DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.017
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)19-1725-03

论著

c-jun 反义基因转染与缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞凋亡关系的研究

胡安根,黄跃生 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 *c-jun* 反义基因转染与缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞凋亡的关系。方法 烧伤血清采自30% TBSA Ⅲ度烫伤Wistar大鼠;采用含1%O_2的混和气体造成缺氧模型;采用基因重组技术构建 *c-jun* 反义基因重组体;用Lipofectamine kit介导心肌细胞转染;用核苷酸末端转移酶介导的dUTP末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞的凋亡情况,同时对凋亡心肌细胞进行计数并作统计学分析。结果 加入烧伤血清并造成缺氧(下文称非转染组)后12 h,24 h和48 h,凋亡心肌细胞数(每高倍视野均数)分别为(7.1±0.842),(28.4±1.635)和(13.2±1.525);转染 *c-jun* 反义基因(下文称转染组)后12 h,24 h和48 h,凋亡心肌细胞数分别为(4.1±0.716),(12.3±1.455)和(8.5±1.341),两组比较差异有显著性($P<0.01$)。结论 *c-jun* 反义基因转染可以减轻缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞凋亡性损伤。

关键词:反义基因转染;缺氧复合烧伤血清处理;*c-jun*;PcDNA3.1(+);凋亡
中图法分类号:R644.02;R845.22;R394.2 文献标识码:A

Relation of *c-jun* antisense gene transfection and cardiomyocyte apoptosis following hypoxia and burn serum treatment

HU An-gen, HUANG Yue-sheng (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relation of *c-jun* antisense gene transfection and cardiomyocyte apoptosis following hypoxia and burn serum treatment. Methods Burn serum was collected from Wistar rats with 30% total body surface area (TBSA) Ⅲ degree burn. Rats inhaling mixed gas containing 1% O_2 was used as hypoxia model. The *c-jun* antisense gene recombinant was constructed by genetic recombination technique. Cardiomyocytes from neonatal Wistar rats were cultured *in vitro* with hypoxia and burn serum treatment. *c-jun* antisense gene recombinant was transfected into the cultured cardiomyocytes. Cardiomyocytes were stained with TUNEL for the examination of cardiomyocyte apoptosis at 12, 24 and 48 h after hypoxia and burn serum treatment. In addition, the number of apoptotic cardiomyocytes was counted. The results were processed statistically. Results In the group with only the addition of burn serum and hypoxia (non-transfected group), the numbers of apoptotic cardiomyocytes (mean per high-power visual field) were 7.1±0.842, 28.4±1.635 and 13.2±1.525, respectively. But after transfection of *c-jun* antisense gene recombinant, numbers of apoptotic cardiomyocytes were 4.1±0.716, 12.3±1.455 and 8.5±1.341, respectively. There was a significant difference between the transfected group and the non-transfected group ($P<0.01$). Conclusion The *c-jun* antisense gene recombinant transfection may attenuate apoptotic injury of cardiomyocytes exposed to burn serum and hypoxia.

Key words: cardiomyocyte; PcDNA3.1(+); hypoxia; *c-jun*; antisese gene transfection; apoptosis

烧伤早期休克心是当前缺血缺氧损伤防治研究的重要课题[1],以往的研究表明[2],心肌缺血缺氧时核转录因子 *c-jun* 显著表达,增加的 *c-jun* 通过调控下游基因的表达引发心肌细胞凋亡。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,本实验通过构建 *c-jun* 反义基因重组体,转染心肌细胞,然后对心肌细胞进行缺氧复合烧伤血清处理,通过观察心肌细胞凋亡情况来探索 *c-jun* 反义基因重组体转染与心肌细胞凋亡之间的关系,希望为严重烧伤心肌损害的防治提供理论依据。

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(30125040);国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054202);全军"十五"指令性课题(01L066);高等学校骨干教师资助计划资助项目(2000);军队首批临床高新技术重大项目(2002)
作者简介:胡安根(1977—),男,江西省吉安市人,硕士,医师,主要从事严重烧伤"休克心"的防治方面的研究。电话:(023)68754149-8082;E-mail:hmfpfmhbt0301090@sina.com.cn
通信作者:黄跃生,电话:(023)68754173;E-mail:yshuang@cta.cq.cn
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-08-28

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

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

c-jun-PGEM3 质粒(Dr JB 惠赠); PcDNA3.1(+)质粒(晶美公司); *Eco*RⅠ, *Hind* Ⅲ(TaKaRa); 凝胶成像系统(BIORAD 公司); CO_2 培养箱(美 Sheldon Inc SHEL2300 型); T4 DNA Ligase (Promega)。

1.2 实验模型及分组

1.2.1 心肌细胞分离及培养 取新生 Wistar 大鼠心脏, PBS 液冲洗 3 次, 留心尖部剪碎, 加入 0.125% 胰酶 5 ml, 轻轻吹打, 37 ℃消化 7 min, 小牛血清终止反应, 弃第 1 次消化液, 重复消化 7 次, 收集每次消化液, 200 目滤网过滤消化液, 1 000 r/min 离心 10 min, DMEMf12 含胎牛血清培养基接种细胞沉淀, 光镜下观察, 见有大量悬浮细胞, 37 ℃, 5% CO_2 孵箱培养, 30 min 后差速贴壁, 并换含 Brdu 的 DMEMf12 培养基, 光镜下观察, 见有许多悬浮细胞, 37 ℃, 5% CO_2 孵箱培养。

1.2.2 烧伤血清的制备 Wistar 大鼠 20 只, 体质量 200 ~ 260 g, 实验前 12 h 禁食, 异戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉, 98 ℃烫伤 20 s, 造成 30% 总体表面积(TBSA) Ⅲ度烫伤, 伤后按 Parkland 公式补液, 6 h 后由腹主动脉抽血制备血浆, 1 000 r/min 离心收集血清备用。

1.2.3 实验分组 正常对照组; 非转染组: 10% 烧伤大鼠血清+缺氧(1% O_2); 转染组: 先转染, 然后 10% 烧伤大鼠血清+缺氧(1% O_2)。

1.3 *c-jun* 反义基因重组体的构建

1.3.1 *c-jun*-PGEM3 质粒和 PcDNA3.1(+)的酶切与回收 参照文献[3]。

1.3.2 *c-jun* 酶切片断的平端化和 PcDNA3.1(+)酶切片断的去磷酸化 按 Blunting kit 说明书操作。

1.3.2 *c-jun* 和 PcDNA3.1(+)酶切片断的连接 按 T4 DNA Ligase 说明书操作.

1.3.3 反义 *c-jun* -PcDNA3.1(+)重组体的鉴定 由于 PcDNA3.1(+)和 PGEM3 上的 *Eco*RⅠ, *Hind* Ⅲ酶切位点方向刚好相反, 所以构建出来的 *c-jun*-PcDNA3.1(+)重组体就是反义重组体。

1.4 反义-PcDNA3.1(+)重组体转染

按 Lipofectamine kit 说明书操作。

1.5 TUNEL 染色

参照文献[4]操作, 光学显微镜下观察心肌细胞, 发现细胞核中有棕褐色颗粒者为凋亡阳性细胞。在放大率为 400 倍时(每高倍镜下)随机对 10 个视野进行观察, 计算出每个视野下凋亡细胞的平均数(每高倍视野均数)。

1.6 统计学分析

凋亡细胞的数据应用 SPSS 软件包进行统计分析, 计算 $\bar{x}\pm s$, 转染组与非转染组之间进行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 *c-jun*-PcDNA3.1(+)重组体的构建和鉴定

c-jun-PGEM3 酶切结果见图 1, 片断大小分别为 2.0 kb 和 2.56 kb; 构建的 *c-jun*-PcDNA3.1(+)重组体结果见图 2, 片断大小为 7.4 kb。

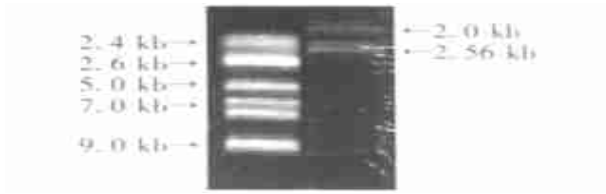


图 1 *c-jun*-PGEM3 *Eco*RⅠ, *Hind* Ⅲ双酶切结果

Fig 1 Results of *c-jun*-PGEM3 digested with *Eco*RⅠ and *Hind* Ⅲ

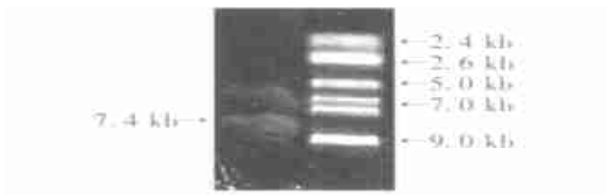


图 2 *c-jun*-PcDNA3.1(+)重组体

Fig 2 The *c-jun*-PcDNA3.1(+) recombinant

2.2 TUNEL 染色检测

正常对照组心肌细胞 TUNEL 染色阴性; 非转染组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, 细胞核大小不一, 形状不规则, 胞核中有棕黄色颗粒或核质呈均匀的棕黄色, 分布不匀, 凋亡细胞总数为(7.1±0.842)(每高倍视野均数); 24 h 时凋亡现象最显著, 凋亡细胞总数为(28.4±1.635); 48 h 凋亡征象有所减弱, 但仍较 12 h 明显, 凋亡细胞总数为(13.2±1.525); 转染组缺氧复合烧伤血清处理后 12 h, 24 h 和 48 h, 心肌细胞凋亡细胞总数分别为(4.1±0.716), (12.3±1.455)和(8.5±1.341), 其中 24 h 凋亡现象最明显, 与非转染组比较, 凋亡细胞数明显减少, 差异有显著性($P<0.01$)。

3 讨论

缺血缺氧时, 心肌细胞产生的核转录因子 *c-jun* 通过调控下游基因的转录引起心肌的蛋白组成及蛋白比例改变而导致心肌细胞凋亡, 坏死等损伤[5,6]。严重烧伤时休克心的出现实质上是一个心肌缺血缺氧损伤的过程[7]。因此, 研究如何防治缺血缺氧 *c-jun* 引起的心肌损害对严重烧伤心肌损伤的治疗有很强的理论指导意义和临床价值。为此, 本实验构建 *c-jun* 反义基因重组体, 转染进入心肌细胞, 采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况, 通过与非转染组比较, 阐明 *c-jun* 反义基因重组体转染与缺氧复合烧伤血清处理心肌细胞凋亡之间的关系, 希望为临床上防治缺血缺氧 *c-jun* 引起心肌损伤的新策略提供理论依据。

由于 PcDNA3.1(+)和 PG EM3 上的 *Eco*RⅠ, *Hind* Ⅲ酶切位点方向刚好相反, 所以本实验中构建出来的

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

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