

现象,上述问题均有待进一步深入研究。

应用裸鼠人体肝癌移植模型,国内外曾进行不少研究,主要涉及肝癌病理形态、酶学、生化及生长动力学等方面的内容。本文结果提示,裸鼠人原发性肝癌移植模型,也可作为肝癌分子生物学研究的一个可行的模型。

本实验过程曾受到上海市肿瘤研究所国家癌基因中心实验室及上海第二医科大学生生化教研室的帮助,特此致谢。

参 考 文 献

1 Gu. Jian-ren *Carcinogenesis*, 1988; 9(5):697

- 2 顾健人等. 肿瘤, 1988; 8(6): 289
- 3 Chomczynski P *et al. Anal Biochem*, 1987; 162:156
- 4 Maniatis T *et al. Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: Chapt. 1, p. 38
- 5 Maniatis T *et al. Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: Chapt. 10, p. 13
- 6 顾健人等. 中国科学 B 辑, 1985; (5): 452
- 7 胡利富等. 中国科学 B 辑, 1985; (5): 458

氢磷酸法手工合成寡聚硫代磷酸脱氧核苷*

宗建超 倪爱国 刘福森 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

关键词 DNA 化学合成, 寡聚硫代磷酸脱氧核苷, 修饰 DNA

虽然寡聚核苷酸化学合成自动化发展迅速,但在某些场合,如一种新方法的初步试验,人们还是偏爱手工操作方法。以注射器^[1]、磨砂玻璃漏斗^[2]和柱^[3]为反应器的手工操作已有不少文献报道,这里我们想介绍一种新颖的以特氟隆(Teflon)柱为反应器的手工操作方法。特氟隆柱制作容易,结构类似于 ABI 或 Biosearch DNA 合成仪的反应柱,柱盖与柱腔之间隔以经过处理的滤纸^[4],这样一方面可防载体漏失,另一方面稍许加压,溶剂和试剂就能自由通过。

作者试验室采用下列合成方案,用衍生的控制孔径玻璃珠(CPG)载体和 3'-氢磷酸脱氧核苷单体^[5],合成了 6 个链长为 14 个碱基的寡聚脱氧核苷酸的硫代磷酸型类似物(合成的类似物均表现出强烈的反义抑制病毒的细胞致病作用,详情另文发表)。根据二甲氧基三苯甲基(DMT)测试,平均每步缩合产率不低于 96%,合成方案见表 1。

操作: 给反应柱装填适量的 CPG 载体,加盖后,在柱一端接一支活塞全部插入的空注射器(1 ml)为宜,如 Atkinson^[6]等介绍的那样制备缩合反应混合物,然后将缩合反应混合物快速吸入专用的注射器(一种碱基一个),脱去针头,将该注射器接到反应柱的另一端,缓慢地把反应物推过反应柱到另一端的空注射器,30s 后,再把反应物推回,如此来回推几次进行缩合。对于分次缩合来说,缩合分两、三次进行,每次使

表 1 硫代磷酸型 DNA 片段手工合成方案¹⁾

步骤	操 作
1. 脱 DMT	3%(二氯乙酸)DCA/CH ₂ Cl ₂ 通 20s, 等 10s; 重复 5 次
2. 洗涤	CH ₂ Cl ₂ 通 40s
3. 洗涤	CH ₃ CN/吡啶 (1:1) 通 20s, 等 10s, 重复 3 次
4. 干燥	通氮气 1min
5. 缩合	10—13 倍当量单体(0.133mol/L) ^[6] 和 40—52 倍当量三甲基乙酰氯(1.6mol/L), 反应 3min
6. 封闭	30 倍当量异丙醇亚磷酸酯(0.2mol/L) ^[7,8] 和 60 倍当量三甲基乙酰氯(1.6mol/L), 反应 1 min
7. 洗涤	CH ₃ CN/吡啶 (1:1) 通 20s, 等 10s; 重复 2 次
8. 洗涤	CH ₂ Cl ₂ 通 20s, 等 10s; 重复 5 次, 然后开始下一轮循环,直到合成结束
9. 硫化	与 0.2 mol/L 硫的 CS ₂ /吡啶/三乙胺 (12:12:1) 溶液室温反应 2h

1) 单体、三甲基乙酰氯、异丙醇亚磷酸酯均为 CH₃CN/吡啶 (1:1) 溶液; 合成规模: 3—4 μmol; 溶剂或试剂流速: 4ml/min

用 5—7 倍的过量单体(相对于载体上脱氧核苷的 5'-羟基而言)。封闭步骤操作类似。其它试剂以“流动→停→流动”的方式,通过氮气压送。在单体消耗相同的

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-01-07 修回日期: 1991-02-11

条件下, 比较上述两种缩合方式, 后者提高缩合产率 2—4%。

参 考 文 献

- 1 Letsinger R L, Tanaka T. *Nucleic Acids Res.*, 1982; 10: 3249
- 2 McBride L J, Kierzek R, Beaucage S L et al. *J Amer Chem Soc.*, 1986; 108: 2040
- 3 Adamiak R W, Cramer F. *Nucleosides Nucleotides*, 1987;

- 6: 6445
- 4 Frank et al. *Nucleic Acids Res.*, 1983; 11: 4365
- 5 Marugg J E, Tromp M, Kuyl-Yeheskiely E et al. *Tetrahedron Lett.*, 1986; 27: 2661
- 6 Takaku et al. *Chem Lett.*, 1988; 202(10): 1675
- 7 Andrus A, Efcavitch J W, McBride L J et al. *Tetrahedron Lett.*, 1988; 29: 861
- 8 Hammond P R. *J Chem Soc.*, 1962; 2521
- 9 Gait M J. *Oligonucleotide synthesis: a practical approach*, oxford: IRL, 1984: 35—81

慢型克山病心功能代偿期超氧化物歧化酶活性的初步探讨

李日明 尚志宏 郭 阳 李 立

(辽宁省地方病防治所, 沈阳 110005) (辽宁省基础医学研究所)

关键词 克山病, 超氧化物歧化酶

超氧化物歧化酶(SOD)是体内超氧化物阴离子自由基($\cdot O_2^-$)的清除剂。近年来, 国内外研究发现, 它在炎症、肿瘤、老年病等疾病的发生发展中都起着重要作用^[1,2]。亚急性型克山病和慢型克山病(慢克)急性发作住院的患者红细胞 SOD 活性降低已有报告^[3], 现将慢克心功能代偿期患者的 SOD 活性报告如下。

1 材料与方法

辽宁省清原县克山病患区, 随访 10 年以上的慢克患者 8 例, 男女各 4 例, 41—55 岁(平均 45.3 岁), 心脏功能代偿期, 都有心力衰竭住院治疗病史。正常对照 8 名, 男女各 4 名, 40—52 岁(平均 44.5 岁)。

空腹采静脉血 5ml, 肝素抗凝, 3000r/min 离心 10min, 分离血浆, 除去白血球和血小板, 红细胞用生理盐水冲洗 3 次, 每次洗后均离心 3000r/min, 10min。红细胞中 SOD 活性用邻苯三酚自氧化法, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性用 Hefeman 法^[4], 血浆中丙二醛(MDA)含量用 Ohkawa 法测定^[5]。

2 结果与讨论

在研究人体内 SOD 活性时, 应充分考虑各种因素的干扰, 不同年龄组红细胞 SOD 活性存在规律性变化^[6]; 不同的心脏功能状态, 即机体组织细胞在不同氧浓度下也影响 SOD 的活性^[7], 本文选择的观测对象注意避免这两方面的影响。

表 1 中的结果表明, 慢克组 SOD 活性比对照组明显升高($P < 0.01$)。这种现象的原因可能存在着二个机理。一个机理是由于 $\cdot O_2^-$ 是氧进行单电子还原时首先生成的产物, 它可以再生成脂质过氧化物(ROOH)等其它活性氧^[8]。慢克患者 ROOH 的增加表现 MDA

明显增加($P < 0.05$)。它说明体内 $\cdot O_2^-$ 增加, 能引起 ROOH 的增加, 而 $\cdot O_2^-$ 的增加又可诱导 SOD 的生物合成量的显著增加^[9], 表现为 SOD 活性增高。当然, 慢克 GSH-Px 活性明显降低($P < 0.01$), 阻断脂质过氧化链式反应能力下降, 也是 MDA 增加的原因。

表 1 慢型克山病与正常人血中 SOD、GSH-Px 和 MDA 含量 ($\bar{X} \pm SD$)

组别	例数	红 细 胞		血 浆	
		SOD U/ml	GSH-Px U/ml	GSH-Px U/ml	MDA $\mu\text{mol/L}$
慢克	8	584 $\pm$ 132	45.60 $\pm$ 19.66	107.32 $\pm$ 26.65	3.01 $\pm$ 0.25
正常	8	395 $\pm$ 85	97.46 $\pm$ 10.76	215.30 $\pm$ 5.64	2.67 $\pm$ 0.21
P		<0.01	<0.001	<0.001	<0.05

SOD 活性升高的另一个机理, 是慢克患者心脏功能在代偿状态下, 血液中氧浓度正常, 组织细胞的氧供应充足, 机体能够较好地进入氧应激态 (oxidative stress)^[10], 对体内 $\cdot O_2^-$ 有较强的应激反应, 也表现为 SOD 活性升高。只有上述两种机理同时存在, 慢克 SOD 活性才表现明显升高。这种慢克心功能代偿期 SOD 活性升高的现象, 在刘松岩等的克山病动物模型试验过程中多次出现过^[11]。需要指出, 慢克心脏功能代偿状态下, 抗氧化酶活性的特点——SOD 活性升高, GSH-Px 活性降低, 在克山病自由基代谢紊乱或者克山病的发病机制上, 可能具有一定的意义。

如果慢克患者心功能丧失代偿, 即发展为心力衰竭时, 组织细胞严重缺血缺氧, 克山病原有的细胞膜缺