

基因芯片筛选肝硬化相关基因

黄海涛, 林菊生, 余爽, 马昕

黄海涛, 广州军区武汉总医院消化内科 湖北省武汉市 430070
林菊生, 余爽, 马昕, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.net
电话: 027-83662578 传真: 027-83662578
收稿日期: 2004-04-28 接受日期: 2004-06-24

摘要

目的:应用基因芯片技术研究肝硬化相关基因的基因表达谱。

方法:乙肝肝硬化组织为实验组, 以正常肝组织为对照。按一步法抽提实验组和对照组标本的总RNA并纯化mRNA; 将等量的实验组和对照组标本mRNA分别逆转录合成荧光分子掺入的cDNA做探针, 混合后杂交1568点BioDoorChipLiver-16S芯片。经严格洗片后用ScanArray3000扫描仪扫描芯片获取荧光信号图像, 计算机分析后比较两种组织中差异表达的基因。

结果:在1568种基因中, 肝硬化组织与正常肝组织间存在差异表达的基因。所检测的3例临床标本中, 2例共有的差异表达基因66-76条(4.2-4.8%), 3例共有的差异表达基因28条(1.8%)。其中包含有与细胞外基质降解相关的基因, 与细胞生长因子有关的基因, 与信号传导有关的基因等。

结论:应用基因芯片技术筛选肝硬化相关基因有助于阐明肝硬化发展机制。

黄海涛, 林菊生, 余爽, 马昕. 基因芯片筛选肝硬化相关基因. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1984-1985

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1984.asp>

0 引言

肝硬化是一种常见的慢性肝脏疾病, 他对人类健康危害极大。在我国, 肝硬化主要由病毒性肝炎引起, 特别是慢性活动性乙型肝炎。近十多年来, 基于分子水平研究技术的进步, 人们对肝硬化的发生、发展及恶化机制有了一定的认识, 但其详细机制仍未完全阐明。我们利用基因芯片技术^[1-2]研究正常肝组织和乙肝相关性肝硬化的基因表达谱与筛选肝硬化相关基因, 以便深入阐明肝硬化在基因表达水平上的变化和进一步认识肝硬化组织癌变的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 临床经病理证实的门脉性肝硬化标本(患者均有慢性活动性乙型肝炎病史)3例及正常肝组织(取自交

通意外死亡健康成年男子)1例, 迅速液氮冻存备用。所用芯片由上海博星基因芯片公司提供, 为BioDoor Chip Liver-16S芯片。

1.2 方法 按一步法抽提肝硬化和肝正常组织的总RNA: 将液氮保存的肝硬化和正常肝组织碾碎成粉末状, 加入溶液D和10 g/L巯基乙醇, 磨成粉末后匀浆成溶液, 匀浆液离心, 上清液经10 g/L的酚-氯仿两次抽提后经NaAc和5:1酸性酚-氯仿抽提; 再经等体积异丙醇沉淀; 离心后用750 mL/L乙醇洗涤沉淀, 用Milli-Q水溶解沉淀, 紫外分析。过柱分离纯化mRNA, 紫外线分析其质量。在逆转录反应体系50 μ L中加入mRNA 3 μ g, 参照Schena *et al*^[3]方法逆转录标记cDNA探针并纯化, 用Cy3-dUTP标记正常肝组织mRNA, 用Cy5-dUTP标记肝硬化组织mRNA, 乙醇沉淀后将标记的两种探针混合溶解在20 μ L \times SSC+2 g/L SDS杂交液中。芯片置95 $^{\circ}$ C水浴锅内2 min, 取出立即放入无水乙醇中30 s, 晾干。取5 \times SSC及2 g/L SDS各6 μ L, 置0.5 mL的Eppendorf管中, 于95 $^{\circ}$ C水浴锅内2 min, 根据定位框将其加到芯片上, 盖上盖玻片, 置于含少许双蒸水(滴入50 μ L)的保湿杂交仓中, 封口膜封口, 42 $^{\circ}$ C水平放置5 h。将预杂交的芯片取出, 用ddH₂O冲去盖玻片。将探针置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性2 min; 芯片置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性30 s, 玻片取出浸无水乙醇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, 置于杂交箱中, 用parafilm密封, 放入42 $^{\circ}$ C杂交箱内杂交过夜(18 h)。按顺序用2 \times SSC+2 g/L SDS, 1 g/L \times SSC, 洗涤10 min, 室温晾干。用ScanArray 3000扫描仪扫描芯片, 获取荧光信号图像, 用ImaGene 3.0软件分析和Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值。用以下2个条件作为判定基因差异表达的标准: (1) Ratio(Cy5/Cy3)>2或Ratio<0.5; (2) Cy3和Cy5信号值其中之一必须>600。

2 结果

电泳结果及A比值均证实已抽提到高纯化的总RNA。基因芯片的质量标准是: 40个管家基因必须阳性, 32个植物基因(阴性对照)必须阴性, 42个点样液(空白对照)也必须阴性。本结果完全符合上述条件, 说明实验无污染而且检测系统正常。检测的3例临床标本中, 2例共有的差异表达基因66-76条(4.2-4.8%), 3例共有的差异表达基因28条(1.8%)。这些基因可能与肝硬化发生发展相关, 可分为2类: (1)与正常肝组织相比在肝硬化时表达量明显下调的基因有60条; (2)与正常肝组织相比在肝硬化时表达量明显上调的基因有16条。(表1)。

表1 肝硬化组织中表达增高/降低的基因(部分)

GenBank ID	GeneName	Cy5/Cy3		
		Case1	Case2	Case3
K03191	Human cytochrome P-1-450 mRNA	0.3181	0.4054	0.2845
X82834	H.sapiens mRNA for golgin	0.3272	0.3254	0.3524
X76538	H.sapiens Mpv17 mRNA	0.3605	0.4222	0.3521
Ab023153	KIAA0936 protein	0.3752	0.3190	0.3586
D90070	Human APR peptide mRNA	0.3838	0.3879	0.3765
X78678	ketoheokinase	0.3842	0.3029	0.3476
U14971	Human ribosomal protein S9 mRNA	0.4009	0.1035	0.2431
D00244	H.sapiens mRNA for pro-uPA	0.4119	0.4319	0.4264
X79536	hnRNP core protein A1	0.4119	0.2578	0.3182
Z11531	elongation factor-1-gamma	0.4183	0.2034	0.3012
M81601	transcription elongation factor	0.4250	0.4651	0.4152
U47634	beta-tublin class III isotype mRNA	0.4426	0.3151	0.4153
U46838	Human p105 MCM mRNA	0.4450	0.4689	0.4728
y07968	H.sapiens mRNA for TFG protein	0.4632	0.4480	0.4082
af127670	Homo sapiens HAR mRNA	0.4761	0.4506	0.3212
U43286	Human SPS2 mRNA	0.4822	0.2882	0.3593
X68277	H.sapiens CL100 mRNA	3.6946	4.4131	5.2143
M31145	Human IGFBP mRNA	3.8857	4.7775	3.7845

3 讨论

肝脏生态系统在致病因素反复或持续作用下,致纤维生成作用不断增强,纤维溶解作用不断减弱,导致细胞外基质(ECM)过度沉积,最终进展至肝硬化.在此基础上有可能发展为肝细胞癌.我们对1568条基因同时进行研究,并在一张芯片上同时分析正常肝组织和肝硬化组织基因表达谱的差异,具有良好的平行性.分析差异表达的基因:(1)透明质酸受体(HAR)下调.在肝纤维化和肝硬化的发生发展机制中ECM过度沉积是一个核心问题.肝病时HA分解受阻及合成增加.HA通过肝窦内皮细胞特异的透明质酸酶而水解.血清HA水平与肝纤维化程度相关^[4].HA升高与CD44(HAR)减少有关^[5].提高血清CD44水平可降低血/肝HA水平^[6].CD44可能具有促进HA降解作用,肝硬化时CD44表达减少,HA降解减少,从而使血/肝HA增加,加重肝内ECM沉积.(2)尿激酶前体(pro-uPA)表达下调.pro-uPA是双链尿激酶(uPA)的单链前体,尿激酶可诱导纤维蛋白酶原生成,而后者可降解细胞外基质与基底膜蛋白.本实验表明,肝硬化组织中pro-uPA表达下调,可能促进肝内ECM过度沉积.(3)Mpv17表达下调.推测与肝硬化时ECM过度沉积有关.(4)胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)表达上调.胰岛素样生长因子(IGF)可促进肝细胞再生,其活性主要由IGFBP调节^[7].肝组织中IGF及其受体表达对肝细胞增生有较大影响^[8].肝硬化患者血清中的IGF水平

明显降低,且患者IGF水平与预后呈正相关^[9-10].本实验表明肝硬化时IGFBP的表达明显上调,推测这可能导致游离IGF减少,从而引起肝细胞再生功能低下,加重肝细胞网络紊乱.(5)CL100(MKP-1)表达上调.CL100(MKP-1)是一种细胞外调节激酶(ERK),其上调与DNA损伤和应激有关^[11].我们的结果提示MKP-1可能与肝硬化组织恶变有关.(6)硒磷酸化合成酶2(SPS2)表达下调.硒作为体内含硒酶类的必需组分,参与含硒酶拮抗氧自由基对肝脏细胞的损伤,具有抗肝纤维化的作用^[12-14].肝硬化患者血清中硒浓度明显下降^[15].本实验表明SPS2在肝硬化组织中表达下调,预示他可能与肝硬化发展有关.肝硬化的发生发展极其复杂,其表达谱与正常肝组织相比有较大差别,其中表达增加的基因数目远少于表达降低的基因数目,推测与肝硬化时肝细胞功能减退有关.在我们的实验结果中,基因复制和表达相关蛋白的表达下调也证明这一点.

4 参考文献

- Narayanan A, Keedwell EC, Olsson B. Artificial intelligence techniques for bioinformatics. *Appl Bioinformatics* 2002;1: 191-222
- Chen Z, Ge B, Hudson TJ, Rozen R. Microarray analysis of brain RNA in mice with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and hyperhomocysteinemia. *Gene Expr Patterns* 2002;1:89-93
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Dais RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10614-10619
- 燕忠生, 席春生, 周进茂, 孟庆常, 陈瑜, 肖良晋. 血清HA, IV-C, LN水平在肝硬化和慢性肾功能不全患者中的变化及意义. *世界华人消化杂志* 2000;8(Suppl 8):30
- Tamaki S, Ueno K, Torimura T, Sata M, Tanikawa K. Evaluation of hyaluronic acid binding ability of hepatic sinusoidal endothelial cells in rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1996;111:1049-1057
- Urashima S, Tsutsuni M, Ozaki K, Tsuchishima M, Shimanaka K, Ueshima Y, Takase S. Immunohistochemical study of hyaluronate receptor (CD44) in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:34-38
- Zhu M, de Cabo R, Lane MA, Ingram DK. Caloric restriction modulates early events in insulin signaling in liver and skeletal muscle of rat. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1019:448-452
- 梁巧明, 周最明, 杨冬华, 徐重. 肝组织中IGF-II及其受体表达对肝细胞增生的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:545
- 吴巍, 张曙, 吴云林, 叶静, 奚容平. 肝硬化血清胰岛素样生长因子-I与肝功能和数字连接试验的关系. *世界华人消化杂志* 2001; 9:1391-1394
- 夏兴洲, 卢艳馨, 普长生, 王长武, 闫国亭, 阮红, 赵瑞红. 肝硬化患者血清IGF-II和测定及临床意义. *胃肠病学和肝病杂志* 2001;10:370-371
- Sanchez-Perez I, Martinez-Gmariz M, Williams D, Keyse SM, Perona R. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene* 2000;19: 5142-5152
- 徐连喜, 谢贤春, 金瑞, 吉中和, 吴卓智, 王竹生. 硒对大鼠肝纤维化的防治作用. *华人消化杂志* 1998;6:133-135
- 李锋. 硒与肝纤维化. *国外医学·卫生学分册* 2000;27:150-153
- 李琳, 孔晓霞, 陈宝琅, 孙士春, 刘洪健. 硒和维生素E对实验性肝纤维化的协同保护作用. *临床消化病杂志* 2003;15:9-10
- 张卉, 戈琳, 谈一飞. 肝硬化患者血清及腹水中硒水平的测定. *国外医学·医学地理分册* 2003;24:62-63