DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.04.028

影响地高辛标记TNF cDNA探针原位杂交效果的因素*

周立新 袁建成 肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,630038

提 要 应用地高辛标记肿瘤坏死因子(TNF)cDNA探针原位杂交检测TNF mRNA在烧伤大鼠内脏组织中的表达。并参考文献比较了几个影响原位杂交效果的因素如冰冻与石蜡切片,蛋白酶K,组织固定,脱片,热变性和试剂配制等。并提出了改良方法。

关键词 原位杂交;地高辛标记;肿瘤坏死因子

中图法分类号 Q782

原位杂交技术操作复杂,影响因素多,各家报道不一[1,2]。而应用地高辛标记探针检测脏器中的TNF mRNA表达阳性细胞还无报道。作者参阅文献,结合实际操作,对影响原位杂交成败的主要因素进行了探讨并予改进,现报告如下。

1 材料与方法

对40只烫伤大鼠主要脏器(肝、脾、肾、肺、小肠)进行原位杂交试验,其中36只大鼠主要脏器阳性,阳性率为90%。在实验中,我们设置了3种对照:①每次杂交过程中均设一组切片,操作过程同原位杂交,只是不加入标记探针,结果阴性。②切片在杂交前用RNase(150 μg/ml,溶于2×SSC中,Sigma)37℃消化2 h,消除细胞内所有RNA,杂交结果应为阴性。RNase消化后,仍有mRNA表达。说明是非特异地连接。③先用等量的未标记探针杂交后再用标记探针杂交,这种过程阻断了标记探针与TNF mRNA的结合,结果为阴性。

操作流程:①40只大鼠雌雄各半(四川中药研究所提供),200±30 g,随机分组。按我所致伤模型造成背部30% Ⅱ°烫伤,常规补液抗休克分别于3、6、12、24 h活杀迅速取其回盲部小肠一段,肝、肾、肺、脾。正常对照4只。液氮保存,一周内作冰冻切片。②载玻片预处理:用清洁液浸泡;1 mol/L HCl浸泡24 h以上;用含DEPC(0.1%焦碳酸二乙酯,Sigma)去离子双蒸水冲洗后,在含100 μg/ml的多聚赖氨酸(Sigma)无菌双蒸水中浸泡30～60 min;双蒸水冲洗两次;室温凉干。以增强对组织的粘附性。③冰冻切片8～10 μm(Bright恒温封闭式旋转切片机,英国),石蜡切片4～6 nm(Litz1512旋转切片机,德国)。④石蜡切片常规脱蜡至80%乙醇后入水。冰冻切片在4%多聚甲醛固定5 min;梯度酒精水化。⑤石蜡,冰冻以下操作相同。双蒸水,PBS分别振洗5 min;0.2 mol/L HCl 20 min;双蒸水5 min。⑥蛋白酶K(1 mg/ml,Sigma)37℃消化30～60 min。⑦0.2%甘氨酸洗2次;每次5 min。⑧PBS洗10 min。⑨4%多聚甲醛固定1 min。⑩PBS洗2次,每次5 min。⑪0.25%三乙醇胺洗10 min。⑫PBS洗2次,每次5 min。⑬风干。⑭置温盒内预杂交37℃ 2～4 h(预杂交液含50%甲酰胺,2×SSC)。⑮杂交液每片20 μl,含探针100～500 ng/ml,杂交液(0.5%SDS,40%甲酰胺,2×SSC,12.5%Dehard's液(含0.02%Ficoll400,0.02%小牛白蛋白,0.02%聚乙烯吡咯烷酮,250 μg/ml鲑鱼DNA)。⑯100℃水浴10 min。⑰冰浴5 min。⑱预杂交后的切片95℃干热10 min。⑲4℃ 5 min,迅速加入杂交液。⑳置温盒内杂交;42℃ 20 h。㉑取玻片室温2×SSC洗2次,每次10 min。㉒45℃ 0.1×SSC洗20 min。㉓缓冲液Ⅰ(0.1 mol/L Tris-HCl pH7.5,0.15 mol/L NaCl)漂洗5 min。㉔加入1∶500抗地高辛抗体,室温孵化2 h。㉕用缓冲液Ⅰ洗2次,每次10 min。㉖缓冲液Ⅱ(0.1 mol/L Tris-HCl,pH9.5,0.1 mol/L NaCl,0.05 mol/L $MgCl_2$)孵育2 min。㉗加入NBT(硝基四氮唑蓝溶于二甲基甲酰胺中70%V/V)显示,镜下控制强度。㉘基甲绿复染,二甲苯透明封片。

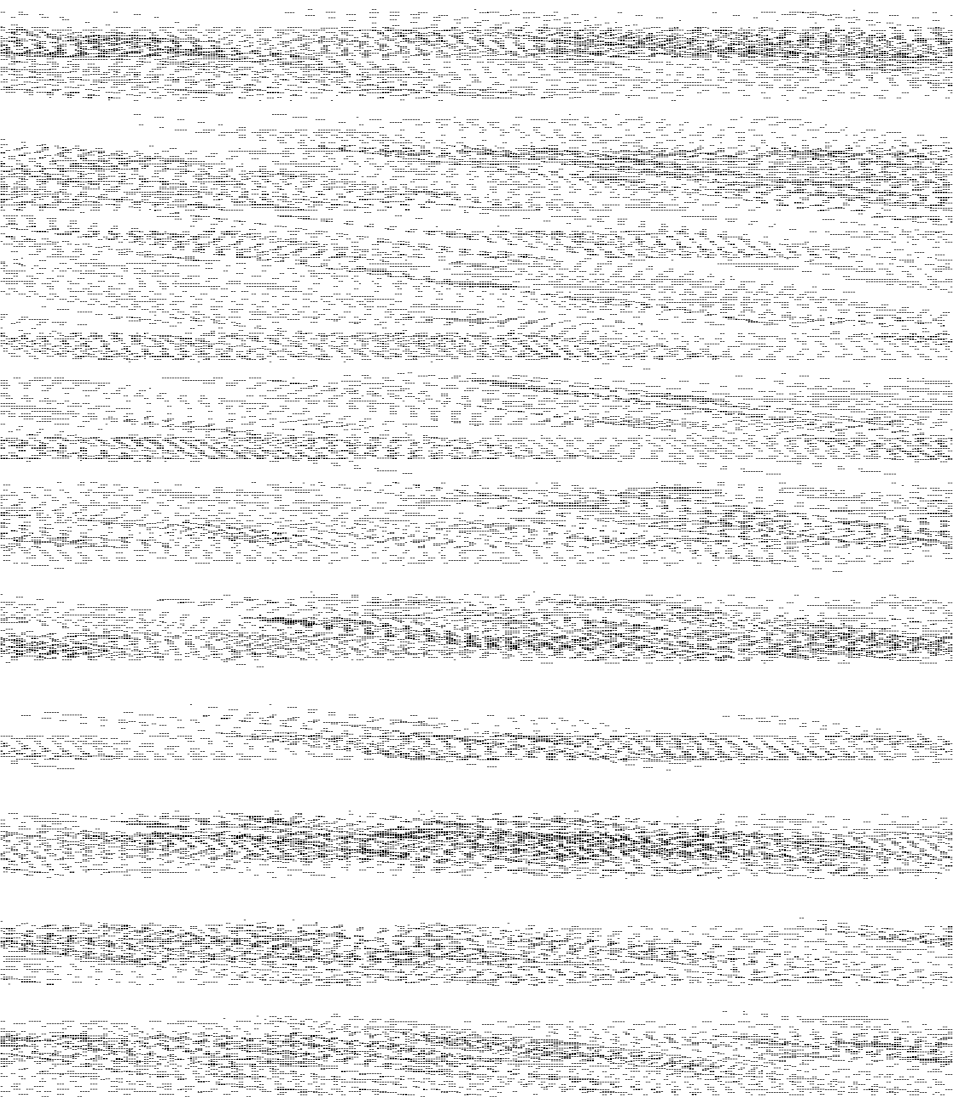
2 结果与讨论

2.1 冰冻与石蜡切片的比较

冰冻切片阳性率明显高于石蜡切片(见附图),因为在原位杂交处理因素相同的条件下,我们认为是组织经过甲醛、梯度酒精、二甲苯、浸蜡等处理后细胞内mRNA有很大降解。所以,在冰冻切片中可检出单拷贝核酸,而在石蜡切片则需5～6个拷贝方可检出。因此,对于检测细胞因子这类单拷贝基因,采用冰冻切片为佳。切片厚度以5～8 μm为佳。过厚必然要延长蛋白酶K消化时间,导致组织结构紊乱,染色不均。虽然石蜡切片在形态上优于冰冻切片,但冰冻切片却在保持mRNA活性上使石蜡切片相形见拙。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39290700

?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

The factors effecting on the results of in situ hybridization with digoxigenin-labelled TNF cDNA probe

Zhou Lixing, Yuan Jiancheng, Xiao Guangxia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The digoxigenin-labelled TNF cDNA probe was used for detection of the expression of TNF mRNA in the organs of burned rats. The authors contrast several factors effecting on the results of in situ hybridization, such as paraffin and cryostat sections, proteinase K, tissue fixation, hot melting and reagent preparation, and provide a new modified method.

Key words in situ hybridization; organs; tumor necrosis factor

****

5/6肾切除大鼠残肾形态演变及维生素E对其影响的定量研究

A quantitative study of morphological evolution of remanent kidney and vitamin E effects on 5/6 nephrectomized rats

袁发焕 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室)重庆,630038

慢性肾功能衰竭(CRF)发病率高、预后差,其发病机理仍不十分清楚。采用形态计量等手段,对5/6肾切除所致CRF大鼠残肾形态和功能演变及其影响因素进行动态观察,旨在阐明CRF残存肾单位演变规律及可能机理。成年雄性Wistar大鼠360只,分为A组(假手术对照)、B组(5/6肾切除)和C组(5/6肾切除+维生素E治疗),每组120只。分别于术后30、60、90、120 d观察各指标。主要结果如下:

(1)以往研究很少探讨肥大残肾各部分的比例,本研究B组大鼠术后残肾进行性肥大;肾小球体积进行性增加;肾小球毛细血管长度和面积显著增加;肾实质体密度、肾小球毛细血管长度密度和面积密度与A组无显著差别。说明术后残肾各组成部分呈大致成比例的有功能的代偿性肥大。

(2)肾小球肥大能否导致其自身硬化的问题尚无定论,本研究表明硬化肾小球比率与肾小球体积呈显著正相关;在多种因素中,以肾小球体积对硬化肾小球比率的影响最明显。C组大鼠用维生素E治疗后,硬化肾小球比率显著下降,而肾小球肥大程度下降得有限。分别对B组和C组大鼠肾小球体积与硬化肾小球比率的相关性进行回归分析,发现C组相关系数和回归系数小于B组,相关曲线的斜率也显著小于B组。证实肾小球肥大确实能促进其自身的硬化。

(3)B、C两组大鼠术后,光镜下毛细血管数目增多,透射电镜下可见肾小球系膜区有新生毛细血管,肾小球毛细血管铸型扫描电镜检查发现毛细血管分支显著增多,首次为证实残存肾小球毛细血管增生提供了直接形态学证据。

(4)B组术后肾小球有核细胞数密度显著增高;肾小球有核细胞数与毛细血管截面数之比值均>2,而A组该比值均<1,提出用该比值>1作为衡量肾小球有核细胞增多的客观标准。肾小球增多的有核细胞除增生的系膜细胞外,也有增生的肾小球内皮细胞和上皮细胞。

(5)B组大鼠术后硬化肾小球比率、病变肾小管和肾间质体密度、肾小球毛细血管滤过膜厚度和肾组织羟脯氨酸含量显著增高。相应地血浆肌酐和尿素氮浓度、平均动脉血压、尿蛋白浓度及大鼠死亡率显著增高,血红蛋白含量、红细胞压积和大鼠体重增加量显著低于A组。硬化肾小球比率、肾小球系膜区体密度、肾小球毛细血管滤过膜厚度和病变肾小管、肾间质体密度与血浆肌酐浓度显著正相关,说明术后残肾功能损害与残肾形态学改变基本吻合。

(6)B组大鼠术后,残肾皮质和髓质单位组织血流量、肾组织总自由基和脂质过氧化物含量显著增高,肾组织超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和钠钾ATP酶活力及维生素E含量显著降低。说明残肾有显著的高灌注和氧自由基产生增多及抗氧化能力降低。而C组虽也有残肾高灌注,但残肾氧自由基含量显著降低,抗氧化能力显著升高,相应地残肾形态和功能损害程度显著减轻,说明氧自由基反应亢进在残肾的进行性毁损中起有重要作用。

(7)B组大鼠术后外周血单个核细胞内游离钙浓度和其培养上清白介素-1(IL-1)活性以及肾组织血小板源生长因子(PDGF)-α mRNA含量显著增高。IL-1活性和PDGF-α mRNA含量与硬化肾小球比率显著正相关;游离钙浓度与IL-1活性和PDGF-α mRNA含量显著正相关;钠钾ATP酶活力与游离钙浓度显著负相关;脂质过氧化物含量与钠钾ATP酶活力显著负相关。C组IL-1和PDGF-α mRNA含量显著低于B组。提示IL-1和PDGF-α mRNA的高表达,可能参与了残肾的进行性毁损;而氧自由基通过抑制钠钾ATP酶活力使细胞内游离钙浓度升高,可能是促使IL-1和PDGF-α mRNA高表达的原因之一。

本研究证实:大鼠5/6肾切除术后,残肾的形态演变具有代偿增生使残肾功能增强和加速自身毁损的双重特性,加速自身毁损的特性能为抗氧化剂治疗所抑制。残肾形态演变受多种因素影响,包括残肾血流动力学异常、氧自由基反应亢进和多种细胞因子高表达。

关键词 慢性肾功能衰竭;残肾;形态计量;大鼠

中图法分类号 R692

(收稿:1995-07-06;修回:1995-07-27)

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