

用 cDNA 微阵列研究内毒素休克小鼠肺组织 基因表达谱的改变

袁开宇¹⁾ 赵震宇¹⁾ 刘 瑛 邹 江 刘梅冬 陈广文 尤家驷 肖献忠*

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 长沙 410078)

摘要 利用 cDNA 微阵列检测了小鼠内毒素休克 2 h 及 20 h 肺组织基因表达谱的改变. 发现内毒素休克 2 h 有 128 个基因表达上调, 3 个基因下调; 内毒素休克 20 h 有 51 个基因表达上调, 21 个下调. 并用 RT-PCR 进一步验证了结果的可靠性. 初步分析了基因表达谱改变的意义. 有助于从基因组水平阐明内毒素休克的分子机制.

关键词 基因表达谱, 内毒素休克, 肺, 小鼠

学科分类号 R363

败血症休克是常见危重病症, 近年虽采用了强有力的抗生素及有效的支持治疗, 其死亡率仍高达 30% ~ 60%^[1].

败血症休克的病理基础是全身性炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)^[2], 引起 SIRS 的最主要原因是革兰氏阴性菌胞壁上的内毒素, 其主要成分为脂多糖 (LPS). 近年来的研究表明, LPS 与血液中的 LPS 结合蛋白 (LBP) 结合, 作用于单核细胞或多形核细胞膜受体 CD14, 激活多种细胞内蛋白激酶系统, 引起 NF- κ B 及 NF-IL-6 等转录因子活化, 诱导 TNF- α 、IL-1、IFN 等促炎因子及 IL-4、IL-6、IL-10、IL-11 等抗炎因子的转录明显增加^[3,4]. 同时, 在败血症休克的发生发展中, 一氧化氮 (NO)、脂质介质和热休克蛋白的产生也增多^[5]. 上述多种因子与靶细胞相互作用, 使得败血症休克的病理生理机制错综复杂, 至今仍未完全阐明. 以往的研究大多只针对单个或数个细胞因子、炎症介质及其细胞信号转导途径中某个环节, 而忽略了多种炎症介质及信号转导途径的同时存在及相互作用. 因此, 过去经典的研究方法不利于全面系统地阐明败血症休克这样极其复杂的病理生理过程的发生机制^[6].

为了系统地了解败血症休克发生发展过程中多个基因的改变情况, 我们利用 cDNA 微阵列 (microarray) 检测了正常、内毒素休克早期和晚期小鼠肺组织基因表达谱 (gene expression profile) 的变化, 试图发现某些以前研究中未知的与败血症休克密切相关的基因及信号传导途径, 以便进一步阐明其发生机制, 为其临床防治提供新的线索.

1 材料与方 法

1.1 材 料

Balb/c 小鼠购自北京医科大学动物中心; 大肠杆菌内毒素 (O111B4) 购自 Sigma 公司; Trizol 购自美国 GIBCO 公司; DNase I 购自 Roche 公司; cDNA 微阵列膜 (AtlasTM Mouse 1.2 Array Kit) 购自 Clontech 公司; 微阵列密度分析软件为本科室自行开发; PCR 引物由上海生工生物公司合成.

1.2 内毒素休克模型的复制

Balb/c 小鼠均为雄性, 体重 18~24 g. Balb/c 小鼠经腹腔注射大肠杆菌内毒素 (溶于生理盐水, 15 mg/kg) 后, 观察 72 h 内死亡率, 一部分小鼠于注射后 2 h 及 20 h 摘取心、肝、肺、肾、脾、脑和肌肉组织, 用液氮快速冷冻后转至 -80 °C 冰箱保存, 对照组仅注射等量生理盐水.

1.3 RNA 提取及去 DNA 消化处理

用 Trizol 抽提肺组织总 RNA, DNase I 消化去除 gDNA 后再用 Trizol 抽提总 RNA 一次, 用分光光度计测 RNA 浓度及纯度.

1.4 cDNA 探针的标记与纯化

每样品取 5 μ g 总 RNA, 加 1 ml cDNA 合成引物 (cDNA synthesis primer, CDS) (Clontech 公司), 用 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 处理水调节总体积到 2 μ l, 在 PCR 仪中进行反应: 70 °C 变性 2 min, 50 °C 复性 2 min; 然后加入 3.5 μ l α -³²P dATP

* 通讯联系人.

¹⁾袁开宇和赵震宇并列为第一作者.

Tel: 0731-4805491, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com

收稿日期: 2001-09-11, 接受日期: 2001-11-28

(北京亚辉公司), 0.5 μ l DTT (100 mol/L), 10 \times 缓冲液 1 μ l, 莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, MMLV-RT) 1 μ l (100 U/ml), 于 50 $^{\circ}$ C 逆转录 20 min; 再用 Clontech 公司 kit 中的纯化柱纯化探针. 探针的放射性强度在 6.7×10^5 Bq 以上.

1.5 杂交、洗膜及放射自显影

于标记探针中加 1/10 体积的 10 \times 变性液 (1 mol/L NaOH, 0.5 mol/L EDTA), 加 Cot-1 DNA 1 μ l, 于 68 $^{\circ}$ C 变性 20 min, 加 1 倍体积 2 \times 复性液 (NaH_2PO_4 , pH 7.0) 于 68 $^{\circ}$ C 复性 10 min. 将 Mouse cDNA Array 1.2 微阵列膜于 68 $^{\circ}$ C 行预杂交 30 min 后, 于每 1 ml 杂交液中加 Bq 为 1.7×10^5 探针杂交 16 h. 2 \times SSC, 1% SDS 65 $^{\circ}$ C 洗膜 20 min \times 2 次, 0.1 SSC, 0.5% SDS 65 $^{\circ}$ C 洗膜 20 min \times 1 次, 用 Kodak 胶片于 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 3~7 d.

1.6 图像分析

胶片显影后用扫描仪扫描. 用本室自行设计的密度分析软件分析杂交的相对密度. 以微阵列膜中的看家基因三磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 做内对照, 计算出各杂交点密度变化的倍数, 以比对照组相应杂交点大于 2 倍或小于 2 倍作为判断该基因表达上调或下调的依据.

1.7 RT-PCR

选在休克 20 h 高表达的基因 4 个, 分别设计引物, 以正常及内毒素休克 20 h 的小鼠肺组织总

RNA 为模板进行 RT-PCR 反应, 以 GAPDH 为内对照, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色后于紫外透射仪摄像.

2 结果

2.1 小鼠死亡率

Balb/c 鼠腹腔注射大肠杆菌内毒素 (15 mg/kg) 后, 其 72 h 内死亡率为 59%, 其中绝大部分于 24 h 内死亡 (44%) (图 1).

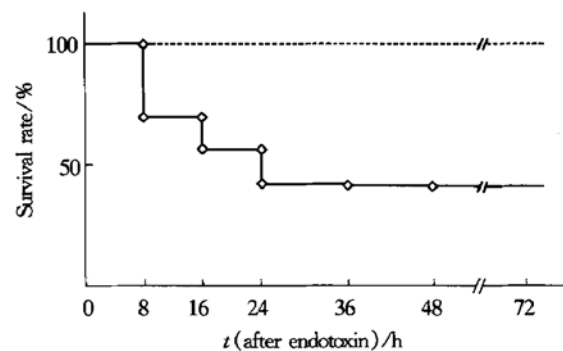


Fig. 1 The survival rate of Balb/c mice treated with *E. coli* endotoxin

---: control group; \diamond — \diamond : endotoxic shock group.

2.2 小鼠内毒素休克后肺组织基因表达谱改变

将正常、内毒素休克 2 h 及 20 h 小鼠肺组织总 RNA 所标记的 cDNA 探针分别与 Mouse cDNA Array 1.2 微阵列杂交后, 利用本科室自行开发的密度分析软件分析各点阵的杂交点密度 (图 2).

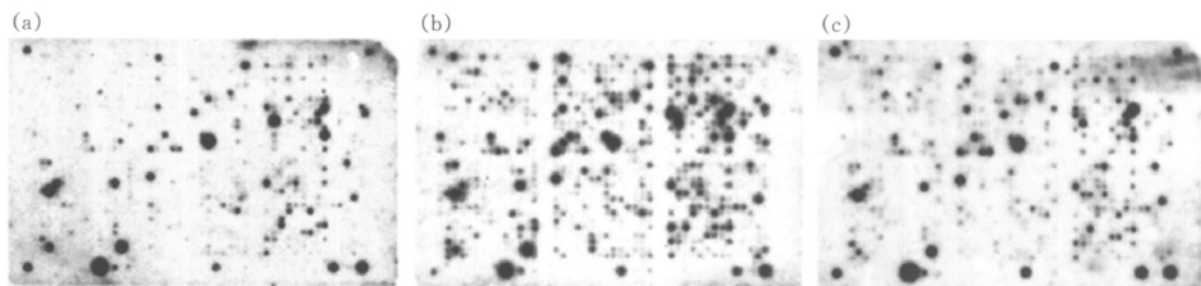


Fig. 2 The changes of gene expression profiles in lung tissues of mice during endotoxic shock

(a) normal mice; (b) 2 h after endotoxin; (c) 20 h after endotoxin.

内毒素休克 2 h 与正常肺组织相比有 128 个基因表达上调 (密度比值 > 2), 3 个基因下调 (密度比值 < 0.5) (图 3). 上调的 128 个基因主要属于核蛋白、转录激活因子及抑制因子、膜蛋白、细胞内传导、效应或调节蛋白、基本转录因子、瘤基因及抑瘤基因 (表 1).

内毒素休克 20 h 与正常肺组织相比, 有 51 个基因表达上调 (密度比值 > 2), 21 个下调 (密度比值 < 0.5) (图 3). 上调基因的主要分类与休克 2 h 的上调基因分类大致相似 (表 2). 其中有 16 个基因的上调超过 10 倍 (表 3), 5 个基因下调超过 10 倍 (表 4).

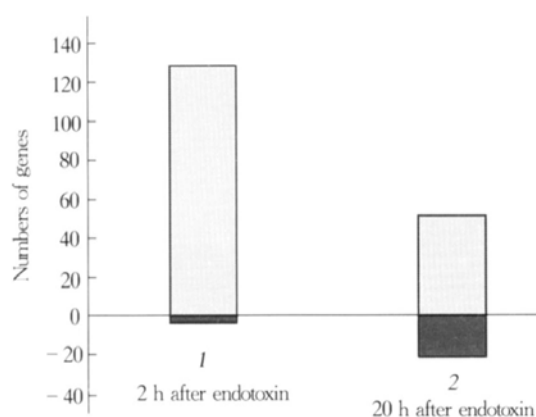


Fig. 3 The numbers of up-regulated and down-regulated genes in lung tissues of mice during endotoxic shock

□: numbers of up-regulated genes; ■: numbers of down-regulated genes. 1: 2 h after endotoxin; 2: 20 h after endotoxin.

Table 1 The main classifications of up-regulated genes at 2 h after endotoxin exposure

Names of classification	The numbers of genes
nuclear proteins	38
transcription activators and repressors	27
plasma membrane proteins	26
intracellular transducers/ effectors/ modulators	26
basic transcription factors	20
oncogenes and tumor suppressors	17
other classifications	133

Because some genes belong to several classifications, the total number of genes is more than 128.

Table 2 The main classifications of up-regulated genes at 20 h after endotoxin exposure

Names of classification	The numbers of genes
nuclear proteins	18
basic transcription factors	17
transcription activators and repressors	13
intracellular transducers/ effectors/ modulators	8
plasma membrane proteins	7
oncogenes and tumor suppressors	5
other classifications	36

Because some genes belong to several classifications, the total number of genes is more than 51.

Table 3 The names of genes up-regulated more than 10 folds at 20 h after endotoxin exposure

Gene name	GenBank accession #
interferon regulatory factor 7	U 73037
transformation related protein 53	K01700
Fc receptor, IgG, low affinity II b	X04648
transcription factor UBF	X60831
Tera enhancer binding factor interacting protein 1	U 89876
forkhead box A2	X74937
M sx-interacting zinc finger	AF039567
TEA domain family member 4	D87965
Kruppel like factor 1 (erythroid)	M 97200
Kruppel like factor 4 (gut)	U 20344
trans-acting transcription factor 3	AF062567
hematopoietically expressed homeobox	Z21524
cytokine inducible SH2-containing protein 3	U 88328
mesenchyme homeobox 2	Z16406
signal transducer and activator of transcription 3	U 06922
distal-less homeobox 3	S81932

Table 4 The names of gene down-regulated more than 10 folds at 20 h after endotoxin

Gene name	GenBank accession #
transthyretin	D89076
prostaglandin D2 synthase (21 ku, brain)	X89222
estrogen related receptor, alpha	U 85259
leukemia inhibitory factor receptor	D26177
patched homolog	U 46155

内毒素休克 2 h 上调的 128 个基因中, 有 97 个在 20 h 恢复正常, 有 30 个在 20h 继续上调, 有 1 个表达下调.

2.3 RT-PCR 检测

从内毒素休克 20 h 上调的 51 个基因中, 选取 4 个基因做 RT-PCR 检测 (表 5), 发现在注射内毒素 20 h 后的肺组织中, 上述 4 个基因的表达均明显高于正常组 (图 4).

Table 5 The sequences of primers for RT-PCR

Gene name	GenBank accession #	The fold of up regulation	Sequences of primers	Length of PCR products/ bp
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	M32599		aagcccatcaccatcttcca/ cctgcttaccacctcttg	580
interferon inducible protein 1(IFP1)	U19119	10.71	actactcccaacatggcag/ tgggaaagtgggatgaagag	347
FBJ osteosarcoma (Fos)	V00727	2.83	atccttgagccagtcaaga/ gtaagtagtgagccggag	259
Jun oncogene (c-jun, Apr 1)	J04115	2.35	tgagaacttgactggtgcg/ ttgcagttgtaaccctcc	308
BTB and CNC homology 1 (BACH1)	D86603	7.52	ctcagggctctactccttg/ gctgcaaatgtcactccaga	345

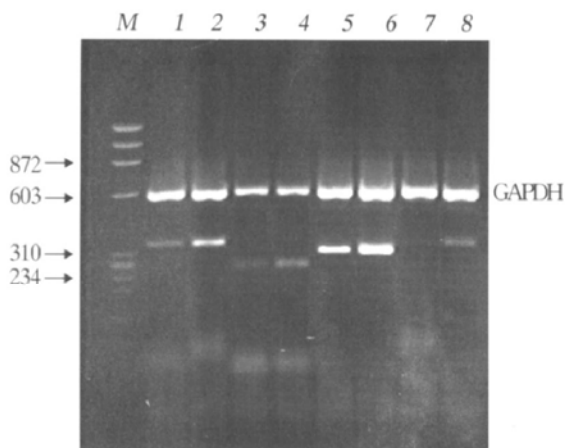


Fig. 4 RT-PCR further confirmed the results of cDNA microarray

M: marker of molecular mass (Φ X174 DNA/*Hae* III); 1, 3, 5, 7: normal lung tissues; 2, 4, 6, 8: lung tissues at 20 h after endotoxin; 1, 2: IFP1; 3, 4: Fos; 5, 6: c-jun; 7, 8: BACH1.

3 讨 论

近年来, 人类基因组计划积累了大量基因序列资源, 为 DNA 微阵列 (DNA microarray) 及 DNA 芯片 (DNA chip) 的研制开发打下了坚实的基础, 也为内毒素休克等复杂的病理过程提供了新的研究手段^[7,8].

内毒素休克的主要靶细胞为内皮细胞, 单核巨噬细胞及中性粒细胞. 肺组织在休克过程中是较早受损伤的器官之一. 它是全身血液的过滤器, 具有大量的毛细血管网及丰富的血管内皮细胞, 在休克早期即可出现白细胞扣留, 且肺泡腔中存在大量巨噬细胞. 所以, 我们将肺脏作为研究内毒素休克机制的首选组织. Bahl/c 小鼠腹腔注射内毒素后, 72 h 的死亡率为 59%, 44% 的小鼠在 24 h 内死亡. 因此, 我们选取注射内毒素 2 h 作为休克早期, 20 h 作为休克晚期, 分别观察小鼠肺组织基因表达谱的改变. 结果发现, 经内毒素处理 2 h 后, 肺组织中有 128 个基因表达上调, 3 个基因表达下调.

128 个表达上调的基因主要属于核蛋白、转录激活因子及抑制因子、膜蛋白、细胞内传导、效应或调节蛋白、基本转录因子、癌基因及抑癌基因 (因为每个基因可以归纳成 1 类以上, 所以表 1 中各类基因总数超过 128), 表明休克早期是组织中基因表达的活跃期. 随着休克从早期进入晚期, 上述在休克早期表达增高的 128 个基因大部分 (97 个基因) 恢复正常, 少部分 (30 个基因) 仍继续上调, 并有 1 个基因表达下调. 在内毒素休克 20h, 共有 51 个基因表达上调, 21 个基因表达下调. 表达上调的基因主要类别类似于休克 2 h 的分类. 上述结果表明, 在休克晚期, 组织基因表达的活跃程度不如休克早期. 我们从注射内毒素 20 h 后上调的 51 个基因中, 选取 4 个基因作 RT-PCR 检测, 发现在注射内毒素 20 h 后的肺组织中, 上述 4 个基因的表达均明显高于正常组, 说明 cDNA 微阵列的结果可靠. 深入分析休克 20 h 表达上调及下调基因的生物学功能, 可能有助于揭示内毒素休克从早期进入不可逆期的分子机理.

在内毒素休克 20 h 表达上调的 51 个基因中有 16 个基因表达水平超过正常水平的 10 倍. 这 16 个基因大部分属于转录因子类, 说明休克晚期基因的转录仍较活跃. 其中细胞因子诱导的含 Src 同源结构域 2 的蛋白 3 (cytokine inducible SH2-containing protein 3) 属于细胞因子信号抑制家族 (family of suppression of cytokine signaling, SOCS). SOCS 是多种细胞因子信号转导途径的细胞内抑制物. 内毒素休克时产生的大量细胞因子除了激活炎症及免疫反应外, 还可以活化细胞 Janus kinase/signal transducer, 进一步活化 Jak/STAT 途径, 致使 STAT1, STAT2 及 STAT3 (STAT3 在内毒素休克 20 h 表达上调也超过正常的 10 倍) 等转录因子活化并转入细胞核内, 通过使 SOCS 家族成员 cytokine inducible SH2-containing protein3 转录增

加, 而抑制细胞因子的作用^[9, 10]. 此细胞因子抑制物在休克晚期持续增高, 可能是机体抵抗内毒素休克的重要机制, 它在内毒素休克进程中的病理生理意义有待进一步深入研究阐明. 在内毒素休克 20h 表达超过 10 倍的基因还有 IgG 的低亲和受体 II B (Fc receptor, IgG, low affinity II b), 此受体能抑制免疫反应, 其抑制作用是由其酪氨酸为基础的免疫受体抑制域 (immunoreceptor tyrosine based inhibition motif, ITIM) 介导的, 当其磷酸化后, 可结合含有 Src 同源结构域 2 的肌酸磷酸酶 (SH2-containing inositol 5'-phosphatase, SHIP) 和含有 Src 同源结构域 2 的酪氨酸磷酸酶 (SH2-containing tyrosine phosphatase 1 and 2, SHP-1 和 SHP-2), 再抑制免疫受体中以酪氨酸为基础的结构域的活化从而抑制免疫反应. 此受体的表达在内毒素休克 20 h 增高, 说明休克晚期存在着免疫抑制^[11, 12]. 在内毒素休克 20 h 表达超过 10 倍的其他基因大部分属于转录因子, 它们参与生长发育的调控及组织损伤的修复. 上述转录因子在内毒素休克中究竟发挥何种病理生理作用值得进一步深入研究.

DNA 微阵列自 1995 年出现至今, 已广泛应用于基因表达水平监测, DNA 测序, 药物筛选, 生长发育等方面的研究, 是一种可在短时间内大范围筛选差异表达基因的有效方法. 本研究采用 cDNA 微阵列技术, 在国际上首次报道了小鼠内毒素休克时肺组织基因表达谱的改变, 为从基因组水平进一步揭示内毒素休克的发病机制提供了新的信息. 目前本室正对上述基因表达改变的意义及内毒素休克小鼠其

他组织中基因表达谱的改变做进一步的研究分析.

参 考 文 献

- 1 Beishuizen A, Vermes I, Haanen C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. *Advances in Clinical Chemistry*, 1998, **33**: 54~ 131
- 2 Karima R, Matsumoto S, Higashi H, *et al.* The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today*, 1999, **5** (3): 123~ 132
- 3 Murphy K, Haudek S B, Thompson M, *et al.* Molecular biology of septic shock. *New Horizons*, 1998, **6** (2): 181~ 193
- 4 Charles A D. Proinflammatory cytokines. *Chest*, 2000, **118** (2): 503~ 508
- 5 Bone R C. Why sepsis trails fail. *J American Medical Association*, 1996, **276** (7): 565~ 566
- 6 Horn K D. Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 1998, **91** (4): 265~ 277
- 7 Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270** (5235): 467~ 470
- 8 Gerhold D, Rushmore T, Caskey C T. DNA chips: promoting toys have become powerful tools. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, **24** (5): 168~ 173
- 9 Lejeune D, Demoulin J B, Renaud J C. Interleukin induces expression of three cytokine signal inhibitors: cytokine inducible SH2-containing protein, suppressor of cytokine signaling SOCS-2 and SOCS-3, but only SOCS-3 over expression suppresses interleukin signaling. *Biochem J*, 2001, **353** (Pt 1): 109~ 116
- 10 Ogle C K, Kong F, Guo X, *et al.* The effect of burn injury on suppressors of cytokine signaling. *Shock*, 2000, **14** (3): 392~ 398
- 11 Tamir I, Stolpa J C, Helgason C D, *et al.* The Ras GAP-binding protein Pbdok is a mediator of inhibitory Fc gamma RIIB signals in B cells. *Immunity*, 2000, **12** (3): 347~ 358
- 12 Fong D C, Brauweiler A, Minskoff S A, *et al.* Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor II B that function in inhibitory signaling. *J Immunol*, 2000, **165** (8): 4453~ 4462
- 13 Yuan K Y, Zhao Z Y, Yuan C, *et al.* A study on gene expression profiles of murine tissues during endotoxic shock using cDNA microarray. *Shock*, 2001, **15** (suppl): 41

A Study on The Changes of Gene Expression Profiles in Lung Tissues During Endotoxic Shock Using cDNA Miroarray

YUAN Kai-Yu¹⁾, ZHAO Zhen-Yu¹⁾, LIU Ying, ZOU Jiang,

LIU Mei-Dong, CHEN Guang-Wen, YOU Jia-Lu, XIAO Xian-Zhong*

(Department of Pathophysiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract The gene expression profiles of 1 176 genes were analyzed using AtlasTM Mouse cDNA array 1.2 in Babl/c mice lung tissues during endotoxic shock. Results showed that the expression of 128 genes was up regulated and 3 genes down regulated at 2 hours after exposure to endotoxin; the expression of 51 genes was up regulated and 21 genes down regulated at 20 hours after exposure to endotoxin. The changes in gene expression were further confirmed by RT-PCR. The significance of above changes in gene expression was analyzed. The results would be helpful to elucidating the molecular mechanism of endotoxic shock.

Key words gene expression profiles, endotoxin shock, lungs, mice

* Corresponding author. Tel: 86-731-4805491, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com

¹⁾These two authors contributed equally to this work. Received: September 11, 2001 Accepted: November 28, 2001