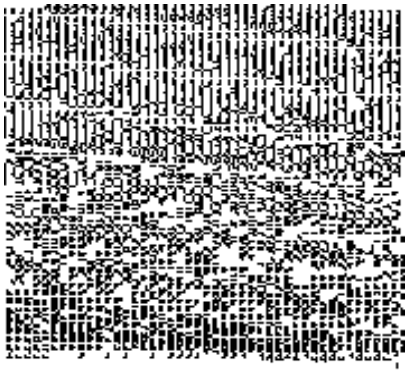
DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.033

2 结果

LDH-H亚单位的各外显子分析结果见附图,其中外显子 4显示出异常的泳动度。SSCP改进法与原法所需时间比较见表2



附图 PCR产物的 SSCP分析检测人 LDH-H基因变异
2 3 4 5 6代表外显子,加 N代表相应的正常对照

表 2 SSCP改进法与原法所需时间的比较(t /h)

步骤	原法	改进法
PCR	3	3
SSCP	2	2
凝胶干燥	1	
放射自显影	24	
染色		1
总时间	30	6

3 讨论

近年来,PCR-SSCP技术被广泛地应用于各个领域的基因变异分析[2,3]。DNA扩增产物变性成单链后在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,因单链 DNA的高级结构随着碱基序列的改变而变化,在电泳时表现为泳动度的改变,因此发生变异的 DNA与正常 DNA在电泳时的泳动位置各异,故能检出单个碱基的变异。这种方法被称为 DNA的单链构象多型性(SSCP),但是最初的方法在鉴定区分开的各带时需要使用放射性同位素标记引物,通过放射自显影分析结果,限制了常规实验室的普及。

我们用非放射性的银染色法代替放射性的同位素标记法进行 SSCP分析,对乳酸脱氢酶基因的点突变的检出非常方便,特别是使用 Phast system全自动电泳系统,大大地减少了人工操作手续,提高了检测的灵敏度,从附图可以清楚地看到区分的各带,分辨率极高,测定下限可达 20 pg/带。

银染色过程中的高温条件增加了试剂在凝胶中的扩散,加速了染色和脱色的过程,使染色所需时间大为减少。由表可见改进法比原法减少了 1 d的时间。因此从检测基因变异的灵敏度,操作的安全,所需时间等方面综合考虑,非放射性的 SSCP法比放射性的原法具有更实用的优点,适于在常规实验室中普及。

关键词 银染色法;PCR-SSCP;乳酸脱氢酶;亚单位变异
中图法分类号 Q7

参考文献

1 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T *et al*. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 1989; 5: 874
2 Mashiyama S, Murakami Y, Yoshimoto T *et al*. Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand coformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene, 1991; 6: 1313
3 Labrune P, Melle D, Rey F *et al*. Single-strand conformation polyorphism for detection of mutations and base substitutions in phenylketonuria. Am J Hum Genet, 1991; 48: 1115

(收稿: 1997-07-04;修回: 1998-01-08)
(编辑 张大春)

大鼠生后脑星形胶质细胞发育的形态学观察

A morphological study on postnatal rat brain astrocytes

邓晓林* 蔡文琴 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室)重庆,400038

提 要 目的:观察大鼠生后脑星形胶质细胞发育特征,推测其在大鼠脑发育中的作用。方法:采用胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体进行免疫组化染色。结果:① 大鼠脑 GFAP阳性星形胶质细胞的分布于生后 3个

* 邓晓林,男,33岁,讲师,博士

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

月达成体状态。② 室管膜区及室管膜下区辐射状 GFAP阳性细胞不明显,整个大脑 GFAP阳性细胞形态相对单一。③ 海马和齿状回的 GFAP阳性细胞呈规则的分层排列。结论: 大鼠脑星形胶质细胞发育较晚,提示其对神经元迁移的引导作用可能不如人类重要;随着成熟,星形胶质细胞形成固定而独特的分布模式。

随着对脑发育过程中辐射状胶质纤维 (包括辐射状胶质母细胞和辐射状星形胶质细胞两类) 的认识,人脑辐射状星形胶质细胞对神经元迁移的引导作用受到肯定,而鼠脑神经元迁移是否如此,尚未见明确结论[2];此外,新近关于胶质网络概念的提出和对其生理特性的了解[3],提示星形胶质细胞的不同分布模式可能潜在有其独特的生理意义。本实验对大鼠生后不同时期脑星形胶质细胞进行胶质纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫组化染色,了解其分布特性,推测其在脑发育中的可能作用。

1 材料与方法

Wistar大鼠 63只,按年龄分为生后 1、3、6、9、14、21 d、3、6、12月 9组,每组 7只。麻醉后 4% 多聚甲醛灌注固定,开颅取脑及颈段脊髓,冠状面将脑切成约 0.5 cm厚的小块,固定 4~12 h,冰冻切片 (厚 30μm),每隔 10张取 2张分为两套,一套行 Nissl染色,证明神经元无尼氏体溶解现象,并用于 GFAP抗体染色后分布特征描述的参考。另一套行 GFAP SP (Streptavidin/peroxidase,链酶亲和素 过氧化物酶)法免疫组化染色[4]。

2 结果

1、3 d 颈段脊髓、延髓和桥脑的软脑脊膜染色为阳性,膜下区及毛细血管周围可见阳性反应细胞,其胞体细小,突起稀疏,染色浅;在大脑、小脑和中脑仅见软膜胶质膜呈阳性带状环,实质内未见阳性细胞。

6、9 d 大脑和小脑白质神经纤维束内出现突起少、胞体小的阳性细胞;海马和间脑偶见散在阳性细胞;颈段脊髓和脑干软膜及其下的纤维增粗、增长,见图 1,实质内毛细血管旁的阳性细胞增多;脑室的室管膜细胞中出现可疑阳性反应物质。

14 d 小脑伯格曼纤维阳性反应明显增强,室管膜区 (Ventricular zoon, VZ)及室管膜下区 (Subventricular zoon, SVZ)出现明显的阳性细胞,与人胎脑 VZ及 SVZ的阳性细胞相比,其突起短而细,排列不甚规则;大脑灰质、小脑灰质和海马均见清晰的阳性细胞,特别是在小血管和毛细胞管周围,见图 2。



图 1 大鼠生后第 6天,GFAP阳性星形胶质细胞环绕颈段脊髓的软脊膜,并向白质部辐射 (ICC× 400)

图 2 大鼠生后第 14天,大脑灰质小血管旁可见 GFAP阳性纤维环绕 (ICC× 400)

21 d 各部位阳性细胞数目增多,特征性的表现为齿状回的阳性细胞出现内、外两层规则分布,其突起垂直于表面而相互平行,多为单突起和少突起细胞;海马 CA_3区的细胞亦表现类似的排列方式,而海马其它区域的阳性细胞则主要集中于海马的锥体细胞层和分子层。

3月: 除海马和齿状回的阳性细胞增至 4~5层,呈规则排列外,其它部位阳性细胞数目、形态及排列方式变化不明显。

6、12月: 各部位细胞密度与 3月无明显差异,分布特点为在软膜、大脑和小脑皮层的白质部、胼胝体、脑干和中脑的神经束髓内段中,GFAP阳性细胞密集,染色较深,而在大脑、小脑灰质 GFAP阳性细胞数少,染色也较浅。

3 讨论

Bignami等[1]对大鼠新皮层及海马进行的 GFAP免疫组化染色显示: GFAP阳性星形胶质细胞于生后一周间断出现于新皮层的软膜胶质膜,生后 9 d胶质膜呈连续性阳性反应;而血管周胶质膜出现于生后 18 d。本实验采用的间接法亲合免疫细胞化学其敏感性比 Bignami所用的直接荧光抗体染色法高数百倍[4],因此检测的大鼠生后 GFAP阳性细胞及软膜胶质膜阳性反应的出现时间较 Bignami报道的早。脑发育过程中,神经元由 VZ和 SVZ分化,迁移到不同的脑区和皮层,有赖于长的胶质突起[2],而本结果表明大鼠 VZ及 SVZ GFAP阳性辐射状星形胶质细胞不如人类典型。Edward[5]也有类似报道,并报道用 RC-1抗体可显示出密集而长突起的辐射状胶质母细胞,提示大鼠引

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

导神经元迁移的可能主要为辐射状胶质母细胞,而不像人类主要由辐射状星形胶质细胞完成。

本实验还观察到: GFAP阳性星形胶质细胞在海马和齿状回呈明显的规则排列,表明星形胶质细胞在脑的分布是有规律的,这种有序性有利于神经元与星形胶质细胞之间建立固定的位置关系和稳定的功能关系。新近的研究表明星形胶质可能参与了脑的复杂功能活动,包括学习和记忆[6],星形胶质细胞通过缝隙连接彼此相联在中枢构成复杂的胶质网络,这一网络与神经元网络在功能上相互影响[3],进一步研究星形胶质细胞在中枢神经系统的有序性排布,将有助于更深入地认识星形胶质细胞在脑功能中的作用。

关键词　大鼠;脑;星形胶质细胞;发育
中图法分类号　R329. 1

参考文献

1 Bignami A, Dabl D. Astrocytic-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to GFAP. J Comp Neuro, 1991; 15(43): 27
2 Jacobson M. Developmental neurobiology. 3rd ed. New York: A division of plenum publishing corporation, 1991: 105~ 106
3 邓晓林,蔡文琴.星形胶质细胞的异质性及胶质网络.解剖科学进展, 1997; 3(1): 45
4 蔡文琴,王伯　.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都: 四川科学技术出版社, 1994 95~ 96
5 Edwards M A, Yamamoto M Y, Caviness V S. Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. Neuroscience, 1990; 36(1): 121
6 O'dowd B S, Gibbs M E, Sedman G L. Astrocyte implicated in the energizing of intermediate memory processes in neonate chicks. Brain Res Cogn Brain Res, 1994; 2(2): 93

(收稿: 1997-04-22;修回: 1997-12-18)
(编辑　汪勤俭)

不同术式对治疗消化性溃疡的疗效评价

Evaluation of the therapeutic effects of different operation styles on the treatment of peptic ulcer

孙念绪*　蔡志民　(第三军医大学附属西南医院普通外科)重庆, 400038

提　要　目的: 探讨高选迷切加半胃切除术(HSV+ HG)治疗消化性溃疡的疗效。方法: 将同期收治的消化性溃疡115例,分成胃大部切除, HSV和 HSV+ HG 3组,于术前及术后6个月行放射性核素、胆酸测定和病理组织学检查,了解胆汁返流和溃疡愈合情况。用21条狗分成3组试验,了解胃十二指肠和保留胃窦浆肌层的功能。结果: HSV+ HG能防止胆汁返流,而且无溃疡复发,动物试验证实保留的胃窦浆肌层功能存在。结论: HSV+ HG是目前治疗消化性溃疡的理想术式。

我科1988年设计了高选迷切加保留胃窦浆肌层的半胃切除术治疗消化性溃疡,经临床研究及动物试验证实,可避免胃大部切除和高选迷切的不足,是目前治疗消化性溃疡较理想的术式,现报告如下。

1　材料和方法

1. 1　临床资料

选择1988~ 1996年内收治的消化性溃疡115例,男性108例,女性7例,平均年龄43. 2岁。病程半年至25年。HSV+ HG组85例,包括十二指肠球部溃疡75例(伴穿孔的29例,出血6例,幽门梗阻5例,无并发症的35例)、复合性溃疡6例、胃溃疡4例。胃大部切除 Billroth-I (B-I)式胃肠吻合10例,其中球部溃疡5例,胃溃疡5例。Billroth-II (B-II)式胃肠吻合10例,其中球部溃疡7例,胃溃疡3例,包括穿孔2例。高选迷切(HSV)组10例,全部为球部溃疡,其中伴穿孔3例。全部穿孔病人,穿孔至手术时间为3~ 24 h,穿孔直径0. 2~ 1. 5 cm。

1. 2　手术方法

HSV+ HG:开腹后距幽门环6 cm处沿胃大弯分离大网膜

* 孙念绪,男,43岁,副主任医师,副教授

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