

文章编号:1005-6947(2008)04-0355-05

· 基础研究 ·

缺血预处理对大鼠移植小肠基因表达谱的影响

王曙逢¹, 李国威²

(1. 西安交通大学医学院第一附属医院 普通外科, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学医学院第二附属医院 普通外科, 陕西 西安 710004)

摘要:目的 研究缺血预处理(IPC)后大鼠移植小肠基因表达谱的变化,探讨IPC保护移植物的机制。方法 大鼠随机分为假手术组(S组)、小肠移植组(SBT组)和缺血预处理后小肠移植组(ISBT组)。移植肠冷保存/再灌注1h后,抽提各组小肠总RNA并纯化mRNA;逆转录合成cDNA荧光探针,与cDNA芯片杂交。洗片后扫描芯片荧光信号图像,将SBT组和S组杂交结果与ISBT组和S组杂交结果行生物信息学分析。结果 在4096条基因中,正常小肠与ISBT组差异表达基因共有297条,已报道有GeneBank(基因库)登录号的基因84条。其中表达下调的基因共18条,表达上调基因共66条,这些差异表达基因与IPC保护效应有关。结论 IPC通过调节细胞黏附相关基因、细胞能量和物质代谢相关基因及细胞信号转导相关基因的表达,发挥移植细胞保护效应。

[中国普通外科杂志,2008,17(4):355-359]

关键词: 小肠/移植; 基因芯片; 缺血预处理

中图分类号: R 617; R 322.45

文献标识码: A

Effect of ischemic preconditioning on gene expression profile in small intestinal allografts in rats

WANG Shufeng¹, LI Guowei²

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University of Medical School, Xi'an 710061, China; 2. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University of Medical School, Xi'an 710004, China)

Abstract: Objective To determine the changes of gene expression profile in small intestinal allograft in rats after ischemic preconditioning (IPC), and to study the mechanism of graft protection of IPC. **Methods** Rats are randomly divided into 3 groups: sham operation (S group), small bowel transplant (SBT group) and IPC small bowel transplant group (ISBT group). Total RNAs was extracted from intestine of the 3 groups 1h after the intestine removed and cold preservation/reperfusion, and then purified to mRNA. mRNAs was then reversely transcribed to cDNA and to prepare hybridization probes. The mixed probes were hybridized to the cDNA microarray. After high-stringent washing, the fluorescent signals on cDNA microarray were scanned and analyzed. **Results** Among the 4096 target genes, 297 differentially expressed genes were identified between normal intestine and intestinal allograft in ISBT group; among those 84 genes which have been reported, including 18 genes expressing down and 66 genes expressing up regulation. Differentially expressing genes could be related to the protective effect of IPC. **Conclusions** The mechanisms of protective effect of IPC on cells of the graft are by modulation of genes related to cell adhesion, related to cellular energy and metabolism, and related to the signal transmission of the cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(4): 355-359]

Key words: Intestine small/transpl; Genechip; Ischemic Preconditioning

CLC number: R 617; R 322.45

Document code: A

收稿日期:2007-09-28; 修订日期:2007-11-26。

作者简介:王曙逢,男,西安交大医学院第一附属医院主治医师,主要从事胃肠外科基础与临床方面的研究。

通讯作者:王曙逢 E-mail:dawn@mail.xjtu.edu.cn

缺血预处理 (ischemic preconditioning, IPC) 作为机体内源性的一种保护效应,具有生物种属的普遍性^[1]。小肠黏膜是对缺血再灌注十分敏感的组织,笔者以往的研究发现,IPC 对大鼠移植小肠上皮细胞和细胞外基质的基底膜均有早期保护作用。从细胞水平来看,IPC 减轻上皮细胞线粒体损伤维持细胞能量代谢稳定,抑制冷保存/再灌注时移植小肠上皮凋亡可能是其保护移植小肠上皮的机制之一^[2]。然而从基因和分子水平看,短暂的 IPC 对移植小肠基因表达模式的影响目前并不甚明了。因此,本研究采用具有快速高效率的 cDNA 微矩阵基因芯片的方法,分析 IPC 对大鼠移植小肠基因表达谱的作用,初步筛选与 IPC 保护效应相关的基因。旨在为临床实践 IPC 奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和实验设计

供、受体均为健康雄性 SD 大鼠,体重 (280 ± 20) g,购自本校医学实验动物中心。混合性饲料适应性饲养 1 周后用于手术,实验期间照明与黑暗 12 h 交替。大鼠随机分为:(1)假手术组(S 组, $n = 6$),接受麻醉、剖腹术和左肾切除术。(2)大鼠异位节段小肠移植组(SBT 组, $n = 12$),供、受体移植配对时体重相近。(3)缺血预处理加大鼠异位节段小肠移植组(IPC + SBT, ISBT 组, $n = 12$),供体移植肠切取前实施 IPC(用无损伤显微外科动脉夹,夹闭肠系膜上动脉 10 min,松夹再灌注 10 min),余操作同 SBT 组切取移植肠。

1.2 异位节段小肠移植

参照文献方法^[3-5]并加以改进。术前供、受体禁食 12 h,自由饮水。2%戊巴比妥钠 35 mg/kg 腹腔内注射麻醉。原位冷灌注,灌洗液为含肝素 100 U/mL 的 4 °C 乳酸林格液。Tretz 韧带下 5 cm 切取带有腹主动脉柱和门静脉的节段小肠,4 °C 乳酸林格液保存 1 h。游离受体左肾静脉及腹主动脉,切除左肾。血管重建采用供体腹主动脉柱与受体腹主动脉 9-0 无损伤尼龙线端侧连续吻合,供体门静脉与受体左肾静脉行袖套式吻合。受体自身小肠不作处理。移植肠置于左侧腹腔,近侧段关闭,远侧端左下腹外置。移植肠平均热缺血时间 < 1 min,移植肠冷缺血时间 < 60 min。

1.3 基因芯片制备

cDNA 芯片所用的 4 096 个靶基因克隆系由上海博星基因有限公司提供。使用通用引物,多聚酶链反应(PCR)扩增靶基因,并采用标准方法纯化 PCR 产物。通过琼脂糖凝胶电泳监测 PCR 质

量。将上述制备的靶基因溶解于 3 × 标准柠檬酸盐(SSC)点样液中,用 Cartesian 7 500 点样仪(美国 Cartesian 公司)点于硅烷化的玻片(美国 Telechem 公司)上。点样后,玻片经水合(2 h)、室温干燥(0.5 h)、紫外线(UV)交联,分别用 0.2% 十二烷基硫酸钠(SDS)、水及 0.2% 硼氢化钠处理 10 min,凉干备用。

1.4 荧光探针制备

SBT 组和 ISBT 组在移植物血管重建成功再灌注 1 h 后与 S 组在相同的解剖位置切取 3 cm 小肠组织,迅速置液氮中冻存。一步法抽提各组标本总 RNA。UV 灯和电泳分析显示纯化的 RNA 质量好。用 Oligotex mRNA Midi Kit(Qiagen 公司)纯化 mRNA。参照 Schena 等的方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。用 Cy3-dUTP 标记 S 组小肠组织 mRNA,用 Cy5-dUTP 分别标记 SBT 组和 ISBT 组移植小肠组织 mRNA。乙醇沉淀后,分别将 S 组和 SBT 组,S 组和 ISBT 组探针混合溶解在 20 μL 5 × SSC + 0.2% SDS 杂交液中。

1.5 杂交和洗涤

将基因芯片和杂交探针分别在 95 °C 水浴中变性 5 min;将探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置 60 °C 杂交 15 ~ 17 h。然后揭开盖玻片,分别用 2 × SSC + 0.2% SDS,0.1 × SSC + 0.2% SDS 和 0.1 × SSC 洗涤 10 min,室温晾干。

1.6 荧光扫描和分析

用 ScanArray 4 000 扫描仪(美国 General Scanning 公司)扫描芯片,获得芯片 Cy3 和 Cy5 扫描结果。用 ImaGene 3.0 软件(美国 BioDiscovery 公司)分析所得 Cy5/Cy3 图像文件,获取基因表达的荧光信号值。用管家基因对 Cy3 和 Cy5 的原始信号进行均衡,得到 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。用以下 2 个条件作为判定基因差异的标准:(1)Cy5/Cy3 的自然对数的绝对值 > 0.69 或 Cy5/Cy3 比值 > 2.0 或 < 0.5;(2)Cy3 或 Cy5 荧光信号强度 > 800。

2 结果

2.1 总 RNA 抽提和 mRNA 纯化

3 组提取的总 RNA 紫外分析 OD260/OD280 值为 1.967 ~ 1.986。琼脂糖凝胶电泳结果分析总 RNA,可见 18S rRNA 和 28S rRNA 条带清晰,两者比例约为 1:2。RNA70 °C 保温试验(RNA70 °C 保温后行琼脂糖凝胶电泳分析)合格,说明所提取的总 RNA 完整性好,保证了可获得高纯度的 mRNA。

2.2 表达谱芯片杂交体系验证

基因芯片上点有4 096种不同的大鼠cDNA全长或片段。本实验结果完全符合质量控制标准(即有20个管家基因必须阳性,16个植物基因为阴性对照必须阴性,19个点样液为空白对照也必须阴性),说明研究过程中无污染。

2.3 基因芯片杂交信号散点图

基因表达谱的双色荧光杂交信号强度散点图中,每一点代表一个基因。大多数点分布于45°

对角线附近。黄色点分布于远离45°对角线,表明S组和SBT组(图1),S组和ISBT组(图2)存在差异表达的基因。表达上调的基因分布于45°对角线的上部,表达下调的基因分布于45°对角线的下部。红色点代表S和ISBT组,S组和SBT组差异无显著性表达的基因,表达比值为0.5~2.0。无显著差异表达的基因分布在45°对角线的附近。

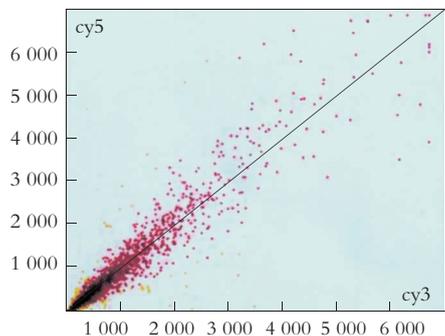


图1 S组,SBT组基因表达分布散点图

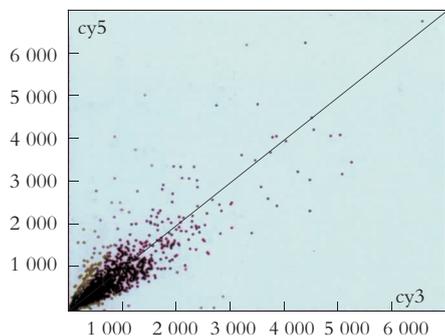


图2 S组,ISBT组基因表达分布散点图

2.4 基因芯片杂交结果的生物信息学分析

S组和SBT组的基因芯片杂交结果扫描生成双色荧光标记图(图3)。该图反映每个基因在两种相比较的组织中的表达差异。黄色点代表该基因表达丰度在两种组织中无显著差异,绿色点表明该基因在正常小肠中表达高于再灌注后的移植小肠,红色点反映该基因在移植小肠中表达高于正常小肠。S组和SBT组差异表达基因共有82条。有GenBank登录号的基因共31条,其中表达下调的基因17条,表达上调的基因14条。

S组和ISBT组的基因芯片杂交结果扫描生成双色荧光标记图(图4)。该图反映每个基因在正常小肠和IPC后移植小肠中的表达丰度和差异。黄色点代表该基因表达在两种组织中无显著差异,绿色点表明该基因在正常小肠中表达高

于IPC后的移植小肠,红色点反映该基因在IPC后移植小肠中表达高于正常小肠。S组和ISBT组差异表达基因共有297条。有GeneBank登录号的基因共84条。其中表达下调的基因共18条,表达上调基因共66条。

ISBT组移植小肠受到IPC和冷缺血/再灌注两个处理因素的作用,SBT组与S组的基因芯片杂交结果可显示冷保存/再灌注对移植肠基因表达模式的作用变化,将SBT组和S组杂交结果与ISBT组和S组杂交结果比较分析,可得知IPC对移植小肠基因表达谱的影响。

采用判定基因表达差异的标准分析显示,调节细胞黏附、细胞能量和糖代谢及细胞信号转导相关基因的表达在SBT组和ISBT组间存在差异(表1)。

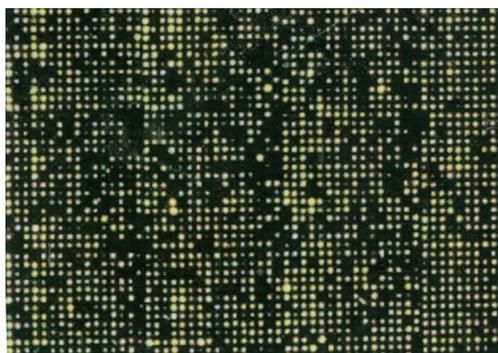


图3 S组,SBT组基因芯片杂交信号叠加图



图4 S组,ISBT组基因芯片杂交信号叠加图

表1 在 SBT 组和 ISBT 组筛选的部分差异表达基因

基因库编号	定义	SBT 组表达丰度	ISBT 组表达丰度
NM-017211	黏附分子选择素家族	上调	下调
NM-053372	白细胞分泌性蛋白酶抑制剂	上调	下调
NM-053297	丙酮酸激酶	下调	上调
NM-017008	3-磷酸甘油醛脱氢酶	下调	上调
NM-013098	葡萄糖-6-磷酸酶	下调	上调
NM-012504	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	下调	上调
NM-017073	谷氨酰胺合成酶	下调	上调
NM-030826	谷胱甘肽过氧化物酶	下调	上调
AB073721	酪氨酸激酶相关蛋白	正常	上调
NM-031622	丝裂原活化蛋白激酶	正常	上调
AF187818	表皮生长因子受体相关蛋白	正常	上调
NM-032612	信号转导和转录激活因子	正常	上调

3 讨论

生理情况下,微血管内皮细胞与多形核白细胞有相互排斥作用,这是保证微循环灌注的重要条件。选择素依赖的多形核白细胞沿内皮细胞的滚动是建立与内皮牢固黏附的必需前提。本实验发现,SBT 组移植肠冷缺血/再灌注 1 h 后,黏附分子选择素家族表达上调,诱发多形核白细胞黏附至内皮细胞的级联反应,这是造成移植肠再灌注损伤的关键因素^[6]。而在 ISBT 组黏附分子选择素家族表达下调,即有可能减缓多形核白细胞沿内皮细胞的滚动,阻抑黏附的级联反应,减轻对微血管的机械性阻塞,使多形核白细胞释放至组织中的蛋白水解酶和氧自由基减少,使组织中蛋白水解酶及其抑制剂重新达到新的平衡状态。如表 1 所示白细胞分泌性蛋白酶抑制剂的表达亦下调。因此,IPC 通过调节多形核白细胞与微血管内皮细胞的黏附行为,对移植肠产生保护效应。

高能磷酸化合物(ATP)耗竭/缺乏被认为是引起再灌注损伤的重要原因。黏附级联反应介导的微血管损伤使得移植肠在再灌注过程中处于相对缺氧状态,葡萄糖的生物氧化以糖酵解为主,但糖酵解反应中的关键酶丙酮酸激酶和 3-磷酸甘油醛脱氢酶在 SBT 组表达下调,阻碍糖酵解使 ATP 合成受抑制,糖异生反应中的关键酶葡萄糖-6-磷酸酶表达亦下降,抑制糖异生反应。而在 ISBT 组丙酮酸激酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶和葡萄糖-6-磷酸酶表达上调,促进糖异生和糖酵解,生

成 ATP,充足的 ATP 储备可以使细胞内环境和功能稳定。

Na⁺-K⁺泵是以多种形式存在于细胞膜上的 Na⁺-K⁺-ATP 酶。其生理意义在于:形成和保持细胞内外 Na⁺ K⁺ 不均匀分布,建立一种势能贮备,为其他物质如氨基酸葡萄糖进行跨膜转运提供能源。SBT 组移植肠再灌注时 Na⁺-K⁺-ATP 酶表达下调,Na⁺ 潴留于细胞内,使胞内渗透压升高,大量水分积聚于细胞内,使细胞和细胞器水肿。而在 ISBT 组,Na⁺-K⁺-ATP 酶表达水平上调,同时细胞又可通过氧化磷酸化和底物水平磷酸化生成 ATP,提供能量储备,这样使细胞内过多的 Na⁺ 被转移至细胞外,恢复正常情况时细胞内高 K⁺ 细胞外高 Na⁺ 的不平衡分布,减轻细胞水肿和细胞内的高渗状态,恢复细胞的正常体积和形态。

目前,困扰临床小肠移植的关键问题之一是术后的多源性感染^[7]。其中部分原因是移植肠在经历冷保存/再灌注后,其肠上皮细胞受到明显损伤,小肠黏膜屏障遭到破坏,通透性增大诱发肠道细菌移位。谷氨酰胺合成酶可促使谷氨酰胺和氨合成谷氨酰胺。它对维持小肠黏膜细胞的增殖分化和上皮细胞结构完整具有重要作用。在 SBT 组冷缺血/再灌注后小肠上皮细胞内的谷氨酰胺很快耗竭,同时谷氨酰胺合成酶表达下调,致小肠黏膜屏障功能受损。而在 ISBT 组 cDNA 微矩阵芯片结果显示谷氨酰胺合成酶表达丰度上调,使谷氨酰胺合成增多,因此可修复由冷缺血/再灌注所致小肠黏膜屏障损伤,阻止细菌/

内毒素移位^[8];调节炎性/抗炎性因子平衡,阻抑冷保存/再灌注过程中过度的炎症反应^[9]。故认为IPC后,谷氨酰胺合成增多可通过多种途径对小肠上皮细胞产生保护效应。

短暂的IPC产生的细胞外信号如何通过跨膜信号转导引起上述细胞黏附相关基因和能量与代谢基因表达水平的改变呢? cDNA 微矩阵芯片结果显示:IPC后与细胞信号转导途径相关的蛋白激酶和因子表达丰度均比其在SBT组的水平上调。如:酪氨酸激酶相关蛋白、丝裂原活化蛋白激酶、表皮生长因子受体相关蛋白、信号转导和转录激活因子等表达丰度升高。在转录水平使核内特定的基因转录活性升高,在翻译水平可诱导一些内源性保护蛋白,如谷胱甘肽过氧化物酶的表达丰度升高。作为氧自由基消除系统的酶类可有效清除源于多形核白细胞与内皮细胞介导的黏附级联反应中释放的氧自由基,对移植产生保护效应。

综上所述,cDNA 微矩阵基因芯片发现,IPC通过调节细胞黏附相关基因、细胞能量和物质代谢相关基因及细胞信号转导相关基因的表达,发挥细胞保护效应。

参考文献:

- [1] Ferencz A, Rácz B, Gasz B, *et al.* Threshold level of NF- κ B activation in small bowel ischemic preconditioning procedure [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38 (6): 1800 - 1802.
- [2] Wang SF, Li GW. Early protective effect of ischemic preconditioning on small intestinal graft in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (8): 1866 - 1870.
- [3] Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations [J]. *Surgery*, 1971, 70 (5): 693 - 702.
- [4] 王曙逢,李国威.大鼠小肠移植模型的改进[J].*中国普通外科杂志*,2003,12(4):279-282.
- [5] 张建平,刘彤.近系大鼠小肠移植模型排斥反应的研究[J].*中国普通外科杂志*,2004,13(5):360-362.
- [6] 王曙逢,梁琪,李国威.大鼠移植小肠冷保存/再灌注后基因表达谱的变化[J].*中国普通外科杂志*,2004,13(12):900-904.
- [7] Ruiz P, Kato T, Tzakis A. Current status of transplantation of the small intestine [J]. *Transplantation*, 2007, 83 (1): 1 - 6.
- [8] Shimizu M, Son DO. Food-derived peptides and intestinal functions [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13 (9): 885 - 895.
- [9] Medeiros AC, Chacon DA, Sales VS, *et al.* Glucan and glutamine reduce bacterial translocation in rats subjected to intestinal ischemia-reperfusion [J]. *J Invest Surg*, 2006, 19 (1): 39 - 46.

穗港海外胃肠肿瘤学术研讨会征文通知

由中山大学附属第一医院、广东省抗癌协会胃癌专业委员会和中山大学胃癌诊治研究中心联合主办的穗港海外胃肠肿瘤学术研讨会定于2008年10月中旬在广州市召开。会议将邀请国内外著名专家做专题研讨和现场手术演示,欢迎国内外医师踊跃参加。参会者可获I类继续医学教育学分。

征文内容:胃肠肿瘤的诊治新进展;胃肠肿瘤的扩大和缩小手术;胃肠间质瘤;胃肠恶性肿瘤微创手术的现状和前景;胃肠癌化学治疗、生物治疗的研究进展;胃肠肿瘤外科密切相关的边缘交叉学术问题。

征文要求:①使用Word文档格式,全文字数4000字符左右,摘要600字左右;②摘要内容应包括文题,作者单位,邮编,姓名及“目的、方法、结果、结论”;③稿件请注明准确的通讯地址、单位名称、邮政编码和联系电话,以便联系;④征文截稿日期2008年9月15日前(请自留底稿,恕不退稿),请务必通过电子邮箱将稿件发至zhwewk@21cn.com

主题请标明“胃肠肿瘤学术研讨会征文”。联系地址:广州市中山二路58号中山大学附属第一医院胃肠胰外科(邮编510080),联系人及电话:张常华13678987415;徐泽娥020-88263393