DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.006

不同龄大鼠大脑神经细胞核染色质 10 nm和 30 nm纤维核小体排布特征分析*

茆象千** 彭家和 董 覃*** 邱 平 (第三军医大学基础医学部生物化学教研室) 重庆,400038

提 要 目的:观察不同年龄大鼠大脑神经细胞核染色质 10 nm和 30 nm纤维核小体排布特征,探讨老化过程导致大脑神经细胞核转录活性衰退的分子机制。方法:选用微球菌核酸酶(MCN)为染色质结构识别探针,经蔗糖密度梯度离心、凝胶电泳,可显示不同龄大鼠大脑染色质结构特征的变化。结果:幼年鼠、成年鼠和老年鼠大脑染色质 10 nm纤维核小体重复长度分别保持在(176± 4)、(175± 6)和(178± 7)bp水平上;而 30 nm抗酶解寡聚体核小体数目为:酶解 30%染色质时,分别是(39± 0.47)、(42± 0.26)和(46± 0.02);酶解 50%染色质时,则是(18± 0.12)、(21± 0.41)和(26± 0.27)。结论:大鼠大脑细胞核 10 nm染色质纤维核小体重复长度不受老化过程影响;30 nm纤维抗酶解寡聚体大小与年龄呈正相关,提示大鼠老化过程大脑染色质构象发生不利于 MCN酶解的变化,这可能是老化导致转录功能衰退的重要原因之一。

关键词 大脑;染色质构象;核小体
中图法分类号 R338.25

真核生物遗传信息载体 DNA以染色质形式存在于细胞核中,细胞分裂间期染色质 DNA在 10 nm纤维多聚核小体结构的基础上进一步卷曲、折叠形成具有 30 nm直径多层次的复合超螺旋构象[1]。已往研究结果证实,核小体及其转录调节因子不仅作为染色质基本结构单元,而且在细胞核内的排布特征参与了真核基因表达正、负调控全能(Omnipotent)效应,直接影响生物发育、衰老变化过程[2,3]。我们及国外一些实验室在研究中发现,大鼠老化过程脑神经元细胞核转录功能减退,染色质模板活性降低[4],因而有必要进一步对染色质 10 nm和 30 nm核小体构象特征进行分析,以期从染色质结构水平上获得老化过程导致脑神经细胞核染色质转录功能衰退的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 不同龄的健康 Wistar大鼠,雌雄随机按年龄分为幼年鼠(16~ 17周龄)、成年鼠(30~ 33周龄)和老年鼠(100~ 105周龄)。老年 Wistar大鼠模型由我校动物中心共同协作建立。

1.1.2 主要实验试剂 微球菌核酸酶(MCN)、优质超纯蔗糖(不含核酸酶)为 Sigma公司产品;苯甲基磺酰氟(PMSF)为 Boehringer Mannhein公司产品;琼脂糖为 Pharmacia公司产品,DNA标准华美公司产品;其他常用普通化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大脑神经细胞核分离、纯化 参照本室的方法[5]。①按每克脑组织加入 15 ml A液(300 mmol/L蔗糖、150 mmol/L KCl、50 mmol/L $MgCl_2$、0.5 mmol/L PMSF、0.5% Triton-X100、10 mmol/L Tris-HCl,pH7.0),用 Teflon杵玻璃匀浆器(间隙为 150μm)手动匀浆约 12~ 15次,200目尼龙布过滤,残渣重复匀浆过滤,两次滤液合并,3 000 r/min离心 10 min,获粗核沉淀。②将粗核均匀悬浮于 60 ml B液(2.1 mol/L蔗糖、150 mmol/L KCl、50 mmol/L $MgCl_2$、0.5 mmol/L PMSF、10 mmol/L Tris-HCl,pH7.0)25 000 r/min超离心 1 h,获纯核。③以 C液(0.5 mmol/L $MgCl_2$、25%甘油、10 mmol/L Tris-HCl,pH7.0)制成 1 mg/ml核悬液,低温保存备用。全部操作需在 4℃条件下进行,耗时约 3 h。

1.2.2 MCN酶解脑神经细胞核 参照 Walker等[6]的方法,取细胞核悬液 3 000 r/min 4℃离心 10 min,与酶解基质液(150 mmol/L KCl、0.5 mmol/L PMSF、8.3%甘油、10 mmol/L Tris-HCl,pH8.2)配制成含核 DNA 1 mg/ml核悬液,30℃预温 5 min,加入 MCN 40 u/mg DNA酶解到指定时间,加入 0.1 mol/L EDTA,使之最终浓度为 10 mmol/L终止反应,冰浴中静置 10 min,17 000 r/min离心 15 min,得可溶性上清和沉淀 DNA,并计算酶解百分率。

1.2.3 蔗糖密度梯度离心分析 参照并改进 Walker等[6]的方法,用梯度仪制 10%~ 35%(W/W)蔗糖梯度(含 150 mmol/L KCl、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.6)上层加可溶性上清 DNA 0.5 ml,4℃ 40 000 r/min离心

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39570353
** 茆象千,男,60岁,教授 *** 现在重庆市第三人民医院中心实验室 重庆,400000
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5 h,以核酸蛋白检测仪检测并分部收集 25~ 30管,每管 0.25 ml.

1.2.4 电泳　酶解可溶性上清 DNA或经蔗糖密度梯度离心收集的峰顶管 DNA,均用氯仿∶异戊醇(24∶1)提取 2次,加 2.5倍体积无水乙醇 - 20℃沉淀,然后进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,紫外观察、照像。由 DNA标准确定各区带碱基对数(bp)。前者用于单核小体重复长度分析,后者计算抗酶解寡聚体核小体数。

$$\text{酶解寡聚体含核小体数} = \frac{\text{酶解寡聚体 DNA碱基对数}}{\text{单核小体 DNA碱基对数}}$$

2 结果

2.1 大脑神经核染色质核小体重复长度分析

不同龄大鼠大脑神经细胞核经 MCN酶解 10 min,染色质 DNA降解为单核小体及其寡聚体形式,在电泳图谱上表现为重复排列的核小体结构特征,见图 1.

依据 DNA标准的碱基对,求得幼年鼠、成年鼠和老年鼠大脑神经细胞核染色质 DNA重复长度的碱基对数,分别稳定在(176± 4)、(175± 6)和(178± 7)水平上,见表 1,无明显随龄变化特征,提示大鼠老化过程大脑神经细胞核染色质 10 nm纤维核小体连接 DNA长度年龄差异不明显。

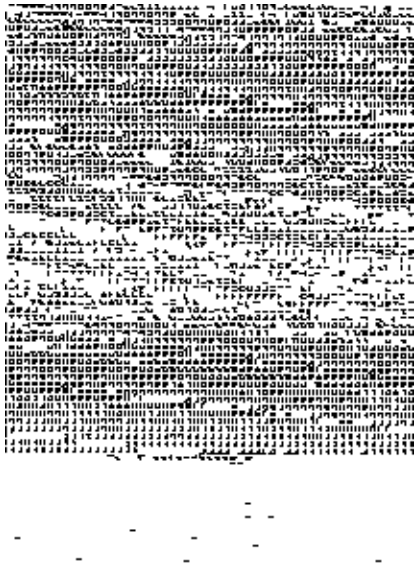


图 1　染色质核小体电泳图谱

Fig 1　Electrophoretogram of chromatin nucleosome

1. Young rats　2. Adult rats　3. Old rats　4, 5. DNA markers

表 1　核小体 DNA平均重复长度(碱基对,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Average repeat lengths (base pairs) of nucleosome DNA ($\bar{x}\pm s$)

Band	Young rats		Adult rats		Old rats	
	bp	△bp	bp	△bp	bp	△bp
1	174± 4		168± 3		171± 6	
2	354± 6	180± 5	339± 4	171± 2	345± 3	174± 4
3	525± 5	171± 4	519± 6	180± 4	525± 5	180± 7
4	704± 8	179± 6	689± 5	169± 6	703± 7	178± 5
5	877± 9	173± 7	868± 6	179± 9	879± 7	176± 9
6			1041± 14	174± 7	1053± 13	180± 5
Repeat length		176± 4		175± 6		178± 7

2.2 大脑神经细胞核染色质抗 MCN酶解寡聚体核小体数分析

图 2为不同龄大鼠大脑神经细胞核 MCN酶解 6 min后,可溶性上清 DNA蔗糖密度梯度离心分部收集检测曲线。

图中显示:MCN酶解程度不同,吸收峰的位置不同;但酶解程度相同,而年龄不同时,吸收峰的位置也不同,这表明不同龄大鼠大脑神经细胞核染色质经 MCN相同程度酶解时,呈现大小不等的抗酶解寡聚体。

为比较抗 MCN酶解寡聚体核小体组成数量的差异,取各年龄组 30%和 50%酶解时分部收集的峰管组分抽提、纯化的 DNA进行琼脂糖凝胶电泳,由 DNA标准求得 30%和 50%酶解时,各年龄组抗酶解寡聚体碱基对数,再分别除以各年龄组单体重复长度即为抗 MCN酶解寡聚体包含的核小体数,见表 2.

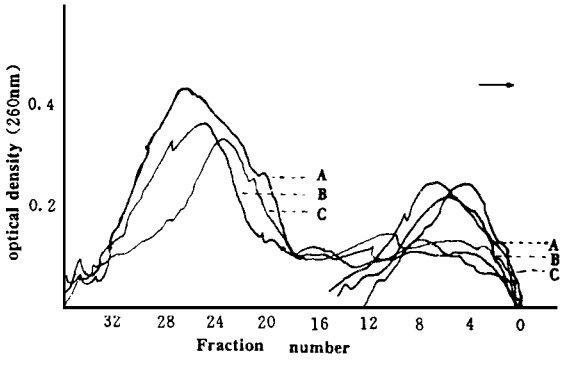


图 2　MCN酶解的 DNA寡聚体蔗糖密度梯度离心分析

Fig 2　Sucrose density gradient centrifugal analysis of DNA oligomers from cerebrum released by MCN. The digestion percentage was 30% (right) and 50% (left)

A: Young rats; B: Adult rats; C: Old rats. The horizontal arrow indicates the direction of sedimentation.

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

表 2 不同龄大鼠大脑染色质寡聚体 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Cerebral chromatin oligomers of different age rats ($\bar{x}\pm s$)

	30% digestion			50% digestion		
	Young rats	Adult rats	Old rats	Young rats	Adult rats	Old rats
Number of base pair	6948± 38	8187± 23	7396± 57	3190± 48	3747± 22	4676± 52
Nucleosomes	39± 0.47	42± 0.26	46± 0.02	18± 0.12	21± 0.41	26± 0.27

比较不同年龄、不同酶解程度的抗 MCN酶解寡聚体核小体数发现: 无论 30% 还是 50% 酶解时,抗酶解寡聚体核小体数均随年龄增加而递增,以 50% 酶解时,递增更为显著。

3 讨论

MCN能够选择性剪切染色质核小体间连接 DNA,将染色质 10 nm纤维多聚核小体分解为单体。当染色质由 10 nm多聚核小体组装成 30 nm染色质超卷曲结构过程中,核小体借连接 DNA区域相互靠拢、接合,其连接 DNA被遮蔽而不易被 MCN酶切,常常以抗 MCN酶解寡聚体形式出现[6]。因此,染色质可接近程度是 MCN识别染色质不同结构层次内 DNA构象的决定因素,它主要表现在 MCN 对染色质 10 nm核小体表面缠绕 DNA的接触和对 30 nm及其以上结构层次中 DNA超螺旋卷曲、折叠形成的空隙内部的渗透,这样,只有 MCN分子直径能够满足一定层次"腔隙"的内在空间要求时,才能够对构成该"腔隙"的结构层次内所具有的 DNA构象特征进行识别。

本研究选用不同龄大鼠大脑神经细胞核为研究对象,以 MCN为染色质结构识别探针,对核小体 10 nm纤维线性排布和 30 nm纤维空间排布特征进行观察,结果显示: 幼年鼠、成年鼠和老年鼠大脑染色质 10 nm纤维核小体重复长度分别稳定在 (176± 4) bp、(175± 6) bp和 (178± 7) bp水平上,未发现有随龄变化特征。由于各年龄组大鼠核小体核心 DNA均为 140 bp,说明核小体间连接 DNA长度与脑老化神经元功能状态无明显联系,其原因可能与脑老化过程染色质组蛋白组成高度保守性有关[5,7]。在 150 mmol/L KCl离子浓度下,又进一步观察老化过程 30 nm染色质纤维抗 MCN酶解寡聚体包含的核小体数,结果表明: 不同龄大鼠抗 MCN酶解寡聚体有随老化过程核小体数增加趋势,尤以 50% MCN 酶解时,核小体数增加更为显著。这显示大鼠老化过程大脑染色质构象发生不利于 MCN 分子接近的构象变化。结果与 Das等[8]证明 EcoRI酶解缺口翻译也显示老龄大鼠较幼龄大鼠脑神经元染色质具有更致密的染色质构象结果相似。

以上结果从另一侧面获得了大鼠老化过程脑神经细胞核染色质构象收缩的直接证据,为进一步研究老化过程脑细胞染色质构象变化规律,阐明老化影响真核基因表达的机制提供新的研究途径。

参考文献

1 Suman M P, Rohinton T K, James T K. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymeraseⅡ. Annu Rev Biochem, 1994, 63(297): 265

2 Medvedv Z A. Age changes of chromatin. Mech Aging Dev, 1984, 28(2): 149

3 Timmusk T, Belluardo N, Persson H. Developmental regulation of brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs transcribed from different promoters in the rat brain. Neuroscience, 1994; 60(2): 287

4 邱 平,易禄康.大鼠老化过程大脑皮层细胞、染色质转录研究.生物化学杂志, 1990, 6(4): 339

5 彭家和,茆象千,邱 平.不同龄大鼠脑神经元细胞核的纯化及其性质的比较.第三军医大学学报, 1994, 16(6): 398

6 Walker P R, Sikorska M, Whithfield J F. Chromatin structure-nuclease digestion profiles reflect intermediats stages in the folding of the 30 nm fiber rather than the existence of subunit beads. J Biol Chem, 1986, 261(15): 7044

7 Patterton H G, Landel C C, Landsman D. The biochemical and phenotypic characterization of Hholp, the putative linker histone H_1 of saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem, 1998, 273(13): 7268

8 Das B R, Kanungo M S. Developmental changes in the chromatin of the brain of the rat: analysis by nick-translation. Molec Biol Rep, 1986, 11(197): 195

(收稿: 1998-04-06;修回: 1998-10-07)

(编辑 汪勤俭)

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

Characteristics of arrangement of 10 nm and 30 nm chromatin fiber necleosomes in cerebral cell nuclei in rats of different ages

Mao Xiangqian, Peng Jiahe, Dong Qin, Qiu Ping (Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective:** To observe the characteristics of arrangement of 10 nm and 30 nm chromatin fiber necleosomes in cerebral cell nuclei in rats of different ages and explore the molecular mechanism for the inducing effects of aging on decline in transcription activities of the cerebral cell nuclei. **Methods:** Micrococcal nuclease (MCN) was used as the probe to study chromatin structure and agarose gel electrophoresis and sucrose density gradient centrifugation were employed to investigate the changes of cerebral chromatin structure in rats of different ages. **Results:** The 10 nm chromatin fiber of the cerebral nuclei in young, adult and old rats had a repeat length of 176± 4, 175± 6 and 178± 7 bp respectively. In 30 nm chromatin fiber oligomers, the number of nucleosomes was 39± 0.47, 42± 0.26 and 46± 0.02 when 30% chromatin had been digested by MCN, but 18± 0.12, 21± 0.41 and 26± 0.27 when 50% chromatin had been digested by MCN in the young, adult and old rats respectively. **Conclusion:** The repeat length of the nucleosomes in 10 nm chromatin fibers in the cerebral nuclei is not associated with aging. The size of oligomers in 30 nm chromatin fibers is positively correlated to aging. These suggest that the changes of the cerebral nuclear chromatin against MCN digestion occur during aging, which might be one of the important reasons for decline in transcription of the cerebral nuclei caused by aging.

Key words cerebrum; chromatin; nucleosome; structure; rat

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39570353

颌面刀砍伤并发颅内血肿 1例报告

A case report of intracranial hematoma accompanying maxillofacial cut wound

胡学明* 谭颖徽 (第三军医大学附属新桥医院口腔科) 重庆, 400037

颌面部和颅脑解剖位置相连,在高速交通事故伤和火器伤中常见并发损伤[1,2],但面部刀砍伤致颅内血肿少见报道。

1 一般资料

患者王某,男,10岁,因右颞颧区菜刀砍伤 6 h入院。入院时检查神志清楚,呼吸平稳,脉搏稍快, 130次/min,血压 12 kPa/8 kPa。面部检查见:右眶外侧至右枕部有一长 10 cm的软组织裂伤,深达颞骨、枕骨骨面,另有一裂伤自右颧骨下方至右耳屏,长 6 cm,伤口已无明显出血,伤口内充满凝血块。立即输血、补液,同时送手术室急诊全麻下清创。术中见右颞骨、枕骨骨面均有线形骨折,但颅骨无凹陷,清创后放引流分层对位缝合。术后 6 h患者仍未清醒,但生命体征平稳,急诊头颅 CT检查,报告:右颞部硬膜外血肿。立即转脑外科急诊开颅手术,清除颅内血肿,术后 8 h患者清醒,术后 7~ 10 d面部、头部拆线,伤口愈合良好,神经系统检查无明显异常发现。

2 讨论

由于颌面和颅脑间的特殊解剖关系,各种类型损伤时均易发生并发损伤。本文报告的病例即为面部刀砍伤并发颅内血肿,由于初诊时无任何颅内损伤的症状和体征,未作特殊检查和处理。面部手术后密切观察病情,发现异常表现后立即作相应检查,迅速作出诊断和治疗,使患者转危为安。

关键词 颅内血肿;面部损伤

中图法分类号 R782.4

参考文献

1 薄 斌,顾小明,周树夏,等. 1693名颌面创伤临床病例回顾性研究.华西口腔医学杂志, 1998, 16(1): 56

2 Tan Y H, Zhou S X, Li Z Y, *et al*. A gross and microscopic study of cerebral injury accompanying maxillofacial high-velocity projectiles wounding in dogs. J Oral Maxillofac Surg, 1998, 56(3): 345

(收稿: 1998-05-11;修回: 1998-10-09)

(编辑 冷怀明)

* 胡学明,男,42岁,医师,四川省华蓥市中医院口腔科进修生。

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