c-jun-PcDNA3.1(+)重组体就是反义重组体，片断大小为7.4 kb。

本实验正常对照组心肌细胞TUNEL染色阴性；非转染组在缺氧复合烧伤血清处理后12 h已有明显凋亡心肌细胞出现，24 h时凋亡现象最显著，48 h凋亡征象有所减弱。该结果表明缺氧复合烧伤血清处理可使心肌细胞出现凋亡现象。转染组缺氧复合烧伤血清处理后12 h，24 h和48 h，与非转染组比较，凋亡细胞数明显减少($P<0.01$)，表明*c-jun*反义基因重组体转染能有效地减少缺氧复合烧伤血清处理凋亡心肌细胞数，从而对缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞具有保护作用。

本实验成功构建了*c-jun*反义基因重组体，并且高效地转染进入心肌细胞，经测定心肌细胞的凋亡数目变化，证实*c-jun*反义基因重组体转染可以减轻缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞的凋亡损伤，对心肌细胞具有保护作用。由于缺氧和细胞因子(烧伤血清中含有大量的致炎细胞因子)是烧伤早期心肌损害的主要因素[8,9]，因此，本研究结论为寻找防治严重烧伤心肌缺血缺氧损伤和"休克心"的新策略提供了理论依据和新思路。

参考文献：

[1] 黄跃生，杨宗城，迟路湘，等. 烧伤后"休克心"的研究[J]. 中华烧伤杂志，2000，16(5)：25.
[2] Wang L X, Ideishi M, Yahiro E, *et al*. Mechanism of the cardioprotective effect of inhibition of the renin-angiotensin system on ischemia/reperfusion-induced myocardial injury[J]. Hypertens Res, 2001, 24(2): 179-187.
[3] J萨姆布鲁克，E F弗里奇，T曼尼阿蒂斯著. 金冬雁，黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版，北京：科学出版社，1992. 35-48
[4] Ville K, Antti S, Jan F, *et al*. Cardiomyocyte apoptosis after antiviral WIN 54954 treatment in murine coxsackievirus B3 myocarditis[J]. Scand Cardiovasc J, 2002, 36(3): 187-192
[5] Corbucci G G. Adaptive changes in response to acute hypoxia, ischemia and reperfusion in human cardiac cell[J]. Minerva Anestesiol, 2000, 66(7-8): 523-530.
[6] Takuma A, Genzou T, Rumi M, *et al*. Molecular mechanisms of non-apoptosis by Fas stimulation alone versus apoptosis with an additional actinomycin D in cultured cardiomyocytes[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(4): 787-798.
[7] Maass D L, Hybki D P, White J, *et al*. The time course of cardiac NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion by cardiac myocytes after burn injury: contribution to burn-related cardiac contractile dysfunction[J]. Shock, 2002, 17(4): 293-299.
[8] Carlson D L, White D J, Maass D L, *et al*. I kappa B overexpression in cardiomyocytes prevents NF-kappa B translocation and provides cardioprotection in trauma[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(3): H804-814.
[9] Maass D L, White J, Horton J W, *et al*. IL-1beta and IL-6 act synergistically with TNF-alpha to alter cardiac contractile function after burn trauma[J]. Shock, 2002, 18(4): 360-366.

(编辑 陈聪连)

文章编号：1000-5404(2003)19-1727-01

个案与短篇

硬脂酸硬蜡混合液及硬蜡二步浸蜡法在石蜡切片中的应用

Application of two-step soaking method in mixure of stearic acid and high melting point ceresin in paraffin section

汤金梁，叶明福 (第三军医大学附属新桥医院病理科，重庆 400037)

用硬脂酸和石蜡混合液代替二甲苯透明浸蜡在病理界已得到了广泛应用。经过实践发现，硬脂酸和硬蜡混合液一步法[1]，二步法及三步法[2]相比较，二步法取得了良好的效果。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

病理常规外检标本，常规脱水剂，硬脂酸，石蜡(60～62 ℃)。

1.2 方法

①标本固定取材后脱水至无水乙醇。②硬脂酸和硬蜡按质量比1∶7的比例混合后浸蜡，温度67 ℃，时间1.5 h。③硬蜡浸蜡1.5 h，温度67 ℃。④根据标本的多少适当补充硬脂酸和石蜡；硬蜡要1周左右换1次，换下来的石蜡可和包埋蜡混合用于包埋。

2 结果

组织收缩情况同二甲苯透明的组织相比较无明显异常，切片平展，组织硬度适中。镜下观察：细胞核与细胞浆着色清晰分明，均匀一致。

(下转1730页)

作者简介：汤金梁(1975－)，男，河北省唐山市人，技师，主在从事病理技术工作方面的研究。电话：(023)68774697

收稿日期：2003-02-26；修回日期：2003-06-30

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

3 讨论

本室应用抑制性消减杂交结合 RACE(Rapid amplification of cDNA ends)方法发现了 ECV304 细胞中一个新基因,全长 cDNA 被 GeneBank 接受(登录号:AY074889),基于该基因发现的方法将其命名为内皮细胞高表达脂多糖相关因子 1(EOLA1),目前该基因的功能尚不清楚,其推论蛋白质为 158 氨基酸,与 GeneBank NP-835225 理论蛋白序列 100%同源。针对该基因进行T 载体克隆测序的过程中我们意外的发现在 mRNA 水平它的表达不是 LPS 诱导性的,而是组成性的,这似乎与抑制性消减杂交得到差异片段的研究策略相悖。在后续的实验中,我们为这种现象寻求到了一定的解释。

重复实验中我们得到多个经酶切验证的阳性克隆,其中包含两种阳性克隆,一个测序结果与我们在 GeneBank 中登录的序列一致,另外一个克隆测序结果在阅读框的上游多出 19 bp(经重复实验,并经两家公司独立测序验证),提示这两个克隆可能代表了该基因 mRNA 两个不同的剪接型。对两种序列进行分析,发现增加的 10 多个碱基没有改变基因的开放阅读框,为了进一步证实这两种 mRNA 剪接型的存在以及在 ECV304 细胞中的表达情况,我们设计了两个上游引物,根据 PCR 扩增原理,引物的 5′端序列可以在一定程度上与模板不相匹配(如添加酶切位点等等),而引物 3′端必须是与模板严格匹配的,如果引物 3′末端一个或多个碱基与模板不相匹配,那么扩增效率会明显降低[3,4]。因此本实验针对目的基因两个剪接型设计的引物增出的产物应能够分别代表目的基因的两种剪接型,我们用 RT-PCR 方法证实,EOLA1 基因野生型 mRNA 的确是组成性表达的,而剪接突变型 mRNA 是 LPS 诱导性表达的,这一定程度上解释了为什么我们用 SSH 和 RACE 得到的 cDNA 全长序列是组成性表达而不是 LPS 诱导性表达的,因为以短的表达序列标签(Expression sequence tag,EST)片段为基础进行 RACE 可能扩增出两种剪接型的任何一种全长 cDNA[5,6],从表达丰度看,扩增出野生型 cDNA 全长的机会更多,本室得到的也确实是组成性表达的野生型 cDNA 全长。根据本实验的发现,EOLA1 存在不同的 mRNA 剪接型,并且表达的丰度以及对 LPS 刺激的反应性上存在明显的差异,其生物学意义目前尚不清楚,仅从 mRNA 表达水平看,剪切突变型更确切的反映了该基因的特点、更符合其命名含义。

为什么仅仅因为 10 多个碱基的差别,使得它们对 LPS 的反应性不同呢,根据以往研究,许多基因的 mRNA 非翻译区能够影响其稳定性和翻译效率,由此导致质或量上有差异的蛋白产物生成。关于 EOLA1 基因的不同剪接型可能的生物学意义,我们正在应用 RNA 干扰技术进行深入研究。

参考文献:

[1] 梁自文,罗向东,杨宗城,等. 应用抑制消减杂交克隆内皮细胞内毒素刺激后相关基因[J]. 解放军医学杂志,2002,27(4):336-338.

[2] 梁自文,杨宗城,罗向东. 人类新基因 *eola*1 全长 cDNA 序列的克隆[J]. 第三军医大学学报,2002,24(3):封2.

[3] 黄培堂,俞炜源,陈天弥 等 译. PCR 技术实验指南[M]. 北京:科学出版社,1998. 23-33.

[4] 吴乃虎. 基因工程原理[M]. 北京:科学出版社,2002. 99-107.

[5] Schaefer B C. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends[J]. Anal Biochem,1995,227(2):255-273.

[6] Das M, Harvey I, Chu L L, *et al*. Full-length cDNAs: more than just reaching the ends[J]. Physiol Genomics, 2001,6(2):57-80.

(编辑 张 宁)

(上接 1727 页)

3 讨论

多年来我科室一直用硬脂酸和软蜡混合液一步法浸蜡,包埋时用硬蜡。因为透明浸蜡后没有浸硬蜡,组织中的软蜡与硬蜡的密度不同,所以造成存档后组织内陷,给再次切片造成困难。另外一些含脂肪的组织制片困难,尽管在脱水的同时已脱脂,但在浸蜡时脂肪又进入了脂肪组织,至使切片不全或切片过厚给病理诊断造成困难。而三步浸蜡法一是延长了时间,二是由于组织中的硬脂酸被置换出来了,使硬脂酸软化组织的作用明显减弱或消失,造成一些致密组织如皮肤、子宫肌瘤、肝、脾等制片困难。而二步法有效的弥补它们的不足,其中最大的优点是:浸蜡时间短;对致密的组织有软化作用;组织不内陷及保证了含有脂肪的组织切片质量。

因重庆地区夏季温度较高,为便于石蜡组织块存档,我科全年均用 60~62 ℃ 的高熔点硬蜡。浸蜡的温度宜高出石蜡熔点 2~4 ℃,而浸蜡的最高温度不宜高出 68 ℃,一般将浸蜡温度控制在 66~67 ℃。浸蜡包埋全用硬蜡,有效地避免了组织内陷。并因组织中硬脂酸大部分被置换了出来,所以脂肪组织一样可以切出 4 μm 的切片来;而子宫肌瘤等组织切起来又不涩刀。为防止第二缸中的硬脂酸逐渐增多,要每周更换一次。换下来的石蜡可以再同包埋蜡混合用于组织包埋,也可用于添补第一缸中的蜡,这样既可适当少用一些硬脂酸,也可节省石蜡的用量。经过 3 年来的临床实践证明二步法用于临床实践更具有实际意义。

关键词:石蜡切片;浸蜡法
中图法分类号:R361.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] 陈恒光,吕惠荣. 应用 18 酸和软石蜡混合液改良透明浸蜡方法[J]. 诊断病理学杂志,1994,1(2):87.

[2] 王伯沂云,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2000. 80-81.

(编辑 薛国文)

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