1994, 91(20): 9 451—9 455.
[4] Canzian F, Salovaara R, Hemmink A, *et al*. Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors[J]. Cancer Res, 1996, 56(14): 3 331—3 337.
[5] Richard C B, Stephen N T, Stanley R H, *et al*. A national cancer insitute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial redisposion: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1998, 58: 5 248—5 257.
[6] Ignacio I W, Moying T, Anirban M, *et al*. Genome-wide allelotyping analysis reveals multiple sites of alletic loss in gallbladder carcinoma[J]. Cancer Res, 2001, 61: 3 795—3 800.
[7] Alfred G, Knudson. Antioncogenes and human cancer[J]. Proc Natl Acad Sci Usa, 1993, 90(23): 10 914—10 921.
[8] Mills M D, Windle J J, Albert D M. Retinoblatoma in transgenic mice: models of hereditary retinoblastoma[J]. Surv Ophthalmol, 1999, 43(6): 508—518.
[9] Doz F, Peter M, Schleiermacher G, *et al*. N-MYC amplification, loss of heterozygosity on the short arm of Chromosome 1 and DNA ploidy in retinoblastoma[J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(4): 645—649.
[10] Venkateswara R. Chromosomal abnormalities in human retinoblastoma Review[J]. Cancer, 1986, 58: 663—671.
[11] Carvenee W K, Koufos A, Hansen M F. Recessive mutant genes predisposing to human cancer[J]. Mutat Res, 1986, 168: 3—14.
[12] Zhu X, Dunn J M, Goddard A D, *et al*. Mechanism of loss of heterozygosity in retinoblastoma[J]. Cytogenet Cell Genet, 1992, 59(4): 248—252.
[13] Munier F L, Thonney F, Bamlmer A, *et al*. Prognostic factors associated with loss of heterozygosity at the RB1 locus in retinoblastoma[J]. Ophthalmic genetics, 1997, 18(1): 7—12.
[14] Lavanchy L, Munier F L, Cousin P, *et al*. Molecular characterization of the deletion in retinoblastoma patients with 13q14 cytogenetic anomalies[J]. Ophthalmic Genetics, 2001, 22(1): 1—10.
[15] Chiu L L, Lai P S, Low P S, *et al*. Molecular Studies of Loss of Heterozygosity in Retinoblastoma[J]. Ann Acad Med Singapore, 1997, 26(3): 315—319.
[16] Mitsuo V Kato, Kanji Ishizaki, Yosuke Ejima, *et al*. Loss of heterozygosity on chromosome 13 and its association with delayed growth of retinoblastma[J]. Int J Cancer, 1993, 54(6): 922—926.

（编辑 王 红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)01-0054-02

钙离子再灌注后两种胶质细胞凋亡规律比较研究

Comparative research of apoptosis rules of two glia cells after Ca^{2+} reperfusiont

马海涵，伍亚民，廖维宏，刘 媛，邵 阳，杨恒文，曾 林，龙在云 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第三研究室，重庆 400042）

近年来，凋亡现象与神经系统疾病之间的关系正随着研究的不断深入而得到更多的认识；神经胶质细胞是中枢神经系统结构和功能的重要组成部分，在病理条件下其凋亡的特性和规律必然影响到其功能实现。目前，对于星型胶质细胞和少突胶质细胞在钙离子再灌注条件下的凋亡发生规律尚无明确报道。本实验在对星形胶质细胞和少突胶质细胞分离培养、纯化的基础上，用钙离子再灌注法诱导凋亡，观察在相同凋亡诱导因素作用下两种细胞凋亡发生发展的规律及其间的差异。

1 材料与方法

1.1 标本来源及模型建立

培养并纯化星形胶质细胞和少突胶质细胞[1]。用文献[2]所载钙离子再灌注法诱导细胞发生凋亡。

1.2 试剂与方法

S-P kit购自北方同正公司，TUNEL原位细胞凋亡检测试剂盒购自博士德公司，实验过程按试剂盒操作说明。分别把纯化后的星形胶质细胞和少突胶质细胞制成细胞悬液，70%酒精固定，PI染色及RNA酶处理后，上机后进行FCM检测。

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39370689)
作者简介：马海涵(1972—)，女，河南省邓州市人，博士研究生，从事中枢神经系统损伤及再生方面研究。电话：(023)68757433
收稿日期：2001-06-23；修回日期：2001-11-29

2 结果

应用Tiger计算机图像分析系统计算每平方毫米TUNEL染色阳性细胞数，结果见表1。FCM检测结果见表2。

表1 TUNEL阳性细胞数($/mm^2$，$\bar{x}\pm s$)

分组	n	在灌注时间(t/h)			
		3	12	24	48
Ast	5	1.4±0.55 **	7.2±1.30 **	13.6±1.82 *##△	15.2±1.48 *
Oli	5	9.8±2.39	17.2±1.64	21.4±1.95	21.6±2.61

**：$P<0.01$ *vs* Oli；##：$P<0.01$ *vs* 3 h；△：$P<0.05$ *vs* 12 h

表2 流式细胞仪所测凋亡比率(%，$\bar{x}\pm s$)

分组	n	在灌注时间(t/h)			
		3	12	24	48
Ast	5	4.07±2.13 **14.69±3.52 **	19.64±4.67 **##△	19.67±2.63 **	
Oli	5	15.22±2.38	24.79±1.38	39.73±4.16 ##△	39.25±3.44

**：$P<0.01$ *vs* Oli；##：$P<0.01$ *vs* 3 h；△：$P<0.05$ *vs* 12 h

1.3 统计学方法

应用Tiger计算机图像分析系统计算每平方毫米TUNEL染色阳性细胞数，根据流式细胞仪检测收集凋亡比率数据，采用t检验进行统计学处理。

（下转57页）

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

带 Pro347Leu 的母亲和 3 名子女均在 17 岁时即出现夜盲, 母亲此次就诊时视网膜功能已严重紊乱, 大部分视野已丧失, ERG 已无杆体及锥体反应。

另外在 1 名晚发型 RP 患者中, 我们首次发现了一新的 RHO 基因突变-Pro327(1-bp del)。突变改变了视蛋白 C 末端的阅读框架(自第 327 密码子起), 致使原有的磷酸化位点及末端一段高度保守的序列-QVS(A)PA 均丧失。磷酸化位点的缺失会导致感光细胞光电转换后不能及时复苏而处于过度应激状态, 继而诱发细胞变性[8]。而另一方面 C 末端保守序列的丧失则会影响视蛋白分子在胞内的运输[7], 引发细胞变性的机理类似于 Pro347Leu 突变。以上两种可能的机制究竟哪一种比较占主导, 还有赖于通过建立相应突变的转基因模型或细胞培养系统来进行更深入地研究。

RHO 基因突变以单个碱基改变和微小缺失为突出特征, 检测时须选择比较敏感的突变筛选方法。本研究选用构象敏感凝胶电泳(CSGE), 通过设计适当的 PCR 引物控制 DNA 片断的长度以及优化电泳条件等, CSGE 的突变检出率可维持在 98%以上。另外基于我们的经验, CSGE 优于其他筛选方法的一主要特点在于其操作简便, 可同时在一条泳道中快速筛选多个大小不同的 DNA 片段, 并且电泳条件的重复性好, 适于大批量标本的突变筛选。方法不使用放射性, 不需要特殊的仪器设备或样本前处理, 只需制作一块含有适宜变性剂-缓冲液系统的标准聚丙烯酰胺凝胶[4], 适于在常规分子生物学实验室推广应用。

参考文献:

[1] Berson E L. Retinitis pigmentosa: the Friedenwald lecture[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34(5): 1 659—1 676.

[2] Dryja T P, McEvoy J A, McGee T L, *et al*. Novel rhodopsin mutations Gly114Val and Gln184Pro in dominant retinitis pigmentosa[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(10): 3 124—3 127.

[3] Gilbert C, Rahi J, Eckstein M, *et al*. Hereditary disease as a cause of childhood blindness: regional variation[J]. Ophthalmology Genetics, 1995, 16(1): 1—3.

[4] Leung Y F, POS Tam, Tong W C, *et al*. High Throughput conformation sensitive gel electrophoresis (HTCSGE) for rapid detection of novel single nucleotide polymorphisms (SNPs)[J]. Biotechniques, 2001, 30(2): 334—340.

[5] Dryja T P, McGee T L, Hahn L B, *et al*. Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa[J]. New Engl J Med, 1990, 323(19): 1 302—1 307.

[6] Li T, Snyder W K, Olsson J E, *et al*. Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S: evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(24): 14 176—14 181.

[7] Deretic D, Schmerl S, Hargrave P A, *et al*. Regulation of sorting and post-Golgi trafficking of rhodopsin by its C-terminal sequence QVS(A)PA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(18): 10 620—10 625.

[8] McDowell J H, Robinson P R, Miller R L, *et al*. Only phosphorylated residues in the carboxyl terminal region of rhodopsin will activate arrestin[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41: S608.

(编辑　王　红)

(上接 54 页)

3　讨论

在本实验中, 钙离子灌注后 3 h, 两种细胞均开始出现凋亡; 从 3 ~ 24 h, 凋亡发生与诱导后时间呈相关性; 24 ~ 48 h, 相对稳定。其他实验室的相关在体实验则观察到凋亡细胞在出现高峰以后随时间推移而比例渐低。我们认为, 由于离体培养细胞没有来自于机体全身性因素的作用, 如巨噬细胞吞噬、体液信号传导引起的其他细胞参与, 使凋亡细胞呈现相对静止状态。

近来研究发现短暂性脑缺血和脑外伤引起的继发性神经组织死亡也有凋亡。实验声明, 在不同细胞和不同凋亡诱导条件下, 细胞出现凋亡高峰的时间不尽相同, 可能在 5、5、12 或 24 h, 甚至更长[3~5], 这可能与不同的凋亡通路有关, 但多数实验证实凋亡活动具有明显的时间依赖性, 在达到高峰以前与时间呈近似的线性关系。凋亡启动时相点及其发生发展规律的进一步阐明可为临床及时采取有效的治疗措施提供可靠的理论依据。

星形胶质细胞和少突胶质细胞在接受诱导后的差异性表现可能与其不同的自我调节能力有关。已有资料证明, 少突胶质细胞是中枢神经系统中对缺氧损伤的敏感性比神经原更为敏感的细胞。在中枢神经系统中, 胶质细胞之间以及胶质细胞和神经元之间的联系多通过细胞间液内活性成分的作用实现。实验证明在星形胶质细胞膜表面, 存在着中枢神经系统内几乎所有活性因子的受体, 真正理解星型胶质细胞受体功能的意义, 还需要对在体星形胶质细胞功能有更充分的理解。

关键词: 调亡; 星型胶质细胞; 少突胶质细胞
中图法分类号: R338.1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Wu yamin, Ma haihan, Liao weihong. The purified cultivation and identification of astrocytes and oligodendrocytes from rats[J]. J Trauma Surg, 2000, 4(): 22—27.

[2] Kazuhiro Tokuma, Toshio Matsuda, Yoko Kishida, *et al*. Heat shock protects cultured rat astrocytes in a model of reperfusion injury[J]. Brain research. 1996, 735(): 265—270.

[3] Filippovich I V, Sorokina N I, Robillard N, *et al*. Radiation—induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells growing as a monolayer and as multicell spheroids[J]. Int J Cancer, 1997, 72(5): 851—859.

[4] Wirleitner B, Baier Bitterlich G, Bock G. 7, 8-Dihydroneopterin—induced apoptosis in Jurkat T lymphocytes: a comparison with anti-Fas- and hydrogen peroxide-mediated cell death[J]. Biochem Pharmacol, 1998, 56(9): 1 181—1 187.

[5] Mello M A, Tuan R S. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999, 35(5): 262—269.

(编辑　王　红)

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