

应用基因表达谱芯片技术筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因

肖凡, 魏红山, 李国力, 张剑平, 宋川

肖凡, 魏红山, 李国力, 张剑平, 宋川, 北京地坛医院病毒研究所 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, 北京地坛医院病毒研究所. cindy2358@163.com

电话: 010-64211031-2358 传真: 010-64211031-2306

收稿日期: 2006-12-13 接受日期: 2007-01-04

Screening of genes differentially expressed in hepatic stellate cells acted by gamma aminobutyric acid with microarray assay

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Guo-Li Li, Jian-Ping Zhang, Chuan Song

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Guo-Li Li, Jian-Ping Zhang, Chuan Song, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Correspondence to: Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. cindy2358@163.com

Received: 2006-12-13 Accepted: 2007-01-04

Abstract

AIM: To screen genes regulated by gamma aminobutyric acid (GABA) in hepatic stellate cells (HSC) using microarray assay, and to investigate GABA biological function.

METHODS: HSC-T6 was co-cultured with 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA for 48 hours, and then mRNA was extracted from the cells to reversely transcribe into cDNA. HSC-T6 co-cultured with phosphate buffer saline (PBS) was used as controls. The cDNA profile was analyzed by microarray assay.

RESULTS: For the profile of 4096 genes, 37 genes were found differentially expressed, of which 11 were up-regulated while 26 were down-regulated significantly.

CONCLUSION: Differentially expressed genes under the action of GABA are successfully screened by microarray technique, demonstrat-

ing that GABA can affect the gene profile of HSC.

Key Words: Gamma aminobutyric acid; Hepatic stellate cell; Microarray assay

Xiao F, Wei HS, Li GL, Zhang JP, Song C. Screening of genes differentially expressed in hepatic stellate cells acted by gamma aminobutyric acid with microarray assay. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):629-632

摘要

目的: 应用基因芯片技术检测 γ -氨基丁酸(GABA)对肝星状细胞(HSC-T6) 基因表达谱的影响。

方法: 10 $\mu\text{mol/L}$ 的GABA作用于HSC-T6细胞48 h, 提取mRNA, 逆转录为cDNA. 以PBS作用的HSC-T6细胞为对照, 进行cDNA 芯片分析。

结果: 在4096个基因表达谱的筛选中, 发现有11个基因表达水平显著上调, 26个基因表达水平显著下调。

结论: 成功地应用基因芯片筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因, 证明GABA对肝星状细胞的表达谱有显著作用。

关键词: γ -氨基丁酸; 肝星状细胞; 基因芯片技术

肖凡, 魏红山, 李国力, 张剑平, 宋川. 应用基因表达谱芯片技术筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因. *世界华人消化杂志* 2007;15(6):629-632

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/629.asp>

0 引言

γ -氨基丁酸(GABA)是一种非蛋白质组成的天然氨基酸. GABA是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质, 具有重要的生理功能^[1]. 已经研究报道的生理活性有诸如降低血压、促使精神安定、促进脑部血流、增进脑活力、营养神经细胞、增加生长激素分泌、健肝利肾、改

■背景资料

γ -氨基丁酸(GABA)是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质, 具有重要的生理功能. 目前针对GABA的研究主要集中在神经方面.

表 1 表达显著增强的基因

序号	GenBank登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	M27812	突触蛋白Ia(synapsin Ia)	2.018
2	AF121265	β -连锁蛋白(beta-catenin)	2.030
3	J05214	5'-核苷酸酶(5'-nucleotidase)	2.086
4	BC062235	异种核蛋白-a1(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1)	2.09
5	BC081810	法尼基转移酶1 (farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1)	2.120
6	U34843	细胞周期相关蛋白(cell cycle progression related D123)	2.129
7	BC062034	醛类还原酶(Aldehyde reductase 1)	2.209
8	AF476963	结合珠蛋白(haptoglobin-like protein)	2.364
9	L27111	刺激激活的蛋白激酶(stress activated protein kinase alpha I)	2.435
10	BC078869	CTL靶抗原(CTL target antigen)	2.460
11	BC060556	核糖核蛋白体结合蛋白(ribophorin II)	2.725

善更年期综合症等^[2-3]. GABA广泛存在于大脑内, 是大脑的主要抑制性介质. 正常时GABA来源肠, 由谷氨酸盐脱羧而来. GABA能与 α -酮戊二酸反应生成谷氨酸, 抑制谷氨酸的脱羧反应, 使血氨浓度有效降低, 还能促使更多的谷氨酸与氨结合生成尿素排出体外, 解除氨毒, 增进肝功能. 而肝功能不全以及肝硬化时, 肝脏的解毒能力降低. 肝昏迷时, GABA在血中滞留, 血浆及脑脊液中其浓度明显增高, 造成大脑功能的紊乱^[4]. 肝纤维化的发生是以肝窦和门静脉周围细胞外基质过量沉积为特点. 激活的肝星状细胞被认为是肝纤维化发生过程中细胞外基质的主要来源^[5]. 因此本实验应用基因芯片技术筛选GABA作用肝星状细胞HSC-T6后差异表达的基因, 为进一步阐明GABA可能的生物学功能提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 HSC-T6细胞由本室保存. 细胞培养相关试剂、总RNA提取试剂TRIzol均购自Invitrogen公司. 人类基因组分类I芯片包括原癌基因和抑癌基因、离子通道和运输蛋白、细胞周期蛋白类、细胞受体、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、细胞信号转导相关基因等4096个cDNA, 由上海联合基因有限公司提供. mRNA纯化试剂Oligotex mRNA Midi Kit购自Qiagen公司.

1.2 方法 在35 mm培养皿中常规培养HSC-T6细胞, 细胞生长至对数期时, 分别将PBS和10 μ mol/L GABA加入细胞, 48 h后收获细胞, 每5 \times 10⁶个细胞加入1 mL TRIzol 试剂, 立即于液

1 2 3 4



图 1 RNA电泳图. 1, 2: GABA-10 μ mol/L; 3,4: Control.

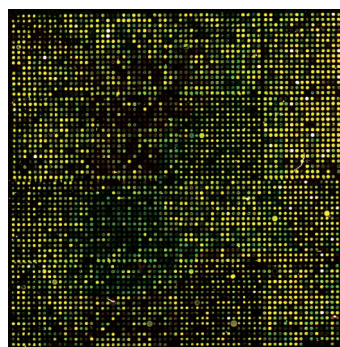


图 2 双色荧光标记叠加图.

氮中保存. TRIzol试剂一步法提取总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, 经琼脂糖凝胶电泳检测28S、18S条带变化. 纯化mRNA并行电泳检测. 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 μ g), Cy5-dUTP标记实验组细胞mRNA(5 μ g). 将探针置于95 $^{\circ}$ C水浴中变性2 min; 玻片置于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, 置于杂交舱

表 2 表达显著下降的基因

序号	GenBank登录号	编码蛋白	Cy5/Cy3
1	L27084	果糖-2, 6-磷酸酶(fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase)	0.206
2	BC088090	视黄醇脱氢酶3(retinol dehydrogenase type III)	0.213
3	BC081844	岩藻糖苷酶 α -L-1(fucosidase, α -L-1)	0.239
4	BC088847	磷酸果糖激酶(phosphofructokinase)	0.268
5	AY323237	辅酶Q结合蛋白(low molecular mass ubiquinone-binding protein)	0.274
6	AB039663	孔蛋白2(VDAC2)	0.281
7	AY177703	r-酪氨酸磷酸酶(receptor-like protein tyrosine phosphatase gamma A-type isoform)	0.304
8	BC079369	丙酮酸脱氢酶E1 (pyruvate dehydrogenase E1)	0.338
9	BC088166	α 1-微球蛋白 (α 1 microglobulin/bikunin)	0.339
10	U17253	转录抑制因子NAB1(transcriptional repressor NAB1)	0.342
11	AF461496	柠檬酸合酶前体(citrate synthase precursor)	0.368
12	BC061819	甘露糖苷酶2(mannosidase 2)	0.378
13	AB097077	核蛋白UKP83(nuclear protein UKp83)	0.383
14	U76714	细胞黏附调节因子(cell adhesion regulator)	0.385
15	M11185	髓磷脂脂蛋白(myelin proteolipid protein)	0.397
16	J02679	甲萘醌氧化还原酶(menadione oxidoreductase)	0.397
17	BC091363	维甲类受体(retinoid X receptor gamma)	0.400
18	BC078838	肾特异性膜蛋白(kidney-specific membrane protein)	0.425
19	AB180485	核受体联合激活蛋白P120(nuclear receptor coactivator p120)	0.426
20	BC081855	磷脂结合蛋白(annexin A5)	0.430
21	AF121217	前- α -2胶原蛋白(pro- α -2(I) collagen)	0.437
22	BC088191	短链脱氢还原酶(short-chain dehydrogenase/reductase)	0.444
23	BC062066	硫辛酰胺脱氢酶(diaphorase)	0.452
24	BC085739	3-羟邻氨基苯丙酸-3, 4, -加双氧酶 (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase)	0.472
25	BC088146	C细胞色素P450(cytochrome P450)	0.481
26	M83560	谷氨酸受体5-1(glutamate receptor subunit 5-1)	0.485

■同行评价

本文应用基因表达谱芯片技术筛选GABA作用下肝星状细胞差异表达基因, 方法先进, 结果可信, 但讨论部分欠深入.

中, 用Parafilm密封, 放入42℃杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 洗片后, 晾干扫描. 用General Scanning公司的ScanArray 4000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24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ImaGene310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 总RNA及mRNA的定性、定量分析 电泳条带比较, 显示28S条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA(图1).

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有4096个cDNA. 为了监控芯片杂交技术体系的整个过程, 在芯片上设置阴性对照(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4096个基因中筛选出差异表达基因共27条, 其中11条基因表达增强, 26条基因表达降低(图2, 图3).

2.3 差异表达基因分析 在基因芯片的扫描分析中, 如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在2.0以上, 就判断为上调基因, 在本研究中发现有11种基因的表达水平上调(表1). 如果荧光染料的Cy5/Cy3比值在0.5以下, 就判断为下调基因, 在本研究中发现有26种基因的表达水平下调(表2).

3 讨论

基因芯片技术充分利用生物科学、信息学等前

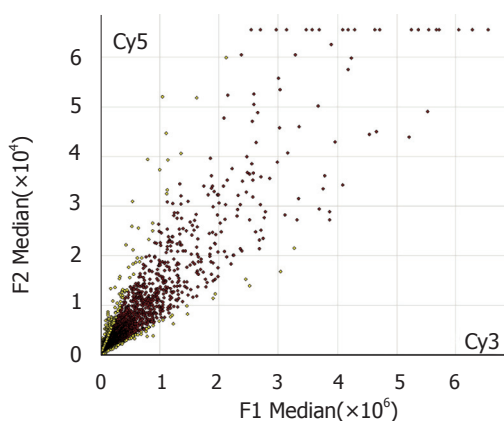


图3 杂交信号强度散点图。

沿学科的先成果, 其具有高通量、微型化和自动化等特点, 广泛应用于医学科研的各个领域, 为后基因组时代的生命科学研究提供了一种强有力的工具。本研究采用的微矩阵基因芯片是以联合基因科技集团发现的4096条基因为靶基因, 制备成cDNA芯片。对两种对照组细胞总RNA逆转录产生的cDNA进行杂交检测, 寻找和筛选GABA作用于HSC-T6细胞后, 基因表达变化。37条基因在HSC-T6细胞中均有差异表达, 其中上调基因11条, 下调基因26条。

上调基因中突触蛋白I在将突触泡与包括肌丝、微管和血影蛋白在内的几种细胞骨架元素的结合中发挥作用^[6]。胞质蛋白中 β -连锁蛋白是致癌蛋白的多功能蛋白质, 在细胞连接处他与钙黏素相互作用, 参与形成黏合带, 而游离的 β -连锁蛋白可进入细胞核, 调节基因表达, 提示该基因表达上调可能与HSC增殖加速有关^[7]。当肝细胞受损或肝内外梗阻时, 5'-核苷酸酶释放入血液中, 是诊断肝脏疾病的一项较为敏感的生化指标^[8]。法尼基转移酶1活化Ras信号转导通路, 促进细胞增殖^[9]。应激活蛋白激酶是细胞外信号转导至细胞内4大信号转导途径之一^[10]。下调基因中孔蛋白是线粒体外膜上的通道蛋白^[11]。代谢型谷氨酸受体激活后通过胞内信号转导系统调制离子通道活动^[12]。电压依赖性通道调节活性是HSC功能调节的重要方式。细胞色素P450主要分布在内质网和线粒体内膜上, 作为一种末端加氧酶, 参与了生物体内的甾醇类激素合成等过程。P450可能是人肝细胞内质网中一种重要的磷脂酶D, 有改变膜的性质和信号功能等作用^[13]。磷脂结合蛋白是一类被钙离子活化后可与膜磷脂结合的蛋白, 参与膜转运及膜表

面其他一系列依赖于钙调蛋白的活动^[14]。维甲类受体调控细胞生长、分化、凋亡等生命活动中起重要作用^[15]。该基因的下调表达可能与HSC的增殖相关。

总之, GABA可能参与调控肝星状细胞的增殖。该芯片的结果还需要进一步的验证, 其具体的生物学功能还需深入的研究。

4 参考文献

- 1 Barker JL, Behar T, Li YX, Liu QY, Ma W, Maric D, Maric I, Schaffner AE, Serafini R, Smith SV, Somogyi R, Vautrin JY, Wen XL, Xian H. GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol* 1998; 5: 305-322
- 2 Fiszman ML. Insights into GABA functions in the developing cerebellum. *Int Rev Neurobiol* 2005; 71: 95-112
- 3 Jelitai M, Madarasz E. The role of GABA in the early neuronal development. *Int Rev Neurobiol* 2005; 71: 27-62
- 4 Katayama K. Ammonia metabolism and hepatic encephalopathy. *Hepatol Res* 2004; 30S: 73-80
- 5 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 6 Yamagata Y. New aspects of neurotransmitter release and exocytosis: dynamic and differential regulation of synapsin I phosphorylation by acute neuronal excitation *in vivo*. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 22-29
- 7 Gonzalez FJ. Role of beta-catenin in the adult liver. *Hepatology* 2006; 43: 650-653
- 8 Sotil EU, Jensen DM. Serum enzymes associated with cholestasis. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 41-54
- 9 Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3631-3652
- 10 Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6274-6282
- 11 Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2249-2270
- 12 Dhami GK, Ferguson SS. Regulation of metabotropic glutamate receptor signaling, desensitization and endocytosis. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 260-271
- 13 Soars MG, McGinnity DF, Grime K, Riley RJ. The pivotal role of hepatocytes in drug discovery. *Chem Biol Interact* 2006; 18
- 14 Oancea M, Mazumder S, Crosby ME, Almasan A. Apoptosis assays. *Methods Mol Med* 2006; 129: 279-290
- 15 Klopper JP, Hays WR, Sharma V, Baumbusch MA, Hershtman JM, Haugen BR. Retinoid X receptor-gamma and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression predicts thyroid carcinoma cell response to retinoid and thiazolidinedione treatment. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 1011-1020

电编 李琪 编辑 王晓瑜