

Ganglioside GM₃ Inhibits Phosphatidylinositol Turnover of Human Leukemia J6-2 Cell Line.

Ma Keli, Liu Yan, Cui Zhaochun (*Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116023, China*).

Abstract The effect of ganglioside GM₃ on the metabolism of phosphoinositides of human monocytoid leukemia J6-2 cells has been studied using the incorporation of [³²P] Pi and [³H] inositol into them. The results show that GM₃ inhibited the incorporation of [³²P] Pi and [³H] inositol into phosphatidylinositol

(PI), stimulated the incorporation of those into phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂) and [³²P] Pi into phosphatidylcholine (PC), inhibited the incorporation of [³H] inositol into inositol phosphates (IP₃, IP₂, IP), and of [³²P] Pi into phosphatidic acid (PA) in a dose-dependent manner. These results suggest that GM₃ inhibits the PI turnover of J6-2 cells.

Key words ganglioside GM₃, leukemia, phosphoinositides, inositol phosphates

急性重复性缺氧小鼠脑神经节苷脂含量的研究

黄如彬 杨典洱 李爱华 潘颖 金有豫

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

贺建宇

(上海医科大学生物化学教研室, 上海 200032)

摘要 以昆明鼠为实验对象, 用 CS-9000 薄层扫描仪测定急性重复性缺氧小鼠脑组织中神经节苷脂 GM1、GD1a、GD1b 和 GT 的各个组分相对百分比及唾液酸的含量。结果发现: 与未经缺氧处理的空白对照组 (A) 比较, 缺氧一次的实验对照组 (B) 及急性重复缺氧 4 次后饲养 2d (天) 实验对照组 (D) 等 3 组小鼠比急性重复缺氧 4 次实验组 (C) 小鼠脑组织中的唾液酸含量显著下降, 神经节苷脂 GM1 与 GD1b 相对百分比明显降低; 神经节苷脂 GT 相对组分百分比明显上升, 神经节苷脂 GD1a, 还没发现有统计学差异。结果提示脑组织中神经节苷脂可能参与急性重复缺氧小鼠的耐缺氧能力的形成, 而且是一个短时间内不能恢复的过程。

关键词 重复缺氧, 神经节苷脂, 小鼠, 薄层扫描

神经节苷脂是一类含唾液酸的鞘糖脂, 特别集中于突触部位, 是与膜活性极有关的物质。有文献报导^[1-4], 缺血或缺氧条件下, 均会导致神经节苷脂总量的降低及组分比例的明显变化, 尤其 GM1、GD3 的降低比较明显; 这提示神经节苷脂在缺血/缺氧性损伤的病理生理过程中有作用。但是, 在急性重复性缺氧条件下, 对神经节苷脂的影响至今尚未见报道。本文选择了急性重复性脑缺氧小鼠为动物模型, 研究急性重复性缺氧情况下, a. 小鼠脑组织中神经节苷脂含量和单个组分的相对百分比的变化,

b. 缺氧次数与神经节苷脂含量和组分的关系, 通过本实验以期了解急性重复性缺氧对动物的神经节苷脂的影响规律, 并为进一步全面阐明急性重复性缺氧所致的耐缺氧机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

随机挑取体重为 18g 左右的昆明小鼠, 雌雄不限。

1.2 主要试剂及仪器

唾液酸 (NANA), 神经节苷脂 GD1b、GD1a、GM1, 混合神经节苷脂, 间苯二酚, 以上试剂均为 Sigma 公司产品. 正丁醇 (A. R. 北京化工厂); 二异丙醚 (C. R. 上海试剂一厂); 氯仿 (A. R. 上海试剂一厂); Sephadex G-50 (上海长征制药厂); 层析硅胶 (Kiesel gel G-60 Merck 公司); 正戊醇 (Fluka 产品上海进口分装); 真空冷冻干燥机 (Labaco 公司, 美国); CS-9000 薄层扫描仪 (岛津公司, 日本); UV-120-02 紫外分光光度计 (岛津公司, 日本).

1.3 主要试剂

超纯水: 新鲜的双蒸馏水, 经 Milli-Q plus 超纯水处理器处理.

间苯二酚显色液: 取浓盐酸 80ml 依次加入: 0.1mol/L 硫酸铜 0.25ml, 间苯二酚储备液 (2% 水溶液) 10ml, 混匀而后用水定容至 100ml; 再混匀室温放置 4h, 而后低温 4℃ 避光保存备用.

唾液酸标准液: 精密称量取唾液酸 1.0mg, 置于 50ml 容量瓶定容, 相当于 20mg/L.

1.4 动物模型的制备

将体重 18g 左右的小鼠随机分为 4 组, 按吕国蔚教授^[5]的急性重复性缺氧模型制作. 未经缺氧处理的为空白对照组 (A), 缺氧一次的为实验对照组 (B), 急性重复缺氧 4 次后饲养 2d (天) 为实验对照组 (D), 急性重复缺氧 4 次者为实验组 (C).

1.5 神经节苷脂分析

1.5.1 总脂 (TLE) 的提取 各组小鼠断头处死, 取全脑称重, 制成匀浆. 第一次共加 10 倍量的 $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$ (1 : 1, V/V) 溶液匀浆, 冰浴中匀浆 30min, 4℃ 提取 12h, 3000r/min 低温离心 10min 分层, 取上清液; 沉淀加 $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (5 : 5 : 1, V/V) 溶液 4℃ 再提取 2 次, 合并提取液; 在低于 40℃ 水浴中, 旋转减压蒸发至总提取液的 1/4 体积, 而后用 N_2 吹干, 得棕黄色粘稠物.

1.5.2 神经节苷脂 (Gls) 的分离纯化

a. 异丙醚/正丁醇/ NaCl (50mmol/L) 水溶

液分配^[6]: 将上述提取所得的总脂用异丙醚/正丁醇溶液 (6 : 4, V/V) 溶液 10.0ml 充分混匀至沉淀完全分散, 再加 5.0ml 50mmol/L 的 NaCl 溶液, 使异丙醚/正丁醇/ NaCl (50mmol/L) 水溶液为 6 : 4 : 5 (V/V), 振摇数分钟成悬浊液, 静置, 1000r/min 离心 10min 分层, 弃有机相; 再加异丙醚/正丁醇溶液 (6 : 4, V/V) 至原体积, 超声混匀, 离心, 弃有机相, 上述过程重复两次. 透析低温真空冷冻干燥, 得白色蓬松粉末.

b. 过 Sephadex G-50 柱除去小分子物质以双蒸水为流动相, 紫外分光光度计监测, 接收 206nm 处的第一个峰的洗脱液, 冷冻干燥.

1.5.3 神经节苷脂的分析鉴定 在 105℃ 活化的层析薄板底边 2cm 处作上标记点样, 样品间距 1.5cm, 展开, 展开剂 $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : 0.2\% \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 : 40 : 9, V/V), 温度 16—18℃. 间苯二酚喷雾显色, 显紫色斑点. CS-9000 扫描仪上进行定性定量扫描. 扫描操作条件如下: 扫描波长 $\lambda = 580\text{nm}$, 输出形式: 面积.

1.6 唾液酸含量的测定

按 Svennerholm 法^[7]测定; 取标准液作标准曲线.

2 实验结果

2.1 神经节苷脂各组分的薄层扫描 (图 1)

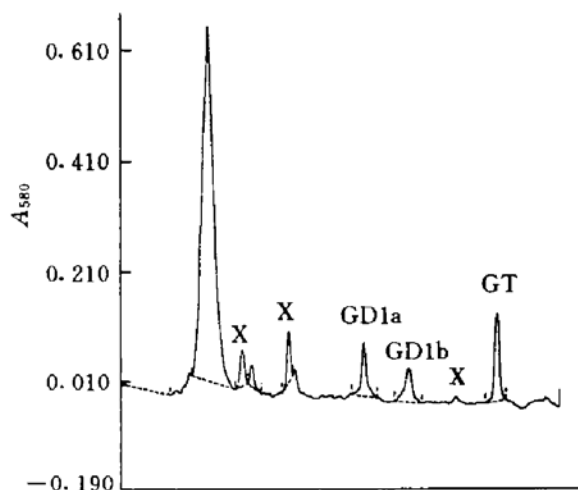


图 1 神经节苷脂各组分的薄层扫描图

2.2 唾液酸的标准工作曲线及相关系数

本实验所取的范围为 10—30 μ g

$$Y = -0.008 + 54.399X \quad r = 0.995$$

X 为吸光值, Y 为含量值, r 为相关系数.

2.3 神经节苷脂的组分分析

各组神经节苷脂组分的相对百分比值, 其中组分 GM1 和 GD1b 随缺氧的次数的增加, 其相对百分比下降是明显的, 而与实验对照 D

组比较则无显著性差异; GD1a 的相对百分比基本没有变化; GT 的相对百分比是升高的, 而且各组间存在显著性差异 (见表 1).

2.4 唾液酸含量测定值

各组实验动物间的唾液酸含量呈明显的下降趋势, 其组间的差异都有统计学上的意义, C 组与实验对照 D 组间虽然也有下降的趋势, 但是还没有发现有显著性差异. 见表 2.

表 1 小鼠脑组织中神经节苷脂组分的相对百分比值

组别 ¹⁾	GM1	GD1a	GD1b	GT
A	8.844 $\pm$ 2.359	38.656 $\pm$ 3.040	29.222 $\pm$ 2.497	21.700 $\pm$ 1.522
B	7.130 $\pm$ 1.370 ²⁾	39.950 $\pm$ 1.339	26.650 $\pm$ 1.515 ²⁾	25.060 $\pm$ 1.894 ³⁾
C	7.088 $\pm$ 1.164 ²⁾	39.925 $\pm$ 1.765	25.213 $\pm$ 2.396 ³⁾	26.100 $\pm$ 2.040 ³⁾
D	7.456 $\pm$ 1.037 ²⁾	39.889 $\pm$ 2.803	26.911 $\pm$ 3.768 ²⁾	24.400 $\pm$ 2.704 ³⁾

¹⁾实验动物数 (n): A=30, B=31, C=29, D=30.

²⁾和空白对照组 A 比较有显著性差异 ($P < 0.05$).

³⁾和空白对照组 A 比较差异非常显著 ($P < 0.01$).

表 2 小鼠脑组织中唾液酸含量¹⁾

组别	A	B	C	D
n	30	30	30	31
含量 ($\bar{x} \pm s$)	289.582 $\pm$ 10.052	252.775 $\pm$ 10.981 ¹⁾	227.058 $\pm$ 14.058 ¹⁾²⁾	225.500 $\pm$ 12.661 ¹⁾²⁾

¹⁾与空白对照组 A 比较差异非常显著 ($P < 0.01$).

²⁾实验组 B 与 C、D 组间差异非常显著 ($P < 0.01$).

3 讨 论

缺氧而致的组织细胞中的氧分压降低, 势必影响质膜、线粒体膜上的一些酶的活性, 如 Na⁺, K⁺-ATP 酶, Mg²⁺-ATP 酶, 蛋白激酶等^[8,9]. 对缺氧影响最敏感的部位是脑组织中的神经细胞. 经急性重复性缺氧, 小鼠的脑组织中的神经节苷脂含量 (以唾液酸含量表示) 下降, 这与文献 [2] 报导的单纯缺血相似. 本实验发现: 急性重复性脑缺氧引起神经节苷脂总量的下降, 而且各组 (A 与 B、C、D, B 与 C、D) 间的有显著性差异 ($P < 0.01$), 这提示, 急性重复性缺氧对神经节苷脂总量的影响是很大的, 但 C 与 D 组间没有显著性差异, 含量水平相当, 这说明, 这种影响所造成的结果很难在

短时间内恢复.

经急性重复性缺氧, 神经节苷脂组分的相对百分比发生变化, a. 从纯粹的单个神经节苷脂组分相对百分比来看, GM1 和 GD1b 是下降的, 而且实验组 B 和 C 与空白对照组 A 相比较存在显著性的差异; GD1a 基本上保持不变, 而 GT 则是升高的, 且与对照组 A/D 比较有统计学上的差异, 但在实验组之间还没发现有明显的差异. b. 从单位重量的组织所含的单一神经节苷脂 (以唾液酸表示) 组分的绝对量 (唾液酸含量 $\times$ 单一组分的相对百分含量 $\times$ 所含唾液酸的数目) 来看, 除 GM1、GD1b 的含量明显下降外, GD1a 的含量也是下降的, 这种下降是有显著性意义的; 而 GT 存在下降趋势, 但各组间还没有发现有统计学上的差异. 我们从这种

下降趋势可推测, 缺氧对神经节苷脂已知的 4 种单一组分均有影响, 至于具体的规律还有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Leon A, Lipartiti M, Seren Ms *et al.* *Stroke*, 1990; **21** (11 Suppl): III 95
- 2 Irwin L N, Samson F E. *J Neurochem*, 1971; **18**: 203
- 3 Holm M R. *J Neurochem*, 1968; **15**: 821
- 4 Yan Qi, Qiming X. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 1991; **14**: 87
- 5 吕国蔚. 见: 潘世威主编. 病理生理学进展. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 196
- 6 Ladisch S, Gillard B. *Anal Biochem*, 1985; **146** (1): 220
- 7 Svennerholm L. *Biochim Biophys Acta*, 1957; **24**: 604
- 8 Magal B, Louis J C, Aguilera J *et al.* *J Neurochem*, 1990; **55** (6): 2126
- 9 史美棠, 吕国蔚, 李 凌等. 中国病理生理杂志, 1993; **9** (3): 426

Studies of Gangliosides in the Mice Brain Tissue with Acute and Repeatitive Hypoxia.

Huang Rubin, Yang Dianer, Li Aihua, Pan Ying, Jin Youyu (*Department of Biochemistry, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China*); He Jianyu (*Department of Biochemistry, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*).

Abstract Kumming mice were chosen as ex-

perimental animals. Under the conditions of acute and repeatitive hypoxia and normal, the individual relative percentage of ganglioside GM1, GD1a, GD1b and GT in the brain were measured by the CS-9000 thin-layer-scanning photometer respectively. Comparing with the group A of blank control without exposure to hypoxia, group B of experimental control exposed to hypoxia only once, and group D of another experimental control fed for two days after acute and repeatitive exposure to hypoxia for 4 times, the content of sialic acid significantly decreased and that of GT markedly increased in the experimental animals group C acutely and repeatedly exposed to hypoxia for 4 times; while the contents of ganglioside were also different between group A and D significantly. The results indicate that ganglioside in the brain may be involved in the development of tolerance to hypoxia in animals exposed to acute and repeatitive hypoxia and the proceeding was not a fast response which may be restored.

Key words repeatitive hypoxia, ganglioside, mice, thin-layer-scanning

DNA 对电穿孔转染效率的影响

卢柏松 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 以外源红细胞生成素 cDNA 的表达产物为指标, 研究了运载 DNA 和重组表达质粒的构象对电穿孔转染 CHO 细胞的效率的影响. 结果 250mg/L 的运载 DNA 可使外源基因表达水平提高 3 倍; 线性化质粒 DNA 比超螺旋 DNA 更适合于用电穿孔方法获得永久表达. 这一结果提示, 运载 DNA 的存在和质粒 DNA 的线性化对提高电穿孔转染 CHO 细胞的效率是必须的.