

· 基础论著 ·

转化生长因子 β_1 刺激肝星状细胞 差异表达下调基因筛选

肖琳 成军 郭江 张黎颖 洪源 伦永志 蓝贤勇 武会娟 张丽娟
张跃新 张建龙 李燕

【摘要】 目的 筛选并克隆转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 刺激肝星状细胞差异表达下调基因, 阐明 TGF- β_1 导致肝纤维化的分子生物学机制。**方法** 以 TGF- β_1 及磷酸盐缓冲液分别刺激大鼠肝星状细胞(即实验组和对照组), 提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 *Rsa* I 酶切后, 将对照组细胞 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与实验组细胞 cDNA 进行 2 次消减杂交及 2 次抑制性 PCR 扩增, 将产物与 pGEM-Teasy 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠埃希菌进行文库扩增, 随机挑选克隆经 PCR 扩增后进行测序及同源性分析。**结果** 成功构建了 TGF- β_1 刺激肝星状细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到 98 个阳性克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200 ~ 1000 bp 插入片段。选取含有插入片段的 35 个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得了 19 种已知基因序列和 2 个未知功能基因。**结论** 应用抑制性消减杂交技术成功构建了 TGF- β_1 刺激的肝星状细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库, 为进一步阐明 TGF- β_1 参与肝纤维化的分子生物学机制提供了理论依据。

【关键词】 转化生长因子 β_1 ; 抑制性消减杂交技术; 肝星状细胞; 肝纤维化; 反式激活

Screening and cloning of down-regulated genes transactivated by transforming growth factor β_1 in hepatic stellate cells XIAO Lin, CHENG Jun, GUO Jiang, ZHANG Li-ying, HONG Yuan, LUN Yong-zhi, LAN Xian-yong, WU Hui-juan, ZHANG Li-juan, ZHANG Yue-xin, ZHANG Jian-long, LI Yan. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

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

【Abstract】 Objective To screen and clone the down-regulated genes transactivated by transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), further to elucidate the molecular

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2010.03.001

基金项目:国家重点基础研究发展计划“973”项目(2004CB518908);新疆科技厅自然科学基金(200221107)

作者单位:830011 乌鲁木齐市,新疆医科大学第一附属医院感染科(肖琳、张跃新);首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(成军、郭江、张黎颖、洪源、伦永志、蓝贤勇、武会娟、张丽娟);新疆医科大学基础医学院(张建龙);中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所(李燕)

通讯作者:成军,Email:chengjdt@ccmu.edu.cn

biological mechanisms of hepatic fibrosis mediated by TGF- β_1 . **Methods** mRNA were isolated from hepatic stellate cells (HSCs) treated with TGF- β_1 or PBS, respectively (experimental and control groups). Suppression subtractive hybridization (SSH) technique was employed to analyze the differentially expressed DNA sequences between the two groups. After restriction enzyme *Rsa* I digestion, small sizes cDNAs were obtained. Then control cDNA was divided into two groups and ligated to the specific Adaptor 1 and Adaptor 2, respectively. After experimental cDNA was hybridized with control cDNA and underwent subtractive PCR twice, respectively, and then subcloned into pGEM-Teasy plasmid vectors to construct the subtractive library. Amplification of the library was carried out with *E. coli* strain DH5 α . The cDNA was sequenced and analyzed in GenBank by Blast search. **Results** The subtractive cDNA library of differentially expressed genes in HSCs treated with TGF- β_1 was constructed successfully. The amplified library contained 98 positive clones, which were identified as 200-1000 bp inserts by PCR. Thirty-five clones were analyzed by sequencing and bioinformatic analysis, there were 19 known genes and 2 unknown genes. **Conclusions** The subtractive cDNA library of differentially expressed genes in HSCs treated with TGF- β_1 by SSH technique was constructed successfully, which provide new insights into the study on mechanisms of liver fibrosis.

【Key words】 Transforming growth factor β_1 (TGF- β_1); Suppression subtractive hybridization; Hepatic stellate cells; Liver fibrosis; Transactivation

肝纤维化是肝脏在各种慢性损伤后发生的一种修复反应,是各种慢性肝病共有的病理改变。目前认为肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是参与肝纤维化最主要的细胞成分^[1],转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)也是作用最强的促肝纤维化因子之一^[2]。为揭示 TGF- β_1 参与肝纤维化的分子生物学机制,本课题组应用抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术构建了 TGF- β_1 刺激肝星状细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库,筛选 TGF- β_1 作用于肝星状细胞的反式调节基因。反式调节从效果上可分为上调和下调,之前本课题组已经筛选了 TGF- β_1 刺激肝星状细胞的反式作用上调基因^[3],鉴于 TGF- β_1 广泛的生物学活性以及肝纤维化形成的复杂机制,本文应用同样的方法,将驱动子和测试子进行调换,以筛选 TGF- β_1 刺激肝星状细胞的反式作用下调基因,以期 TGF- β_1 调节肝纤维化的机制研究提供更多的线索。

材料和方法

一、试剂及材料

细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自美国 Invitrogen 公司;重

组 TGF- β_1 购自英国 Peprotech 公司; mRNA 纯化试剂盒购自美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司; 选择性 PCR cDNA 消减试剂盒、50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒购自美国 Clontech 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司; T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体购自美国 Promega 公司。DNA 序列测定由北京奥科生物公司完成。大鼠肝星状细胞系 LX02 由徐列明教授惠赠; 感受态 *E. coli* DH5 α 为首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所保存。

二、方法

1. HSCs 的培养: 先前的工作中应用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 实验探索 TGF- β_1 不同浓度 (0、0.5、1、5、10 ng/ml) 及不同作用时间 (24、48、72 h) 对 HSCs 增殖的影响, 结果显示最佳效应浓度为 5 ng/ml, 作用时间为 48 h, 为后续实验奠定了基础。常规复苏大鼠肝星状细胞, 接种于 25 cm² 培养瓶中, 培养至对数生长期接近 80% 融合时, 用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 同步过夜, 计数细胞, 分别按 1×10^6 /ml 浓度接种至 25 cm² 培养瓶中。将 HSCs 分为 2 组: 实验组及对照组, 每组 3 瓶细胞。培养 24 h 后更换新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 并在实验组加入 TGF- β_1 至终浓度为 5 ng/ml, 对照组以相同浓度加入含 2 mg/ml 白蛋白的磷酸盐缓冲液 (PBS), 继续培养 48 h 后收获细胞, 每 5×10^6 个细胞加入 1 ml Trizol 试剂, 立即保存于液氮中。上述实验用同代肝星状细胞重复 3 次。

2. mRNA 提取: 使用 mRNA 纯化试剂盒直接提取 TGF- β_1 及 PBS 液处理的 HSCs 总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计分别进行定性、定量分析。

3. 消减杂交文库的建立: 采用选择性 PCR cDNA 消减试剂盒, 常规 SSH 技术: 以 TGF- β_1 及 PBS 液处理的 HSCs mRNA 为模板, 逆转录合成双链 cDNA (dscDNA), 并分别标记为实验组和对照组, dscDNA 经 *Rsa* I (可识别 4 个碱基序列的内切酶) 消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物。将对照组的 dscDNA 分为 2 组, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 然后与过量的实验组 dscDNA 进行杂交, 合并两种杂交产物后再与实验组 dscDNA 进行第 2 次杂交, 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 TGF- β_1 处理组 dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

4. 消减文库扩增及克隆分析: 扩增产物与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37℃ 培养 18 h。取白色菌落增菌, 以 pGEM-T 载体多克隆位点两端 T7/SP6 通用引物进行菌落 PCR 扩增, 证明含有插入片段 (200 ~ 1000 bp) 后, 随机挑选其中 35 个克隆增菌测序, 并应用生物信息学将测得序列提交 GenBank 数据库进行同源性分析。

结 果

一、HSCs mRNA 的定性及定量分析

紫外分光光度计检测显示 TGF- β_1 及 PBS 液处理的 HSCs mRNA 分别为 6.28

$\mu\text{g/ml}$ 和 $7.32 \mu\text{g/ml}$, A_{260} 和 A_{280} 分别为 1.804 和 1.725。琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带,提示提取的 mRNA 质量合格,可以满足抑制性消减杂交实验的要求。

二、dscDNA 两端连接效率检测

将连接有 Adaptor 1 和 Adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)进行 28 个循环扩增,在 25 个循环结束时从体系中吸取 $5 \mu\text{l}$ 进行电泳分析。结果显示:使用两个基因特异性引物(G3PDH 3' 和 5' 引物)与使用一个基因 PCR 引物所得到的产物浓度相当,说明该连接反应具有较高的连接效率。

三、cDNA 消减文库消减效率的鉴定

分别以消减及未消减 PCR 产物为模板,用 G3PDH 引物进行 PCR 扩增,分别在第 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 $5 \mu\text{l}$ 进行电泳鉴定。结果显示:与未消减组 PCR 产物相比,消减组 PCR 产物中 G3PDH 基因产物明显减少,说明所构建的消减文库具有较高的消减效率,见图 1。

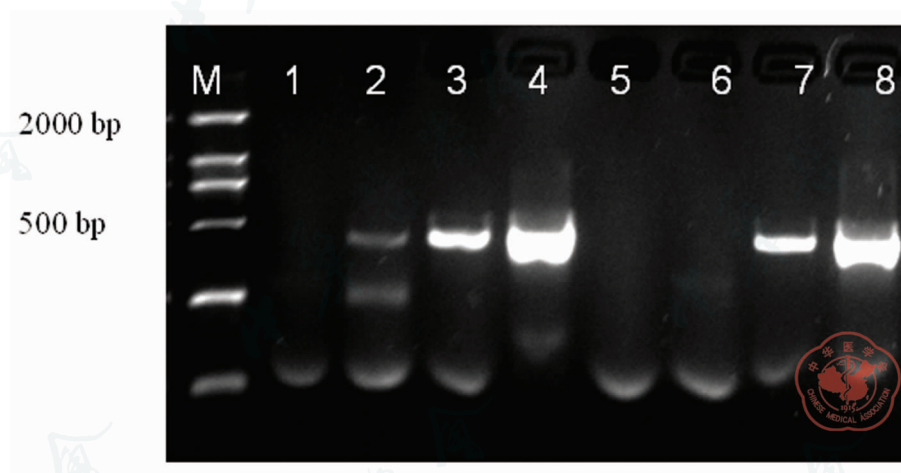


图1 消减效率分析结果

注:M:分子量标准,1~4:未消减组,引物为 G3PDH3'、5';5~8:消减组,引物为 G3PDH3'、5',PCR 循环次数均为 18、23、28、33

四、差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆

杂交产物经两轮 PCR 扩增后,结果显示为 200 ~ 1000 bp 的插入片段,所获得的 98 个克隆中几乎均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2)。

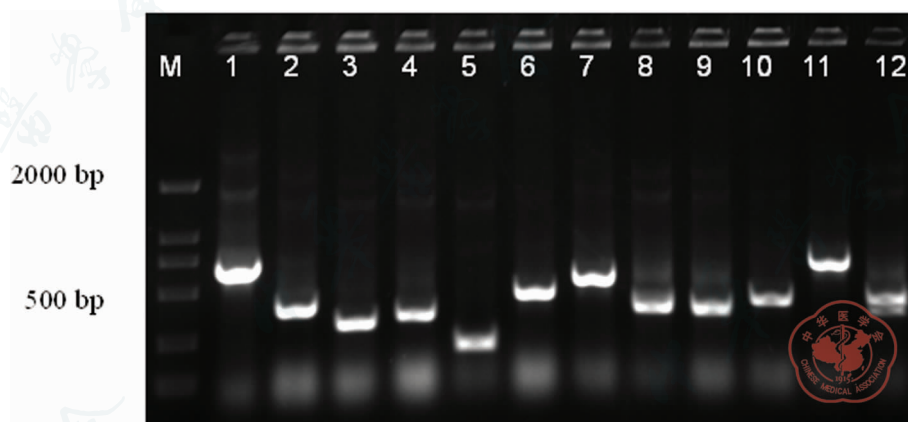


图2 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图

注:M:分子量标准;1~12:阳性克隆

五、cDNA 测序与同源性分析结果

挑选 35 个克隆测序,21 个克隆测序成功。与 GenBank 数据库进行初步比较,应用生物信息技术分析发现,19 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(见表 1),另有 2 个克隆为未知功能基因。

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白名称	同源克隆数	同源性(%)
N-乙基-马来酰胺敏感融合蛋白附属物	1	100
RP23-225M6 45 S 前核糖体 RNA 部分序列	1	100
结肠和肝脏肿瘤过度表达蛋白对碘氨基苯甲醚相似物	1	99
转化生长因子 II 型受体	1	98
肿瘤相关蛋白 1	1	100
甲状腺激素受体相关蛋白 3	1	88
RIKEN cDNA 1810045K1 相似物	1	99
核糖体蛋白 L3	1	99
神经氨酸苷酶 1	1	100
转录延长因子 B(SⅢ),多肽 3	1	100
18 S,5.8 S 和 28 S 核糖体 RNAs	1	99
13 号染色体上生长停滞特异基因 3(gas 3)	1	100
密度调节蛋白 drp1 相似物(LOC498180)	1	100
真核生物转录延长因子 1 β_2	2	100
ALG-2 相互作用蛋白 1	1	99
蛋白酶体亚单位 α_3 (Psm α_3)	1	100
视网膜母细胞瘤结合蛋白 2 相似物	1	99
醛酮基还原酶家族 7 成员 A2	1	99
未知功能基因	2	

讨 论

基因在不同生理和病理状态下的选择性表达决定了生命过程的多样性、复杂性以及常态和病态。对细胞基因表达的差异进行比较和研究,可以获得与生命过程相关的信息,并有助于揭示疾病的发生发展机理。抑制性消减杂交技术是1996年开展起来的一种分离差异表达基因的新技术,该技术将抑制性PCR和消减杂交相结合,利用杂交二级动力学原理即高丰度序列退火时产生同源杂交的速度大于低丰度序列,及抑制性PCR链内退火优于链间退火的特点,从而选择性扩增目的基因而抑制非目的基因片段的扩增,快速有效地分离差异表达基因。抑制性消减杂交技术已成为当今研究基因差异表达最为有效的工具之一,被广泛应用于病毒感染及肿瘤发生机制等研究领域^[4],但在肝纤维化中的应用报道较少。

TGF- β_1 具有多种功能,对细胞外基质基因表达、基质降解、细胞增殖分化、细胞凋亡及免疫调节具有明确作用,是目前研究最多的与器官纤维化发生、发展密切相关的细胞因子。本课题组应用SSH技术成功筛选了TGF- β_1 刺激大鼠肝星状细胞差异表达下调基因,这些基因涉及到RNA生物合成、蛋白质翻译、细胞代谢,肿瘤发生、信号转导等生物学功能。同时获得2个未知功能基因,可能为新基因。

在已知功能基因中值得注意的有以下几类:

1. 蛋白酶体亚单位 α_3 (PSMA 3):细胞内的蛋白质合成对机体的生长发育具有重要意义,而细胞内的蛋白质降解对维持机体的生理平衡具有不可忽视的作用,二者在生命过程中具有同样重要的地位。细胞内蛋白质降解主要有两条途径即蛋白酶体途径和溶酶体途径。经蛋白酶体降解的蛋白包括多种限速酶、癌基因产物、转录因子、细胞周期调控蛋白和细胞表面受体等。同时经该途径还可去除细胞内有害蛋白质如氧化损伤的蛋白以及错误折叠的蛋白。因此,蛋白酶体途径在细胞周期、凋亡、发育、应激反应及抗原提呈等重要的生命活动中发挥关键的调控作用^[5,6]。Ding等^[7]研究发现蛋白酶体途径参与中枢神经系统一系列衰老相关的功能紊乱,可导致线粒体功能异常,增加活性氧产生,促进RNA、DNA和蛋白质氧化。Koistinen等^[8]研究细胞外基质成分在子宫内膜腺癌发生机制中的作用时,观察到许多20S蛋白酶体表达下调。本研究发现TGF- β_1 刺激肝星状细胞后蛋白酶体PSMA 3基因表达下调,推测TGF- β_1 抑制蛋白质降解途径进而导致细胞外基质沉积以及持续氧化压力可能是TGF- β_1 参与肝纤维化的重要原因。

2. 醛酮还原酶家族7成员A2:醛酮还原酶超家族包括114个在原核生物和真核生物中表达的蛋白质^[9],分布在14个家族中(AKR1-AKR14)。AKR1是最大的家族,包括醛糖还原酶、乙醛还原酶、水合氧甾醇脱氢酶、类固醇5 β 还原酶。AKR6包括钾通道 β 亚单位,AKR7包括黄曲霉毒素乙醛还原酶。2个新的家族AKR13即酵母醛糖还原酶,AKR14即大肠埃希菌乙醛还原酶。醛酮还原酶超家族广泛地与机体固有的和外来的底物发生氧化还原反应,催化葡萄糖还原为山梨醇,通过减少内源或外源性代谢产物而起到解毒作用。文献报道^[10]该蛋白在癌

前病变及肝细胞癌中表达强烈,而在肝脏周围的正常组织中并不表达。表明该蛋白可能与肝细胞癌的发病有很大关系。本研究显示醛酮还原酶表达下调,削弱了肝脏的解毒功能,可能是其导致肝纤维化的机制之一。

3. 甲状腺激素受体相关蛋白 3:甲状腺激素受体(TRs)是配体依赖性的转录因子,具有调节三碘甲腺原氨酸(T₃)促进生长、发育、分化及维持代谢稳态等多种生物活性。Iwahashi 等^[11]应用酵母双杂交技术从人肝细胞 cDNA 文库中筛选出甲状腺激素受体相关蛋白 3,该蛋白与肝细胞核因子(HNF-4)相互作用,HNF-4 是甲状腺激素受体超家族成员,为胰腺 B 细胞表达的一个转录因子,在调节糖代谢相关基因表达中起重要作用。该蛋白同时也和类维生素 A 样 X 受体相互作用,确切的功能尚不清楚。甲状腺激素受体 β (TR- β) 变异导致甲状腺激素抵抗,Ying 等^[12]构建了一个 TR- β 基因定点敲入 PV 突变小鼠,当甲状腺激素受体相关蛋白 3 缺陷时,观察到血清胰岛素样生长因子 1(IGF-1)水平降低,进一步抑制了 PI3K/AKT/mTOR 信号转导途径,同时血清生长激素(GH)水平也降低,最终抑制了细胞生长和增殖。根据以上资料推测 TGF- β_1 下调甲状腺激素受体相关蛋白 3 基因引发的肝纤维化事件,可能与 IGF-1、GH 水平下降抑制肝细胞再生有关。

4. ALG-2 相互作用蛋白 1:ALG-2,即 Ca^{2+} 结合凋亡连接基因 2^[13],属于 PEF 蛋白家族,有 2 个高亲和力和一个低亲和力的 Ca^{2+} 结合位点,和其他的 PEF 蛋白一样,N-端包含一个富含甘氨酸的片段,与靶蛋白的相互作用需要结合 Ca^{2+} 。在许多细胞作为细胞凋亡前因子,依赖胱天蛋白酶启动细胞凋亡。国外研究^[14,15]应用酵母双杂交技术筛选到一个 ALG-2 相互作用蛋白 1——AIP1,ALG-2 和 AIP1 共同定位在胞质,其相互作用依赖 Ca^{2+} 的存在。序列比对显示 AIP1 与一个酵母蛋白相关的 Pkc1p-MAP 激酶串连元件 BRO1 高度相似,AIP1 截短形的过度表达可保护细胞免遭营养因子缺乏所诱导的细胞死亡。本研究 TGF- β_1 下调 ALG-2 致肝纤维化的机制可能与抑制星状细胞凋亡有关。

5. 生长停滞特异基因 3(gas 3):生长停滞特异基因广泛地在哺乳动物胚胎发育过程中表达,与细胞生长增殖的负性调控和细胞凋亡有关。本实验发现 gas 3 下调,可能是促进肝星状细胞增殖的原因之一。

本研究结果表明,TGF- β_1 在分子水平调控肝纤维化的发生涉及复杂的机制,其反式作用下调基因可能扮演着重要的角色。筛选到的某些下调基因以及未知功能基因在肝纤维化研究领域为我们展现了全新的视角,值得关注和深入研究。

参 考 文 献

- 1 Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution. Clin Sci(Lond),2007,112:265-280.
- 2 Mauviel A. Transforming growth factor-beta: a key mediator of fibrosis. Methods Mol Med,2005,117:69-80.
- 3 肖琳,成军,郭江,等. 应用抑制性消减杂交技术筛选转化生长因子 β_1 刺激 LX02 细胞的反式调节基因. 中华肝脏病杂志,2008,16:857-860.
- 4 郭江,成军,纪冬,等. 抑制性消减杂交技术克隆和筛选丙型肝炎病毒 F 蛋白的反式调节基因. 中华肝脏病杂志,2005,

13:660-663.

- 5 Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. The ubiquitin system. *Nature Medicine*,2000,6:1073-1081.
- 6 Ben-Neriah Y. Regularory function of ubiquitination in the immune system. *Nature Immunology*,2002,3:20-26.
- 7 Ding Q, Dimayuga E, Keller JN. Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid Redox Signal*,2006,8:163-172.
- 8 Koistinen H, Seppälä M, Knuutila S, et al. Extracellular matrix-induced changes in expression of cell cycle-related proteins and proteasome components in endometrial adenocarcinoma cells. *Gynecol Oncol*,2006,102:546-551.
- 9 Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV, et al. The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact*,2003,143:621-631.
- 10 Zeindl-Eberhart E, Haraida S, Liebmann S, et al. Detection and identification of tumor-associated protein variants in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*,2004,39:540-549.
- 11 Iwahashi H, Yamagata K, Yoshiuchi I, et al. Thyroid hormone receptor interacting protein 3 (trip 3) is a novel coactivator of hepatocyte nuclear factor-4 alpha. *Diabetes*,2002,51:910-914.
- 12 Ying H, Furuya F, Willingham MC, et al. Dual functions of the steroid hormone receptor coactivator 3 in modulating resistance to thyroid hormone. *Mol Cell Biol*,2005,25:7687-7695.
- 13 Jia J, Tarabykina S, Hansen C, et al. Structure of apoptosis-linked protein ALG-2: insights into Ca^{2+} -induced changes in penta-EF-hand proteins. *Structure*,2001,9:267-275.
- 14 Vito P, Pellegrini L, Guiet C, et al. Cloning of AIP1, a novel protein that associates with the apoptosis-linked geneALG-2 in a Ca^{2+} -dependent reaction. *J Biol Chem*,1999,274:1533-1540.
- 15 Chatellard-Causse C, Blot B, Cristina N, et al. Alix (ALG-2-interacting protein X) , a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem*,2002,277:29108-29115.

(收稿日期:2010-03-19)

(本文编辑:孙荣华)

肖琳,成军,郭江,等. 转化生长因子 β_1 刺激肝星状细胞差异表达下调基因筛选 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(3):236-243.