

鼠肝 tRNA^{Ile} 序列相同), 与 *E. Coli* tRNA^{Ile} 仅

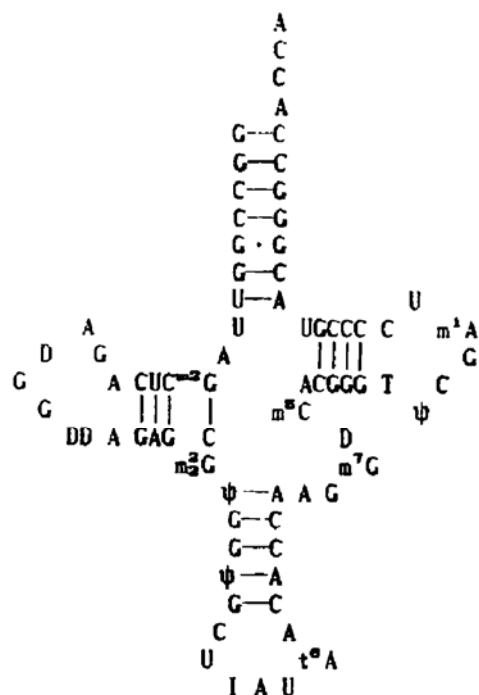


图1 牛肝 tRNA^{Ile} 的序列及二级结构

有 61.0% 同源性。哺乳动物 tRNA^{Ile} 含有较多

且集中的 G-C 对。氨基酸臂 G5 • G69 不配对为哺乳动物 tRNA^{Ile} 的显著特征。根据 tRNA 螺旋区和环区自由能的大小及 tRNA 分子二级结构(三叶草结构)的普遍模型^[8], 牛肝 tRNA^{Ile} 的序列及二级结构见图 1。

参 考 文 献

- 1 Igarashi K, Matsuzaki K, Takeda Y. Biochim Biophys Acta, 1972; **262** (4): 476
- 2 Zhao-hui Peng, Kusama-Eguchi K, Watanabe S *et al.* Arch Biochem Biophys, 1990; **279** (1): 138
- 3 Shinriki N, Ishizaki K, Ikehata A *et al.* Nucleic Acids Symp Ser, 1981; **10**: 211
- 4 Gupta R C, Randerath K. Nucleic Acids Res, 1979; **6** (11): 3443
- 5 Donis-Keller H, Maxam A M, Gilbert W. Nucleic Acids Res, 1977; **4** (8): 2527
- 6 Bruce A G, Uhlenbeck O C. Nucleic Acids Res, 1978; **5** (10): 3665
- 7 彭朝晖, Kusama-Eguchi K, Igarashi K. 第一军医大学学报, 1993; **13** (3): 208
- 8 Holley R W. Sci Am, 1966; **214** (2): 30

离体缺血再灌注鼠心肌钙离子的变化*

车成日 李香善** 金基焕 王明勇 李素香** 李 丹**

(延边医学院附属医院胸心外科, 延吉 133000)

摘要 用液体闪烁计数法测定离体再灌注鼠心肌肌质网(SR)和线粒体(Mit)内⁴⁵Ca²⁺放射性强度(cpm), 比较能量制剂 ATP-MgCl₂, 活性氧自由基清除剂 SOD 和钙阻滞剂 Verapamil 对离体缺血再灌注鼠心肌细胞 SR 和 Mit 钙离子浓度的影响。结果表明, SR 内 ATP-MgCl₂, SOD 和 Verapamil 组⁴⁵Ca²⁺的 cpm 均高于对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而 Mit 内均低于对照组 ($P < 0.01$)。此三种药均能提高离体大鼠心肌细胞内 SR ⁴⁵Ca²⁺ 和降低 Mit ⁴⁵Ca²⁺ 积聚, 从而保护了心肌细胞, 防止缺血再灌注损伤。

关键词 缺血-再灌注, 心肌肌质网, 线粒体, 钙离子

近年来的研究结果^[1]表明, 细胞内钙离子的积聚及氧自由基的产生是心肌缺血再灌注损伤的重要因素。肌质网(sarcoplasmic reticulum vesicle, SR)是心肌细胞储存和释放钙的重要部位, SR 摄钙可因其膜上 Ca²⁺-ATPase 受抑

制而减弱, 导致细胞内钙过荷, 且缺血再灌注的心肌细胞常伴有线粒体(mitochondria, Mit)

* 国家自然科学基金资助项目分题。

** 延边医学院心血管研究室。

收稿日期: 1993-01-28, 修回日期: 1993-04-08

钙过荷. 应用 ATP-MgCl₂、超氧化物歧化酶 (SOD) 和戊脉安 (Verapamil) 对心肌细胞 SR 和 Mit 同步进行研究钙离子流动关系的报道迄今尚未见报道.

钙离子在 SR 的跨膜转运对心肌的收缩和舒张功能有重要作用, 同时, 维持细胞钙平衡又与 SR 和 Mit 等的钙泵^[2]以及膜结构的完整性密切相关. 本实验采用离体大鼠心肌缺血再灌注损伤模型, 以 ⁴⁵Ca²⁺ 标记药物, 应用液体闪烁计数方法研究 ATP-MgCl₂ 等对缺血再灌注的大鼠心肌 SR 和 Mit 内钙离子的影响, 着重观察 SR 和 Mit 的钙离子流动的动态关系, 以便探讨缺血再灌注损伤的发生机理.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 选用健康 Wistar 种系大白鼠, 雌雄兼用, 体重 180—350g, 由延边医学院动物科提供.

1.1.2 药品 ATP-MgCl₂ 由延边医学院制药厂提供; SOD 由长沙生物化学制药厂提供; Verapamil 由天津市和平制药厂生产; ⁴⁵Ca²⁺ 由中国原子能科学研究院同位素研究所提供, 放射性比活度为 $1.295 \times 10^9 \text{ Bq/g}$ (3.5mCi/g), CaCl₂ 比浓度为 $1.369 \times 10^8 \text{ Bq/ml}$ (3.7mCi/ml), pH5—6.

1.1.3 实验设备 Langendorff 恒温恒压离体灌流器; 超速离心机 (日立-图们 85p); 液体闪烁计数仪 (2200 CA · TRI-CABB); 超级恒温器 (WC 109-05 型).

1.2 方法

将 48 只大白鼠随机分为 4 组, 每组所用灌注液的成分不同: I. Krebs-Henseleit (KH) 缓冲液 + ⁴⁵Ca²⁺ 为对照组; II. KH 缓冲液 + ATP-MgCl₂ + ⁴⁵Ca²⁺ 组; III. KH 缓冲液 + SOD + ⁴⁵Ca²⁺ 组; IV. KH 缓冲液 + Verapamil + ⁴⁵Ca²⁺ 组.

1.2.1 心肌细胞 SR 和 Mit 的制备 按文献 [3] 的方法, 再灌注结束后将心脏放在冰浴中, 取心室肌约 1g, 剪碎、匀浆、过滤、离心分离

SR 及 Mit, 具体过程如下: a. 用含 50mmol/L Tris-HCl 和 1mmol/L EDTA (pH7.4) 的缓冲液匀浆 (冰浴中) 1min; b. 2000×g 离心 15min; c. 取上清 15 000×g 离心 25min; d. 取沉淀, 加入 0.25mol/L 蔗糖缓冲液, 15 000×g 离心 15min, 所得沉淀为纯化的线粒体; e. 取 c 之上清, 100 000×g 离心 3h; f. 取沉淀, 用 0.25mol/L 蔗糖缓冲液制成混悬液, 铺在从上至下为 1.0, 1.1, 1.15, 1.32, 2.4mol/L 的蔗糖梯度液上, 200000×g 离心 6h, 取 1.15 和 1.32mol/L 两种梯度液之间的区带; g. 加入 1mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 混匀, 106 000×g 离心 40min, 所得沉淀即为纯化了肌质网.

1.2.2 心肌细胞 SR 和 Mit 的纯度鉴定 经透射电子显微镜检查 (transmission electronic microscope, TEM), 纯度很高, 几乎未见到其他细胞器, 图 1 为正常 SR 标本的电镜照片.

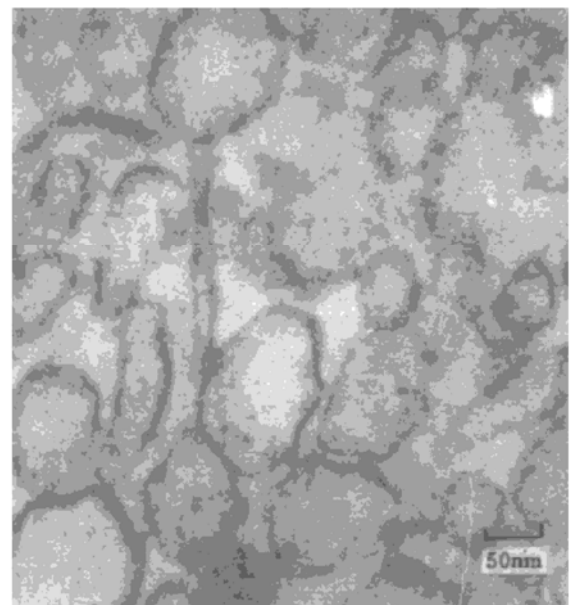


图 1 正常肌质网标本电镜照片

1.2.3 灌注液及闪烁液成分 KH 缓冲液成分 (mmol/L): NaCl 118, KCl 4.75, CaCl₂ 2.50, MgCl₂ 1.19, KH₂PO₄ 1.19, NaHCO₃ 24.8, glucose 5—8, Na-EDTA 0.50, pH7.4. 闪烁液 (1L 含): PPO 5g, POPOP 0.3g, 萘 80g, 甲醇 3 份, 甲苯 5 份, 二氧六环 5 份 (每份约

76.5ml).

1.2.4 给药剂量 上述 I 组, 0.1mmol/L ATP-MgCl₂; II 组, 15 000U/L SOD; III 组, 40mg/L Verapamil. ⁴⁵Ca²⁺ 均为 1.48×10⁴Bq/g.

1.2.5 实验过程 按文献 [3] 方法, 开胸取心, 放入备好的冷 KH 液里, 然后将心脏悬挂于 Langendorff 灌流装置上, 以持续平衡 (95% O₂ 和 5% CO₂) 的灌注液 (37℃), 进行主动脉灌注 (灌注压为 75.5 kPa) 约为 10min, 待心肌收缩稳定后, 分别停止灌流 6min 和 30min, 造成缺血缺氧, 然后用相应灌注液进行再灌注 (从 Langendorff 装置下方的三通管直接灌注给药), 之后立即进行样品制备.

1.2.6 将分离得到的 SR 和 Mit 制成混悬液, 取其一部分用 Lowry 法进行蛋白定量. 剩余部分用 84% 甲酸和 30% H₂O₂ 消化成均相液体, 取其 500μl 加入 10ml 闪烁液, 用液体闪烁计数器测定每个样品中 ⁴⁵Ca²⁺ 的放射强度 cpm·mg⁻¹·ml⁻¹. 数据的统计学处理用 *t* 检验.

2 结 果

2.1 在 SR 内, I, II, IV 组的 cpm 高于或显著高于对照组 (见表 1).

2.2 在 Mit 内, I, II, IV 组的 cpm 均低于对照组 (见表 2).

表 1 缺血 (氧) 鼠心肌再灌注肌质网内 ⁴⁵Ca²⁺ 的放射强度比较

缺血时间/min	n	⁴⁵ Ca ²⁺ 放射强度/cpm. mg ⁻¹ . min ⁻¹			
		I	II	III	IV
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
6	24	136.99 ± 31.26	532.00 ± 112.50 ¹⁾	660.36 ± 199.72 ¹⁾	760.67 ± 227.09 ¹⁾
30	24	192.07 ± 87.10	338.79 ± 155.43 ²⁾	444.63 ± 199.54 ²⁾	530.85 ± 263.57 ²⁾

注: ¹⁾ *p* < 0.01 ²⁾ *p* < 0.05 与相应时间 I 组比较.

表 2 缺血 (氧) 鼠心肌再灌注线粒体内 ⁴⁵Ca²⁺ 放射强度的比较

缺血时间/min	n	⁴⁵ Ca ²⁺ 放射强度/cpm. mg ⁻¹ . min ⁻¹			
		I	II	III	IV
		$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$
6	24	302.06 ± 57.65	126.33 ± 27.24 ¹⁾	81.67 ± 23.66 ¹⁾	148.67 ± 18.59 ¹⁾
30	24	380.67 ± 54.87	143.67 ± 15.67 ¹⁾	89.00 ± 25.57 ¹⁾	263.33 ± 55.4 ¹⁾

注: ¹⁾ *p* < 0.01 与相应时间 I 组比较.

3 讨 论

再灌注损伤^[1]的机理目前尚不甚清楚, 但倾向于钙过荷与氧自由基两大因素的作用. 深入研究再灌注损伤的机理, 设法避免或减轻再灌注损伤已成为心肌保护研究中的重要课题. 本研究旨在通过离体大鼠心脏模拟缺血和再灌注, 观察 ATP-MgCl₂ 等对缺血心脏再灌注后 SR 和 Mit 钙离子浓度的影响, 以进一步从分子水平探讨缺血再灌注损伤发生的机理.

正常 SR 摄钙需在其膜上 Ca²⁺-ATPase 的作用下逆浓度差进行. 齐鹰等人^[4]认为再灌注时心肌 SR 发生功能障碍, Ca²⁺-ATPase 受到抑制, 钙摄取能力减弱, 是胞质内钙超载的原因之一. 有报道^[6]认为氧自由基可使 Ca²⁺-ATPase 失活, 从而 SR 摄钙能力明显下降, 故活性氧自由基是再灌注损伤的促进因素.

Mit 是细胞生物氧化的主要场所, 也能释放、聚集钙. 再灌注后大量钙从细胞外流入, 镁则释放到细胞外, 平衡趋向于聚钙, 损伤 Mit,

使 ATP 缺乏加重, 可导致细胞不可逆损伤^[1]. Mit 对氧自由基的毒性作用十分敏感, 将离体心脏悬挂于能产生氧自由基的溶液中, 发现 Mit 严重肿胀甚至崩解^[6].

ATP-MgCl₂ 可进入缺血心肌细胞内^[7], 有抗脂质过氧化效应^[8], 可直接供应能量, 清除活性氧自由基, 从而使 SR 膜 Ca²⁺-ATPase 活性增高, SR 摄钙增加, Mit 阻滞钙内流. SOD 是活性氧自由基清除剂, 可使 SR 膜 Ca²⁺-ATPase 活性增高, 抑制胞内钙浓度的增加. Verapamil 对钙通道的阻断作用, 有效地降低缺血再灌注心肌细胞内因钙过负荷触发的氧自由基的产生, 起到对心肌的保护作用^[6]. 本实验证明, ATP-MgCl₂, SOD 和 Verapamil 可增加离体缺血再灌注鼠心肌细胞内钙的积聚, 抑制 Mit 内钙的沉积, 从而推测 SR 在某种程度上

可减轻钙对 Mit 的毒性作用, 进一步说明此三种药保护 Mit 电子传递系统和维持高能磷酸盐化合物的水平, 可减轻心肌缺血和再灌注的损伤, 对心肌起到保护作用.

参 考 文 献

- 1 Klunger R A, Przyklenk K, Whittaker P. Circ, 1989; **80** (5): 1115
- 2 Fiskum G. Fed Proc, 1980; **39**: 2432
- 3 中国医学科学院心血管病研究所. 生物化学与生物物理进展, 1977; (3): 17
- 4 齐 鹰. 生理学报, 1992; **44** (4): 379
- 5 Stewart J R. J Thorac Cardiovasc Surg, 1983; **86**(2): 262
- 6 Burton K P. Am J Physiol, 1984; **246** (6): 776
- 7 金基焕. 中华医学杂志, 1990; **70** (1): 38
- 8 金基焕. 生物化学与生物物理进展, 1990; **17** (6): 476—477

二氮杂芴酮席夫碱两亲分子双层膜的特性*

邵子厚 钱向平 邹 娟 张根成

(南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210008)

摘要 合成了一类新型的成膜物质——二氮杂芴酮席夫碱两亲分子, 它可自组装为双层膜, 并具有良好的稳定性和振荡特性, 当膜两侧的溶液为 0.01mol/L AgNO₃ 时, 电流可达 4.0μA, 可望在分子电子器件的研究中得到应用.

关键词 二氮杂芴酮, 席夫碱, 两亲分子, 双分子膜

长期以来, 双层脂膜被广泛地用作为生物膜的模型, 并以各种天然及合成的化合物加以修饰, 在膜的离子运送、电子传递、分子识别、能量转换等方面提供了大量的有用信息^[1,2]. 近年来, 随着生物分子电子器件研究的开展, 世界各国的科学家们对于双层脂膜 (bilayer membrane, BLM) 在这方面的潜在应用颇感兴趣^[3-5], 但因其稳定性甚差, 给研究工作带来诸多不便, 因而, 设计并合成具有良好稳定性的两亲分子成膜物质就成为一个十分迫切的问题.

1 材料和方法

1.1 二氮杂芴酮席夫碱两亲分子的合成及表征

请详见文献 [6].

1.2 双层膜的形成

成膜方法如前所述^[7]. 二氮杂芴酮与十四烷基胺形成的席夫碱两亲分子

*国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1993-01-21, 修回日期: 1993-03-05

leaf structure of tRNA^{leu} was showed according to the Holley mode as well as the amount of free energy in the each of stems versus loops.

Key words bovine liver tRNA, nucleotide sequence, cloverleaf structure

The Change of Ca²⁺ in SR and Mit of Isolated Ischemia-Reperfusion Rat Heart. Che Chengri, Li Xiangshan, Jin Jihuan, Wang Mingyong, Li Suxiang, Li Dan. (*Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital, Yian Bian Medical College, Yanji 133000*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 73

The strength of radiation of ⁴⁵Ca²⁺ in sarcoplasmic reticulum vesicle (SR) and mitochondria (Mit) was measured by liquid scintillation counting method. Comparing the effects of ATP - MgCl₂, SOD and verapamil on the ⁴⁵Ca²⁺ concentration in SR and Mit which prepared from isolated ischemia reperfused rat hearts. The result showed that the ⁴⁵Ca²⁺ cpm of SR of the three groups were higher than that of control, while the ⁴⁵Ca²⁺ cpm of Mit of the three groups were lower than that of control. These results suggested that the three kinds of reagent could protect reperfusion injury of heart cell through enhance ⁴⁵Ca²⁺ storage in SR and inhibiting the ⁴⁵Ca²⁺ accumulation in Mit.

Key words ischemia-reperfusion, sarcoplasmic reticulum vesicle, mitochondria, calcium

Novel Properties of Bilayer Membrane Formed by Diazafluorenone Schiff Base Amphiphiles. Tai Zihou, Qian Xiangping, Zou Juan, Zhang Gencheng. (*State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210008*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 76

A new kind of diazafluorenone Schiff base amphiphiles were synthesized. Bilayer membrane formed with these compounds possess good stability and oscillation properties. When 0.1 mol/L AgNO₃ presented in bathing solution and an electrical field was applied on this system, a maximum value of the current, 4.0 μA, was obtained. A possible application in the development is indicated.

Key words diazafluorenone, Schiff base, amphiphile, bimolecular membrane

The Purification and Characterization of Bacteriophage T7 Lysozyme of Recombinant Strains. Hua Ling, Li Dianjun, Xu Yongrui, Niu Zeling, Cui Daoshan. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 79

The culture solution of recombinant strains of lysozyme was treated by ultrasonic wave, purified by DE52 chromatography and CM52 chromatography, a polyacrylamide gel electrophoresis pure T7 lysozyme of Mr 17000 was obtained, the optimal react pH is 8.0, 21% of total enzyme activity lost at 37°C in 5 min.

Key words T7 lysozyme, purification, characterization

Measurement of Creatine Kinase MM Isoforms by Chromatofocusing. Kong Qingyin, Yang Zhenhua, Yang Shude, Tang Zhiyi. (*Dept. of Laboratory Medicine, Beijing Hospital, Beijing 100730*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (1): 83

A rapid and sensitive method of isoforms of CK (EC 2.7.3.2) -MM in human serum by chromatofocusing was reported. The assay system involved Mono P (HR5/20) column, fast protein liquid chromatography (FPLC)