

胶原诱导性关节炎大鼠肝细胞基因表达的变化

李 莉¹, 申秀萍², 景小龙², 郭传敏², 刘 静^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院有限公司, 天津 300193

摘要: **目的** 通过研究胶原诱导性关节炎大鼠肝组织基因表达谱, 探讨类风湿性关节炎的发病机制。**方法** 采用 dChip (Dec.2009 version) 分析软件 lower bound fold change 方法分析表达差异 1.5 倍以上基因, 芯片类型为 GeneChip Rat Genome 230, 基因库为 Affymetrix Gene, 参考 GenBank 基因库, 功能通路参考 KEGG 数据库。用大鼠全基因表达谱芯片研究胶原诱导性关节炎及正常大鼠肝组织基因表达谱, 比较模型大鼠及正常大鼠肝组织基因表达的差异。**结果** 结果显示, 胶原诱导性关节炎大鼠差异表达基因有 1 009 个, 其中上调基因 480 个, 下调基因 529 个。差异表达基因主要涉及生物过程调控、刺激反应、细胞通信、细胞周期的负调控、免疫反应、应激反应、血管生成、内皮细胞分化等功能。涉及的代谢及信号通路主要有细胞凋亡通路、钙调节通路、TGF- β 通路、凝血功能通路、炎症反应通路等通路。模型组差异表达上调的基因主要有 *Aldh1a7*、*Bad*、*Gdf10*、*Ccar2*、*Slc1a3*、*Il1b*、*Il7*、*Vegfb*、*IgG-2a* 等, 差异表达下调的基因主要有 *Ugt2b*、*Mx2*、*Usp18*、*Comt*、*Zfp354a*、*Oas1a*、*G1p2*、*Irf7* 等。**结论** 胶原诱导性关节炎是一个涉及多基因表达异常的全身免疫性疾病, 筛选到的差异表达基因初步反映了类风湿性关节炎的发病机制, 为类风湿性关节炎的防治提供重要线索。

关键词: 基因表达谱; 胶原性关节炎; 基因芯片; 微阵列; DNA

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)05-0727-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.005

Analysis on etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis by gene chip technology

LI Li¹, SHEN Xiu-ping², JING Xiao-long², GUO Chuan-min², LIU Jing²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To better understand pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) and to facilitate the search for novel RA therapeutics, we studied collagen-induced arthritis rat hepatic tissue genes profile expression. **Methods** Using DNA microarray technology, the hepatic tissue genes profile expression of the collagen-induced arthritis rats and the normal rats was compared. Hepatic tissue was purified and total RNA was processed for a microarray analysis using Affymetrix Gene Chip technology. Statistical comparison analysis identified differentially expressed genes that distinguished CIA from control rats. **Results** Clustering analysis indicated that 1009 genes expression of rats with collagen-induced arthritis were differences compared with normal rats, including 480 up-regulated genes and 529 down-regulated genes. Differential genes involved in the function group of regulation of cellular process, stimulation, cell communication, vasculature development, immune response, inflammation, and the pathway of apoptosis, oxidative stress, blood clotting cascade, TGF Beta signaling pathway, and so on. The major overexpressed genes were *Aldh1a7*, *Bad*, *Gdf10*, *Ccar2*, *Slc1a3*, *Il1b*, *Il7*, *Vegfb*, and *IgG-2a*, and the major underexpressed genes were *Ugt2b*, *Mx2*, *Usp18*, *Comt*, *Zfp354a*, *Oas1a*, *G1p2*, and *Irf7*. **Conclusion** The collagen-induced arthritis is a systemic immune disease involving multi-genes abnormal expression. The abnormal genes could initially reflect the pathogenesis of rheumatoid arthritis, and provide important clues for the prevention and treatment of RA.

Keywords: gene expression; collagen-induced arthritis; gene chip; microarray; DNA

收稿日期: 2016-03-25

作者简介: 李 莉 (1986—), 博士生, 研究方向为中医药抗肿瘤基础研究。

*通信作者 刘 静 (1980—), 硕士, 副研究员, 药理毒理。E-mail: liuj@tjipr.com

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性系统性自身免疫疾病^[1], 好发于对称分布的腕、踝等小关节, 具有病程长、致残率高、预后差的特点, 严重时可出现程度不等的关节畸形、骨骼肌萎缩甚至终身残疾。

基因表达谱芯片主要是利用分子生物学中的核酸分子碱基之间互补配对的原理, 与传统的核酸杂交相比更加高效、准确。目前已广泛应用于临床疾病的筛查、诊断、疾病相关基因的发现, 药物的作用机制及药物筛选等等领域^[2-4]。

II型胶原免疫大鼠诱发的关节炎模型 (CIA) 是接近人类 RA 较理想的关节炎模型之一^[5], 目前研究热点在于 CIA 模型动物滑膜细胞基因的表达研究。RA 的发生发展是一个多基因表达失常的复杂过程, 现代医学对于 RA 具体发病机制尚不明确。但有研究显示, 在人类和动物发生感染或出现炎症反应时, 众多的肝源性蛋白参与了炎症反应的病理生理过程。研究 RA 发病过程中肝源性蛋白表达的变化可能有助于研究 RA 的发病机制及寻找治疗靶点。通过基因芯片技术对 CIA 大鼠模型组与对照组的肝细胞基因差异性进行筛选和研究分析比较, 从众多基因中聚类分析, 寻找关于 CIA 的致病靶基因。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠, SPF 级。动物合格证号: SCXK (津) 2009-0001。由天津市山川红实验动物科技有限公司繁殖提供。体质量 120~140 g。

1.2 主要试剂

鸡源性 II 型胶原 (Sigma, 批号 020M4059); 弗氏完全佐剂 (Sigma, 批号 050M8702); GeneChip 3' IVT Express Kit (Affymetrix, 批号 0909015); Rneasy Mini Kit (QIAGEN, 批号 136232630); Nuclease-free Water (Ambion, 批号 0908151); Water, Molecular Biology Grade (Cambrex, 批号 0000077674); Bovine Serum Albumin (BSA) solution (50 mg/mL), Invitrogen Life Technologies (批号 665042); Herring Sperm DNA (Promega Corporation, 批号 27354408); 5 mol/L NaCl (Ambion, 批号 10040100); MES hydrate SigmaUltra (Sigma-Aldrich, 批号 065K54051); MES Sodium Salt (Sigma-Aldrich, 批号 097K54241); EDTA Disodium Salt, 0.5 mol/L solution (Sigma-Aldrich, 批号 0808006); DMSO (Sigma-Aldrich, 批号

108K0185); 10%Surfact-Amps 20(Tween-20)(Pierce Chemical, 批号 KD132406); R-Phycoerythrin Streptavidin [Molecular Probes, 批号 673582 (S866)]; 20X SSPE [Cambrex, 批号 0000151031 (51214)]; Goat IgG, Reagent Grade [Sigma-Aldrich, 批号 047K7435 (I5256)]; Anti-streptavidin antibody (goat), biotinylated, Vector Laboratories [V0430 (BA-0500)]; MOPS, Free Acid, MB Grade, Calbiochem, D00070894 (475922); Bleach (5.25% Sodium Hypochlorite) 500 mL, Sigma-Aldrich, 050K0237(239205); Agarose, BBI, GS1024B1008C; GelRed, BIOTIUM, 10G0318。

1.3 主要仪器

实验平台: 本实验所采用的是 Affymetrix GeneChip 3000 TG System, 具体包括: Scanner 3000 7G 4C with Autoloader, Scanner 3000 Workstation, Fluidics Station 450, Hybridization Oven 640; DK 型电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); QZX-C 空气浴振荡器 (哈尔滨市东明医疗仪器厂); Heatblock (CHB-202&HB-202) (杭州博日); Gel Electrophoresis Unit (北京六一仪器厂); GeneAmp PCR System 9700 金版 (Applied Biosystems); Centrifuge (5415D) (Eppendorf); 磁力架 (Invitrogen); Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 1.5 mL, Axygen; Sterile, RNase-free, microcentrifuge vials, 0.2 mL, Axygen; Micropipettors (P-2.5, P-10, P-20, P-100, P-200, P-1000) (Eppendorf); Sterile-barrier, RNase-free pipette tips, Axygen; powder-free gloves, Sfsai; Centrifuge Tube (15 mL, 50 mL), Corning; 0.2 μ m filter, Millipore; Tough-Spots, USA Scientific; 芯片类型: Affymetrix Rat-2.0 microarray; 分析软件: dChip (Dec.2009 version)。

2 实验方法

随机选取体质量 120~140 g 的雄性 Wistar 大鼠 20 只, 对照组及模型组每组各 10 只。按文献方法^[6]建立胶原关节炎模型大鼠, 将鸡 II 胶原 (CII) 溶于 0.1 mol/L 冰醋酸中, 质量浓度为 2 mg/mL, 在 2~8℃下搅拌使之充分溶解, 置于 2~8℃冰箱中过夜。在冰浴条件下在 CII 中加入等体积的 CFA, 并使二者充分乳化。模型组每只大鼠背部及尾部皮内多点注射 0.5 mL CII 佐剂混合乳液 (1 mg/mL), 对照组大鼠皮内注射等量 0.05 mol/L 冰醋酸。7 d 后同法再

次免疫。

3 测定指标

3.1 关节肿胀度

从加强免疫后第4天起,测每只大鼠左后足踝周长,2次/周,连续测量6次,以左后足踝周长作为肿胀度观察指标。

3.2 全身表现评分、关节肿胀数、关节炎指数

于造模后第25天参考文献^[7]对全身的继发性病变全身表现进行评分(表1),每只动物的评分相加得全身表现评分,最大评分8分。计算关节肿胀

数及关节炎指数。

胶原关节炎模型关节肿胀数评分标准:每只足趾计一个踝关节和5个指(趾)关节,每只鼠最多24个关节肿胀。

胶原关节炎模型关节炎指数评分标准:0分为正常;1分为踝关节出现红斑和轻微肿胀;2分为踝关节到趾、掌关节出现红斑和轻微肿胀;3分为踝关节到趾、掌关节出现红斑和中度肿胀;4分为踝关节到趾关节出现红斑和重度肿胀。最大评分为16分。

表1 胶原关节炎模型继发性病变全身表现评分标准

Table 1 Scoring criteria of systemic manifestations of secondary lesions in collagen arthritis model

评分项目	0分	1分	2分
耳	无结节和发红症状	一只耳朵有结节和发红症状	两只耳朵有结节和发红症状
鼻	无结缔组织的肿胀	强烈的结缔组织肿胀	
尾	无结节	有结节	
前爪	无肿胀	一个前足趾肿胀	两个前足趾肿胀
后爪	无肿胀	一个后足趾肿胀	两个后足趾肿胀

3.3 关节病理观察

于末次给药后1h,麻醉大鼠,腹主动脉取血后取所有动物的左后足踝关节,12%甲醛溶液固定,脱钙,酒精逐级脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE常规染色。光镜下观察滑膜、软骨、骨的病理改变。

3.4 肝组织基因芯片表达

于再次免疫后25d,麻醉后打开腹腔,取肝组织保存于液氮中。各样品提取并纯化总RNA,利用T7-(dT)24做为引物,在反转录酶的作用下,由RNA反转录成单链cDNA,同时掺入poly-A control,42℃反应2h,以所合成的单链cDNA为模板,RNA片段为引物,在DNA Polymerase作用下合成双链DNA,并两端补平,16℃反应1h,65℃反应10min。合成并纯化aRNA后,将aRNA片段化、配制杂交液,进行芯片杂交、洗脱、扫描,采用dChip(Dec.2009 version)分析软件 lower bound fold change 方法分析表达差异1.5倍以上基因,差异表达基因包括:(1)对照组肝细胞和模型组肝细胞中均存在;(2)对照组肝细胞中未表达,仅在模型组肝细胞表达的;(3)在对照组中表达较高,但模型组不表达的。芯片类型:GeneChip Rat Genome 230, 基因库为 Affymetrix

Gene, 参考 GenBank 基因库,功能通路参考 KEGG 数据库。

4 统计方法

采用 SPSS 11.5 One-Way ANOVA (单因素方差分析, LSD) 对计量数据进行统计分析;采用 dChip (Dec.2009 version) 分析软件 lower bound fold change 方法分析表达差异 1.5 倍以上基因;采用 Excel 对差异表达基因按功能分类、差异表达基因按通路分类等作图。

5 结果

5.1 关节肿胀度

由表2可见,与对照组比较,模型组大鼠注射足对侧在加强免疫后第4天即出现明显的肿胀,在第14天达到肿胀高峰,出现了严重的踝关节及趾关节肿胀变形,踝关节周长显著增加,证明 CIA 大鼠造模成功。

5.2 全身表现评分、关节肿胀数、关节炎指数

全身表现评分、关节肿胀数、关节炎指数结果显示(表3),与对照组比较,模型组大鼠耳、鼻、尾、前爪及后爪有显著的继发性病变,耳廓有显著的结节、发红,鼻端结缔组织肿胀明显,尾部有结节,前爪发红,部分前爪趾关节肿胀,后爪肿胀明显。

表2 两组大鼠左后足踝关节周长的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 2 Comparison on left ankle circumference between two groups ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	造模后不同时间左后足踝关节周长/cm						
	4 d	7 d	10 d	14 d	17 d	21 d	25 d
对照	2.23±0.05	2.23±0.05	2.26±0.07	2.29±0.02	2.28±0.04	2.28±0.05	2.33±0.04
模型	2.61±0.08 ^{###}	2.86±0.21 ^{###}	2.91±0.24 ^{###}	3.02±0.20 ^{###}	3.03±0.17 ^{###}	3.13±0.17 ^{###}	3.14±0.17 ^{###}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group表3 CIA大鼠继发全身性病变评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 3 Secondary systemic lesion scores of CIA rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	剂量/(g·kg ⁻¹)	全身表现评分/分	关节肿胀数/个	关节炎指数/分
对照	—	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
模型	—	6.6±1.3 ^{###}	21.1±4.2 ^{###}	13.8±1.8 ^{###}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group

5.3 关节病理观察

对照组大鼠踝关节结构正常,滑膜组织无充血水肿,滑膜细胞无增生现象,无血管翳形成,关节软骨表面光滑平整,无剥脱现象,关节软骨下骨小梁大小、排列正常。模型组大鼠踝关节可见明显的滑膜细胞增生,排列紊乱,滑膜组织充血水肿,毛细血管增生,并可见炎细胞浸润;增生的滑膜组织形成绒毛状,伸向关节腔,或向软骨面爬行形成血管翳。关节软骨剥脱,可见关节腔内有剥脱的关节软骨及滑膜组织。见图1。

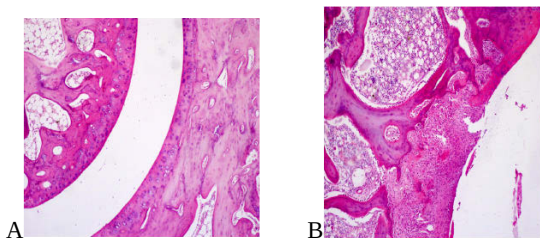


图1 ig给药3周对照组(A)和模型组(B)大鼠的踝关节图

Fig.1 Ankle joint of control group (A) and model group (B) after ig administration for 3 weeks

5.4 肝组织基因芯片检测结果

结果显示,共筛选出模型组与对照组肝组织表达显著差异的基因1 009个,其中480种基因表达水平上调,529种基因表达下调;(1)对照组和模型组都表达的基因有708个,其中上调基因332个,下调基因376个;(2)对照组未表达,仅模型组表达的基因有148个;(3)在对照组中表达较高,但

模型组不表达的基因有153个。结果说明RA的发病是多因素多基因共同作用的结果。模型组与正常组肝组织差异表达的1 009种基因可能参与了RA的发生和发展,对以上基因进行研究有助于阐明RA的发病机制和找到新的疾病相关靶点。

差异表达基因按功能分类统计见图2,代谢及信号通路统计见图3。由图2、3可知,与对照组比较,模型组差异表达基因主要涉及生物过程调控、刺激反应、细胞通信、细胞周期的负调控、免疫反应、应激反应、血管生成、内皮细胞分化等功能。涉及的代谢及信号通路主要包括细胞凋亡通路、钙调节通路、TGF- β 通路、凝血功能通路、炎症反应通路等。其中涉及炎症反应、免疫应答、增殖侵袭、细胞周期调控等多种病理过程。

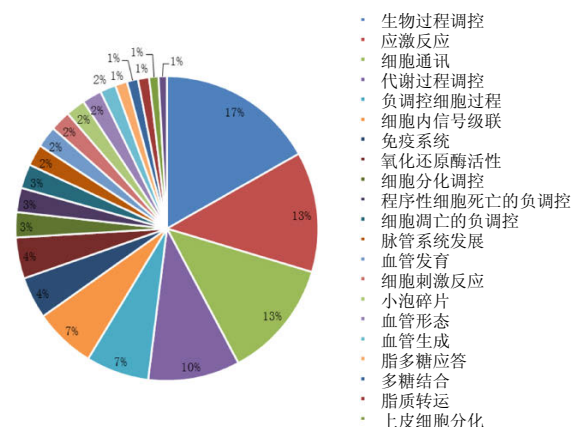


图2 差异表达基因按功能分类

Fig.2 Differentially expressed genes by functional classification

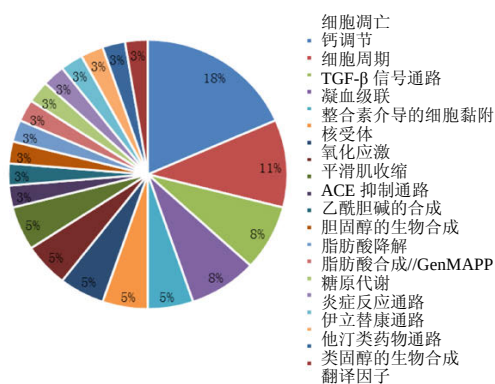


图3 差异表达基因按代谢及信号通路分类

Fig. 3 Differentially expressed genes by pathway

上调基因包括: *Aldh1a7*、*Bad*、*Gdf10*、*Ccar2*、*Slc1a3*、*Il1b* (IL-1 β)、*Il7* (IL-7)、*Vegfb*、*IgG-2a*、*RGD1564865*、*A2m* 等, 其中 *Aldh1a7* 上调最显著。上调的基因中有许多如 *Aldh1a7*、*Ccar2*、*Vegfb* 都与 RA 的类肿瘤性质相关, 如细胞增殖、黏附、细胞周期调控及侵袭。Chou 等^[8]对人膝关节胫骨平台进行 RNA 表达检测, 结果显示 *Gdf10* 基因与关节软骨退变及软骨下骨病理学结构改变有关, *Slc1a3*、免疫相关的 *RGD1564865*、*Il1b* 参与炎症反应通路; 凝血功能通路的蛋白酶抑制剂 *A2m*, 亦可调节控制炎症反应^[9]。

下调基因包括: *Ugt2b*、*Mx2*、*Usp18*、*Comt*、*Zfp354a*、*Oas1a*、*G1p2*、*Irf7*、*1Akr1c1*、*Ppp1r3c*、*Dusp1* 等, 其中 *Ugt2b* 下调最显著。具有免疫调节功能的干扰素 *Mx2*、干扰素调节因子 *Irf7* 能对干扰素所有反应进行调节, 被认为是依赖于 I 型干扰素的免疫反应的重要调节者, 泛素特异性蛋白酶 *Usp18*、儿茶酚-O-甲基转移酶 *Comt*、2'-5'寡腺苷酸合成酶 *Oas1a*、II 型成对免疫球蛋白样受体、参与炎症反应通路的醛-酮还原酶 1c 家族 *1Akr1c1*、蛋白磷酸酶 I、*Ppp1r3c*、*Dusp1* 在细胞内主要催化已活化的 MAPK 家族成员 (p38、JNK、ERK) 特异性基序 TxY 中磷酸基团的水解, 抑制其活性, 从而减轻炎症反应^[10]。

由结果可知 (表 4、5), 模型组在关节炎发生过程中, 应激反应相关蛋白启动, 并进一步引起免疫反应、血管生成、细胞凋亡、物质代谢等相关蛋白基因表达变化。

6 讨论

以胶原诱导性关节炎为研究对象, 利用基因表达谱芯片技术寻找在 RA 发展过程中表达发生变化

的基因, 试从结果中寻找与 RA 发病机制相关的关键分子。

6.1 对 *Aldh1a7* 的影响

值得注意的是 *Aldh1a7* 上调最显著, *Aldh1a7* 是存在于细胞内具有解毒作用的醛脱氢酶, 是新发现的肿瘤干细胞标记分子, 具有自我更新能力和侵袭能力。该基因过表达可能与肿瘤患者预后差、转移率高有关, 推测 *Aldh1a7* 增殖与侵袭转移方面的特性可能与 RA 的异常增殖的类肿瘤性质以及对软骨的侵袭破坏有关。因此设想, 该分子可能成为今后 RA 治疗中的又一新的待选靶点。

6.2 对 *Ugt2b* 的影响

二相代谢酶 *Ugt2b* (UDP 糖基转移酶 2 家族, 多肽 B) 下调最显著。同一个功能蛋白会有好几个基因位点表达, 可能为同工酶。文献报道^[11], 佐剂诱导的关节炎模型中, 大鼠注射佐剂后 3 d, 肝组织 *Ugt2b* 的 mRNA 水平显著下降, *Ugt2b* 可能参与 RA 发病。研究表明, *Ugt2b* 主要参与戊糖、葡萄糖醛酸转换、抗坏血酸代谢、甾体 (雌激素、雄激素) 激素代谢、维生素 A 的代谢、细胞色素 P450 的异物代谢等。*Aldh1a7* 参与维生素 A 代谢, 代谢产物是视黄酸盐 (Retinoate), 而 *Ugt2b* 则将视黄酸盐进一步代谢为 Retinoyl- β -glucuronide。*Aldh1a7* 上调, *Ugt2b* 下调会导致视黄酸盐增加。维生素 A、视黄酸盐、*Aldh1a7*、*Ugt2b* 在 RA 的发病中参与的作用及机制尚不明确, 还有待于进一步研究。通过对 TGF- β 激活激酶 1 (TAK1)-TAK1 结合蛋白 1 (TAB1) 复合物的去泛素化调节, *Usp18* 可调控 T 细胞的活化和 T 辅助细胞 179 (Th17) 的分化^[12], 故 *Usp18* 可能成为治疗自身免疫性疾病的重要靶点。

6.3 对 IL-7 的影响

模型组基因 IL-7 上调, RA 的发病机制与多种细胞因子有着密切的关系, 其中 IL-7 是促炎症性细胞因子, 同时也是一种强有力的趋化因子^[13-19], 可加重炎症反应, 通过激活 IL-7R 发挥生理学效应, IL-7 和 IL-7R 与多种自身免疫性疾病如多发性硬化症、RA 等关系密切。IL-7 负责维持 T 细胞的动态平衡, 它通过上调 Bcl, 抑制 T 细胞凋亡, 从而增加 TH-1 和 TH-17 细胞, 此外, IL-7 还可以促进 T 细胞增殖、产生细胞因子。在 RA 患者的单核细胞可以检出高水平的 IL-7、IL-7R 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。过度增殖的滑膜细胞与炎性细胞及小血管形成血管翳。TNF- α 是一种能促进 IL-7 表达的免

表4 模型组部分表达上调基因

Table 4 Partial expression up regulated gene of model group

探针设置	基因名称	倍数变化	功能
1368718_at	<i>Aldh1a7</i> : aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	136.81	代谢过程调控
1386991_a_at	<i>Bad</i> : Bcl2-antagonist of cell death	29.86	细胞过程调控
1368459_at	<i>Gdf10</i> : growth differentiation factor 10 <i>Dcb1</i> : deleted in bladder cancer 1 (human)	14.87	细胞过程调控
1369408_at	<i>Ccar2</i> : cell cycle and apoptosis regulator 2 <i>Brinp1</i> : bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural-specific 1	13.18	细胞周期
1368565_at	<i>Slc1a3</i> : solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 transporter), member 3	10.08	应激反应
1393221_at	<i>RGD1564865</i> : similar to 20-alpha-hydroxy steroid dehydrogenase	7.42	氧化还原酶活性
1368607_at	<i>Cyp4a8</i> : cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 8	6.75	小泡碎片
1367794_at	<i>A2m</i> : alpha-2-macroglobulin	6.54	应激反应
1368494_at	<i>S100a8</i> : S100 calcium binding protein A8	5.7	应激反应
1369577_at	<i>Socs2</i> : suppressor of cytokine signaling 2	5.43	细胞过程调控
1367648_at	<i>Igfbp2</i> : insulin-like growth factor binding protein 2	5.23	应激反应
1396150_at	<i>Cldn1</i> : claudin 1	4.77	细胞通讯
1370605_s_at	<i>Lepr</i> : leptin receptor	4.34	脉管系统发展
1387125_at	<i>S100a9</i> : S100 calcium binding protein A9	4.13	代谢过程调控
1382083_at	<i>Coch</i> : coagulation factor C homolog, cochlin (<i>Limulus polyphemus</i>)	4.12	应激反应
1398250_at	<i>Acot1</i> : acyl-CoA thioesterase 1	3.99	有机酸
1387316_at	<i>Cxcl1</i> : chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	3.25	免疫系统
1377172_at	<i>Gpsm2</i> : G-protein signaling modulator 2 (AGS3-like, <i>C. elegans</i>)	3.14	细胞通讯
1374962_at	<i>Rtn4ip1</i> : reticulon 4 interacting protein 1	3.05	氧化还原酶活性
1394490_at	<i>Abca1</i> : ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	3.02	应激反应
1393260_at	<i>LOC360228</i> : WDNM1 homolog WDNM1	2.89	应激反应
1368103_at	<i>Abcg1</i> : ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	2.89	代谢过程调控
1369208_at	<i>Il7</i> : interleukin 7	2.83	免疫系统过程
1368078_at	<i>Esm1</i> : endothelial cell-specific molecule 1	2.74	细胞过程调控
1398482_at	<i>Bcl3</i> : B-cell CLL/lymphoma 3	2.64	应激反应
1388773_at	<i>Tnfaip2</i> : tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	2.64	免疫反应
1387267_at	<i>Ntf3</i> : neurotrophin 3	2.64	细胞通讯
1386912_at	<i>Pcolce</i> : procollagen C-endopeptidase enhancer	2.63	应激反应
1372844_at	<i>Efn1</i> : ephrin A1	2.56	脉管系统发展
1371250_at	<i>Pf4</i> : platelet factor 4	2.56	脉管系统发展
1370394_at	<i>IgG-2a</i> : gamma-2a immunoglobulin heavy chain	2.51	免疫系统过程
1367689_a_at	<i>Cd36</i> : CD36 molecule (thrombospondin receptor)	2.5	脉管系统发展
1368447_x_at	<i>Spink3</i> : serine peptidase inhibitor, Kazal type 3	2.47	代谢过程调控
1367709_at	<i>Cd63</i> : Cd63 molecule	2.25	上皮细胞分化
1368422_at	<i>Meox2</i> : mesenchyme homeobox 2	2.24	脉管系统发展
1380854_at	<i>Vegfb</i> : vascular endothelial growth factor B	2.2	脉管系统发展
1398256_at	<i>Il1b</i> : interleukin 1 beta	2.19	免疫系统过程
1380366_at	<i>Igh-6</i> /// LOC314509: immunoglobulin heavy chain 6 /// similar to single chain Fv antibody fragment scFv 7-10A	2.13	免疫系统过程
1387868_at	<i>Lbp</i> : lipopolysaccharide binding protein	2.09	应激反应
1368073_at	<i>Irf1</i> : interferon regulatory factor 1	2.05	免疫系统过程
1392577_at	<i>Map3k3</i> : mitogen activated protein kinase kinase kinase 3	2.02	细胞过程调控

表5 模型组部分表达下调基因

Table 5 Partial expression down regulated gene of model group

探针设置	基因名称	倍数变化	功能
1385247_at	<i>Ugt2b</i> : UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B	-258.07	代谢过程调控
1387283_at	<i>Mx2</i> : myxovirus (influenza virus) resistance 2	-14.35	免疫反应
1389034_at	<i>Usp18</i> : ubiquitin specific peptidase 18	-10.16	代谢过程调控
1387825_at	<i>Ugt2b</i> : UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B	-9.93	代谢过程调控
1368826_at	<i>Comt</i> : catechol-O-methyltransferase	-8.39	应激反应
1368877_at	<i>Zfp354a</i> : zinc finger protein 354A	-7.77	应激反应
1397205_at	<i>Dhrs7</i> : dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7	-5.46	氧化还原酶活性
1382314_at	<i>G1p2</i> : interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	-5.39	免疫反应
1376688_a_at	<i>LOC685020</i> /// <i>Pilra</i> : similar to paired immunoglobulin-like type 2 receptor	-5.38	免疫反应
1393902_at	<i>Akr1c1</i> : aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol	-5.09	免疫反应
1383564_at	<i>Irf7</i> : interferon regulatory factor 7	-5.05	免疫反应
1387007_at	<i>Gfra1</i> : GDNF family receptor alpha 1	-4.94	细胞通讯
1379748_at	<i>H28</i> : Histocompatibility 28	-4.74	应激反应
1383350_at	<i>Slc35c2</i> : solute carrier family 35, member C2	-4.67	氧化还原酶活性
1373108_at	<i>Ppp1r3c</i> : protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	-4.05	小泡碎片
1387376_at	<i>Aox1</i> : aldehyde oxidase 1	-3.97	应激反应
1368146_at	<i>Dusp1</i> : dual specificity phosphatase 1	-3.72	应激反应
1368460_at	<i>Slc2a5</i> : solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter),	-3.69	应激反应
1386977_at	<i>Car3</i> : carbonic anhydrase 3	-3.62	应激反应
1377497_at	<i>Oasl</i> : 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	-3.62	免疫反应
1388188_at	<i>Cyp7b1</i> : cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	-3.51	代谢过程调控
1368025_at	<i>Ddit4</i> : DNA-damage-inducible transcript 4	-3.31	细胞过程调控
1387391_at	<i>Cdkn1a</i> : cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	-3.27	细胞过程调控
1368121_at	<i>Akr7a3</i> : aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde	-3.23	免疫反应
1368144_at	<i>Rgs2</i> : regulator of G-protein signaling 2	-3.21	细胞通讯
1394494_at	<i>Arhgef19</i> : Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 19	-3.18	细胞通讯
1398540_at	<i>Rgs1</i> : regulator of G-protein signaling 1	-3.17	细胞通讯
1370387_at	<i>Cyp3a9</i> : cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 9	-3.05	小泡碎片
1388694_at	<i>H2-T24</i> : histocompatibility 2, T region locus 24	-2.98	免疫系统过程
1369850_at	<i>Ugt2a1</i> : UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A1	-2.63	代谢过程调控

疫调节和炎症刺激因子。最新研究表明 TNF- α 启动子区 -308 过高表达可影响 RA 的发生发展和预后^[20-21]。在 RA 疾病中找到 TNF- α 高表达的基因位点及其基因型对于 RA 治疗有重要意义。IL-7 作用于滑膜的巨噬细胞分泌细胞因子, 还可以促进单核细胞归巢, 破骨细胞分化和血管化, 参与 RA 病人滑膜的病变过程, 推测 IL-7、IL-7R 是治疗 RA 的潜在靶点。

6.4 对 A2M 的影响

作为血浆主要蛋白成分之一, A2M 主要在肝脏中合成, 是一种广谱的蛋白酶抑制剂, 它与凝血通路有着密切的关系, 在调节凝血和纤溶平衡中发挥

重要作用^[22]。A2M 是天然的抗凝物质, 在发生急性炎症时在血清中含量会发生变化。A2M 在调节和控制炎症反应中也起着重要的作用, 在 Payutichi 等^[23-24]的研究中发现, 它可调节众多细胞因子的分布和活性, 包括转化生长因子- β (TGF- β)、TNF- α 、血小板衍生生长因子 (PDGF)、白细胞介素-6 (IL-6)、神经生长因子 (NGF)、成纤维细胞生长因子 (BFGF) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β)。

6.5 对其他免疫反应相关基因的影响

数据显示, 凋亡蛋白 Bad (Bcl 拮抗剂) 表达显著上调, Bad 可以抑制 Bcl, 具有促凋亡作用, 但目前 Bad 在 RA 发病中的参与机制尚不清楚。结果表

明,模型组大鼠肝组织 *IL-1 β* 、*Cxcl1*、*Irf1*、*IgG-2a*、*Igh-6*、*Lbp* 基因表达上调,其中 *IL-1 β* 、*Lbp* 为免疫炎症相关蛋白,可导致关节滑膜和软骨的炎性病变。*IgG-2a* 上调提示机体倾向细胞免疫反应。*Igh-6* 的过表达机体可出现免疫抑制。*Cxcl1*、*Irf1* 过表达提示 RA 具有类肿瘤的特性即过度侵袭和增殖能力。

类风湿性关节炎(RA)是一个涉及到炎症、异常的自身免疫反应、类肿瘤样细胞改变等多个环节和过程,其中涉及庞大复杂的信号转导网络的调控。目前对于众多基因的表达情况及其对滑膜增生抑制或促进作用,未有详尽的文献报道。细胞因子的生物学研究将有助于对 RA 发病机制的认识。应用于 RA 的治疗提供有力的理论依据,开发其临床应用的新领域,以减少 RA 骨破坏,改善预后。

参考文献

- [1] Komatsu N, Takayanagi H. Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints [J]. *Adv Immunol*, 2012, 115: 45-71.
- [2] Arango B A, Rivera C L, Glück S. Gene expression profiling in breast cancer [J]. *Am J Transl Res*, 2013, 5(2): 132-138.
- [3] Villase or-Park J, Ortega-Loayza A G. Microarray technique, analysis, and applications in dermatology [J]. *J Invest Dermatol*, 2013, 133(4): e7.
- [4] Campo E. Whole genome profiling and other high throughput technologies in lymphoid neoplasms--current contributions and future hopes [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(Suppl 1): S97-S110.
- [5] 王淑月. 抗类风湿性关节炎的药物研究 [J]. 中国临床康, 2004, 27: 5956-5957.
- [6] 刘 静, 王晶晶, 邸志权, 等. 胶原诱导性关节炎大鼠淋巴细胞基因表达的变化 [J]. 药物生物技术, 2013(2): 115-123.
- [7] 徐叔云 卞如濂 陈修. 药理实验方法学(第三版) [M]. 北京: 人民卫生出版社.
- [8] Chou C H, Lee C H, Lu L S, et al. Direct assessment of articular cartilage and underlying subchondral bone reveals a progressive gene expression change in human osteoarthritic knees [J]. *Ost Cart*, 2013, 21(3): 450-461.
- [9] 冯仁丰. 急性相和 C 反应蛋白 [J]. 上海医学检验杂志, 1999, 14(5): 258-260.
- [10] Lei Y Y, Wang W J, Mei J H, et al. Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(20): 8539-8548.
- [11] Kawase A, Wada S, Iwaki M. Changes in mRNA expression and activity of xenobiotic metabolizing enzymes in livers from adjuvant-induced arthritis rats [J]. *Pharmacol Pharm*, 2013, 4: 478-483.
- [12] Liu X, Li H, Zhong B, et al. USP18 in hibs NF- κ B and NFAT activation during TH17 differentiation by deubiqu-uitinating the TAK1-TAB1 complex [J]. *Exp Med*, 2013, 210(8): 1575-1590.
- [13] Chen Z L, Kim S J, Nathan D. The novel role of IL-7 ligation to IL-7 receptor in myeloid cells of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis [J]. *J Immunol*, 2013, doi:10.4049/jimmunol.1201675
- [14] Haas J M, Korporal A, Schwarz B, et al. The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis [J]. *Eur J Immunol*, 2011, 41(3): 845-853.
- [15] Churchman S M, Ponchel F. Interleukin-7 in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*, 2008, 47: 753-759.
- [16] Liu X, Leung S, Wang C, et al. Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease [J]. *Nat Med*, 2010, 16: 191-197.
- [17] van Roon J A, Hartgring S A, Wenting-van Wijk M, et al. Persistence of interleukin 7 activity and levels on tumour necrosis factor α blockade in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66: 664-669.
- [18] Standiford T J, Strieter R M, Allen R M, et al. IL-7 up-regulates the expression of IL-8 from resting and stimulated human blood monocytes [J]. *J Immunol*, 1992, 149: 2035-2039.
- [19] Alderson M R, Tough T W, Ziegler S F, et al. Interleukin7 induces cytokine secretion and tumoricidal activity by human peripheral blood monocytes [J]. *J Exp Med*, 1991, 173: 923-930.
- [20] Kang J H, Park D J, Lee J W, et al. Drug survival rates of tumor necrosis factor inhibitors in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29: 1205-1211.
- [21] De Vries-Bouwstra J K, Dijkmans B A, Breedveld F C. Biologics in early rheumatoid arthritis [J]. *Rheum Dis Clin North Am*, 2005, 31: 745-762.
- [22] Harpel P C, Mosesson M W. Degradation of human fibrinogen by plasma α 2-macroglobulin-enzyme complexes [J]. *J Clin Inv*, 1973, 52(9): 2175.
- [23] Panyutich A, Ganz T. Activated α 2-macroglobulin is a principal defensin-binding protein [J]. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 1991, 5(2): 101-106.
- [24] LaMarre J, Wollenberg G, Gonias S, et al. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated α 2-macroglobulins [J]. *Lab Inv*, 1991, 65(1): 3-14.