

# 肝再生增强因子对肝星状细胞基因表达谱的影响

邵凤娟<sup>1</sup>, 成军<sup>2,3</sup>, 马英骥<sup>4</sup>, 郭江<sup>5</sup>, 张黎颖<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; 5.首都医科大学附属北京地坛医院 内五科, 北京 100015)

**摘要:** 目的 将pcDNA3.1(-)-ALR(hALR)和pcDNA3.1(-)分别转染人肝星形细胞(HSC), 筛选在人肝星形细胞中存在表达差异的基因, 进一步研究hALR的生物学功能及机制。方法 以脂质体技术将pcDNA3.1(-)-ALR和pcDNA3.1(-)分别转染人肝星形细胞系, 提取总mRNA, 逆转录为cDNA, 应用基因表达谱芯片方法分析差异表达的基因。结果 在所筛选的4096个基因中, 有2个基因表达水平显著上调, 25个基因表达水平显著下调。结论 hALR对于人肝星形细胞基因表达谱有显著影响, 为进一步研究hALR的生物学功能和作用机制提供了线索。

**关键词:** 肝星形细胞; 肝再生; 基因表达谱

## Effect of augments of liver regeneration on the gene expression profiling of hepatic stellate cells

SHAO Feng-juan<sup>1</sup>, CHENG Jun<sup>2,3</sup>, MA Ying-ji<sup>4</sup>, GUO Jiang<sup>5</sup>, ZHANG Li-ying<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; 5.The Fifth Department of Internal Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100011, China)

**Abstract: Objective** To screening the differential gene expression in human hepatic stellate cells (HSC) treated with pcDNA3.1-ALR in order to investigate the biological functions and mechanism of human augments of liver regeneration (hALR). **Methods** HSC were transfected by pcDNA3.1(-) and pcDNA3.1-ALR, respectively, using FuGENE6 transfection reagent. The total mRNA was isolated and reverse transcribed to synthesize the cDNA probes. Analyzed the differentially expressed genes by microarray gene expression profiling technique. **Results** Two genes were up-regulated and 25 genes were down-regulated among detected 4096 genes. **Conclusions** hALR has marked effect on gene expression profilings of human HSC. These results provide new clues for studying the molecular biological function and mechanism of hALR.

**Key words:** Hepatic stellate cells; Liver regeneration; Gene expression profiling

肝再生增强因子(augments of liver regeneration, ALR)是一种耐热的能刺激肝细胞再生的物质, 其相对分子质量为15 kD。人ALR基因组结构由3段外显子和2段内含子组成。由于ALR具有多种生物学作用, 近年来对肝再生增强因子的研究很受重视,

ALR不仅有促进肝细胞再生和抗肝损伤作用<sup>[1-4]</sup>, 还有一定的抗肝纤维化作用<sup>[5]</sup>。

近年来的研究<sup>[6]</sup>表明, 肝星状细胞活化成大量细胞外基质是肝纤维化形成的直接原因, 也是肝纤维化发生的核心环节, 而且也是参与细胞外基质降解代谢的酶类的主要细胞来源。一些细胞因

子、生长因子通过调控肝星状细胞而在肝纤维化形成中起作用<sup>[6]</sup>。本研究应用基因表达谱芯片技术,筛选人肝再生增强因子(human augments of liver regeneration, hALR)对人肝星状细胞差异表达的基因,为进一步研究hALR分子生物学作用及作用机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 主要材料 FuGENE6转染试剂购自Roche公司;胎牛血清购自Hyclone公司;pcDNA3.1(-)真核表达载体购自Invitrogen公司;重组表达载体pcDNA3.1(-)-ALR为本课题组构建,UNIZol试剂和BiostarH-40S cDNA表达谱芯片均由上海博星基因芯片有限公司提供。人的肝脏星状细胞为首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所提供。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞瞬时转染 用FuGENE6将pcDNA3.1(-)-ALR和pcDNA3.1(-)分别转染35 mm平皿的人HSC细胞。

1.2.2 总RNA提取 按照UNIZol试剂提取方法提取被转染的人HSC细胞的总RNA(实验组和对照组),样品应用分光光度计测260/280 nm波长下的吸收度(A)和比值来测定总RNA浓度和纯度,并用琼脂糖凝胶电泳和保温实验检测总RNA质量。

1.2.3 荧光标记的cDNA探针获得 逆转录标记cDNA探针并纯化,Cy3-dCTP标记对照组,Cy5-dCTP标记实验组,合并对照组和实验组,乙醇沉淀纯化cDNA。

1.2.4 芯片制备 BiostarH-40S cDNA表达芯片包含4096个人类基因,包含原癌基因和抑癌基因、细胞凋亡相关基因、细胞信号转导相关基因等。采用通用引物进行多聚酶链反应PCR扩增。使用点样仪在玻片上进行点样,玻片经处理后,晾干备用。

1.2.5 预杂交、杂交及洗涤 将已变性的预杂交液加到玻片点样区域内,盖上盖玻片,放入杂交箱内42℃预杂交5~6小时。将预杂交的玻片取出,用ddH<sub>2</sub>O冲去盖玻片;将探针置于95℃水浴中变性2分钟;玻片置于95℃水浴中变性30秒,玻片取出浸无水乙醇30秒,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℃杂交箱内杂交过夜

(16~18小时)。洗片后,晾干后扫描。

1.2.6 基因表达谱检测与分析 应用美国General Scanning公司的基因芯片专用检测系统ScanArray 3000扫描杂交后芯片。用GenePix Pro 3.0图像处理软件对扫描图像进行分析,可以得到芯片上每个基因点的原始信号值,根据这些原始信号值进行后续的数值分析。测得Cy3、Cy5两种荧光信号的强度值,计算Cy5/Cy3比值。

## 2 结果

2.1 总RNA样本质量分析 实验组和对照组的总RNA的A260/A280的比值为1.7~2.2。总RNA电泳图谱有清晰的28 S、18 S条带,而且28 S条带的宽度和亮度是18 S条带的两倍,保温实验前后的电泳图谱无明显差异,以上结果均说明获得高质量的总RNA。

2.2 差异表达基因分析 通过芯片图像分析软件对芯片灰度扫描图进行分析,计算每个基因点在本次实验中的表达差异值Ratio(Ratio = Cy5/Cy3)。筛选出Ratio > 2或< 0.5的基因点,即为差异表达的基因,按此阳性标准,从4096个基因中筛选出差异表达基因共27条,其中实验组中有25条表达减弱、2条表达增强,如表1、表2所示。

## 3 讨论

开始对ALR的认识源于对肝再生现象的研究,从最初的肝刺激物(hepatic stimulating substance, HSS)的发现至今,对ALR的研究已有30多年。ALR为进化保守的功能基因家族,各种属ALR/ERV1具有高度同源性。ALR是黄素依赖性巯基氧化酶且具有细胞色素C还原酶活性,羧基端的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,进而调控细胞的生长、增殖及凋亡<sup>[7,8]</sup>。

各器官组织中均存在ALR,以肝脏、睾丸、肾脏表达量最著,表明ALR具有多种生物功能。ALR与线粒体的生成、细胞分裂周期调节、肝、肾、睾丸的发育均有密切关系<sup>[2,9,10]</sup>。

动物模型研究证实,ALR在各种原因引起的肝损伤的修复过程中,均具有明显的促进肝细胞再生和受损肝脏再生的作用<sup>[2-4]</sup>。ALR水平在急、慢性肝

表 1 表达显著减弱的基因

序号	GenBank	基因名称	Cy3/Cy5比值
1	NM_014991	WDFY3, 转录变异体1	0.251
2	BC010132	含有KH结构域的RNA结合、信号转导相关因子1	0.286
3	AK092204	FLJ34885 fis	0.287
4	BX647463	DKFZp686I10110	0.295
5	BC045686	细胞周期末期促进复合物亚基5 (ANAPC5)	0.296
6	AK127017	FLJ45073 fis	0.317
7	CR627407	DKFZp686M148	0.341
8	BC091489	ZMYND11	0.351
9	NM_013336	Sec61 $\alpha$ 1	0.376
10	NM_022170	Williams-Beuren综合征染色体1 (WBSCR1), 转录变异体1	0.384
11	BX537657	DKFZp686I1394	0.394
12	BC042297	上游结合转录因子, RNA聚合酶 I	0.396
13	AK001505	FLJ10643 fis, 高度类似人类 I -1受体候选蛋白	0.417
14	BC045632	通用转录因子 II	0.423
15	NM_001130	裂片氨基末端增强因子 (AES)	0.455
16	AK127038	FLJ45094 fis	0.464
17	NM_199040	Nudix型基序4 (NUDT4), 转录变异体2	0.475
18	AF081195	钙和DAG调节的鸟苷酸转换因子 II	0.480
19	AB029015	KIAA1092 蛋白	0.481
20	XM_496136	预测: 类似MGC9515蛋白	0.483
21	AK125502	FLJ43513 fis, 类似与琥珀酰CoA合成酶 $\alpha$ 亚单位 (SUCLA1)	0.484
22	NM_000302	前胶原肽赖氨酸羧化酶1 (PLOD1)	0.488
23	AB209443	神经细胞黏着分子1, 120 kDa对碘氧基苯甲醚前体变异蛋白	0.492
24	NM_199188	c-Mpl结合蛋白, 转录变异体2	0.497
25	NM_002291	层粘连蛋白B1 (LAMB1)	0.498

表 2 表达显著增强的基因

序号	GenBank	基因名称	Cy3/Cy5比值
1	BC036520	KIAA0251蛋白	2.032
2	AF051151	Toll/IL-1受体样蛋白3 (TIL3)	2.320

炎及肝硬化和肝衰竭患者中均升高, 且可促进肝细胞再生, 降低肝衰竭的病死率<sup>[11,12]</sup>。ALR不仅能促进肝再生和肝细胞的生存, 还能促进Kuffer细胞炎症因子如IL-6和TNF的产生及一氧化氮的释放, 其可能是肝细胞应激和炎症的一种新型生物学标志物<sup>[13]</sup>。ALR还有一定的抗纤维化作用, 对慢性肝病和肝硬化具有治疗作用<sup>[5,14]</sup>。

ALR可以有效地加速庆大霉素诱导的急性肾功能衰竭的肾功能恢复, 与促进肾小管上皮细胞增殖相关<sup>[15]</sup>。缺氧及缺氧复氧均能诱导大鼠肾小管上皮细胞表达ALR增加, 其中缺氧复氧能较早激活ALR表达, 低浓度的外源性ALR减弱p38MAPK 通路的

表达, 提示ALR对缺氧再灌注损伤大鼠肾小管上皮细胞有保护作用<sup>[16]</sup>。ALR在生精细胞发育的早期起着重要作用, 因其缺陷引起的代谢障碍可能是其精子发生障碍的重要机制之一<sup>[10,17]</sup>。

本课题组将hALR重组表达载体pcDNA3.1 (一)-ALR转染人HSC细胞系, 并以转染pcDNA3.1 (一)空白载体的细胞系作为对照, 应用基因表达谱芯片技术, 筛选hALR对人肝星状细胞差异表达的基因, 共筛选出表达增强的基因2种, 表达减弱的基因25种。上调基因之一为Toll/IL-1受体样蛋白3 (Toll/interleukin-1 receptor-like protein 3, TIL3), 即Toll样受体5 (Toll-like receptor 5, TLR5)。TIL<sub>s</sub>

最初是在研究果蝇胚胎腹背侧体轴的形成中发现的, 由于其与IL-1受体在结构、功能、信号转导通路上的诸多相似, 人们将他们归入一个大的信号受体Toll/UIL-1R家族。多项研究证实除与胚胎发育有关外, 这一信号受体家族的成员在机体对抗外来病原体的天然免疫中起到了重要的作用。TIL<sub>s</sub>多表达于树突状细胞等抗原提呈细胞, 主要识别脂多糖等病原体保守结构, 可以促进抗原提呈细胞的成熟。TIL<sub>s</sub>结合配体后, 通过髓分化因子88(MyD88)、NF- $\kappa$ B等多条信号途径, 启动细胞活化进程, 上调MHC和CD80、CD86等共刺激分子表达, 分泌TNF- $\alpha$ 、IL-6等细胞因子。TLR5可以识别细菌的鞭毛蛋白, 介导机体针对鞭毛蛋白的天然免疫防御和炎症反应来抵抗微生物感染<sup>[18,19]</sup>。另一上调基因为KIAA0251, 编码吡哆醛依赖脱羧酶结构域蛋白1(pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1, PDXDC1)具有羧基裂合酶活性, 参与羧酸代谢。

下调的基因中令人感兴趣的基因是编码层粘连蛋白B1(Laminin beta 1, LAMB1)的基因, 层粘连蛋白是细胞外基质成分, 主要存在于基底膜的透明层, 共有A链400 kD, B1链225 kD、B2链205 kD 3条多肽链构成, 各链以二硫键组装在一起。层粘连蛋白在健康人血清中浓度较低, 当肝纤维化时, 其合成增加, 升高幅度与肝组织纤维化程度呈正相关<sup>[20]</sup>。层粘连蛋白参与肝窦毛细血管瘤化, 在肝纤维化过程中有重要的作用。LAMB是层粘连蛋白主要的活性区域, 含有与分布在肿瘤和上皮细胞上的受体高度亲和的配体区, 层粘连蛋白对细胞的黏附、移行和增殖均有影响<sup>[21]</sup>。hALR下调LAMB1的表达可能是其抗纤维化机制之一。

下调的基因中还有PLOD1、ZMYND11等。PLOD1编码蛋白为赖氨酸羟化酶1(lysyl hydroxylase1, LH1), LH主要通过羟化胶原分子中的赖氨酸而影响胶原的合成, 与一些组织纤维化性疾病和遗传性疾病有很大的关系<sup>[22]</sup>。ZMYND11为锌指蛋白基因, 是一种转录抑制因子作用。另外, 还筛选到一些其他与细胞信号转导、能量代

谢、蛋白质合成相关的蛋白编码基因, 如钙和DAG调节的鸟苷酸转换因子(calcium and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor II, CalDAG-GEF II)、Sec61 $\alpha$ 1等。CalDAG-GEF II能使与Ras结合的GDP交换为GTP并激活Ras。Ras在通过受体酪氨酸激酶介导的信号转导中发挥中心作用, 控制细胞的生长和分化。在哺乳动物中, Sec61 $\alpha$ 是Sec61复合体的3个跨膜亚基之一, 每个Sec61 $\alpha$ 蛋白复合物由10个跨膜 $\alpha$ 螺旋组成。真核生物的Sec61通道是一种位于内质网上的跨膜复合体, 其是转运功能蛋白的运输通道<sup>[23]</sup>。

通过基因表达谱芯片技术对pcDNA3.1(一)-ALR转染的人肝星状细胞中存在的差异表达基因的分析, 进一步证实了hALR与细胞信号转导、细胞生长调节、蛋白质合成及运输、能量代谢、免疫调节、肿瘤发生及转移、肝纤维化等密切相关。本实验结果为进一步研究hALR的生物学功能和作用机制提供了线索。

#### 参考文献

- [1] 李曼妮, 苏先狮. 人肝脏再生增强因子对体外肝细胞生长的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2009, 25: 343-345.
- [2] 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.
- [3] Ilowski M, Kleespies A, de Toni EN, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) protects human hepatocytes against apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404: 148-152.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 郭蓉, 阎明. 肝纤维化的细胞和分子机制研究进展[J]. 中国肝脏病杂志(电子版), 2012, 4: 57-62.
- [7] Farrell SR, Thorpe C. Augmenter of liver regeneration: a flavin-dependent sulfhydryl oxidase with cytochrome C reductase activity[J]. Biochemistry, 2005, 44: 1532-1541.
- [8] 潘艳, 佟明华, 鞠桂芝, 等. 人肝再生增强因子CXXC活性结构的研究[J]. 中国生物工程, 2006, 26: 25-28.
- [9] 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.
- [10] 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.



- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Vodovotz Y, Prelich J, Lagoa C, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) is a novel biomarker of hepatocellular stress/inflammation: in vitro, in vivo and in silico studies[J]. Mol Med, 2013, 18: 1421-1429.
- [14] 代文杰, 姜洪池, 吕晓颖, 等. 人肝再生增强因子基因转导对大鼠肝硬化的保护作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9: 210-213.
- [15] 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.
- [16] Liao XH, Zhang L, Liu Q, et al. Augmenter of liver regeneration protects kidneys from ischaemia/reperfusion injury in rats[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25: 2921-2929.
- [17] 陈旋, 张德迎, 刘星, 等. 肝再生增强因子在隐睾生精细胞中的表达及意义[J]. 中华男科学杂志, 2007, 13: 700-705.
- [18] Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5[J]. Nature, 2001, 410: 1099-1103.
- [19] 杨昱, 徐剑铖. Toll样受体5在机体免疫反应中的作用[J]. 重庆医学, 2006, 35: 1231-1233.
- [20] Parsian H, Rahimpour A, Nouri M, et al. Assessment of liver fibrosis development in chronic hepatitis B patients by serum hyaluronic acid and laminin levels[J]. Acta Clin Croat, 2010, 49: 257-265.
- [21] Turck N, Gross I, Gendry P, et al. Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells[J]. Exp Cell Res, 2005, 303: 494-503.
- [22] 谭彬, 罗忠金, 张吉翔. 赖氨酸羟化酶的研究进展[J]. 医学分子生物学杂志, 2005, 2: 220-223.
- [23] Lang S, Benedix J, Fedeles SV, et al. Different effects of Sec61 $\alpha$ , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells[J]. J Cell Sci, 2012, 125: 1958-1969.

收稿日期: 2013-02-24

## · 消息 ·

## 本刊对来稿医学名词和文字的要求

来稿中医学名词要求: 应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词, 可选用最新版《医学主题词表(MeSH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对没有通用译名的名词术语于文内第一次出现时应注明原词。中医名词术语按GB/T 16751.1/2/3-1997《中医临床诊疗术语疾病部分/证候部分/治法部分》和GB/T 20348-2006《中医基础理论术语》执行, 腧穴名称与部位名词术语按GB/T 12346-2006《腧穴名称与定位》和GB/T 13734-2008《耳穴名称与定位》执行。中西药名以最新版本《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。确需使用商品名时应先注明其通用名称。中药应采用正名, 药典未收录者应附注拉丁文名称。

来稿中文字要求: 严格执行《中华人民共和国国家通用语言文字法(2000-10-31)》和新闻出版总署2010年12月24日发布的《关于进一步规范出版物文字使用的通知》, 以及1992年新闻出版总署、国家语言文字工作委员会发布的《出版物汉字使用管理规定》, 以1986年10月国家语言文字工作委员会重新发布的《简化字总表》和1988年3月国家语言文字工作委员会和新闻出版总署发布的《现代汉语通用字表》为准。

本刊编辑部