

参 考 文 献

- 1 唐大椿, 向继洲, 鲁文彤 (Tang D C, Xiang J Z, Lu W T). 一种新的平滑肌调控蛋白 Calponin. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1996, **23** (4): 325~ 329
- 2 Tang D C, Kang H M, Jin J P, *et al.* Structure-function relations of calponin. Biophys J, 1995, **68** (2Pt2): A163
- 3 曹 圣, 唐大椿, 骆建云 (Cao S, Tang D C, Luo J Y). 冻融对分离重组蛋白影响的实验研究. 同济医科大学学报 (Acta Universitatis Medicinal Tongji), 1997, **26** (1): 67~ 68
- 4 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼可 T (Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T). 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南 (Molecular cloning: a laboratory manual). 北京 (Beijing): 科学出版社 (Science Press), 1992. 23~ 371
- 5 Winder S J, Walsh M P. Calponin: thin filament-linked regulation of smooth muscle contraction. Cell Signal, 1993, **5** (6): 677~ 682
- 6 Sobue K, Sellers J R. Caldesmon: a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. J Biol Chem, 1991, **266** (19): 12115~ 12118
- 7 Tang D C, Stull J T, Kubota Y, *et al.* Regulation of Ca^{2+} dependence of smooth muscle contraction. J Biol Chem, 1992, **267** (17): 11839~ 11845
- 8 Hiromitsu N, Katsuhiko S, Minoru S, *et al.* Phosphorylation of calponin by PKC is blocked by F-actin *in vitro*. Biochem and Biophys Res Comm, 1994, **203** (3): 1502~ 1507
- 9 王迪浚 (Wang D X). 病理生理学 (Pathophysiology). 北京: 人民卫生出版社, 1994. 147~ 437
- 10 Kolakowski J, Makuch R, Stepkowski D, *et al.* Interaction of calponin with actin and its functional implications. Biochem J, 1995, **306** (Pt1): 199~ 204

Construction, Expression and Purification of Calponin T184A: a Mutant of Calponin. CAO Sheng, TANG Da-Chun, LUO Jian-Yun (Key Laboratory of Pulmonary Disease, Health Ministry of China; Department of Pathophysiology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China).

Abstract Calponin cDNA was site-mutated (Thr184 → Ala184) by overlap extension PCR method to reduce the opportunity for calponin to be phosphorylated by PKC or CaMK II. The PCR product was sequenced. The mutated cDNA was then recombined into an expression vector pAED₄ and transferred into, expressed in *E. coli* BD₂₁ (DE₃) induced by IPTG. The expression level was up to 15% of total bacterial proteins. Mutated calponin was liberated from *E. coli* by freezing and thawing and purified by Sephadex G-50. The recombinant protein and the purified mutant protein was identified by Western blotting.

Key words recombinant calponin, site-directed mutation, *E. coli* expression purification

TF-1 细胞凋亡相关基因的研究

刘红涛 王玉刚 张颖妹 宋泉声 敬保迁 袁 勇 马大龙

(北京医科大学卫生部医学免疫学重点实验室, 北京 100083)

摘要 利用近年来发展起来的代表差异分析 (cDNA representational differences analysis, cDNA-RDA) 技术研究了在人红白血病细胞株 TF-1 细胞撤除细胞因子后进入凋亡时诱导表达的基因. 发现了 6 个新基因片段. 其中有三个经与 GenBank nr 和 dbEST 查询均没有发现同源性, 已经向 GenBank 进行登记, 登记号分别为 U83208, U83279, U83397. 此外还发现一批已知基因的表达与凋亡相关, 其中包括 Hsp 和人硫氧还蛋白等, 提示它们在凋亡中可能起作用. 这项作为为进一步研究凋亡相关基因打下了良好基础. 通过 RDA 的研究结果, 有可能发现人白血病细胞凋亡的特异标记蛋白或发挥作用的重要蛋白, 以期对白血病治疗提供理论基础.

关键词 TF-1 细胞株, 代表差异分析, 凋亡

学科分类号 R392.1

细胞凋亡 (apoptosis) 是当前国际生物研究的热点之一. 目前已发现多种基因参与细胞凋亡, 例如 TNF/FAS 家族, BCL2 家族, ICE/CED-3 家族, 多种癌基因, 抗癌基因, 热休克蛋白等^[1]. 但由于细胞凋亡为多阶段, 多系统, 多基因参与的复杂过程, 目前对其参与的全部基因尚远未了解清

楚. 通过进一步克隆化新的凋亡诱导基因, 特别是具有启动作用的凋亡早期表达基因, 将有助于阐明凋亡机理, 为一些凋亡相关疾病特别是肿瘤的治疗提供新的思路.

收稿日期: 1997-08-28, 修回日期: 1998-01-07

细胞凋亡也是造血细胞自然死亡的一种主要形式, 一些血液病问题也与细胞凋亡密切相关, 特别在一些血液肿瘤的发生、发展中起重要作用. 在 CML、B-CLL、ALL、AML 等肿瘤细胞中均有高水平 BCL-2 的表达, 细胞凋亡过程的受阻是血液肿瘤形成的重要原因^[2]. 目前已证明抗肿瘤化疗药物, 肿瘤细胞诱导分化剂 (如维甲酸及其合成的衍生物 HPR), 某些激素 (如糖皮质激素及 PGE₂ 等), 某些细胞因子及某些化学药物 (如砷类化合物 (As₂O₃)^[3]) 也是通过诱导血液肿瘤的细胞凋亡, 发挥治疗作用. 因此深入研究血液肿瘤细胞凋亡的发生机制, 及其基因调控并进行基因分离和克隆, 可望人为地调控细胞凋亡, 提高治疗效果, 预防疾病发生.

本研究以细胞因子依赖性的人红白血病细胞株 TF-1 细胞作为研究对象, 通过撤除细胞因子诱导其凋亡, 利用代表差异分析技术 (cDNA-representational difference analysis, cDNA-RDA)^[4] 进行凋亡早期特异表达基因的克隆化, 并进行功能研究. RDA 是 1993 年^[5] 发展起来的一种新方法, 最初用于基因组表达差异的研究, 因其简便有效性被大家推广用于 cDNA 的差异表达研究.

1 材料和方法

1.1 细胞系和细胞培养

TF-1 细胞由中国药品生物制品检定所丁锡申教授惠赠, 由本室长期传代培养. 培养基中加入 80~100 U/ml 的人重组 GM-CSF. 细胞去细胞因子时用 Hank's 液洗三遍后悬于不含 GM-CSF 的培养基中.

1.2 DNA 片段化分析

为了解 TF-1 细胞去细胞因子后凋亡情况, 分别于去细胞因子后 0、8、12、24、48、80 h 收集 2×10^6 TF-1 细胞, 提取片段化 DNA^[6].

1.3 细胞总 RNA 及 mRNA 的提取

细胞总 RNA 的提取利用 GIBCO-BRL 公司的 TRIzolTM 试剂. 各取 1×10^7 去细胞因子 8 h 后的 TF-1 细胞及相同数目不去细胞因子的 TF-1 细胞, 离心收集后, 加入 1 ml TRIzolTM 试剂提取总 RNA. 以上两种细胞 mRNA 的提取使用 Pharmacia 公司的 QuickPrep Micro mRNA Purification kit.

1.4 双链 cDNA 的合成

采用 GIBCO-BRL 的 SuperscriptTM Choice System for cDNA Synthesis 试剂盒, 利用 1.3 所提

的不去细胞因子和去细胞因子细胞 mRNA 为模板, 进行单链及双链 cDNA 的合成.

1.5 RDA 寡核苷酸

以下是应用于 RDA 的寡核苷酸^[4, 5, 7].

RBgl24, 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3', RBgl12, 5'-GATCTGCGGTGA-3', JBgl24, 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3', JBgl12, 5'-GATCTGTTTCATG-3', NBgl24, 5'-AGGCAAC-TGTGCTATCCGAGGGA-3', NBgl12, 5'-GATCTTCCCTCG-3'

划线的地方是每对引物配对互补的区域, 以上引物由上海生工生物工程有限公司合成.

1.6 RDA 差示杂交

操作参照文献 [4, 5, 7]. 去细胞因子和不去细胞因子组 cDNA 2 μ g 用 Dpn II 切后连上 RBgl12 和 RBgl24, 然后以 RBgl24 为引物对两者进行 PCR 扩增, 扩增产物用 Dpn II 切后, 利用 Glassmilk 回收 200~1600 bp 的片段, 并定量取 2 μ g 去细胞因子组的回收产物再连入 JBgl12 和 JBgl24 后, 再取 0.4 ng 纯化的连接产物 (被测组), 与 40 μ g 加因子的回收产物 (本底组) (1:100) 进行长时间杂交, 杂交后的产物以 JBgl24 为引物进行 PCR 扩增, PCR 产物纯化后用绿豆核酸酶处理. 终止反应后取 20 μ l 处理后的产物为模板, 以 JBgl24 为引物, 进行 18 轮 PCR 反应. 此次 PCR 产物纯化后用 Dpn II 切, 酶切后片段为 DP1 (以上为第一轮杂交). 取 2 μ g 酶切后的 DP1 再按以上操作连上新的 Adaptor NBgl12 和 NBgl24 (第一轮后) 或 JBgl12 和 JBgl24 (第二轮后), 重复 RDA 过程, 连入新 adaptor 的 DNA 为被测组, 作 PCR 时分别以 NBgl24 或 JBgl24 为引物, 杂交时本底组的量分别为 0.1 ng (1:400), 0.01 ng (1:4000), 分别得到 DP2 和 DP3. 取一定量的 DP3 与经 BamHI 酶切并用 CIP 处理的载体 pGEM3zf 进行连接并筛选阳性克隆.

1.7 测序反应

测序使用 Pharmacia Biotech 公司的 ALFTM DNA Sequencer, 测序反应按 Standard Annealing of Primer to Double-Stranded Template, 以荧光标记的反向引物为测序引物, 使用的酶为 T7 DNA 聚合酶.

1.8 与 GenBank 已有序列的比较及新序列的登记注册

将测序所得到的序列以 E-mail 的形式或通过 <http://WWW3.ncbi.nlm.nih.gov> 进行序列比较, 并通过 <http://WWW3.ncbi.nlm.nih.gov>.

gov 所提供的 BankIt 功能将在 nr 和 dbEST 中完全没有同源性的序列到 GenBank 进行登记^[8~10].

1.9 mRNA 斑点杂交和 RNA 印迹

基本操作按文献 [11], 去细胞因子和未去细胞因子组总 RNA 用分光光度计 Beckman 640 定量后, 对应狭线孔中各加入 20 μ g 总 RNA, 利用 GIBCO-BRL 公司抽滤点膜装置 HXBRI-SLOTTM MANIFLD 将总 RNA 点于 DUPONT 公司的 Gene Screen Plus Hybridization Transfer Membrane 上. RNA 印迹时^[12], 总 RNA 经在含有甲醛的凝胶上进行的 RNA 电泳后, 通过毛吸法转到尼龙膜上. 探针的标记和杂交操作参照 DUPONT 公司 Random Primer Fluorescein Labeling kit with Antifluorescein HRP (DuPont NEN NEL803) 试剂盒说明书, 一般 X 片压膜过夜后显影, 定影.

2 结 果

2.1 TF-1 细胞去细胞因子后进入凋亡

分别于去细胞因子 0、8、12、24、48、80 h 时提取 TF-1 细胞的 DNA, 并进行电泳. 电泳显示 (图 1) 去细胞因子 12 h 时 DNA 的片段化就已经非常明显, 说明 TF-1 细胞去细胞因子后进入凋亡. 一般来说, 基因水平的改变 TF-1 细胞应该早于形态学上的改变. 为此我们选取去细胞因子 8 h 后 TF-1 细胞进行 RDA.

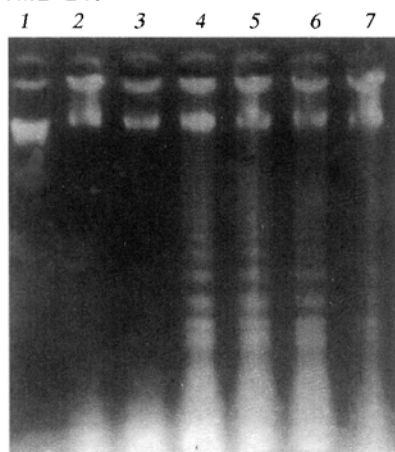


图 1 TF-1 细胞去细胞因子后 DNA 片段化电泳结果

1: λ DNA/*Hind* III 标准; 2~7: TF-1 细胞去因子 0、8、12、24、48、80 h.

2.2 RDA

进行 RDA 操作时, 以未去细胞因子的 TF-1 细胞为本底组, 而以去细胞因子 8 h 后的 TF-1 细胞为被测组. 进行三轮 RDA, 每轮中本底组: 被

测组分别为 100: 1, 400: 1, 4000: 1. 图 2 显示了杂交前不去及去细胞因子 TF-1 细胞 cDNA, 以及三轮 RDA 每一轮的产物, 从电泳上可以看出, 随着 RDA 进行, 带型发生了改变, 大部分消失而局部增强. 第三轮后, 可以看到明显的不同条带, 此类差异带可能代表差异表达的基因.

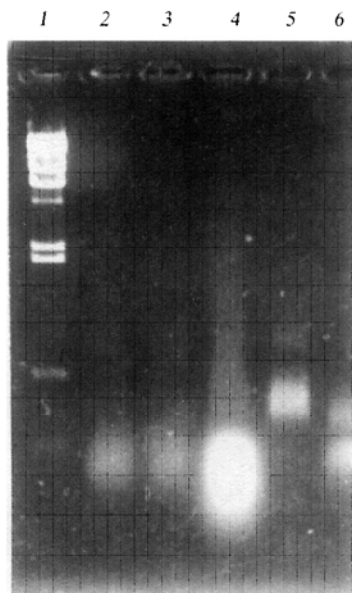


图 2 利用 RDA 筛选在 TF-1 细胞去细胞因子 8 h 后特异表达片段的电泳结果

1: λ DNA/*Hind* III 标准; 2: 正常培养 (不去细胞因子) 的 TF-1 细胞 cDNA 经 *Dpn* II 酶切后, PCR 扩增; 3: 去细胞因子 8 h 时 TF-1 细胞 cDNA 经 *Dpn* II 酶切后, PCR 扩增; 4: 第一轮 RDA 后即 DP1; 5: 第二轮 RDA 后即 DP2; 6: 第三轮 RDA 后即 DP3.

2.3 测序, 检索和杂交结果

三轮 RDA 后的产物与 pGEM3zf 相连后, 电泳分析选择大于 pGEM3zf 载体的克隆进行保存并选择 20 个克隆用 LiCl 和 PEG8000 的方法提取质粒^[12]后进行测序. 测定的序列以 E-mail 或 WWW 的方式到 GenBank 进行检索. 检索结果 (表 1) 表明其中有 7 个克隆只有部分序列有同源性, 可能为新的未知基因. 其余 13 个为已知基因, 将以上 7 个未知序列再到 dbest 数据库进行检索, 发现其中 4 个有相同序列, 3 个没有同源序列, 将这 3 个基因片段以 EST 的形式向 GenBank 进行登记, 并获得承认. GenBank 的登记号码分别是 U83208, U83279, U83397. 对以上克隆中的 12 个进行了斑点杂交以检测它们在 TF-1 细胞中的表达情况, 杂交结果显示其中 7 个在凋亡的 TF-1 细胞中高表

达 (图 3 显示了部分结果), 而在正常 TF-1 细胞中低表达或不表达. 并用 RNA 印迹的方法对 2 个新基因转录产物 (被命名为 TFAR19 和 TFAR15 (2)) 的长度进行了估算. 结果显示 (图 4) TFAR15 (2) 长度约为 1.0 kb, 而 TFAR19 长度

约为 700 bp. 利用 Pharmacia 公司的 Pharmacia LKB Imagemaster DTS 扫描仪扫描分析. 结果显示以上两个克隆在去细胞因子组及不去细胞因子组间表达有差异 (表 2).

表 1 利用 RDA 技术发现在 TF-1 细胞去细胞因子所致凋亡中表达的基因

克隆号	测序长度	同源性	已知序列 (全长)	杂交结果
1	309	98%	HSU32849 人 Hou 基因 (1426)	H
3	250	96%	HSU54645 人腺苷激酶 2B (adk2b) 基因 (2105)	H
4	257	98%	HSU21138 人核糖体蛋白 L9mRNA	N. D
5 ¹⁾	396	68% (40/68)	CEF07A11 <i>Caenorhabditis elegans</i> cosmid F07A11 (35, 692)	H
6	203	98%	HSLDHAR 人乳酸脱氢酶 A (LDH-A, EC1. 1. 1. 27) (1661)	NH
7	247	97%	HUMCD24B 人 CD24 mRNA (2116)	ND
8	111	98%	人硫氧还原蛋白 mRNA (501)	H
9	236	97%	人胸腺嘧啶核苷合成酶基因 (18597)	NH
10	220	98%	人卫星 DNA III	NH
11			同 4	ND
13	288	98%	HSU17899 人氯离子通道调节蛋白 mRNA (1355)	ND
14 ¹⁾	166	58% (68/117)	DDP8A7 <i>Dictyostelium discoideum</i> P8A7 gene (2568)	NH
15	290		同 4	ND
17	290	96%	同 10	NH
19 ¹⁾	290	59% (71/119)	HUMSFRS 人剪切因子 7(富含精氨酸/丝氨酸)(SFRS7) (8213)	H
20	200	99%	HSU56637 人帽蛋白 alpha 亚基同种异形体	ND
23 ¹⁾	270	89% (44/49)	X58779/HSHTLIP 人肝三甘油酯脂酶 5' 非编码区	ND
8 (2) ¹⁾	263		无同源	ND
15 (2) ¹⁾	312	74% (35/47)	HUMMDR1 人 P 糖蛋白 (MDR1) mRNA (4646)	H
19 (2) ¹⁾	250	59% (71/119)	同 19 号	H

¹⁾表示可能为新基因; ND 表示没有检测; H 或 NH 表示在去细胞因子 TF-1 细胞中高表达或不高表达.

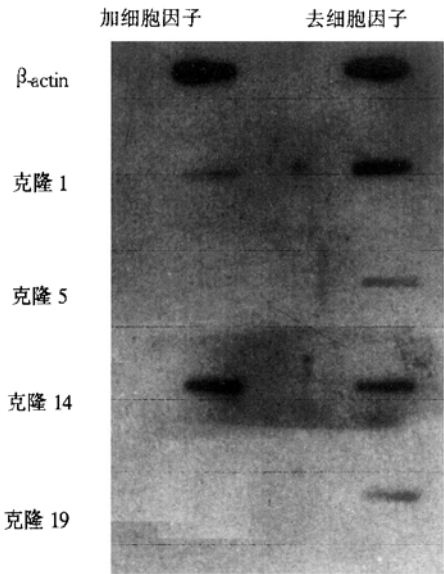


图 3 RDA 得到克隆在正常培养和去细胞因子 TF-1 细胞中表达的狭缝杂交结果
1: β -actin; 2~5: 克隆 1, 5, 14, 19.

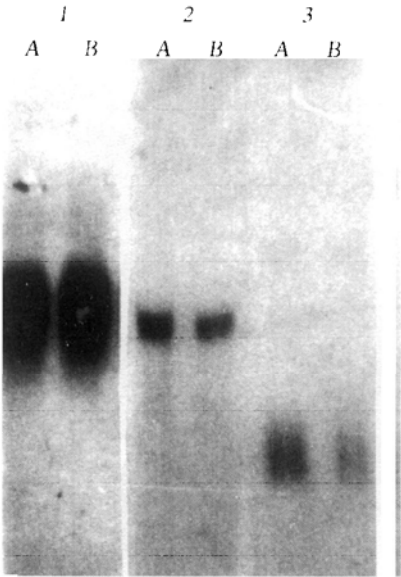


图 4 二个未知新基因的 RNA 印迹结果
1: 人 GAPDH; 2: TFAR15 (2); 3: TFAR19.
A: 去细胞因子; B: 加细胞因子.

表 2 RNA 印迹扫描分析结果

	去细胞因子组	加细胞因子组
GAPDH	1.27	1.27
TFAR19	0.324	0.132
TFAR15 (2)	0.696	0.236

注:表中数值为去除背景(background)后条带的平均分光光度值(A)。

3 讨 论

TF-1 细胞株^[13]是从患红白血病的病人分离建立的人前髓细胞株。TF-1 细胞的生长增殖依赖于 IL-3、GM-CSF、IL-13、EPO、SCF 等细胞因子的单独或联合作用^[13]。一旦在培养基中去除细胞因子, TF-1 细胞就会进入凋亡。一般去细胞因子 8 h 后, 几乎 70% 的细胞进入凋亡^[14]。我们的 DNA 片段化电泳结果也证实了这一点。去细胞因子后培养基中加入蛋白质合成抑制剂环己酰胺后, 细胞的凋亡受到抑制^[15], 这说明 TF-1 细胞去细胞因子后的凋亡时有大分子蛋白质的合成。尽管以前的工作证明, TF-1 细胞凋亡时 BCL-2 的 mRNA 和蛋白质水平均下降, 而且是通过抑制 PKC 激酶的活性达到的^[14]。但对 TF-1 细胞凋亡早期基因水平的变化还没有一个全面的了解。

为了更好地研究 TF-1 细胞去细胞因子凋亡机制并以期发现在凋亡中起作用的新基因, 我们用 RDA 方法进行了 TF-1 细胞去细胞因子凋亡中基因差异表达的研究。本研究以细胞因子刺激生长的正常 TF-1 细胞为本底, 以去除细胞因子的进入凋亡的 TF-1 细胞为被检查者, 试图发现在凋亡早期过程中发挥作用的一系列基因。并进一步为其他血液肿瘤细胞的诱导凋亡和临床治疗提供一定的理论基础。

总的来说, 凋亡涉及到从胞外至胞内一系列的信号传导过程和效应器蛋白水解酶的活化和调节两个步骤^[16]。从本研究中所得到的在 TF-1 细胞凋亡中差异表达的基因编码的蛋白质, 主要是一些核内调控因子, 这与我们选择去细胞因子的时相在早期有关。一些克隆 (如 Thioredoxin^[17], Hou^[18] 等) 经过检索发现以前的工作提示它们的高表达在凋亡中起作用, 为我们今后进一步地研究以上已知基因在凋亡中的作用打下良好基础。更为重要的是, 我们发现了数个新基因片段。而利用未知基因的片段可以从文库中筛选全长 cDNA 或用 RACE 的方法克隆出全长 cDNA 序列, 有可能发现信号传导途径上的新蛋白或凋亡的标记蛋白。使我们对血液肿瘤

细胞的凋亡的认识有进一步的提高, 具有重要的理论意义和潜在的应用价值。最近, 我们已克隆出 TFAR15 和 TFAR19 的全长 cDNA 序列在 GenBank 登记并被接受, 登记号分别为 AF022385 和 AF014955。

参 考 文 献

- 1 Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, **267** (5203): 1456~ 1465
- 2 张之南, 潘华珍 (Zhang Z N, Pan H Z). 细胞凋亡与血液病. *中华血液学杂志* (Chinese Journal of Hematology), 1996, **17** (5): 267~ 270
- 3 Chen G Q, Zhu J, Shi X G, *et al.* *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. *Blood*, 1996, **88** (3): 1052~ 1061
- 4 Hubank M, Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research*, 1994, **22** (25): 5640~ 5648
- 5 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between Two complex Genomes. *Science*, 1993, **259** (5097): 946~ 951
- 6 Rajotte D, Haddad P, Hermen A, *et al.* Role of protein kinase C and the Na^+/H^+ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony stimulating factor and interleukin 3. *J Biol Chem*, 1992, **267** (14): 9980~ 9988
- 7 Braun B S, Frieden R, Lessnick S L, *et al.* Identification of target gene for the ewing's sarcoma EWS/FL1 fusion protein by representational differences analysis. *Mol Cell Biol*, 1995, **15** (8): 4623~ 2630
- 8 Brenner S E. Network Sequence retrieval. *TIG*, 1995, **11** (6): 247~ 248
- 9 Brenner S E. Blast, Blitz, Blocks and BEAUTY: sequence comparative on the net. *TIG*, 1995, **11** (8): 330~ 331
- 10 Bassett Jr D E, Boguski M S, Spencer F. Comparative genomics, genome cross referencing and XREdb *TIG*, 1995, **11** (9): 372 ~ 373
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7.3~ 7.58
- 12 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.40~ 1.42
- 13 Kitamura T, Tanga T, Terasawa T, *et al.* Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3 or erythropoietin. *J Cell Physiol*, 1989, **140** (2): 323~ 334
- 14 Rinaudo M S, Su K, Falk L A, *et al.* Human interleukin 3 receptor modulates bcl-2 mRNA and protein levels through protein kinase C in TF-1 cells. *Blood*, 1995, **86** (1): 80~ 88
- 15 Williams G T, Smith C A, Spooncer E, *et al.* Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*, 1990, **343** (6253): 76~ 79
- 16 Vaux D L, Stresser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc*

- Natl Acad Sci USA, 1996, **93** (6): 2239~ 2244
- 17 Iwata S, Hori T, Sato N, *et al.* Adult T cell leukemia (ATL) - derived factor/human thioredoxin prevents apoptosis of lymphoid cells induced by L-cystine and glutathione depletion —possible involvement of thiol-mediated redox regulation in apoptosis caused by pro-oxidant state. J Immunology, 1997, **158** (7): 3108~ 3117
- 18 Bao J X, Zeros A S. Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. Oncogene, 1996, **12** (10): 2171~ 2176

Studies on the Apoptosis Related Genes of TF-1 Cell Line by cDNA-RDA Technique. LIU Hong-Tao, WANG Yu-Gang, ZHANG Ying-Mei, SONG Quan-Sheng, JING Bao-Qian, YUAN Yong, MA Da-Long (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract The genes effecting in the process of the apoptosis of TF-1 cell line when it is deprived of the cytokine in the culture medium were studied by RDA (representational difference analysis) method. The TF-1 cell depriving of cytokines for 8 hours was

selected as the Tester and normal cultured TF-1 cell as the Driver. Seven gene fragments were found uniquely expressed or highly expressed in the process of apoptosis of TF-1 cell line which include some known genes such as Hou and thioredoxin that formerly suggested to play a role in apoptosis. There are three fragments are complete novel after searching the nr and EST catalogues of GenBank and were banked into GenBank. The accession numbers for them are U83208, U83279, U83397 respectively. From the novel gene fragments, the complete cDNA sequence of them can be fished and the bioactivity and function of them in apoptosis of TF-1 cell and other hematological tumors can be further studied. On the other hand, the function of some known genes which were not suggested formerly in the course of apoptosis can be studied.

Key words TF-1 cell line, representational difference analysis (RDA), apoptosis

内毒素休克大鼠肝线粒体质子跨膜转运的改变^{*}

杨鹤鸣

(国防科工委总医院, 北京 100101)

陆松敏 刘建仓 李 萍 朱正坤 郭素清

(第三军医大学野战外科研究所, 重庆 400042)

摘要 用稳态荧光探针标记技术动态观察内毒素休克大鼠肝亚线粒体质子跨膜转运的变化. 发现, 休克 5 h ATP、NADH 和琥珀酸钠所致的 9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶 (ACMA) 最大荧光淬灭值 ($\Delta A_{\max}$) 显著低于对照组 ($P < 0.05$)、最大荧光淬灭时间 ($T_{\Delta A_{\max}}$)、半数荧光淬灭时间 ($T_{1/2 \Delta A_{\max}}$) 非常显著延长 ($P < 0.01$), 肝线粒体质子跨膜转运能力下降; 膜脂分子烃链和膜脂深层次流动性下降; 线粒体膜 PLA₂ 活性增加; 血浆脂质过氧化产物 MDA 和线粒体 MDA 含量均显著增加. 可能膜脂质过氧化和磷脂酶 A₂ 的水解是引起内毒素休克肝线粒体质子转运功能改变的重要因素.

关键词 线粒体, 质子, 内毒素, 休克

学科分类号 R631.1

机体器官线粒体氧化磷酸化功能的改变往往是影响内毒素休克发生、发展的重要因素^[1]. 在氧化磷酸化过程中, 在底物氧化还原能的驱动下, 质子由基质转运到线粒体内膜外侧, 形成质子电化学梯度 ($\Delta \mu H^+$). 质子跨膜转运是线粒体磷酸化的基础^[2]. 然而, 内毒素休克时线粒体质子跨膜转运的情况如何, 尚未见报道. 本实验研究内毒素休

克大鼠肝线粒体质子跨膜转运变化及其机理.

1 材料和方法

1.1 Wistar 大鼠 80 只, 随机分为对照组和内毒素

^{*} 军队“九五”攻关重点课题 (96L041).

收稿日期: 1997-09-09, 修回日期: 1998-07-06