DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.16.006
第26卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 16
1432 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)16-1432-04

失血性休克大鼠心肌和肠上皮细胞ND1、ND2、mtTFA基因表达的变化

陈 锐,刘友生,王水明 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨失血性休克后线粒体呼吸链复合体Ⅰ亚单位ND1、ND2及其调控因子-mtTFA在大鼠心肌和肠上皮细胞内基因转录物水平改变规律。方法 通过采用大鼠失血性休克模型,提取心肌和肠上皮细胞总RNA,行RT-PCR扩增呼吸链复合体Ⅰ亚单位ND1、ND2基因及mtTFA基因并对其基因转录物水平进行了检测。结果 大鼠失血性休克后1~2 h,心肌细胞ND1基因的转录水平与正常对照组比较均显著升高;而肠上皮细胞ND1基因的转录水平较正常对照组显著下降,但两种细胞ND2基因的转录水平在失血性休克后的变化趋势基本一致。两种细胞mtTFA基因的转录水平在失血性休克1~2 h后的转录水平则较正常对照组显著下降。结论 在缺血缺氧性损害中,心肌和肠上皮细胞内线粒体ND1亚单位基因转录物水平的改变可能具有组织差异性。

关键词:失血性休克;线粒体呼吸链复合体Ⅰ;基因表达
中图法分类号:R394.3;R605;971 文献标识码:A

Changes of ND1, ND2 and mtTFA gene expressions in myocardial cells and intestinal epithelial cells of rats after hemorrhagic shock

CHEN Rui, LIU You-sheng, WANG Shui-ming (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the transcription pattern of ND1, ND2 and mtTFA gene in the myocardial cells and intestinal epithelial cells of rats after hemorrhagic shock. Methods Total RNA of myocardial cells and intestinal epithelial cells in rats were extracted after hemorrhagic shock. ND1, ND2, and mtTFA gene transcription levels were measured by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Results During the period from 1 to 2 h after hemorrhagic shock, the ND1 gene transcription levels in myocardial cells in the hemorrhagic shock groups were higher than that in the normal control group, but the levels in intestinal epithelial cells were lower than that in the normal control group. The pattern for the changes of ND2 gene transcription in myocardial cells and intestinal epithelial cells was basically similar. Conclusion There might exist certain tissue differences in the changes of ND1 gene transcripts in myocardial cells and intestinal epithelial cells of rats with hypoxic and ischemic damage.

Key words: hemorrhagic shock; mitochondrial respiratory chain complex Ⅰ; gene expression

线粒体是对机体缺血缺氧性损害十分敏感的重要细胞器。线粒体复合体Ⅰ是氧化呼吸链上的最大的复合体,由线粒体DNA和核DNA共同编码,其中线粒体编码的7个亚单位分别为ND1~6和ND4L。线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA)是调节线粒体编码基因转录和复制的重要调控因子之一。关于缺血缺氧性损害发生后线粒体编码基因的表达变化规律,至今国内外文献报道不多。本研究以失血性休克大鼠为动物模型,初步探讨了失血性休克大鼠心肌和肠上皮细胞ND1、ND2、mtTFA基因表达变化及其组织差异性。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar大鼠由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供;RNA提取液Tripure(Roche公司)、RT-PCR试剂盒(宝生物公司)、BIORAD凝胶电泳装置及凝胶扫描分析系统(美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及模型制作 成年Wistar大鼠20只,雌雄

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202)
作者简介:陈 锐(1976-),男,湖北省武汉市人,硕士,医师,主要从事缺血缺氧与创伤病理方面的研究。电话:(023)68774697
通信作者:刘友生,电话:(023)68754431,E-mail:youshengliu660@hotmail.com
收稿日期:2003-08-25;修回日期:2003-10-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

不拘，体质量（250±20）g，实验前 24 h 禁食。动物按数字表法随机分为休克组和正常对照组每组各 4 只大鼠，前者设休克后 1、2、4、5 h，失血性休克采用改良 Wiggers 模型[1]。休克组大鼠在较短时间（10 min 以内）经股动脉放血使血压降至 5.32 kPa（40 mmHg），前 2 h 维持此水平不变，后 3 h 继续观察，无特殊处理。正常对照组大鼠除不通过股动脉放血致休克处理外，其余同休克组。

1.2.2　两种组织细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR 反应　　心肌细胞和小肠粘膜上皮细胞总 RNA 的提取，参照 Tripure 试剂使用说明书进行，所提样品经紫外光分光光度计测定 RNA 浓度，其中 A_{260}/A_{280} 大于 1.8。

两种组织细胞线粒体呼吸链复合体Ⅰ亚单位 ND1、ND2 及 mtTFA 等基因转录产物的 RT-PCR 检测，参照试剂盒说明书进行，所有反应均以β-actin 为内参照在同一扩增条件下进行。

引物序列如下：① ND1 基因设计扩增产物的片段大小为 518 bp，上游引物为 5′-TCCCAGAGGTTCAAATCC- 3′（2 700 bp），下游引物为 5′-TTGTAGGGAGAAGGAGCC-3′（3 217 bp）；②ND2 基因设计扩增产物的片段大小为 614 bp，上游引物为 5′-CCAC-CAATACACCCTATCCT- 3′（3 800 bp），下游引物为 5′-TTGGGTCT-GGTTAAGTCCTC- 3′（4 413 bp）；③mtTFA 基因片段大小为 485 bp，上游引物为 5′-GCAGAAACGCCTAAAGAAGA-3′（281 bp），下游引物为 5′-CATTCAGTGGGCAGAAGTCC-3′（765 bp）；④β-actin 基因片段大小为 275 bp，上游引物 5′-TCATGAAGTGT-GACGTTGACATCC GTAAAG-3′（845 bp），下游引物为 5′-CCTA-GAAGCATTTGCGGTGC ACGATGGAGG-3′（1 129 bp）。

逆转录反应（RT）按 40 μl 体系进行逆转录反应。RNA 模板量为 5 μg，buffer 4 μl，$MgCl_2$ 8 μl，dNTP 4 μl，随机引物 2.0 μl，逆转录酶 2.0 μl，RNA 酶抑制剂 1.0 μl，加入无 RNase 的灭菌蒸馏水补足至 40 μl。反应条件为：30 ℃，10 min；45 ℃ 30 min；99 ℃ 5 min；5 ℃ 5 min。

PCR 扩增 ND1、ND2、mtTFA 基因 PCR 反应体系为 50 μl。取 cDNA 2.0 μl，加入 10× Buffer 5.0 μl，$MgCl_2$ 8 μl，dNTP 6.4 μl，目的基因及内参照β-actin 上下游引物各 1.5 μl，Ex *Taq* 酶 0.5 μl，灭菌双蒸水 23 μl，石蜡油 24 μl。扩增反应条件为：95 ℃预变性 4 min 后按照 95 ℃ 30 s；55 ℃ 30 s；72 ℃ 60 s 共 30 个循环，反应结束后 72 ℃延伸 10 min。

将 PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后使用 BIO-RAD 凝胶扫描系统进行分析。用目的基因与β-actin 扩增产物电泳条带的亮度面密度比值来定量所检测的基因转录水平。

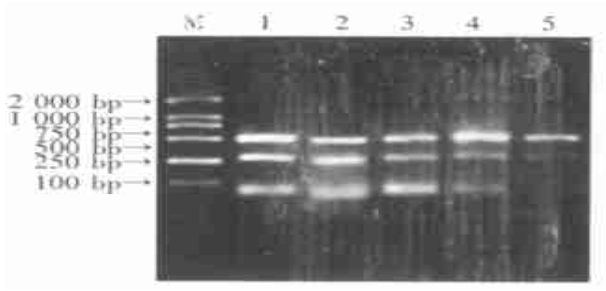
1.3　统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，双因素方差分析及均数间的多重比较。

2　结果

2.1　RT-PCR 产物电泳鉴定

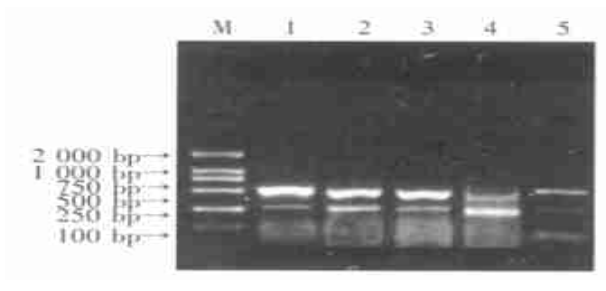
电泳结果如下图（图 1、2），从左至右依次为 DNA marker、正常对照、休克后 1、2、4、5 h、DNA marker。其中 ND1、ND2、mtTFA、β-actin 基因的 RT-PCR 产物片段大小依次为 518、614、485、275 bp。各组动物的两种组织细胞 ND1、ND2 基因与内参照β-actin 基因的 RT-PCR 产物条带清晰，每条泳道最前端有多少不等的引物二聚体形成，其大小均小于 100 bp。



M：Marker；1：0 h；2：1 h；3：2 h；4：4 h；5：5 h

图 1　失血性休克大鼠心肌 cDNA ND1β-actin 基因共扩增电泳结果

Fig 1　Electrophoretic results of ND1 and β-actin gene after RT-PCR from cDNA of rat myocardial cells after hemorrhagic shock



M：Marker；1：0 h；2：1 h；3：2 h；4：4 h；5：5 h

图 2　失血性休克大鼠肠上皮 cDNA ND1β-actin 基因共扩增电泳结果

Fig 2　Electrophoretic results of ND1 and β-actin gene after RT-PCR from cDNA of rat intestinal epithelial cells after hemorrhagic shock

2.2　ND1、ND2 亚单位及线粒体转录因子 A（mtTFA）基因 RT-PCR 产物的定量检测

将上述各组每只动物的 ND1、ND2、mtTFA 分别与β-actin 基因的 RT-PCR 产物电泳后经凝胶扫描仪扫描，然后用 quantity one 定量及 SPSS 10.0 软件进行析因设计资料的双因素方差分析处理。结果见表 1～3，除 ND1 基因转录水平在失血性休克 5 h 与失血性休克 2 h 两组间相比较无差别（$P=0.910$）外，其余各个基因转录水平在两种组织细胞中进行多重比较均有显著差异（$P<0.01$）。

表 1　失血性休克大鼠心肌和肠上皮线粒体 ND1 基因的转录水平改变（$n=4$　$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　Changes of mitochondrial ND1 gene transcription of myocardial cells and intestinal epithelial cells of rats after hemorrhagic shock（$n=4$　$\bar{x}\pm s$）

Group	Heart	Intestine
Normal	0.929±0.005△△	1.779±0.012△△
1 h	1.064±0.004**	1.149±0.007**
2 h	1.086±0.003**△△	1.522±0.046**△△
4 h	1.017±0.003**△△	1.261±0.003**△△
5 h	1.157±0.006**△△	1.450±0.017**△△

**：$P<0.01$，*vs* normal；△△：$P<0.01$，*vs* 1 h after hemorrhagic shock

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 失血性休克大鼠心肌和肠上皮线粒体 ND2 基因的转录水平改变($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of mitochondrial ND2 gene transcription of myocardial cells and intestinal epithelial cells of rats after hemorrhagic shock ($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Heart	Intestine
Normal	1.291±0.007△△	1.210±0.010△△
1 h	1.028±0.012**	0.953±0.010**
2 h	1.564±0.011**△△	1.615±0.014**△△
4 h	1.308±0.016**△△	1.444±0.018**△△
5 h	1.260±0.007**△△	1.045±0.006**△△

**: $P<0.01$, *vs* normal; △△: $P<0.01$, *vs* 1 h after hemorrhagic shock

表 3 失血性休克大鼠心肌和肠上皮线粒体 mtTFA 基因的转录水平改变($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Tab 3 Changes of mitochondrial ND1 gene transcription of myocardial cells and intestinal epithelial cells of rats after hemorrhagic shock ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Group	Heart	Intestine
Normal	0.890±0.018△△	1.175±0.022△△
1 h	0.727±0.019**	0.528±0.017**
2 h	0.641±0.014**△△	0.832±0.019**△△
4 h	0.912±0.004**△△	1.526±0.013**△△
5 h	0.726±0.014**△△	1.491±0.014**△△

**: $P<0.01$, *vs* normal; △△: $P<0.01$, *vs* 1 h after hemorrhagic shock

3 讨论

线粒体是细胞呼吸和氧化磷酸化的主要场所,在维持细胞能量代谢方面具有举足轻重的作用,而以往的研究大多局限于通过测定组织细胞呼吸链氧化酶、糖酵解酶、离子浓度及相应的 ATP 酶等方面的变化,来衡量组织、细胞的缺血缺氧性损害[2~4]。线粒体 DNA (mtDNA)是线粒体特有的、独立于核基因组的遗传物质,mtDNA 编码的 13 条多肽是维持线粒体呼吸链复合体功能完整性的重要组成部分,而对线粒体编码基因在缺血缺氧性损害中的表达变化规律,目前尚少见有系统文献报道。

NADH 脱氢酶(复合体Ⅰ)是线粒体呼吸链的关键酶之一,也是线粒体氧化磷酸化途径的最大和结构最为复杂的酶复合体。线粒体呼吸链编码基因的表达受 mtTFA、NRF-1(核呼吸因子-1)、NRF-2(核呼吸因子-2)、SP1 等核转录因子的调节[5~8]。mtTFA 在线粒体 DNA 的复制和线粒体发生中发挥关键的调节因子的作用。Larsson 等[9]研究发现,在胚胎细胞中 mtTFA 等位基因功能全部缺失(homozygous knockout)的小鼠,其心肌细胞内线粒体 DNA 含量缺如,呼吸链氧化磷酸化功能完全丧失;在胚胎细胞中 mtTFA 等位基因功能不完全缺失(heterozygous knockout)的小鼠,其心肌细胞内线粒体 DNA 含量明显减低,同时伴有呼吸链氧化磷酸化功能缺陷。在严重创伤、失血性休克、烧伤等病理条件下 mtTFA 基因及其蛋白产物的表达变化规律,国内外文献尚缺乏相关报道。从基因水平探讨 NADH 脱氢酶各亚单位在缺血缺氧性损害中的变化规律,将促进线粒体功能保护与缺血缺氧性损害防治研究进一步深入。为此,本研究采用大鼠失血性休克动物模型,利用 RT-PCR 技术对心肌和肠上皮细胞呼吸链复合体Ⅰ亚单位 ND1、ND2 基因与核转录因子 mtTFA 基因的转录水平变化进行了探讨。

本研究初步揭示了失血性休克大鼠心肌和肠上皮细胞呼吸链复合体Ⅰ亚单位 ND1、ND2 基因和线粒体转录因子 A(mtTFA)的转录水平变化规律(见表 1~3):①大鼠失血性休克后心肌细胞 ND1 基因转录水平均显著高于正常对照组;而肠上皮细胞 ND1 基因转录水平均显著低于正常对照组。②失血性休克各组大鼠 ND2 基因的转录水平从失血性休克 2 h 后才开始短暂增高,失血性休克 4 h 达到基因转录水平高峰,5 h 后表现为下降趋势。③两种组织细胞的 mtTFA 的基因转录水平失血性休克 1 h 后下降,至 4 h 才开始升高,但 5 h 后该基因在心肌细胞降至略低于失血性休克1 h 转录水平,而在肠上皮细胞仍高于正常对照组。

失血性休克发生后,机体由于缺血缺氧,细胞能量供应急剧下降,线粒体可通过多个环节如基因转录、翻译、蛋白质空间构象的调节来增强线粒体呼吸链转运电子、合成 ATP 的能力。本研究表明,同一组织(心肌或肠上皮细胞)中,ND1、ND2 基因转录水平的变化以及同一基因在两种不同组织细胞中的基因转录水平的变化不尽相同,可能与以下因素有关:①同一种组织细胞中,ND1、ND2 基因在线粒体呼吸链复合体Ⅰ中的转录调节方式存在差异,这种差异可能与 ND1、ND2 基因转录生成的 mRNA 稳定性、ND1 和 ND2 亚基蛋白的降解代谢速度存在差异有关,并反映出 ND1、ND2 在复合体Ⅰ中发挥的重要性可能不尽相同。虽然这两个亚基都位于线粒体呼吸链复合体Ⅰ“L”形结构的同一端长臂上,在传递电子的过程中可能发挥着不同的作用。②大鼠失血性休克早期(1~2 h)心肌和肠上皮细胞的 mtTFA 基因转录水平都显著降低,休克 4h 后才有转录水平的增高,提示失血性休克后 mtTFA 基因转录水平的调节过程发生较晚,可能由于 mtTFA 基因定位于细胞核 DNA 中,还存在转录后水平的调节方式或其它核转录因子如 NRF-1、NRF-2 与 mtTFA 之间的相互作用[9]。③与肠上皮细胞相比,心肌细胞在缺血缺氧性损害中的能量储备和代偿能力较强,因此在失血性休克大鼠心肌细胞中 ND1 基因转录表现为迅速增强,并持续保持上升

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

水平；而 mtTFA 基因在失血性休克后转录水平的变化幅度较肠上皮细胞平缓，提示其作为一种核转录因子在心肌细胞线粒体编码基因中发挥的调控作用可能较为温和。本实验提示：ND1 亚单位基因转录可能存在心肌和肠上皮两种不同组织细胞的差异性，而这种现象在 ND2 亚单位及 mtTFA 基因的转录中表现较不明显。ND1 基因是否与这两种不同组织细胞在缺血缺氧性损害中的敏感性差异有关，值得进一步研究。

参考文献：

[1] 朱善宏，廖明永，陈克明，等. 失血性休克致鼠心肌线粒体内膜的损伤[J]. 第二军医大学学报，1992，13(3)：212－215.

[2] Li L, Liu G. Protective effects of schisanhenol against oxygen free radical induced injury of rat cerebral mitochondria and synaptosomes[J]. Yao Xue Xue Bao, 1998, 33(2): 81－86.

[3] Wan Y I L, Hui T, Zong-Cheng Y, *et al*. Changes of myocardial mitochondrial Ca^{2+} transport and mechanism in the early stage after severe burns [J]. Burns, 2002, 28(5): 431－434.

[4] 蒋建新，汪江淮，陈惠孙，等. 脓毒败血症时大鼠肾脏线粒体损伤及其机制的研究[J]. 中国危重病急救医学，1992，4(4)：195－198.

[5] Moraes C T. Moraes What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells[J]? Trends Genet, 2001, 17(4): 199－205.

[6] Scarpulla R C. Scarpulla Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1576(1－2): 1－14.

[7] Miranda S, Foncea R, Guerrero J, *et al*. Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(1): 44－49.

[8] Zaid A, Li R, Luciakova K, *et al*. On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes[J]. J Bioenerg Biomembr, 1999, 31(2): 129－135.

[9] Larsson N G, Wang J, Wilhelmsson H, *et al*. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice [J]. Nat Genet, 1998, 18(3): 231－236.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)16-1435-01

个案与短篇

头胸导联与 Wilson 导联心电图对阵发性心房颤动患者 P 波振幅时间的对比分析

Comparative analysis of P wave dispersion in patients of paroxysmal atrial fibrillation with head chest lead electrocardiogram and Wilson lead electrocardiogram

庄国强，宋治远，舒茂琴，孙玉锦，杨 柳，柴 虹 （第三军医大学西南医院心血管内科，重庆市介入心脏病学研究所，重庆 400038）

头胸导联心电图是一种新型的双极导联系统，临床应用结果显示对右室梗塞、缺血及平均心电轴等诊断优于 Wilson 导联。为了进一步探讨头胸导联的临床应用价值，我们对 43 例阵发性房颤患者分别进行头胸导联和 Wilson 导联心电图检查，并对两种心电图的 P 波振幅及时间进行对比分析。

1 资料与方法

本组 43 例均为我院 2002 年 3 月至 6 月门诊和住院的阵发性房颤患者。其中男性 18 例、女性 25 例，平均年龄(45.23±10.38)岁。病因有冠心病 15 例，风心病 12 例，高血压病 7 例，先心病 4 例，特发性房颤 4 例，甲亢 2 例。对本组患者采集头胸导联及 Wilson 导联心电图，分别测出两种导联 P 波时间和振幅。并对头胸导联 HL3、HO、HR3、HV1、HV2、HV3、HV4、HV5、HV6 与 Wilson 导联Ⅱ、Ⅲ、avF、V1、V2、V3、V4、V5、V6 相对应导联的 P 波进行对比分析。

统计学处理：采用 t 检验。

2 结果

头胸导联心电图 HL3、HO、HR3、HV1、HV2、HV3、HV4、HV5、HV6 与 Wilson 导联Ⅱ、Ⅲ、avF、V1、V2、V3、V4、V5、V6 相对应导联的 P 波对比结果显示：头胸导联心电图 P 波的振幅，明显高于 Wilson 导联；头胸导联心电图 P 波时间也明显长于 Wilson 导联心电图(表 1)。

表 1 43 例患者的头胸导联(HD)与 Wilson 导联相对应的 P 波时间、振幅的比较($\bar{x}\pm s$)

导联名称	振幅(mv)		时间(ms)	
Wilson *vs* HD	Wilson	HD	Wilson	HD
Ⅱ *vs* HL3	0.099±0.025	0.124±0.037**	128.18±10.41	136.36±6.77**
Ⅲ *vs* HR3	0.075±0.031	0.113±0.033**	104.54±9.86	127.73±8.36**
avF *vs* HO	0.087±0.027	0.118±0.035**	110.91±7.93	126.82±7.16**
V1 *vs* HV1	0.118±0.046	0.131±0.048**	94.54±14.99	114.55±9.88**
V2 *vs* HV2	0.110±0.300	0.121±0.039**	94.91±13.62	110.40±10.10**
V3 *vs* HV3	0.830±0.029	0.120±0.039**	84.10±11.04	97.73±10.80**
V4 *vs* HV4	0.082±0.023	0.123±0.038**	84.09±11.04	98.66±9.07**
V5 *vs* HV5	0.08 ±0.024	0.128±0.033**	83.18±12.48	91.60±10.02**
V6 *vs* HV6	0.076 ±0.025	0.119±0.034**	82.73±14.36	90.45±10.17**

**：与相应的 Wilson 导联比较，$P<0.05$

（下转 1438 页）

作者简介：庄国强(1967－)，男，河南省原阳县人，主管技师，主要从事心电生理及心电图方面的研究。电话：(023)68754470

收稿日期：2003-07-18；修回日期：2003-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net