

·论著·

宫内至断乳前持续被动吸烟幼鼠脑组织凋亡相关基因的表达

孟药, 吴圣楣, 沈永年, 钱龙华

(上海市儿科医学研究所, 上海 200092)

[摘要] 目的 探讨不同浓度香烟暴露对宫内至断乳前持续被动吸烟幼鼠脑组织凋亡相关基因 Bax mRNA 及 Bcl-2 mRNA 相对表达量的影响。方法 SD 雌鼠于交配后第 2 天, 入低、中、高 3 种香烟浓度的被动吸烟箱中, 每日 5 h, 待其自然分娩, 幼鼠置与宫内相同香烟浓度的被动吸烟箱中, 每日 5 h, 至 21 d 断乳。用快速竞争性 RT-PCR 法测定幼鼠脑组织 Bax mRNA 及 Bcl-2 mRNA 的相对表达量。结果 各组幼鼠脑组织 Bax mRNA 相对表达量: 对照组 0.31, 低浓度被动吸烟组 0.47, 中浓度被动吸烟组 0.55, 高浓度被动吸烟组 0.60, 中浓度及高浓度被动吸烟组幼鼠脑组织 Bax mRNA 的相对表达量明显高于对照组 ($P < 0.05$); 各组 Bcl-2 mRNA 变化不显著 ($P > 0.05$)。结论 幼鼠脑组织凋亡启动基因 Bax mRNA 相对表达量的增高提示细胞凋亡在宫内至断乳前持续被动吸烟幼鼠脑损害机制中可能起一定作用。

[关键词] 被动吸烟; 宫内生长迟缓; 脑组织; 凋亡; 幼鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)04-0370-03

被动吸烟可影响幼鼠脑的发育^[1]。本文用快速竞争性 RT-PCR 法检测宫内至断乳前持续被动吸烟幼鼠脑组织凋亡相关基因 Bax mRNA 及 Bcl-2 mRNA 的相对表达情况, 从而探讨凋亡在被动吸烟致幼鼠脑损伤发病机制中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 实验对象与分组

SD 雌鼠 12 只, 于交配后第 2 天随机分为对照组、低浓度 (香烟雾 CO 浓度 5 ~ 10 ppm)、中浓度 (香烟雾 CO 浓度 50 ppm) 及高浓度 (香烟雾 CO 浓度 200 ppm) 被动吸烟组。

1.2 动物模型的建立及标本的获取

实验组入可调控香烟浓度的半封闭有机玻璃箱中, 每天被动吸烟 5 h, 对照组放入无香烟的半封闭有机玻璃箱中, 每日 5 h, 待各组孕鼠自然分娩, 每组随机保留 10 只幼鼠, 幼鼠置与母鼠相同香烟浓度的被动吸烟箱中, 每日 5 h, 均至 21 d 断乳, 称量幼鼠体重、一侧大脑半球脑重。脑组织 - 80 °C 冰箱保存待测。

1.3 实验方法

1.3.1 总 RNA 的抽提 采用柱离心式组织/细胞 RNA 抽提试剂盒 (上海华舜生物工程公司) 提取 RNA。

1.3.2 引物的设计与合成 应用 Oligo 5.0 软件程序设计有意义、反意义引物, 另设计一个反意义竞争引物 (包含反意义引物另加若干个碱基序列)。引物由美国 CyberSyn 生物工程公司合成。

1.3.3 特定竞争性内参照的制备 特定竞争性内参照 (internal standard, IS) 的制备参照文献^[2]。并用不同稀释度的 IS 与一定量的目的 cDNA 竞争, 以选择 IS 的最佳竞争浓度。

1.3.4 柱离心式胶回收 用柱离心式胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程公司) 完成。

1.3.5 快速竞争性 RT-PCR 取 2 μ g 总 RNA 按逆转录试剂盒说明进行逆转录, 然后在 Gene Amp PCR System 2400 (Gene, U. S. A.) 上行 PCR。总反应体系为 25 μ l。两者 PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ g/ml 溴乙锭) 电泳, 紫外灯下拍照。用凝胶成像仪观察结果。电泳所用 Marker 为 pGEM-7Zf(+)/Hand DNA Markers (华美公司)

产品)。分别测定 PCR 产物与其 IS 的荧光密度比作为该基因的相对表达强度。每样本测量 2 次,取均值。

1.3.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果分析采用 Statistica 5.0 软件包进行方差分析。

2 结果

2.1 各组幼鼠体重、脑重

各实验组幼鼠与对照组相比,体重、脑重均明显减轻,香烟雾浓度越高,体重、脑重减轻越明显。见表 1。

表 1 各组幼鼠体重、脑重情况($\bar{x} \pm s$, g, n=30)

组别	体重	脑重
对照组	31.81 $\pm$ 5.05	1.28 $\pm$ 0.07
低浓度组	24.61 $\pm$ 3.97 ^a	1.22 $\pm$ 0.05 ^a
中浓度组	23.44 $\pm$ 3.38 ^a	1.19 $\pm$ 0.07 ^a
高浓度组	18.66 $\pm$ 3.11 ^{a,b,c}	1.08 $\pm$ 0.08 ^{a,b,c}

注: a * "与对照组比较 $P < 0.01$; b * "与低浓度组比较 $P < 0.01$; c * "与中浓度组比较 $P < 0.01$

2.2 特定竞争性内标量的确定

目的条带与竞争条带均较明显的电泳泳道含量即为较合适的竞争水平。Bax 自右向左泳道内标(IS)的量分别为 320,160,80,40,20,10,5,2.5,1.25 fg,目的 cDNA 为 0.3 μ g,PCR 产物条带(436 bp),IS(224 bp),取第 8 泳道对应的 IS 量(2.5 fg)作为竞争内标量(见图 1)。Bcl - 2 自右向左泳道 IS 的量分别为 160,80,40,20,10,5,2.5,1.25,0.625 fg,目的 cDNA 为 0.4 μ g,PCR 产物条带(431 bp),IS(223 bp),取第 7 泳道对应的 IS 量(2.5 fg)作为竞争内标量(见图 2)。

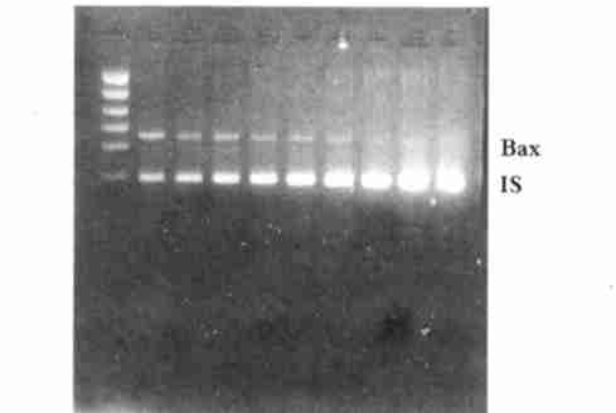


图 1 Bax 特定竞争性内标量的确定

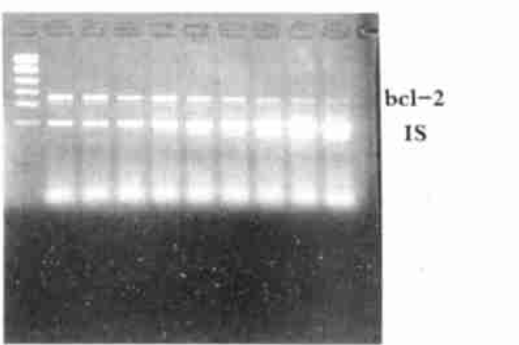


图 2 Bcl-2 特定竞争性内标量的确定

2.3 各组幼鼠脑组织 Bax mRNA ,Bcl - 2 mRNA 表达情况。

各实验组幼鼠脑组织 Bax mRNA 表达随着烟雾浓度增高而增多,但以中高浓度组的 Bax mRNA 增高有统计学意义($P < 0.05$)。各组 Bcl-2 mRNA 变化不显著。见表 2 及图 3,4。

表 2 各组幼鼠脑组织 Bax mRNA ,Bcl-2 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	Bax mRNA	Bcl - 2 mRNA
对照组	0.31 $\pm$ 0.18	0.37 $\pm$ 0.23
低浓度组	0.47 $\pm$ 0.27	0.38 $\pm$ 0.21
中浓度组	0.55 $\pm$ 0.22 ^a	0.44 $\pm$ 0.33
高浓度组	0.60 $\pm$ 0.21 ^a	0.46 $\pm$ 0.40

注: a * "与对照组比较 $P < 0.05$



图 3 各组幼鼠脑组织 Bax mRNA PCR 电泳图



图 4 各组幼鼠脑组织 Bcl-2 mRNA PCR 电泳图

3 讨论

本实验显示,随香烟浓度增加,宫内至断乳前持续被动吸烟幼鼠体重、脑重明显减轻,同时脑组织 Bax mRNA 的相对表达量增加,Bcl - 2 mRNA 的相对表达量无明显变化,故 Bax 与 Bcl - 2 的比值增加。细胞凋亡也叫程序化细胞死亡,该过程受基因调控,控制细胞凋亡的基因分两类,一类诱导凋亡的发生如 Bax,另一类抑制凋亡的发生如 Bcl - 2。当细胞受到损伤刺激后,凋亡促进基因异常表达,形成死亡蛋白,继之激活内源性核酸内切酶,引起核染色质断裂凝聚,不可逆的细胞损伤随之发生^[2]。Bcl - 2 通过抵抗多种形式的细胞死亡,延长细胞寿命^[3],Bax 与 Bcl - 2 的比值决定着细胞受诱导刺激后是凋亡还是存活,若 Bax 占优势,则细胞凋亡,反之则细胞存活^[4]。宫内至断乳前持续被动吸烟幼鼠脑重减轻可能与 Bax/Bcl - 2 的比值增加有关。本文检测 mRNA 所用方法为 RT - PCR 半定量方法,mRNA 尚可用 Northern 方法检测。

本文幼鼠宫内即受香烟中有害物质刺激,香烟中的尼古丁和 CO 可导致胎盘功能障碍,影响其宫内的营养供给^[1]。出生后香烟中的有害物质尚可直接进入幼鼠体内,香烟中的 CO 可影响血红蛋白和肌红蛋白与氧的结合力,降低血氧饱和度,造成组织缺氧;香烟中的氰化物可导致血中维生素 B₁₂和硫

胺素水平降低,抑制细胞色素酶的活性,进一步加重缺氧。Ferrer^[5]等报道缺氧可引起局部脑组织 Bax 表达增加,本文被动吸烟胎鼠脑组织 Bax mRNA 的相对表达量增加可能与慢性缺氧有关。

结论:本文幼鼠脑组织凋亡启动基因 Bax mRNA 相对表达量的增加提示细胞凋亡在宫内至断乳前持续被动吸烟幼鼠脑损害机制中可能起一定作用。

[参 考 文 献]

[1] Gospe SM, Zhou SS, Pinkerton KE. Effects of environmental tobacco smoke exposure in utero and/or postnatally on brain development [J]. Pediatric Res, 1996, 39(3): 494 - 498.

[2] Jin YH, Davidson LA, Lupton JR, et al. Rapid competitive PCR determination of relative gene expression in limiting tissue samples [J]. Clin Chem, 1996, 42(2): 227 - 223.

[3] Easton RM, Deckwerth TL, Parsanian AS, et al. Analysis of the mechanism of loss of trophic factor dependence associated with neuronal maturation: a phenotype indistinguishable from bax deletion [J]. J Neurosci, 1997, 17(24): 9656 - 9666.

[4] Furukawa K, Estus S, Fu W, et al. Neuroprotective action of cycloheximide involves induction of bcl - 2 and antioxidant pathways [J]. J Cell Bio, 1997, 136(3): 1137 - 1149.

[5] Ferrer I, Pozas E, Ballabriga J, et al. Bcl - 2, bax and bcl - X expression following hypoxia - ischemia in the infant rat brain [J]. Acta Neuropathol, 1997, 94(6): 583 - 589.

(本文编辑:曹励之 英文译文见本期 461 页)

· 消息 ·

国家级医学继续教育学习班通知

广州市儿童医院将于 2001 年 9 月举办《全国儿科临床实践新进展》学习班,届时将采用自编最新教材并请国内外专家授课,学习班结束将授予国家级继续医学教育学分 10 分,热忱欢迎各级医院儿科医务人员参加,有意参加者请与广州市儿童医院教科科联系。联系人:何苍生,地址:广州市人民中路 318 号,邮编:510120,联系电话:020 - 81886332 - 3304。