

抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸调节的肝星状细胞系靶基因

樊文梅, 李国力, 魏红山

樊文梅, 李国力, 魏红山, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011

通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市安外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. dr_liver@hotmail.com

电话: 010-64211031-2358 传真: 010-64281540

收稿日期: 2007-05-24 修回日期: 2007-09-01

Screening for genes regulated by gamma aminobutyric acid in hepatic stellate cells using suppression subtractive hybridization

Wen-Mei Fan, Guo-Li Li, Hong-Shan Wei

Wen-Mei Fan, Guo-Li Li, Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. dr_liver@hotmail.com

Received: 2007-05-24 Revised: 2007-09-01

Abstract

AIM: To screen for genes regulated by gamma aminobutyric acid (GABA) in hepatic stellate cells (HSC) using suppression subtractive hybridization (SSH), and to investigate the biological function of GABA in the liver.

METHODS: The hepatic stellate cell line HSC-T6 was co-cultured with 10 μ mol/L GABA for 24 hours, after which mRNA was extracted and reverse transcribed into cDNA. HSC-T6 cells co-cultured with phosphate buffer saline (PBS) were used as controls. mRNAs upregulated by GABA were identified by SSH. Thirty one randomly selected clones were sequenced and analyzed bioinformatically.

RESULTS: Fifteen genes were found to be significantly up-regulated, including genes involved in DNA synthesis, apoptosis, mitochondrial function and tumor suppression. These results showed that GABA might promote HSC-T6 cell proliferation and inhibit

apoptosis.

CONCLUSION: SSH technology successfully enabled the identification of genes that are differentially expressed in the presence and absence of GABA, demonstrating that GABA can affect the gene expression profiles of HSCs.

Key Words: Gamma aminobutyric acid; Hepatic stellate cell; Suppression subtractive hybridization

Fan WM, Li GL, Wei HS. Screening for genes regulated by gamma aminobutyric acid in hepatic stellate cells using suppression subtractive hybridization. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2831-2834

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交技术(SSH)筛选 γ -氨基丁酸(GABA)作用肝星状细胞系HSC-T6后的差异表达基因。

方法: 10 μ mol/L的GABA作用于HSC-T6细胞24 h, 提取mRNA, 用分光光度计进行定量分析。以GABA处理和未处理的T6细胞mRNA为模板逆转录合成双链cDNA(dscDNA), 并分别标记为Tester和Driver, 酶切后与接头连接, 经两次杂交, 构建消减杂交文库, 将消减文库的扩增产物进行转化、克隆分析后应用生物信息学技术将测得序列再进行同源性分析。

结果: 15种基因表达上调, 其中包括与DNA合成、线粒体、肿瘤抑制以及凋亡相关的4类基因, 结果显示GABA可能促进HSC-T6细胞增殖而抑制凋亡。

结论: 用SSH技术可以成功获得GABA刺激肝星状细胞基因上调的监测, 证明GABA能够影响肝星状细胞的基因表达谱。

关键词: γ -氨基丁酸; 肝星状细胞; 抑制性消减杂交

樊文梅, 李国力, 魏红山. 抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸调节的肝星状细胞系靶基因. *世界华人消化杂志* 2007;15(26):2831-2834

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2831.asp>

■背景资料

临床研究表明, 在急性慢性肝病患者中, 血清GABA水平升高, 肝再生活性下降, GABA受体拮抗剂促进肝再生, 还可改善临床转归; 肝性脑病患者血清中GABA水平亦升高。

■研发前沿

最新研究发现, GABA可以逆转乙醇诱导的大鼠肝细胞毒性, 乙醇以剂量依赖的方式使细胞生存力下降, 而GABA处理能够恢复乙醇诱导的细胞毒性, 多胺也能逆转乙醇诱导的细胞毒性(Amino acid, 2007, 32: 419-423). 提示GABA可能与肝纤维化的发生相关, 但机制不明.

■创新盘点

肝星状细胞的激活是肝纤维化发生的中心环节, GABA与肝性脑病的发生密切相关. 本文把两个似乎毫不相干的领域联系起来, 科研思路具有创新性.

0 引言

肝星状细胞(HSC)位于肝窦周Disse腔内, 在肝纤维化的病理过程中HSC充当了重要的角色, 静止状态的HSC主要参与视黄醇的代谢调节, 活化后具有增殖、收缩调节肝窦张力与血流、分泌细胞因子、产生基质金属蛋白酶及其抑制物(TIMPs)、合成大量细胞外基质(ECM)等功能, 是肝纤维化时ECM的主要来源细胞^[1-2]. 因此, HSC的活化是肝纤维化发生的核心环节, 许多因素参与了该过程的调节, 其中细胞因子起主要作用. γ -氨基丁酸(GABA)是一种天然存在的功能性氨基酸, 是哺乳动物大脑的主要抑制性神经递质, 由肠道细菌产生. 近年在暴发性肝衰竭和肝性脑病的动物模型中发现GABA血浓度增高, 血脑屏障的通透性也增高, 大脑突触后神经元的GABA受体显著增多. 临床研究表明, 在急慢性肝病中, 血清GABA水平升高, 肝再生活性下降, GABA受体拮抗剂促进肝再生, 还可改善临床转归, 提示GABA可能抑制肝再生^[3-4]. 肝性脑病患者血清中GABA水平亦升高^[5]. GABA可能与肝纤维化的发生相关. 抑制性消减杂交技术(SSH)是一种简便有效、以抑制PCR和消减杂交为基础的分离差异表达基因的新技术^[6]. 该技术的操作流程包括2轮杂交和2轮PCR扩增, 对低丰度基因的扩增非常敏感. 本研究以一定浓度的GABA刺激HSC-T6, 用SSH技术筛选GABA对肝星状细胞上调的靶基因.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝脏星状细胞系T6细胞及大肠杆菌DH5a(本室保存), mRNA Purification试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒(Clontech), 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-T载体(Promega). DNA序列测定由上海生物工程公司完成.

1.2 方法

1.2.1 药物处理及mRNA提取 培养瓶中常规培养T6细胞, 细胞生长至对数期时用2 g/L胰酶消化平均分成两瓶, 将10 μ mol/L的GABA加入细胞培养液中, 24 h后收获细胞. 使用mRNA Purification试剂盒, 直接提取GABA处理的T6细胞mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计分别进行定性、定量分析.

1.2.2 消减杂交文库的建立 采用PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规SSH方法按说明书进行: 以GABA处理和未处理的T6细胞mRNA为模板逆转录合成双链cDNA(dscDNA), 并分别标记为Tester和Driver, dscDNA经*Rsa* I (一种识别4碱基序列的内切酶)消化, 产生相对较短的平端片段, 纯化酶切产物. 将Tester的dscDNA分为2份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头Adapter 1和Adapter 2, 然后与过量的Driver dscDNA进行杂交; 合并两种杂交产物后再与Driver dscDNA作第2次杂交; 然后将杂交产物做选择性PCR扩增, 使Tester dscDNA中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增.

1.2.3 消减文库扩增及克隆分析 扩增产物与pGEM-T easy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18 h. 挑取白色菌落, 增菌, 以pGEM-T easy载体多克隆位点两端T7/SP6引物进行菌落PCR扩增, 证明含有插入片段后(200-1000 bp)后, 测序. 应用生物信息学将测得序列与GenBank数据库进行同源性分析.

2 结果

2.1 mRNA的定性、定量分析 使用高质量的mRNA是保证cDNA高产量的前提. 紫外分光检测显示, GABA处理和未处理的T6细胞mRNA分别为13.08 mg/L和9.84 mg/L, A_{260}/A_{280} 分别为2.031和2.067. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳见mRNA为大于0.5 kb清晰慧尾片状条带, 证实mRNA质量足.

2.2 dscDNA两端连接效率检测 dscDNA与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有Adaptor 1和Adaptor 2的2组dscDNA分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶G3PDH引物)进行28个循环扩增, 产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示2组dscDNA扩增产物浓度相当, 说明dscDNA已与接头高效率连接.

2.3 cDNA消减文库消减效率的鉴定 分别以消减及未消减PCR产物为模板, 用G3PDH引物进行PCR扩增, 分别在18, 23, 28和33次循环结束时从体系中吸取5 mL进行电泳鉴定. 结果显示: 与未消减组PCR产物相比, 消减组PCR产物中G3PDH基因产物大大减少, 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图1).

2.4 差异表达cDNA片段的扩增及克隆 杂交产

物经2轮PCR扩增后, 菌落PCR扩增结果显示为200-1000 bp大小不等的插入片段, 所获得的85个克隆中几乎均含有插入片段, 这些条带可能代表差异表达的基因片段(图2)。

2.5 cDNA测序与同源性分析结果 随机挑选31个克隆测序, 与GenBank数据库进行初步比较. 应用生物信息学技术分析发现, 均与已知基因的部分序列高度同源(94%-100%), 共编码15种基因(表1)。

3 讨论

GABA为主要的抑制性神经递质, 在肝性脑病中血清GABA水平升高, 预示GABA与肝脏疾病的相关性. SSH技术是通过消减杂交除去实验组和对照组之间的共有序列, 并使低丰度基因得到富集, 再通过抑制PCR使实验组和对照组之间差异表达的序列得到扩增, 是消减杂交与抑制性PCR的完美结合, 在克隆差异基因表达中具有绝对优势^[7-8]. 自从SSH技术建立以来, 在不同疾病中筛选差异表达基因中已得到了广泛的应用^[9-10].

本研究利用抑制性消减杂交技术筛选GABA刺激的肝星状细胞差异表达基因, 随机挑选31个克隆, 测序分析获得15种基因, 这些基因可分为4类: (1)与DNA合成、蛋白质降解有关的蛋白. 包括DNA聚合酶 δ 催化亚基、核糖体蛋白S25、蛋白酶体亚基 β 4、蛋白酶体26S亚基非ATP酶7和核结合素1(Nucb1), 表明GABA刺激肝星状细胞的DNA合成和蛋白的降解. 蛋白酶体既存在于细胞核中又存在于细胞质溶胶中, 是溶酶外的蛋白水解体系, 显示多种肽酶的活性, 能够从碱性、酸性和中性氨基酸的羧基侧水解多种与泛素蛋白连接的蛋白质底物. 蛋白酶体可能通过对病毒抗原的加工而调节乙型肝炎病毒的适应性免疫^[11]. 核结合素Nuc, 也叫CalNuc, 是钙结合蛋白, 定位于核内、高尔基体和内质网中, Nucb1大小为63 kDa, 可能参与调节骨髓成熟^[12-13]. (2)与肿瘤抑制有关的蛋白. 大鼠肿瘤抑制因子ST13, 介导热休克蛋白HSP70和HSP90的接头蛋白, 并参与糖皮质激素受体的装配过程, 在结肠癌直肠癌中其水平下调, 提示他可能是肿瘤抑制基因^[14]. 钙蛋白酶(Calpain)是一类钙依赖性的高度保守的蛋白水解酶, 参与细胞骨架蛋白重整、细胞转化和迁移, 加快细胞循环. 研究发现, 钙蛋白酶抑制剂可以改善大鼠肝脏炎症^[15-16]. Calpain 1参与了凋亡诱导因子的释

表 1 阳性克隆与Genbank同源序列比较结果

同源蛋白基因	相同克隆数	同源性
1, 4- α 葡聚糖分支酶	4	99%
肿瘤抑制因子13(St13)	2	99%
CD48抗原	5	99%
核糖体蛋白S25	1	99%
蛋白磷酸酶4调节亚基2	2	100%
精氨酸-丝氨酸二肽富含性剪切因子1(SFRS1)	2	94%
核结合素1(Nucb1)	1	99%
电压依赖的离子通道2(Vdac2)	6	99%
钙蛋白酶小亚基1(Capns1)	1	97%
蛋白酶体亚基 β 4(proteasome)	2	99%
蛋白酶体26S亚基非ATP酶7	1	100%
DNA聚合酶 δ 催化亚基	1	99%
类KIAA0877蛋白	1	100%
细胞色素氧化酶亚基 I 部分序列及 tRNA-丝氨酸基因 (Cox I)	1	99%
核糖体蛋白L23	1	100%

■名词解释

抑制性消减杂交: 是一种以抑制性PCR反应为基础, 将标准化测试cDNA单链步骤和消减杂交步骤合为一体的技术. 通过合成两个不同的接头, 接于经限制性内切酶消化后的测试cDNA片段的5'末端, 将测试和驱动进行两轮杂交. 标准化步骤均等了测试中的cDNA单链丰度, 消减杂交步骤去除测试和驱动之间的共同序列. 利用抑制性PCR选择性扩增目的cDNA片段, 同时抑制非目的cDNA的扩增. 因此, 抑制性消减杂交技术显著增加了获得低丰度差异表达基因的cDNA的概率。

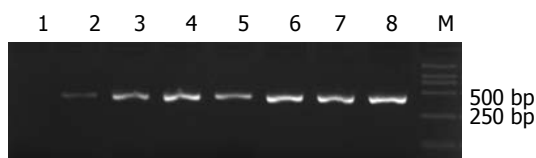


图 1 消减效率分析结果, 引物为G3PDH 5'3'. M: Marker; 1-4: 消减组, PCR循环次数分别为18, 23, 28, 33; 5-8: 未消减组, PCR循环次数分别为18, 23, 28, 33.

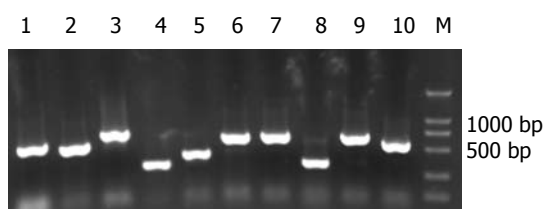


图 2 部分克隆(1-10)菌落PCR鉴定电泳图。

放^[17]. (3)与凋亡相关的蛋白. 电压依赖的离子通道2(Vdac2)是线粒体膜蛋白, 在哺乳动物中低丰度表达, Vdac2缺陷的细胞中, 增加BAK的寡聚化而更易于凋亡. 反之, 过表达Vdac2选择性抑制BAK激活, 并抑制线粒体的凋亡通路^[18]. 然而, 最近的报道发现电压依赖的离子通道对于线粒体的凋亡并不是必不可少的^[19]. 在GABA刺激的肝星状细胞中Vdac表达上调的机制还需进一步的研究. CD48抗原在本研究中筛出5个克隆, 表明CD48抗原上调较普遍, CD48可以保持T细胞和巨噬细胞的炎症反应^[20]. (4)线粒体相关蛋白. COX1在所有正常细胞中都有表达, 但在发生

■同行评价

本文应用抑制性消减杂交技术筛选 γ -氨基丁酸(GABA)作用下肝星状细胞系(HSC-T6)差异表达基因。研究结果表明GABA作用下的HSC-T6有15种基因表达上调,涉及DNA合成相关蛋白、肿瘤抑制相关蛋白、凋亡相关蛋白及线粒体相关蛋白。研究方法新颖,所研究的内容具有实际意义,有一定的参考价值。

肝硬化的星状细胞中COX1的表达水平高于正常肝脏星状细胞^[21]。蛋白磷酸酶4是蛋白磷酸酶2A(PP2A)家族的重要成员之一,他与多个调节亚基形成各种复合体参与诸多重要的细胞进程,具有抗凋亡活性^[22]。精氨酸-丝氨酸二肽富含性剪切因子1(SFRS1),具有与DNA、RNA以及蛋白质的结合活性,参与选择性剪切,同时有致癌潜力^[23]。类KIAA0877蛋白功能尚不清楚。总之,GABA可能促进HSC细胞增值和细胞凋亡过程,但其具体机制还有待于进一步的研究。

4 参考文献

- 1 蒋业贵,李兆申.肝星状细胞与肝纤维化的研究进展.世界华人消化杂志 2003; 11: 1443-1446
- 2 姜惠卿,姚希贤.肝星状细胞的活化与肝纤维化.胃肠病学和肝病杂志 2007; 16: 86-89
- 3 Minuk GY, Kren BT, Xu R, Zhang X, Burczynski F, Mulrooney NP, Fan G, Gong Y, Steer CJ. The effect of changes in hepatocyte membrane potential on immediate-early proto-oncogene expression following partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1997; 25: 1123-1127
- 4 Minuk GY, Gauthier T. The effect of gamma-aminobutyric acid on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *Gastroenterology* 1993; 104: 217-221
- 5 Ferenci P, Schafer DE, Kleinberger G, Hoofnagle JH, Jones EA. Serum levels of gamma-aminobutyric-acid-like activity in acute and chronic hepatocellular disease. *Lancet* 1983; 2: 811-814
- 6 Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 5640-5648
- 7 Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6025-6030
- 8 Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303: 349-380
- 9 Li AQ, Dai N, Yan J, Zhu YL. Screening for metronidazole-resistance associated gene fragments of *H pylori* by suppression subtractive hybridization. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1847-1850
- 10 Chen Y, Zhang YZ, Zhou ZG, Wang G, Yi ZN.

Identification of differently expressed genes in human colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1025-1032

- 11 Robek MD, Garcia ML, Boyd BS, Chisari FV. Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to hepatitis B virus. *J Virol* 2007; 81: 483-491
- 12 Petersson U, Somogyi E, Reinholt FP, Karlsson T, Sugars RV, Wendel M. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. *Bone* 2004; 34: 949-960
- 13 de Alba E, Tjandra N. Structural studies on the Ca²⁺-binding domain of human nucleobindin (calnuc). *Biochemistry* 2004; 43: 10039-10049
- 14 Wang LB, Zheng S, Zhang SZ, Peng JP, Ye F, Fang SC, Wu JM. Expression of ST13 in colorectal cancer and adjacent normal tissues. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 336-339
- 15 Rose R, Banerjee A, Ramaiah SK. Calpain inhibition attenuates iNOS production and midzonal hepatic necrosis in a repeat dose model of endotoxemia in rats. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 785-794
- 16 Mehendale HM, Limaye PB. Calpain: a death protein that mediates progression of liver injury. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 232-236
- 17 Polster BM, Basanez G, Etchebarria A, Hardwick JM, Nicholls DG. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280: 6447-6454
- 18 Cheng EH, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003; 301: 513-517
- 19 Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkentin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 550-555
- 20 Abadia-Molina AC, Ji H, Faubion WA, Julien A, Latchman Y, Yagita H, Sharpe A, Bhan AK, Terhorst C. CD48 controls T-cell and antigen-presenting cell functions in experimental colitis. *Gastroenterology* 2006; 130: 424-434
- 21 Graupera M, March S, Engel P, Rodes J, Bosch J, Garcia-Pagan JC. Sinusoidal endothelial COX-1-derived prostanoids modulate the hepatic vascular tone of cirrhotic rat livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G763-770
- 22 Mourtada-Maarabouni M, Kirkham L, Jenkins B, Rayner J, Gonda TJ, Starr R, Trayner I, Farzaneh F, Williams GT. Functional expression cloning reveals proapoptotic role for protein phosphatase 4. *Cell Death Differ* 2003; 10: 1016-1024
- 23 Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 185-193

编辑 何燕 电编 郭海丽