

溃疡性结肠炎与克罗恩病基因谱表达的差异

赵琦, 何鲜平, 游绍伟

赵琦, 何鲜平, 游绍伟, 贵阳中医学院第二附属医院消化科
贵州省贵阳市 550001

赵琦, 副主任医师, 主要从事胃肠疾病及消化内镜的诊治研究。

作者贡献分布: 赵琦负责课题的设计; 游绍伟负责数据的统计分析; 何鲜平负责论文的写作。

通讯作者: 赵琦, 副主任医师, 550001, 贵州省贵阳市飞山街32号, 贵阳中医学院第二附属医院消化科. xuelong1983@126.com
电话: 0851-6855119

收稿日期: 2014-08-17 修回日期: 2014-10-12

接受日期: 2014-10-16 在线出版日期: 2014-12-08

Differential gene expression profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease

Qi Zhao, Xian-Ping He, Shao-Wei You

Qi Zhao, Xian-Ping He, Shao-Wei You, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Correspondence to: Qi Zhao, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, 32 Feishan Street, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. xuelong1983@126.com

Received: 2014-08-17 Revised: 2014-10-12

Accepted: 2014-10-16 Published online: 2014-12-08

Abstract

AIM: To compare the difference in gene expression profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease to provide a theoretical basis for further understanding of their pathogenesis and clinical treatment of choice.

METHODS: Intestinal epithelial cells from patients with Crohn's disease, those with ulcerative colitis and healthy volunteers were subjected to microarray analysis to obtain their gene expression profiles. Linear regression model was built using the Limma package to compare differences in gene expression between different groups. Gene Ontology (GO) analysis was performed to predict gene function, and cluster Profiler was used to conduct enrichment analysis of gene clusters. KEGG pathway analysis was performed to obtain the similarities and differences in pathways between Crohn's disease and ulcerative colitis.

RESULTS: Differential gene expression profiles were obtained between ulcerative colitis, Crohn's disease and normal controls by microarray analysis. GO analysis showed that ulcerative colitis and Crohn's disease had significant differences in gene expression. KEGG pathway analysis indicated that ulcerative colitis and Crohn's disease had significant differences in cell adhesion molecules (CAMs), ECM-receptor interaction, B cell receptor signaling pathway, and cytokine-cytokine receptor interaction.

CONCLUSION: There are thousands of differentially expressed genes between ulcerative colitis and Crohn's disease. The two diseases have significant differences in intracellular pathways, particularly metabolism, and differential metabolites may be used to distinguish the two diseases.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; Crohn's disease; Functional analysis; Pathway analysis; Treatment

Zhao Q, He XP, You SW. Differential gene expression profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(34): 5371-5375
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5371.asp>
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i34.5371>

摘要

目的: 探究溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD)两种肠道炎症疾病的发病机制, 为临床治疗时的给药选择提供参考。

方法: 收集UC肠上皮细胞, CD肠上皮细胞, 正常人肠上皮细胞, 将他们进行基因芯片分析, 从而拿到各自的基因表达谱。通过线性回归模型软件包limma对不同组的芯片进行差异比较, 从而得到不同处理间的差异表达基因。利用数据库Gene Ontology对基因功能定位的分类, 通过cluster Profiler包进行GO聚类富集, 将这些差异表达的基因从细胞内组成、分

■背景资料

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD)都是肠道炎症疾病, 同时他们的症状有很多相似之处, 造成传统诊断时很难确定患者到底是患有哪种疾病, 也因此造成对症下药的困难。

■同行评议者

程英升, 教授, 上海交通大学附属第六人民医院放射科

■研究前沿

为了区分UC与CD, 这里利用生物芯片分析来自UC、CD患者和正常人肠上皮细胞的表达谱, 分析差异表达的基因, 以期从分子水平上得到UC与CD的异同之处, 从而为UC与CD患者的确诊提供医疗手段上新的突破。

子功能和生物进程三方面上进行聚类, 从而得到这些差异表达的基因对细胞的影响. 利用DAVID网站对差异表达的基因进行KEGG PATHWAY的聚类分析, 从而得到前UC与CD细胞发生改变的信号通路的异同之处。

结果: 通过差异分析, 得到了UC、CD和正常细胞差异表达基因比较. GO结果显示UC和CD两种疾病确实存在着显著的差异, KEGG通路分析UC与CD细胞通路的一个重要区别在于信号传导方面, 包括Cell adhesion molecules (CAMs)、ECM-receptor interaction、B cell receptor signaling pathway和Cytokine-cytokine receptor interaction.

结论: 两种疾病存在着上千个差异表达基因. 其次, 这两种疾病的细胞表现存在明显差异. 最后, 细胞内通路也存在差异, 尤其是代谢上存在差异, 因而可以通过代谢产物对这两种疾病以示区分. UC和CD这些分子水平上的差异, 为临床上对这两种疾病的确诊提供了很好的思路。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 功能分析; 通路分析; 治疗

核心提示: 本文运用基因芯片技术, 探索溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)和克罗恩病(Crohn's disease)在分子表现上的不同之处. 从GO生理进程的聚类上看, 这两种疾病的细胞表现存在着明显的差异. 因此, 这两种疾病绝不能混为一谈, 同时, 对症下药也显得尤为重要。

■相关报道

UC与CD都属于炎症性肠病, 这两种疾病都是以反复发生的肠道溃疡为特征, 患者常表现为腹泻、黏液血便及腹痛, 并且症状很相似, 所以有些时候, 即使是医生也很难明确作出诊断. 目前, 临床上普遍认为的两者的不同之处是, CD可能影响到消化道的各个部分(如食管、胃、小肠、结肠), 而UC的影响常局限于大肠. 但是, 仅靠这些很难区分这两种疾病。

赵琦, 何鲜平, 游绍伟. 溃疡性结肠炎与克罗恩病基因谱表达的差异. 世界华人消化杂志 2014; 22(34): 5371-5375 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/5371.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i34.5371>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与克罗恩病(Crohn's disease, CD)都是肠道炎症疾病, 同时他们的症状有很多相似之处, 造成传统诊断时很难确定患者到底是患有哪种疾病, 也因此造成对症下药的困难^[1,2]. 为了甄别UC与CD, 这里利用生物芯片分析来自UC、CD患者和正常人肠上皮细胞的表达谱, 分析差异表达的基因, 以期从分子水平上得到UC与CD的异同之处, 从而为UC与CD患者的确诊提供医疗手段上新的突破。

1 材料和方法

1.1 材料 为了探索UC与CD细胞的差异, 这里从基因水平上去寻找差异表达基因, 并探究改变的代谢通路. 收集UC肠上皮细胞、CD肠上皮细胞和正常人肠上皮细胞, 将他们进行基因芯片分析, 从而拿到各自的基因表达谱. 我们选取GEO数据库中样本数据, 组成如下: GSM6731中正常人肠上皮细胞芯片4张(GSM155564、GSM155565、GSM155566、GSM155567), CD肠上皮细胞芯片6张(GSM155568、GSM155569、GSM155571、GSM155572、GSM155573、GSM155574), UC肠上皮细胞芯片5张(GSM155587、GSM155588、GSM155589、GSM155590、GSM155591); 平台信息: GPL8300, [HG_U95Av2] Affymetrix Human Genome U95 Version 2 Array. 我们下载原始CEL文件以及该平台探针注释信息文件。

1.2 方法

1.2.1 差异表达基因提取: 在得到芯片的原始数据后, 将这些数据分为UC、CD和正常细胞(Normal)3组. 我们通过R软件(v.2.13.0)^[3]平台对芯片数据进行分析. 首先用Robust Multichip Averaging(RMA)法^[4]对不同芯片进行归一化处理, 在通过线性回归模型软件包limma^[5]对不同组的芯片进行差异比较, 从而得到不同处理间的差异表达基因。

1.2.2 差异表达基因GO分析: 为了寻求这些差异表达基因在细胞层面上发生的改变及他们的功能聚类, 这里利用数据库Gene Ontology^[6]对基因功能, 定位的分类, 通过cluster Profiler^[7]包进行GO聚类富集, 将这些差异表达的基因从细胞内组成、分子功能和生物进程三方面上进行聚类, 从而得到这些差异表达的基因对细胞的影响。

1.2.3 生物学通路数据: 为了从分子水平上UC与CD的异同之处, 我们这里专注于生物学通路这一层面. 我们从当前比较权威的通路数据库KEGG PATHWAY DATABASE中获取所有代谢与非代谢通路, 利用DAVID网站对差异表达的基因进行KEGG PATHWAY的聚类分析^[8,9], 从而得到前UC与CD细胞发生改变的信号通路的异同之处。

统计学处理 实验数据以mean±SD表示, 采用Student's *t*检验方式检测组间的差异, *P*<0.05为差异有统计学意义。

表 1 溃疡性结肠炎、克罗恩病和正常细胞差异表达基因比较

分组	UC vs Normal	CD vs Normal	UC vs CD
UC vs Normal	3532	1907	564
CD vs Normal	1907	3035	327
UC vs CD	564	327	1232

UC: 溃疡性结肠炎; CD: 克罗恩病; Normal: 正常细胞。

2 结果

2.1 识别不同心理状态下的差异表达的基因 我们对UC、CD和正常细胞基因表达谱进行多重比较, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, 得到UC与CD细胞差异表达的基因。UC、CD和正常细胞两两间差异表达基因数目如表1所示。

2.2 差异表达基因GO聚类 为了探索UC和CD的分子差异, 我们首先考察他们差异表达基因的GO分类情况。通过cluster Profiler对UC和CD的差异表达基因进行GO聚类。取显著性阈值为 $P<0.01$, 对差异表达的基因进行GO聚类。这些差异表达的基因的聚类结果如表2所示。从GO聚类结果来看, UC与CD确实是可以从分子水平上进行区分的。首先, 从差异基因的细胞组成上看, 他们在细胞表面和膜外确实是存在差异的, 而这些膜外组分的差异, 又很容易通过抗体抗原免疫反应进行识别。因此从细胞组成上看, 可以发展细胞表面UC和CD差异表达的特异蛋白的特异抗体, 从而通过免疫反应对这两种疾病进行区别; 其次, 从分子功能上看, UC和CD也是有着明显差异的。细胞表面结合(cell surface binding)和GDP binding是细胞信号传导的重要组成部分。因此, UC和CD他们的细胞内部信号存在着差异。而从分子功能的聚类结果上看, neurotrophin和nerve growth factor两个信号分子介导的信号通路很可能发生了变化。此外, UC和CD细胞在生理进程上的差异更为显著, 其GO聚类条目多大上百条。因此, UC和CD两种疾病确实存在着显著的不同, 而临床上对他们的区别对待也显得尤为重要。

2.3 UC与CD细胞发生改变的生物学通路 UC与CD发生时, 其细胞基因表达谱发生了明显的变化。除GO聚类外, 我们同时希望能够从代谢通路上寻找出一些差异。我们选取UC和CD的差异表达的基因进行KEGG子通路富集分析, 从而寻找UC与CD细胞发生改变的信号通路。这里以 $P<0.01$, 并且至少有两个基因处于该信号通路

表 2 差异表达基因GO聚类分析

GO term	P值
Component Compartment	0.005
Extracellular region	0.005
Cell fraction	0.005
Membrane fraction	0.005
Isoluble fraction	0.005
Extracellular space	0.005
Molecular function	
Antigen binding	0.005
Cell surface binding	0.005
GDP binding	0.005
Eukaryotic cell surface binding	0.005
Nerve growth factor binding	0.005
Biological process	
Positive regulation of cell differentiation	1.05×10^{-5}
Positive regulation of developmental process	8.02×10^{-5}
Neurogenesis	0.00013
Cell development	0.000162
Regulation of gastrulation	0.000162

为限制条件, 从而得到显著改变的生物学通路(表3)。从表3可以看到, UC与CD细胞通路的一个重要区别在于信号传导方面, 包括cell adhesion molecules(CAMs)、ECM-receptor interaction、B cell receptor signaling pathway及cytokine-cytokine receptor interaction。其中, B cell receptor signaling pathway与cytokine-cytokine receptor interaction说明机体对这两种疾病的免疫应答时存在差异的。而聚集得到的另一个通路hematopoietic cell lineage更进一步证实了这一点。Cell adhesion molecules(CAMs), ECM-receptor interaction, cytokine-cytokine receptor interaction作为细胞接受细胞外信号的通路, 最终造成的是对细胞本身的影响, 因此我们把目光聚焦在B cell receptor signaling pathway通路上。

3 讨论

UC与CD都属于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 这两种疾病都是以反复发生的肠道溃疡为特征, 患者常表现为腹泻、黏液血便及腹痛, 并且症状很相似, 所以有些时候, 即使是医生也很难明确作出诊断^[10]。目前, 临床上普遍认为的两者的不同之处是, CD可能影响到消化系的各个部分(如食管、胃、小肠、结肠), 而UC的影响常局限于大肠^[11]。但是, 仅靠这些很难区分这两种疾病。

■应用要点

本文从多种层面探索UC和CD的差别。首先是这两种疾病存在着上千个差异表达基因; 其次, 这两种疾病的细胞表现存在明显差异; 最后, 细胞内通路也存在差异, 尤其是代谢上存在差异, 因而可以通过代谢产物对这两种疾病以示区分。UC和CD这些分子水平上的差异, 为临床上对这两种疾病的确诊提供了很好的思路。

■名词解释

GO: 是基因本体联合会(Gene Ontology Consortium)所建立的数据库。Gene Ontology对基因功能,定位的分类,通过cluster Profiler包进行GO聚类富集,将这些差异表达的基因从细胞内组成,分子功能和生物进程三方面进行聚类,从而得到这些差异表达的基因对细胞的影响。

表 3 溃疡性结肠炎与克罗恩病不同的生物学通路

Term	P值
hsa05200: Pathways in cancer	5.71×10^{-6}
hsa00100: Steroid biosynthesis	5.76×10^{-5}
hsa04640: Hematopoietic cell lineage	7.73×10^{-5}
hsa04662: B cell receptor signaling pathway	1.14×10^{-4}
hsa04060: Cytokine-cytokine receptor interaction	0.002985
hsa04960: Aldosterone-regulated sodium reabsorption	0.003344
hsa04514: Cell adhesion molecules(CAMs)	0.004324
hsa05220: Chronic myeloid leukemia	0.007849
hsa05210: Colorectal cancer	0.009148
hsa04512: ECM-receptor interaction	0.009148

本文运用基因芯片技术,探索UC和CD在分子表现上的不同之处。从GO生理进程的聚类上看,这两种疾病的细胞表现存在着明显的差异。因此,这两种疾病绝不能混为一谈,同时,对症下药也显得尤为重要。可以看到,UC与CD细胞首先是细胞膜上对信号能力的应答存在差异。其一: CD22、Ig α 及Ig β 的差异造成非受体型酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, SYK)和Bruton酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)的差异,进一步影响PLC- γ 2的差异,最终通过钙信号通路影响NFAT,从而造成B细胞免疫的差异;其二: 通过膜上Fc γ RIIB、CD81、CD19及CD21分子表达差异,再通过PI3K通路的传递,最终造成NF- κ B的差异,影响细胞降解异物蛋白的能力^[12]。其次,UC与CD患者的细胞通路的差异在癌症相关的一些通路上,包括pathways in cancer、colorectal cancer及small cell lung cancer^[13]。此外,临床上更容易区分UC与CD的通路在与代谢上的两个通路。其一是steroid biosynthesis,由于这个通路的差异,UC与CD细胞中甾醇的含量很可能存在着差异^[14]。这个通路的差异主要在于一些酶的表达差异,包括carboxyl ester lipase(bile salt-stimulated lipase)、emopamil binding protein(sterol isomerase)、sterol-C4-methyloxidase-like等,因此也可以通过检测这些酶的差异来区分这两种疾病。另外一个通路是aldosterone-regulated sodium reabsorption。同样的,也可能可以通过醛固酮来区别UC和CD^[15]。

本文从多种层面探索UC和CD的差别。首先是这两种疾病存在着上千个差异表达基因;其

次,这两种疾病的细胞表现存在明显差异;最后,细胞内通路也存在差异,尤其是代谢上存在差异,因而可以通过代谢产物对这两种疾病以示区分。UC和CD这些分子水平上的差异,为临床上对这两种疾病的确诊提供了很好的思路。

4 参考文献

- Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, Brant SR, Kwon JH. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 241-250 [PMID: 20812331 DOI: 10.1002/ibd.21450]
- Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics and new diagnoses of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106: 2133-2142 [PMID: 21912437 DOI: 10.1038/ajg.2011.304]
- Dean CB, Nielsen JD. Generalized linear mixed models: a review and some extensions. *Lifetime Data Anal* 2007; 13: 497-512 [PMID: 18000755]
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4: 249-264 [PMID: 12925520 DOI: 10.1093/biostatistics/4.2.249]
- Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: Article3 [PMID: 16646809]
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25: 25-29 [PMID: 10802651]
- Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS* 2012; 16: 284-287 [PMID: 22455463 DOI: 10.1089/omi.2011.0118]
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4: 44-57 [PMID: 19131956 DOI: 10.1038/nprot.2008.211]
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 1-13 [PMID: 19033363 DOI: 10.1093/nar/gkn923]
- Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 475-507 [PMID: 8809232]
- Vilela EG, Torres HO, Martins FP, Ferrari Mde L, Andrade MM, Cunha AS. Evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 872-881 [PMID: 22408345 DOI: 10.3748/wjg.v18.i9.872]
- Christophi GP, Rong R, Holtzapfel PG, Massa PT, Landas SK. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18: 2342-2356

- [PMID: 22467146 DOI: 10.1002/ibd.22957]
- 13 Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 2011; 140: 1807-1816 [PMID: 21530747 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.057]
- 14 Pearl DS, Masoodi M, Eiden M, Brümmer J, Gullick D, McKeever TM, Whittaker MA, Nitch-Smith H, Brown JF, Shute JK, Mills G, Calder PC, Trebble TM. Altered colonic mucosal availability of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in ulcerative colitis and the relationship to disease activity. *J Crohns Colitis* 2014; 8: 70-79 [PMID: 23619007 DOI: 10.1016/j.crohns.2013.03.013]
- 15 Regmi P, Malla B, Gyawali P, Sigdel M, Shrestha R, Shah DS, Khanal MP. Product of serum calcium and phosphorus ($\text{Ca} \times \text{PO}_4$) as predictor of cardiovascular disease risk in predialysis patients. *Clin Biochem* 2014; 47: 77-81 [PMID: 24064489 DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.09.012]

■同行评价

本文分析UC与CD差异表达的基因谱,有一定的临床指导意义。

编辑 韦元涛 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。