

STUDY ON THE EXPRESSION OF RETROVIRUS-MEDIATED TPO GENE TRANSFERRED INTO HUMAN BONE MARROW STROMAL CELL LINE

ZHANG Yi TANG Pei Xuan LIU Xiu Sen JIANG Fei Zi MAO Ning
(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences Beijing 100850)

ABSTRACT

To study the expression of retrovirus-mediated TPO gene transfer into human bone marrow stromal cell line HFCL. Thrombopoietin(TPO)cDNA was recombined with retroviral vector pLXSN. After this recombinant plasmid was transferred into retrovirus packaging cell line PA317 by Lipofectamine, resistant clones were selected by G418 selective medium. TPO mRNA expression and Neo gene and TPO cDNA in HFCL were successfully detected by RT-PCR and genome DNA PCR. The biological activity of TPO in the cultural medium was demonstrated that HFCL transfected with cDNA could significantly secrete TPO in vitro. These results provided a basis for further study on hematopoietic regulation.

Key Words: Retroviral vector Bone marrow stromal cell line Thrombopoietin Gene expression

ATP 对中性粒细胞 H_2O_2 产生双重作用机制的研究

张煜巴图

(白求恩医科大学第一临床学院 长春 130031)

由于血小板与白细胞在血液中的密切关系,人们对血小板中的 ATP 研究越来越多。现已表明,ATP 增强白细胞表面粘附分子的表达;促进白细胞粘附于内皮细胞;促进白细胞向感染或缺血部位移动;促进白细胞释放水解酶。然而,对于白细胞呼吸爆发的作用却有不同的报道。Kuhns 等^[1] 研究结果显示,ATP 增强 fMLP(甲酰基-甲硫氨基-亮氨酸-苯丙氨酸)活化的白细胞释放氧自由基。而 McGarrity 等^[2] 报道则相反,ATP 抑制白细胞释放氧自由基;Naum 等^[3] 研究认为,低浓度 ATP 具有增强作用,高浓度时则表现为抑制。为了解答这一差异性的结果,我们用高压液相方法测定了 ATP 的代谢。现报道如下。

材料与方 法

1. 白细胞分离

取健康成年人静脉血 50mL,肝素抗凝,用 Percoll 细胞分离液,参照 Wright 法^[4] 进行,离心后收集白细

胞,用 PBS 冲洗二次,蒸馏水溶解污染的红细胞。冲洗后的细胞再用 HBSS 配成理想的浓度 1×10^6 /mL,计数所得细胞,以白细胞比例 >90% (革兰氏染色)及细胞活力 >95% (台盼蓝拒染)为合格。

2. H_2O_2 的测定

采用鲁米诺依赖的全血化学发光法 (CL) 参照 Wymann 法^[5] 进行,这是测定白细胞呼吸爆发非常敏感的方法。不同浓度 ATP 或和腺苷受体拮抗剂 CGS15943 ($1 \mu\text{mol/L}$) 加到含白细胞 10^6 /mL 的试管中,37°C 条件下水浴 2 或 5min, fMLP ($1 \mu\text{mol/L}$) 激活细胞,细胞释放的 CL 用 Luminometer 测定。CL 峰值代表白细胞产生的 H_2O_2 量。数据表达采用对照组的百分比。所有药物在无细胞情况下均不影响鲁米诺系统。

3. ATP 的代谢

1×10^6 /mL 白细胞与 ATP ($10 \mu\text{mol/L}$) 在 37°C 条件下,按规定的时 间水浴后,15,000 转 (常温) 离心 1min,上清液在 85°C 条件下再水浴 2min,15,000 转 (+4°C) 离心 10min,上清液储存在 -20°C 下直到使用。采

本文 1999 年 1 月 18 日收到,4 月 20 日接受。

用高压液相法测定 ATP、ADP、AMP 和腺苷浓度,详细方法见文献^[6]。

4. 统计学处理

所有数据均为平均值并列标准差,来源于 4-8 个试验。显著性差异用 T 检验方法。

结 果

一、ATP 对白细胞 H_2O_2 产生的调节作用

ATP 不能作为激活剂激活白细胞,但却对 fMLP 活化的白细胞引起不同的反应,ATP 与白细胞水浴 2min 后, H_2O_2 产生增强,最大效应为 161%,随着水浴时间的延长到 5min,ATP 所引起的 H_2O_2 增强作用迅速转为抑制作用,抑制率为对照组的 40%(图 1)。

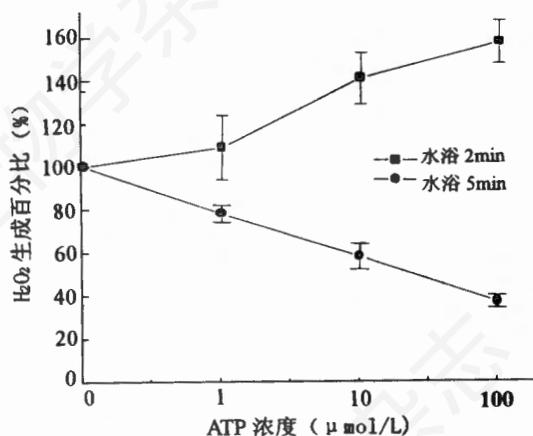


图 1 ATP 对白细胞 H_2O_2 生成的作用

二、ATP 对白细胞双重作用的机制

这种暂时的增强继而为抑制作用可能与 ATP 的代谢产物腺苷有关,因为腺苷已显示抑制白细胞呼吸爆发。因此,我们检测了 ATP 在白细胞内的代谢,正象图 2(a, b)所示,ATP 迅速转为 ADP 和 AMP,AMP 又进一步水解为腺苷,时间上恰好与图 1 相吻合。

三、ATP 对白细胞抑制作用的机制

为进一步验证 ATP 对白细胞的抑制作用是由其代谢产物腺苷所致,我们应用腺苷受体拮抗剂 CGS15943($1\mu\text{mol/L}$),这是一个非选择性腺苷 A_1 、 A_2 受体拮抗剂。在 CGS15943 存在

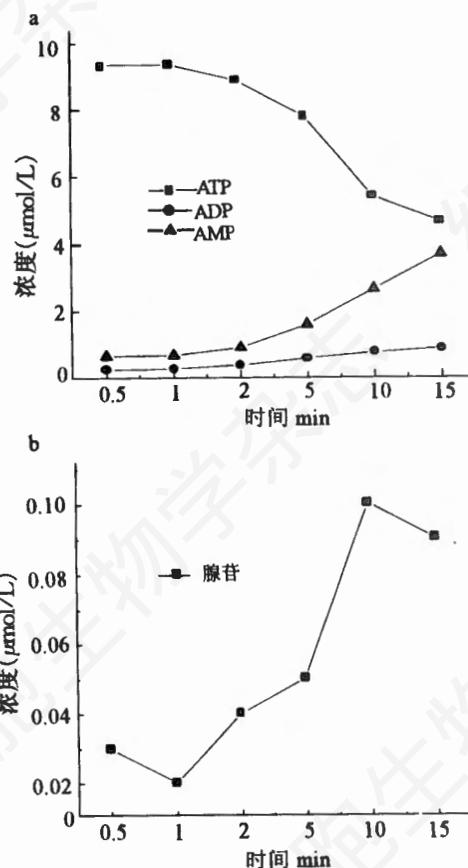


图 2 ATP 在白细胞内的代谢

下,ATP 对白细胞的抑制作用完全被抵消(图 3)。

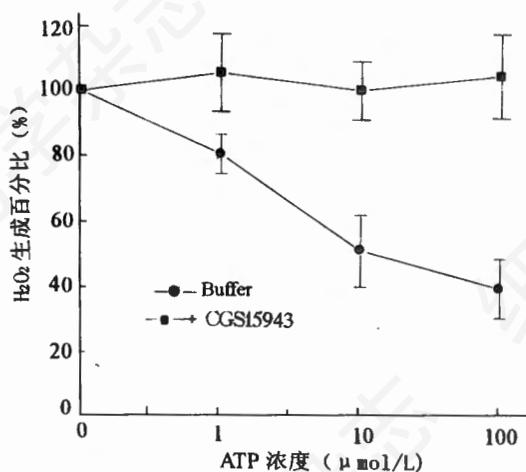


图 3 腺苷拮抗剂 CGS15943 对 ATP 作用的影响

讨 论

ATP 作用于白细胞是通过其受体,由于白细胞对 ATP 和 UTP 的作用产生类似的效应,因此认为白细胞表面具有 P_{2u} 受体^[7]。ATP 引起白细胞暂时性呼吸爆发增强可能与其 P_{2u} 激活有关。

继之出现抑制作用,这种变化过程从时间上恰好为 ATP 代谢为 AMP 和腺苷的过程,腺苷抑制白细胞呼吸爆发通过其 A_2 受体。腺苷在这方面的作用是很强的,10 $\mu\text{mol/L}$ 就有很强的抑制作用^[8]。此作用能被 CGS15943 拮抗,也说明这种抑制作用与腺苷有关。腺苷 A_2 受体又分为两种亚型 A_{2a} 和 A_{2b} ,腺苷抑制白细胞呼吸爆发通过 A_{2a} 受体已经得到证实^[9]。

ATP 对白细胞的增强作用可能具有生物学意义。体外实验中人们发现,激活的血小板能增强白细胞的作用^[3]。正常情况下,体内由于 ATP 酶的作用,血中 ATP 浓度极微。然而,在组织缺血后游离 ATP 浓度可达到 20 $\mu\text{mol/L}$ ^[10]。因此,在炎症部位,核酸可能通过暂时性的激活继之抑制而影响白细胞的功能。

摘 要

本文通过高压液相法测定 ATP 的代谢,探讨其对中性粒细胞 H_2O_2 产生双重作用的机制。结果显示,ATP 本身不能激活中性粒细胞产生 H_2O_2 ,但却对 fMLP 活化的中性粒细胞有双重作用。ATP 与中性粒细胞水浴 2min,

H_2O_2 产生明显增加,当水浴时间延长至 5min 时, H_2O_2 的产生明显受抑制。这种变化在时间上恰好与 ATP 的代谢一致。ATP 从 2min 开始迅速转为 ADP 和 AMP,AMP 又进一步水解为腺苷。ATP 对白细胞的抑制作用能被腺苷受体拮抗剂 CGS15943 抵消。表明 ATP 对白细胞的双重作用,即开始的兴奋继之抑制与其代谢形成腺苷有关。换句话说,ATP 对白细胞的兴奋作用是通过 ATP 的 P_{2u} 受体,而抑制作用是通过腺苷 A_2 受体。

关键词: ATP 白细胞 H_2O_2 腺苷

参 考 文 献

- [1] Ward, P.A., et al., 1988, *Lab Invest.*, **58**: 37 - 44.
- [2] McGarrity, S.T., et al., 1988, *J. Leukocyte Biol.*, **44**: 93 - 98.
- [3] Naum, C.C., et al., 1991, *J. Leukocyte Biol.*, **49**: 83 - 89.
- [4] Wright, D.G., 1988, *Methods Enzymol.*, **162**: 538 - 543.
- [5] Wymann, M.P., et al., 1987, *Anal Biochem.*, **165**: 371 - 378.
- [6] Fredholm, B.B. et al., 1984, *Brain Res.*, **295**: 127 - 136.
- [7] Zhang, Y. et al., 1996, *Biochem Pharmacol.*, **51**: 975 - 965.
- [8] Zhang, Y. and B.B. Fredholm., 1994, *Biochem Pharmacol.*, **48**: 2025 - 2032.
- [9] Fredholm, B.B. 1996, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **354**: 262 - 267.
- [10] Born, G.V.R. and MAA. Kratzer., 1984, *J. Physiol.*, **354**: 419 - 429.

THE MECHANISMS OF THE BIPHASIC EFFECTS OF ATP ON H_2O_2 PRODUCTION IN HUMAN NEUTROPHILS

ZHANG Yu BA Tu

(Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun, 130021, Jilin, China)

ABSTRACT

Metabolism of ATP was studied by HPLC assay in order to elucidate the mechanism of the biphasic effects of ATP on H_2O_2 production by fMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)-stimulated neutrophils. Results show that ATP was found

to be ineffective per se on H_2O_2 production as a stimulus, but there were biphasic effects on fMLP-stimulated neutrophils. ATP and neutrophils were incubated for 2 min, H_2O_2 production was increased markedly. With the prolong of time at 5 min, H_2O_2 production was changed into inhibition. This change is coincided with metabolism of ATP in time course. ATP starting from 2 min was changed into ADP and AMP, which was breakdowned to adenosine. The inhibition of ATP on neutrophils was antagonized by CGS15943, an antagonist of adenosine. It was indicated that the biphasic effects of ATP, from stimulation to inhibition, was related to metabolism of ATP to adenosine. In other words, the stimulation was performed by P_{2u} receptor, while the inhibition was performed by adenosine A_2 receptor.

Key words: ATP Neutrophil H_2O_2 Adenosine

氯化钾或谷氨酸对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞钙离子通透性的影响*

陈文东 李雅莉 李 林

(首都医科大学宣武医院药理研究室 北京脑老化重点实验室 北京 100053)

人神经母细胞瘤细胞是一种分化程度较低的肿瘤细胞。该细胞繁殖快,细胞形态、生理和生化功能与正常神经细胞相似,胞体也呈锥体状,同时具有明显的轴突^[1]。高浓度的氯化钾或谷氨酸对正常的神经细胞均具有损伤作用,甚至造成细胞死亡。其损伤机制的主要原因之一是由于氯化钾或谷氨酸引起细胞膜上的 Ca^{2+} 通道开放,使得细胞内 Ca^{2+} 超载,造成细胞损伤^[2]。我们的研究目的是考察氯化钾或谷氨酸对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系是否具有同样的损伤作用,希望能用该细胞作为神经药理研究中的实验细胞模型。

材料与方 法

1. 试剂和主要仪器

氯化钾(分析纯)为北京德茂生物化工厂产品;谷氨酸购自 Serva 公司;3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT),2-thiobarbituric acid (TBA)为 Sigma 公司产品;DMEM 培养基,胎牛血清为 Gibco 公司产品。

LP4000 型全自动酶标仪,法国巴斯德公司生产;RF5000 型荧光分光光度计,日本岛津公司生产;IMT-2 型相差倒置显微镜,日本奥林巴斯公司生产。

2. SH-SY5Y 细胞培养

SH-SY5Y 细胞由瑞典卡罗琳斯卡研究所 B. Winblad 教授赠送。将传代的 SH-SY5Y 细胞用 DMEM 培养液(内含 10% 胎牛血清)从培养瓶壁上吹散下来,用台盼蓝拒染法在显微镜下计算,算出活细胞密度,然后用含胎牛血清 DMEM 培养液稀释至 5×10^4 /ml,将其接种于培养板中(96 孔和 24 孔板),在 37℃ 二氧化碳孵箱培养 4 天后待用。

3. 细胞活性的测定(MTT 法)

接种在 96 孔板的 SH-SY5Y 细胞在 CO_2 孵箱培养 4 天后,分组分别加入不同浓度的细胞损伤诱导剂(氯化钾或谷氨酸),将细胞在 CO_2 孵箱内培养 4h;然后每孔加入 20 μ l 浓度为 5mg/ml 的 MTT 溶液,再置入 CO_2 孵箱培养,4h 后弃培养孔中的上清液,每孔加入 200 μ l 的 DMSO,轻轻振荡后,于全自动酶标仪在 550nm 处测定吸光度,其值代表细胞活性大小。

4. 细胞脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的测定

接种在 24 孔板的细胞在 CO_2 孵箱培养 4 天后,分组分别加入细胞损伤的诱导剂(氯化钾或谷氨酸),然后将细胞在 CO_2 孵箱内培养 4h,每孔取 150 μ l 上清液与等体积的 12.5% 冰醋酸混合,2000rpm 离心 10min,

本文 1999 年 4 月 19 日收到,2000 年 5 月 8 日接受。

*北京市科委资助北京市重点科技实验室项目(编号 951890600),北京市科委资助北京市科技项目(编号 952601800),国家人事部资助优秀留学回国人员科研项目(1998)。