

- Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent ischemic events (CURE) trial. *Circulation*, 2004, 110 (10) : 1202 – 1208
- 4 Kulik A, Le May M, Wells GA, *et al.* The clopidogrel after surgery for coronary artery disease (CASCADE) randomized controlled trial; Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone after coronary bypass surgery. *Curr Control Trials Cardiovasc Med*, 2005, 6: 15
- 5 Patel JH, Stoner JA, Owora A, *et al.* Evidence for using clopidogrel alone or in addition to aspirin in post coronary artery bypass surgery patients. *Am J Cardiol*, 2009; 103 (12) : 1687 – 1693
- 6 Steinhubl SR, Berger PB, Brennan DM, *et al.* CREDO Investigators; Optimal timing for the initiation of pretreatment with 300 mg clopidogrel before percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47 (5) : 939 – 943
- 7 Hongo RH, Ley J, Dick SE, *et al.* The effect of clopidogrel in combination with aspirin when given before coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40 (2) : 231 – 237
- 8 Chu MW, Wilson SR, Novick RJ, *et al.* Does clopidogrel increase blood loss following coronary artery bypass surgery? *Ann Thorac Surg*, 2004, 78 (5) : 1536 – 1541
- 9 Leong JY, Baker RA, Shah PJ, *et al.* Clopidogrel and bleeding after coronary artery bypass graft surgery. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80 (3) : 928 – 933
- 10 Mehta RH, Roe MT, Mulgund J, *et al.* Acute clopidogrel use and outcomes in patients with non – ST segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48 (2) : 281 – 286
- 11 Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*, 2001, 409 (6817) : 145 – 147
- 12 Vincent Chan, Alexander Kulik, Michael Bourke, *et al.* Clopidogrel Is Safe Early after On – and Off – pump Coronary Artery Bypass Surgery. *J Card Surg*, 2007, 22 : 493 – 497

(收稿: 2010 – 03 – 09)

(修回: 2010 – 03 – 24)

快速老化小鼠 SAMP8 海马组织中基因表达谱的研究

戴大鹏 宋晓宁 郑君德 蔡剑平

摘 要 **目的** 观察快速老化小鼠 P8 (SAMP8) 与同龄正常老化小鼠 R1 (SAMR1) 海马组织中基因表达谱的差异。**方法** 选用 1、4、6、8、12 月龄的 SAMP8 小鼠, 用 SAMR1 作为对照组, 每组各 9 只, 快速处死后取海马组织提取总 RNA, 用纯化后的总 RNA 合成 cDNA 并标记荧光染料, 与 32k 小鼠寡核苷酸微阵列芯片杂交, 用共聚焦扫描仪 LuxScan™ 10KA 及 LuxScan 3.0 软件进行图像采集与数据处理, 用 SAM 软件分析差异表达的基因, 用 MAS 系统对差异基因进行通路 (pathway) 分析。**结果** 正常老化小鼠 SAMR1 各月龄间表达谱差异无显著性, 快速老化小鼠 SAMP8 各月龄间差异显著, 两种品系小鼠的比较结果显示 1 月龄、12 月龄基因表达差异最为显著, 6 月龄无显著差异。Pathway 分析结果显示 MAPK 信号通路的基因表达差异最为显著。**结论** SAMP8 小鼠与 SAMR1 小鼠海马的基因表达存在明显的差异, 以 MAPK 信号通路的基因表达差异最为显著。

关键词 快速老化小鼠 基因芯片 pathway 分析

Gene Expression Profiles in the Hippocampus of Senescence – accelerated Mouse SAMP8. Dai Dapeng, Song Xiaoning, Zheng Junde, Cai Jianping. The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Abstract Objective To explore the different expression patterns of senescence accelerated mouse substrain SAMP8 and control substrain SAMR1 in different month ages. **Methods** Nine SAMP8 and SAMR1 mice at 1, 4, 6, 8, 12 month age were sacrificed and 3 hippocampus of each set were pooled as one starting samples for RNA extraction. After being purified, some total RNAs were reverse transcribed and labeled for oligonucleotide microarray analysis with approximately 32 000 probes. After hybridization, slides were scanned with a confocal scanner LuxScan™ 10KA and the data were extracted from images using LuxScan 3.0 software. Differentially expressed genes were identified using SAM software and pathway analysis was performed using MAS platform which was constructed by CapitalBio Cor. **Results** Within each substrain, unsupervised clustering analysis revealed that SAMP8 mice showed different expression patterns in different month ages whereas SAMR1 mice were not. On the another hand, at the same month age, SAMP8 and SAMR1 mice at 1 month

基金项目: 科技部国际科技合作计划 (2006DFB31410), 卫生部北京医院面上项目 (BJ – 2008 – 77)

作者单位: 100730 卫生部北京医院、卫生部北京老年医学研究所、卫生部老年医学重点实验室 (戴大鹏、宋晓宁、郑君德、蔡剑平); 510120 广州医学院第一附属医院检验科 (郑君德)

通讯作者: 蔡剑平, 电子信箱: caijp61@vip.sina.com

and 12 month had largest differently expressed genes. Interestingly, mice at 6 month could not be detected having statistically differently expressed genes. Pathway analysis showed that most of these statistically expressed genes were involved in the MAPK signaling pathway.

Conclusion Expression patterns of SAMP8 and SAMR1 were significantly different in different month ages and the genes involved in MAPK signaling pathway had the largest numbers in all statistically expressed genes.

Key words Senescence - accelerated mouse; Gene chip; Pathway analysis

快速老化小鼠 SAM (senescence accelerated-mouse, SAM) 包括 SAMP (senescence accelerated - prone mouse, SAMP) 和 SAMR (senescence accelerated - resistant mouse, SAMR) 两种品系^[1]。SAMR 表现为正常老化, 一般作为 SAMP 的正常对照。快速老化小鼠 SAMP8 是 SAMP 系中的一个亚系, 主要以学习记忆能力障碍为老化特征, 其寿命约为 12.1 个月, 是目前公认的较理想的自然衰老模型^[2,3]。近年来大月龄 SAMP8 小鼠的研究表明, 在 SAMP8 海马及大脑组织内有 β 淀粉样蛋白 (A β) 前体的过表达, 近来还有报道在 SAMP8 小鼠脑组织中磷酸化的 tau 蛋白表达上调, SAMP8 小鼠已成为研究老年性痴呆 (又称 Alzheimer's disease, AD) 的理想动物模型^[4,5]。为了探讨 SAMP8 小鼠与对照 SAMR1 小鼠间基因表达的差异, 我们选用 1、4、6、8、12 月龄的 SAMP8 小鼠与对照组 SAMR1 小鼠海马组织开展了寡核苷酸微阵列芯片研究, 通过检测 5 个时间点基因表达的差异, 较系统的比较了 SAMP8 小鼠与对照组小鼠 SAMR1 间基因表达模式的异同, 为老化及老年性痴呆的发病机制研究提供理论依据。

材料与方法

1. 动物及分组: 所用 SAMP8 及 SAMR1 小鼠均由天津中医药大学附属第一医院实验动物中心提供。选取 1、4、6、8、12 月龄 SAMP8 小鼠每个月龄各 9 只为实验组, 相同条件的同龄 SAMR1 小鼠为对照组。两者均置于 SPF 环境中饲养: (24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 12h 光照/黑暗, 7:00am 给光。

2. 方法: (1) 总 RNA 的提取: 每个月龄 SAMP8 和 SAMR1 小鼠各 9 只, 快速处死后冰上迅速解剖取海马组织, 每 3 只小鼠材料混合作为一个起始材料, 利用 Trizol 试剂 (美国 Life technologies 公司) 提取总 RNA, 用 RNeasy mini kit (美国 Qiagen 公司) 纯化所得 RNA。 (2) 基因芯片杂交: 取 5 μ g 纯化后的 RNA 参考文献^[6,7] 合成 cDNA 并标记荧光染料。cDNA 经 PCR Clean-up NucleoSpin kits (德国 Macherey Nagel 公司) 纯化后与 32k 小鼠寡核苷酸微阵列芯片 (北京博奥生物芯片公司) 杂交, 用共聚焦扫描仪 LuxScanTM 10KA 及其相关软件 LuxScan 3.0 进行图像采集与数据处理。 (3) 基因芯片数据分析: 用 Stanford 大学 SAM 软件^[8] 分析扫描后的芯片数据, 参数设置为 ≥ 2 倍差异, $q < 0.001$, 用北京博奥生物芯片公司 MAS 系统进行通路 (pathway) 分析。

结 果

1. 同品系小鼠不同月龄间的基因表达模式: 为研究 SAMP8 和 SAMR1 同品系不同月龄间基因表达模式的差异, 利用 SAM 软件对同品系小鼠不同月龄间的实验数据进行非监督聚类分析, 结果如 135 页彩图 1 所示, 快速老化小鼠 SAMP8 可分为两组, 1、4 月龄小鼠基因表达类似, 且与 6、8、12 月龄小鼠基因表达显著异同; 对照组 SAMR1 小鼠各月龄间基因表达模式差异较小, 不能明显区分为两群。

2. 同月龄不同品系小鼠间的基因表达模式: 为研究 SAMP8 和 SAMR1 同一月龄小鼠间基因表达模式的差异, 利用 SAM 软件对同月龄的两种品系小鼠的实验数据进行监督聚类分析, 共有 2525 个基因在两种小鼠间的表达差异达到显著性水平 (图 1)。进一步分析显示, 1 月龄时两种品系小鼠间的差异表达基因数目最多, 12 月龄次之, 而 6 月龄时两者之间无显著性差异, 两种品系小鼠基因表达的整体趋势为先下降后又上升的表达模式。

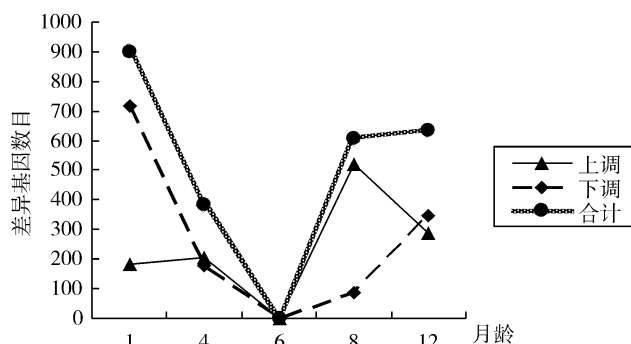


图 1 同一月龄 SAMP8/SAMR1 差异基因数目分布图

3. 两种品系小鼠间表达差异显著的基因: 各月龄组 SAMP8 和 SAMR1 海马组织中表达有显著性差异的基因, 用 MAS 系统进行通路 (pathway) 分析的结果显示, 属于 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、刺激神经的配体受体相互作用通路 (neuroactive ligand - receptor interaction)、细胞黏附因子通路 (cell adhesion molecules) 的差异基因最多 (表 1), 各月龄间整体表达差异最为显著的 24 个基因见表 2。

表 1 同一月龄 SAMP8/SAMR1 差异显著的基因 pathway 分析结果

信号通路	包含基因数	<i>P</i>	<i>Q</i>
MAPK 信号通路	17	0	0
刺激神经的配体受体相互作用通路	14	0	0
细胞黏附因子	13	0	0
甘油磷酸酯代谢	6	2.70E-05	0
Wnt 信号通路	7	1.55E-04	0
黏着斑	9	2.75E-04	0
白细胞跨内皮迁移	7	3.88E-04	0
阿尔茨海默病	4	6.94E-04	0
嘌呤代谢	6	0.001027	0
T 细胞受体信号通路	5	0.001118	0
硒基氨基酸代谢	3	0.001581	0
1 型糖尿病	4	0.001644	0
牛磺酸次牛磺酸代谢	2	0.001723	0
磷脂酰肌醇信号系统	4	0.002822	0
磷脂酰肌醇生物合成	2	0.003977	0

讨 论

对快速老化小鼠 SAMP8 的基因表达或蛋白表达的研究是老化研究领域一个感兴趣的课题,在这一小鼠模型的早期研究中多利用差异显示^[9]、反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)^[10]、免疫组化^[11]、二维蛋白电泳^[12]等技术,发现了少量差异表达的基因或蛋白。近年来,基因芯片技术的发展使得大规模研究差异基因成为可能,国际上开始出现对 SAMP8 小鼠的基因芯片研究报道,但多以 4 月和 12 月龄小鼠为实验材料,未能动态反映整个发育过程中 SAMP8 小鼠独特的基因表达模式^[13-15]。为此,本研究选取 1、4、6、8、12 月龄的 SAMP8 小鼠与对照 SAMR1 小鼠海马组织开展寡核苷酸微阵列芯片研究,通过检测 5 个时间点基因表达的差异,较系统的比较了 SAMP8 小鼠海马组织在增龄过程中的基因表达模式与正常老化

表 2 同一月龄 SAMP8/SAMR1 差异最为显著的基因列表

NCBI 登录号	SAMP8/R1 比值	基因	基因全称
NM_011888	79.59	Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
NM_207682	6.36	Kif1b	Kinesin family member 1B
NM_007509	3.96	Atp6v1b2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit B2
NM_144838	3.67	Sgtb	small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing, beta
NM_013915	3.10	Zfp238	zinc finger protein 238
NM_021710	1.82	Ap4s1	adaptor-related protein complex AP-4, sigma 1
NM_017400	1.78	Sh3gl3	SH3-domain GRB2-like 3
NM_019793	1.68	Tspan3	tetraspanin 3
NM_023277	1.57	Jam3	Junction adhesion molecule 3
NM_030236	1.56	Fbxo34	F-box protein 34
NM_018824	1.54	Slc23a2	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2
NM_020012	1.53	Rnf14	ring finger protein 14
NM_026921	1.53	IscA1	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog (S. cerevisiae)
NM_024176	0.67	Drap1	Dr1 associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha)
NM_008997	0.65	Rab11b	RAB11B, member RAS oncogene family
NM_010731	0.65	Zbtb7a	zinc finger and BTB domain containing 7a
NM_153597	0.63	Trpt1	tRNA phosphotransferase 1
NM_016658	0.62	Galt	galactose-1-phosphate uridyl transferase
NM_023524	0.60	Tfpt	TCF3 (E2A) fusion partner
NM_029629	0.56	Fahd2a	fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 2A
XM_354546	0.53	Cabin1	Calcineurin binding protein 1
NM_011125	0.51	Pltp	Phospholipid transfer protein
NM_022418	0.43	Tmub1	Transmembrane and ubiquitin-like domain containing 1
NM_009003	0.22	Rab4a	RAB4A, member RAS oncogene family

对照小鼠 SAMR1 的差异。我们的研究结果显示, SAMP8 小鼠在不同时间点上的基因表达变化显著, 6 月龄之前与之后基因表达模式明显不同, 而 SAMR1 小鼠的各月龄间差异相对较小(135 页彩图 1)。最近,本研究小组对 SAMP8 小鼠的研究结果已经显示, SAMP8 小鼠出现的快速老化及学习记忆能

力的显著性下降^[16],同步于淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)表达量的显著性增加,也与 MTH2 蛋白表达量的显著性下降同步^[17,18]。我们用免疫印迹法检测 SAMP8 小鼠海马总蛋白中 MTH2 蛋白的表达结果表明,从 SAMP8 小鼠 4 月龄开始 MTH2 蛋白的表达量即与正常对照组呈现显著性差

异,由于学习记忆能力的显著减退及快速老化特征的出现始于8月龄,因此我们推测,在AD的发病过程中,海马神经元细胞内抗氧化机制的缺陷早于海马神经元细胞中氧化损伤累积的增加^[17,18]。本研究结果与我们的前期研究相符,表明随着SAMP8小鼠快速老化特征的出现,海马组织内基因表达模式也发生了显著变化。本研究结果表明,虽然在SAMP8小鼠的幼年期与SAMR1小鼠之间其行为学的表现无明显差异,但在基因表达水平,两者之间已存在很大差异,这种巨大差异反映出虽然两种品系小鼠具有一定的亲缘关系,但在遗传背景上两者的差异是显著的^[16]。另一方面,本研究结果也表明,随着月龄的增加,两种品系小鼠之间基因表达的差异逐渐缩小,至6月龄时两者几乎无显著性差异,但随后又随增龄而急剧增加(图1),这种独特的表达模式目前尚未见报道,其生物学意义有待进一步研究。

本研究通过对SAMP8及SAMR1两种品系小鼠不同月龄时间基因表达谱的分析,显示随月龄增加,两种品系小鼠之间差异表达基因的数目先减少,后又迅速增加的独特表达模式,为老化及老年性痴呆发生机制研究提供了新的思路。

参考文献

- 1 Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, *et al.* A new murine model of accelerated senescence[J]. *Mech Ageing Dev*, 1981, 17(2): 183 - 194
- 2 Okuma Y, Nomura Y. Senescence - accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach[J]. *Jan J Pharmacol*, 1998, 78(4): 399 - 404
- 3 Nomura Y, Okuma Y. Age - related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice [J]. *Neurobiol Aging*, 1999, 20(2): 111 - 115
- 4 Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, *et al.* β - Amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory [J]. *Peptides*, 2000, 21(12): 1761 - 1767
- 5 Alonso AC, Zaidi T, Novak M, *et al.* Interaction of tau isoforms with Alzheimer's Disease abnormally hyperphosphorylated tau and in vitro phosphorylation into the disease - like protein [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 37967 - 37973
- 6 Guo Y, Guo H, Zhang L, *et al.* Genomic analysis of anti - hepatitis

- B virus (HBV) activity by small interfering RNA and lamivudine in stable HBV - producing cells [J]. *Journal of virology*, 2005, 79(22): 14392 - 14403
- 7 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]. *Nature biotechnology*, 2006, 24(9): 1140 - 1150
- 8 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(9): 5116 - 5121
- 9 Wei X, Zhang Y, Zhou J. Differential display and cloning of the hippocampal gene mRNAs in senescence accelerated mouse [J]. *Neurosci Lett*, 1999, 275(1): 17 - 20
- 10 Wei X, Zhang Y, Zhou J. Alzheimer's disease - related gene expression in the brain of senescence accelerated mouse [J]. *Neuroscience Letters*, 1999, 268(3): 139 - 142
- 11 Tanka J, Okuma Y, Tomobe K, *et al.* The age - related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence - accelerated mouse (SAM) P8: a quantitative immunohistochemical study [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(4): 615 - 618
- 12 Nabeshi H, Oikawa S, Inoue S, *et al.* Proteomic analysis for protein carbonyl as an indicator of oxidative damage in senescence - accelerated mice [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(11): 1173 - 1181
- 13 Cheng XR, Zhou WX, Zhang YX, *et al.* Differential gene expression profiles in the hippocampus of senescence - accelerated mouse [J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(4): 497 - 506
- 14 Carter TA, Greenhall JA, Yoshida S, *et al.* Mechanisms of aging in senescence - accelerated mice [J]. *Genome Biol*, 2005, 6(6): R48
- 15 Kumar VB, Franko MW, Farr SA, *et al.* Identification of age - dependent changes in expression of senescence - accelerated mouse (SAMP8) hippocampal proteins by expression array analysis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(3): 657 - 661
- 16 蔡剑平, 黑爱莲. 快速老化痴呆模型小鼠SAMP8学习记忆能力的增龄性变化 [J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2005, 12(4): 219 - 222
- 17 郑君德, 宋晓宁, 蔡剑平. MTH2蛋白在快速老化P8小鼠海马中表达的增龄性变化 [J]. *中华老年医学杂志*, 2008, 27(7): 537 - 540
- 18 Zheng JD, Hei AL, Zou PP, *et al.* Age - related alterations in the expression of MTH2 in the hippocampus of the SAMP8 mouse with learning and memory deterioration [J]. *J Neurol Sci*, 2009, 287(1): 188 - 196

(收稿: 2010 - 03 - 30)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统启事

自2010年起,《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统,请各位作者登陆《医学研究杂志》网站: <http://www.yxyjzz.cn>, 注册登陆投稿系统, 填写作者相关信息后进行投稿。咨询电话: 010 - 52328679 (单政)。

《医学研究杂志》编辑部