

克山病患者红细胞膜唾液酸含量分析

张春明 夏德义 杨鸿昌

(哈尔滨医科大学克山病研究所, 哈尔滨)

克山病是一种原因不明的, 以心肌损害为主要特征的地方性心肌病。近年来, 围绕克山病因研究, 国内许多专家, 学者在生物化学方面进行了较全面的深入探讨, 并取得了显著成绩。但是由于克山病病因复杂, 到目前为止, 尚未找到一种能对克山病进行早期诊断的较理想的生化指标。因此, 探索一种能对克山病进行早期诊断, 特异性和敏感性较强的生化指标, 仍然是当前和今后克山病防治研究工作中的重要课题。本文对克山病患者红细胞膜唾液酸进行了分析, 并与非病区健康人群进行了对比。为克山病的诊断与鉴别诊断及综合防治提供理论和实验依据。唾液酸存在于大多数哺乳动物的细胞膜中(包括红细胞膜), 它是细胞膜上碳水化合物末端的残基, 是膜上负电荷的来源。细胞表面的许多生物学现象, 如细胞的分化, 恶性细胞的迁移, 细胞识别, 粘着和接触抑制等都与膜上唾液酸有关。因此, 细胞膜上唾液酸含量的减少或增加将引起细胞内一系列生物学改变。我们选择临床上确诊的克山病患者 20 例, 其中潜在型患者 13 例, 慢型患者 7 例。样品采自黑龙江省富裕县繁荣乡。非病区健康对照 16 例, 样品采自哈尔滨医科大学第二附属医院献血员。克山病患者及健康对照人群的性别及年龄

表 1 克山病患者与非病区健康对照人群的性别及年龄分布

分组	例数	性别		年龄分布(岁)			
		男	女	20—29	30—39	40—49	50—59
潜在型克山病组	13	2	11	5	3	5	
慢型克山病组	7	5	2	1	1	1	4
非病区健康对照组	16	6	10	3	12	1	

龄分布见表 1。红细胞膜的制备主要参照 Pearson^[1]和董伟^[2]等方法, 膜蛋白的测定采用改良

的 Lowry 法^[3], 红细胞膜唾液酸含量测定依据董伟^[4]和 Aminoff, D.^[5]等方法, 并略有改进。克山病患者, 健康对照人群的红细胞膜唾液酸含量及各组间比较见表 2。

表 2 克山病患者及非病区健康人红细胞膜唾液酸含量比较

分 组	例数	膜唾液酸含量 ($\bar{x} \pm SD$)	P 值
		$\mu\text{g}/\text{mg}$ 膜蛋白	
(1)非病区健康对照组	16	32.99 ± 1.57	(1):(2) < 0.05
(2)潜在型克山病组	13	31.89 ± 1.15	(2):(3) < 0.05
(3)慢型克山病组	7	30.68 ± 0.61	(1):(3) < 0.01

上述结果表明, 潜在型和慢型克山病患者的红细胞膜唾液酸含量均明显低于非病区健康人。此外, 潜在型克山病组与慢型克山病组比较也具有显著性差异, ($P < 0.05$)。说明患者红细胞膜的结构可能已发生异常, 只是潜克患者和慢克患者红细胞膜结构发生异常的程度而有所不同。克山病病区一般都处于低硒地带, 病区水土, 粮食中的硒含量明显低于非病区, 克山病病人的发硒, 血硒及含硒酶-谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)含量也明显低于健康对照人群。已证实含硒的谷胱甘肽过氧化物酶对生物膜具有保护作用, 硒对红细胞膜也有相应的稳定作用。由此可以推断, 克山病病人红细胞膜唾液酸含量的明显降低可能与克山病病区所处的低硒环境有一定的内在联系。有关红细胞膜唾液酸与其它疾病的关系也曾有报道^[4], 据文献报道, 心肌梗塞患者的红细胞膜唾液酸含量明显低于健康人; 而胃癌及食道癌患者的红细胞膜唾液酸含量则明显高于健康人。另外, 本文中所采用的红细胞膜唾液酸测定方法灵敏度较高, 用于检

(下转第 213 页)

胃癌 823 细胞 cDNA 文库的建立

祖志飞 韩复生

杨卫民 沈孝宙

(北京市肿瘤防治研究所生化室) (中国科学院动物研究所)

随着 DNA 重组技术的发展,某些与细胞癌变有关的基因的分离与克隆越来越受到人们的重视。要达到分离和纯化癌基因及其产物的目的,一个较为有效的方法就是构建 cDNA 文库。最近我们建立了胃癌 823 细胞(BGC-823)的 cDNA 文库,希望能从文库中分离到与胃癌变有关的基因,并令其表达产物,从而更深入研究胃癌发病机制和寻找治疗途径。

从接种 823 细胞到裸鼠身上 4 周后取肿瘤组织,经异硫氰酸胍/氯化铯超离心,oligo-dT 纤维素亲和层析柱纯化得到 mRNA^[1]。以 mRNA 为模板,利用 oligo-dT₁₂₋₁₈ 作为引物,在逆转录酶作用下合成第一条 cDNA 链^[2,3],效率为 25%,长度在 0.1—5kb 之间。第二条 cDNA 链是在 RNaseH, DNA 聚合酶 I 和大肠杆菌 DNA 连接酶作用下完成的^[4,5],合成效率近 100%。合成的双链 cDNA 用 EcoRI 甲基化酶将其内部的 EcoRI 位点保护之后,利用 T₄-DNA 聚合酶使其成为平端。该产物与 5'末端磷酸化的 EcoRI 人工接头连接后,再用 EcoRI 限制性内切酶消化。经 Sepharose 4B 柱除去小片段的 cDNA(<500bp) 和多余的接头,收集

500bp 以上带有接头的双链 cDNA,与 EcoRI 完全消化,并经碱性磷酸脂酶(CIP)处理的 λgt11 DNA 连接,然后用大肠杆菌 BHB2688 和 BHB2690 制备的包装蛋白进行包装(包装效率为 3×10^8 pfu/μg DNA)。用其感染大肠杆菌 Y1090,得到 7.1×10^5 个重组体。即此 cDNA 文库的构建效率为 7.1×10^5 重组体/μg DNA。

典型哺乳动物细胞含有 10000—30000 种不同的 mRNA,低丰度 mRNA 所需的克隆数一般在 $1-2 \times 10^5$,我们所获得的 cDNA 是完整的,这是首次构建该细胞系的 cDNA 文库。目前,此文库的筛选工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory New York, 1982, 128—131.
- [2] Gubler, U. et al.: *Gene*, 1983, **25**, 263.
- [3] Okayama, H. et al.: *Mol. Cell. Biol.*, 1982, **2**, 161.
- [4] 沈翔非等:《生物化学与生物物理进展》,1986,6, 62.
- [5] 刘良式等:《生物工程学报》,1987,3(2), 108.

[本文于 1989 年 2 月 28 日收到]

(上接第 214 页)

查唾液酸含量的最少的红细胞膜蛋白量为 0.2 毫克。为了深入探讨生物膜损伤与克山病病因之间的关系,为克山病的综合防治提供更多的理论和实验依据,今后尚需对亚急性克山病及病区正常人进行测定,还应结合病情在病区的易感人群中进行动态观察和综合分析。

参 考 文 献

- [1] Pearson, T. W.: *Life Sciences*, 1978, **22**, 127.
- [2] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》1983,3,31.
- [3] Mary, A. K. M.: *Anal. Biochem.*, 1978, **87**, 206.
- [4] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》1985,2,66.
- [5] Aminoff, D. et al: *Biochem. J.*, 1961, **81**, 384.

[本文于 1888 年 12 月 20 日收到]