

大鼠心肌缺血预适应诱导表达 上调基因的筛选和鉴定*

袁 灿 吕青兰 陈广文 刘 瑛 王尧玲 刘海军 邹 江 肖献忠**

(中南大学湘雅医学院病理生理教研室, 长沙 410078)

摘要 采用反复短时间结扎及松解左冠状动脉前降支构建大鼠心肌缺血预适应动物模型, 运用抑制消减杂交技术建立大鼠心肌缺血预适应诱导表达上调基因的消减 cDNA 文库, 通过反向 RNA 点杂交对部分文库基因进行差异表达初筛, 选取表达差异最明显的 85 个基因进行测序, 获得了 31 个核编码基因和 18 个新基因 (EST), 核编码基因中有相当一部分与细胞保护或信号转导有关, 新基因已被 GenBank 收录. 从已测序基因中任选 5 个进行 RT-PCR 检测, 并任选 2 个进行 RNA 印迹检测, 均证实缺血预适应表达增高. 上述结果为进一步深入研究缺血预适应心肌保护作用的分子机制和克隆新的缺血预适应相关基因提供了重要信息.

关键词 心肌缺血预适应, 抑制消减杂交, 基因表达

学科分类号 R36

心肌缺血-再灌注现象在临床上非常常见, 如心肺旁路手术、经皮腔内冠状动脉成形术 (PTCA)、心脏移植、心肌梗塞溶栓治疗、心绞痛等. 根据缺血程度的不同心肌缺血-再灌可能导致不同的后果: 长时间缺血后再灌可导致心肌发生不可逆的损伤——凋亡或坏死; 短时间缺血后再灌则可通过诱导心肌的内源性保护机制, 逐渐修复心肌的功能代谢紊乱, 最终部分或完全恢复心肌正常功能. 同时短时间缺血-再灌可明显提高心肌对随后较长时间缺血-再灌注损伤的抵抗性, 这种现象被称为缺血预适应 (ischemic preconditioning)^[1].

缺血预适应对心肌的保护作用已被大量实验证实, 但其作用的确切机制目前尚不清楚. 近来研究表明, 短时间心肌缺血-再灌可诱导许多具有保护作用的基因表达上调, 如抗氧化酶基因、NO 合酶、热休克蛋白、bcl-2、钙调蛋白以及一些生长因子和代谢相关酶类等. 这些基因发挥抗损伤、抗凋亡、促生长等作用, 调节缺血-再灌后心肌的功能代谢变化, 是心肌内源性保护机制的重要组成部分, 也是缺血预适应心肌保护作用的重要分子基础之一. 研究这些基因的表达变化及其意义, 对揭示心肌内源性保护的分子机制, 探寻治疗心肌缺血-再灌注损伤的分子靶具有重要意义.

然而, 以往的研究往往局限于对单个或少数几个相关基因的研究, 很难全面反映心肌缺血预适应的分子机制, 也很难有新的发现和突破. 为了克服这一缺点, 从基因组水平较全面系统地揭示缺血预

适应的心肌保护分子机制, 本实验通过反复结扎及松解大鼠左冠状动脉前降支建立心肌缺血预适应的动物模型, 采用抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术, 建立了大鼠心肌缺血预适应诱导表达上调基因的消减 cDNA 文库, 并对该文库部分基因进行了筛选和鉴定, 获得了多个大鼠心肌缺血预适应诱导表达上调基因和表达序列标签 (EST) 片段, 为进一步深入研究心肌缺血预适应的分子机制和克隆新基因提供了重要信息.

1 材料和方法

1.1 材料

体重约 250 g 的 Wistar 雄性大鼠由本校实验动物中心提供; Trizol 试剂、mRNA 提取试剂盒购自 Gibco BRL 公司; PCR-select cDNA subtraction kit、Advantage cDNA polymerase 和杂交液购自 Clontech 公司; Taq DNA 聚合酶购自华美生物工程公司; PCR 产物纯化试剂盒为 Qiagen 公司产品; pGEM-T 载体为 Promega 公司产品; 随机引物标记试剂盒为宝灵曼公司产品; [α -³²P] dCTP 购自北京亚辉公司; Titan one tube RT-PCR system 购自罗氏公司.

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G2000056908) 和国家自然科学基金资助项目 (30170373).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2002-09-23, 接受日期: 2003-01-11

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌缺血预适应动物模型的建立: 大鼠心肌缺血预适应动物模型的建立参考文献 [2], 并做了部分改动, 具体方法如下: 将 Wistar 大鼠采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 在小动物人工呼吸机维持通气下行胸骨正中切开, 结扎左冠状动脉前降支, 根据左心室壁颜色变灰白和心电图 ST 段抬高判断结扎完全, 3 min 后松解结扎线, 再灌流 10 min, 然后再次结扎 10 min, 再灌 1 h, 取左室游离壁, 立即置液氮中冷冻并置 -80℃ 保存, 对照组除不结扎冠状动脉外, 其余同上。

1.2.2 心肌总 RNA 和 mRNA 的提取: 分别按 Gibco BRL 公司的相应试剂盒说明书进行。提取的总 RNA 和 mRNA 溶于无 RNase 水中, 分光光度计定量后, -70℃ 保存备用。

1.2.3 抑制消减杂交: 按 Clontech 公司 PCR-select cDNA subtraction kit 试剂盒说明书进行。首先分别取 2 µg 缺血预适应组和假手术组心肌 mRNA 逆转录合成 cDNA, 并用 *Rsa* I 酶切成较小片段。将缺血预适应组作为受检组 (tester), 假手术组作为驱动组 (driver), 将受检组酶切后的 cDNA 分别与两种不同的接头连接, 并与过量的驱动组 cDNA 进行两轮杂交, 利用接头引物进行两次选择性 PCR, 使受检组中特异表达或高表达的片段得到扩增。将第二次 PCR 扩增产物纯化后与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。

1.2.4 反向 RNA 点杂交初步筛选差异表达基因: 通过蓝白筛选挑取白色克隆, 利用载体上的 T7、SP6 引物进行 PCR 扩增, 扩增产物热变性后, 通过真空抽吸, 等量平行点于两张尼龙膜上, 分别与等量 [α -³²P] dCTP 标记的缺血预适应组或假手术组 cDNA 探针于 72℃ 杂交过夜, 同等条件下洗膜, 并于同一张 X 光片于 -70℃ 同时曝光一天, 选取杂交信号吸光度值相差 5 倍以上的克隆进行进一步分析。

1.2.5 测序与序列分析: 将以上杂交信号吸光度比值相差 5 倍以上的克隆送上海博亚公司进行测序, 测序结果通过 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行分析鉴定。

1.2.6 RT-PCR 和 RNA 印迹进一步鉴定差异表达: 从以上已测序分析的基因中任选 5 个设计基因特异性引物, 以 GAPDH 为内对照, 缺血预适应组或假手术组总 RNA 为模板, 采用 Titan one tube

RT-PCR system 进行一步法 RT-PCR 扩增。GAPDH 上下游引物分别为 5' AAGCCCATG-ACCATCTTCCA 3' 和 5' CCTGCTTCACCACG-TTCTTG 3', 扩增片段长度为 580 bp; *c-fos* 上下游引物分别为 5' CAACCGCATGGAGTGTATTG 3' 和 5' GGAACACACTATTGCCAGGAA 3', 扩增片段长度为 231 bp; *hsp70* 上下游引物分别为 5' TTTTGCAGGACAGTCAGAGC 3' 和 5' TCTCGAGTTCACACACTGG 3', 扩增片段长度为 301 bp; *S100a8* 上下游引物分别为 5' GCAACTGAAGTGGAGAAGGC 3' 和 5' CCCACCCTTATCACCAACAC 3', 扩增片段长度为 233 bp; *MIR-30* 上下游引物分别为 5' CATCATTCTAGGCGATATCACA 3' 和 5' TGCAAATTAGCTCTTAGTCAGGG 3', 扩增片段长度为 224 bp; *hsp40* 上下游引物分别为 5' AACAACAGCCAAGTAGTAGCA 3' 和 5' AGAAGAGCCTGATGAAATGGA 3', 扩增片段长度为 226 bp。任选两个基因 PCR 产物作为探针进行 RNA 印迹分析, 方法如下: 分别将 20 µg 缺血预适应组或假手术组心肌总 RNA 经甲醛琼脂糖变性胶电泳后转移至尼龙膜上, 80℃ 固定 2 h, 亚甲蓝染色 18 S RNA 作为内对照, 脱色后分别与 [α -³²P] dCTP 标记的探针于 68℃ 杂交过夜。

2 结果

2.1 消减 cDNA 文库的建立

将抑制消减杂交后的第二轮 PCR 产物克隆入 T 载体, 铺板后随机挑选 215 个白色克隆进行 PCR 扩增, 其中绝大部分可扩增出插入片段, 插入片段大小为 200~2 000 bp (图 1)。

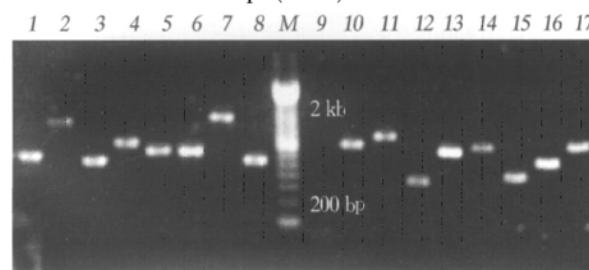


Fig. 1 PCR identification of positive clones

M: 100 bp ladder; 1~17: PCR products.

2.2 反向 RNA 点杂交初步筛选差异表达基因

随机挑选 192 个阳性克隆的 PCR 扩增产物真空抽吸点于尼龙膜上, 每张膜上 96 个克隆, 每个

克隆平行点两张膜, 分别与等量的缺血预适应组或假手术组心肌 cDNA 探针于相同条件下进行杂交、洗膜、显影, 选取杂交信号吸光度值相差 5 倍以上的克隆进行进一步分析. 其中一组的杂交结果如图 2 所示.

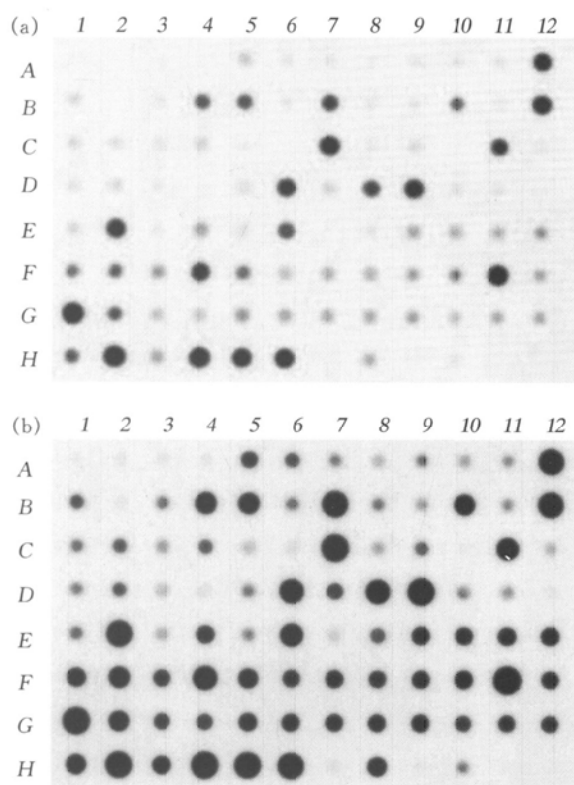


Fig. 2 Results of reverse Northern blot

(a) Sham operated; (b) Ischemic preconditioned. PCR products of positive clones were dotted onto the nylon membranes dublicately. Then the duplicated membranes were hybridized with equal [α - 32 P] dCTP labeled cDNA probes from sham operated myocardium or ischemic preconditioned myocardium respectively. The membranes were washed under equal condition and were exposed against the same X-ray film for 1 day.

2.3 测序和序列分析

将以上选取的 85 个克隆进行测序, 测序结果与 GenBank 数据库进行比较, 发现 85 个克隆中, 有 30 个为线粒体基因组 DNA, 53 个为核编码基因, 其中包含 31 个不同的已知基因 (表 1) 和 18 个未命名的新基因序列. 新基因序列指与 GenBank 数据库比较后未发现有明显同源已知基因的序列, 可能代表大鼠中新发现的基因. 上述 18 个新基因序列已被 GenBank 收录, 收录号见表 2.

Table 1 The catalog of known genes up regulated in ischemic preconditioned myocardium

Category	Identification
Calcium	Calmodulin
	Ca ²⁺ -ATPase (Atp2a2)
	S100 calcium binding protein A8 (S100a8)
Cytoprotection	DnaJ (Hsp40) homolog
	Heat shock protein 70
	Non-canonical ubiquitin conjugating enzyme 1
	Ferritin subunit H
Proliferation	ADP-ribosyltransferase (Adprt)
	Cellular apoptosis susceptibility protein
	Growth arrest specific 1 (Gas 1)
Transcriptional factor	C-fos
	Ets avian erythroblastosis virus E2 oncogene homolog 1 (Ets 1)
	Serum/glucocorticoid regulated kinase (Sgk)
	Putative hypoxia induced gene HIG1
Translation	Ribosomal protein L3
	Ribosomal protein L23a
Metabolism	Malate dehydrogenase like enzyme (Mdh 1)
	Malonyl-CoA decarboxylase
	F ₁ O-ATPase subunit b
Ion channel	Chloride intracellular channel 1 (Clc1)
Structure	Cytoplasmic gamma isoform of actin
	FAT2 related protein 2
	Histone H2A. Z
Inflammation	MHC class I RT1. Ac heavy chain precursor
	Thymosin beta like protein
	A disintegrin like and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1 (ADAMTS-1)
Others	beta globin
	Coatmer protein complex, subunit zeta 1 (Copz1)
	TAR DNA binding protein (TARDBP)
	Integral membrane protein Clt-3

Table 2 The novel genes (ESTs) up regulated in ischemic preconditioned myocardium

Clone ID	GenBank accession number	dbEST ID
M IR-30	BQ609970	12754874
M IR-186	BQ609971	12754875
M IR-27	BQ609972	12754876
M IR-24	BQ609973	12754877
M IR-40	BQ609974	12754878
M IR-43	BQ609975	12754879
M IR-85	BQ609976	12754880
M IR-87	BQ609977	12754881
M IR-8	BQ609978	12754882
M IR-34	BQ609979	12754883
M IR-197	BQ609980	12754884
M IR-91	BQ609981	12754885
M IR-159	BQ609982	12754886
M IR-210	BQ609983	12754887
M IR-55	BQ609984	12754888
M IR-71	BQ609985	12754889
M IR-9	BQ609986	12754890
M IR-88	BQ609987	12754891

2.4 RT-PCR 和 RNA 印迹进一步验证差异表达

从已测序基因中任选 5 个进行 RT-PCR 分析 (图 3), 任选 2 个进行 RNA 印迹分析 (图 4), 均显示所选基因在缺血预适应组比假手术组表达明显增高, 进一步证实了上述基因在大鼠心肌缺血预适应时表达上调。

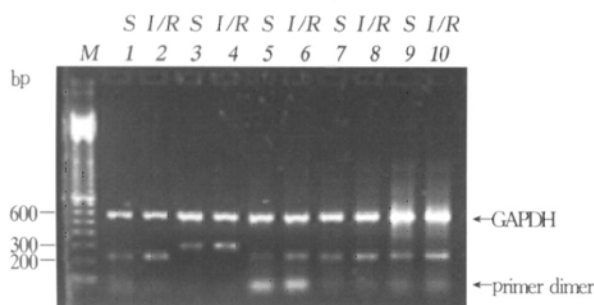


Fig. 3 Changes in gene expression analyzed by RT-PCR

M: 100 bp ladder; S: RT-PCR products of sham operated myocardium; I/R: RT-PCR products of ischemic preconditioned myocardium; 1, 2: *c-fos*; 3, 4: *hsp70*; 5, 6: *S100a8*; 7, 8: *MIR-30*; 9, 10: *hsp40*.

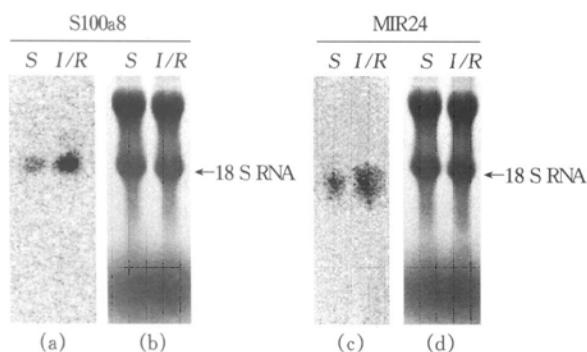


Fig. 4 Changes in gene expression analyzed by Northern blotting

(a) and (c): Northern blotting; (b) and (d): methylene blue staining of total RNA as loading control. S: sham operated myocardium; I/R: ischemic preconditioned myocardium.

3 讨 论

缺血预适应现象的存在表明, 短暂缺血-再灌可调动心肌的内源性保护机制, 增强心肌的抗损伤能力。而大量研究表明, 基因表达改变是这种内源性保护机制的重要分子基础。本研究首次采用抑制消减杂交技术, 大规模筛选心肌缺血预适应时的差异表达基因, 建立了心肌缺血预适应时表达上调基因的消减 cDNA 文库, 为从基因组水平全面探讨心肌缺血预适应心肌保护的分子机制奠定了基础。

在所获得的心肌缺血预适应时表达上调的已知基因中, 有相当一部分是已有文献报道, 在心肌缺

血-再灌时表达上调并与心肌内源性保护机制密切相关的基因。如热休克蛋白 HSP40、HSP70 可帮助修复受损蛋白质, 防止蛋白质变性聚集^[3]; 泛素活化酶 1 可催化泛素活化的第一步反应, 促使变性蛋白的泛素化并通过蛋白酶体降解^[4]; 铁蛋白重链可催化 Fe^{2+} 转变为 Fe^{3+} , 并有利于铁离子与运铁蛋白结合, 使游离铁离子减少, 从而可抑制铁离子催化的 Fenton 氏反应, 减少再灌时羟自由基生成, 减轻氧化损伤^[5]; ADP-核糖体转移酶可刺激 DNA 修复和抑制转录, 帮助 DNA 损伤的恢复^[6]; 其他还有肌浆网 Ca^{2+} -ATPase (*Atp2a2*)、钙调蛋白 (*CaM*)、及一些立即早期基因如 *c-fos*、*ets1*、*sgk*、*hig1* 等^[7,8]。这些基因在我们的消减文库中出现也从一个侧面反映了我们的文库构建是成功的。

我们筛选到的另一些已知基因与心肌缺血-再灌的关系至今未见报道, 这些基因可能也是心肌内源性保护机制的组成部分。如 *S100a8* 是一种 Ca^{2+} 结合蛋白, 可以由中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞以及某些上皮细胞合成, 在炎症组织中表达上调, 具有抗病原微生物功能和趋化活性, 而且在炎症反应时 *S100a8* 的活性同源二聚体可以被次氯酸盐氧化成非活性的同源二聚体, 这一方面可限制白细胞的进一步浸润, 另一方面可保护细胞免受过度的氧化损伤, 因此 *S100a8* 在调控炎症反应中发挥重要作用^[9]。心肌缺血-再灌时 *S100a8* 表达增加可能同样发挥调控炎症反应和抗氧化的作用, 从而减轻心肌损伤。另外, 最近研究发现 *S100a8* 与角蛋白细胞骨架的重构有关^[10], 提示 *S100a8* 可能也与缺血-再灌时心肌的重塑有关, 其具体功能有待进一步分析。ADAMTS-1 是一种与细胞外基质结合的金属蛋白酶, 其生理功能目前尚不清楚, 在 LPS 处理的小鼠肾脏和心肌组织中 ADAMTS-1 表达增加, 提示其可能与炎症反应有关, ADAMTS-1 基因剔除小鼠显示肾上腺髓质毛细血管的形成需要 ADAMTS-1^[11], 因此缺血-再灌时, ADAMTS-1 表达增加可能参与调控炎症反应和血管生成。细胞凋亡敏感蛋白 (CAS) 被认为可同时调控细胞增殖和凋亡^[12], 它与细胞有丝分裂周期染色体的精确分离有关, 具有保证染色体稳定性的作用, 而在细胞染色体排列发生错误造成染色体不稳定的情况下, 又可促使细胞倾向凋亡。这种作用的双重性与它的核转运蛋白功能有关, 它可以介导多种蛋白质 (如 CDKs、P53、核转录因子 NF- κ B 等) 从胞浆到核

的转运, 这些蛋白质有的与增殖有关, 有的与凋亡有关, 因此 CAS 可同时调控细胞增殖与凋亡. 缺血-再灌时, CAS 表达增加可能与心肌细胞或血管内皮细胞等的再生调控有关. 在本实验发现的缺血预适应诱导表达上调已知基因中, 还包括 Copz1、TARDBP、Clt-3 等, 研究这些基因在心肌缺血预适应时的功能将可能进一步丰富心肌内源性保护机制, 并将有助于寻找治疗心肌缺血及再灌注损伤的分子靶.

另外, 本实验还筛选得到了 18 个可能代表新基因的 EST 片段, 并已在 GenBank 上登录, 对这些未知新基因进行全长克隆及功能分析, 也将可能为发现新的心肌内源性保护机制提供线索.

参 考 文 献

- 1 Kloner R A, Jennings R B. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation*, 2001, **104** (25): 3158~ 3167
- 2 Feng J, Chahine R, Nadeau R. Influence of extracellular potassium on the antiarrhythmic effect of global preconditioning in isolated perfused rat hearts. *Mol Cell Biochem*, 2000, **214** (1~ 2): 75~ 80
- 3 Latchman D S. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res*, 2001, **51** (4): 637~ 646
- 4 Joazeiro C A, Hunter T. Ubiquitination-more than two to tango. *Science*, 2000, **289** (5487): 2061~ 2062
- 5 Berenshtein E, Vaisman B, Goldberg-Langerman C, *et al.* Roles of ferritin and iron in ischemic preconditioning of the heart. *Mol Cell Biochem*, 2002, **234-235** (1~ 2): 283~ 292
- 6 Oei S L, Griesenbeck J, Schweiger M, *et al.* Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly (ADP-ribosyl)ation of transcription factors. *J Biol Chem*, 1998, **273** (48): 31644~ 31647
- 7 Khimenko P L, Moore T M, Wilson P S, *et al.* Role of calmodulin and myosin light-chain kinase in lung ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*, 1996, **271** (1-1): L121~ 125
- 8 Liu P K, Grossman R G, Hsu C Y, *et al.* Ischemic injury and faulty gene transcripts in the brain. *Trends in Neurosciences*, 2001, **24** (10): 581~ 588
- 9 Harrison C A, Raftery M J, Walsh J, *et al.* Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8. *J Biol Chem*, 1999, **274** (13): 8561~ 8569
- 10 Thorey I S, Roth J, Regenbogen J, *et al.* The Ca²⁺-binding proteins S100A8 and S100A9 are encoded by novel injury-regulated genes. *J Biol Chem*, 2001, **276** (38): 35818~ 35825
- 11 Shindo T, Kurihara H, Kuno K, *et al.* ADAMTS-1: a metalloproteinase disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest*, 2000, **105** (10): 1345~ 1352
- 12 Brinkmann U. CAS, the human homologue of the yeast chromosome segregation gene CSE1, in proliferation, apoptosis, and cancer. *Am J Hum Genet*, 1998, **62** (3): 509~ 513

Identification of Genes Up-regulated During Myocardial Ischemic Preconditioning in Rats^{*}

YUAN Can, LÜ Qing-Lan, CHEN Guang-Wen, LIU Ying

WANG Yao-Ling, LIU Hai-Jun, ZOU Jiang, XIAO Xian-Zhong^{**}

(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Changsha 410078, China)

Abstract Brief periods of ischemia can protect the heart from a subsequent longer coronary artery occlusion, the phenomenon called ischemic preconditioning. The mechanism of ischemic preconditioning are not well understood. A number of genes have been shown to play roles in cytoprotective effect of ischemic preconditioning, but there are clearly many missing elements to be found. Suppression subtractive hybridization was used to construct cDNA libraries enriched for genes up-regulated during ischemic preconditioning. After being confirmed by reverse Northern dot blot for differential expression, the selected genes were sequenced and searched in GenBank for homology analysis. Many nuclear-encoded genes that were up-regulated during ischemic preconditioning participate in cytoprotection. The 18 novel ESTs were banked into GenBank with accession numbers. The specificity of this response was confirmed by RT-PCR and Northern blot. Understanding the genes up-regulated during ischemic preconditioning may open new avenues for therapy in ischemic heart disease.

Key words myocardial ischemic preconditioning, suppression subtractive hybridization, gene expression

^{*} This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G200056908) and The National Natural Sciences Foundation of China (30170373).

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

Received: September 23, 2002 Accepted: January 11, 2003