

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)。

融合状态,在含1%血清DMEM培养液中孵育24h,然后置入8ml/瓶的无血清培养液(DMEM、胰岛素10 μ g/ml、转铁蛋白10 μ g/ml、Vit C 100 μ mol/L、Vit B₁₂1.5 μ mol/L、青霉素100 U/ml、链霉素100 μ g/ml)。同一批成纤维细胞,在第3d收集全部培养液,此培养液即为条件培养液(fibroblast conditioned growth medium,FCGM),用0.45 μ m滤膜过滤,贮于-20 $^{\circ}$ C。

3. FCGM生化分离与提纯

1) 超滤浓缩 将FCGM解冻,经Diaflo YM-10滤膜(Amicon产品)超滤浓缩,截留分子量大于10KD的浓缩蛋白液。超滤浓缩在4 $^{\circ}$ C条件下进行。

2) Sephadex G-75凝胶层析 将Sephadex G75凝胶于室温下溶胀48h,溶胀好的Sephadex G75凝胶缓慢倒入洗涤干净的层析柱(70cm \times 1.5cm,上海玻璃仪器厂)内,洗脱液为PBS(10mmol/L, pH 7.4),控制洗脱液流速为2.5ml/管/7.5min。用分部收集器(BJQ-74-2,上海医疗器械十厂)收集洗脱液。以上整个过程在4 $^{\circ}$ C条件下进行。将各管收集液用紫外/可见光分光光度计(53W_BUV/VIS,上海光学仪器厂)测光密度值,检测波长为280nm。洗脱后得到两个主峰,分别收集各峰洗脱液并将它们分成两部分。一部分经0.2 μ m微孔滤膜除菌,用于生物活性的检测,其余大部分具有生物活性的洗脱液透析去盐并超滤浓缩。分管盛装,-20 $^{\circ}$ C冻存,备用。

3) 高效液相色谱分离 吸取经Sephadex G75凝胶层析分析的活性峰洗脱液,进行高效液相色谱。色谱仪(Waters公司,美国)中的凝胶柱为半制备蛋白柱(PAK 200SW, 8mm \times 300m,美国),洗脱液(0.1mol/L PBS, pH 7.4)脱气待用,采用6000A泵和U6K进样器,接触样品的管路均换成非金属材料管,以消除金属成分对洗脱液中活性成分的影响。柱温18 $^{\circ}$ C,洗脱速度为0.2ml/min-0.3ml/min,每次进样量为0.2ml。数据处理系统由大连国家色谱中心开发的色谱工作站提供软件。紫外检测器(Model 441),波长为280nm。分管收集各峰洗脱液。各洗脱液分两部分,一部分经0.2 μ m微孔滤膜除菌,用于生物活性的检测。其余部分具有生物活性的洗脱液透析去盐并超滤浓缩,于-20 $^{\circ}$ C冷冻过夜,取出后置真空干燥器行冷冻抽干,用于电泳蛋白定量。

4. 考马斯亮蓝染色

将已分离、纯化的HPLC单一峰行SDS-PAGE。电泳浓缩胶浓度为4%,分离胶浓度为10%(Acr: Bis/29.2:0.8, Sigma)。制胶规格为70mm \times 50mm \times 1mm,电极缓冲液为Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.3),行垂直板电泳,考马斯亮蓝G250染色。用标准蛋白作为标准来计算样品中蛋白质的分子量。

5. 心肌细胞的营养作用

1) 心肌细胞的[³H]-Leu掺入测定 将含有0.1mmol/L Brdu、细胞浓度为4 \times 10⁵个/ml的心肌细胞接种于24孔培养板上,每孔1ml,每4孔为一组。48h换为含1%血清的DMEM培养液,72h换为分别含有[³H]-Leu 1 μ ci/孔

(北京原子能研究所)的无血清DMEM培养液、>10KD的FCGM和<10KD的FCGM三组。每孔加入量为30 μ l,其余步骤见参考文献[4]。实验重复3次。

2) 心肌细胞快速自动比色微量分析(MTT定量分析)

将含有0.1mmol/L Brdu、细胞浓度为4 \times 10⁵个/ml的心肌细胞接种于96孔培养板上,每孔100 μ l,每8孔为一组。48h换为含1%血清的DMEM培养液,72h分别加入>10KD FCGM和<10KD FCGM。每孔加入量为15 μ l,对照组为等量的无血清DMEM培养液。在终止培养前5h,每培养孔加入20 μ l黄色四唑盐的衍生物MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma产品,用D-Hank's配置,浓度为5mg/ml],继续培养5h后,每孔加入200 μ l的二甲亚砜(Dimethyl Sulphoxide, DMSO)溶液终止MTT反应。将培养板放在EL_x800微板读数器上(BIO-TEK INSTRUMENTS, INC),测定每孔光密度(OD)值。所用的实验波长为570nm,参考波长为630nm。光密度值的高低直接反映活跃细胞的相对数量。实验重复3次。

6. 统计学处理

所有数据均以X \pm SD表示,组间数据处理根据处理方差齐性分析结果,采用非配对t检验。

结 果

1. Sephadex-G75凝胶层析洗脱结果

经超滤截留分子量大于10KD的FCGM经Sephadex-G75凝胶层析得到I、II两个明显不同的洗脱峰(图1)。

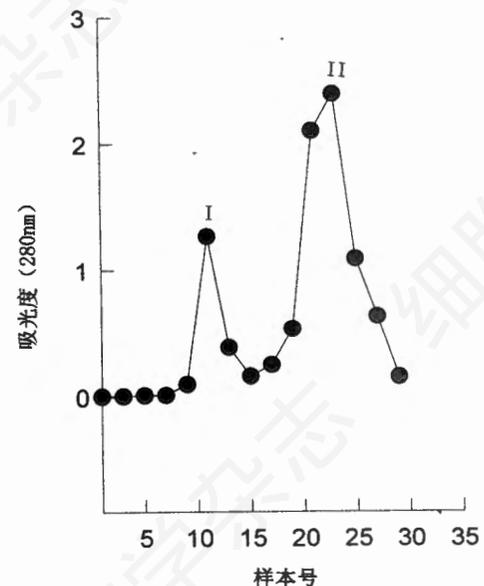


图1 FCGM的Sephadex G75凝胶层析洗脱图谱

2. HPLC分析结果

Sephadex-G75凝胶层析的I峰,再行HPLC分

析,得出5个洗脱峰,出峰时间分别是:36.53 min, 42.50 min,64.88 min,69.92 min,74.23 min(洗脱液的流速是0.2 ml/min)(图2)。将已行半制备高效液相色谱分析I峰(活性峰)洗脱透析、浓缩,再行高效液相色谱分析,结果获单一峰(洗脱液的流速是0.3ml/min)(图3)。用该单一峰物质行 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳),以标准蛋白质作对照,可知该单一峰中含有数种物质,分子量在25-35 KD之间(图4)。

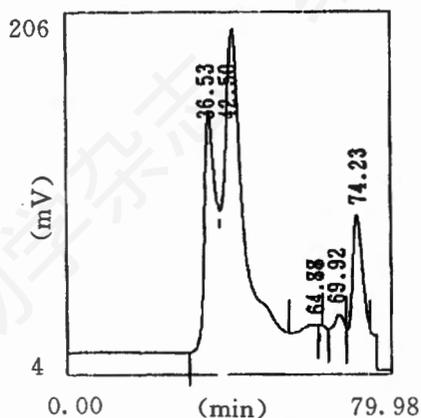


图2 Sephadex G75 凝胶层析 I 峰液 HPLC 洗脱图谱

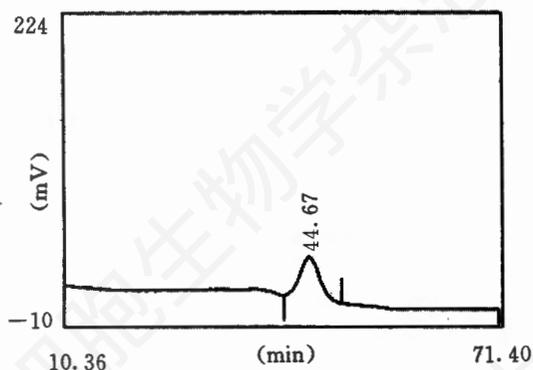


图3 HPLC I 峰液的再次 HPLC 洗脱图谱

3. FCGM 对心肌细胞增殖和³H-Leu 掺入影响

采用 MTT 定量分析方法,观察截留分子量大于 10 KD 的 FCGM 对心肌细胞作用,与无血清 DMEM 对照组比较有显著性意义($P < 0.01$,表 1)。

表 1 分子量 >10 KD 及分子量 <10 KD 的 FCGM 对心肌细胞活力的作用($\bar{X} \pm SD$, 15 μ l/孔, n=24)

Group	OD 值	P 值
无血清 DMEM	0.1985 \pm 0.024	
>10KD FCGM	0.2734 \pm 0.009	<0.01
<10KD FCGM	0.2100 \pm 0.021	>0.05

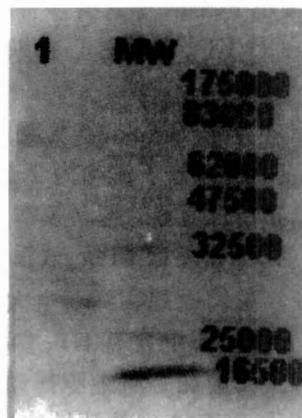


图4 SDS-PAGE 图谱
第1泳道:提纯物,MW:标准蛋白

截留分子量大于 10 KD 的 FCGM 对心肌细胞 [³H]-Leu 掺入作用,与无血清 DMEM 对照组比较有显著性意义($P < 0.01$,图 5)。

因此,通过 MTT 测定和 [³H]-Leu 掺入实验,表明 sephadex-G75 凝胶层析的 I 峰具有对心肌细胞的生物活性。

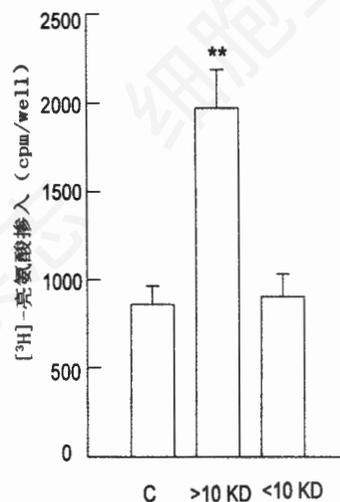


图5 分子量 >10 KD 及分子量 <10 KD 的 FCGM 对心肌细胞 [³H]-Leu 掺入的作用

讨 论

我们证实新生大鼠心室成纤维细胞条件培养液 (FCGM) 能促进心肌细胞肥大^[3]、增加心肌细胞搏动频率^[4],其成分中含有内皮素 (endothelin, ET) 等活性物质。为了鉴定 FCGM 中的活性物质,我们对 FCGM 进行超滤浓缩、凝胶过滤及高效液相技术分离纯化,同时用 MTT 定量分析方法和 [³H]-Leu 掺

入率测定方法观察了活性成分对心肌细胞的营养作用。实验结果显示 FCGM 中含有多种活性物质,分子量在 25 KD - 35 KD,它们对心肌细胞具有营养作用。

1997年,日本学者 Suzuki 等发现,心室成纤维细胞条件培养液中含有分子量均为 2.5 KD 的两组活性成分,能增加心肌细胞的搏动频率,该作用能被 ET_A 受体阻断剂 FR139317 阻断,表明心室成纤维细胞能分泌 ET。我们也观察到新生大鼠心室成纤维细胞分泌的活性物质中含有 ET,参与 FCGM 促进心肌细胞肥大^[4]、增加心肌细胞搏动频率^[5]。然而,我们分离纯化 FCGM 中的活性物质时,分子量 10 KD 以下的蛋白质都对心肌细胞的肥大反应和增殖不起作用。内皮素的分子量为 2.4 KD,而我们用 ET_A 受体阻断剂 BQ₁₂₃ 的实验证实,FCGM 对心肌肥大作用和成纤维细胞增殖作用与 ET-1 有关。为什么 FCGM 分离纯化出来的分子量在 10 KD 以下的蛋白质(理应包含 ET)却无明显的促心肌肥大反应和成纤维细胞的增殖作用?对这一矛盾的结果我们尚无法满意解释,有待于进一步探讨。一个可能的原因是,ET 可能与大分子蛋白质结合在一起,形成大分子的复合物,使分子量增大,因而在滤过时包含在 10 KD 以上的大分子量的蛋白质中;另外目前,国内外对心脏局部分泌的生长因子和细胞因子的研究较多,但它们的纯化还没有一个统一的方法。我们采用 HPLC 这一目前较先进的生化分析分离技术,对 FCGM 进行提纯,从实验结果来看,蛋白峰之间仍存在着不同程度的重叠。由于只有获得一定的质和量的纯品,才能满足对蛋白质的结构、活性、生理功能实验研究的要求。而蛋白质又具有严格的构象和热稳定性差,对环境 pH、重金属敏感的特点,易引起蛋白质的失活。因此,既能高效、快速地分离纯化蛋白质,又尽可能保持蛋白质生物活性则成为目前蛋白质纯化的重要课题。尽管 HPLC 是目前蛋白质分离纯化的较高级技术之一,但在使用

HPLC 纯化蛋白质时,常常需要同其他技术结合并用,如超速离心、超滤、盐析、有机溶剂沉淀、经典的柱层析以及电泳技术等,因为没有两种蛋白质可以用相同方法提纯到同一程度,必须综合使用几种方法才能制备出一种纯化的生物大分子^[5]。至于如何编排纯化步骤的顺序,到目前为止尚无统一的规定,必须按照待分离蛋白质的性质而设计。

摘 要

收集 FCGM,用 0.2 μm 微孔滤膜除去细胞碎片,再经 Diaflo-YM-10 滤膜超滤浓缩,截留分子量大于 10 KD 的 FCGM,行 Sephadex-G75 凝胶层析,得到 I、II 两个洗脱峰。经生物学鉴定,证明 I 峰洗脱液具有明显的心肌营养活性。将凝胶层析 I 峰洗脱液透析、浓缩,行 PAK200SW 高效液相色谱分析,结果得到五个不同的洗脱峰。经生物学鉴定,第 I 峰具有生物活性。将已行半制备高效液相色谱分析 I 峰洗脱液透析、浓缩,再行高效液相色谱分析,结果获单一峰。用该单一峰物质行 SDS-PAGE 电泳,以标准蛋白质作对照,可知该单一峰中含有数种物质,分子量在 25 - 35 KD。

关键词: 心肌细胞 成纤维细胞 [³H]-亮氨酸 MTT
Sephadex-G75 凝胶层析 高效液相色谱

参 考 文 献

- [1] Long CS, Henrich CJ, Simpson PC. 1991, A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Reg*, 2:1081 - 1095.
- [2] An autocrine or paracrine role of adrenomedullin in modulating cardiac fibroblast growth. *Cardiovasc Res* 1999; 43(4): 958 - 967.
- [3] 龚素珍、刘培庆、潘敬运等。2000, 新生大鼠心室成纤维细胞条件培养液促进心肌细胞肥大的作用。生理学报, 52(1):34 - 38.
- [4] 龚素珍、刘培庆、潘敬运等。2000, 新生大鼠心室成纤维细胞条件培养液增加心肌细胞搏动频率的作用。中国应用生理学杂志 16(2):153 - 157.
- [5] 李建武、肖能庚、余瑞元等。1994, 生物化学原理和方法, 第一版, 北京大学出版社, p12 - 16.

PURIFICATION AND EFFECTION OF CARDIOTROPHIC PROTEINS SECRETED BY VENTRICULAR FIBROBLASTS

GONG Su Zhen GU Xiong Fei* HE Guang Yao* LIU Pei Qing** PAN Jing Yun**

(Research Institute of Neurosciences Guangzhou Medical

College Guangzhou 510182 * Department of Biochemistry ** Department of
Physiology Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510089)

ABSTRACT

Fibroblasts conditioned growth medium (FCGM) was collected after culture of three days. It was removed debris of cells using 0.2

μm filters, and then ultrafiltrated and concentrated by Diaflo YM-10, so the fraction of molecular weight (MW) > 10 KD from FCGM was obtained. FCGM of MW > 10 KD was separated by gel filtration through Sephadex G75 column at 4°C . Two fractions of peak I and II were collected and bioassayed respectively. The fraction I was identified to possessed cardiotropic activity. Above mentioned biologically active fraction I was dialysed, concentrated, and then further purified by high performance liquid chromatography (HPLC). The five elutions of Peak were obtained and the first fraction was identified to be of biological activity. The elution of peak I, which was dialysed and concentrated, was applied to the high performance liquid chromatography column again, Protein peak was detected and gained only one elution peak. Elution protein of peak I of HPLC was analysed by SDS-PAGE. Contrast to the standard proteins, several substances were found in the one elution peak and their MWs were between 25 - 35 KD.

Key words: Cardiomyocytes Fibroblasts [^3H]-Leu MTT Sephadex G-75 gel filtration High pressure liquid chromatography (HPLC)

不同因素对大鼠卵母细胞孤雌激活作用影响的研究

谭信^{*,**3} 李光鹏^{*} 孙青原^{*} 廉莉^{*} 王永潮^{**2} 陈大元^{*1}

(* 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080

** 北京师范大学细胞增殖与调控生物学教育部重点实验室 北京 100875)

卵母细胞激活研究是发育生物学的一项基本课题。研究不同理化因素对卵母细胞的激活作用和过程既有利于对诸如激活过程的信号偶联过程、激活动力学、细胞周期阻滞的恢复等生理机制的深入了解,也有利于解决胚胎细胞核移植过程中卵母细胞的激活这一关键问题。目前已知,机械、温度、渗透压及电刺激等物理因素以及酶、氢离子、二价阳离子、钙离子载体、乙醇、蛋白质合成抑制剂等化学因素均能有效激活卵母细胞^[1,2]。这些因素涉及到许多不同的激活机理。其中细胞内钙离子浓度及其变化样式对激活过程起到关键的作用^[3],由蛋白质合成抑制所引起的细胞静止因子(CSF)的某些组分缺乏也是影响卵母细胞激活的一个因素^[4]。目前对卵母细胞激活虽然已有一些研究,但对大鼠卵母细胞孤雌激活的研究却很少且缺乏系统性^[5,6]。本实验研究了电激、乙醇、蛋白质合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide, CHX)、二价阳离子氯化锶(SrCl_2)等因素对大鼠卵母细胞的激活作用,以及卵龄和卵丘细胞对大鼠卵母细胞孤雌激活的影响,为哺乳动物孤雌生殖的研究和提高胚胎细胞核移植的成功率提供参考依据。

材料和方法

1. 卵母细胞的获得

对4周龄SD大鼠进行光控饲养(6:00-20:00光照;20:00-6:00黑暗)。腹腔注射PMSG 20IU/只,48-54小时后腹腔注射hCG 20IU/只。于次日按hCG注射后所需时间处死动物,取输卵管。于M2培养液中划破输卵管壶腹

部,将卵丘-卵母细胞复合体(COC)轻轻挤出。用透明质酸酶(300IU/ml溶于M2培养液中)去除卵丘细胞。再经M2培养液洗涤3次以上后进行激活处理或体外培养。一部分COC不经透明质酸酶处理直接进行激活或体外培养。

2. 激活前后的体外培养

COC或去除卵丘细胞的卵母细胞于激活处理后在添加4mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的DMEM培养液(DMEM/BSA)中培养8小时后进行激活鉴定。部分实验中COC或去除卵丘细胞的卵母细胞于激活前在上述培养液中先培养一段时间再行激活。

3. 激活处理

(1) SrCl_2 先用0.9%生理盐水将 SrCl_2 配制成16mmol/L和30mmol/L的贮存液,使用前加入无钙M2培养液稀释到所需浓度^[7]。以不同时间,不同浓度激活处理卵母细胞或COC,用无钙M2培养液洗涤4至5次后培养观察。

(2) 乙醇 用M2培养液将无水乙醇稀释至8%浓度,激活处理卵母细胞或COC 8分钟,用M2培养液洗涤4至5次后转入培养液进行培养并观察。

(3) 电刺激 取去除卵丘细胞的卵母细胞,先用无钙M2培养液洗涤一次,再移至电融合液(0.3 mol/L甘露醇,0.1 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05mmol/L CaCl_2)中。吹吸数次使其沉入溶液底部。取自制电融合板,在相距1.2mm的电极丝之间滴上电融合液,将卵母细胞置于其中。给予一定强度的电刺激后,用无钙M2培养液洗涤3至4次后培养观

本文2000年8月29日收到,2001年3月19日接受。

致谢:本文由预攀登计划(编号:970211019-2)及中国国家重大基础研究项目(G1999053901)资助。

*1第一联系人。 **2第二联系人。 **3现工作单位:首都医科大学