

db/db 小鼠糖尿病肾病相关基因的分析 and 克隆*

郑敬民 刘志红** 张 鑫 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 用 GM-U74A 基因芯片分别检测了正常对照组 (db/m 小鼠)、糖尿病肾病组 (db/db 小鼠)、大黄酸治疗组 (大黄酸 150 mg/kg 治疗 12 周) 肾脏基因表达谱, 发现在 12 437 个基因 (包括表达序列标签) 中, 与正常对照组相比, 糖尿病肾病组有 1 085 个基因表达下调, 37 个基因表达上调, 其中变化幅度大于 2 倍, 表达下调的有 166 个和表达上调的有 29 个。与糖尿病肾病组相比, 大黄酸治疗组有 384 个基因表达下调, 155 个表达上调, 其中变化幅度大于 2 倍, 表达下调的有 47 个和表达上调的有 30 个。在此基础上, 对其中的一个差异表达的表达序列标签 (EST) 进行了详细的生物信息学分析, 发现它是一个未知功能基因——“REKEN cDNA 0610006H10” 基因的一部分。在用 RT-PCR 进一步验证了其 with 糖尿病肾病的相关性后, 对 “REKEN cDNA 0610006H10” 基因进行了克隆。

关键词 基因表达谱, 糖尿病肾病, “REKEN cDNA 0610006H10” 基因, db/db 小鼠

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。虽然国内外对糖尿病肾病进行了不少研究, 但有关糖尿病肾病详细的分子机制至今仍不很清楚。寻找糖尿病肾病相关基因并研究其表达及功能等情况, 对于进一步探讨糖尿病肾病发生、发展的分子机制, 阐明糖尿病肾病的本质具有重要意义。

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。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]。解放军肾脏病研究所以往的工作已证实大黄酸对治疗糖尿病肾病具有很好的效果^[2~4]。为了寻找糖尿病肾病相关基因, 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公认的 Affymetrix 公司生产的基因芯片, 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。在此基础上, 我们又利用 RT-PCR 的方法对其中的一个差异表达基因——RIKEN cDNA 0610006H10 基因, 在糖尿病肾病小鼠、大黄酸治疗小鼠以及正常对照小鼠中的表达情况进行了分析, 在验证了其 with 糖尿病肾病的相关性后, 对 RIKEN cDNA 0610006H10 基因进行了克隆。

1 材料和方法

1.1 药物

大黄酸由本院药剂科提供, 经高效液相色谱 (HPLC) 检验纯度在 98% 以上。

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^[5]。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, 均为雌性。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 大黄酸每公斤体重; 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。

1.3 RNA 的提取和表达探针的制备

从各组小鼠中取肾脏, 利用 QIAGEN 公司生产的 RNAeasy Mini Kit 抽提总 RNA, 按 Invitrogen Life Technologies 公司的 SuperScript II 试剂盒进行反转录, 并以 Affymetrix 公司的 RNA Transcript Labeling Kit 进行体外转录 (同时进行生物素标记) 合成 cRNA 探针。

1.4 基因芯片和芯片杂交、洗脱、染色及检测

合成好的 cRNA 探针经片段化处理后用于与基因芯片杂交。基因芯片为 Affymetrix 公司生产的 GM-U74A, 其上有对应于约 6 000 个已知基因和

* 军队 “十五” 重点课题资助项目 (01Z013)。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2002-11-05, 接受日期: 2003-02-18

6 000 个表达序列标签 (EST) 的原位合成的寡核苷酸群。芯片的杂交、洗脱、染色及检测利用 Affymetrix 公司生产的专用设备“基因芯片检测工作站”(work station) 进行, 一切操作过程均按 Affymetrix 公司推荐的条件进行^[6~8]。

1.5 基因芯片检测数据的处理

芯片扫描所得数据利用“Affymetrix Microarray Suite software 5.0”进行计算和处理^[9~11]。

1.6 RIKEN cDNA 0610006H10 基因的扩增

利用 TaKaRa 公司提供的 RT-PCR 试剂盒进行逆转录和目标基因的扩增。具体条件如下: 逆转录反应体系为 MgCl_2 5 mmol/L, $10\times$ 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 RNase Free dH_2O 补足至 20 μL 。混匀后于 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。PCR 扩增体系为逆转录产物 20 μL , MgCl_2 2.5 mmol/L, $10\times$ PCR 缓冲液 8 μL , 引物 6A、6B 各 25 pmol, Taq 酶 5 U, 以灭菌水补至 100 μL 。PCR 扩增循环条件如下: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 连续进行 25 个循环后, 延伸 7 min。用以扩增“RIKEN cDNA 0610006H10”基因的引物 6A 和 6B, 针对 GenBank 数据库中“RIKEN cDNA 0610006H10”的序列设计为 6A: 5' tcaccctc-agacatttca 3'; 6B: 5' gtagtatttgggttagggagtc 3'。引物 6A/6B 的预期扩增产物是一个包含了“RIKEN cDNA 0610006H10”基因起始密码子和终止密码子在内的, 长度为 1.1 kb 的 DNA 片段。半定量 RT-PCR 所用内参照为 β -actin 基因, β -actin 预期扩增片段长度为 342 bp。半定量 RT-PCR 的其他扩增条件如上, 只是在反应体系中同时加入一对 β -actin 片段扩增引物, 正、反引物各 25 pmol。

1.7 PCR 产物的纯化、连接、转化及重组子鉴定

“RIKEN cDNA 0610006H10”基因 PCR 扩增产物于 0.7% 琼脂糖凝胶上电泳, 切取约 1.1 kb 条带回收, 采用常规的分子克隆方法将其克隆到载体 PUC-T 上, 构建成重组质粒 pUCm-6AB。以酶切及测序法对所得重组子进行鉴定。

2 结 果

2.1 总 RNA 抽提

图 1 所示为所抽提的总 RNA 变性凝胶电泳结果。18 S RNA 和 28 S RNA 相应条带清晰可见, 显示所抽提的 RNA 完整性良好。

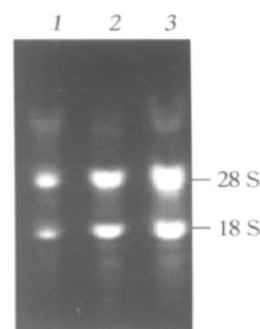


Fig. 1 Result of electrophoresis of RNA

1: normal control group RNA; 2: db/db mice group RNA;

3: rhein treated group RNA.

2.2 芯片检测结果

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 进行检测的结果是: 在 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 个表达下调和 30 个表达上调。表 1 所示的就是利用“Affymetrix Microarray suite software 5.0”软件进行分析的部分结果。其中的数字是指与正常对照组相比后, 特定基因在糖尿病肾病组或大黄酸治疗组表达水平变化的倍数。

2.3 “RIKEN cDNA 0610006H10”基因的表达分析

通过芯片检测发现, 芯片 ID 号为“95725_at”(GenBank 号为 AI314227) 的 EST 在糖尿病肾病组表达下调了 2 倍多, 经大黄酸治疗, 其表达又恢复到正常水平。进一步的核酸序列同源性比对发现, 此 EST 应是小鼠“RIKEN cDNA 0610006H10”基因的一部分。而有关“RIKEN cDNA 0610006H10”基因的生理功能尚未见任何报道。利用 DNASIS 2.5v Demo 软件将此核酸序列翻译成蛋白质, 以所得蛋白质氨基酸序列开展同源性比对, 发现它与人

天冬氨酸酰基转移酶 3 (aspartoacylase 3, ACY-3) 有约 67% (214/318) 的同源性. 为了进一步检验芯片检测的结果, 我们又以定量 RT-PCR 的方法对“REKEN cDNA 0610006H10”基因的表达情况进行了分析. 图 2 所示的是 RT-PCR 检测结果: 与正常对照组相比, db/db 糖尿病肾病组 “REKEN cDNA

0610006H10”基因表达明显下调, 密度扫描显示其相对水平 (以 β -actine 为内参照) 仅为正常对照组的一半, 而大黄酒治疗组 “REKEN cDNA 0610006H10”基因表达水平则与正常对照组相似. 这一结果与芯片检测结果完全吻合. 证明 “REKEN cDNA 0610006H10”基因的表达与糖尿病肾病相关.

Table 1 Expression level of some genes in db/db mice and rhein treated db/db mice compared with normal control mice

Chip ID	Change A	Change B	GenBank No.	Gene
98423_at	1.66 ↓	2.6 ↓	M81445	Gap junction membrane channel protein beta 2
102914_s_at	8.8 ↓	4.0 ↓	U23778	hematopoietic-specific early-response A1-b protein gene
98477_s_at	1.35 ↓	2.3 ↓	L40632	Ankyrin 3
92590_at	2.2 ↓	1.6 ↓	U12791	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase 2
98447_at	1.3 ↓	2.3 ↓	M62362	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)
101441_i_at	1.7 ↓	2.9 ↓	AF031127	inositol trisphosphate receptor type 2 (Itpr2) gene
97411_at	3.3 ↓	7.2 ↓	L11316	Ect2 oncogene
99475_at	6.6 ↓	3.2 ↓	U88327	suppressor of cytokine signalling-2 (SOCS-2) mRNA
104701_at	2.3 ↓	1.5 ↓	Y07836	mRNA for basic-helix-loop-helix protein
98555_at	1.4 ↓	2.2 ↓	AB008516	tetratricopeptide repeat domain
96110_at	1.7 ↓	2.8 ↓	U31966	carbonyl reductase
94777_at	3.1 ↓	1.8 ↓	X13060	serum albumin gene with LINE-1 repeat
103288_at	2.3 ↓	1.6 ↓	AF053062	receptor interacting protein 140 mRNA, complete cds
160514_at	2.5 ↓	NC	D78255	mRNA for PAP-1, complete cds
100771_at	2.3 ↓	NC	AF068182	B cell linker protein BLNK mRNA
95725_at	2.1 ↓	NC	A1314227	“REKEN cDNA 0610006H10” cDNA
92904_at	10.5 ↓	NC	U08185	B lymphocyte induced maturation protein
92767_at	5.0 ↓	NC	D16250	bone morphogenetic receptor for Bmp2 and Bmp4
101307_at	4.4 ↑	3.0 ↑	Y10221	cytochrome P450, 4a12
93435_at	2.1 ↑	4.9 ↑	D89669	cytochrome P450, 24
93996_at	2.0 ↑	3.7 ↑	X01026	mouse mRNA fragment for repetitive element B2
94297_at	2.6 ↑	2.3 ↑	U16959	FK506 binding protein 5
99197_at	3.9 ↑	2.5 ↑	M55413	group specific component
96796_f_at	NC	3.0 ↑	X06358	UDP-glucuronosyltransferase 2 family, member 5
100213_f_at	NC	2.0 ↑	U93862	Mus musculus ribosomal protein L41 mRNA
92898_at	NC	4.5 ↑	U36993	cytochrome P450, 7b1
103674_f_at	NC	5.8 ↑	AJ006584	mRNA for translation initiation factor eIF2 gamma Y
102401_at	NC	5.5 ↓	M21065	interferon regulatory factor 1
95597_at	NC	3.1 ↓	M34141	prostaglandin endoperoxide synthase 1
93573_at	NC	2.0 ↓	V00835	metallothionein 1
100412_g_at	NC	2.5 ↓	AF053943	aortic carboxypeptidase-like protein ACLP mRNA
92484_at	NC	2.4 ↓	Y15907	mRNA for myc-intron-binding protein 1
103639_at	NC	7.8 ↓	U43085	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2

Change A: Change fold of db/db group's gene expression level compared with normal control group; Change B: Change fold of rhein treated group's gene expression level compared with normal control group. ↓: decrease; ↑: increase; NC: not changed.

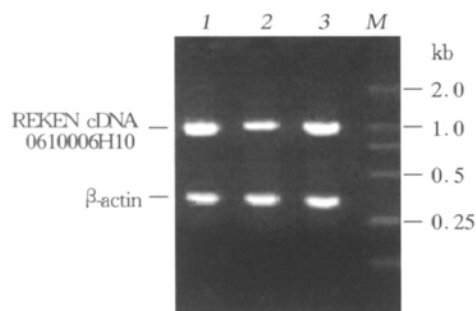


Fig. 2 Result of RT-PCR

1: normal control group; 2: db/db mice group; 3: rhein treated group; M: DNA Marker DL2000.

2.4 “REKEN cDNA 0610006H10” 基因的克隆

对所构建的 pUCmr-6AB 酶切鉴定见图 3。图 3a 是 pUCmr-6AB 的预期结构示意图; 图 3b 是对得到的重组克隆的酶切分析结果。酶切结果与预期的 pUCmr-6AB 结构相符。

2.5 克隆产物测序结果

在酶切鉴定的基础上, 我们进一步利用分别位于插入片段两端载体上的通用引物 T7 和 M13

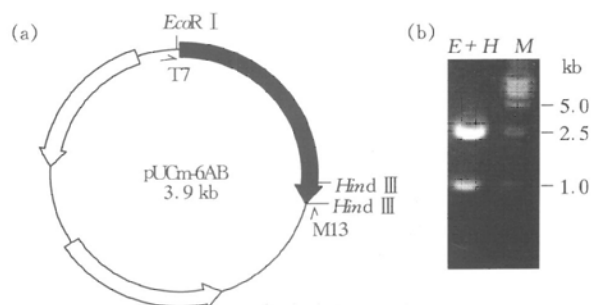


Fig. 3 Result of endonuclease analysis of pUCmr-6AB

E: EcoR I; H: Hind III; M: DNA Marker DL15000.

(图 3a) 对构建的重组载体 pUCmr-6AB 进行了部分测序, 测序结果显示, pUCmr-6AB 中 1.1 kb 插入片段的序列 (图 4), 与英特网检索得到的 “REKEN cDNA 0610006H10” 基因序列完全一致, 且所扩增的片段中包含了 “REKEN cDNA 0610006H10” 基因从起始密码子 ATG 到终止密码子 TAA 的完整阅读框。根据这一阅读框, 其所编码的蛋白质总共含 318 个氨基酸残基 (图 4)。

1 gaagaggagctagaggttgcaagggggaacaaaatttgctgtggtgtcttgaacttggcttctgggtacagttcttccccacactggag 92

```

93 ATG TCC TCC CTA CCT GGG TCC CGG GAG CCC CTG CTC CGT GTG GCT GTG ACT GGA GGC ACC 152
1 M S S L P G S R E P L L R V A V T G G T 20
153 CAC GGG AAT GAG ATG TGT GGT GTC TAC CTG GCC CGG TAC TGG CTA CAG AAC CCA GGG GAG 212
21 H G N E M C G V Y L A R Y W L Q N P G E 40
213 CTG CAG AGA CCC AGC TTC TCA GCC ATG CCG GTT CTG GCC AAC CCA GCA GCC ACA GCT GCT 272
41 L Q R P S F S A M P V L A N P A A T A A 60
273 TGT TGC CGT TAC CTG GAC CGT GAT CTC AAC CGC TCC TGC ACC CTC ACC TTC CTT GGT TCC 332
61 C C R Y L D R D L N R S C T L T F L G S 80
333 ACC GCT ACC CCT GAT GAC CCC TAT GAA GTG AAA AGA GCC CGA GAG TTG AAC CAG CTG CTG 392
81 T A T P D D P Y E V K R A R E L N Q L L 100
393 GGT CCC AAG GGC ACA GGC CAG GCT TTT GAC TTT ACC CTA GAC CTG CAC AAC ACC ACA GCA 452
101 G P K G T G Q A F D F T L D L H N T T A 120
453 AAC ACT GGA GTC TGC CTC ATC TCT GAA TCC AAC ATC TCC TTC AAC TTG CAC CTG TGC CAC 512
121 N T G V C L I S E S N I S F N L H L C H 140
513 TAC CTA CAG CGG CAG AAC CCG GGG ATG CCC TGC CGC CTC TTT CTG TAT GAG CCA GCT GGG 572
141 Y L Q R Q N P G M P C R L F L Y E P A G 160
573 ACG GAG ACC TTC AGC GTG GAA TCT ATA TCC AAG AAT GGA ATC TGT CTG GAG ATG GGC CCA 632
161 T E T F S V E S I S K N G I C L E M G P 180
633 CAG CCT CAG GGC GTG CTG CGG GCC GAC CTG TTC TCC CGG ATG CGA GCT CTG GTG GCA TCC 692
181 Q P Q G V L R A D L F S R M R A L V A S 200
693 ATT CTG GAC TTC ATC GAG CTC TTC AAC CAA GGC ATG GAC TTA CCC GCC TTT GAG ATG GAT 752
201 I L D F I E L F N Q G M D L P A F E M D 220
753 ATC TAC AGG AAC TTG GGC AGT GTG GAC TTC CCA CGC ACT GCA GAT GGT GAC CTG GCT GGC 812
221 I Y R N L G S V D F P R T A D G D L A G 240
813 ACT GTG CAC CCT CAA CTG CAG GAC CAT GAC TTT GAG CCA CTG AGG CCT GGT GAA CCC ATC 872
241 T V H P Q L Q D H D F E P L R P G E P I 260
873 TTC AAG CTT TTC AGC GGA GAA GAC GTA CTG TAT GAG GGG GAC TCC ATT GTG TAC CCT GTG 932
261 F K L F S G E D V L Y E G D S I V Y P V 280
933 TTC ATT AAT GAG GCT GCC TAT TAT GAG AAG CAC GTG GCA TTC CTG AAG TCT GAG AAG ATC 992
281 F I N E A A Y Y E K H V A F L K S E K I 300
993 AGG GTC ACA GTG CCT GCC CTG CTG AGG TTG ACC CCC CGC TCC ACC CAG ACT CCC TAA cccaaat1056
301 R V T V P A L L R L T P R S T Q T P318 *

```

Fig. 4 Sequence of 1.1 kb inserted fragment of pUCmr-6AB, which is identical to “REKEN cDNA 0610006H10” gene cDNA, and the potential sequence of the protein coded by it

3 讨 论

差异表达研究是揭示疾病相关基因的重要方法. 基因差异表达的研究方法有多种, 基因芯片检测和 RT-PCR 定量分析都是其中的常用方法. 为了研究糖尿病肾病发病过程中的基因表达谱变化情况, 寻找糖尿病肾病相关基因, 我们采用 Affymetrix 公司生产的基因芯片对糖尿病肾病模型小鼠 (db/db 小鼠) 的肾脏基因表达谱进行了检测. 在所检测的 12 473 个基因中, 发现了 1 085 个可能与糖尿病肾病相关, 539 个可能与大黄酸作用机制相关的差异表达基因 (包括 EST). 为了检验芯片检测的结果, 我们又利用半定量 RT-PCR 的方法对所发现的一个差异表达基因——“RIKEN cDNA 0610006H10”基因在 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达情况进行了分析. 半定量 RT-PCR 分析结果与芯片检测结果完全一致, 证明上述基因芯片检测结果是可靠的.

小鼠“RIKEN cDNA 0610006H10”基因是 2002 年由 Eukaryota 等提交到 GenBank 数据库的. 经检索, 我们未发现有关其功能的报道. 从其与人天冬氨酸酰基转移酶 3 基因 (aspartoacylase 3, ACY3) 的同源性分析结果来看, 它很可能是小鼠的对应同源基因. 天冬氨酸酰基转移酶是一种催化 N-乙酰天冬氨酸分解为天冬氨酸的氨基乙酰酶 (aminoacylase). 目前研究较多的分解 N-乙酰天冬氨酸的氨基乙酰酶为氨基乙酰酶 2 (aminoacylase 2), 即通常的天冬氨酸酰基转移酶 (aspartoacylase, ASPA)^[11~16]. ASPA 基因缺陷是导致人 Canavan 病的主要原因. 这是一种退化性脑白质营养不良疾病, 主要特点是脑白质产生膨胀性海绵样恶化. 据报道, N-乙酰-L-天冬氨酸在有髓鞘神经元中能起一种分子水泵的作用^[17]. ASPA 缺陷引起 N-乙酰-L-天冬氨酸代谢紊乱, 进而引起中枢神经系统病变. 我们的以上研究结果表明, “RIKEN cDNA 0610006H10”基因 mRNA 表达水平, 与糖尿病肾病模型小鼠 db/db 小鼠的病理情况具有明显的相关性 (有关实验所用的 db/db 小鼠的生理和生化指标及大黄酸治疗对其影响情况请参阅参考文献 [5]). “RIKEN cDNA 0610006H10”基因在糖尿病肾病中究竟起什么样的作用呢? 它与大黄酸治疗效应是如何相关的呢? 这是我们下一步需要研究的问题. 我们对“RIKEN cDNA 0610006H10”基因的成功克隆, 为下一步开展“RIKEN cDNA 0610006H10”基

因的功能研究创造了条件.

参 考 文 献

- 1 Coleman D L. Diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetes*, 1982, **31** (suppl 1): 1~6
- 2 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
- 3 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己糖胺通路的影响. *中华内分泌代谢杂志*, 2001, **17** (6): 370~373
Liu Z H, Li Y J, Zhu J M, *et al.* *Chin J Endocrin Metabol*, 2001, **17** (6): 370~373
- 4 朱加明, 刘志红, 李颖健, 等. 大黄酸对 GLUT1 基因转染系膜细胞功能的影响. *中华内科杂志*, 2001, **40** (8): 537~542
Zhu J M, Liu Z H, Li Y J, *et al.* *Chin J Inter Med*, 2001, **40** (8): 537~542
- 5 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
Zhu J M, Liu Z H, Huang Y F, *et al.* *Chin J Neph Dial Trans*, 2002, **11** (1): 3~10
- 6 Wurbach E, Yuen T, Ebersole, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptor coupled gene network organization. *J Biol Chem*, 2001, **276** (50): 47195~47201
- 7 Tanaka T S, Jaradat S A, Lim M K, *et al.* Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15 000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (16): 9127~9132
- 8 Cho R J, Fromont-Racine M, Wodicka L, *et al.* Parallel analysis of genetic selections using whole genome oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (7): 3752~3757
- 9 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
- 10 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
- 11 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
- 12 Matalon R, Rady P L, Platt K A, *et al.* Knock-out mouse for Canavan disease: a model for gene transfer to the central nervous system. *J Gene Med*, 2000, **2** (3): 165~175
- 13 Sistermans E A, de Coe R F, van Beerendonk H M, *et al.* Mutation detection in the aspartoacylase gene in 17 patients with Canavan disease: four new mutations in the non-Jewish population. *Eur J Hum Genet*, 2000, **8** (7): 557~560
- 14 Baslow M H. Canavan's spongiform leukodystrophy: a clinical anatomy of a genetic metabolic CNS disease. *J Mol Neurosci*, 2000, **15** (2): 61~69
- 15 Tahmaz F E, Sam S, Hoganson G E, *et al.* A partial deletion of the aspartoacylase gene is the cause of Canavan disease in a family from Mexico. *J Med Genet*, 2001, **38** (3): E9
- 16 Janson C, McPhee S, Bilaniuk L, *et al.* Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. *Hum Gene Ther*, 2002, **13** (11): 1391~1412
- 17 Baslow M H. Evidence supporting a role for N-acetyl-L-aspartate as a molecular water pump in myelinated neurons in the central nervous system. An analytical review. *Neurochem Int*, 2002, **40** (4): 295~300

Analyzing and Cloning of Diabetic Nephropathy Relative Gene From db/db Mice^{*}

ZHENG Jing-Min, LIU Zhi-Hong^{**}, ZHANG Xin, LI Lei-Shi

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

Abstract Eight weeks old db/db mice were treated with or without rhein at a dosage of 150 mg/kg for 12 weeks. Kidney's total RNA was extracted and renal gene expression profiles were tested using the gene chip GM-U74A from Affymetrix company. Among the total 12 437 tested genes, 1 085 genes were down-regulated and 37 genes were up-regulated in untreated db/db mice when compared with normal control. Among them, 166 genes were down-regulated and 29 genes up-regulated more than 2 fold. It was found that 384 genes were down-regulated and 155 genes up-regulated in rhein treated db/db mice as compared with untreated db/db mice. About 47 genes were down-regulated and 30 genes up-regulated more than 2 fold. Then, an EST, which was down-regulated by about 2 fold in db/db mice and recover to normal level in rhein treated mice, was further analyzed by bioinformatical method and proved to be part of "REKEN cDNA 0610006H10" gene, which function is unknown. After its expression level was further proved by RT-PCR, diabetic nephropathy relative gene, "REKEN cDNA 0610006H10" gene, was cloned for further study.

Key words gene expression profile, diabetic nephropathy, "REKEN cDNA 0610006H10" gene, db/db mice

^{*} This work was supported by a grant from A Key Project of "The Tenth Five Years Science Plan of PLA" (01Z013).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-25-4826808-58038, E-mail: Zhihong@public1.ptt.js.cn

Received: November 5, 2002 Accepted: February 28, 2003