

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.20.022

利用基因芯片技术研究葱白提取物对血脂的调控基因*

冯云霞,张介眉,谢沛霖,郝建军,朱旭
(武汉市中西医结合医院 430000)

[摘要] **目的** 利用基因芯片技术探讨葱白提取物调节血脂的可能机制。**方法** 利用高脂饲料法建立高脂血症模型,葱白提取物组给予葱白提取物灌胃 6 周,造模成功后分别提取模型组和葱白提取物组肝脏组织的总 RNA,标记后与 OneArray[®] 大鼠基因芯片杂交,洗脱、染色、扫描芯片,GCOS 软件分析和处理数据;运用实时荧光定量 PCR 技术对 Fgf21、Scap 基因进行验证。**结果** 按照表达差异倍数大于等于 2, $P < 0.05$ 的筛选条件,筛选出高脂血症模型组和葱白提取物组差异基因有 58 个,其中表达上调的基因 16 个,表达下调的基因 42 个。经 PCR 验证:与模型组相比,葱白提取物可以明显上调 Fgf21 的表达 ($P < 0.05$),而对 Scap 的表达影响不大,这与基因芯片结果一致。**结论** 基因芯片技术是一高效筛选葱白提取物调节血脂相关基因的方法,Cpt1b、Cidea、Lcn2、Fgf21、Scd 等基因可能与葱白提取物调节血脂机制相关。

[关键词] 高脂血症;葱白提取物;基因芯片;差异基因

[中图法分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)20-3511-05

Regulatory gene of allium fistulosum extract on blood lipid by using gene chip technology*

FENG Yunxia, ZHANG Jiemei, XIE Peilin, HAO Jianjun, ZHU Xu
(Wuhan Municipal Hospital of Integrated Traditional Chinese and
Western Medicine, Wuhan, Hubei 430000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the possible mechanisms of allium fistulosum extract for regulating blood lipid by using the gene chip technology. **Methods** The hyperlipidemia model was established by using the high fat diet method. The allium fistulosum extract group was gavaged by allium fistulosum extract for 6 weeks. After constructing the mode, total RNA was extracted from the model and allium fistulosum extract groups, after labeling, which were hybridized with OneArray[®] rat microarray for conducting elution, staining, scanning chip, GCOS software analysis and processing the data; the real-time PCR technique was used to verify the Fgf21, Scap gene. **Results** Fifty-eight differential genes were screened out from the model group and allium fistulosum extract group according to the screening conditions of the expression difference fold ≥ 2 and $P < 0.05$. Among them, 16 genes expressed the upregulation and 42 genes expressed the downregulation. By PCR verification, compared with the model group, allium fistulosum could significantly up-regulate the expression of Fgf21 ($P < 0.05$), but had little effect on the expression of Scap, which was consistent with the gene chip results. **Conclusion** The gene chip technology is a highly efficient method for screening allium fistulosum extract for regulating blood lipid related genes, and Cpt1b, Cidea, Lcn2, Scd, Fgf21 and other genes may be related with allium fistulosum extract regulating blood lipid mechanisms.

[Key words] hyperlipidemia; allium fistulosum extract; gene chip; differential gene

血脂异常与心脑血管疾病密切相关,是冠心病和缺血性脑卒中独立危险因素,血脂异常已成为影响我国人群健康的重要公共卫生问题^[1]。本课题组历时十余年开发研制的葱白提取物^[2-4],将“通阳”药物葱白冷冻干燥后,通过超临界二氧化碳萃取技术制备而成。该制剂(博心通软胶囊)于 2009 年获得湖北省药监局院内制剂批号(鄂药制字 Z20093124Z)。在本院临床广泛应用,在调节血脂方面疗效显著,本文拟利

用基因芯片技术探讨葱白提取物调节血脂的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 16 只雄性 SPF 级 SD 大鼠 (180±20)g,购自湖北省动物实验研究中心,合格证号:42000600000069,许可证号:SCXK(鄂)2008-0005。随机分为模型组、葱白提取物组,每组 8 只。

* 基金项目:全国名老中医传承工作室建设项目(国中医药人教发[2011]41号);湖北省武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WZ19Q01)。作者简介:冯云霞(1981-),主治医师,博士,主要研究方向为中西医结合防治周围血管病。

1.1.2 建立高脂血症模型 采用邱服斌等^[5]的方法用高脂饲料连续喂养 6 周,确认形成高脂血症模型后再检测其他相关指标。高脂饲料配方:82.3%基础饲料添加 10%的猪油,2%胆固醇,5%蔗糖,0.5%脱氧胆酸钠,0.2%甲硫氧嘧啶。由北京华卓康生物科技股份有限公司生产提供。

1.1.3 药物及给药 葱白提取物由武汉市中西医结合医院制剂中心提供。根据人动物换算剂量,葱白提取物组给予 42 mg/kg 葱白提取物灌胃,模型组大鼠给予同体积生理盐水灌胃,每天 1 次,均连续给药 6 周。

1.1.4 观察指标 利用基因芯片技术研究葱白提取物对血脂的调控基因。

1.1.5 仪器与试剂 OneArray[®] 大鼠表达谱芯片(台湾华联生物科技,226-2013070101);GCOS(数据处理软件);RNeasy Mini Kit(Qiagen 74104);TRIzol Reagent (Invitrogen, 5596-018);RNAlater (Qiagen, 76106);One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, 900454);GeneChip Eukaryotic (Affymetrix, 900454); β -Mercaptoethanol(Calbiochem,444203)

1.2 方法

1.2.1 提取纯化总 RNA 及 cDNA、标记、杂交 用 TRIzol 按照试剂盒说明抽提总 RNA 并进行浓度测定。纯化采用 QIAGEN RNeasy[®] Kit,纯化后做进一步的 RNA 质量检测。取 2 μ L Poly-A RNA Control Stock,稀释,加入 T7-(d7) 24 primer 50 μ mol/L,2 μ L、5 \times First strand cDNA buffer、SuperScript II 温浴,离心,加 2 μ L 10 U/ μ L T4 DNA 聚合酶,0.5 mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)终止反应。在合成的双链 cDNA 产物中加入 600 μ L cDNA Binding Buffer,QIAGEN RNeasy Total RNA Isolation kit 纯化生物素标记的 cRNA。cRNA 质控用分光光度计分析。片断化 cRNA,芯片使用前需平衡至室温。确定芯片的类型(Standard Array)。在新的 1.5 mL RNase-free 离心管中配制杂交液。杂交液先 99 $^{\circ}$ C,5 min,然后 45 $^{\circ}$ C,5 min。在进行上述步骤的同时通过加样孔加入适量体积 1 \times 杂交缓冲液湿润芯片。杂交炉中 45 $^{\circ}$ C,60 rpm 预杂交芯片 10 min。从芯片中取出杂交缓冲液,加等体积处理好的杂交液。杂交炉中 45 $^{\circ}$ C,60 rpm 杂交芯片 16 h。

1.2.2 洗脱、染色、扫描芯片 洗脱、染色、扫描芯片之前都必须先定义一个 Experiment。基因芯片洗涤工作站 450 用来洗脱和染色探针阵列。洗脱和染色、

扫描。关闭洗涤工作站。

1.2.3 质控标准 同一样品杂交同一种类两张芯片时,两张芯片上除控制点以外,所有信号点的强度经 normalize 以后的相关性大于 95%。阵列图像:阵列上没有人为的痕迹,没有大于芯片面积 2.5%的刮痕。平均杂交背景信号值不大于 100。B2 寡核苷酸探针的特性描述如下:(1)在杂交矩阵的边缘处亮度为交替出现型;(2)每个拐角处图案为棋盘形图案;(3)阵列的名称位于阵列左上方

杂交控制:杂交信号中,BioB 作为代表,其检出率应该至少有 50%;BioC, BioD 和 cre 的信号值应比 BioB 的信号强。内控制基因:rpt 文件中所列的芯片上的看家基因(House keeping controls),其中至少一个基因 3'端的探针集合的杂交信号不能超过其 5'端的探针集合的杂交信号的 3 倍(两轮放大的除外)。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 技术验证相关基因 Trizol 提取组织 RNA,逆转录成 cDNA。反应体系:GAPDH:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 25 s;30 个循环,72 $^{\circ}$ C 4 min,4 $^{\circ}$ C 4 min。Fgf21:第 1 个循环:50 $^{\circ}$ C 2 min 95 $^{\circ}$ C 10 min,40 个循环 95 $^{\circ}$ C 30 s 60 $^{\circ}$ C 30 s,Scap:第 1 个循环 50 $^{\circ}$ C 2 min 95 $^{\circ}$ C 10 min,40 个循环 95 $^{\circ}$ C 30 s 60 $^{\circ}$ C 30 s,荧光检测,并绘制熔解曲线和扩增曲线。验证基因及引物序列见表 1。

1.3 数据处理 首先对原始数据进行预处理和均一化处理。没有重复的数据采用倍数法和 Z 值法相结合的方法来进行差异基因的筛选,再对其他基因进行差异表达筛选和聚类分析。用 Gene Ontology(GO)功能分类标准对差异基因进行功能分类分析。用 Pathway 分析对差异表达基因进行生物信号通路分析。

表 1 设计的验证基因的引物序列

基因	引物序列
GAPDH	F:5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3' R:5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'
Fgf21 (142 bp)	F:5'- GACTGTGGGTCTGTCTCTCTGCTGC-3' R:5'-TCGGTGTCTGGTCGTCACTGT-3'
Scap (203 bp)	F: 5'- CTGGTGGTGGTTATTTGGGCT -3' R:5'-AGGCAGAACTCTTGGATGGC-3'

2 结 果

2.1 RNA 质量监控 见表 2。

2.2 差异基因的筛选分析

表 2 RNA 质量监控

组别	样本 ID	OD260/280 \geq 1.8	OD260/230 \geq 1.5	总数	RIN \geq 6	QC 结果
葱白提取物组	1R613070101-5A	2.01	2.07	17.38	6.80	通过
模型组	1R613070101-7A	2.01	2.31	20.98	7.40	通过

2.2.1 差异表达基因的聚类分析 模型组和葱白提取物组基因芯片检测数据标化后,根据差异倍数(fold change)筛选差异表达基因,选择标准如下:(1)LOG2|差异倍数|≥1 和 P<0.05(2)LOG2 比率=“NA”和样品强度两者之间的差异≥1 000;列出的葱白提取物与模型组差异表达基因以≥Ratio 值 2 倍标准筛选。筛选出表达上调 2 倍以上并有统计学意义的差异基因 59 个,其中表达上调的基因 16 个,表达下调的基因 43 个。

表 3 模型组和葱白提取物组差异表达基因列表

ID	基因名称	Ratio 值	
		上升	下降
0000091	Adtrp	5.612 237	
0014322	Tsku	3.224 748	
0010774	Cpt1b	3.058 147	
0015471	Fgf21	2.996 539	
0009393	Slc16a5	2.952 202	
0015017	Gpx2	2.887 306	
0002347	Cyp2j4	2.819 914	
0015901	Cox8b	2.570 820	
0020221	Gpx2	2.539 275	
0015678	Abcg2	2.448 984	
0019353	Cidea	2.268 283	
0004027	Grin2c	2.127 087	
0014765	Slc6a13	2.126 539	
0024225	Abcb1b	2.055 158	
0014753	Cidea	2.053 117	
0011752	Mme	2.041 460	
0008613	Sdr16c6		-4.795 855
0003250	Sds		-4.532 369
0010578	Lcn2		-4.110 884
0023415	Scd		-3.676 619
0001898	LOC100360095		-3.550 043
0013558	MGC105649		-3.174 834
0011862	Serpine1		-3.113 695
0021101	MGC105649		-3.092 709
0021902	Spp1		-3.084 049
0003057	Mmd		-3.078 351
0011656	Ubd		-3.039 112
0011083	Cxcl9		-2.634 988
0011272	A2m LOC1		-2.577 853
0000824	LOC360228		-2.567 775
0014107	Serp1b1a		-2.483 394
0001473	Gbp4		-2.465 079
0014846	Lilrb4		-2.432 311
0009677	Inmt		-2.335 653

续表 3 模型组和葱白提取物组差异表达基因列表

ID	基因名称	Ratio 值	
		上升	下降
0012831	RT1-Ba		-2.323 272
0005913	Dram		-2.299 391
0011792	RT1-Db1		-2.293 52
0002897	Fabp5		-2.265 078
0020404	RT1-Db2		-2.249 512
0004680	Gbp2		-2.219 128
0009289	Bcl2a1		-2.20 9400
0014351	Slpi		-2.209 085
0022664	Slc16a12		-2.174 145
0014480	Sctr		-2.171 636
0010522	Plac8 LOC1		-2.121 689
0007827	Ciita		-2.117 037
0014106	Capg		-2.113 429
0002658	C6		-2.107 990
0008057	Myo1f		-2.107 271
0009865	Slamf8		-2.075 122
0012512	Mmp9		-2.074 554
0004592	Plvap		-2.052 497
0021117	Scimp		-2.016 793
0002165	Cyp2c11		-2.015 219
	Fcgr2a		
	LOC498276		
0024197	LOC100911825		-2.007 791
	LOC100912098		
	LOC100912061		
	LOC100362543		
0013313	Tril		-2.007 239
0022653	NA		-2.001 307
0004091	Chi3l1		-2.000 037

2.2.2 差异表达基因的 GO 分析和 Pathway 分析 根据 KEGG 数据库,利用 DAVID 数据库的注释功能对差异性的表达基因进行注释及 GO 分析,对靶基因整合后进行显著性 Pathway 分析,结果显示肉碱棕榈酰转移酶 1B(carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle,Cpt1b)、诱导细胞死亡 DNA 片断化因子 a 样效应因子 A(cell death-inducing DFFA-like effector a,Cidea)、载脂蛋白 2(lipopalin 2,Lcn2)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶(stearoyl-coenzyme Adesaturase, Scd)、成纤维细胞生长因子 21(fibroblast growth factor 21, Fgf21)等可能在葱白提取物调节血脂异常方面发挥了重要作用,葱白调节血脂异常的导致差异表达的基因集中在能量代谢方面。而其他基因在血脂异常及其调节的研究方面罕见报道,也提示深入研究它们在

血脂异常中的作用具有一定的空间。

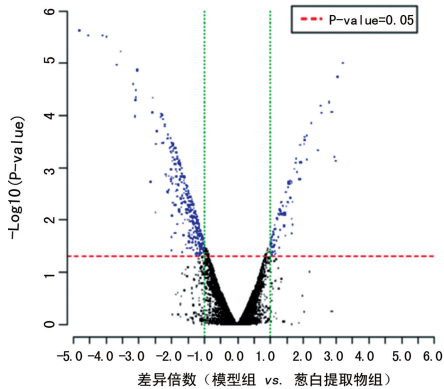
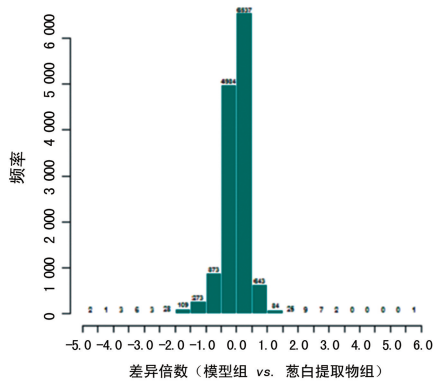
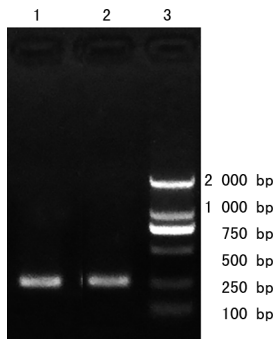


图 1 各组探针表达差异倍数统计图

2.3 实时荧光定量 PCR 验证结果 挑选相关基因 Fgf21 和非相关基因 Scap 去做 RT-PCR 验证, 结果表明和芯片结果一致。

2.3.1 各组大鼠肝组织 Fgf21 的表达 葱白提取物调节血脂的机制可能与上调 Fgf21 的表达有关。

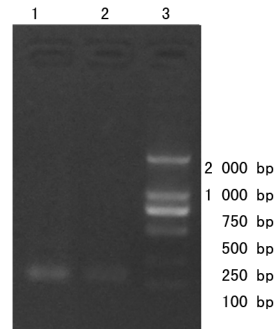


1: 葱白提取物组; 2: 模型组; 3: 内参

图 2 各组 GAPDH RNA 凝胶电泳图

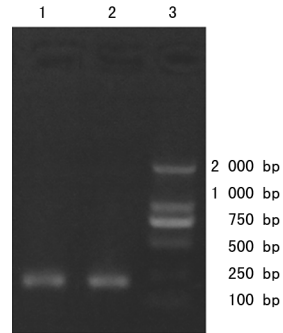
与模型组相比, 葱白提取物可以明显上调 Fgf21 的表达 (0.44 ± 0.01 vs. 0.65 ± 0.01 , $P < 0.05$), 与基因芯片结果一致。

2.3.2 各组大鼠肝组织 Scap 的表达 与模型组相比, 葱白提取物虽然可以减少 Scap 的表达, 但差异无统计学意义 (1.70 ± 0.15 vs. 1.41 ± 0.13)。基因芯片结果显示葱白提取物对 Scap 的表达影响不大, 二者结果一致。葱白提取物调节血脂的机制可能与减少 Scap 的表达关系不大。



1: 葱白提取物组; 2: 模型组; 3: 内参

图 3 各组 Fgf21 RNA 凝胶电泳图



1: 葱白提取物组; 2: 模型组; 3: 内参

图 4 各组 Scap RNA 凝胶电泳图

与模型组相比, 葱白提取物虽然可以减少 Scap 的表达, 但没有统计学意义 (1.70 ± 0.15 vs. 1.41 ± 0.13)。基因芯片结果显示葱白提取物对 Scap 的表达影响不大, 二者结果一致。葱白提取物调节血脂的机制可能与减少 Scap 的表达关系不大。

3 讨论

葱白提取物与高脂血症基因间存在着一定的关系, 基因芯片为高通量筛选技术, 可以将葱白提取物和基因有效地结合起来, 从而为探讨葱白提取物通过何种途径发挥辛温通阳调节血脂代谢作用机制提供可能。

血脂是血清中的胆固醇、TG 和类脂 (如磷脂) 等的总称, TG 主要存在于人体的脂肪组织中, 食物摄取的外源性 TG 经胰脂肪酶水解后由肠道吸收, 肝脏中内源性 TG 的合成由底物供给 (游离脂肪酸的可用性)、能量平衡 (肝糖原的储存水平) 和激素状态 (胰岛素与胰高血糖素之间的平衡) 所调节。本研究结果显示葱白提取物调节 TG 主要通过以下几个方面: 一方面通过调节相关信号通路影响脂肪酸转运降低 TG, 如 Cpt1b 是长链脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化的限速酶, Scd 是催化饱和脂肪酸第 9 位碳链形成 n-9 系单不饱和脂肪酸的关键酶。Scd 上升, 抑制 Cpt1b 的活性, 影响脂肪酸转运进入线粒体, 使已进入细胞的脂肪酸及其活化产物脂酰辅酶 A 沉积在胞质内, 在线粒体的外膜外难以顺畅地进入线粒体基质中进行 β 氧化以实现最终的能量生成, 从而加剧大量脂质堆

积。而葱白提取物可以减少 Scd 的表达的同时,使 Cpt1b 的表达上调,促进脂肪酸转运及其活化产物脂酰辅酶 A 进入线粒体基质中进行 β 氧化,生成能量,减轻脂质的沉积^[6]。

另一方面通过影响脂肪转化降低 TG。Fgf21 主要来源于肝脏,其过表达可促进游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)转化为酮体,三酰甘油水平下降^[7]。脂肪组织按形态和功能分为两种形式:白色脂肪组织(WAT)和棕色脂肪组织(BAT)。WAT 储存能量,BAT 则可加快体内代谢,促进能量消耗。Cidea 在棕色脂肪组织的线粒体中呈高表达,肥胖者脂肪组织中 Cidea 基因的 mRNA 表达水平降低,在体重减轻后可以恢复正常^[8-9]。而在白色脂肪组织中 Lcn2 表达显著增加,在前脂肪细胞分化成熟为脂肪细胞时 Lcn2 表达急剧增加^[10-12]。而葱白提取物调节血脂的机制可能与上调 Fgf21、Cidea 的表达,增加脂肪的利用、消耗及转运,同时下调 Lcn2 的表达减少前脂肪细胞分化为脂肪细胞,使脂肪贮存量下降,循环中的游离脂肪酸及甘油三酯减少^[13]。

另外,本课题组前期数据挖掘^[14-15]发现,葱白提取物具有良好的辛温通阳作用和降低 TG 作用,而高脂血症动物模型中,笔者发现能量代谢相关基因表达出现明显变化,如 Fgf21、Cpt1b、Cidea、Lcn2、Scd 等基因的表达异常,而辛温通阳中药葱白提取物可以调节这种表达异常,说明辛温通阳的分子机制可能与能量代谢相关。

本研究采用高通量芯片技术对葱白提取物辛温通阳作用及调血脂作用进行评价。考虑到数据有可能存在假阳性,本课题组在后期进行了特征基因的 RT-PCR 验证,结果具有一致性,证明本研究结果可靠。研究结果不仅揭示葱白提取物调节血脂的作用机制可能与上调 Fgf21、Cpt1b、Cidea,下调 Lcn2、Scd 基因的表达有关。而且提示了葱白提取物辛温通阳作用与能量代谢之间的关系。这为后续探讨葱白提取物辛温通阳作用的分子机制提供了思路。

参考文献

[1] 中国成人血脂异常防治指南制订联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(10): 937-953.

[2] 冯云霞, 朱旭, 杨帆, 等. 葱白提取物及其活性成分调节血脂的实验研究[J]. 中西医结合研究, 2013, 5(4): 181-183.

[3] 王勇. 搏心通胶囊对冠心病心绞痛患者血脂及血小板聚

集率的影响[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009: 3-13.

- [4] 朱浩. 葱白提取物防治冠心病心肌缺血临床和实验研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009: 5-25.
- [5] 邱服斌, 张海杰. 建立雄性 SD 大鼠高脂血症模型研究[J]. 中国预防医学杂志, 2010, 11(11): 1113-1115.
- [6] YU G S, LU Y C, GULICK T. Expression of novel isoforms of carnitine palmitoyltransferase I (CPT-1) generated by alternative splicing of the CPT-1beta gene[J]. Biochem J, 1998, 334(Pt 1): 225-231.
- [7] DUSHAY J, CHUI P C, GOPALAKRISHNAN G S, et al. Increased fibroblast growth factor 21 in obesity and nonalcoholic fatty liver disease [J]. Gastroenterology, 2010, 139(2): 456-463.
- [8] GUMMESSON A, JERNÅS M, SVENSSON P A, et al. Relations of adipose tissue CIDEA gene expression to basal metabolic rate, energy restriction, and obesity: population-based and dietary intervention studies [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(12): 4759-4765.
- [9] NORDSTRÖM E A, RYDÉN M, BACKLUND E C, et al. A human-specific role of cell death-inducing DFFA (DNA fragmentation factor-alpha)-like effector A (CIDEA) in adipocyte lipolysis and obesity [J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1726-1734.
- [10] WU Y, ZHANG Y. The role of lipocalin 2 in the regulation of inflammation in adipocytes and macrophages [J]. Mol Endocrinol, 2008, 22(6): 1416-1426.
- [11] WANG YU, LAM K S, KRAEGER E W, et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans [J]. Clin Chem, 2007, 53(1): 34-41.
- [12] ILLIAM-OLSSON I W, AHNMARK A. Liver-directed overexpression of mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase results in hepatic steatosis, increased triacylglycerol secretion and reduced fatty acid oxidation [J]. FASEB J, 2006, 20(12): 434-443.
- [13] REPA J J, LIANG G, OU J, et al. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta [J]. Genes Dev, 2000, 14(22): 2819-2830.
- [14] 冯云霞, 张介眉, 谢沛霖, 等. 基于数据挖掘探讨通阳中药的特点及分类 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(8): 856-860.
- [15] 冯云霞, 朱旭, 张介眉, 等. 葱白提取物对高脂血症大鼠脂质代谢的影响 [J]. 华南国防医学杂志, 2016, 30(9): 560-562.

(收稿日期: 2019-02-12 修回日期: 2019-06-03)