DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.002
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

文章编号:1000-5404(2003)15-1315-03

论著

失血性休克对肠上皮细胞线粒体编码的细胞色素氧化酶mRNA表达变化的研究

柏干荣,陆松敏,李 萍,刘建仓,郭素清,陈 凤 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 观察大鼠失血性休克后肠上皮细胞线粒体编码基因细胞色素氧化酶亚基(COX Ⅰ、COX Ⅱ、COX Ⅲ)mRNA的表达变化。方法 采用失血性休克模型,分离肠上皮细胞后进行RNA的提取,应用RT-PCR检测COX Ⅰ、COX Ⅱ、COX ⅢmRNA的表达变化。结果 大鼠失血性休克1 h,COX Ⅰ、COX Ⅱ基因表达开始增强,2 h表达最强,以后随着休克时间延长,表达又逐渐减弱,失血性休克晚期5 h表达显著低于正常对照组($P<0.01$)。结论 失血性休克可引起大鼠肠上皮细胞线粒体编码基因COX Ⅰ、COX Ⅱ mRNA的明显改变。

关键词:失血性休克;线粒体;基因表达
中图法分类号:R322.4^{+}5; R394.3; R605.971 文献标识码:A

Expression changes of mitochondrial encoding cytochrome oxidase genes in intestinal epithelial cells of hemorrhagic shock rats

BAI Gan-rong, LU Song-min, LI Ping, LIU Jian-cang, GUO Su-qing, CHEN Feng (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the expression changes of mitochondrial encoding cytochrome oxidase genes (COX Ⅰ, COX Ⅱ and COX Ⅲ) of intestinal epithelial cells in hemorrhagic shock rats. Methods The model of hemorrhagic shock of rats was used in this experiment. The RNA was extracted from the intestinal epithelial cells. Reverse transcriptional polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to detect the expression changes of COX Ⅰ, COX Ⅱ and COX Ⅲ. Results The expressions of COX Ⅰ and COX Ⅱ increased at 1 h and peaked at 2 h following hemorrhagic shock, but they gradually decreased in a time-dependent manner and were the lowest at 5 h following hemorrhagic shock. Conclusion Hemorrhagic shock can significantly change the expressions of mitochondrial encoding genes COX Ⅰ and COX Ⅱ mRNA in intestinal epithelial cells in rats.

Key words: hemorrhagic shock; mitochondria; gene expression

失血性休克可导致机体各组织器官损伤,其中肠道是最容易受损伤的主要靶器官[1]。有报道失血性休克后肠粘膜上皮细胞容易受损与线粒体氧化磷酸化功能障碍有关[2]。细胞色素氧化酶(Cytochrome oxidase, COX)是线粒体呼吸链氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation, OP)过程中的关键酶,其损伤可直接影响线粒体功能。但多年来失血性休克与COX的损伤主要局限在其形态、功能和酶的活性等方面的研究,对其基因表达变化情况,目前国内外未见报道。由于线粒体本身具有相对独立的基因组,它们编码部分线粒体呼吸链有关蛋白,这些蛋白的基因表达可能与失血性休克对肠上皮细胞线粒体的损伤有关。本研究对失血性休克对线粒体自主基因中编码细胞色素氧化酶的基因表达进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

健康Wistar雄性大鼠30只(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量(250±20)g。随机分为6组:正常对照组(休克前),休克1 h组,休克2 h组,休克3 h组,休克4 h组,休克5 h组。每个时相点均5只大鼠。

1.2 模型制作

采用大鼠失血性休克模型,动物禁食过夜,3%戊巴比妥钠腹腔麻醉,行右股动脉插管,连接三通,分别连接注射器和血压

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202)
作者简介:柏干荣(1958-),女,四川省广元市人,博士,副主任药师,主要从事创伤与线粒体DNA损伤及创伤药理方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)68757432
通信作者:陆松敏,电话:(023)68757232
收稿日期:2002-12-04;修回日期:2003-05-21

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

计。放血(约10 min)降至血压5.3 kPa(40 mmHg),维持该血压2 h,2 h后继续观察至5 h。正常对照组(休克前)处理同上,仅不放血。动物于休克前,休克后1、2、3、4、5 h分别处死大鼠,取回肠分离肠上皮细胞,提取RNA备用。

1.3 引物设计

根据GenBank中的Rattus norvegicus(Wistar) mitochondrial genome sequence应用Whitehead Institute for Biomedical Research www primer picking software(primer3)进行引物设计。以看家基因β-actin作为内对照,引物设计如下,由上海博亚公司合成。

COX Ⅰ(1 047 bp)。

上游引物序列:GGGAGAAGCCTTAGTAGAGGAGATTCTC

下游引物序列:CGGGTGTCTACATCTAGGCCTACTGT

COX Ⅱ(906 bp)

上游引物序列:TCGACCCCCTACAACTGGTTTCAAGC

下游引物序列:AAATCATGTGGATGTGTCTAGTTGTGGC

COX Ⅲ(1 001 bp)

上游引物序列:ATTCACCCTTCTAGTCAGCCTGTACC

下游引物序列:TGGGTTTGCTTTTTCGGAGTATAAG

β-actin(270 bp)

上游引物序列:AAATCGTCGGTGACATCAAA

下游引物序列:ATCGTACTCGTGCTTGCTGA

1.4 总RNA的分离

应用Tripure isolation reagent(Roche)分离细胞总RNA,按说明书要求操作。RNA分离的有关物品均以DEPC(Sigma)处理后高压消毒。其A_{260}/A_{280}为1.6~2.0。

1.5 RT-PCR检测

COXⅠ、COXⅡ、COXⅢmRNA的变化应用日本宝生物公司TaKaRa RT-PCR Kit(AMV),按要求操作。逆转录反应条件是30 ℃ 10 min,45 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min。PCR扩增循环条件是95 ℃变性40 s,72 ℃延伸70 s,55 ℃退火30 s,反应30个循环,最后72 ℃延伸10 min。

琼脂糖凝胶电泳检测,紫外灯下观察,凝胶成像系统扫描存盘。记录各条带积分光密度(IOD),将各个检测基因与自身β-actin条带IOD相比较得到其相对IOD。

1.6 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,各组间比较采用单因素方差分析,t检验。

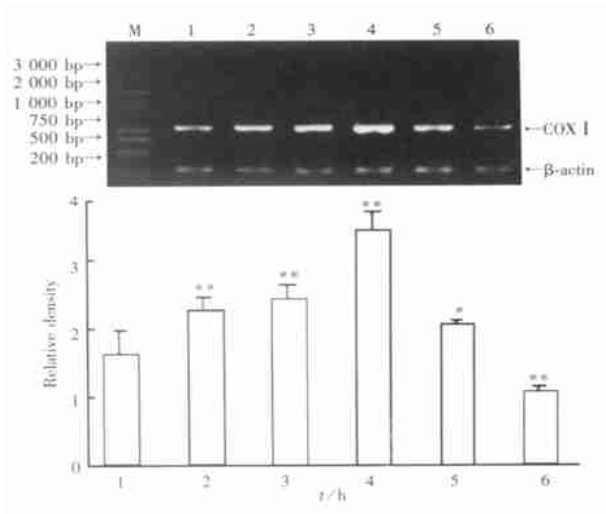
2 结果

2.1 失血性休克大鼠对肠上皮细胞线粒体编码基因COX Ⅰ mRNA的改变

RT-PCR结果显示,正常情况下,肠上皮细胞COX Ⅰ mRNA有一定程度的表达。失血性休克后1 h其表达量开始逐渐增加,3 h达高峰,之后逐渐降低,到休克晚期5 h时,显著低于正常对照组($P<0.01$),见图1。

2.2 失血性休克大鼠对肠上皮细胞线粒体编码基因COX Ⅱ mRNA的改变

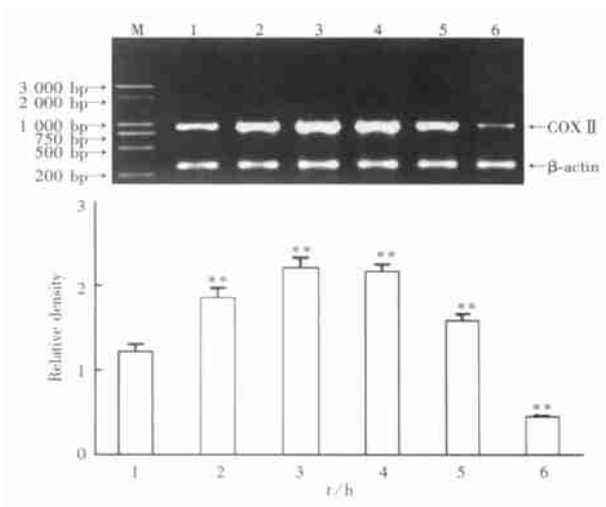
正常情况下,肠上皮细胞COX Ⅱ mRNA稳定表达,失血性休克后1 h其表达量开始逐渐增加,2 h达高峰,维持到3 h,4 h时其表达逐渐减少,5 h时显著低于正常对照组($P<0.01$),见图2。



1: Normal control; 2: Shock 1 h; 3: Shock 2 h; 4: Shock 3 h; 5: Shock 4 h; 6: Shock 5 h; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* normal control group

图1 失血性休克对肠上皮细胞线粒体编码基因COXⅠ mRNA的改变

Fig 1 Effects of hemorrhagic shock on the expression of COX Ⅰ mRNA in rats



1: Normal control; 2: Shock 1 h; 3: Shock 2 h; 4: Shock 3 h; 5: Shock 4 h; 6: Shock 5 h; **: $P<0.01$ *vs* normal control group

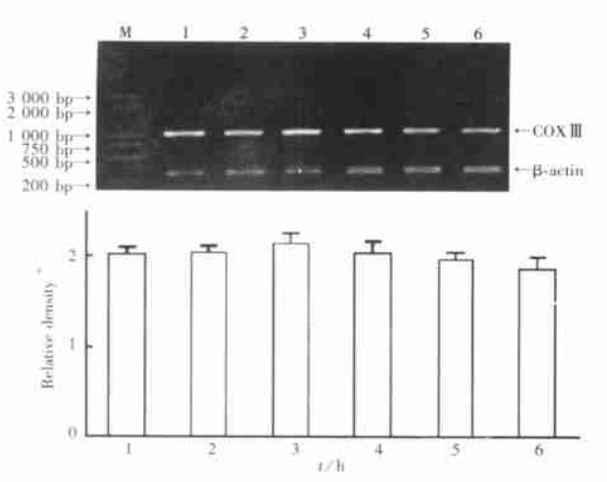
图2 失血性休克对肠上皮细胞线粒体编码基因COX Ⅱ mRNA的改变

Fig 2 Effects of hemorrhagic shock on the expression of COX Ⅱ mRNA in rats

2.3 失血性休克大鼠对肠上皮细胞编码基因COX Ⅲ mRNA的表达变化

正常情况下,肠上皮细胞COX Ⅲ mRNA稳定表达,失血性休克后1 h其表达量有所增加,2 h其表达量较高,休克晚期表达呈减少趋势,但与正常对照组相比,无统计学意义。见图3。

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



1: Normal control; 2: Shock 1 h; 3: Shock 2 h; 4: Shock 3 h; 5: Shock 4 h; 6: Shock 5 h

图 3　失血性休克对肠上皮细胞线粒体编码基因 **COX Ⅲ mRNA** 的改变

Fig 3　Effects of hemorrhagic shock on the expression of COX Ⅲ mRNA in rats

3　讨论

3.1　缺血缺氧可使线粒体编码基因 mRNA 表达改变

大鼠失血性休克后 1 h COX Ⅰ 和 COX Ⅱ mRNA 表达量开始逐渐增加, 3 h 达高峰, 之后逐渐降低, 到休克晚期 5 h 时, 显著低于正常对照组 ($P<0.01$); COX Ⅱ失血性休克后其表达变化不明显。这些研究结果显示, 失血性休克对于线粒体编码基因 COX Ⅰ、COX Ⅱ mRNA 的表达具有明显影响。线粒体自主编码基因之间存在对缺血缺氧敏感性的差异。这种差异的存在可能与缺血缺氧时线粒体 COX 功能改变及 OP 障碍、细胞受损密切相关, 这与 Abe 等[3] 的有关报道一致。Abe 研究发现缺血缺氧可使线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) COX 表达紊乱, mtDNA 受损。其机制可能是在翻译水平热休克蛋白(Heat shock proteins, HSP)被抑制, 扰乱了 mtDNA 在转录水平的表达。mtDNA 表达障碍又更进一步使细胞能量产生不足, 最终导致细胞死亡。

3.2　氧自由基导致肠粘膜上皮细胞线粒体编码基因 mRNA 的表达改变

失血性休克后肠粘膜上皮细胞缺血缺氧, 线粒体 OP 功能障碍。线粒体是真核细胞中最重要的细胞器, 它是细胞有氧呼吸的主要场所, 电子通过电子链传递给分子氧的呼吸作用也是作为呼吸副产品的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)和自由基的主要细胞内来源。因此, 线粒体既是氧自由基产生的重要场所, 又是氧化损伤的主要靶细胞器。缺血缺氧时, 氧自由基增加。当自由基产生增多且不能被抗氧化剂中和时可泄出对膜脂、蛋白质、DNA 及其它生物大分子造成损伤。在 DNA 中生成胸苷乙二醇和 8-羟基鸟嘌呤, 抑制了转录和翻译, 使休克晚期 COX 表达降低; 另一方面由缺血缺氧, 使氧利用能力降低, 能量代谢障碍, ATP 生成减少。而为了补偿 ATP 生成的减少, 缺血性脏器诱导核编码的 OP 基因, ANT1、ANT3 和 ATPsynβ 以及 mtDNA 基因, Cytb、12 S rRNA、16 S rRNA、COX 表达。

3.3　mtDNA 独特的性质容易引起 COX 基因改变

mtDNA 为一 16 596 bp 的闭环双链 DNA 分子, 其自身具有相对独立的基因组, 它编码参与 OP 过程的 13 种多肽。其中最大的 3 个亚基(COX Ⅰ、COX Ⅱ、COX Ⅲ)由 mtDNA 编码。由于 mtDNA 是游离的, 缺少组蛋白的保护, 无完整的修复系统, 又处在一个高氧化还原环境中而产生大量的氧自由基, 所以 mtDNA 比核 DNA 更易受损[4]。我们的前期研究也证实了这一点。已有研究表明缺血缺氧可以引起线粒体基因的突变, 而它与基因表达之间的关系很值得探讨。另外需要注意的是, 线粒体中存在许多蛋白, 它们是由核基因所编码的, 它们的种类远多于线粒体自身, 例如在所有哺乳动物真核细胞的 COX 由 13 个亚基组成, 线粒体仅编码其中最大的 3 个亚基(COX Ⅰ、COXⅡ、COX Ⅲ), 其余 10 个亚基(COX Ⅳ, Va, Vb, Ⅵa, Ⅶb, Ⅶc, Ⅷa, Ⅷb, Ⅷc, 和 Ⅷd)均由核 DNA (Nuclear DNA, nDNA)编码。COX 具有的这种由线粒体基因组与核基因组各自编码的亚基共同组成的复合物的特性, 被认为是研究线粒体和核基因组之间转录、翻译及其调节等相互作用的一个典型, 研究此相互作用将有利于弄清在特定组织线粒体生物起源的变化和检测从两基因组发展下来的特定 mRNA 的改变。并且线粒体编码基因的表达也受到核呼吸因子(Nuclear respiratory factor, NRF)、线粒体转录调节因子等的调控。因而线粒体基因与核基因之间的相互协调作用的研究也将成为研究的难点和热点。

参考文献:

[1] Parikh A A, Moon M R, Pritts T A, *et al*. IL-1 beta induction of NF-kappaB activation in human intestinal epithelial cells is independent of oxyradical signaling[J]. Shock, 2000, 13(1): 8—13.

[2] Cairns C B. Rude unhinging of the machinery of life: metabolic approaches to hemorrhagic shock[J]. Curr Opin Crit Care, 2001, 7(6): 437—443.

[3] Abe K, Kawagoe J, Lee T H. Disturbance of a mitochondrial DNA expression in gerbil hippocampus after tansient forebrain ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1993, 19(1—2): 69—75.

[4] Poulton J, Marchington D R. Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications[J]. Reproduction, 2002, 123(6): 751—755.

(编辑　薛国文)

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