

2.3 Cecropin AD 基因序列分析

用 ABI 377A DNA 自动测序仪对克隆到 pCR™2.1 上的 cecropin AD 基因进行序列测定, 结果表明其碱基序列与设计序列完全一致. 以上工作表明, 我们已成功合成了 cecropin AD 基因. 目前, 我们正在对该基因在酵母中的表达进行研究, 结果将在以后进一步报道.

参 考 文 献

1 Jaynes J M , Catherine A , Burton C A *et al.* *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on plasmodium falciparum and trypanosoma cruzi. FASEB J, 1988, 2 (13): 2878~2883
2 黄自然, 郑庭辉, 屈贤铭等. 柞蚕抗菌肽的抑菌效应. 科学通报, 1986, 13 (2): 1107~ 1109
3 Fink J, Boman A, Boman H G *et al.* Design, synthesis and antibacterial activity of Cecropin-like model peptides. Int J Pept Prot Res. 1989. 33 (6): 412~ 421
4 阎隆飞, 张玉麟. 分子生物学. 北京: 北京农业大学出版社, 1993. 265~ 274
5 Sambrook J M , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 70~ 76

Synthesis of Cecropin AD Gene. ZHENG Qing, BAO Shi-xiang, YAO Ru-hua (*Department of Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China*); SU Zhi-hui (*Biohistory Research Hall, Japan*); HUANG Zi-ran (*Department of Sericulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China*); ZHENG Xue-qin, WANG Yu-guang (*National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China*).

Abstract A novel hybrid cecropin AD gene was synthesized. The synthetic cecropin AD gene is 140 by in length. It was cloned into the pCR™2.1 vector. It was confirmed that the DNA sequence of the synthetic cecropin AD gene was identical with that of the designed gene by DNA sequencing.

Key words cecropin, gene, synthesis

病毒感染致病与自由基的损伤

韩 娜 张卫东 徐贝力 王美岭 李晓冰 刘 斌

(山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

摘要 以流感病毒 A/FM1/1/47 (H₁N₁) 鼠适应株, 鼻腔内接种感染小鼠为模型, 探讨了病毒感染过程中, 自由基的产生以及在致病过程中的作用. 结果表明, 感染病毒的小鼠肺组织中氧自由基水平和黄嘌呤氧化酶活性显著升高, 并与肺组织损伤和死亡率之间呈正相关. 提示, 氧自由基参与了病毒感染小鼠的致病过程, 是造成组织损伤的重要因素.

关键词 流感病毒, 氧自由基, 小鼠

学科分类号 Q505

氧自由基和某些氧化剂在防御微生物的入侵中起了重要作用^[1]. 细菌、病毒或其他微生物侵入机体可诱导炎症反应, 急性和慢性反应的重要成分为吞噬细胞. 一旦吞噬的异物被辨认, 吞噬细胞即出现呼吸爆发, 表现为氧消耗增加, 磷酸戊糖途径代谢增高和氧自由基等

代谢物产生. 这些代谢物是一类高活性的杀菌物质, 它们还能逸出细胞外. 如果吞噬细胞过度积聚, 呼吸爆发的活性过强, 可引起组织损伤, 成为致病的因素. 目前认为病毒感染机体

收稿日期: 1997-03-03, 修回日期: 1997-07-23

造成相应的症状甚至宿主死亡，一是病毒毒力直接引起，二是引起机体过度免疫应答的结果。通过本项研究，初步探讨了氧自由基在病毒-宿主相互作用中的致病作用和机理。

1 材料和方法

1.1 材料

昆明种小鼠，18~ 22 g，雌雄各半。流感病毒 A/FM1/1/47 (H₁N₁) 鼠适应株。

1.2 方法

1.2.1 病毒感染：用鸡胚尿囊传代病毒，- 70℃保存备用。感染滴度 (LD₅₀) 10^{4.8}。正常小鼠轻度乙醚麻醉，每只鼠鼻腔内接种 LD₅₀为 10 病毒悬液 0.04 ml。

1.2.2 肺内病毒量的测定：分别于感染病毒后的第 2、4、6、8、10 天时处死小鼠 3 只，取肺称重，研磨制成 1: 10 悬液，以 10 倍递次稀释法稀释成不同稀释度的悬液，分别接种于 9~ 10 日龄鸡胚尿囊腔，每只鸡胚接种 0.2 ml，每个稀释度接种 3 只鸡胚，按常规血凝试验法测病毒滴度 (EID₅₀)，出现血凝++ 者判为阳性。

1.2.3 肺病理组织学检验：分别于感染病毒后的第 2、4、6、8、10、14 天时处死小鼠 3 只，取肺脏 10% 福尔马林固定，石蜡包埋，HE 染色，光镜下观察病理变化，用 Cinsbergand Horsfall 方法稍加修改计算肺实变度。

1.2.4 死亡率观察：取感染病毒的小鼠 20 只，连续观察 14 d，记录死亡只数及天数。

1.2.5 支气管肺泡灌洗方法：分别在感染病毒即刻和第 2、5、8 天时，处死小鼠 3 只，游离气管和肺脏，通过气管插管将 5 ml 生理盐水分数次缓缓注入灌洗肺组织，并收集回抽灌洗液，即刻用于分析测定。

1.2.6 氧自由基释放水平的测定：采用化学诱导发光法^[2]，使用 SHG-1 型生物化学发光测量仪 (上海计量局实验工厂制造)，测试温度 (20±3)℃，甄别电压 0.2 V。取支气管肺泡灌洗液 (细胞浓度 1×10⁷ 个/ml) 0.25 ml，测量其本底发光强度 (脉冲数/min) 后，加

1 mmol/L 鲁米诺 0.2 ml，混匀立即测定 1 min 的发光强度，每个样品连续测 10 次，取其平均发光强度减去本底发光强度表示氧自由基释放水平。

1.2.7 肺组织中黄嘌呤氧化酶的测定：分别于感染病毒即刻和第 3、6、9 天时处死小鼠 3 只，取肺组织称重剪碎后加等体积生理盐水，充分研磨，3 000 r/min 离心 10 min，取上清按吴晓生比色法^[3]测定。

1.2.8 支气管肺泡灌洗液中细胞分析：以支气管肺泡灌洗液涂片，并用 HE 染色，读取 100 个细胞作分类计数。

1.2.9 统计分析：每个指标的测定均进行 3 次，取其平均值，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 *t* 检验法进行显著性检验。

2 结 果

2.1 肺内病毒量、肺实变度、死亡率的变化

表 1 显示，感染病毒后其肺内病毒增殖高峰在第 4 天，而此时肺病理组织学观察仅见轻微炎性改变。随着肺病理组织学改变的加重，小鼠死亡率逐渐增加，至第 10 天时可见部分肺泡腔中充满水肿液，炎症改变几乎波及全肺，肺实变度达 100%，小鼠死亡率达 90%，而肺内病毒量却降至较低水平。肺内病毒量与病理组织学改变及死亡率呈负相关 (*r* = 0.91, *r* = - 0.953)。

表 1 肺内病毒滴度、肺实变度、死亡率的变化

<i>t</i> (感染病毒后)	病毒滴度	肺实变度	死亡	死亡率
/ d	lg EID ₅₀	/ %	只数	/ %
2	5.8	0		
4	7.8	10		
6	6.4	30	4	20
8	3.8	85	13	65
10	1.1	100	18	90

2.2 氧自由基水平、黄嘌呤氧化酶活性与肺实变度的变化

感染病毒后不同时间的测定结果显示，支

气管肺泡灌洗液中氧自由基水平和肺组织中黄嘌呤氧化酶的活性不断升高, 与感染即刻比较, 差异显著 ($P < 0.01$). 随着氧自由基水平和黄嘌呤氧化酶活性的不断升高, 肺病理组织学改变逐渐加重, 其之间呈正相关 ($r = 0.768$, $r = 0.947$) (表 2).

表 2 氧自由基水平、黄嘌呤氧化酶活性与肺实变的变化

t (感染病毒后) / d	氧自由基水平 脉冲数/min	黄嘌呤氧化酶 活性/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	肺实变度 / %
0	2177 $\pm$ 706	0.181 $\pm$ 0.013	0
2	17703 $\pm$ 2567		
3		0.261 $\pm$ 0.015	
4			10
5	40171 $\pm$ 9084		
6		0.339 $\pm$ 0.012	30
8	44495 $\pm$ 6953		85
9		0.449 $\pm$ 0.032	
10			100

注: $n = 9$, $\bar{x} \pm s$.

2.3 支气管肺泡灌洗液中细胞成分变化

感染病毒即刻的支气管肺泡灌洗液中, 巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞百分比分别为 75%、5%、20%, 以后巨噬细胞降低 (5 d 时 50%、8 d 时 40%), 淋巴细胞逐渐增加 (5 d 时 40%、8 d 时 50%), 即感染早期以巨噬细胞胞为主, 晚期淋巴细胞百分比较高.

3 讨 论

吞噬作用是白细胞, 如多形核白细胞, 单核细胞, 肺泡和腹膜巨噬细胞吞噬和杀灭入侵微生物的过程. 在这一过程中, 吞噬细胞通过“呼吸爆发”产生了多种氧自由基和氧代谢产物, 如超氧化物阴离子自由基、过氧化氢、羟自由基、单线态氧及次氯酸盐. 而产生的这些氧自由基和氧代谢产物是产生化学发光的来源, 因而化学发光可直接反映这些物质的产量. 本文通过支气管肺泡灌洗方法分析了肺浸

润细胞成分的变化, 并用化学发光法测定了其产生氧自由基的能力. 结果表明, 在小鼠感染病毒的早、中期, 灌洗液中巨噬细胞占较大比例, 同时氧自由基释放水平明显升高. 尽管巨噬细胞总数在感染后期逐渐降低, 但每 1×10^7 个肺泡吞噬细胞释放氧自由基的能力明显增强, 在感染病毒 8 d 时氧自由基水平是感染即刻的 20 倍. 在感染病毒后期淋巴细胞的逐渐增加与氧自由基的关系有待进一步探讨.

在正常的生理过程中, 黄嘌呤氧化酶的活性在许多组织是非常低的. 但在某些病理状态下, 如缺血-再灌注、成人呼吸窘迫综合症等, 黄嘌呤氧化酶活性明显增高. 而黄嘌呤氧化酶在催化底物次黄嘌呤代谢过程中, 与氧反应产生了过量的氧自由基. 本文研究结果显示, 在病毒感染的小鼠肺组织中, 黄嘌呤氧化酶活性明显升高, 与感染病毒即刻比较有显著差异.

呼吸爆发产生的氧自由基及其代谢产物, 是一类高活性的杀菌物质, 它们也可逸出细胞外. 因此, 吞噬细胞过量积聚, 呼吸爆发的活性过强, 可引起组织损伤, 即成为致病因素. 本文实验结果证实, 在流感病毒感染小鼠的过程中, 氧自由基水平及黄嘌呤氧化酶活性明显升高, 且随着氧自由基水平及黄嘌呤氧化酶活性的不断升高, 肺组织的损伤逐渐加重, 小鼠死亡增加, 它们之间呈正相关. 而小鼠肺内病毒增殖的测定结果表明, 病毒增殖高峰 (第 4 天) 与肺病理组织学改变和死亡率之间并未观察到直接的关系.

通过以上的研究结果提示, 本文提出氧自由基参与了流感病毒感染小鼠的致病过程, 可造成组织损伤. 这是从自由基生物学的角度提供了阐明流感病毒造成组织损伤机制的某些实验证据.

参 考 文 献

1 陈 瑗, 周 玫. 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991. 106~ 127

2 胡天喜, 陈 杞, 陈克明等. 发光分析与医学. 上海: 华东师范大学出版社, 1990. 89~ 103

3 吴晓生. 比色法测定黄嘌呤氧化酶. 生物化学与生物物理进展, 1986, (5): 65~ 67

Virus induced Pathogenesis and Free Radicals

Injury. HAN Na, ZHANG Weidong, XU Beili, WANG Meiling, LI Xiaobing, LIU Bin (*Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China*).

Abstract To prove up production and effect of free radicals on virus induced pathogenesis, the influenza A/FM 1/1/47 (H₁N₁) was adapted to mice by nostril inoculation. The results demonstrated that the oxygen free radical levels and

xanthine oxidase activity in the lung tissues from the mice after infection by virus raised remarkably. These were positively correlated with lung tissues injury and mice mortality. The results demonstrated that oxygen free radicals may involve in influenza induced pathogenesis in mice, and may be an important factor causing tissue injury.

Key words influenza, oxygen free radicals, mice

人神经营养因子 4 基因的分子克隆及序列分析

王爱坤 刘哲伟 包怡华

(首都儿科研究所, 北京市高技术实验室, 北京 100020)

摘要 以正常人血淋巴细胞染色体 DNA 为模板, PCR 扩增出神经营养因子 4 (NT4) 编码基因. 将所得基因片段重组于噬菌体载体 M13mp18RF, 筛选得到含人 NT4 基因的克隆. 采用 Sanger 单链末端终止法测出其全部的核苷酸序列, 该序列与国外文献所报道的完全一致.

关键词 神经营养因子 4, 基因克隆, 序列分析

学科分类号 Q75

神经营养因子 4 (neurotrophin-4, NT4) 是神经营养因子超家族成员之一. 成熟的 NT4 由 130 个氨基酸残基构成, 具有广泛的生理学作用, 尤其在促进神经元的生长、发育、分化与成熟, 维持神经元的存活及促进神经损伤后的修复与再生方面发挥着重要的作用, 因而在治疗多种神经性疾患方面有潜在的应用价值. 目前, 有关中国人 NT4 基因的克隆及序列方面的工作尚未见报道, 本实验成功克隆了中国人的 NT4 完整基因, 并进行了基因序列的测定, 为今后在真核细胞系统表达能分泌的成熟 NT4 打下基础.

1 材料和方法

1.1 载体与菌株

噬菌体载体 M13mp18RF, 大肠杆菌

DH5aF' 由加拿大英属哥伦比亚大学研究中心赠送.

1.2 工具酶、引物及实验试剂

限制性内切酶及连接酶为美国 BRL 公司产品. PCR 引物及 Taq plus II 聚合酶购自上海生工生物工程公司. 上游引物为: GAGTGAATTCGAGAGATGCTCCCTCTC, 5' 端含 EcoR I 酶切位点. 下游引物为: AGTCAAGCTTCCTGGGCATGGGTCTCAG, 于 5' 端含 Hind III 酶切位点. T7 测序试剂盒为 Promega 公司产品. [α -³²P] dATP 购自北京福瑞公司.

1.3 淋巴细胞染色体 DNA 的制备

取一正常中国人的全血 5 ml, 参照《分

收稿日期: 1997-03-12, 修回日期: 1997-07-17