

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 $[^3\text{H}]$ -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)。

使实验操作变为较简单、方便、省时、敏感,而且 WST-1 稳定性好可作为即用型试剂^[1-3],因此受国外研究者的欢迎和应用^[2,3]。由于^[3H]-TdR 具有放射性毒性和实验操作繁杂、耗时,在国外又开发了无放射性的 5-溴 2-脱氧尿嘧啶(BrdU)掺入 DNA 合成的 ELISA 方法^[4-6],它比^[3H]-TdR 更为敏感、快速而简捷,在国外得到广泛应用。然而,WST-1 的缺点是不能被所有细胞类型所还原代谢^[3],它是否能被 VSMC 代谢并作为其增殖及代谢活性的指标尚未见文献报道。本研究在首先证明 VSMC 能对 WST-1 进行还原代谢的基础上,建立同一标本 BrdU 和 WST-1ELISA 联合测定 VSMC 的增殖及其活性的测定,现报道如下。

材料和方法

1. 新西兰大白兔主动脉平滑肌细胞培养及其鉴定^[7]

选用健康新西兰大白兔(福建省兔类实验动物重点实验室),体重 2kg 左右,空气栓塞处死后,无菌方法迅速取出胸主动脉于 Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM, GIBCOBRL)培养液(内含青霉素 100IU/ml 和链霉素 100 μ g/ml)除去动脉内血液和血块,剥去血管外膜的纤维脂肪层,纵向剪开血管,去除内皮细胞并在培养液中漂洗 2 次后,横向撕下中膜小条,剪成 1mm³ 小块,接种于培养瓶的一侧壁,沿没有组织块培养瓶的侧壁缓慢加入含 20% 胎牛血清(杭州四季青生物材料技术研究所)的 IMDM(完全培养液)后,将培养瓶直立于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中 3-4 小时(去掉组织块的水分并使之与培养瓶侧壁贴紧)后,平放培养瓶使组织块完全浸泡于培养液中而不漂浮在上清液中,静置一周后换完全培养液,待细胞生长并汇合成片后,以 0.125% 的胰蛋白酶(DIFCO)消化传代培养(培养液含 10% 的胎牛血清)。传代培养的细胞经下列鉴别为平滑肌细胞:(1)倒置显微镜观察细胞呈长梭形,放射性生长,成束的细胞平行排列,呈现“峰”、“谷”状。(2)透射电子显微镜,细胞经 3% 戊二醛-5% 多聚甲醛,1% 锇酸固定后送福建医科大学电镜室,经常规乙醇和丙酮逐级脱水,环氧树脂 618 包埋,LKB-V 超薄切片机切片,醋酸铀、枸橼酸铅双染后,在 Hu12 电镜下观察细胞超微结构并摄片,可见胞浆内有肌丝及其微

密体和密斑(图版图 1 和图版图 2)。(3)平滑肌肌动蛋白(Actin)SP 免疫细胞染色(SP 即用型试剂盒和 Actin 单抗购自福州迈新公司)呈阳性反应;细胞浆内可见有染成红色的与细胞长轴平行的丝状物,本实验采用 AEC 作为显示剂(图版图 3)。取第三代细胞进行实验。

2. 细胞计数

同源的第三代细胞接种于 12 孔培养板(Nunc Denmark),待细胞生长达 50% 融合时,以无血清培养液温育 24 小时后,分别换含 0%、1%、2.5%、5%、10% 的胎牛血清的 IMDM 继续培养 24 小时,以 0.125% 的胰蛋白酶 0.01% EDTA 进行消化,2% 台盼蓝拒染计数活细胞。

3. 细胞增殖 ELISA 实验(同一标本 BrdU 和 WST-1ELISA 联合测定)

BrdU 和 WST-1ELISA 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司 Cat. No. 分别为 1647229 和 1644807,实验操作严格按说明书进行,但把两者结合起来,简述如下:以 1×10^4 个细胞(0.1ml)接种于 96 孔微量培养板(Nunc Denmark)的每孔中,待细胞达 50% 融合时,用无血清 IMDM 温育 24 小时后,分别换含 0%、1%、2.5%、5%、10% 的胎牛血清及 10 μ M BrdU 的 IMDM 继续培养 22 小时后每孔加入 10 μ l WST-1 温育 2 小时后,置振荡器振荡 1 分钟(300rpm/min),在 Bio-RAD550 酶标仪 450/655nm 双波长测定 OD 值,即为 WST-1 检测值。之后,倾倒入上述培养板中的液体后,细胞经 FixDenat 固定和 DNA 变性后,加入辣根过氧化物酶(Horse-Radish Peroxidase, POD)标记的 BrdU 抗体(Anti-BrdU-POD),再加入发色底物(四甲基联苯胺)进行显色,以 1mol/L H₂SO₄ 终止反应,立即在酶标仪 450/655nm 双波长测定 OD 值。每组重复 3 孔,并设空白对照(无细胞,仅含培养液)和背景对照(含细胞,但不含 BrdU/WST-1 标记液),上述对照孔吸光值均应小于 0.1。

4. 数据处理

实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,用 SPSS 8.0 One-Way ANOVA 中的 Student-Newman-Keuls 检验进行统计学处理。

结 果

1. 细胞数量变化

胎牛血清作用于 SMC 24 小时后,SMC 数量随着其浓度的升高而增多($P < 0.05$, 呈现浓

度依赖效应作用),见附表。

2. SMC 能对 WST-1 进行还原代谢

如附表所示,随着胎牛血清浓度增加,SMC 细胞数量的增多,WST-1 测定的 OD 值亦随之增高($P < 0.05$),证实 SMC 确能对 WST-1 进行代谢。

3. 同一标本 SMC 的 WST-1 和 BrdU ELISA 联合测定

在 WST-1 测定之后,倾倒入 MTP 中的液体,对同一 MTP 进行 BrdU 的测定,如附表所示,BrdU 的 OD 值随着细胞数量的增多,WST-1 OD 值的增加而逐渐升高,呈现浓度依赖效应作用($P < 0.05$,见附表),说明对 SMC 能进行同一标本的 WST-1 和 BrdU ELISA 的联合测定。

附表 胎牛血清作用 SMC 后细胞数量及其 BrdU 掺入和 WST-1 代谢变化($n = 8$)

血清浓度 (%)	细胞数量 ($\times 10^4$)	BrdU (OD)	WST-1 (OD)
0	7.2 ± 0.84	0.08 ± 0.02	0.37 ± 0.14
2.5	$8.5 \pm 0.50^*$	$0.32 \pm 0.07^*$	$0.73 \pm 0.15^*$
5.0	$10.9 \pm 0.65^{**\star}$	$0.49 \pm 0.13^{**\star}$	$0.86 \pm 0.14^{**\star}$
10	$12.5 \pm 0.28^{**\star}$	$0.70 \pm 0.22^{**\star}$	$0.95 \pm 0.08^{**\star}$

*: $P < 0.05$ 与对照组比较; #: $P < 0.05$ 与 2.5% 组比较; ★: $P < 0.05$ 与 5% 组比较

讨 论

细胞代谢活性测定常用四唑氮盐类物质,其原理是:MTT 法主要被活细胞内质网的酶还原分解为不溶性的产物,而 WST-1 通过加入一种专有的中间电子受体,主要在胞膜的细胞外表面裂解成有色的可溶性 Formazen 产物,两者的产物主要取决于细胞糖酵解的 NAD(P)H 净产率,用酶标仪在一定波长处测定其有色产物的吸光值可间接反映有代谢活性的细胞数量,在一定细胞数量范围内两者密切相关^[2]。

为了确定 WST-1 能否被 SMC 代谢,本实验应用微量滴定板法(MTP, 96 孔板)测定 SMC 加入 2 小时后 WST-1 的变化,如附表所示,随着胎牛血清浓度的逐渐增加,细胞数量增

多的同时 WST-1 的 OD 值亦逐步升高($P < 0.05$),说明 WST-1 能被 SMC 所代谢,可作为测定 SMC 增殖及其代谢活性的一项新的指标。

反映细胞增殖的另一重要指标是 DNA 合成,BrdU 掺入 ELISA 方法由于省时、简便,它从细胞接种到测定数值分析的整个过程能在同一 MTP 进行,并且无同位素放射毒性而受欢迎。与传统的 $[^3\text{H}]$ -TdR 比较,BrdU ELISA 方法更为敏感、方便^[4,5,6]。本实验应用 BrdU ELISA 测定 BrdU 掺入以反映 DNA 合成及其细胞分裂增殖能力,结果随着血清浓度的增加,细胞数量的增多,BrdU OD 值亦逐步增加(见附表),说明 BrdU ELISA 方法能反映 SMC 的增殖状况。

在绝大多数情况下,细胞增殖时,DNA 合成增加,细胞数目增多代谢活性升高;但在某些特殊条件下,细胞 DNA 合成的增加并不一定意味着细胞增殖,有时是代表着细胞凋亡的先兆。如 Liu^[8]等的研究表明腺病毒 E1A 在诱导心肌细胞凋亡的同时其 DNA 合成增加;Wanger^[9]报道小剂量的幽门螺旋菌使胃上皮细胞数目减少但其 DNA 合成却增加。DNA 合成抑制剂放线菌素 D 可抑制细胞 DNA 的合成,但并不明显影响细胞的代谢活性。可见,细胞 DNA 合成与细胞代谢活性并非总是呈平行关系。因此,对同一群体细胞进行某种干预时,若联合测定其 DNA 合成和代谢活性,则能全面地反映出干预因素对细胞的特殊作用。因此,我们在首先证明 WST-1 能被 SMC 所代谢的基础上,利用 WST-1 即用型及其产生可溶产物的优点,联合应用 BrdU 和 WST-1ELISA 方法,在同一 MTP 中,先后加入 BrdU 及 WST-1,再进行 WST-1 测定,最后行 BrdU 掺入 DNA 合成的检测,结果两者的 OD 值均随着血清浓度升高而增加,实现了 BrdU WST-1 ELISA 在同一标本联合测定 SMC 增殖活性。上述测定方法的建立,不但简化了实验步骤,节省了实验材料,克服了 $[^3\text{H}]$ -TdR 具有放射毒性,而且更

重要的是建立了一种更客观评价群体细胞增殖的方法,尤其对研究某一因子或药物对某种细胞有促进 DNA 合成与细胞毒性的双重作用,或者仅影响细胞 DNA 合成及其代谢活性之一的特殊作用具有重要意义。

摘 要

本文首先报道培养的新西兰大白兔的血管平滑肌细胞(SMC)能对 WST-1 进行还原代谢,并联合应用 WST-1 和 BrdU ELISA 测定同一标本的 SMC 的增殖及其代谢活性。结果表明:随着胎牛血清浓度的增加,SMC 活细胞数目、WST-1 和 BrdU 的 OD 值逐渐增多。说明 WST-1 和同一标本的 WST-1 和 BrdU ELISA 联合测定方法是检测 SMC 增殖的指标,能客观地反映 SMC 的 DNA 合成和代谢活性。

关键词: 血管平滑肌细胞 增殖 代谢

WST-1 BrdU ELISA

参 考 文 献

- [1] Scudiero, D. A. , 1988, *Cancer Res.* , **48**: 4827 - 4833.
- [2] Berridge, M. Y. , 1996, *Biochemica.* , **4**: 15 - 19.
- [3] Francoeur, A. M. , et al. , 1996, *Biochemica.* , **3**: 19 - 25.
- [4] Gratzner, H. g. , 1982, *Science.* , **218**: 474 - 475.
- [5] Magaud J. , et al. , 1988, *J. Immunol Methods* , **106**: 95 - 100.
- [6] Werner, B. E. , et al. , 1995, *Biochemica.* , **4**: 37 - 39.
- [7] 章静波, 1995, 《细胞生物学实用方法与技术》, 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社.
- [8] Liu, Y. , et al. , 1996, *J. Cell Biol.* , **133**: 325 - 334.
- [9] Wagner, S. , et al. , 1997, *Gastroenterology.* **113**: 1836 - 1847.

ASSAY OF PROLIFERATION AND METABOLIC OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS

HONG Hua Shan* CHEN Fen Rong* ZHU Ying Bao* WANG Yi Bo** LIN Lan** JIANG Qiong*

(* *The Third Hospital, Beijing Medical University, Beijing, 100083*

** *Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, 350001*)

ABSTRACT

WST-1 that could be metabolized by the cultured smooth muscle cells(VSMC) of New Zealand white rabbit was firstly reported in this paper. In the same sample, WST-1 and BrdU colorimetric ELISA were also used simultaneously to measure the DNA synthesis and metabolic activity of VSMC. The results showed the viable cell number, the OD of WST-1 and BrdU were increased respectively with the increasing concentration of fetal calf serum in VSMC. It demonstrates that WST-1, WST-1 and BrdU ELISA simultaneous measurement can reflect objectively the DNA synthesis and metabolic activity of VSMC and detect proliferation of the VSMC.

Key words: Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Metabolism WST-1 BrdU ELISA

This report is financially aided by the assistance fund for doctors provided by the Country's Educational Commission (9724) and the Fujian Educational Commission(99A063).