

纤维化肝窦内皮细胞中
基因表达的研究

R 575.202

Q344.13

陈宏¹, Stolz F-M², Dargel R²

(1 西北农林科技大学 动物科学与动物医学学院, 陕西 杨陵, 712100; 2 Institute of Pathobiochemistry, Medical Faculty, Friedrich-Schiller-University, D-07740 Jena, Germany)

[摘要] 按照肝脏受 TAA 损伤的程度把试验动物 Wistar 大白鼠分为两组(TAA-1 和 TAA-2)。Northern 杂交分析表明,在 TAA-1 的窦内皮细胞中, *bcl-x* 和 *bax* 基因的表达水平轻微降低;随着肝损伤的增加,表达水平再度下降。核 Run-off 转录分析表明,两组的窦内皮细胞、总的 RNA 合成率下降约 30% ($P < 0.001$); TAA-1、*bad*、*bax* 和 *cyclin E* 的 mRNA 合成有所降低,而 *cyclin A* 的 mRNA 合成则明显增加; TAA-2、*bad*、*bax* 和 *bcl-2* 的 mRNA 合成增加了 2~3 倍, *bcl-x* 的 mRNA 合成增加了 7 倍多。

[关键词] 硫代乙酰胺(TAA); 肝纤维化; 窦内皮细胞; 凋亡基因; 周期基因; 基因表达

[中图分类号] Q344.13 **[文献标识码]** A

增生和凋亡过程可能在慢性纤维化肝脏疾病的发病机理中起着重要的作用。许多因素如缺氧、感染和化学毒素都可引起肝脏的增生和纤维化过程,这些过程由肝实质性细胞和非实质性细胞释放的许多因子所控制。用硫代乙酰胺(TAA)对大白鼠的慢性处理会导致明显的肝脏纤维化并常伴随着增生过程^[1,2]。因此,本研究的目的是检测从不同损伤程度的纤维化肝脏中所分离的窦内皮细胞凋亡因子、细胞周期因子 mRNA 量和合成的可能变化,以揭示肝硬化发病遗传的分子机理。

1 材料和方法

1.1 材料

试验动物 观察饲养 1 周后认定为健康的 3 月龄 Wistar 大白鼠。

化学试剂 所用化学试剂都是高纯度的商业试剂,均购于德国各公司。

杂交探针 下列 cDNA 片断被用作杂交探针: 鼠 *bad* cDNA 700 和 400 个核苷酸的 *EcoR* I 片断; 大白鼠 *bax* cDNA 446 个核苷酸的 *EcoR* I 片断; 大白鼠 *bcl-2* cDNA 708 个核苷酸的 *EcoR* I - *Hind* III 片断; 大白鼠 *bcl-x* cDNA 765 个核苷酸的 *EcoR* I 片断; 大白鼠 *cyclin A* cDNA 400 个核苷酸的 *EcoR* I 片断; 大白鼠 *cyclin B* cDNA 1 470 个核苷酸的 *Msp* I - *Dra* I 片断; 大白鼠 *cyclin D₁* cDNA 2 800 和 800 个核苷酸的 *Bam*H I 片断; 大白鼠 *cyclin E* cDNA 1 960 个核苷酸的 *Bam*H I 片断。大白鼠 GAPDH cDNA 1 300 个核苷

[收稿日期] 1999-12-21

[基金项目] 德国 DFG 基金资助项目

[作者简介] 陈宏(1955-),男,教授,博士,博士生导师。

酸的 *Pst* I 片断和大白鼠 β -actin cDNA 1 850 个核苷酸的 *Pst* I 片断被用作阳性对照, pUC18 cDNA 2 686 个核苷酸的 *Pst* I 片断和 PCR-Script cDNA 2 961 个核苷酸的 *Pst* I 片断被用作阴性对照。这些 cDNA 质粒通过 Plasmid Kit (Promega, 德国) 提取。

1.2 方法

肝脏纤维化的诱发 Wistar 大白鼠从 3 月龄开始连续饮用 3~6 个月 0.3 g/L 的 TAA 水溶液, 以获得肝脏的纤维化。按照肝脏损伤的程度把试验动物分为 2 组 (TAA-1 和 TAA-2)。损伤的程度通过组织学方法评价。组织学分类的标准见表 1, 以相应年龄的正常动物作对照 (C-1 和 C-2)。

表 1 组织学分类的标准

处 理	门 区 连接组织	门 区 炎症浸润	改 变 似延髓病	胆导管 增 生	肝细胞 核 仁	肝细胞 异核体
TAA-1	O/+	O/(+)	O	O/+	+/++	+/++
TAA-2	+ /+++	O/+	(+)/+++	+ /+++	+ /+++	+ /+++

注: 损伤程度分 O: 正常; (+): 轻微; +: 轻度; ++: 中等; +++: 严重。

窦内皮细胞的分离 按照 Vogl 等^[2]的方法分离。即大白鼠的肝脏经过 Pronase E 和胶原酶消化后获得的细胞, 再经 Nycodenz 梯度离心和洗脱而得到。

Northern Blot 分析 按照制造商的方法, 用 TOTALLY™ RNA Kit 从窦内皮细胞中分离总的 RNA, 在 10 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳。再通过 Northern-Blotting 把总的 RNA 转移到 Hybond-N⁺ 膜上, 用 bax 和 bcl-x cDNA 探针杂交。探针用 [α -³²P] dCTP (111 PBq/mol) 通过随机引物法标记。杂交在 42℃, 18~24 h 的严格条件下进行。杂交后用 1×SSC, 1 g/L SDS 室温 30 min 洗涤 2 次, 用 0.1×SSC, 5 g/L SDS 42℃ 20 min 洗涤 2 次, 然后通过同位素成像仪 (Bio Rad laboratories, CA, USA) 显带和量化分析。

体外转录率分析 细胞核的分离按照 Samsbrook 等^[3]的方法。总 RNA 的合成和 mRNA 转录率的测定通过核 Run-off 转录试验。400 μ L 反应混合物 (含有 5.0×10^7 个细胞核, 体积分数 20% Glycerol, 50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.3), 5 mmol/L MgCl₂, 150 mmol/L KCl, 500 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L DTT, 1 mmol/L CTP, ATP, GTP, 750 mmol/(L·min) RNasin, 9.25 PBq/L 的 [α -³²P] UTP) 30℃ 下温浴 60 min。接着反应混合物用 DNase I, 蛋白酶 K 消化, 用酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 提取, 然后用 2 倍体积分数 100% 乙醇沉淀。标记的 RNA 被溶解在 2 mL 的预杂交溶液 (50 mmol/L PIPES, pH 6.8, 10 mmol/L EDTA, 600 mmol/L NaCl, 2 g/L SDS, 2.5×Denhardt 溶液, 100 mg/L 鲑鱼精子 DNA 和 100 mg/L Poly A) 中, 通过同位素液闪仪测定新合成的总 RNA 的放射性强度, 以计算试验组的相对合成量。

通过 Slot blot 将每一种 cDNA 固定到 Hybond-N⁺ 膜上, 在 65℃ 预杂交 4 h 后, 换入标记的 RNA 杂交液继续杂交 40~44 h, 杂交后用 2×SSC, 1 g/L SDS 室温 10 min 洗涤 2 次, 65℃ 5 min 2 次, 0.2×SSC, 1 g/L SDS 65℃ 5 min 洗涤 2 次, 最后, 0.16×SSC, 1 g/L SDS 65℃ 5 min 洗涤 2 次, 然后通过同位素成像仪显带和量化, 再用 β -actin 标准化。所有数据资料来自 6~9 个动物独立的细胞制剂。

2 结果

2.1 Northern Blot 分析

图1描述了借助 Northern-Blotting *bcl-x* 和 *bax* 基因在窦内皮细胞中的表达。与对照组相比,在 TAA-1 的窦内皮细胞中,*bcl-x* 和 *bax* 的表达水平轻微降低。随着肝损伤的增加,这2个基因的表达水平再继续下降。

2.2 总 RNA 的合成率

总 RNA 的合成通过核 Run-off 转录试验测定。在每一试验中,对照和试验2组同时进行。在所分离的窦内皮细胞中,与相应年龄的对照组相比,两个试验组³²P-UTP 结合到总的 RNA 上的结合率明显降低约 30% ($P < 0.001$) (图2),2个对照组之间没有明显差异 ($P > 0.05$)。

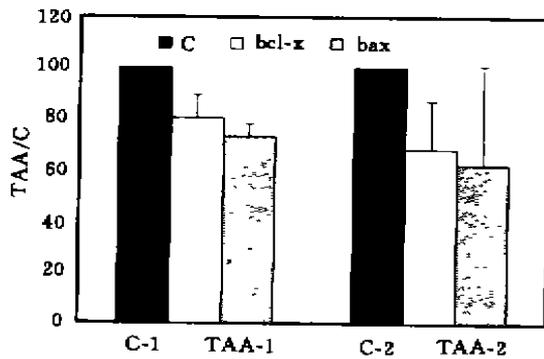


图1 *bcl-x* 和 *bax* 基因的表达分析

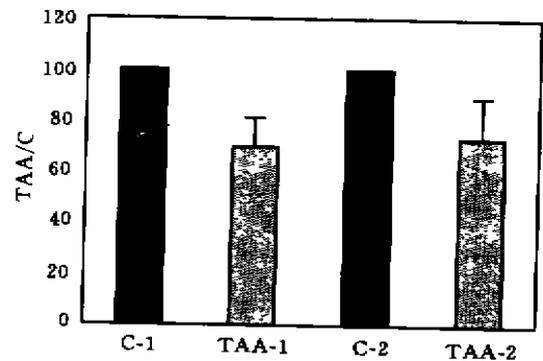


图2 TAA 对³²P-UTP 结合到总的 RNA 上的影响

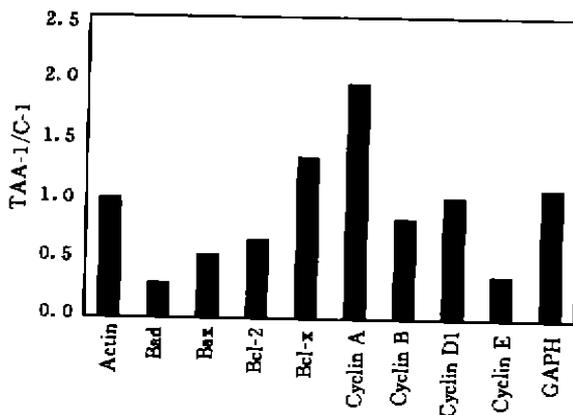


图3 C-1 和 TAA-1 损伤肝脏窦内皮细胞凋亡基因和周期基因的相对转录率

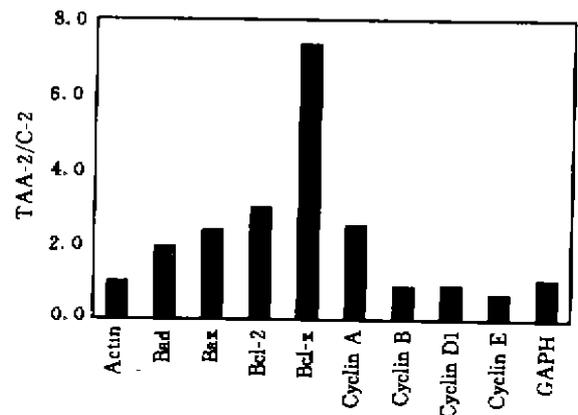


图4a C-2 和 TAA-2 损伤肝脏窦内皮细胞凋亡基因和周期基因的相对转录率

2.3 mRNA 的体外转录率分析

通过 Run-off 体外转录和 Slot blot 杂交测定了 4 个凋亡基因和 4 个周期基因

mRNA 的转录率,其结果见图 3 和图 4(a,b)。在 TAA-1 肝脏的窦内皮细胞中,与对照组相比,bad,bax 和 cyclin E mRNA 的合成有所降低,而 cyclin A 的 mRNA 的合成则明显升高(图 3)。在 TAA 诱发的肝纤维化后期(TAA-2),bad,bax,bcl-2 和 cyclin A 的 mRNA 在窦内皮细胞中合成增加了 2~3 倍,bcl-x 的 mRNA 合成增加了 7 倍多(图 4a,b)。

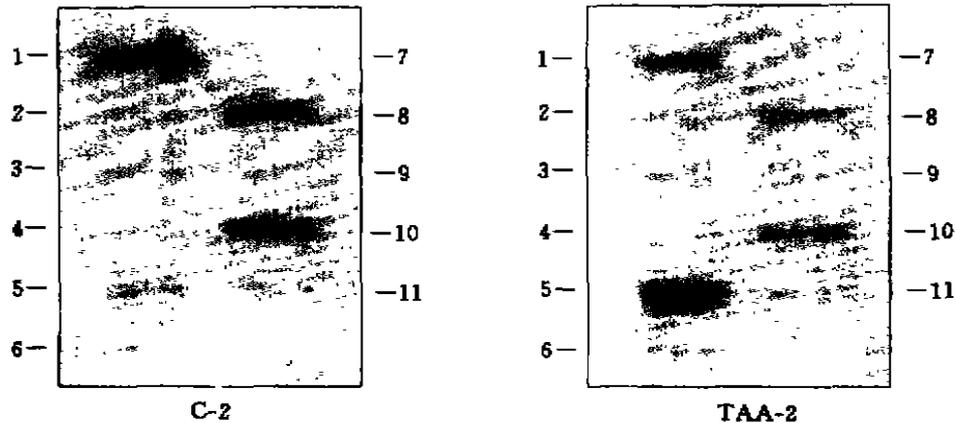


图 4b C-2 和 TAA-2 窦内皮细胞中通过 Run-off 新转录的、经³²P 标记的总 RNA 与不同凋亡因子和周期因子 cDNA 探针杂交后的同位素成像图

每一种 cDNA 4 μg 通过 Slot blot 仪被转移到尼龙膜上。cDNA 探针依次为 1. β-actin; 2. bad; 3. bax; 4. bcl-2; 5. bcl-x; 6. cyclin A; 7. cyclin B; 8. cyclin D₁; 9. cyclin E; 10. GAPDH; 11. pUC18

3 讨 论

本研究检查了 TAA 诱发的肝纤维化期间窦内皮细胞总 RNA 的合成率和凋亡基因 bad、bax、bcl-2、bcl-x 和细胞周期基因 cyclin A、cyclin B、cyclin D₁ 和 cyclin E 表达的变化。TAA 诱发的损伤肝脏窦内皮细胞总 RNA 的合成率与相应年龄对照组相比显著地降低。这表明一些基因的转录活性在 TAA 诱发的损伤肝脏中受到了抑制。

与对照组相比,在 TAA 诱发的损伤肝脏中存在着明显的增生(表 2)。周期基因及其产物在真核细胞周期中作为重要的调节参与者已被识别,在啮齿动物增生的肝脏和人类肝脏疾病中周期基因的表达和调节已有报道^[4,5]。在肝切除的不同时间 cyclin A 有不同的表达。然而对周期基因在 TAA 诱发的损伤肝脏中表达的模式还未见报道。在本检测中已发现,与相应的对照组相比,窦内皮细胞 cyclin A 的表达增加,而 cyclin D₁、cyclin B 和 cyclin E 没有明显的变化。周期因子参与细胞周期过程的调节,在这个过程中,依赖周期因子的激酶(CDKs)控制着细胞周期的进程^[6]。cyclin A 促进 S 期进入 G₁ 期。因此,推测 cyclin A 或许在 TAA 诱发的肝纤维中对于肝增生起着重要作用。据 Albrecht 等^[4]报道,通过 Run-on 转录试验研究 cyclin A、cyclin B、cyclin D、cyclin D₃ 和 cyclin E 的 mRNA 转录率在肝脏的增生期间没有变化。但通过 Northern Blotting 分析,周期因子 mRNA 的表达在肝切除后增生的大白鼠中出现了不同的变化,这表明在肝切除后的不同时间 mRNA 有不同的降解速度。在本研究中,周期因子 mRNA 转录率出现不同的变化模式,

其原因有待于进一步研究。

表2 TAA 诱发的损伤肝脏中每个动物窦内皮细胞的数量和活力

处 理	动物数	SEC 平均数	活力/%
对 照	27	151.1±7.3	98.4
TAA-1	11	223.6±8.4	97.8
TAA-2	14	323.2±11.7	98.4

注:活力指活细胞所占的比例。

许多报道已经描述凋亡因子如 bad、bax、bcl-2、bcl-x 和 bak 等在肝切除后增生肝脏中的功能和表达^[7~10], bcl-x_L、bcl-2 和 bcl-2 复合体及 bax 能抑制细胞的坏死过程^[10,11], 而 bcl-x_S、bad 和 bax 的复合体能促进细胞的死亡^[9], 在本研究中 bcl-2 和 bcl-x 的转录率与相应年龄的对照组相比显著升高。本研究中所用的 bcl-x cDNA 探针是 bcl-x_L 和 bcl-x_S 的复合物, 含有两者的 DNA 序列。另外, 已有报道表明, 不同 mRNA 的稳定性在不同的组织和细胞中是不同的。不同 mRNA 有不同的半衰期。因此, bcl-2 mRNA 的半衰期有待进一步研究。

另一方面, 对于细胞凋亡和细胞周期过程的调节因子是凋亡因子和细胞周期因子基因的产物, 而不是它们的转录物。在正常的细胞中, 促进细胞死亡的调节因子和抑制细胞的调节因子总是维持一个平衡的关系。前者的增加或者后者的减少都会导致坏死。

[参考文献]

- [1] Petermann H, Heymann S, Vogl S, et al. Phagocytic function and metabolite production in thioacetamide-induced liver cirrhosis; a comparative study in perfused livers and cultured Kupffer cells[J]. *Journal of Hepatology*, 1996, 24:468-477.
- [2] Vogl S, Petermann H, Dargel R. Oxygen radical formation. Proliferative activity and phagocytic capacity of cultivated macrophages from cirrhotic rat livers[J]. *Liver*, 1996, 16:313-320.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning; A laboratory manual*[M]. 2th ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- [4] Albrecht J H, Hoffman J S, Kren B T, et al. Cyclin and cyclin-dependent kinase I mRNA expression in models of regenerating liver and human liver diseases[J]. *Am J Physiol*, 1993, 265 (Gastrointest. Liver Physiol. 28): G857-G864.
- [5] Trembley J H, Kren B T, Steer C J. Posttranscriptional regulation of cyclin B messenger RNA expression in the regenerating rat liver[J]. *Cell Growth & Differentiation*, 1994, 5:99-108.
- [6] Nigg E A. Targets of cyclin-dependent protein kinases[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1993, 5:187-194.
- [7] Kren B T, Trembley J H, Steer C J. Alterations in mRNA stability during rat liver regeneration[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270: (Gastrointest. Liver Physiol. 33): G763-G777.
- [8] Kren B T, Trembley J H, Krajewski S, et al. Modulation of Apoptosis-associated genes bcl-2, bcl-x and bax during rat liver regeneration[J]. *Cell Growth & Differentiation*, 1996, 7:1633-1642.
- [9] Abastado J-P. Apoptosis; function and regulation of cell death[J]. *Res. Immunol*, 1996, 147:443-456.
- [10] Tsung S-P, Nelson F, David M, Hockenbery, Expression of bcl-2 family during liver regeneration and identification of bcl-x as a delayed early response gene[J]. *American Journal of Pathology*, 1997, 150:1985-1994.
- [11] Hockenbery D M, Oltvai Z H, Yin X-M, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis [J]. *Cell*, 1993, 75:241-251.

Study on the expression of genes in sinusoidal endothelial cells of rat liver with fibrogenesis

CHEN Hong¹, F-M Stolz², R Dargel²

(1 *College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;*

2 *Institute of Pathobiochemistry, Medical Faculty, Friedrich-Schiller-University, D-07740 Jena, Germany*)

Abstract: Experimental animals of Wistar-rats using oral treatment of Thioacetamide (TAA) were divided into two groups (TAA-1 and TAA-2) according to the extent of liver injury. The analysis by means of Northern-blotting showed that a slightly decreased expression level of *bcl-x* and *bax* was observed in sinusoidal endothelial cells (SEC) of group TAA-1. In SEC of group TAA-2, a further decreased expression of *bcl-x* and *bax* was more slightly detected. The analysis of nuclear run-off transcription assays showed that, in both experimental groups, the rate of incorporation of ³²P-UTP into total RNA by isolated nuclei of SEC was significantly reduced by about 30% ($P < 0.001$) and that the synthesis of mRNA of *bad*, *bax* and *cyclin E* was moderately decreased in SEC of the early phase of liver injury, while that of *cyclin A* and *bcl-x* was significantly increased. In the late phase of TAA-induced fibrogenesis (TAA-2), the synthesis of mRNA of *bad*, *bax* and *bcl-2* in SEC was increased by 2—3 fold and that of *bcl-x* was raised more than 7 fold.

Key words: thioacetamide; liver fibrogenesis; sinusoidal endothelial cells; apoptosis-genes; cyclin-genes; gene expression