DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.005

严重体表烧伤早期大鼠肾脏内皮素-1的基因表达*

王 旭 吴雄飞 高建川 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,630038

提 要 应用分子斑点杂交、原位杂交技术,观察了大鼠烧伤早期肾脏各时相点的内皮素-1(ET-1) mRNA的表达和定位变化。结果表明:烧伤早期肾脏 ET-1 mRNA含量明显上升,分布有所变化,且为肾脏自身分泌释放(自分泌/旁分泌)。文中还简要讨论了上述变化的原因。

关键词 灼伤;肾脏;内皮素;原位杂交

中图法分类号 R644

多器官功能衰竭(MOF)是严重烧伤的重要死亡原因。其中急性肾功能衰竭(ARF)发生率占58%~64%,死亡率极高。既往的研究认为,严重烧伤早期肾功能损害是由于严重休克,肾脏缺血缺氧所致,但发病机理甚为复杂,迄今远未阐明。内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)是目前已知的作用最强,时间最持久的内源性缩血管活性肽。基于它对肾血流、肾功能的强大调节作用,提示烧伤后肾功能损害与其可能存在密切关系。我们在发现烧伤后肾静脉血和肾组织 ET-1浓度明显升高的基础上,进一步利用斑点杂交及原位杂交,观察了大鼠烧伤后肾脏不同时相点 ET-1 mRNA表达和定位变化,以期对烧伤后肾功能损害的病理生理改变作进一步的探讨。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制作

Wistar大鼠(四川省中药研究所提供),体重(230±30) g,置室温代谢笼喂养一周。随机分为6组,分别为正常对照组,烧伤后1、3、6、12、24 h组。每组10只,斑点杂交及原位杂交各5只。

戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,背部剪毛,20%硫化钠脱毛,清洁皮肤。固定后以3%凝固汽油均匀涂布已脱毛部位,燃烧20 s,扑灭,造成30% TBSAⅢ度烧伤(病理切片证实)。伤后腹腔注射等渗盐水0.04 ml/g体重抗休克。正常对照组除不烧伤外,实验过程均做相应处理。

1.2 肾组织 ET-1 mRNA的检测

1.2.1 特异性探针的制备[1] 将含有 ET-1 cDNA的质粒(日本 Sakurai惠赠),转化入 JM109细菌中,筛选后扩增质粒。质粒 DNA转化细菌、转化子鉴定、质粒扩增、提取及探针回收按常规进行。采用随机引物法分别以两条变性的 cDNA链为模板合成两条新的含地高辛标记的 cDNA链。

1.2.2 总 RNA的提取,采用异硫氰酸胍一步法[2] 取各时相点大鼠双肾组织1 g,加入4 mol/L异硫氰酸胍1 ml,匀浆后依次加入2 mol/L乙酸钠(pH 4.0) 0.1 ml,酚1 ml,氯仿:异戊醇(49:1) 0.2 ml,剧烈振摇,12000× g离心20 min,取上清水相加1 ml异丙醇,离心去上清,沉淀加75%乙醇洗涤后再离心,加50μl 0.5% SDS冷冻干燥,保存于-70℃。

1.2.3 斑点杂交 以一定行列形式在尼龙膜上点印肾组织总 RNA, RNA浓度为20μg/μl,各点总体积15μl。将碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体与杂交后的核酸反应,使抗体与标记在探针上的地高辛结合,加入碱性磷酸酶显色底物 NBT(硝基四氮唑蓝),产生紫蓝色斑点。如果未杂交上,探针被冲洗掉,不产生紫蓝色斑点。用薄层层析扫描仪(岛津),500 nm半定量 mRNA,以斑点与该组总表达量的百分率表示。

1.2.4 原位杂交 采用改良漂浮法[3]。各时相点大鼠活杀,取肾脏立即冰冻切片,常规固定。按宝灵曼公司地高辛标记及检测药盒说明书进行标本处理、NBT显色、铺片、透明封片。染色阳性细胞内含有蓝紫色颗粒,于光镜200倍下任选10个视野对阳性细胞定量计数。

为了确定杂交信号是特异性 mRNA,设如下对照:① 每次杂交均设一组切片,除不加探针外,其余过程相同,结果为阴性;② 切片在杂交前用 RNase 37℃消化2 h,消除细胞内所有 RNA,杂交结果为阴性;③ 先用等量未标记探针杂交,再用标记探针杂交,结果为阴性。

2 结果

2.1 大鼠烧伤后肾脏 ET-1 mRNA斑点杂交

正常大鼠肾脏可测到 ET-1 mRNA。烧伤后1 h ET-1 mRNA含量明显上升,伤后3 h达高峰,伤后24 h仍明显高于正常,见图1。将尼龙膜上杂交显色的斑点,在薄层层析扫描仪

* 国家自然科学基金资助项目 No. 39290700-03

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

上(波长 500 nm)扫描后得出各斑点吸光率的百分占有率,见图 2

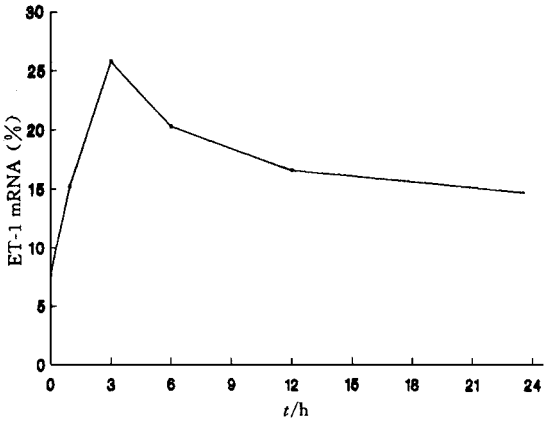


图 1　大鼠烧伤后肾 ET-1斑点杂交

Fig 1　Blot hybridization of ET-1 in rat kidney after burns

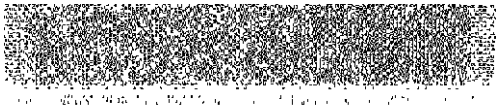


图 2　大鼠烧伤后 ET-1 mRNA斑点杂交

Fig 2　Blot hybridization of ET-1 mRNA in rats after burns

2.2　大鼠烧伤后肾脏 ET-1 mRNA原位杂交

正常肾小球内皮细胞,小血管内皮细胞、集合管胞浆有少量分布。烧伤后 ET-1 mRNA杂交信号明显增强,3 h达高峰,24 h仍较强,见图 3;分布在肾小球内皮细胞、系膜细胞、球旁小血管、直小血管及弓状动脉内皮细胞,近曲小管、集合管上皮细胞浆及内缘,见图 4

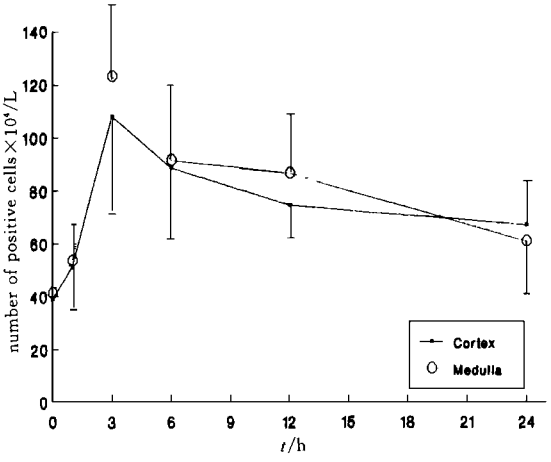


图 3　大鼠烧伤后肾 ET-1原位杂交

Fig 3　*In situ* hybridization of ET-1 in rat kidney after burns

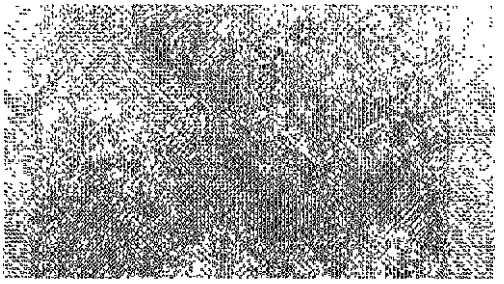


图 4　烧伤后 6 h远曲小管及近曲小管内缘大量 ET-1 mRNA分布

Fig 4　On the 6th h after burns, large amount of ET-1 mRNA was found on the inner side of distal and proximal convoluted tubules

3　讨论

严重烧伤后肾功能损害机理较为复杂,影响因素颇多,但肾血管收缩所致的肾缺血可能是其关键因素。肾素、血管紧张素、前列腺素、儿茶酚胺等均可导致烧伤后肾血流量下降。但近年来发现 ET-1是作用最强的内源性缩血管活性肽,在心、肺、脑、肝、肾等主要脏器均有表达和分泌,无论在生理状态还是各种疾病过程中均发挥重要作用[4,5]。我们在首先证实烧伤早期肾静脉血及肾组织 ET-1显著升高并与肾功能损害密切相关的基础上,进一步分析 ET-1 mRNA的定量和定位改变,以期证明 ET-1对肾脏的作用究竟是自分泌/旁分泌作用还是循环作用以及在受到烧伤刺激后 ET-1 mRNA优势表达部位。

本实验采用斑点杂交和原位杂交的方法观察了烧伤后 ET-1在肾脏不同部位基因表达和分泌的变化,结果发现:斑点杂交显示正常大鼠肾脏有稳定的低丰度 ET-1 mRNA表达,原位杂交发现正常大鼠 ET-1 mRNA阳性染色在肾小球内皮细胞、小血管内皮细胞、集合管胞浆有少量分布,说明在基础状态下 ET-1可能参与了肾血流和肾功能的调节。烧伤后,斑点杂交和原位杂交显示 ET-1 mRNA阳性信号明显增强,3 h达高峰,24 h仍持续高水平。我们认为 3 h时 ET-1基因表达的高峰与滞后的肾组织成熟 ET-1肽的分泌高峰 6 h,正好吻合,为 ET-1 mRNA转录到 ET-1原(Prepro. ET)的翻译表达,肽链内切酶水解形成 ET-1前体(Pro ET),ET转化酶作用到成熟 ET-1分泌到一系列复杂生物化学过程提供了时间基础[6]。从而证实 ET-1是肾脏自身分泌释放(自分泌/旁分泌)。

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

实验还发现:烧伤后肾脏 ET-1 mRNA分布有所变化,除正常分布部位阳性明显增强外,系膜细胞、近端小管也呈强阳性,提示烧伤早期受缺血缺氧、体液-机械刺激导致正常组织细胞原来存在的 ET-1基因表达增强,同时促使原来不表达或低丰度表达的 ET-1基因的组织细胞快速大量地表达和分泌 ET-1。这些改变说明烧伤后肾脏本身 ET-1基因表达和分泌显著增强,高浓度的 ET-1可能参与了烧伤后肾血流动力学改变和肾功能改变。例如弓状动脉、叶间动脉、肾小球动脉内皮细胞 ET-1 mRNA表达的 ET-1,必然导致大量成熟 ET-1肽分泌,导致这些血管收缩而致肾缺血;系膜细胞的 ET-1基因增强表达,提示 ET-1对系膜细胞的收缩而致的超滤过系数(kf)下降[7],降低肾小球滤过率(GFR);肾小管的 ET-1基因增强表达,可能在水钠重吸收过程中参与了异常调节。

烧伤早期 ET-1基因表达和分泌释放的机理尚不清楚,但已证实烧伤后发生体液-机械性刺激,缺氧、缺血再灌注,肿瘤坏死因子(TNF)、血栓素 A_2、肾上腺素、白介素-1、白介素-2(IL-1、IL-2)分泌释放增加,内毒素释放入血等,这些因素正是 ET-1分泌的强烈刺激原[8],所以烧伤早期 ET-1分泌增加可能是由于上述因素的复合作用。

参考文献

1 J.萨姆布鲁克, E. F.费里奇, J.曼尼阿蒂斯.分子克隆实验指南.金冬雁,黎孟枫译.第2版.北京:科学出版社,1993. 16~34
2 沈 萍.二种简便分离 RNA的方法.生物化学与生物物理进展,1990;17(6):481
3 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. 406~424
4 Perico N, Remuzzi G. Role of endothelin in glomerular injury. Kidney Int, 1993; 39(Suppl): S76
5 Kon V, Badr K F. Biological actions and pathophysiologic significance of endothelin in the kidney. Kidney Int, 1991; 40(1): 1
6 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S *et al*. Novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988; 322(6163): 441
7 Zoja C, Orisio S, Perico N *et al*. Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor B, thrombin, and a thromboxane A_2 analogue. Lab Invest, 1991; 64(1): 16
8 Marsen T A, Schramek H, Dunn J. Renal action of endothelin: Linking cellular signaling pathways to kidney disease. Kidney Int, 1994; 45(2): 336

(收稿:1995-12-07;修回:1996-09-25)
(编辑 冷怀明)

Expression of endothelin-1 gene in early stage after severe burns in rats*

Wang Xu, Wu Xiongfei, Gao Jianchuan, Yang Zongcheng, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The expression and localization changes of endothelin-1 mRNA (ET-1 mRNA) at different time points after severe burns were observed in the kidneys of rats with northern blot and *in situ* hybridization. It was found that ET-1 mRNA content was significantly increased and its localization was changed. ET-1 was mainly secreted and released by the kidneys themselves (auto- or para-secretion). The reasons for the above findings were briefly discussed.

Key words burns; kidney; endothelin; *in situ* hybridization; rat

* This project was supported by the National Natural Science Fundation of China, No. 39290700-03

脾切除后肺炎球菌雾化吸入感染动物模型的建立

Establishment of an overwhelming post-splenectomy infection animal model by exposing to nebulized suspension of pneumococci

冷建军 陈维佩 (第三军医大学基础部应用解剖与手术学教研室)重庆,630038

脾切除患者易感性增高,终生有发生切脾后凶险感染(OPSI)的可能性,但迄今对于 OPSI的发病机理尚未完全明了,没有满意的防治措施。以往有些感染模型多采用经腹腔、静脉或鼻腔、气管内注射接种细菌(肺炎球菌)等方法,在对动物感染的途径上,我们采用超声雾化器将肺炎球菌悬液雾化,使动物在呼吸过程中自主吸入细菌,获得了满意的结果。

(下转 416页)

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