

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.01043

MAPK信号通路基因在小鼠肝再生中的表达谱变化

赖林泉¹, 袁运生¹, 郅尽², 朱润芝¹, 俞雁¹

1. 上海交通大学农业与生物学院上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240;
2. 上海交通大学药学院, 上海 200240

摘要: 为了分析丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-Activated Protein Kinases, MAPK)信号通路基因在肝再生中的表达图谱, 以及探讨 MAPK 信号通路在肝再生中的作用, 文章利用四氯化碳(Carbon Tetrachloride, CCl₄)诱导的小鼠肝损伤再生模型对 MAPK 信号通路基因的表达进行检测。首先, 采用 CCl₄腹腔注射的方法建立小鼠肝损伤再生模型, 通过肝脏切片 HE 染色和测定血清中谷丙转氨酶活性确认模型的质量, 然后, 在注射 CCl₄后的第 0、0.5、1.5、4.5、7 d 分别采集小鼠肝脏样本, 应用 Affymetrix 公司的小鼠基因表达芯片, 检测 MAPK 信号通路中 93 个基因的差异表达图谱, 并用荧光实时定量 PCR 法验证芯片检测的结果。结果表明, 在芯片检测到的 93 个 MAPK 信号通路基因中, 有 31 个在肝再生中有不同程度差异表达, 且经荧光实时定量 RT-PCR 检测的结果与基因芯片的结果相符合。基因表达谱芯片技术可以筛选出肝再生中差异表达的基因, 在小鼠肝再生中的第 0.5 和 1.5 d, MAPK 信号通路中表达水平上调的基因增多, 而在第 4.5 和 7 d, 则表达水平下调的基因明显增多。这一结果表明 MAPK 信号通路对肝再生不同阶段的双重调控作用。

关键词: 肝脏再生; 基因表达图谱; MAPK信号通路; 实时定量PCR

Differential expression of MAPK-pathway genes during liver regeneration of mouse

LAI Lin-Quan¹, YUAN Yun-Sheng¹, GAO Jin², ZHU Run-Zhi¹, YU Yan¹

1. Shanghai Municipality Key Laboratory for Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200240, China;
2. School of Pharmacy, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200240, China

Abstract: To investigate the different expression profiles of MAPK pathway genes and their corresponding functions during liver regeneration, we used a CCl₄ induced mouse liver regeneration model in this study. Mouse was injected with CCl₄ in the abdominal cavity to cause damage in the liver and followed by liver histology examination and measurement of serum ALT levels in blood sample collected at 0, 0.5, 1.5, 4.5, and 7 d after CCl₄ injection. Differentially expressed genes in the MAPK pathway during liver regeneration were analyzed using mouse cDNA microarray method (Affymetrix). The results obtained were further subjected to hierarchical clustering study and were validated with real-time PCR. Microarray hybridization identified 31 out of the 93 MAPK pathway component genes, which have significantly altered their expression levels during liver regeneration. Among them, both up- and down-regulated genes were classified into various groups according to clustering studies and functional analysis. At the initial stage of liver regeneration, the number of up-regulated

收稿日期: 2009-11-26; 修回日期: 2010-01-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2007AA02Z149)资助

作者简介: 赖林泉(1984-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 肝脏再生。Tel: 021-34205769; E-mail: cliphace@gmail.com

通讯作者: 俞雁(1964-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肝脏再生。Tel: 021-34205769; E-mail: yanyu@sjtu.edu.cn

genes was greater than the down-regulated genes, while at the late stage the situation was reversed. Our results suggest that MAPK pathway might play different regulatory roles in responding to different stages of liver regeneration.

Keywords: liver regeneration; gene expression profile; MAPK pathway; quantitative RT-PCR

肝脏是成年人和哺乳动物成年后体内再生能力最强的器官, 正常肝脏仅有 0.0012%~0.01% 的肝细胞进行有丝分裂, 但肝脏在受到化学毒物诱导肝损伤或肝部分切除后, 肝脏中剩余的肝细胞开始快速增殖^[1,2]。在 CCl₄ 诱导小鼠肝再生模型中, 小鼠肝脏在损伤后 1.5 d 左右出现 DNA 的合成高峰, 1 周时间即可恢复至正常水平^[3,4]。肝再生是由多条信号通路、多种因子共同参与的一种复杂生理过程, 此过程涉及各种细胞因子与生长因子的分泌, 细胞外基质的重构, 以及促进或抑制再生过程信号通路间的相互调控^[5]。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路动物体内重要的信号转导通路之一, 已有文献报道 MAPK 信号通路也参与了肝脏再生的信号调节^[6-8], 但在肝再生过程中 MAPK 信号通路的各个基因表达水平的变化却未见报道。本文采用 CCl₄ 腹腔注射的方法建立小鼠肝损伤再生模型, 应用 Affymetrix 公司的 Gene Chip® Mouse 430 2.0 小鼠基因表达芯片, 检测 MAPK 信号通路基因在肝再生中的表达谱, 并用荧光定量 PCR 法验证芯片分析结果, 从而为进一步探讨 MAPK 信号通路中不同基因对肝脏再生的具体调控作用提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 肝脏再生动物模型的建立

9 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠, 自由采食, 自由饮水, 12 h 光照, 12 h 黑暗。15 只小鼠, 按 1 μL/g 体重的剂量, 腹腔注射 CCl₄ (花生油稀释成 25% 的溶液后使用)。分别在小鼠注射 CCl₄ 后第 0、0.5、1.5、4.5 和 7 d 共 5 个时间点采集肝脏, 每次 3 只。并分别另取出一小块肝组织, 置入 4% 的甲醛溶液中固定, 用常规的方法进行组织包埋和制作石蜡切片, 并对切片进行 HE 染色。小鼠处死前先采用眼球摘除法采血, 常规方法分离血清保存于 -20℃, 用于测定血清中谷丙转氨酶活性, 测定方法参考谷丙转氨酶测定

试剂盒(南京建成公司)说明书。

1.2 RNA 抽提及纯化

将取出的肝脏立即冻入液氮, 利用 Trizol (Invitrogen) 方法抽提总 mRNA, 并采用 Rneasy Mini kit (Qiagen) 纯化总 mRNA, 参照说明书应用 Rneasy Mini Kit (Qiagen 公司, 美国) 对 RNA 样品进行纯化, 琼脂糖凝胶电泳进行质检。纯化样品的 A₂₆₀: A₂₈₀ 光吸收度比值应在 1.8~2.0 之间, 同时琼脂糖电泳结果需显示核酸的 28S 和 18S 两条特征条带。纯化后, 将每个时间点的 3 只小鼠肝脏总 RNA 等量混合, 用于下一步的芯片实验。

1.3 基因芯片

Affymetrix 公司的 Genechip® Mouse 430 2 基因芯片, 涵盖了 39 000 个转录本, 包含有 34 000 个明晰的小鼠基因, 详见该公司网站 www.affymetrix.com。

1.4 探针合成及芯片杂交

利用 One-cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix) 合成 cDNA, 该 cDNA 纯化由 GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) 试剂盒来完成。纯化的 cDNA 可以根据 GeneChip IVT Labeling Kit 的实验说明制备生物素标记的 cRNA。使用 GeneChip Sample Cleanup Module (Affymetrix) 试剂盒纯化生物素标记的 cRNA, 并于 94℃ 保温 35 min 进行片段化。片段化的 cRNA 即为杂交用的探针。应用检测芯片 (Test Chip) 检测片段化 cRNA 的质量。之后取适量 cRNA 与实验芯片 (Experimental chip) 杂交, 杂交完成后的芯片按照实验流程进行洗涤, 扫描(该部分实验由 Affymetrix 合同完成)。

1.5 数据分析

对于扫描的芯片杂交图像结果, 采用基因芯片操作软件 (Genechip operating software, GCOS) 进行处理, 对所有芯片数据中最大的 2% 和最小的 2% 进行剔除, 剩下的进行均一化至平均信号值为 500。并

根据杂交信号, 将基因分为表达(Present, P)、模糊表达(Marginal, M)和缺失(Absent, A)3 种情况。基因变化水平根据不同时间点的信号值与 0 d 进行比较, 其比值(Ratio)进行 \log_2 对数处理。比值 >2 为基因表达明显上调, 比值 <0.5 为基因表达明显下调。另外, 采用聚类分析软件 Cluster3.0 和 Treeview 对数据进一步聚类分析。

1.6 实时荧光定量RT-PCR验证芯片数据

采用两步法 SYBR Green 荧光嵌合 RT-PCR, 检测 4 个重要通路基因(*Il1b*、*Il1r*、*Grb2*、*Sos1*)的 mRNA 表达水平, 以验证芯片表达的结果。利用 primer premier 5.0 引物设计软件, 根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)公布的 *Il1b*、*Il1r*、*Grb2*、*Sos1* 的 mRNA 基因序列, 设计相应的引物(表 1)。引物设计的原则: 引物长度为 17~25 bp; 扩增片段大小在 80~150 bp 之间; GC 含量最好为 45%~55%; 正反两条引物的解链温度(T_m)应尽量接近; 且尽量在外显子交界处(Exon Junction)设计引物, 限制基因组 DNA 的扩增。并且通过 NCBI 中 Blast 功能, 检测引物的特异性。引物由宝生物(大连)工程有限公司合成。

表 1 定量 RT-PCR 引物信息

基因名称	引物序列(5' 3')	扩增片段大小(bp)
<i>β-actin</i>	F: GCGCGCACCAACCATGTACCT R: AGGGGCCGGACTCGTCATACT	120
<i>Sos1</i>	F: CTGTTCAACAAATCCCTAG R: TCTCATGGTTCCTGGTC	129
<i>Il1b</i>	F: TGAGCACCTTCTTTTCCTTC R: GTTCATCTCGGAGCCTGTAG	124
<i>Il1r</i>	F: ACAGCGGCTCCACATTG R: CTCCGAAGAAGCTCACGT	115
<i>Grb2</i>	F: TCTCCCTGTCCGTCAAGTTT R: TGGACACGGATGTTGATCTG	100

第一步 RT-PCR 反转录 cDNA: 取 5 μ L RNA 样本, 依次加入 Oligo(dT)₁₈ 2 μ L、DEPC 水 4 μ L, 70 5 min; 5 \times Reaction Buffer 4 μ L、RNase Inhibitor 0.5 μ L、10 mmol/L dNTP Mix 2 μ L、DEPC 水 1.5 μ L, 37 5 min; M-MuLV 反转录酶 1 μ L, 42 60 min。

第二步荧光定量 PCR 反应: 以 cDNA 作为模板, 取模板 2 μ L, 依次加入 2 \times PCR SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μ L, 10 nmol/L 的正反向引物各 0.4 μ L, 灭菌蒸馏水(dH₂O) 7.2 μ L, 体系为 20 μ L。在 MJ Chromo 4

型荧光 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行扩增。反应条件: 95 预变性 30 s; 95 变性 5 s, 60 复性及延伸 20 s, 共 40 个循环。循环结束后执行熔解曲线程序。由熔解曲线判定 PCR 反应的特异性, 根据荧光曲线的 Ct 值以及标准曲线, 以 *β -actin* 为内参照, 用相对定量方法计算基因表达量。

2 结果与分析

2.1 肝脏再生模型形态学观察

小鼠肝脏在注射 CCl₄ 1.5 d 左右后, 肝组织损伤最为严重, 坏死区域最多, 而到第 7 d 左右肝脏基本恢复到正常状态。而血清中谷丙转氨酶水平在 1.5 d 时也达到峰值, 到第 7 d 基本与正常水平一致(图 1)。

2.2 芯片检测结果

总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.88~2.08 之间, 表明 RNA 纯度较高, 无明显降解, 芯片实验结果可靠。从京都基因与基因组百科全书(KEGG, [HTTP://www.genome.ad.jp/kegg](http://www.genome.ad.jp/kegg))数据库, 检索到 MAPK 信号通路已知包含 93 个基因。根据芯片结果分析, 在 CCl₄ 诱导的小鼠肝再生中有 31 个 MAPK 信号通路基因的 mRNA 表达水平发生了变化。根据这些基因在肝再生中表达的动态变化规律, 用 Cluster3.0 和 TreeView 软件进行聚类分析, 并经过手工修正后, 得到以下 4 组结果(图 2)。

组 1: 总共有 15 个基因, 主要为显著下调基因, 包括重要的转录因子如 *Jun*、*Myc* 和 *Atf4*, 在小鼠肝再生中的第 4.5 d, *Jun*、*Myc* 和 *Atf4* 的表达水平分别下调 1.36 倍 2.49 倍和 1.03 倍; 而在第 7 d 也分别下调 2.28 倍、3.31 倍和 0.73 倍。这组结果提示这些基因可能在肝脏再生的恢复阶段即第 4.5 和 7.5 d 发挥作用, 关键的转录因子如 *Jun*、*Myc* 和 *Atf4* 通过其表达水平的下调, 抑制肝细胞增殖和调控细胞凋亡, 从而维持和调控肝脏的正常功能。组 2: 共有 3 个基因, 主要为生长因子受体如 *Grb2*、*Sos1* 和 *Il1r*, 它们仅在第 0.5 d 表达上调, 分别上调 1.28 倍、1.74 倍和 1.67 倍, 这组基因可能在启动肝细胞增殖中发挥着重要作用。而且我们还发现, 在整个小鼠肝再生中 *Grb2* 和 *Sos1* 的表达趋势很一致(图 3)。组 3: 这组基因仅在第 1.5 d 表达显著上调, 其他时间点表达

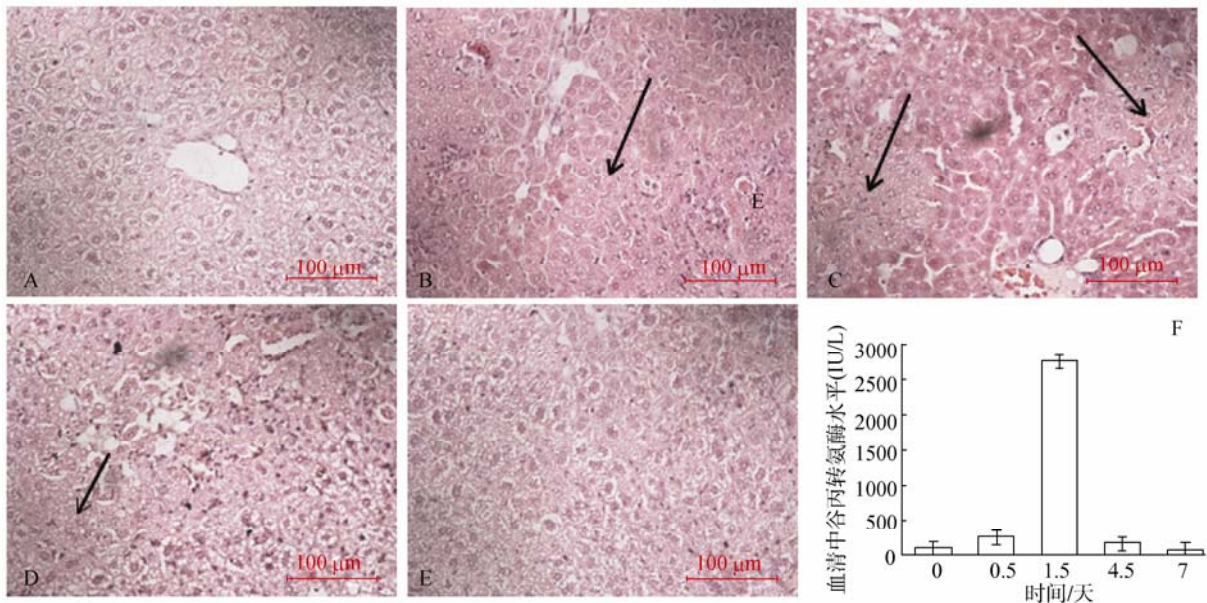


图1 CCl₄ 诱导肝再生过程中肝细胞增殖变化

A~E: 分别是注射 CCl₄ 后的第 0、0.5、1.5、4.5 和 7 d 的肝组织切片 HE 染色, 黑色箭头指示有坏死区; F: CCl₄ 诱导肝再生过程中血清中谷丙转氨酶的变化。

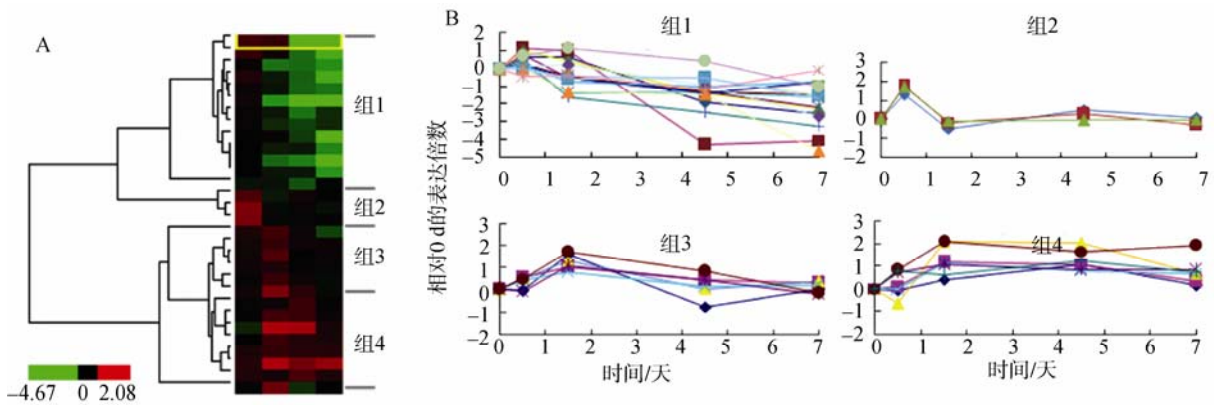


图2 小鼠肝脏再生过程中 MAPK 信号通路基因表达谱的聚类分析

A: 聚类分析小鼠肝再生过程中表达水平发生变化的 MAPK 信号通路基因(绿色表示表达水平显著下调, 黑色表示表达水平没有变化, 红色则表示表达水平显著上调); B: 每组分类基因的变化趋势。

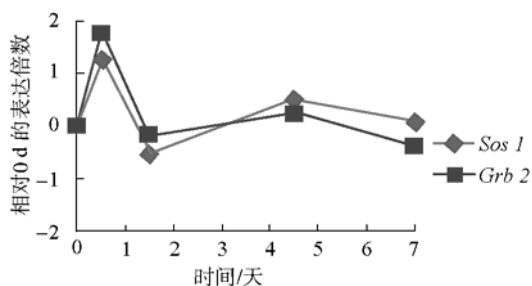


图3 *Sos1* 和 *Grb2* 的表达变化趋势

无明显变化。*Fos*、*Il1b*、*Rasa1*、*Dusp3* 和 *Flna* 在第 1.5 d 分别上调 1.58 倍、1.02 倍、1.26 倍、1.07 倍

和 1.71 倍。组 4: 这组基因在肝再生的恢复阶段即第 4.5 或 7 d 依然保持高表达, 如 *Rac2* 在第 1.5、4.5 和 7 d 分别上调 2.08 倍、1.66 倍和 1.91 倍(表 2)。

通过对表达变化基因的时序分析, 在 0.5 d 和 1.5 d 表达上调的基因数量明显多于表达下调的基因, 在第 1.5 d 上调的基因最多, 而在第 4.5 d 和 7 d 表达下调的基因数量明显多于表达上调的基因数量(图 4)。在 MAPK 信号通路的 4 条途径中, ERK1/2 途径的 *Sos1*(1.28 倍)、*Grb2*(1.74 倍)在小鼠注射 CCl₄ 的第 0.5 d 表达显著上调, *Ras*(1.1 倍)、*Map2k2*(1.04 倍)、

表 2 小鼠肝再生中 MAPK 信号通路基因的表达变化

分组	基因	GenBank 登录号	相对 0 d 的表达倍数			
			0.5 d	1.5 d	4.5 d	7 d
组 1	<i>Cd14</i>	NM_000591	0.64	0.62	-1.9	-2.55
	<i>Hspb1</i>	NM_001540	1.13	1.02	-4.33	-4.05
	<i>Jun</i>	NM_002228	1.03	0.47	-1.36	-2.28
	<i>Hspa5</i>	NM_005347	0.2	-1.39	-1.34	-1.61
	<i>Rras2</i>	NM_012250	0.78	-0.52	-1.28	-2.2
	<i>Dusp1</i>	NM_004417	0.32	-0.43	-1.29	-1.43
	<i>Myc</i>	NM_002467	0.49	-1.63	-2.49	-3.31
	<i>Rapgef2</i>	NM_014247	0.24	-0.51	-1.42	-0.76
	<i>Atf4</i>	NM_001675	0.25	-0.73	-1.03	-0.72
	<i>Hspa8</i>	NM_006597	0.11	0.22	-0.96	-2.7
	<i>Map3k7</i>	NM_003188	0.01	-0.55	-0.5	-1.56
	<i>Hspa1b</i>	NM_005346	-0.03	-1.31	-1.49	-4.67
	<i>Map2k7</i>	NM_145185	-0.01	-0.47	-0.48	-1.65
	<i>Map3k7ip2</i>	NM_015093	-0.42	-0.39	-1.15	-0.06
	<i>Mknk2</i>	NM_199054	0.73	1.16	0.4	-1.05
组 2	<i>Sos1</i>	NM_005633	1.28	-0.51	0.5	0.09
	<i>Grb2</i>	NM_002086	1.74	-0.19	0.25	-0.37
	<i>Il1r</i>	NM_000877	1.67	-0.11	-0.1	-0.05
组 3	<i>Fos</i>	NM_005252	-0.06	1.58	-0.77	0.05
	<i>Il1b</i>	NM_000576	0.53	1.02	0.46	0.32
	<i>Map2k1ip1</i>	NM_006116	0.51	1.32	0.04	0.38
	<i>Rasa1</i>	NM_002890	0.42	0.76	0.12	0.2
	<i>Dusp3</i>	NM_004090	-0.1	1.07	0.42	-0.22
	<i>Flna</i>	NM_001110556	0.51	1.71	0.85	-0.16
	<i>Casp3</i>	NM_004346	-0.06	0.4	1.09	0.13
组 4	<i>Mapk3</i>	NM_001040056	0.11	1.18	1.09	0.3
	<i>Stmn1</i>	NM_001145454	-0.66	2.08	2.02	0.67
	<i>Rras</i>	NM_006270	0	1.1	0.8	0.68
	<i>Map2k2</i>	NM_030662	0.71	1.04	0.86	0.83
	<i>Rac2</i>	NM_002872	0.84	2.08	1.66	1.91
	<i>Map2k5</i>	NM_145160	0.77	0.59	1.25	0.71

Fos(1.58 倍)、*Mapk3* (1.18 倍)等则在第 1.5 d 出现表达上调, 且 *Mapk3*(1.09 倍)在第 4.5 d 保持上调表达(图 5); 而在 *Il1* 介导的传递途径中, *Il1r*(1.67 倍)与 *Il1b*(1.02 倍)的表达水平在小鼠注射 CCl₄ 的第 0.5 d 与第 1.5 d 分别升高, 而 *Tab2*(-1.15 倍)只在第 4.5 d 表达明显下调, *Tak1*(-1.56 倍)则只在第 7 d 表达显著下调(图 6)。

2.3 荧光定量RT-PCR验证结果

我们选择 MAPK 通路中 4 个关键的基因(*Il1b*、*Il1r*、*Grb2*、*Sos1*)进行荧光定量 RT-PCR 检测, 来验证

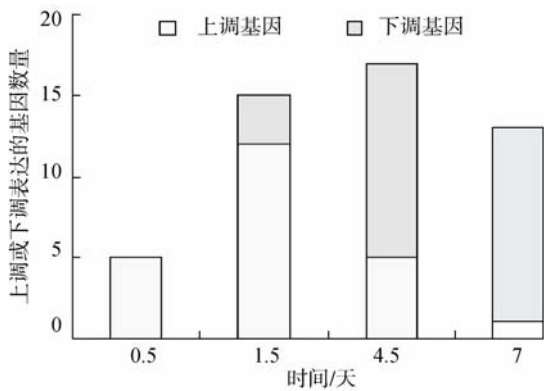


图 4 不同时间点表达上调或下调基因个数

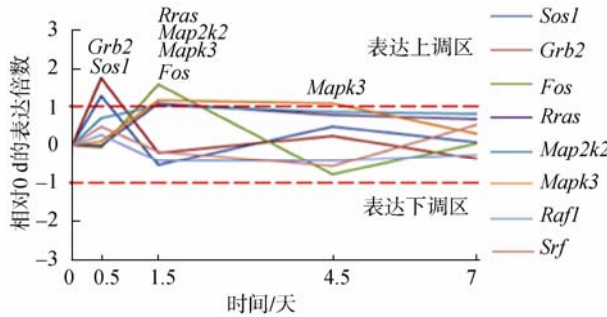


图 5 ERK1/2 途径相关基因 mRNA 表达的时序变化

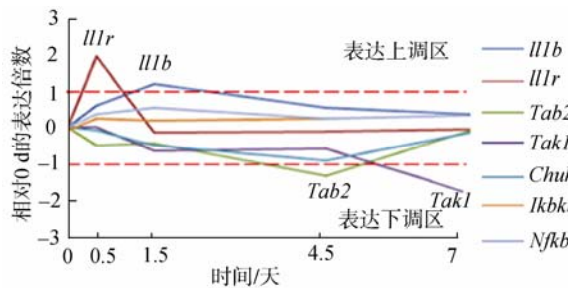


图 6 IL-1 介导的传递途径相关基因 mRNA 表达的时序变化

芯片的结果。应用 Spearman 相关分析, 荧光定量 RT-PCR 检测结果与芯片结果的相关性 $\gamma_s=0.793$, 相关性极高($n=20, \gamma_s(20,0.01)=0.380$), 表明芯片结果与荧光定量 RT-PCR 检测的结果相吻合(图 7)。

3 讨论

CCl₄ 诱导的肝脏损伤再生模型是研究肝脏再生常见的模型之一^[9~11]。CCl₄ 是经典的肝脏毒素, 经肝脏代谢产生高活性的三氯甲基自由基, 后者可以使脂质过氧化进而损伤肝细胞膜。自由基作用于 DNA 后, 损伤核糖和碱基, 使核酸直接破坏, 引起 DNA 链的断裂, 从而使 DNA 链间或与蛋白质间相互交联, 进而影响其信息传递功能以及转录和复制的特性, 改变癌基因和抑癌基因的活性状况, 最后可引发细胞增殖失控而至癌变^[10]。通过芯片数据分析可知, 1.5 d 上调基因最多, 是 DNA 合成和细胞有丝分裂的高峰, 而 4.5 d 变化表达的基因数量最多, 是肝细胞增殖和修复最活跃的阶段; Weber 等^[11]也证实小鼠肝脏在受到损伤后的 1.5 d 左右出现 DNA 合成高峰, 随后逐渐进入 G₂ 期和细胞增殖, 大约到第 7 d 左右肝脏基本恢复到正常状态。这也与肝脏切片 HE 染色(图 1)以及血清中谷丙转氨酶的变化(图 2)相吻合, 表明建立的 CCl₄ 诱导的肝脏损伤再生模型是成功的。肝脏在开始受到化学药物 CCl₄ 的刺激后, 肝组织和肝细胞大量坏死, MAPK 信号通路相关的基因通过表达上调参与启动肝细胞的增殖与分化, 而到后期, 肝脏功能逐渐恢复, 再生也逐渐终止, 其

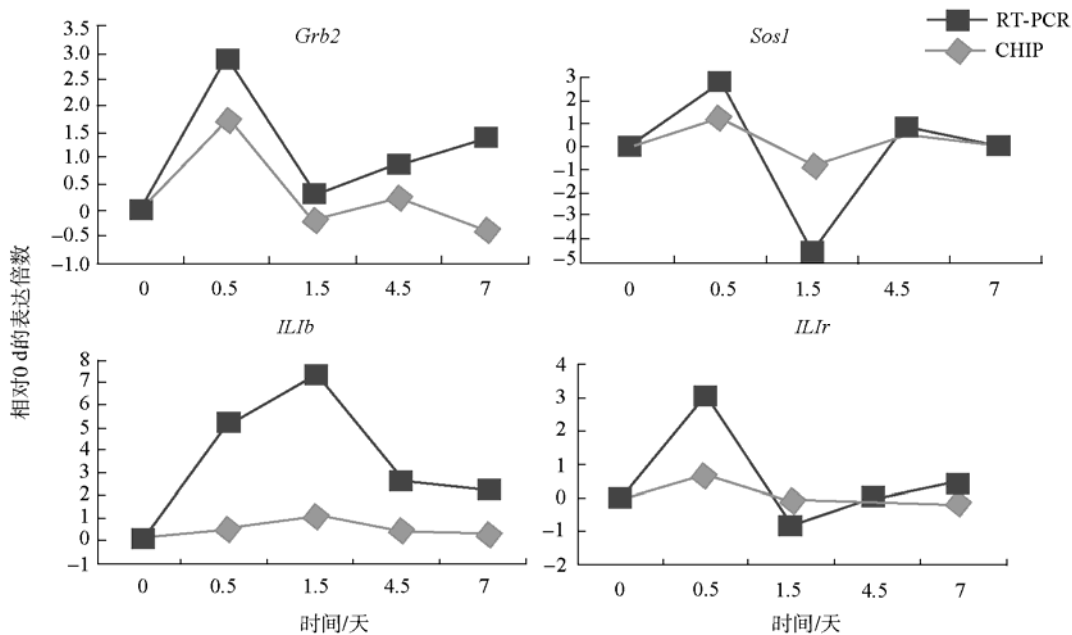


图 7 定量 RT-PCR 验证基因表达

表达下调基因增多则有助于抑制细胞增殖和调控细胞凋亡,从而调控肝脏正常功能。所以 MAPK 通路参与调控了肝再生的起始、进程和终止,在肝脏再生过程中可起到正向和负向双重调控作用。

MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。哺乳动物的MAPK信号通路主要包括胞外信号调节激酶 1/2(Erk1/2)、Erk5、c-jun N端激酶(c-jun N-terminal kinase, Jnk)及P38 途径 4 条通路^[12,13]。生长因子受体连接蛋白 2(The growth factor receptor-bound protein-2, Grb2)主要在 MAPK 信号转导中起作用^[14]。小鼠肝脏在受到 CCl₄ 损伤后,生长因子受体如 *Il1r*、*Grb2*、*Sos1* 便通过上调表达,激活 MAPK 信号通路,随后 *Ras*、*Raf*、*Mek*s 和 *Fos* 等细胞分裂相关转录调节因子也先后出现表达上调,而这些因子可以加快有丝分裂细胞周期的进程,促使细胞增殖、分裂和抑制细胞凋亡。根据这些基因表达的时序动态变化(图 5),表明 MAPK 信号通路可遵循 *Grb2/Sos1*→*Ras*→*Raf*→*Mek*s→*Fos* 三级酶促级联反应来促进细胞 DNA 合成和细胞增殖,进而参与调控肝脏再生。这与文献^[15~17]中的报道: Grb2 可利用其 SH3 功能区与富含脯氨酸的 *Sos* 形成复合物,启动 Ras-Mapk 通路,逐级激活 *Raf*、*Mek*、*Mapk* 及其下游的蛋白激酶和转录因子,从而将外界信号输入核内,引起相应的生物效应,调控细胞增生、分化相一致。同时经荧光定量 RT-PCR 验证,我们还发现 *Grb2*、*Sos1* 的表达变化趋势一致(图 7),提示 *Grb2* 与 *Sos1* 可通过蛋白相互作用以 *Grb2-Sos1* 复合体的形式参与小鼠肝脏再生整个过程的调控^[18],这也与有文献报道 *Grb2-Sos1* 也是通过蛋白相互作用以复合体的形式在乳腺癌组织和骨髓细胞性白血病(CML)细胞增生中发挥作用相一致^[19,20]。

Tak1(Map3k7)属于丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, Mapkkk)家族成员, Tak1 与其特异的结合蛋白 Tab2(Tak1 binding protein, Map3k7ip2)在 *Mapk*、*Tgf-β*、*Tnf-α* 以及 *Nf-κb* 等介导的信号传导通路中起着关键的作用^[21], Takaesu 等^[22]也证实 *Il1* 可以刺激 Tab2 从细胞膜转位至细胞浆,胞浆的 Tab2 通过自磷酸化活化后与 Tak1 相结合后,再与 *Tnf* 受体相关因子 6(*Traf6*)相互作用,进而激活 *Nik* (*NNf-κb* induced kinase),最后激活核转录因子(*Nf-κb*),从而调控细胞的生长、分化与凋

亡。因此 Tab2 可以作为一种 Tak1 与 *Traf6* 之间的连接蛋白,组成 *Traf6-Tab2-Tak1* 复合体,从而介导 MAPK 的信号传递^[22~24]。根据这些基因表达的时序动态变化表明 MAPK 信号通路也可能遵循 *Il1*→*Il1r*→*Tab2/Traf6*→*Tak1*→*Chuk*→*Nf-κb* 来调控细胞增殖分化和凋亡(图 6),肝脏损伤的第 0.5 d 和 1.5 d 主要通过 *Il1* 和 *Il1r* 的表达上调,参与启动肝细胞的增殖与分化,而在肝脏功能逐渐恢复的第 4.5 d 和第 7 d 则主要通过 Tab2 和 Tak1 的表达显著下调来抑制细胞增殖和调控细胞抗凋亡,提示 *Tak1* 和 *Tab2* 在小鼠肝脏再生的负向调控中扮演着关键作用。

该研究通过应用基因芯片技术,从 mRNA 水平上揭示了肝脏再生 MAPK 信号通路基因的表达变化,并筛选出肝脏再生各阶段 MAPK 信号通路基因表达水平显著上调和下调的基因,并且根据 MAPK 信号通路各基因表达的时序变化,推测出复杂的 MAPK 信号通路参与调控小鼠肝脏再生的两条途径,为进一步研究 MAPK 信号通路对肝脏再生的作用提供理论基础。

参考文献(References):

- [1] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2004, 5(10): 836–847. [DOI](#)
- [2] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*, 2006, 43(2): S45–53. [DOI](#)
- [3] Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Science*, 1997, 276(5309): 60–66. [DOI](#)
- [4] Yuan YS, Wu XY, Ou QX, Gao J, Han W, Tennant, BC, and Yu Y. Differential expression of the genes involved in amino acids and nitrogen metabolisms during liver regeneration of mice. *Hepatol Res*, 39(3): 301–312.
- [5] Ozaki M. Role of Jak/STAT 3 and PI3-K/Akt pathways in liver injury and regeneration. *Seikagaku*, 2008, 80(5): 399–408.
- [6] Diehl AM, Rai R. Review: Regulation of liver regeneration by proinflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol*, 1996, 11(5): 466–470. [DOI](#)
- [7] Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(4): 144–146.
- [8] Wang B, Gao C, Ponder KP. C/EBPβ contributes to hepatocyte growth factor-induced replication of rodent hepatocytes. *J Hepatol*, 2005, 43(2): 294–302. [DOI](#)
- [9] Brucoleri A, Galhcci R, Germolec DR, Blackshear P. In-

- duction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology*, 1997, 25(1): 133–141. [\[DOI\]](#)
- [10] Castro GD, Díaz Gómez MI, Castro JA. DNA bases attack by reactive metabolites produced during carbon tetrachloride biotransformation and promotion of liver microsomal lipid peroxidation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1997, 95: 253–258.
- [11] Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbontetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33(2): 105–136. [\[DOI\]](#)
- [12] Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol*, 2008, 20(2): 183–189. [\[DOI\]](#)
- [13] Cuschieri J, Maier RV. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit Care Med*, 2005, 33(12): 417–441. [\[DOI\]](#)
- [14] Punnett A, Mockridge JW, Farooqui S, Marber MS, Heads RJ. Sustained activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase during recovery from simulated ischaemia mediates adaptive cytoprotection in cardiomyocytes. *Biochem J*, 2000, 350(Pt 3): 891–899. [\[DOI\]](#)
- [15] Lee JT Jr, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia*, 2002, 16(4): 486–507. [\[DOI\]](#)
- [16] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 2001, 81(2): 807–869.
- [17] Simon JA, Schreiber SI. Grb2 SH3 binding to peptides from Sos: evaluation of a general model for SH3-ligand interactions. *Chem Biol*, 1995, 2(1): 53–60. [\[DOI\]](#)
- [18] Gao J, Li WX, Feng SQ, Wan DF, Han W, Yu Y. A protein-protein interaction network of transcription factors acting during liver cell proliferation. *Genomics*, 91(4): 347–355.
- [19] Feller SM, Tuchscherer G, Voss J. High affinity molecules disrupting GRB2 protein complexes as a therapeutic strategy for chronic myelogenous leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(3): 411–427. [\[DOI\]](#)
- [20] Kardinal C, Konkol B, Lin H, Eulitz M, Schmidt EK, Estrov Z, Talpaz M, Arlinghaus RB, Feller SM. Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2-SOS complexes. *Blood*, 2001, 98(6): 1773–1781. [\[DOI\]](#)
- [21] Jun N, Kazuya K1, Atsushi H, Jun-ichiro I, Zhaodan C, Kunihiro M. The kinase TAK1 can activate the NIK-IB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 1999, 398(6724): 252–256.
- [22] Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol Cell*, 2000, 5(4): 649–658. [\[DOI\]](#)
- [23] Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 2001, 412(6844): 346–351. [\[DOI\]](#)
- [24] Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E. TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *Biol Chem*, 1997, 272(13): 8141–8144. [\[DOI\]](#)

• 综合信息 •

抗体制备与使用实验指南(生命科学实验指南系列)

〔美〕G. C. 霍华德 M. R. 凯瑟 著 张权庚 张玉祥 丁卫 王炜 主译

978-7-03-028556-0 ¥78.00 2010年8月出版

内容简介

本书收集了抗体制备与使用中的基本实验方法及相关的最新科研进展,这些方法是开展抗体制备研究的必备知识!包括鼠源性单克隆抗体的制备、纯化、应用以及抗体的修饰等,同时也包括部分基因重组性单克隆抗体,涉及内容具体、全面,反映了国际上的最新发展方向。

本书对从事生物学、免疫学、生物化学与分子生物学、医药卫生科学领域的科研技术人员,以及高等院校师生具有参考价值。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人:科学出版社科学销售中心 周文宇

电话:010-64031535; E-mail:zhouwenyu@mail.sciencep.com