

肝细胞、胰岛细胞与储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波, 北京军区总医院肝胆外科 北京市 100700
国家自然科学基金资助项目, No. 30170421
项目负责人: 于聪慧, 100700, 北京市东城区朝内北小街2号, 北京军区总医院肝胆外科, ychst@public.fhnet.cn.net
电话: 010-66721896
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-09-09

摘要

目的: 探讨肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响。

方法: 采用改良胶原酶消化法分离获得大鼠肝细胞和储脂细胞, 同时利用梯度离心分离胰岛细胞。分两组实验, 肝细胞培养组(对照组), 肝细胞用 RPMI1640、胰岛素 10^{-7} mol/L、100 mL/L FBS 及地塞米松 10^{-8} mol/L 配成细胞悬液, 2 mL 放入 9 cm^2 培养瓶中连续培养 15 d (37°C 50 mL/L CO_2)。肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养组(实验组): 将 1×10^7 L 的储脂细胞 2 mL 先加入培养瓶中, 培养条件及培养液同肝细胞培养组, 培养 48 h 后弃上清后将肝细胞 2×10^6 L 2 mL 和胰岛细胞(100个)分别加入并观察肝细胞存活情况; 全自动生化分析仪测定培养上清液中总蛋白及尿素氮的含量; 两组细胞均在培养 10 d 行细胞组织学及组织化学检测, 包括肝细胞 HE 染色、肝细胞内糖原 PAS 染色及葡萄糖-6-磷酸酶染色检测。

结果: 培养第 7 d 对照组部分肝细胞脱落, 核固缩, 胞质破碎分解。而实验组肝细胞粘壁生长好, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞相间形成团状和索形。培养 10 d 对照组肝细胞核完全固缩, 胞质破碎分解, 糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达消失; 实验组肝细胞呈片状, 胞质饱满, 糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达良好。培养 5 d 后实验组白蛋白及尿素氮的合成明显高于对照组 ($P < 0.05$)。

结论: 肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞共培养明显延长肝细胞存活期。

于聪慧, 林梅, 梅建民, 余昌中, 杨荣华, 姚军波. 肝细胞、胰岛细胞与储脂细胞共培养对肝细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2731-2733
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2731.asp>

0 引言

肝细胞和胰岛细胞混合培养能促进肝细胞功能已有许多报道^[1-2], 但肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞三种细胞混合培养是否能增强肝细胞存活时间研究较少。我们将肝细胞、胰岛细胞和储脂细胞三种细胞共培养, 观察肝细胞的生长和功能表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠, δ , 质量 250-300 g, 北京大学医学部医用动物中心提供, 普通饲料喂养, 随意饮水, 室温 $22-28^\circ\text{C}$ 。胶原酶 IV 型, DNA 酶 I 型, Nycodenz 和 Ficoll-400 均购自 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基、胎牛血清 (56°C , 30 min 灭活) 购自华美化学试剂公司, 全自动生化分析仪 (TOSHIBA-7170, 日本), 二氧化碳孵育箱 CI-46 (BAXTER 公司, 美国), 兰格恒流泵 - YZ1515 (保定兰格恒流泵有限公司)。

1.2 方法 采用胶原酶消化法分离大鼠肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞。主要步骤: 首先分离出胆总管和十二指肠, 在胆管开口的上下端结扎十二指肠, 16 G 穿刺针行胆总管穿刺将 0.5 g/L 的胶原酶溶液约 5 mL 缓慢注入, 使胰腺充分膨胀后将穿刺远端的胆总管结扎; 然后将 18 G 的穿刺导针置入门静脉并固定, 同时将肾静脉远端的下腔静脉剪开并剪开膈肌夹闭肝上下腔静脉, 启动循环灌流装置。先灌流 0.2 g/L 的 EDTA (乙二胺四乙酸 Ethylenediamine tetraacetic acid) 溶液, 以 15 mL/min 的灌流速度灌注肝脏, 灌流温度 37°C , 不时地轻揉肝表面, 10 min 左右将灌流液变换为 0.5 g/L 的胶原酶溶液, 与此同时将胰腺解剖剪下放入一含 0.5 g/L 胶原酶溶液的无菌盘内由另一组人员进一步消化分离 (方法见下)。肉眼观察肝脏出现小的裂纹后停止灌流, 将肝脏剪下, 移入装有 HANK'S 液无菌平皿中。

1.2.1 分离肝细胞和储脂细胞组 将平皿放入超净台, 用无菌镊剥去肝表面的包膜, 用肝梳轻轻刮肝表面, 将肝脏的管道系统及纤维弃去, 细胞悬液经 80 目网过滤, 将细胞悬液等份置入两个 50 mL 离心管中并用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液充分稀释至 50 mL 吹打均匀放低速离心机离心 5 min, 离心速度 300 r/min (20°C), 将上清液移入另外一个 50 mL 的离心管 (以下称 B 管) 中, 此上清液中富含储脂细胞; 有沉淀的管 (以下称 A 管) 富含肝细胞。A 管细胞悬液经 0.2 g/L 胶原酶孵育液 (含 DNA I 酶) 孵育 10 min (37°C 50 mL/L CO_2), 100 目网过滤, 将细胞悬液用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液离心清洗 3 次, 三次的时间分别是 2, 1.5 和 1 min, 离心速度为 500 r/min (20°C) 即获得肝细胞。B 管细胞悬液经 2 000 r/min 5 min, 弃上清, 加入 0.5 g/L 的胶原酶溶液放入恒温震荡器中消化 30 min (200 r/min, 37°C), 所得细胞悬液经 200 目筛网过滤, 用 RPMI1640+100 mL/L FBS 培养液离心清洗, 反复 3 次。三次的时间分别是 5, 3 min 和 2 min, 离心速度为 2 000 r/min。在所得的沉淀中加入 RPMI1640 液至 12 mL, 再加入 Nycodenz 液 6 mL,

充分吹打混匀.将细胞悬液分别装入两个10 mL的锥型离心管中,在细胞悬液上小心地滴加一层 RPMI1640 液.3 000 r/min 离心 15 min(20 °C),将 RPMI1640 液与细胞悬液交界面间的细胞吸出,用 RPMI1640 液 2 000 r/min 离心冲洗 2 次,每次 7 min (20 °C)即得储脂细胞.

1.2.2 分离胰岛细胞组 将无菌盘放在冰浴上,用小镊子撕去胰腺被膜同时用小剪刀剪碎胰腺组织,将悬液倒入锥形瓶置恒温振荡器中消化 12–16 min (200 r/min, 38 °C),每 5 min 取样 30 μ L 用双硫脲染色观察发现胰岛消化良好时立即用含有 200 mL/L FBS 的培养液离心清洗 2 次.用 200 目网过滤后将沉淀和 250 mL/L Ficoll 4 mL 均匀混合,在其上小心加入 230 mL/L、200 mL/L、110 mL/L 和 RPMI1640 液各 2 mL,高速离心 20 min (3 000 r/min, 20 °C),吸出上两层界面的细胞,用 RPMI1640 液洗涤 2 次即得胰岛细胞.

1.2.3 细胞计数及存活率的判定 采用 4 g/L 台盼蓝溶液鉴定细胞存活率,并将染有台盼蓝的细胞单独计数.按公式计算细胞总数和细胞存活率.

1.2.4 三种细胞混合培养方法 肝细胞培养组(对照组):肝细胞用 RPMI 1640 + 胰岛素 10^{-7} mol/L + 100 mL/L FBS + 地塞米松 10^{-8} mol/L 配成 2×10^8 /L 的肝细胞悬液,将 2 mL 细胞悬液放入 9 cm² 的培养皿中,二氧化碳孵箱连续培养(37 °C 50 mL/L CO₂). 三种细胞共培养组(下称实验组),先将 1×10^7 /L 的储脂细胞 2 mL 加入培养瓶中,培养条件及培养液同肝细胞培养组,培养 48 h 后将培养液弃去,再加入肝细胞 2 mL(2×10^8 /L)和胰岛细胞 100 个/瓶,实验组三种细胞的培养比例为 4 000 : 200 : 1,对照组和实验组分别培养 10 瓶,培养 15 d.培养期间倒置显微镜观察细胞生长情况,隔日收集培养上清液 1 mL 放入试管封存, -20 °C 冰箱冻存待测,全自动生化检测仪检测培养液中总蛋白、尿素氮含量.两组在培养第 10 d 时分别做爬片组织学及组织化学检测,包括肝细胞 HE 染色、肝细胞内糖原 PAS 染色及葡萄糖-6-磷酸酶染色检测.

统计学处理 实验数据采用 mean \pm SD, 结果进行 *t* 检验.

2 结果

2.1 三种细胞的存活率和细胞计数 肝细胞分别为(93.5 \pm 3.5%)和(2.5 \pm 0.2) $\times 10^{11}$ /L, 储脂细胞分别为(90.5 \pm 3.5%)和(1.0 \pm 0.2) $\times 10^7$ /鼠, 胰岛细胞分别为(89.3 \pm 25%)和 462 \pm 125 个/鼠(纯化后).

2.2 两组细胞培养观察结果 在两组细胞培养的过程中通过倒置显微镜观察,实验组在培养 3 d 后肝细胞生长活跃,细胞逐渐形成呈团状和索条状,同时储脂细胞有明显的网状伪足长出,和肝细胞胰岛细胞共同生长,到培养第 10 d 时细胞长成大片状,肝细胞胞质丰满,胞核完整.而对照组肝细胞在培养第 7 d,部分细胞有脱

落,肝细胞质变稀疏,细胞核固缩,第 10 d 大部分细胞脱落.培养第 10 d 肝细胞经 HE 染色,对照组肝细胞胞质分解,细胞核固缩.实验组中 90% 的肝细胞圆形,胞质丰满,胞膜完整,细胞内糖原、葡萄糖-6-磷酸酶的表达正常.

2.3 两组细胞培养液检测结果 (图 1–2) 连续日检测肝细胞功能,结果显示,实验组培养上清液中的总蛋白和尿素氮含量较对照组明显增高, $P < 0.05$.

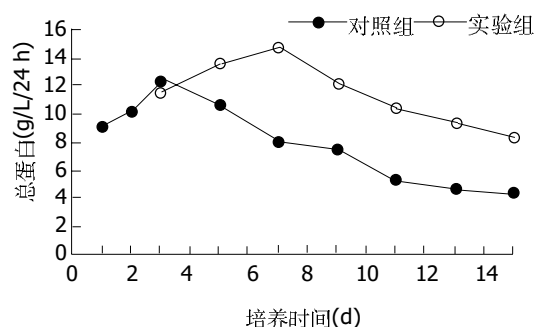


图1 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞混合培养液中白蛋白含量: 培养液总蛋白含量为 4.45 g/L.

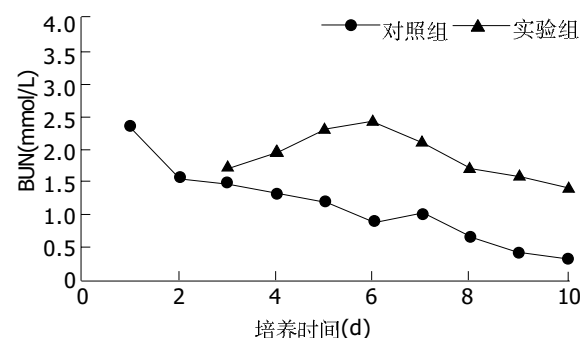


图2 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞混合培养液中尿素氮合成量: 总尿素氮为 0.43 mmol/L.

3 讨论

肝细胞生长需要良好的内环境,胰岛素是肝细胞生长过程中的重要因素之一,能促进肝细胞糖原和蛋白质的合成,同时肝细胞和其共生细胞之间的连接也是肝细胞生长、分裂、细胞间信号传导的重要条件^[3–8],大量的研究表明,肝细胞在生长过程中需要良好的立体结构才能使细胞的功能良好的发挥^[9–12].储脂细胞呈伪足样生长,良好的纤维臂呈网络样,是肝细胞生存的良好框架^[13–15].我们的结果表明,三种细胞培养能够提高肝细胞存活时间和功能表达,但影响因素有多种,其中培养顺序和三种细胞的培养比例是影响细胞生长的重要因素,三种细胞中储脂细胞贴壁时间最长大约 48 h,肝细胞和胰岛细胞贴壁时间相近.我们采取先培养储脂细胞 48 h 后,待观察到储脂细胞已有部分纤维丝伸展出来后再将肝细胞和胰岛细胞接种于上,结果较满意,肝细胞有良好的功能表达,细胞贴壁好,生存

时间明显延长. 另外, 肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞的培养比例仍需要进一步摸索. 在实验中, 我们对三种细胞培养比例进行了大量摸索实验(实验结果待发表), 结果发现肝细胞、储脂细胞和胰岛细胞以 4 000 : 200 : 1 配比培养较为合适. 我们认为肝细胞生长虽然需要良好的框架, 但是在整体的培养体系中, 储脂细胞需要适当的数量才有利于肝细胞的生长, 过多的储脂细胞将会限制肝细胞的生长.

4 参考文献

- 1 Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 1999;5: 583-596
- 2 Kneser U, Kaufmann PM, Fiegel HC, Pollok JM, Kluth D, Herbst H, Rogiers X. Heterotopic hepatocyte transplantation utilizing pancreatic islet cotransplantation for hepatotrophic stimulation: morphologic and morphometric evaluation. *Pediatr Surg Int* 1999;15:168-174
- 3 Murakami S, Ijima H, Ono T, Kawakami K. Development of co-culture system of hepatocytes with bone marrow cells for expression and maintenance of hepatic functions. *Int J Artif Organs* 2004;27:118-126
- 4 Agius L. Metabolic interactions of parenchymal hepatocytes and dividing epithelial cells in co-culture. *Biochem J* 1998; 252:23-28
- 5 Miura K, Nagai H, Ueno Y, Goto T, Mikami K, Nakane K, Yoneyama K, Watanabe D, Terada K, Sugiyama T, Imai K, Senoo H, Watanabe S. Epimorphin is involved in differentiation of rat hepatic stem-like cells through cell-cell contact. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:415-423
- 6 Arnaud A, Fontana L, Saez-Lara MJ, Gil A, Lopez-Pedrosa JM. Exogenous nucleosides modulate the expression of rat liver extracellular matrix genes in single cultures of primary hepatocytes and a liver stellate cell line and in their co-culture. *Clin Nutr* 2004;23:43-51
- 7 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900
- 8 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9:1137-1160
- 9 Griffith LG, Wu B, Cima MJ, Powers MJ, Chagnaud B, Vacanti JP. *In vitro* organogenesis of liver tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1997;831:382-397
- 10 Kudryavtseva EI, Engelhardt NV. Requirement of 3D extracellular network for maintenance of mature hepatocyte morphology and suppression of alpha-fetoprotein synthesis in vitro. *Immunol Lett* 2003;90:25-31
- 11 De Bartolo L, Bader A. Review of a flat membrane bioreactor as a bioartificial liver. *Ann Transplant* 2001;6:40-46
- 12 Bhandari RN, Riccalton LA, Lewis AL, Fry JR, Hammond AH, Tendler SJ, Shakesheff KM. Liver tissue engineering: a role for co-culture systems in modifying hepatocyte function and viability. *Tissue Eng* 2001;7:345-357
- 13 Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, Rubin J, Rojas-Valencia L, de Carvalho AC, Stockert R, Spray D, Hertzberg EL, Wolkoff AW. Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 1995;146:1508-520
- 14 Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 1992;15:5-11
- 15 Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Imuro Y, Yamaoka Y. Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. *J Hepatol* 2002;36:590-599

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

乙型肝炎病毒前 - 前 -S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化

蔺淑梅, 成 军, 张树林, 刘 敏, 王 琳, 黄燕萍, 杨 媛, 白桂琴

蔺淑梅, 张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
成军, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴, 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
北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
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
c: cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933391 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒前 - 前 -S 蛋白结合蛋白新基因 PPSBP9 的克隆化.

方法: 构建前 - 前 -S 的酵母细胞表达载体, 采用酵母双杂

交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析. 发现其中有1个未知功能的新基因. 根据GenBank中的序列信息设计引物, 以HepG2细胞系cDNA文库为模板, 以逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)技术扩增获得该新基因的全长编码序列, 并经测序证实, 命名该新基因为PPSBP9并在GenBank中注册, 注册号为AY553877.

结果: PPSBP9基因的编码序列全长为840个核苷酸(nt), 编码产物由279个氨基酸残基(aa)组成. 经核苷酸序列数据库(GenBank)和蛋白质一级结构序列数据库(SwissProt)同源序列的搜寻, 与已知基因序列和蛋白序列之间没有显著同源性.

结论: 筛选并成功的克隆了乙型肝炎病毒前 - 前 -S蛋白与肝细胞cDNA文库中结合蛋白新基因PPSBP9, 为进一步

研究HBV前-前-S及其肝细胞结合蛋白新基因在HBV致病中的作用奠定了基础。

蔺淑梅, 成军, 张树林, 刘敏, 王琳, 黄燕萍, 杨媛, 白桂琴. 乙型肝炎病毒前-S蛋白结合蛋白新基因PPSBP9的克隆化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2733-2736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2733.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染常见, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生发展密切相关^[1-6]. HBV是很小的包膜病毒, HBV基因组全长在3200个核苷酸(nt)左右, 为部分双链DNA病毒. HBV至少含有4个开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 4个ORF中表达的氨基酸长度不同, 其生物学功能也不相同, 其中全S区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2和S三个区, 前-S1、前-S2和表面抗原主蛋白是按照同一开放读码顺序(in frame)进行翻译的. 最近董菁 *et al* 对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现在前-S1区之前还存在一个ORF, 长度135 bp, 编码45 aa, 将其命名为前-前-S区. 并在既往已克隆的HBV基因组中得到了证实^[7]. 杨倩 *et al* 对前-前-S基因启动子序列的鉴定和转录活性的研究证实, 前-前-S-基因ORF上游的序列具有启动子活性, 进一步证实了董菁 *et al* 发现的前-前-S编码基因存在^[8]. 基因是通过蛋白质之间的相互作用而实现其功能的, 病毒蛋白和肝细胞蛋白之间的作用是病毒致病的关键. 为进一步研究前-前-S-基因在HBV致病中的作用, 我们利用酵母双杂交技术对肝细胞cDNA文库中与乙型肝炎病毒前-S相互作用的蛋白进行研究, 获得了一种能与HBV前-前-S蛋白结合的未知功能蛋白, 将编码该蛋白的基因命名为PPSBP9, 对其进行克隆化研究, 为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能鉴定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 pGBKT7-BD克隆载体, *Saccharomyces cerevisiae* AH109 酵母株、Y187 酵母株(K1612-1)、人cDNA肝细胞文库等均购自Clontech公司. 酵母YPDA培养基、SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade培养基, X- α -半乳糖苷酶(Gal)等购自Clontech公司, 半硫酸腺苷、醋酸锂购自Sigma公司. 复杂高效感受态(FSB), 本室自制. 大肠杆菌(DH5 α), 本室保存. Taq酶、T4 DNA连接酶、*EcoRI*、*BamHI*等限制性内切酶、pGEM-T载体及RT-PCR试剂盒购自Promega公司. 玻璃奶回收试剂盒购自博大公司. 新基因PPSBP9的扩增引物合成及DNA序列测定由上海生工生物工程技术有限公司承担.

1.2 诱饵质粒载体的构建及酵母配合实验 用多聚酶链反应(PCR)法扩增HBV前-前-S蛋7中构建诱饵质粒, 酶切鉴定后, 用醋酸锂法转入酵母细胞AH109, 并在四缺培养基上培白编码基因, 连接入酵母表达载体pGBKT-养以排除其自身激活作用^[9]. 挑取3 mm大小在SD/-Trp培养基上生长的转化了pGBKT7-前-前-S质粒的酵母AH109单菌落接种于SD/-Trp培养基中, 30℃ 250 r/min 振荡过夜, 次日离心后用2 × YPDA 培养液5 mL 重悬细胞, 计数浓度大于 1×10^9 细胞/mL, 与肝细胞文库酵母细胞在50 mL 2 × YPDA中30℃轻摇配合约22 h, 离心后用0.25 × YPDA 8 mL 重悬细胞, 分别铺板于150 mm的SD/-Trp/-Leu/-His(3缺), SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade(4缺)培养基板各25块上, 同时将配合产物按1:100、1:1 000、1:10 000铺于SD/-Trp、SD/-Leu及SD/-Trp/-Leu培养基上检验配合效率. 生长10-14 d后挑取直径大于3 mm的菌落再次画线于铺有X- α -gal的4缺培养基上检查 α -半乳糖苷酶活性, 认为在此培养基上能生长且变成蓝色的为真阳性菌落.

1.3 阳性质粒的克隆和分析 挑取真正的阳性集落按照试剂盒提供的操作指南Lyticase法提取酵母质粒. 提取的质粒以复杂冰冻高效感受态方法转化大肠杆菌, 于含有氨苄青霉素的SOB平板培养, 所获得的菌落酶切鉴定后测序. 阳性克隆DNA测序后, 提交GenBank比对, 进行生物信息学分析.

1.4 多聚酶链反应(PCR)扩增PPSBP9新基因 根据GenBank的序列信息设计上下游引物. 上游引物: 5' -GAA TTC ATG CCA TAT ATT CCT CTC A-3', 下游引物: 5' -GGA TCC CTA ATA CAA ATG TAT GTG G-3'. 提取HepG2细胞的总RNA, 进行反转录, 以反转录产物为模板进行PCR, PCR参数如下: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 1 min 变性, 58℃ 1 min 退火, 72℃ 1 min 延伸, 共35个循环, 72℃再延伸10 min.

1.5 克隆目的片段 将PCR产物在12 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 切取目的片段, 玻璃奶法回收PCR产物, 与pGEM-T载体连接, 转化DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的LB/X-gal/IPTG培养板上, 37℃培养15 h. 挑取阳性菌落, 增菌. 提取质粒进行限制性酶切分析鉴定, 选择经鉴定的菌落送测序.

2 结果

2.1 pGBKT7-p-p-S诱饵与肝细胞文库酵母菌株配合结果 我们共挑选54个阳性克隆测序, 测序结果与GenBank数据库进行初步比较, 其中8个克隆为未知功能蛋白基因. 其余46个均与已知基因序列高度同源.

2.2 新基因的序列分析及全长基因的获得 对所筛选到的未知功能蛋白基因其中之一利用美国国立卫生院(NIH)国立医学图书馆(NLM)国立生物工程中心(NCBI)建立的核苷酸序列数据库(GenBank)及其同源基因序列的搜索(BLASTN), 发现该克隆序列与GenBank中注册的

已知功能基因序列没有同源. 电子拼接推定该基因的开放读码框架, 设计引物, 从HepG2细胞提取总RNA后, 进行RT-PCR, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见1条清晰、单一、大小约840 bp的特异性扩增条带(图1), 其大小与预计的相吻合. PCR产物与T-载体连接, 转化大肠杆菌, 提取质粒进行酶切鉴定后送测序. 测序结果完全符合拼接序列, 表明我们已成功克隆出新基因的完整序列, 命名为PPSBP9, 其编码序列全长为840个核苷酸, 编码产物由279个氨基酸残基组成(图2). GenBank注册号为AY553877.

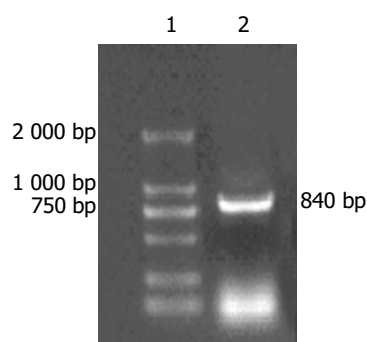


图1 PPSBP9基因的RT-PCR产物凝胶电泳图. 1: DNA marker; 2: PCR product.

ATG CCA TAT ATT CCT CTC ATG GAG TTC AGT
M P Y I P L M E F S
TGT TCA CAT TCT CAC TTA GTA TGC TTA CCC
C S H S H L V C L P
GCA GAG TGG AGG ACT AGC TGT ATG CCC AGT
A E W R T S C M P S
TCC AAA ATG AAG GAG ATG AGC TCG TTA TTT
S K M K E M S S L F
CCA GAA GAC TGG TAC CAA TTT GTT CTA AGG
P E D W Y Q F V L R
CAG TTG GAA TGT TAT CAT TCA GAA GAG AAG
Q L E C Y H S E E K
GCC TCA AAT GTA CTG GAA GAA ATT GCC AAG
A S N V L E E I A K
GAC AAA GTT TTA AAA GAC TTT TAT GTT CAT
D K V L K D F Y V H
ACA GTA ATG ACT TGT TAT TTT AGT TTA TTT
T V M T C Y F S L F
GGA ATA GAC AAT ATG GCT CCT AGT CCT GGT
G I D N M A P S P G
CAT ATA TTG AGA GTT TAC GGT GGT GTT TTG
H I L R V Y G G V L
CCT TGG TCT GTT GCT TTG GAC TGG CTC ACA
P W S V A L D W L T
GAA AAG CCA GAA CTG TTT CAA CTA GCA CTG
E K P E L F Q L A L
AAA GCA TTC AGG TAT ACT CTG AAA CTA ATG
K A F R Y T L K L M

ATT GAT AAA GCA AGT TTA GGT CCA ATA GAA
I D K A S L G P I E
GAC TTT AGA GAA CTG ATT AAG TAC CTT GAA
D F R E L I K Y L E
GAA TAT GAA CGT GAC TGG TAC ATT GGT TTG
E Y E R D W Y I G L
GTA TCT GAT GAA AAG TGG AAG GAA GCA ATT
V S D E K W K E A I
TTA CAA GAA AAG CCA TAC TTG TTT TCT CTG
L Q E K P Y L F S L
GGG TAT GAT TCT AAT ATG GGA ATT TAC ACT
G Y D S N M G I Y T
GGG AGA GTG CTT AGC CTT CAA GAA TTA TTG
G R V L S L Q E L L
ATC CAA GTG GGA AAG TTA AAT CCT GAA GCT
I Q V G K L N P E A
GTT AGA GGT CAG TGG GCC AAT CTT TCA TGG
V R G Q W A N L S W
GAA TTA CTT TAT GCC ACA AAC GAT GAT GAA
E L L Y A T N D D E
GAA CGT TAT AGT ATA CAA GCT CAT CCA CTA
E R Y S I Q A H P L
CTT TTA AGA AAT CTT ACG GTA CAA GCA GCA
L L R N L T V Q A A
GAA CCT CCC CTG GGA TAT CCG ATT TAT TCT
E P P L G Y P I Y S
TCA AAA CCT CTC CAC ATA CAT TTG TAT TAG
S K P L H I H L Y *

图2 PPSBP9基因的核苷酸序列及编码产物一级结构序列.

3 讨论

酵母双杂交系统是近年来新发展起来的一种分析真核细胞中蛋白-蛋白相互作用的一种有效的基因分析方法, 他的产生为研究蛋白在体内生理情况下相互作用提供了一种新的遗传学方法. 我们利用此技术, 已成功筛选到一系列与乙肝病毒蛋白及丙肝病毒蛋白相结合的蛋白基因, 其中, 也包括了一些未知功能蛋白的基因^[9-11].

1979年Galibert *et al*^[12-13]首次报告了HBV基因组的全序列, 并确定4个主要的开放读码框架(ORF), 分别命名为S、C、P、X区, 一直沿用至今. HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与功能基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠^[14]. 关于这一紧密DNA结构中是否存在新的编码序列, 一直没有进行系统的研究. 最近董菁 *et al*^[7-8, 15-19]对于中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 发现了前-S和前-X基因序列, 改写了HBV DNA编码基因序列研究的历史.

HBV表面抗原即外膜蛋白不仅是病毒遗传结构的包装蛋白, 病毒感染所必需, 也是引起宿主保护性应

答的免疫原表位,而且截短型表面抗原中蛋白和大蛋白具有反式激活作用^[7],这种功能是与表面抗原的多种形式激活癌基因有关^[20]。董菁*et al*进一步应用DNA SIS软件的蛋白质分析功能分析了前-前-S、前-S1、前-S2和S基因的完全表达产物,前-前-S区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区,那么全S蛋白(含前-前-S区)与大蛋白有不小的差异。其中的19(21)个疏水氨基酸在前-前-S区形成了一个小的疏水功能域,可能与蛋白的空间折叠或表面蛋白合成后分泌有关。进一步研究前-前-S所编码蛋白的功能及与之相互作用的蛋白具有重要意义。

我们应用酵母双杂交技术成功的筛选出肝细胞文库中与前-前-S蛋白相互作用的蛋白基因54种,其中包括HBV前-前-S蛋白结合蛋白9这一未知功能的新基因。根据GenBank的信息,电子拼接推定该基因的开放读码框架获得相应的全长编码基因,我们设计了新基因的上下游引物,并成功地从HepG2细胞的mRNA中逆转录出该基因的完整序列。PCR反应产物经T-A克隆测序完全符合计算机分析结果,表明我们已顺利得到了该新基因的编码序列,其编码序列全长为840个核苷酸,编码279个氨基酸残基。值得我们关注的是,在对这一未知功能新基因进行进一步生物信息学分析时发现,我们这一研究小组在用酵母双杂交技术筛选HCV F蛋白与肝细胞文库相互作用的蛋白时也筛选到这一相同的未知功能的新基因,故我们将其命名为PPSBP9/HCVFbp2。表明这一未知功能基因能与多种病毒蛋白结合,提示这一未知功能基因可能在HBV, HCV感染的致病过程中发挥重要作用。新基因的发现及克隆化成功为今后进一步深入地研究新基因的生物学功能奠定了基础。

4 参考文献

- 1 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:1
- 2 董菁, 成军, 皇甫竞坤, 洪源, 王刚, 陈国凤, 李莉, 张玲霞, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒序列准种个体化特征的研究. 解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 3 Wang XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM. Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8:95-98
- 4 Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* 2001;33:751-757
- 5 Walton CM, Wu CH, Wu GY. A ribonuclease H-oligo DNA conjugate that specifically cleaves hepatitis B viral messenger RNA. *Bioconjug Chem* 2001;12:770-775
- 6 Wang X, Grammatikakis N, Hu J. Role of p50/CDC37 in hepadnavirus assembly and replication. *J Biol Chem* 2002;277:24361-24367
- 7 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 8 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-前-S编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:761-762
- 9 陆荫英, 王琳, 李克, 刘妍, 成军, 张玲霞. HBeAg肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆. 世界华人消化杂志 2003;11:422-425
- 10 张健, 成军, 王琳, 邵清, 陆荫英, 梁耀东, 陈天艳, 洪源. 丙型肝炎病毒非结构蛋白5B结合蛋白的酵母双杂交筛选研究. 解放军医学杂志 2003;28:768-770
- 11 王琳, 李克, 成军, 张健, 邵清, 梁耀东, 刘敏. 应用白细胞表达型cDNA文库的酵母双杂交技术筛选丙型肝炎病毒非结构蛋白5A的结合蛋白. 中西医结合肝病杂志 2003;13:340-342
- 12 Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 1979;281:646-650
- 13 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 14 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- 15 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 16 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;28:765-767
- 17 董菁, 李进, 施双双, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 洪源, 李莉. 乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究. 解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 18 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. 中华医学杂志 2002;82:81-85
- 19 董菁, 施双双, 张国庆, 皇甫竞坤, 成军, 王勤环, 李莉. HBsAg与抗-HBs同时阳性者体内S基因序列分析. 中国公共卫生 2002;18:535-537
- 20 成军. 肿瘤相关基因. 第1版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000:96-100

应用噬菌体展示技术筛选 HBsAg 启动子 I 的 DNA 结合蛋白

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖

杨艳杰, 成军, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖, 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 北京市 100038
陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院消化内科 重庆市 400038
国家自然科学基金项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
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: 2004-02-14 接受日期: 2004-06-09

摘要

目的: 通过筛选HBsAg基因启动子I(SPI, surface promoter I)结合蛋白, 为HBV复制机制的研究探索新的途径。

方法: 应用噬菌体展示技术, 以HBsAg基因启动子I的聚合酶链反应(PCR)产物DNA作为固相筛选分子, 对噬菌体人肝细胞cDNA文库进行4轮“黏附-洗脱-扩增”筛选过程, 经噬斑的PCR扩增后, 构建克隆载体, 最后对所筛选克隆进行DNA序列分析和同源性搜索。

结果: 噬菌体经富集后, 从随机筛选的14个克隆中得到8个阳性克隆, 成功构建了克隆载体。序列测定后经过同源性搜索, 确定了和HBV表面抗原基因启动子I特异结合的肝细胞蛋白, 共编码7种蛋白。其中3个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白。

结论: 用噬菌体人肝cDNA文库筛选得到HBsAg基因启动子I的结合蛋白, 分析了该蛋白的编码基因。

杨艳杰, 成军, 陈东风, 王春花, 黄燕萍, 吴煜, 刘敏, 王建军, 钟彦伟, 刘妍, 张黎颖. 应用噬菌体展示技术筛选HBsAg启动子I的DNA结合蛋白. 世界华人消化杂志 2004; 12(11):2737-2739
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2737.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)持续感染导致全球性健康问题。世界人口约6%是病毒携带者, 因此HBV是慢性肝病的重要病原体, 且是引发肝细胞癌(HCC)的重要因素^[1-5], 而病毒基因组编码的蛋白与宿主肝细胞之间的相互作用, 可能是病毒致肝细胞癌的重要分子机制^[6-12]。HBV基因组分为结构基因序列和调节基因序列两大部分。调节基因序列和结构基因序列相互重叠, 即使结构基因序列本身也有部分重叠, 因此, HBV具有结构紧密的特点。HBsAg基因含有两个串联的启动子SPI和SPII。其中SPI(2 219-2 780 nt)调节2.4 kb mRNA的转

录, 编码表面抗原大蛋白。在HBV复制中具有十分重要的作用。SPI含有典型TATA盒序列, 其上游50 bp处为肝细胞特异性核因子(hepatocyte nuclear factor, HNF)I结合位点。该结合位点是HBV转录调节的重要组成部分, 也是HBV嗜肝性的重要原因之一; 这一位点可能还有其他肝特异因子与之结合, 从而调节2.4 kb mRNA的转录^[13-14]。另外, SPI的腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)核苷酸丰富区中还有一个AFP-1(一种可与AFP基因的增强子及启动子结合的核因子)结合位点, 也可能与肝细胞特异性的转录有关。因此, 作为指导前-S基因组RNA转录的SPI启动子在HBV的生活周期中具有十分重要的作用。为了寻找与SPI结合的肝特异性转录作用因子, 进一步探讨SPI的转录调节机制, 我们应用噬菌体展示技术, 利用人肝细胞cDNA文库, 以生物素化的SPI的DNA作为固相分子进行筛选, 研究影响HBV DNA复制的肝细胞蛋白的结构和功能。

1 材料和方法

1.1 材料 T7 select 人肝细胞cDNA文库, 受体菌BLT5615 (Novagen公司), 质粒pGEM-Teasy和pcDNA3.1(-) (Promega公司), Taq酶、琼脂糖、dNTP、T4连接酶、RNA酶、玻璃奶DNA回收试剂盒(博大科技), EcoRI、BamHI、MluI、NheI (购于宝生物公司), 热循环仪、凝胶成像仪、酶联吸附读数仪、大肠杆菌DH5 α 、pCP10质粒为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞cDNA文库的筛选 HBV SPI启动子的扩增根据HBV *ayw*的基因序列, 在编码区的上游和下游分别设计合成一对寡核苷酸引物, 并用生物素标记, P1: 5' -ACG CGT GAA CAT CTA GTT AAT C-3', P2: 5' -GCT AGC GCT GTA GAT CTT GTT C-3' 在引物5'端分别引入MluI和NheI位点, 由赛百盛公司合成。在0.5 mL Ep管中依次加入17 μ L双蒸水, 2.5 μ L的10 \times 缓冲液(含20 mmol/L MgCl₂), 2 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L P1和P2, 1 μ L pCP10质粒, 0.5 μ L Taq酶(5 Mu/L)。放入PE 9 600 PCR仪中扩增。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C变性60 s, 57 $^{\circ}$ C退火60 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 循环33次后, 72 $^{\circ}$ C保温10 min。10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。玻璃奶法回收DNA片段。文库扩增: 将BLT5615新鲜克隆在3 mL LB/Amp内振摇, 37 $^{\circ}$ C过夜。在3 mL LB/Amp内加入30 μ L振摇细菌, 将细菌浓度摇至A₆₀₀值0.5, 加入30 μ L IPTG, 再振摇30 min后加入噬菌体文库5 μ L。37 $^{\circ}$ C振摇1-3 h直到观察到

细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移至另一无菌 Ep 管中, 4 °C 保存. 链亲和素 20 μ L (1 g/L) 包被微孔板, 4 °C 过夜. 1 \times TBS 洗涤, 加入 100 μ L SP I 启动子 DNA 回收片段, 4 °C 过夜. 1 \times TBST (5 g/L Tween-20) 洗涤 5 遍, 加入文库扩增裂解液 100 μ L, 4 °C 过夜. 1 \times TBST 洗板 5 次, 加入 100 μ L T7 洗脱缓冲液, 室温孵育 20 min, 将洗脱液移至另一无菌 Ep 管中. 将 15 μ L 洗脱噬菌体加入 3 mL 中对数生长期的细菌培养液, 37 °C 振荡培养, 直到看到细菌裂解. 8 000 *g* 离心 10 min, 将上清移到一新 Ep 管, 4 °C 保存备下一轮筛选用. 每轮筛选后, 均做噬斑分析. 按上述步骤再筛选 5 遍.

1.2.2 噬斑的 PCR 扩增 刮取第 5 轮筛选后的阳性噬斑, 置于 100 μ L pH 8.0 的 10 mol/L EDTA 的 Ep 管中, 65 °C 加热 10 min, 14 000 *g* 离心 10 min 至澄清. 在 0.5 mL 管中依次加入 40 μ L 双蒸水, 5 μ L 的 10 \times 缓冲液 (含 20 mmol/L MgCl₂), 4 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 12.5 μ mol/L T7 select 上游引物 P3: 5' -GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC-3' 和下游引物 P4: 5' -AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA-3', 1 μ L pCP10 质粒, 0.5 μ L Taq 酶 (5 Mu/L) 放入 PE 9 600 PCR 仪中扩增. 扩增条件: 94 °C 变性 60 s, 50 °C 退火 55 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 次后, 72 °C 保温 10 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果. 玻璃奶法回收 DNA 片段.

1.2.3 序列比对和同源性分析 将纯化的噬斑 PCR 产物与 pGEM-Teasy 载体混合, 在 16 °C 条件下用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 随后转化用氯化钙法制备的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在铺有 IPTG/X-gal 的氨苄西林平板上进行蓝白斑菌落筛选, 挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒, 进行酶切鉴定. 以酶切鉴定阳性的重组子为模板, 进行目的基因的 DNA 序列测定, 序列测定由上海博亚生物公司完成. 同源性搜索由以下网址上的 BLASTn 软件完成 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>).

2 结果

2.1 肝细胞 cDNA 文库的筛选 以固相化的 SPI 启动子 DNA 片段作为支持分子, 对肝细胞 cDNA 文库进行 4 轮 “吸附-洗脱-扩增” 的筛选. 噬菌体的富集结果见表 1. 从固相平板洗脱的噬菌体数显示了明显的增加趋势, 第 4 轮与第 1 轮相比, 富集了 356 倍 (富集倍数 = 第 4 轮产出率 / 第 1 轮产出率 产出率 = 洗脱的噬菌体数量 / 所用的噬菌体数量).

表 1 亲和筛选对噬菌体的富集

筛选次数	噬菌体数		产出率
	投入	捕获	
第 1 轮	3.5×10^8	2.5×10^{11}	7.1×10^2
第 2 轮	2.5×10^{11}	2.6×10^{15}	1.0×10^4
第 3 轮	2.6×10^{15}	1.5×10^{20}	5.8×10^4
第 4 轮	1.5×10^{20}	3.8×10^{25}	2.5×10^5

2.2 目的基因的 PCR 扩增 经过 4 轮筛选, 随机挑取 14 个噬斑为模板, 用 T7 select 引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳. 结果产生片段大小不等的条带 (图 1), 用同一噬斑裂解液重复 PCR 得到相同结果.

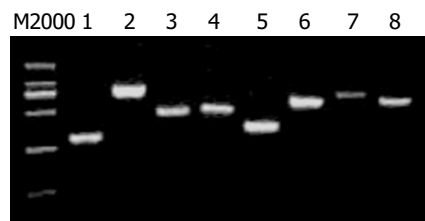


图 1 阳性噬斑裂解液 PCR 扩增.

2.3 序列比对和同源性分析 对阳性克隆基因的 DNA 序列测定, 及根据 GenBank 数据库提供的数据库进行 BLASTn 同源性搜索, 8 个阳性克隆筛选到启动子 DNA 结合蛋白, 共编码 7 种蛋白. 其中 3 个克隆编码未知功能蛋白; 其余的克隆分别编码 4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白、复制蛋白等蛋白 (表 2).

表 2 应用噬菌体展示技术筛选到的阳性克隆

编号	编码蛋白	同源性 (%)	克隆数
1	isolate 183 mitochondrion (孤立线粒体 183)	99	1
2	RF-C/activator 1 homolog (释放因子 C/激活因子 1 同源体)	100	1
3	hypothetical protein MGC9515 (人类假想蛋白 MGC9515)	99	2
4	haptoglobin (触珠蛋白)	99	1
5	4-aminobutyrate aminotransferase (4-氨基丁酸氨基转移酶)	100	1
6	chromosome 3 clone RP11-801L18 (复制蛋白 11-801L18)	100	1
7	hypothetical protein FLJ22056 (人类假想蛋白 FLJ22056)	100	1

3 讨论

作为调节元件的一段 DNA 序列, 可与某些细胞蛋白或病毒蛋白结合, 正性或负性调节转录. HBV 的 SPI 启动子是 HBV 的一个重要调节元件. 转录因子 HNF1 和 HNF3 对 SPI 的转录调节具有重要作用, 他们作用的位置在肝脏而不在其他组织. 这两种因子协同作用可能抑制 2.4 kb mRNA 的转录. 在多聚腺苷酸 (PolyA) 加尾信号、糖皮质激素应答元件 (GRE)、增强子 I (ENH I)、增强子 II (ENH II) 和 HBxAg 及其他的细胞因子作用下顺式或反式激活 SPI, 开始发挥调节功能^[15-16]. SPI 调节 2.4 kb 的 mRNA 转录, 编码大蛋白. 对 HBV 转基因鼠的研究显示, 2.4 kb mRNA 在肝组织内呈严格分布, 具有高度的嗜肝性. 由于大蛋白的增加易导致病毒包膜蛋白在细胞内蓄积, 引起细胞病变效应^[17-18]. HBV 各种包膜蛋白的这种比例不仅有利于感染性 HBV 颗粒成熟和释放, 而且有利于宿主细胞的生存, 使二者能共生共存^[19-20]. 因此, 3 种外膜蛋白的产量有正常比例, 大蛋白过量时, 将顺式干扰 SPI, 从而降低基因的转

录水平. Li *et al*^[21]从1例慢性肝炎患者血清中分离到S基因启动子缺失变异株,转染肝癌细胞后,大蛋白过度表达,而中、主蛋白表达减少,因而病毒及亚病毒颗粒的分泌都受到抑制,肝细胞内大蛋白堆积,认为可能是慢性肝炎肝细胞毛玻璃样变性的原因.他们进一步研究发现,过度表达的大蛋白在肝细胞内质网通过激活grp78和grp94启动子,改变宿主细胞的生理功能^[22-24].转基因小鼠模型已经证实,若大蛋白过度表达,在肝细胞内堆积,将导致肝细胞内质网肿胀,肝细胞变性.因此,在感染过程中,改变大、中、小蛋白的比例将影响疾病的进程.

我们以已知启动子DNA序列筛选出与其相结合的蛋白编码基因,通过生物信息分析来确定该蛋白质的名称.经过4轮“吸附-洗脱-扩增”筛选过程,结果得到了8个阳性克隆,共表达7种蛋白.其中有3个为未知功能蛋白,对已知功能蛋白,如4-氨基丁酸氨基转移酶、触珠蛋白(haptoglobin)、复制蛋白等蛋白的结合作用,尚未见有文献报道,需体外结合及真核细胞共转染等实验进一步证实.总之,本实验应用噬菌体展示技术,试图寻找与HBV SPI启动子结合的肝特异蛋白及HBV、特别是表面抗原大蛋白严格嗜肝性的原因,探索病毒表面抗原大蛋白转录、翻译的调控机制.通过本实验,我们筛选到了一些与SPI启动子序列特异结合的蛋白,为今后更好地了解HBV的转录调控机制及其生活史打下了基础.

4 参考文献

- Dai LC, Yao X, Lu YL, Ping JL, Zhang BW, Ni CR. Expression of midkine and its relationship with HBV infection in hepatocellular carcinomas. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1691-1693
- Huo TI, Wu JC, Lui WY, Lee PC, Huang YH, Chau GY, Tsay SH, Chang FY, Lee SD. Diabetes mellitus is a recurrence-independent risk factor in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma undergoing resection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1203-1208
- Fujioka S, Shimomura H, Iwasaki Y, Fujio K, Nakagawa H, Onishi Y, Takagi S, Taniguchi H, Umeoka F, Nakajima H, Moriya A, Nanba K, Piao CY, Shinji T, Koide N, Shiratori Y. Hepatitis B virus gene in liver tissue promotes hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Dig Dis Sci* 2003;48:1920-1924
- Wang T, Wang Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:356-360
- Kwon JA, Rho HM. Transcriptional repression of the human p53 gene by hepatitis B viral core protein (HBc) in human liver cells. *Biol Chem* 2003;384:203-212
- 柯亨宁, 斯崇文, 成军, 于敏, 刘丹, 田秀兰. 表面抗原DNA疫苗诱导小鼠体液免疫及抑制转基因鼠表面抗原的产生. *中华内科杂志* 2000;39:319-322
- 成军, 钟彦伟, 施双双, 倪勤, 夏小兵, 董菁, 王刚, 刘友昭, 王琳, 刘妍, 杨继珍, 陈菊梅. 乙型肝炎病毒表面抗原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. *肝脏* 2000;5:130-132
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *Gastroenterology* 2003;124:327-334
- Raimondo G, Costantino L, Caccamo G, Pollicino T, Squadrito G, Cacciola I, Brancatelli S. Non-sequencing molecular approaches to identify preS2-defective hepatitis B virus variants proved to be associated with severe liver diseases. *J Hepatol* 2004;40:515-519
- Dong J, Cheng J, Wang QH, Liu Y, Wang G, Shi SS, Xia XB, Shao Q, Si CW. The preliminary study on hepatitis B virus (HBV) quasispecies in patients with chronic HBV infection. *China J Infect Dis* 2001;19:199-203
- 董菁, 成军, 王勤环, 皇甫竞坤, 施双双, 张国庆, 洪源, 李莉, 斯崇文. 乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究. *中华医学杂志* 2002;82:81-85
- Cheng J. Progress in gene therapy for liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(Suppl):A261-262
- Cai YN, Zhou Q, Kong YY, Li M, Viollet B, Xie YH, Wang Y. LRH-1/hB1F and HNF1 synergistically up-regulate hepatitis B virus gene transcription and DNA replication. *Cell Res* 2003;13:451-458
- Schulte-Frohlinde E, Seidler B, Burkard I, Freilinger T, Lersch C, Erfle V, Foster GR, Classen M. Different activities of type I interferons on hepatitis B virus core promoter regulated transcription. *Cytokine* 2002;17:214-220
- Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL, Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. *J Virol* 2002;76:5875-5881
- Waris G, Siddiqui A. Interaction between STAT-3 and HNF-3 leads to the activation of liver-specific hepatitis B virus enhancer 1 function. *J Virol* 2002;76:2721-2729
- Tu Y, Qi Z, Yang P, Pan Y, Yu S, Du M, Li G. Transgenic mice model of human hepatitis B virus x gene. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao* 2000;22:263-265
- Raney AK, Eggers CM, Kline EF, Guidotti LG, Pontoglio M, Yaniv M, McLachlan A. Nuclear covalently closed circular viral genomic DNA in the liver of hepatocyte nuclear factor 1 alpha-null hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2001;75:2900-2911
- Bock CT, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Two control elements in the hepatitis B virus S-promoter are important for full promoter activity mediated by CCAAT-binding factor. *Hepatology* 1999;29:1236-1247
- Cha JY, Kim H, Kim KS, Hur MW, Ahn Y. Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Co-operative role of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta. *J Biol Chem* 2000;275:18358-18365
- Li J, Ou JH. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol* 2001;75:8400-8406
- Reifenberg K, Wilts H, Lohler J, Nusser P, Hanano R, Guidotti LG, Chisari FV, Schlicht HJ. The hepatitis B virus X protein transactivates viral core gene expression in vivo. *J Virol* 1999;73:10399-10405
- Xu Z, Yen TS, Wu L, Madden CR, Tan W, Slagle BL, Ou JH. Enhancement of hepatitis B virus replication by its X protein in transgenic mice. *J Virol* 2002;76:2579-2584
- Barnabas S, Andrisani OM. Different regions of hepatitis B virus X protein are required for enhancement of bZip-mediated transactivation versus transrepression. *J Virol* 2000;74:83-90

抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿

孙志伟, 王双, 俞炜源, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 10071
赵君, 刘彦仿, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室
陕西省西安市 710032
国家自然科学基金资助, No. 30171065
项目负责人: 孙志伟, 100071, 北京市军事医学科学院生物工程研究所蛋白
质工程研究室. szwyh@263.net
电话: 010-66948819 传真: 010-63833521
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 构建人源化抗肝癌双价抗体, 并实现其在大肠杆菌中的可溶性表达。

方法: 缩短人源化抗肝癌单链抗体 hscFv₂₅ 的连接肽为 5 肽, 构建(hscFv₂₅)₂ 基因, 克隆入原核表达载体后, 转化入大肠杆菌表达, 并纯化目的蛋白, 细胞 ELISA、免疫组织化学法检测其生物活性。

结果: 目的基因在大肠杆菌中得到了可溶性表达, 纯化蛋白的相对亲和力比亲本抗体提高了 10 倍左右, 对肝癌组织切片的免疫组织化学染色呈强阳性, 阳性率为 75%。

结论: 成功制备了人源化抗肝癌双价抗体, 该抗体具有较高的亲和力, 为进一步的临床研究奠定了基础。

孙志伟, 赵君, 王双, 俞炜源, 刘彦仿. 抗肝癌人源化 Diabody 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2740-2742
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2740.asp>

0 引言

Diabody 是单链抗体的二聚体形式, 相对分子质量大约 M_r 55 000 的双价抗体, 具有较高的亲和力和较强的穿透能力, 同时血清廓清时间又比较合适, 因此是比较理想的肿瘤放射免疫诊断和治疗载体^[1]。我们已经制备了一株亲和力较好、特异性较高的人源化抗肝癌单链抗体 hscFv₂₅, 该抗体具有良好的靶向定位功能^[2]。我们将 hscFv₂₅ 的连接肽改成 5 肽(GGGGS), 构建人源化抗肝癌双价抗体基因并在大肠杆菌中对该基因进行可溶性表达研究, 目的获得高亲和力的人源化抗肝癌双价抗体(hscFv₂₅)₂, 为进一步的临床应用研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 *E.coli* BL21(DE3)菌株为本室保存。表达载体 pTIG 为军事医学科学院生物工程研究所赵志虎副研究员惠赠, 含促进可溶性表达的伴侣分子硫氧还蛋白基因(Trx), Trx 与下游抗体基因之间引入了翻译终止起始序列 TAAATG。IPTG、琼脂糖、SDS-PAGE 所用材料及限制性内切酶等, 购自 Sigma 公司。Taq DNA 聚合

酶和 T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品。PCR 引物由上海生物工程公司合成, 序列如下: P1: 5' -CGGAATTCTAAATGGAGCTACAGCTGGTTGA ATC-3' (V_H 5' 端引物, 引入 *EcoR* I 酶切位点和终止起始序列 TAAATG); P2: 5' -CAGGAGCTCTGG AACTGGCCTGGCTT-3' (V_H 3' 端引物, 3' 端引入 *SacI* 酶切位点); P3: 5' -CGGAGCTC GGAGGTGGAGGTTCTATGACCCAGACTCC ATCTCC-3' (V_L 5' 端引物, 包含 5 肽 Linker 和引入的 *SacI* 酶切位点); P4: 5' -CCCAAGCTTACGCGTTCC AGCGGA TCCGG-3' (3' 端引物, 于模板上 V_L 3' 端后面的检测标签 E-tag 相配对, 同时引入 *Hind* III 酶切位点)。

1.2 方法

1.2.1 重链可变区(V_H)、含 5 个连接肽的轻链突变体(Linker-V_L-E-tag)基因的 PCR 扩增 以 pTIG-hscFv₂₅-E-tag 为模板, P1 和 P2 为引物, PCR 扩增 V_H 基因片段; 以 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增 Linker-V_L-E-tag 基因片段。

1.2.2 重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的构建 上述 PCR 产物经胶回收后分别用 *EcoR* I、*SacI* 和 *SacI*、*Hind* III 酶切并与 *EcoR* I、*Hind* III 酶切的表达载体 pTIG 大片段进行 3 片段连接, 构建重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂, 转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细菌, 碱裂解法提取质粒并用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 对酶切鉴定阳性克隆进行序列测定。

1.2.3 诱导表达 含重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的宿主菌 BL21(DE3), 以 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)于 28 °C 诱导表达 6 h, 离心收集菌体, 超声碎菌。进行 12% SDS-PAGE 及以鼠抗 E-tag 抗体为二抗的 Western blot 鉴定。

1.2.4 可溶性表达产物的纯化 诱导表达 pTIG(hscFv₂₅)₂ 菌体 100 mL, 离心收集菌体, 超声碎菌 15 min 后, 取上清, 用 Ni-NTA Agarose 亲和层析法纯化表达产物(载体多克隆位点下游含 6×His)。表达产物的纯度采用 SDS-PAGE 鉴定, 经核酸蛋白检测仪定量后, 除菌分装, 4 °C 保存备用。

1.2.5 (hscFv₂₅)₂ 的活性的鉴定

1.2.5.1 细胞 ELISA 检测 (hscFv₂₅)₂ 相对亲和力和特异性 SMMC-7721 肝癌细胞及正常肝细胞 HL-02 铺 96 孔板, 经固定和封闭后, 以上述纯化产物(hscFv₂₅)₂ 为一抗(做倍比稀释, 最高终浓度为 20 mg/L), 以鼠抗 E-tag 抗体为二抗, 进行细胞 ELISA, 酶标仪测定 A_{492/630} 值, 达到饱和后的 A_{492/630} 值降低到 50% 时的抗体浓度为 (hscFv₂₅)₂ 的相对亲和力。以亲本单链抗体 hscFv₂₅-E-tag

为平行对照。

1.2.5.2 临床肝癌患者石蜡切片免疫组织化学染色 上述纯化的(hscFv₂₅)₂对60例临床确诊的肝癌、3例肝硬化及2例正常肝的石蜡切片进行常规免疫组织化学染色,显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 的构建 V_H 基因 PCR 扩增片段、Linker-V_L-E-tag PCR 基因扩增片段与 pTIG 表达载体大片段进行 3 片段连接,转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细菌,提取质粒。该质粒经 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切,可切出约 760 bp 大小的片段,与目的基因大小相符,后经序列测定证实序列与设计一致,说明重组表达载体 pTIG(hscFv₂₅)₂ 构建成功。

2.2 (hscFv₂₅)₂ 的诱导表达和纯化 将重组 pTIG(hscFv₂₅)₂ 表达载体转化的宿主菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导(以未诱导的同一菌株为对照)表达,碎菌上清进行的 12% SDS-PAGE 显示,约在 *M*_r 30 000 处出现 1 条新生蛋白带(图 1),与目的蛋白的大小相一致,表达量约占细

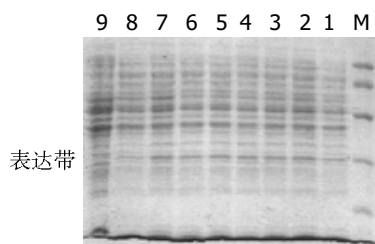


图1 重组(hscFv₂₅)₂表达产物的SDS-PAGE分析。M: 蛋白标记物 *M*_r×10³: 97, 66, 43, 31 和 20; 1-8: 诱导表达不同时间的(hscFv₂₅)₂ 宿主菌碎菌上清。9: 未诱导表达(hscFv₂₅)₂ 宿主菌碎菌上清。

菌裂解上清总蛋白量的 8% 左右,说明是可溶性表达,可溶性表达产物经 Nie 柱(His 亲和层析柱)纯化,纯度达到电泳纯。可溶性表达产物经 Western blot 鉴定,证实为目的基因表达产物。

2.3 表达产物抗体活性的检测 细胞 ELISA 检测结果显示,所纯化的表达产物可与 SMMC-7721 肝癌细胞结合而与正常肝细胞 HL-02 不结合,Diabody 的相对亲和力约为 0.25 mg/L,而亲本单链抗体的相对亲和力约为 2.50 mg/L,即 Diabody 的相对亲和力提高了 10 倍左右。肝癌石蜡切片脱蜡、封闭后,加纯化产物 37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加鼠抗 E-tag 抗体(1:2 000),37 °C 作用 1 h,洗涤三次,加 HRP 标记的兔抗鼠抗体,37 °C 作用 30 min 后显色,衬染封片后在显微镜下观察。结果显示,有 45 例为阳性,阳性率为 75%,抗原主要定位于肿瘤细胞膜上,少数病例细胞质或细胞核也呈阳性,癌旁肝、正常肝及肝硬化组织未见阳性着色(图 2),这于亲本单克隆抗体相一致,说明我们所制备的人源化抗肝癌(hscFv₂₅)₂ 较好地保持了亲本抗体的特异性,其相对亲和力比其亲本单链抗体大约高 10 倍。

3 讨论

我国是肝癌高发区,10 a 前的统计数字就显示,我国每年有 11 万人死于肝细胞肝癌,今年来虽未见明确的统计数字,但可以肯定的是其发病率还在呈上升趋势。对于肿瘤的治疗,基因工程抗体再次成为肿瘤诊断和治疗研究的热点。对于实体瘤的体内诊断和治疗,小分子抗体是比较理想的靶向载体,目前已有数株小分子抗体作为放射免疫诊断或治疗载体被批准上市,但尚无肝癌体内诊断性或治疗性抗体上市^[3]。在我国,目

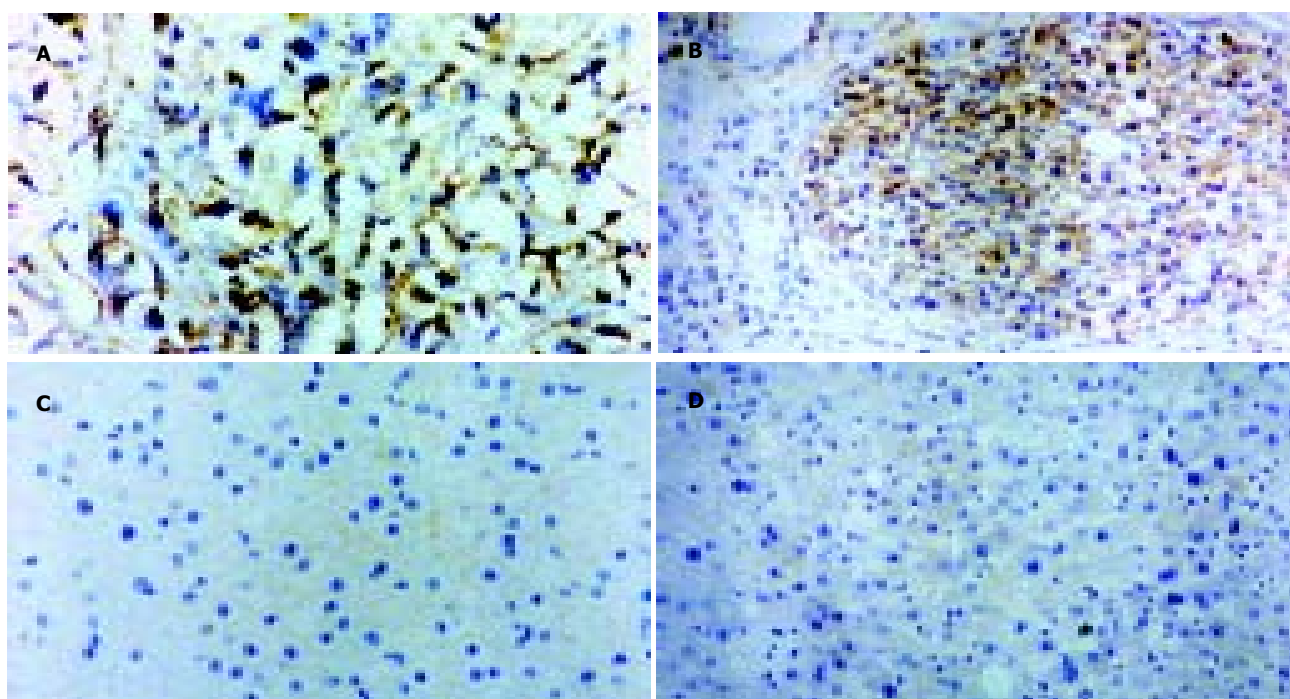


图2 重组表达产物 Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色(×400)。A-B: Diabody 对肝癌组织的免疫组织化学染色; C: 正常肝的免疫组织化学染色; D: 肝再生结节的免疫组织化学染色。

前有一株同位素标记的,通过全抗体消化而制备的鼠源性抗肝癌抗体片段进入临床研究的报道,在国外还未见类似报道。Diabody具有穿透能力强、亲和力较高和半衰期较合适等特点,同时又具有基因操作简单,容易进行高效表达和大规模生产,因此是比较理想的放射免疫诊断或治疗载体^[2,4]。Diabody是单链抗体通过自然折叠而形成的二聚体形式,两条链间无共价键连接,但和单链抗体一样,轻重链可变区之间也需要连接肽连接,连接肽的长度以5-10个氨基酸为宜,多数报道为5肽,即GGGGS。连接肽长度不宜过长,否则活性蛋白会以单链抗体的形式存在,但也不宜过短,否则活性蛋白会以多聚体的形式存在(三价抗体活四价抗体)^[5-6]。

我们已经制备了一株抗肝癌人源化单链抗体,该抗体与肿瘤坏死因子 α 、PE38等基因融合表达的抗肝癌双功能抗体,对荷肝癌移植裸鼠具有一定的导向杀伤作用^[7],表明单链抗体具有良好的靶向性能,因此我们将该单链抗体改造成Diabody,为应用该型抗体进行临闯肝癌的放射免疫诊断或治疗奠定基础。

4 参考文献

- 1 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikler DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radiolabeled fragments. *Bioconjug Chem* 2001;12:220-228
- 2 张静,刘彦仿,杨守京,孙志伟,乔庆,张素珍. 抗肝癌单链抗体融合人突变型TNF α 的构建与表达. *世界华人消化杂志* 2000;8: 616-620
- 3 陈惠鹏. 医药生物工程进展. 北京: 人民军医出版社, 2004:89-108
- 4 Tahtis K, Lee FT, Smyth FE, Power BE, Renner C, Brechbiel M W, Old LJ, Hudson PJ, Scott AM. Biodistribution properties of (111)indium-labeled C-functionalized trans-cyclohexyl diethylenetriaminepenta acid humanized 3S193 diabody and F(ab')₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clin Cancer Res* 2001;7:1061-1072
- 5 Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Meth* 2001;248:47-66
- 6 Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, Hu SZ, Odom-Maryon T, Wong JY, Shively JE. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2:21-26
- 7 孙志伟,刘彦仿,袁清安,俞伟源,黄翠芬,马兰花,于继云. 抗肝癌人源化单链抗体融合肿瘤坏死因子 α 的导向作用. *中华肝脏病杂志* 2000;8:352-355

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

应用基因芯片技术筛查大肠癌相关基因

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保

南清振,张振书,杨希山,肖冰,高蕾,叶方鹏,武金保,南方医科大学附属南方医院消化研究所 广东省广州市 510510
国家自然科学基金资助项目, No.39970825
项目负责人: 南清振, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学附属南方医院消化研究所. nanqzh@fimmu.com
收稿日期: 2004-08-31 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 筛选与大肠癌相关的差异表达基因。

方法: 用包含8 000个cDNA的基因芯片法检测4例大肠高分化腺癌组织及其癌旁正常肠黏膜组织标本RNA表达谱, 通过对比分析寻找与大肠癌相关的基因。

结果: 大肠癌差异表达基因中有1 807个基因发生了显著性变化, 其中上调表达的基因有936个, 最有显著上调的有36个; 下调表达的基因有871个, 最有显著下调的有30个。

结论: 大肠癌的发生是一个多基因表达失调的过程, 大肠癌与癌旁正常肠黏膜组织间存在差异表达的基因。

南清振, 张振书, 杨希山, 肖冰, 高蕾, 叶方鹏, 武金保. 应用基因芯片技术筛查

大肠癌相关基因. *世界华人消化杂志* 2004;12(11):2742-2744
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2742.asp>

0 引言

随着人类基因组计划的开发研究和分子生物学、分子遗传学的迅速发展成熟, 人类对肿瘤的认识已进入分子水平^[1]。寻找大肠癌相关基因, 深入了解该相关基因在肿瘤发生及转移过程中的作用已成为可能。基因芯片技术适用于大规模的基因检测和基因功能的研究、疾病发生机制的研究及临床诊断等方面^[2-4]。本研究系选用有8000条人类基因的cDNA表达谱芯片, 以临床切除的大肠癌及癌旁正常肠黏膜组织标本为研究对象, 筛查大肠癌发生、发展过程中与肿瘤相关的基因, 为大肠癌的早期诊断与治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 我院2003年收治的4例大肠高分化腺癌患者组织标本和其对应癌旁5 cm以上的正常大肠黏膜组织。

标本切除后立即置于液氮,冻存备用。TRIzol试剂购自Life Technologies公司,dNTP购自Promega公司;Taq酶购自上海生物工程服务公司;逆转录酶及缓冲液购自Gibco公司;荧光素3标记的脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy3 dUTP)、荧光素标记的5脱氧尿嘧啶三磷酸(Cy5 dUTP)购自美国Amersham Pharmacia公司;总RNA提取试剂盒购自德国Qiagen公司。芯片类型(微芯公司基因表达谱芯片CSC-GE-80),Gen III Microarray Spotter芯片点样仪购自Amersham Pharmacia公司;恒温杂交箱购自Shellab公司;芯片扫描仪购自Amersham Pharmacia公司;聚合酶链反应(PCR)仪购自MJ Research公司;扫描图像显示用软件为ImageQuant (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd);扫描图像分析用软件为ArrayVision (Imaging Research, Ltd)。芯片实验数据分析软件为MIDAS(Chipscreen Biosciences, Ltd)。

1.2 方法 按一步法抽提、纯化大肠癌及正常大肠组织的总RNA。用无RNA酶的三蒸水溶解沉淀,紫外分光分析及电泳检测显示,获得高质量的总RNA。参照Draghici *et al*^[9]方法进行逆转录标记cDNA探针并纯化。在链合成中掺入荧光素标记的dUTP,用Cy3 dUTP标记正常组织mRNA,用Cy5 dUTP标记大肠癌组织mRNA。检测标记的荧光含量。用分光光度计检测260 nm, 550 nm, 650 nm时的A值,然后计算出荧光含量。将标记好的探针(Cy3/Cy5)按等量混匀,溶解在30 μ L的杂交缓冲液中。将芯片和杂交混合探针分别置于95 $^{\circ}$ C双蒸水浴中变性5 min,立即将混合探针加在芯片上,封片(不能留有气泡),置杂交舱,密闭,42 $^{\circ}$ C孵箱恒温杂交16 h,洗片,晾干。玻片完全干燥后,放入扫描片夹中,利用扫描仪进行扫描;扫描后将图像转化为基于荧光强度的数字信号,随后进行数据分析和处理。用以下3个条件作为判定基因差异表达的标准:(1)Cy3和Cy5信号的比值相差2倍(上调Cy3/Cy5 >2.0或下调<0.5)以上;(2)Cy3或Cy5, Cy3和Cy5信号值其中之一必须>600;(3)聚合酶链反应实验结果良好。同时要求筛选出的内对照基因表达数据在所有标本中重复^[6-9]。

2 结果

大肠癌组织 A_{260}/A_{280} 值达1.85,而癌旁正常肠黏膜组织的 A_{260}/A_{280} 值1.96,电泳结果证实高纯化的总RNA。部分基因芯片杂交结果及所有基因点CY3/CY5信号强度散点图(图1, 2)。用微矩阵基因芯片筛选4例大肠癌和癌旁正常肠黏膜组织的差异表达的基因,按照我们的数据筛选标准,芯片结果中有1 807个基因发生了显著性变化,其中上调表达的基因有936个,最有显著性上调的有36个;下调表达的基因有871个,最有显著性下调的有30个。筛选出的有显著差异性的基因按照功能进行分类可以发现他们涉及到细胞生长的各个方面,包括细胞增生,细胞凋亡,细胞代谢以及细胞骨架结构,同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达

变化。这反映了肿瘤生长过程涉及到各方面的基因表达变化。

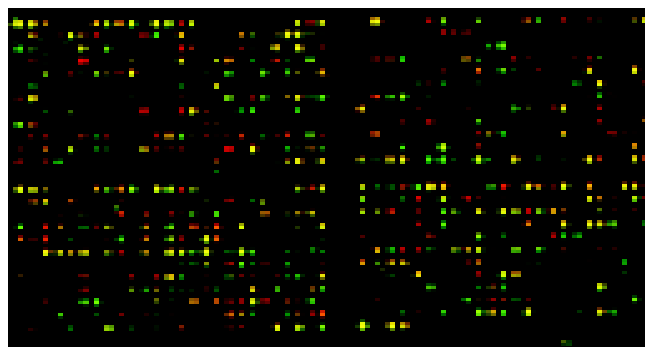


图1 部分基因芯片杂交双色荧光标记叠加图。Cy3标记正常大肠黏膜的总RNA作为对照组,Cy5标记大肠癌的总RNA作为实验组,分别与芯片杂交后进行双色荧光叠加。对于某一点的两种叠加荧光信号,如果Cy3信号较强,该点多显示绿色(下调);如果Cy5信号较强,该点多显示红色(上调);如果强度相似,即显示黄色。

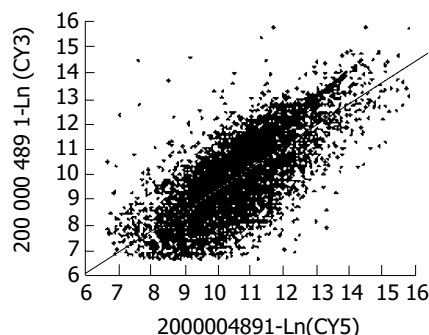


图2 所有基因点CY3/CY5杂交信号强度散点图。X轴、Y轴分别以Cy3荧光强度值和Cy5荧光强度值为坐标,每一个数据点代表芯片上一个基因杂交信号。

3 讨论

我们采用的微矩阵基因芯片是以微芯基因科技公司的8 000条基因为靶基因,制备成cDNA芯片,以临床切除的大肠癌及正常大肠黏膜标本为研究对象,对这两种组织总RNA逆转录产生的cDNA进行杂交检测,寻找和筛查大肠癌相关基因,探讨大肠癌在发生、发展过程中各种基因的表达变化,为大肠癌的早期诊治提供理论依据。软件统计分析微矩阵扫描结果提示,大肠癌发生中有众多基因发生了分子生物学改变(个体差异存在不同),其中有1 807个基因发生了显著性变化,上调表达的基因有936个,最有显著性上调的有36个;下调表达的基因有871个,最有显著性下调的有30个。而且发现在大肠癌的发生、发展中有多种基因的参与,他们涉及到细胞生长的各个方面,包括细胞增生,细胞凋亡,细胞代谢以及细胞骨架结构,同时还涉及到各种原癌基因和肿瘤抑制基因的表达变化。证实大肠癌中基因改变的多样性,进一步推断肿瘤的发生、发展是一多基因、多阶段过程^[10-12]。

由于肿瘤部位所包含的细胞类型的多样性,使得人们在解释这些相关基因的表达变化与肿瘤中特定细

胞类型的表型变化的相关性时遇到一定的困难.但是对于那些有非常明显变化的基因和主要的细胞类型间的相关性仍然可以在进一步的研究中得到明确^[13-15].我们按照相关的功能挑选了部分基因可以看出一些与肿瘤相关的基因表达变化,如细胞凋亡相关基因的下调表达,但是同时也注意到一些细胞凋亡启动基因的表达上调,这其中可能反映了肿瘤对抗细胞凋亡的内在机制^[16-17];而在原癌基因方面,大部分发生了表达上调,但是也有部分表达下调,这可能与不同原癌基因在不同肿瘤发生中的作用不同有关;其他如细胞骨架蛋白相关基因的表达变化则与肿瘤细胞的生长和转移特性密切相关^[18].

4 参考文献

- 1 南清振,高蕾,杨希山,肖冰,周京旭,张亚历,施理. mRNA差异显示法筛选大肠癌相关基因. 第一军医大学学报 2001;21:258-261
- 2 纪冬,成军,刘妍,王建军,郭江. 应用基因表达谱芯片技术筛选NS3TP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12:1707-1711
- 3 岑辉,唐小萍,韩英,曾晓,吴岚军,方永明. 低密度基因芯片的性能与应用. 中国医学检验杂志 2004;5:8-11
- 4 Man XB, Tang L, Qiu XH, Yang LQ, Cao HF, Wu MC, Wang HY. Expression of cytochrome P4502E1 gene in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:1565-1568
- 5 Draghici S, Kulaeva O, Hoff B, Petrov A, Shams S, Tainsky MA. Noise sampling method: an ANOVA approach allowing robust selection of differentially regulated genes measured by DNA microarrays. *Bioinformatics* 2003;19:1348-1359
- 6 Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002;3:research0062
- 7 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
- 8 刘妍,成军,王春花,杨倩,王建军,纪冬. 基因表达谱芯片技术筛选XTP4基因转染细胞差异表达基因. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:209-213
- 9 Li SR, Dorudi S, Bustin SA. Identification of differentially expressed genes associated with colorectal cancer liver metastasis. *Eur Surg Res* 2003;35:327-336
- 10 盛剑秋,晨智敏. 大肠癌相关基因对大肠癌的筛选. 世界华人消化杂志 2001;9:783-785
- 11 潘胜武,孙安乐,刘变英,崔大祥,闫小君,栗彤,雷宇锋,王胜. 大肠癌相关基因表达的早期诊断意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1431-1432
- 12 Frederiksen CM, Knudsen S, Laurberg S, Orntoft TF. Classification of Dukes'B and C colorectal cancers using expression arrays. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:263-271
- 13 陈尧,周总光. 基因表达谱芯片在筛选直肠癌转移相关基因中的应用. 中华胃肠外科杂志 2004;7:137-139
- 14 Gupta V, Cherkassky A, Chatis P, Joseph R, Johnson AL, Broadbent J, Erickson T, DiMeo J. Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e13
- 15 Skubitz KM, Skubitz AP. Gene expression in aggressive fibromatosis. *J Lab Clin Med* 2004;143:89-98
- 16 Kluger HM, Kluger Y, Gilmore-Hebert M, DiVito K, Chang JT, Rodov S, Mironenko O, Kacinski BM, Perkins AS, Sapi E. cDNA microarray analysis of invasive and tumorigenic phenotypes in a breast cancer model. *Lab Invest* 2004;84:320-331
- 17 Williams NS, Gaynor RB, Scoggin S, Verma U, Gokaslan T, Simmang C, Fleming J, Tavana D, Frenkel E, Becerra C. Identification and validation of genes involved in the pathogenesis of colorectal cancer using cDNA microarrays and RNA interference. *Clin Cancer Res* 2003;9:931-946
- 18 Ognjanovic S, Tashima LS, Bryant-Greenwood GD. The effects of pre-B-cell colony-enhancing factor on the human fetal membranes by microarray analysis. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189:1187-1195

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化

邢晓静, 官月华, 袁媛

邢晓静, 官月华, 袁媛, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室 辽宁省沈阳市 110001
国家“十五”科技攻关项目资助, No. 2001BA703B06(B)
项目负责人: 袁媛, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路 92 号, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第三研究室. yyuan@mail.com.edc.cn
电话: 024-23256666-6153
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-08-30

摘要

目的: 探讨血清骨桥蛋白(osteopontin, OPN)水平与慢性萎

缩性胃炎之间的关系。

方法: 慢性萎缩性胃炎患者 42 名, 正常人 38 名, 胃癌患者 42 例应用酶联免疫技术(ELISA 法)检测血清 OPN 表达情况。

结果: 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 水平($25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$) 低于正常人($41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$), 低于胃癌患者血清 OPN 水

平($78.9 \pm 44.5 \mu\text{g/L}$), 三者相比差异均有统计学意义($P < 0.01$). 血清OPN水平与慢性萎缩性胃炎患者的性别、年龄无相关性($P > 0.05$).

结论: 慢性萎缩性胃炎患者血清OPN明显下降.

邢晓静, 宫月华, 袁媛. 慢性萎缩性胃炎患者血清骨桥蛋白的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2744-2746
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2744.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎指慢性胃膜炎性病变累及胃膜腺体萎缩. 作为在胃癌演变中一个最重要的癌前疾病与胃癌的发生关系密切, 是胃癌的病变基础. 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白. 可由多种细胞分泌, 普遍认为 OPN 与肿瘤的发生, 发展关系密切, 能够促进肿瘤的浸润转移, 反映肿瘤的恶性程度. 而近来亦有不同意见认为, OPN 与肿瘤的发生相关而非转移相关. 肿瘤的防治是当前医学迫切需要解决的问题, 癌前疾病的早期发现对肿瘤的防治意义重大, 寻求新的有意义的筛查指标是其中的重要研究方向. 目前, 尚无 OPN 与萎缩性胃炎关系的报道.

我们检测血清 OPN 在正常人、慢性萎缩性胃炎和胃癌患者中的表达情况, 探讨血清中 OPN 水平与慢性萎缩性胃炎之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 辽宁省庄河地区正常人 38 名, 男 18 名, 女 20 名, 年龄 34-79(平均 51 岁); 慢性萎缩性胃炎患者 42 例, 男 21 例, 女 21 例, 年龄 24-72(平均 54 岁); 胃癌患者 42 例来自中国医科大学附属第一医院肿瘤科、中国医科大学附属第二医院普外科: 男 23 例, 女 19 例, 年龄 36-78(平均 57 岁), 全部病例均经病理诊断确诊, 均为未经治疗患者. 采集受试对象空腹外周静脉血, 分离血清, -80°C 放置备用.

1.2 方法 应用血清 OPN 抗体 ELISA 检测试剂盒(美国 Assay Disigns 公司)检测血清 OPN 水平. 全部操作均严格按照试剂盒操作说明书进行, 应用 Multiskan Ascent 自动酶标仪(芬兰 Labsystems 公司)空白孔调零, 在 450 nm 波长下读取吸光度值, 根据标准曲线得出 OPN 浓度. 实验中所有样品及标准品均双份检测.

统计学处理 采用 t 检验及(s)方差分析, 应用统计软件 SPSS10.0 处理.

2 结果

慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 浓度平均为 $25.0 \pm 2.8 \mu\text{g/L}$, 正常人为 $41.4 \pm 7.5 \mu\text{g/L}$, 胃癌患者为 $78.9 \pm 44.5 \mu\text{g/L}$. 慢性萎缩性胃炎患者血清 OPN 显著低于正常人及胃癌患者($P < 0.01$). 慢性萎缩性胃炎患者性别、年龄与血清 OPN 表达无相关性($P > 0.05$, 图 1).

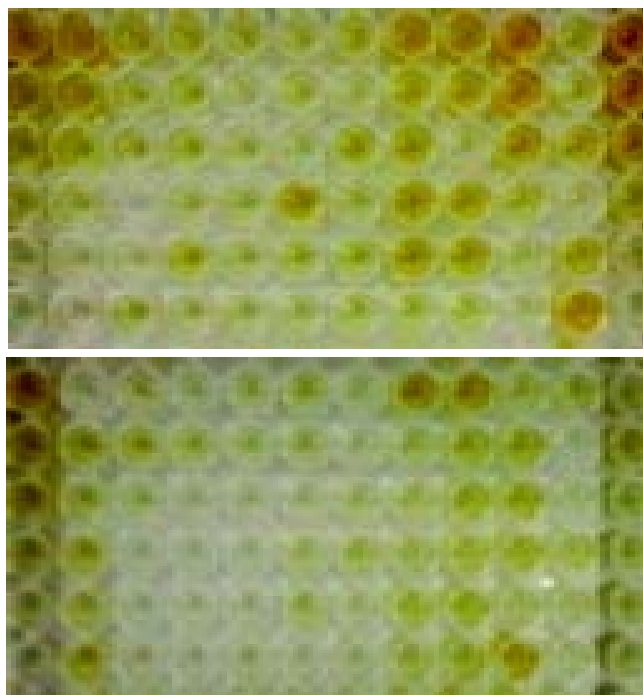


图1 骨桥蛋白 ELISA 检测. 无色或极浅色者为阴性, 棕黄色为阳性.

3 讨论

慢性萎缩性胃炎作为慢性胃炎的一种, 因其与胃癌的发生关系密切, 较其他疾病发生胃癌的频率高, 是胃癌的病变基础, 为胃癌的癌前疾病, 受到较多关注. 流行病学资料表明胃癌高发区慢性萎缩性胃炎的发病率明显高于低发区^[1-4]. OPN 是一种有多种功能的分泌型糖蛋白, 在体内以游离状态和结合状态两种形式存在, 在多种体液中均可检测得到. OPN 含多个酪氨酸蛋白激酶介导的磷酸化部位和糖基化部位, 多种激酶对 OPN 发生磷酸化的部位不同是其发挥不同的功能的原因之一. OPN 作为多功能蛋白质, 对肿瘤生长的诸多方面均有影响, 参与细胞的信号传导; 参与细胞外基质的迁移和体外形成毛细血管样管道, 抑制 p53 活性, 影响机体非特异性应答^[5-13]. Chang *et al*^[14]报道, 体外由 TPA 诱发的癌性生长可被 OPN 抗体所抑制, 其认为体外诱导中 OPN 必不可少. Takahashi *et al*^[15]报道成纤维母细胞瘤的 OPN 转染体在老鼠体内可显著诱导新血管生成. Terashi *et al*^[16]认为 OPN 水平的低表达与肝胆管癌的进展和临床结论相关. OPN 参与癌基因对细胞的转染, 同时抑制抑癌基因活性, 抑制增生细胞凋亡从而发挥其作为增生细胞标志蛋白的作用^[17]等. 我们在慢性萎缩性胃炎患者组中, 血清 OPN 水平明显低于正常人组和胃癌患者组($P < 0.01$), 可能是在慢性萎缩性胃炎中, 其胃黏膜层变薄, 胃黏膜内固有腺管萎缩, 黏膜表面上皮细胞及胃小凹上皮细胞脱落, 从而 OPN 分泌减少, 分泌入血清的 OPN 同样减少, 导致在慢性萎缩性胃炎患者中表达下降, 血清 OPN 值降低.

当前, 肿瘤的防治仍是医学界迫切需要解决的问题. 对人群进行有计划的、定期的普查, 不仅可以及

时发现已患肿瘤的患者,为早治提供有利的条件,而且可以及早查出癌前疾病(病变)的患者并予以适当的处置,这对预防癌症的发生、发展有着重要的意义。因此,寻求新的、有意义的监测指标意义重大。Van Heek *et al*^[18]以 Affymetrix 人类基因组 U133 标记基因分析 235 例基因片段,认为血清 OPN 测定优于基因片段分析,血清 OPN 测定可作为恶性疾病筛查指标之一。本实验发现血清 OPN 水平在胃良、恶疾病以及正常人群之间存在明显的差异,结果提示血清 OPN 水平可能对慢性萎缩性胃炎有预警作用,血清 OPN 水平降低的人群可能是慢性萎缩性胃炎的高发人群。血清 OPN 水平可作为鉴别胃癌及癌前疾病的良好的标志物。今后有必要进一步扩大样本例数及癌前疾病的种类,进行更深入研究。

4 参考文献

- 1 Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO, Uwaifo AO, Otegbayo JA, Ola SO, Coker AO. Comparison of three PCR methods for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of cagA gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol* 2004;10:1958-1960
- 2 Yang GF, Deng CS, Xiong YY, Gong LL, Wang BC, Luo J. Expression of nuclear factor-kappa B and target genes in gastric precancerous lesions and adenocarcinoma: Association with *Helicobacter pylori* cagA (+) infection. *World J Gastroenterol* 2004;10:491-496
- 3 Li S, Lu AP, Zhang L, Li YD. Anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses and the value of clinical presentations in diagnosis of *H pylori* infection in patients with precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2003;9:755-758
- 4 Yin GY, Zhang WN, Shen XJ, Chen Y, He XF. Ultrastructure and molecular biological changes of chronic gastritis, gastric cancer and gastric precancerous lesions: a comparative study. *World J Gastroenterol* 2003;9:851-857
- 5 Gao C, Guo H, Downey L, Marroquin C, Wei J, Kuo PC. Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1871-1878
- 6 Gao C, Guo H, Wei J, Kuo PC. Osteopontin inhibits expression of cytochrome c oxidase in RAW 264.7 murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:120-125
- 7 Zhang GX, Zhao ZQ, Wang HD, Hao B. Enhancement of osteopontin expression in HepG2 cells by epidermal growth factor via phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *World J Gastroenterol* 2004;10:205-208
- 8 Mangum J, Bermudez E, Sar M, Everitt J. Related Articles, Links Osteopontin expression in particle-induced lung disease. *Exp Lung Res* 2004;30:585-598
- 9 Gao C, Mi Z, Guo H, Wei J, Wai PY, Kuo PC. Related Articles, Links A transcriptional repressor of osteopontin expression in the 4T1 murine breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:1010-1016
- 10 Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Wei J, Kuo PC. Related Articles, Links Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *J Biol Chem* 2004;279:46659-46667
- 11 Marroquin CE, Downey L, Guo H, Kuo PC. Related Articles, Links Osteopontin increases CD44 expression and cell adhesion in RAW 264.7 murine leukemia cells. *Immunol Lett* 2004;95:109-112
- 12 Iguchi S, Nishi S, Ikegame M, Hoshi K, Yoshizawa T, Kawashima H, Arakawa M, Ozawa H, Gejyo F. Related Articles, Links Expression of osteopontin in cisplatin-induced tubular injury. *Nephron Exp Nephrol* 2004;97:96-105
- 13 Nagatomo T, Ohga S, Takada H, Nomura A, Hikino S, Imura M, Ohshima K, Hara T. Related Articles, Links Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. *Clin Exp Immunol* 2004;138:47-53
- 14 Chang PL, Cao M, Hicks P. Osteopontin induction is required for tumor promoter-induced transformation of preneoplastic mouse cells. *Carcinogenesis* 2003;24:1749-1758
- 15 Takahashi F, Akutagawa S, Fukumoto H, Tsukiyama S, Ohe Y, Takahashi K, Fukuchi Y, Saijo N, Nishio K. Osteopontin induces angiogenesis of murine neuroblastoma cells in mice. *Int J Cancer* 2002;98:707-712
- 16 Terashi T, Aishima S, Taguchi K, Asayama Y, Sugimachi K, Matsuura S, Shimada M, Maehara S, Maehara Y, Tsuneyoshi M. Decreased expression of osteopontin is related to tumor aggressiveness and clinical outcome of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Liver Int* 2004;24:38-45
- 17 Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of Osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:723-749
- 18 Van Heek NT, Maitra A, Koopmann J, Fedarko N, Jain A, Rahman A, Iacobuzio-Donahue CA, Adsay V, Ashfaq R, Yeo CJ, Cameron JL, Offerhaus JA, Hruban RH, Berg KD, Goggins M. Gene expression profiling identifies markers of ampullary adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2004;3:651-656

乌斯他丁对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用

李旭, 石力, 赵碧, 田伏洲, 黄大熔

李旭, 石力, 田伏洲, 黄大熔, 成都军区总医院全军普外中心
四川省成都市 610083
赵碧, 成都军区总医院临床实验科 四川省成都市 610083
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院全军普外中心.
lishi@mail.sc.cninfo.net
收稿日期: 2004-07-28 接受日期: 2004-09-19

摘要

目的: 观察乌斯他丁(ulinastatin, UTI)对急性胰腺炎大鼠肝脏核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的抑制及其对肝损伤的损伤保护作用。

方法: Wistar 大鼠 72 只, 随机分为: 急性胰腺炎组(AP), 急性胰腺炎UTI治疗组(APU)和假手术组(SO). 分别于术后 3, 6, 12, 24 h 检测肝组织中 NF- κ B 活性、血浆丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平。

结果: SO 组术后未见 NF- κ B 活化, 血浆 ALT 及肝脏病理无显著变化. 与 SO 组相比, AP 组术后 3, 6 h NF- κ B 活性(积分灰度)显著增加(3.13 ± 0.57 vs 0.71 ± 0.10 , 1.92 ± 0.26 vs 0.67 ± 0.11 , $P < 0.01$), 血浆 ALT 在 3-24 h 也显著高于 SO 组(1.1 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.09 , 1.6 ± 0.2 vs 0.7 ± 0.1 , 2.4 ± 0.4 vs 0.7 ± 0.09 , 3.5 ± 0.7 vs 0.8 ± 0.1 , $P < 0.01$). APU 组 NF- κ B 活性在 3, 6 h 后显著低于 AP 组(2.26 ± 0.41 vs 3.13 ± 0.57 , 1.56 ± 0.23 vs 1.92 ± 0.26 , $P < 0.01$), 血浆 ALT 较 AP 组在 6, 12, 24 h 后也有了显著下降(1.2 ± 0.2 vs 1.6 ± 0.2 , 1.8 ± 0.3 vs 2.4 ± 0.4 , 2.5 ± 0.5 vs 3.5 ± 0.7 , $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$).

结论: UTI 能够抑制 NF- κ B 活化, 对急性胰腺炎大鼠肝损伤具有保护作用。

李旭, 石力, 赵碧, 田伏洲, 黄大熔. 乌斯他丁对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2747-2749
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2747.asp>

0 引言

急性胰腺炎肝损伤发生过程中, 有着许多炎症因子的参与^[1-2]. 而核因子 κ B 则是一类主要参与机体炎性分子表达调控的转录因子^[3-5], 他参与了急性胰腺炎肝损伤发生过程^[6]. 我们观察了大鼠急性胰腺炎发生时, 乌斯他丁(UTI)对 NF- κ B 活化的抑制作用以及由此而产生的对肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠 72 只, 雌雄不限, 体质量 200-250 g, 随机分为 3 组: (1)急性胰腺炎组(AP 组, 24 只);

用 3 g/L 戊巴比妥钠 ip 麻醉(10 mL/kg), 上腹部正中切口入腹, 经十二指肠穿刺胆管成功后, 以无创血管夹阻断肝门部胆管, 向胰管内逆行注入 50 g/L 牛磺胆酸钠(1 mL/kg), 注射完毕后松开血管夹, 关腹, 皮下注射生理盐水 2 mL, 以补充术中丢失水分. (2)急性胰腺炎 UTI 治疗组(APU 组, 24 只): 诱导胰腺炎前 1 h ip UTI (10 万 u/kg). (3)假手术组(SO 组, 24 只): 操作方法同 1, 但不向胰管内注入牛磺胆酸钠. 各组分别在术后 3, 6, 12, 24 h 再次开腹, 经下腔静脉采血约 5 mL, 置于肝素钠抗凝瓶中, 离心(2 000 r/min, 1 min), 取上清冻存; 并取大小约 0.5 cm³ 肝中叶组织二块, 一块浸泡于 40 g/L 多聚甲醛中, 另一块置于液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 肝组织 NF- κ B 活性 参照文献介绍的方法对肝组织进行核蛋白提取, 并用考马斯亮蓝测定蛋白浓度, 调蛋白浓度为 0.5 μ g/L 后置于 -70 $^{\circ}$ C 保存. 以 γ -³²P 在 T₄ 激酶的作用下标记 NF- κ B 探针, 探针序列为 5' -AGT GAGGGGACTTTCCAGGC-3'. 将标记的探针同肝组织核蛋白进行结合后, 置于非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳并进行放射自显影, 用凝胶扫描分析仪对显影结果进行分析, 以积分灰度值表示 NF- κ B 的活性变化。

1.2.2 血浆丙氨酸氨基转移酶 用自动生化分析仪(Beckman CX7)进行 ALT 检测。

统计学处理 结果以 mean \pm SD 表示, 组间行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义; $P < 0.01$ 为差异有极显著意义。

2 结果

2.1 肝组织 NF- κ B 活性 除 SO 组外, 其余 2 组在术后 3 h, 肝组织中 NF- κ B 存在显著活化, 6 h 后活化程度下降, 但仍显著高于 SO 组($P < 0.01$), 术后 12 h NF- κ B 活化程度则明显下降, 同 SO 组相比无显著差异($P > 0.05$), 至 24 h 活化消失. 其中 AP 组 NF- κ B 活化程度在 3-6 h 均显著高于 APU 组($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 急性胰腺炎大鼠肝组织 NF- κ B 活性的积分灰度值(mean \pm SD, $n = 24$)

分组	<i>t</i> (术后) / h		
	3	6	12
AP	3.13 ± 0.57	1.92 ± 0.26	0.8 ± 0.12
APU	2.26 ± 0.41^b	1.56 ± 0.23^b	0.75 ± 0.10
SO	0.71 ± 0.10	0.67 ± 0.11	0.69 ± 0.11

^b $P < 0.01$ vs AP, SO 组。

2.2 血浆 ALT SO 组 ALT 术后无明显变化 AP 及 APU 组 ALT 在术后 3–24 h 均呈持续性上升, 显著高于 SO 组 ($P < 0.01$). 但 6 h 后 APU 组 ALT 明显低于 AP 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 2).

表 2 急性胰腺炎大鼠血浆 ALT (mean \pm SD, $n = 24$, kat/L)

分组	t (术后)/h			
	3	6	12	24
AP	1.1 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	2.4 \pm 0.4	3.5 \pm 0.7
APU	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2 ^a	1.8 \pm 0.3 ^d	2.5 \pm 0.5 ^d
SO	0.7 \pm 0.09 ^b	0.7 \pm 0.1 ^b	0.7 \pm 0.09 ^b	0.8 \pm 0.1 ^b

^b $P < 0.01$ vs AP 和 APU 组; ^a $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ s AP 组.

3 讨论

急性胰腺炎常合并全身多脏器功能损害, 而肝脏则是最常受累的器官之一, 急性胰腺炎所引起的肝损害不但可以加重胰腺炎病情, 肝功能的好坏还直接关系到其他脏器并发症的出现与否. 核因子 κ B 是一类能与某些基因启动子及增强子区的 κ B 序列结合的蛋白质, 他能启动或增强这些基因的转录^[7–9]. 在静息的细胞中, NF- κ B 以无活性的形式存在于细胞质之中, 当受到一定的刺激后, NF- κ B 发生活化, 活化的 NF- κ B 于是发生核易位, 同靶基因启动子或增强子上的 κ B 结合位点, 从而启动或增强这些基因的转录^[10–13]. 研究表明, NF- κ B 可以促进与炎症有关的多种基因的转录^[14–19], 从而参与多种原因引起的组织损伤过程^[20–25], 在急性胰腺炎发生过程中, 肝组织中 NF- κ B 发生了显著活化, 活化的 NF- κ B 参与了肝损伤的发生^[6].

乌斯他丁是一种从人的尿液中提取出来的蛋白多肽, 它具有抑制多种酶活性、清除氧自由基、抑制炎症递质释放的作用. Itabashi *et al*^[26]发现, 乌斯他丁能够抑制肝脏 ICAM-1 以及 CNCI 表达, 降低血浆 TNF- α 浓度. Aosasa *et al*^[27]则证明乌斯他丁可以抑制 LPS 刺激下的单核细胞 NF- κ B 的激活, 降低 TNF- α 表达. 本实验结果显示, APU 组在术后 3–6 h NF- κ B 活化程度显著低于 AP 组, 与此同时, 血浆 ALT 在术后 6–24 h 也显著低于 AP 组. 这就说明 UTI 对急性胰腺炎肝损伤具有保护作用, 其产生作用的机制可能与抑制 NF- κ B 活化有关.

4 参考文献

- Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via onflammatory mediators. *J Surg Res* 2000;90:95-101
- Hori Y, Takeyama Y, Ueda T, Shinkai M, Takase K, Kuroda Y. Macrophage-derived transforming growth factor- β 1 induces hepatocellular injury via apoptosis in rats severe acute pancreatitis. *Surgery* 2000;127:641-469
- Li YY, Gao ZF. Acute pancreatitis and NF- κ B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:420-421
- Suk K, Yeou Kim S, Kim H. Regulation of IL-18 production by

- IFN gamma and PGE2 in mouse microglial cells: involvement of NF- κ B pathway in the regulatory processes. *Immunol Lett* 2001;77:79-85
- Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Hamanaka I, Takahashi N, Kawakami R, Li Y, Takemura G, Fujiwara H, Garbers DL, Mochizuki S, Nakao K. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- κ B activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001;108:203-213
- Shi L, Huang DR, Tian FZ, Wang Y, Ma JX, Li XJ, Yin ZL. The relationship between hepatic NF- κ B activation and liver injury in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:554-557
- Antonelli A, Bianchi M, Crinelli R, Gentilini L, Magnani M. Modulation of ICAM-1 expression in ECV304 cells by macrophage-released cytokines. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:978-991
- Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM. TNF-alpha-induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- κ B transactivation: the role of NF- κ B association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:142-152
- Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrance IK, Hall G, Cross AS, Rogers TB. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- κ B activation and tumor necrosis factor-alpha expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H872-879
- Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, Evans AJ, Wedin KE, Michael LH, Entman ML. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia. *Am J Pathol* 2001;159:1301-1311
- Moine P, McIntyre R, Schwartz MD, Kaneko D, Shenkar R, Le Tulzo Y, Moore EE, Abraham E. NF- κ B regulatory mechanisms in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Shock* 2000;13:85-91
- Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:307-314
- Omoya T, Shimizu I, Zhou Y, Okamura Y, Inoue H, Lu G, Itonaga M, Honda H, Nomura M, Ito S. Effects of idoxifene and estradiol on NF- κ B activation in cultured rat hepatocytes undergoing oxidative stress. *Liver* 2001;21:183-191
- Altavilla D, Saitta A, Guarini S, Galeano M, Squadrito G, Cucinotta D, Santamaria LB, Mazzeo AT, Campo GM, Ferlito M, Minutoli L, Bazzani C, Bertolini A, Caputi AP, Squadrito F. Oxidative stress causes nuclear factor-kappaB activation in acute hypovolemic hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1055-1066
- Shames BD, Barton HH, Reznikov LL, Cairns CB, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Ischemia alone is sufficient to induce TNF-alpha mRNA and peptide in the myocardium. *Shock* 2002;17:114-119
- Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002;102:198-206
- Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002;2:3
- Helin E, Vainionpaa R, Hyypia T, Julkunen I, Matikainen S. Measles virus activates NF- κ B and STAT transcription factors and production of IFN-alpha/beta and IL-6 in the human lung epithelial cell line A549. *Virology* 2001;290:1-10
- Zhang XY, Shimura S, Masuda T, Saitoh H, Shirato K. Antisense oligonucleotides to NF- κ B improve survival in bleomycin-induced pneumopathy of the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 1):1561-1568
- Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, Tribble CG, Laubach VE. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L528-536

- 21 Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Norman J. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000;128:225-231
- 22 Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000;106:867-872
- 23 Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, Lin M, Seabra V, Rivera CA, Bradford BU, Forman DT, Thurman RG. Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF-kappaB, and TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G652-661
- 24 Kono H, Rusyn I, Bradford BU, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Allopurinol prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;293:296-303
- 25 Okada K, Marubayashi S, Fukuma K, Yamada K, Dohi K. Effect of the 21-aminosteroid on nuclear factor-kappa B activation of Kupffer cells in endotoxin shock. *Surgery* 2000;127:79-86
- 26 Itabashi K, Ito Y, Takahashi T, Ishii K, Sato K, Kakita A. Protective effects of urinary trypsin inhibitor (UTI) on hepatic microvasculature in hypotensive brain-dead rats. *Eur Surg Res* 2002;34:330-338
- 27 Aosasa S, Ono S, Mochizuki H, Tsujimoto H, Ueno C, Matsumoto A. Mechanism of the inhibitory effect of protease inhibitor on tumor necrosis factor alpha production of monocytes. *Shock* 2001;15:101-105

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP11 反式调节基因

王琳, 成军

王琳, 成军, 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
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技公关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技面上项目, No. 01MB135
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 北京市中国人民解放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

王琳, 成军. 基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP11 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2749-2752
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2749.asp>

摘要

目的: 应用基因芯片技术研究未知功能基因 NS5ATP11 的表达对于肝细胞基因表达谱的影响。

方法: 从 HepG2 细胞 RNA 中用反转录聚合酶链反应法(RT-PCR)扩增出 NS5ATP11 编码区 DNA, 常规分子生物学技术构建 NS5ATP11 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11, 利用脂质体转染技术转染 HepG2 细胞, NS5ATP11 的表达以 Western blot 杂交技术证实. 从转染和非转染细胞 HepG2 中提总 mRNA, 逆转录为 cDNA, 并进行基因芯片技术分析。

结果: 证实构建 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 在 HepG2 细胞中表达正确. NS5ATP11 重组表达载体和空白载体转染的 HepG2 细胞的基因表达改变进行分析. 结果表明, 8 种基因的表达水平上调, 10 种基因的表达水平下调。

结论: NS5ATP11 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 NS5ATP11 对肝细胞和其他生物学功能的调节作用。

0 引言

在嗜肝病毒中丙型肝炎病毒(HCV)被认为是有引起人类肝脏疾病的主要因素, 感染全世界约 2% 的人口^[1-2]. HCV 编码的非结构蛋白 5A 是一种具有隐性反式激活作用的磷蛋白, 参与调节细胞周期、干扰素耐受、脂质和糖类的代谢以及其他细胞内信号转导, 但其对细胞进程影响的生物学机制所知很少^[3-7]. 我们分别应用酵母双杂交^[8]、抑制性消减杂交^[9]、基因芯片^[3]和 SV40 早期启动子/增强子功能分析^[10]等技术从不同角度对 NS5A 的功能进行研究得到的结果说明, NS5A 功能复杂多样. 应用基因芯片技术对 NS5A 转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 我们发现了 NS5A 上调表达的未知功能基因, 命名为 NS5ATP11, 并对之进行了克隆^[11]. 我们对 NS5ATP11 转染肝癌细胞系的基因表达谱进行分析, 获得了部分上调或下调表达及未知功能基因。

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 HBV HBxAg 蛋白真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 为本室构建^[25]. 用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 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 使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取转染了 NS5ATP11 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 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 5 \times SSC+2 g/L SDS 20 μ L 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、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 \times SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 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 $^{\circ}$ C 水浴变性 5 min, 将混合探针加在基因芯片上, 置于 60 $^{\circ}$ C 杂交 15–17 h. 依次以 2 \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times SSC+2 g/L SDS、1 g/L \times 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 ImageGene3.0 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 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱^[12–19].

2 结果

真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP11 由本室构建. 总 RNA 的吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.89, 热稳定实验 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 与 -20 $^{\circ}$ C 1 h 电泳条带比较, 显示 28 S 条带无明显降解, mRNA 主要集中于 0.9–4.0 kb 的连续条带.

2.1 NS5ATP11 上调基因 (表 1).

2.2 NS5ATP11 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, 就判断为该基因的下调基因. 结果有 10 种基因的表达水平下调 (表 2).

表 1 表达显著增加的基因

GenBank 登陆号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_014863	B cell RAG associated protein (GALNAC4S-6ST), mRNA B 细胞重组激活蛋白结合蛋白	3.000
NM_003463	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1 (PTP4A1), mRNA 蛋白酪氨酸磷酸酶	3.042
NM_002736	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta (PRKAR2B), mRNA cAMP 依赖的蛋白激酶	3.175
NM_005627	serum/glucocorticoid regulated kinase (SGK), mRNA 血清 / 糖皮质激素调节激酶	3.358
NM_004827	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (ABCG2), mRNA ATP 结合盒亚家族 G	3.453
NM_007268	Ig superfamily protein (Z39IG), mRNA Ig 超家族蛋白	3.564
D50683	mRNA for TGF- β type I receptor, complete cds 转化生长因子 β 2R α	3.939
NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), mRNA N-myc 下游调节基因 1	6.376

表 2 表达显著下降的基因

GenBank 登陆号	编码蛋白	Cy5/Cy3
NM_012248	selenophosphate synthetase 2 (SEPHS2), mRNA 磷酸硒合成酶 2	0.161
NM_002388	minichromosome maintenance deficient 3 (S. cerevisiae) (MCM3), mRNA 小染色体维持缺陷 3 (酿酒酵母)	0.168
NM_002292	laminin, beta 2 (laminin S) (LAMB2), mRNA 层粘连蛋白 B2	0.171
NM_001034	ribonucleotide reductase M2 polypeptide (RRM2), mRNA 核糖核苷酸还原酶 M2 多肽	0.174
NM_004184	tryptophanyl-tRNA synthetase (WARS), mRNA 色氨酸-tRNA 合成酶	0.189
NM_001033	Homo sapiens tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity, collagenase inhibitor) (TIMP1) 金属蛋白酶的抑制因子	0.223
NM_003254	TRAF and TNF receptor associated protein (TTRAP), mRNA TRAF、TNF 受体结合蛋白	0.236
NM_016614	Homo sapiens mRNA for KIAA0968 protein, partial cds KIAA0968 蛋白	0.245
AB023185	eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1 (EIF4A1), mRNA 真核翻译起始因子 4A	0.255
BC006997	Ras-GTPase-activating protein (GAP) SH3-domain-binding protein (G3BP), mRNA Ras-GTP 酶激活蛋白结合蛋白	0.256

3 讨论

NS5A 是丙型肝炎病毒重要的调节蛋白, 作用于病毒自身及宿主细胞多种功能性蛋白, 调节并改变他们的活性, 为病毒复制与传播提供有利环境和免疫逃避策略. 一些体内外实验证实 NS5A 可以直接作用或反式调节宿主蛋白及基因表达, 本实验室曾对 NS5A 基因表达谱变化进行比较, 发现了上调表达的未知功能基因 NS5ATP11 并将其克隆, 片段全长 1 257 bp, 基因产物由 418 个氨基酸残基(aa)组成. 为了进一步探讨该未知基因的功能, 本实验再次应用基因芯片技术, 对于转染和未转染该基因的 HepG2 细胞进行了分析, 以期发现其部分下游信息和对 HCV NS5A 致病机制的影响.

获得的表达显著增加的 8 类基因包括: B 细胞重组激活蛋白结合蛋白、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP4A1)、cAMP 依赖的蛋白激酶、血清 / 糖皮质激素调节激酶、ATP 结合盒亚家族 G、Ig 超家族蛋白、转化生长因子 $\beta 2R\alpha$ 及 N-myc 下游调节基因 1(NDRG1). 其中 NDRG1 基因的上调十分显著, Cy5/Cy3 > 6. 是 N-myc 下游调节基因家族成员, 这个在多种细胞内高度保守的蛋白被 p53 和 DNA 损伤刺激所诱导, 而在细胞生长的条件下表达被抑制, 说明其参与细胞内应激应答机制. 在 N-myc 敲除的小鼠胚胎及分化早期的组织中, N-myc 活性与 NDRG1 表达呈负相关, 在肿瘤细胞中被分化刺激剂诱导. 研究还发现 NDRG1 是代谢抑制基因, 说明在细胞分化中可能起作用. 另外报道 NDRG1 蛋白在细胞内具有穿梭在细胞质及细胞核之间的运动行为, 其磷酸化形式依赖于细胞外刺激剂, 有可能 NDRG1 在细胞中起到信号的传递作用^[13-18]. NS5ATP11 对该基因的上调作用可能与 NS5A 改变细胞周期的生物学功能有关. PTP4A1 编码的蛋白是一种蛋白酪氨酸磷酸酯酶, 对大鼠的研究显示, 该基因可能是细胞丝裂源刺激的立早基因^[19]. SGK 编码一个丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 调节细胞的分解代谢信号转导, 刺激肝糖分解和蛋白质水解, 并抑制蛋白和葡萄糖的合成, 参与糖尿病并发病的病理生理反应^[20-21]. ABCG2 编码的膜结合蛋白属于 ATP 结合盒(ABC)运输蛋白超家族, 在正常组织中介导细胞内毒性物质的排泄, 防止毒素的堆积, 因此该蛋白也与多种药物耐药相关, 研究发现其在对化疗制剂的抵抗中发挥作用^[22-23]. NS5ATP11 对上述基因的上调作用可推测该蛋白在细胞代谢和膜运输中的功能.

表达显著降低的基因包括: 磷酸硒合成酶 2、小染色体维持缺陷 3、层粘连蛋白 B2、核糖核苷酸还原酶 M2 多肽、色氨酸-tRNA 合成酶、金属蛋白酶的抑制因子、TRAF、TNF 受体结合蛋白、真核翻译起始因子 4A、Ras-GTP 酶激活蛋白结合蛋白以及一个未知功能蛋白. TTRAP 编码二价阳离子依赖的磷酸二酯酶, 结合 CD40、肿瘤坏死因子受体 75 和 TNF 结合因子, 并抑制核因子 kappa-B 活性, 参与 DNA 修复和转录因子的激活^[24]. G3BP 为 Ras-GTP 酶激活蛋白 SH3-域结合蛋

白, 物理上与 GAP 的 SH3 域结合, 对于 Ras 的信号转导是必要的. Ras 激活时, GAP-G3BP 复合体发生组建, 其氨基末端的两个核糖核蛋白基序具有 RNA 结合蛋白的特征而参与 RNA 代谢进程^[25-28]. 被 NS5ATP11 下调的另一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^[29-30]. NS5ATP11 对他的下调可能将对有序的肝再生和抗纤维化产生抑制作用.

总之, NS5ATP11 是机体中正常存在的基因, 对其他基因的调节体现了其潜在的生物学功能, 通常情况下只引起细胞正常的生理活动, 但当其表达受到病毒蛋白 NS5A 上调后, 相关的某些生物信号将被放大或削减, 平衡被打破, 引起一系列病理改变. 我们注意到 NDRG1 可通过 NS5ATP11 介导被 NS5A 显著上调, 对于细胞分化和信号转导具有意义, 但在 HCV 的致病机制中所承担的角色还不清楚, 尚需进一步的证实.

4 参考文献

- 1 成军. 慢性病毒性肝炎发病机制的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:125-128
- 2 Cheng J. Molecular pathogenesis of viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;16:A185
- 3 Reed KE, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family flaviviridae are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J Virol* 1998;72:6199-6206
- 4 Park KJ, Choi SH, Lee SY, Hwang SB, Lai MM. Nonstructural 5A protein of hepatitis C virus modulates tumor necrosis factor alpha-stimulated nuclear factor kappa B activation. *J Biol Chem* 2002;277:13122-13128
- 5 He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, Jacobs BL, Katze MG. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 2002;76:9207-9217
- 6 Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and p53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- 7 Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002;21:4801
- 8 王琳, 李克, 成军. 筛选与克隆丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白结合蛋白基因. 解放军医学杂志 2003;28:54-56
- 9 刘妍, 陆荫英, 成军. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS5A 反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- 10 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
- 11 王琳, 李克, 成军, 张健, 梁耀东, 刘妍. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活基因 11 的克隆化研究. 胃肠病和肝病杂志 2003;12:257-259
- 12 Kurdistan SK, Arizti P, Reimer CL, Sugrue MM, Aaronson SA, Lee SW. Inhibition of tumor cell growth by RTP/rit42 and its responsiveness to p53 and DNA damage. *Cancer Res* 1998;58:4439-4444
- 13 Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev* 1999;83:39-52

- 14 Wakisaka Y, Furuta A, Masuda K, Morikawa W, Kuwano M, Iwaki T. Cellular distribution of NDRG1 protein in the rat kidney and brain during normal postnatal development. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1515-1525
- 15 van Belzen N, Dinjens WN, Diesveld MP, Groen NA, van der Made AC, Nozawa Y, Vlietstra R, Trapman J, Bosman FT. A novel gene which is up-regulated during colon epithelial cell differentiation and down-regulated in colorectal neoplasms. *Lab Invest* 1997;77:85-92
- 16 Xu B, Lin L, Rote NS. Identification of a stress-induced protein during human trophoblast differentiation by differential display analysis. *Biol Reprod* 1999;61:681-686
- 17 Piquemal D, Joulia D, Balaguer P, Basset A, Marti J, Commes T. Differential expression of the RTP/Drg1/Ndr1 gene product in proliferating and growth arrested cells. *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:364-373
- 18 Agarwala KL, Kokame K, Kato H, Miyata T. Phosphorylation of RTP, an ER stress-responsive cytoplasmic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272:641-647
- 19 Carter DA. Expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1442:405-408
- 20 Maiyar AC, Leong ML, Firestone GL. Importin- α mediates the regulated nuclear targeting of serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by recognition of a nuclear localization signal in the kinase central domain. *Mol Biol Cell* 2003;14:1221-1239
- 21 Firestone GL, Giampaolo JR, O'Keefe BA. Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:1-12
- 22 Abbott BL. ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol* 2003;21:115-130
- 23 Zhao R, Goldman ID. Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003;22:7431-7457
- 24 Pye S, Declercq W, Ibrahim A, Michiels C, Van Rietschoten JG, Dewulf N, de Boer M, Vandenabeele P, Huylebroeck D, Remacle JE. TTRAP, a novel protein that associates with CD40, tumor necrosis factor (TNF) receptor-75 and TNF receptor-associated factors (TRAFs), and that inhibits nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem* 2000;275:18586-18593
- 25 French J, Stirling R, Walsh M, Kennedy HD. The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J* 2002;34:223-231
- 26 Barnes CJ, Li F, Mandal M, Yang Z, Sahin AA, Kumar R. Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors. *Cancer Res* 2002;62:1251-1255
- 27 Liu Y, Zheng J, Fang W, You J, Wang J, Cui X, Wu B. Identification of metastasis associated gene G3BP by differential display in human cancer cell sublines with different metastatic potentials G3BP as highly expressed in non-metastatic. *Chin Med J (Engl)* 2001;114:35-38
- 28 Kennedy D, French J, Guitard E, Ru K, Tocque B, Mattick J. Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem* 2001;84:173-187
- 29 Peng ZM, Yang ZL, Liu YW. Expression of MMP1 and TIMP1 proteins in lung cancer and its biological significance. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2002;27:159-161
- 30 Wang A, Yang X, Wang W, Zuo F, Wang Q, He F. Effect of recombinant human augmentor of liver regeneration on gene expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rat with experimental liver fibrosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:610-612

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 HCTP4 反式调节基因

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖

刘敏, 成军, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖, 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 北京市 100039

张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 北京市中国人民解放军302医院传染病研究所基因治疗研究中心, c.j@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-07-30 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究丙型肝炎病毒核心(HCV core)蛋白的反式调节基因HCTP4作用的靶基因。

方法: 构建HCTP4基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-

HCTP4, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-HCTP4转染的HepG2(人肝母细胞瘤细胞系)细胞和转染空载体的相同细胞差异表达的mRNA进行检测和分析。

结果: HepG2细胞经转染HCTP4后, 有104条差异基因表达, 其中54条基因表达增强, 50条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关。

结论: HCTP4是一种病毒反式激活蛋白, 对于肝细胞基因表达谱有显著影响, 与细胞的增生、分化及细胞的信号转导密切相关, 在HCV的致病过程中有重要作用。

刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 王燕颖. 基因表达谱芯片技术筛选 HCTP4 反式调节基因. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2752-2756
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2752.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)可引起慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌(HCC),目前有1.7亿人感染,中国普通人群抗-HCV的阳性率约为3.2%,干扰素联合利巴韦林是其治疗方案,但是疗效不佳,其核心问题之一是有关发病机制不清. HCV core蛋白长191 aa,是一种多功能蛋白质,除了作为核壳蛋白具有病毒颗粒组装功能外,还具有调节细胞凋亡、脂代谢、转录、免疫呈递等作用,特别是在细胞凋亡中的作用可能与丙肝慢性化及肝细胞癌(HCC)的发生密切. HCV core蛋白具有广泛的反式激活作用,这种反式激活的作用机制,一方面是HCV core蛋白本身可以与感染的靶细胞的基因组中相关启动子序列结合,影响基因表达. 另外一种机制就是HCV core蛋白与感染靶细胞核中转录因子蛋白进行结合,从而对于靶细胞基因的表达产生间接的影响.

肝炎病毒蛋白与宿主蛋白相互作用,可能是病毒感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因.为了从不同的角度对HCV core的反式调节基因进行验证及研究,我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对HCV core反式调节的靶基因HCTP4成功地进行了筛选和克隆^[1].为更加广泛深入地研究HCV core的反式调节基因HCTP4,我们应用基因表达谱芯片技术对HCTP4反式调节的靶基因进行筛选鉴定研究,试图对HCTP4的生物学功能有所了解,探索丙肝慢性化及肝细胞癌发生的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞及感受态大肠杆菌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).

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 HCTP4蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-HCTP4为本室构建并保存.用Lipofectamine PLUS 转染试剂将2 μg pcDNA3.1(-)-HCTP4及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞,48 h后收获细胞.

1.2.2 细胞mRNA提取 使用mRNA Purification试剂盒,直接提取转染了HCTP4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.

1.2.3 探针标记 常规方法逆转录标记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20 μL 5 × SSC+2 g/L SDS杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的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0.2 g/L SDS、水及0.2 g/L的硼氢化钠溶液处理10 min,晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入95 °C水浴锅内变性2 min,将待预杂交的芯片放入95 °C水浴锅内变性30 s,芯片取出后即放入无水乙醇中30 s,晾干.将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内42 °C预杂交5–6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于95 °C水浴中变性2 min;芯片置于95 °C水浴中变性30 s,芯片取出浸无水乙醇30 s,探针取出后迅速置于冰上.将探针置于芯片上,用盖玻片覆盖,置于杂交舱中,用Parafilm密封,放入42 °C杂交箱内杂交过夜(16–18 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.

1.2.7 扫描与分析 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ImaGene 3.0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<0.5,为绿色荧光,显示表达减弱.

2 结果

2.1 HCTP4蛋白的表达载体构建 HCTP4蛋白真核表达质粒pcDNA3.1(-)-HCTP4由本室构建.

2.2 总RNA及mRNA的定性、定量分析 总RNA的吸光度A₂₆₀/A₂₈₀>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.

2.3 HCTP4蛋白上调基因类型 在基因芯片的扫描分析中,如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在2.000以上,就判断为HCTP4蛋白的上调基因.我们在研究中发现有54种基因的表达水平上调(表1).

表1 HCTP4蛋白部分上调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	2.000	苹果酸盐脱氢酶 1(MDH1)
2	2.011	磷酸二酯酶 2A(PDE2A)
3	2.014	转录变体 1(FAP48)
4	2.017	雌激素调节蛋白 LIV-1
5	2.017	DKFZp564L2416克隆

6	2.030	亲脂素亚家族 3 成员 A 2
7	2.033	4 跨膜位点亚家族 A1(MS4A1)
8	2.048	脑丙氨酸脱羧酶(GAD1)
9	2.055	核糖体蛋白 L34(RPL34)
10	2.058	锌指蛋白 217(ZNF217)
11	2.068	酯酶 D
12	2.079	博莱霉素水解酶(BLMH)
13	2.088	溶血磷脂酶(LYPLA1)
14	2.089	KIAA0035 基因
15	2.091	RPB5 介导蛋白(RMP)
16	2.096	cAMP 反应元素结合蛋白 CRE-BPa
17	2.118	Ran 结合蛋白 2
18	2.123	墨角藻糖基转移酶 8(FUT8)
19	2.126	转录抑制蛋白(UK114)
20	2.138	热休克蛋白 8(HSP8)
21	2.152	KIAA0205 基因产物(KIAA0205)
22	2.156	异质核糖核蛋白 K
23	2.174	γ -氨基丁酸 A 受体 γ 2(GABRG2)
24	2.174	三十碳六烯环氧化物酶(SQLE)
25	2.183	泛素连接酶 E2D3(UBE2D3)
26	2.211	T 细胞白血病毒易位变异基因(TCTA)
27	2.256	热休克蛋白(HSP105B)
28	2.281	凋亡蛋白 1 抑制因子(MIHC)
29	2.281	CGI107
30	2.285	酪蛋白激酶 1(CSNK1)
31	2.303	热休克蛋白(HSJ2)
32	2.325	细胞内氯化物通道 4(CLIC4)
33	2.344	KIAA0824 蛋白
34	2.370	细胞骨架相关的维生素 A 反应(JVVA)
35	2.378	KIAA 基因产物(KIAA0009)
36	2.395	T 细胞受体重排 β 链基因 V 区
37	2.396	核受体亚家族 3, C 组, 成员 1(NR3C1)
38	2.403	BCRA2 区的假想蛋白
39	2.411	假想蛋白 FLJ20432
40	2.414	cAMP 依赖性蛋白激酶 II(PRKA2B)
41	2.445	Ig 超家族蛋白(Z39IG)
42	2.460	B 细胞淋巴瘤 10(BCL10)
43	2.498	焦磷酸酶(无机的)(PP)
44	2.525	cAMP 分解依赖的蛋白激酶 β (PRKACB)
45	2.559	confilin 同功型 1
46	2.621	选择素 2(CUL2)
47	2.635	肠促胰酶肽型 A 受体基因
48	2.658	热休克蛋白 40
49	2.676	C5 固醇脱氢酶
50	2.690	假想蛋白 9535
51	2.694	转化生长因子- β
52	2.697	染色体分离因子 1 类(CSE1L)
53	2.730	假想蛋白 FLJ11806
54	2.802	肌小管素相关蛋白 6

2.4 HCTP4 蛋白下调基因 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 HCTP4 蛋白的下调基因. 我们在研究中发现有 50 种基因的表达水平下调(表 2).

表 2 HCTP4 蛋白部分下调基因类型

编号	Cy3/Cy5 比值	基因名称
1	0.040	白细胞转录延长因子 2(EF2)
2	0.188	支架黏附因子 B(SAFB)
3	0.214	肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)
4	0.234	KIAA0100 基因产物(KIAA0100)
5	0.259	MAP 激酶激活死亡域(MADD)
6	0.266	prosaposin(PSAP)
7	0.304	小染色体持续缺陷因子 3(MCM3)
8	0.313	DEAD/H 盒多肽 21(DDX21)
9	0.317	DNA, ATP 依赖性连接酶 III (LIG3)
10	0.338	碱化素(BSG)
11	0.343	多聚酶 II 多肽 E(POLR2E)
12	0.347	金属蛋白酶 1(MP1)
13	0.348	小 EDRK 富集因子 2(SERF2)
14	0.368	ras 同源基因家族成员 C(ARHC)
15	0.369	胰岛素受体(INSR)
16	0.373	硫氧化还原素还原酶(TXNRD1)
17	0.375	组织蛋白酶 E(CTSE)
18	0.390	丝分裂素激活蛋白激酶激酶 2(MAP3K2)
19	0.396	尤因瘤破坏点区 1(EWSR1)
20	0.397	RAD23A
21	0.404	N-myc 下游调节基因 2(NDRG2)
22	0.406	肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(TNFRSF5)
23	0.414	蛋白磷酸酶 2 调节亚型 A
24	0.415	N-酰基-肽水解酶(APEH)
25	0.415	v-raf 鼠胸腺瘤 3 611 病毒癌基因类同子 1(ARAF1)
26	0.416	组织特有的移植抗原 P35B(TSTA3)
27	0.416	G 蛋白途径抑制子 1(GPS1)
28	0.420	1, 25-二羟基维生素 D-3(VDUP1)
29	0.420	肌肉丙酮酸激酶(PKM2)
30	0.426	类组织相容性 13
31	0.431	蛋白磷酸酶 1(PPP1)
32	0.444	CD47 抗原
33	0.450	v-akt 鼠胸腺瘤病毒基因类同子 1(AKT1)
34	0.453	妊娠特有 β 1 糖蛋白 6(PSG6)
35	0.454	干扰素调节因子 2(IRF2)
36	0.458	肌动蛋白
37	0.466	通过死亡域协助 TNFRSF1A(TrADD)
38	0.469	粒素(GRN)
39	0.471	TAL1 中断点(SIL)
40	0.471	果蝇属激酶(PLK)
41	0.475	转移生长因子 β 1(TGFB1)

42	0.478	精氨酸琥珀酸盐合成酶(ASS)
43	0.479	KIAA0943 蛋白
44	0.481	多核巨细胞克隆 15351
45	0.481	CGI-78 蛋白
46	0.490	丝氨酸蛋白激酶抑制子
47	0.493	谷胱甘肽过氧化物酶 3(GPX3)
48	0.495	转羟乙醛酶(TKT)
49	0.498	NY-REN-62 抗原
50	0.498	烯醇化酶 3

3 讨论

与宿主多种形式蛋白相互作用,可能是 HCV 感染导致肝细胞损伤和肝细胞癌发生、发展的重要原因. HCV core 蛋白转基因小鼠发生 HCC 病理学特征直接证明了 HCV core 蛋白的这种作用^[2-4]. 因此,研究 HCV core 蛋白结合蛋白对于 HCV 感染慢性化的机制,以及探讨 HCV 感染治疗新方法的研究,具有十分重要的意义. 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)和分子克隆方法对 HCV core 反式调节的靶基因 HCTP4 成功地进行筛选和克隆. HCTP4 作为获得新的编码基因序列,关于其生物学功能,甚至其医学意义的研究,有待进一步研究.

我们应用酵母双杂交系统-3 筛选出与 HCTP4 相互作用的蛋白基因 11 种,其中免疫球蛋白 λ 轻链、智能弹(mind bomb, MIB)、小核糖核蛋白 G、UMP-CMP 激酶与免疫调节、信号转导及能量供给等作用相关,说明 HCV core 的反式调节基因 HCTP4 具有相关作用,证明 HCTP4 与 core 蛋白在 HCV 感染致病机制作用密切相关^[5]. 应用 SSH 技术筛选到新基因 HCTP4 与诱导膜损伤的癌前受体、肿瘤排斥抗原(TRA)、肝细胞癌抗原、Fn、干扰素调节因子 2 结合蛋白、干扰素 γ 有相互作用,而这些基因与免疫及肿瘤发生有关,推测 HCTP4 在 Core 蛋白与这些基因之间起桥梁作用.

基因芯片技术是研究基因表达谱改变的有效分析技术^[6-8]. 实验中我们用基因芯片技术分析 HCTP4,结果表明,54 种基因的表达水平上调,50 种基因的表达水平下调. 在上调基因中,细胞内氯化物通道 4 介导纤维母细胞与肌成纤维细胞间的转化,与肝纤维化发生有关^[9]. 锌指蛋白 217 增高与肿瘤发生有关^[10]. 凋亡蛋白 1 抑制因子与细胞凋亡关系密切^[11]. 细胞骨架相关的维生素 A 反应调节细胞分化^[12]. cAMP 是一种重要的信号分子,对各种细胞功能有重要作用, cAMP 通过使不同靶蛋白磷酸化而转导信号,但 cAMP 发挥作用须通过激活 cAMP 依赖的蛋白激酶,所以 cAMP 依赖的蛋白激酶与信号转导及细胞功能关系密切^[13-14].

在下调基因中,转移生长因子 $\beta 1$ (TGFB1)与控制增生、分化有关,调节细胞生长的抑制作用,其信号传导途径发生障碍可引起肿瘤发生^[15]. 肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1(ABLIM)在调节进化方面有重要作用,是肿

瘤抑制基因之一^[16]. HCTP4 使 TGFB1 和 ABLIM 表达降低,与 HCV 感染肿瘤发生密切相关. 鞘脂脂激活因子蛋白由单基因 prosaposin 编码,在蛋白分解过程中编码四种不同的鞘脂激活因子蛋白, prosaposin(PSAP)或鞘脂激活因子蛋白缺乏时导致各种鞘脂脂储存疾病^[17-18]. 胰岛素是一种多效性激素,通过与胰岛素受体结合参与多种代谢和有丝分裂^[19]. HCTP4 使 PSAP 和胰岛素受体表达减低,与 HCV 引起糖、脂肪代谢异常有关^[20-21]. DNA, ATP 依赖性连接酶 III 与 DNA 修复、重组有关,在 DNA 损伤因子引起的细胞凋亡过程中由钙激活蛋白酶降解^[22]. 硫氧化还原素还原酶(TXNRD1)是一种氧化还原蛋白,参与细胞增生、转化、凋亡. CD47 抗原广泛分布在各种组织,在膜运输和信号转导中有重要作用^[23-24]. DEAD/H 盒多肽 21(DDX21)与细胞生长、分裂有关,在核糖体 RNA 的编辑、运输、转录过程中有重要作用^[25]. MAP 激酶激活死亡域(MADD)与细胞凋亡有关^[26]. N-myc 下游调节基因 2 属于 α/β 水解酶超家族,是一种胞质蛋白,与肿瘤发生有关^[27]. 肿瘤坏死因子受体超家族成员 5(TNFRSF5)介导多种免疫和炎症反应,包括 T 细胞依赖性免疫球蛋白的转换、记忆性 B 细胞发育和生发中心的形成^[28-29].

总之,我们的研究结果表明,与 HCTP4 相互作用的基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号转导、免疫调节、肿瘤发生等. 进一步证明了 HCTP4 确在 HCV 的发病过程中有重要作用. 其中 HCV 与多种基因如转移生长因子 $\beta 1$ 、肌动蛋白结合 LIM 蛋白 1 等有相互作用为首次发现,这为 HCV 的致病机制提供了新线索,有待进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 刘敏, 成军, 王琳, 张树林. 丙型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因 HCTP4 的克隆化研究. 胃肠病学和肝病杂志 2003;12:233-236
- 2 Liu M, Liu Y, Cheng J, Zhang SL, Wang L, Shao Q, Zhang J, Yang Q. Transactivating effect of hepatitis C virus core protein: A suppression subtractive hybridization study. *World J Gastroenterol* 2004;10:1746-1749
- 3 Van Pelt JF, Severi T, Crabbe T, Eetveldt AV, Verslype C, Roskams T, Fevery J. Expression of hepatitis C virus core protein impairs DNA repair in human hepatoma cells. *Cancer Lett* 2004;209:197-205
- 4 Watashi K, Shimotohno K. The roles of hepatitis C virus proteins in modulation of cellular functions: A novel action mechanism of the HCV core protein on gene regulation by nuclear hormone receptors. *Cancer Sci* 2003;94:937-943
- 5 刘敏, 成军, 张树林, 王琳, 邵清, 张健, 梁耀东. 应用白细胞 cDNA 文库的酵母双杂交技术筛选 HCTP4 结合蛋白基因. 世界华人消化杂志 2004;12:832-835
- 6 Dubois JW, Hill S, England LS, Edge T, Masson L, Trevors JT, Brousseau R. The development of a DNA microarray-based assay for the characterization of commercially formulated microbial products. *J Microbiol Methods* 2004;58:251-262
- 7 Sartippour MR, Heber D, Henning S, Elashoff D, Elashoff R, Rubio R, Zhang L, Norris A, Brooks MN. cDNA microarray analysis of endothelial cells in response to green tea reveals a suppressive phenotype. *Int J Oncol* 2004;25:193-202
- 8 Weeraratna AT, Nagel JE, de Mello-Coelho V, Taub DD. Gene expression profiling: from microarrays to medicine. *J Clin Immunol* 2004;24:213-224

- 9 Ronnov-Jessen L, Villadsen R, Edwards JC, Petersen OW. Differential expression of a chloride intracellular channel gene, CLIC4, in transforming growth factor-beta1-mediated conversion of fibroblasts to myofibroblasts. *Am J Pathol* 2002; 161:471-480
- 10 Nonet GH, Stampfer MR, Chin K, Gray JW, Collins CC, Yaswen P. The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001;61:1250-1254
- 11 Horrevoets AJ, Fontijn RD, van Zonneveld AJ, de Vries CJ, ten Cate JW, Pannekoek H. Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. *Blood* 1999;93:3418-3431
- 12 Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotohno K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 2003;22:3307-3318
- 13 Cartier C, Hemonnot B, Gay B, Bardy M, Sanchiz C, Devaux C, Briant L. Active cAMP-dependent protein kinase incorporated within highly purified HIV-1 particles is required for viral infectivity and interacts with viral capsid protein. *J Biol Chem* 2003;278:35211-35219
- 14 Zidovetzki R, Wang JL, Chen P, Jeyaseelan R, Hofman F. Human immunodeficiency virus Tat protein induces interleukin 6 mRNA expression in human brain endothelial cells via protein kinase C- and cAMP-dependent protein kinase pathways. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:825-833
- 15 Fukuchi M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Sohda M, Manda R, Tsukada K, Kato H, Kuwano H. Increased expression of c-Ski as a co-repressor in transforming growth factor-beta signaling correlates with progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004;108: 818-824
- 16 Kim AC, Peters LL, Knoll JH, Van Huffel C, Ciciotte SL, Kleyn PW, Chishti AH. Limatin (LIMAB1), an actin-binding LIM protein, maps to mouse chromosome 19 and human chromosome 10q25, a region frequently deleted in human cancers. *Genomics* 1997;46:291-293
- 17 Ahn VE, Faull KF, Whitelegge JP, Fluharty AL, Prive GG. Crystal structure of saposin B reveals a dimeric shell for lipid binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:38-43
- 18 Sun Y, Qi X, Grabowski GA. Saposin C is required for normal resistance of acid beta-glucosidase to proteolytic degradation. *J Biol Chem* 2003;278:31918-31923
- 19 He HJ, Kole S, Kwon YK, Crow MT, Bernier M. Interaction of filamin A with the insulin receptor alters insulin-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003;278:27096-27104
- 20 Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Tsukamoto K, Kimura S, Moriya K, Koike K. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology* 2004;126:840-848
- 21 Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126:529-540
- 22 Bordone L, Campbell C. DNA ligase III is degraded by calpain during cell death induced by DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 2002;277:26673-26680
- 23 Lechner S, Muller-Ladner U, Neumann E, Spottl T, Schlottmann K, Ruschoff J, Scholmerich J, Kullmann F. Thioredoxin reductase 1 expression in colon cancer: discrepancy between in vitro and in vivo findings. *Lab Invest* 2003;83:1321-1331
- 24 Anestis K, Arner ES. Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *J Biol Chem* 2003;278:15966-15972
- 25 Henning D, So RB, Jin R, Lau LF, Valdez BC. Silencing of RNA helicase II/Galpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J Biol Chem* 2003;278:52307-52314
- 26 Lim KM, Chow VT. Induction of marked apoptosis in mammalian cancer cell lines by antisense DNA treatment to abolish expression of DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells). *Mol Carcinog* 2002;35:110-126
- 27 Deng Y, Yao L, Chau L, Ng SS, Peng Y, Liu X, Au WS, Wang J, Li F, Ji S, Han H, Nie X, Li Q, Kung HF, Leung SY, Lin MC. N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int J Cancer* 2003;106:342-347
- 28 Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 2003;278:32801-32809
- 29 Eeva J, Postila V, Matto M, Nuutinen U, Ropponen A, Eray M, Pelkonen J. Kinetics and signaling requirements of CD40-mediated protection from B cell receptor-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 2003;33:2783-2791

应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清

张黎颖, 邓红, 党晓燕, 纪泛扑, 西安交通大学第二医院感染科
陕西省西安市 710004

成军, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 邵清, 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 北京市 100039

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关项目, No. 01MB135

项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 北京市中国人民解
放军 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-66933392 传真: 010-63801283

收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片研究 HCV 非结构蛋白 NS5A 反式激活基因 NS5ATP13 的反式调节基因。

方法: 构建 NS5ATP13 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13, 应用基因表达谱芯片技术对 pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 转染的人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞和转染空载体的相同细胞的差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 NS5ATP13 后, 有 86 条差异基因表达, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞的增生、分化及细胞的信号转导、代谢、凋亡密切相关。

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了 NS5ATP13 的反式调节基因, 为进一步阐明 NS5ATP13 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张黎颖, 邓红, 成军, 党晓燕, 刘妍, 蔺淑梅, 黄燕萍, 纪冬, 吴顺华, 纪泛扑, 邵清.
应用表达谱芯片技术研究 NS5ATP13 的反式调节基因. 世界华人消化杂志
2004;12(11):2757-2761

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2757.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)属于黄病毒属, 是含外膜蛋白的单股正链RNA病毒。在大多数感染人群中丙型肝炎病毒表现为持续性感染, 并可导致慢性肝炎、肝硬化, 或肝细胞癌, 而且与肝脏脂肪变、糖代谢紊乱有关^[1-10]。其基因组含有单一的开放读码框架, 编码 3 010-3 033 个氨基酸残基(aa)的多肽前体, 两侧是 5' - 非翻译区及 3' - 非翻译区。因为 HCV 的基因复制形式没有经过 DNA 阶段, 不存在 HCV 基因组与肝细胞基因组 DNA 的整合, 所以, HCV 主要是通过基因组编码蛋白和肝细胞蛋白之间的相互作用及肝细胞蛋白与 HCV 调节基因的相互作用造成对肝细胞的损伤。其多肽前体至少被加工为十种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白

NS5A 基因(位于 6 258-7 601 nt 之间)编码的 56 ku 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[11-14]。研究报道, NS5A 上存在干扰素 α 敏感决定区(ISDR), 与干扰素治疗的敏感性相关^[15-16]; 此外, NS5A 还是一种作用很强的基因转录激活因子^[17-21], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关, 我室已证明他可以反式激活 SV40 早期启动子/增强子^[21], 并应用抑制性消减杂交技术(SSH)对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究^[22]。NS5ATP13 是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的, 经过 PCR 扩增, TA 克隆, 测序鉴定证实, 已在 GenBank 上注册成功, 注册号为 AY820769。NS5ATP13 基因的编码序列全长为 2 103 个核苷酸(nt), 编码产物由 700 aa 组成。本研究为了进一步阐明 HCV 的致病机制, 应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)^[23-24]。对于 HCV 的 NS5A TP13 反式调节的靶基因成功地进行筛选, 为今后更加广泛深入地研究 HCV NS5A 在 HCV 的致病机制中的作用及新基因 NS5ATP13 的生物学功能提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Gibco 公司, FuGENE 购自 Roche 公司, NS5ATP13 真核表达质粒由本室构建。表达谱芯片由上海联合基因有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和取材 在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 以脂质体转染试剂 FuGENE 分别将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS5ATP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂, 立即于液氮中保存。

1.2.2 总RNA提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 NS5ATP13 表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5A TP13 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA(分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20 $^{\circ}$ C 和 70 $^{\circ}$ C 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带变化。

1.2.3 探针标记 参照 Chena *et al*^[25] 方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA(5 μ g),

Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA(5 μ g). 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L 5 × SSC+2 g/L SDS 杂交液中.

1.2.4 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA, 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、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 7 500 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), 紫外线交联, 再分别用 2 g/L SDS、双蒸水及 2 g/L 硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用.

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入 95 °C 水浴锅内变性 2 min, 将待预杂交的芯片放入 95 °C 水浴锅内变性 30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s, 晾干. 将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42 °C 预杂交 5–6 h.

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于 95 °C 水浴中变性 2 min; 芯片置于 95 °C 水浴中变性 30 s, 芯片取出浸于无水乙醇 30 s, 探针取出后迅速置于冰上. 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交舱中, 用 Parafilm 密封, 放入 42 °C 杂交箱内杂交过夜 (16–18 h). 依次以 2 × SSC+2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC +2 g/L SDS、1 : 1 000 SSC 洗涤 10 min, 室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3 000 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 > 2.5, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.4, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总 RNA 的定性、定量分析 总 RNA 的吸光度 A_{260}/A_{280} > 2.01, 热稳定实验 70 °C 保温 1 h 与 -20 °C 1 h 的电泳条带比较, 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.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有 1 152 个 cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照 (8 条水稻基因, 共 8 个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记 Cy5 荧光素 (呈红色), 对照组探针标记 Cy3 荧光素 (呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 按阳性标准, 从 1 000 个基因中筛选出差异表达基因共 86 条, 占 8.6%, 其中 46 条基因表达增强, 40 条基因表达降低.

2.3 差异表达基因分析 部分表达增强的基因 (表 1). 部分表达降低的基因 (表 2).

表 1 部分表达显著增加的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	2.512	酪蛋白激酶 1a1 (CSNK1A1)
2	2.516	RNA 结合基序蛋白 6 (RBM6)
3	2.526	磷脂酶 B1 (LYPLA1)
4	2.568	细胞骨架相关蛋白
5	2.579	神经紧张肽 (NTS)
6	2.579	翻译抑制蛋白 p14.5 (UK114)
7	2.602	转化生长因子 β II 受体 α
8	2.612	氯离子通道 /p53 调节器官氯离子通道蛋白 4 (CLIC4)
9	2.618	RB 结合蛋白
10	2.618	低密度脂蛋白相关蛋白 2 (LRP2)
11	2.620	黑素瘤缺乏因子 2 (AIM2)
12	2.636	乳酸脱氢酶 B
13	2.656	泛素特异性蛋白酶 11 (USP1)
14	2.657	肿瘤高表达因子 (HEC) 富含亮氨酸重复序列
15	2.689	调节因子 X2, 影响人类组织相容性抗原 II 表达
16	2.708	cAMP 依赖性蛋白激酶催化亚单位 β (PRKACB)
17	2.770	选择素 2 (CUL2)
18	2.789	鲨烯环氧化酶 (SQLE), mRNA
19	2.793	Ran 结合蛋白 2 (RanBP2alpha)
20	2.821	凋亡蛋白 1 抑制因子 (MIHC)
21	2.870	DnaJ 类热休克蛋白 40 (HLJ1)
22	2.904	低电压依赖性钙离子通道 α 1 亚单位
23	2.918	alkB 分子类似物
24	2.954	转录因子 7 (TCF7)
25	2.965	甾醇 C5 脱氢酶 (SC5DL), mRNA
26	2.979	亚铁螯合酶
27	3.021	嗜乳脂蛋白亚家族 2 成员 A2 (BTN2A2)
28	3.087	钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3
29	3.110	脆性 X 精神迟滞蛋白 1 (FMR1)
30	3.119	FYN 结合蛋白 (FYB-120/130)
31	3.323	包含 WD 重复序列的 SOCS 盒
32	3.457	细胞分裂周期蛋白 23 (CDC23)
33	3.755	造血细胞特异性 Lyn 底物 1 (HCLS1)
34	4.025	γ 氨基丁酸 α 受体 γ 2
35	4.053	FK506 结合相关蛋白 (FAP48) 转录子
36	5.609	cAMP- 依赖性蛋白激酶调节亚单位 II β (PRKAR2B)

表2 部分表达显著降低的基因

编号	Cy5/ Cy3	编码蛋白
1	0.243	核糖体蛋白 L32 (RPL32)
2	0.253	突触素样蛋白(SYPL), mRNA
3	0.274	基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP1)
5	0.280	层粘连蛋白 β 2 (LAMB2)
6	0.282	谷胱甘肽过氧化物酶 1 (GPX1)
7	0.282	BRCA2 和 CDKN1A 相互作用蛋白(BCCIP)转录本 C
8	0.316	转化生长因子 β 1 (TGFB1)
9	0.322	热休克蛋白 70(HSPA9B)
10	0.338	小 RNA 活化复合物, 多肽 1
11	0.352	微管相关蛋白, RP/EB 家族成员 2(MAPRE2)
12	0.354	CD79A 结合蛋白 1 (IGBP1),
13	0.355	乙酰辅酶 A 氧化酶 1 样蛋白
14	0.357	蛋白磷酸激酶 1 催化亚单位 α 型
15	0.359	核仁蛋白
16	0.364	蜡样质脂褐素
17	0.364	钙调素结合蛋白 1 (CALD1)
18	0.369	金属硫蛋白 3(MT3)
19	0.369	假想 IL-16 蛋白前体
20	0.370	肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合物亚单位 3 (ARPC3)
21	0.374	层粘连蛋白 B 受体
22	0.374	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)
23	0.377	环指蛋白和肿瘤坏死因子受体相关蛋白
24	0.383	肿瘤坏死因子受体相关蛋白 2 (TRAF2)
25	0.384	ADP 核糖基转移酶样 1 (ADPRTL1)
26	0.390	谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)
27	0.391	鸟苷酸环化酶 1 α 3 (GUCY1A3)
28	0.392	有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 3 (MAP4K3)
29	0.393	亮氨酸拉链
30	0.394	富含半胱氨酸血管生成诱导因子 (CYR61)
31	0.397	核糖体蛋白 S10
32	0.400	钙联接蛋白(CANX)

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)感染与肝纤维化及肝细胞癌(HCC)的发生密切相关, 其中病毒基因编码的非结构蛋白 NS5A 起着重要的作用. HCV NS5A 位于 HCV 多蛋白的羧基末端, 是丝氨酸磷酸化蛋白质, 依磷酸化程度的不同而产生两种不同分子量大小的多肽 p56 和 p58. NS5A 是转录反式激活因子, 其羧基末端富含酸性氨基酸及脯氨酸, 这是真核细胞转录因子特有的结构特征. 研究发现^[26]NS5A 蛋白通过双链 RNA-活化蛋白激酶结合域与病毒复制、干扰素抵抗、细胞生长的限制有一定关系, 但是对结合域在疾病发展过程中的作用的认识是很有限的, 有待于进一步研究. 具有易变性特质的 NS5A 在感染 HCV 的自然病程中维持稳定, 表明其可能在病毒的生活周期中扮演中心角色. 一般来说, 转录的反式

激活因子是在细胞核中起作用的, 而 NS5A 定位于细胞内质网, 因此推测 NS5A 可能参与了细胞信号传导途径. NS5A 能够反式激活核转录因子 NF- κ B 及 STAT3, 在细胞炎症反应、肿瘤发生及转移过程中起重要作用^[27]. Ghosh *et al*^[28]研究发现, NS5A 蛋白能够抑制细胞周期调节基因 p21WAF1, 激活人肝癌细胞中增生细胞核抗原(PCNA)基因, 从而调节细胞凋亡, 促进细胞增生. NS5A cDNA 能够使转染的小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 具有转化特性, 且转化细胞移植入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶, 这一证据直接证明了 HCV NS5A 蛋白的恶性转化潜能.

NS5ATP13 是我室利用 SSH 从分别转染真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5A 和 pcDNA3.1(-)空载体的 HepG2 细胞中筛选出来的 NS5A 上调的未知功能蛋白基因, 我们应用基因表达谱芯片技术筛选 NS5ATP13 反式调节基因, 发现 NS5ATP13 可显著影响 HepG2 细胞基因表达谱, 得到 86 条显著差异表达基因, 包括已知和未知功能基因, 分别与细胞生长、分化、凋亡等相关.

结果表明 NS5ATP13 可上调 Ran 结合蛋白 2(RanBP2)、凋亡蛋白 1 抑制因子(IAP-1, MIHC, cIAP2)、细胞分裂周期蛋白 23(CDC23)等. RanBP2 作为核孔复合物的组成成分, 在细胞核内外的物质转运中发挥着重要的作用, Forler *et al*^[29]敲除果蝇细胞中的 RanBP2, 发现细胞增生和 mRNA 向核外转运均受到抑制. Gordon *et al*^[30]研究发现 IAP-1 在恶性胸膜间皮瘤细胞中高表达. Lee *et al*^[31]研究发现 CDC23 通过聚集 Dfp1-Hsk1 激酶及刺激小染色体维持蛋白的磷酸化参与复制前体复合物的活化过程. NS5ATP13 可能通过上调这些凋亡相关因子抑制细胞凋亡, 从而引起肿瘤的发生. cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA)可作用于多种与糖脂代谢有关的酶类、一些离子通道和某些转导因子, 使他们发生磷酸化而改变其活性状态. 垂体腺苷酸环化酶激活肽被 PKA 激活后, 可引起细胞膜的持续去极化, 发挥抗凋亡的效应, 其中, 钾离子通道的活化在程序性细胞死亡中扮演了重要的角色^[32]. NS5ATP13 通过上调 PKA 和钾离子电压门控通道 KQT 样亚家族成员 3, 也可能是抑制凋亡发生的机制之一. 同时, 渗透压应激、炎症细胞因子、脂多糖(LPS)、紫外线、生长因子等细胞应激可以激活 p38 MAPK 信号转导途径, 而有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶 2(MAP3K2)通过 p38 MAPK 信号转导途径可激活胱冬蛋白酶-3, 诱导细胞凋亡^[33]. MAP3K 还可磷酸化 IKK (I κ B kinase). IKK 是一种丝/苏氨酸蛋白酶, 活化后可以磷酸化 I κ B, 进而释放出活化的 NF- κ B, 使其进入细胞核内发挥转录因子的功能^[34]. NS5ATP13 下调多种诱导细胞凋亡的信号分子, 可能在肝细胞癌的发生机制中起到一定的作用.

基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMPI)作为胶原酶抑制剂, 抑制 I 型, II 型, III 型胶原分解, 在肝纤维化的发生发展过程中起到重要作用^[35]. 转化生长因子 β 1

(TGF β 1)可诱导黏附分子CD44, CD49b, CD49, CD51, CD54和CD61以及细胞外基质成分纤维连接蛋白, 层粘连蛋白和IV型胶原的表达^[36]. NS5ATP13通过下调TIMP1、TGF β 1、层粘连蛋白 β 2 (LAMP β 2)是否可以抑制肝纤维化的发生和发展, 其作为感染HCV的机体保护机制有待于进一步研究. NS5ATP13除了与已知蛋白基因相互作用外, 尚可作用于一些未知功能基因, 例如可下调假想蛋白AF038182, 其生物学功能以及该假想基因的结构和功能有待于进一步研究.

总之, 利用基因芯片高通量多角度系统地进行基因特征分析, 为我们从一个全新的视角认识靶基因NS5ATP13和HCV非结构蛋白NS5A的分子生物学功能、HCV的致病机制和肝纤维化及肝癌的发病机制打下了重要基础.

4 参考文献

- Zandman-Goddard G, Levy Y, Weiss P, Shoenfeld Y, Langevitz P. Transverse myelitis associated with chronic hepatitis C. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:111-113
- Moriguchi H, Kobayashi M, Chung RT, Sato C. Optimal IFN therapy for 40-year-old patients with severe HCV-1b infection. *Gastroenterology* 2003;124:1166-1167
- Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, Dhali GK, Chaudhuri S, Maity SG, Naik TN, Bhattacharya SK, Mazumder DN. Hepatitis C virus infection in the general population: A community-based study in west bengal, India. *Hepatology* 2003;37:802-809
- Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. Racial differences in the relationship between hepatitis C infection and iron stores. *Hepatology* 2003;37:795-801
- Ryu KJ, Kim JH, Lee SW. Ribozyme-mediated selective induction of new gene activity in hepatitis C virus internal ribosome entry site-expressing cells by targeted trans-splicing. *Mol Ther* 2003;7:386-395
- Kasuno K, Ono T, Matsumori A, Nogaki F, Kusano H, Watanabe H, Yodoi J, Muso E. Hepatitis C virus-associated tubulointerstitial injury. *Am J Kidney Dis* 2003;41:767-775
- Chen S, Wang Y. Genetic variation characteristics of the envelope region of hepatitis C virus in the patients with chronic hepatitis. *Zhonghua Shiyen He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:219-222
- Hui CK, Belaye T, Montegrande K, Wright TL. A comparison in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C between persistently normal and elevated transaminase. *J Hepatol* 2003;38:511-517
- Fang CT, Tobler LH, Haesche C, Busch MP, Phelps B, Lepar G. Fluctuation of HCV viral load before seroconversion in a healthy volunteer blood donor. *Transfusion* 2003;43:541-544
- Sunagawa H, Takayama H, Yamashiro T, Sasaki H, Sashida Y, Matsuura K, Kayou M. Hepatocellular carcinoma in a patient with primary biliary cirrhosis and seronegativity for markers of hepatitis B virus and hepatitis C virus: report of a case. *Surg Today* 2003;33:219-223
- Sarrazin C, Berg T, Lee JH, Teuber G, Dietrich CF, Roth WK, Zeuzem S. Improved correlation between multiple mutations within the NS5A region and virological response in European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999;30:1004-1013
- Zech B, Kurtenbach A, Krieger N, Strand D, Blencke S, Morbitzer M, Salassidis K, Cotten M, Wissing J, Obert S, Bartenschlager R, Herget T, Daub H. Identification and characterization of amphiphysin II as a novel cellular interaction partner of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Gen Virol* 2003;84:555-560
- Georgopoulou U, Caravokiri K, Mavromara P. Suppression of the ERK1/2 signaling pathway from HCV NS5A protein expressed by herpes simplex recombinant viruses. *Arch Virol* 2003;148:237-251
- Qadri I, Iwahashi M, Simon F. Hepatitis C virus NS5A protein binds TBP and p53, inhibiting their DNA binding and 53 interactions with TBP and ERCC3. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:193-204
- Sarrazin C, Herrmann E, Bruch K, Zeuzem S. Hepatitis C virus nonstructural 5A protein and interferon resistance: a new model for testing the reliability of mutational analyses. *J Virol* 2002;76:11079-11090
- Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001;59:1271-1276
- Ghosh AK, Majumder M, Steele R, Yaciuk P, Chrivia J, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates transcription through a novel cellular transcription factor SRCAP. *J Biol Chem* 2000;275:7184-7188
- 成军. 慢性丙型肝炎病毒肝细胞防变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997;71:8856-8859
- Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 刘妍, 段惠娟, 成军, 王建军, 陆荫英, 牟劲松, 王琳, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活SV40病毒启动子的研究. 军医进修学院学报 2003;28:40-42
- 刘妍, 陆荫英, 成军, 王建军, 李莉, 张玲霞. 丙型肝炎病毒非结构蛋白NS5A反式激活基因的克隆化研究. 解放军医学杂志 2003;28:40-43
- Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. *Med Device Technol* 2002;13:14-18
- Ruano JM, Glidle A, Cleary A, Walmsley A, Aitchison JS, Cooper JM. Design and fabrication of a silica on silicon integrated optical biochip as a fluorescence microarray platform. *Biosens Bioelectron* 2003;18:175-184
- Chena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470
- Franco S, Gimenez-Barcons M, Puig-Basagoiti F, Furci I, Sanchez-Tapias JM, Rodes J, Saiz JC. Characterization and evolution of NS5A quasispecies of hepatitis C virus genotype 1b in patients with different stages of liver disease. *J Med Virol* 2003;71:195-204
- Gong G, Waris G, Tanveer R, Siddiqui A. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599-9604
- Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS5A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80:1179-1183
- Forler D, Rabut G, Ciccarelli FD, Herold A, Kocher T, Niggeweg R, Bork P, Ellenberg J, Izaurralde E. RanBP2/Nup358 provides a major binding site for NXF1-p15 dimers at the nuclear pore complex and functions in nuclear mRNA export. *Mol Cell Biol* 2004;24:1155-1167
- Gordon GJ, Appasani K, Parcells JP, Mukhopadhyay NK, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma. *Carcinogenesis* 2002;23:1017-1024
- Lee JK, Seo YS, Hurwitz J. The Cdc23 (Mcm10) protein is required for the phosphorylation of minichromosome maintenance complex by the Dfp1-Hsk1 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:2334-2339
- Mei YA, Vaudry D, Basille M, Castel H, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ. PACAP inhibits delayed rectifier potassium current via a cAMP/PKA transduction pathway: evidence for the involvement of I_k in the anti-apoptotic action of PACAP. *Eur J Neurosci* 2004;19:1446-1458

- 33 Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:539-546
- 34 Schmidt C, Peng B, Li Z, Sclabas GM, Fujioka S, Niu J, Schmidt-Supprian M, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2003;12:1287-1300
- 35 Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, Lin YL, Huang YT. Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004;11:408-417
- 36 Schierano G, Bellone G, Manzella C, Preti G, Emanuelli G. In vitro effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol* 2001;72:1658-1665

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对 IGF- I、IGF- II 表达的影响

何必立, 吕 宾, 徐 毅, 苗 青, 范一宏

何必立, 浙江省台州医院消化科 浙江省临海市 317000
吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏, 浙江省中医院消化科 浙江省杭州市 310006
项目负责人: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江省中医院消化科.
lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的:探讨温郁金对人胃癌细胞SGC-7901的抑制作用及其作用机制。

方法:采用超临界二氧化碳萃取法提取温郁金挥发油成分。以氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照药物, 采用MTT法, 测定温郁金提取物对体外培养胃癌细胞SGC-7901增生的影响; 应用放射免疫测定法分析温郁金提取物对细胞培养液中IGF- I、IGF- II 浓度水平的影响。

结果:超临界二氧化碳萃取法提取温郁金获得温郁金提取物1和提取物2。温郁金提取物1、提取物2对胃癌细胞的生长有显著的抑制作用(均 $P < 0.01$), 且抑制率随药物浓度的升高而增高, 存在明显的量效关系。200 mg/L浓度的温郁金提取物1和提取物2对胃癌细胞生长的抑制率分别为64.44%、60.80%, 在这个浓度水平, 其抑制肿瘤细胞生长作用与阳性对照药物5-Fu效果相当。温郁金提取物1、提取物2能降低胃癌细胞培养液中IGF- I、IGF- II 的浓度水平(均 $P < 0.05$)。

结论:温郁金提取物对人胃癌细胞SGC-7901生长有抑制作用, 其抑癌作用的机制可能与抑制胃癌细胞分泌IGF- I、IGF- II 有关。

何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2761-2763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2761.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)同肿瘤的关系近年来受到了广泛的关注^[1]。温郁金具有行气破血、消积止痛等作用, 是抗肿瘤复方中常见的药物, 前期在其抗肿瘤作用方面已有报道^[2], 但有关其对胰岛素样生长因子的影响研究鲜见。我们研究温郁金提取物对体外培养的胃癌细胞株SGC-7901的抑制作用, 并从其对胰岛素样生长因子 I (IGF- I)、胰岛素样生长因子 II (IGF- II)分泌的影响来分析其作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌细胞(SGC-7901)株(购自中科院上海细胞所), RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司, 噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶为上海生物工程公司产品, 氟尿嘧啶(5-Fu)为上海旭东海普药业有限公司产品, IGF- I 放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, IGF- II 放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 二甲基亚砜为浙江杭州双林化工试剂厂产品, 温郁金购自浙江省中医院中药房, HA121-50-01型超临界萃取装置为江苏南通华安超临界实业公司产品, CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品, ELX800 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司生产, SN-682 放射免疫γ计数器由中科院上海原子核研究所日环仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、50 mL/L 的 CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养。

1.2.2 温郁金提取物的制备 采用超临界CO₂流体萃取技术提取温郁金有效成分。萃取温度 40 °C, 压力 3×10^7 Pa, 时间为 120 min/循环, CO₂ 流量为 50 kg/h, 分离 1 的反应条件为: 压力 1.25×10^7 Pa, 温度 50 °C; 分离 2 的反应条件为压力 5.5×10^6 Pa, 温度 40 °C。获温郁金提取物 1、温郁金提取物 2 后 4 °C 避光冷藏保存。药物在使用前新鲜配制, 先用适量 DMSO 溶解, 再以 RPMI-1640 培养液进行稀释, 使其浓度达到用药需求。

1.2.3 细胞增生抑制试验(MTT 还原法) 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 1.0×10^7 /L 接种细胞于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 置 37 °C、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养液, 阴性对照组为不含温郁金的培养液, 空白对照组不含细胞, 阳性对照组加入含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 的 5-Fu 的完全培养液, 每个药物浓度设 6 个复孔; 分别继续培养 48 h; 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 孵育 4 h, 再加入 150 μ L DMSO, 上微量振荡器振荡 10 min, 立即用酶标仪测定 490 nm 波长吸光度值(A)。

抑制率(%) = [(阴性对照 A - 空白 A) - (实验 A - 空白 A)] / (阴性对照 A - 空白 A) \times 100%

1.2.4 条件培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的测定 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 5.0×10^7 /L, 接种细胞于 24 孔培养板中, 每孔 1 000 μ L, 37 °C、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养基, 阴性对照组细胞更换为 1 000 μ L 完全培养基, 分别继续培养 48 h, 收集各处理组培养液。按照 IGF- I、IGF- II 放免试剂盒的说明步骤测定培养液中 IGF- I 和 IGF- II 浓度, 由自动 γ 计数器预先编制的程序(以 B-NSB/B0-NSB 计算标准及待测样品结合百分率, 半对数绘制标准曲线)直接给出有关参数、标准曲线和样品浓度。

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组间比较采用方差分析, 量效关系采用相关与回归分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 温郁金对SGC-7901细胞增值的影响 温郁金提取物 1、提取物 2 随剂量的增加, 其对胃癌细胞的抑制率也增加(图 1, 表 1), 有显著相关性(P 均 < 0.01)。200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 和对照药物 5-Fu 对胃癌细胞株生长的抑制作用无显著差异($P > 0.05$), 其抑制作用相当。

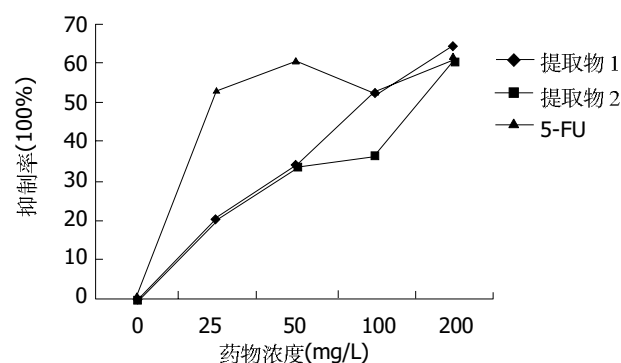


图 1 不同浓度药物对胃癌细胞生长的影响。

表 1 不同药物对胃癌细胞生长的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	A 值	细胞抑制率(%)
提取物 1	200	6	0.2752 \pm 0.0242 ^b	64.44
提取物 1	100	6	0.3547 \pm 0.0332 ^b	51.59
提取物 1	50	6	0.4697 \pm 0.0270 ^b	33.00
提取物 1	25	6	0.5492 \pm 0.0278 ^b	20.15
提取物 2	200	6	0.2977 \pm 0.0075 ^d	60.80
提取物 2	100	6	0.4493 \pm 0.0291 ^d	36.29
提取物 2	50	6	0.4678 \pm 0.0111 ^d	33.30
提取物 2	25	6	0.5582 \pm 0.0330 ^d	18.70
5-Fu 对照组	200	6	0.2920 \pm 0.0146 ^f	61.72
5-Fu 对照组	100	6	0.3492 \pm 0.0210 ^f	52.48
5-Fu 对照组	50	6	0.2978 \pm 0.0270 ^f	60.78
5-Fu 对照组	25	6	0.3448 \pm 0.0274 ^f	53.18
阴性对照组	0	6	0.6738 \pm 0.0559	0

^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$, ^f $P < 0.01$ vs 阴性对照组。

2.2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的影响 和对照组相比, 25、50、100 mg/L 浓度的温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF- I 及 IGF- II 的含量均有较明显的下调作用 (P 均 < 0.01 , 表 2)。

表 2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 浓度的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	IGF- I 含量(ug/L)	IGF- II 含量(ug/L)
对照组	0	4	28.2160 \pm 2.0554	0.1818 \pm 0.0504
提取物 1	25	4	13.5133 \pm 3.1200 ^b	0.1223 \pm 0.0219 ^e
提取物 1	50	4	10.5938 \pm 4.2190 ^b	0.1058 \pm 0.0067 ^f
提取物 1	100	4	7.6120 \pm 3.6616 ^b	0.0815 \pm 0.0211 ^f
提取物 2	25	4	20.0393 \pm 2.6845 ^c	0.1253 \pm 0.0192 ^b
提取物 2	50	4	15.6623 \pm 3.4037 ^d	0.1168 \pm 0.0122 ^b
提取物 2	100	4	12.7520 \pm 2.7613 ^d	0.0803 \pm 0.0095 ⁱ

^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$, ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

超临界CO₂萃取技术是近20 a来在国际上取得迅速发展的化工分离技术, 在中药有效成分提取方面有诸多优

势^[3]. 我们运用超临界 CO₂ 萃取技术, 从温郁金中提取出其药用成分, 根据提取条件不同, 获得提取物 1、提取物 2, 所设定萃取条件大致相当于以乙醇和乙醚萃取所得, 提取物 1 主要含姜黄素, 而提取物 2 主要为挥发油成分. MTT 结果显示, 和阴性对照组比较, 浓度范围为 25–200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 对 SGC-7901 均有显著的抑制作用 (P 均 < 0.05), 且有明显的量效关系.

以往温郁金中抗肿瘤成分研究较多的有两大类成分, 即姜黄素和挥发油. 研究者从直接细胞毒作用, 诱导细胞凋亡, 诱导肿瘤细胞分化等多个角度进行了其抗肿瘤作用机制的探讨^[2,4], 但针对细胞生长因子的研究少见.

胰岛素样生长因子系统 (IGFs) 由胰岛素样生长因子 I (IGF-I)、胰岛素样生长因子 II (IGF-II)、他们相应的受体 IGF-IR、IGF-IIR 及其 6 种胰岛素样生长因子相关蛋白 (IGFBPs) 组成. IGF-I 对各种细胞活动既有即刻作用又有远期影响, 而这些作用的发挥依赖于其和 IGF-IR 的结合. IGF-I 通过刺激细胞糖原和蛋白合成以及增强细胞摄取氨基酸和葡萄糖的能力而直接促进细胞蛋白质和碳水化合物代谢^[5]. IGF-I 也对细胞增生、分化、凋亡有间接的影响. 对很多细胞系而言, IGF-I 是强有力的有丝分裂促进剂, 他可通过增加 DNA 合成、上调细胞周期蛋白 D1 表达, 从而加速细胞从 G1 期向 S 期过渡^[6-7]. 另外, IGF-I 又通过上调 Bcl 蛋白表达, 下调 Bax 蛋白表达而提高 Bcl/Bax 二聚体含量, 这一变化可封闭细胞凋亡程序的启动^[8-9]. 同样, IGF-II 也具有促有丝分裂、抗细胞凋亡、促进细胞增生和分化作用.

鉴于 IGFs 在细胞增生、分化、凋亡、突变等过程中起着重要的作用, 最近数十年人们对 IGFs 在肿瘤细胞生长和发展中的作用进行了大量的研究, 结果表明: IGFs 与多种肿瘤包括白血病细胞、肉瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、肠癌、肝癌、胰腺癌、肾癌等各种肿瘤的发生发展关系密切^[10-11]. IGFs 和胃癌的关系最初在体外细胞实验中被观察到, Thompson *et al*^[12] 在 1990 年报道在人胃癌细胞系 LIM-1839 中存在 IGF-II 的自分泌. Chung and Antoniades^[13] 于 1992 年用原位杂交法在 3 个人胃癌标本中检测到 IGF-I mRNA 的表达.

IGFs 和 IGF-IR 的结合激活酪氨酸激酶的活性, 从而促发一系列分子介导的信号转导级联反应. 目前已经清楚的信号转导途径有两个, 其一途径为激活 Ras 蛋白、Raf 蛋白和有丝分裂活化的蛋白激酶. 另一途径为激活三磷酸腺苷激酶而发挥作用^[5]. 除和 IGFs 结合而调节细胞有丝分裂和凋亡过程外, IGF-IR 还和细胞转化相关. 体外实验表明从细胞膜表明除去 IGF-IR 基因后, 可抑制细胞的转化^[14]. IGF-IIR 可通过和 IGF-II 结合而降低 IGF-II 的生物学活性.

鉴于 IGF 在肿瘤发生发展中的作用意义, 有学者采用阻断 IGF 的方法对肿瘤进行治疗, 方法有两种: 第

一, 阻断 IGF 的合成或分泌; 第二, 阻断 IGF 与受体的结合, 应用这些方法, 已取得了初步的效果^[15].

为了探讨温郁金提取物是否抑制胃癌细胞分泌 IGF, 我们采用放射免疫测定法检测不同浓度温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量的影响. 结果提示, 25、50、100 mg/L 温郁金两种提取物对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量均有显著的下调 (P 均 < 0.05), 提示温郁金可能通过影响胃癌细胞 IGF 的分泌起到抗肿瘤作用的.

温郁金对肿瘤细胞的调控机制复杂, 我们的研究仅提示温郁金提取物对体外培养的 SGC-7901 具有抑制其增生作用; 抑制胃癌细胞分泌 IGF-I 和 IGF-II 可能是其作用机制的一方面, 温郁金对胃癌细胞 IGF-I 和 IGF-II 基因表达及其受体的影响有待于进一步深入研究.

另外, 我们的研究中提取物化学成分不明确, 有待于进一步分离纯化, 但温郁金资源丰富, 在胃癌的化学防治中值得深入研究.

4 参考文献

- 1 Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000;21:215-244
- 2 王琰, 王慕邹. 姜黄属常用中药的研究进展. *中国药学杂志* 2001; 36:80-84
- 3 毛中兴, 赖炳森. 超临界二氧化碳技术在中药有效成分萃取中的应用. *北京中医* 2001;1:34-35
- 4 李国栋, 许付, 沈爱军. 莪术油的研究进展. *中国药学杂志* 2002; 37:806-809
- 5 Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34
- 6 Furlanetto RW, Harwell SE, Frick KK. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells *in vitro*. *Mol Endocrinol* 1994;8:510-517
- 7 Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, Sussenbach JS. Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:31163-31171
- 8 Parrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 1997;138:1355-1358
- 9 Wang L, Ma W, Markovich R, Lee WL, Wang PH. Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* 1998;139:1354-1360
- 10 LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 1995;122:54-59
- 11 Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 1992;65:311-320
- 12 Thompson MA, Cox AJ, Whitehead RH, Jonas HA. Autocrine regulation of human tumor cell proliferation by insulin-like growth factor-II: an *in vitro* model. *Endocrinology* 1990;126:3033-3042
- 13 Chung CK, Antoniades HN. Expression of c-sis platelet derived growth factor-B, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor messenger RNA and their respective receptor messenger RNA in primary human gastric carcinomas: *in vivo* studies with *in situ* hybridization and Immunocytochemistry. *Cancer Res* 1992;52:3453-3459
- 14 Oates AJ, Schumaker LM, Jenkins SB, Pearce AA, DaCosta SA, Arun B, Ellis MJ. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:269-281
- 15 Huynh HT, Tetenes E, Wallace L, Pollak M. *In vivo* inhibition of insulin-like growth factor 1 gene expression by amoxifen. *Cancer Res* 1993;53:1727-1730