

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00123

NF- κ B 通过调控早期反应基因-2 参与小鼠肝再生启动

陈欢[△], 许青[△], 董瑞琦, 杨生生, 缪明永, 焦炳华*

第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 结合基因芯片技术、生物信息学分析和染色质免疫共沉淀技术分析小鼠肝再生启动阶段的差异表达基因,并探讨其调控方式。**方法** 采用小鼠全基因组基因表达谱芯片检测并验证肝再生启动阶段 2 组差异表达基因;应用基于 TRANSFAC 数据库的 PAINT 对差异表达基因进行转录调控分析;最后运用染色质免疫共沉淀技术验证 NF- κ B 的潜在靶基因。**结果** 肝切后 4 h 小鼠差异表达基因共 332 个(上调 127 个,下调 205 个),其中早期反应基因-2(immediate early response 2, IER2)上调约 5 倍;对所有差异表达基因进行 PAINT 分析,预测到多个转录因子如 Stat 家族和 NF- κ B 均参与差异表达基因调控网络;免疫共沉淀技术证实 IER2 受 NF- κ B 调控。**结论** NF- κ B 可能通过调控 IER2 参与肝再生启动。

[关键词] 微阵列分析;肝再生;IER2;NF- κ B

[中图分类号] R 334.4

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)02-0123-05

Nuclear factor κ B participates in liver regeneration through regulating immediate early response 2

CHEN Huan[△], XU Qing[△], DONG Rui-qi, YANG Sheng-sheng, MIAO Ming-yong, JIAO Bing-hua*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the differentially expressed genes and their regulatory network during priming phase of liver regeneration in mice using gene chip technology, bioinformatic analysis, and chromatin immunoprecipitation methods. **Methods** Liver tissues of mice from post-hepatectomy and sham groups were processed for microarray to detect the differentially expressed genes. PAINT analysis based on TRANSFAC database was used to analyze the transcription regulatory network for differentially expressed genes. Chromatin immunoprecipitation was employed for the verification of the target genes of NF- κ B. **Results** A total of 332 genes were differentially expressed during the priming phase of liver regeneration, with 205 down-regulated and 127 up-regulated. The immediate early response 2 (IER2) was increased by about 5 folds. PAINT analysis showed that several transcription factors such as Stat family and NF- κ B participated in the regulatory network of these genes. Chromatin immunoprecipitation demonstrated that IER2 was regulated by NF- κ B. **Conclusion** NF- κ B participates in priming phase of liver regeneration through regulating IER2.

[Key words] microarray analysis; liver regeneration; IER2; NF- κ B

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):123-127]

肝部分(70%)切除术后数分钟到数小时内,肝实质细胞和非实质细胞内有大量信号分子迅速被激活,如 TNF- α 、IL-6、NF- κ B、AP-1、SRF 等^[1],随后多条信号通路被激活并成功启动肝再生。NF- κ B 作为即早基因(immediate early genes, IEG)在肝再生启动阶段发挥重要作用。其中 TNF- α -NF- κ B 通路的靶基因有 IL-6、iNOS、MMPs 和 cyclin D 等,它们能抵抗 TNF- α 诱导的细胞凋亡作用,促进细胞周期进程,恢复肝细胞功能^[2-3]。由于 NF- κ B 作为转录因

子,参与了复杂的基因表达调控,目前可能仍存在许多尚未被认知的靶基因参与了肝再生的启动过程。因此,本研究结合应用表达谱芯片、PAINT 生物信息学分析和染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)技术系统研究 NF- κ B 在肝再生启动过程中的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 动物来源及分组 6 只 BALB/c 小鼠由第二

[收稿日期] 2009-09-10 **[接受日期]** 2009-11-13

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(30800553)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30800553)。

[作者简介] 陈欢, 博士生, 助教, E-mail: chenhuansym@hotmail.com

[△]共同第一作者(Co-first authors)。

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-65493936, E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

军医大学实验动物中心提供,体质量 20~24 g,随机分为 2 组,分别进行 70% 肝切除术和假手术,肝切除 (PH)组和假手术(SH)组各 3 只小鼠。术后 4 h 收集肝组织样本。

1.2 组织块总 RNA 的提取和测定 采用 TRIzol (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) 一步法提取组织块中的总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 NucleoSpin RNA clean-up 试剂盒(MA-CHEREY-NAGEL, Germany)对总 RNA 进行过柱纯化,测定浓度和 D_{260}/D_{280} ,并电泳检测 RNA 的完整性。RNA 分光光度计进行 RNA 定量时, D_{260}/D_{280} 为 1.8~2.0, 甲醛变性凝胶电泳 28S 和 18S rRNA 比值约为 2.0。

1.3 基因芯片及相关试剂 基因芯片采用博奥生物有限公司的小鼠全基因组寡核苷酸微阵列芯片,该芯片共有 32 000 条 70 mer 长度的寡核苷酸,每条寡核苷酸探针代表一个小鼠基因或转录本,小鼠全基因组寡聚核苷酸库购自德国 Operon 公司。整个芯片实验的详细过程参见文献[4]。取 5 μ g 总 RNA 作为模板反转录合成双链 cDNA,通过体外转录技术(IVT)进行扩增形成 cRNA,然后通过随机引物反转录并使用 dCTP-Cy3 和 dCTP-Cy5 (GE healthcare)进行标记。对照和实验组标本分别标记 Cy3 和 Cy5,每对样品同时做荧光交换。

1.4 生物芯片扫描及数据分析 芯片杂交后,利用 LuxScan 10K (博奥生物)激光共聚焦扫描仪对芯片进行扫描,通过 LuxScan 3.0 软件(博奥生物)提取芯片数据,然后用 lowess 回归进行芯片数据归一化处理,计算芯片上每个基因的比值。以比值 >2 或小于 0.5 并且重复试验的 $P < 0.05$ 作为筛选差异表达基因的标准。为了更加深入地分析差异表达基因的功能,我们通过 MAS 软件 (Molecular Annotation System, <http://bioinfo.capitalbio.com/mas>),对肝切 4 h 后相关基因差异表达谱进行基因作用路径 (pathway) 分析,探讨肝再生初期相关差异表达基因可能参与的信号路径。

1.5 PAINT 生物信息学分析 PAINT (Promoter Analysis and Interaction Network Generation Tool) 是一个基于 TRANSFAC 数据库,自动分析目标基因的启动子区域与转录因子相互作用的生物信息学工具。我们将差异表达基因导入到 PAINT 的分析网站 (<http://www.dbi.tju.edu/dbi/tools/paint/>),对目标基因上游启动子 1 kb 内的序列进行转录因子结合位点分析和评价,提示差异基因可能参与的调控网络。具体操作方法参见文献[5]。

1.6 逆转录及 real-time PCR 为了验证表达谱芯

片结果,选取 3 个上调约 5 倍的基因用 real-time PCR 的方法进行重复验证。取 1 μ g 模板 RNA, 1 μ l 随机引物,参照 Fermentas MBI 逆转录试剂盒 (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) 说明进行操作,合成 cDNA 链。随后用 ABI 试剂盒进行 β -actin、早期反应基因-2 (immediate early response 2, IER2) 扩增。用 Primer Express 软件设计引物: β -actin-1、 β -actin-2、IER2-1、IER2-2、IER2-3、IER2-4、Jun-1、Jun-2、Fos-1、Fos-2 (表 1)。Real-time PCR 反应总体积为 20.0 μ l, 含 1 μ l DNA 模板, 10 μ l 的 MasterMix 缓冲液, 0.2 μ l 20 mmol/L 的上下游引物, 9.6 μ l dd H₂O。采用 ABI7300, 按照机器说明书进行 40 个循环 (96 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s)。用 Light Cycler Software version 3.5 进行数据分析。

表 1 QRT-PCR 和 ChIP 所用引物序列
Tab 1 Primers used in QRT-PCR and ChIP

Primer	Sequence (5'-3')
β -actin-1	GAT GGT GGG AAT GGG TCA GA
β -actin-2	TCC ATG TCG TCC CAG TTG GT
IER2-1	CCT TTC AAG GCC GTT TCA CTA C
IER2-2	ACC CAC GCA AGG CAA CAG
IER2-3	ATT AGC AGG CTG GTA GGC
IER2-4	CCT TAA AGC AAT AGG GAT AA
Jun-1	CGC GGA CTC CGG ACT GTT
Jun-2	AAG GCG GGA GAA GGG ACT CT
Fos-1	CAG AGC GGG AAT GGT GAA GA
Fos-2	TTC CGT TCC CTT CGG ATT CT

1.7 染色质免疫共沉淀 染色质免疫共沉淀实验过程参见文献[6]。(1)组织处理和甲醛交联。组织经液氮研磨和匀浆处理后经 1% 甲醛室温交联 10 min,加入终浓度为 0.2 mol/L 的甘氨酸处理 5 min 终止交联。(2)基因组 DNA 超声破碎。将组织裂解后重悬在 SDS 裂解液中,超声后离心收集上清。(3)染色质免疫共沉淀。上清稀释在 IP dilution buffer 中,然后加入 NF- κ B 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。(4)DNA 回收。加入 Protein A(G)包被的磁珠反应 2 h,然后清洗。沉淀下来的 DNA 通过洗脱缓冲液进行洗脱,在洗脱下来的 DNA 加入终浓度为 1.0 mg/ml 蛋白酶 K, 65 $^{\circ}$ C 孵育 6 h,解交联后的 DNA 纯化后供后续的 PCR 反应。ChIP-PCR 检测 IER2 所用引物 IER2-3、IER2-4。

2 结果

2.1 肝再生启动阶段的转录组变化 与 SH 组相比,肝切后 4 h 的 PH 组小鼠差异表达基因共 332 个,其中上调基因 127 个,下调基因为 205 个(图

1A), 这些差异表达基因有许多是与应激反应、信号转导以及细胞代谢相关的基因。图 1B 可看出表达变化基因数量较多的通路有 MAPK 相关通路, 细胞因子及其受体通路以及凋亡相关通路等。由图 1C

可见, PH 组的 IER2、Jun 和 Fos 的表达均上调, 且倍数与芯片结果相吻合, 其中 Jun 和 Fos 也与文献^[1-2]报道变化一致。

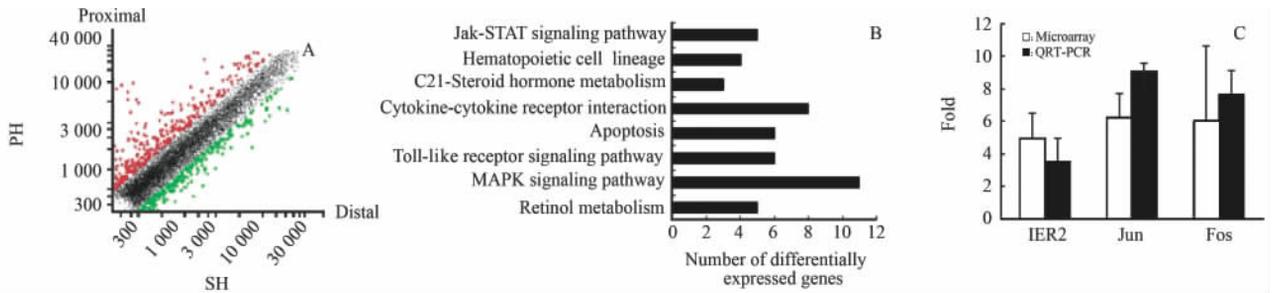


图 1 肝再生启动阶段的转录组变化

Fig 1 Transcriptome changes during priming phase of liver regeneration

A: Scatterplot of microarray result. Red and green spots respectively stand for up-regulated and down-regulated genes in PH group compared with SH mice. B: Significant pathways with $P < 0.001$ analyzed by MAS software (<http://bioinfo.capitalbio.com/mas>). C: Validation of differentially expressed genes using QRT-PCR method. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 差异表达基因转录调控分析和验证 PAINT 分析结果表明: 共调控这些基因的转录因子包括 Pax-3、Stat 家族、FOXD3、c-Rel 等, 其中 Stat3 与肝再生启动的关系已经有相关报道^[1-2]。c-Rel 作为 NF- κ B 的亚基之一, 也在肝再生起始过程中发挥重要作用。分析结果显示, c-Rel 调控的基因有 30 多个, 包括已知的 Fos、Jun 等, 其中早期反应基因 IER2 的调控排在最高分端(图 2)。

录起始位点上游 1 kb, 下游 200 bp) 进行了 c-Rel 结合位点的分析工作, 在 -294 bp 处找到了 NF- κ B 的结合位点 CGG GTT TTC C。

免疫共沉淀实验结果如图 3B 所示, 在 SH 组, 由于 NF- κ B 处于非活性状态, 所以非特异 IgG 对照与抗体富集的 DNA 含量相似; 在 PH 组, NF- κ B 的激活是保证肝再生顺利启动的关键因子, 特异性抗体富集的样品经过 IER2 的启动子区引物扩增后, 其电泳条带的亮度明显高于非特异 IgG 组, 证明 IER2 确实受到 NF- κ B 的调控。

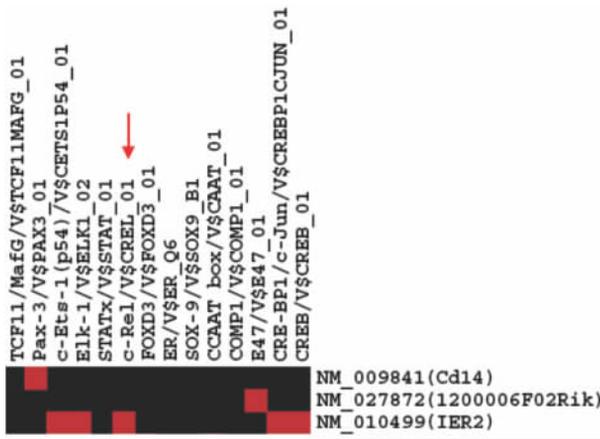


图 2 差异表达基因的 PAINT 生物信息学分析

Fig 2 PAINT analysis of differentially expressed genes

IER2 is a potential target gene regulated by c-Rel (red arrow)

为了进一步通过实验证明 IER2 基因是否受到 NF- κ B 调控, 我们对 IER2 的基因结构进行了分析(图 3A), 成熟的 IER2 mRNA 包括了约 1.5 kb 的编码区(图中黄色区域)以及 3' 和 5' 的非翻译区(图中蓝色区域)。我们对 IER2 基因的启动子区域(转

3 讨论

肝细胞作为终末分化细胞, 在正常情况下处于 G₀ 期。当受到肝损伤如 70% 肝切除术, 肝细胞立即启动一系列信号通路系统从而推动肝细胞进入 DNA 合成期, 继而 S 期、分裂期和终末期。肝切后 1~8 h 为肝再生早期, 肝内实质细胞和非实质细胞通过细胞间和细胞内的信号分子相互交通促进大量基因表达, 为细胞进入 DNA 合成期做准备。肝切后 4 h 是肝再生早期的中间时间点, 选择它进行研究即可以减低肝切后短时间内应激相关蛋白表达变化的干扰, 又可以适当减少部分肝细胞进入 DNA 合成期带来的影响。为探讨小鼠肝再生启动过程所涉及的重要变化基因, 随机选取肝切后 4 h 的 PH 组和 SH 组小鼠各 3 只, 分别作为独立样本进行肝组织的 RNA 抽提、验证和小鼠全基因组表达谱检测。

本研究为进一步明确肝再生启动阶段参与的信

号分子和相关信号通路,采用高通量的方法检测差异表达基因,并运用 KEGG 等路径分析数据库对结果进行归类和分析。所得结果与文献报道基本一致,参与肝再生启动过程的信号通路众多,但关键的信号通路主要围绕细胞凋亡和细胞因子相关通路等^[1-2]。在肝再生启动过程中,MAPK 信号通路成员如 Fos 和 Jun 的激活对于下游重要靶基因的激活

至关重要。而细胞因子及相关受体通路变化成员众多提示肝再生起始阶段涉及多个细胞因子及其信号通路的调控,如白介素 1 受体 1(interleukin 1 receptor 1,IL-1R1)、肿瘤坏死因子超家族成员受体以及死亡受体家族 Fas 等,它们对于再生肝细胞抵抗术后炎症反应和凋亡具有重要意义。

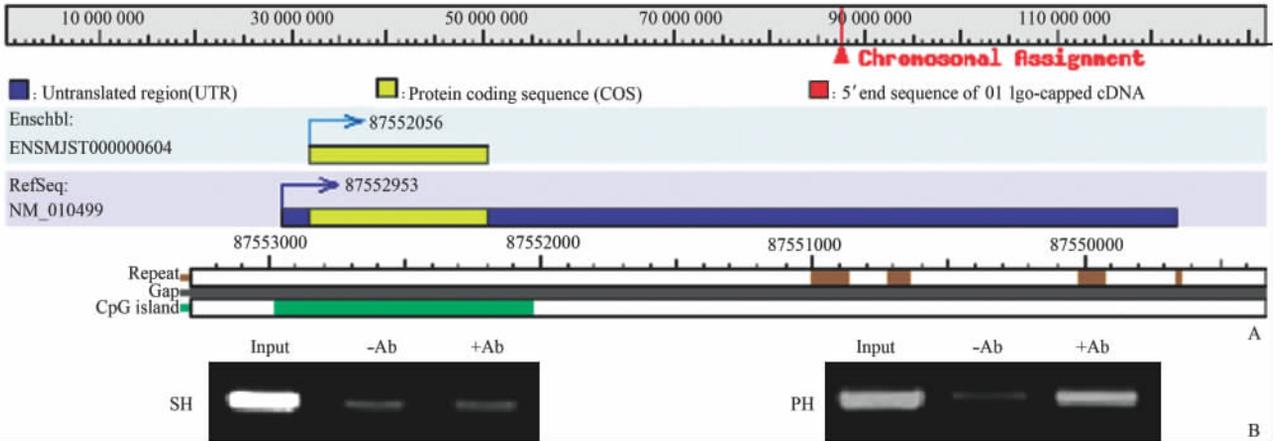


图 3 ChIP 验证 NF-κB 调控 IER2

Fig 3 ChIP validation of regulation of IER2 by NF-κB

A: Genomic structure of IER2 gene provided by DBTSS database (<http://dbtss.hgc.jp/>). B: PCR result of enriched DNAs by NF-κB antibody (+ Ab) and IgG (- Ab) using primers designed in IER2 promoter. In SH mice, IER2 was not regulated by NF-κB because of the inactivation. But in PH group, IER2 was significantly enriched by NF-κB antibody, which indicated that IER2 was regulated by NF-κB in the priming phase of liver regeneration

随后选取 3 个差异表达基因对表达谱结果进行验证,Real-time PCR 与表达谱芯片检测结果相符。选取的 3 个差异表达基因中,Jun 和 Fos 是已报道的在肝再生启动阶段显著上调的基因^[7-8],它们在肝再生启动过程中发挥重要作用,它们的上调对于即早基因 AP-1 下游靶基因的激活至关重要。

差异表达基因的转录调控分析一直是科学工作者们研究的热点,目前已经有多种在线软件可以完成类似工作,其中基于 TRANSFAC 数据库的 PAINT (Promoter Analysis and Interaction Network Generation Tool) 软件是非常有效的一种。本研究首先通过 PAINT 生物信息学分析明确 IER2 的启动子上游调控序列中含有 NF-κB 的结合序列。

ChIP 技术是目前为止公认的在体内水平研究转录因子-核酸相互作用的技术。为了进一步证实 NF-κB 对 IER2 的调控作用,我们在 NF-κB 结合位点的上下游设计了 PCR 引物,利用 NF-κB 抗体进行了 ChIP-PCR 检测。随后我们通过 ChIP 实验验证肝切后 4 h 的肝细胞内 IER2 基因与 NF-κB 的结合活性显著升高,进一步证实了在肝再生启动阶段 NF-κB 参与调控 IER2 的表达。IER2 属于早期慢

反应基因家族中的一员,也即 pip92,它可能被多种细胞因子诱导上调,但目前对其功能的认识仍然较为局限。作为急性期反应蛋白,可以参与细胞的凋亡和脑缺血损伤^[9-10]。在脑缺血后,IER2 表达上调,发挥促凋亡因子的作用,参与脑缺血后的损伤过程。由于大部肝切术后对于肝细胞而言也是一个缺血再灌注的过程,IER2 可能也是肝组织缺血损伤的指标之一。缺血再灌注是指缺血的组织、器官重新得到血液再灌注,这一过程可能会加重组织器官功能障碍和结构损伤。目前的研究表明,参与肝组织缺血再灌注损伤的机制包括 TNF-α、IL、钙离子等^[11]。若 IER2 参与了肝再生早期的缺血再灌注过程调控,可能其作用与 NF-κB 的靶基因 TNF-α 密切相关。已知 TNF-α-NF-κB 信号通路的活化在肝再生早期有促进和抑制凋亡两方面的效应。其负面效应为促进肝细胞凋亡,导致肝衰竭。推测 IER2 亦可能是肝再生早期应激阶段的一个受 NF-κB 调控的急性反应蛋白,参与了缺血再灌注损伤的过程。如果肝再生过程中 TNF-α-NF-κB 信号通路激活受抑制后,可能导致肝再生失败。要确认 IER2 在肝再生启动阶段的作用和意义,还需要进一步对其功能

进行探讨,比如采用基因递降手段干扰 IER2 的表达,观察其对肝再生进展带来的影响等。

[参考文献]

- [1] Mangnall D, Bird N C, Majeed A W. The molecular physiology of liver regeneration following partial hepatectomy[J]. *Liver Int*, 2003, 23: 124-138.
- [2] Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns K E, Schoonhoven R, Grisham J W, et al. NF κ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101: 802-811.
- [3] Diaz-Guerra M J, Velasco M, Martin-Sanz P, Bosca L. Nuclear factor κ B is required for the transcriptional control of type II NO synthase in regenerating liver[J]. *Biochem J*, 1997, 326(Pt 3): 791-797.
- [4] Patterson T A, Lobenhofer E K, Fulmer-Smentek S B, Collins P J, Chu T M, Bao W, et al. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project[J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24: 1140-1150.
- [5] Vadigepalli R, Chakravarthula P, Zak D E, Schwaber J S, Gonye G E. PAINTE: a promoter analysis and interaction network generation tool for gene regulatory network identification [J]. *Omics*, 2003, 7: 235-252.
- [6] Sun Y M, Zhang Y, Zeng L Q, Wu J P, Wei L, Ren A H, et al. Broad profiling of DNA-binding transcription factor activities improves regulatory network construction in adult mouse tissues[J]. *J Proteome Res*, 2008, 7: 4455-4464.
- [7] Stepniak E, Ricci R, Eferl R, Sumara G, Sumara I, Rath M, et al. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity[J]. *Genes Dev*, 2006, 20: 2306-2314.
- [8] Moh A, Iwamoto Y, Chai G X, Zhang S S, Kano A, Yang D D, et al. Role of STAT3 in liver regeneration; survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery[J]. *Lab Invest*, 2007, 87: 1018-1028.
- [9] Zeng F, Hon C C, Sit W H, Chow K Y, Hui R K, Law I K, et al. Molecular characterization of *Coriolus versicolor* PSP-induced apoptosis in human promyelotic leukemic HL-60 cells using cDNA microarray[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27: 513-523.
- [10] Schneider A, Fischer A, Weber D, von Ahsen O, Scheek S, Krüger C, et al. Restriction-mediated differential display (RM-DD) identifies pip92 as a pro-apoptotic gene product induced during focal cerebral ischemia[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24: 224-236.
- [11] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284: G15-G26.

[本文编辑] 尹 茶

• 消 息 •

我校3项成果获2009年度国家科学技术奖

2009年度国家科学技术奖励共授奖374项。其中,国家最高科学技术奖获得者2人;国家自然科学基金授奖项目28项,包括一等奖1项,二等奖27项;国家技术发明奖授奖项目55项,包括一等奖2项,二等奖53项;国家科学技术进步奖授奖项目282项,包括特等奖3项,一等奖17项,二等奖262项;授予7名外籍科学家中华人民共和国国际科学技术合作奖。我校共有3项成果受到表彰,其中,国家自然科学基金二等奖1项,国家科技进步二等奖2项,获奖总数居全军医疗单位第一。苏定冯、秦永文、侯春林三位教授作为获奖代表参加国家科学技术奖励大会并领奖。

国家科学技术奖是我国科学技术领域的最高奖,是衡量一个单位科技创新能力的重要标志。近年来我校加强了对基础研究的投入,促进了临床与基础的合作,优化了科研基地的环境,浓厚了科技创新的氛围。通过“选苗”与“培养”、“开窗”与“铺路”、“内优”与“外联”的方式,对成果形成的规律进行了深入广泛的探索与研究,产生了明显的成效;继2005年吴孟超院士荣膺国家最高科学技术奖以来,2006年我校获国家奖1项,2007年获国家奖4项,2008年获国家奖2项,2009年获国家奖3项,2005年~2009年累计获得国家奖13项,获国家奖的质量和数量均居全军医疗单位第一。