

大鼠短间隔连续部分肝切除上调表达基因的克隆与分析*

李玉昌^① 徐存拴^① 林俊堂^① 张会勇^① 李文强^① 魏明旭^① 张云汉^②

(① 河南师范大学生命科学学院 新乡 453002; ② 河南省肿瘤病理重点实验室 郑州 450052)

摘要:以短间隔连续部分肝切除 112 h 为试验方,以 0 h 对照为驱动方,应用抑制性消减杂交技术构建了高效率的正向消减 cDNA 文库,从中随机挑取的 50 个克隆中有 45 个包含了 100 ~ 350 bp 插入片段,对这些片段进行测序后经 GenBank blast 同源性检索,表明 8 个片段均为未知新序列。大鼠短间隔连续部分肝切除后肝再生 cDNA 正向消减文库的建立和未知的上调表达基因片段的克隆为研究肝再生的分子机理奠定了基础。

关键词:短间隔连续部分肝切除;抑制性消减杂交;肝再生;大鼠

中图分类号:Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2003)01-22-05

* 国家自然科学基金资助项目(No.39970362),河南省重大科技攻关项目(No.0122031990);

第一作者介绍 李玉昌,男,30岁,博士;研究方向:细胞分化和去分化分子生物学;E-mail:yeli-vs@yahoo.com。

收稿日期:2002-02-20,修回日期:2002-11-01

Screening and Identification of Up-regulated Expressed Genes by Suppression Subtractive Hybridization in Rat Liver Regeneration after Short Interval Successive Partial Hepatectomy

LI Yu-Chang^① XU Cun-Shuan^① LIN Jun-Tang^① ZHANG Hui-Yun^① LI Wen-Qiang^①
WEI Ming-Xu^① ZHANG Yun-Han^②

(^① College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453002;

^② Henan Key Laboratory for Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: In this study, suppression subtractive hybridization (SSH) was carried out using normal rat liver tissue as the driver and the 112 h tissue following short interval successive partial hepatectomy (SISPH) as the tester to establish a highly efficient forward-subtractive cDNA library. After screening, 45 of 50 clones derived from the cDNA library were inserted into 100–450 bp cDNA fragments. Among these up-regulated clones, 8 cDNA fragments were from unknown sequences (GenBank accession number: BM403207, BM403208, BM403209, BM403210, BM285361, BM285365, BM285369, BM2853).

Key words: Short interval successive partial hepatectomy; Suppression subtractive hybridization; Liver regeneration; Rat

肝脏是哺乳动物体内惟一能再生的器官,自从 Higgins^[1]建立一次性大鼠肝切除 (partial hepatectomy, PH) 模型以来,这一模型已在研究哺乳动物组织和器官的重建、细胞增殖、分化与去分化、生理生化调控等方面得到了十分广泛的应用^[2]。但由于肝再生的多层次性和复杂性,人们至今难以解释具有器官特异性的肝再生的分子机制,为了更好地分析一次性部分肝切除模型所揭示的生物学问题,人们建立了一些连续部分肝切除模型,如各次部分肝切除时间间隔多于 3 周的长间隔连续部分肝切除 (long interval successive partial hepatectomy, LISPH)^[3]、各次部分肝切除时间间隔为 4 和/或 36 h 的短间隔连续部分肝切除 (short interval successive partial hepatectomy, SISPH) 模型^[4],因为部分肝切除后肝细胞的增殖启动、去分化、分裂和再分化等过程主要发生在部分肝切除后的 144 h 以内,所以研究 SISPH 中各关键点肝脏的组织、结构和生化变化,无疑能为分析肝再生的机理提

供有用资料。本研究首次以徐存拴等建立的 SISPH 模型中的 112 h (即 4 ~ 36 ~ 36 ~ 36 h) 的肝组织为实验材料,应用抑制性消减杂交技术构建了由正常肝组织和 SISPH 112 h 肝组织的正向 cDNA 消减文库,并从中克隆出了 45 个上调表达的 ESTs,为进一步研究肝再生的分子机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 大鼠肝切除和正常肝组织材料 SD 纯系大鼠由河南师范大学生命科学学院实验动物房提供,体重 200 ~ 250 g。按徐存拴等^[4]方法进行 0 ~ 4 ~ 36 ~ 36 ~ 36 h 肝切除,分别取肝脏左外叶 (对照)、左中叶和中叶 (第 1 次部分肝切除后恢复 4 h 材料)、右叶 (第 2 次部分肝切除后恢复 36 h 材料)、尾状叶 (第 3 次部分肝切除后恢复 36 h 材料) 和蒂状叶 (第 4 次部分肝切除后恢复 36 h 材料),将对照和第 4 次肝切除材料于 4℃ 预冷的 PBS 中洗涤,液氮速冻, -80℃ 保存。

1.2 mRNA 提取和定量 分别取正常对照和 SISPH 后 112 h 的肝组织 0.25 g, 加裂解液后匀浆, 总 RNA 和 mRNA 分别用 Gibco BRL 公司的 Trizol 试剂盒和 Promega 的 polyAT Tract mRNA

接头 1: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGG CAGGT -3'

接头 2: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

cDNA 合成引物: 5'-TTTTGTACAAGCTT₃₀N1N-3'

引物 1: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

巢式引物 1: 5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT-3'

巢式引物 2: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3'

1.4 SISPH 中 0 和 112 h 正向消减文库的建立

以正常肝组织为对照群体 (driver), 以 SISPH 后 112 h 肝组织为目标群体 (tester), 应用 Clontech PCR select™ cDNA Subtraction Kit (cat # k1804-1), 50 × PCR Enzyme Mix 进行 SSH 操作。取 poly(A⁺) RNA 和 cDNA 合成引物于 70℃ 退火结合 2 min, 用 MMLV 200 U 于 42℃ 延伸 1.5 h 加入 DNA 聚合酶 I, RNaseH, *E. coli* DNA 连接酶, dNTP, 16℃ 孵育 2 h 后加入 T₄ DNA 聚合酶, 16℃ 再反应 30 min 后, 乙醇和乙酸钠沉淀 dscDNA, 并溶于 50 μl 水中。将 dscDNA 用 *Rsa* I 在 37℃ 下酶切 5 h 后, 将 Tester dscDNA 分为两组, 分别与 Adaptor1, 2 连接, 16℃ 反应过夜后进行连接效率检测。将连接有 Adaptor1 和 2 的 tester dscDNA 分别与 Driver dscDNA 在 68℃ 下杂交 8 h 后, 立即将两组体系混合, 加入新变性的 Driver cDNA, 68℃ 再次杂交过夜。取稀释后的第 2 次杂交后的产物, 在 50 × Advantage Klen *Taq* 聚合酶作用下, 以试剂盒里提供的引物 1 为引物进行第 1 次 PCR 扩增, 再以巢式引物 1 和引物 2 为内引物进行第 2 次 PCR 扩增。Tester 对照 (1-c) 不进行消减而直接进行两次 PCR, 得到非抑制性消减 PCR 产物。对消减文库用 *G3PDH* 基因引物扩增进行消减效率的检测, 各取 1 μl 消减 PCR 产物和非抑制性消减 PCR 产物为模板, 分别用持家基因 *G3PDH* 的引物进行 PCR 扩增, 在 18、23、28、33 个循环结束时从体系中吸取 5 μl 进行 2.0% 电泳检测。

1.5 消减文库的筛选与克隆分析 将 PCR 扩

分离试剂盒, mRNA 定量用 Toshiba 紫外分光光度计。

1.3 接头与引物

增后的正向消减 cDNA 文库用 Qiagen 公司的 PCR Purification kit 纯化后, 与 pGEM T 载体 (Promega) 连接, 4℃ 过夜。转化受体菌 JM109 并进行蓝白斑筛选 (X-gal/IPTG), 随机挑取 50 个清晰的白色菌落, 扩大培养后按 Sambrook 等^[5]的方法制备质粒, 以巢式引物 1 与巢式引物 2 进行扩增, 将有清晰单条谱带出现的质粒送 TaKaRa (大连) 测序, 测序结果送 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行同源性检索, 确认为新序列后, 递交给 GenBank。

2 结果与分析

2.1 mRNA 的定量分析 分别取正常肝组织和 SISPH 后 112 h 肝组织 mRNA 4 μl 稀释至 50 μl, 用紫外分光光度计 (Toshiba) 检测显示正常肝组织 mRNA $OD_{260/280} = 1.73/0.85 = 2.035$, SISPH 后肝组织 mRNA $OD_{260/280} = 1.54/0.79 = 1.95$, 两者显示 poly(A⁺) RNA 分别为 0.87 μg/μl 和 0.77 μg/μl, 符合做抑制性消减杂交的条件。

2.2 cDNA 消减文库的构建及消减效率鉴定

图 1 为正常肝组织与 SISPH 后 112 h 肝组织 cDNA 经抑制性消减杂交后建立的正向消减电泳图, 可见未经消减的对照 PCR 产物的分子量分布范围比消减后的 PCR 产物分子量的范围广泛。用持家基因 *G3PDH* 引物进行消减效率的检测见图 2, 结果显示抑制性消减 PCR 产物中 *G3PDH* 基因产物远不如非抑制性消减 PCR 产物条带亮, 这说明构建的消减文库具有很高的消减效率。

2.3 cDNA 正向消减文库中克隆的筛选及序列鉴定 cDNA 消减文库经连接、转化、筛选后,从平板上挑取 50 个清晰饱满的白色克隆,扩大培养后制备质粒,用巢式引物 1 和 2 进行扩增,结果显示 50 个克隆中有 45 个克隆插入了 100

~ 350 bp 大小的外源片段,如图 3 所示。测序结果显示 37 个序列与公共数据库中的已知序列有较高的同源性,8 个 cDNA 插入片段经 GenBank 检索后鉴定为未知 EST (expressed sequence tags) 序列(表 1),现已被 GenBank 收录。

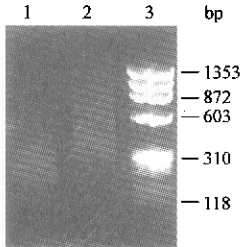


图 1 正向消减巢式 PCR 产物分析

1. 抑制性消减 PCR 产物; 2. 非抑制性消减 PCR 产物;
3. PCR 标准分子量

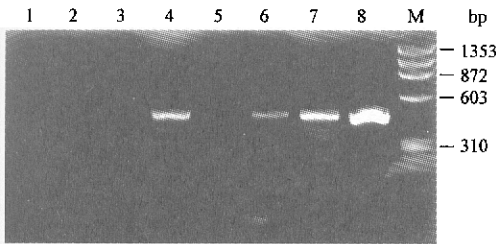


图 2 消减文库效率分析

1~4. *G3PDH* 5'和 3'抑制性 PCR 产物,扩增循环分别为 18,23,28,33 个;5~8. *G3PDH* 5'和 3'非抑制性 PCR 产物,扩增循环分别为 18,23,28,33 个;
M: PCR 标准分子量

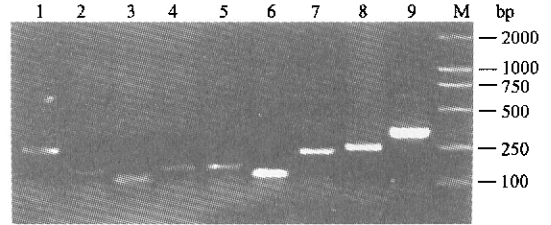


图 3 外源片段 PCR 扩增产物凝胶电泳
1~9. 筛选的阳性克隆; M: PCR 标准分子量

表 1 大鼠连续部分肝切除后肝再生中新发现的基因片段

Clone ID	Length(bp)	GenBank accession number	DbEST number
EST00001	98	BM285361	10691382
EST00002	106	BM285365	10691386
EST00003	132	BM285369	10691390
EST00004	106	BM285370	10691391
EST00005	286	BM403207	10875700
EST00006	284	BM403208	10875701
EST00007	304	BM403209	10875702
EST00008	114	BM403210	10875703

这些已注册的 EST 分别对应于图 3 泳道中的 3、2、5、6、8、1、9、4。它们的碱基序列分别为:

BM285361:

ACTCCTACAGCACCCTGCTGTCGTCAGTAACCCCCAGAAGTCTGAGGGACCCAGCCCA
GGAGGACCAGGATCTTGCCAAAGCAGTAGCTTCCCATTTGT

BM285365:

ACTTGCACCAGCCGGAAAGGTGAAAATCCTGGAGGCCCTAGAAAATCATCATGTCTAGCG
CTTGGCATCTGACAGTCCGGACGACTTTGTTCTCCCAAGGTCTCATGT

BM285369:

AGTGGATCGGGAAGCACCCGGCCGCGGACTGTGCTTTTCCAAGCGAAGGAGAATA
TGATCCGTCGCCTGGAGGTGGAGGCCGAGAACCACTACTGGCTGAGCATGCCCTACAT
GACACGGGAGCAGGACT

BM285370:

ACATGAGACCTTGGGAGAACAAAGTCGTCGCCGACTGTCAGATGCCAAGCACTAGATAT
GATGATTTCTAGGCCTCCAGGATTTTACCTTTCCGGCTGGTGGCAGT

BM403207:

TTTTTTTTTTTTTTTTCTTTATTAATCAGGTTTGCTTTAATAAGATACTGGTCCGATGGGCT
 CACACTGGTACATAAAATTACATTTTCTCAGCTCCAGGACCAAGTAAGGACAGAGCAGTCTA
 TTATCCGTGATCTTGAAGGGTGTGCGATTCTGGGTTAGGACCAATTTCTTCGAGATGTTGAGA
 TGGTCTAGCTGGTCTGCAAATGTATCTATGCTTAGGGAACCTTCGAGCTGGCTGCTGCCTGA
 TGGCCTCAAAGCCTGGGCCCTTCGCTCTGCGGCGTGGCCGT

BM403208:

TCTGATATAGCTGTGGTGGCCAGGGGCTGGATGGACAATCGCTTCAAATCCCTGAAAGGCTA
 CTGGAGCAAGTTCACCTGATAAGTTCACCTGGCCCTCTGGGAGTCTGGCCCTGAGGACCAACTAA
 CAACACCAACTCTTGAGCCGTGAGACCTCCATGTTCCAGATGTGTCTGGCCATCTATCCTGC
 TGCCTCCGAAGGTTGCTCTAAGGGGAAAGTATATTCTCATGCCTTTATCCCTCCCAGACCT
 CACCTAAGCATGCTGTCCCTAATAAGGCTGGACGCA

BM403209:

GGTGTCCAGCTTTATTAGGGACAGCATGTTTAGGTGAGCTCTGGGGAGGGATAAAGGCATGA
 GAATATACTTTCCCCTTAGAGCAACCTTCGGAGGCAGCAGGATAGATGGCCAGACACATCTG
 GAACATGGAGGTCTCACGGCTCAAGAGTTGGTGTGTTAGTTGGTCTCAGGGCCAGACTCC
 CAGAGGCCAGTGAACCTTATCAGTGAACCTTGCTCCAGTAGCCTTTCAGGGATTTGAAGCGATT
 GTCCATCCAGCCCCTGGCCACCACAGCTATATCAGACTCCTGCTCCGCTGTATGA

BM403210:

CGAATTGGCCAAGTGAGCTCGAATTGCGGCCCGCATGCATAAGCTTGCTCCAGTCTAGAGTCC
 ACTGGGCCGAGGCGGCCGACATGTT

3 讨论

抑制性消减杂交技术^[6] (suppression subtractive hybridization, SSH)是新近发展起来的一种差减杂交技术,它主要用于分离两个有细微差别的群体间差异表达的基因,它最大的技术特点有:①消减杂交;②抑制 PCR。与以往的差减杂交相比,其最大的优点有:①具有极高的消减效率;②对高丰度和低丰度表达的 mRNA 均可有效克隆,这主要取决于 SSH 技术第一次杂交的归一化过程。SSH 技术刚刚问世就很快得到从事分子生物学研究者的青睐,除了因为它能高效地批量克隆差别表达的 ESTs 外,它还可以与 RACE (rapid amplification of cDNA end)、cDNA 文库筛选、cDNA 微阵列、高通量 Northern 等技术相结合,在短时间内即可获得全长 cDNA 基因, Diatchenko^[6]、Von stein^[7]、Kuang^[8]、Pitzerc^[9] 等以 SSH 与上述技术相结合,相继发现了一些在 GenBank 中尚未登录的新基因。本课题组以 SSH 与 RACE PCR 及 cDNA 文库筛选相

结合,在较短的时间内已克隆到一个全新的 cDNA 全长和 10 余个有物种差异的在大鼠中从未报道的新基因,这无不说明了 SSH 是一种高灵敏度的有效的克隆和鉴别差异表达基因的方法。

作者用来自同一群体的大鼠正常和 SISPH 后的肝组织材料,借助于 SSH 技术构建了正向消减 cDNA 文库,消减效率分析表明所构建的 cDNA 文库是高度特异的。文库片段经纯化、亚克隆、筛选、测序及 blast 同源性检索,在极短的时间内即分离到 45 个表达上调的 EST 片段,这些 EST 片段既有与肝再生报道的一些相关的基因,也有一些在肝再生中未报道过的基因,如由于手术引起机体损伤后表达上调以及在肝再生中起作用的主要急性反应 α -1 蛋白 (major acute phase alpha-1 protein) (表中 EST00002)^[10]、T-激肽原 (EST00004),激肽原由肝细胞合成,只在大鼠中存在,是一种强烈的 Cys 蛋白酶抑制剂,属于半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族。有如下功能:①凝固过程中的辅因子;②半胱氨酸蛋白

酶的抑制子;③参与急相反应这些激肽是潜在的血管活化肽,具有诸多特性,包括增加血管透性、抑制血管舒张、疼痛、平滑肌收缩、刺激花生四烯酸代谢,同时 ODC(鸟苷酸脱氢酶)活性增加,而 ODC 是 DNA 合成的前体,因此 T-激肽原的上调表达可能与肝再生中细胞分裂增强有关^[11]。EST00003 与小鼠线粒体核糖体蛋白 63 有 95% 的同源性,它的上调表达可能预示着 SISPH 后肝组织需要合成大量的蛋白质以弥补体内所需。EST00006、EST00007 与大鼠载脂蛋白 C-III 有极高的同源性,它们的上调与抑制肝脏摄取脂蛋白有关,在肝再生中的具体功能有待进一步研究。EST00001 与大鼠中甲状腺素转运蛋白有 100% 的同源性,肝组织中甲状腺素转运蛋白的上调表达,推测其作用有:① 打破了肝再生刺激因子与抑制因子的平衡作用,使肝再生去分化增强;② 影响酶的诱导与氧的消耗,PH 后造成肝脏局部缺氧从而使线粒体代偿性呼吸作用增强^[11]。EST00005 和 EST00008 在 GenBank 中未找到与大鼠同源的序列,它们的上调可能预示着新的基因在肝再生中表达。总之,SISPH 后的肝再生过程是一个复杂的受到精细调控的过程,肝切除后几乎调动了所有与肝再生有关的因素参与肝细胞的去分化、细胞分裂和增殖,并且依赖于肝实质细胞、肝间质细胞及细胞外基质与某些肝外组织来源的因子、营养物质和激素,通过旁分泌、自分泌和内分泌的协同作用来完成,作者采取的短间隔连续部分肝切除模型一方面还需不断完善,另一方面,由于 SSH 方法本身的原因,一次性得到的结果并不能说明肝特异表达基因的全貌,所以关于肝再生的分子机理必须用整体的策略(包括肝

胞源、血源、营养物质、代谢方式等)进行全面的

参 考 文 献

- [1] Higgins G M, Anderson R M. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 1931, **12**: 186 ~ 202.
- [2] Michalopoulos G K, DeFrances M C. Liver regeneration. *Science*, 1997, **275**: 60 ~ 66.
- [3] 吴毅平, 吴在德. 大鼠反复肝切除模型的建立及其意义. *中华实验外科杂志*, 1997, **14**(1): 53 ~ 55.
- [4] 徐存拴, 李永辉, 段瑞峰等. 短间隔连续部分肝切除对大鼠生存和肝组织结构的影响. *动物学报*, 2001, **47**(6): 659 ~ 665.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 18 ~ 24.
- [6] Fabrikant J L. The kinetics of the cellular proliferation in the regeneration liver. *Cell Biol*, 1968, **36**: 551 ~ 557.
- [7] Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M A. High through put screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(13): 2 598 ~ 2 602.
- [8] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, et al. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**(4): 16 ~ 23.
- [9] Pitzer C, Stassar M, Zoller M. Identification of renal-cell-carcinoma-related cDNA clones by suppression subtractive hybridization. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1999, **125**(8 ~ 9): 487 ~ 492.
- [10] Friedman J M, Chung E Y, Darell J E Jr. Gene expression during liver regeneration. *J Mol Biol*, 1984, **179**(1): 37 ~ 53.
- [11] 曾民德, 萧树东主编. 肝脏与内分泌(第二版). 北京: 人民卫生出版社, 1997. 19.