

37: 755

High Level Expression of Chinese Human γ -Interferon cDNA in *E. coli*. Qu Chengkui, Wei Handong, Yu Yongtao, He Fuchu, Wu Zuze (*Institute of Beijing Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Chinese hIFN- γ cDNA deleted signal sequence was subcloned into downstream the P_{RPL} promoter of the expression plasmid pBV220 by using of DNA recombinant tech-

nique. This recombinant plasmid can express hIFN- γ stably with high efficiency (up to 44.4% of the total bacterial soluble protein) in *E. coli* DH5 α through thermal induction. The bioactivity assay showed that 0.45×10^7 U $\sim 2.34 \times 10^7$ U rhIFN- γ were expressed in every liter of bacteria culture after preliminary purification and refolding procedures.

Key words hIFN- γ , molecular evolution, high level expression

缺氧小鼠脑中神经节苷脂和单胺类神经递质水平

杨典洱 潘 颖 李爱华 黄如彬 熊 英

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

摘要 脑缺氧和缺氧后的再灌注常导致一系列复杂的生理生化改变. 通过小鼠重复缺氧后, 观察其脑组织中的神经节苷脂和单胺类递质水平变化情况, 发现重复缺氧时, 随着缺氧次数的增加, a. 神经节苷脂水平 (以唾液酸含量表示) 非常明显地持续下降 ($P < 0.01$), 其中 GM1 与 GD1b 相对组分百分比值下降尤为突出 (GM1: $P < 0.05$, GD1b: $P < 0.01$); b. 单胺类神经递质中 NE 和 DOPA 水平下降, DA 和 HIAA 水平升高 ($P < 0.01$). 结果提示脑组织经重复缺氧后, 中枢神经组织细胞膜受到一定程度的损伤, 其结果可能影响到单胺类神经递质的合成、释放、重摄取和贮存的全过程; 据此推测脑组织缺氧时神经节苷脂与单胺类神经递质水平改变时存在着相互联系.

关键词 重复缺氧, 神经节苷脂 (Gls), 单胺类神经递质

缺氧和缺氧耐受的研究一直是临床医学、运动医学和航天医学的主要课题, 急性脑缺氧导致脑组织中乳酸水平升高, 去甲肾上腺素降低和 cAMP 含量的升高均已报道^[1,2]. 然而, 重复缺氧后所致的膜上受体类物质的变化则报道不多, 神经节苷脂 (gangliosides, Gls) 和单胺类神经递质水平变化的报道更少, 至于在缺氧条件下他们之间的相互影响关系还未见报道.

Gls 是神经细胞膜的正常成分, 可作为某些神经递质、激素、病毒和干扰素等的受体成分^[3,4], 参与突触间的信息传递, 影响神经组织分化、再生和修复, 促进脑的发育. 目前 Gls 的生物学作用的研究已成为神经科学的重要课题. 本文拟就小鼠重复缺氧时, 脑组织中 Gls 及

单胺类神经递质水平的变化进行讨论, 并寻求其可能的内在关系.

1 材 料

18 g 左右昆明小鼠, 雌雄不限 (来自本院动物室), 单胺类递质标准品: 3, 4-二羟基苯乙酸 (DOPA), 去甲肾上腺素 (NE), 肾上腺素 (E), 多巴胺 (DA) 和 5-羟吲哚乙酸 (5-HIAA), 唾液酸 (NANA), 神经节苷脂 (Gls) (以上均为 Sigma 产品), 600E 高效液相色谱仪, 460 电化学检测器 (Waters 公司产品), TYG-C₁₈H₃₇ 色谱柱 (天津化学试剂二厂),

CS-9000 薄层扫描仪, UV-120-2 紫外可见分光光度计 (岛津公司产品)。

2 方 法

2.1 实验小鼠的制备

依照吕国蔚教授^[1]的方法制备实验性重复缺氧鼠模型。将小鼠随机分为 3 组: 空白对照组 (A), 缺氧一次实验组 (B), 连续重复缺氧四次实验组 (C) 和连续重复缺氧四次后再饲养 2 d 的实验对照组 (D)。制成模型的小鼠立即断头取脑。

2.2 单胺类递质含量的测定

选用 Warnhoff^[5]方法和高效液相电化学检测器。色谱条件: 流动相选用 0.1 mol/L 柠檬酸-乙酸钠缓冲液 (pH3.7), 流量: 1 ml/min, TYG-C₁₈H₃₇ 色谱柱, 电化学检测器工作电压 0.75 V, 灵敏度 50 mA。

2.3 神经节苷脂分析

按照 Ladish^[6]方法, 用氯仿: 甲醇 (1:1 体积比), 氯仿: 甲醇: 水 (5:5:1 体积比) 依次提取总脂, 经反复 Folch 分配保留水相

再经透析, 过 Sephadex G-50 柱, 冻干, 即得总 Gls; 按照 Ledeen^[7]方法, 将纯化样品进行 HPTLC 分析, 得 Gls 层析图谱 CS-9000, 扫描仪上进行定性定量鉴定。

3 结 果

3.1 小鼠耐缺氧时间 (表 1)

表 1 小鼠耐缺氧时间

	min			
缺氧次数	1	2	3	4
每次耐缺氧	12.83±	28.71±	46.56±	61.21±
时间	2.46	5.2	6.6	7.1

注: 每组实验动物数 $n=30$ 。

随着小鼠连续缺氧次数增加, 耐缺氧时间明显延长。各组间比较差异非常显著 ($P<0.01$)。这与有关文献报道一致^[1]。

3.2 小鼠脑组织中单胺类神经递质及代谢物测定 (表 2)

表 2 小鼠脑组织中单胺类神经递质及代谢物测定

	ng/g				
组别	DOPA	NE	E	DA	HIAA
A	84.33±4.76	32.84±3.86	103.04±8.58	100.0±10.5	143.8±18.5
B	80.68±6.96	32.22±4.33	101.99±8.60	111.3±13.5	139.9±15.4
C	73.02±7.46	18.54±2.44	102.79±12.8	134.2±12.2	171.4±13.0
D	84.09±4.92	32.15±3.79	102.66±8.54	99.9±6.9	143.7±10.0

注: $\bar{x} \pm s$ (以每 g 脑组织中单胺类的 ng 量表示)。每组实验动物数 (只): $n_A=30$, $n_B=28$, $n_C=29$, $n_D=31$ 。

从实验数据的统计结果发现: 实验组 (B、C) 和空白对照组 (A) 比较, 其中 DA、HIAA 含量显著上升 ($P<0.01$), NE、DOPA 明显下降 ($P<0.01$), 而 E 则无明显变化。另外比较 A 组和 D 组发现: 单胺类递质水平基本一致, 没有显著性差异 ($P>0.05$), 说明单胺类神经递质水平在一定条件下能可逆性地恢复。

3.3 神经节苷脂含量及成分的分析测定

3.3.1 Gls 的含量测定: Gls 的含量通常以每

g 湿重的脑组织中唾液酸的 μg 量来表示 (表 3)。

表 3 各组小鼠脑组织中的唾液酸含量

	$\mu\text{g/g}$			
组别	A	B	C	D
含量	289.582±	252.775±	227.058±	225.50±
	10.052	10.981	14.058	12.661

注: $\bar{x} \pm s$, 每组实验动物数 (只) 同表 2。

从 GlS 的含量实验数据的统计结果来看: 实验组 (B) 与 (C) 和实验对照组 (D) 存在显著性差异 ($P < 0.01$), 随着缺氧次数的递增, GlS 的水平持续下降, 提示重复缺氧导致膜的损伤; 而空白对照组 (A) 和实验对照组 (D) 也

有显著性差异 ($P < 0.01$), 说明重复缺氧对膜的影响难于在短时间内恢复.

3.3.2 神经节苷脂组分相对百分比测定 (表 4):

表 4 神经节苷脂组分相对百分比测定

组别	GM1	GD1a	GD1b	GT
A	8.844±2.359	38.656±3.040	29.222±2.497	21.700±1.522
B	7.130±1.370	39.950±1.39	26.650±1.515	25.650±1.894
C	7.088±1.164	39.925±1.765	25.213±2.396	26.100±2.040
D	7.46±1.037	39.889±2.083	26.911±3.768	24.400±2.704

注: $\bar{x} \pm s$, 实验动物数 (只) 同表 2.

从表 4 结果可以发现: GM1 和 GD1b 随重复缺氧次数的增加相对百分比值下降, 其中 GM1: B、C、D 三组与 A 组比较 $P < 0.05$; GD1b: B、C 与 A 组比较 $P < 0.05$, 也具有显著性差异, 而 C 与 A 比较 $P < 0.01$, 差异非常显著; GT 随重复缺氧次数的增加, 相对百分比值上升, B、C、D 三组与 A 组比较均有非常显著性差异 ($P < 0.01$).

4 结论与讨论

缺氧和缺氧后的再灌注是目前医学工作中经常遇到的问题, 常导致一系列复杂的生理生化改变^[8]. GlS 是细胞膜的正常组织成分, 特别是在神经细胞膜上分布广泛, 并且具有多种生物学功能^[8]; 在体液中 GlS 应呈负电性且有强的螯合金属离子 (如 Ca^{2+}) 的能力. 同时单胺类递质极性很强, 不易透过膜结构, 它们在体液中呈正电性. 神经细胞膜上的 GlS 吸引正电性的单胺类递质分子和 Ca^{2+} 等, 影响膜的通透性和可塑性, 从而对神经细胞的再生功能的恢复等方面发挥重要的调节作用. 本文的结果可以看出: 缺氧时脑内 GlS 的水平下降而 DA 和 HIAA 水平升高, 一方面可能是由于 GlS 水平的下降, 致使突触膜对 DA 和 5-HT 的重摄取量减少; HIAA 是 5-HT 的分解代谢物, 5-HT

被胞膜上的 GlS 静电吸引的量减少, 导致分解增加, 5-HT 在中枢神经系统内的贮存释放以及摄取的机理与 NE 相似, 所以 HIAA 水平升高. 另一方面因 GlS 对 Ca^{2+} 有很强的螯合能力, GlS 和 Ca^{2+} 螯合作用可影响 NE 的释放, 当 GlS 降低时 NE 释放量减少, 所以 NE 水平下降; NE 和 DA 是中枢神经系统的经典神经递质, 缺氧时 GlS 水平降低, 同时 DA 升高和 NE 下降, DA 反馈抑制酪氨酸羟化酶活性的作用, 可能导致了 NE 水平的进一步下降, 表明 GlS 和单胺类神经递质释放有一定的相关关系.

缺氧后, 再灌注可发生多种复杂的继发性变化, 大量的研究报告表明, 再灌注可导致产生大量的自由基, 攻击神经细胞膜, 损伤膜的结构和功能. 近年来大量文献报道短暂性脑缺血缺氧可造成海马迟发性神经元坏死 (delayed neuronal death; DND). 国内外学者提出了许多假说来解释 DND, 有学者用“血管理论”, 能量代谢障碍来解释 DND 发生机制, 但是更多学者从代谢方面来探讨 DND 发生机制, 认为花生四烯酸代谢产物、 γ -氨基丁酸、乳酸酸中毒、氧自由基及阿片肽类等物质与海马 DND 的发生有密切关系, Ca^{2+} 超载是神经元坏死的最后共同通路, 这与我们的实验结果一致. 连续重复缺氧后, 小鼠的耐缺氧时间延长, GlS 持

续地下降, 导致其对体液中 Ca^{2+} 螯合能力下降, 使因缺氧时 ATP 耗竭引起的 Ca^{2+} 积累加剧, 造成小鼠脑组织的损伤加重, 我们的实验对照组因 GIs 不能恢复, Ca^{2+} 仍处于较高水平, 所以小鼠脑组织因神经元坏死, 对外界刺激的反应明显迟钝, 实验过程中的小鼠反应也正好如此. 所以在某种程度上 GIs 水平的变化, 可以衡量缺氧后脑组织细胞损伤的程度.

在正常机体, 突触膜上浓集了 GM1、GD1a、GT1 等, Svennerholm 认为, 稳定的节苷脂- Ca^{2+} 聚合物有利于突触间的信息传递: 当冲动到达时, 突触前膜的节苷脂释放与其结合的 Ca^{2+} , Ca^{2+} 经专一的膜通道进入胞内, 进而触发一系列细胞活动, 导致递质释放. 而脑组织细胞缺氧时, GIs 中的组分 GM1、GD1a 的相对百分比下降而 GT 升高, 影响神经细胞突触间的信息联系. 因此, 对缺氧患者, 在考虑努力恢复氧的供给同时, 是否同时施以 GIs 进行治疗将有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 吕国蔚, 潘世巖主编. 病理生理学进展, 北京: 人民卫生出版社, 1963; 196
- 2 Petroni A, Bertazzo A, Sarti S. *J Neurochem*, 1989; **53** (3): 747
- 3 Morgam J, Seifert N. *J Supramol Struct*, 1979; **10**: 111
- 4 Koga T, Kojima H, Yamada S *et al.* *Brain Research*, 1990; **652** (2): 315
- 5 Warnhoff M. *J Chromatogr*, 1984; **307**: 271
- 6 Ladisch S, Wong C. *J Lipid Res*, 1983; **24** (5): 666
- 7 Ledeen R W, Yu R K *et al.* In: Ledeen R eds. *Methods in enzymology*, New York: Academic Press, 1982; **83**: 156
- 8 McCord J M. *J Med*, 1985; **312**: 159

The Analysis on the Level of Gangliosides and Monoamine Transmitters under Repetitive Hypoxia of Mice. Yang Dianer, Pan Ying, Li Aihua, Huang Rubin, Xiong Ying (*Department of Biochemistry, Capital University of Medical Science, Beijing 100054, China*).

Abstract Hypoxia and post-hypoxia reinfusion usually lead to a series of complicated physiological and biochemical changes. Through the model of mouse repetitive hypoxia, the content changes of gangliosides and monoamine neurotransmitters were observed in the brain and it was found that: with the increment of the anoxic times: ① Gangliosides (calculated as NANA) was continuously falling ($P < 0.01$), and the falling of relative percentages of GM1 and GD1b of which were magnificent (GM1: $P < 0.05$, GD1b: $P < 0.01$); ② Among monoamine neurotransmitters, the level of NE and DOPA descended and that of DA and HIAA increased ($P < 0.01$). The results point out: after repetitive hypoxia, the cell membrane in central nerve tissues is injured in some degree and thus may affect the whole process of synthesizing, releasing, reabsorbing and storing of monoamines. There is association relation between changes of gangliosides and monoamines when hypoxia occurs.

Key words repetitive hypoxia, gangliosides, monoamine neurotransmitters