

胞外基质成分 FN 的作用没有明显关系。TGF 可能通过在其作用的早期下调 Smad6 的表达,而在中后期上调 Smad2 的表达而增强其信号转导。

摘 要

本研究在人肾小管上皮细胞系(HK-2)上探讨了介导转化生长因子 β_1 (TGF β_1)生物学效应的信号介导分子。结果表明 SMAD₅ 信号蛋白及 ERK 激酶均参与 TGF β_1 的信号转导;通路特异性 Smad2 于 TGF β_1 作用 4 小时后开始增加,持续至 48 小时;而抑制性 Smad6 于 TGF β_1 作用 1 小时开始减少,4 小时达到最低值,以后逐渐恢复;ERK 只参与 TGF β 抑制增殖效应,对 TGF β 促进 FN 分泌无影响。

关键词: 转化生长因子 β 增殖 细胞外基质

信号转导

参 考 文 献

- [1] 李玉瑞主编,1988.细胞外基质的生物化学及研究方法.第一版,北京:人民卫生出版社,216-219.
- [2] 魏林等,1998,中华内科杂志,37(3):151-153.
- [3] Melanie T et al.,1997,*Pharmacol Ther*,75(1):21-41.
- [4] Kribben A et al.,1993,*Am J Physiol*,265:C939-945.
- [5] Albertcht M et al.,1999,*Histochem Cell Biol*,112(1):51-61.
- [6] Huang HY et al.,1998,*J Clin Endocrinol Metab*,83:1721-1729.
- [7] 丁炜等,1998,中华肾脏病杂志,14(4):229-232.
- [8] Huwiler A et al.,1994,*FEBS Lett*,354:255-258.
- [9] Hayashida T et al.,1999,*Kidney Int*,56:1710-1720.
- [10] Poncelet AC et al.,1999,*Kidney Int*,56:1354-1365.

THE SIGNAL TRANSDUCTION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR β IN HK-2 CELL LINE

MA Chun Yan WANG Hai Yan.

(*Institute of Nephrology The First Hospital Beijing University Beijing 100034*)

ABSTRACT

In this study, we have found that the biological events governed by TGF β_1 were mediated by SMAD₅ and ERK signal transduction pathways in HK-2 cell line. Smad2 was increased from 4-48 hours after being treated with TGF β_1 ; in contrast, Smad6 markedly decreased after 1 hour treatment of TGF β_1 , it reached the minimum at 4 hours, returned to baseline after 24 hours. ERK involved in the negative growth control of TGF β_1 , but had no effect on FN secretion stimulated by TGF β_1 .

Key Words: Transforming growth factor β Cell proliferation Extracellular matrix Signal transduction

BCL-2 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸对原代急性白血病细胞选择性抑制作用

林艳娟 吕联煌 陈英玉 陈志哲 张学敏

(福建医科大学附属协和医院 福建省血液病研究所 福州 350001)

BCL-2 是调节细胞凋亡的重要基因,它的过度表达可阻止细胞程序性死亡,延长细胞寿命,使细胞堆积,在许多癌肿的发生中起着不可忽视的作用。且无论是急性髓系还是淋巴细胞系白血病,原始细胞 BCL-2 高水平表达与临床化疗效果差均有关^[1-2]。基于 BCL-2 调节细胞生存的功能和潜在的抗药作用,BCL-2 基因可能代表着改进癌症治疗的一种理想的治疗策略设计,因此针对 BCL-2 的反义基因治疗技术被国内外学者用以治疗肿瘤的研究。已有研究表明 BCL-2 基因在正常骨髓原始细胞、恶

性造血细胞中均有表达^[3,4]。那么,BCL-2 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide, AS-PS-ODN, ASPO)在对急性白血病作用的同时,是否也对正常造血细胞产生影响尚不清楚,因此本文应用 BCL-2 ASPO 作用于正常或良性血液病骨髓细胞和原代急性白血病细胞,观察它们的增殖和 BCL-2 表达的变化,了解 BCL-2

本文 2001 年 2 月 20 日收到,5 月 23 日接受。

本课题获卫生部科研基金(98-2-337)、福建省科委优先发展基金(97-Z-47)资助。

ASPO 是否对正常造血细胞产生抑制作用及对白血病细胞作用的特点。以期为 BCL-2 ASPO 进一步的应用研究提供实验依据。

材料和方法

1. 研究对象

从福建省血液病研究所门诊及住院患者中,随机选择 20 例病人骨髓液或外周血(幼稚细胞在 85% 以上),男 16 例,女 4 例,中位年龄 33.5 岁(4-66 岁),急性非淋巴细胞白血病(AML)13 例(4 例 M3,6 例 M5,3 例 M5 复发),急性淋巴细胞白血病(ALL)6 例(2 例 L1,2 例 L2,1 例 L3,1 例慢粒急淋变),恶性组织细胞病 1 例。对照骨髓标本 7 例[4 例大致正常,1 例血小板减少,2 例缺铁性贫血(IDA)],男 2 例,女 5 例,中位年龄 33 岁(20-60 岁)。

2. 单个核细胞悬液的制备

对照及急性白血病患者髂后上棘抽取骨髓液或外周血(幼稚细胞比例大于 85%),以含肝素(20 单位/ml 髓血),1640 培养液(TL 公司),对倍稀释后用淋巴细胞分离液(华美,比重 1.077),分离单个核细胞,以 1640 培养液洗涤 2 次后,用含 10% 胎牛血清(FBS)的 1640 培养液配成 2×10^6 /ml 浓度的细胞悬液备用。若为骨髓液单个核细胞则种入培养瓶,置 37℃,5% CO₂,饱和湿度培养箱中培养 12-24 小时,轻振荡后取上清悬浮细胞(以去贴壁基质细胞),离心、沉淀后用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液调成 2×10^6 /ml 浓度的细胞悬液备用。

3. ASPO 合成^[5]

为 BCL-2 mRNA 开放阅读框架(-7-+13),20 个碱基。

4. ASPO 处理骨髓细胞及分组

1) 分组 Bcl-2 ASPO 处理正常或良性血液病骨髓细胞:设对照组和处理组,ASPO 终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$;处理原代急性白血病细胞:设对照组和处理组,ASPO 终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 。

2) 培养体系 为骨髓单个核细胞终浓度为 1×10^6 /ml,1640 培养液,胎牛血清 10%。

3) 培养方法 细胞悬液种于 96 孔培养板,100 μl /孔,置 37℃,5% CO₂,饱和湿度培养箱中预培养 1 小时后,加入 1640 培养液溶解的 ASPO,对照组仅含 10% 胎牛血清的 1640 培养液,不加任何其他物质。各组至少做 3 个平行孔。

5. 观察指标

1) 台盼蓝拒染试验 于培养的第 1、3、5、7 天取细胞作台盼蓝拒染试验,计活细胞数。

2) 集落培养 于培养的第 3 天按拒染率取活细胞,正常或良性血液病骨髓细胞对照组及其 ASPO 组;原代急性白血病细胞对照组及其 ASPO 组均以 2×10^5 /ml 单个核细胞数(其中 ALL 为 5×10^5 /ml),分别种于 96 孔板,100 μl /孔,各组均 3 孔,置 37℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中做以下集落培养。在倒置显微镜下计数集落,部分集落做 W-G 染色观

察。

(1) 粒-单系祖细胞集落(CFU-GM)琼脂半固体培养:正常或良性血液病骨髓细胞及原代急性白血病细胞均做 CFU-GM 培养。培养体系为 1640 培养液,20% 马血清(GIBCO),10% 人 AB 血清(制备方法参见文献^[6]),20% 胎肌条件培养液(制备方法参见文献^[6]),0.3% 琼脂。于培养的 7-10 天,计数细胞 ≥ 40 个为 1 个集落。

(2) 多向祖细胞集落(CFU-Mix)甲基纤维素培养:培养体系为 IMDM 培养液,5% 植物血凝素-单个核细胞条件培养液(PHA-MNCCM)(制备参见文献^[7])(PHA,华美),30% 人 AB 血浆(制备参见文献^[7]),2-巯基乙醇(2-ME,华美) 5×10^{-5} mol/L,促红细胞生成素(EPO, KIR IN)1 单位/ml,0.9% 甲基纤维素。于培养的 14-18 天,计数含两系以上的混合细胞集落。

(3) 后红系祖细胞集落(CFU-E)甲基纤维素培养:培养体系为 MEM 培养液(GIBCO),20% 人 AB 血清,1% 牛血清白蛋白(BSA,华美),2-ME 10^{-5} mol/L,EPO1U/ml,0.8% 甲基纤维素,于培养第 7 天,计数 CFU-E 集落,8-50 个具桔红色的细胞团为 1 个集落。

(4) 前红系祖细胞集落(BFU-E)甲基纤维素培养:培养体系为 MEM 培养液,1% BSA,30% AB 血浆,10% PHA-MNCCM,2-ME 10^{-4} mol/L,EPO1U/ml,0.9% 甲基纤维素。于培养第 14 天,计数 BFU-E 集落。50 个以上桔红或红色集落或 3 个以上中心的集落为爆发群(burst)。

(5) 急性髓系白血病祖细胞集落(CFU-AML)甲基纤维素培养:13 例 AML 和 1 例恶性组织细胞病做 CFU-AML 培养体系为 IMDM 培养液,20% 胎牛血清,20% 植物血凝素白细胞条件培养液(制备参见文献^[6])(PHA-LCM),2-ME 5×10^{-5} mol/L,2.7mmol/L 左旋谷氨酰胺,0.9% 甲基纤维素。于培养的第 7-8 天,计数 CFU-AML 集落,大于 20 个细胞为 1 个集落。并取部分集落做过氧化物酶(POX)细胞化学染色。

(6) 急性淋巴细胞白血病祖细胞集落(CFU-ALL)甲基纤维素培养:6 例 ALL 做 CFU-ALL 培养,培养体系为 IMDM 培养液,15% PHA-LCM,10% 新生小牛血清(华美),0.8% 甲基纤维素。于培养的 5-7 天计数,含 50 个以上细胞的细胞团为 1 个集落,并取部分集落做 POX 染色。

3) Bcl-2 蛋白免疫细胞化学染色 于培养的第 3、6 天,分别取细胞悬液涂片作 Bcl-2 蛋白免疫细胞化学染色。染色方法按链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶免疫化学染色试剂盒(Sp Kit,Maxim 公司)说明书进行,一抗为兔抗人 BCL-2 多克隆抗体(中山生命技术公司),二抗为羊抗兔,用 DAB 酶底物(maxin 公司)显色。用半定量积分法对 Bcl-2 蛋白染色阳性细胞进行分级(+ - + + +),每份标本对 200 个细胞进行分级,平均计算 100 个细胞的积分量(阳性指数)^[5]。

结 果

1. ASPO 对细胞生长的影响

1) ASPO 对正常及良性血液病骨髓细胞生长的影响 比较对照组和 ASPO10 μ mol/L 组于培养的第1、3、5、7天的活细胞数变化,无显著差别($P > 0.05$)(图1)。

2) ASPO 对原代急性白血病细胞生长的影响 比较对照组和 ASPO 5 μ mol/L 组于培养的第1、3、5、7天的活细胞数变化,发现于培养的第3至7天 ASPO 5 μ mol/L 组活细胞数显著低于对照组($P < 0.05$)(图1)。

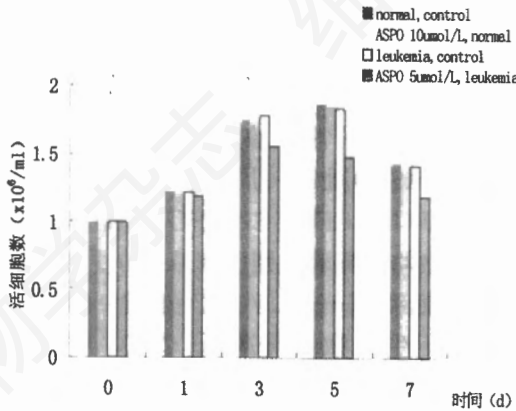


图1 BCL-2 ASPO对正常及良性血液病或急性白血病骨髓细胞作用前后活细胞数变化

2. ASPO对祖细胞集落形成的影响

1) ASPO对正常及良性血液病骨髓造血祖细胞集落形成的影响 ASPO作用3天后 CFU-GM、CFU-Mix、CFU-E 和 BFU-E 的形成率与对照组比较无明显差别(表1)。

2) ASPO对原代急性白血病祖细胞和粒单系祖细胞的集落形成影响 比较对照组和 ASPO 5 μ mol/L 组培养第3天急性白血病祖细胞集落和 CFU-GM 的形成率,发现13例 AML 病例做 CFU-AML 培养的,除了其中1例无论有无 ASPO 作用均无 CFU-AML 生长和1例 ASPO 作用后 CFU-AML 形成率无减少外,其余11例均有不同程度的减少;6例 ALL 病例做 CFU-ALL 培养的,其中3例对照组和 ASPO 组均无 CFU-ALL 生长,另外3例 ASPO 作用后 CFU-ALL 均减少;10例做 CFU-GM 培养的,其中2例对照组和 ASPO 组均无 CFU-GM 生长,而另外8例 ASPO 作用后 CFU-GM 集落形成率则增多(表1)。

3. ASPO对 Bcl-2 蛋白表达的影响

1) ASPO对正常及良性血液病骨髓细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 ASPO 组 Bcl-2 蛋白表达阳性率,阳性强度(积分)与对照组比较无显著差别($P >$

0.05)(表2)。

表1 ASPO作用前后造血祖细胞和白白血病细胞集落形成率的变化

集落种类 (/2 $\times 10^4$ 细胞)	正常对照组	ASPO 10 μ mol/L 组	白血病对照组	ASPO 5 μ mol/L 组
CFU-Mix	5.48 \pm 1.20	* 4.72 \pm 1.6		
CFU-E	11.0 \pm 1.99	* 11.0 \pm 2.23		
BFU-E	9.43 \pm 4.40	* 9.19 \pm 3.85		
CFU-GM	10.81 \pm 5.45	* 9.81 \pm 7.34	0.57 \pm 0.76	** 2.63 \pm 1.93
CFU-AML			11.75 \pm 6.49	** 7.61 \pm 4.61
CFU-ALL*			25.0 \pm 1.46	** 13.11 \pm 2.91

*细胞接种数 $5 \times 10^4 / 100\mu\text{l}$ /孔 *与正常对照比较 $P > 0.05$ **与白血病对照组比较 $P < 0.05$ 。

表2 ASPO作用前后正常及良性血液病骨髓细胞、及白血病细胞 Bcl-2 蛋白表达的变化

	Bcl-2 阳性率 (%)	Bcl-2 阳性强度 (积分)
正常对照组	42.71 \pm 3.45	54.57 \pm 5.03
ASPO 组 3d (10 μ mol/L)	* 40.86 \pm 3.18	* 52.86 \pm 3.63
6d	43.29 \pm 4.19	* 54.71 \pm 5.06
白血病对照组	77.92 \pm 22.50	152.25 \pm 50.90
ASPO 组 3d (5 μ mol/L)	** 54.05 \pm 20.20	** 99.20 \pm 37.52
6d	*** 55.35 \pm 22.74	*** 105.68 \pm 50.19

*与正常对照组比较 $P > 0.05$, **与白血病对照比较 $P < 0.01$, ***与白血病对照比较 $P < 0.05$

2) ASPO对原代急性白血病细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 ASPO 5 μ mol/L 作用于20例原代急性白血病细胞及恶性组织细胞,于作用的第3、6天观察 Bcl-2 蛋白表达的变化。除2例 Bcl-2 蛋白表达无变化外,18例于作用的第3、6天均较对照组显著降低,(表2)。原代急性白血病对照组细胞 BCL-2 蛋白表达与正常及良性血液病骨髓细胞 Bcl-2 表达比较阳性率和阳性强度均显著增高($P < 0.01$)。

讨论

由于传统化疗药物非选择性地作用于肿瘤细胞和正常造血细胞,呈现出明显的非特异毒性作用。反义技术以其特异性高,毒性低的特点掀起了反义基因治疗的浪潮。BCL-2 癌基因在许多肿瘤中的过表达,使得 BCL-2 反义基因药物在肿瘤治疗研究中倍受关注。

研究已表明 Bcl-2 蛋白不仅在急性白血病细胞中高表达,且表达于正常未成熟骨髓细胞^[3-4]。我们应用 Bcl-2 反义技术探讨急性白血病细胞和正常骨髓造血细胞之间的效应是否存在差别。首先观察了终浓度 10 μ mol/L 的 Bcl-2 ASPO 处理正常及良性

血液病骨髓单个核细胞,结果表明 Bcl-2 ASPO 对正常及良性血液病骨髓细胞的生长曲线,造血祖细胞集落形成(CFU-GM, CFU-Mix, CFU-E, BFU-E)以及 Bcl-2 蛋白表达均无影响。对比之下原代急性白血病细胞经终浓度为 $5\mu\text{mol/L}$ 的 Bcl-2 ASPO 处理结果与对照组比较显示:能抑制白血病细胞生长及白血病祖细胞(CFU-AML、CFU-ALL)的生长;和特异性抑制白血病细胞 Bcl-2 mRNA 及蛋白质的表达。

我们的结果提示:Bcl-2 ASPO 具有选择性抑制白血病细胞的作用。Skorski 等^[8]在用 ASPO 作用免疫缺陷鼠白血病时发现 ASPO 被白血病细胞足量地吸收而对正常细胞无影响。这种 ASPO 似乎有选择性地被白血病细胞内吞,可能由于白血病细胞和正常造血细胞的群体构成不同,且所处的细胞周期不同。有以下证据说明:(1)骨髓中 CD34+、CD33- 和 CD10- 的祖细胞 Bcl-2 表达最高,而随着细胞向粒、单核细胞分化其表达逐渐减低^[4]。我们研究的正常骨髓细胞中原始细胞的比例($<1.5\%$)较急性白血病原始细胞比例($>85\%$)低;Bcl-2 蛋白的适量表达是正常骨髓细胞生存所必需^[9],但我们结果表明急性白血病细胞的 Bcl-2 蛋白表达的阳性率和阳性强度均显著高于正常对照组,因此受 Bcl-2 ASPO 特异性作用可能超过正常骨髓祖细胞。Campos^[9]用 Bcl-2 ASPO 分别作用于正常骨髓细胞分离出的 CD34+ 细胞与 AML 细胞,就发现 ASPO 除降低白血病细胞外也可抑制 CD34+ 的正常骨髓细胞,也说明 Bcl-2 ASPO 作用效应与受作用细胞群体构成有关。(2)处于 G_0 期的细胞 Bcl-2 表达高,白血病细胞处于 G_0 期要比正常骨髓细胞的多^[10],受 Bcl-2 ASPO 作用后,凋亡增加,而细胞增殖能力较正常细胞为弱。我们结果提示 Bcl-2 ASPO 能抑制白血病祖细胞集落(CFU-AML、CFU-ALL)的生长,使 CFU-GM 的生长恢复。(3)Gewirtz 等^[11]认为细胞靶基因受抑制后会出现反馈性转录增强效应,而白血病细胞靶基因的反馈性转录增强能力较正常细胞为弱。这可能也与 BCL-2 ASPO 的选择性作用有关。(4)至于 BCL-2 ASPO 不影响红系造血祖细胞生长,本研究没有红白血病的病例以对照,但可能与红系造血细胞中无 ASPO 分布有关^[12]。

根据我们用 Bcl-2 ASPO 对原代急性白血病细胞和正常或良性血液病骨髓细胞作用差别的实验结果,展示了 Bcl-2 ASPO 良好的应用前景,但其更确

切的生化机制还有待进一步探讨。

摘 要

为探讨 BCL-2 反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(AS-PS-ODN, ASPO)对急性原代白血病细胞和正常或良性血液病骨髓细胞的作用是否存在差别。应用台盼蓝拒染试验测定细胞存活力;用造血祖细胞集落培养:粒一单系祖细胞集落(CFU-GM),多向祖细胞集落(CFU-Mix),后红系祖细胞集落(CFU-E)、前红系祖细胞集落(BFU-E)和白血病祖细胞集落(CFU-AML, CFU-ALL)培养检测细胞增殖能力;免疫细胞化学染色检测细胞 BCL-2 蛋白表达变化。结果发现(1)正常或良性血液病骨髓细胞经 $10\mu\text{mol/L}$ ASPO 处理一周,同对照组比较:细胞生长数、CFU-GM、CFU-Mix、CFU-E、BFU-E 及 BCL-2 蛋白表达均无显著差别($P < 0.05$)。(2)急性原代白血病细胞经 $5\mu\text{mol/L}$ ASPO 处理一周,同对照组比较:细胞生长数显著减低;CFU-AML 或 CFU-ALL 显著降低($P < 0.05$),而 CFU-GM 明显增高($P < 0.05$);对照组 BCL-2 蛋白表达率为 $77.92\% \pm 22.50\%$, ASPO 组于培养的第 3 天为 $54.05\% \pm 20.20\%$ ($P < 0.01$)和第 6 天为 $55.35\% \pm 22.74\%$ ($P < 0.05$)均显著低于对照组。因此认为 BCL-2 ASPO 具有选择性地抑制白血病细胞的增殖和 BCL-2 蛋白的表达的作用。

关键词:反义寡核苷酸类 BCL-2 抑制作用
急性白血病细胞

参 考 文 献

- [1] Compos C, et al., 1993, *Blood*, **83**:3091 - 3096.
- [2] Maung Z, et al., 1994, *Br J Haematol*, **88**:105 - 109.
- [3] Bonati A, et al., 1996, *Exp Haematol*, **24**:459 - 465.
- [4] Porwit-MacDonald A, et al., 1995, *Leukemia*, **9**:1191 - 1198.
- [5] 林艳娟等, 1999, *中华医学遗传学杂志*, **16**(1):12 - 15.
- [6] 唐佩弦等主编, 1985, *造血细胞培养技术*, P. 99 - 128.
- [7] 李梅生等, 1987, *中华血液学杂志*, **8**(3):138 - 140.
- [8] Skorski T, et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(8):3966 - 3971.
- [9] Campos L, et al., 1994, *Blood*, **84**(2):595 - 600.
- [10] Vairo G, 1996, *Oncogene*, **13**(7):1511 - 1519.
- [11] Gewirtz AM. 1996, *Mt. Sinai. J Med.*, **63**(5-6):372 - 380.
- [12] Butler M, et al, 1997, *Lab Invest*, **77**(4):379 - 388.

SELECTIVE INHIBITION OF GROWTH OF ACUTE LEUKEMIC CELLS BY TREATMENT WITH BCL-2 ANTISENSE PHOSPHOROTHIOATE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

LIN Yan Juan LU Lian Huang CHNE Ying Yu CHEN Zhi Zhe ZHANG Xue Min
(Union Hospital Affiliate to Fujian Medical University Fujian Institute of Hematology Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT

To observe the different effects between acute leukemic cells and bone marrow cells of normal or benign blood diseases produced by treatment with Bcl-2 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides(ASPS-ODN, ASPO). The cellular viability was detected by trypan blue exclusion. The ability of proliferation of hematopoietic cells were determined by the culture of colony forming unit-granulocyte/macrophage(CFU-GM), mix-colony forming unit(CFU-Mix), colony forming unit-erythroid(CFU-E) and burst forming unit-erythroid(BRU-E). The ability of proliferation of leukemic cells were tested by the culture of colony forming unit-acute myeloid leukemia(CFU-AML) and colony forming unit-acute lymphoid leukemia(CFU-ALL). The expressions of Bcl-2 protein was determined by immunocytochemistry. It was shown that in normal or benign blood disease, there were no significant differences in the cellular viability, proliferation of hematopoietic cells and the expression of Bcl-2 protein whatever the treatment with ASPO at 10 μ mol/L or without ASPO. In acute leukemia, otherwise; the cellular viability and the forming rate of CFU-AML or CFU-ALL were significant lower in presence of ASPO at 5 μ mol/L than that without ASPO($P < 0.05$), but the amount of CFU-GM was significant higher($P < 0.05$). The expression rate of Bcl-2 protein of acute leukemic cells treated without ASPO was 77.92% \pm 22.50%. In the third day and the sixth day of treatment with ASPO, the expression rates of Bcl-2 protein of acute leukemic cells were significantly decreased to 54.05% \pm 20.20% ($P < 0.01$) and 55.35% \pm 22.74% ($P < 0.05$) respectively. Our data suggested that ASPO could selectively inhibit the proliferation and the expression of Bcl-2 protein in acute leukemic cells.

Key words: Antisense Oligonucleotides BCL-2 Inhibition Acute leukemic cells

心室成纤维细胞分泌心肌营养活性蛋白的分离提纯及其作用*

龚素珍 顾熊飞* 何光耀* 刘培庆** 潘敬运**

(广州医学院神经科学研究所 广州 510182 *中山医科大学生化教研室 **生理教研室 广州 510089)

构成心脏的细胞,除心肌细胞外,还有占心脏细胞总数 2/3 的非心肌细胞,其中大多数为成纤维细胞。既往人们对心脏成纤维细胞的研究主要集中在其产生和分泌的胶原蛋白在心脏的骨架作用,而其对心肌细胞和自身生长及功能的调控研究很少。1991年,Long等^[1]首先报道了非心肌细胞无血清条件培养液(NMC-CM)具有促进心肌细胞肥大反应的作用,该现象相继被多位学者证实,并认为其中心脏成纤维细胞起主要作用。1999年,又有学者报道心脏成纤维细胞也能分泌肾上腺髓质素影响自身的胶原合成和细胞增殖^[2]。这提示心脏成纤维细胞具有旁分泌和自分泌功能,在生理和病理状态下的心脏重塑中起着重要作用。心脏成纤维细胞产生的活性物质种类目前尚不完全清楚,本研究主要探讨心室成纤维细胞条件培养液的分离提纯及其对心

肌细胞的营养作用。

材料与方 法

1. 心肌细胞和心脏成纤维细胞分离和培养

取 1-3d 龄的 SD 大鼠,在无菌条件下开胸取出心脏,立即置入 4 $^{\circ}$ C D-Hank's 液中剪取心室肌,用胰蛋白酶进行反复消化,获取细胞。采用差速贴壁 1h,分别获得心肌细胞和成纤维细胞。培养前 48h,在心肌细胞的培养液中加入 Brdu 0.1mmol/L,以抑制成纤维细胞的增殖。用鼠抗 sacromeric-actin(sigma, 1:600)鉴定心肌细胞和成纤维细胞,纯度达 95% 以上。具体方法见参考文献^[3,4]。

2. 成纤维细胞条件培养液(FCGM)的获取

将成纤维细胞传代,接种于 50 ml 的玻璃培养瓶生长至

本文 2000 年 7 月 14 日收到,11 月 27 日接受。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39870888)。