

· 实验研究 ·

基因芯片技术分析同种异基因大鼠心脏移植急性排斥反应的相关基因

DNA microarray in identifying acute rejection related genes in rat allogeneic cardiac transplantation

庄聪文, 黄盛东*, 李 莉, 于伟勇, 卢继忠, 徐志云, 张宝仁

(第二军医大学长海医院胸心外科研究所, 上海 200433)

[摘要] **目的:**运用基因芯片技术分析同种异基因大鼠心脏移植后急性排斥反应的基因表达谱。**方法:**建立大鼠颈部心脏移植模型,以同种同基因和异基因移植动物作为对照,术后5 d移植心脏中抽提总RNA,纯化后的mRNA进行逆转录制备杂交探针,应用含有4 096个靶基因的表达谱芯片对两组移植心脏组织进行差异表达谱分析。**结果:**在同种异基因心脏移植术后差异表达基因共有210条(下调96条,上调114条);其中已知基因有33条(下调13条,上调20条);未知基因177条(下调83条,上调94条),其中有15条已知基因(上调2条,下调13条)尚未见报道。**结论:**运用基因芯片技术研究同种异基因心脏移植术后急性排斥相关基因,可为进一步研究其发病机制和治疗提供新思路。

[关键词] 心脏移植;排斥反应;基因表达;基因芯片

[中图分类号] R 654.2 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0211-03

心脏移植是目前治疗终末期心衰患者的主要有效方法,目前临床上开展的移植基本上都是同种异基因的心脏移植。同种异基因心脏移植(allogeneic cardiac transplantation)术后急性免疫排斥反应机制的研究对心脏移植具有指导意义,但其分子生物学研究尚处于初级阶段^[1]。流行病学及遗传学证据表明该病具有多基因调控的特征,某些相关基因可能在发病中发挥重要作用。为此我们建立大鼠异位心脏移植模型,运用基因芯片技术,对同种异基因心脏移植术后急性排斥反应的移植心脏组织进行基因差异性表达的初步研究,分析其差异表达的基因,为进一步研究其发病机制、基因诊断与基因治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组 实验共分2组,第一组为同基因大鼠异位心脏移植组($n=33$),供体为10周龄,健康雄性的Lewis大鼠,体质量(200 ± 20)g,受体为12周龄的Lewis大鼠;第二组为异基因大鼠异位心脏移植($n=33$),供体同第一组,受体为健康雄性,体质量(200 ± 20)g,12周龄的SD大鼠。采用成熟的颈部异位心脏移植的方法^[2]完成两组的心脏移植手术。取每组大鼠心脏移植术后1、3、5 d的移植心脏(每一观察点各6例)行病理及基因芯片检测。

1.2 实验方法 芯片制备所用的4 096个靶基因cDNA克隆来自联合基因公司。通用引物进行PCR扩增,PCR产物长度为1 000~3 000 bp(少数例外),PCR反应及产物纯化采用标准方法^[3],通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物质量。从两组术后5 d移植心脏($n=6$)中抽提总RNA,方法参考Chomczynski等^[4]提出的一步法并加以改进。以Oligotex mRNA Midi-Kit(Qiagen公司,美国)纯化mRNA,根据RNA溶液的浓度取适量总RNA,用oligo dT亲和柱纯化,得到纯度较高的mRNA。参照Schna的方法逆转录标记cDNA探针并纯化^[5],然后杂交及洗涤。

1.3 基因芯片测定与分析 采用美国General Scanning公司Scan Array3000扫描芯片及ImaGene 3.0软件对Cy5和

Cy3两种荧光信号的强度和比值进行分析。根据40个管家基因作参照对原始数据进行标准化处理^[3],判定基因差异表达的标准:(1)基因的表达差异3倍以上;(2)Cy5和Cy3信号值均必须 >600 。

2 结果

2.1 术后急性排斥反应的病理改变 正式实验共进行心脏移植手术66例,术后24 h内死亡6例,移植心存活超过24 h共30例,平均存活时间(6.3 ± 0.5)d。根据ISHT(International Society of Heart Transplantation)标准进行病理学诊断显示:在同种异基因移植心脏组,从术后第3天开始病理检查显示有排斥反应发生,组织学分级为1B级;术后第5天,病理检查显示排斥反应显著,组织学分级在3A级以上;上述结果表明,术后3~5 d是发生急性排斥反应的高峰期,尤以第5天明显。而在同种同基因移植组中术后1、3、5 d心肌病理显示无明显急性排斥。

2.2 RNA抽提结果和芯片的质量标准控制 总RNA电泳图谱有清晰的28S、18S条带,表明RNA无降解,RNA抽提结果良好,按芯片的质量标准控制证明实验无污染而且检测体系正常。

2.3 基因表达谱特征 两组在心脏移植术后5 d相比有差异表达的基因总数为210条(下调96条,上调114条),即同种异基因心脏移植急性排斥反应相关基因;其中已知基因有33条(下调13条,上调20条);未知基因177条(下调83条,上调94条)(表1、2)。两组之间分别用不同标记物标记后杂交信号差别比较的结果,扫描显示杂交信号清楚,两组之间信号有明显差异。基因在不同标本中的杂交信号差异用散点图表示,X轴和Y轴分别代表Cy3和Cy5的荧光信号比值,愈靠近X轴或Y轴表明该点基因表达差异愈明显(图1)。

[基金项目] 国家自然科学基金(30070749)。

[作者简介] 庄聪文(1968-),男(汉族),硕士,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: huangsd@publicb.sta.net.cn

表 1 部分同种异基因心脏移植急性排斥反应表达上调基因

基因登录号	基因名称	可能的基因产物	Cy3/Cy5 比值
Z97074	p40	白细胞介素 12	3.331
E01884	IL-1 beta	β-白细胞介素 1	3.984
AF269160	TNF-alpha	α-肿瘤坏死因子	4.325
M57441	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	单核细胞诱导蛋白	6.241
NM_053958	Chemokine (C-C) receptor 3 (Cmkr3)	趋化因子受体 3	4.065
NM_022958	Phosphatidylinositol 3-kinase (Pik3c3)	磷脂酰肌醇-3-激酶	11.352
AY185563	COX2	前列腺素合成和 NO 分泌	4.256
NM_013098*	Glucose-6-phosphatase(G6PC)	葡萄糖-6-磷酸酶	5.635
M28671	Rearranged IgG-2b gene	IgG-2b	4.365
E02522	Interleukin 6	白细胞介素 6	3.568
NM_013195	Interleukin 2 receptor, beta chain (IL-2rb)	白细胞介素 2 受体	4.362
NM_031112*	Ribosomal protein S24 (Rps24)	核糖体蛋白	3.384
AF010466	Interferon gamma (IFN-gamma)	γ-干扰素	6.325
NM_012854	Interleukin 10 (IL-10)	白细胞介素 10	3.365
AF282896	Chemokine RANTES gene	调节 T 细胞功能	25.325
U22414	Macrophage inflammatory protein-1alpha(MIP-1α)	巨噬细胞激动蛋白 1	16.654
X65647	MIP-2 for macrophage inflammatory protein-2	巨噬细胞激动蛋白 2	13.365
U22520	Interferon inducible protein 10 (IP-10)	干扰素诱导因子	30.352
L37971	T-cell receptor alpha-chain	编码 T 细胞受体 α 链基	10.325
U77350	Chemokine receptor CCR5 gene	趋化因子受体 5	8.231

* 未见报道过的基因

表 2 部分同种异基因心脏移植急性排斥反应表达下调基因

基因登录号	基因名称	可能的基因产物	Cy3/Cy5 比值
NM_012598	Lipoprotein lipase (Lpl)	脂蛋白,脂肪分解素	0.235
NM_031714	Heat-responsive protein 12 (Hrsp12)	编码热反应蛋白 12	0.241
NM_024151	ADP-ribosylation factor 4 (Arf4)	ADP 核糖基化因子 4 基因	0.148
D29960	Alpha-B-crystallin	编码晶状体相关蛋白 α 链	0.187
AB041723	AIF mRNA for apoptosis-inducing factor	细胞凋亡诱导因子	0.149
NM_031101	Ribosomal protein L13 (Rpl13)	核糖体蛋白 L13	0.184
NM_030826	Glutathione peroxidase 1 (Gpx1)	谷胱甘肽过氧化物酶 1	0.135
NM_031587	Peroxisomal membrane protein 2 (Pmp2)	过氧化氢酶体膜蛋白 2	0.105
NM_017008	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapd)	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	0.154
NM_053917	Inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II (Ip4p-2)	多聚磷酸肌醇-4-磷酸酯酶	0.145
NM_053475	Protein tyrosine phosphatase type IV A member 2 (Ptp4a2)	IV 型酪氨酸磷酸酶	0.198
NM_017211	Selectin, endothelial cell, ligand (Glg1)	内皮细胞选择蛋白配体	0.154
NM_012756	Insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r)	胰岛素样生长因子 2 受体	0.301

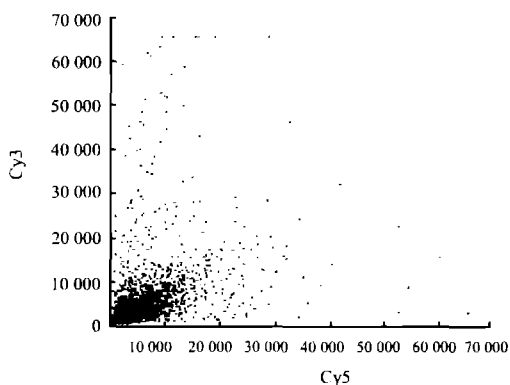


图 1 同种异基因移植组(Cy3)与同基因移植组(Cy5)杂交信号散点图

3 讨论

同种异基因心脏移植术后早期的发病过程是一个极其复杂的病理生理学变化,包括供心的缺血再灌注损伤和主要由 T 细胞介导的急性排斥反应等多因素参与的复杂病理生理变化,这些过程,不是单个基因突变及调控所致,而是多个基因相互作用和相互影响的结果。采用基因芯片的方法对心脏移植术后早期急性排斥反应相关基因进行高通量、平行性研究国内外鲜有报道,而运用该技术从基因及蛋白水平来研究同种异基因心脏移植术后早期急性排斥反应的发病机制无疑是疾病研究的新趋势。

本实验首次运用 4 096 点的 cDNA 表达谱芯片对同种同基因与异基因大鼠心脏移植术后第 5 天移植心脏表达差异

的基因进行了比较筛选,考虑到同基因大鼠心脏移植术后无排斥反应,排除非排斥反应因素包括手术创伤、缺血再灌注损伤等与心脏移植相关的因素,我们筛选出同种异基因大鼠心脏移植急性排斥反应相关基因 210 条(表达下调的基因有 96 条,上调 114 条);其中已知基因有 33 条,未知基因 177 条,新发现的相关基因 15 条。已有研究发现,在心脏移植术后早期急性排斥反应中有多种基因表达上调^[6],根据这些基因在排斥反应中的作用,结合本研究结果及文献可分为 4 类:(1)T 细胞基因:主要包括:IL-2R 基因、p40 基因、IL-1 β 基因、IL-6 基因、IL-15 基因、Pik3c3、TCR- α 等,这类基因的功能与 T 细胞分化、生长及活性密切相关。(2)多能性基因:以 IFN- γ 和 TNF- α ^[7,8] 基因为代表,其作用是多方面的,一方面可以促进 T 细胞增殖分化,另一方面可以诱导促炎细胞因子的分泌、激活炎性细胞释放各种效应分子、增强血管内皮细胞表面黏附分子的表达、启动炎性细胞渗入移植、上调移植 MHC 分子表达,通过增强 MHC 抗原表达和共刺激分子表达而强化 APC 的作用等。(3)双向性基因:其作用可能具有两面性,如 IL-10 基因和 COX2 基因^[9,10]。(4)炎症相关基因:炎症反应相关细胞因子及其受体基因,包括 CCR5、MIP-2、MCP-1、IP-10、MIP-1、Cmkbr3、RANTES 等,炎症反应在心脏移植早期,促进炎性细胞浸润,在早期对移植排斥反应的发生具有促进作用。

新发现的 15 条基因,其中上调 2 条,下调 13 条,至今尚未见报道,2 条表达上调基因为:(1)Rps24 编码核糖体蛋白 S24;(2)G6PC (glucose-6-phosphatase)^[11],其中 13 条表达下调的基因的功能目前已有一些了解如 AIF(细胞凋亡诱导因子基因)^[12]在全身皆可表达,以往的研究已证实 AIF 既是生命的必需物质,也可以诱导细胞凋亡,其具体功能决定于其表达的水平和其他蛋白质的相互作用。AIF 基因在同种异基因大鼠心脏移植排斥反应中表达下调为国内外首次发现,其对心脏移植排斥反应作用究竟如何,很值得进一步研究。Igf2r(胰岛素样生长因子 2 受体基因)^[13]可分别在不同的位点与 M6P(mannose-6-phosphate,6-磷酸甘露醇)、视黄酸(retinoic acid)高亲和力结合,发挥多种生物功能,可以转运并定位溶酶体参与胞饮作用,调节细胞生长发育,诱导细胞凋亡,并有抑制癌细胞生长的作用。这 15 条新基因及 177 条未知基因的发生机制和功能还有待于进一步研究。

值得指出的是,移植心脏标本中混有供体和受体免疫细胞两种成分,本试验将其看作无明显差异。如能在 RNA 抽提之前将两种免疫细胞分离,无疑会有助于更深入地了解受体免疫系统及供体心脏各自地变化。随着绿色荧光蛋白(GFP)转基因动物的建立,这类试验将成为可能。

[参考文献]

- [1] 赵永祥,胡冬煦. 基因工程在心脏移植中的应用[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,1998,18(3):224-226.
- [2] 邹良建,张宝仁,朱家麟,等. 改良豚鼠至大鼠异种移植模型[J]. 第二军医大学学报,1994,15(6):329.
- [3] Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. *Science*, 1995, 270 (5235):467-470.
- [4] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, 162(1):156-163.
- [5] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: microarray based expression monitoring of 1 000 genes [J]. *PNAS*, 1996, 93(102):10614-10619.
- [6] Napoli C, Lerman LO, Sica V, et al. Microarray: a novel research tool for cardiovascular scientists and physicians [J]. *Heart*, 2003, 89(6):597-604.
- [7] Newell KA, He G, Guo Z, et al. Cutting edge: blockade of the CD28/B7 costimulatory pathway inhibits intestinal allograft rejection mediated by CD4⁺ but not CD8⁺ T cells[J]. *J Immunol*, 1999, 163(45):2358-2362.
- [8] Assanimi M. TNF- α mRNA and protein product within biopsies from cardiac transplant recipients; Comparison with serum TNF- γ levels[J]. *Cardiromsc Res*, 1996, 32(85):551-556.
- [9] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR, et al. Two types of mouse T helper cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones[J]. *J Exp Med*, 1989, 170(65):2081-2095.
- [10] Furukawa Y, Becker G. Interleukin-10 augments allograft arterial disease: Paradoxical effects of IL-10 *in vivo* [J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(125):1929-1943.
- [11] von Groote-Bidingmaier F, Schmoll D, Orth HM, et al. DYRK1 is a co-activator of FKHR (FOXO1a)-dependent glucose-6-phosphatase gene expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300(3):764-769.
- [12] Kim SW, Hayashi M, Lo JF, et al. ADP-ribosylation factor 4 small GTPase mediates epidermal growth factor receptor-dependent phospholipase D2 activation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(4):2661-2668.
- [13] Wutz A, Theussl HC, Dausman J, et al. Non-imprinted Igf2r expression decreases growth and rescues the Tme mutation in mice[J]. *Development*, 2001, 128(10):1881-1887.

[收稿日期] 2004-08-30

[修回日期] 2004-11-26

[本文编辑] 尹 茶