

一个糖尿病肾病相关新基因的 筛选、克隆和序列分析*

郑敬民 刘志红** 张 鑫 恽时峰¹⁾ 黎磊石

(南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所, 全军肾脏病研究重点实验室, 南京 210002)

摘要 利用 Affymetrix 寡核苷酸基因表达谱芯片对 2 型糖尿病肾病模型动物——db/db 小鼠的肾脏基因表达谱进行了研究。在此基础上, 利用末端快速扩增法和 RT-PCR 方法, 对筛选出来的一个糖尿病肾病相关表达序列标签 (EST) 进行了 cDNA 克隆和表达分析。得到了一长为 1.4 kb 的 cDNA, 并暂时命名为 mdnr411 (mouse diabetic nephropathy related mRNA No. 411)。序列分析和网上数据库比对说明, 这是一个新的 cDNA 序列。利用 DNA 序列分析软件对此 cDNA 阅读框进行的预测性分析表明, 此 cDNA 包含了一个完整的阅读框序列。其编码的蛋白质由 90 个氨基酸残基组成。以氨基酸序列进行的同源性搜索表明, 此多肽只与 *Archaeoglobus fulgidus* 的 Na⁺/H⁺ antiporter (napA-2) 具有局部的同源性。以上结果表明, mdnr411 是一个功能完全未知的小鼠糖尿病肾病相关新基因。mdnr411 cDNA 的成功克隆, 为进一步研究其生物学功能及其在糖尿病肾病发生、发展过程中的作用创造了条件。

关键词 基因芯片, 糖尿病肾病, db/db 小鼠, mdnr411 基因

学科分类号 R363

糖尿病肾病是一种严重危害人类健康的疾病。多年来, 国内外对糖尿病肾病已进行了不少研究。但由于病因的复杂性, 有关糖尿病肾病发病的分子机制仍然不是很清楚。db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天肥胖性 2 型糖尿病小鼠, 具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特性。其发病过程与人 2 型糖尿病肾病非常相似, 是国际上广为采用的研究糖尿病肾病的动物模型^[1]。为了寻找糖尿病肾病新相关基因, 探讨糖尿病肾病发生发展的分子机制, 我们利用目前国际学术界广为接受的 Affymetrix 公司生产的基因表达谱芯片, 对 db/db 小鼠在糖尿病肾病发病状态及大黄酸治疗后的肾脏基因表达谱进行了研究, 发现了不少差异表达基因 (或 EST)。在此基础上, 我们对这些差异表达基因 (或 EST) 进行了较为详细的生物信息学分析, 并对一些重要基因进行克隆, 以便对其作进一步的功能研究。本文报道了对其中的一个糖尿病肾病相关新基因 mdnr411 (mouse diabetic nephropathy related gene No. 411) 的筛选、克隆和序列分析情况。

1 材料和方法

1.1 药物、试剂

大黄酸由南京军区南京总医院药剂科提供, 经 HPLC 检验纯度在 98% 以上。SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit、Advantage 2 PCR Kit 购自

CLONTECH 公司; RNAeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; RNA LA PCRTM Kit (AMV) Ver. 1.1 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 克隆载体 pUCm-T、T4 DNA 连接酶、限制性核酸内切酶、胶回收试剂盒, 购自上海申能博采公司; 所用引物由上海申能博采公司合成。基因芯片 GM-U74A 购自 Affymetrix 公司, 其上有对应于约 6 000 个小鼠已知基因和 6 000 个表达序列标签 (EST) 的原位合成的寡核苷酸群。

1.2 实验动物和实验分组

db/m 小鼠从美国 Jackson 动物中心引进。db/db 小鼠出生约一个月后逐渐出现肥胖、高血糖、高血脂、糖尿等糖尿病症状; 至出生后约二个月, 开始出现糖尿病肾病症状^[2]。本研究分正常对照组、糖尿病肾病组和大黄酸治疗组, 每组 3 只小鼠。其中大黄酸治疗组和糖尿病肾病组为 db/db 小鼠, 前者从出生后第 8 周开始每天灌喂 150 mg/kg 体重的大黄酸; 后者则从出生后第 8 周开始, 每天灌喂等量体积的饮用水; 正常对照组采用同龄的 db/m 小鼠, 与糖尿病肾病组一样, 每天灌喂饮用水。连续灌喂三个月。

* 军队“十五”重点课题资助项目 (01Z013)。

** 通讯联系人。

¹⁾ 南京军区南京总医院实验动物科, 南京 210002

Tel: 025-4826808-58038, E-mail: zhihong@public1.ptt.js.cn

收稿日期: 2003-06-04, 接受日期: 2003-07-29

1.3 RNA 的提取、基因芯片杂交检测 and 数据处理

按照 QIAGEN 公司提供的 RNAeasy Mini Kit 操作说明抽提小鼠肾脏总 RNA, 并混合每组小鼠的 RNA 用于进一步的实验。按照 Affymetrix 公司推荐的方法进行反转录、体外转录 (同时进行生物素标记) 合成 cRNA 探针、基因芯片杂交、洗脱、染色和检测。芯片扫描所得数据利用 “Affymetrix Microarray Suite software 5.0” 进行计算和处理^[3-5]。

1.4 mdnr411 cDNA 的扩增、克隆、及测序分析

根据 EST AI851387 的序列设计特异性引物 (引物位置见图 1)。按 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 介绍的方法进行 5' 端快速扩增。具体方法如下: a. 合成 cDNA 第一链。样品 RNA 1 μg, 5' CDS primer 1 μl, SMART II A oligonucleotide 1 μl, 加水至 5 μl, 70℃ 2 min, 冰上放置 2 min, 加入 5 × 第一链合成缓冲液 2 μl, 20 mmol/L DTT 1 μl, 10 mmol/L dNTPs 1 μl, 逆转录酶 1 μl, 42℃ 温育 2 h, 加入 100 μl Tricine-EDTA 缓冲液, 72℃ 温育 10 min。b. 5' 端快速扩增法扩增 mdnr411 cDNA。先利用特异性扩增引物 411 和通用引物混

合物 (Universal Primer A Mix, UPM) 作第一轮扩增, 利用胶回收试剂盒回收扩增产物中的长约 1.4 kb 扩增片段, 再利用特异性扩增引物 412 和通用引物混合物进行第二轮扩增。PCR 扩增的具体反应体系如下。第一轮扩增: 上述 cDNA 第一链合成产物 2.5 μl, 10 × 通用引物混合物 5 μl, 特异性引物 411 (10 μmol/L) 1 μl, 10 × PCR 扩增缓冲液 5 μl, dNTP 混合物 (10 mmol/L) 1 μl, 50 × Advantage 2 聚合酶混合物 1 μl, 纯水 34.5 μl; 第二轮扩增: 以特异性引物 412 代替 411。PCR 扩增条件为: 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 65℃ 1 s, 72℃ 3 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。所用引物的序列为: 引物 411, 5' TGGCAAGGGCGTAGAAAAGAACCTC 3'; 引物 412, 5' TCGAAAAGCAAGAAGGTGGGGAGGC 3'; 通用引物混合物 (UPM), 包括长链引物 (5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3', 0.4 μmol/L) 和短链引物 (5' CTAATACGACTCACTAT AGGGC 3', 2 μmol/L)。

```

TTTTTTTTTTTTTTTTTGAAGATTGCTTCATACTTTATTTACAACAGAATGTAAGAAAAAGTAAGTTATTAACAATAATAATAATTGGGGTTGGCATCGACGACAGAA
CAGCCATAAAAGGACACAGAGGGCTGTGTGTGTGAGGGTCACCTTCGCTTTCGCTTGTGCAACACTGTGCATTGCAACACCTGGTCCTCAGCGGTGGCAGTGGTATTT
TGACTAAGTTAGCCGATCAAGGTCTCAGCTCGAAAAATGTAACACTGAAATGACACTGGCAAGGGCGTAGAAAAGAACCTCTTCTCTTCTCAGGGACACTGGGAAACCGA
ACGGGAGACTTGAAATTCAGCAGATACAGTTTGAACCTCGAAAAGCAAGAAGGTGGGGAGGCCTTAGTCTAAGCATTCATTAATAATGGGGTTACAGTGAAAGGACATG

```

Fig. 1 Sequence of EST AI851387 and the primer 411 and 412

Sequence with shadow represent primer 411, while sequence with black frame representing primer 412.

利用胶回收试剂盒回收第二轮扩增产物中长约 1.4 kb 的特异性扩增片段, 将其克隆到克隆载体 pUCm-T 上, 构建成 pUCm-mdnr411 载体。利用结合于插入片段两端载体序列上的通用测序引物 T7、M13 对 mdnr411 两端先进行测序, 再根据测序结果设计引物进行进一步的步行测序, 直到两端相重叠。

1.5 mdnr411 表达情况的半定量 RT-PCR 分析

根据对 mdnr411 的直接测序得到的序列, 设计针对 mdnr411 的引物 417、418。其序列分别是: 417, 5' agttgttggtggaccctgttac 3'; 418, 5' agaccgctttgaaggtggaatac 3'。利用 TaKaRa 公司提供的 RT-PCR 试剂盒 RNA LA PCR™ Kit 进行 RT-PCR 扩增。具体条件如下。转录反应体系: MgCl₂ 5 mmol/L, 10 × RNA PCR 缓冲液 2 μl, dNTP 混合物 20 nmol,

RNase 抑制剂 20 U, AMV 逆转录酶 5 U, Oligo dT 2.5 pmol, RNA 1 μg, 以无 RNA 酶的水补足至 20 μl。混匀后于 42℃ 孵育 30 min。PCR 扩增体系: 逆转录产物 5 μl, MgCl₂ 2.5 mmol/L, 10 × PCR 扩增缓冲液 2 μl, 引物 417、418 各 6 pmol, β-肌动蛋白基因正、反链引物各 6 pmol, Taq 酶 1 U, 以灭菌水补至 25 μl。PCR 扩增循环条件如下: 94℃ 30 s, 60℃ 5 s, 72℃ 45 s, 连续进行 24 个循环后, 延伸 7 min。此半定量 RT-PCR 所用内参照为 β-肌动蛋白基因, 其正义链引物序列为 5' GAAGAGCTACGAGCTGCC 3', 反义链引物序列为 5' TGATCCACATCTGCTGGA 3'。β-肌动蛋白基因预期扩增片段长度为 362 bp。引物 417/418 扩增的 mdnr411 cDNA 片段预期长度为 639 bp。

1.6 mdnr411 序列分析

对 mdnr411 cDNA 的阅读框预测性分析采用 DNASIS v 2.5 Demo 软件; 序列同源性比对利用网上的 BLAST 工具进行分析。

2 结果

2.1 芯片检测数据生物信息学分析结果

利用基因芯片 GM-U74A 对来自正常对照组、糖尿病肾病组、以及大黄酸治疗组的 cRNA 进行检测的结果^[6]是: 在总共 12 473 个基因中, 正常对照组检测到了 5 163 个, 占总基因数的 41.4%; 糖尿病肾病组检测到了 4 166 个, 占 33.4%; 大黄酸治疗组检测到了 3 676 个, 占 29.5%。进一步运用 Affymetrix 公司提供的分析软件“Affymetrix Microarray suite software 5.0”对上述 3 个样品的芯片检测所得数据进行处理, 结果发现: 与正常对照组相比, 糖尿病肾病组检测到有 1 085 个基因(包括 EST)表达下调, 其中下调倍数大于 2 倍的有 166 个, 表达上调的基因共有 37 个, 其中有 29 个基因的上调倍数大于 2。与糖尿病肾病组比较, 大黄酸治疗组共有 539 个差异表达基因, 其中 384 个表达下调, 155 个表达上调, 表达差异大于 2 倍的分别有 47 个和 30 个。

在上述差异表达基因中, 芯片 ID 号为 102922_at (GenBank 号为 AI851387) 的 EST 在糖尿病肾病组其表达水平明显下调(与正常对照组相比下调了约 3 倍), 而在大黄酸治疗组的表达水平又恢复到接近正常水平。与 db/db 糖尿病肾病小鼠的病理情况显示出明显的相关性(我们的病理研究已表明, 大黄酸对糖尿病肾病具有明显的疗效^[2,7,8])。根据 GenBank 中提供的有关此 EST 的序列信息说明, 此 EST 带有 poly (T) 结构, 已位于 cDNA 的 3' 端。为此, 我们根据此 EST 的序列设计引物, 利用 5'-RACE 的方法对此 cDNA 进行了克隆。

2.2 末端扩增法扩增靶 cDNA 结果

图 2a 所示的是利用特异性引物 411 和 5' 端通用引物混合物 (universal primer A mix) 进行 PCR 扩增的结果。从图 2 中可以看出, 第一轮扩增产物在约 1.4 kb 处有一明显的扩增条带。图 2b 是以第一轮扩增产物中切取的 1.4 kb 产物为模板, 以内引物 412 和 5' 端通用引物混合物 (universal primer A mix) 重新进行扩增 (第二轮扩增) 的结果, 显示在 1.4 kb 处有一特异的扩增带。基于内引物的第二轮扩增结果表明我们得到了靶 cDNA。

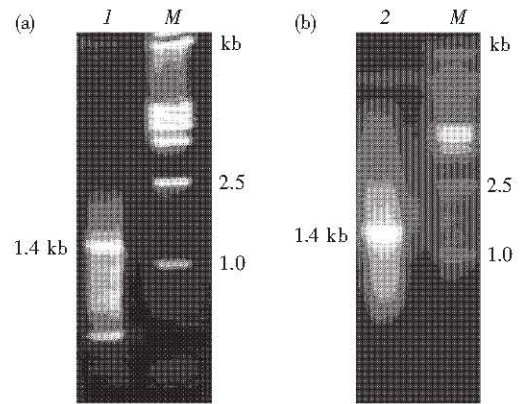


Fig. 2 Result of amplification of target cDNA

(a) Result of first time amplification when primer 411 and universal primer A mix were used; (b) Result of second time amplification when internal primer 412 and universal primer A mix used. 1, 2: Sample; M: DNA molecular mass marker.

2.3 mdnr411 cDNA 的克隆和酶切分析

利用胶回收试剂盒回收上述第二轮扩增产物中的约 1.4 kb DNA 片段, 克隆到克隆载体 pUCm-T 上。图 3a 所示的是克隆重组子的预期结构示意图。图 3b 则是对重组子的酶切分析情况。当以 *EcoR* I 或 *Hind* III 分别进行单酶切时, 电泳显示出约 4.2 kb 的单一一条带, 其大小与预期重组子 pUCm-mdnr411 的大小一致。说明我们已成功地扩增片段克隆到了克隆载体 pUCm-T 上。

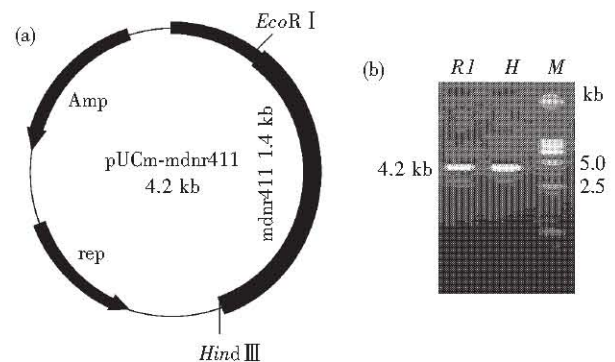


Fig. 3 Structure of pUCm-mdnr411 and result of endonuclease analysis of recombinant

RI: *EcoR* I; H: *Hind* III.

2.4 mdnr411 cDNA 测序结果

在酶切分析证实已成功地将扩增的 cDNA 克隆到了载体 pUCm-T 载体上后, 我们利用能分别结合于插入片段两端的测序引物 T7 和 M13, 对所克隆的 cDNA 进行了测序分析。图 4 所示的是这一测序

结果 (示 mRNA 序列): 带下划线部分是来自载体 pUCm-T 的序列, 带印影的分别是用以扩增 cDNA 的 “universal primer A mix” 长链引物 (位于 5'端) 和特异性引物 412 (位于 3'端), 而带框的则是来

自 EST AI851387 的序列. 带框的这一 EST AI851387 序列的存在证明: 我们克隆到的 cDNA 片段正是 EST AI851387 所对应的 cDNA——mdnr411 cDNA.

CTCACTATAGGGCGACATATGATCGATGATCCCATGGCGGGCGCCTGCAGACCAGGTCTCTAATACGACTCCTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA
CGCGGGACCTGTACATATATATACATGTATAAAAGGCAGTATAGCAAGTCACACACCAGTCCTAAATCTCTGGTGGTCAAACGTAAATAGTTGCCATAGGATAA
CACATATGTTTACCCCTCTTCATATCTGATGGTGGCAGATGCCACTAAAAATGGCCACATGTGTCTGACTCCAGGTGGCTCCGAATAGGAAATATCCCTGCGATCTT
GGTGTGGCATGGCAGCAGCATCTCTCTCTCGCGCTTTCCTGGGTCAAGGTTTGTGGTGGTTTTATTGTATAAAAGTTTGTCTGAAACCGCCCCCAAGGAGGGTTTCC
TTTTATGCTGTAGTAAGAGAAAACAAAGGAAAAAGAACTGTGACATTTTGTGTGTCAGTTTGTGGTGGACCGCTTACCATGGCTTCACATCTAAGTGGGACTA
TTTTAACTTATTTACAGGTATATGGTGTGGAATAAGTTAGCTCAATTGTGGATATAATGAACATCCACACAGACACATACACACACATACAAAATAAAAA
TTTAAAGTAAATACACAACCTCATGCTAAACTAGTCATGTGGTTTTCTTTTCATGGCTCATAACAACTTTAAGAGGCATTTTGATAAGAACTCTCTTCAGTGCT
CTGAGACAACAGGGTAACAGGACACAGCTGGCTTAGATCGATGGGAACCTTGTCTTTGAAAAGGGCCAGCATATAGTTAATTGATTATACTTTTGATCTATAAGCAA
ATAATCCAATGGAGAGTGACTCTCTAAATAGTTTCAAACCTTTTCTGGTCACCTGACTAGTAGGCTAGATGACATTCGCCATCTAAGCCATAGCTGTAAAAATAA
AATAAAAAATAAATCCTGGCTGTGCTATAAGTTGACATGAATAAGTATATTAAGCTCTTTATCTTGGTGAGACAAAGTGTGGCACTGTGTTGACACCATGGGC
AGACACAGGACACCTTGGGTTCTTCTGTATTCACCTTCAAAGCGGTCTGTCTGAGTATGATATCTTACTGCTCAAGATCCACAGGACTTCACGATGTAAGAGGGGT
GACTTCATGGAGAACCTCAGTCCATGTCCCTTCACTGTAACCCCTCTAATACGACTCCTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACCGGGGTTGACGCCA
TGGGCAGACAGACACCTTGGGTTCTTCTGTATTCACCTTCAAAGCGGTCTGTCTGAGTATGATATCTTACTGCTCAAGATCCACAGGACTTCACGATGTAAGAG
GGTGTGACTTCATGGAGAACCTCAGTCCATGTCCCTTCACTGTAACCCCTCTAATGAATGCTTAGACTAAGCCTCCCACTTCTTGTCTTTTCGAAAGACTGGA
GATCTGGATCCCTCGAGTCT

Fig. 4 Result of partial sequencing of pUCm-mdnr411

Sequence underlined is from the vector, sequence shadowed is from primer 412, sequence represented by shadowed bold alphabet is from “universal primer A mix”, and sequence with black frame is from EST AI851387.

2.5 定量 RT-PCR 结果

图 5 所示的是半定量 RT-PCR 分析结果. 与正常对照组相比, db/db 糖尿病肾病组 mdnr411 基因表达明显下调, 密度扫描显示其相对水平 (以 β -actin 为内参照) 仅为正常对照组的约 38%, 而大黄酒治疗组的表达水平则与正常对照组相似. 这一结果与芯片检测结果吻合. 证明 mdnr411 基因的表达与糖尿病肾病相关.

2.6 mdnr411 的序列同源性分析

根据测序得到的序列信息, 我们利用网上 BLAST 工具进行了序列的同源性比对分析. 结果表明, 此 cDNA 与小鼠 “RIKEN cDNA 5830436L09 gene (5830436L09Rik) mRNA” (GenBank 号为 XM_286402) 和小鼠 “adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 5830436L09” (GenBank 号为 AK077777) 具有极高的同源性. 主要的差异在于: mdnr411 cDNA 近 3'端多了 221 个碱基, 5'端多了 43 个碱基 (图 6). 我们已将此序列提交给了 GenBank 数据库 (GenBank accession number 为 AY256858), 并将此 cDNA 暂时命名为 mdnr411 (mouse diabetic nephropathy related mRNA No. 411).

2.7 mdnr411 阅读框和氨基酸同源性分析

利用 DNASIS v 2.5 Demo 软件, 我们对 mdnr411 的阅读框进行预测性分析. 根据软件分析结果, mdnr411 mRNA 的阅读框全长应为 270 bp, 即从 160 到 430 处 (图 6), 其编码的多肽由 90 个氨基酸残基组成. 利用氨基酸序列进行的 BLAST 同源性比对搜索分析表明, 除了与 *Archaeoglobus fulgidus* 的 Na^+/H^+ antiporter (napA-2, 由 338 个氨基酸残基组成) N 端具有一定的同源性外 (图 7), 未发现它与其他已知蛋白质具有同源性.

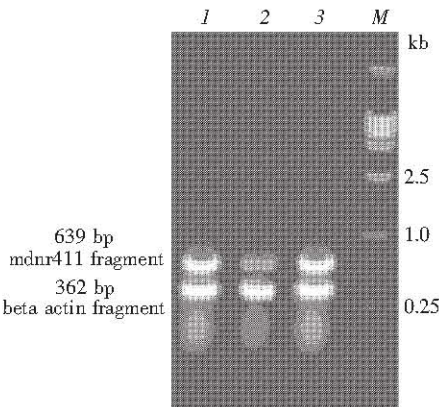


Fig. 5 Result of expression analysis of mdnr411 gene by semi-quantitative RT-PCR

1: normal control group; 2: db/db mice group; 3: rhein treated group; M: DNA molecular mass marker.

CTTTTCGA 1390
CTTTTCGA
CTTTTCGA

Italics represents mdmr411 mRNA sequence; underlined alphabet represents the sequence of mouse “RIKEN cDNA 5830436L09 gene (5830436L09Rik) mRNA”; and the other represents the sequence of mouse “adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 5830436L09”.

```

NapA-2   41  HLSEVDFLGKLGIVFLLFYVGLKIPPST  68
           HLS   FLG+  +VRL+  V L K  PP  +
mdnr411  24  HSLCAFLGQGFVVFLLYKVKLPPRR  51

```

Fig. 7 The homology region between *Archaeoglobus fulgidus* Na⁺/H⁺ antiporter (napA-2) and putative protein coded by mdnr411 mRNA

3 讨 论

糖尿病肾病是一种复杂的多基因相关疾病。由于病因的复杂性,有关糖尿病肾病发病的分子机制仍然不是很清楚。寻找糖尿病肾病新相关基因,探讨其在糖尿病肾病发生、发展过程中的可能作用,对于揭示糖尿病肾病的分子机制,进而发展新的糖尿病肾病诊断、防治方法,提高糖尿病肾病的诊断、防治水平无疑是非常必要的。

为了寻找糖尿病肾病新相关基因,我们利用 Affymetrix 公司的寡核苷酸基因表达谱芯片对 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏的基因表达谱进行了研究^[9]。通过比较其与正常对照小鼠、大黄酸治疗小鼠肾脏基因表达谱,筛选糖尿病肾病相关基因。在发现的众多差异表达基因(或 EST)中,芯片 ID 号为 102922_at 的 EST 表达水平与 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏病理进程表现出有明显的相关性。为了进一步研究其在糖尿病肾病发生、发展过程中的可能作用,我们根据此 EST 位于 mRNA 3'端这个特点,设计了特异性引物,利用 5'端快速扩增法(5'RACE)对其进行了 cDNA 全长克隆,成功地克隆到了一长为 1.4 kb 的 cDNA。全长测序分析表明,这是一条未知功能的新序列(我们已将其提交给了 GenBank 数据库,GenBank accession number 为 AY256858)。进一步的同源性比对表明,此 cDNA 与 GenBank 数据库中刚刚登录的(2003 年 2 月 24 日登录)小鼠“RIKEN cDNA 5830436L09 gene (5830436L09Rik) mRNA”(GenBank 号为 XM_286402),及小鼠“adult male thymus cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 5830436L09”(GenBank 号为 AK077777)具有很高的同源性。利用 DNASIS v 2.5 Demo 软件进行的阅读框分析表明,此 cDNA 很可能编码一由 90 个氨基酸残基组成的多肽。进一步利用氨基酸序列进行的 BLAST 同源性比对搜索分析表明,此蛋白质除与 *Archaeoglobus fulgidus* 的 Na⁺/H⁺ antiporter (napA-2, 由 338 个氨基酸残基组成)N 端具有一

定的同源性外,未发现它与其他已知蛋白质具有同源性,因此是一个功能完全未知的新蛋白质。

另外,我们还利用半定量 RT-PCR 方法对 mdnr411 基因在正常对照组小鼠、db/db 糖尿病肾病组小鼠、以及大黄酸治疗组小鼠肾脏中的表达情况进行了进一步的分析。其结果与芯片检测的结果一致。从而进一步证明了 mdnr411 基因与小鼠糖尿病肾病之间的相关性,也进一步证明了我们所作的基因芯片研究结果的可靠性。

通过以上工作,本文成功地筛选、验证、并克隆到了包含有完整阅读框的小鼠糖尿病肾病相关新基因 mdnr411 cDNA。这对于加深对糖尿病肾病分子机制的认识具有重要意义。从基因芯片检测结果和 RT-PCR 分析结果来看,中药大黄酸能诱导 mdnr411 基因的表达,这可能是大黄酸治疗糖尿病肾病的分子机制之一,也为今后临床上利用大黄酸治疗 2 型糖尿病肾病提供了新的思路。作为一个糖尿病肾病相关新基因,mdnr411 的具体生物学功能及其在糖尿病肾病发生、发展中的真正作用仍有待于进一步的研究,本文对 mdnr411 cDNA 的成功克隆,为我们进一步开展这方面的工作创造了条件。

参 考 文 献

- 1 Coleman D L. Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes*, 1982, **31** (suppl 1): 1~6
- 2 朱加明,刘志红,黄燕飞,等. 大黄酸对 db/db 小鼠糖尿病肾病疗效的观察. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, **11** (1): 3~10
- 3 Zhu J M, Liu Z H, Huang Y F, et al. *Chin J Nephrology, Dialysis & Transplantation*, 2002, **11** (1): 3~10
- 4 Zhao L P, Prentice R, Breeden L. Statistical modeling of large microarray data sets to identify stimulus-response profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (10): 5631~5636
- 5 Yang M C, Ruan Q G, Yang J J, et al. A statistical method for flagging weak spots improves normalization and ratio estimates in microarrays. *Physiol Genomics*, 2001, **7** (1): 45~53
- 6 Li C, Wong W H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (1): 31~36
- 7 刘志红,郑敬民,吴义超,等. db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏基因表达谱及大黄酸对其的影响. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, **11** (3): 201~205
- 8 LIU Z H, ZHENG J M, WU Y C, et al. *Chin J Nephrology, Dialysis & Transplantation*, 2002, **11** (3): 201~205
- 9 刘志红,李颖健,朱加明,等. 葡萄糖转运蛋白对大鼠肾小球系膜细胞血糖通路的影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2001, **17** (6): 370~373
- 10 LIU Z H, LI Y J, ZHU J M, et al. *Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2001, **17** (6): 370~373
- 11 Liu Z H, Li Y J, Chen Z H, et al. Glucose transporter-1 in human glomerular mesangial cells modulated by transforming growth factor-beta and rhein. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, **22** (2): 169~175

Screening, Cloning and Analyzing of a New Diabetic Nephropathy Related Gene From db/db Mice *

ZHENG Jing-Min, LIU Zhi-Hong **, ZHANG Xin, YUN Shi-Feng¹⁾, LI Lei-Shi

(Research Institute of Nephrology, Jingling Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract Kidney gene expression profile of db/db diabetic nephropathy mice was analyzed by using Affymetrix oligonucleotide genechip. Mice diabetic nephropathy related genes (and ESTs) were found out. Then, a 1.4 kb cDNA (mouse diabetic nephropathy related cDNA No. 411, mdnr411, GenBank accession number AY256858) was amplified and cloned by using RACE method, based on the sequence of EST. Homologous analysis of the sequence was carried out. And the result shows that it is a new cDNA, which is highly homologous with mouse “RIKEN cDNA 5830436L09 gene (5830436L09Rik) mRNA”. The ORF of mdnr411 was predicted by using DNASIS v 2.5 Demo program. The result shows that the peptide coded by mdnr411 mRNA has 90 amino acids. And the result of homology screening did not find any obviously homologous protein, except *Archaeoglobus fulgidus* Na⁺/H⁺ antiporter (napA-2), which is partially homologous with the peptide coded by mdnr411 mRNA. All these results show that a cDNA of a new DNA related gene which function is fully unknown have screened and cloned. The foundation for further study of the function of the new gene, and its possible role in the pathogenesis of mice diabetic nephropathy has been laid, which is valuable to further understand the mechanism of diabetic nephropathy.

Key words gene chip, diabetic nephropathy, db/db mice, mdnr411

* This work was supported by a grant from a Key Project of “The Tenth Five Years Science Plan of PLA” (01Z013).

** Corresponding author.

¹⁾ Department of Experimental Animal, Jingling Hospital, Nanjing 210002, China.

Tel: 86-25-4826808-58038, E-mail: Zhihong@public1.ptt.js.cn

Received: June 4, 2003 Accepted: July 29, 2003