

核>胞液,TPK为胞核>膜性>胞液。EBV和EBV+TPA再感染CNE-2Z细胞后,抑制细胞增殖,同时胞液PKC和TPK活性升高,膜性和胞核TPK和膜性PKC活性降低。本研究结果提示,EBV可能通过影响不同细胞组分中PKC和TPK活性来调节CNE-2Z鼻咽癌细胞的增殖。

关键词:鼻咽癌细胞株 Epstein-Barr病毒
蛋白激酶 增殖

参 考 文 献

- [1] Nemrow, GR. et al., 1981, *J. Immunol.*, 127:272.
- [2] Hedric, JA. et al., 1992, *Eur J Immunol.*, 22:1123.
- [3] 黄谨, 1992, 白求恩医科大学学报, 18(4): 395.
- [4] Wong, WT. et al., 1983, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80:2529.
- [5] Krug, E. et al., 1987, *Cancer Res*, 47:22436.
- [6] Wray, W. et al., 1970, *Exp Cell Res*, 59: 469.
- [7] Kong, SK. et al., 1987, *Bio Chem*, 262: 2597.
- [8] 吴锋, 赵明伦, 1995, 中华肿瘤杂志, 17(增刊):22.
- [9] Li QX, et al., 1992, *Nature*, 356:347.
- [10] 陈南岳, 1991, 生物化学与生物物理学进展, 10(4):269.
- [11] Murphy, CT. et al., 1995, *Biochemical Society Transactions*, 23:194.

THE EFFECT OF EPSTEIN-BARR VIRUS INFECTION ON THE ACTIVITIES OF PROTEIN KINASE C AND TYROSINE PROTEIN KINASE IN DIFFERENT SUBCELLULAR FRACTIONS OF CNE-2Z CELL LINE IN VITRO

LI Yan Song* CHEN Xiao Yi** SUN Ning** SHEN Shu Jing**

(* Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524001.

** Department of Pathology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524023)

ABSTRACT

In order to explore the effect of EBV infection on the activities of protein kinase C(PKC) and tyrosine protein kinases (TPK) in different subcellular fractions of CNE-2Z cell line in vitro. Polymerase chain reaction (PCR), immunocytochemical staining, MTT assay and kinase assay were employed in our experiment. The results showed that in vitro EBV can reinfect CNE-2Z cell line (positive rates of early antigen from group E and ET were markedly higher than of early antigen from group C.). After reinfection by EBV and EBV combined with TPA, OD value of MTT of group E and group ET were distinctly lower than that of control group ($P < 0.01$). It was found that in group C the activity of PKC was membranous > nuclear > cytosolic; the activity of TPK was nuclear > membranous > cytosolic. After treatment with EBV and EBV combined with TPA, the membranous and nuclear TPK and membranous PKC were obviously decreased. The cytosolic PKC and TPK were significantly elevated. Our study suggested that the proliferation of CNE-2Z cells infected by EBV and EBV combined with TPA is related to the changes of PKC and TPK activities in three different subcellular fractions in vitro.

Key words: Epstein-Barr virus Nasopharyngeal carcinoma Protein kinase Proliferation

微血管内皮细胞的分离、纯化、鉴定及基因转移的研究

苏 宁 严 航 李 懿 萍

(南京铁道医学院病理教研室 南京 210009)

血管内皮细胞位于血液和组织之间,除了构成完整的血管内膜、维持血管内、外液体平衡外,随着生物学研究的进展,尚发现它能分泌多

种生物活性物质,在凝血、炎症、修复等病理过

本文1999年3月5日收到,11月2日接受。

程中起重要作用。微血管内皮细胞的分离及体内外基因转移国外已有报道,国内较少,主要是集中在分离大血管内皮细胞或脐静脉内皮细胞^[1],分离肺微血管内皮细胞的报道不多。本文就小鼠肺微血管内皮细胞(MLMEC)的分离、纯化、鉴定和基因转移作一简要报道,为研究肿瘤间质血管、肿瘤转移机理及微血管在其他病理状况下的作用提供体外模型。

材 料 和 方 法

一、培养液、消化液及清洗液

培养液为 M-199,添加 20% 胎牛血清(FBS),表皮生长因子 $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (sigma 公司),肝素 $5\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, 抗生素-抗霉菌素混合液(简称抗生素混合液,内含青霉素 $100\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、链霉素 $100\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、二性霉素 $2.5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$),谷氨酰胺 $4\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Biofluid 公司,美国)。消化液用 D-PBS(含钙、镁)配制,含 0.2% 胶原酶(IA 型, Worthington 公司,美国),0.5% 牛血清白蛋白(BSA),并添加 DNA 酶、HEPES $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。清洗液为 M199,添加 10% FBS、0.5% BSA、HEPES、谷氨酰胺、抗生素混合液。

二、MLMEC 的分离和原代培养

无菌条件下取出 8—10 周龄的 C57BL/6 小鼠肺组织,去除气管、支气管及其主要分枝后剪成 $1-2\text{mm}^3$ 大小。PBS 洗后加入消化液, 37°C 水浴内震荡 30 分钟^[2]。消化的组织悬液通过 $100\mu\text{m}$ 孔径尼龙膜,收集滤液离心、洗后置于 45% Percoll(Pharmacia 公司)表层,离心(3000rpm , 4°C , 30 分钟)后收集上 $1/10-1/3$ 组分的悬液, PBS 洗 2 次,置入预先用纤维连接蛋白($2\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 培皿, Gibco 公司,美国)复盖的培皿内静置培养 20 小时。次日用清洗液轻洗,去除红细胞及未贴壁细胞,继续培养 5 日,其间换液 1 次。

三、MLMEC 的纯化和鉴定

1. 纯化 MLMEC 采用 LDL-FACS 法^[3]纯化 MLMEC。简述如下:自培养皿内移去培液加入新鲜培液,内含罗丹明标记的乙酰化低密度脂蛋白(RB-DiL-Ac-LDL) $10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 37°C 培养 4 小时。PBS 洗 2 次后胰酶消化,制成单细胞悬液,经 FACS 后收集带荧光的细胞,此即 MLMEC。人脐带静脉血管内皮细胞(HU-VEC, ATCC, 美国)及 NIH3T3 细胞同法处理作为阳性及阴性对照。

2. 免疫荧光法鉴定 MLMEC (1) DiL-Ac-LDL 摄取法。生长在盖玻片上的细胞与 RB-DiL-Ac-LDL 培育 4 小时后移去染液,加入 3% 中性福尔马林,常温固定 20 分钟, PBS 洗后干燥, 90% 甘油封片, 荧光显微镜检查、拍照。(2) 检测血小板内皮细胞粘附分子(PECAM-1/CD31, 美国 VECTOR 公司)表达。生长在盖玻片上的细胞经冷丙酮 4°C 固定 5 分钟后,依次与大鼠抗小鼠 PECAM、荧光素标记的抗大鼠 IgG(Vector 公司, 美国)室温孵育 30 分钟^[4]。余同上法。

四、HSV-TK 基因转移及对 ganciclovir (GCV) 敏感性测定

1. HSV-TK 基因转移 HSV-TK 基因已转入包装细胞 PA317 内(Freeman 惠赠)^[6]。每毫升 PA317 转染细胞上清内病毒滴度为 10^6 集落形成单位。采用感染法将 HSV-TK 基因导入 MLMEC 内。新霉素抗性基因为选择标记。耐 $G418(100\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$ 生长的细胞命名为 MLMEC/TK。

2. GCV 敏感性测定 采用 XTT 法体外测定转 TK 基因细胞对 GCV (Syntex, 日本) 的敏感性。MLMEC/TK、MLMEC 细胞分别置于 96 孔板内(5×10^3 孔),培养过夜,总容积 $200\mu\text{l}$ 。第二天移去培液置入含不同浓度 GCV($0-10\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)的新鲜培液,继续培养 2—8 天,其间每三天换液一次,加入同前浓度的 GCV。培养结束前 4 小时每孔内加入 XTT/PMS^[6](Polysciences, 美国)混合液体 $200\mu\text{l}$ 。培养结束显微分光光度计阅读每孔 OD_{450} 值。细胞对 GCV 的敏感性以细胞存活率表示,用下列公式计算。细胞存活率(%) = (加 GCV 细胞的 OD 值 ÷ 未加 GCV 的同种细胞的 OD 值) × 100。敏感性越高,细胞存活率越低。所有细胞一式三孔,结果表示为 $X\pm SD$ 。

五、DNA PCR

收集培养细胞,提取转导及未转导细胞基因组 DNA^[7]。 $0.5\mu\text{g}$ DNA 在 taq 多聚酶, TK 引物对^[8]作用下扩增 30 周期(94°C 变性 45 秒, 60°C 退火 45 秒, 72°C 延伸 2 分)。PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。 β -actin(按 Clontech 公司序列合成)引物对扩增产物作为每份标本 DNA 用量对比。

结 果

一、原代细胞的特征

肺组织经胶原酶消化后置于培皿, 12 小时后 MLMEC 开始生长, 72 小时细胞生长活跃,

形成由数个到数十个细胞组成的集落,此后集落体积迅速增大,细胞数增多(图版 1A、1B)。MLMEC 细胞为多边形、卵圆形或仿锤形,相嵌排列。原代培养内尚见其它形态的细胞,散在分布或呈集落状。

二、FACS 纯化及免疫荧光染色

1. FACS 原代培养细胞在 LDL-FACS 分类时出现双峰,左峰与 3T3 波峰重叠、右峰荧光较 HUVEC 为强,收集此峰细胞继续培养。此峰细胞通常占有原代细胞数的 25%—50%(图 1)。经 FACS 后细胞纯度通常近 100%,细胞形态基本同前,此外尚见胞浆延伸、胞体略有弯曲的细胞,(图版 1D)。

2. 免疫荧光 MLMEC 经 RB-DiI-Ac-LDL 染色、固定后荧光显微镜下胞浆内有多量桔红色颗粒(黑白照片中为亮点,图版 1C、1F)。细胞经 PECAM 染色固定后镜下见细胞接触处呈亮绿色,使细胞轮廓清晰可见(图版 1E)。其他类型的细胞不显荧光。

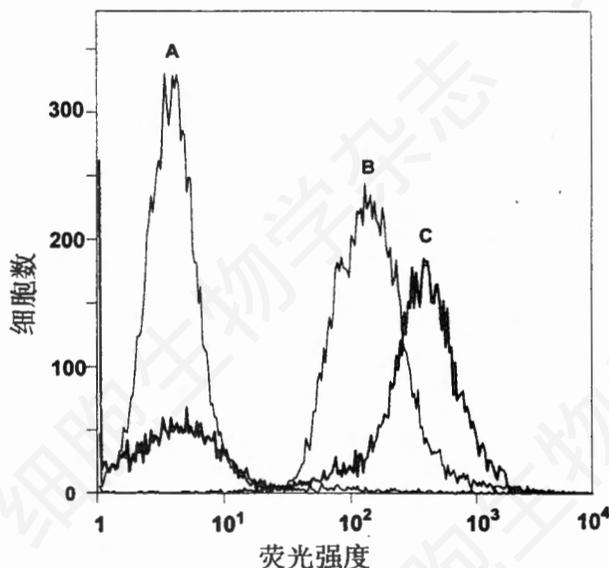


图 1 原代培养细胞 LDL-FACS 分析
A. NIH3T3 细胞(阴性对照)。
B. HUVEC(阳性对照)。
C. MLMEC 原代培养细胞。

三、细胞自杀效应及 TK 基因整合

1. 细胞自杀效应 培养的 MLMEC/TK 细胞加入 GCV 后细胞存活率降低,并呈剂量相关性。MLMEC/TK 在含 $0.01\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ GCV 的培液内生长 48 小时,细胞存活率降低约 10%,在含 $5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ GCV 的培液内生长 8 天,仅有 2% 细胞存活,无 HSV-TK 基因的 MLMEC 存活率高于 86%,二者有显著性差异 ($P < 0.01$)。从剂量反应曲线中测得引起 50% MLMEC/TK 细胞死亡 (ID_{50}) 的 GCV 浓度在培养 72hr、5 天、8 天分别是 $6.7\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $0.06\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 、 $<0.01\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (图 2)。

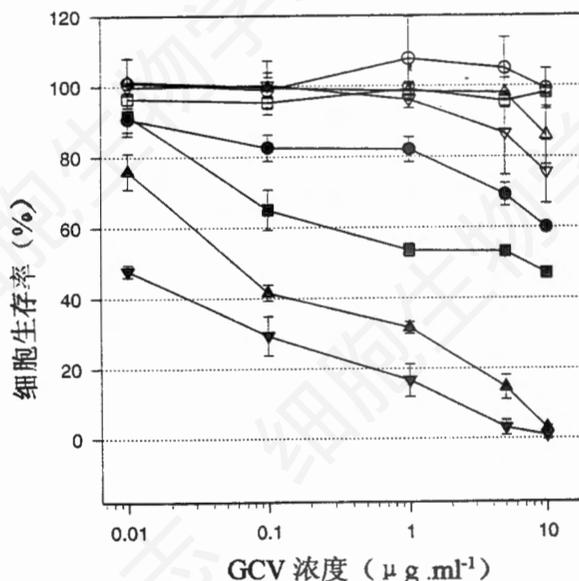


图 2 体外 GCV 敏感性测定
●■▲▼ 分别代表 MLMEC/Tk 细胞以 GCV 处理 48h、72h、5d、8d 时的生长状况。各空心图标为相应处理的 MLMEC 生长状况。

2. TK 基因整合 带 TK 基因的 MLMEC/TK 及 HUVEC/TK 细胞 DNA 在 taq 多聚酶及 TK 引物对作用下扩增 30 周期,琼脂糖凝胶电泳可见 327bp 的扩增产物,无 TK 基因的 MLMEC 细胞未见 PCR 产物(图 3)。

讨 论

血管内皮细胞位于血液和组织之间,随着

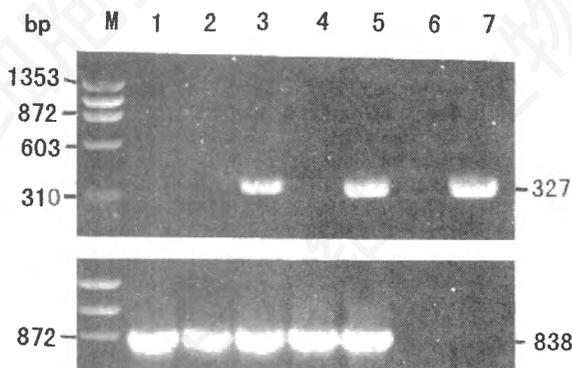


图 3 DNAPCR 琼脂糖凝胶电泳结果

M. 分子量标准

1. HUVEC, 2. HUVEC/空白载体,
3. HUVEC/Tk, 4. MLMEC,
5. MLMEC/Tk, 6. H₂O 代替 DNA,
7. HSV-TK 质粒 DNA。

生物学研究的进展,血管内皮细胞除了构成完整的血管内膜、维持血管内、外液体平衡,还能分泌具有生物活性物质,如硫酸乙酰肝素、纤维蛋白溶解酶原激活因子等,在抗凝血,炎症,修复等生物反应中起重要作用。基因工程技术用于医学以来,以逆转录病毒或腺病毒为载体将目的基因转入血管内皮细胞,可望成为先天性、后天性疾病的治疗方法之一。肿瘤间质内的血管则对肿瘤的生长和转移起重要作用^[9],因而可用以研究肿瘤生长和转移的机理。微循环在体内拥有广大的面积,肺又是体内微血管最丰富的器官,成功的分离、纯化对研究微血管内皮细胞的生物学特点有重要意义。

在分离 MLMEC 时胶原酶仍是有效的解离组织的试剂,但是如何将原代培养细胞中的 MLMEC 和其他细胞,特别是成纤维细胞分离是培养能否成功的关键。机械法或免疫磁珠法虽能得到较为纯化的 MLMEC,但混杂其内的少量成纤维细胞的生长、蔓延将导致培养失败(资料未示)。本研究中采用 LDL-FACS 法,其机理为 MLMEC 有 LDL 受体,除间皮外其他细胞则缺乏这一受体。LDL 已用荧光素-罗丹明标记,从而摄取 LDL 的细胞可被 FACS 识

别,将其与其他细胞分开。由于间皮细胞与血管内皮细胞起源于同一胚层,难以通过 LDL 的摄取将两者区别,需用血小板内皮细胞粘附分子作进一步鉴别,PECAM 是血管内皮细胞和血小板特有的免疫标记。

本研究不但成功地分离、纯化微血管内皮细胞,而且将 HSV-TK 基因转入 MLMEC。DNA-PCR 提示 HSV-TK 基因已整合到 MLMEC/TK 细胞基因组内,从而在 TK 引物对作用下扩增 30 周期,琼脂糖凝胶电泳可见 327bp 的扩增产物,无 TK 基因的 MLMEC 细胞未见 PCR 产物。体外 GCV 敏感性测定试验的结果也证实这点。HSV-TK 基因编码的胸苷激酶(Thymidine kinase, TK)能将无毒的前药 GCV 转化为有毒的磷酸化 GCV (pGCV)从而阻断携带 TK 基因的细胞合成 DNA,细胞生长受抑或自杀死亡。MLMEC/TK 细胞在添加 GCV 的培液内生长不良,其存活率随 GCV 浓度加大、培养时间延长而降低,提示 TK 基因已转入 MLMEC 细胞内。GCV 对无 TK 基因的 MLMEC 细胞则无毒性作用。上述结果显示目的基因可以转入微血管内皮细胞,用于基因治疗的研究。

摘 要

用胶原酶消化,梯度离心,LDL-FACS 法分离及纯化小鼠肺组织微血管内皮细胞 (MLMEC),并根据细胞形态及间接免疫荧光法加以鉴定。纯化后的 MLMEC 形态为多边形、短梭形,呈鹅卵石样排列;它能摄取 RB-DiL-Ac-LDL,从而胞浆内出现亮红色颗粒;用抗 PECAM 抗体间接免疫荧光染色后细胞接触处呈亮绿色,细胞轮廓清晰可见。用感染法将 HSV-TK 基因转入 MLMEC 细胞内,用 XTT 法显示携带有 HSV-TK 基因的 MLMEC/TK 细胞对 GCV 敏感,引起自杀效应。该分离、纯化及基因转移方法的建立将为研究 MLMEC 在各种病理状况下的作用及作为基因治疗的载体提供体外模型。

关键词: 肺微血管内皮细胞 体外培养
小鼠 基因转移

参 考 文 献

- [1] 王琪等, 1991, 细胞生物学杂志, 13(1): 31-34.
 [2] Folkman J., et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5217-5221.
 [3] Voyta JC., et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 99: 2030-2040.
 [4] Nicosia RF., et al., 1994, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 30A: 394-399.
 [5] Freeman SM., et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 5274-5283.
 [6] Scuciero DA., et al., 1988, *Cancer Res.*, 48: 4827-4833.
 [7] Yancopoulos GD., 1990, In *Methods for cloning and analysis of eukaryotic genes*, ed by Bothwell AL., et al., pp3-7, Jones and Bartlett publishers, Boston.
 [8] Rong BL., et al., 1991, *Invest. Ophthalmol. & Visual Sci.*, 32(6): 1808-1816.
 [9] Florence P., 1998, *Human Gene Therapy*, 9: 768-770.

A STUDY ON THE SEPARATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF MOUSE MICRO-VASCULAR ENDOTHELIAL CELL AND THE GENE TRANSFER

SU Ning YAN Hang LI Yi Ping

(Department of Pathology, Nanjing Railway Medical Collage, Nanjing. 210009)

ABSTRACT

Mouse lung micro-vascular endothelial cell (MLMEC) was isolated and purified with the methods of collagenase digestion and LDL-FACS. The characterization of MLMEC was confirmed base on the morphology and indirect immunofluorescence technology. Morphologically, MLMEC was polygonal, cuboidal, with cobblestone pattern, all cells took up RB-DiL-Ac-LDL that imparted brightly red granular fluorescent in their cytoplasm. For indirect immunofluorescence technology, the MLMEC bound the PECAM antibody to show the green fluorescent, which highlights their intercellular contacts to make the cell contour clear. With the method of infection, the HSV-TK gene was transferred to MLMEC. The sensitivity of TK gene transferred cell to GCV has been tested with XTT. The methods allowed the production of pure MLMEC and transfer in this study that may prove a useful model *in vitro* for study of the role of MLMEC in pathologic states and as a vehicle for gene therapy.

Key words: Lung micro-vessel endothelia cell Culture *in vitro* Gene transfer Mouse

带培养室的倒置显微镜下人雪旺细胞形态和运动的观察

杨 勤 邱云芳 汪 洋* 沈馨亚 刘才栋

(上海医科大学解剖学教研室 上海 200232)

*中科院上海生理研究所神经生物学开放研究实验室 上海 200031)

雪旺细胞因为在周围神经损伤后的修复及促进中枢神经再生方面所具有的独特功能而引起国内外学者的极大关注^[1]。其中雪旺细胞的迁移途径、方式、信号机制等与神经的发育及神经损伤后的再生有着密切的联系。迄今为止,由于条件限制,较难对雪旺细胞的立体迁移作动态观察。我们曾对大鼠雪旺细胞在立体网架上的迁移作了探讨^[2]。但是,在体外培养条件下显示人雪旺细胞在三维结构上的迁移方式,国内外尚无报道。本文将培养在聚酯纤维上的人胎

儿雪旺细胞置于带二氧化碳培养室的倒置相差显微镜下,对细胞的运动和形态作连续观察,探讨雪旺细胞形成周围神经髓鞘的机制。

材 料 和 方 法

引产的4月龄人胎儿,无菌条件下取出坐骨神经,在解剖显微镜下仔细剔除神经外膜和束膜及表面的血管,以减少成纤维细胞的污染。用D-Hank's液漂洗神

本文1999年3月27日收到,7月9日接受。