

合蛋白 D-9k 在着床中的功能和子宫内膜 Ca^{2+} 信号转导奠定了基础。

关键词: 钙结合蛋白 D-9K 大肠杆菌
克隆和表达 多克隆抗体

参 考 文 献

- [1] Inpanbutr, N. et al., 1994, *Biology of Reproduction*. 50:561-571.
[2] Stachecki, J. J. and Armant, D. R., 1996, *Development*. 122:2485-2496.
[3] Sakoff, J. A. and Murdoch, R. N., 1994,

Journal of Reproduction and Fertility. 101: 97-102.

- [4] Jun Wang, et al., 1998, *Development*. 125: 4293-4302.
[5] 申庆祥等, 1995, 生物化学与生物物理学报, 27(2):129-136.
[6] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor Laboratory, Press, U. S. A. .
[7] 徐宜为, 1991, 《免疫检测技术》第六章“免疫酶技术”, 科学出版社.

THE CONSTRUCTION OF PROKARYOTIC EXPRESSION VECTOR FOR THE GENE ENCODING THE CALCIUM BINDING PROTEIN D-9K, PURIFICATION OF THE EXPRESSED PRODUCT AND PREPARATION OF ITS POLYCLONAL ANTIBODY

KE Bi Xia* WANG Jian SHEN Wei Ying GAO Jian Min* SHEN Qing Xiang
(Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai, 200032;
* Biological Engineering College, Fu Jian Teacher's University, Fu Zhou, 350007)

ABSTRACT

The expression plasmid pBV220/CabpD-9K- β hCG was constructed, then was transferred into *E. Coli* TG-1 to express the fusion protein CabpD-9K- β hCG. The result of SDS-PAGE showed that CabpD-9K- β hCG had an apparent molecular weight of 34.5KD. Western blot analysis indicated that the product CabpD-9K- β hCG could be recognized specifically by the rabbit-anti-human hCG IgG. Finally we immunized C57 BL mouse with the purified fused protein to acquire the polyclonal antibody which would lay a foundation of the study on the CabpD-9K function and endometrial calcium signal transduction.

Key words: Calcium binding protein D-9K *E. coli* Cloning and expression Polyclonal antibody

诱导嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*) 细胞凋亡样变化的研究

艾斯卡尔·依米提

庞延斌

(新疆维吾尔自治区维吾尔医研究所 乌鲁木齐 830001)

(华东师范大学生物系 上海 200062)

细胞凋亡(apoptosis)即程序性细胞死亡(Programmed Cell Death)是一种细胞生理性死亡形式,在活体组织中的细胞可以通过细胞凋亡消亡,不致引起周围细胞的损伤。细胞凋亡是一个主动过程,它是机体在生理条件下受刺

激后经过多种途径的信号传递导致细胞产生一系列形态和生物化学方面的改变而引起的细胞死亡,与创伤和疾病引起的坏死(Necrosis)是不相同的^[1,2]。

本文 1999 年 9 月 1 日收到,2000 年 4 月 28 日接受。

有关研究四膜虫凋亡的报道在国内外文献中极少见到。此项研究中,我们以能诱导哺乳类细胞凋亡的药物处理对数生长期的单细胞原生动物嗜热四膜虫(培养36小时),并培养一段时间(半小时起)后提取核DNA对其进行了琼脂糖凝胶电泳定性分析,同时用流式细胞仪对细胞周期核DNA进行了定量分析,并对四膜虫的形态及核染色体变化进行了观察。通过上述实验我们想了解嗜热四膜虫的凋亡机制是否与高等多细胞有机体有相似之处。

材料与方 法

1. 材料

嗜热四膜虫购自美国动物养殖中心编号为 ATCC 357。接种于含1000ml水,5.0g 脲蛋白胨,5.0g 胰蛋白胨,0.2g K_2HPO_4 ,100 μ g/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素的完全营养培养基中,在光照培养箱内37 $^{\circ}$ C培养,每三天换液传代。

2. 实验试剂及溶液

琼脂糖(电泳用)Serva公司,地塞米松(9- α -氟-16-甲基脱氢皮质醇, Dex)Sigma公司,用纯酒精配成1mg/ml 4 $^{\circ}$ C保存待用。放线菌素D(ActD)Serva公司,用纯酒精配成1mg/ml,外包箔片-20 $^{\circ}$ C保存。碘化丙啶(PI)Sigma公司(PI 20 μ g/ml Tripton-x100 1%,NaCl 0.9%)。高三尖杉脂碱(HHT),中国医学科学院试验药厂生产。

3. 药物处理

地塞米松处理(5 μ g/ml、10 μ g/ml、25 μ g/ml)时间间隔从药物处理半小时至7小时,每半小时收集细胞一次并用于实验,并在20ml培养基里加1ml $CaCl_2$ 与 $MgCl_2$,各自终浓度分别为 5×10^{-5} mol/L。ActD及高三尖杉脂碱(5 μ g/ml、10 μ g/ml、50 μ g/ml)处理24小时。细胞培养液体积为20ml,细胞密度大于 5×10^5 cell/ml。

4. 细胞形态学观察

将培养了36小时的对数生长期细胞离心收集并滴在载玻片上,加一滴Protosto液(原生动物运动阻滞剂),盖好盖玻片,在相差显微镜下观察。

5. 细胞核总DNA的提取

细胞核总DNA按“分子克隆实验指南”方法提取。

6. 电泳

取20 μ l核DNA样品加5 μ l含溴酚兰的样品缓冲液,以 λ DNA/HandIII Markers(华美生物工程公司产

品)做标准分子量对照,0.5 \times TBE电泳缓冲液,胶浓度为1.6%,室温下以3V/cm的条件电泳2.5小时,电泳后用溴化乙锭染色15分钟,水冲洗2分钟,在紫外透射仪下观察并拍照。

7. 细胞染色及流式细胞仪(FACS)检测

流式细胞仪(BECTON DICKENSON公司,FAC-Scan型)样品用PI染色后上机记录。激光波长为488nm,打印并分析其结果。

结果与分析

1. 嗜热四膜虫细胞凋亡的诱导及细胞形态观察

不同的诱导凋亡的药物处理对数生长期嗜热四膜虫细胞(约 5×10^5 cell/ml),结果不相同。我们首先用抗生素类药物ActD处理半小时后观察其细胞形态。结果发现不同浓度(5 μ g/ml、10 μ g/ml、50 μ g/ml)的ActD及同样浓度(10 μ g/ml)不同时间(1小时、5小时、10小时、24小时、36小时)处理嗜热四膜虫,细胞形态与对照组(图1)一样,没有出现细胞核染色质固缩、芽染色体聚集等程序性细胞死亡特征。



图1 正常自由生活四膜虫细胞(40 \times)

我们还根据有关高三尖杉脂碱(HHT)能诱导肿瘤细胞凋亡的报道^[3,4],用不同浓度

($5\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $50\mu\text{g/ml}$)的高三尖杉脂碱处理对数生长期嗜热四膜虫 24 小时,发现细胞的活动能力及细胞核形态与对照组一样,没有出现程序细胞死亡特征性的变化。这说明高三尖杉脂碱不能引起嗜热四膜虫细胞凋亡。

我们也选择了糖皮质激素类药物地塞米松(Dexamisone, Dex)与对数生长期(培养 36 小时)嗜热四膜虫共同培养。当培养基里加了终浓度($5\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $25\mu\text{g/ml}$)的 Dex 及 $5 \times 10^{-8}\text{mol/L}$ 的 CaCl_2 及 $5 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 的 MgCl_2 时,培养基里体积缩小的细胞开始出现并逐步增加,这种形态的细胞占总数的 25% 左右。我们根据这一变化,用同样浓度的 Dex ($10\mu\text{g/ml}$)处理细胞半小时起到 7 小时每隔半小时观察四膜虫在培养基里的形态变化。图 2 表示 Dex 处理 30 分钟后在相差显微镜下($40 \times$)观察,嗜热四膜虫形状开始变圆(B)与正常的椭圆形细胞(A)不相同。图 3 表示嗜热四膜虫用 Dex 处理 3 小时后细胞核染色质聚集,密度增高呈半月形,并凝聚在核模周边,核仁裂解。图 4 表示凋亡后期(Dex 处理 7 小时)的嗜热四膜虫胞核和细胞外形皱折,核裂解或质膜包绕的碎片,形成凋亡小体(Apoptosis body)。

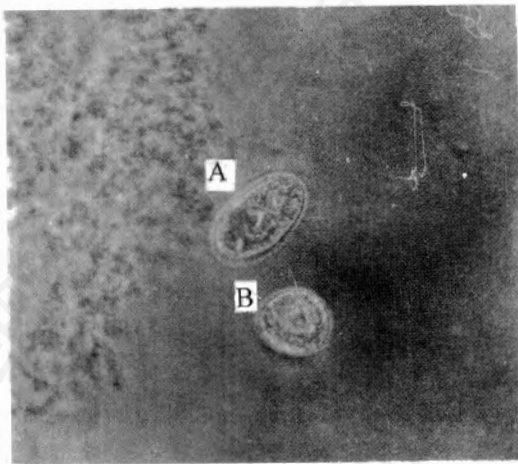


图 2 Dex 处理半小时正常细胞(A)与凋亡初期细胞(B)的对比($40 \times$)

2. 细胞核总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳分析

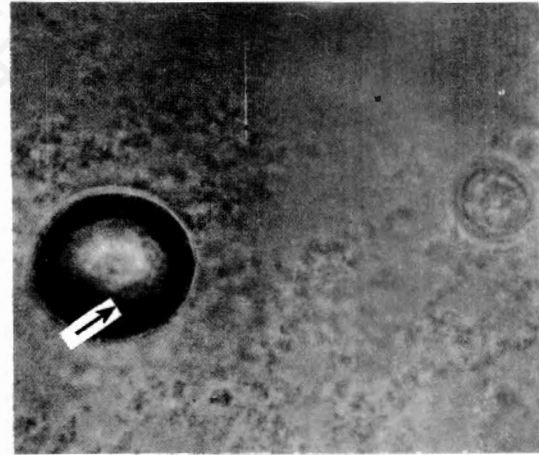


图 3 Dex 处理 3 小时后核染色质聚集,密度增高呈半月形聚在核周边
箭头←所示为染色质($100 \times$)

嗜热四膜虫用同一浓度的 Dex ($10\mu\text{g/ml}$)处理,每隔半小时至 7 小时提取核 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳分析,图 4 表示琼脂糖凝胶电泳结果。

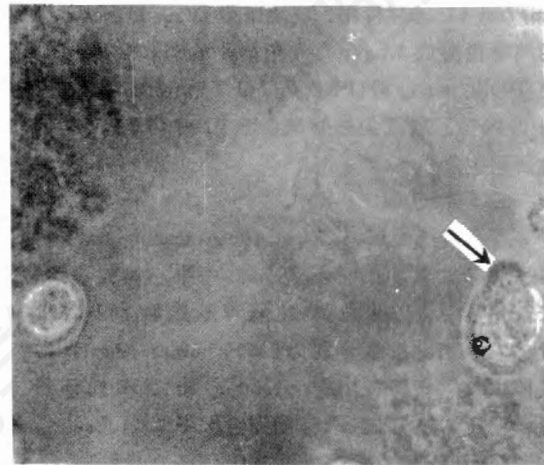


图 4 Dex 处理 7 小时后出现凋亡小体
箭头←所示为凋亡小体($100 \times$)

从以上结果分析来看 $10\mu\text{g/ml}$ 的糖皮质激素能诱导四膜虫核 DNA 发生降解,在电泳图谱出现“梯子”状条带,其第一条带约为 180bp,依次倍增,说明在核小体连结处的 DNA 被随机切断产生寡聚核小体。而对照组细胞不

显示“梯子”状 DNA 带纹。

对照组中未出现此类细胞。

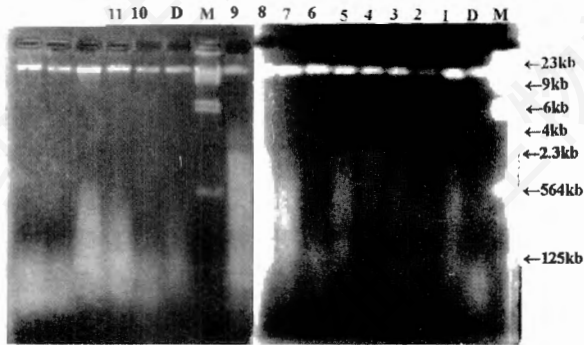


图5 嗜热四膜虫核总 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果
M 为 λ DNA/HandIII Makers. D 为对照

1. 处理 1 小时; 2. 处理 1.5 小时; 3. 处理 2 小时;
4. 处理 2.5 小时; 5. 处理 3 小时; 6. 处理 3.5 小时;
5. 处理 4 小时; 6. 处理 4.5 小时; 7. 处理 5 小时;
8. 处理 5.5 小时; 9. 处理 6 小时; 10. 处理 6.5 小时;
11. 处理 7 小时。

3. 流式细胞术鉴别及分析细胞凋亡嗜热四膜虫核 DNA

将用同一浓度 ($10\mu\text{g/ml}$) 不同时间 (1 小时、5 小时、10 小时、24 小时、36 小时) ActD 处理嗜热四膜虫, 离心收集细胞并用 PI 染色后在流式细胞仪上检测核 DNA, 并作直方图与前侧向散射图。其结果表明, 同一浓度 ($10\mu\text{g/ml}$) 的 ActD 处理嗜热四膜虫时没有随时间出现凋亡细胞特征性的 Ap 峰或 G1 期细胞减少的现象。不同浓度的 ($5\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ 、 $50\mu\text{g/ml}$) 高三尖杉脂碱处理嗜热四膜虫 24 小时, 经 PI 染色后, DNA 直方图上没有看出 DNA 含量减少的 Ap 峰, 处理组 DNA 含量直仿图与对照组一样。用同一浓度 ($10\mu\text{g/ml}$) 的 Dex 不同时间 (见上述) 处理嗜热四膜虫后经流式细胞仪分析, 却有与对照组不同的结果 (图 6):

图 6 表示当 $10\mu\text{g/ml}$ Dex 处理嗜热四膜虫半小时后就出现比正常细胞体积小的细胞及细胞质密度高的细胞。因此, 流式细胞仪图谱中出现低前向散射和高侧向散射, 随处理时间的延长皱缩的细胞 (下面一群) 数量逐渐增加, 而对

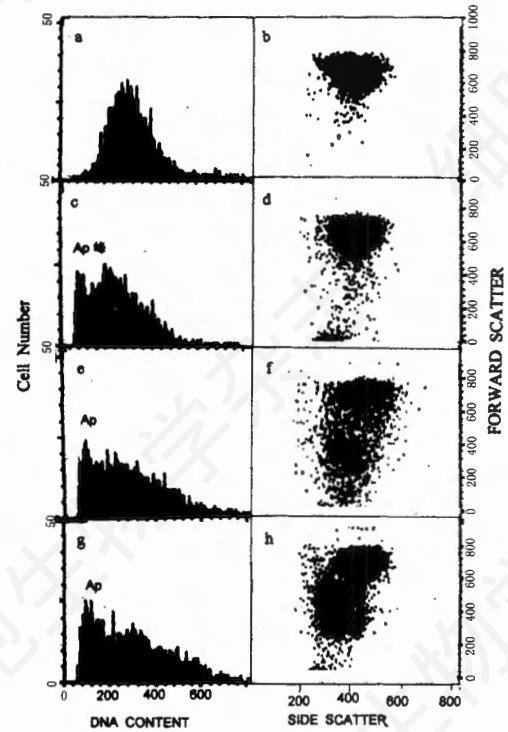


图6 流式细胞仪分析 $10\mu\text{g/ml}$ Dex 处理的嗜热四膜虫 ($5 \times 10^5 \text{cell/ml}$)

a 和 b, 对照; c 和 d, Dex 处理 1 小时; e 和 f, 处理 3 小时; g 和 h, 处理 6 小时 PI 染色 DNA 周期图谱 (a, c, e, g) 及前向, 侧向散射图谱 (b, d, f, h)。

讨论与总结

1. 放线菌素 D 及高三尖杉脂碱不能诱导嗜热四膜虫凋亡

最近, 郑泽铨及宝福凯等^[5]报道抗生素类药物放线菌素 D 能诱导人体外周血淋巴细胞发生凋亡。在本研究中我们按不同浓度和同样浓度不同时间 ActD 处理四膜虫, 然后收集细胞, 其核酸电泳图谱结果表明没有出现核 DNA 降解成“梯子”状的电泳条带, 而流式细胞仪检测结果也表明没有出现 G1 期前的亚二倍体峰。ActD 虽然能诱导某些多细胞真核生物细胞的凋亡, 但对单细胞真核生物嗜热四膜虫可能没有这种作用。

高三尖杉脂碱是一种对急性粒细胞白血

病,急性单核白血病等有良好疗效的抗癌药。国内李林等人(1994年)报道它在低浓度时(10^{-7} mol/L)能在数小时内诱导人早幼粒白血病细胞的程序性死亡。本文以高三尖杉脂碱作为诱导嗜热四膜虫(培养了36小时的对数生长期细胞)凋亡的药物,发现 $5\mu\text{g/ml}$ 、 $10\mu\text{g/ml}$ 及 $50\mu\text{g/ml}$ 的高三尖杉脂碱作用24小时不能诱导其凋亡。流式细胞术检测与对照组一样没有出现DNA含量减少的Ap峰。提示高三尖杉脂碱虽然能诱导HL-60细胞凋亡,但在上述作用浓度及时间范围内不能诱导嗜热四膜虫的凋亡。这可能提示嗜热四膜虫对高三尖杉脂碱的作用机制与HL-60细胞的有所不同。

2. 糖皮质激素能诱导嗜热四膜虫细胞凋亡

1980年Wyllie等报道糖皮质激素诱导胸腺细胞凋亡过程的形态特征是核DNA降解成不同倍数的180bp核苷酸片段^[8]。上述实验结果显示,糖皮质激素(Dex)在 $10\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内可以使嗜热四膜虫大核DNA降解。琼脂糖凝胶电泳图谱(图5)及形态学观察显示(图2-4), $10\mu\text{g/ml}$ 浓度的Dex处理对数生长期细胞(培养了36小时,浓度约 5×10^5 cell/ml)半小时后就出现凋亡细胞,电泳图谱中(处理了1小时)可观察到约180bp碱基对不同倍数的DNA“梯状”物。Dex可通过细胞外膜直接影响核染色体,并在一定浓度 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子(10^{-5} mol/L)存在下激活细胞核内核酸内切酶使核DNA降解成180bp-200bp大小的核苷酸片段^[9]。我们的电泳条带的形式与Mpoke^[6](1996年)及Davis^[10]等(1992年)在嗜热四膜虫有性生殖期间其大核DNA的自然降解电泳图谱条带形式相近。外部形态学照片与Mpoke等人在嗜热四膜虫有性生殖期间大核的一系列变化^[6]中拍到的结果相近。

核酸内切酶的活化依赖于 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子^[8]。Mpoke等(1996)报道在嗜热四膜虫有性生殖期间DNA的降解及染色体的聚集需要一种对 Ca^{2+} 依赖性的和对 Zn^{2+} 不敏感的核酸内

切酶的活化^[6]。Cohen等(1984)也报道,糖皮质激素诱导胸腺细胞发生凋亡是由于核内激活了 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶的结果^[7,9]。我们研究中,当嗜热四膜虫独用糖皮质激素处理时,并不发生核染色质凝聚及DNA的降解,当培养基里加了少量 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 离子(终浓度为 10^{-5} mol/L)时嗜热四膜虫开始皱缩,体积变小,染色质聚于核膜下,DNA开始降解。这意味着嗜热四膜虫大核内也存在着 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 离子依赖性的内源性核酸内切酶活化机制,这种机制使得 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 离子以活化内源性核酸内切酶的形式移向嗜热四膜虫大核内使嗜热四膜虫大核DNA降解并发生凋亡。

总之,本文以嗜热四膜虫及一些诱导凋亡的药物证明了发生在许多高等动物体的程序性细胞死亡也存在于自由生活的嗜热四膜虫中,并且认为嗜热四膜虫凋亡过程的诱导及发生有一定的选择性,也许包括单细胞生物在内的核酸内切酶的活化是许多类型细胞程序性细胞死亡的最终共同的途径。因此,嗜热四膜虫有可能作为研究细胞程序性死亡机制的研究模型。

摘 要

本文以单细胞真核生物嗜热四膜虫(*Tetrahymena thermophila*)作为实验材料以抗肿瘤药物高三尖杉脂碱(Homoharringtonine, HHT)、糖皮质激素类药物地塞米松(9 α -Fluoro-16 α -methylprednisolone, Dex)和抗生素类药物放线菌素D(Actinomycin D)诱导嗜热四膜虫凋亡并研究其细胞凋亡过程的生物化学特性。结果表明抗肿瘤药物及抗生素类药物均不能明显地诱导嗜热四膜虫细胞凋亡。但糖皮质激素类药物在含一定量的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子时能诱导嗜热四膜虫发生凋亡。作者认为诱导嗜热四膜虫凋亡过程可能与糖皮质激素类药物诱导鼠胸腺细胞凋亡的机制是类似的,嗜热四膜虫与胸腺细胞的凋亡过程可能同样被 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子依赖性的核酸内切酶的活化机制所控制着。

关键词: 嗜热四膜虫 凋亡 诱导

参 考 文 献

- [1] 冯建芳等, 1995, 生理科学进展, 26(4): 373—378.
- [2] 曹伟等, 1995, 26(4): 443—445.
- [3] 方敏等, 1994, 科学通报, 39(12): 1125—1129.
- [4] 牛建昭等, 1995, 解剖学报, 26(2): 142—145.
- [5] 郑泽铨等, 1995, 上海免疫学杂志, 15(5): 273—276.
- [6] S. Mroke et al., 1996, Exp Cell Res., 225: 357—365.
- [7] S. T Christensen et al., 1995, Cell Death and Differentiation, 2: 301—306.
- [8] A. H. Wyllie et al., 1980, Nature, 284: 554—557.
- [9] J. J. Cohen et al., 1984, The J. Immunol., 132(1): 38—42.
- [10] Maria C. Davis, C. David Allis et al., 1992, Developmental Biology, 154: 419—432.

RESEARCH ON INDUCED APOPTOTIC-LIKE DEGRADATION IN *TETRAHYMENA THERMOPHILA*

Ascar YIMIT

(Institute of Xinjiang Uighyr Medicine Research, 830001 Urumqi)

PANG Yan Bin

(East China Normal University, 200062 Shanghai)

ABSTRACT

In order to study whether apoptosis in *Tetrahymena thermophila* has the same biochemical characters of apoptosis in eukaryotic organism, Homoharringtonine, Glucocorticoid and ActD were used to induce apoptosis in *T. thermophila*.

T. thermophila nucleic DNA was extracted intervally after given medicine, analyzed the process of DNA degradation qualitatively in 16% agarose gel. FCM was used to study quantitative change of whole cell DNA. Cytological analyses were also done to observe *T. thermophila* morphological changes. The results showed that antitumor medicine and antibiotic medicine did not induce apoptosis *T. thermophila* obviously.

On the contrary, when some Ca^{2+} , Mg^{2+} existed in media, glucoicute can induce apoptosis in *T. thermophila*. It is concluded that the mechanism of induced apoptosis in *T. thermophila* is similar to that in thymocyte induced by glucoicute and both required activation of Ca^{2+} , Mg^{2+} dependent endonuclease.

Key words: *Tetrahymena thermophila* Induced Apoptosis

中国科学院上海细胞生物学研究所

ONCO-LAB 实验室 DNA 合成研究开发部

DNA 合成——PCR 引物, 探针, 反义核酸等

为了加强 DNA 合成的竞争力, 提高 DNA 合成质量, 本室从 ABI 引进了新一代的 DNA 合成仪两台。本室仍奉行“质量就是生命”的宗旨, 再加上在 DNA 合成方面悠久的历史和丰富的经验, 依托雄厚的科研力量, 将为您的科研工作提供有力保证。同时为了使您 RT-PCR 实验取得成功, 本室将赠送精心设计的反转录用引物一组。目前 DNA 合成的价位是 4 元/碱基, FPLC 纯化, 2OD 值。欢迎垂询! 电话: 021-64336896 传真: 021-64331090 (请注明联系人收)

email: oncolab@sunm.shcnc.ac.cn 联系人: 胡拥军 徐 铨

上海市岳阳路 320 号上海细胞生物学研究所 Oncolab 实验室 DNA 合成部 200031