

利用激光显微切割与 microarray 技术对恒河猴脑中白质与灰质基因表达的差异性的研究 *

梁洪雨^{1,2} 张晓宇^{1,2} 邵宁一² Philipp Khaitovich^{2Δ} 赵敏^Δ

(1 东北林业大学生命科学学院 黑龙江 哈尔滨 150040 ;

2 中国科学院 - 马普学会计算生物学伙伴研究所, 中国科学院计算生物学重点实验室 上海 200031)

摘要 目的 利用激光显微切割技术和 microarray 技术比较恒河猴脑组织中前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)与小脑皮质(cerebellar cortex, CBC)的灰质与白质基因表达的差异。方法 利用激光显微切割技术(laser capture dissection, LCM)与 microarray 技术的有效结合,提取恒河猴 PFC 与 CBC 的白质与灰质,分别提取 RNA,合成 cDNA 文库。最后利用 GeneChip 1.0 ST 芯片技术,分析得出大脑与小脑中灰质与白质的表达差异性。结果 无论是灰质还是白质,在 PFC 中的高表达基因都要远远多于在 CBC 中的高表达基因。结论 使用 LCM 可以提取单一的细胞群,从而用于要求更为精确的实验当中。

关键词 激光纤维切割 灰质 白质 微芯片

中图分类号 :Q95-3, Q75, Q78, R323.1, R338.2 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)09-1605-04

Research of Differential Expression between Grey Matter and White Matter in Rhesus Macaque Brain by Laser Capture Microdissection and Microarray*

LIANG Hong-yu^{1,2}, ZHANG Xiao-yu^{1,2}, SHAO Ning-yi², Philipp Khaitovich^{2Δ}, ZHAO Min^Δ

(1 College of Life Science, Northeast Forestry University, 26 Hexing Road, Harbin, 150040, China;

2.Key Laboratory of Computational Biology, CAS-MPG Partner Institute for Computational Biology,

Chinese Academy of Sciences, 320 Yueyang Road, Shanghai, 200031, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the different expression of the genes in the gray matter, white matter and cerebellar cortex.

Methods: The white matter and gray matter were extracted from PFC and CBC via LCM technology. The expression differences between gray matter and white matter in the PFC and CBC were analyzed. **Results:** There were more highly expressed genes in the PFC than in the CBC whatever for grey matter or white matter. **Conclusion:** The LCM can extract a single cell population, which is vital for studies requiring a high level of precision.

Key words: Laser capture microdissection(LCM); Grey matter; White matter; Array

Chinese Library Classification: Q95-3, Q78, R323.1, R338.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1605-04

前言

大脑是由上百亿个神经元组成的,而神经元又是由细胞体和神经纤维组成的,细胞体中有细胞核(颜色深),神经纤维中有细胞质(颜色浅)。细胞体在大脑表面富集,色深,称为灰质;而神经纤维聚集于大脑内部,色浅,称为白质。灰质是调节机体机能的最高部位。但是组织的异质性导致无法用传统的方法研究灰质与白质的区别和联系。而激光显微切割技术的出现成功地解决这一难题^[1-4]。本文通过激光显微切割^[1,2]与 microarray 技术的结合^[5],更加精确的研究了脑组织中白质与灰质在表达方面的区别与联系,为组织中特殊细胞群的分离以及类似实验的研究提供了可行的参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

一只 10 岁大的健康的雄性恒河猴,来自于中国苏州实验动物中心。此研究经过伦理委员会的批准,样本经提供机构的病理学家确认为健康正常样本,没有经受过濒死痛苦的折磨。实验组织:这只恒河猴的大脑前额叶皮质(PFC)和小脑皮质(CBC)(图 1)。在取组织的过程中,为保证组织 RNA 的完整性,所有的实验工具,镊子手术刀,均用 RNase Zap(Ambion)处理。最后将收集好的组织置于 -80℃ 保存^[6]。

1.2 方法

1.2.1 准备切片 将切下小块 PFC 与 CBC 组织用包埋剂 OCT (Jung, Leica)包埋后,在冰冻切片机(CM1900, Leica)内冷却至凝固,并将载玻片(Histogene LCM slides, Molecular Devices)置于切片机内预冷,之后在每张载玻片上贴上三片 10-20 μm 的组织切片,切完后迅速放置于干冰盒内保存。

1.2.2 组织染色 染色前,将所有的染色溶液均置于 4℃。将上述冰冻切片依次放置在:75%乙醇 30 s,蒸馏水 30 s, Histogene

* 基金项目:中国科学院重要方向项目(KSCX2-EW-R-02-02)资助

作者简介:梁洪雨(1985-)男,研究生,主要研究方向:人类进化研究,电话:15021503066, E-mail: lianghongyu123456@163.com

Δ 通讯作者:赵敏, E-mail: 82191513@163.com, Philipp khaitovich, E-mail: khaitovich@eva.mpg.de

(收稿日期:2011-09-26 接受日期:2011-10-21)



图 1 恒河猴的脑部
Fig. 1 Brain of rhesus macaque

staining solution(加 1 ?l RNA inhibitor)30 s-60 s ;蒸馏水 30 s ; 75%乙醇 30 s ;95%乙醇 30 s ;100%乙醇 30 s ;二甲苯 5 min^[7,8]。染色脱水后的玻片置于封闭容器内 2-3 min ,然后直接放于激光显微切割仪内 ,准备显微切割。染色后 ,组织上颜色深的部分为白质 ,颜色浅的则为灰质。可以清楚的观测到 ,灰质中存在着大量的细胞体 ,也可观测到白质中的胶质细胞(图 2)。

1.2.3 显微组织切割 根据光镜下样品情况及获得最佳捕获效率 设定仪器参数 Pulse power: 80-100 mV , pulse duration: 2000-350 usec ,laser spot diameter: 30-40 μ m ,为了保证 RNA 的完整性 ,一个 Cap (CapSure Macro LCM Caps, Molecular Device)的切割时间尽量要保证在 30 min 中以内^[9]。显微切割后 ,组织会黏在 Cap 的膜上 ,用干净的镊子取下膜放在事先准备好的装用 50 μ l 缓冲液 Extraction Buffer (Arcturus Pico Frozen

RNA Isolation Kit, Molecular Device) 的 EP 管内 ,用于后续实验。

1.2.4 RNA 的提取 将上述的 EP 管置于 42 $^{\circ}$ C 30 min ,800 g 离心 2 min ,用灭过菌的镊子取出管内的膜 ,加入 50 μ l 70%酒精 ,用移液枪上下吹打混合均匀 ,再将管子内液体约 100 μ l 移入 ,已经用 CB Buffer 处理过的过滤柱中 ,之后 100 g 2 min ,再 16000 g 30 s ,加入 100 μ l W1 于柱中 ,8000 g 离心 1 min ,加入 100 μ l W2 ,8000 g ,1 min ;为除去 DNA 的影响 ,加入 RNase-free DNase(RNase-free DNase Set, Qiagen) ,15min^[10] ,再加入 100 μ l W2 ,16000 g 2 min ;16000 g ,1 min ,最后换一个新的接收管 ,加入 Elution Buffer 10-15 μ l ,室温 1 min 后 1000 g ,1 min 离心。RNA 提取完毕。以上试剂均购自 Arcturus Pico Frozen RNA Isolation Kit(Molecular Device)。

1.2.5 cDNA 的合成 第一条链的合成 :利用 Random hexamer T7-(N6)Primer 和 Superscript II(Invitrogen)反转录试剂盒完成对第一条链的合成。第二条链的合成 :用 RNase H 处理后 ,在 DNA polymerase I 作用下 ,利用 Genechip WT cDNA Amplification Kit(Affymetrics) ,完成对第二条链的合成。DNA 单链的片段化与标记 :利用 Genechip WT Terminal Labeling Kit(Affymetrics)完成对 DNA 的片段化与标记。

1.2.6 DNA Microarray 利用 Genechip hybridization ,Wash and Staining Kit 与 169format ,GeneChip 1.0 ST Array(Affymetrics) ,对上述样品进行 17 小时过夜杂交。

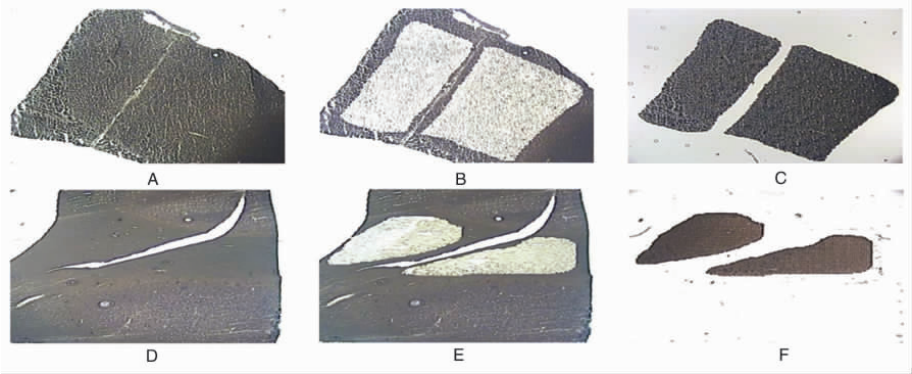


图 2 显微切割前后对比 :
A:LCM 前 PFC B:LCM 后的 PFC C:LCM 所得的 PFC 的灰质 D:LCM 前 CBC E:LCM 后的 CBC F:LCM 所得的 CBC 的白质
Fig. 2 Samples and samples after LCM :A: PFC B: PFC after LCM C: grey matter of PFC D: CBC E:CBC after LCM F:white matter of CBC

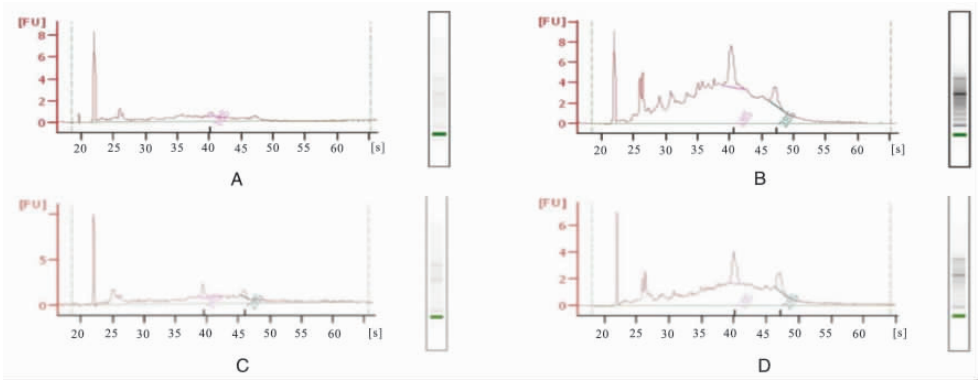


图 3 RNA 的质量 :A: PFC 白质 B: PFC 灰质 C: CBC 白质 D: CBC 灰质
Fig. 3 Profiles of RNA :A: White matter of PFC B: Grey matter of PFC C: White matter of CBC D: Grey

表 1 样本信息以及显微切割前后灰质与白质 RIN 的对比结果
Table 1 Grey matter and white matter RIN information of samples

	灰质(Grey matter)	白质(White matter)	切割前(Before LCM)
前额叶皮质(PFC)	4.2	2.4	8.6
小脑皮质(CBC)	4.6	4.5	9.0

2 结果

2.1 LCM

显微切割后，依靠 Agilent RNA 6000 pico kit 和 Agilent 2100 生物分析仪检测其 RNA 的完整度 (RNA Integrity Number, RIN)。结果显示：其 RIN 值由切割前的 8.6-9.0 骤降到 2.4-4.6。而在 PFC 中，从 RNA 的数量与质量上讲，灰质几乎都是白质的两倍；而在 CBC 中，灰质与白质几乎持平。

2.2 Array 结果

将 Microarray 的结果利用统计软件 R(<http://www.r-project.org/>)及 bioconductor 软件包 Affy 和 preprocesscore 分析完成。利用 Fisher 检验(P<0.05)检测灰质与白质在不同区域中的表达情况(图 4)。

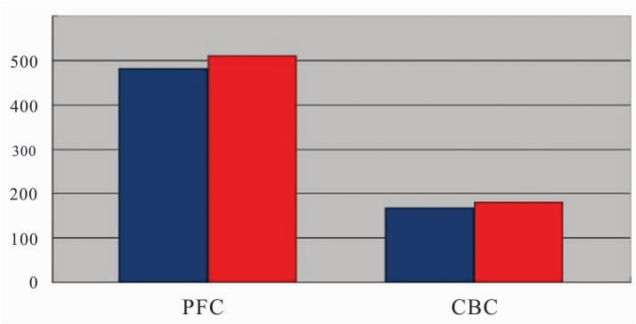


图 4 灰质与白质中高表达基因的数量。在 PFC 中有 481 个基因在灰质中高表达，510 个基因在白质中高表达。在 CBC 中有 168 个基因在灰质中高表达，180 个基因在白质中高表达。蓝色代表灰质，红色代表白质。

Fig. 4 Numbers of highly expressed genes between GM and WM :There are 481 highly expressed genes in PFC grey matter while 510 in PFC white matter, and there are 168 highly expressed genes in CBC grey matter while 180 in CBC white matter. grey matter: blue; white matter: red.

3 讨论

显微切割前后组织 RIN 值骤降，一方面来自 RNA 自身降解，实验过程中对组织的影响^[11]。另一方面，空气相对湿度的影响也很明显^[12]。相对湿度超过 31%，湿度越大，RNA 降解越多，RIN 值越小。而上海空气相对湿度为 70%-80%^[13]，远远高于 31%，即使采取相应措施，对实验的影响也很明显。RIN 值的高低直接影响下游实验的好坏，所以保证组织 RIN 的完整，是实验的重中之重。而避免 RNA 降解的方法除了常规的操作过程，如戴手套，操作台要 RNase 处理等等，保证空气湿度，减少实验脱水，染色时间，都会对保护组织的完整性起到积极作用。而以往的研究，也证明获取良好质量的 RNA 可能性^[14-18]。另外，由于白质中所含细胞体较少，而主要为含有髓鞘的轴突胶质细胞，

所以白质主要含有 mRNA，其 RIN 值相对较小^[19]。而在灰质中由于细胞体多聚集于此，所以灰质的 RIN 应该会比白质的稍高，这一点体现在 PFC 中(如图 3，表 1)。而在 CBC 中 RIN 值相差不多，这可能由于实验过程中 RNA 的降解所引起。

本研究工作运用显微切割技术与芯片技术，检测在大脑中 PFC 与 CBC 中灰质与白质中的基因表达的不同。通过 GO enrichment analysis of genes 分析，得出在 PFC 中灰质主要参与一些神经性活动，比如突触传递(synaptic transmission)，神经冲动传输(transmission of nerve impulses)，神经元的形成(generation of neurons)(P 值都小于 10⁻¹⁰)。而 PFC 中的白质与胶质细胞联合起来，在髓鞘生成(myelination)，轴突髓鞘包裹(axon ensheathment)(P 值都小于 10⁻⁴)起到重要作用。而在 CBC 中，灰质与白质都在一些神经活动中起到关键作用，如突触传递(synaptic transmission)，神经冲动传输(transmission of nerve impulse)(P 值都小于 10⁻⁴)。而且，在动物行为上方面，CBC 中的白质要比胶质细胞起到更为重要的作用^[20]。

本研究利用 LCM 技术，分离出灰质与白质，并依靠 Microarray 技术及生物信息学，得出两者在基因表达方面的差异，PFC 中的灰质与白质的高表达基因数量都要远远多于 CBC 中的灰质与白质的高表达基因数量(图 4)，表明灰质和白质间的差异可能远小于 PFC 和 CBC 组织间的差异。而早前的研究，都只是基于肉眼与显微镜的结合，分离取得不同组织，不同细胞，这种方法并不能完全保证异质细胞的影响，而 LCM 完全电脑化的精确操作解决了这一难题，有效地避免了出现假阳性或假阴性的实验结果。目前，国内应用激光显微切割技术，主要用来有关癌症方向的研究，更多地倾向于临床医学的应用，而在国外，除了应用于医学方面，同样广泛涉及到基因组学，蛋白组学等有关生命科学其它方面。因而，利用显微切割并联合其他手段进行生命科学方面的研究，将有助于缩短我国与国外生命科学技术的差距，有利于我国科技的进步与发展。

本文以灵长类动物为样本，他们的大脑与小脑，灰质与白质存在差异性，决定了在灵长类动物进化过程中起到重要作用，比如语言，行为，思考等等方面。恒河猴是人类的近亲，研究其灰质白质的差异，将有助于对人类自身的了解。而应用 LCM 分离出异质性组织的单一性细胞群，在现代临床医学、解剖学，尤其是在研究恶性细胞机制，需要从组织中提取肿瘤细胞的肿瘤基因组学、病理学起到了革命性的作用，推动了这些相关科学的发展，而与芯片技术的有机结合，更是显示出 LCM 技术的广阔应用前景。相信两者的结合，将给高等动物的生命科学领域，带来更多重大发现。

参考文献(References)

[1] Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, et al. Laser capture microdissection[J]. Science, 1996, 274(5289): 998-1001
[2] Espina V, Wulfschlegel JD, Calvert VS, et al. Laser-capture microdisse-

- ction[J]. Nature Protocols, 2006, 1(2): 586-603
- [3] Banks RE, Dunn MJ, Forbe MA, et al. The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis-preliminary findings [J]. From genome to proteome, 1999, 20(1): 689-700
- [4] Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, et al. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis [J]. Trends Genet, 1998, 14(7): 272-276
- [5] McGinley JN, Zhu ZJ, Jiang WQ, et al. Collection of Epithelial Cells from Rodent Mammary Gland Via Laser Capture Microdissection Yielding High-Quality RNA Suitable for Microarray Analysis[J]. Biological procedures online, 2010, 12(1): 31-43
- [6] Mikulowska-Mennis A, Taylor TB, Vishnu P, et al. High-quality RNA from cells isolated by laser capture microdissection[J]. Biotechniques, 2002, 33(1): 176-179
- [7] Goldsworthy SM, Stockton PS, Trempus CS, et al. Effects of fixation on RNA extraction and amplification from laser capture microdissected tissue[J]. Molecular Carcinogenesis, 1999, 25(2): 86-91
- [8] Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, et al. Effects of dietary energy restriction on gene regulation in mammary epithelial cells [J]. Cancer Research, 2007, 67(1): 12018-12025
- [9] Batorfi J, Ye B, Mok SC, et al. Protein profiling of complete mole and normal placenta using proteinchip analysis on laser capture microdissected cells[J]. Gynecologic Oncology, 2003, 88: 424-428
- [10] Parlato R, Rosica A, Cuccurullo V, et al. A preservation method that allows recovery of intact RNA from tissues dissected by laser capture microdissection[J]. Analytical Biochemistry, 2002, 300(2): 139-145
- [11] Clément-Ziza M, Munnich A, Lyonnet S, et al. Stabilization of RNA during laser capture microdissection by performing experiments under argon atmosphere or using ethanol as a solvent in staining solutions[J]. RNA, 2008, 14(12): 2698-2705
- [12] Ordway GA, Szebeni A, Duffourc MM, et al. Gene expression analyses of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes isolated by laser capture microdissection from human brain: detrimental effects of laboratory humidity [J]. Journal of neuroscience research, 2009, 87(11): 2430-2438
- [13] Chow SD, Chang C. Shanghai urban influences on humidity and precipitation distribution[J]. GeoJournal, 1984, 8(3): 201-204
- [14] Dolter KE, Braman JC. Small-sample total RNA purification: laser capture microdissection and cultured cell applications [J]. Biotechniques, 2001, 30(6): 1358-1361
- [15] Kohda Y, Murakami H, Moe OW, et al. Analysis of segmental renal gene expression by laser capture microdissection [J]. Kidney international, 2000, 57(1): 321-331
- [16] Luo L, Salunga RC, Guo HQ. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes [J]. Nature Medicine, 1999, 5(1): 117-122
- [17] Ohshima H, Zhang X, Kohno Y. Laser capture microdissection-generated target sample for high-density oligonucleotide array hybridization[J]. Biotechniques, 2000, 29(3): 530-536
- [18] Sgroi DC, Teng S, Robinson G, et al. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression [J]. Cancer Research, 1999, 59(22): 5656-5661
- [19] Giuditta A, Chun JT, Eyman M, et al. Local gene expression in axons and nerve endings: the glia-neuron unit [J]. Physiological reviews, 2008, 88(2): 515-555
- [20] Karssen AM, Li JZ, Her S, et al. Application of microarray technology in primate behavioral neuroscience research[J]. Methods, 2006, 38(3): 227-234