

大鼠肠上皮细胞缺血缺氧损伤后基因表达谱变化的实验研究

贾震易, 秦环龙

贾震易, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院普通外科
上海市 200233

贾震易, 男, 1975-07-14 生, 上海市人, 汉族, 2005 年上海第二医科大学硕士毕业, 住院医师, 主要从事胃肠外科疾病研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271286

上海市科委青年科技启明星跟踪计划资助项目, No. 02QMB1406

通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民医院普通外科, sshosp@public.sta.net.cn

电话: 021-64942226 传真: 021-64368920

收稿日期: 2005-03-22 接受日期: 2005-04-20

Change of gene expression in intestinal epithelial cells under ischemia and anoxia in rats

Zhen-Yi Jia, Huan-Long Qin

Zhen-Yi Jia, Huan-Long Qin, Department of General Surgery, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271286, and Shanghai Science and Technology committee Foundation, No. 02QMB1406

Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of General Surgery, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. sshosp@public.sta.net.cn

Received: 2005-03-22 Accepted: 2005-04-20

Abstract

AIM: To investigate the change of gene expression in intestinal epithelial cells (IECs) under ischemia and anoxia in rats and to search for the correlated genes with IECs injury.

METHODS: IECs injury model was induced by ischemia and anoxia, and the cells were divided into four groups: control group, ischemia group, anoxia group and ischemia and anoxia (I/A) group. Fluorescence reverse transcription was used to label mRNA. The cDNA microarray was used to detect the difference between gene expression of control group and experiment groups.

RESULTS: There were 207 genes differently expressed between control and ischemia group, of which 132 were down-regulated while 75 were up-regulated. One hundred and sixty-eight genes were differently expressed between control and anoxia group, of which 84 were down-regulated while 84 were up-regulated. Between control and I/A group, 321 genes were differently expressed, of which 97 were down-regulated while 224 were up-regulated.

CONCLUSION: cDNA microarray can be used to screen diversified gene expression related to injury under ischemia and anoxia, which brings some new clues for studying the mechanism of IECs injury.

Key Words: cDNA microarray; Ischemia; Anoxia; Intestinal epithelial cells; Rats

Jia ZY, Qin HL. Change of gene expression in intestinal epithelial cells under ischemia and anoxia in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(11):1263-1266

摘要

目的: 研究大鼠肠上皮细胞(IEC)缺血缺氧后基因表达谱的改变, 寻找与 IEC 损伤相关的基因。

方法: 建立缺血缺氧大鼠 IEC 的实验模型, 实验分为对照组、缺血组、缺氧组和缺血缺氧组。荧光逆转录标记 mRNA, 采用大鼠基因表达谱芯片检测正常 IEC 与缺血组、缺氧组及缺血缺氧组 IEC 基因表达谱, 并对比分析检测结果。

结果: 与正常 IEC 相比, 缺血组基因表达有差异的共 207 组, 其中 132 组下调, 75 组上调; 缺氧组基因表达有差异的共 168 组, 其中 84 组下调, 84 组上调; 缺血缺氧组基因表达有差异的共 321 组, 其中 97 组下调, 224 组上调。

结论: 应用基因芯片技术筛选了与 IEC 缺血缺氧损伤密切相关的差异表达基因, 为阐明这方面的机制提供了新的线索。

关键词: 基因芯片; 缺血; 缺氧; 肠上皮细胞; 大鼠

贾震易, 秦环龙. 大鼠肠上皮细胞缺血缺氧损伤后基因表达谱变化的实验研究. *世界华人消化杂志* 2005;13(11):1263-1266
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1263.asp>

0 引言

研究表明, 缺血缺氧可引起肠上皮细胞脱落凋亡, 导致肠屏障功能障碍。但目前关于这一病理变化的分子机制尚不清楚。我们通过基因芯片技术来观察 IEC 缺血缺氧后基因表达谱的改变, 并筛选出一些与 IEC 损伤有密切关系的基因, 为阐明这方面的机制提供一些线索。

1 材料和方法

1.1 材料 孕14-18 d的SD大鼠6只,由上海实验动物中心提供,清洁级,质量300-390 g. DMEM培养液、胰蛋白酶和胶原酶XI型购自GIBCO公司. 胎牛血清购自HyClone公司. 表皮生长因子购自SIGMA公司. Dispase酶购自宝灵曼公司. Matrigel人工基底膜液购自品美生物有限公司. 厌氧气体产生剂购自三菱瓦司化学株式会社. Unizol RNA抽提试剂盒和探针标记杂交试剂盒来自上海博星基因芯片有限公司. Nucleotrap mRNA Midi Purification Kits来自Clontech公司. 消化酶液:1.25 g/L胰蛋白酶、300 mg/L胶原酶XI型、600 mg/L Dispase酶即配即用. 缓冲液:50 mL/L胎牛血清、20 g/L山梨醇,调pH值至7.4,分装,4°C保存. 培养液:100 mL/L胎牛血清、20 μg/L表皮生长因子、1 mmol/L谷氨酰胺、2.5 mg/L胰岛素、1 mmol/L丙酮酸钠、100 mL/L肝素、100 mg/L青霉素、50 mg/L链霉素,调pH值至7.2,分装,4°C保存.

1.2 方法 培养瓶于实验前滴加Matrigel人工基底膜液100 μL后,置于培养箱中,培养皿晾干后备用. SD孕鼠,剖宫取胎鼠及小肠,纵行剪开肠管,剪成1 mm小块,加入消化酶液50 mL,室温下消化20 min,吸取上层液离心,最后将沉淀悬浮于培养液中,种植在已涂膜的培养瓶中,在37°C,50 mL/L CO₂ 孵箱内培养. 2 d后首次换液,弃去含有非贴壁细胞的上清液,贴壁细胞用PBS彻底冲洗,每3 d换以新鲜培养液. IEC鉴定:弃去培养液后,用Hanks液洗细胞3次,用-20°C的冷丙酮固定,放入酶反应基质液,孵育30 min,加入碱性磷酸酶(AKP)试剂,孵育45 min,弃去AKP和酶反应基质液,三蒸水洗3次,苏木精孵育30 min后弃去,三蒸水洗3次,甘油封片后,倒置光学显微镜观察,红色反应表示阳性. 模拟缺氧:细胞样品放入特制的密封仓系统(三菱瓦司化学株式会社),配有与其体积相应量的厌氧气体产生剂及指示剂,厌氧气体产生剂在20 min内即可置换密封仓内氧气并释放出相同体积的二氧化碳,厌氧气体指示剂颜色由粉红变成白色即证实缺氧达到要求(O₂浓度

<1 mL/L). 模拟缺血:把正常的培养液换成同体积的无糖含钙的缓冲液PBS液(配方:117 mmol/L氯化钠、5.3 mmol/L氯化钾、1.8 mmol/L氯化钙、0.8 mmol/L硫酸镁、26 mmol/L碳酸氢钠、1 mmol/L磷酸二氢钠、0.1 mmol/L酚红),置于培养箱中. 模拟缺血缺氧:同时达到缺血和缺氧的要求. 所有实验组在IEC培养7 d采样,经缺血/缺氧2 h后分成以下各组:对照组、缺氧组、缺血组、缺血缺氧组. 取对照组与实验组的IEC,通过Unizol RNA抽提液抽提总RNA,使用“Nucleotrap mRNA Midi Purification Kits”纯化mRNA,用探针标记杂交试剂盒,将对照组与实验组IEC的mRNA分别用Cy3和Cy5逆转录标记,与Mouse40S基因表达谱芯片杂交(上海博星基因芯片有限公司),双色荧光信号扫描后得到双色荧光标记叠加图,图像中每一点代表一条基因,如果Cy3信号较强,该点显绿色(下调趋势),如果Cy5信号较强,该点显红色(上调趋势),如果信号强度相似,该点即呈黄色. 以X、Y轴分别代表Cy3和Cy5的荧光强度,则得到杂交信号强度散点图,图像中每一点代表芯片上一个基因点的杂交信号,红色代表Y值和X值的比值在0.5-2.0,基本属非差异表达,黄色则代表Y值和X值的比值在0.5-2.0范围之外,属差异表达.

2 结果

各组样品总RNA得率为159.0-192.0 μg/g, A₂₆₀/A₂₈₀值1.811-1.908,70°C保温结果合格,电泳结果证实已抽提到高纯度的总RNA(图1). 将实验组和对照组细胞中的基因表达谱芯片扫描结果通过计算机进行量化,获得每个基因的荧光强度值. 将实验组/对照组(Cy5/Cy3)比值>2者判定为表达上调,比值<0.5者判定为表达下调. 结果缺血/正常组(A组)表达有差异基因共207组,其中132组下调,75组上调. 缺氧/正常组(B组)表达有差异基因共168组,其中84组下调,84组上调. 缺血缺氧/正常组(C组)表达有差异基因共321组,其中97组下调,224组上调. 各组间发生共同差异表达的基因数如下:A与B有21组,A与C有56

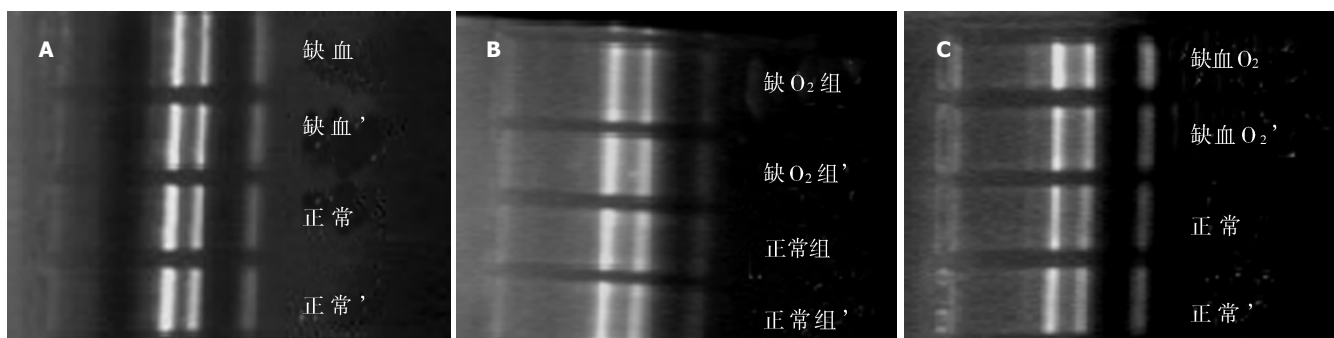


图1 RNA电泳图. A: 缺血/正常组; B: 缺氧/正常组; C: 缺血缺氧/正常组

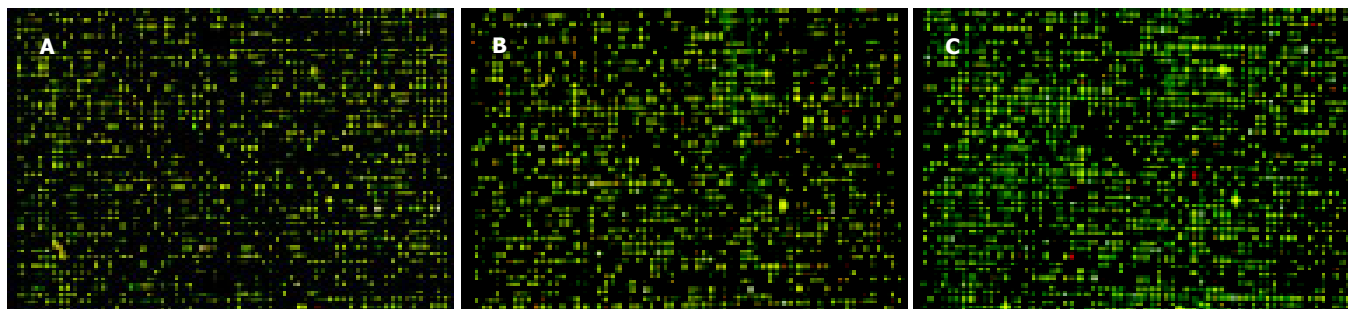


图2 双色荧光标记叠加图. A: 缺血/正常组; B: 缺氧/正常组; C: 缺血缺氧/正常组.

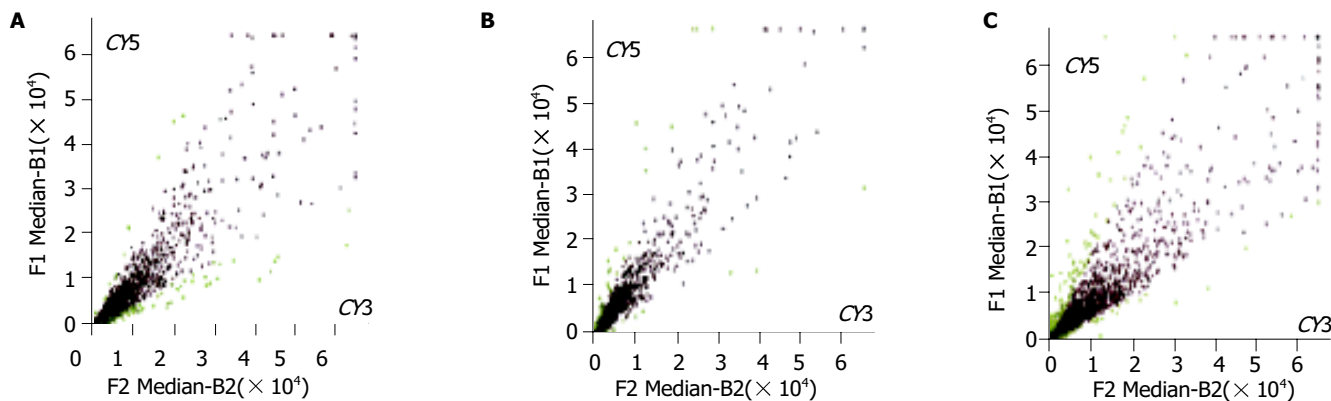


图3 杂交信号强度散点图. A: 缺血/正常组; B: 缺氧/正常组; C: 缺血缺氧/正常组.

组, B与C有22组, A与B与C有11组. 双色荧光标记叠加图及杂交信号强度散点图如图2, 3所示. 表1列出部分表达差异的基因.

3 讨论

基因芯片(gene chip), 也称基因微矩阵(microarray), 是在玻璃、硅等载体上有序地、高密度地(目前点与点之间的距离小于500 μm)排列, 以固定大量的靶基因片段(也称分子探针). 样品核酸分子经过标记, 与固定在载体上的DNA阵列中的点同时进行杂交, 杂交信息通过计算机进行集约化和平行处理, 这就是基因芯片技术. 这一技术能以大规模、高通量方式同时研

究成千上万个基因在某种生理和病理条件下的表达变化, 其获得信息量及效率是传统生物学技术无法比拟的^[1]. 我们应用此技术于IEC缺血缺氧损伤的分子机制研究, 采用含有4096个点阵的高密度芯片, 研究正常大鼠IEC与缺血缺氧损伤后基因表达的差异, 结果显示损伤后2 h即有一部分基因发生了差异表达, 不同的刺激条件下差异基因数量有所不同, 由多到少依次为缺血缺氧组、缺血组、缺氧组. 这些基因主要属于细胞信号和传递蛋白类、凋亡相关蛋白类、DNA结合、转录和转录因子类、细胞表面抗原和黏附蛋白类、离子通道和运输蛋白类、代谢类及一些未知功能类基因^[2]. 同时我们发现不同的实验组发生差异表

表1 部分表达差异的基因

Genbank_ID	Definition	Ratio A	Ratio B	Ratio C
NM_058213	ATPase Ca ²⁺ -transporting	0.231	0.265	0.487
U30789	N27	4.613	5.460	6.069
M64300	ERK2	0.786	0.488	0.429
U42627	dual-specificity protein tyrosine phosphatase(rVH6)	0.257	0.295	0.074
XM_215801	actin	0.394	2.147	4.215
XM_219470	tubulin	0.408	3.849	2.640
XM_213626	cell adhesion molecule nectin-3α	0.499	0.525	0.380
XM_232252	Bcl-2	0.588	0.497	0.424
L01624	Serum and glucocorticoid-regulated kinase(SGK)	0.238	0.213	0.205

A: 缺血/正常组; B: 缺氧/正常组; C: 缺血缺氧/正常组.

达的基因既有联系,也有所区别.其联系表现为各组间均有相同的基因发生差异表达,而区别则体现在不同的实验组有不同的基因发生差异表达以及相同的差异表达基因存在表达方式和表达量的不同.这就提示不同的刺激条件下细胞损伤的发生存在着共同的机制,而彼此间基因表达的不同可能导致了细胞损伤程度的差异.

我们发现细胞内一些抗凋亡基因发生了变化,如抗凋亡蛋白 Bcl-2、抗凋亡细胞通路蛋白 ERK2、血清/糖皮质激素调节激酶(SGK)及双特异性蛋白磷酸酶(rVH6)均较正常细胞表达减少^[3-5].其中前二者在缺血缺氧组、缺氧组属差异表达,而SGK和rVH6在三组芯片中均呈差异表达.下调程度由大到小依次是缺血缺氧组、缺氧组、缺血组,这一排列顺序与我们先前研究显示的IEC凋亡率由高到低的排列序相对应^[6].由此看来,某些抗凋亡因素的减弱及其减弱程度与缺血缺氧后IEC凋亡密切相关.细胞骨架与凋亡关系密切,大量研究表明凋亡时多种细胞骨架蛋白发生了改变,而细胞骨架的状态也直接影响着凋亡信号的传导^[7].本研究显示三组细胞中肌动蛋白和微管蛋白均发生了差异表达,缺血后二者均下调,而缺氧和缺血缺氧刺激后二者均上调,上调的程度缺血缺氧组高于缺氧组.这就证实缺血缺氧后IEC细胞骨架的确发生了变化,且不同的刺激条件下细胞骨架的变化亦有不同.至于这一变化发生的原因及其与IEC凋亡的关系尚需深入研究.已知nectin-3 α 是nectin家族中的一种亚型,是不依赖Ca²⁺的细胞黏附分子,分布于IEC细胞锚定连接处.其主要功能是与E-钙黏素共同构成细胞锚定连接及促进细胞紧密连接形成^[8-9].本研究还显示实验组nectin-3 α 表达减少,其中缺血缺氧组、缺血组属差异表达.减少程度由大到小依次是缺血缺氧组、缺血组、缺氧组.由此提示缺血缺

氧损伤导致的细胞连接破坏、肠道通透性增高与nectin-3 α 密切相关.此外钙泵功能在缺血缺氧后也发生了变化,表现为IEC钙泵相关ATP合成酶表达下调,在三组中均呈差异表达,下调程度由大到小依次是缺血组、缺氧组、缺血缺氧组.这一结果提示ATP依赖的钙泵功能障碍与缺血缺氧后IEC钙超载密切相关.

总之,IEC缺血缺氧损伤的基因谱变化是多方面的,钙泵、Bcl-2、ERK通路、SGK、rVH6、nectin-3 α 及细胞骨架均可能与IEC损伤相关.其中有关细胞骨架、nectin家族、SGK及rVH6的改变目前尚缺乏研究,此外研究中还发现一些未知功能基因,如N27的改变.这些基因在IEC缺血缺氧损伤中的表达差异及缺血、缺氧敏感性差异还有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 陈胜良, 萧树东. 基因芯片技术在消化病学领域的应用进展. 中华消化杂志 2002;22:494-496
- 2 吴朝晖, 金惠铭, 顾玉东. 大鼠臂丛神经损伤后萎缩骨骼肌基因表达谱的变化. 中华创伤杂志 2002;18:357-360
- 3 郑曙云, 付小兵, 徐建国. MAPK信号传导通路与肠损伤后黏膜上皮修复. 中国危重病急救医学 2004;16:59-62
- 4 Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, Boschert U, Camps M, Gillieron C, Davies K, Ashworth A, Arkininstall S. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1996;271:27205-27208
- 5 Brunet A, Park J, Tran H, Hu LS, Hemmings BA, Greenberg ME. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHRL1 (FOXO 3a). *Mol Cell Biol* 2001;22:952-965
- 6 陈前, 秦环龙. 缺血缺氧损伤对肠上皮细胞整合素极性及其凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2005;13:456-459
- 7 夏伟, 周建伟. 细胞骨架与细胞凋亡及细胞内信息通路的关系. 细胞生物学杂志 2001;23:205-209
- 8 Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 1):17-27
- 9 Satoh-Horikawa K, Nakanishi H, Takahashi K, Miyahara M, Nishimura M, Tachibana K, Mizoguchi A, Takai Y. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. *J Biol Chem* 2000;275:10291-10299

编辑 潘伯荣 审读 张海宁