

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00918

· 短篇论著 ·

大鼠失血性休克及复苏后肝脏 EPHX2 和 Sp1 基因表达的变化

钱 琤^{1△}, 张育理^{1△}, 俞晓军^{1△}, 易 伟¹, 胡志前^{1*}, 方国恩^{2*}

1. 第二军医大学长征医院普通外科, 上海 200003

2. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察失血性休克及复苏对大鼠肝脏 EPHX2 基因及预测转录因子 Sp1 表达的影响。**方法** 通过软件预测 EPHX2 转录因子, 筛选出 Sp1 为研究对象。将 25 只 SD 大鼠随机平均分为 5 组: 对照(CON)组、失血性休克(HS)组、休克复苏 1 h(HSR1)组、休克复苏 3 h(HSR3)组、休克复苏 6 h(HSR6)组。采用 real-time RT-PCR 和蛋白质印迹法检测大鼠肝脏中 EPHX2 和 Sp1 的表达。**结果** HS、HSR1、HSR3、HSR6 组 EPHX2 mRNA 表达低于对 CON 组($P < 0.05$), HSR1、HSR3、HSR6 组 EPHX2 mRNA 表达低于 HS 组($P < 0.05$), HSR1 组 EPHX2 mRNA 表达低于 HSR3、HSR6 组($P < 0.05$)。CON 组 Sp1 mRNA 表达和其他组比较差异无统计学意义($P > 0.05$), HS、HSR1 组 Sp1 mRNA 表达低于 HSR6 组($P < 0.05$)。HSR1、HSR3、HSR6 组 EPHX2 蛋白表达较 CON 组降低($P < 0.05$), Sp1 蛋白在各组间表达差异无统计学意义。**结论** 失血性休克可引起肝脏 EPHX2 基因表达下调, 而复苏不能快速逆转这种趋势; 失血性休克及复苏对预测转录因子 Sp1 表达没有影响。

[关键词] 创伤; 失血性休克; 转录因子; Sp1; EPHX2; 肝**[中图分类号]** R 605.971 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)08-0920-04

Expression of EPHX2 and Sp1 gene in rat liver following severe hemorrhagic shock and resuscitation

QIAN Cheng^{1△}, ZHANG Yu-xing^{1△}, YU Xiao-jun^{1△}, YI Wei¹, HU Zhi-qian^{1*}, FANG Guo-en^{2*}

1. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of severe hemorrhagic shock and resuscitation on expression of EPHX2 and predictive transcription factor Sp1 in rat liver. **Methods** Sp1 was selected for study following software prediction of the transcription factors of EPHX2. A total of 25 SD rats were randomly divided into 5 groups ($n=5$): control (CON) group, hemorrhagic shock (HS) group, 1 h after hemorrhagic shock and resuscitation (HSR1) group, 3 h after hemorrhagic shock and resuscitation (HSR3) group, 6 h after hemorrhagic shock and resuscitation (HSR6) group. Real-time RT-PCR and Western blotting analysis were used to examine the expression of EPHX2 and Sp1 in the rat liver. **Results** The expressions of EPHX2 mRNA in HS, HSR1, HSR3, and HSR6 groups were significantly lower than those in CON group ($P < 0.05$), those in HSR1, HSR3 and HSR6 groups were significantly lower than those in HS group ($P < 0.05$), and that in HSR1 group was significantly lower than those in the HSR3 and HSR6 groups ($P < 0.05$). The expression of Sp1 mRNA in CON group was not significantly different from those in other groups, but the expressions in HS and HSR1 groups were significantly lower than that in the HSR6 group ($P < 0.05$). Compared with CON group, EPHX2 protein expression was significantly lower in HSR1, HSR3, and HSR6 groups ($P < 0.05$), and Sp1 protein expressions were not significantly different between different groups. **Conclusion** EPHX2 mRNA expression is decreased in rat liver following severe hemorrhagic shock, and this decrease cannot be reversed by effective resuscitation. And Sp1 is not involved in the process.

[Key words] trauma; hemorrhagic shock; transcription factor; Sp1; EPHX2; liver

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(8): 920-923]

重度失血性循环复苏后的救治一直是临床研究的重点, 其救治方法和病死率的控制尚不能令人满意^[1], 针对炎症通**[收稿日期]** 2011-11-24 **[接受日期]** 2012-02-21**[作者简介]** 钱 琤, 博士生. E-mail: shock.smmu@hotmail.com; 张育理, 博士生. E-mail: 89399758@qq.com; 俞晓军, 博士. E-mail: fish0220@163.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-63586818, E-mail: huzq62@163.com; Tel: 021-81873339, E-mail: fanguoen@yahoo.com.cn

路中已知基因的靶向治疗也未成熟,期望在重症失血性休克的救治中有新的、确切的靶点。本课题组在一种特定创伤失血性休克条件下,利用基因芯片对存活和死亡大鼠肝脏的基因背景进行分析,筛选出 100 个差异基因,进一步采用基因网络分析后筛选出 18 个已知基因,EPHX2(s-EH,环氧化物水解酶 2)是这群调控网络基因之一^[2]。EPHX2 与失血性休克复苏的关系还不甚明了,本研究通过对大鼠失血性休克及复苏后肝脏 EPHX2(s-EH)及预测转录因子之一 Sp1 进行测定,了解 EPHX2 和 Sp1 在失血性休克中的作用。

1 材料和方法

1.1 转录因子预测 在我们的前期工作^[2]的基础上,从调控网络中结合失血性休克研究方向,选取 EPHX2 和 AOC3 基因作转录因子预测,提取 2 个基因转录起始位点上游 4 500 bp 至下游 500 bp。转录因子数据库使用 TRANSFAC 7.0 public。转录因子结合位点预测使用 Patser 程序 (<http://ural.wustl.edu/resources.html>),设置 relative score >0.9。通过转录因子预测 EPHX2 有 13 个转录因子,研究较多的是核转录因子(NF- κ B)^[3],其在创伤、失血性休克、缺血再灌注损伤病理方面起重要作用,而失血性休克与 Sp1 的关系有待研究,因此本研究主要观察了 Sp1 在失血性休克及复苏中表达趋势。

1.2 实验动物 健康 8~9 周龄 SPF 级 SD 大鼠共 25 只[上海西普尔-必凯动物有限公司提供,生产许可证号 SCXK(沪)2007-0003,使用许可证号 SYXK(沪)2007-0003],体质量 280~310 g,雄性,SPF 级条件下分笼饲养于屏障系统内(第二军医大学实验动物中心),室温控制在(25±1)℃,湿度控制在(55±1)%。实验动物按 12 h:12 h 昼夜规律适应性饲养 2 周以上,术前 12 h 禁食,自由饮水。

1.3 模型制备 大鼠行戊巴比妥钠(上海西唐生物科技有限公司)按 50 mg/kg 腹腔麻醉,麻醉起效后重新称量大鼠并固定,直肠内置入恒温探头监测体温变化,恒温垫(ALC-HTP,上海奥尔科特生物科技有限公司)维持动物体温在(37±0.5)℃。无菌条件下用 22G 密闭式静脉留置针(苏州碧通医疗器械有限公司)行右侧颈总动脉插管并固定(管内预充 25 U/ml 肝素钠溶液),经三通管连接多导生理记录仪(MPA2000,上海奥尔科特生物科技有限公司)测血压及心率,22G 密闭式静脉留置针行右侧股动脉及股静脉插管并固定(管内预充 100 U/ml 肝素钠溶液 0.1 ml),操作结束动物稳定 10 min 后开始使用实验动物用微量注射系统(ALC-IP900,上海奥尔科特生物科技有限公司)经右侧股动脉 2 ml/(kg·min)匀速放血至平均动脉压(MAP)为 30 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),血压回升超过 40 mmHg 后再次放血,通过多次放血使大鼠血压维持在 30~40 mmHg,1 h 后按照 2 ml/(kg·min)匀速给予 1/2 失血和 2 倍失血量的乳酸林格液体复苏。

1.4 实验分组 实验动物按照体质量随机分为 5 组($n=5$):对照(CON)组、失血性休克(HS)组、休克复苏 1 h(HSR1)组、休克复苏 3 h(HSR3)组、休克复苏 6 h(HSR6)组。断头法处死实验动物,无菌条件下取肝脏左外叶,肝组

织分块后,经过 4℃ PBS 漂洗后快速以液氮处理之后,于-80℃冻存备用。

1.5 Real-time RT-PCR 检测肝组织 EPHX2、Sp1 mRNA 表达 肝组织使用 TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取总 RNA, RNA 储存于-80℃冻存备用。EPHX2 上游引物 5'-GCT TCT TCC GAA CCA GTG ATG-3',下游引物 3'-CTT CTT GAA CTG CTG TAT GTA ATA CTC T-5',产物长度 152 bp; Sp1 上游引物 5'-CAA CTT GGC CTT CAT GGA CC-3',下游引物 3'-CCC CTC CCC TCA CTG TCT TTA-5',产物长度 158 bp;rGAPDH 上游引物 5'-TGG CAT GGA CTG TGG TCA TG-3',下游引物 3'-TGG GTG TGA ACC ACG AGA AA-5',产物长度 144 bp。取 1.5 μ g RNA 进行反转录,合成 cDNA。Real-time RT-PCR 反应体系为 10 μ l,反应条件为 50℃ 2 min,95℃ 10 min;95℃ 20 s,58℃ 15 s,72℃ 20 s,共 40 个循环;60℃ 15 s,95℃ 15 s。以 rGAPDH 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算 EPHX2 和 Sp1 mRNA 相对表达强度。

1.6 蛋白质印迹法检测肝组织 EPHX2、Sp1 蛋白表达 50 mg 肝组织匀浆后裂解、定量。EPHX2、Sp1 蛋白表达检测按试剂盒说明操作(EPHX2:美国 Santa Cruz 公司,稀释比为 1:400; Sp1:美国 Abcam 公司,稀释比为 1:200)。以 β -actin 为内参。暗室胶片曝光并观察结果,用仪器自带软件行灰度分析。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 检验或非参数检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 模型制备结果 失血性休克模型制备中无动物意外死亡,HSR1、HSR3、HSR6 组复苏后,动物亦无意外死亡。

2.2 失血性休克复苏对大鼠肝脏 EPHX2、Sp1 mRNA 表达的影响 Real-time RT-PCR 结果显示,失血性休克后及复苏后 3 个时间点 EPHX2 mRNA 表达均低于 CON 组($P<0.05$),休克复苏后 3 个时间点表达低于 HS 组($P<0.05$),其中 HSR1 组表达最低(图 1A);休克及复苏后 3 个时间点 Sp1 mRNA 表达较 CON 组差异无统计学意义($P>0.05$),HS 组和 HSR1 组表达较 HSR6 组表达差异有统计学意义($P<0.05$,图 1B)。

2.3 失血性休克复苏对大鼠肝脏 EPHX2、Sp1 蛋白表达的影响 蛋白质印迹分析结果显示,失血性休克复苏后 EPHX2 蛋白表达出现减弱,与 CON 组比较差异有统计学意义($P<0.05$),而 Sp1 蛋白在休克和复苏后均无明显变化(图 2)。

3 讨论

在重度失血性休克救治中,人们期望找到病理过程中的靶点并能有效阻断,但目前临床上还没有为大家接受的针对某一病理靶点的治疗手段和药物。最有可能在创伤失血性休克救治中成为靶点的是肿瘤坏死因子^[4-6],其在创伤失血

性休克中的作用为大家所接受,但目前罕见肿瘤坏死因子单抗在失血性休克中的临床应用。其他例如一氧化氮酶抑制剂^[7]、金属基质蛋白酶抑制剂^[8]等仅局限于实验研究。加倍酯^[9]针对炎症通路的多个靶点,在临床虽有应用,但数据缺乏说服力。因此需要重新认识创伤、失血性休克病理过程,找到新的干预靶点。

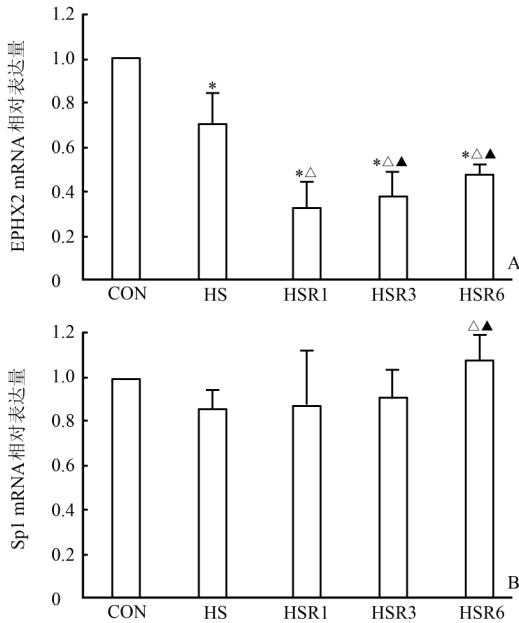


图1 失血性休克及复苏后大鼠肝脏 EPHX2 和 Sp1 mRNA 表达

CON: 对照组; HS: 失血性休克组; HSR1: 休克复苏 1 h 组; HSR3: 休克复苏 3 h 组; HSR6: 休克复苏 6 h 组。A: EPHX2 mRNA; B: Sp1 mRNA。* $P < 0.05$ 与 CON 组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 HS 组比较; $\blacktriangle P < 0.05$ 与 HSR1 组比较; $n = 5, \bar{x} \pm s$

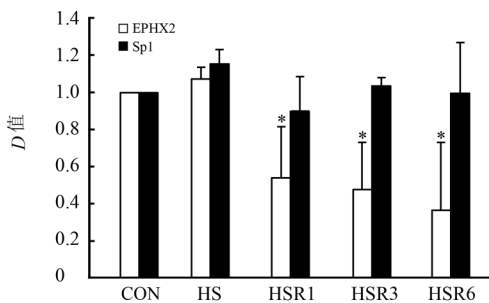


图2 失血性休克及复苏后各组大鼠 肝脏 EPHX2 和 Sp1 蛋白表达

CON: 对照组; HS: 失血性休克组; HSR1: 休克复苏 1 h 组; HSR3: 休克复苏 3 h 组; HSR6: 休克复苏 6 h 组。* $P < 0.05$ 与 CON 组比较; $n = 5, \bar{x} \pm s$

基于这种需要,本课题组在一种特定的肝切除+定容失血性休克大鼠模型中,比较死亡和存活大鼠的基因背景,筛选出 100 个差异基因,采用进一步的网络分析,有 18 个已知基因入选,EPHX2 就是其中之一^[2]。在已发表的文献数据库中,罕见失血性休克和 EPHX2 的研究,但对于 EPHX2 的底物 EETs(内源性环氧二十碳三烯酸)却有相关报道,如 EETs 的缺失与肺动脉高压及肺血管收缩相关^[10],EETs 对

于缺血再灌注后心肌细胞起保护作用^[11]等。EPHX2(s-EH)为环氧化物水解酶,系 EETs 水解为二羟基二十碳三烯酸的关键酶。作为 EETs 的水解酶,EPHX2 与血压调节有关,敲除 EPHX2 基因的小鼠基础血压较野生型小鼠明显下降,针对 EPHX2 的阻断剂也能有效改善高血压动物的血压^[12-13]。另外也有研究发现 EPHX2 基因的多态性和脑卒中后神经细胞缺血再灌注损伤有关^[14]。这些研究都提示 EPHX2 和以全身脏器缺血再灌注损伤为核心的失血性休克救治相关。本研究结果表明在可逆性失血性休克动物模型中,失血性休克后大鼠肝脏 EPHX2 mRNA 表达下调,蛋白表达变化不明显。乳酸林格液复苏能有效改善休克后的循环,且被认为能有效抑制失血性休克后的多种炎症因子的过度释放^[15],但本研究结果表明失血性休克后循环复苏不能带来 EPHX-2 表达恢复,而是呈现出持续低水平表达状态。

基因的调控是个复杂的过程,对于失血性休克基因调控网络中为人们所熟知的转录因子有 NF- κ B 等,已知 NF- κ B 参与了重症创伤、失血性休克后炎症级联反应,与脏器细胞的凋亡相关^[3],但目前并没有在实验动物和临床上见到 NF- κ B 在失血性休克中的实质性应用。因此在 EPHX2 预测的十余个转录因子中,我们没有对 NF- κ B 进行检测,而是将 Sp1 作为进一步测试的靶基因。已知转录因子 Sp1 和转录因子 E2F1 共调节细胞生长^[16],且有众多基因存在 Sp1 结合位点,但 Sp1 和失血性休克的关系不甚明了。而本研究结果显示,无论是失血性休克还是休克后复苏与 Sp1 表达均无明显关系。

本研究采用可逆性失血性休克大鼠模型,发现失血性休克可引起肝脏 EPHX2 基因表达下调,而复苏不能快速逆转这种趋势;失血性休克及复苏对预测转录因子 Sp1 表达没有影响。有关不可逆性失血性休克模型及不同低血压维持的失血性休克模型的相关实验数据有待补充,另鉴于在创伤失血性休克研究中动物模型和临床的脱节^[17-18],尚无法将本研究中的结果外延到人体。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Curry N, Hopewell S, Dorée C, Hyde C, Brohi K, Stanworth S. The acute management of trauma hemorrhage: a systematic review of randomized controlled trials[J]. Crit Care, 2011, 15: R92.
- [2] Yu X J, Qian C, Zhang Y X, Hu Z Q. Microarray analysis of differentially expressed background genes in rats following hemorrhagic shock [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 2045-2053.
- [3] Meldrum D R, Shenkar R, Sheridan B C, Cain B S, Abraham E, Harken A H. Hemorrhage activates myocardial NFkappaB and increases TNF-alpha in the heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29: 2849-2854.
- [4] Zingarelli B, Squadrito F, Altavilla D, Calapai G, Di Rosa M, Caputi A P. Role of tumor necrosis factor-alpha in acute hypovolemic hemorrhagic shock in rats[J]. Am J Physiol, 1994, 266(4

- Pt 2): H1512-H1515.
- [5] Rhee P, Waxman K, Clark L, Kaupke C J, Vaziri N D, Tominaga G, et al. Tumor necrosis factor and monocytes are released during hemorrhagic shock[J]. *Resuscitation*, 1993, 25: 249-255.
- [6] Bauer C, Roth W, Bahrami S, Marzi I. Attenuation of shock-induced inflammation in the rat liver depends on the time of TNF- α inhibition[J]. *J Mol Med (Berl)*, 1996, 74: 51-58.
- [7] Brown I P, Williams R L, McKirnan M D, Limjoco U R, Gray CG. Nitric oxide synthesis inhibition does not improve the hemodynamic response to hemorrhagic shock in dehydrated conscious swine[J]. *Shock*, 1995, 3: 292-298.
- [8] Wang P, Ba Z F, Galardy R E, Chaudry I H. Administration of a matrix metalloproteinase inhibitor after hemorrhage improves cardiovascular and hepatocellular function [J]. *Shock*, 1996, 6: 377-382.
- [9] Novelli G P, Innocenti P, Livi P. [Gabexate mesilate (FOY), a new synthetic protease inhibitor, in the treatment of shock. An Italian multicenter study][J]. *Minerva Anesthesiol*, 1993, 59: 247-253.
- [10] Keser B, Barbosa-Sicard E, Schermuly R T, Tanaka H, Hammock B D, Weissmann N, et al. Hypoxia-induced pulmonary hypertension: comparison of soluble epoxide hydrolase deletion vs inhibition[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85: 232-240.
- [11] Batchu S N, Lee S B, Qadhi R S, Chaudhary K R, El-Sikhry H, Kodala R, et al. Cardioprotective effect of a dual acting epoxyeicosatrienoic acid analogue towards ischaemia reperfusion injury [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162: 897-907.
- [12] Gross G J, Nithipatikom K. Soluble epoxide hydrolase: a new target for cardioprotection[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10: 253-258.
- [13] Inceoglu B, Schmelzer K R, Morisseau C, Jinks S L, Hammock B D. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2007, 82(1-4): 42-49.
- [14] Iliff J J, Alkayed N J. Soluble epoxide hydrolase inhibition: targeting multiple mechanisms of ischemic brain injury with a single agent [J]. *Future Neurol*, 2009, 4: 179-199.
- [15] Boomer L, Jones W, Davis B, Williams S, Barber A. Optimal fluid resuscitation: timing and composition of intravenous fluids [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2009, 10: 379-387.
- [16] Lin S Y, Black A R, Kostic D, Pajovic S, Hoover C N, Azizkhan J C. Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 1668-1675.
- [17] Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, et al. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review [J]. *BMJ*, 2007, 334: 197.
- [18] Roberts I, Kwan I, Evans P, Haig S. Does animal experimentation inform human healthcare? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation [J]. *BMJ*, 2002, 324: 474-476.

[本文编辑] 孙 岩