

· 基础论著 ·

人肝细胞生长因子转染 L02 细胞的锌指基因差异表达筛选

吴亮 张锦前 王琦 李国力 张晨宇 王晓春 洪源 曾辉 成军

【摘要】 目的 构建人肝细胞生长因子(hHGF)真核表达载体,在 L02 细胞中表达 hHGF 并筛选其中的差异表达基因。**方法** 构建 pcDNA3.1(-)-hHGF 载体,测序鉴定;其转染 L02 细胞后进行蛋白免疫印迹检测;将 pcDNA3.1(-)-hHGF 和 pcDNA3.1(-)载体分别转染 L02 细胞后,提取总 mRNA 并逆转录为 cDNA,运用基因表达谱芯片技术分析差异表达基因。**结果** 构建的 hHGF 真核表达载体 pcDNA3.1(-)-hHGF 经酶切和测序鉴定正确;转染 L02 细胞后经蛋白免疫印迹证实 hHGF 存在明确表达;pcDNA3.1(-)及 pcDNA3.1(-)-hHGF 分别转染 L02 细胞后提取总 RNA,经基因表达谱芯片分析发现,表达水平显著上调和下调的基因分别有 404 个和 145 个,在表达显著上调的基因中包含 7 种锌指基因。**结论** 筛选出了 hHGF 转染 L02 细胞后的差异表达基因,为其作用机制及与锌指蛋白相关性的研究提供了重要依据。

【关键词】 人肝细胞生长因子;L02 细胞;锌指基因

Screening of zinc finger genes differentially expressed in L02 cells transfected by human hepatocyte growth factor WU Liang, ZHANG Jin-qian, WANG Qi, LI Guo-li, ZHANG Chen-yu, WANG Xiao-chun, HONG Yuan, ZENG Hui, CHENG Jun. The 3rd Department Services, Beijing Ditan Hospital, Institute of Infectious Diseases of Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email:chengjdt@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To detect the hepatocyte growth factor(hHGF) expression and screen the differentially expressed genes in L02 cells transfected by hHGF. **Methods** pcDNA3.1(-)-hHGF expressive vector were constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. The expression of hHGF protein in L02 cell line was tested by Western blot. mRNA of L02 cells transfected by pcDNA3.1(-)-hHGF and pcDNA3.1(-) were isolated and reverse transcribed to cDNA. Differentially expressed genes were analyzed by cDNA microarray technique.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.04.002

基金项目:国家自然科学基金(No. 30600524);北京市卫生局项目(2004-局-051)

作者单位:100015 北京市,首都医科大学传染病学研究所 北京地坛医院内三科(吴亮),传染病研究所(张锦前、王琦、李国力、张晨宇、王晓春、洪源、曾辉、成军)

通讯作者:成军,Email:chengjdt@ccmu.edu.cn

Results The expressive vector pcDNA3.1(-)-hHGF were constructed and confirmed by restriction enzyme digestion and DNA sequencing. hHGF protein expression were confirmed by Western blot. High quality mRNA and cDNA were prepared from L02 cells tranfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1(-)-hHGF, respectively. Successful microarray screening were conducted. From the scanning results, 404 genes were up-regulated (including 9 zinc finger genes) and 145 were down-regulated genes in L02 cell line transfected by hHGF. **Conclusions** cDNA microarray technology was successfully used to screen the genes differentially expressed in L02 cell line transfected by hHGF, which brought some new clues for the regulation mechanism study on hHGF in liver cells.

【Key words】 Human hepatocyte growth factor; L02 cell; Zinc finger gene

人肝细胞生长因子(human hepatocyte growth factor, hHGF)具有多种生物学作用,是正常胚胎发育、多种组织器官(如肝、肾、肠、骨骼、神经系统、造血系统)发生过程中的一个重要调控因子^[1],但其作用机制仍不十分明确。锌指基因家族是人体中最大的基因家族,参与细胞分化、胚胎发育,并与许多疾病的发生相关。锌指蛋白(zinc finger protein)则是哺乳动物细胞内含量最丰富的蛋白质模体,是各种特异性DNA结合蛋白中最大的一个类别。据统计,约2%的人类基因(700~900个)编码锌指蛋白,这些锌指蛋白与真核基因的表达调控密切相关^[2]。本研究应用基因芯片技术,筛选hHGF对L02细胞差异表达的基因,并从中发现了7种锌指基因,为进一步深入研究hHGF在肝细胞中的多种作用机制及其与锌指基因调控的相关性提供了一定依据。

材料和方法

一、材料

真核表达质粒 pcDNA3.1(-) 购自 Invitrogen 公司; L02 细胞购自协和医院细胞中心; 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 等均购自 Gibco 公司; 限制性内切酶 *Apa* I、*Bst* XI 购自 Toyobo 生物科技有限公司; 抗-hHGF 购自 Simga 公司。

二、方法

1. 构建 hHGF 基因真核表达载体: 将质粒 pGEM-T hHGF 转化感受态大肠埃希菌 DH5 α 后, 提取该转化菌质粒 pGEM-T hHGF, 并将该质粒用 *Apa* I、*Bst* XI 双酶切鉴定; 测序质粒 pGEM-T hHGF 测定其基因序列约为 2200 bp, 结果与目的基因序列 hHGF 对照, 其序列长度一致, 同源性和氨基酸序列完全一致。以 pGEM-T hHGF 为模板用 *Apa* I 及 *Bst* XI 双酶切, 回收 2.2 kb 左右目的片段, 与表达载体 pcDNA3.1(-) 连接, 再转化入感受态大肠埃希菌 DH5 α 后提取质粒 pcDNA3.1(-)-hHGF 进行 *Apa* I 及 *Bst* XI 双酶切鉴定。

2. L02 细胞的转染和筛选: 细胞株用 DMEM 培养基(含 100 kU/L 氨卞青霉素的 100 ml/L 小牛血清)常规培养, 待细胞生长到 50%~70% 融合时, 采用 Lipo-

fectin 脂质体法(转染程序参照 Manitsans 方法)将 pcDNA3.1(-) 及 pcDNA3.1(-)-hHGF 质粒转染细胞,以含 G418 的培养基续培养 48 h,裂解细胞后留取上清,用于表达产物的 Western blot 检测。

hHGF 蛋白表达的 Western blot 检测:将上清于 SDS-PAGE 胶电泳,转膜后将膜置于 TPBS(含 30 g/L 牛血清白蛋白)封闭液室温封闭 2 h,加入封闭液稀释后的抗体(抗-HGF, 1:500 稀释),4℃ 孵育 1 h, PBS 液漂洗 4~6 次,每次 5 min,再与封闭液稀释的酶标抗体(抗-IgG-HRP, 1:1000 稀释)于 30℃ 温育 60 min, PBS 漂洗 4~5 次后滤纸吸干残余液体,加入 ECL 化学发光底物,在 X 光片曝光,显影、定影后观察。

3. 总 RNA 提取:在 35 mm 培养皿中常规培养 L02 细胞,待细胞生长至对数期时分别将 pcDNA3.1(-) 及 pcDNA3.1(-)-hHGF 转染 L02 细胞 48 h 后收获细胞。采用 Trizol 试剂一步法提取细胞总 RNA(对照组和实验组),样品经分光光度计检测吸光度(A),并行琼脂糖凝胶电泳进行检测。

4. mRNA 纯化:探针标记和芯片制备,以 Oligotex mRNA Midi kit(Qiagen 公司)分离纯化得到 mRNA,并行电泳检测常规方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。用 Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μg),用 Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μg)。乙醇沉淀后溶解于杂交液中。芯片包含的 20 000 个 cDNA 由上海国家工程研究中心上海生物芯片有限公司提供,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 1000~3000 bp。靶基因溶解于 3 × SSC 溶液中,用 Cartesian 7500 点样仪(Cartesian 公司)及硅烷化玻片(TeleChem 公司)进行点样。玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h)、UV 交联,再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 的硼氢化钠溶液处理 10 min,晾干备用。

5. 杂交及洗涤:将基因芯片和杂交探针在 95℃ 水浴变性 5 min,将混合探针加在基因芯片上,置于 60℃ 杂交 15~17 h。以 SSC 洗涤 10 min,室温晾干。

6. 检测与分析:用 ScanArray3000(General Scanning 公司)扫描芯片。用预先选定的内参照基因对 Cy3 和 Cy5 的原始提取信号进行均衡和修正。用 Image 3.0 软件分析 Cy3、Cy5 两种荧光信号的强度,计算 Cy5/Cy3。阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 1.8, 红色荧光,显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.6, 为绿色荧光,显示表达减弱。

结 果

一、真核表达载体 pcDNA3.1(-)-hHGF 的酶切鉴定

将质粒 pGEM-T hHGF 转化感受态大肠埃希菌 DH5α 后,提取菌落质粒并用 *Apa* I、*Bst* XI 双酶切鉴定后测序,结果插入序列约为 2200 bp,与目的基因 hHGF 比对同源性为 99%,且氨基酸序列一致;以 pGEM-T hHGF 为模板用 *Apa* I、*Bst* XI 双酶切,回收 2.2 kb 左右的目的片段,与表达载体 pcDNA3.1(-) 连接,再转化入转化感受态大肠埃希菌 DH5α 后提取质粒 pcDNA3.1(-)-hHGF 进行 *Apa* I、*Bst* XI 双酶切鉴定(图 1)。

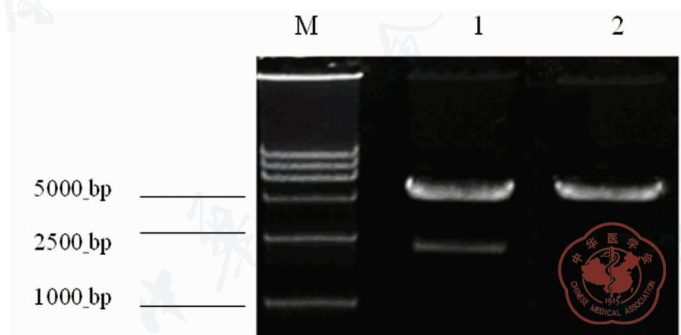


图1 pcDNA3.1(-)-hHGF 经 *Apa*I 和 *Bst*XI 双酶切鉴定
注:M:标记物;1:*Apa*I 及 *Bst*XI 双酶切鉴定的 pcDNA3.1(-)-hHGF;2:*Apa*I 及 *Bst*XI 双酶切鉴定的 pcDNA3.1(-)质粒

二、真核表达载体 pcDNA3.1(-) 和 pcDNA3.1(-)-hHGF 分别转染 L02 细胞后蛋白免疫印迹检测

L02 细胞培养后分别转染 pcDNA3.1(-) 及 pcDNA3.1(-)-hHGF 质粒,再培养 48 h 裂解细胞蛋白 SDS-PAGE 胶电泳,Western blot 检测结果可见 pcDNA3.1(-) 转染组未见蛋白表达,而 pcDNA3.1(-)-hHGF 质粒转染组细胞可见 hHGF 大量表达(图2)。

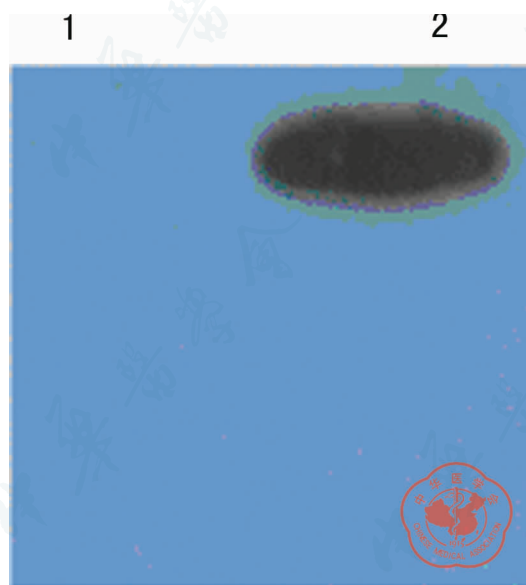


图2 pcDNA3.1(-)质粒及 pcDNA3.1(-)-hHGF 质粒转染的 L02 细胞蛋白免疫印迹检测
注:1:pcDNA3.1(-)质粒转染细胞培养后裂解细胞上清 Western blot 结果;2:pcDNA3.1(-)-hHGF 质粒转染细胞培养后裂解细胞上清 Western blot 结果

三、总 RNA 提取

L02 细胞分别转染 pcDNA3. 1(-) 及 pcDNA3. 1(-)-hHGF 质粒,培养 48 h 后提取细胞总 RNA,琼脂糖凝胶电泳可见 28 S、18 S 及 8 S 条带(图 3)。可见两组细胞中提取 RNA 效果良好。

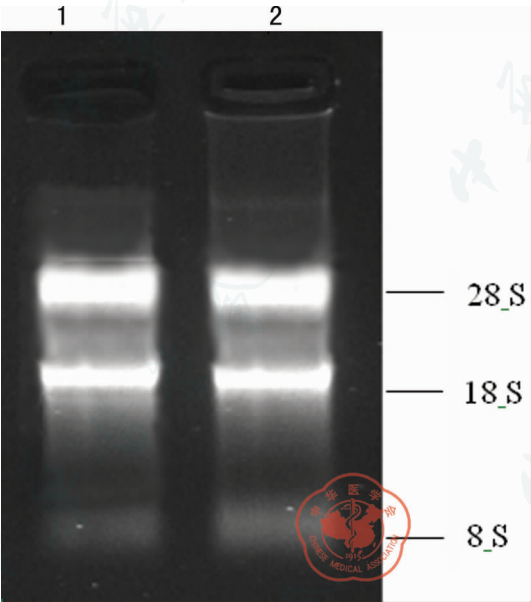


图 3 pcDNA3. 1(-)质粒及 pcDNA3. 1(-)-hHGF 质粒转染的 L02 细胞总 RNA 电泳
注:1:pcDNA3. 1(-)质粒转染 L02 细胞后提取的总 RNA; 2:pcDNA3. 1(-)-hHGF 质粒转染 L02 细胞后提取的总 RNA

四、差异表达基因的分析

表达水平显著上调和下调的基因分别有 404 个和 145 个,显著上调表达的基因中含 7 种锌指基因(表 1)。

表 1 表达显著增强的锌指蛋白基因

序号	GenBank 编号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	NM_007222.2	Homo sapiens zinc fingers and homeoboxes 1	2.01
2	NM_006526.2	Homo sapiens zinc finger protein 217	2.16
3	NM_014345.1	Homo sapiens zinc finger protein 318	2.06
4	NM_014153.2	Homo sapiens zinc finger CCCH type domain containing 7	2.94
5	NM_016107.3	Homo sapiens zinc finger RNA binding protein	2.57
6	NM_053023.2	Homo sapiens zinc finger protein 91	2.28
7	NM_024772.2	Homo sapiens zinc finger, MYM domain containing 1	2.94

讨 论

hHGF 具有多种生物学功能,也可用于多种疾病的治疗如逆转肝纤维化、改善肝硬化、脂肪肝、防止肺纤维化、血管性疾病、胃溃疡、糖尿病等^[3]。近年来,有关 hHGF 生物学功能机制的研究逐渐深入但尚无定论。hHGF 在肝脏首先与肝

细胞表面的 c-met 结合,通过后者将信号转导入胞内,促进肝细胞 DNA 合成后导致肝细胞增殖和有丝分裂,促进肝细胞及肝脏再生^[4]。而这些过程中相关的信号通路并不明确,国内外尚未见有关研究报道。因此,为深入研究并明确其在肝细胞中的作用机制,本实验应用基因芯片技术研究 hHGF 转染 L02 健康人肝细胞后的差异表达基因。最终,从 20 000 个基因中筛选出 549 个差异表达的基因,其中表达水平显著上调和下调的基因分别有 404 个和 145 个,表达显著上调的基因中包括 7 种锌指基因。这些基因涉及细胞信号转导、细胞凋亡、肿瘤发生、物质代谢等多个领域,这与 hHGF 的多样化生物学功能密切相关。

几乎所有生物过程均涉及生物大分子的特异相互作用,这些作用有赖于大分子内的结构域。近年来又发现一些由较短多肽片段(少于 50 个氨基酸残基长)形成的结构域,但这些多肽片段不能自身折叠成稳定的结构域。锌离子在一定条件下可以不需要任何化学反应就能与这种结构稳定性结合,故非常适于结合在这种同步短片段多肽形成的结构中以维持其稳定,发挥其特殊作用。人们将这种能够特异与核酸位点结合并调节生理功能的蛋白质片段称为锌指结构(简称锌指),含有锌指结构的蛋白称为锌指蛋白^[5]。

锌指蛋白是一种常见的转录因子,自 1983 年首次在转录因子 III A 中发现锌指结构以来,现已发现 10 多种不同的锌指家族,约占人类基因产物的 1%。锌指结构由多个半胱氨酸和(或)组氨酸组成,通过锌离子来维持结构的稳定性。在哺乳动物中,锌指蛋白在转录因子中占大多数,与各种基因的调控和细胞发育有关。其可在 DNA 进行转录时,间接或直接结合到 DNA 增强子,抑制或增强转录。此种蛋白质的主要特征是形成像手指的蛋白结合域,利用这种手指形状的结构结合到 DNA 大沟。通常会存在多个锌指以加强作用。同时,特定的蛋白结合域与特定的 DNA 序列结合。锌指通过与目的基因的 DNA 或 RNA 结合,或锌指之间的相互作用来调控基因表达^[6-8]。

本研究发现 hHGF 明显上调几种锌指基因的表达,这可能是 hHGF 发挥其生物学功能的机制之一^[9-12],hHGF 可能通过对某些特定锌指蛋白的调控从而进一步实现其下游的基因表达调控^[13-15]。这就为研究并明确 hHGF 在肝细胞中的作用机制提供了较好的实验基础和研究方向。

本实验通过筛选 hHGF 转染 L02 细胞的差异表达基因发现,其对参与多种生物学过程的多种基因都存在明显表达差异,主要与细胞信号转导、细胞增殖与分化、物质代谢、细胞凋亡和肿瘤发生等密切相关,且可调控锌指基因。本实验结果为研究 hHGF 在肝细胞中相关生物学过程及其信号转导机制,也为研究 hHGF 与锌指蛋白之间的基因调控相关性提供了坚实的基础。

参 考 文 献

- 1 Bogatkevich GS, Ludwicka-Bradley A, Highland KB, et al. Down-regulation of collagen and connective tissue growth factor ex-

- pression with hepatocyte growth factor in lung fibroblasts from white scleroderma patients via two signaling pathways. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(10):3468-3477.
- 2 Nishida M, Kato M, Kato Y, et al. Identification of ZNF200 as a novel binding partner of histone H3 methyltransferase G9a. *Genes Cells*, 2007, 12(7):877-888.
 - 3 Bell LN, Ward JL, Yamauchi MD, et al. Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006, 291(4):E843-E848.
 - 4 Ma PC, Tretiakova MS, Nallasura V, et al. Downstream signalling and specific inhibition of c-MET/HGF pathway in small cell lung cancer; implications for tumour invasion. *Br J Cancer*, 2007, 97(3):368-377.
 - 5 Edelstein LC, Collins T. The SCAN domain family of zinc finger transcription factors. *Gene*, 2005, 359(10):1-17.
 - 6 Schnabl B, Hu K, Muhlbauer M, et al. Zinc finger protein 267 is up-regulated during the activation process of human hepatic stellate cells and functions as a negative transcriptional regulator of MMP-10. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 335(1):87-96.
 - 7 张健琦, 李文娟, 王臻臻, 等. 一个 phiC31 相互作用的蛋白: 人锌指蛋白 403 功能分析. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(37):7286-7290.
 - 8 任道龙, 胡兴旺, 徐甜, 等. 人锌指蛋白 ZNF256 基因克隆、表达谱分析及其功能研究. *激光生物学报*, 2009, 18(2):143-147.
 - 9 张宝珍, 谷连坤, 邓大君. 锌指蛋白 Kaiso 的甲基化特异性结合功能分析. *中华预防医学杂志*, 2007, 6(41):43-46.
 - 10 马占福, 杨冬, 贺福初, 等. KRAB 型锌指蛋白在高等脊椎动物胚胎发育和肿瘤发生、发展中的调控功能. *遗传*, 2010, 32(5):431-436.
 - 11 吴丽娟, 刘国栋, 陈伟, 等. 锌指蛋白 A20 对人单核细胞 LPS 应答的影响. *第三军医大学学报*, 2007, 29(14):1388-1390.
 - 12 张晓颖, 阎影, 宋海峰, 等. 锌指蛋白 A20 与树突状细胞. *白血病·淋巴瘤*, 2010, 4(19):253-256.
 - 13 胡娟, 王启军. 肝癌患者血清锌指蛋白和 p53 高表达的临床意义. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2009, 23(5):38-41.
 - 14 陈颖, 广桥良彦, 林谋斌, 等. 锌指蛋白 KOX12 单克隆抗体的制备及在肿瘤组织中的表达. *放射免疫学杂志*, 2010, 23(2):183-187.
 - 15 夏伟, 曾甫清, 叶哲伟, 等. 胶质细胞源性神经营养因子对体外培养大鼠精原干细胞 PLZF 和 c-Kit 表达的影响. *中华泌尿外科杂志*, 2010, 4(31):223-226.

(收稿日期:2009-12-19)

(本文编辑:孙荣华)

吴亮, 张锦前, 王琦, 等. 人肝细胞生长因子转染 L02 细胞的锌指基因差异表达筛选[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2010, 4(4):383-389.