

ESTABLISHMENT OF ES CELL LINE DERIVED FROM BALB/c MICE AND SUCCESS OF MAKING UP CHIMAERIC MICE

HUANG Bing CHEN Xi Gu DENG Xin Yan

LIN Yi Li CHEN Ying Qing HUANG Chun Nong LIANG Ying Jie

(Experimental Animal Center of Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510089)

ABSTRACT

Purpose: To establish an embryonic stem (ES) cell line derived from BALB/c mice and make chimaeric mice. **Method:** Isolation and culture inner cell mass (ICM) from BALB/c mice blastocysts. After stable proliferation and propagation, we create chimaeric mice by injecting ES cells into blastocysts of C₅₇BL/6J mice. **Results:** We have established the first embryonic stem cell line derived from BALB/c mouse in China. It has stably maintained in an undifferentiated state with a typical morphology of ES cell clone, expressing the embryonic stem cell marker alkaline phosphatase, and displaying a normal diploid karyotype. Five chimaeric mice have been obtained. **Conclusion:** The established embryonic stem cell line express all characteristics of the ES cells. It can be used on differential research in vivo and in vitro. After further observation of its germline transmission, we'll decide whether it can be applied to make-up transgenic and knock out animal.

Key words: BALB/c mice ES cell Chimaeric mice Isolation culture

APP17 肽对 β -淀粉样肽及有关蛋白质表达的影响

孟艳 王蓉 艾厚喜 张景艳 阮燕* 姬志娟 张岱* 盛树力

(首都医科大学宣武医院 北京脑老化研究实验室 北京 100053)

(*北京医科大学精神卫生研究所 北京 100083)

老年性痴呆 (Alzheimer's Disease, 简称 AD) 是一种中枢神经系统退行性疾病, 其主要病理特征是老年斑和神经元纤维缠结。 β -淀粉样肽 (β -amyloid peptide, 简称 A β) 是构成老年斑的核心成分, 也是 AD 脑神经元纤维缠结以及血管淀粉样变性的生化基础^[1,2]。A β 是其前体蛋白 (β -amyloid protein precursor, 简称 APP) 的水解产物, 分子量约为 4.2KDa。APP 是一种具有受体样结构的跨膜糖蛋白, 分子量约 110-130KDa, 由位于细胞外的 N 末端长片段、跨膜区和膜内 C 末端构成, A β 的部分结构位于跨膜区^[3]。APP 翻译后加工分两条途径, 这两条途径由三种分泌酶 (α 、 β 、 γ) 裂解 APP 完成: (1) α -分泌酶在 A β 结构内水解 APP, 生成分

泌性 APP (secretory APP, 简称 sAPP α), 此途径破坏了 A β 的完整结构, 所以称非 A β 生成途径。(2) β -分泌酶在 A β 的 N 端水解 APP, 生成 sAPP β 和 11KDa 含有 A β 完整结构的 C 端片段 (A4CT)。A4CT 再经一次酶解过程 (γ -分泌酶在 A β 的 C 端水解 A4CT) 使 A β 生成并释放到细胞外环境, 这一代谢过程称 A β 生成途径。因此, A4CT 可能是 A β 的直接前体。

以往很多研究表明 APP 促进神经细胞生长、分化和维持脑内神经网络的稳定性的功能区定位在 APP695 的 319-335 肽段 (以下简称

本文 1999 年 12 月 13 日收到, 2000 年 8 月 15 日接受。

APP17肽)^[4]。我们对糖尿病鼠、去卵巢大鼠和半乳糖老化小鼠等动物模型的一系列研究发现,APP17肽具有促进大鼠神经元存活,改善海马神经元退变等作用^[5,6],例如,在存在神经元退行性变的糖尿病脑鼠脑组织切片中,免疫组化研究发现,产生A β 的神经元阳性数目增加,而经APP17肽保护后其阳性细胞数目明显减少。有报道胰岛素降解酶(Insulin-degrading enzyme,简称IDE)是降解胰岛素的酶,但在脑内它却有降解A β 的作用^[7,8],为了深入研究APP17肽减少A β 分泌的机理,我们选用人类SY5YA4CT基因转染以及野生型SY5Y细胞研究体外条件下APP17肽对A β 分泌及IDE表达的影响。

神经营养素-3(neurotrophin-3,简称NT-3)是支持成熟神经元功能必不可少的因素之一。神经原纤维蛋白(Neurofibril,简称NF)是组成细胞骨架的成分,它是细胞维持正常功能的必要因素。本室用细胞计数、MTT代谢率测定等方法研究APP17肽对野生型SY5Y生长的影响(待发表资料),发现APP17肽处理组细胞数较对照组明显增加,MTT代谢率显著高于对照组,这说明APP17肽具有促进神经元生长,增加细胞线粒体活性的作用。为了进一步研究APP17肽促进神经元生长、存活,改善海马神经元退变的可能机理,我们同时选用人类野生型SY5Y细胞研究APP17肽对内源性NT-3和NF表达的影响。

材料和方法

1. 细胞分泌A β 的含量分析方法

(1) 细胞模型及培养 人类野生型神经母细胞瘤细胞株(HY-SY5Y),培养在含10%灭活胎牛血清的MEM培养基中,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 温箱培养。APP695的C端100个氨基酸残基(A4CT)的基因转染的人类神经母细胞瘤细胞株(SY5YA4CT),可稳定表达A4CT片段(北京医科大学精神卫生研究所张岱教授提供),用含10%灭活胎牛血清的MEM/F12培养基培养,其他条件同野生型细胞。

(2) 抗体 W0-2(抗A β_{1-16} 的单克隆抗体,北京

医科大学精神卫生研究所张岱教授提供)。

(3) 主要试剂 APP17肽,由本室固相合成,HPLC纯化,纯度在99%以上;蛋白G-sepharose,Boehringer Mannheim公司产品;碱性磷酸酶显色试剂盒,北京中山生物制品公司产品。

(4) 免疫沉淀 Western Blot 分析法(immunoprecipitated Western Blot) 实验组加50 μ mol/L的APP17肽,对照组用PBS代替。37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 培养8-10个小时,收集对照组及实验组培养基上清(冰浴中操作),离心,取上清,经蛋白定量后各组分别加入Sepharose-protein G 25 μ l及W0-25 μ l,室温混合4h。反复洗涤上述沉淀物,吸净上清,变性10min,取上清进行Western Blot分析^[9]。第一抗体W0-2(1:2000稀释)室温放置1h,碱性磷酸酶偶联抗鼠IgG中放置1h,漂洗后用碱性磷酸酶显色试剂盒显色。

2. 细胞表达IDE、NT-3、NF的含量分析方法

(1) 细胞模型和培养 人类野生型神经母细胞瘤细胞株(HY-SY5Y),培养条件同上。

(2) 抗体 抗胰岛素降解酶抗体(抗体的制备:固相合成法合成IDE片段,其序列为:WQNADLNGK-FKLPTKNE,C端与甲状腺球蛋白交联后,免疫小鼠。ELISA方法测定抗体效价,抗体最高效价为1:16000),抗NT-3抗体及抗NF抗体购自北京中山生物制品公司。

(3) Western Blot 分析法 实验组加入10 μ mol/L的APP17肽,对照组加入PBS代替。37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 培养8-10个小时,收集对照组及实验组细胞裂解物(冰浴中操作),取上清。各组经蛋白定量后,变性分别取90 μ g用8%SDS-PAGE凝胶电泳。分别用抗IDE(1:500稀释)、NT-3(1:200稀释)、NF(1:200稀释)的抗体为第一抗体室温温育1h,其余步骤同上。

3. 结果统计

Western Blot实验每组独立地进行6次,结果经AGFA ARCUS II扫描仪读取,采用Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software软件系统定量分析各条带的吸光度数值,用SPSS8.0统计软件包中配对t检验的统计学方法进行统计分析。

结 果

1. 野生型SY5Y细胞培养液中A β 的分泌

用4瓶面积75cm 2 的大培养瓶培养细胞,当细胞生长至90%密度(大约10 8 个细胞/瓶)

时收集培养液上清进行免疫沉淀 Western Blot 分析,在分子量 3.4Kda 和 6.2Kda 之间有一清晰的条带,即 A β ,另外,在分子量大约 8.0KDa 处还有一稍淡的条带,可能是 A β 的二聚体(图 1)。



图 1 野生型 SY5Y 细胞 A β 胞外分泌

1. 标准蛋白。2. 野生型 SY5Y 培养液。免疫沉淀所用抗体及 Western Blot 所用第 1 抗体均为 W0-2。

2. APP17 肽能使 SY5YA4CT 基因转染细胞 A β 膜外分泌减少

A β 分子量约为 4.2Kda,在 Western 印迹结果中表现为在分子量 3.4Kda 和 6.2Kda 之间有清晰的单一条带。由于 W0-2 为抗 A β 第 1-16 氨基酸残基的抗体,可沉淀不同长度的 A β ,即醋酸纤维膜上显示的是总的 A β (包括 A β_{1-40} 和 A β_{1-42})。用 50 μ mol/L 的 APP17 肽处理细胞后,PBS 对照组和处理组相比培养液中 A β 的量明显减少(图 2),结果如表 1 所示。

表 1 对照组和 APP17 肽处理组吸光度测定数值比较

	N	均数 \pm 标准差
对照组	6	324.42 \pm 8.3
处理组	6	271.92 \pm 29.9**

**与对照组相比 P=0.01



图 2 APP17 肽抑制 SY5YA4CT 基因转染细胞 A β 的分泌

1. 标准蛋白。2. APP17 肽 50 μ mol/L 处理组。3. 空白对照组。免疫沉淀所用抗体及 Western Blot 所用第 1 抗体均为 W0-2。

3. APP17 肽促进野生型 SY5Y 细胞内胰岛素降解酶的表达

从 Western Blot 结果可以看出,胰岛素降

解酶在 65Kda 处有一清晰的条带,加入 10 μ mol/L APP17 肽后,其量明显较 PBS 对照组增加(图 3),结果如表 2 所示。

表 2 对照组和 APP17 肽处理组吸光度测定数值比较

	N	均数 \pm 标准差
对照组	6	106.36 \pm 8.1
处理组	6	219.88 \pm 54.1**

**与对照组相比 P=0.005

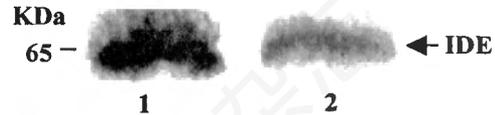


图 3 APP17 肽对 SY5Y 细胞 IDE 表达的影响

1. APP17 肽 10 μ mol/L 处理组。2. 空白对照组。第 1 抗体:抗 IDE 抗体(1:500 稀释)。

4. APP17 肽促进野生型 SY5Y 细胞内 NT-3 的表达

从 Western Blot 结果可以看出,在 30Kda 处有一清晰的 NT-3 条带,加入 10 μ mol/L APP17 肽后,其量明显较 PBS 对照组增加(图 4),结果如表 3 所示。

表 3 对照组和 APP17 肽处理组吸光度测定数值比较

	N	均数 \pm 标准差
对照组	6	29.4 \pm 2.8
处理组	6	50.9 \pm 16.0*

*与对照组相比 P=0.028

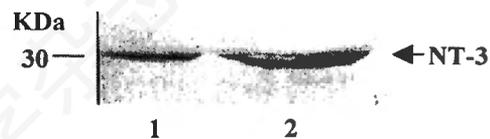


图 4 APP17 肽对 SY5Y 细胞 NT-3 表达的影响

1. 空白对照组。2. APP17 肽 10 μ mol/L 处理组。第 1 抗体:抗 NT-3 抗体(1:200 稀释)。

5. APP17 肽促进野生型 SY5Y 细胞内 NF 的表达

从 Western Blot 结果可以看出,在 68Kda 处有一清晰的 NF 条带,加入 10 μ mol/L APP17 肽后,其量明显较 PBS 对照组增加(图 5),结果如表 4 所示。

表4 对照组和 APP17 肽处理组吸光度测定数值比较

	N	均数±标准差
对照组	6	42.8±2.5
处理组	6	75.8±17.1**

**与对照组相比 P=0.008

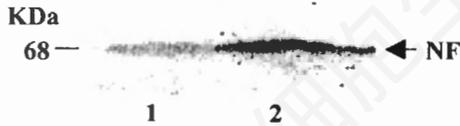


图5 APP17 肽对 SY5Y 细胞 NF 表达的影响
1. 正常对照组。2. APP17 肽 10 μ mol/L 处理组。
第1抗体:抗 NF 抗体(1:200 稀释)。

讨 论

近些年, APP C 端转基因小鼠研究表明, 这些小鼠出现年龄依赖的神经元和突触退行性变以及与海马神经元有关的学习和记忆的损害^[4], APP C 端可能是 A β 的直接前体, 因此, 研究影响 APP C 端产生 A β 的因素, 有重要意义。

本研究结果表明, 未转染 APP 基因的野生型 SY5Y 细胞的培养液中很难检出 A β , 需要 4 个面积为 75cm² 的培养瓶才能用 W0-2 抗体勉强检出, 所以很难用于观察 A β 的分泌情况, 但是这一实验证明了 A β 是可以从细胞内分泌到胞外的。应用 SY5YA4CT 基因转染细胞研究证明, 它们能大量分泌 A β , 这种分泌被 APP17 肽明显抑制, 但机理不明。有研究认为 APP17 肽的促进神经细胞生长, 缺血神经元损伤修复等功能是通过与细胞膜的位点的结合实现的^[10], 因此本实验的结果提示, APP17 肽可能是通过一种受体介导的机制来反馈调节或通过旁分泌/自分泌的作用机理发挥作用的。

IDe 是降解胰岛素的酶, 但在脑内还能降解 A β 。本实验发现, APP17 肽能促进野生型 SY5Y 细胞 IDE 的表达, 这是否与 APP17 肽减少 A β 分泌有关, 值得进一步研究。

NF-3 等神经营养因子是支持成熟神经元

存活的重要因素之一。NT-3 为神经营养因子家族成员之一, 在海马颗粒细胞及某些特定的神经元中表达, 但它的受体分布广泛, 它可刺激神经元形态学和含特异性递质的分子分化。NT-3 与 NT4/5 和神经生长因子(NGF)相同, 在横断连接大鼠内嗅区和海马穿通束的实验中, 表现出对改善动物行为的良好效果^[4]。NF 是组成细胞骨架的成分之一, 它是细胞维持正常功能的必要因素。本室近来的研究已发现 APP17 肽不仅能降低糖尿病小鼠脑内 A β 表达量, 而且还能促进糖尿病小鼠及去卵巢大鼠和半乳糖老化小鼠海马神经元多种表达减少的神经存活因子(NGF、NT-3、BDNF)恢复正常^[4-6]。同时, 体外研究中 APP17 肽能保护神经元免受谷氨酸、高糖等神经毒性物质的损害(待发表资料)。这些研究表明, 神经元退变不仅是一些毒性物质作用的结果而且也与神经元赖以生存的神经存活因子减少有关, 其中 α APPs 和 A β 的平衡可能更为重要。本实验发现, 在体外条件下, APP17 肽使野生型 SY5Y 细胞 NT-3、NF 表达增加。结合本室其它结果, 我们认为 APP17 肽抑制 A β 分泌和促进内源性神经营养因子和生长因子的表达可能是其支持神经元存活、改善神经退变的机理之一。

摘 要

本研究选用人类野生型 SY5Y 及 SY5YA4CT 基因转染细胞, 应用免疫沉淀 Western Blot 等分析方法研究 APP17 肽对 β -淀粉样肽及有关蛋白质如 IDE、NT-3、NF 表达的影响, 探讨其影响神经元存活和退变的可能机理。结果发现, APP17 肽能抑制转染细胞 A β 胞外分泌, 并能促进野生型 SY5Y 细胞中 IDE 的表达, 同时对内源性 NT-3 和 NF 的表达也有促进作用。提示: APP17 肽抑制 A β 分泌和促进内源性神经营养因子的表达可能是其支持神经元存活、改善神经退变的机理之一。

关键词: APP17 肽 SY5YA4CT 基因转染细胞
野生型 SY5Y 细胞 A β IDE NT-3 NF

参 考 文 献

- [1] Selkoe, D J. et al. , 1994, *Annu Rev Cell Biol.* , **10**: 373 - 376.
- [2] Beyreuther K and Hilbich C. , 1992, *Genetic Research in Psychiatry.* , 85 - 105.
- [3] Kang J. , 1987, *Nature.* , **325**: 733 - 743.
- [4] 盛树力, 裴进京主编, 1998, 老年性痴呆的临床和分子学基础, 北京: 科学技术文献出版社.
- [5] 赵咏梅, 盛树力, 1999, 中华内分泌杂志, **2**(15): 38 - 40.
- [6] 赵咏梅, 赵志炜, 姬志娟, 盛树力, 1999, 中华老年医学杂志, **18**(5): 306 - 309.
- [7] Qiu, W Q and Walsh, D M. et al. , 1998, *J. B. C.* , **273**: 32730 - 32738.
- [8] Kurochkin, I V. et al. , 1994, *FEBS letters.* , **345**: 33 - 37.
- [9] 张岱, 1998, 中国心理卫生杂志, **12**(2): 97 - 100.
- [10] Nalbantoglu, J. and Tirado-Santiago, G. , 1997, *Nature.* , **387**: 500 - 504.

THE EFFECT OF APP17 PEPTIDE ON A β SECRETION AND EXPRESSION OF RELATED PROTEIN

MENG Yan WANG Yong AI Hou Xi ZHANG Jing Yan JI Zhi Juan RUAN Yan* ZHANG Dai* SHENG Shu Li
 (Beijing Geriatric Clinical & Research Center, Xuanwu Hospital of the Capital University of the Medical Sciences, Beijing 100053)
 (* Institute of Mental Health, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT

Using wild type SY5Y cell lines and cell lines transfected with cDNA of APP C-terminal 100 amino acids, we studied the effect of APP17-mer peptide on A β secretion and expression of related protein IDE, NT-3 and NF. The result indicated that APP17-mer peptide could increase expression of IDE, NT-3 and NF, but inhibit the secretion of A β . The possible mechanisms underlying the protective effects of APP17-mer peptide on neurodegeneration are related to inhibiting A β secretion and increasing expression of endogenous neurotrophins.

Key words: APP17-mer peptide Wide type SY5Y cells SY5YA4CT gene transfected cells A β IDE NT-3 NF

血管平滑肌细胞增殖及其代谢活性的测定

洪华山**# 陈凤荣* 朱应葆* 王一波** 林 岚** 江 琼**

(*北京医科大学第三医院 北京 100083 **福建医科大学附属协和医院 福州 350001)

血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖是动脉粥样硬化(As)关键病理过程之一, VSMC的增殖及其影响因素是As研究的重要手段与方法。测定细胞增殖方法有多种, 但最常用的是微量群体细胞增殖的测定, 它主要包括细胞代谢活性和DNA合成两大类。这两类传统的检测方法, 前者为MTT(噻唑蓝)法, 后者用 ^3H -TdR。由于第一代的MTT经细胞还原后产生

难溶的结晶体, 测定步骤较多, 敏感性较低。所以发展了XTT、WST-1ELASA等第二代方法。第二代经细胞还原后形成可溶性的代谢产物,

本文2000年2月21日收到, 11月22日接受。

#通信作者, 福州福建医科大学附属协和医院心内科(350001), 北京医科大学在职博士研究生。

福建省教委(99A063)及国家教委博士点基金资助课题(9724)。