

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00333

细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中表达模式分析

李红蕾^{1,2}, 陈晓光^{1,2}, 张富春¹, 马纪¹, 徐存拴³

1. 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046;
2. 细胞分化调控重点实验室, 新乡 453007;
3. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

摘要: 细胞外基质具有维持细胞极性、调节细胞粘附、增殖、组织器官形态、发生、分化等功能。为了进一步了解在基因转录水平了解细胞外基质在大鼠肝再生中变化和作用, 用搜集网站资料和查阅相关论文等方法获得细胞外基质基因, 用 Rat Genome 230 2.0 芯片检测它们在大鼠再生肝中表达情况, 用真、假手术比较方法确定肝再生相关基因。初步证实上述 97 个基因与肝再生相关。其中, 肝再生启动(部分肝切除(partial hepatectomy, PH)后 0.5~4 h)、G0/G1 过渡(PH 后 4~6 h)、细胞增殖(PH 后 6~66 h)、细胞分化和组织结构功能重建(PH 后 72~168 h)等 4 个阶段起始表达的基因数为 49、19、73、5, 基因总表达的次数为 84、51、369、144, 表明相关基因主要在肝再生启动阶段起始表达, 在不同阶段发挥作用。它们表达的相似性分为均上调、上调占优势、均下调、下调占优势、上调和下调相近等 5 类, 涉及 38、21、21、10 和 7 个基因, 共上调 411 次, 下调 186 次, 分为 24 种表达模式, 表明肝再生中细胞生理生化活动具有阶段性、多样性和复杂性。根据细胞外基质相关基因在肝再生中表达变化推测, 肝再生前期纤粘连蛋白形成相关基因表达增强, 肝再生中期胶原形成相关基因表达增强。

关键词: 部分肝切除; Rat Genome 230 2.0 芯片; 细胞外基质; 肝再生相关基因

Expression profiles of the extracellular matrix-associated genes during rat liver regeneration

LI Hong-Lei^{1,2}, CHEN Xiao-Guang^{1,2}, ZHANG Fu-Chun¹, MA Ji¹, XU Cun-Shuan³

1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China;
2. Key Laboratory for Cell Differentiation Regulation, Xinxiang 453007, China;
3. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract: It has been well known that the extracellular matrix (ECM) plays an important role in cell polarization, cell adhesion, cell proliferation, morphogenesis and differentiation. For the sake of the further in-depth investigation of the changes and actions of ECM in liver regeneration (LR) at gene transcriptional level, the ECM-associated genes were obtained by databases searching and literature retrieving, subsequently their expression profiles in rat regenerating liver were detected using Rat Genome 230 2.0 array, then LR-associated genes were identified based on comparison of the gene expression difference between sham operation (SO) group and partial hepatectomy (PH) group. A total of 97 genes were verified to be LR-associated. The initially and totally expressed number of these genes occurring in initial phase of LR, G0/G1 transition, cell proliferation, cell differentiation and structure-functional reconstruction were 49, 19, 43, 5 and 84, 51, 369, 144, respectively, illustrating that expression of the ECM-associated genes were initiated mainly in the early phase, working in different phases. Their expression similarity was classified into 5 groups including only up-, predominantly up-, only down-, predominantly down-, and equal in up-regulated and down-regulated, involving 38, 21, 21, 10 and 7 genes, respectively; the

收稿日期: 2007-09-10; 修回日期: 2007-12-03

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 项目)项目 (编号: 2006CB708506)资助[Supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2006CB708506)]

作者简介: 李红蕾(1970-), 女, 在读博士, 研究方向: 细胞分化调控。Tel: 0373-3326851; E-mail: lihongleihn@163.com

通讯作者: 徐存拴(1957-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞分化调控。Tel: 0373-3326001; E-mail: xucs@x263.net

number of up-regulated expressed genes and down-regulated expressed ones was 411 and 186; their expression patterns were categorized into 24 types, showing that the physiological and biochemical activities in LR were characterized by phase, diversity and intricacy. According to expression profiles and expression patterns of the ECM-associated genes in LR, it was confirmed that the levels of the below-listed genes in expression increased at the corresponding phases of LR, including fibronectin-associated genes at early phase in LR, and collagen-associated genes at middle phase.

Keywords: partial hepatectomy; Rat Genome 230 2.0 array; extracellular matrix; genes associated with liver regeneration

肝脏有重要功能和再生能力^[1]。部分肝切除 (parital hepatectomy, PH) 后, 残肝细胞从G₀期进入细胞周期循环以补偿丢失的肝组织, 该过程称为肝再生^[2-7]。通常, 根据细胞的生理活动将肝再生分为启动(PH后 0.5~4 h)、G₀/G₁过渡(PH后 4~6 h)、细胞增殖(PH后 6~66 h)、细胞分化和组织结构功能重建(PH后 72~168 h)等 4 个阶段^[4]。根据时间进程分为早期(PH后 0.5~4 h)、前期(PH后 6~12 h)、中期(16~66 h)和后期(72~168 h)等 4 个时期^[6], 涉及细胞激活、去分化、增殖及调控、再分化、组织结构和功能重建等生理生化过程^[7,8]。在此过程中, 细胞外基质的作用必不可少。一般认为, 细胞外基质包括胶原、纤粘连蛋白、层粘连蛋白、氨基聚糖、蛋白聚糖、弹性蛋白和基质金属蛋白酶等。其中, 胶原维持组织结构完整性方面起重要作用^[9-11]。纤粘连蛋白和层粘连蛋白影响细胞生长、分化、代谢^[12-14]。氨基聚糖在细胞增殖、细胞间相互作用、血管形成等中起重要作用^[15,16]。蛋白聚糖参与细胞运动、信号传递、调节胶原微纤维的形成^[17-19]。弹性蛋白介导细胞移动, 影响细胞粘附^[20]。过去我们已分析了基质金属蛋白酶与肝再生的相关性^[21]。为在基因转录水平了解细胞外基质相关基因在肝再生中表达变化和作用, 本文用含 163 个细胞外基质相关基因的Rat Genome 230 2.0 芯片检测了大鼠 2/3 肝切除后基因表达情况, 发现其中 97 个基因与肝再生相关, 在此基础上, 进一步分析了它们在肝再生中表达动态、模式和作用。

1 材料和方法

1.1 大鼠再生肝制备

实验用SD纯系大鼠由河南师范大学实验动物中心提供, 体重 200~250 g。将 264 只大鼠随机分组, 每组 6 只。其中, 22 组用于部分肝切除, 22 组用于假手术。部分肝切除按Higgins^[22]等方法进行, 即用外科手术方法切除大鼠左叶肝和中叶肝, 并于 0.5、1、

2、4、6、8、12、16、18、24、30、36、42、48、54、60、66、72、96、120、144 和 168 h的相应恢复时间颈椎脱臼处死动物, 切取右叶肝置 4 PBS 中涮洗 3 次, 然后从其中部取 100~200 mg肝组织, 将同组的 6 只大鼠肝样混合(总肝量为 0.1~0.2 g×6=0.6~1.2 g), 于-80 保存备用。对照组材料为成年大鼠肝, 取材方法同部分肝切除组。假手术组除不切除肝叶外, 其他同部分肝切除组。实验中严格遵循中国动物保护法。

1.2 总 RNA 提取与纯化

总RNA提取按Invitrogen公司的Trizol试剂盒操作指南进行^[22]。总RNA纯化按QIAGEN公司的RNeasy Mini试剂盒操作指南进行^[23]。在 260/280 nm 波长下测定总RNA浓度和纯度^[24]。用琼脂糖凝胶电泳(180 V, 0.5 h)检测总RNA质量, 实验样品RNA的 28S和 18S亮度比例约为 2:1。

1.3 cDNA、cRNA 合成与纯化

以T7-(dT)₂₄ Primer作引物, 取 5 μg总RNA作模板, 通过SuperScript II RT反转录系统合成cDNA第一条链, 按Affymetrix cDNA单链合成试剂盒操作指南合成cDNA第 2 条链。按cDNA纯化指南纯化cDNA。用 12 μL上述纯化的cDNA作为模板, 按GeneChip IVT标记试剂盒操作指南合成生物素标记的cRNA, 最后按cRNA纯化指南纯化cRNA^[25]。两者的浓度、纯度和质量检测方法同上^[24]。

1.4 cRNA 片段化和芯片检测

在 15 μL浓度为 1 μg/μL的cRNA溶液中加入 6 μL 5×片段化缓冲液和 9 μL无RNA酶水混匀, 94 温浴 35 min, 得到长度为 35~200 bp的cRNA片段。按Affymetrix公司提供的配方配制杂交液, 将经过预杂交处理的Rat Genome 230 2.0 芯片放入杂交液中, 于 45 、60 r/min条件下杂交 16 h, 然后吸去杂交液, 在GeneChip全自动洗涤工作站 450(Affymetrix公司, USA)中洗涤和染色芯片。用高分辨芯片扫描仪 3000(Affymetrix公司, USA)扫描芯

片, 获得扫描图像^[26]。

1.5 芯片检测结果分析

用Affymetrix GCOS 1.4 软件将上述扫描图像转化为信号值。根据探针信号值的 P 值确定基因表达(P 值 < 0.05)、临界表达($0.05 < P$ 值 < 0.065)和不表达(P 值 > 0.065)。然后分别对每张芯片的信号值做均一化处理, 用实验组的均一化比对照组的均一化值得出某一基因是否发生表达变化, 当比值 ≥ 2 时, 视为基因表达上调; 当比值 ≤ 0.5 时, 视为基因表达下调; 当比值在 $2 \sim 0.5$ 之间时, 视为基因示发生有意义表达变化^[26]。为减少芯片分析误差, 每个时点的再生肝均用Rat Genome 230 2.0 芯片重复检测 3 次, 将 3 次检测的平均值视为可靠值。最后用GeneMath、GeneSpring和Microsoft Excel等分析软件对各组数据进行统计和聚类分析^[26~28]。

1.6 大鼠肝再生相关基因的确认

根据 GENEONTOLOGY (www.geneontology.org) 网站的生物活动分类, 将胶原、纤粘连蛋白、层粘连蛋白、氨基聚糖、蛋白聚糖和弹性蛋白分别输入 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)和 RGD(rgd.mcg.edu)等网站查找大鼠、小鼠和人的相关基因, 并根据 GENMAPP (www.genmapp.org)、KEGG (www.Genome.jp/kegg/pathway.html#amino)和 BIOCARTA(www.biocarta.com/genes/index.asp)等网站的途径图汇总上

述基因。然后查阅相关文献资料对上述基因进行再确认。除大鼠基因外, 将现在认为只存在于人和/或小鼠、在大鼠肝再生中发生有意义表达变化的基因视为大鼠同源基因。最后把 3 次检验结果相同或相似、至少在部分肝切除后一个时点表达上调或下调两倍以上、部分肝切除组与假手术组差异显著($0.01 < P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)的大鼠基因和大鼠同源基因视为肝再生相关基因。

2 结 果

2.1 细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中表达变化

查 NCBI、RGD、GENMAPP、KEGG、BIOCA-RTA 和 MGI 等网站资料表明, 196 个基因与细胞外基质相关; 查 Rat Genome 230 2.0 芯片资料表明, 该芯片含上述的 163 个基因。其中 97 个基因至少在部分肝切除(partial hepatectomy, PH)后一个时点发生了有意义表达变化, 部分肝切除组与假手术(sham operation, SO)组有显著或极显著差异, 3 次 Rat Genome 230 2.0 芯片检测结果具有重复性。因此, 初步确认这些基因与肝再生(liver regeneration, LR)相关。上述 97 个基因中 38 个基因在肝再生中表达上调, 21 个基因表达下调, 38 个基因在有的时点表达上调、有的时点表达下调(简称上/下调)。它们的上调范围为对照的 2~45 倍, 下调范围为对照的 2~17 倍(表 1)。

表 1 97 个细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中表达丰度
Table 1 Expression abundance of 97 extracellular matrix-associated genes during rat liver regeneration

名称	基因简称	参与的其他细胞外基质结构	最大变化倍数	名称	基因简称	参与的其他细胞外基质结构	最大变化倍数
Name	Gene Abbr.	Associated to	Fold difference	Name	Gene Abbr.	Associated to	Fold
1 Collagen				procollagen, type I, alpha 6	Col4a6		7.7, 0.38
prolyl-4 hydroxylase 2	P4ha2		7.2	procollagen, type I, alpha 1	Col3a1		6.5, 0.31
prolyl-4 hydroxylase 3	P4ha3		4.9	Usher syndrome 2A	Ush2a		4.9, 0.31
annexin A2	Anxa2		4.5	procollagen, type XV	Col15a1		4.7, 0.32
procollagen, type I, alpha 1	Col12a1		4.2	procollagen C-endopeptidase enhancer protein	Pcolce		4.2, 0.29
dentin sialophosphoprotein	Dspp		3.4	procollagen, type I, alpha 1	Col2a1		3.8, 0.30
lysyl oxidase	Lox		3.3	procollagen, type I, alpha 4	Col4a4		3.7, 0.40
procollagen, type I, alpha 1	Col9a1		3.2	serine proteinase inhibitor, clade H, member 1	Serpinh1		3.6, 0.36
procollagen, type XV, alpha 1	Col18a1		3.1	neurofibromatosis 1	Nf1		3.2, 0.22
procollagen, type I, alpha 2	Col1a2		3.0	procollagen, type I, alpha 1	Col11a1		3.1, 0.34
integrin alpha 1	*Itga1		2.9	thrombospondin 4	Thbs4	2,3	2.6, 0.29
procollagen-lysine, 2-oxo-glutarate 5-dioxygenase 1	Plod1		2.5	procollagen, type I, alpha 2	Col4a2		2.6, 0.18
procollagen, type I, alpha 1	Col4a1		2.3	kallikrein 6	Klk6		2.4, 0.41

续表

名称	基因简称	参与的其他细胞外基质结构	最大变化倍数	名称	基因简称	参与的其他细胞外基质结构	最大变化倍数
Name	Gene Abbr.	Associated to	Fold difference	Name	Gene Abbr.	Associated to	Fold difference
collagen, type V, alpha 2	<i>Col5a2</i>		2.2	leprecan 1	<i>Lepre1</i>		0.38
procollagen, type XIV, alpha 1	<i>Col14a1</i>		2.1	procollagen, type , alpha 2	<i>Col6a2</i>		6.9, 0.29
secreted acidic cysteine rich glycoprotein	<i>Sparc</i>		2.1	2 Fibronectin			
forkhead box C2	<i>Foxc2</i>		2.0	thrombospondin 4	<i>Thbs4</i>	3	2.6, 0.29
coagulation factor 5	<i>F5</i>		0.46	cartilage oligomeric matrix protein	<i>Comp</i>		2.0, 0.22
ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide	<i>Atp7a</i>	6	0.38	tenascin C	<i>Tnc</i>		8.6, 0.50
nidogen 2	<i>Nid2</i>		0.31	3 Laminin			
procollagen, type XXIV, alpha 1	<i>Col24a1</i>		0.29	integrin alpha 7	<i>Itga7</i>		4.4
procollagen, type , alpha 1	<i>Col7a1</i>		0.25	laminin, alpha 5	<i>*Lama5</i>		3.8
discoidin domain receptor family, member 2	<i>Ddr2</i>		0.15	laminin, alpha 1	<i>*Lama</i>		2.5
pancreatic trypsin 1	<i>Prss1</i>		0.06	laminin, alpha 3	<i>*Lama3</i>		2.3
pancreatic trypsin 2	<i>Prss2</i>		39.4, 0.38	integrin, alpha 6	<i>Itga6</i>		2.0
procollagen, type XV , alpha 1	<i>Col17a1</i>		14.9, 0.38	sonic hedgehog homolog	<i>Shh</i>		2.8, 0.47
procollagen, type , alpha 1	<i>Col8a1</i>		12.0, 0.50	thrombospondin 4	<i>Thbs4</i>	2	2.6, 0.29
Lumican	<i>Lum</i>	5	10.3, 0.06	laminin, gamma 1	<i>*Lamc1</i>		2.5, 0.38
procollagen, type , alpha 1	<i>Col10a1</i>		9.8, 0.25	4 Glycosaminoglycan			
UDP-glucose dehydrogenase	<i>Ugdh</i>		2.3	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	<i>Man1c1</i>		2.6, 0.38
ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6	<i>Cln6</i>		0.47	carbohydrate sulfotransferase 3	<i>Chst3</i>		2.5, 0.43
xylosyltransferase	<i>Xylt2</i>		0.39	N-sulfoglucosamine sulfohydrolase	<i>Sgsh</i>	4	3.4, 0.41
hexosaminidase B	<i>Hexb</i>		0.37	6 Elastin			
sulfatase modifying factor 1	<i>Sumf1</i>		0.35	cyclin A2	<i>Ccna2</i>		45.1
transforming growth factor, beta receptor	<i>Tgfr3</i>		0.33	connective tissue growth factor	<i>*Ctgf</i>		13.9
xylosylprotein beta1, 4-galactosyltransferase, polypeptide 7	<i>B4galt7</i>	5	2.8, 0.27	lysyl oxidase-like 3	<i>Loxl3</i>		4.9
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5	<i>Galnt5</i>		2.3, 0.20	lysyl oxidase-like 2	<i>Loxl2</i>		3.5
latent transforming growth factor beta binding protein 4	<i>Ltbp4</i>		2.1, 0.35	lysyl oxidase	<i>Lox</i>	1	3.3
arylsulfatase B	<i>Arsb</i>		2.1	elastin microfibril interfacer 2	<i>Emilin2</i>		3.0
N-sulfoglucosamine sulfohydrolase	<i>Sgsh</i>	5	3.4, 0.41	fibrillin 1	<i>Fbn1</i>		2.8
5Proteoglycan				biglycan	<i>Bgn</i>		2.1
CD47 antigen	<i>Cd47</i>		6.5	fibulin 1	<i>Fbln1</i>		0.41
glypican 1	<i>Gpc1</i>		3.5	angiotensin receptor, type 2	<i>Agtr2</i>		0.38
intercellular adhesion molecule 1	<i>Icam1</i>		3.0	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide	<i>Atp7a</i>	1	0.38
lipase, hepatic	<i>Lipc</i>		0.47	fibulin 2	<i>Fbln2</i>		0.33
interleukin 17F	<i>Il17f</i>		0.14	microfibrillar-associated protein 2	<i>Mfap2</i>		0.19
Lumican	<i>Lum</i>	1	10.3, 0.06	fibrillin 2	<i>Fbn2</i>		6.1, 0.32
chondroitin sulfate proteoglycan 2	<i>Cspg2</i>		6.8, 0.45	ficolin A	<i>Fcna</i>		3.4, 0.31
exostoses-like 2	<i>Extl2</i>		5.6, 0.17	elastin microfibril interfacer 3	<i>Emilin3</i>		2.3, 0.31
procollagen, type , alpha 1	<i>Col2a1</i>	1	3.8, 0.30	elastin microfibril interfacer 1	<i>Emilin1</i>		16.0
chondroitin polymerizing factor	<i>D1bwg136e</i>		3.2, 0.29	Interleukin 1 beta	<i>Il1b</i>		0.35
procollagen, type , alpha 1	<i>Col11a1</i>	1	3.1, 0.34	fibroblast growth factor 2	<i>Fgf2</i>		2.1, 0.50
Xylosylprotein beta1, 4-galactosyltransferase, polypeptide 7	<i>B4galt7</i>	4	2.8, 0.27				

*: 已报道肝再生相关基因。

*: Reported genes associated with liver regeneration.

2.2 细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中起始表达及总表达情况

不同基因在肝再生中开始表达、持续表达及终止表达的时间有较大差异。本文把基因最初发生有意义表达变化的时间称为基因的起始表达时点, 把在该时点表达的基因均称为起始表达基因; 把各时点发生有意义表达变化的基因相加得到总表达的基因数。分析表明, 肝再生中 65 个基因起始上调, 32 个基因起始下调。其中, 在启动阶段(PH 后 0.5~4 h) 33 个基因起始上调, 16 个基因起始下调; G_0/G_1 过渡阶段(PH 后 4~6 h) 15 个基因起始上调, 4 个基因起始下调; 细胞增殖阶段(PH 后 6~66 h) 28 个基因起始上调, 15 个基因起始下调; 细胞分化和组织结构功能重建阶段(PH 后 72~168 h) 4 个基因起始上调, 1 个基因起始下调。肝再生中基因共表达上调 411 次, 下调 186 次。其中, 肝再生启动阶段(PH 后 0.5~4 h) 基因上调 67 次, 下调 17 次; G_0/G_1 过渡阶段(PH 后 4~6 h) 基因上调 44 次, 下调 7 次; 细胞增殖阶段(PH 后 6~66 h) 基因上调 260 次, 下调 109 次; 细胞分化和组织结构功能重建阶段(PH 后 72~168 h) 基因上调 84 次, 下调 60 次(图 1)。

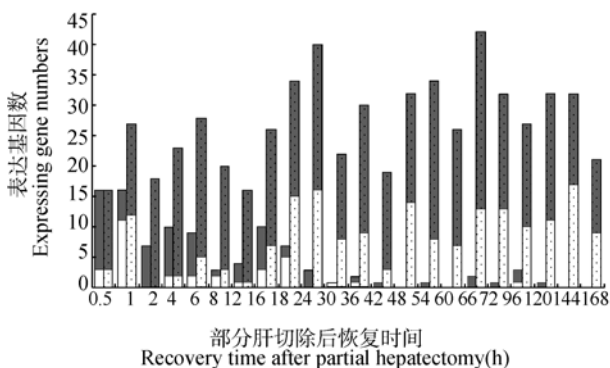


图 1 97 个细胞外基质相关基因在大鼠肝再生各时点起始表达及总表达情况

非点状柱示起始表达基因; 点状柱示总表达基因; 灰底柱示表达上调基因; 白底柱示表达下调基因。基因表达贯穿于整个肝再生。其中, 在 0.5、2~6、12、16、24、42、54 和 66~120 h 起始表达上调占优势, 在 1、8、18 和 30 h 起始表达下调基因占优势, 其他时点只有极少数基因起始表达。

Fig. 1 The initial and total expression profiles of 97 ECM-associated genes in rat liver regeneration

Non-dotted columns: Initial expressing genes. Dotted columns: The total expressing genes; Gray-background columns: Upregulated genes; White-background columns: Downregulated; Gene expression changes span the whole LR. The initially upregulated genes and initially downregulated one are predominant respectively at 0.5, 2~6, 12, 16, 24, 42, 54, 66~120 h time points and at 1, 8, 18, 30 h time points, whereas, very few genes are initially expressed at other time points.

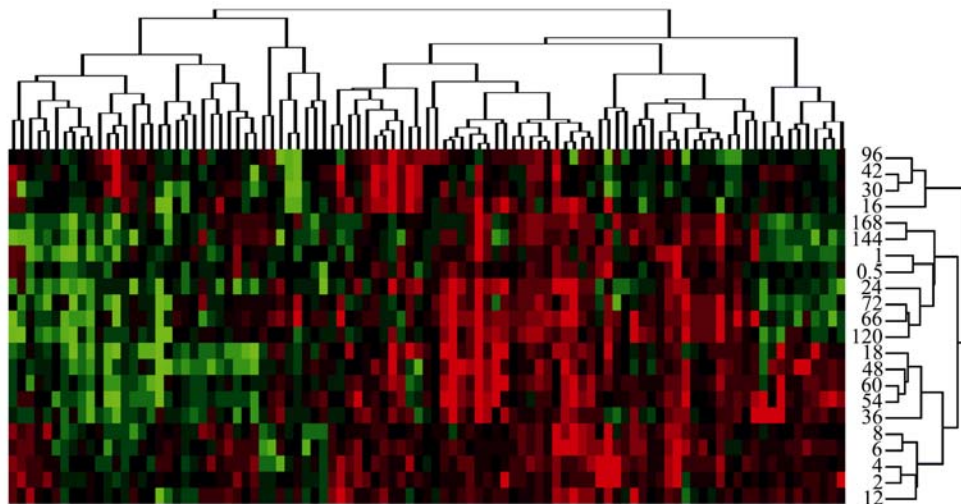


图 2 97 个细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中表达的相似性聚类和时间相关性聚类

用 H-clustering 软件分析 Rat Genome 230 2.0 芯片检测资料。红色示表达上调基因。主要为促进细胞外基质形成基因; 绿色示表达下调基因。主要为抑制细胞外基质形成基因; 黑色示未发生有意义变化基因。上方树为表达相似性聚类, 分为 5 大类, 每个大类都有明显的内部结构; 右侧树为时间相关性聚类, 分为 6 大类。

Fig. 2 Expression similarity and time relevance clusters of 97 ECM-associated genes during rat liver regeneration

Detection data of Rat Genome 230 2.0 array were analyzed by H-clustering. Red: Upregulated genes, among which the ones enhancing ECM formation were dominant; Green: Downregulated ones, among which the ECM formation-inhibiting genes took up a relatively large portion; Black: No alteration in expression. The upper and right trees represent expression cluster and time series clusters respectively, by which the above genes are classified into 5 and 6 groups separately.

2.3 细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中表达的相似性和时间相关性

根据肝再生中基因表达相似性将上述 97 个基因分为均上调、上调占优势、均下调、下调占优势、上调和下调相近 5 个大类, 涉及 38、21、21、10 和 7 个基因, 每个大类都有明显的内部结构(图 2 上方树)。根据肝再生中基因表达的时间相关性将上述基因分为 16-96、144-168、0.5-1、24-120、18-36 和

8-12 等 6 大类, 表达上调和下调的基因数分别为 66 和 28, 27 和 26, 28 和 15, 93 和 53, 94 和 11(图 2 右侧树)。上调表达基因主要为促进细胞外基质形成基因。下调表达基因主要为抑制细胞外基质形成基因。

2.4 细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中表达模式

根据肝再生中基因表达变化将上述 97 个基因的表达模式分为 24 类(图 3)。(1)1 个时点上调, 发生在大鼠部分肝切除后 1、4、12、42、66、72 或 96 h,

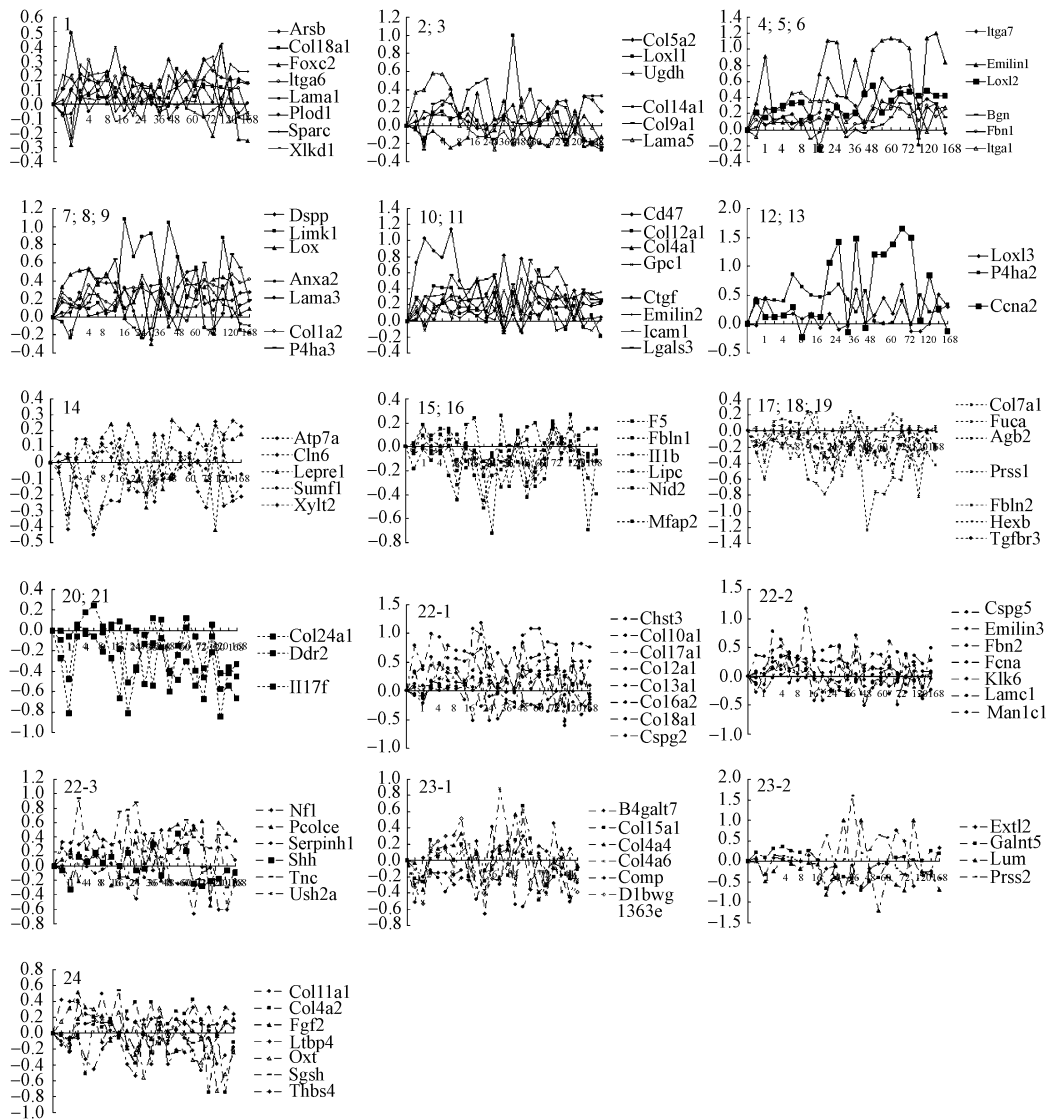


图 3 97 个细胞外基质相关基因在大鼠肝再生中表达模式

用 Microsoft Excel 软件分析 Rat Genome 230 2.0 芯片检测资料得到 24 种基因表达模式。1~13, 表达上调基因, 共 38 个; 14~21, 表达下调基因, 共 21 个; 22~24, 上/下调混合表达基因, 共 38 个。X 轴为部分肝切除后恢复时间(h), Y 轴为各时点基因表达产物信号值与对照比值的对数。

Fig. 3 expression patterns of 97 ECM-associated genes during rat liver regeneration

Expression patterns were obtained by the analysis of the detection data of Rat Genome 230 2.0 array with Microsoft Excel. 1-13: 38 upregulated genes; 14-21: 21 downregulated genes; 22-24: 38 up/downregulated genes. X-axis represents recovery time after PH (h); Y-axis shows logarithm ratio of the signal values of genes at each time point to control.

涉及8个基因; (2)2个时点上调, 在6和120 h、16和42 h、36和48 h, 涉及3个基因; (3)1个时段上调, 在0.5~6 h、12~18 h、120~168 h, 涉及3个基因; (4)2个时段上调, 在18~30和54~144 h, 涉及1个基因; (5)3个时段上调, 涉及2个基因; (6)1个时点/1个时段上调, 在24和66~72 h、54和6~24 h、144和66~72 h, 涉及3个基因; (7)1个时点/2个时段上调, 涉及3个基因; (8)2个时点/1个时段上调, 涉及2个基因; (9)2个时点/2个时段上调, 涉及2个基因; (10)3个时点/1个时段上调, 涉及4个基因; (11)3个时点/2个时段上调, 涉及4个基因; (12)多个时点/1个时段上调, 涉及2个基因; (13)多个时点/2个时段上调, 涉及1个基因; (14)1个时点下调, 在1、6或96 h, 涉及5个基因; (15)2个时点下调, 在8和168 h、18和48 h、18和54 h、30和48 h、36和48 h, 涉及5个基因; (16)3个时点下调, 涉及1个基因; (17)多个时点下调, 涉及3个基因; (18)1个时点/2个时段下调, 涉及1个基因; (19)2个时点/1个时段下调, 涉及3个基因; (20)2个时点/3个时段下调, 涉及2个基因; (21)多个时点/1个时段下调, 涉及1个基因; (22)上/下调混合表达中上调占优势, 涉及21个基因; (23)上/下调混合表达中下调占优势, 涉及10个基因; (24)上/下调混合表达中上调和下调基因相近, 涉及7个基因。

3 讨论

细胞外基质对细胞与组织起支架或骨架作用, 具有维持细胞极性、调节细胞粘附、增殖、确定组织器官形态、发生、分化等功能。其中, 胶原在维持组织结构完整性方面起重要作用。本文研究表明, 促进胶原形成的 *prss2* 在 PH 后 18、36 和 54~60 h 上调, 36 h 达到高峰, 是对照的 39 倍。 *coll7a1* 在 PH 后 16~24 和 48~66 h 上调, 18 h 达到高峰, 是对照的 15 倍, 推测中期它们在肝再生中期的胶原形成中起关键作用。

纤粘连蛋白和层粘连蛋白影响细胞生长、分化、代谢等活动。张顺利等用免疫组化方法研究表明, 层粘连蛋白在 12 h 表达上调^[29], 本文研究表明, 层粘连蛋白基因 *lama1* 在 PH 后 12 h 上调, 表明两者在基因转录水平和蛋白水平相关性。另外, 本文研究表明, 促进纤粘连蛋白形成的 *thbs4* 在 PH 后 0.5~2 h 表达上调, 抑制纤粘连蛋白形成的 *tnc* 在 16~24、36 和 60~66 h 表达上调, 推测纤粘连蛋白主要在肝再生前期形成。

弹性蛋白介导细胞移动, 影响细胞粘附。氨基

聚糖在细胞增殖、细胞间相互作用、血管形成等中起重要作用。蛋白聚糖参与细胞运动、信号传递、调节胶原微纤维的形成。Pi 等^[30]研究表明, 促进弹性蛋白形成的 *ctgf* 的 RNA 和蛋白量在 PH 后均增加, 本文研究表明, *ctgf* 在 0.5~8、18~24、36、54 和 72 h 表达上调, 6 h 达到高峰, 是对照的 14 倍。 *ccna2* 在 0.5、6、18~24、36、48~72 h 表达上调, 66 h 达到高峰, 是对照的 45 倍。促进氨基聚糖形成的 *cspg5* 在 PH 后 2~4、12、30、42、66~72 h 表达上调, 12 h 达到高峰, 是对照的 15 倍。促进蛋白聚糖形成的 *cd47* 在 16、30、42、48 和 96 h 表达上调, 42 h 达到高峰, 是对照的 7 倍, 推测它们与再生肝的细胞外基质形成密切相关。

综上所述, 本文从较长时间和较多时点入手, 用高通量基因表达谱芯片分析了部分肝切除后大鼠细胞外基质相关基因表达情况。初步证实肝再生前期纤粘连蛋白形成相关基因表达增强, 肝再生中期胶原形成相关基因表达增强。然而, 从基因 mRNA 蛋白质 功能等受包括蛋白互作在内的多种因素影响, 今后我们将进一步用蛋白质芯片、RNA 干扰、蛋白互作等技术分析上述结果。

参考文献(References):

- [1] Taub R. Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature*, 2004, 5: 836-847.
- [2] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*, 1931, 12: 186-202.
- [3] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl.1): S45-S53. [\[DOI\]](#)
- [4] Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 93: 101-134.
- [5] Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev*, 2003, 120(1): 117-130. [\[DOI\]](#)
- [6] Xu CS, Chang CF, Yuan JY, Li WQ, Han HP, Yang KJ, Zhao LF, Li YC, Zhang HY, Rahman S, Zhang JB. Expressed genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 2932-2940.
- [7] Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology*, 2001, 48: 556-562.
- [8] Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol*, 2000, 32: 19-31. [\[DOI\]](#)
- [9] Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying en-

- zymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet*, 2004, 20(1): 33–43. [\[DOI\]](#)
- [10] Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 403–434. [\[DOI\]](#)
- [11] Vogel WF. Collagen-receptor signaling in health and disease. *Eur J Dermatol*, 2001, 11(6): 506–514. [\[DOI\]](#)
- [12] Mao Y, Schwarzbauer JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol*, 2005, 24(6): 389–399. [\[DOI\]](#)
- [13] Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci*, 1997, 2: d126–d146.
- [14] Timpl R, Brown JC. The laminins. *Matrix Biol*, 1994, 14(4): 275–281. [\[DOI\]](#)
- [15] Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V. Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng*, 2006, 8: 181–231. [\[DOI\]](#)
- [16] Abzalimov RR, Dubin PL, Kaltashov IA. Glycosaminoglycans as naturally occurring combinatorial libraries: developing a mass spectrometry-based strategy for characterization of anti-thrombin interaction with low molecular weight heparin and heparin oligomers. *Anal Chem*, 2007, 79(16): 6055–6063. [\[DOI\]](#)
- [17] Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 609–652. [\[DOI\]](#)
- [18] Cattaruzza S, Perris R. Proteoglycan control of cell movement during wound healing and cancer spreading. *Matrix Biol*, 2005, 24(6): 400–417. [\[DOI\]](#)
- [19] Schamhart DH, Kurth KH. Role of proteoglycans in cell adhesion of prostate cancer cells: from review to experiment. *Urol Res*, 1997, 25(Suppl.2): S89–S96. [\[DOI\]](#)
- [20] Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J*, 1993, 7(13): 1208–1218.
- [21] XU Cun-Shuan, ZHANG Wei-Min, LING Jun-Tang, HU Yi-Hong, LIANG Wei-Hong, LI Yu-Chang. The structure and function of ADAMs. *Progress in Natural Science*, 2001, 11(9): 902–908.
徐存拴, 张为民, 林俊堂, 胡轶红, 梁卫红, 李玉昌. ADAM 的结构和功能. *自然科学进展*, 2001, 11(9): 902–908.
- [22] Knepp JH, Geahr MA, Forman MS, Valsamakis A. Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(8): 3532–3536. [\[DOI\]](#)
- [23] Nuyts S, Van Mellaert L, Lambin P, Anné J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. *J Microbiol Methods*, 2001, 44(3): 235–238. [\[DOI\]](#)
- [24] Arkin A, Ross J, McAdams HH. Stochastic kinetic analysis of developmental pathway bifurcation in phage lambda-infected *Escherichia coli* cells. *Genetics*, 1998, 149(4): 1633–1648.
- [25] Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res*, 2003, 63(24): 8614–8622.
- [26] Collins JF. Gene chip analyses reveal differential genetic responses to iron deficiency in rat duodenum and jejunum. *Biol Res*, 2006, 39(1): 25–37.
- [27] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25): 14863–14868. [\[DOI\]](#)
- [28] Werner T. Cluster analysis and promoter modelling as bioinformatics tools for the identification of target genes from expression array data. *Pharmacogenomics*, 2001, 2(1): 25–36. [\[DOI\]](#)
- [29] ZHANG Shun-Li, ZHANG Guo-Jun, JIA Yong-Fang, SONG Xing-Li, ZHANG Tong, XU Chun-Shuan. The changes of expression of integrin $\alpha 1$, laminin and IL-1 α and their roles during rat liver regeneration. *Acta Anatomica Sinica*, 2004, 35(6): 624–631.
张顺利, 张国俊, 贾永芳, 宋兴丽, 张彤, 徐存拴. 整合素 $\alpha 1$ 、层粘连蛋白和 IL-1 α 在大鼠肝再生过程中的表达变化. *解剖学报*, 2004, 35(6): 624–631.
- [30] Pi L, Oh SH, Shupe T, Petersen BE. Role of connective tissue growth factor in oval cell response during liver regeneration after 2-AAF/PHx in rats. *Gastroenterology*, 2005, 128(7): 2077–2088. [\[DOI\]](#)