采用患儿脐带血或者孕妇羊水,无法避免对胎儿的有创风险。并且传统的检测方法是利用反向点杂交技术进行明确诊断,此方法操作较繁杂、费时,且只能检测出常见的几种 α 型地中海贫血^[12]。表达谱基因芯片是用于基因功能研究的一种基因芯片,可以对基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、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,迅速将某个或几个基因与疾病联系起来,极大地加快这些基因功能的确立,同时进一步研究基因与基因间相互作用的关系,是一种在基因组中寻找新位点的方法^[13]。目前为止,通过微阵列芯片技术检测单基因遗传病地中海贫血尚未见有报道。作者在对 α 地中海贫血表达谱的筛选中发现大量的基因以及它们的细胞功能可能与地中海贫血相关,这些基因有可能成为地中海贫血潜在的代表基因,但仍需进一步关注和深入研究。

近年来,利用基因芯片对疾病的血液样本制备得到大家广泛关注^[14],即寻求一种通过微创或者无创方法制备芯片样品。受此启发,作者拟通过微阵列分析法分析比较外周血与脐血在诊断地中海贫血过程中的差异情况。因此,本实验选取已经明确与 α 地中海贫血致病直接相关的基因 HBA2 为间接比较的指标,通过 RT-PCR 验证芯片的比较结果。芯片结果显示,与正常脐血和外周血比较, α 珠蛋白 2 (HBA2)在 α 地中海贫血中表达显著下调(ratio=0.44, ratio $<$ 0.50);RT-PCR 验证结果表明,HBA2 在脐血和外周血中表达无差异(ratio=1.34, 0.5 $<$ ratio $<$ 2.0)。提示利用微阵列分析法在地中海贫血寻找新位点并利用新位点进行早期诊断时,可以采用无创方法取材制备芯片样本,以期达到可以指导临床上对地中海贫血的早期诊断。

参考文献:

[1] Pfister S, Schlaeger C, Mendrzyk F, et al. Array-based profiling of reference-independent methylation status (aPRIMES) identifies frequent promoter methylation and consecutive downregulation of ZIC2 in pediatric medul-lo-

- blastoma[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(7): e51.
- [2] Tang Y, Chen YW, Ni B, et al. Up-regulation of the expression of costimulatory molecule CD40 in hepatocytes by hepatitis B virus X antigen[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(1): 12.
- [3] Yu J, Zhang L, Chen AL, et al. Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF- β -Smad2/3-Smad4 signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 215(2): 422.
- [4] Chunming D, Rossa K, Chiu TK. MS analysis of single nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive prenatal diagnosis[J]. *PNS*, 2004, 29: 10762.
- [5] Talmaci R, Traeger Synodinos E, Kanavakis T, et al. Scanning of β -globin gene for identification of β -thalassaemia mutation in Romanian population [J]. *J Cell Mol Med*, 2004, 18(2): 232.
- [6] 胡华, 李彩霞, 孙古亚, 等. 多重引物延伸的方法检测 β 地中海贫血[J]. *重庆医学*, 2007, 36(21): 2193.
- [7] Christina V, Voanne TS. Rapid screening of multiple β -globin gene mutations by realtime PCR on the lightcycler: application to carrier screening and prenatal diagnosis of thalassaemia syndromes[J]. *Clin Chem*, 2003, 49: 5769.
- [8] 冯东晓, 刘德培. 人 α -珠蛋白基因表达调控研究进展[J]. *国外医学分子生物学分册*, 2004, 22(1): 162.
- [9] Li C, Yane Y, Dai H, et al. Detection of β -thalassaemia by PCR connected with reverse dot blot[J]. *China Pediatr Blood Cancer*, 2007, 2(12): 9.
- [10] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of α and β thalassaemia in Guangdong Province: implications for the future health burden and population screening[J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57: 517.
- [11] Mathias LA, Fisher TC, Zeng L, et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia major is due to apoptosis at the polychromatophilic normoblast stage[J]. *Exp Hematol*, 2000, 28: 1343.
- [12] Liao C, Mo QH, Li J, et al. Carrier screening for alpha and beta-thalassaemia in pregnancy: the results of an 112 year prospective program in Guangzhou Maternal and Neonatal Hospital [J]. *Prenat Diagn*, 2005, 25(2): 163.
- [13] Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, et al. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1140.
- [14] Zhang X. De novo induction of platelet-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells from CD4⁺ CD25⁻ cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. *Blood*, 2009, 113: 2568.

(收稿日期: 2009-09-15)

(上接第 2826 页)

产生更多的 VEGF 和 MMP9, 具有促发新生血管形成的作用。因此, Sca-1/CXCR4 可能是具有高侵袭力的 LLC 干细胞的重要表面标志。作者下一步将建立 Sca-1/CXCR4 双阳性 LLC 分选培养平台, 并更加深入地研究 NSCLC 干细胞参与肿瘤血管生成调控的分子机制。

参考文献:

- [1] Sakariassen P, Prestegarden L, Wang J, et al. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells[J]. *PNAS*, 2006, 103(44): 16466.
- [2] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 313.
- [3] Rahman A, Dhar DK, Yamaguchi E, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(5): 1325.
- [4] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1.
- [5] Cho YJ, Murgu SD, Colt HG. Bronchoscopy for bevacizumab-related hemoptysis [J]. *Lung Cancer*, 2007, 56(5): 465.
- [6] Sardari Nia P, Colpaert C, Blyweert B, et al. Prognostic value of nonangiogenic and angiogenic growth patterns in non-small-cell lung cancer[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(7): 1293.
- [7] Adighibe O, Micklem K, Campo L, et al. Is nonangiogenesis a novel pathway for cancer progression? A study using 3-dimensional tumour reconstructions[J]. *Br J Cancer*, 2006, 94(8): 1176.
- [8] Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, et al. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis Vascular Endothelial Growth Factor [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(16): 7843.
- [9] Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells[J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(1): 69.
- [10] 平轶芳, 姚小红, 卞修武, 等. 人胶质瘤干细胞趋化因子受体 CXCR4 活化促进血管生成的作用[J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36(3): 179.
- [11] Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche[J]. *Nature*, 2005, 438(7069): 820.
- [12] 敖绪军, 钱莘, 安江宏, 等. Sca-1+ Lewis 肺癌细胞成瘤实验的研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(20): 2044.

(收稿日期: 2009-08-29)