

# 野生型与 L10P 突变型 DJ-1 蛋白稳定表达单克隆细胞株的基因表达谱分析

刘振华 唐北沙 严新翔 郭纪锋

**【摘要】** 研究背景 DJ-1 基因是常染色体隐性遗传性早发性帕金森综合征 (AREP) 的致病基因之一,其作用机制尚不十分清楚。既往研究提示, DJ-1 蛋白可以通过其转录调控活性调控某些基因的表达,从而在帕金森病的发病机制中发挥作用。本研究小组发现一种新的 DJ-1 基因突变位点——L10P,即 DJ-1 基因编码框第 29 位碱基胸腺嘧啶 (T)→胞嘧啶 (C),从而使 DJ-1 蛋白第 10 位上的亮氨酸被脯氨酸替代。探讨 DJ-1 基因 L10P 突变在帕金森病发病机制中的作用,可以明确其通过转录调控活性调控相关基因表达的具体方式,继而参与帕金森病之发病机制。方法 筛选稳定表达 pCMV-Tag2A-Flag、pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 的人胚肾细胞 293 (HEK293) 单克隆细胞株,通过 DNA、RNA 和蛋白质水平鉴定,以证实获得的 HEK293 单克隆细胞株是否能够稳定表达空载体、野生型 DJ-1 蛋白和 L10P 突变型 DJ-1 蛋白,基因芯片检测技术对各组 HEK293 单克隆细胞株进行差异基因筛选。结果 基因芯片技术检测显示,与空载体组相比,野生型组共有 14 个基因表达上调、28 个基因表达下调,L10P 突变型组有 14 个基因表达上调、9 个基因表达下调;与野生型组相比,L10P 突变型组共有 59 个基因表达上调、27 个基因表达下调。这些差异基因分别参与信号转导、基因转录调控、细胞周期调节、细胞凋亡、氧化应激等生物学过程。结论 L10P 突变型 DJ-1 蛋白可能通过直接或间接方式对差异基因进行表达调控,从而影响这些信号转导通路的正常功能,进而参与帕金森病的发病机制。

**【关键词】** 帕金森病; 基因表达谱; 突变; 转染; 免疫印迹法; DNA 探针; 细胞,培养的

## Expression profiles of genes in wild-type DJ-1 and L10P mutant DJ-1 in monoclonal cell strains

LIU Zhen-hua<sup>1</sup>, TANG Bei-sha<sup>1,2,3</sup>, YAN Xin-xiang<sup>1,3</sup>, GUO Ji-feng<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, Xiangya Hospital, <sup>2</sup>State Key Laboratory of Medical Genetics, <sup>3</sup>Key Laboratory of Hunan Province in Neurodegenerative Disorders, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China  
Corresponding author: GUO Ji-feng (Email: guojifeng2003@163.com)

**【Abstract】** Background DJ-1 gene is a causative gene which contributes to the onset of autosomal recessive early-onset parkinsonism (AREP). Many research suggest that DJ-1 protein may change expression of certain genes through regulate its transcriptional activity, which play a role in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). In our previous study, we found a new mutation of DJ-1 which we named as L10P. DJ-1 gene encodes the first frame 29 bp from the thymine (T)→cytosine (C), so that the leucine on the 10th locus of DJ-1 protein was replaced by proline (L10P). To elucidate the effect of the L10P mutation, we identify genes for which expressions are abnormally regulated by L10P mutant DJ-1 protein using DNA microarray analysis. Methods Human embryonic kidney cell 293 (HEK293) monoclonal cell strains which can stably express pCMV-Tag2A-Flag, pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 and pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P were selected by screening, and identified on the basis of DNA, RNA and protein

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2013.07.007

基金项目:国家重点基础研究计划(973计划)项目(项目编号:2011CB510000);国家自然科学基金重点资助项目(项目编号:81130021);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81171198);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81200870);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81000542)

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院神经内科(刘振华、唐北沙、严新翔、郭纪锋),医学遗传学国家重点实验室(唐北沙),神经退行性疾病湖南省重点实验室(唐北沙、严新翔、郭纪锋)

通讯作者:郭纪锋 (Email: guojifeng2003@163.com)

levels to confirm whether the acquired HEK293 monoclonal cell strains can stably express empty vector, wild-type DJ-1 protein and L10P mutant DJ-1 protein. Gene chip technique was used to perform differential gene screening for different groups of HEK293 monoclonal cell strains. **Results** Compared with the expression in empty vector group, the expression of 14 genes was up-regulated and 28 genes was down-regulated in wild-type group; and the expression of 14 genes was up-regulated and 9 down-regulated in expressing L10P mutant group respectively. Comparison of the expression in wild-type group, expression of 59 genes was up-regulated and 27 genes down-regulated in L10P mutant group. These differential genes all took part in the biological processes including signal transduction, transcriptional regulation, cell cycle, apoptosis, oxidative stress and so on. **Conclusion** L10P mutant DJ-1 protein may directly or indirectly influence the signal transduction and play a role in the mechanism of PD.

**【Key words】** Parkinson disease; Gene expression profiling; Mutation; Transfection; Immunoblotting; DNA probes; Cells, cultured

This study was supported by National Basic Research Program of China (973 Program, No. 2011CB510000) and Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 81130021, 81171198, 81200870, 81000542).

帕金森病(PD)是临床常见的中枢神经系统退行性疾病,主要病理改变为中脑黑质多巴胺能神经元进行性变性死亡和残留神经元胞质内出现蛋白包涵体——路易小体(LB)<sup>[1]</sup>,其病因及发病机制仍不十分清楚。近年来,随着家族性帕金森病致病基因的相继定位与克隆,遗传因素在帕金森病发病机制中的作用越来越受到关注。迄今为止,已先后定位 10 余个致病基因,包括 *SNCA*、*Parkin*、*PTEN* 诱导激酶 1 (*PINK1*)、*DJ-1*、富亮氨酸重复序列激酶 2 (*LRRK2*)、*ATP13A2* 等<sup>[2]</sup>。*DJ-1* 基因(又称 *PARK7* 基因)最初由 Bonifati 等<sup>[3]</sup>于 2003 年克隆获得,是常染色体隐性遗传性早发性帕金森综合征(AREP)相关致病基因,编码含 189 个氨基酸的蛋白质,相对分子质量约  $20 \times 10^3$ ,称为 DJ-1 蛋白。目前已在帕金森病患者中发现 10 余种 *DJ-1* 基因的致病突变,但这些致病基因突变引起帕金森病的具体机制尚知之甚少。有研究表明,DJ-1 蛋白为一多功能蛋白质,具有转录调控活性,可以抑制转录辅助抑制因子嘧啶结合蛋白相关剪接因子(PSF)和阻止组蛋白去乙酰化酶(HDACs)苏素化的依赖招募,从而调节酪氨酸羟化酶(*TH*)基因启动子以调控其表达,而 DJ-1 蛋白活性下降则可降低 TH 蛋白表达和左旋多巴生成,因此 DJ-1 蛋白表达和转录调控活性失衡可以直接影响多巴胺合成<sup>[4]</sup>。DJ-1 蛋白可与 p54nrb 和 PSF 共同担当神经保护的转录辅助激活因子,调节神经保护遗传程序的表达变化,因此影响 DJ-1 蛋白转录辅助激活因子功能的基因突变均可使多巴胺能神经元对细胞凋亡更易感<sup>[5]</sup>;DJ-1 蛋白通过抑制 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor)抑制蛋白

Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) 和 Nrf2 泛素化而稳定后者表达,从而调节多条抗氧化应激通路的基因表达,当 DJ-1 蛋白缺失时,Nrf2 蛋白稳定性和转录活性减弱,抗氧化应激基因表达水平下降,氧化应激反应增强,继而致病<sup>[6]</sup>。以上研究提示,DJ-1 蛋白可以通过其转录调控活性调节某些基因的表达变化,从而在帕金森病的发病机制中发挥作用。突变型 DJ-1 蛋白是否能够通过转录调控其他相关基因的表达从而参与帕金森病的发病机制,尚待进一步研究。本研究小组在前期工作中,自一 AREP 家系中发现一种 *DJ-1* 基因的新突变,即 *DJ-1* 基因编码框第 29 位碱基胸腺嘧啶(T)→胞嘧啶(C),从而使 DJ-1 蛋白第 10 位上的亮氨酸被脯氨酸替代(L10P)<sup>[7]</sup>。为了研究该突变在帕金森病发病机制中的作用,我们建立了转染空载体、稳定表达野生型 DJ-1 蛋白和 L10P 突变型 DJ-1 蛋白的人胚肾细胞 293(HEK293)单克隆细胞株,进一步应用基因芯片技术进行分析,以明确 L10P 突变型 DJ-1 蛋白是否可以通过其转录调控活性而导致相关基因表达异常,进而参与帕金森病的发病机制。

## 材料与方法

### 一、实验材料

1. 材料 (1)质粒来源:本实验所用野生型和 L10P 突变型 *DJ-1* 真核表达质粒(pCMV-Tag2A-Flag-*DJ-1*、pCMV-Tag2A-Flag-*DJ-1*-L10P)均为中南大学医学遗传学国家重点实验室构建。(2)细胞株来源:HEK293 细胞由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供,于体外传代至第

35 代用于建立稳定表达空载体、野生型 DJ-1 蛋白和 L10P 突变型 DJ-1 蛋白的 HEK293 单克隆细胞株。(3) 主要试剂: 脂质体 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司。聚合酶链反应(PCR)引物序列由生物工程(上海)股份有限公司提供。配制封闭液的牛血清白蛋白(BSA)购自河南洛阳华美生物工程有限公司。胎牛血清(FBS)购自北京四季青生物技术有限公司。乙二胺四乙酸(EDTA)为美国 Sigma 公司产品。DMEM 培养基由美国 Gibco 公司提供。TRIzol 液由美国 Sigma 公司提供。

2. 实验分组 用于本研究的质粒共分为 3 组, 分别为稳定表达空载体(空载体组)、野生型 DJ-1 蛋白(野生型组)和 L10P 突变型 DJ-1 蛋白(L10P 突变型组)的 HEK293 单克隆细胞株组。为了提高基因芯片技术的准确性, 每组均重复检测两次, 因此每一实验组又分为两组, 即空载体 1 组和 2 组、野生型 1 组和 2 组、L10P 突变型 1 组和 2 组。

## 二、实验方法

1. 单克隆细胞株构建与鉴定 为研究 DJ-1 基因功能, 本研究小组在前期工作中成功构建了野生型和 L10P 突变型 DJ-1 真核表达质粒(pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1、pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P), 按照常规实验方法复苏、培养、消化、传代并冻存 HEK293 细胞。转染操作程序严格按照脂质体 Lipofectamine2000 试剂盒说明书进行, 将 pCMV-Tag2A-Flag、pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 以及 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 分别转染至 HEK293 细胞, 并进行细胞筛选、单克隆挑取和培养, 再分别于 DNA、RNA 和蛋白质水平验证单克隆细胞株是否构建成功。(1) 单克隆细胞株 DNA 水平验证: 所有单克隆细胞株均成功提取基因组 DNA(gDNA), 应用 PCR 技术对单克隆细胞株进行 DJ-1 基因编码区序列扩增, 并以体积分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。(2) 单克隆细胞株 RNA 水平验证: 对经测序证实的基因组中已整合 pCMV-Tag2A-Flag、pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 的单克隆细胞株进行 mRNA 提取, 以逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)对单克隆细胞株进行 DJ-1 基因编码区序列扩增, 并以体积分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。(3) 单克隆细胞株蛋白质水平验证: 经 RNA 水平证实, 整合于 HEK293 细胞基因组中的 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 以及 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 为具有转录功能的单克隆细胞株,

于体外培养后提取蛋白质, 以抗 Flag 抗体为 I 抗进行 Western blotting 检测。

2. TRIzol 法提取 RNA 分别去除各种稳定表达细胞株的培养基, 按照 TRIzol Reagent 试剂盒操作步骤进行总 RNA 提取<sup>[8]</sup>, 全自动紫外分光光度仪分别于 260 和 280 nm 处测量提取的总 RNA 光密度(OD)值, 再以体积分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 表达量。

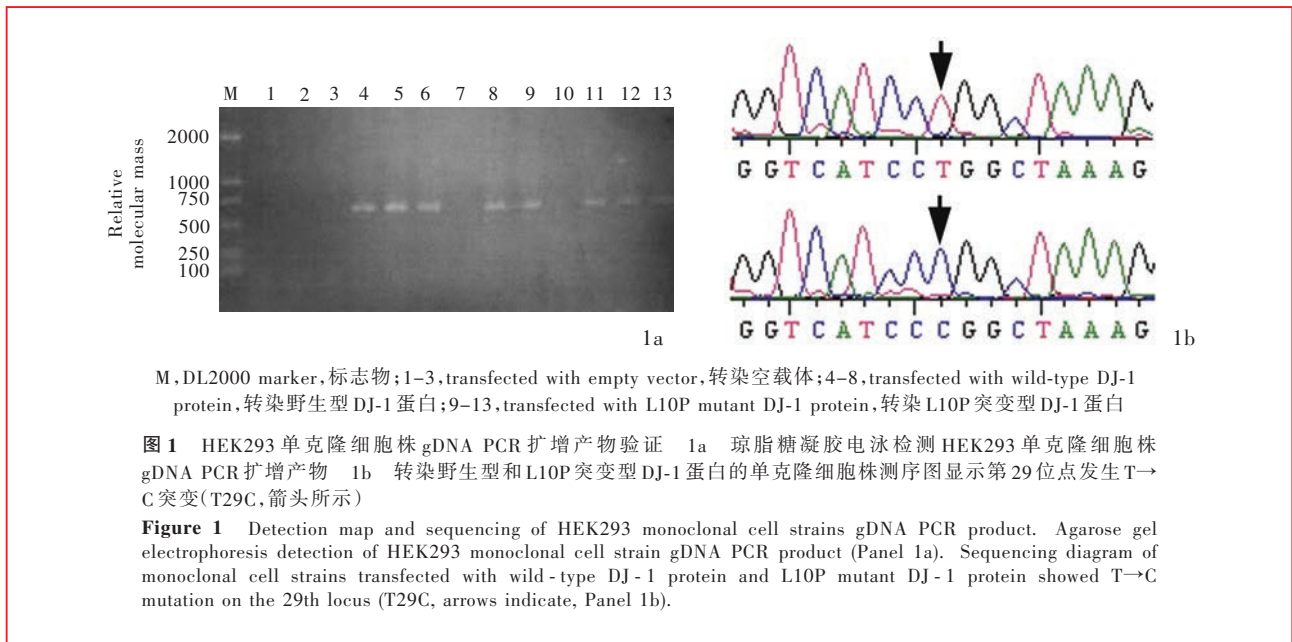
3. 探针标记及杂交 (1) 检测方法: 按照试剂盒说明书合成 cDNA 并进行荧光标记、纯化、与基因芯片杂交、洗脱, 应用美国 Illumina 公司生产的 Human Ref-8 基因表达微珠芯片, 对稳定表达空载体、野生型 DJ-1 蛋白和 L10P 突变型 DJ-1 蛋白的 HEK293 单克隆细胞株中的差异表达基因进行筛选。(2) 读取数据及获得图像: 采用美国 Illumina BeadChip Reader 扫描仪进行基因芯片扫描, 图像转化为基于荧光信号强度的数字信号, 经自动和人工定位排列确定杂交点范围; 过滤背景噪音, 获得基因表达的荧光信号强度, 以列表形式输出, 从而完成图像定量转化为数值的过程。

4. 数据分析与处理 (1) 数据分析: 采用立方样条函数法(Cubic Spline)进行数据校正, 根据美国 Illumina 公司的计算方法进行基因差异表达判断, 对某一个基因而言, 一个探针在两种组织中的表达差异程度即差异分值(diffscore)来自其对应的全部探针分值的平均值。差异基因的筛选标准为, 选择实验组与对照组中的有效基因, 且实验组差异分值  $< -20$  或  $> 20$ 。(2) 数据处理: 各组均行两次基因芯片杂交, 两次所得差异分值均  $< -20$  或均  $> 20$  即为差异基因。

## 结 果

一、稳定表达空载体、野生型 DJ-1 蛋白和 L10P 突变型 DJ-1 蛋白的 HEK293 单克隆细胞株的建立

1. 单克隆细胞株 DNA 水平验证结果 在转染空载体 pCMV-Tag2A-Flag 的单克隆细胞株中未发现 594 bp 大小的扩增产物, 而在转染 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 真核表达质粒的单克隆细胞株中部分可见 594 bp 大小的扩增产物, 对扩增的 PCR 片段进行 DNA 正反双向测序证实为其预期目的产物(图 1)。表明 pCMV-Tag2A-Flag、pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 已整合至 HEK293 细胞系基因组中。



2. 单克隆细胞株 RNA 水平验证结果 在转染 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 真核表达质粒的单克隆细胞株中存在 589 bp 大小的 PCR 扩增产物, 而转染空载体 pCMV-Tag2A-Flag 的单克隆细胞株中未发现该片段, 所有 PCR 扩增产物均经正反双向测序证实为预期目的产物(图 2), 提示整合到 HEK293 细胞系基因组中的 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 均具有转录功能。

3. 单克隆细胞株蛋白质水平验证结果 转染 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 真核表达质粒的单克隆细胞株在  $20 \times 10^3$  bp 处均出现电泳条带(图 3), 说明转染 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1 和 pCMV-Tag2A-Flag-DJ-1-L10P 真核表达质粒的 HEK293 单克隆细胞株能翻译表达蛋白质, 单克隆细胞株构建成功。经筛选稳定表达单克隆细胞株中的外源性 DJ-1 蛋白表达量有所差异, 其中稳定表达野生型 DJ-1 蛋白的单克隆细胞株中的克隆 3 和克隆 4 DJ-1 蛋白表达量最高, 而稳定表达 L10P 突变型 DJ-1 蛋白的单克隆细胞株中的克隆 6 和克隆 7 DJ-1 蛋白表达量最高; 野生型组单克隆细胞株采用克隆 3, L10P 突变型组单克隆细胞株采用克隆 6。

## 二、总 RNA 测定

所有 HEK293 单克隆细胞株均成功提取总 RNA, 全自动紫外分光光度仪测定显示, 所有检测标本 OD<sub>260/280</sub> 值均约为 2(表 1), 经体积分数为 1.2%

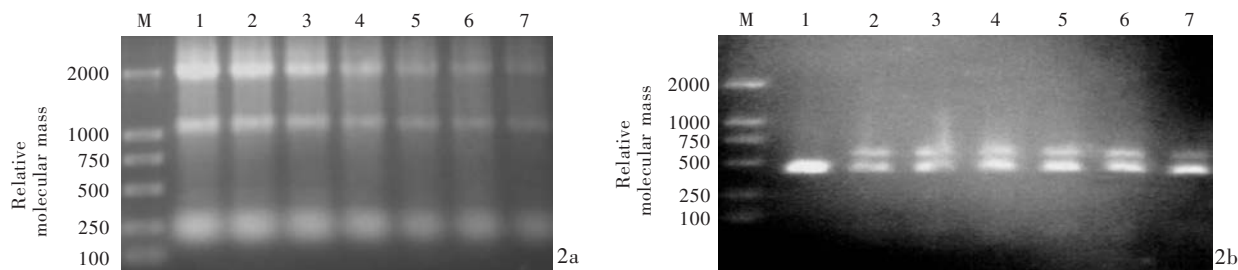
琼脂糖凝胶电泳检测显示, 28 S、18 S、5 S 共 3 条 RNA 电泳条带完整清晰, 同时 28 S/18 S 比值 > 2, 70 °C 水浴保温 1 h 后的电泳图谱与水浴前无明显差异(图 4)。表明总 RNA 无明显降解, 符合下一步进行基因芯片杂交的条件。

## 三、基因芯片杂交结果分析

对标志物 cy-3 进行基因杂交芯片扫描, 获得各组单克隆细胞株的基因表达谱(图 5)。应用图像分析软件对基因芯片的灰度值进行分析, 获得芯片上每个基因点的原始信号值(表 2); 采用立方样条函数法对所有数据进行归一化分析, 获得各组单克隆细胞株基因芯片比较的散点图(图 6); 通过美国 Illumina 公司的基因差异表达判断方法, 获得各组的差异分值。结果显示, 与空载体组相比, 野生型组有 14 个基因表达上调、28 个基因表达下调, L10P 突变型组有 14 个基因表达上调、9 个基因表达下调; 与野生型组比较, L10P 突变型组有 59 个基因表达上调、27 个基因表达下调。进一步对各组的差异基因进行功能分析, 可知其参与的生物学过程(表 3)。

## 讨 论

DJ-1 基因是 AREP 致病基因之一, 已有研究显示其所编码的 DJ-1 蛋白参与多种生理过程, 例如细胞周期调节、基因转录调控、RNA 稳定性调节、雄激素受体(AR)通路信号转导、肿瘤生成、氧化应激和线粒体功能等多个方面<sup>[3-4]</sup>。DJ-1 蛋白具有转录调



M, DL2000 marker, 标志物; 1, transfected with empty vector, 转染空载体; 2-4: transfected with wild-type DJ-1 protein, 转染野生型 DJ-1 蛋白; 5-7: transfected with L10P mutant DJ-1 protein, 转染 L10P 突变型 DJ-1 蛋白

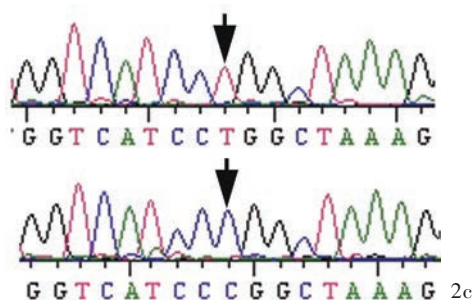


图 2 HEK293 单克隆细胞株 mRNA PCR 扩增产物验证 2a 琼脂糖凝胶电泳检测 HEK293 单克隆细胞株 mRNA PCR 扩增产物 2b 琼脂糖凝胶电泳检测 HEK293 单克隆细胞株 cDNA PCR 扩增产物 2c 转染野生型和 L10P 突变型 DJ-1 蛋白的 HEK293 单克隆细胞株测序图显示第 29 位点发生 T→C 突变(T29C, 箭头所示)

Figure 2 HEK293 monoclonal cell strains mRNA PCR products. Electrophoresis of monoclonal cell strains mRNA PCR products (Panel 2a). Electrophoresis of monoclonal cell strains cDNA PCR products (Panel 2b). Sequencing diagram of monoclonal cell strains transfected with wild-type DJ-1 protein and L10P mutant DJ-1 protein showed T→C mutation on the 29th locus (T29C, arrows indicate, Panel 2c).

1, transfected with empty vector, 转染空载体; 2-4, transfected with wild-type DJ-1 protein, 转染野生型 DJ-1 蛋白; 5-7, transfected with L10P mutant DJ-1 protein, 转染 L10P 突变型 DJ-1 蛋白

图 3 Western blotting 法检测显示, HEK293 单克隆细胞株在  $2 \times 10^3$  bp 处出现一条电泳条带

Figure 3 Western blotting analysis of HEK293 monoclonal cell strains. An electrophoresis band could be seen at  $2 \times 10^3$  bp.

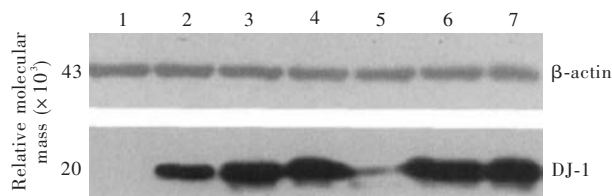


表 1 HEK293 细胞总 RNA 测定\*

Table 1. Total RNA assay in HEK293 cells\*

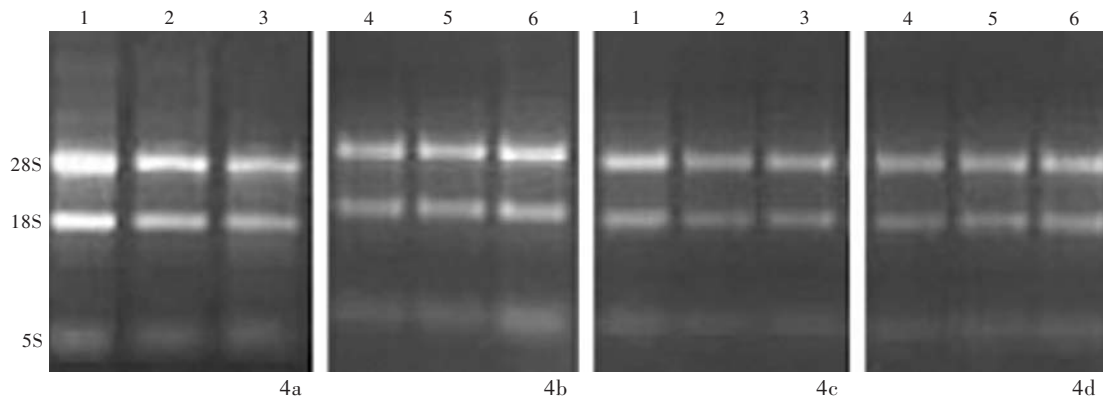
OD value	EV group 1	Wt group 1	L10P group 1	EV group 2	Wt group 2	L10P group 2
OD <sub>260 nm</sub>	79.87	62.32	67.11	71.20	72.06	73.80
OD <sub>280 nm</sub>	40.66	31.04	33.22	35.44	36.47	37.49
OD <sub>260/280</sub>	1.96	2.01	2.02	2.01	1.98	1.97

\*Each group was experimented 2 times, and gene chip analysis was performed in the single blind form. EV, empty vector, 空载体; Wt, wild-type DJ-1 protein, 野生型; L10P, L10P mutant DJ-1 protein, L10P 突变型

控活性,可正向调控雄激素受体和 p53、负向调控肿瘤抑制基因 *PTEN*、负向调控 PSF,还能与共活化物 p54nrb 协同抵抗 PSF 诱导的细胞凋亡<sup>[4,6,9-10]</sup>。提示 DJ-1 蛋白可以通过其转录调控活性调节某些基因的表达变化,从而在帕金森病的发病机制中发挥作用。突变型 DJ-1 蛋白是否能够通过转录调控其他相关基因的表达从而参与帕金森病的发病机制仍待进一步研究。然而,传统研究方法仅局限于研究某个或某几个可能与 DJ-1 蛋白存在相互作用的蛋白质(或基因)及其互相之间简单的调控关系,而无法全面认识帕金森病发生发展过程中所有与 DJ-1 蛋白相互作用的蛋白质(或基因)及其相互之间的

调控关系,基因芯片技术就是针对这种需求发展起来的一项分子生物学新技术。

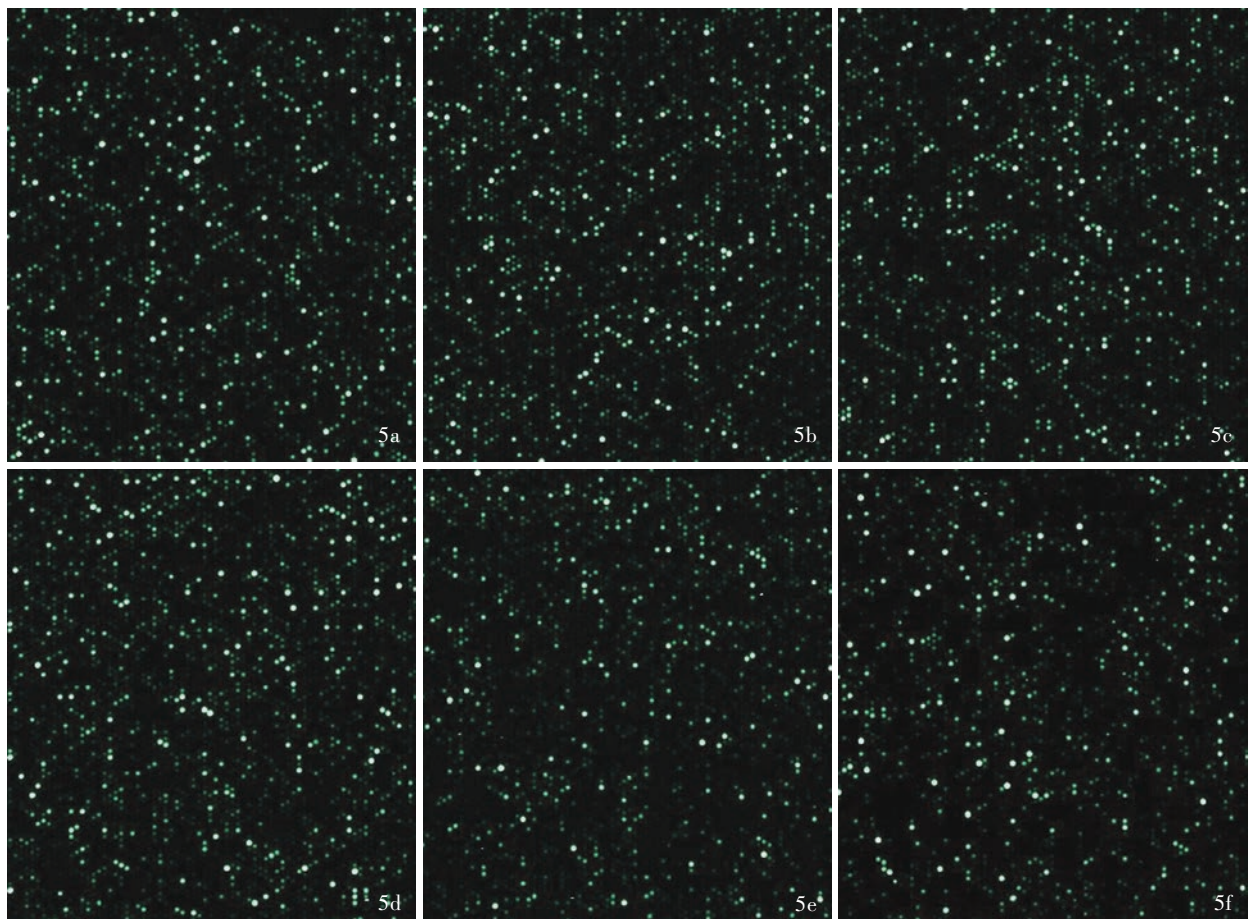
基因芯片技术可以在一次反应中进行多种信息的平行分析,以大规模、高通量的方式研究成千上万个基因在生理或病理状态下的表达变化,并预测、发现其功能及其相互之间的作用和调控关系,因此具有高通量、高集成、高敏感、平行化、快速和简便之特点。正是由于这些优点,基因芯片技术目前已广泛应用于致病基因表达谱分析、基因诊断、药物筛选及序列分析等领域<sup>[11]</sup>。我们应用美国 Illumina 公司生产的 Human Ref-8 基因表达微珠芯片,对稳定表达空载体、野生型 DJ-1 蛋白和 L10P 突



1, EV group 1, 空载体 1 组 2, Wt group 1, 野生型 1 组 3, L10P group 1, L10P 突变型 1 组  
4, EV group 2, 空载体 2 组 5, Wt group 2, 野生型 2 组 6, L10P group 2, L10P 突变型 2 组

**图 4** 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 70 °C 水浴前后总 RNA 表达量无明显变化 4a 第 1 次实验水浴前总 RNA 表达量 4b 第 2 次实验水浴前总 RNA 表达量 4c 第 1 次实验 70 °C 水浴保温 1 h 后总 RNA 表达量 4d 第 2 次实验 70 °C 水浴保温 1 h 后总 RNA 表达量

**Figure 4** Agarose gel electrophoresis showed no difference of total RNA expression was seen between before and after 70 °C water bath. First experiment of total RNA electrophoresis (Panel 4a). Second experiment of total RNA electrophoresis (Panel 4b). First experiment of total RNA electrophoresis pattern after 70 °C water bath for 1 h (Panel 4c). Second experiment of total RNA expression after 70 °C water bath for 1 h (Panel 4d).



**图 5** 基因芯片扫描获得各组单克隆细胞株基因表达图谱 5a 空载体 1 组 5b 野生型 1 组 5c L10P 突变型 1 组 5d 空载体 2 组 5e 野生型 2 组 5f L10P 突变型 2 组

**Figure 5** Result of gene chip scanning. Empty vector group 1 (Panel 5a). Wild-type group 1 (Panel 5b). L10P mutant group 1 (Panel 5c). Empty vector group 2 (Panel 5d). Wild-type group 2 (Panel 5e). L10P mutant group 2 (Panel 5f).

表 2 对基因芯片灰度值分析后获得的基因芯片原始信号强度

Table 2. The original signal intensity of control gene after grey value analysis

Gene	EV group 1	P value	Wt group 1	P value	L10P group 1	P value
BIOTIN	4 088.57	0.000	3 684.43	0.00	3 309.96	0.000
CY3 HYB	9 876.95	0.000	9 187.42	0.000	8 123.87	0.000
HIGH STRINGENCY HYB	46 375.97	0.000	47 370.77	0.000	46 009.71	0.000
HOUSEKEEPING	27 596.97	0.005	26 076.46	0.005	24 763.79	0.005
LABELING	10 223.17	0.561	103.68	0.605	90.26	0.796
LOW STRINGENCY HYB	13 069.02	0.000	12 170.54	0.000	10 766.63	0.000
NEGATIVE	103.85	0.076	106.87	0.059	95.38	0.164
Gene	EV group 2	P value	Wt group 2	P value	L10P group 2	P value
BIOTIN	3 694.93	0.000	3 358.74	0.000	3 275.01	0.000
CY3 HYB	9 400.20	0.000	8 801.98	0.000	8 106.21	0.000
HIGH STRINGENCY HYB	55 278.30	0.000	49 533.97	0.000	42 053.23	0.000
HOUSEKEEPING	26 378.30	0.005	25 364.24	0.005	24 961.19	0.005
LABELING	100.93	0.667	93.62	0.601	96.22326	0.380
LOW STRINGENCY HYB	12 452.94	0.000	11 657.11	0.000	10 716.06	0.000
NEGATIVE	105.23	0.134	96.96	0.045	98.09	0.008

EV, empty vector, 空载体; Wt, wild-type DJ-1 protein, 野生型; L10P, L10P mutant DJ-1 protein, L10P 突变型。The same as Table 3

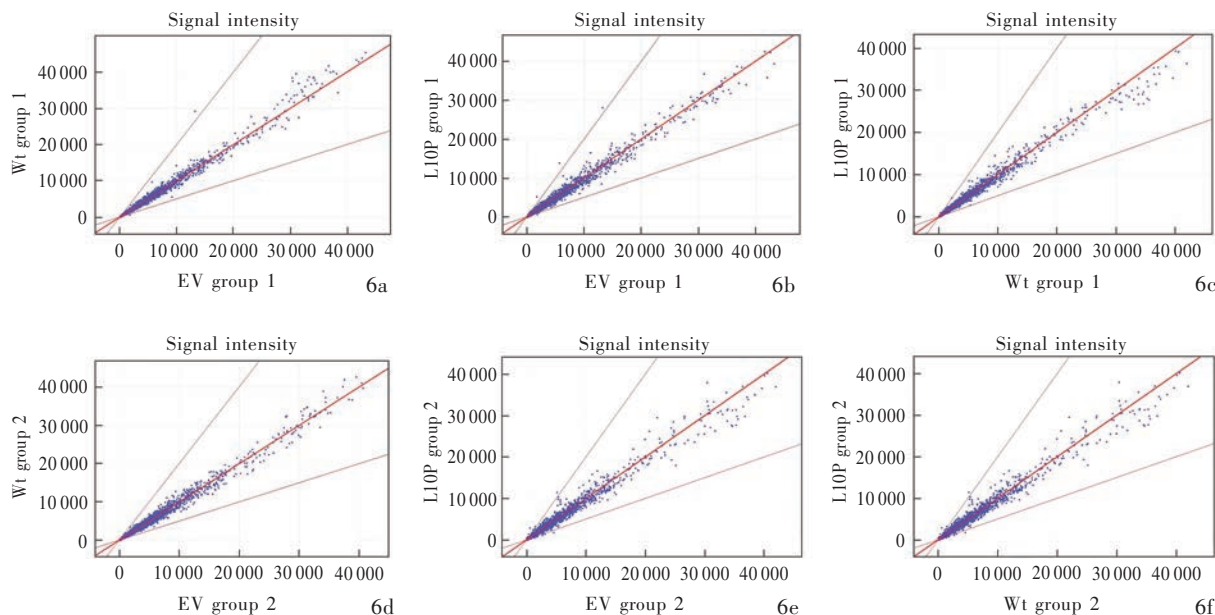


图 6 各组 HEK293 单克隆细胞株基因芯片比较的散点图 6a 野生型 1 组与空载体 1 组的比较 6b L10P 突变型 1 组与空载体 1 组的比较 6c L10P 突变型 1 组与野生型 1 组的比较 6d 野生型 2 组与空载体 2 组的比较 6e L10P 突变型 2 组与空载体 2 组的比较 6f L10P 突变型 2 组与野生型 2 组的比较

Figure 6 The scatter diagrams of gene expression pattern in different groups. Comparison between wild-type group 1 and empty vector group 1 (Panel 6a). Comparison between L10P mutant group 1 and empty vector group 1 (Panel 6b). Comparison between L10P mutant group 1 and wild-type group 1 (Panel 6c). Comparison between wild-type group 2 and empty vector group 2 (Panel 6d). Comparison between L10P mutant group 2 and empty vector group 2 (Panel 6e). Comparison between L10P mutant group 2 and wild-type group 2 (Panel 6f).

变型 DJ-1 蛋白的 HEK293 单克隆细胞株中的差异表达基因进行筛选。据文献报道, 单次基因芯片杂交导致的假阳性率约为 3%, 重复实验可显著降低假

阳性率, 若重复两次假阳性率即可降至 0.09%<sup>[12]</sup>。鉴于此, 在本研究中我们对每一样品均进行两次实验, 差异分值均 < -20 或 > 20 者方视为差异基因, 进

表 3 各种差异基因参与的生物学过程

Table 3. Biological processes involved by a variety of genes

Biological process	Wt group compared with EV group		L10P group compared with EV group		L10P group compared with Wt group	
	Number of up-regulated genes	Number of down-regulated genes	Number of up-regulated genes	Number of down-regulated genes	Number of up-regulated genes	Number of down-regulated genes
Protein folding	1	0	2	0	3	0
Signal transduction	4	0	0	1	5	5
Cell adhesion	1	0	1	0	4	0
Regulation of transcription	2	4	4	0	8	5
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	0	2	1	0	1	1
Regulation of cell cycle	1	2	0	0	1	2
Transport	0	3	0	1	7	0
Microtubule-based movement	0	1	0	0	2	0
Homeostasis	0	2	0	0	1	0
Cell proliferation	0	1	0	1	3	2
Nucleosome assembly	0	1	0	1	0	0
Amino acid metabolism	1	0	4	0	4	0
Amino acid biosynthesis	0	1	1	1	1	0
Cholesterol biosynthesis	1	0	0	0	1	1
DNA replication	1	0	0	2	0	0
Fatty acid desaturation	0	1	0	0	0	0
Protein modification	0	4	0	2	4	6
Immune response	0	0	0	0	2	0
Development	2	4	1	0	3	3
Apoptosis	0	1	0	0	4	0
Response to oxidative stress	0	1	0	0	0	2
Total	14	28	14	9	59	27

一步增加了实验结果的可靠性。本研究结果显示,与空载体组比较,野生型组有 14 个基因表达上调、28 个基因表达下调,L10P 突变型组有 14 个基因表达上调、9 个基因表达下调;与野生型组比较,L10P 突变型组有 59 个基因表达上调、27 个基因表达下调。对各组的差异基因进行功能分析,发现其分别参与信号转导、细胞黏附、基因转录调控、细胞周期调节、物质合成与代谢、蛋白修饰、免疫应答、细胞凋亡、氧化应激、发育等生物学过程。提示野生型 DJ-1 蛋白可能通过调控与这些通路相关的基因表达、参与这些信号转导通路的正常生理功能而发挥作用,而 L10P 突变型 DJ-1 蛋白亦可通过直接或间接方式对这些差异基因进行表达调控,进而影响这些信号转导通路的正常过程,最终参与帕金森病的发病机制。与空载体组相比,野生型组和 L10P 突变型组单克隆细胞株早期生长反应基因 1 (*EGR1*)、*IL-8*、*NIF3L1* 和 *HIST1H1C* 基因均存在差异

表达,其中 *EGR1* 和 *IL-8* 基因在 L10P 突变型组中表达升高,而在野生型组中表达下降;*NIF3L1* 和 *HIST1H1C* 基因在野生型组和 L10P 突变型组中均表达下降。表明 L10P 突变型 DJ-1 蛋白并未完全丧失野生型 DJ-1 蛋白的转录调控活性,可能对相同的基因亦有调控活性,但其转录调控活性并不完全一致,L10P 突变型 DJ-1 蛋白可能获得了某些调控其他基因的活性,且与野生型 DJ-1 蛋白完全不一致。

目前的研究发现,*EGR1* 是一种核蛋白,属于锌指蛋白转录因子家族,可被生长因子、细胞因子、损伤、多种应激信号(如紫外线、电离辐射)、凋亡诱导因子等快速而短暂诱导。*EGR1* 蛋白的转录调控活性不仅与 DNA 序列相关,还与转录辅助激活因子 [CREB 结合蛋白(CBP)和 P300] 及转录辅助抑制因子 [NGFI-A 结合蛋白 1 和 2(NAB1 和 NAB2)] 有关。*EGR1* 蛋白还具有肿瘤抑制基因活性,可以抑制纤维肉瘤、胶质母细胞瘤和骨肉瘤等的生长和成瘤作



用<sup>[13]</sup>。此外,局部组织缺血可导致脑组织 *EGR1* 蛋白表达上调,而 *EGR1* 基因敲除小鼠短暂性大脑中脑动脉闭塞可导致小梗死,从而改善神经系统功能和减少炎症基因的表达;急性腺病毒性脑膜炎的局部脑组织缺血区 *EGR1* 蛋白表达明显升高,提示 *EGR1* 蛋白可能是预测炎症和脑卒中后神经功能缺损的一项敏感性较高的生物学标志物<sup>[14]</sup>。*IL-8* 为多种细胞来源的趋化性白细胞因子,由单核细胞、T 细胞、内皮细胞等多种细胞在肿瘤坏死因子(TNF)、*IL-1* 和脂多糖(LPS)等诱导剂作用下合成并释放。*IL-8* 与 T 细胞、中性粒细胞等细胞表面分布的特异性受体结合可引起细胞膜上与 G 蛋白耦联的磷脂酰肌醇 3-激酶(*PI<sub>3</sub>K*)信号转导通路发生改变,从而引起相应的细胞因子分泌,形成 *IL-8* 的调节功能。目前的研究显示,*IL-8* 参与肿瘤血管新生,与肿瘤浸润、转移密切相关,同时还参与抑制细胞凋亡、促进细胞与细胞及细胞与基质间的黏附,以及自分泌、上调基质金属蛋白酶(MMPs)、调节表皮生长因子(EGF)等生物学过程<sup>[15]</sup>。*L10P* 突变型 DJ-1 蛋白是否能够通过直接或间接调控 *EGR1* 和 *IL-8* 基因的表达而参与帕金森病的发病机制,尚待进一步研究。

*L10P* 突变是我们研究小组最新发现的突变位点,相关功能尚不十分明确,本研究首次对该突变位点进行功能机制的研究。通过基因芯片技术检测显示:与空载体组相比,野生型组和 *L10P* 突变型组存在许多差异表达的基因突变,其中部分呈差异表达的基因在野生型组和 *L10P* 突变型组中均同时存在,而部分仅存在于其中某一组中,有些表现为野生型组表达水平升高、*L10P* 突变型组表达降低。我们的结论是:*L10P* 突变可以影响其他基因的转录调控。

### 参 考 文 献

- [1] Deutch AY. Parkinson's disease redefined. *Lancet Neurol*, 2013, 12:422-423.
- [2] Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord*, 2013, 28:14-23.
- [3] Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 2003, 299:256-259.
- [4] Zhong N, Kim CY, Rizzu P, Geula C, Porter DR, Pothos EN, Squitieri F, Heutink P, Xu J. DJ-1 transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor. *J Biol Chem*, 2006, 281:20940-20948.
- [5] Xu J, Zhong N, Wang H, Elias JE, Kim CY, Woldman I, Pifl C, Gygi SP, Geula C, Yankner BA. The Parkinson's disease-associated DJ-1 protein is a transcriptional co-activator that protects against neuronal apoptosis. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: 1231-1241.
- [6] Gan L, Johnson DA, Johnson JA. Keap1-Nrf2 activation in the presence and absence of DJ-1. *Eur J Neurosci*, 2010, 31:967-977.
- [7] Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia JH, Xia K, Zhang Z. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 2006, 15:1816-1825.
- [8] Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*, 2010, (6): pdb.prot5439.
- [9] van der Brug MP, Blackinton J, Chandran J, Hao LY, Lal A, Mazan-Mamczarz K, Martindale J, Xie C, Ahmad R, Thomas KJ, Beilina A, Gibbs JR, Ding J, Myers AJ, Zhan M, Cai H, Bonini NM, Gorospe M, Cookson MR. RNA binding activity of the recessive parkinsonism protein DJ-1 supports involvement in multiple cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105:10244-10249.
- [10] Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS, Mak TW. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*, 2005, 7:263-273.
- [11] Kapushesky M, Adamusiak T, Burdett T, Culhane A, Farne A, Filippov A, Holloway E, Klebanov A, Kryvych N, Kurbatova N, Kurnosov P, Malone J, Melnichuk O, Petryszak R, Pultsin N, Rustici G, Tikhonov A, Travillian RS, Williams E, Zorin A, Parkinson H, Brazma A. Gene expression atlas update: a value-added database of microarray and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40:D1077-1081.
- [12] Wang K, Gan L, Jeffery E, Gayle M, Gown AM, Skelly M, Nelson PS, Ng WV, Schummer M, Hood L, Mulligan J. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene*, 1999, 229:101-108.
- [13] DeLigio JT, Zorio DA. Early growth response 1 (EGR1): a gene with as many names as biological functions. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8:1889-1892.
- [14] Vollmann H, Wölfel S, Ohneseit P, Stransky E, Vonthein R, Wick W, Meyermann R, Simon P. Differential expression of egr1 and activation of microglia following irradiation in the rat brain. *Strahlenther Onkol*, 2007, 183:248-255.
- [15] Shahzad A, Knapp M, Lang I, Köhler G. Interleukin 8 (IL-8): a universal biomarker? *Int Arch Med*, 2010, 3:11.

(收稿日期:2013-06-26)

### 本期广告目次

- |                              |    |
|------------------------------|----|
| 卡迪克(上海迈普瑞生物科技<br>有限公司) ..... | 封二 |
| 波立维[赛诺菲(杭州)制药<br>有限公司] ..... | 封三 |
| 凯时(北京泰德制药股份有限公司) .....       | 封四 |