DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.017
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0857-03

论著

呼吸性酸碱失衡对家兔肾脏内髓集合管细胞碳酸酐酶活性及其mRNA表达的影响

夏前明,钱桂生,黄 坚,肖贞良 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨呼吸性酸碱失衡对家兔内髓集合管(IMCD)细胞碳酸酐酶(CA)活性及其mRNA表达的影响。方法 采用咪唑-Tris技术测定呼吸性酸碱失衡IMCD细胞的CA活性;分别用原位杂交和RT-PCR检测这些细胞CA Ⅳ mRNA的表达变化。结果 呼酸组的CA的$T_{1/2}$明显缩短,而呼碱组显著延长。原位杂交和RT-PCR结果均显示呼酸显著上调CA Ⅳ mRNA表达;呼碱下调CA Ⅳ mRNA表达,但与对照组无显著差别。结论 呼酸显著影响家兔肾脏IMCD细胞CA活性及其mRNA表达;呼碱显著降低CA活性,而CA Ⅳ的mRNA表达无明显下调,其原因尚等进一步研究。

关键词:酸碱失衡;内髓集合管;细胞培养;碳酸酐酶;基因表达
中图法分类号:R394-3;R589.6 文献标识码:A

Effect of respiratory acid-base unbalance on carbonic anhydrase activity and its mRNA expression in primary cultured rabbit renal IMCD cells

XIA Qian-ming, QIAN Gui-sheng, HUANG Jian, XIAO Zhen-liang (Research Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of respiratory acid-base unbalance on carbonic anhydrase (CA) activity and its type Ⅳ mRNA expression in primary cultured rabbit renal inner medullary collecting duct (IMCD) cells. Methods CA activity in unbalanced IMCD cells was measured with imidazole-Tris technique. The expression of CA Ⅳ mRNA was detected with RT-PCR and *in situ* hybridization. Results The reactive time of CA ($T_{1/2}$) was significantly shorter in the respiratory acidosis group (ACG) but markedly longer in the respiratory alkalosis group (ALG) as compared with the control group (CG). Both *in situ* hybridization and RT-PCR showed that CA Ⅳ mRNA expression was obviously up-regulated in ACG but down-regulated in ALG which had no difference with CG. Conclusion Respiratory acidosis plays a very important role in CA activity and CA Ⅳ mRNA expression in primary cultured rabbit IMCD cells. However, the phenomenon of respiratory alkalosis can lower CA activity but no marked down-regulate CA Ⅳ mRNA expression. Needs further to investigation.

Key words: acid-base unbalance; inner medullary collecting duct; cell culture; carbonic anhydrase; gene expression

内髓集合管(Inner medullary collecting duct, IMCD)是哺乳类动物肾小管的最后节段,被称为尿液pH的"最终调节器"。早期的免疫组化研究没有检出IMCD细胞的碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA),近年来研究证实IMCD细胞存在着2种CA亚型,即CA Ⅱ(胞浆型)和CA Ⅳ(膜结合型)[1~3]。新近,Winkler等[4]观察代谢性酸中毒使家兔肾脏内髓CA Ⅳ mRNA表达升高。目前尚未见有呼吸性酸碱失衡对肾脏IMCD细胞CA活性及其mRNA表达影响的研究报道。本研究观察呼吸性酸碱失衡时,家兔肾脏IMCD细胞CA活性及其mRNA表达的变化,以便深入认识呼吸性酸碱失衡

作者简介:夏前明(1955-),男,四川省泸州市人,博士,副主任医师,主要从事酸碱平衡调节、血气分析方面的研究,发表论文30余篇,现在成都军区成都总医院呼吸科,成都 610083。电话:(028)5565811

收稿日期:1999-07-15;修回日期:2000-03-13

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

时,IMCD细胞酸碱平衡的代偿调节规律。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

1月龄新西兰大白兔,购自第三军医大学实验动物中心,体重350~400 g,雌雄不拘。DMEM/F12(Gibco),1.3′-末端地高辛标记试剂盒、地高辛标记检测试剂盒、Trpure分离试剂盒(BM),AMV逆转录酶、Oligadt、dNTP、RNA酶抑制物(Promage),Taq酶(Sangon),DNA标记、DEPC、SDS(Sigma)。恒温CO_2孵箱(Shell-Lab),PCR仪(Bio-Rad),920型细胞图像分析仪(重庆泰格尔图形图像工程技术研究所)。

1.2 呼吸性酸碱失衡细胞培养模型的制备

用胶原酶消化-低渗溶解法分离IMCD细胞,将分散IMCD细胞接种在玻璃培养瓶内(用于测定CA活性或RT-PCR)或孔板内的盖玻片上(用于原位杂交),补充适量的含10%小牛血清的DMEM/F12培养基,在5%CO_2+空气平衡、37 ℃培养6~7 d,细胞接近融合[5]。参照Mrkic等[6]报道的呼吸性酸碱失衡近端小管细胞培养模型的制备方法,更换为无血清培养基后,分别将细胞转入3%CO_2+空气平衡或10%CO_2+空气平衡,37 ℃培养72 h,间隔(36±1) h更换1次培养基,即为呼吸性碱中毒(呼碱,ALG)或呼吸性酸中毒(呼酸,ACG)IMCD细胞培养模型。对照组(CG)为5%CO_2+空气平衡,其他条件完全相同。

1.3 IMCD细胞CA反应速率测定

本实验采用Brion等[7]建立的咪唑-Tris技术测定IMCD细胞CA反应速率,然后将各组的1/2反应时间($T_{1/2}$)进行比较。

1.4 原位杂交

根据Winkler等[4]的文献,由中国科学院上海生物工程中心合成寡核苷酸探针:5′-CAGGAA GCC GGC CAG GCA-3′。寡核苷酸探针地高辛(Dig)标记使用3′-末端转移法,标记效率检测按试剂盒介绍的方法进行,实际标记效率约为90%。原位杂交参照路建平等[8]介绍的方法。原位杂交结果扫描入920型细胞图像分析仪进行图像分析。染色越深,积分光密度(IOD)越大,反映mRNA表达量越大。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

采用RT-PCR,通过设立β-actin阳性对照,作基因转录之mRNA的半定量测定[4]。下列引物由中国科学院上海生物工程中心合成。

CA Ⅳ primer

Sense 5′-CAC TTT GCC ATG GAG ATG CAC-3′

Antisense 5′-CAG GAA GCC GGC CAG CAG GCA-3′

β-actin primer

Sense 5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGAC-3′

Antisense 5′-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGAC-3′

参照Tripure分离试剂说明提取总RNA,按两管两步法进行逆转录,然后进行PCR扩增反应,反应条件首次循环:94 ℃变性2 min,55 ℃退火1 min,72 ℃延伸1 min;2~34次循环:94 ℃变性1 min,55 ℃退火1 min,72延伸1.5 min;末次循环:72 ℃延伸10 min。每孔加入15 μl PCR反应终产物,于2%琼脂糖凝胶电泳2 h。将琼脂糖凝胶电泳图像扫描入920型细胞图像分析仪,分析目的电泳带和相对应的β-actin带的IOD,然后将$IOD_{(目的带)}/IOD_{(\beta\text{-actin})}$之比值进行统计分析。$IOD_{(目的带)}/IOD_{(\beta\text{-actin})}$越大,说明目的基因的相对表达量越大。

1.6 统计学处理

资料用$\bar{x}\pm s$表示,用非配对t检验作组间差异显著性检验。

2 结果

2.1 呼吸性酸碱失衡对原代培养家兔IMCD细胞CA($T_{1/2}$)的影响

ACG的$T_{1/2}$显著短于CG($P<0.01$),ALG的$T_{1/2}$显著长于CG($P<0.01$),见表1。

表1 呼吸性酸碱失衡对原代培养兔IMCD细胞CA($T_{1/2}$)的影响

Tab 1 Effect of respiratory acid-base unbalance on $T_{1/2}$ of CA in primary cultured rabbit IMCD cells

Group	n	$T_{1/2}$(t/s)
CG	12	27.225±0.055
ALG	8	32.513±0.053★
ACG	9	25.111±0.131★

CG: Control; ALG: Respiratory alkalosis group; ACG: Respiratory acidosis group; ★: $P<0.01$ *vs* CG

2.2 呼吸性酸碱失衡对原代培养家兔IMCD细胞CA Ⅳ mRNA的表达影响

2.2.1 CA Ⅳ mRNA原位杂交分析结果 CG的IOD为75.08±23.78;ALG的IOD为53.86±23.18;ACG的IOD为401.00±95.59。ALG与CG之间差别不显著($P>0.05$),ACG显著高于CG($P<0.01$)。

2.2.2 CA Ⅳ mRNA的RT-PCR检测结果 本实验CG的CA Ⅳ mRNA的相对表达量为1.63±0.12,ALG的相对表达量为1.48±0.14,ACG的相对表达量为5.06±0.38,ACG显著高于CG($P<0.01$),ALG略低于CG,但无显著的统计学差别($P>0.05$)。

3 讨论

CAs是一类含锌的金属酶,目前确定CAs有7种亚型[9],在肾脏主要表达胞浆型(CA Ⅱ)和膜结合型

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

(CA Ⅳ)两种亚型。CA Ⅱ含量较高, 正常情况下对 CO_2 水合反应的催化不存在问题, 因而 CA Ⅳ就成为 CO_2 水合反应的限速因素。CA Ⅱ缺陷的小鼠和病人, 肾脏仍有 CA Ⅳ活性, 这些可能就是 CA Ⅳ越来越受重视的原因。

1992 年, Okuyama 等[3] 克隆出人 CA ⅣcDNA, CA ⅣcDNA 长 1 105 bp, 包括 47 bp 的 5′-端非翻译区, 936 bp 的开放阅读窗和 122 bp 的 3′-端非翻译区。新近, Tamai 等[9] 发现, 小鼠编码 CA Ⅳ的基因长约 8.2 kb, 小鼠和大鼠 CA ⅣcDNA 的核苷酸序列同源性 84%, 小鼠与人 CA Ⅳ编码区序列同源性 69%, 所有外显子/内含子交界区都是保守的。推衍的 312 个氨基酸序列与人肺 CA Ⅳ几乎完全吻合, 肺和肾的 CA Ⅳ都是通过糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜上。这种结构上的相似性可能是肺和肾参与体内酸碱平衡调节相关性的物质基础。

以前测定 CA 活性大多采用碳酸-碳酸氢盐技术。由于其敏感性差, 几乎不能测出 IMCD 细胞的 CA 活性。1988 年, Brion 等[7] 建立了咪唑-Tris 技术, 明显提高测定敏感性, 可用于 IMCD 细胞的 CA 活性测定。其基本原理是 CA 催化 CO_2 和 H_2O 反应, 使溶液酸化, 导致指示剂(对硝基苯酚)的颜色改变, 指示剂颜色改变速率反映的是 CA 催化反应速率。本研究采用咪唑-Tris 技术, 观察呼吸性酸碱失衡对原代培养家兔 IMCD 细胞 CA 的 $T_{1/2}$的影响, 结果显示呼酸组的 $T_{1/2}$显著短于对照组($P<0.01$), 呼碱组则显著长于对照组($P<0.01$)。可见, 呼吸性酸碱失衡影响 CA 活性, 通过增加或减少 H^+ 分泌和 HCO_3^- 重吸收, 来代偿呼酸或呼碱。显然, IMCD 细胞的 CA 在呼吸性酸碱失衡代偿调节中起重要作用。

本实验观察呼吸性酸碱失衡家兔 IMCD 细胞 CA Ⅳ mRNA 表达的变化特点, 结果显示呼酸组原位杂交信号和 RT-PCR 产量均明显高于对照组($P<0.01$), 呼碱组原位杂交信号和 RT-PCR 产量降低, 但与对照组相比, 无明显的统计学差别($P>0.05$)。呼酸组 CA Ⅳ mRNA 表达增加可能反映 CA Ⅳ表达增加。CA 能催化 CO_2 与 H_2O 形成 H_2CO_3, H_2CO_3 再解离为 H^+ 和 HCO_3^-, 既促进 H^+ 分泌, 又增加 HCO_3^- 重吸收。可见 CA 在呼酸代偿调节中的作用极为重要。呼碱组 CA Ⅳ的 mRNA 表达无显著降低, 是否系呼碱组 CO_2 降低的幅度不足, 这一问题尚需进一步研究。

酸碱失衡对肾脏 CA Ⅳ mRNA 表达的影响, 目前研究较少。Winkler[4] 采用原位杂交和 RT-PCR 技术首次确定 CA Ⅳ在家兔肾脏的表达情况, 内髓质明显高于皮质, 并观察到代酸使家兔肾脏内髓 CA Ⅳ mRNA 表达升高, 但因变异较大, 无明显的统计学差异。目前尚未见有呼吸性酸碱失衡对肾脏 CA Ⅳ mRNA 表达影响的研究报道。本实验不仅证明呼吸性酸碱失衡明显影响 IMCD 细胞 CA Ⅳ mRNA 表达, 而且所采用培养的单一 IMCD 细胞作实验标本, 更为准确地反映 IMCD 的代偿调节作用。

参考文献:

[1] Schwartz J H. Renal acid-base transport: the regulatory role of the inner medullary collecting duct[J]. Kidney Int, 1995, 47(2): 333—341.

[2] Brown D, Kumpulainen T, Roth J, *et al*. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase in postnatal and adult rat kidney [J]. Am J Physiol, 1983, 245(1): F110—118.

[3] Baird T T, Waheed A, Okuyama T, *et al*. Catalysis and inhibition of carbonic anhydrase Ⅳ[J]. Biochemistry, 1997, 36(9): 2 669—2 678.

[4] Winkler C A, Kittelberger A M, Schwartz G J. Expression of carbonic anhydrase Ⅳ mRNA in rabbit kidney: stimulation by metabolic acidosis[J]. Am J Physiol, 1997, 272(4 Pt 2): 551—560.

[5] 夏前明, 黄　坚, 肖贞良, 等. 家兔肾脏内髓集合管细胞的分离与原代培养[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(1): 92—94.

[6] Mrkic M, Helmle-Kolb C, Krapf R, *et al*. Functional adaptation to high PCO_2 of apically and basolaterally located Na^+/H^+ exchange activities in cultured renal cell lines[J]. Pfluegers Arch, 1994, 426(3-4): 333—340.

[7] Brion L P, Schwartz J H, Zavilowitz B J, *et al*. Micromethod for the measurement of carbonic anhydrase activity in cellular homogenates[J]. Anal Biochem, 1988, 175(1): 289—293.

[8] 路建平. 非放射性杂交技术[M]. 海口: 南海出版公司, 1996. 66—73.

[9] Tamai S, Cody L B, Sly W S. Molecular cloning of the mouse gene coding for carbonic anhydrase Ⅳ[J]. Biochem Genet, 1996, 34(1-2): 31—43.

(编辑　薛国文)

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