

AL023001 基因在 2 型糖尿病肾病小鼠中的差异表达分析*

郑敬民 刘志红** 张鑫 陈 珊 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 的方法, 对筛选出来的一个糖尿病肾病相关 EST 进行了 cDNA 克隆和表达分析。得到了一长为 1.7 kb 的 cDNA 片段。序列分析和网上数据库比对发现, 此 cDNA 片段是小鼠表达序列 AL023001 的一部分。根据 AL023001 序列设计特异性引物, 利用半定量 RT-PCR 的方法对 AL023001 在 db/db 小鼠肾脏、肝脏、脂肪、骨骼肌、脑等组织中的表达情况进行了分析, 发现 AL023001 在 db/db 小鼠肾脏中的表达情况与基因芯片检测结果吻合, 且 AL023001 在肝脏、脂肪、骨骼肌和脑等糖尿病肾病相关组织中有差异表达。这些结果提示: AL023001 与 db/db 小鼠的糖尿病肾病具有相关性。上述工作有利于揭示 AL023001 基因的功能, 探讨糖尿病肾病的分子机制。

关键词 基因芯片, 糖尿病肾病, db/db 小鼠, AL023001

学科分类号 R363

糖尿病肾病是糖尿病患者的最常见并发症, 在欧美等发达国家, 糖尿病肾病已成为导致终末期肾脏病变发生的主要原因^[1,2]。在我国, 由糖尿病肾病所致的肾功能衰竭已占 15%。糖尿病肾病是一多基因相关疾病, 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。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^[3,4]。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, 我们利用基因芯片技术, 对 db/db 小鼠的肾脏基因表达谱进行了研究, 发现了一批差异表达基因 (或 EST)^[5]。在此基础上, 本文利用末端扩增法对芯片检测发现的差异表达 EST——AI838293 的 cDNA 5'端进行了扩增和克隆, 同源性比对分析发现, 所克隆的 cDNA 片段是小鼠 AL023001 基因 cDNA 的一部分, 同时又利用半定量 RT-PCR 的方法对 AL023001 在多种组织中的表达情况进行了分析研究。

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、限制性核酸内切酶和胶回收试剂盒, 均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。

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^[6]。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。

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

* 军队“十五”重点课题资助项目 (012013)。

** 通讯联系人。

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

收稿日期: 2004-03-29, 接受日期: 2004-05-30

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、检测和数据处理^[7-9]。

1.4 cDNA 的扩增、克隆及测序分析

根据 EST AI838293 的序列设计特异性引物（引物位置见图 1）。按 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 介绍的方法进行 5' 端快速扩增。具体方法如下：a. cDNA 第一链的合成。样品 RNA 1 μg ，5' CDS 引物 1 μl ，SMART II A Oligo 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' 末端快速扩增法扩增 cDNA 全长。利用特异性扩增引物 G8 和通用引物混合物（Universal Primer A Mix, UPM）进行扩增。PCR 扩增的具体反应体系如下：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 G8（10 $\mu\text{mol/L}$ ）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 。PCR 扩增条件为：94℃ 20 s，72℃ 4 min，5 个循环；94℃ 20 s，70℃ 30 s，72℃ 4 min，5 个循环；94℃ 30 s，65℃ 10s，72℃ 4 min，35 个循环；最后 72℃ 延伸 7 min。所用引物的序列：引物 G8 为 5' CAGGTGAGCTAGGCTGTACTTTC 3'；通用引物混合物（UPM），长链引物为 5' CTAATACG-ACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT 3'（0.4 $\mu\text{mol/L}$ ），短链引物为 5' CTAATA-CGACTCACTATAGGGC 3'（2 $\mu\text{mol/L}$ ）。

利用胶回收试剂盒回收扩增产物中的长约 1.7 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-G8 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 对插入片段两端先进行测序，再根据测序结果设计引物进行进一步的测序，直到两端相重叠。

```

TTTTTTTTTTTTTTTTTGCAGGGCTGAGTCTTTATTGAAACCTGCATTGGTGTGAGCAGGGAGGCCCCCAGGTGAGCTAGGCT
GTACTTTCATTTCACAATGGATATTTTTTCCCCCAAACCTCTTTGTAACCTAAGAGGCTTATTGTCAACATACCTTCTAC
ATTCTAGCTACTTTCCAAGCCTGGCATCCCATCAGTATCTATGGATGCAATTTCAITTCATTTTCAGTTAGCAGTAAAAAGAAC
CTTGAACCGGGAAGTGGTGGTGCAAACTCTCTGCTCTCAAATGTTGGGGGCAAGCAGATA

```

Fig. 1 Sequence of EST AI838293 and the primerG8 Sequence with shadow represent primer G8

1.5 半定量 RT-PCR 分析

根据 GenBank 数据库中的 AL023001 序列，设计特异性引物 G815、G813。其序列分别是：G815 为 5' GTTCGCTCAGTTCAGGCCGAATG 3'；G813 为 5' CAGGGAGCAAACCTGCAAGCACAC 3'。利用 TaKaRa 公司提供的 RT PCR 试剂盒 RNA LA PCRTM Kit 进行 RT-PCR 扩增。具体条件如下：逆转录反应体系为 MgCl₂ 5mmol/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 扩增体系为：逆转录产物 5 μl ，MgCl₂ 2.5 mmol/L，10 × PCR 扩增缓冲液 2 μl ，引物 G815、813 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℃ 20 s，60℃ 10 s，72℃ 2.5 min，连续进行 25 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' TGATCCACATCTGCT-GGA 3'。 β -肌动蛋白基因预期扩增片段长度为 362 bp。引物 G815/G813 扩增的靶 cDNA 片段预期长度为 2 142 bp。

2 结 果

2.1 EST AI838293 表达的基因芯片检测结果

在利用基因芯片 GM-U74A 对正常对照组、糖尿病肾病组、以及大黄酸治疗组的肾脏基因表达谱研究中，我们从 12 473 个基因（或 EST）中发现了 195 个糖尿病肾病差异表达基因（指通过比较糖尿病肾病组与正常对照组发现的变化倍数大于 2 倍的差异表达基因）和 77 个大黄酸效应差异表达基因（指通过比较大黄酸治疗组与糖尿病肾病组发现的变化倍数大于 2 倍的差异表达基因）。在上述差异表达基因中，芯片 ID 号为 96781_at（GenBank 号为 AI838293）的 EST 在糖尿病肾病组

的表达水平明显下调（与正常对照组相比下调了 60%），而在大黄酸治疗组的表达水平又恢复到接近正常水平。其表达水平变化与 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^[6,10,11]）。根据 GenBank 中提供的序列信息说明，EST AI838293 带有 poly（T）结构，位于 cDNA 的 3'端。为此，我们设计引物，利用 5'-RACE 的方法进行了 cDNA 克隆。

2.2 末端扩增法扩增靶 cDNA 结果

图 2 所示的是利用特异性引物 G8 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，扩增产物在约 1.7 kb 处有一明显的扩增条带。

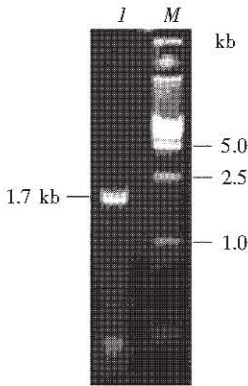


Fig. 2 Result of amplification of target cDNA
I: RACE product; M: DNA molecular mass marker.

2.3 靶 cDNA 的克隆和酶切分析

利用胶回收试剂盒，回收上述扩增产物中的约 1.7 kb cDNA 片段，克隆到克隆载体 pUCm-T 上。

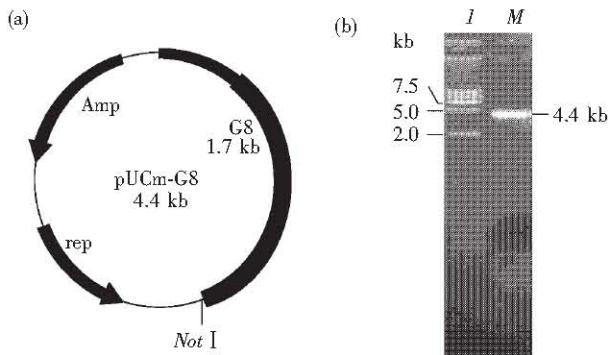


Fig. 3 Structure of pUCm-G8 and result of endonuclease analysis of recombinant
I: Sample; M: DNA molecular mass marker.

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 *Not* I 进行单酶切时，电泳显示出约 4.4 kb 的单一一条带，其大小与预期重组子 pUCm-G8 的大小一致。说明我们已成功地将扩增片段克隆到了载体 pUCm-T 上。

2.4 对克隆片段的测序结果

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）：阴影所示的是来自 EST AI838293 的序列。带阴影的这一 EST AI838293 序列的存在证明：我们克隆到的 cDNA 片段正是 EST AI838293 所对应的 cDNA。

2.5 对克隆 cDNA 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：我们所克隆的 cDNA 与小鼠表达序列 AL023001（GenBank 号为 XM_358764.1, 3 595 bp）的 1 767 ~ 3 544 间的序列几乎完全相同（差异仅在于个别碱基，图 4）。说明它们对应的极可能是同一基因。

2.6 半定量 RT-PCR 结果

在上述工作的基础上，根据 GenBank 数据库中的 AL023001 序列，设计了引物 815/813，利用半定量 RT-PCR 的方法，对 AL023001 在糖尿病肾病小鼠肾脏等处的表达情况进行了分析。图 5a 所示的是 AL023001 在肾脏中表达的半定量 RT-PCR 分析结果。与正常对照组相比，AL023001 在 db/db 糖尿病肾病组肾脏中的表达水平（以 β -actin 为内参照）明显下调，而大黄酸治疗组的表达水平与正常对照组相当。这一结果与芯片关于 EST AI838293 的检测结果吻合。这进一步说明 AL023001 表达水平与小鼠糖尿病肾病具有相关性。

图 5b 所示的是 AL023001 在小鼠肝脏、骨骼肌、脑以及脂肪组织中表达情况的半定量 RT-PCR 分析结果。从图 5b 可以看出，AL023001 在正常小鼠的肝脏、骨骼肌、脑、脂肪组织中均有表达，与正常对照小鼠相比，靶基因 mRNA 表达水平在肝脏、骨骼肌和脑中均有不同程度的下调，而在脂肪组织中却有明显的上调。

AAGAAGTTCATTGATCCTATTTATCAGATTGGGAAGATGGGAGTGCTGAAGAGCTTCAGGAGTTTAAGAAATCTACTAAAA
AAGAAGTTCATTGATCCTATTTATCAGATTGGGAAGATGGGAGTGCTGAAGAGCTTCAGGAGTTTAAGAAATCTACTAAAA
AGGAGGTAGTGAGGATGAAGATGATGACTTTTGAAGGCGAGGTGCCCCAGAGTGACACAGTGACTGGCCTTACTCCGA
AGGAGGTAGTGAGGATGAAGATGATGACTTTTGAAGGCGAGGTGCCCCAGAGTGACACAGTGACTGGCCTTACTCCGA
GCTCCTTTGATACCCACTTCCAAGTCCTTCCAGTAGTGTGGGCTCCCCCTCTTTGCTGTATACACCAGGCCAGTCTCCACTC
GCTCCTTTGATACCCACTTCCAAGTCCTTCCAGTAGTGTGGGCTCCCCCTCTTTGCTGTATATACACCAGGCCAGTCTCCACTC
CTCACAAGGATCTATGATTGAGCTGCGCAATCTTCCAGGGCCCTGTGACCCTGTGTTCACCCCGACCCCACTGGACT
CTCACAAGGATCTATGATTGAGCTGCGCAATCTTCCAGGGCCCTGTGACCCTGTGTTCACCCCGACCCCACTGGACT
AGTCTATGCCTCATGTGTCCAGCTTCCATGTTGGACTTCGACCAGCATCTGAAGGGAACCAGGTTGTGTGTGCTTGCACTT
AGTCTATGCCTCATGTGTCCAGCTTCCATGTTGGACTTCGACCAGCATCTGAAGGGAACCAGGTTGTGTGTGCTTGCACTT
GCTCCCTGTTGACATAGGAAAACTGAGTGTCTATAGGCAGTATTTACAGTGACATTTACAGTATTTACAGTCTTGCTT
GCTCCCTGTTGACATAGGAAAACTGAGTGTCTATAGGCAGTATTTACAGTGACATTTACAGTATTTACAGTCTTGCTT
GTGGCCTGCTGGCTGCATGCTGTATCAGCCACAACCTGGCAAGTGGCCTTCTGACAGGTTTCTTTTATTAGAACCACAGTTT
GTGGCCTGCTGGCTGCATGCTGTATCAGCCACAACCTGGCAAGTGGCCTTCTGACAGGTTTCTTTTATTAGAACCACAGTTT
TGACTTTGTTTTGGTAAGCTGTCTCCAGGATCAGCACTGCCTGTGAATACTTTGAAGTGTCTCCTGTTACAGGGGTGAAT
TGACTTTGTTTTGGTAAGCTGTCTCCAGGATCAGCACTGCCTGTGAATACTTTGAAGTGTCTCCTGTTACAGGGGTGAAT
GGTTTCCTTTGACTAGAAGTCTATTTGTGTGTGGGGTGCGTGGGGAGAGCCAAGCAGGCCAAAGCTGAACATTTGGGCTTC
GGTTTCCTTTGACTAGAAGTCTATTTGTGTGTGGGGTGCGTGGGGAGAGCCAAGCAGGCCAAAGCTGAACATTTGGGCTTC
ACTGAGGGACACCAAGGGCTGCAGAGGAGTCAGGCCGGAAGAGAGGAGTCGGAGAAGCACACAAGGTCCTTGTGCAGGA
ACTGAGGGACACCAAGGGCTGCAGAGGAGTCAGGCCGGAAGAGAGGAGTCGGAGAAGCACACAAGGTCCTTGTGCAGGA
GTCCCCAGAGACCTAGCTGCAGCTCAGGCCGACTGAAGCAGGCCTGGGGGTCTGTGAGCATTCCACAGCCTGCACAACA
GTCCCCAGAGACCTAGCTGCAGCTCAGGCCGACTGAAGCAGGCCTGGGGGTCTGTGAGCATTCCACAGCCTGCACAACA
CGGACTCAGCCAGGAGAGCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTTCTTGAGACAGGGTTTCTCTGTTAGCTCTGGCTGTAG
CGGACTCAGCCAGGAGAGCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTTTCTTGAGACAGGGTTTCTCTGTTAGCTCTGGCTGTAG
ACCAGCTGGCCTCAAACTCAGAAATCCGCTGTCTCTGCTCCCGAGCACTGGGATTAAAGGTGTGCACCACTGCTGTG
ACCAGCTGGCCTCAAACTCAGAAATCCGCTGTCTCTGCTCCCGAGCACTGGGATTAAAGGTGTGCACCACTGCTGTG
GCTCAGGAAAGCTTTTTTACACTGAACAGCCAGCCTTGCTCTGTAGCAGGTGTGCTCGAGGACTGTGGACGTTGACTTCC
GCTCAGGAAAGCTTTTTTACACTGAACAGCCAGCCTTGCTCTGTAGCAGGTGTGCTCGAGGACTGTGGACGTTGACTTCC
CTTGGATCCTTACATGTAACTTGCGTGTTGTGAAAAATGCCCTTTAAGTATATTTAATTTTTGCCACATATTTATTTAAAGG
CTTGGATCCTTACATGTAACTTGCGTGTTGTGAAAAATGCCCTTTAAGTATATTTAATTTTTGCCACATATTTATTTAAAGG
CGAGCAATATTTCTTGGTCACAATATTTTATAGTGAATTCCTCTCAAGGTTTTTATACTCCTGTGTAATAAGACTGATGCAG
CGAGCAATATTTCTTGGTCACAATATTTTATAGTGAATTCCTCTCAAGGTTTTTATACTCCTGTGTAATAAGACTGATGCAG
AGCCCTGAATTTTATCTGTCTATGAATACCTTTTTGAACAAAGAAAATTTATTGATTTAAAAAGCTTTTATATGAGACAGAC
AGCCCTGAATTTTATCTGTCTATGAATACCTTTTTGAACAAAGAAAATTTATTGATTTAAAAAGCTTTTATATGAGACAGAC
AAGTCCCTGAGTTCAGGCCAGCCTTGGTGGCAAGTCACTAGGAACTTCAAGGTCTGTCTCATCTTTATTTTACTGTGTGC
AAGTCCCTGAGTTCAGGCCAGCCTTGGTGGCAAGTCACTAGGAACTTCAAGGTCTGTCTCATCTTTATTTTACTGTGTGC
CCCTGGCTGTCTGGAAATCACTATATGCTCAGGCTGGCTTCGGACTCAGAGATCTATCTGCTTGCTCCCAACATTTGAGAG
CCCTGGCTGTCTGGAAATCACTATATGCTCAGGCTGGCTTCGGACTCAGAGATCTATCTGCTTGCTCCCAACATTTGAGAG
CAGAGAGTTTGACCACTTCCCGGTTCAAGGTTCTTTAACTGCTAACTGAAAATGGAATGAAATGTCATCCATAGATAC
CAGAGAGTTTGACCACTTCCCGGTTCAAGGTTCTTTAACTGCTAACTGAAAATGGAATGAAATGTCATCCATAGATAC
TGATGGGATGCCAGGCTTGGAAAGTAGCTAGAATGTAGAAGGTATGTTGACAAATAAGCCTCTTAGGTTACAAAGGAGTTTG
TGATGGGATGCCAGGCTTGGAAAGTAGCTAGAATGTAGAAGGTATGTTGACAAATAAGCCTCTTAGGTTACAAAGGAGTTTG
GGGGGAAAAAATATCCATTGTGAAAATGAAAGTACAGCCTAGCTCACCTG
GGGGGAAAAAATATCCATTGTGAAAATGAAAGTACAGCCTAGCTCACCTG

Fig. 4 Sequence of cDNA cloned while compared with AL023001

Sequence underlined represents cDNA cloned, while sequence without underline represent AL023001. Sequence shadowed is identical to that of EST AI838293, Sequence framed represents difference between cloned cDNA and AL023001.

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^[5]。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 96781_at (GenBank 号为 AI838293)的 EST 表达水平,与 db/db 小鼠的糖尿病肾病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'末端快速扩增法(5'RACE)对其进行了 cDNA 全长克隆,成功地克隆到了一长为 1.7 kb 的 cDNA。全长测序分析表明,我们所克隆到的 cDNA 序列与小鼠表达序列 AL023001 (GenBank 号为 XM_358764.1)仅存在个别碱基的差异,考虑到 PCR 扩增和测序过程中都可能存在细小的错误,靶基因本身亦可能存在多态性,我们判断所克隆的 cDNA 很可能是小鼠表达序列 AL023001 的一部分。

为了验证上述判断以及基因芯片的检测结果,我们又用半定量 RT-PCR 的方法,对 AL023001 在正常对照小鼠和 db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达情况进行了进一步的分析,同时对所扩增的 2.1 kb 扩增片段进行了克隆和测序分析,结果与基因芯片的检测结果一致。从而进一步证明了 AL023001 与小鼠糖尿病肾病的相关性。

小鼠表达序列 AL023001 是新近才提交到 GenBank 数据库中的新序列(参见 GenBank accession No. 为 XM_358764),根据相关软件预测,它编码的蛋白质由 656 个氨基酸残基组成。至今未见其功能方面的研究报道。以其可能编码的蛋白质进行的同源性比对分析发现,其可能编码的蛋白质与人 RRN3 具有很高的同源性,目前有关人 RRN3 (hRRN3)的功能仍不是很清楚,有文献报

道^[12],hRRN3 是 RNA 聚合酶 I 的一个重要转录起始因子,在转录因子 SL1 介导的核糖体 RNA 转录起始过程中是必不可少的。在上述研究中,我们首次发现,小鼠表达序列 AL023001 不仅在糖尿病肾病小鼠肾脏中的表达情况与 db/db 小鼠糖尿病肾病的病理进程表现出明显的相关性,而且在其他一些糖尿病肾病相关联组织(肝脏组织、脂肪组织、骨骼肌组织等)均显示有明显的差异性的表达。AL023001 的具体功能是什么?是否仅是 RNA 聚合酶 I 的一个转录起始因子那么简单?它在小鼠糖尿病肾病的发生、发展过程中究竟有什么样的作用?这些问题将是我们下一步研究的重点。AL023001 cDNA 的成功克隆(我们所克隆的 2 kb AL023001 cDNA 片段包含了从起始密码子到终止密码子的序列)为我们下一步开展 AL023001 体外表达等工作创造了条件。

参 考 文 献

- 1 Merta M, Reiterova J, Rysara R, *et al.* Genetics of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, **18** (suppl 5): v24 ~ 25
- 2 Harvey J N. Trends in the prevalence of diabetic nephropathy in type 1 and type 2 diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, **12** (3): 317 ~ 322
- 3 Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson D J. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney Int*, 2004, **65** (1): 116 ~ 128
- 4 Allen T J, Cooper Me, Lan H Y. Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy. *Curr Atheroscler Rep*, 2004, **6** (3): 197 ~ 202
- 5 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
Liu Z H, Zheng J M, Wu Y C, *et al.* *Chin J Nephrol Dial Transplant*, 2002, **11** (3): 201 ~ 205
- 6 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 Nephrol Dial Transplant*, 2002, **11** (1): 3 ~ 10
- 7 Wurbach E, Yuen T, Ebersole B J, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone receptor-coupled gene network organization. *J Biol Chem*, 2001, **276** (50): 47195 ~ 47201
- 8 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**: 9127 ~ 9132
- 9 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
- 10 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 Endocrinology 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

- 12 Miller G, Kostya I P, Friedrich J K, *et al.* hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA polymerase I to rRNA gene promoters, *EMBO J*, 2001, **20** (6): 1373 ~1382

Differential Expression of AL023001 in db/db Diabetic Nephropathy Mice*

ZHENG Jing-Min, LIU Zhi-Hong**, ZHANG Xin, CHEN Shan, 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. A 1.7 kb cDNA 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 part of mouse expression sequence AL023001, which function is unknown. To further investigate the relationship between AL023001 and diabetic nephropathy, the function of AL023001, expression levels of AL023001 were analyzed quantitatively using RT-PCR method. Result of RT-PCR shows that AL023001 is expressed differentially in liver, muscle, brain and fat, while the expression pattern of AL023001 in kidney is just like that revealed by gene chip. These results suggest that AL023001 is related to mice diabetic nephropathy, though its function and possible role played in the development of mice diabetic nephropathy still to be investigated.

Key words gene expression profile, diabetic nephropathy, AL023001, 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: March 29, 2004 Accepted: May 30, 2004