

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00226

• 研究简报 •

应用基因芯片分析牛磺酸对肝星状细胞基因表达的调控

Microarray-bioinformatics analysis of taurine-regulated gene expression in hepatic stellate cells

梁 健¹, 邓 鑫¹, 王 勤², 张锡流³, 吴发胜¹

1. 广西中医学院附属瑞康医院消化内科, 南宁 530011

2. 广西中医学院药理学研究室, 南宁 530001

3. 广西中医学院第一附属医院病理科, 南宁 530021

[关键词] 牛磺酸; 肝星状细胞; 微阵列分析

[中图分类号] R575.2 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2010)02-0226-02

牛磺酸具有多种生物学功能, 近来的研究热点集中于其对肝脏损伤的保护作用, 尤其是对肝纤维化的防治^[1-2]。而肝星状细胞的活化是导致肝纤维化的重要原因。本实验应用基因芯片技术筛选牛磺酸作用于肝星状细胞后的差异表达基因, 并对这些基因进行功能分类和代谢通路分析, 进一步阐明牛磺酸抗肝纤维化的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 人肝星状细胞(LX-2)购自中南大学湘雅中心实验室, 牛磺酸由广西龙源珍珠有限责任公司提供, 总RNA提取用的TRIzol试剂和细胞培养相关试剂均购自Invitrogen公司。人类全基因组寡核苷酸微阵列芯片由博奥生物有限公司提供。NucleoSpin[®] RNA clean-up试剂盒购自德国MN公司。

1.2 细胞培养 LX-2细胞在含5%胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 37℃、5% CO₂条件下常规培养。用0.25%胰蛋白酶消化后以1:3传代, 24 h换液, 72 h再次传代。

1.3 分组及给药 实验分为对照组和实验组, 对照组不加处理因素, 实验组加入40 μmol/L的牛磺酸处理48 h后收集细胞。

1.4 基因芯片筛选差异表达基因 采用TRIzol一步法提取细胞样品中的总RNA, 反转录合成cDNA第一链, 以RNA短片段为引物延伸, 合成cDNA第二链, 并纯化双链cDNA; 经体外转录合成cRNA后再进行反转录, 所得cDNA用Klenow酶标记, 对照组样品用Cy5-dCTP标记, 治疗组样品用Cy3-dCTP标记。芯片用LuxScan 10 KA双通道激光扫描仪(CapitalBio公司)进行扫描, 采用LuxScan 3.0图像分析软件(CapitalBio公司)对芯片图像进行分析。

1.5 差异表达基因的生物信息学分析 将筛选出的差异表达基因导入公共数据库GO(<http://www.geneontology.org>)、KEGG、BioCarta和GenMAPP进行基因分类学分析(GO分析)和分子调控路径分析。

2 结果

2.1 基因芯片检测结果 共得到46个差异表达基因, 其中HDAC3、TGFB1I1、NP_114131、ZF25_HUMAN 4个基因表达上调, 另外42个基因表达下调(表1)。

2.2 差异表达基因的功能分类及表达谱分析 利用基因本体数据库GO(<http://www.geneontology.org>)对样品进行比较分析, 差异表达基因涉及细胞代谢过程、生理过程、新陈代谢等生物学过程, 细胞组分、细胞器、膜性细胞腔等细胞成分以及结合、催化、区域定位等分子功能, 其中涉及细胞代谢过程、生理过程和新陈代谢的基因最多, 分别占差异基因总数的12.97%、11.21%、7.69%, 说明牛磺酸对人肝星状细胞的影响主要集中在基础代谢活动。

2.3 差异表达基因的分子调控路径分析 对差异表达基因KEGG、BioCarta和GenMAPP三大路径数据库进行路径分析, 发现牛磺酸作用于LX-2细胞后的差异表达基因主要参与氧化磷酸化、硫胺素代谢、维生素B₆代谢、糖基磷脂酰肌醇锚定生物合成、肌动蛋白细胞骨架调控等路径。

3 讨论

3.1 上调基因的分析 本研究获得的46个差异表达基因中, 下调基因占了绝大多数(42个), 只有HDAC3、TGFB1I1、NP_114131和ZF25_HUMAN 4个表达上调。HDAC3基因编码的蛋白属于组蛋白去乙酰化酶家族, 具有组蛋白去乙酰化酶活性, 与启动子结合后能抑制转录。它还可以通过锌指转录因子YY1结合参与转录调控。该蛋白还能通过下调p53基因的功能从而调控细胞生长和凋亡。有研究表明, 这个基因是一个潜在的肿瘤抑制基因^[3-4]。TGFB1I1基因即转化生长因子beta 1诱导的转录本1, 参与细胞增殖的负调控^[5]。在本研究中, 该基因表达水平的上调可能抑制LX2细胞的生长。另外两个基因的功能目前尚不十分清楚。

[收稿日期] 2009-08-07 [接受日期] 2009-11-05

[基金项目] 国家自然科学基金(30660235), 广西青年科学基金(0728080)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30660235), and Youth Science Foundation of Guangxi(0728080)。

[作者简介] 梁 健, 博士, 教授、主任医师。E-mail: li99669@163.com

表1 表达显著下调的基因

序号	GenBank 登录号	基因名称	比例
1	AF205632	SH3BP3	0.499 3
2	X84194	ACYP1	0.499 3
3	BC011549	ATP5S	0.499 3
4	BM701358	NDUFC1	0.495 3
5	BC023144	SMARCA5	0.493 8
6	AY251280	PAX3	0.487 2
7	M22760	COX5A	0.485 0
8	BC016949	SLC30A9	0.481 5
9	AF063020	PSIP1	0.480 4
10	-	RPL36AL	0.475 9
11	AF161415	SELK_HUMAN	0.475 0
12	BX648473	PIGK	0.468 3
13	AK026902	GNA13	0.464 4
14	-	LSM8	0.461 9
15	AB011159	NCKAP1	0.459 6
16	AL162079	SLC16A1	0.458 4
17	AB000220	SEMA3C	0.453 6
18	AF135168	NSF	0.453 1
19	CR605719	UBC1_HUMAN	0.448 4
20	AK075007	ZMPSTE24	0.446 8
21	D44466	PSMD1	0.444 4
22	Y10183	ALCAM	0.444 4
23	-	HIST1H4E	0.442 8
24	-	EIF3S10	0.441 9
25	AK000160	MYO1B	0.440 8
26	AK122841	GDI1	0.436 8
27	Y09703	PNN	0.432 5
28	BX537365	MATR3	0.429 2
29	AB037776	IGSF9	0.413 7
30	D79986	BCLAF1	0.410 4
31	U73704	GLMN	0.409 1
32	X13238	COX6C	0.407 8
33	AF072928	MTMR6	0.402 6
34	BC072433	SNRPE	0.402 6
35	-	HNRPH3	0.392 3
36	AK023089	SLC30A7	0.383 3
37	AF000987	EIF1AY	0.378 1
38	AB033079	TDE2	0.360 6
39	X76732	NUCB2	0.332 8
40	U41766	ADAM9	0.330 1
41	L34600	MTIF2	0.318 0
42	AK055348	NDUFB1	0.232 1

3.2 下调基因及 GO 和路径分析 从差异基因 GO 分析的分子功能归类分析可以看到, EIF1AX、EIF3S10、EIF1AY 等基因具有转录起始因子和 RNA 结合活性, 而相对应的是, 这些基因在生物学过程分类中参与蛋白生物合成和转录起始, 表明这些基因表达水平的下调将减少细胞的转录和翻译活动。在路径分析中参与 mRNA 处理和翻译调控相关基因的

分布情况与 GO 分析相一致。

COX6C 基因编码 Vic 亚基, 它与小鼠的相应基因有 77% 的氨基酸同源性。这个基因在前列腺癌细胞系中表达上调。它催化从减少的细胞色素 C 到氧的电子转移, 与代谢物前体和能量的产生有关^[6]。NDUFB1 和 NDUFC1 基因同样是线粒体电子传递链中的重要成分, NDUFB1 即 NADH 脱氢酶 (泛醌) 1 beta 亚复合物, 主要具有泛醌脱氢酶的活性^[7], 参与线粒体中电子从 NADH 到泛醌的转移。而 NDUFC1 基因属于线粒体呼吸链复合物 I, 功能与 NDUFB1 相似。这 4 个基因在 KEGG 路径分析中都是氧化磷酸化代谢路径的组成部分, 与 GO 的分析和 GenMaPP 路径的分析都是相对应的。

从以上分析来看, 牛磺酸作用于 LX-2 细胞后筛选出的差异表达基因主要参与氧化磷酸化路径和电子传递路径, 其次是转录和翻译相关路径, 相关基因的表达水平绝大多数呈显著下调, 由此可推断, 本次实验中, 牛磺酸可能是通过下调 LX-2 细胞氧化磷酸化路径相关基因的表达, 从而降低能量的供应, 进而抑制细胞基因的转录和翻译活动, 最终抑制细胞的增殖, 但具体这些相关基因如何起作用还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis[J]. J Clin Invest, 2005, 115:209-218.
- [2] Refik Mas M, Comert B, Oncu K, Vural S A, Akay C, Tasci I, et al. The effect of taurine treatment on oxidative stress in experimental liver fibrosis[J]. Hepatol Res, 2004, 28:207-215.
- [3] Thangaraju M, Carswell K N, Prasad P D, Ganapathy V. Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3[J]. Biochem J, 2009, 417:379-389.
- [4] Arito M, Horiba T, Hachimura S, Inoue J, Sato R. Growth factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low density lipoprotein uptake, and lipid synthesis[J]. J Biol Chem, 2008, 283:15224-15231.
- [5] Shibanuma M, Mashimo J, Kuroki T, Nose K. Characterization of the TGF beta 1-inducible hic-5 gene that encodes a putative novel zinc finger protein and its possible involvement in cellular senescence[J]. J Biol Chem, 1994, 269:26767-26774.
- [6] Otsuka M, Mizuno Y, Yoshida M, Kagawa Y, Ohta S. Nucleotide sequence of cDNA encoding human cytochrome c oxidase subunit Vic[J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16:10916.
- [7] Loeffen J L, Triepels R H, van den Heuvel L P, Schuelke M, Buskens C A, Smeets R J, et al. cDNA of eight nuclear encoded subunits of NADH: ubiquinone oxidoreductase: human complex I cDNA characterization completed[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253:415-422.

[本文编辑] 孙岩