

# 基因表达谱芯片技术筛选肝再生增强因子反式调节基因

王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 刘敏

王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 刘敏, 中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市 100039  
王琳, 女, 实验技师. 主要从事肝炎病毒蛋白结合蛋白和分子生物学调节机制的研究.

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-16

## Screening and identification of genes transactivated by human augmenter of liver regeneration by microarray assay

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Qing Shao, Min Liu

Lin Wang, Ke Li, Jun Cheng, Jian Zhang, Qing Shao, Min Liu, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, the 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China

Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, 100 Xisihuanzhong Road, Beijing 100039, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-16

## Abstract

AIM: Augmenter of liver regeneration (ALR) is a protein that plays a role in liver regeneration. In order to clarify the effect of the expression of ALR on profile of the hepatocytic gene expression, we analyzed difference between the HepG2 cells transfected with ALR and controls by using gene chip technology.

METHODS: Total RNA was extracted from HepG2 cells, and RT-PCR was performed to amplify the coding region of ALR. The expression of ALR in the transfected HepG2 cells was confirmed by Western blot. Total mRNA was isolated from the transfected HepG2 cells with pcDNA3.1(-) and pcDNA3-ALR, respectively. cDNA was prepared by reverse transcription. Microarray assay was conducted for screening of up-and down-regulated genes in both HepG2 cells.

RESULTS: The expressive vector of pcDNA3(-)-ALR was constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The expression of ALR was confirmed by Western blot. After screening with cDNA microarray, we found 2 genes were up-regulated, and 24 genes including TNFRSF1A-associated via death domain, tissue inhibitor of metalloproteinase 1, epididymal androgen-related protein, down-regulated.

CONCLUSION: ALR is a cell growth factor, which has some influences on gene expression profile of hepatocytes; Microarray technology is a method to analyze gene expression spectra of trans-regulation of a protein and conducive to understand the regulative effect of ALR on hepatocytes and other biological function.

Wang L, Li K, Cheng J, Zhang J, Shao Q, Liu M. Screening and identification of genes transactivated by human augmenter of liver regeneration by microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(4):821-823

## 摘要

目的: 为了阐明人肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)的表达对于肝细胞基因表达谱的影响, 我们应用基因芯片技术, 对于转染和未转染的HepG2细胞进行了分析.

方法: 从HepG2细胞RNA中用反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)扩增出ALR编码区DNA, 常规分子生物学技术构建ALR的真核表达载体pcDNA3.1(-)-ALR, 利用脂质体转染技术转染HepG2细胞, ALR的表达以Western blot杂交技术证实. 从转染和非转染细胞HepG2种提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 并进行基因芯片技术分析.

结果: 经过限制性内切酶分析和序列测定, 证实pcDNA3.1(-)-ALR构建正确. ALR在HepG2细胞中的表达以Western blot杂交技术得到证实. 对于ALR重组表达载体和空白载体转染的HepG2细胞的基因表达谱, 利用基因芯片技术进行分析. 结果表明, 2种基因的表达水平上调, 24种基因的表达水平下调. 这些基因包括淀粉酶 $\alpha$ 、肿瘤坏死因子受体、金属蛋白酶1组织抑制因子、性激素相关蛋白等基因, 相信这些类型的基因在ALR所发挥的生物学效应起到重要的作用.

结论: ALR对于肝细胞基因表达谱存在一定影响; 基因芯片技术是分析蛋白反式调节基因表达谱的重要技术途径, 有助于了解ALR对肝细胞和其他生物学功能的调节作用.

王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 刘敏. 基因表达谱芯片技术筛选肝再生增强因子反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(4):821-823

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/821.asp>

## 0 引言

肝脏是为数不多能够再生的哺乳动物器官, 生长因子在肝再生启动及其进程中发挥着举足轻重的作用<sup>[1-7]</sup>. 肝再生增强因子(augmentor of liver regeneration, ALR)或称肝细胞生成素(hepatopoietin, HPO), 是一种刺激肝细胞增生的小分子物质, 组织分布广泛, 缺乏特异性, 但并不排除其作用靶位是特异的. 除了主要的促进肝再生活性外, ALR还参与核及线粒体转录文本的合成、稳定, 及一些重要脏器(如生殖细胞)的发育过程. 我们

曾经利用酵母双杂交方法发现了一些与 ALR 具有结合作用的蛋白质<sup>[8-11]</sup>, 现应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对于 ALR 反式调节的靶基因进行了筛选, 从另一角度探讨 ALR 潜在的生物学功能.

## 1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态 E.coli JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega). 真核表达载体及细胞转染 ALR 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-ALR 为本室构建<sup>[25]</sup>. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μg pcDNA3.1(-)-ALR 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞.

1.2 方法 细胞 mRNA 提取使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 ALR 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性定量分析. 参照 Schena et al 的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化. Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μg), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μg). 乙醇沉淀后溶解在 5 × SSC+2 g/L SDS 20 μL 杂交液中. 包含 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因和抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等. 以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp. 靶基因以 0.5 g/l 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样. 玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线(UV)交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用. 将基因芯片和杂交探针在 95 °C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 °C 杂交 15-17 h. 依次以 2 × SSC+2 g/L SDS、1 g/L × SSC+2 g/L SDS、1 g/L × SSC 洗涤 10 min, 室温晾干. 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24 条管家基因, 每个基因点 2 个点, 共 48 个点)对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正. 用 ImaGene3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度, 计算 Cy5/Cy3 比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3>2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 小于 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱<sup>[12-19]</sup>.

## 2 结果

真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-ALR 由本室构建. 总 RNA 的吸光度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>>1.89, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解,

电泳结果证实已抽提高纯度的总 RNA. mRNA 主要集中于 0.9-4.0 kb 的连续条带.

### 2.1 ALR 上调基因两条(表 1).

表 1 部分表达显著增加的基因

| GenBank 号 | 编码蛋白                            | Cy5/Cy3 |
|-----------|---------------------------------|---------|
| NM_000699 | 淀粉酶 α2A(AMY2A)                  | 2.053   |
| NM_016045 | 推测蛋白(CGI-107 protein, LOC51012) | 2.056   |

2.2 ALR 下调基因 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的 Cy5/Cy3 比值在 0.500 以下, 就判断为 HCV NS3 蛋白得下调基因. 结果有 24 种基因的表达水平下调(表 2).

表 2 部分表达显著下降的基因

| GenBank 登陆号 | 编码蛋白   | Cy5/Cy3 |
|-------------|--|---------|
| NM_001509   | 谷胱甘肽过氧化物酶 5 转录变体 1 (附睾雄激素相关蛋白)(GPX5)                                       | 0.183   |
| NM_002388   | 小染色体维持缺陷 3(MCM3)   | 0.287   |
| NM_021016   | 妊娠特异 β 1 糖蛋白 3(PSG3)   | 0.302   |
| NM_003254   | 金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMP1)   | 0.341   |
| NM_004728   | 天冬 - 谷 - 丙 - 天冬 / 组氨酸多肽 21 盒(DDX21)  | 0.351   |
| NM_003998   | NFκB1  | 0.367   |
| NM_003330   | 硫氧还蛋白还原酶 1(TXNRD1)   | 0.369   |
| NM_001554   | 富含半胱氨酸的血管生成诱导物 61(CYR61)   | 0.370   |
| NM_002820   | 甲状旁腺激素样激素(PTHrP)   | 0.374   |
| NM_003789   | 肿瘤坏死因子受体超家族 1A 死亡域转录变体 1 (TRADD)   | 0.376   |
| NM_003564   | (transgelin 2, TAGLN2)   | 0.380   |
| NM_005573   | 核纤层蛋白 B1 (LMNB1)   | 0.383   |
| NM_005053   | 酿酒酵母 RAD23 同源物 (RAD23A)  | 0.405   |
| NM_007002   | 细胞膜糖蛋白 M, 110 000 (GP110)  | 0.428   |
| NM_005770   | small EDRK-rich factor 2, (SERF2)  | 0.441   |
| NM_001823   | 脑肌酸激酶(CKB)   | 0.449   |
| NM_001343   | disabled (Drosophila) homolog 2 (mitogen-responsive phosphoprotein) (DAB2) | 0.453   |
| NM_014889   | 金属蛋白酶(MP1)   | 0.454   |
| NM_002782   | 妊娠特异 β1 糖蛋白 6(PSG6)  | 0.454   |
| NM_003752   | 真核转录起始因子 3 亚单位 8 (EIF3S8)  | 0.455   |
| NM_005160   | 肾上腺 β 受体激酶 2(ADRBK2)   | 0.473   |
| NM_003682   | MAPK 激活死亡域(MADD)   | 0.476   |
| NM_000048   | 精氨酸琥珀酸裂解酶(ASL)   | 0.483   |
| NM_005950   | 金属硫蛋白 1G(MT1G)   | 0.491   |

## 3 讨论

肝炎、肝硬化在我国发病率高、危害严重, 预防肝坏死与促进肝再生已成为目前临床肝损伤各种治疗的出发点. ALR 是一种能够特异作用肝细胞或肝癌细胞细胞因

子, 具有明确救治功能和药用价值. 他促使肝细胞从 G<sub>1</sub> 期向 S 期过渡, 有助于肝再生的完成<sup>[20-30]</sup>. ALR 调控肝再生的作用机制是研究问题的关键, 但还不能取得一致.

我们利用基因芯片技术对 ALR 上调、下调基因进行分析, 结果表明 24 种基因的表达水平下调, 包括肿瘤坏死因子受体、金属蛋白酶 1 组织抑制因子、激素相关蛋白等基因. 肿瘤坏死因子受体胞质内保守的死亡域 (TRADD) 是触发细胞凋亡通路的必要的成分, MADD 被鉴定为 TNFR1 信号复合物含死亡域蛋白家族成员, 他们在 TNF 起始的不同信号级联反应中起到中枢调节作用, 资料显示 MADD 可激活丝裂源活化蛋白激酶 (MAPK) 的 ERK 及 JNK 途径并使胞质内磷脂酶 A<sub>2</sub> 的磷酸化进而导致花生四烯酸的释放, 除了介导炎症的发生还参与 TNF 诱导的凋亡. ALR 对这两种基因均有一定的下调, 可能的解释是在肝再生过程中对细胞凋亡产生部分抑制作用, 新增肝脏组织以自分泌形式分泌生长因子为其他细胞的再生提供丝裂源和死亡信号的抑制分子. ALR 下调的另一种感兴趣蛋白是金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP1), TIMP 是参与细胞外基质降解代谢的基质金属蛋白酶 (MMP) 特异性抑制物, 可以抑制所有 MMP 的活性, 在肝纤维化的发生发展中起重要作用. 我国学者认为 TIMP1 可特异性地结合激活间质胶原酶从而抑制其对胶原蛋白的分解, 促进肝纤维化形成, 而重组 ALR 有减轻实验性肝纤维化形成的作用. TIMP1 表达的上调或下调的效应方向依赖于细胞背景, 我们发现 ALR 在人肝癌细胞 (HepG2) 中下调 TIMP1 基因的表达, 这种活性对于有序的肝再生和抗肝纤维化治疗是十分有利的. 此作用被另一组实验所证实, 王爱民 et al 观察到大剂量 ALR 对 TIMP1 基因的表达有明显的抑制作用. 实验结果发现 ALR 下调了一些性激素相关蛋白, 如谷胱甘肽过氧化物酶 5, 该蛋白可保护精子细胞膜免受脂质过氧化物的损害, ALR 能够显著下调其基因的表达, 可能与 ALR 在调节生殖细胞发育过程中有关系, 但是具体作用不明. 此外, ALR 下调一些核酸与蛋白的翻译与修饰功能相关蛋白: 天冬-谷-丙-天冬/组氨酸多肽 21 盒、真核转录起始因子 3 亚单位 8、NFκB1 等. 受 ALR 上调的蛋白很少, 其中包括一个未知功能基因, 我们正对其进行克隆, 并将在真核细胞内证实这种上调作用.

#### 4 参考文献

- Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Wang G, Liu Y, Zhong YW, Duan HJ, Hong Y, Li L, Zhang LX, Chen JM. Screening of augmenters of liver regeneration-binding proteins by yeast-two hybrid technique. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:81-84
- Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, Azzarone A, Iacobellis A, Deleo A, Hagiya M, Whiteside TL, Starzl TE. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenters of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology* 1997;25:411-415
- Yang XM, He FC. The advance of augmenters of liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:725-727
- Chen L, An W, Tan X, Gao D, Dai J. Phosphorylation of hepatic stimulator substance on mitogen-activated protein kinase in BEL-7402 hepatoma cells. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9:22-24
- Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Muhlenhoff U, Kispal G, Lill R. An essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO Rep* 2001;2:715-720
- Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, Francavilla A, Hofhaus G. Mammalian augmenters of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase. *Dig Liver Dis* 2001;33:173-180
- Gandhi CR, Kuddus R, Subbotin VM, Prelich J, Murase N, Rao AS, Nalesnik MA, Watkins SC, DeLeo A, Trucco M, Starzl TE. A fresh look at augmenters of liver regeneration in rats. *Hepatology* 1999;29:1435-1445
- 董菁, 成军, 刘友昭, 王勤环, 王刚, 施双双. 大鼠肝再生增强因子假基因的克隆化与序列分析. *中华肝病杂志* 2001;9:105-107
- 夏小兵, 成军, 王刚, 杨继珍, 刘妍, 董菁, 王琳, 李克. 人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:743-746
- Cheng J, Wang L, Li K, Lu YY, Liu Y, Duan HJ, Hong Y, Wang G, Li L, Zhang LX. Cloning and expression of the gene of human augmenters of liver regeneration in yeast cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:87-91
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英, 王刚, 刘妍, 钟彦伟, 段惠娟, 洪源. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因. *世界华人消化杂志* 2002;10:161-164
- 成军. 基因芯片技术的原理及其在肝病研究中的应用. *中华肝病杂志* 2002;10:302
- 刘妍, 成军, 王建军, 陆荫英, 杨倩. 应用基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒核心蛋白反式调节基因. *解放军医学杂志* 2003;28:55-57
- 刘妍, 成军, 李克, 杨倩, 陆荫英, 王琳, 王建军. 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析. *世界华人消化杂志* 2003;11:394-398
- 刘妍, 成军, 王建军, 杨倩, 陆荫英. 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用. *世界华人消化杂志* 2003;11:461-463
- 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选乙型肝炎病毒 X 蛋白反式调节基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:920-924
- 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩. 基因表达谱芯片技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白 3 反式调节靶基因. *世界华人消化杂志* 2003;11:930-934
- 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对截短型乙型肝炎病毒表面抗原中蛋白反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:943-946
- 洪源, 刘妍, 成军, 杨倩, 王建军. 应用表达谱芯片技术对丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式调节基因的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:939-942
- 王刚, 刘妍, 牟劲松, 洪源, 邵得志, 张耀新, 李莉, 成军. 大鼠肝再生相关基因 LRRP1 的克隆化. *世界华人消化杂志* 2002;10:165-168
- Dong J, Cheng J, Wang QH, Shi SS, Wang G, Si CW. Cloning and analysis of the genomic DNA sequence of augmenters of liver regeneration from rat. *Chin Med Sci J* 2002;17:63-67
- 成军, 李莉, 张玲霞, 陆荫英. 肝再生增强因子的作用机制. *临床肝胆病杂志* 2002;18:146-148
- 王琳, 李克, 成军, 陆荫英. 人肝再生增强因子表达载体的构建及其在酵母中的表达. *中华肝病杂志* 2002;10:384
- Cheng J. Progress in Augmenters of liver regeneration superfamily. *Shengwuxue Zazhi* 2000;17:4-7
- Shen M, Qiu DK, Chen Y, Xiong WJ. Effects of recombinant augmenters of liver regeneration protein, danshen and oxymatrine on rat fibroblasts. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1129-1133
- Xu W, Wang S, Wang G, Wei H, He F, Yang X. Identification and characterization of differentially expressed genes in the early response phase during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278:318-325
- Yang XM, Hu ZY, Xie L, Wu ZZ, Wu CT, He FC. In vitro stimulation of HTC hepatoma cell growth by recombinant human augmenters of liver regeneration (ALR). *Shengli Xue bao* 1997;49:557-561
- Yang X, Wang A, Zhou P, Wang Q, Wei H, Wu Z, He F. Protective effect of recombinant human augmenters of liver regeneration on CCl<sub>4</sub>-induced hepatitis in mice. *Chin Med J (Engl)* 1998;111:625-629
- Adams GA, Maestri M, Squiers EC, Alfrey EJ, Starzl TE, Dafoe DC. Augmenters of liver regeneration enhances the success rate of fetal pancreas transplantation in rodents. *Transplantation* 1998;65:32-36
- Giorda R, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sakai H, Michaelson J, Francavilla A, Starzl TE, Trucco M. Analysis of the structure and expression of the augmenters of liver regeneration (ALR) gene. *MolMed* 1996;2:97-108