文章编号:1000-5404(2005)15-1561-03

论著

利用基因芯片技术研究电击伤后心肌组织基因表达谱的改变

马智华[1,2],万立华[1],晏 珩[2],潘守亭[1] ([1]重庆医科大学检验系,重庆 400016;[2]重庆刑事科学技术研究所,重庆 400042)

提 要:目的 研究电击伤后心肌组织基因表达谱的改变,筛选与心肌电损伤过程相关的差异表达基因。**方法** 将大鼠心脏电击伤3 h后的心肌组织(电击组)和正常心肌组织(对照组),分别提取总RNA,制备Cy5-dCTP和Cy3-dCTP的标记的cDNA探针,并与BioStar-40基因芯片进行杂交。杂交信号经扫描后,计算机分析基因表达情况。**结果** 电击伤后心肌组织中共有71个基因或EST发生差异表达,其中35个基因或EST表达上调,36个基因或EST(expressed sequence tags)表达下调。这些基因涉及凝血、炎症反应、信号转导及机体自稳态等多个方面,此外还有44个基因或EST的功能是未知的。**结论** 利用基因芯片技术初步筛选出与心肌电损伤过程相关的多个差异表达基因,为揭示心脏电击伤的分子机制提供了依据。

关键词:电击伤;心脏;基因芯片;基因表达
中图法分类号:R322.11;R394-33;R647 **文献标识码**:A

The gene expression profiles in cardiac muscles by DNA microarray after electrical injury

MA Zhi-hua[1,2], WAN Li-hua[1], YAN Heng[2], PAN Shou-ting[1] ([1]Department of Laboratory Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, [2]Institute of Forensic Science and Technique in Chongqing, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the gene expression profiles in cardiac muscles at the early phase after electrical injury. **Methods** The total RNA in both injured group and control group were isolated and hybridized with BioStar-40 cDNA microarray that contains 4 096 genes or expressed sequence tags (EST) randomly selected from a rat cDNA library. **Results** A total of 71 genes or ESTs were differently expressed in the cardiac muscles in 3 h after electrical injury with 35 up-regulated genes or ESTs and 36 down-regulated genes or ESTs. Some of these genes were involved in coagulation, inflammation, signal transduction and cell homeostasis. **Conclusion** The genomic response to heart electrical injury is complex and a great number of genes involved in this pathophysiological process. The analysis of differently expressed genes is helpful to learn the molecular mechanisms of heart electrical injury.

Key words: electrical injury; heart; microarray; gene expression

电击伤的发生率较高,并呈逐年增加的趋势[1,2]。研究表明,在大多数致死性电击伤中,心脏都发生了一系列病理生理和生化改变,但其发生机制尚不完全清楚[3]。近年来,随着分子生物学技术的发展,为进一步从分子水平研究心脏电损伤的发生机制提供了新的方法。本实验选用上海博星基因芯片公司的BioStar-40基因表达谱芯片,研究电损伤后心肌组织早期基因表达谱的变化情况,初步筛选与心肌电损伤过程相关的差异表达基因。

作者简介:马智华(1969-),男,重庆市人,博士研究生,主检法医师,主要从事法医损伤病理学、分子病理学研究及检案方面的研究。电话:13638308510,E-mail:Formedma@yahoo.com
通讯作者:万立华,电话:(023)68486811

收稿日期:2005-04-08;**修回日期**:2005-06-06

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用成年健康Wistar大白鼠12只(由重庆医科大学动物实验中心提供),雌雄不论,体质量250~300 g,将动物分成电击组和正常对照组,每组各6只。

1.1.1 电击组 动物腹腔注射4%水合氯醛麻醉后仰卧位固定,将电极分别固定于大鼠胸部心脏的体表投影位置(左侧电极位于双上肢上缘与胸骨的交点处,右侧电极位右上肢内侧下1 cm处),利用220 V交流电电击30 s复制心脏电击伤模型。电击后3 h,断颈处死动物,打开胸腔取出心脏,分别提取左右房室4块组织,共约100 mg。所取组织用生理盐水洗涤后用高温干烤过的铝箔包好置于液氮保存。

1.1.2 对照组 按上述方法将动物麻醉但不予电击,3 h后取材保存。

1.2 芯片及其试剂

BioStar－40 芯片由博星基因芯片公司提供，芯片含有4 096个鼠 cDNA 文库中随机筛选的基因或 EST。为监控杂交体系的整个过程，每块芯片设有如下阴性对照：水稻 U2RNA 基因(8 个点)、HCV 外壳蛋白(8 个点)、空白点 32 个。

Oligotex mRNA Kit、dNTP、RNA 荧光标记试剂盒(Kit Cy3 和 Kit Cy5)及其它试剂均由博星公司提供。

1.3 总 RNA 抽提、探针标记及杂交

1.3.1 总 RNA 提取 分别将液氮保存的电击组(1.26 g)和对照组心肌组织(各 1.1 g)按文献[4]的方法抽提总 RNA，通过测定其 A_{260}/A_{280} 值和电泳分析对所获得的 RNA 样品质量进行鉴定。

1.3.2 探针标记 按照 RT-PCR 法，在反应体系中加入 Cy5-dCTP 或 Cy3-dCTP，合成 DNA；后合并对照组和实验组反应体系，避光真空抽干至 50 μl 左右；乙醇沉淀纯化 DNA，加入标记试剂Ⅲ 8 μl，真空抽干。

1.3.3 杂交 将芯片与合成的探针杂交后晾干芯片，用 ScanArray 4000 扫描仪扫描。

1.4 统计学处理

采用图像分析软件 GenePix 3.0 对芯片灰度扫描图进行分析。实验数据经均一化处理后，计算每个基因点的表达差异值 Ratio，筛选出 Ratio 大于 2 或小于 0.5 的基因点，即为差异表达的基因。

2 结果

2.1 总 RNA 质量鉴定和芯片杂交结果的检测

通过紫外分光光度法检验其 A_{260}/A_{280} 值分别为 2.298 和 2.267，并经电泳分析证实已获得高纯度总 RNA，可见清晰的 3 条带(28、18、5、8 S 及 5 S)。通过对实验均一化系数和芯片扫描图信号强度分析，结果符合芯片实验成功的标准。

2.2 基因芯片杂交结果

将 Cy3 标记的对照组 cDNA 探针和 Cy5 标记的电击组 cDNA 探针与 BioStar－40 s 基因芯片杂交，对获得的扫描图谱进行叠加分析(图 1)；在此基础上，通过统计处理，得到了不同组织样本(对照组/实验组)杂交信号强度散点图(图 2)。为降低误差，进行了重复实验。结果显示两次实验中均出现的差异表达基因共有 71 个，其中表达上调基因 35 个(占该基因总数的 0.9%)，表达下调基因 36 个(占基因总数的 0.93%)。

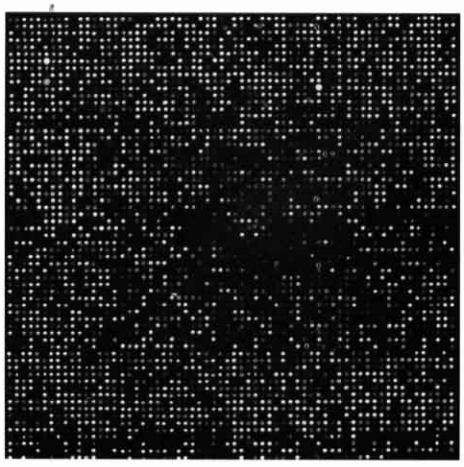


图 1 第 1 组实验扫描图

Fig 1 The scan figure

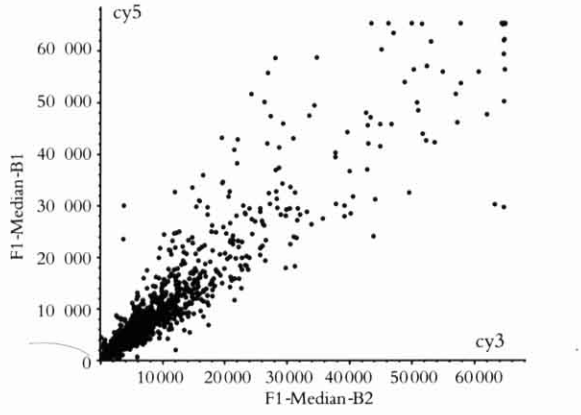


图 2 实验散点图

Fig 2 The scatter plot

2.3 生物信息学分析

通过生物信息学分析显示，差异表达基因涉及到细胞多个方面的病理生理学改变，还有 44 个(约占差异表达基因的 61.97%)基因或 EST 的功能不明确。部分功能比较明确的差异表达基因及其大致分类见表 1、2。

表 1 电击后 3 h 心脏组织表达上调的基因

Tab 1 The up-regulated genes with known functions in the cardiac muscles in 3 h after electrical injury

GenBank ID	Gene name	Ratio
Coagulation		
U06230	Rattus norvegicus protein S	2.105
M81786	Rattus norvegicus ryudocan	2.605
Inflammatory response		
NM_053587	S100 calcium-binding protein A9 (calgranulinB) (S100a9)	2.596
NM_022393	Gal NAc-specific lectin (Mgl)	2.096
Nuclear injury		
AF020618	Progression elevated gene 3 protein	2.469
Signal transduction		
NM_019386	Rattus norvegicus tissue-transglutaminase (Tgm2)	4.509
Y09111	R. norvegicus mRNA for tMDC IV protein	3.516
Defense/homeostasis		
NM_053819	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1(Timp1)	5.240
AF034218	Rattus norvegicus hyaluronidase(Hyal2)	5.456
Metabolism		
NM_017156	Cytochrome P450,2b19(Cy2b15)	5.611
M33648	Mitochondrial 3hydroxy 3methylutaryl CoA synthase	2.606
AF208125	Gonadotropin-regulated long chain acy CoA synthetase(GR-LACS)	2.138
Others		
NM_017342	Rattus norvegicus surfactant protein C (SP-c)	15.120
NM_053516	Unknown Glu-Pro dipeptide repeat protein (LOC85383)	7.461

表 2　电击后 3 h 心脏组织表达下调的基因

Tab 2　The down-regulated genes with known functions in the cardiac muscles in 3 h after electrical injury

GenBank ID	Gene and EST name	Ratio
Coagulation		
X86561	Rat gene for alpha-fibrinogen	0.215
Metabolism		
M20406	Cytochrome P450IIB3 (P450IIB subfamily)	0.245
NM_019292	Rattus norvegicus carbonic anhydrase 3 (Ca3)	0.387
AF062741	Pyruvate dehydrogenase phosphatase iosenzyme 2	0.408
J03752	Rat glutathione S-transferase mRNA, complete cds	0.452
M25732	Peptidyl-glycine alpha-monooxygenase (rPAM-1)	0.455
Differentiation/maturation		
NM_017166	Leukemia-associated cytosolic phosphoprotein stathmin	0.368
Immune response		
M21780	Ig germline Lambda-chain C-region gene (C-Lambda-2)	0.339
X68312	Ig rearranged mu-chain C region, exons2-4	0.317
M28671	Rearranged IgG-2b gene, last 4 exons	0.461
L22655	Anti-acetycholine receptor antibody gene, kappa-chain, VJC regain	0.411
Signal transduction		
NM_013169	CD3 antigen delta polypeptide (Cd3d)	0.188
Defense/homeostasis		
NM_030836	Leucyl-specific aminopeptidase PILS(APPILS)	0.499

3　讨论

电击伤是一种特殊类型的损伤，发病率较高，呈逐年增加的趋势，其致残率和致死率极高[1,2]，目前对其致伤机制仍不清楚。为了解心肌电损伤的分子机制，对心肌电击伤后早期的基因改变进行了研究。本实验采用博星公司的 BioStar－40 芯片研究电击后 3 h 心肌组织发生差异表达的基因及 EST 共有 71 个，约占该芯片的 1.83%。这些基因具有不同功能，大致可分为以下几类：①与有关凝血的基因，如 S 蛋白和 ryudocan 基因；②与炎症反应有关基因，如半乳糖－N 乙酰半乳糖胺－特异性凝集素、S100 蛋白、alpha-fibrinogen 等；③与核损伤有关的基因，如 PEG-3，与信号转导有关的基因，组织转谷氨酰胺酶、tMDCⅣ蛋白；④与机体防御/自稳有关的基因，如组织金属蛋白酶抑制剂、透明质酸酶、Leucyl-specific aminopeptidase 等；⑤与代谢有关的基因，如 cytochrome P450、mitochondrial 3-hydraoxy 3-methylutaryl COA synthase，gonadotropin-regulated long chain acy COA synthase、cytochrome P450II3、carbonic anhydrase 3、Pyruvate dehydrogenase phosphatase 等；⑥细胞分化成熟有关的基因，Leukemia-associated cytosolic phosphoprotein stathmin；⑦与免疫反应有关的基因，如 M21780、X68312 及 M28671 等；⑧其它蛋白基因，如 surfactant protein C、unknown Glu-Pro dipeptide repeat protein 等。这些差异表达基因在心肌损伤的病理生理过程中发挥重要作用。而且，值得注意的是有许多基因具有多重功能，如 S100A9，它既参与细胞信号传导，又参与炎症反应、肿瘤生长分化等过程。Tissue-transglutaminase，既参与细胞信号传导，又参与细胞代谢，与细胞修复与重塑[5]。此外，我们的研究中还筛选获得了 44 个未知功能的差异表达基因或 EST，占全部差异表达基因数量的 60% 以上。因此，我们的实验结果显示，电击后心肌组织内大量基因发生了差异表达，表明电击后心肌组织的病理生理变化机制是十分复杂的，大量的基因参与其中。对差异表达基因特别是未知功能基因的深入研究将有助于从基因水平分析这一复杂的病理生理过程，并为最终揭示其发病机制提供依据。

参考文献：

[1] 侯一平，刘世沧. 电击伤与电击死[A]. 见：侯一平，刘世沧 主编. 法医学进展与实践[M]. 成都：成都科技大学出版社，1997. 46－48.

[2] Lee R C. Injury by electrical forces: pathophysiology, manifestations and therapy[J]. Curr Probl Surg, 1997, 34 (9): 677－764.

[3] Tropea B I, Lee R C. Thermal injury kinetics in electrical trauma[J]. J Biomech Eng, 1992, 114 (1): 241－250.

[4] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔著 D W 著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京：科学出版社，2002. 516.

[5] Harrison C A, Raftery M J, Walsh J, *et al*. Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8[J]. J Biol Chem, 1999, 274(13): 8561－8569.

（编辑　张大春）

欢迎订购《药物临床信息参考》

《药物临床信息参考》(Clinical Drug Reference)是有关药物临床应用信息的大型参考工具书。本书是以通用药物为主线的综述性药物信息工具书，内容侧重于药物的临床应用信息，包括了：药物名称、组成成分、临床应用、药理、注意事项、不良反应、药物相互作用、给药说明、用法与用量、制剂与规格等项目。并采用条目化的编写，使内容清晰，方便查阅。该书适用于临床医生、临床药师、用药管理人员、药物研发人员和医药院校师生。

该书由四川科学技术出版社出版，全书 440 万字，彩色精装印刷，价格 198.00 元。有需要者请与第三军医大学学报编辑部联系邮购。

地　址：重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部　　邮　编：400038

联系人：曾　颖　　电　话：(023)68752187

传　真：(023)68752188　　E－mail：aammt@mail.tmmu.com.cn