

# 肝再生增强因子对细胞周期素依赖性激酶1基因表达的影响

邵凤娟<sup>1</sup>, 成军<sup>2,3</sup>, 马英骥<sup>4</sup>, 刘蔚<sup>2,3</sup>, 纪冬<sup>2,3</sup>, 王志凌<sup>2,3</sup> (1.哈尔滨医科大学附属第一医院 感染科, 哈尔滨 150001; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 3.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015; 4.哈尔滨医科大学附属第四医院 感染科, 哈尔滨 150001)

**摘要:** 目的 研究人肝再生增强因子(ALR)对细胞周期素依赖性激酶1启动子(CDK1p)转录调节的作用, 探讨ALR的生物学作用机制。方法 根据GenBank中CDK1p序列的分析设计引物, 应用聚合酶链反应(PCR)扩增人CDK1基因启动子基因序列, 并克隆至真核报告载体pCAT3-Basic中, 构建CDK1启动子报告基因表达载体pCAT3-CDK1p, 以该质粒转染HepG2细胞系, 并同时与pcDNA3.1(一)-ALR共转染HepG2细胞系, 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性。结果 pCAT3-CDK1p组CAT表达活性明显高于pCAT3-basic组, 差异有统计学意义, pCAT3-CDK1p与pcDNA3.1(一)-ALR共转染组的CAT表达活性明显低于pCAT3-CDK1p组, 差异有统计学意义。结论 CDK1启动子有顺式激活下游基因的活性, ALR对CDK1基因有下调作用。

**关键词:** 肝再生增强因子; CDC2蛋白激酶; 下调作用

## Effect of augmenter of liver regeneration on gene expression of cyclin-dependent kinase 1

SHAO Feng-juan<sup>1</sup>, CHENG Jun<sup>2,3</sup>, MA Ying-ji<sup>4</sup>, LIU Wei<sup>2,3</sup>, JI Dong<sup>2,3</sup>, WANG Zhi-ling<sup>2,3</sup> (1.Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100011, China; 3.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China; 4.Department of Infectious Diseases, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of human augmenter of liver regeneration (ALR) on the transcription of cyclin-dependent kinase 1 gene promoter (CDK1p), and to explore the biological function mechanism of ALR. **Methods** Polymerase chain reaction (PCR) technique was employed to amplify the sequence of CDK1 promoter from HepG2 genomic DNA, named CDK1p, and the PCR product was cloned into pCAT3-basic, named pCAT3-CDK1p. The HepG2 cells were transfected with pCAT3-CDK1p, and then co-transfected with pCAT3-CDK1p and pcDNA3.1(一)-ALR. The chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity was detected by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. **Results** The CAT activity of the HepG2 transfected by pCAT3-CDK1p was significantly higher than that of the negative control group. The CAT activity of the HepG2 co-transfected by pCAT3-CDK1p and pcDNA3.1(一)-ALR was significantly lower than that of the HepG2 transfected by pCAT3-CDK1p. **Conclusions** The CDK1p has transcription activity. It is suggested that ALR can down-regulate CDK1 gene.

**Key words:** Augmenter of liver regeneration factor; CDC2 protein kinase; Down-regulation

肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)是Hagiya等<sup>[1]</sup>最先从新生大鼠肝脏和血清中分离和克隆出的肝细胞增殖因子。不同生物种属的

ALR都有重要的生物学功能。人肝再生增强因子的基因组DNA定位于16p13.31~p13.12, 该基因包括3个外显子和2个内含子。细胞周期素依赖性激酶1(cyclin dependent kinase 1, CDK1)是细胞增殖周期调控的主

要基因之一,在G2/M转变过程中有重要作用,其主要与细胞周期素B结合形成复合物而发挥作用<sup>[2]</sup>。本实验采用报告基因氯霉素乙酰转移酶(CAT)检测系统检测ALR对CDK1启动子活性的影响,为进一步研究ALR的作用及机制奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂 Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶和限制性内切酶购自TaKaRa公司,重组表达载体pcDNA3.1(-)-ALR为本室构建,人肝母细胞瘤细胞系HepG2为本室保存,氯霉素乙酰转移酶ELISA试剂盒和FuGENE6转染试剂购自Roche公司,质粒DNA提取试剂盒、pGEM-T和pCAT3-Basic质粒购自Promega公司。

### 1.2 方法

1.2.1 pCAT3-CDK1p质粒的构建 针对GenBank中的CDK1基因序列进行分析及设计引物,并以HepG2细胞基因组DNA为模板,PCR扩增CDK1p基因启动子序列。PCR产物经纯化后,与pGEM-T连接,并转化大肠埃希菌DH5 $\alpha$ ,提取质粒,并经酶切(*Kpn* I/*Xho* I)鉴定和DNA测序鉴定。将获得的质粒定向克隆至报告质粒pCAT3-basic,构建成重组质粒pCAT3-CDK1p。经鉴定后,应用磁珠法提取质粒以备转染。

1.2.2 细胞瞬时转染 用FuGENE6分别将pCAT3-CDK1p、pCAT3-basic(阴性对照组)、pCAT3-control(阳性对照组)单转染35 mm平皿的HepG2细胞;同时分别将pCAT3-CDK1p与pcDNA3.1(-)-ALR, pCAT3-CDK1p与pcDNA3.1(-)共转染HepG2细胞,转染约36小时后收获细胞。

1.2.3 CAT含量检测 裂解HepG2细胞,分别取细胞裂解上清液200  $\mu$ l进行CAT检测,操作步骤参照CAT ELISA试剂盒说明书。用酶标仪检测在415 nm波长下的吸光度(*A*)值,该数值反映细胞的CAT表达水平。所有实验严格平行操作并重复3次实验。

1.3 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ ,组间比较应用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 pCAT3-CDK1p重组质粒的构建 质粒pGEM-T-

CDK1p经酶切(*Kpn* I/*Xho* I)鉴定,含有510 bp的目的基因CDK1;重组质粒pCAT3-CDK1p分别以*Kpn* I/*Xho* I双酶切,鉴定电泳图谱如图1所示,可见两条带,一条为510 bp(CDK1基因片段),另一条为约4000 bp(pCAT3-basic),并经DNA测序鉴定,均说明重组质粒pCAT3-CDK1p构建正确。

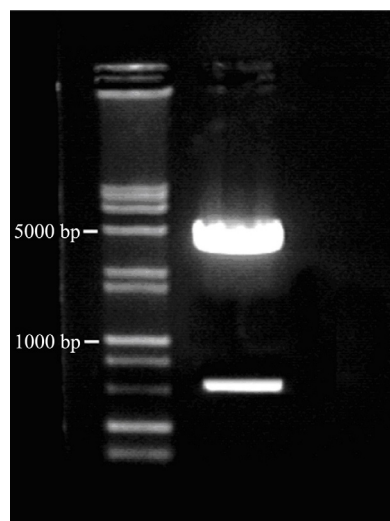


图1 pCAT3-CDK1p鉴定电泳图谱(*Kpn* I/*Xho* I双酶切)  
注:酶切后一条为510 bp(CDK1基因片段),另一条为约4000 bp(pCAT3-basic)

2.2 HepG2细胞瞬时转染及报告基因CAT的表达 pCAT3-CDK1p组与pCAT3-CDK1p + pcDNA3.1(-)组相比,差异无统计学意义( $P = 0.889$ );其余各组间分别比较,各差异均有统计学意义( $P$ 均 $< 0.05$ ),见表1。

## 3 讨论

ALR为进化保守的功能基因家族,人、小鼠和大鼠ALR基因与酵母ERV1基因同属于ALR/ERV1基因家族,各种属ALR/ERV1蛋白序列具有高度同源性,人与大鼠、小鼠的ALR无论从核酸水平还是蛋白质水平均有85%以上的同源性<sup>[3,4]</sup>。从最初的肝刺激物(hepatic stimulator substance, HSS)发现至今,对ALR的研究已有30多年。

ALR不仅与线粒体的生成、细胞分裂周期有关,还与肝、肾损伤的恢复及精子的发育阶段密切相关<sup>[3,5,6]</sup>。ALR能够促进肝细胞损伤后再生、肝移植后肝脏再生,治疗肝衰竭并判断其预后<sup>[7-10]</sup>。

表 1 pcDNA3.1(-)-ALR和pCAT3-CDK1p  
共转染HepG2细胞CAT检测结果

质粒	CAT ( $\bar{x} \pm s$ )
pCAT-basic	0.057 $\pm$ 0.013
pCAT-control	2.445 $\pm$ 0.110
pCAT3-CDK1p	1.573 $\pm$ 0.207
pCAT3-CDK1p + pcDNA3.1(-)	1.394 $\pm$ 0.165
pCAT3-CDK1p + pcDNA3.1(-)-ALR <sup>ab</sup>	0.476 $\pm$ 0.063

注：总体 $F = 154.831$ ,  $P = 0.000$ , 提示各组均值不相等或  
不全相等；<sup>a</sup>与pCAT3-CDK1p组比较,  $P = 0.031$ ；<sup>b</sup>与pCAT3-CDK1p +  
pcDNA3.1(-)组比较,  $P = 0.024$

ALR在急性肾功能衰竭中表达增强,有减轻肾损伤  
和改善肾组织病理改变的作用,能够促进肾小管上  
皮细胞再生修复和肾功能恢复<sup>[1]</sup>。

ALR可能通过信号转导途径,促进线粒体基  
因的表达和提高肝脏线粒体的细胞色素含量和氧化  
磷酸化能力、巯基氧化酶的作用、免疫调控功能  
等途径发挥生物学作用。ALR是黄素依赖性巯基  
氧化酶,同时具有细胞色素C还原酶活性,必须在  
黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide,  
FAD)辅助下才能发挥酶活性;其羧基端有CXXC  
结构域,是ALR发挥巯基氧化酶作用的活性中心,  
参与二硫键的形成,促进Fe/S蛋白的成熟,调控细  
胞的氧化还原状态,进而调控细胞的生长、增殖及  
凋亡<sup>[3,12,13]</sup>。

细胞周期是通过CDK/细胞周期蛋白复合物的  
有序激活来调控的,细胞周期蛋白依赖性激酶1  
(cyclin dependent kinase 1, CDK1)属于Ser/Thr蛋  
白激酶家族,是细胞分裂周期(cell divisioncycle,  
Cdc)基因2 编码的蛋白质,是细胞周期调控的关  
键环节,而且在无CDK2的情况下,CDK1可以替代  
CDK2在G<sub>1</sub>/S的作用<sup>[14,15]</sup>。

研究表明在酵母中DNA损伤后修复过程中,  
CDK1在DNA 5' -和3' -末端的切除、同源重组以  
及关卡调控中发挥着非常重要的作用<sup>[15]</sup>。CDC2失  
控导致肿瘤的发生,在许多肿瘤中CDC2表达均增  
强,且与肿瘤的分化和进展有关,有可能成为一个  
潜在的肿瘤诊断标志<sup>[16-19]</sup>。有研究表明,CDK1细胞  
增殖在早期胚胎发育中必不可少,若CDK1缺失,  
肝脏肿瘤则不能形成,因为CDK1似乎在每种细胞

的每个增殖阶段必不可少,其失活会阻止肿瘤形成  
和转移,而其他CDKs对肿瘤形成影响不大<sup>[20]</sup>。

pCAT3-CDK1p组的CAT表达活性明显高于  
pCAT3-basic组,差异有统计学意义,pCAT3-CDK1p  
与pcDNA3.1(-)-ALR共转染组的CAT表达活性  
明显低于pCAT3-CDK1p组,差异有统计学意义,  
说明CDK1p有顺式激活下游基因的活性,ALR对  
CDK1基因表达有下调作用,ALR可能通过对CDK1  
的调节而发挥其生物学功能。

参考文献

[1] Hygiya M, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:8142-8146.

[2] Xu N, Chang DC. Different thresholds of MPF inactivation are responsible for controlling different mitotic events in mammalian cell division[J]. Cell Cycle,2007,6:1639-1645.

[3] 吴贻琛, 辛绍杰. 肝再生增强因子研究进展[J]. 传染病信息, 2012,25:61-64.

[4] Gatzidou E, Kouraklis G, Theocharis S. Insights on augmenter of liver regeneration cloning and function[J]. World J Gastroenterol,2006, 12:4951-4958.

[5] 邵凤娟, 成军, 马英骥, 等. 人肝再生增强因子上调细胞周期素B2基因表达的研究[J]. 中国地方病杂志,2006,25:646-649.

[6] Cao Y, Fu YL, Ge CH, et al. Mice overexpression of human augmenter of liver regeneration (hALR) in male germ cells shows abnormal spermatogenesis and reduced fertility[J]. Endocr J,2012,59:989-999.

[7] Song M, Yi X, Chen W, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) gene therapy attenuates CCl<sub>4</sub>-induced liver injury and fibrosis in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun,2011,415:152 -156.

[8] 王震侠, 赵海平, 张瑞明, 等. rhALR 在大鼠部分肝移植术后肝再生中的作用及其机制研究[J]. 肝胆胰外科杂志,2011,23:333-335.

[9] 俞海英, 黄海军, 相代荣, 等. 人肝再生增强因子在肝衰竭患者血清及肝组织中的表达及其意义[J]. 中华肝脏病杂志,2009,17:217-220.

[10] Hongbo S, Yu C, Ming K, et al. Augmenter of liver regeneration may be a candidate for prognosis of HBV related acute-on-chronic liver failure as a regenerative marker[J]. Hepatogastroenterology, 2012,59:1933-1938.

[11] Liao XH, Zhang L, Tang XP, et al. Expression of augmenter of liver regeneration in rats with gentamicin-induced acute renal failure and its protective effect on kidney[J]. Ren Fail,2009,31:946-955.

[12] Lisowsky T, Lee JE, Polimeno L, et al. Mammalian augmenter of liver regeneration protein is a sulfhydryl oxidase[J]. Dig Liver Dis,2001, 33:173-180.

[13] 潘艳, 鞠桂芝, 佟明华, 等. 人肝再生增强因子FAD辅助的巯基氧化酶活性测定及其活性位点研究[J]. 中国病理生理杂志,2006,22:

- 2247-2250.
- [14] Garnier D, Loyer P, Ribault C, et al. Cyclin-dependent kinase 1 plays a critical role in DNA replication control during rat liver regeneration[J]. Hepatology, 2009, 50: 1946-1956.
- [15] Ira G, Pelliccioli A, Balijja A, et al. DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1[J]. Nature, 2004, 431: 1011-1017.
- [16] 李波, 阙祥勇, 李新. Cdc2 激酶与肿瘤的相关性研究进展[J]. 广东医学, 2012, 33: 566-568.
- [17] 史惠蓉, 张瑞涛. p53、p21WAF1 和 CDK1 在卵巢上皮性癌组织中的表达及意义[J]. 癌症, 2009, 28: 882-885.
- [18] Meyer A, Merkel S, Brückl W, et al. Cdc2 as prognostic marker in stage UICC II colon carcinomas[J]. Eur J Cancer, 2009, 45: 1466-1473.
- [19] 颜伟, 张永红, 何乐亚, 等. 胃癌中 CDK1 和 CDK2 的表达及预后意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19: 165-167.
- [20] Diril MK, Ratnacaram CK, Padmakumar VC, et al. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109: 3826-3831.

收稿日期: 2012-12-06

· 消息 ·

## 《中华实验和临床感染病杂志（电子版）》征稿启事

《中华实验和临床感染病杂志（电子版）》为中华医学会主办、首都医科大学附属北京地坛医院承办的感染病学专业学术电子期刊，是一本在载体形式上与纸媒体相互补的多媒体光盘期刊（CD-ROM）。本刊以电子期刊特有的表现形式，运用影视语言和多媒体技术登载有关感染病的专业论著、专家讲坛、临床病理讨论及学术会议等，图文声像并茂，是广大感染病工作者了解当前学科前沿、掌握最新技术的有效工具。本刊内容主要包括各种感染病的病原学、流行病学、免疫学、临床诊断及预防的实践经验和研究成果，以及本领域新技术、新方法的重要进展。本刊常设的主要栏目有述评、专家讲座、基础研究、临床研究、继续教育园地、经验交流、病例报告、疑难病例分析、综述、临床病例荟萃、设备技术介绍、国内外学术动态等。

本刊特色栏目：

(1) 继续教育园地（视频）；

(2) 临床病例荟萃（病例分析、典型图像分析、专家点评）。

本刊的办刊宗旨是：

贯彻党和国家的卫生工作方针政策，贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针，反映我国感染病临床和科研工作的重大进展，促进国内外感染病学学术交流。

本刊采编系统网址为<http://zhshylcgr.j-ditan.com/>，欢迎您点击和投稿。您只需简单登陆，即可免费下载期刊的PDF版文章和视频讲座。

本杂志为双月刊，16开，64页。每期定价28元，全年定价168元。编辑部常年办理邮购，邮发代号：80-729，欢迎订阅。

通讯地址：北京市朝阳区京顺东街8号《中华实验和临床感染病杂志（电子版）》编辑部

邮编：100015

电话：010-84322058

传真：010-84322059

Email: editordt@163.com

网址：<http://www.j-ditan.com>