DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.017

视黄酸对淋巴细胞膜转铁蛋白受体mRNA水平影响的研究

糜漫天 余 琦 杨家驹 石元刚 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室) 630038

提 要 在本研究中观察了一定剂量范围(2.5×10^{-4}～2.5×10^{-7} mol/L)视黄酸(retinoic acid,RA)对淋巴细胞膜上的转铁蛋白受体(CD71)mRNA的影响。结果显示:大剂量RA(2.5×10^{-4} mol/L)显著抑制CD71 mRNA产生,且这种抑制作用不能被加入的外源性人重组白介素2(rhIL-2)所逆转;2.5×10^{-5}～2.5×10^{-6} mol/L RA则能增加CD71 mRNA含量,2.5×10^{-7} mol/L RA作用不明显(与二甲基亚砜(DMSO)溶剂对照比)。提示大剂量RA可能直接在基因转录水平上抑制了CD71 DNA转录为mRNA。

关键词 维甲酸;淋巴细胞;CD71分子

中图法分类号 R329.24;R986

淋巴细胞膜上的转铁蛋白受体(CD71)是淋巴细胞膜上一重要的分化抗原,由90kD两亚单位组成,它可与Fe^{++}饱和的转铁蛋白结合,内在化介导细胞对Fe^{++}的摄取[1],因此CD71分子与淋巴细胞增殖分化密切相关。静止淋巴细胞很少或不表达CD71分子,淋巴细胞受有丝分裂剂或特异性抗原活化后CD71表达明显增加,它与CD25、CD30、CD70等被认为是细胞活化过程中期的活化标志物[2],用CD71单抗封闭其与配体的结合,淋巴细胞增殖受抑,细胞大部分受阻于G_1期[3]。有研究显示视黄酸(RA)能直接作用于T、B淋巴细胞,影响细胞因子分泌和CD25、CD71等膜分化抗原表达。本实验从转录水平上研究一定剂量范围RA对CD71分子表达的影响,以推动RA免疫调节作用分子机制的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

PTfR-2质粒由kuhn博士惠赠,人重组IL-2冻干品为本校免疫教研室生产;地高辛标记多聚核苷检测试剂盒(Dig DNA labelling and detection kit)、DNA+Hind Ⅲ marker为德国Boehringer Mannheim公司产品;焦碳酸二乙酯(DEPC)为Fluka产品,Guanidine为Sigma)产品;大肠杆菌限制性内切酶(EcoRI)为华美公司产品,硝酸纤维素(NC)膜为美国Promega产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA片段扩增、酶切及片段回收:质粒转化大肠杆菌HB101,经含氨苄青霉素的LB培养基筛选,转化阳性菌落接种于含氨苄青霉素的LB液体培养基中,用氯霉素扩增质粒,碱变性法大量提取质粒。EcoRI酶切,0.8%琼脂糖凝胶电泳将载体与目的基因分开,电泳洗脱方法回收DNA片段.经酚氯仿抽提,乙醇沉淀纯化CD71 cDNA片段。

1.2.2 Dig标记CD71 cDNA探针制备:将纯化后的目的基因片段1.0 μg,100℃煮沸10 min变性,迅速置－20℃ 10 min,加入六聚核苷酸混合物及dNTP标记用混合底物,在Klenow大片段酶存在下37℃反应20 h,煮沸10 min后－20℃保存备用。

1.2.3 人外周血淋巴细胞的分离、培养:取健康献血员新鲜肝素抗凝静脉血,按常规方法无菌分离淋巴细胞,洗涤后用10% FCS的RPMI1640液悬起细胞,调整细胞浓度为5×10^6个/ml,于24孔板中培养细胞;RA用DMSO配成不同浓度,加入细胞培养液中使终浓度分别为2.5×10^{-4}～2.5×10^{-7} mol/L,同时设立加相应量DMSO无RA的溶剂对照,以PHA刺激培养48 h。用异硫氰酸胍法抽提细胞总RNA,RNA保存于－20℃备用。

1.2.4 斑点印迹杂交

1.2.4.1 标准品及稀释方法:取一定量纯化的PTfR-2质粒在紫外分光上测O.D260,计算其浓度,按3倍稀释法依次稀释成1745,581.67,193.89,64.63,21.54,7.18,2.39,0.80,0.27,0.09 pg/μl。

1.2.4.2 点膜、预杂交及杂交:NC膜依次用ddH_2O、20×SSC、0.1%DEPC浸湿后自然凉干备用。－20℃保存的RNA加变性液(20×SSC:37%甲醛1:1)12 μl稀释,全部溶解后65℃水浴15 min,依次取标准品及样品2 μl点于NC膜上,80℃烤膜2 h。将膜用40 ml预杂交液(5×SSC,0.5%封阻试剂,0.1%N-十二烷酰肌氨酸钠,0.02%SDS)封于塑料袋中,65℃预杂交过夜,然后将膜取出于另一塑料袋中,加入2.5 ml杂交液(含Dig标记CD71 cDNA探针20 μl,50%甲酰胺、5%封阻试剂、5×SSC、0.1%N-十二烷酰肌氨酸钠,0.02%SDS),42℃杂交20 h。

1.2.4.3 洗膜及显色:NC膜在室温下2×SSC,0.1%SDS洗膜5 min×2次,65℃用0.1×SSC,0.1%SDS洗膜15 min×2次,再在室温用2×SSC漂洗一次,再次封阻膜45 min,按试剂盒提供方法加入显色剂显色24 h,然后终止反应。

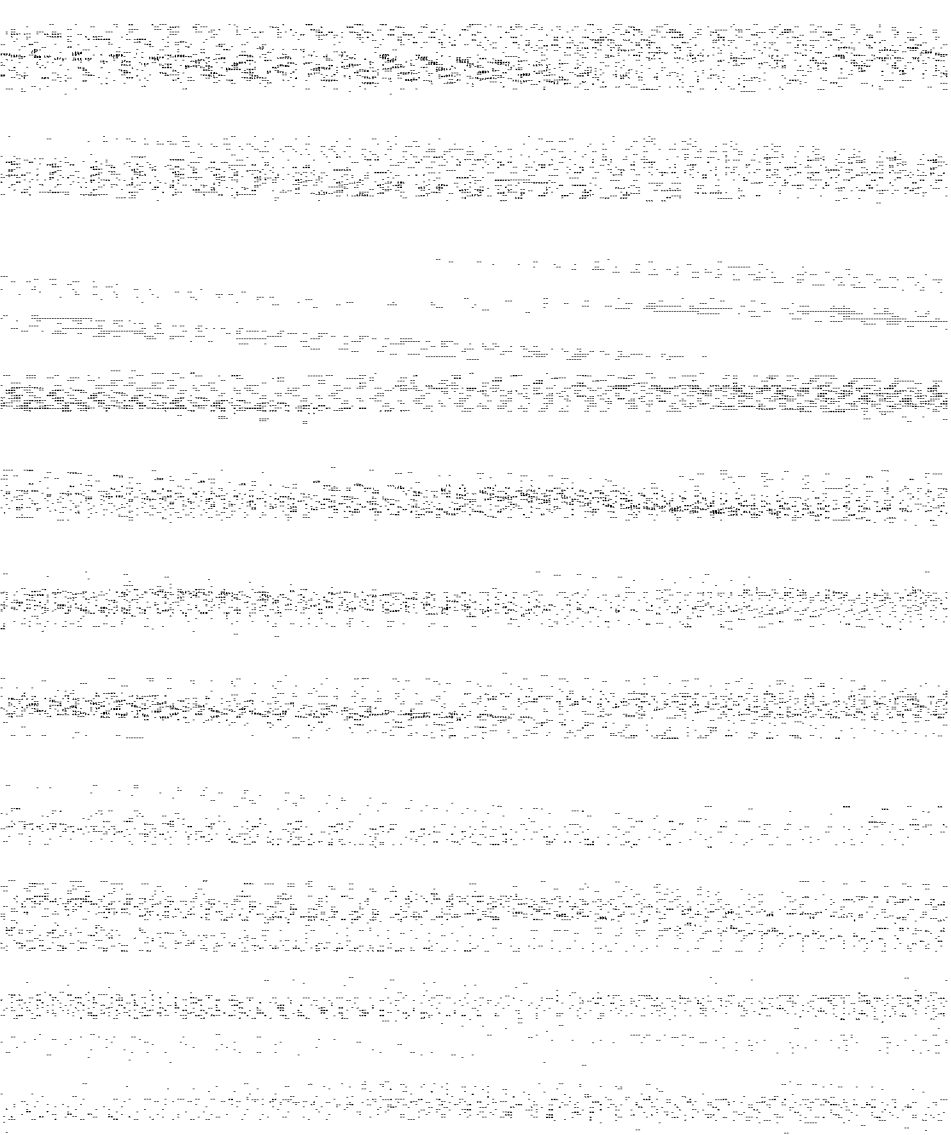
1.2.5 定量分析:湿膜用CS9000型(日本)薄层色谱扫描仪扫描,根据扫描的波形面积在半对数坐标纸上作图,由标准曲线可查出各样品点所含RNA相当于同源DNA的量。

2 结果

2.1 CD71 cDNA片段酶切鉴定

PTfR-2质粒大量扩增、纯化后,取1 μl质粒用EcoRI 37℃

?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

3 Kemp JD, Thorson JA, Mcalmont TH et al. Role of the transferrin receptor in lymphocyte growth: a rat IgG monoclonal antibody against the murine transferrin receptor produces highly selective inhibition of T and B cell activation protocols. J Immunol, 1987; 138(8): 2422
4 Sidell N, Taga T, Hirano T et al. Retinoic acid induced growth inhibition of a human myelomy cell line via dowm-regulation of IL-6 receptors. J Immunology, 1991; 146(11): 38094
5 Heidi KB, Erlend BS, Bjorn E. Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cells. J Biol Chem, 1992; 267(33): 23988
6 Weiping W and Mark B. The effects of retinoic acid on in vitra immunoglobulin synthesis by cord blood and adult peripheral blood mononuclear cell. Cellular Immunology, 1993; 148: 291
7 Neil S, and Ramsdell F. Retinoic acid up-regulates interleukin-2 receptors on activated human thymocytes. Cellular Immunology, 1988; 115: 229
8 Magelsdorf DJ. Nuclear receptor that identifies a noval retinoic acid response pathway. Nature, 1990; 345: 224

(收稿:1994- - ;修回:1994- -)

The effects of retinoic acid on CD71 mRNA level in lymphocytes

Mi Mantian, Yu Qi, Yang Jiaju, Shi Yuangang (Department of Food and Nutrition Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Astract The effects of large or physiological dosage of retinoic acid (RA) on the CD71 mRNA level in the lymphocytes were observed with Dig labelled CD71 cDNA probe. It was found that 2.5×10^{-4} mol/L RA could inhibit dramatically the production of CD71 mRNA, which was irreversible when external recombinant human interleukin−2 was added. Nevertheless, 2.5×10^{-5} to 2.5×10^{-6} mol/L RA could increase the CD71 mRNA content in the lymphocytes and 2.5×10^{-7} mol/L RA induced a same response as that of the control with DMSO soluent. Our findings suggest that RA in large dosage can inhibit the transcription of CD71 DNA into mRNA.

Key words tretinoin; lymphocyte; CD71 molecule

咽喉表面麻醉法的改进

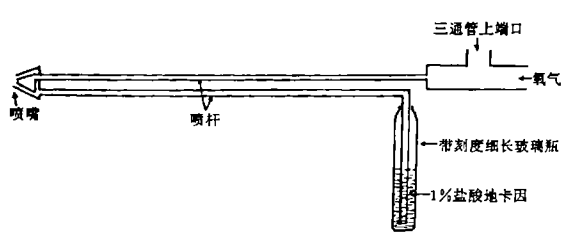
The improvement of pharyngolaryngeal surface anethesia

陈小宏 马惟力 (第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科) 630038

目前使用的普通咽喉喷雾器效率较低,操作较复杂,病人痛苦较大,我们对其稍加改进后,在施行咽喉表面麻醉术时效果甚好。现报道如下:

1 器材及方法

普通咽喉喷雾器,带刻度细长玻璃瓶,三通管,氧气瓶及减压流量计各一,1%盐酸地卡因溶液若干。按附图连结。施术时患者取坐位,先开启氧气阀及流量计,氧气流量调节在5L/min左右,麻醉咽部时嘱患者自然张口发"阿"音,麻醉喉部时则牵舌发"衣"音,与此同时用右手食指按住三通管上端口,地卡因即从喷嘴喷出。取开食指,喷雾停止。为防止呛咳及地卡因中毒,宜采用间歇喷雾。



附图 改进之咽喉喷雾器示意图

(下转 139 页)

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