DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.016

铁对淋巴细胞铁反应子结合蛋白表达的调节作用

官 军 杨家驹 (第三军医大学预防医学系营养卫生教研室)重庆,630038

提 要 采用体外细胞培养、RNA斑点杂交技术和彩色图像分析,观察了铁缺乏或铁负荷过重时淋巴细胞铁反应子结合蛋白(IRE-BP) mRNA的表达情况。结果显示:铁缺乏状态下,(第1,2,3组)IRE-BP mRNA的表达较正常对照组(第4组)增强,杂交图谱图像分析表明,第1,2,3组面积乘吸光度分别是第4组的11.7、8.5、5.6倍,而铁负荷过重状态下IRE-BP mRNA的表达受抑。

关键词 淋巴细胞;铁缺乏;铁负荷过重;铁反应子结合蛋白

中图法分类号 R591.1

铁是几乎所有生物体所必需的一种重要微量元素,铁代谢及其调节的研究历来很受重视。随着细胞生物学和分子生物学的飞速发展,对生命必需元素铁的研究已从对机体铁代谢一般状况的了解深入到了从细胞和分子水平对细胞铁代谢进行探讨。

铁反应子结合蛋白(Iron responsive element-binding protein,IRE-BP)是一种细胞浆RNA结合蛋白,是近年来发现的细胞内铁代谢的重要调节因子[1],具有在转录后水平调节转铁蛋白受体(Transferrin receptor, TfR) mRNA稳定性和铁蛋白(Ferritin,Ft) mRNA翻译的功能[2]。文中报道了在铁负荷过重或缺乏状态下IRE-BP mRNA的表达情况,以探讨不同铁状况下铁代谢的重要调节因子的变化,为铁代谢的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本

健康自愿献血者新鲜外周静脉血取自本校附属西南医院输血科。

1.2 主要材料

pGEM-hIRE-BP质粒(瑞士Kuhn教授惠赠),大肠杆菌JM105(本校免疫学教研室赠送),异硫氰酸胍,Sarcosine(Sigma),EcoRI,Hind Ⅲ(华美生物工程公司),硝酸纤维素膜(NC膜)(Amersham),地高辛标记检测试剂盒(Boehringer Mannheim),RPMI-1640(Gibco),其它试剂均为国产AR级。

1.3 铁盐的选择

选用柠檬酸铁(Fe-cit)作为铁离子供给剂。以正常人外周血清铁浓度为基准[3],分别增加培养基中铁离子浓度5、10、100倍和减少50%、80%,以建立铁负荷过重和缺铁细胞培养环境,同时设一组不加Fe-cit作对照,使各组Fe-cit浓度分别为第1组0,第2组5×10^{-6} mol/L,第3组1.25×10^{-5} mol/L,第4组(正常对照)2.5×10^{-5} mol/L,第5组1.25×10^{-4} mol/L,第6组2.5×10^{-4} mol/L,第7组2.5×10^{-3} mol/L。

1.4 细胞培养

取新鲜外周静脉血,肝素抗凝,以等量D-Hank's液稀释,用淋巴细胞分离液按常规方法分离淋巴细胞,洗涤后用含10%胎牛血清(FCS)的Hank's液调制细胞悬液(1×10^7/ml,存活率>95%)。于培养板中加入细胞悬液1 ml、加不同浓度Fe-cit和PHA(终浓度5 μg/ml),在37℃、含5%CO_2的孵育箱中进行培养。

1.5 pGEM-hIRE-BP质粒DNA的转化、扩增、探针制备及标记

将IRE-BP质粒转入大肠杆菌JM105菌株中,常规扩增、提取质粒DNA[4]。以Hind Ⅲ和EcoRI双酶切质粒,得1.2 kb目的片段,用地高辛标记检测试剂盒标记IRE-BP cDNA探针,备用。

1.6 RNA斑点杂交

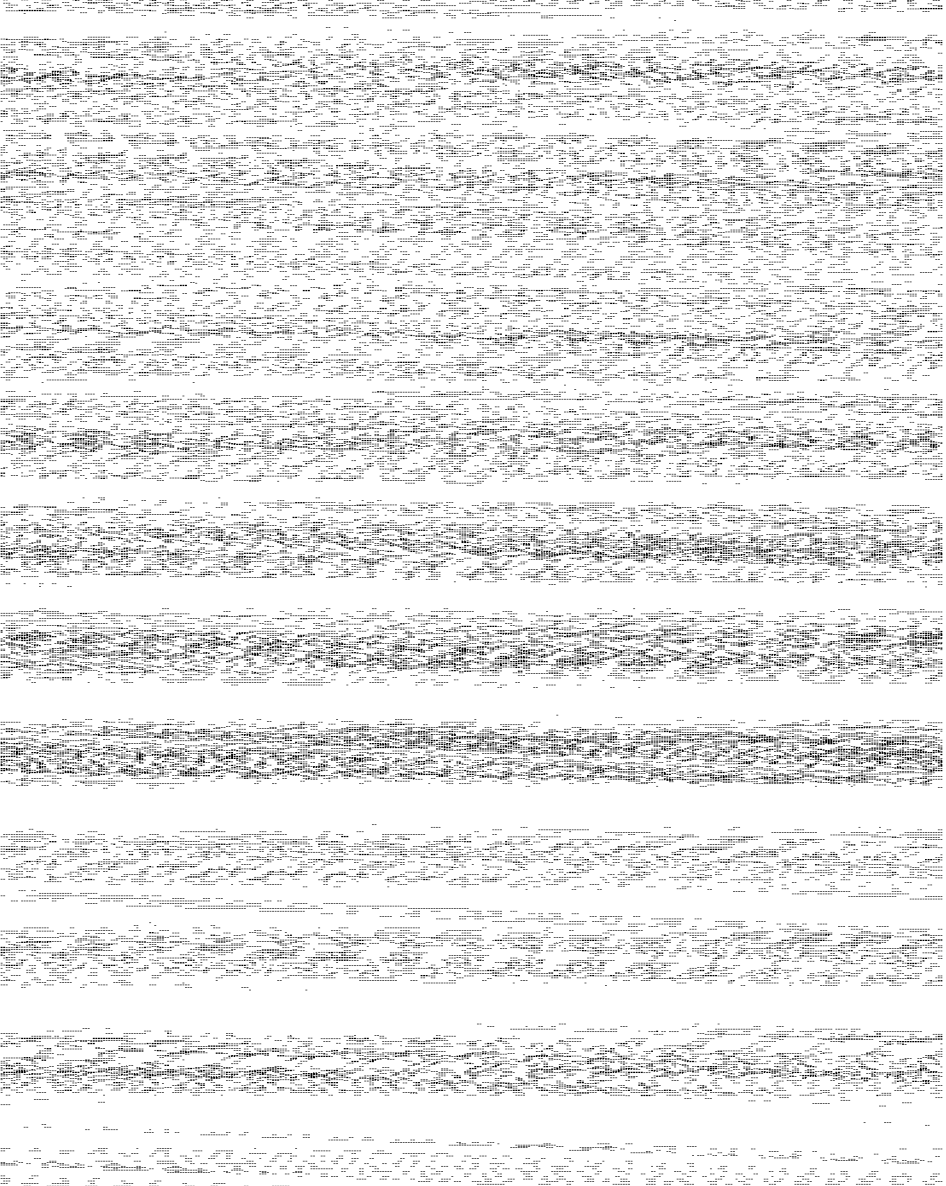
淋巴细胞培养72 h后,收集并采用异硫氰酸胍一步法[5](AGPC)提取RNA。以pGEM-hIRE-BP质粒作阳性对照、pBR_{322}作阴性对照,将抽提的RNA和对照样品点样于NC膜上,用地高辛标记的IRE-BP cDNA探针作RNA斑点杂交。杂交图谱用TECBISA-6803型真彩色图像分析系统处理,以吸光度×面积表示表达量高低。

2 结果

2.1 IRE-BP cDNA探针的制备

将大量抽提的IRE-BP质粒DNA取小量酶切鉴定(图1),而后用Hind Ⅲ和EcoRI大量酶切,取1.2 kb片段胶,用电洗脱法从胶中回收DNA片段,并取出约2 μg,用地高辛标记检测试剂盒进行标记。

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



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

多种复杂基因缺陷的肿瘤疾病
现病情进一步发展其临床预后(PFS
椎管硬膜外恶性淋巴瘤。
恶性淋巴瘤 腰椎管；硬脊膜外；
中图法分类号 R738.1
淋巴瘤指源自淋巴结或淋巴组织的恶性
文献
本病可发于椎管任何节段的硬脊膜外
出现疼痛等神经根性症状前就已确诊
R或行椎板切除减压术(包括T09
②椎管内肿瘤术后复发
单纯性椎管内肿瘤
即其他肿瘤转移至椎管内的病灶
期就已发生椎管内转移而后病情，与

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