

DOI:10.3969/j.issn.1672-5565.201704002

# 两种药物协同效应对酵母细胞转录组的影响

沈成,童侨,金一然,袁辰阳,罗静帆,黄新河\*

(西南交通大学 生命科学与工程学院,成都 610031)

**摘要:**寻找抗衰老活性分子并研究其作用机制是衰老药物学的研究重点和热点。前期研究发现活性分子多球壳菌素和雷帕霉素可通过分子间协同效应延缓芽殖酵母细胞衰老。为了考察这两种小分子协同效应对细胞转录组的影响,利用 DNA Microarray 技术及生物信息学手段系统分析了这两种小分子药物协同处理对基因表达谱、基因本体聚类及相关信号通路的影响。研究结果显示,药物协同效应对细胞转录组产生了显著影响,共导致 2 546 个基因的差异表达 ( $FDR < 0.05$ ,  $Fold\ Change > 10\%$ ),其中 1 157 个基因显著上调,1 389 个基因显著下调。进一步对基因本体聚类及信号通路分析显示,线粒体相关的分子功能、细胞组分、生物学过程和信号通路是此协同效应的一个主要靶点,其他可能的作用靶点还包括核糖体的生物发生、细胞骨架及过氧化物酶体代谢。

**关键词:**多球壳菌素;雷帕霉素;协同效应;芽殖酵母;抗衰老

**中图分类号:**Q255 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-5565(2017)04-229-06

## Influence of synergy by two drugs on transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae*

SHEN Cheng, TONG Qiao, JIN Yiran, YUAN Chenyang, LUO Jingfan, HUANG Xinhe\*

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract:** Searching for anti-aging compounds and studying its mechanism of action are the focus and hotspot of aging pharmacology. Previous studies have shown myriocin and rapamycin could delay the aging of *Saccharomyces cerevisiae* through intermolecular synergistic effects. To study the influence of synergistic effects of these two small molecules on transcriptome, DNA Microarray assay and bioinformatic analysis were used to analyze synergistic effects of these two drugs on gene expression, gene ontology and related signaling pathways as well. Overall results showed synergistic effects of myriocin and rapamycin produced a significant effect on the transcriptome, leading to 2546 differentially expressed genes (DEGs) ( $FDR < 0.05$ ,  $Fold\ Change > 10\%$ ) including 1157 up-regulated DEGs and 1389 down-regulated DEGs. Further gene ontology clustering and signal pathway analysis showed mitochondrial-related cellular component, molecular function, biological processes and signaling pathways are one of the main targets of synergistic effects, and other possible targets include ribosome biogenesis, cytoskeletal organization, and peroxisome metabolisms.

**Keywords:** Myriocin; Rapamycin; Synergistic effects; *Saccharomyces cerevisiae*; Anti-aging

衰老是生物体维持分子、细胞或个体水平生理完整性能力的逐步丧失,表现为细胞或生物体对各种压力和疾病的抗性逐步下降的生物学过程<sup>[1]</sup>。衰老几乎发生于每个物种中,人类也不例外。近年研究显示,衰老本身是导致衰老相关疾病(包括心

血管疾病、II型糖尿病、神经退行性疾病及癌症等)最主要的风险因子<sup>[2]</sup>,因此,通过延缓衰老本身来预防和治疗衰老相关疾病正成为业内共识,而寻找抗衰老活性分子和策略正成为衰老研究领域的重点和热点。

收稿日期:2017-04-10;修回日期:2017-06-11.

基金项目:中央高校科技创新项目(2682016CX099);中国大学生科研训练计划项目(201610613063);四川省科技厅应用基础研究项目(2016JY0113);成都市科学技术局科技惠民计划(2015-HMOJ-00047-SF).

作者简介:沈成,男,本科生,研究方向:生物信息学;E-mail: mapleleaf-soar@my.swjtu.edu.cn.

\* 通信作者:黄新河,男,副教授,研究方向:衰老机制及衰老药物学;E-mail: xinhehuang@swjtu.edu.cn.

天然产物多球壳菌素 (Myriocin, 分子式  $C_{12}H_{39}NO_6$ , 分子量 401.5, 一种神经鞘脂合成特异性抑制剂) 是前期发现的一种新的抗衰老活性分子<sup>[3]</sup>, 雷帕霉素 (Rapamycin, 分子式  $C_{51}H_{79}NO_{13}$ , 分子量 914.0, 一种 TORC1 激酶特异抑制剂) 是一种广谱的抗衰老活性分子。前期研究表明, 多球壳菌素和雷帕霉素可通过分子间协同效应延缓芽殖酵母细胞衰老并延长细胞寿命<sup>[4]</sup>。为进一步阐明此协同效应的作用机制, 本文考察了该协同效应对细胞转录组的影响, 进而从生信角度分析了该协同效应调控的细胞过程和信号通路, 为阐明该协同效应的作用机制提供依据和思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与原始数据

实验菌种、培养基及处理均同文献[4]。菌种为野生型芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) DBY746; 培养基为 SDC (Synthetic Dextrose Complete); 实验处理为: 无药物处理组 (ND, 样本编号 DS-1~5)、45 ng/ml Myr 处理组 (Myr, 样本编号 DS-6~10)、450 pg/ml Rap 处理组 (Rap, 样本编号 DS-11~15)、45 ng/ml Myr 及 450 pg/ml Rap 组合处理组 (Syn, 样本编号 DS-16~20)。随后利用 RNeasy 试剂盒 (Qiagen, Cat#74104) 提取总 RNA, 在各组中筛选出组内 RNA 质量浓度相近且质量好的 3 个样本, 进行基因芯片检测, 得到微阵列 MAS5 信号值作为原始数据<sup>[5-8]</sup>。

### 1.2 生物信息学分析

#### 1.2.1 主成分分析

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 使用 R 软件 (版本 3.3) 及 R Studio (版本 1.0.136), 通过扩展包 “psych”, 对每个样本的 5 900 个探针信号值数据做降维处理, 提取 3 个主成分; 通过扩展包 “rgl”, 将 3 个主成分的因子载荷 (loadings) 作为三维坐标, 进行可视化。

#### 1.2.2 差异表达基因

通过使用 R 语言平台 (版本 3.3, <https://www.r-project.org/> 下载)、“Bioconductor” 扩展包分析基因芯片数据, 得到差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 列表 (DEGs list)。采用在线程序 DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery, 版本 6.8, <https://david-d.nciFoldChangerf.gov/>) 补充探针注释<sup>[9]</sup>, YEASTRACT (yeast search for transcriptional regulators and consensus tracking, <http://www.yeasttract.com/>) 补

充 ORF/Gene Symbol。同时通过扩展包 “Vennrable” 绘建韦恩图 (Venn diagrams), 对差异表达基因进行可视化<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.3 基因本体聚类 (GO terms clustering)

采用在线程序 DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery, <https://david-d.nciFoldChangerf.gov/>) Functional Annotation Clustering 工具<sup>[9]</sup>, 对 DEGs list (FDR < 0.05 & Fold Change > 10%) 进行基因本体聚类<sup>[11]</sup>, 选择 Benjamin = 0.05 为阈值筛选 clusters, 选择 Benjamin < 0.05 得到 Go Terms。

#### 1.2.4 信号通路分析 (pathways analysis)

采用在线程序 DAVID (database for annotation, visualization and integrated discovery, <https://david-d.nciFoldChangerf.gov/>) Functional Annotation Clustering 工具<sup>[9]</sup>, 对 DEGs list (FDR < 0.05 & Fold Change > 10%) 进行信号通路<sup>[12]</sup> 聚类, 选择 Benjamin = 0.05 为阈值筛选聚类簇, 选择 Benjamin < 0.05 的信号通路。

## 2 结果分析

### 2.1 主成分分析

主成分分析结果见表 1。在提取的 3 个主成分中, 协同效应组 (Syn) 的主成分 1 因子载荷与其他 3 组体现出明显的差异。对表 1 中数据进行可视化如图 1 所示, 结果显示, Syn 与单种药物处理组 (Myr, Rap) 及单一药物处理组 (Myr, Rap) 或无药物处理组 (ND) 呈显著差异, 同时, Myr、Rap 及 ND 等 3 组在主成分上有明显重叠, 这表明低剂量药物处理芽殖酵母时, 与对照组无显著差异, 而两种药物组合使用时, 产生了显著差异。

### 2.2 差异表达基因分析

分析差异表达基因数目可知, 相比于无药物处理组, 协同效应用药导致 2 546 个基因的表达水平发生显著变化, 而其中超过 89% 的差异表达基因在 Myr 组、Rap 组未出现。Myr 组、Rap 组及 Syn 组处理导致的差异表达基因列表见表 2。

通过绘制韦恩图 (如图 2 所示) 可直观看出, 在该筛选条件下, 绝大多数差异表达基因只存在于协同效应组中, 协同用药与单一药物处理有显著差异。

### 2.3 基因本体聚类分析

生物学过程的聚类结果 (如图 3 所示) 显示, 差异表达的基因主要与氧化还原过程 (GO:0055114 oxidation-reduction process)、细胞的氧化应激反应 (GO:0034599 cellular response to oxidative stress)、

三羧酸循环(GO:0006099 tricarboxylic acid cycle)、需氧呼吸(GO:0009060 aerobic respiration)、线粒体电子传递(泛醌至细胞色素 c)(GO:0006122 mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c)、ATP 生物合成途径(GO:0006754 ATP biosynthetic process)、线粒体电子传递(细胞色

素 c 至氧)(GO:0006123 mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen)、ATP 合成偶联质子转运(GO:0015986 ATP synthesis coupled proton transport)等过程密切相关。这些生物学过程几乎均发生在线粒体区域中,推测线粒体相关生物学过程是协同效应的一个重要靶点。

表 1 主成分分析数据

Table 1 PCA data

组别	样本编号	荧光信号强度的相对比值		
		主成分 1	主成分 2	主成分 3
ND	DS3	0.809	0.585	-0.032
	DS4	0.817	0.573	0.013
	DS5	0.820	0.568	-0.055
Myr	DS6	0.819	0.571	0.002
	DS7	0.827	0.558	-0.033
	DS10	0.821	0.566	0.038
Rap	DS11	0.818	0.573	-0.025
	DS12	0.818	0.572	0.040
	DS15	0.822	0.566	0.058
Syn	DS16	<b>0.702</b>	0.712	0.014
	DS17	<b>0.716</b>	0.697	0.013
	DS19	<b>0.700</b>	0.713	-0.020
		0.628	0.369	0.001
		0.628	0.997	

因子载荷

方差贡献率/%

方差累积贡献率/%

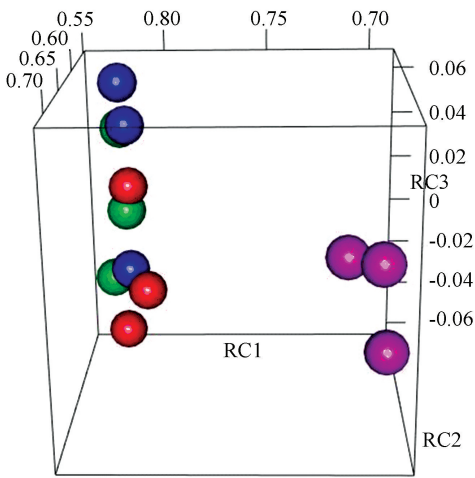


图 1 主成分分析

Fig.1 Principle component analysis

注:红色、蓝色、绿色和粉色分别为无药物处理组、Rap 处理组、Myr 处理组和协同效应组; RC1、RC2、RC3 分别为某样本的主成分 1、2、3 的因子载荷。

表 2 差异表达基因数目

Table 2 The number of differentially expressed genes (DEGs)

组别	表达上调	表达下调	总计
Syn	1 157	1 389	2 546
Myr	325	347	672
Rap	131	80	211

注:筛选条件为 FDR<0.05, Fold Change > 10%。

细胞组分的聚类分析结果(如图 3 所示)显示,差异表达的基因主要与线粒体(GO:0005739 mitochondrion)、线粒体基质(GO:0005759 mitochondrial matrix)、线粒体内膜(GO:0005743 mitochondrial inner membrane)、呼吸链(GO:0070469 respiratory chain)、线粒体膜间隙(GO:0005758 mitochondrial intermembrane space)、线粒体呼吸链复合物 IV(GO:0005751 mitochondrial respiratory chain complex IV)、线粒体呼吸链复合物 III(GO:0005750 mitochondrial respiratory chain complex III)、线粒体拟核(GO:0042645 mitochondrial nucleoid)等密切相关。这一结果也显示,线粒体相关细胞组分是协同效应的重要靶点。

2.4 通路分析

通路分析结果(如图 4 所示)显示,相比于无药物处理组,协同效应用药组内 147 条通路发生改变,其中超过 60%的通路在 Myr 组、Rap 组没有显著变化。按照 Benjamin 由小至大排列,在前 15 条通路中,超过 1/3 的通路(包括氧化磷酸化(sce00190: Oxidative phosphorylation)、碳代谢(sce01200: Carbon metabolism)、三羧酸循环(sce00020: Citrate cycle)、丙酮酸代谢(sce00620: Pyruvate metabolism)、糖酵解(sce00010: Glycolysis / Gluconeogenesis)等)直接与线粒体功能相关,具体可见附加文件 GO term & Pathways.xlsx。

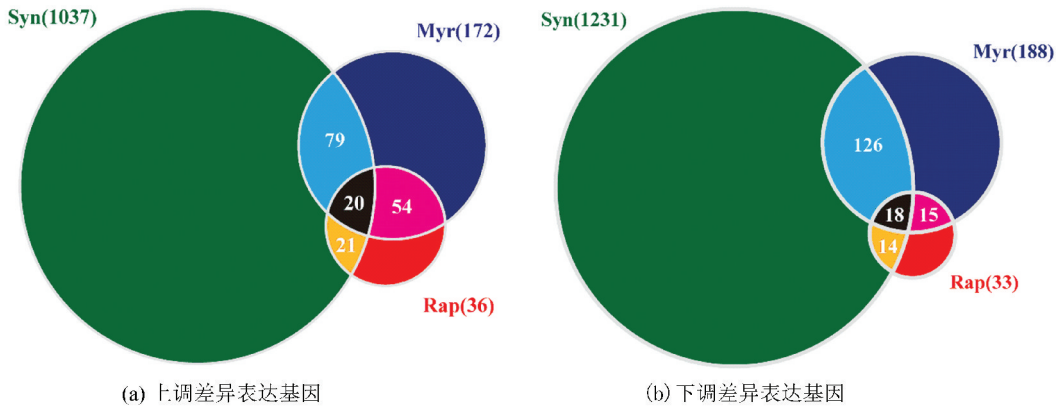
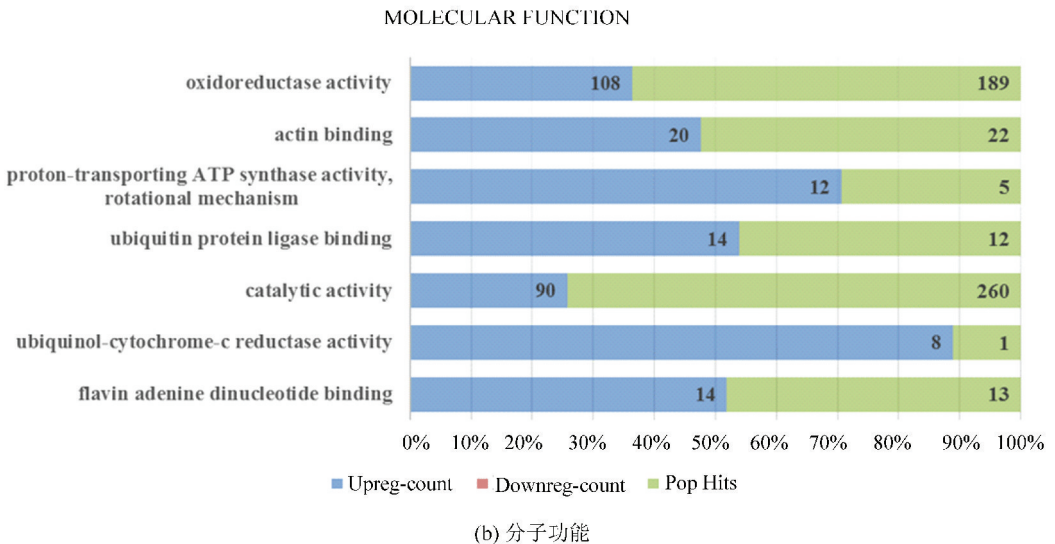
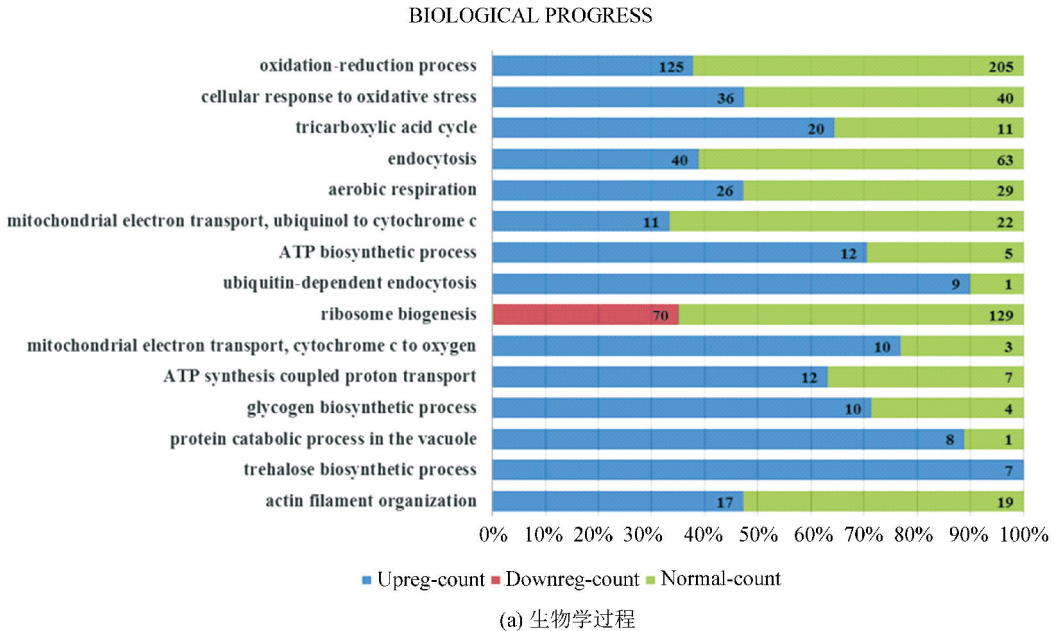


图2 差异表达基因韦恩图  
Fig.2 Venn diagram of DEGs

注:筛选条件为 FDR 值 < 0.05 且 Fold change > 10%, 圆形区域表示在上述筛选条件下差异表达的基因数量, 颜色代表不同的实验处理组: 绿色为 Syn 组; 蓝色为 Myr 组; 红色为 Rap 组。





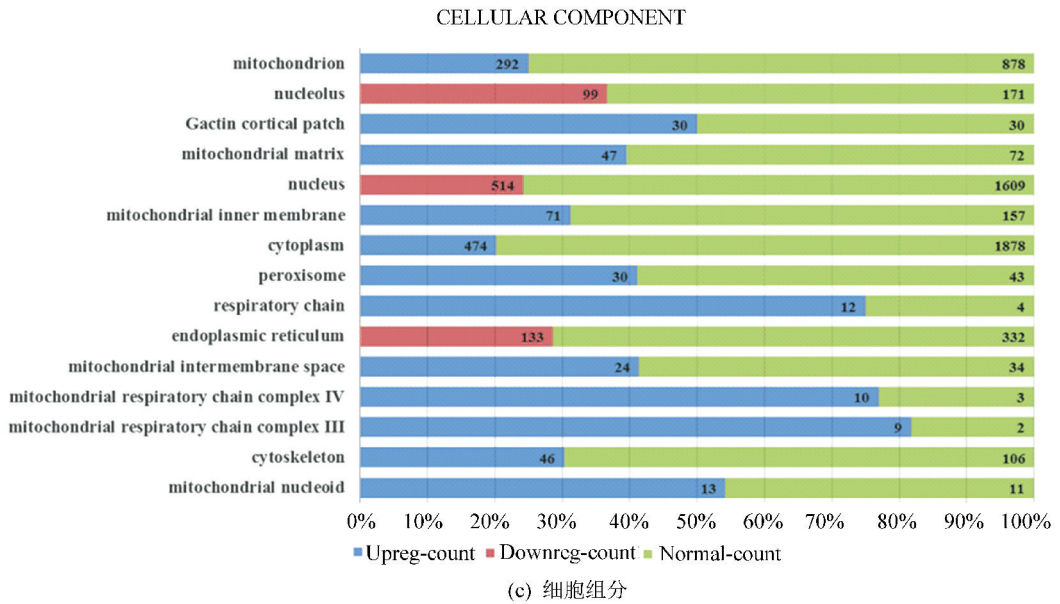


图 3 GO 聚类分析

Fig.3 GO terms clustering analysis

注:图 3(a)中左侧为不同的基因本体项目(GO terms),右侧为某项目中基因表达水平(蓝色表示上调、红色表示下调、绿色表示正常)的计数,图 3(b)、(c)类同。在满足筛选条件的项目中,对  $p$  取负常用对数值,按大小排序,图 3(a)生物学过程取值最大的 15 个项目,图 3(b)分子功能取全部 8 项,图 3(c)细胞组分取值最大的 15 个项目。

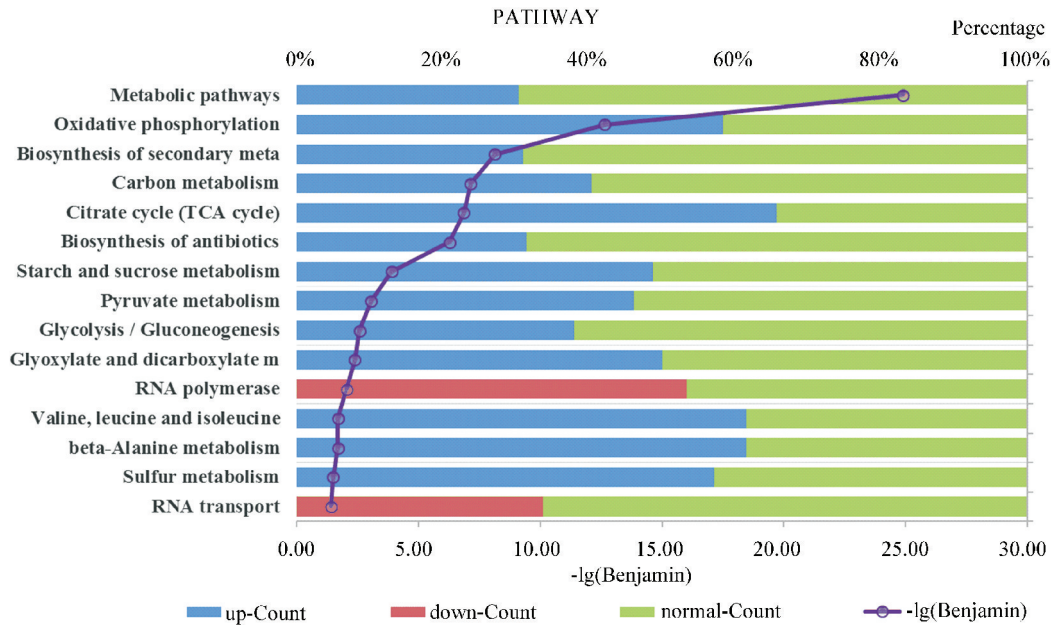


图 4 通路分析

Fig.4 Pathway analysis

注:图中左侧为不同的通路,右侧为不同表达水平(蓝色表示上调、红色表示下调、绿色表示正常)的差异表达基因在某通路中所占比例。对  $p$  取负常用对数值,按大小排序并取值最大的 15 条通路绘制图 4。

### 3 讨论

#### 3.1 主成分分析

主成分分析结果显示单一药物处理组(包括 Myr, Rap)与无药物处理组在转录组水平无显著差

异,说明此低剂量药物对转录组产生极小影响,与实验中发现的低剂量药物对细胞寿命影响极小的结论相吻合。

#### 3.2 差异表达基因数量分析

对差异表达基因列表分析显示,协同效应组表达水平发生显著变化的 2 546 个基因中,有超过 89%

的差异表达基因在 Myr 组、Rap 组未出现。仅在协同药物处理时表达水平发生显著变化的基因, 简称为 Unique to Syn。本文认为, 导致该情况发生的原因: 1) Unique to Syn 的表达受到单一药物雷帕霉素或多球壳菌素的调控, 但由于实验中选用的药物浓度极低 (45 ng/ml Myr, 450 pg/ml Rap), 未能使该类基因的表达水平达到本文选取的统计学筛选阈值, 即未能使其显著性差异表达; 2) Unique to Syn 的表达不受单一药物雷帕霉素或多球壳菌素的调控, 仅仅在两种小分子同时处理时才会对 Unique to Syn 起到调控。这两种猜想还需进一步通过实验加以判断。

### 3.3 差异表达基因聚类分析

差异基因本体聚类及通路分析结果均显示, 线粒体功能, 包括线粒体相关的组分 (如线粒体内膜、外膜) 和生化过程 (如氧化磷酸化、三羧酸循环), 可能是多球壳菌素和雷帕霉素协同效应调控的重要靶点, 后续将从实验角度加以重点研究。线粒体的氧化反应可能参与衰老和长寿的过程。线粒体是细胞内活性氧的主要来源, 线粒体或其 DNA 受到氧化损伤可能缩短寿命<sup>[13]</sup>。因此, 推测线粒体相关的分子功能、细胞组分、生物学过程和信号通路是此协同效应的一个主要靶点, 其与衰老具有密不可分的关系。

## 4 结 论

1) 研究表明, 线粒体内蛋白及核酸等氧化损伤是机体衰老的重要原因。Kovalenko 等<sup>[14]</sup> 提出线粒体 DNA 突变在组织细胞衰老过程中起着重要作用, 发现线粒体 DNA 突变引起细胞凋亡才是导致衰老的根本因素, 而非由自由基增多引起的细胞损伤所导致的。

2) 近年研究发现, 线粒体 DNA 的突变可以引起某种通路中的信号级联放大, 最终导致细胞程序性死亡<sup>[13, 15]</sup>。这一研究结果为本文中所考察的协同效应实验现象的生物学解释提供了思路, 即雷帕霉素和多球壳菌素的组合调控了某种级联放大通路, 导致细胞寿命的显著延长。

## 参考文献 (References)

- [1] LOPEZ-OTIN C, BLASCO M A, PARTRIDGE L, et al. The hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2013, 153(6): 1194–1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- [2] KENNEDY B K, BERGER S L, BRUNET A, et al. Geroscience: linking aging to chronic disease [J]. *Cell*, 2014, 159(4): 709–713. DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.039.
- [3] HUANG Xinhe, LIU Jun, DICKSON R C. Down-regulating sphingolipid synthesis increases yeast lifespan [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8(2): e1002493. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002493.
- [4] HUANG Xinhe, LIU Jun, WITHERS B R, et al. Reducing signs of aging and increasing lifespan by drug synergy [J]. *Aging Cell*, 2013, 12(4): 652–660. DOI: 10.1111/ace.12090.
- [5] IRIZARRY R A, BOLSTAD B M, COLLIN F, et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(4): e15. DOI: 10.1093/nar/gng015.
- [6] PEPPER S D, SAUNDERS E K, EDWARDS L E, et al. The utility of MAS5 expression summary and detection call algorithms [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(273). DOI: 10.1186/1471-2105-8-273.
- [7] 刘建胜, 张善镇, 姚志洪, 等. 不同表达谱芯片分析方法在药效机制研究中的应用 [J]. *计算机应用与软件*, 2015, 32(6): 57–61, 108. DOI: 10.3969/j.issn.1000-386x.2015.06.014.  
LIU Jiansheng, ZHANG Shanzhen, YAO Zhihong, et al. Application of different microarray analysis methods in pharmacological mechanism research [J]. *Computer Applications and Software*, 2015, 32(6): 57–61, 108. DOI: 10.3969/j.issn.1000-386x.2015.06.014.
- [8] 贾晓东, 陈秀杰, 吴欣, 等. 基于基因表达变异性的通路富集方法研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, (12): 1256–1264. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00410.  
JIA Xiaodong, CHEN Xiujie, WU Xin, et al. A method of pathway enrichment analysis based gene expression variability [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, (12): 1256–1264. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00410.
- [9] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44–57. DOI: 10.1038/nprot.2008.211.
- [10] 纪相禹. 基于 R 语言的差异表达基因检测研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2011.  
JI Xiangyu. The study of differentially expressed gene detection based on r language [D]. Changchun: Jilin University, 2011.
- [11] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The gene ontology consortium [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(1): 25–29. DOI: 10.1016/j.jcz.2007.05.001.
- [12] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 27–30.
- [13] 莫菲, 管德龙, 韩燕, 等. 线粒体 DNA 及相关基因与衰老的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(11): 2796–2799. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2016.11.109.
- [14] 龙建纲. 衰老及相关疾病中线粒体损伤与保护机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2006. DOI: 10.7666/d.y897183.
- [15] RAIMUNDO N, SONG Lei, SHUTT T E, et al. Mitochondrial stress engages E2F1 apoptotic signaling to cause deafness [J]. *Cell*, 2012, 148(4): 716–726. DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.027.