DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.003

严重烧伤早期大鼠肾脏内皮素受体 mRNA变化的研究*

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 动态观察大鼠烧伤早期肾脏各时相点内皮素受体 A(ETA)、内皮素受体 B(ETB) mRNA定量和分布的变化规律,发现肾脏 ETA ETB mRNA百分占有率在烧伤后 1 h已明显升高,前者 3 h达高峰,后者 6 h达高峰,皮质以 ETA为主,髓质以 ETB为主,提示烧伤后内皮素受体改变参与了肾功能损害。

关键词 烧伤;肾脏;内皮素;原位杂交

中图法分类号 R644

多器官功能衰竭(MOF)是严重烧伤后的主要并发症,其中肾脏损害所致死亡率极高。内皮素(ET)有强大的缩血管作用,烧伤后肾脏缺血缺氧可能与其密切相关。我们曾观察了烧伤早期肾脏不同时相点内皮素Ⅰ(ET-1)及 mRNA定量和分布的变化规律[1],证实烧伤后肾脏本身 ET-1基因表达和分泌显著增强,参与了肾血流动力学改变和肾功能损害。在此基础上,我们进一步研究了肾脏内皮素 A(ETA)、内皮素 B(ETB) mRNA在烧伤后基因表达强度和分布,以期阐明烧伤后肾脏 ET-1升高的效应部位以及效应的内皮素受体(ETR)亚型。

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 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% 凝固汽油均匀涂布于已脱毛部位,燃烧 20 s,扑灭,造成 30% TBSAⅢ度烧伤(经病理切片证实)。伤后腹腔注射 4 ml/100 g等渗盐水抗休克。正常对照组除不烧伤外,实验过程均同烧伤组。

1.2 肾组织 ETA、ETB mRNA的检测

1.2.1 特异性 ETA ETB mRNA探针的制备[2] 将含有 ETA ETB的 cDNA质粒(ETA为 PUC18、ETB为 PUC19日本 Sakurai教授惠赠)分别转化入大肠杆菌 JM109(购于 Promega公司)。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[3]。取各时相点大鼠双肾组织 1 g,加入 4 mmol/L异硫氰酸胍 1 ml,匀浆后依次加入 0.1 ml 2mol/L硫酸钠(pH4.0)、1 ml酚、0.2 ml氯仿与异戊醇,后两者之比为 49∶1 剧烈振摇,12 000 g离心 20 min。取上清水相加 1 ml异丙醇,离心去上清,沉淀溶于 75% 乙醇后再离心,加 0.5% SDS 50μl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[4]。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(Boehringen Mannheim)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 ETA及 ETB mRNA斑点杂交结果

正常大鼠肾脏可测到 ETA ETB mRNA。烧伤后 1 h ETA ETB mRNA含量均明显上升,ETA mRNA伤后 3 h达高峰,ETB mRNA伤后 6 h达高峰。24 h两种受体 mRNA仍明显高于正常。将尼龙膜上杂交显色的斑点,在薄层层析扫描仪上(波长 500 nm)扫描后得出各斑点折光率的百分占有率,见图 1

* 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

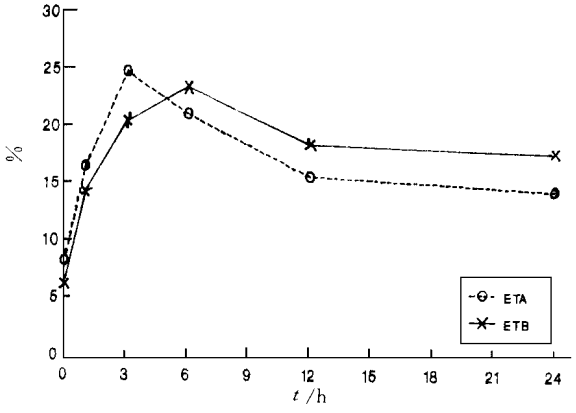


图 1 大鼠烧伤后肾脏 ETA ETB斑点杂交结果 (n= 5)

Fig 1 Blot hybridization of ETA and ETB in kidneys of rats postburn (n= 5)

2.2 大鼠烧伤后肾脏 ETA及 ETB mRNA原位杂交结果

2.2.1 ETA mRNA 正常肾脏小动脉平滑肌细胞、皮质近端小管及集合管胞浆少量分布。烧伤后 ETA mRNA杂交信号明显增强, 3 h达高峰, 24 h仍高于正常。主要位于肾小球旁小动脉平滑肌细胞、弓状、叶间动脉肌细胞、系膜细胞、集合管上皮细胞胞浆,见图 2

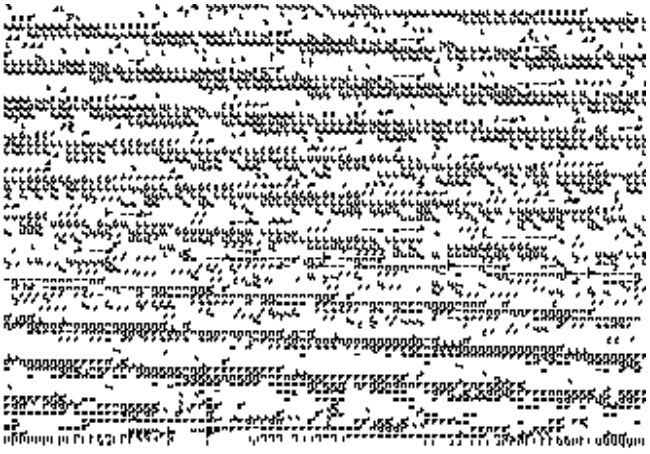


图 2 烧伤后 3 h叶间动脉平滑肌 ETA受体 mRNA大量分布

Fig 2 ETA receptor mRNA distributed in the intralobular arterial smooth muscle in large number 3rd hour postburn

2.2.2 ETB mRNA 正常大鼠少量分布于肾小球、小动脉、直小血管、内皮细胞、系膜细胞、近端肾小管及集合管上皮细胞胞浆。烧伤后 1 h上述部位 ETB mRNA杂交信号即明显增强,特别是近端肾小管及集合管上皮细胞。6 h达高峰, 24 h仍显著高于正常,见图 3



图 3 烧伤后 6 h肾小管 ETB受体 mRNA大量分布

Fig 3 ETB receptor mRNA distributed in the renal tubules in large number 6th hour postburn

2.2.3 ETA ETB mRNA分布变化的比较 烧伤后 ETA ETB mRNA均显著增高,但 ETA mRNA主要在皮质增强,而 ETB mRNA主要在髓质增强。ETB mRNA在内皮细胞、小管上皮细胞均有分布,但 ETA mRNA内皮细胞无阳性颗粒,主要分布在血管平滑肌细胞。分别在皮质和髓质进行阳性细胞计数比较,发现 ETA mRNA在烧伤后 3 h至 24 h,皮质、髓质阳性细胞数都显著高于正常组, (P < 0.01),而皮质又明显高于髓质 (P < 0.05)。ETB mRNA在烧伤后 1 h,髓质内即有阳性细胞增加,不但显著高于正常组,也显著高于皮质 (P < 0.01),此现象维持到烧伤后 24 h,见图 4



图 4 大鼠烧伤后 ETA ETB原位杂交结果 (n= 5)

Fig 4 In situ hybridization of ETA and ETB in kidneys of rats postburn (n= 5)

3 讨论

ET-1作为一种细胞因子,必须经过与靶细胞上特异性 ETR结合,启动一系列细胞生化过程,才能最终产生相应的生物效应。已知同多数膜受体一样,肾脏质膜上内皮素受体 (ETR)密度受缺血、缺氧、再灌注、氧

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

自由基作用可发生上调或下调[5]。我们的其它研究表明,烧伤后肾脏 ET-1升高,但 ETR的变化及其规律尚无文献报道。

斑点杂交发现肾脏 ETA ETB mRNA百分占有率在烧伤早期均明显升高。原位杂交发现:烧伤后 ETR mRNA水平明显增强,其中 ETA mRNA以皮质增加更为明显,ETB mRNA以髓质增加主,主要是近端小管、远曲小管及集合管上皮细胞胞浆及内缘增强,所以髓质较皮质 ETB mRNA升高更为明显。资料表明:生理状况下,大鼠肾脏 ETR总量髓质比皮质高,ETA/ETB在皮质是 54∶46,在髓质为 35∶65[6],Nambi[7]认为在人肾皮质及髓质中 ETB占 70%,而 ETA仅占 30%。在甘油所致急性肾功能衰竭(ARF)模型上,并发生严重肾功能障碍时,ETA/ETB在皮质和髓质的比分别是 52∶48 32∶69,说明在髓质 ETB mRNA升高更显著[8]。本实验原位杂交显示两种受体亚型定位不同,ETA mRNA主要位于小动脉,ETB mRNA主要位于肾小管。提示间质来源的细胞(如血管平滑肌细胞、系膜细胞、髓质间质细胞)以 ETA为主,而上皮来源的细胞以 ETB为主[9]。本实验正常大鼠肾脏 ETA、ETB分布,与文献基本一致,烧伤后皮质以 ETA mRNA升高为主,髓质以 ETB mRNA升高为主,且高峰滞后,持续时间更长。ETR亚型在正常和伤后分布差异的意义与二者介导的生物学效应不同有关,ETA主要介导血管平滑肌收缩,烧伤后肾小血管平滑肌细胞上 ETA受体上调,这些小血管主要位于肾脏皮质,如出、入球动脉、肾小球毛细血管、弓状动脉等,升高的 ET-1与上调的 ETA受体结合导致肾皮质血管强烈收缩,肾皮质严重缺血。ETB介导的生物学效应较为复杂,目前,已知血管内皮细胞上 ETB与 ET结合导致血管内皮细胞产生内皮衍生性松弛因子(EDRF)引起血管平滑肌舒张,据认为灌注 ET所引起的短暂血管扩张即是由 ETB介导的;除此之外,ETB与 ET-1 ET-3有相同的高亲合力,具有调节水钠代谢的功能[10]。

我们认为,烧伤早期肾脏内皮素受体亚型上调,在皮质以 ETA为主,与增多的 ET-1结合主要导致肾脏皮质血管显著收缩,在髓质以 ETB上调为主,与增多的 ET-1或 ET-3结合主要影响髓质的肾小管集合管水钠代谢,而且这种调节高峰时间相对滞后,并持续更长时间。

此外,在正常肾脏肾小球系膜细胞 ETA ETB两种受体亚型均存在,烧伤后 ETA基因表达明显增强,而介导系膜细胞舒张的 ETB表达相对较弱,提示烧伤后 ET-1与 ETA结合导致系膜细胞收缩,肾小球超滤过系数(kf)下降,进而使肾小球滤过率(GFR)下降,损害肾功能。

参考文献

1 王　旭,吴雄飞,高健川等.严重体表烧伤早期大鼠肾脏内皮素-1 的基因表达.第三军医大学学报,1996;18(5):384

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 J.萨姆布鲁克,E. F.费里奇,J.曼尼阿蒂期.分子克隆实验指南.金冬雁,黎孟枫等译.第 2版.北京:科学出版社,1993:16~34

4 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,1994:415~481

5 Liu J, Chen R, Casley D J *et al*. Ischemia and reperfusion increase ^{125}I-labeled endothelin-binding in rat cardiac membranes. Am J Physiol, 1990; 258(3pt2): H829

6 Roubert P, Gillard-Roubert V, Poumarin L *et al*. Endothelin recetpor subtypes A and B are up-regulated in an experimental model of acute renal failure. Mol Pharmacol, 1994; 45(2): 182

7 Nambi P, Pullen M, Wu H L *et al*. Identification of endothelin receptor subtypes in human renal cortex and medulla using subtype-selective ligands. Endocrinology, 1992; 131(3): 1081

8 Arai H, Hori S, Aramori I *et al*. Cloning and expression of a cDNA encoding and endothelin receptor. Nature, 1990; 348(6303): 730

9 Nord E P. Renal actions of endothelin. Kidney Int, 1993; 44(2): 451

10 Yamashita Y, Yukimura T, Miura K *et al*. Effects of endothelin-3 on renal functions. J Pharmacol Exp Ther, 1991; 259(3): 1256

(收稿:1996-07-01;修回:1996-10-09)

(编辑　冯崇英)

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

Changes of mRNA of endothelin receptor in kidneys of rats at the early stage after severe burns*

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

Abstract The changes of the quantity and distribution of mRNA of endothelin receptor A (ETA) and endothelin receptor B (ETB) in rat kidneys at different time phases during the early stage after severe burns were dynamically observed. It was found that the percentages of ETA and ETB mRNA in kidneys were significantly elevated at the 1st hour postburn (the former reached its climax on the 3rd while the latter did so on the 6th hour postburn) and ETA mainly expressed in cortex and ETB in medulla. Our findings suggest that the changes of ET receptors participate in damage of the renal function.

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

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

个案与短篇

恶性淋巴瘤并食道腺癌一例

Report of a case of lymphoma associated with adenocarcinoma of esophagus

邹文孝* 周子成 (第三军医大学附属西南医院消化内科) 重庆, 630038

恶性肿瘤多原发癌屡见报道,但恶性淋巴瘤并食道腺癌则极少有报道,现将我院收治的一例报告如下。

患者,男,72岁。因左侧鼻塞4月,左鼻肿大1月于1992年3月住我院五官科,查体:左鼻翼鼻背明显肿大,左鼻腔见一淡红色新生物,表面不平,行鼻腔肿块活检,病理诊断:左鼻腔非何杰金氏病(病理号:921335),给予^{60}Co放疗(左鼻前野,^{60}Co总剂量为4000 Gy,共照射20次,每次200 Gy)。一月后,肿块消失,鼻塞好转出院。1996年3月,因进行性吞咽困难1年,加重3月收入我院消化科,胃镜检查见食道下段一3.0 cm×3.5 cm肿块,向下侵及贲门,触之出血,食道明显狭窄,行肿块活检,病理诊断:食道腺癌(病理号:961272)。因全身情况差,食道癌已属晚期,行姑息性治疗,于狭窄部位安置记忆合金支架,术后吞咽困难消失出院。

讨论

根据Warren等[1]提出的多原发癌诊断标准:① 每一个肿瘤组织学上必须均是恶性;② 每一个肿瘤有其独特的病理形态;③ 肿瘤发生在不同部位,两者不相连续;④ 必须排除复发或转移癌的可能性。本例符合上述标准。多原发癌的病因尚不完全清楚,苏勇等[2]对160例多原发癌进行分析发现,放疗后发生另一原发癌者明显高于非放疗组,认为放疗可致癌。本例因恶性淋巴瘤行放疗,3年后再患食道腺癌,其食道癌是否与放疗有关尚不能肯定,也可能系独立发生的肿瘤。多原发癌误诊率高,常易误诊为癌的复发或转移。因此,我们认为,凡有恶性肿瘤的病史,以往接受过放疗或化疗,近期出现不明原因的贫血、消瘦、消化道肿块、梗阻、出血等症状者,均应警惕多原发癌的可能。治疗多原发癌与初发癌一样,应争取手术切除,晚期患者则行姑息性治疗,力争提高病人的生活质量,延长生存期。

关键词 淋巴瘤;食道腺癌

中图法分类号 R733.4

参考文献

1 Warren S. Multiple primary malignant tumors. Am J Cancer, 1932; 16(6): 1358

2 苏 勇,张锦明,闵华庆.鼻咽癌与多发癌160例临床分析.癌症, 1994; 13(2): 165

(收稿: 1996-05-23;修回: 1996-09-28)

(编辑 汪勤俭)

* 进修生,现在武警重庆医院内二科 重庆, 630061

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