DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.06.003

不同龄大鼠脑神经元细胞核的纯化及其性质的比较*

彭家和 茆象千 邱 平 (第三军医大学基础部生物化学教研室) 630038

提 要 本研究采用蔗糖法从不同龄Wistar大鼠大脑皮质纯化制备神经元细胞核,并对其性质进行了比较研究。结果显示:以此法制备的神经元细胞核形态、结构均正常,而核产率随老化过程有减少趋势;三种RNA聚合酶、染色质非组蛋白和RNA含量随年龄增加而降低,但组蛋白含量不受老化因素影响。

关键词 神经元;细胞核;转录活性;染色质;大鼠

中国法分类号 R329.24

真核细胞贮存遗传信息的染色质以特定的构象存在于细胞核中,染色质的组成和结构的变化将调控遗传信息的表达,进而影响生物发育和衰老变化过程[1]。我们实验室由于研究大鼠老化过程大脑神经元30 nm染色质纤维构象变化的需要,参照并改进Giuffrida方法[2],纯化了不同龄脑神经元细胞核,同时借助于同位素和生物化学技术,对其核产率、体外转录活性及染色质的化学组分进行分析研究,为阐明大鼠老化过程脑神经元30 nm染色质构象变化规律提供了基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1.1.1 Wistar大鼠由本校动物所提供。雌雄随机分三个年龄组:幼年鼠(16~17周龄);成年鼠(33~34周龄);老年鼠(98~100周龄)。

1.1.2 试剂:α-鹅膏覃碱(α-amanitin)西德Boehringer公司产品),^{3}H-UTP(20 Ci/mmol)上海原子能研究所产品;ATP、CTP、GTP和苯甲基磺酰氟(PMSF)上海东风试剂厂产品,其它化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 脑神经元细胞核的制备:参照Giuffrida方法,将Wistar大鼠断头处死,迅速取大脑置玻璃皿中去白质,称取灰质4 g,用适量冰冷A液(0.3 mol/L蔗糖、150 mmol/l KCl、50 mmol/L $MgCl_2$、0.5 mmol/L PMSF、10 mmol/L Tris-HCl pH7.0、0.5% Triton X-100)漂洗、剪碎,加A液50 ml,经Tefoln杆手动玻璃匀浆器匀浆约12~15次,200目尼龙布过滤,残渣再加A液40 ml重复匀浆、过滤、两次滤液合并,4℃ 3 000 rpm离心10 min,获粗核沉淀。然后再将粗核均匀悬浮在60 ml B液(2.1 mol/L蔗糖、50 mmol/L $MgCl_2$、0.5 mmol/L PMSF、10 mmol/L Tris-HCl pH7.0)中,平分于三支离心管内,每支离心管底加5 ml B液为垫子,25 000 rpm超速离心1 h,获纯核沉淀。以C液(10 mmol/L Tris-HCl pH7.0、5 mmol/L $MgCl_2$、25%甘油)制成1 mg/ml核悬浮液,低温保存备用。以上操作均在0~4℃条件下进行。

1.2.2 匀浆液和细胞核悬液中DNA含量测定:参照Kuehl方法[3]进行。样品用10%三氯醋酸离心沉淀DNA,5%三氯醋酸洗一次,在5%三氯醋酸中加热90℃水解15 min,3 000 rpm离心吸一定量的上清液,用二苯胺反应显色,测其600 nm波长的光吸收,由标准曲线读出DNA含量。

1.2.3 细胞核转录活性测定:按本室方法[4]进行。体外转录活性以RNA中掺入^{3}H-UMP pmol/mg细胞DNA表示。RNA聚合酶Ⅰ活性指低盐系统(50 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$)中加入α-amanitin时测得的活性;RNA聚合酶Ⅱ指高盐系统(240 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$)中加入α-amanitin时测得的活性,减去RNA聚合酶Ⅱ的活性表示。

1.2.4 染色质化学组份分析:按Logan等方法[5]分离DNA和RNA;二苯胺法测DNA含量,紫外吸收法测RNA含量。按Hill方法[6]分离组蛋白和非组蛋白,蛋白含量用Lowry法测得。

2 结果

2.1 不同龄大鼠脑神经元细胞核纯化各步DNA含量和核产率

利用本法制备的幼年鼠、成年鼠和老年鼠神经元细胞核的DNA产量和产率见表1。以匀浆液DNA含量为100%计算,幼年鼠、成年鼠和老年鼠核产率分别为22.3%,21.1%和18.8%,呈现随年龄增加而核产率逐渐降低的趋势。

* 国家自然科学基金资助课题,No. 39070431

?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

表2 不同龄大鼠脑染色质各化学组份含量(DNA=1)

Tab 2 The content of chemical composition from neuronal chromatin of rats at different ages (relative to 1 mg DNA)

Age	RNA (mg)	Histones (mg)	NHCP (mg)
Young rats	0.099±0.006	1.140±0.070	0.840±0.062
Adult rats	0.072±0.002※	1.180±0.125	0.480±0.020※
Old rats	0.054±0.006※	1.050±0.052	0.380±0.078※

Values represent means±S·E for three independent sets of experiments. ※: $P < 0.01$, compared with young rats.

3 讨论

本研究参照 Giuffrida 蔗糖法制备脑神经元细胞核的方法,在匀浆 A 液中加入150 mmol/L KCl 和0.5 mmol/L PMSF,前者不仅可以使核膜脆性减弱,而且避免核内染色质纤维在细胞核分离过程中松散,解螺旋;后者可以抑制细胞内蛋白酶的活性。这样使制得的脑神经元细胞核核膜完整,染色质清晰可见。在超速离心纯化细胞时,我们采用了离心管底加5 ml B 液做垫子,可较好的提高核的纯度,制得无胞浆污染的纯核。

以此法制备的幼年鼠、成年鼠和老年鼠脑神经元细胞核,经体外转录实验证明均具有良好的转录活性,进而表明细胞核生物学功能正常。同时显示,细胞核体外转录活性随大鼠年龄老化而降低,这一结果与 Petricevic[7]报告相似。细胞核体外转录活性的变化通常受到核内活性染色质模板效率和 RNA 聚合酶的催化活性两个因素的影响,Sarkander 报道[8]老年鼠大脑神经元细胞核活性染色质比例明显低于幼年鼠,由此提示,大鼠年龄老化活性染色质降低可能是转录活性下降的主要原因。

从不同龄大鼠脑神经元细胞核染色质化学组份分析结果看,染色质组蛋白含量不受老年因素的影响,在一定程度上反映了组蛋白成分在个体生长、发育过程中的高度保守性[9],组蛋白作为染色质主要结构蛋白对维持染色质结构具有重要意义。而染色质中的非组蛋白和 RNA 含量,老年鼠明显低于幼年鼠和成年鼠,呈现随年龄变化的特征。过去认为非组蛋白也属于结构蛋白,但近年来许多实验证明,染色质非组蛋白和 RNA 一样均能解除组蛋白对基因表达的抑制作用,与复制、转录密切相关[10]。因此,染色质非组蛋白和 RNA 含量下降,基因表达调控异常,是否与机体衰老过程密切相关有待进一步研究。

参考文献

1 Medvedv ZA. Age changes of chromatin. Mech Aging Dev, 1984,28:149

2 Giuffrida D, Anna M, Cox, et al. RNA polymerase activity in various classes of nuclei from different regions of rat brain during postnatal development. J Neurochem,1975,24:749

3 Kuchl L. Isolation of skeletal nuclei methods. Cell Biol, 1977,15:79

4 茆象千,石成德,董燕麟.重度烫伤大鼠肝、肌细胞核转录的动态变化.第三军医大学学报,1986,8:308

5 Logan TE, Mannell WA, Rossitar RJ. Estimation of nucleic acids in tissue from the nervous system. Biochem J,1952, 51:470

6 Hill RJ. Toward a total macromolecular analysis of sea urchin embryol chromatin. J Mol Biol,1971,61:445

7 Petricevic M. Age related changes in total DNA and RNA incorporation of uridine and thymidine in rat brain. Int J Biochem,1983,15:751

8 Sarkander HI. Age dependent change in the organization and regulation of transcriptionally active neucronal and nonastrocytic glial chromatin. In: Aging. Vol 21. New York: Raven Press,1983:301

9 Rothstein M. In Biochemical approaches to aging. New York/London: Academic Press,1982:143

10 Bruce A. Structure of chromatin molecular biology of the cell. New York: Garland Publishing Int,1983:392

(收稿:1994-04-14;修回:1994-09-16)

A comparative study of purification and characteristics of neuronal nuclei from cerebral cortex of rats with different ages

Peng Jiahe, Mao Xiangqian, Qiu Ping (Department of Biochemistry, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The neuronal nuclei from the cerebral cortex of Wistar rats with different ages were isolated with the sucrose method and the transcriptional activities in vitro and chromatin chemical composition of the nuclei were further observed. It was found that the neuronal nuclei prepared with this method exhibited normal morphology and structure. The rate of nuclear recovery, the transcriptional activity of RNA polymerase,

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

I Ⅰ and Ⅱ and the content of NHCP and RNA in the neuronal nuclei would be significantly decreased along with the increase of age but the histone content remained constant without being affected with the aging process.

Key words neurons; cell nucleus; transcriptional activity; chromation; rat

个案与短篇

刎颈患者伤及部位分析与处理

An analysis of the location of knife-cut injury of the larynx and its treatment

范文汉 贺玉梅* (第三军医大学西南医院耳鼻喉科) 630038

颈部解剖关系复杂,刎颈后可发生窒息或大出血死亡严重后果。亦有因刎颈后处理不当,致发音障碍及呼吸道狭窄而长期戴管,给生活带来很多不便。近年来我们救治严重刎颈病人14例,对如何恢复喉粘膜和软骨支架的完整性,特别对一些常致喉狭窄后遗症的环状软骨严重损伤者,Ⅰ期置T型管取得满意效果,报告如下:

1 临床资料

本组患者14例,男女各7例,年龄23～81岁。刎颈时伤及部位:伤及甲状舌骨膜进入喉咽腔1例,伤及甲状软骨进入喉腔6例,伤及环甲膜进入声门下2例,伤及环状软骨进入声门下3例,气管部分断裂2例。入院时有失血性休克8例。所有病人清创修复前均做了常规的低位气管切开。8例病人粘膜对位缝合后仍有较大缺损,均用颈部带状肌肌膜翻转修复粘膜缺损区。4例环状软骨伤患者中一例缺损较少,粘膜保留较完整,软骨缺损不明显,修复后对位良好。另一例术后10天声门下肉芽组织生长,出现呼吸困难。即行喉成型术,摘除肉芽后声门下置硅胶T型管,半年后顺利拔管。另二例病人因环状软骨缺损较多,均术中Ⅰ期置T型管,一例已拔管,另一例因时间短尚待观察。其余11例病人亦顺利拔管,随访1年均无呼吸困难。

2 讨论

颈部外伤不仅影响发音及呼吸道通畅,还可对生命造成潜在严重威胁。处理喉外伤时,恢复喉粘膜和软骨支架的完整性是恢复发音和气道通畅的最主要措施[1]。如何恢复喉粘膜和软骨支架的完整性可因刎颈患者伤及的部位高低不同,出现的症状不同处理方法也不尽相同。如伤及甲状舌骨膜,常将会厌软骨茎部部分或完全切断。从创口可见到喉部发音时声带运动,伤员可致咳嗽,也可因喉水肿出现呼吸困难。处理时应注意创口深部会厌的修复。因会厌粘膜比较疏松,修复一般不困难。伤及甲状软骨,损伤部位在声带上下,虽然直接损伤声带者不多见,但伤员往往可因声带肿胀而出现声音嘶哑,失音和呼吸困难。处理时如甲状软骨仅有裂口或虽然有骨折但错位不明显者,软骨膜,粘膜对位缝合即可。如错位明显而软骨膜又失去缝合固定的条件,则软骨缘需用钢丝固定,以保持术后呼吸道通畅,除已游离或失活的甲状软骨小骨片可去除外,应尽量保留,特别是喉部粘膜及软骨膜,以便于修复和防止术后喉狭窄。对粘膜缺损较多者,可采用带状肌肌膜,带蒂转入喉内,修复喉部缺损粘膜,以消灭喉部粘膜缺损区。术后随访观察,创面光滑。环甲膜部位损伤后正处于声门下,是喉腔的狭窄部位,疏松组织多,淋巴组织丰富。伤后易发生声门下水肿,有较严重的呼吸困难。伤后喉水肿往往在48 h达高峰[2]。应注意早期诊断,严密观察。如不合并伤及上下软骨,行常规气管切开,解决通气避免环状软骨感染即可。而环状软骨是喉腔的唯一完整软骨,是喉的主要支架,环状软骨损伤后可出现明显的呼吸困难,如果处理不当常引起喉狭窄的不良后果。这样的病人在尽量缝合并修复喉粘膜,保留仍有活性软骨同时Ⅰ期置硅胶T型管,以防止喉狭窄的发生,可取得极为满意的效果。气管部位深较隐蔽,气管损伤的机会较少。

刎颈病人急诊致死的主要原因是呼吸道堵塞或伤及颈部大血管造成大量失血性休克。血块堵塞和喉粘膜水肿是呼吸道堵塞的主要原因。而出血则因颈部血管丰富,就是没有伤及要害血管也可致失血性休克。本组14例伤员中入院时有失血性休克者8例。而伤及颈部大血管常未能送入医院即已死亡。所以保持呼吸道通畅和及时止血防休克是刎颈伤员救治的关键。如怀疑有颈内外静脉损伤,应尽量平卧,以减少发生气栓的危险。

关键词 颈/损伤;急救
中图法分类号 R826.62

参考文献

1 Steven D. The acute mainagenment of external laryngeal trauma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1992, 118(6): 598
2 刘艺菁. 喉外伤39例. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1991, 26(4): 244

(收稿:1993-11-03;修回:1994-10-06)

* 第三军医大学基础部数学教研室

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