DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.005

慢性缺氧和二氧化碳潴留大鼠脑阴离子转运蛋白 AE_3 mRNA表达*

张献全 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 630037

提 要 通过向密闭舱内灌注混合气体的方法,分别复制慢性缺氧、慢性缺氧伴二氧化碳潴留及慢性呼吸性酸中毒大鼠模型。以地高辛标记的脑阴离子转运蛋白(AE_3)cDNA探针,用核酸原位杂交及点杂交技术,对 AE_3 mRNA的分布及变化进行检测,结果显示:① AE_3 mRNA广泛分布于脑组织,其中以呼吸调整中枢所在部位脑桥深部灰质最为富集。② 慢性缺氧组 AE_3 mRNA的相对含量显著地低于对照组($P<0.05$),慢性缺氧伴二氧化碳潴留及慢性呼吸性酸中毒组均非常显著地低于对照组($P<0.01$);③ 慢性缺氧伴二氧化碳潴留及慢性呼吸性酸中毒组均非常显著地低于慢性缺氧组($P<0.01$),但二组之间无显著性差异($P>0.05$)。提示 AE_3在呼吸衰竭的发生及其导致的肺性脑病中可能具有一定作用。

关键词 缺氧;二氧化碳潴留;脑阴离子转运蛋白;肺性脑病;氯离子通道
中图法分类号 R563

慢性胸肺疾患当发生呼吸衰竭时,常因缺氧和二氧化碳潴留引起肺性脑病,但其确切的机理尚未阐明。近年的研究发现,细胞膜氯离子通道在神经元细胞兴奋性中起重要的作用[1],脑阴离子转运蛋白作为神经元细胞膜上三种氯离子通道中的一种主要氯离子转运载体[2],其在呼吸衰竭时的变化尚不清楚。本研究旨在通过原位杂交确定 AE_3与呼吸中枢的位置关系,并通过点杂交测定缺氧和/或二氧化碳潴留大鼠脑桥组织中 AE_3 mRNA的变化,以期探讨其在肺性脑病中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

质料 PRG108(含小鼠脑 AE_3cDNA,美国 Stanford大学 Kopito教授惠赠),地高辛标记检测试剂盒、硝酸纤维素膜为德国 Boehringer产品,蛋白酶 K、聚蔗糖、聚乙烯吡铬烷酮、鲑鱼精子 DNA,硫酸葡聚糖、吗啉基丙磺酸(MOPS)为美国 Sigma产品,限制性内切酶 HindⅢ、λDNA/HindⅢ Marker为华美生物工程公司产品,核糖核酸酶 A为 Promega产品,其它试剂均为国产优质醇或分析纯。菌种 HB101为第三军医大学遗传教研室保存菌种。IL-1303血气分析仪,754紫外/可见分光光度计,CSG10型双波长薄层扫描仪,C-RIB型数据记录仪。

1.2 动物模型制作

雄性 Wistar大鼠 48只,随机分为 4组,分别参照文献[3~5]进行。所有大鼠均在实验舱内抽动脉血行血气分析,而后断头活杀,迅速取出脑组织,1%二乙基焦碳酸酯(DEPC)PBS水冲洗血迹,冰浴中分取大脑、中脑、脑桥、小脑各 100 mg,液氮存放。

1.3 点杂交

1.3.1 脑组织总 RNA的提取、鉴定及定量 按文献[6]方法进行,采用甲醛变性凝胶电泳及分光光度计法进行鉴定并定量,使 $A260/A280$均在 2.00±0.10范围内,并将各样本浓度调定为 10μg/ml,以备杂交时定量。

1.3.2 AE_3 cDNA探针的制备 碱变性法提取质粒 DNA HindⅢ酶切,透析袋法回收,参照试剂盒行地高辛随机引物标记,并估测标记率。

1.3.3 点杂交步骤 参照试剂盒说明行高严格度杂交,依次行标准品、样品稀释→点膜、烤膜→预杂交、杂交→洗膜及免疫检测→显色及终止反应。

1.3.4 结果分析 湿膜置于 CSG10型双波长薄层扫描仪上,于 540 nm处扫描,C-RIB数据记录扫描图谱,以标准品各点面积为纵坐标,计数各样品点 AE_3 mRNA的相对含量。结果以 $\bar{x}\pm s$表示,在微机上行 t检验和方差分析。

1.4 原位杂交

1.4.1 切片及固定 将麻醉后大鼠行主动脉插管,灌注 50 ml PBS(内含肝素)后灌 4%多聚甲醛 250 ml,灌注后的大鼠置 4℃冰箱 4 h,开颅取脑组织,置 4%多聚甲醛中后固定 6 h,转入 20%蔗糖液中脱水后。在恒冷箱切片机上冰冻切片,连续 3张为一组,分别行常规染色,免疫细胞化学及原位杂交,切片厚度为 20μm 切片置于 4℃冷丙酮中后固定 15 min室温干燥后,置 -70℃贮存备用。

1.4.2 原位杂交步骤参照文献[7]进行

依次行脱水→消化→封闭→预杂交→杂交→抗体显色→脱水→透明→封片。

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39570306

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

2 结果

2.1 动脉血气分析(见表 1)

表 1 动脉血气分析结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of arterial blood gas analyses ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	pH	PO_2(kPa)	PCO_2(kPa)	HCO_3^- (mmol/L)
Control	12	7.32± 0.03	12.16± 0.98	5.54± 0.82	21.57± 3.1
Hypoxia	8	7.31± 0.08	6.63± 1.70※	5.56± 0.98	20.23± 4.28
Hypoxia with hypercapnia	9	7.25± 0.06△△※	6.37± 0.94※	7.31± 0.75△※	25.50± 2.01△※
Respiratory acidosis	9	7.24± 0.08△※	12.1± 1.45△	8.82± 2.75△※	29.15± 2.34△※

△: $P<0.01$, △△: $P<0.05$ *vs* hypoxia; ※: $P<0.01$, ※※: $P<0.05$ *vs* control

2.2 原位杂交

强杂交信号见于脑桥深部灰质、海马、中脑核团、小脑蒲氏细胞等(见图 1~ 4)



图 1 AE_3在大鼠脑桥灰质呈极强杂交信号 (原位杂交× 100)

Fig 1 AE_3 shows the strongest hybridization in the pontine gray matter signal (ISH× 100)

图 2 AE_3在大鼠中脑核团呈强杂交信号 (原位杂交× 100)

Fig 2 AE_3 shows strong hybridization signal in nucleus of midbrain (ISH× 100)

图 3 AE_3在大鼠小脑蒲肯野氏细胞中呈强杂交信号 (原位杂交× 40)

Fig 3 AE_3 shows strong hybridization signal in purkinje cells of cerebellum (ISH× 40)

图 4 AE_3在大鼠海马呈强杂交信号 (原位杂交× 40)

Fig 4 AE_3 shows strong hybridization signal in hippocampus (ISH× 40)

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

2.3　各组 AE_3 mRNA相对含量(ng/mg组织)(见表 2)

表 2　脑桥组织 AE_3 mRNA的相对含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Comparison of relative contents of AE_3 mRNA ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	AE_3 mRNA (ng/mg)
Control	12	372.70± 28.92
Hypoxia	10	342.20± 26.54※
Hypoxia with hypercapnia	9	185.95± 16.38※※△△
Respiratory acidosis	11	201.07± 13.25※※△△

※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$ *vs* control;
△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* hypoxia

3　讨论

阴离子转运蛋白(AE)是一类分布广泛的膜蛋白,其通过介导 Cl^-/HCO_3^- 跨膜转运参与细胞内 pH 细胞体积及细胞内氯离子浓度的调节[8]。位于红细胞膜上的 AE即 Band 3(又称 AE_1),其在 CO_2的转运和排出中起重要作用,AE_2的分布较为广泛,主要位于肾小管基质细胞,其在调节机体及其质细胞的酸碱及离子浓度具有一定的作用[9]。1989年 Kopito首次从小鼠脑 cDNA文库中筛选出 AE_3 cDNA克隆,并通过细胞转染及细胞内外 pH离子变化的测量等证明其具有与 AE_1、AE_2 相似的功能,随后 Kudrychi分离出大鼠脑 AE_3 cDNA,并证明与小鼠 AE_3 cDNA高度同源,而与 AE_1、AE_2的同源性较低[9,10],因此,本研究应用小鼠脑特异性 AE_3 cDNA探针,成功地检测了大鼠脑 AE_3 mRNA的存在及变化情况。我们以 AE_3 cDNA为探针对鼠脑冰冻切片进行了原位杂交,结果显示 AE_3 mRNA主要分布于大脑皮质II层、V层扣带回海马、中脑核团、脑桥灰质等,其中被认为是呼吸调节中枢的脑桥深部灰质最为富集,此与 Kopito及 Kudrychi的研究结果相似,说明 AE_3 与呼吸调节中枢具有位置相关性。近年国外报道向离体脑片中灌注高浓度二氧化碳气体及动物吸入高浓度二氧化碳气体,可引起膜电位,细胞内氯离子浓度及动物行为的异常[11,12],提示氯离子通道的状态改变可能是二氧化碳引起肺性脑病的中间环节。AE_3 作为神经元细胞膜上的一种主要氯离子通道,尤其是其在呼吸调节中枢—脑桥灰质的富集,都提示其在肺性脑病的发生中具有一定作用,其确切的作用及其机理有待进一步深入研究。

参考文献

1 Jentsch TJ. Molecular physiology of anion channels. Curr Opin Cell Biol, 1994; 6(4): 600

2 Cover CC, Poulin JE, Guslafson MR Posttranslational changes in band 3 in adult and aging brain following treatment with ergoloid mesylates. comparison to changes observed in Alzheimer's disease. Life Sciences, 1996; 58(8): 655

3 薛全福,谢剑鸣,胡长贵等.常压缺氧性大鼠肺动脉高压模型的建立.中华结核呼吸杂志, 1989; 12(6): 350

4 卢文光,徐正惠,陈盛华等.低氧二氧化碳动物饲养箱的研制.温州大学学报, 1984; 6(6): 465

5 Schwartz WB, Silverman L. A large environmental chamber for the study of hypercapnia and hypoxia. J Appl Physiol, 1965; 20: 767

6 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochem, 1989; 162: 156

7 蔡文琴.原位杂交组织化学.见:蔡文琴,王伯　主编.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: 406~421

8 Tanner MJ. Molecular and cellucar biology of the erythrocyte anion exchanger (AE). Seminars Hematol, 1993; 30(1): 34

9 Kudrycki KE, Shull GE. Rat kidney band 3 Cl^-/HCO_3^- exchanger mRNA is transcribed from an alternative promoter. Am J physiol, 1993; 264(3pl 2): F540

10 Alper SL. Molecular and cell biological aspects of the AE anion exchanger gene family. Prog Cell Res, 1992; 2: 9

11 Doan JB. CO_2 decreases membrane conductance and depolariced neurons in the nucleus tractus sotilarii. Exp Brain Res, 1987; 265: 462

12 Sanna E. Carbon dioxide inhalation reduces the function of GABAA receptor in the rat brain. European Journu of pharmacology, 1992; 216: 457

(收稿: 1996-03-25;修回: 1996-07-05)
(编辑　王　红、沈锡庚)

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

Expression of anion exchanger mRNA in brains of rats with chronic hypoxia and hypercapnia

Zhang Xianquan, Qian Guisheng (Department of Repiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract After three models of hypoxia, hypoxia with hypercapnia and chronic acidosis were established in rats by pouring the mixed gases into the chamber, the distribution and changes of anion exchanger 3 (AE_3) in the brain of the rats were studied with *in situ* and dot blot hybridization using digoxigenin-labelled cDNA probe. It was found that: (1) AE_3 and mRNA distributed widely in the brain tissue, especially in pontine gray matter where the respiratory center was located. (2) The relative contents of AE_3 and mRNA in the brains of experimental rats were significantly lower than those of the controls. (3) The relative contents of AE_3 and mRNA in the brains of rats with chronic hypoxia and hypercapnia and chronic respiratory acidosis were also significantly lower than those in rats with chronic hypoxia ($P < 0.01$) but there was no significant difference between chronic hypoxia and hypercapnia and chronic respiratory acidosis. These findings suggest that AE_3 may play an important role in the occurrence of respiratory failure and subsequent pulmonary encephalophathy.

Keywords hypoxia; hypercapnia; anion exchanger; pulmonary encephalophathy; chloride channel; rat

骨肉瘤的临床病理与分子病理学研究—— 影响临床预后因素的探讨及 p53 抑癌基因的改变

A clinical and molecular pathological study on human primary osteosarcoma—— prognostic factor and p53 gene changes

郭乔楠 陈意生 (第三军医大学基础部病理学教研室) 重庆, 630038

作者从临床病理方面对人骨肉瘤的临床预后影响因素和分子生物学方面对 p53抑癌基因与临床病理的联系及其在骨肉瘤发生、发展中的作用进行了较为系统的研究。采用了组织学、组织化学、免疫组织化学及 PCR-SSCP银染技术,从多层次、多角度探讨了判断预后的模型及 p53基因的改变,强调了肿瘤的生物学及分子生物学特点与临床病理间的联系,获得如下结论:

(1)单因素分析影响骨肉瘤患者临床预后的因素中,有显著统计学意义的有: 患者的性别、年龄、肿瘤的发生部位,肿瘤的大小、DNA倍体状态及含量测定、AgNORs计数、肥大细胞计数及 PCNA、KiS1免疫组化染色半定量分级。而骨肉瘤的组织学分型及核丝分裂像计数对预后的判断意义不大。

(2)多元直线回归和多元逐步回归,得到一个有非常显著意义的判断预后模型。对该模型有明确影响的因素依作用大小依次排为: DNA倍体状态及 DNA含量; AgNORs计数;肿瘤大小;肿瘤发生部位;患者年龄;患者性别。

(3)判断骨肉瘤预后模型中最好的因素为 DNA倍体状态及 DNA含量指数。其含量指数在同一肿瘤中的值是恒定的,不依组织学的改变而变化。精确测量肿瘤直径在临床上也是必要的。而 PCNA、KiS1免疫组化检测肿瘤细胞增殖活性及半定量分级仍不失为判断预后的简便、经济快捷的手段。

(4) 96例有随访资料的人骨肉瘤标本中, p53蛋白阳性率为 29.17%, p53蛋白阳性患者的半年生存率明显低于 p53蛋白阴性患者。p53蛋白阳性与骨肉瘤组织学分型间无明显关系。银染 PCR-SSCP方法检测 p53基因 5-8外显子点突变,得到 SSCP阳性率为 23.96%。SSCP阳性患者的半年生存率明显低于 SSCP阴性患者。SSCP阳性与骨肉瘤组织学分型无明显关系。提示 p53基因改变在人骨肉瘤的发生、发展中起某种作用。而 p53蛋白表达及 p53基因点突变有可能成为判断人骨肉瘤恶性程度的指标。

(5)人骨肉瘤中 p53基因点突变以第 7外显子多见。

(6) SSCP和免疫组化的阳性符合率为 82.14%,具有较好的一致性。免疫组化不失为一种简单、经济的检测 p53基因点突变的方法。

关键词 骨肉瘤;预后; p53基因
中图法分类号 R738.1
(收稿: 1996-07-08;修回: 1996-07-11)
(编辑 冷怀明)

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