

叶 云,付军鹏,李祎予,等. 紫檀芪处理对酿酒酵母基因组表达变化的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(5):44-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.05.011

紫檀芪处理对酿酒酵母基因组表达变化的影响

叶 云,付军鹏,李祎予,钟英英

(广西科技大学生物与化学工程学院,广西柳州 545006)

摘要:紫檀芪是存在于葡萄等植物中的天然酚类化合物,具有极强的抗真菌活性。然而,目前关于紫檀芪对真菌影响的分子机制仍是未知;因此,本研究以酿酒酵母为模型,比较紫檀芪处理和对照酿酒酵母中的基因表达谱,在基因组水平上探讨紫檀芪对真菌细胞的影响。结果表明,经紫檀芪处理能使细胞应激反应、细胞透过性及跨膜运输等功能的相关基因表达上调,而下调基因则与碱基代谢有关,并参与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,简称 MAPK)信号通路调控导致细胞衰老、凋亡。这些基因表达的改变,可为探讨紫檀芪抑制真菌的分子机制提供一定依据。

关键词:紫檀芪;基因芯片;酿酒酵母;差异基因;基因表达

中图分类号:Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)05-0044-02

紫檀芪(3,5-二甲氧基-4'-羟基二苯乙烯)广泛存在于葡萄、广西血竭和蜂胶中,是目前研究较多的白藜芦醇天然衍生物^[1-3]。紫檀芪的体外抗真菌特性比白藜芦醇高 5~10 倍^[4],然而对其抗菌分子机制的相关研究相对较少。本研究分析紫檀芪作用酿酒酵母基因芯片数据,为了解白藜芦醇处理对真菌基因表达变化的影响,以及为其抗真菌的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 基因芯片数据

紫檀芪处理酿酒酵母 S288C 细胞基因表达谱 GSE10554 来源于 NCBI 的基因表达数据库(gene expression omnibus,简称 GEO),本研究采用了 3 个经紫檀芪处理的酿酒酵母 S288C 样本及 3 个未处理样本。该芯片试验平台为 GPL90,是 Affymetrix 公司的商业性芯片,共有 9 335 个不同的酵母转录子,包括已知的 6 400 个酵母基因探针。

1.2 数据预处理

芯片数据样本解压后放入同一文件夹,将数据导入 BRB ArrayTools 软件包,并自动生成试验描述符文件。利用软件包中的 Filter 工具对芯片数据进行过滤和标准化,采用的过滤参数是荧光信号强度大于 200;每张芯片采用中位数对整张芯片进行标准化,并对不符合以下标准的基因进行滤除:2 类样本的基因中位数值至少发生 2 倍的变化,且这种改变不少于 20% 的样本数;基因表达数据缺失的样本数不超过 50%。

1.3 差异表达基因的筛选

采用 2 阵列组间非配对样本 t 检验,找到紫檀芪处理酿酒酵母细胞及未处理细胞中的差异表达基因。筛选标准为 $P < 0.001$,变化倍数大于 2,10 000 次随机,假阳性发现

率 < 0.01 。

1.4 差异表达基因的功能富集及通路分析

用 GOEAST 数据库(<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/index.php>)和 DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)在线分析工具分别对上调和下调差异表达基因进行基因功能注释,了解与这些差异表达基因相关的生物学功能,从而探讨紫檀芪作用酿酒酵母的可能分子机制。同时,利用京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,简称 KEGG)找到与这些差异表达基因相应的生物学通路,以便为紫檀芪对酿酒酵母影响的分子机制提供思路。

2 结果与分析

2.1 差异表达基因

通过数据预处理,共有 654 个基因通过了滤过标准,这些基因中进行 2 样本非配对 t 检验,共获得 236 个有统计学意义的差异表达基因,已知其中的 132 个基因。这些基因中有 77 个表达上调,55 个表达下调,变化倍数达到 5 以上的基因有 81 个,上调基因中变化倍数最大的接近 290,变化倍数超过 10 的有 30 个基因;表达下调基因中变化最大的则达到 120 倍,变化倍数超过 10 的有 10 个基因(表 1)。

2.2 差异表达基因 GOEAST 分析结果

用 DAVID 和 GOEAST 等 2 个数据库对差异表达基因进行功能注释发现,上调的差异表达基因主要与转录调控、热激反应、压力反应、细胞膜透过性、ATP 酶活力、药物运输等生物学功能有关;下调的差异表达基因则主要与有性繁殖、细胞增殖、氨基酸运输、细胞融合等生物学过程有关。KEGG 通路分析发现,下调基因富集在 MAPK、嘧啶嘌呤代谢、鞘氨醇的脱氢反应等生物学通路上,表明这些基因的下调抑制了上述通路的生物学活性。

3 讨论

分析基因表达谱数据可以从全基因组水平探讨紫檀芪作

收稿日期:2016-01-21

基金项目:广西科技大学博士基金(编号:12x01)。

作者简介:叶 云(1978—),男,博士,副教授,主要从事基因芯片应用方面的研究。E-mail:yeemvan@126.com。

表 1 部分差异表达基因及表达倍数变化

上调基 因符号	处理/ 对照	上调基 因符号	处理/ 对照	下调基 因符号	对照/ 处理
AZR1	289.99	HXT9	11.08	KNH1	5.26
RSB1	174.45	VHR1	10.82	FEN1	5.00
PUG1	108.43	JLP1	10.67	CLN1	5.26
RDN37 - 1	106.11	SUE1	9.87	IRC8	5.56
HSP12	72.96	RTS3	8.98	CWP1	5.88
SSA4	55.39	HSP82	8.93	HXT4	6.25
BAP2	42.62	FMP43	8.41	MHT1	7.14
RTA1	39.71	MDJ1	8.40	SUL1	7.14
XBPI	36.00	RDN5 - 1	7.73	OPT1	7.14
BDH2	34.54	HSP42	7.46	RNR1	7.14
YGP1	30.83	HAL5	7.40	SST2	7.14
BAG7	29.68	ERO1	7.36	FRE2	7.14
PDR15	25.89	DIA1	7.16	ERS1	7.14
ICT1	24.42	GYP7	7.14	PRM1	7.14
SGA1	22.58	NCA3	7.04	YHP1	7.14
ECM13	21.13	IPT1	6.93	MCD1	8.33
CSR2	15.46	NGL3	6.76	MMP1	8.33
RPN4	14.96	BAP3	6.72	TOS4	8.33
YOR1	14.13	SSE2	6.29	SRD1	9.09
INO1	13.79	HSP78	5.85	HO	10.20
HSP26	13.69	COX17	5.73	SAM3	10.53
ADR1	13.67	CPR6	5.71	PHM6	11.24
MIG2	12.94	RAD16	5.38	GRX8	11.49
SNQ2	12.42	PCK1	5.32	SEO1	12.05
HXT5	11.93	IML2	5.07	ZPS1	12.20
PDR3	11.37			STE3	12.50
PDR10	11.09			WSC4	22.22
				SAG1	31.25
				MF (ALPHA) 2	120.48

用的分子表达变化情况,为进一步探讨紫檀芪作用于真菌的分子机制提供了依据。本研究通过分析经紫檀芪处理酿酒酵母 S288C 细胞及对照的基因表达谱数据,共获得 132 个已知功能的基因,其中 77 个基因表达上调,55 个基因表达下调,表明这些基因的表达变化可能是紫檀芪抑制真菌活性的主要分子基础。

通过进一步功能注释发现,上调基因与细胞膜透透性、应激反应等主要生物功能有关。其中 HSP12、HSP78、MDJ1 对热刺激反应起作用,且在表达过程中分别上调了 72.96、5.85、8.40 倍。HSP12、HSP78 是编码热激蛋白的基因,热激蛋白是生物体在高温等环境胁迫下诱导合成的一类应激蛋白^[5]。除此之外,表达上调的基因中还有 HSP26、HSP42 和 HSP82 等热激蛋白家族成员。生物体受到热激时,热激蛋白基因转录被激活,多数正常蛋白质基因的转录被抑制,同时正常温度下存在的大多数 mRNA 的翻译降低或停止。热激蛋白的上调表达表明,经紫檀芪处理对酵母的生长产生了环境胁迫,使其诱导表达热激蛋白以抵抗不良环境。

根据 KEGG 数据库对差异表达基因进行通路分析发现,下调基因主要参与 MAPK、(神经)鞘脂代谢和嘌呤、嘧啶代

谢等通路调控,且往往位于通路的上游;在 MAPK 信号途径中基因 MF (ALPHA) 2、GPAL、SET3 和 SET4 均参与了通路中第 1 个激酶(调节缩氨酸信息素信号传导的激酶)的调控,在该途径中起着关键的作用。MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能响应各种胞外和胞内刺激而被激活,在多种细胞过程中发挥关键性作用,包括细胞增殖、分化和凋亡等^[6]。而上述基因的下调表达,使得 MAPK 活化受到抑制,从而阻止 MAPK 信号途径,促使酿酒酵母细胞凋亡。有研究表明,经紫檀芪处理可以抑制脂多糖激活的神经小胶质细胞中的 MAPK 信号通路^[7]。在(神经)鞘脂代谢过程中,基因 TSC10 参与催化鞘氨醇的脱氢反应。该反应处于鞘脂代谢的上游,对下游的代谢过程有着非常重要的作用,而该反应所产生的能量也是下游代谢过程中的主要能量来源。经紫檀芪处理后基因 TSC10 表达下调了 4.17 倍,表明紫檀芪对鞘脂代谢过程有较强的抑制作用,而鞘脂普遍存在于各种动植物细胞的细胞膜、细胞器膜、载脂蛋白和富脂器官中,在细胞的胞吞、胞饮等细胞过程中起着重要作用,而且鞘脂代谢途径中的一些中间体还是重要的信号分子,在细胞信号转导、细胞抗逆反应以及细胞的生长、凋亡、分化、衰老等细胞基本活动过程中发挥重要的调节作用^[8-9]。这些说明了紫檀芪对酿酒酵母细胞生长和分化有抑制作用,从而诱导酿酒酵母细胞的凋亡、衰老。经紫檀芪处理后基因 RNR1 下调了 7.14 倍;另外 POL12、FUR1 也分别表达下调了 4.00 倍。由于这些基因对嘌呤和嘧啶代谢起着关键作用,它们表达的下调导致调控的通路过程受到抑制,影响核酸代谢,细胞生长受到抑制。

参考文献:

[1] Liu J, Fan C X, Yu L M, et al. Pterostilbene exerts an anti-inflammatory effect via regulating endoplasmic reticulum stress in endothelial cells[J]. Cytokine, 2016, 77: 88-97.

[2] Al R M, Rimando A M, Silistrel K, et al. Anxiolytic action of pterostilbene; involvement of hippocampal ERK phosphorylation[J]. Planta Medica, 2013, 79(9): 723-730.

[3] McCormack D, McFadden D. Pterostilbene and cancer: current review[J]. Journal of Surgical Research, 2012, 173(2): 53-61.

[4] 王俊芳, 李瑞国, 刘文, 等. 葡萄白藜芦醇主要衍生物的研究进展[J]. 园艺学报, 2011, 38(4): 790-798.

[5] 郭虹霞, 王创云, 赵丽, 等. 小分子热激蛋白的研究进展[J]. 山西农业科学, 2013, 41(12): 1421-1423.

[6] 徐伟丽, 孙文广, 马莺. MAPK 信号通路与结直肠癌[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(2): 389-392.

[7] Hou Y, Li N, Xie G B, et al. Pterostilbene exerts anti-neuroinflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia via inhibition of MAPK signalling pathways[J]. Journal of Functional Foods, 2015 (19): 676-687.

[8] Dickson R C, Lester R L. Shpingolipid functions in Saccharomyces cerevisiae[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1583(1): 13-25.

[9] Dickson R C, Sumanasekera C, Lester R L. Functions and metabolism of sphingolipids in Saccharomyces cerevisiae[J]. Progress in Lipid Research, 2006, 45(6): 447-465.