

臺灣二〇〇三年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學科

作品名稱：微陣列基因分析法探討心肌細胞在機械性展延下
的基因表現

得獎獎項：醫學與健康科學科第二名

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：吳嘉芸

作者簡介



我是吳嘉芸，自小便對科學很有興趣。高一時的選修生物課，接觸到了比課本更為廣泛的生物知識，發覺了自己對於生命科學的興趣；高二時的專題研究，更給了我親自作實驗的機會。對於目前日新月異的生物技術感到十分好奇，因此投入了這個研究，透過每個實驗步驟，我培養了自己的細心與耐性、對事物的觀察力，和處理解決問題的能力，十分感謝中研院生醫所陳錦澤教授以及助教們的熱心指導，讓我學習到很多生物新知以及實驗技巧。

微陣列基因分析法探討

心肌細胞在機械性展延下的基因表現

作品摘要 -----

高血壓所誘發的機械性展延是造成心肌肥大的基本因子，本實驗即藉由微陣列基因分析法同時大量的分析機械性展延所造成心肌細胞的基因表現。將新生鼠的心肌細胞施以 20% 的機械性展延，抽取其 mRNA 製作成 cDNA 探針與現成的 cDNA 晶片進行雜漬反應(此晶片上包含了 480 個如訊息傳遞、控制細胞生長週期、細胞骨架等的已知基因)，在眾多有因為機械性展延而造成基因表現差異的基因中，我們選擇了 eNOS 基因(內皮細胞 NO 合成酶)進行西方墨點法及 NOS 活性和 NO 產生量測定的實驗，進一步證實 eNOS 的基因表現量的確是增加的，此一結果與微陣列基因分析所得之結果不謀而合。

Mechanical stretch induced by high blood pressure is an initial factor leading to cardiac hypertrophy. The use of cDNA microarrays has made it possible to simultaneously analyze stretch-induced gene expression in cardiomyocytes. Neonatal rat cardiomyocytes were cultured on malleable silicone dishes and were stretched by 20%. We compared the transcript profiles of cardiomyocytes under mechanical stretch for 60 minutes by hybridization of cell-derived cDNA to DNA probes immobilized on microarrays. The microarrays contained probes for 480 known genes including signal transduction, cell cycle regulators, cytoskeleton and cell motility, and so on. Eighteen genes were identified that showed significantly differential expression in response to mechanical stretch in cardiomyocytes. Of the represented genes expressed, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes was the most interesting one. Northern blot and western blot analysis further quantified the expression of eNOS gene. Mechanical stretch also increased constitutive NOS activity and NO production. Our results indicate that mechanical stretch induces eNOS gene expression thus increases constitutive NOS activity and NO production in cardiomyocytes.

壹、研究動機：

高血壓所誘發的機械性展延是造成心肌肥大的基本因子。目前雖已知機械性展延與心肌肥大之間的關聯性，但確實之分子機制則尚未完全明朗。以往的文獻中，機械性展延可以誘導如內皮素、血管收縮素等的基因表現，但傳統上研究此類基因的表現層次大都侷限於單一基因或少量基因，並無大量相關基因表現之研究。本實驗即借助 cDNA Microarray 來探討心肌細胞在展延造成之高壓環境下其基因表現型式和相對量的分子關係。

貳、研究目的：

利用活體外心肌細胞培養系統，經機械性展延處理後，抽取和純化 RNA 並進行微陣列基因分析技術，提供高壓時心肌細胞之基因表現的不同型式和相對量的重要訊息。

選擇一感興趣的基因(eNOS)做進一步實驗，與 cDNA Microarray 所得結果互相對照，加以證實機械性展延造成的基因表現量變化。

參、實驗器材或藥品：

新生鼠數隻、CO₂ Incubator、Flexercell strain units、無菌操作台、Cell Culture、像位差顯微鏡、螢光顯微鏡、離心機、凝膠電泳設備、光電比色機、water bath shaker、PTC-100 programmable temperature controller、Microarray。

肆、研究方法：

1.心肌細胞之細胞培養：

利用 differential attach(差異附著)及 high density(高密度培養)兩個步驟，以取得較高純度的心肌細胞。

從新生鼠上取下來的心臟細胞(心肌細胞約佔 25%)，放入裝有培養液的培養皿中，等待約 2 至 3 個小時，大部分的心臟纖維母細胞及少量的心肌細胞會附著在底部，此時取出上清液(心肌細胞約可佔 70%以上)，放入所需的培養皿中；但是，可將種植細胞的密度提高，使心肌細胞擁有生長優勢，而更能提高其所佔比例(至約 90%)。之後，每隔兩到三天換一次培養液即可。

2.機械性展延：

將新生鼠的心肌細胞培養在可伸縮的矽膠膜培養皿上，利用 flexercell strain units (見右圖) 施以 20% 的展延力，以模擬心肌細胞在高血壓時的搏動。

3.RNA 分離，純化和鑑定：

採用 Guanidine isothiocyanate 之方法分離出 total RNA，然後經由吸光值和電泳分析以確定其濃度和純度，最後純化出 mRNA。

4.mRNA 的反轉錄作用：

mRNA 進行反轉錄作用形成 cDNA，其反應 mRNA，DTT，Ige pal，Primer，dNTP 和 200U Superscrip II reverse transcriptase，在 44⁰C 下作用 45 分鐘，再加入含 MgCl₂，DTT，dGTP，KH₂PO₄ 和 10U terminal deoxynucleotide transferase 進行 tailing 反應，形成完全的單股 cDNA。

5.聚合酵素鏈鎖反應：

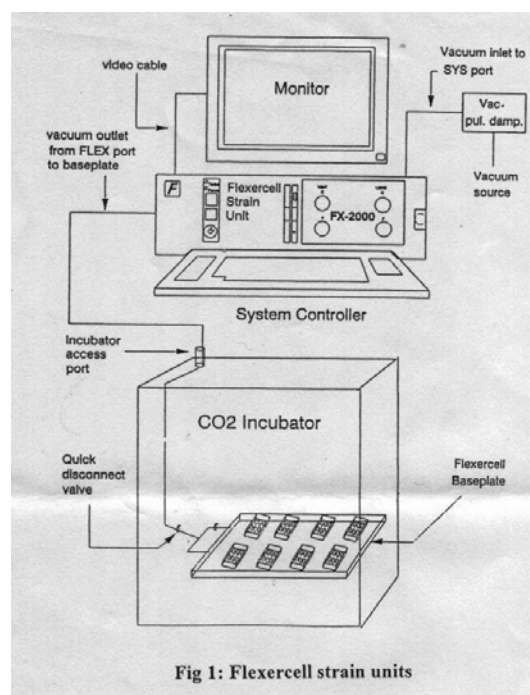
單股 cDNA 再以 PCR 進行複製，反應總體積含 cDNA，formamide，Primer，dNTP 和 4.5U DNA polymerase。利用 PCR 的原理能使 DNA 以短暫的時間在微量試管中擴增至 10⁶ 倍以上。

6.微陣列基因分析技術：

mRNA 經由反轉錄酶作用成的 cDNA probe 與 digoxigenin-11-dUTP (Roche) 進行標示反應，加入雜漬反應液，和 cDNA assay 進行雜漬反應作用。完成後取出已雜漬之 cDNA assay 使用 saline-sodium citrate /0.1% SDS 清洗兩次，再利用 digoxigenin detection system (Roche) 進行呈色反應。經過 Laser scanner 掃描獲得影像，由電腦 Data processing 比對分析獲得結果。

7.西方墨點法：

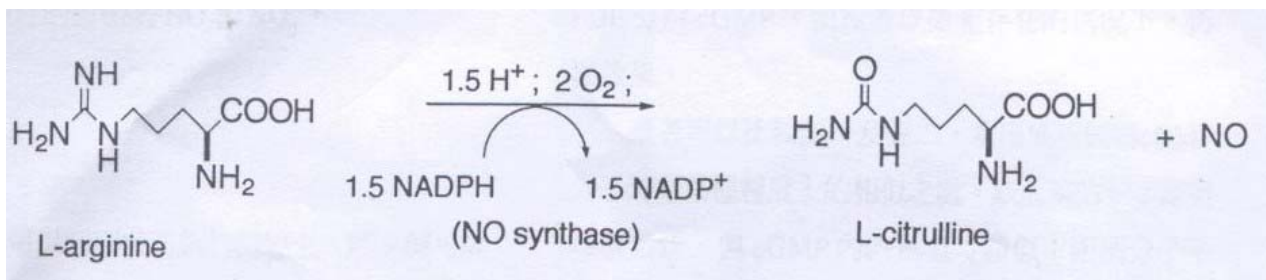
利用溶解細胞之溶液 (lysis buffer,pH=6.8 Tris, 1%SDS) 將心肌細胞溶解。其中 lysis buffer



含有 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 及蛋白酶抑制劑(protease inhibitor, PMSF, aprotinin, sodium orthovanadate)。爲了偵測心肌細胞中 eNOS 蛋白質的含量，收集細胞溶出物並加熱煮沸，利用 SDS-PAGE (12% running, 4% stacking) 作分離，並轉移到 polyvinylidene fluoride membrane 上。將此 membrane 浸泡在 anti-eNOS antibody 中，利用 Western-Light chemiluminescent detection system 進行偵測工作。

8.NOS activity 之測定：

利用 NOS detection assay kit 來分析 NOS activity。其原理爲 NOS 可將 L-arginine 轉變爲 L-citrulline (見下圖)。利用含有 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 的 lysis buffer 將心肌細胞溶解，靜置在冰上 30 分鐘，經離心即可獲得細胞萃取物，並將細胞殘留物丟棄。將 protein extracts 培養在含有 10 mmol/L-[14C]arginine, 1 mmol/L NADPH, 1 mol/L FAD, 1 mol/L FMN, 100 nmol/L calmodulin, 600 mol/L CaCl₂, and 3 mol/L ahydrobipterin 的溶液(40 μl)中 60min 溫度爲 37⁰C。之後再加入 400 μl 的 stop buffer(10mmol/L EDTA, 50 mmol/L HEPES buffer, pH5.5)，使反應停止。再加入 100 μl equilibrated resin 後，將 sample 移至離心管中並離心，經 liquid scintillation counting 的測量，由放射量的多寡即可得知 NOS activity。

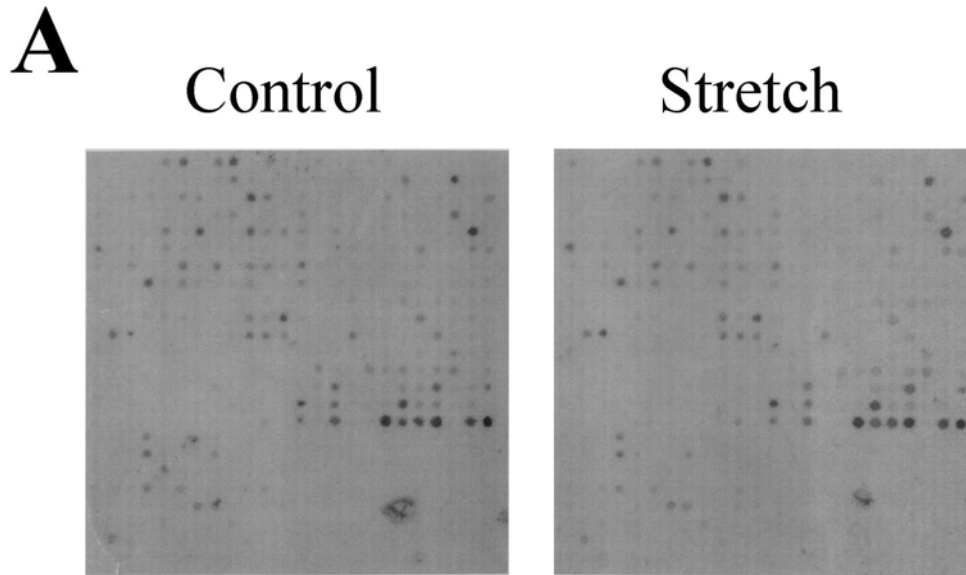


9.Nitrate/Nitrite levels 的測量：

Culture medium 一般儲存在-70⁰C 備用，使用前先將 culture medium 溶解。在 sample 中加入兩倍體積的 99% ethanol 已達 deproteinized, 並離心。將 sample 注射入含有 5% VCl₃ 的 collection chamber 中，在此環境中，可將 nitrate, nitrite 轉變成 NO。有一穩定流的 helium gas 可將 NO 帶入 NO 分析儀中，NO 與 ozone 反應後會產生光，發光的量與 NO 形成的產量成正比。

伍、研究結果與討論

一、微陣列分析 stretch 造成心肌細胞的基因表現



晶片預先植入 480 種已知基因的 DNA 複製物，然後將 cDNA probe 經螢光標識後，進行雜湊反應。若 probe 中有與晶片上互補的基因，則會結合而發出螢光，且隨基因表現量增加，螢光強度亦增強。故可藉由觀察 ctrl 組和 stretch 組晶片的相對位置，發出螢光的深淺，了解基因表現量的增減。Stretch 之後若顏色變深，表示表現量增加；反之，若顏色變淺，則表示表現量減少。

Form 1

Putative Gene Name	Ratio of stretch/ctrl
Nitric oxide synthase	1.70
UPA	72.00
Prefoldin 4	38.00
Chemokine(C-C motif) receptor 2	32.00
P19(cyclin-dependent kinase inhibitor 2D)	31.50
Purine-rich element binding protein A	28.00

Transducer of ERBB2	20.00
Bcl2-alpha	17.00
Ciliary neurotrophic factor receptor	9.00
EIF4E	8.00
Transcriptional activator SNF2a	7.67
Keratin 7	6.30
Early growth response protein 1	4.00
Glucose-6-phosphate isomerase	2.75
Keratin 19	2.43

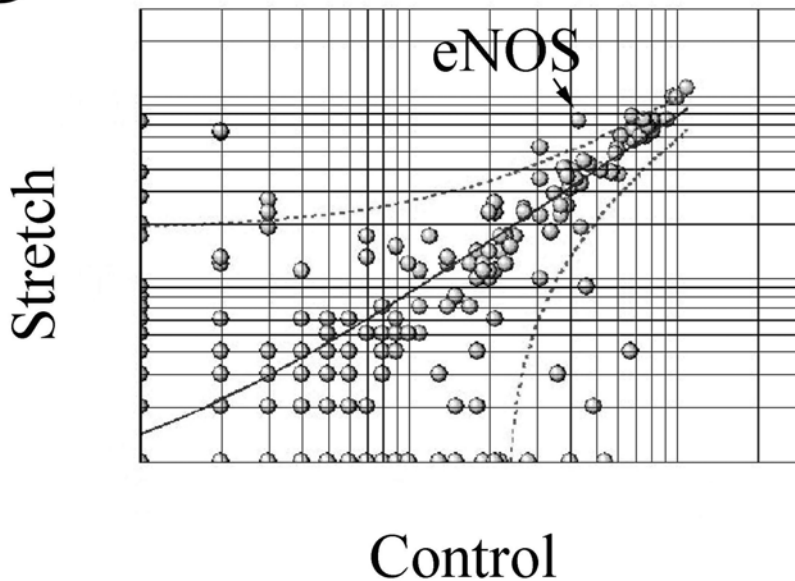
Form 2

Putative Gene Name	Ratio of stretch/ctrl
Tumor suppresser protein DCC precursor(neogenin)	0.41
ATP-dependent DNA helicase II,86 KD subunit	0.29
Neural-cadherin precursor	0.20
Glutathione S-transferase 12 (microsomal)	0.13
Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	0.08
Arginine methyltransferase	0.07
mutL homolog 1	0.06
MLH1	0.06
PML-2	0.05
Cyclin H assembly factor	0.05
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0.04
Glutaredoxin	0.04

PKD 2	0.04
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	0.03
Insulin receptor precursor	0.02

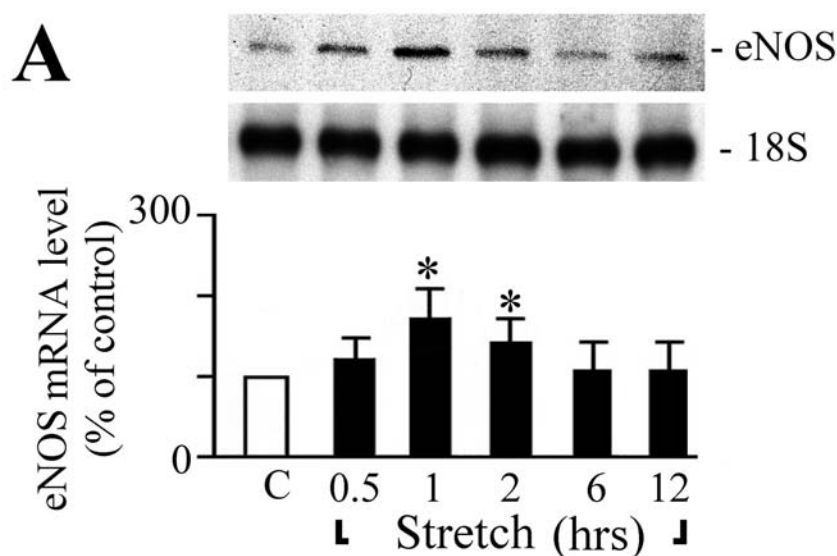
我們的實驗中，Microarray 經電腦分析可得到 480 組量化的數據，其中近 200 個 cDNA 在兩組都有可察覺的訊號。我們擷取 30 個在兩組間有特別明顯表現差異的基因製作表格，將它們的 stretch 組及 ctrl 組數據相除，便可得到上面的比值。第一個表格的 15 個基因 s/c 大於 1，顯示表現量增加；第二個表格的 15 個基因 s/c 小於 1，顯示表現量減少。這些基因分別與細胞生長週期、訊息傳導、轉錄因子、細胞激素、細胞黏附、緊急反應...等有關。

B



圖中每一點代表一個基因，以 stretch 組和 ctrl 組的比值繪製而成。實線是比值約為 1 的界線，故落於線上的基因，表 stretch 前後基因表現量改變不大；落於線左上方的基因，表 stretch/ctrl 比值大於 1，即 stretch 後基因表現量增加；落於線右下方的基因，表 stretch/ctrl 比值小於 1，即 stretch 後基因表現量減少。

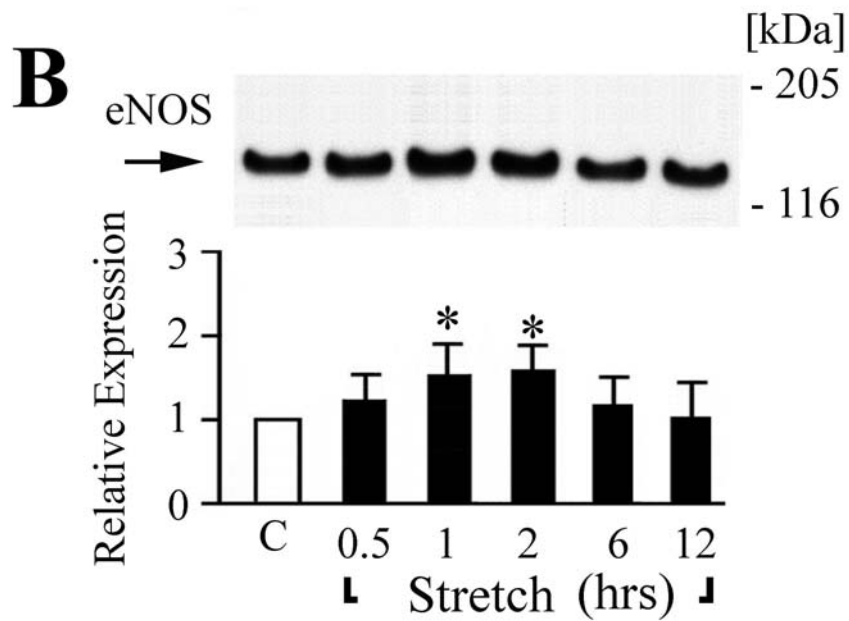
二、機械性展延造成心肌細胞的 eNOS 基因表現



A 機械性展延造成 eNOS mRNA 表現的時間效應

測定 mRNA 的方法有很多種,此實驗使用微陣列基因分析法來測定 eNOS mRNA 的表現量。為證實實驗的準確性,我們亦使用 Northern Blot 作輔助檢驗。透過壓片後所做的結果分析中,我們採用 18S rRNA 作 Internal ctrl。所謂 Internal ctrl,為一恆定的物質,反映出刺激的藥物所造成增加或減少的效應,並非人為操作或其他干擾因子所能導致。基於在不同時間 stretch 作用下的 18S 強度約保持不變,可確定 eNOS mRNA 的強度改變原因的確全是由 stretch 所造成。

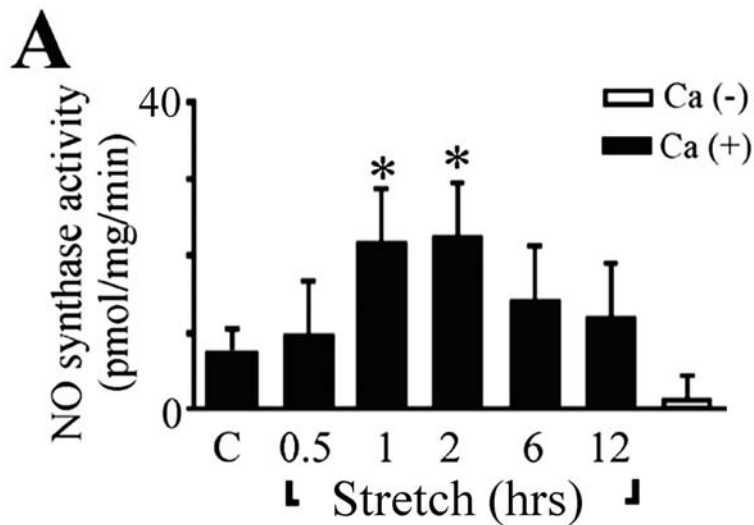
如圖 2A 所示,ctrl 和 stretch 組心肌細胞的 eNOS mRNA 都能被偵測到。然而,stretch 的心肌細胞有較強烈且明顯的反應。初期,eNOS mRNA 表現隨時間的增長而增加,但在兩個小時後則逐漸衰退。對於接受一小時 stretch 的心肌細胞和 ctrl 組所做的分析,我們將其 eNOS 基因表現,與 18S 做數值化比對,結果增加 1.4 ± 0.4 倍。



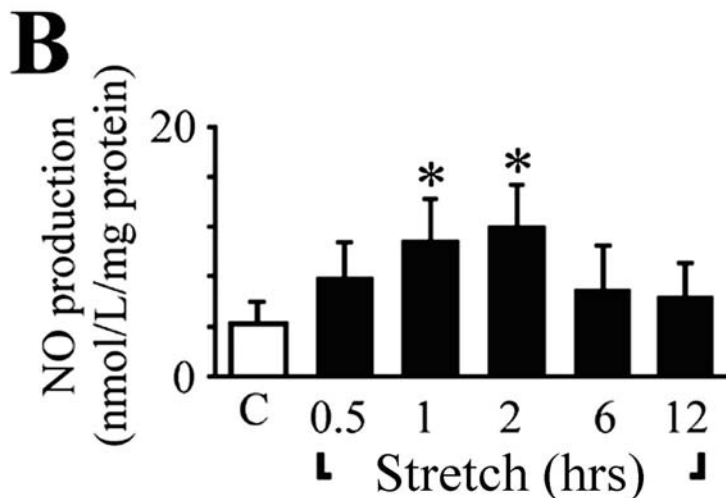
B 機械性展延對 eNOS 蛋白質表現的影響

爲了明確證實 eNOS 基因增加的表現意義，我們利用西方墨點法測量受過機械性展延的心肌細胞 eNOS 蛋白質。我們測量 ctrl 及 stretch 組的心肌細胞免疫反應 eNOS(如圖 2B)。當分子量高達 140kDa 的 eNOS 蛋白質（從條狀圖上方 eNOS 的分子量介於 116 到 205 間得知），在暴露於 stretch 下一個小時後，有表現量增加的現象，但是這些 eNOS 蛋白質在 12 小時後又落回原始實驗前的表現量。以廣泛角度來看，stretch 組之 eNOS 蛋白質在兩個小時內比 ctrl 組增加了 1.3 ± 0.3 倍。

(三)機械性展延造成心肌細胞的 NOS 活性和 NO 產生量反應



圖片 3A 所示，藉著 $[^{14}\text{C}]$ -L- arginine 轉變為 $[^{14}\text{C}]$ -L- citrulline 的原理測量 eNOS 兩個小時內酵素的活性變化。最顯著的效果發生在一小時以及兩小時 stretch 作用後的心肌細胞。此外，eNOS 酵素必須在有 Ca^{2+} 的環境下才能發揮其作用，故在圖中可發現無 Ca^{2+} 參與的對照組，其 eNOS 酵素的活性非常小。



在圖 3B 中，經過 stretch 兩小時的心肌細胞，會造成溶液內 nitrite (亞硝酸鹽) 和 nitrate (硝酸鹽) 堆積較 ctrl 組增為 2.8 倍，再轉變為 NO，故 NO 產量也在大約兩小時內增加到較高的數值。有一穩定流的 helium gas 可將 NO 帶入 NO 分析儀中，NO 與 ozone 反應後會產生光，發光的量與 NO 形成的產量成正比。

陸、討論與結論：

在此一研究中，我們使用 cDNA microarray 來探討機械性展延對心肌細胞作用的效應。但雖然 microarray 是最近才發展出的新技術，仍有兩個缺陷：

1. 在我們的實驗中只比較到 480 個基因，所得到的基因表現量差異的數據有限，並不能完全代表所有基因的相關結果。
2. 當 signal 本身就表現的很少，低於儀器可察覺標準時，會發生儀器無法偵測到的情況，如此即使基因表現量有增減，我們亦無法得知。

因為有此兩大缺陷，為了證明 cDNA Microarray 所偵測出的基因表現量改變的確是對的，我們選擇了 eNOS 基因，利用 NOS 活性與 NO 產生量的測定，進一步探討驗證 cDNA Microarray 所得之結果。

週期性機械性展延的壓力收縮，代表機械力影響環境下使內皮細胞層、血管平滑肌和心肌基因表現正常化的重要成分，以模擬動物體內心臟血管細胞的生理反應。在牛科動物的大動脈內皮細胞，循環的機械性展延會增加內皮細胞的 NOS 表現和 NO 的產生量。在人類大動脈的內皮細胞，脈動性的機械性展延增加了 NOS 蛋白質和 mRNA 的表現，並刺激 NO 的產量。在我們的實驗中，數據顯示機械性展延能誘導 eNOS 基因表現量，因此增加心肌細胞內 NOS 活性及 NO 產生量。此一結果與其他研究不同細胞種類所做出的研究一致。

由此可知，cDNA Microarray 的方法確實可以用來找尋與心肌細胞經機械性展延後所伴隨發生的分子表現型有關的基因。藉此技術，可將得到高血壓性心臟病的個案，抽取血液或是心臟組織切片，作全面性的篩檢比對，進而作為後續基因治療的研究基礎，探討疾病的致病機制和藥物作用的有效技術。因此這方面的研究深信能為臨床上高血壓造成的心血管疾病治療開創一嶄新的局面。

柒、參考文獻：

1. 李玲慧，蔡世峰。1999。基因晶片與基因組研究。科學月刊，739-743。
2. 張維懋。1999。生物晶片研發概況。科學月刊，716-719。
3. 許志僕。1999。DNA 微陣列。科學月刊，720-725。
4. 劉文佐。1999。微生物辨識 DNA 晶片。科學月刊，726-731。

- 5.何子樂。1999。一氧化氮、威而剛及其他。科學月刊，126-132。
- 6.宋晏仁。1998。空物惡棍成了諾貝爾的寵兒。科學月刊。1032-1036。
- 7.Cheng, T.H , N.L.Shih , S.Y.Chen , D.L.Wang , and J.J.Chen. Reactive oxygen species modulate endothelin-I-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes.
- 8.Cheng, Tzu-Hurng, Jeremy J. W. Chen, Neng-Lang Shih, Hong-Jye Hong, Heng Lin, Trees-Juen Chuang, Konan Peck, Danny Ling Wang, and Jin-Jer Chen. Mechanical stretch induces endothelial nitric oxide synthase gene expression in cardiomyocytes.
- 9.Chen, Jeremy J. W., Reen Wu, Pan-Chyr Yang, Jane-Yu Huang, Yuh-Pyng Sher, Meng-Hsuan Han, Wei-Chen Kao, Pei-Jung Lee, Trai Fu Chiu, Fu Chang, Yi-Wen Chu, Cheng-Wen Wu, and Konan Peck. 1998. Profile expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics* 51:313-324.
- 10.Dietlind Zohlhofer, Christoph A. Klein, Thomas Richter, Richard Brandl, Alexander Murr, Thomas Nuhrenberg, Albert schomig, Patrick A. Baeuerle, and Franz-Josef Neumann. Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy.
- 11.Masaru Tanihuchi, Katsuyuki Miura, Hiroshi Kwao, and Shinya Yamanaka. 2001. Quantitative assessment of DNA microarrays-comparison with northern blot analyses. *Genomics* 71:34-39.
12. Wilhelm Bloch, Klaus Assicks, Jurgen Hescheler, and K. Fleischmann. 2001. Nitric Oxide Synthase Expression and Function in Embryonic and Adult Cardiomyocytes. *Microscopy research and technique* 55:259-269.
- 13.Zarko Grozdanovic. NO message From Muscles. 2001. *Microscopy research and technique* 55:148-153.

評語

本研究新生鼠的心肌細胞，以 CO₂ 壓力，施以 20% 的機械性展延，抽取 mRNA 作成 cDNA 探討，進行 cDNA 品比分析，其 eNOS 基因有增加。西方墨點法及 NO 活性可測出 eNOS 可測出 eNOS 基因表現之增加，本計畫具有創造性。