



糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中能量代谢相关基因的表达及其意义

心血管病变是糖尿病患者主要死亡原因之一,过去认为糖尿病血管病变引起的心脏病主要指冠状动脉粥样硬化性心脏病,近来研究发现冠状动脉没有显著粥样硬化的糖尿病患者也存在一种特异性心肌病,称为糖尿病性心肌病[1],并认为其病理基础是心肌内微血管病变。我们运用基因芯片技术比较正常大鼠和糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中基因表达的差异,以探讨糖尿病性心肌病的发病机制。

1 材料与amp;方法

1.1 糖尿病性心肌病动物模型制作

雄性SD大鼠12只,体质量220~260 g,随机分为两组。实验组动物在空腹12 h后按60 mg/kg·b. w.腹腔注入链脲佐菌素(streptozotocin, STZ);对照组动物注射相同体积pH 4.0的0.1 mol/L枸橼酸缓冲液。实验期间自由饮水。每天注射1次,连续注射10周。注射48 h后检测血糖浓度,5周后血糖浓度持续大于16.6 mmol/L,表明已建立糖尿病模型。10周后将糖尿病大鼠处死,取部分心肌组织做电镜检查,发现线粒体变性,肌纤维收缩带形成,表明成功建立糖尿病性心肌病动物模型[2]。

1.2 探针制备

应用Chomczynski等[3]提出的一步法并加以修改,抽提心肌组织总RNA。用Oligotex mRNA Midi Kit (Qiagen公司)纯化mRNA。参照Schena[4]的方法反转录标记cDNA探针并纯化。用Cy3-dUTP(上海博星基因芯片有限公司)标记正常组织mRNA, Cy5-dUTP(上海博星基因芯片有限公司)标记病变组织mRNA,乙醇沉淀后溶解在20 μl 5×SSC+0.2%SDS杂交液中。

1.3 杂交及洗涤

将基因芯片(上海博星基因芯片有限公司)和杂交探针分别在95 °C水浴中变性5 min,探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于60 °C杂交15~17 h;揭开盖玻片,分别用2×SSC+ 0.2%SDS、0.1%SSC+0.2%SDS、0.1%SSC洗涤10 min,室温晾干。

1.4 检测与分析

应用General Scanning公司的ScanArray 5000扫描芯片,ImaGene3.0软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值。用40个管家基因进行Cy3和Cy5的均衡[5]。下面两个条件为判定基因差异表达的标准:(1) Cy3和Cy5信号比值的自然对数的绝对值>0.69(基因的表达变化在2倍以上);(2) Cy3和Cy5信号值之一必须大于1 000。

2 结果

在芯片上总共有4 000个cDNA。为了监控芯片制备和杂交的整个过程,设定阴性对照[HCV外壳蛋白基因

(8个点)]、空白点样液(30个点), 经验证这些点的杂交信号很低, 从一方面可证明本实验数据的可靠性。

本研究结果表明, 部分与能量代谢有关的基因(如磷酸果糖激酶-1、苹果酸脱氢酶、泛素、谷草转氨酶)的表达水平在糖尿病性心肌病大鼠组显著下调(表1)。

表 1 糖尿病性心肌病大鼠中差异表达的部分基因

Tab.1 Some differentially expressed genes in diabetic cardiomyopathy rats

Accession	Identity	Ratio (Cy5/Cy3)
m0021f07	Ubiquitin-activating enzyme E1	0.257
m0074a08	Mus musculus phosphofructokinase-1A mRNA	0.393
m0023f06	Mouse mitochondrial malate dehydrogenase mRNA	0.396
m0084h04	Glutamate oxaloacetate transaminase 1	0.485

3 讨论

基因芯片是将大量的靶基因片段有序、高密度地固定在玻璃、硅等载体上的一项技术, 将待测样品用荧光染料标记制备成探针与芯片杂交, 杂交信号用激光扫描仪检测, 计算机分析检测结果, 可获得类似于传统的点杂交的分子杂交数据, 比较各组织间靶基因表达谱的差异, 以达到快速、高效、高通量及平行性地分析生物信息的目的。

基因表达谱芯片是目前应用最广泛的基因芯片, 它能对来源于不同个体、组织、细胞周期、发育阶段、分化阶段、生理病理状态、刺激(包括不同诱导、不同治疗手段)条件下的组织细胞内基因表达情况进行对比分析, 从而对基因群在个体特异性、组织特异性、分化特异性、疾病特异性、刺激特异性等方面的变化特征和规律进行描述, 进一步阐明基因的相互协同、抑制、互为因果等关系, 有助于理解基因及其编码的蛋白质的生物学功能, 并从已知生物学功能的基因推论未报道基因的生物学意义, 同时还可在基因水平上解释疾病的发病机制, 为疾病的诊断及基因治疗提供有效手段。

目前糖尿病性心肌病的发病机制尚未完全阐明, 运用基因芯片技术我们发现能量代谢相关基因的表达水平在糖尿病性心肌病时显著下调, 提示能量代谢障碍在糖尿病性心肌病发病机制中起重要作用。

糖酵解途径是体内葡萄糖氧化供能的主要途径, 磷酸果糖激酶-1是糖酵解途径的限速酶; 三羧酸循环是糖、脂肪、蛋白质分解的最后共同通路, 通过三羧酸循环和氧化磷酸化使营养物质中蕴藏的能量释放出来, 苹果酸脱氢酶是三羧酸循环中的重要酶; 真核细胞中蛋白质降解有两条途径: 一是不依赖ATP的过程, 另一个是依赖ATP和泛素的过程。

泛素是一种相对分子质量为85 000的小分子蛋白质, 它通过三步反应与被降解的蛋白质形成共价连接, 使蛋白质降解形成氨基酸, 氨基酸再通过谷草转氨酶作用形成 α 酮酸, α 酮酸可通过三羧酸循环氧化供能。

糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中磷酸果糖激酶-1、苹果酸脱氢酶、泛素和谷草转氨酶基因表达下降, 使糖酵解途径、三羧酸循环、蛋白质分解氧化供能途径发生障碍, 加上病变心肌中线粒体变性, 氧化磷酸化障碍, 导致心肌能源供应不足, 心脏收缩功能下降。

(责任编辑: 黄开颜)

参考文献:

[1] Hamby RI, Zoneraim S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy[J]. JAMA, 1974, 229: 1749-56.

[2] Thompson EW. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment[J]. Am J Anat, 1988, 182(3): 270-82.

[3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-9.

[4] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis:Microarray-based expression monitoring of 1000 genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20): 10614-9.

[5] Schena M, Shalon D, Dais RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 467-70.

参考文献:

[1] Hamby RI, Zoneraim S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy[J]. JAMA, 1974, 229: 1749-56.

[2] Thompson EW. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment[J]. Am J Anat, 1988, 182(3): 270-82.

[3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156-9.

[4] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis:Microarray-based expression monitoring of 1000 genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(20): 10614-9.

[5] Schena M, Shalon D, Dais RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 467-70.