

- [13] Yu, H. G. , Muszynski, M. G. , Dawe, R. K. , 1999, *J. Cell. Biol.*, **145**: 425-435.
- [14] Yu, H. G. , Hiatt, E. N. , Dawe, R. K. , 2000, *Trends in Plant Science*, **5**: 543-547.
- [15] Hoopen, R. T. et al. , 2000, *Chromosome*, **109**: 482-489.
- [16] 王关林, 方宏筠. 1998, 植物基因工程原理与技术, 634-636.
- [17] Sambrook, J. , Fritsch, E. F. , Maniatis, T. , 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>nd</sup>)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [18] 上海植物生理学会, 1985, 植物生理学试验手册, 1-5.
- [19] Yao, X. B. , Anderson, K. L. , Cleveland, D. W. , 1997, *J. Cell. Biol.*, **139**: 435-447.
- [20] Mnazanero, S. et al. , 2000, *Chromosome*, **109**: 308-317.
- [21] Hardwick, K. G. , 1998, *Trends Genet*, **14**: 1-4.
- [22] Waters, J. C. et al. , 1998, *J. Cell. Biol.*, **141**: 1181-1191.
- [23] Nicklas, R. B. , 1997, *Annu. Rev. Biophys. Biochem.*, **17**: 431-449.
- [24] Waters, J. C. et al. , 1999, *Current Biology*, **9**: 649-652.
- [25] Nickals, R. B. , Ward, S. C. , Gorbsky, G. J. , 1995, *J. Cell. Biol.*, **130**: 929-939.

## LOCALIZATION OF MAD2 HOMOLOGUE IN Cell CYCLE OF VICIA FABA

MA Lan YAO Jian Hui GU Yue Hua

(School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

### ABSTRACT

Cell cycle is a highly ordered process, and it is tightly monitored by checkpoints. MAD 2 is an important protein of spindle checkpoint. We have identified a *broad bean* homologue of MAD 2 using immunoblotting method. It has a MW of about 26kDa. The pattern of its localization in mitotic cells is almost like those homologues in animal cells, it also varies with the stage of mitosis. During interphase, MAD 2 was distributed throughout the cell and had a prominent localization in perinuclear area. After nuclear envelope broke down, it began accumulating on kinetochore. In prometaphase, MAD 2 colocalized with the kinetochores. With the extension of microtubule, the kinetochore was labeled weakly or not at all. By late metaphase and anaphase, Mad 2 was not detectable on kinetochores.

**Key words:** *Vicia faba* Checkpoint protein Kinetochore Homologous location

## 无血清培养高密度乳猪肝细胞的形态和功能变化

陈 钟\* 丁义涛

张鹤云

(南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 南京 210008)

(南京大学生化系 南京 210093)

生物人工肝(BAL)是治疗急性肝衰竭(ALF)或为肝移植创造条件的一种具有良好前景的手段。猪肝细胞因其分化功能接近于人肝细胞,且细胞产量较高,是最合适的异种细胞来源<sup>[1]</sup>,目前多数BAL使用猪肝细胞。理想的细胞培养密度为 $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5/\text{ml}$ <sup>[2]</sup>,然而,BAL需要大量肝细胞来支持ALF患者的肝功能<sup>[3-4]</sup>。制成有临床意义的BAL约需人全肝量的10% - 20% ( $2 \times 10^9 - 4 \times 10^9$  个细胞)<sup>[5]</sup>,BAL中细胞的密度常超过 $1 \times 10^7/\text{m}^3$ <sup>[3]</sup>。此外,BAL使用时含血清培养基常需换成无血清培养基<sup>[6]</sup>。因此,了解肝细胞在无血清培养基中高密度培养的形态和功能对于判断BAL的治疗效果十分重要。但是,迄今为止,所见报告甚少<sup>[7-9]</sup>。本文研究了高密度猪肝细胞在无血清培养时的形态和功能。

### 材料和方法

#### 1. 材料

中国实验用小型乳猪10只,体重2.7-4.0 kg,雌雄不限,由本院实验动物中心提供。胶原酶IV、RPMI1640购于Gibco公司,其他试剂为分析纯级。

#### 2. 肝细胞分离和培养

采用改良的原位两步胶原酶灌注法分离乳猪肝细胞<sup>[10]</sup>。分离的肝细胞清洗后悬浮在RPMI1640中。台盼蓝拒染试验测活率。肝细胞以不同的密度接种至含 $200 \mu\text{g}/\text{L}$  氢化可的松,  $1 \text{mg}/\text{L}$  HGF,  $10 \mu\text{g}/\text{L}$  EGF,  $20 \mu\text{g}/\text{L}$  NGF,

本文2001年11月15日收到,2002年3月20日接受。  
本研究受江苏省卫生厅重点发展项目基金(BQ2000200)资助。

\*现工作单位:江苏南通医学院附属医院普通外科,邮编:226001。

100 $\mu$ g/L 胰岛素, 4 $\mu$ g/L 胰高血糖素, 6.25mg/L 转铁蛋白, 10mg/L 亚油酸, 2mmol 谷氨酰胺, 0.5g/L 牛血清白蛋白, 3nmol/L 硒酸钠, 0.1 $\mu$ mol/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 50pmol/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15mmol/L HEPES, 200 $\mu$ g/L 头孢哌酮钠, 10 万 U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素的无血清 RPMI1640 培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养 7 天。培养瓶预先用鼠尾胶覆盖。

### 3. 实验分组

A 组( $n=10$ , 高密度培养组): 肝细胞以  $1 \times 10^7$ /ml 培养; B 组( $n=10$ , 低密度培养组): 肝细胞以  $5 \times 10^5$ /ml 培养。

### 4. 观察指标

(1) 活率 用台盼蓝拒染试验测肝细胞活率。

(2) LDH 含量 培养上清中 LDH 含量用全自动生化仪(MEGA Toshiba)测定。

(3) 蛋白质合成功能 将 1 $\mu$ Ci/ml [ $^3\text{H}$ ]-亮氨酸加入培养基中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% (v/v)  $\text{CO}_2$  培养 24 h。肝细胞用 Hanks 液洗涤后在细胞滤纸上用 10% (v/v) 三氯醋酸裂解、无水乙醇固定, 用 Beckman-LS 9800 液体闪烁仪计数肝细胞内 [ $^3\text{H}$ ]-亮氨酸的量。

(4) 安定(Diazepam)转化功能 在培养基中加入 50mg/L(w/v)安定(Diazepam)标准品培养 24 h, 用荧光偏振免疫分析仪(Abbott TDx)测定上清中安定(Diazepam)的浓度。

(5) 葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)活性 收集肝细胞、粉碎, 以葡萄糖-6-磷酸为底物, 反应的终产物磷酸的量表示该酶的活性。

(6) 形态学 倒置显微镜动态观察肝细胞的形态; Hitachi-300 透射电镜(TEM)观察细胞的超微结构。

### 5. 统计学处理

结果用  $\bar{x} \pm SD$  表示。用 stata 6.0 软件进行方差分析(ANOVA)。当  $P < 0.05$  时, 认为有显著差异。

## 结 果

### 1. 活率

肝细胞活率随着时间的延长逐渐下降, A、B 两组间无显著性差异(表 1)。

表 1 培养肝细胞活率 (%) ( $\bar{X} \pm SD$ )

培养天数	A 组	B 组
0	98.7 $\pm$ 1.6	98.7 $\pm$ 1.6
1	95.7 $\pm$ 1.5	96.1 $\pm$ 2.7
2	96.2 $\pm$ 1.5	94.0 $\pm$ 1.6
3	92.5 $\pm$ 1.0	90.6 $\pm$ 1.5
4	94.3 $\pm$ 2.0	92.5 $\pm$ 2.0
5	90.9 $\pm$ 4.8	89.0 $\pm$ 2.8
6	91.4 $\pm$ 1.9	90.5 $\pm$ 1.2
7	90.1 $\pm$ 4.6	88.1 $\pm$ 45.0

### 2. LDH 含量

A 组 LDH 含量较 B 组为高; A、B 两组 LDH 含量培养初期随着时间的延长而增加, 3 天后逐渐下降(表 2)。

表 2 培养肝细胞 LDH 含量(U/L/10<sup>6</sup> cells) ( $\bar{X} \pm SD$ )

培养天数	A 组	B 组
0	2.6 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0*
1	14.6 $\pm$ 2.5	2.8 $\pm$ 2.0*
2	17.6 $\pm$ 2.0	3.5 $\pm$ 2.0*
3	16.4 $\pm$ 2.2	3.3 $\pm$ 2.3*
4	12.6 $\pm$ 0.9	3.0 $\pm$ 2.1*
5	11.9 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 2.3*
6	11.0 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 1.8*
7	10.7 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 1.9*

\*与 A 组相比,  $P < 0.05$ 。

### 3. 蛋白质合成功能

A 组肝细胞内 [ $^3\text{H}$ ]-亮氨酸的量较 B 组为低; A、B 两组肝细胞内 [ $^3\text{H}$ ]-亮氨酸的量在 7 天的培养中略有增高(表 3)。

表 3 培养肝细胞内 [ $^3\text{H}$ ]-亮氨酸量(cpm/10<sup>6</sup> cells) ( $\bar{X} \pm SD$ )

培养天数	A 组	B 组
0	569.6 $\pm$ 25.6	1384.6 $\pm$ 96.0*
1	573.3 $\pm$ 26.7	1376.0 $\pm$ 104.1*
2	590.5 $\pm$ 27.8	1398.4 $\pm$ 153.5*
3	591.3 $\pm$ 35.2	1428.0 $\pm$ 176.9*
4	595.6 $\pm$ 37.2	1512.4 $\pm$ 196.0*
5	617.2 $\pm$ 37.0	1552.3 $\pm$ 168.6*
6	649.2 $\pm$ 59.5	1607.2 $\pm$ 160.0*
7	666.3 $\pm$ 53.8	1639.2 $\pm$ 180.6*

\*与 A 组相比,  $P < 0.05$ 。

### 4. 安定(Diazepam)转化功能

A 组肝细胞的安定(Diazepam)转化能力较 B 组肝细胞为低; A、B 两组肝细胞在第 2、3 天安定(Diazepam)转化功能最强(表 4)。

表 4 肝细胞培养上清安定浓度(mg/L/10<sup>7</sup> cells) ( $\bar{X} \pm SD$ )

培养天数	A 组	B 组
0	12.30 $\pm$ 2.30	0.81 $\pm$ 0.02*
1	11.28 $\pm$ 3.32	0.79 $\pm$ 0.03*
2	9.18 $\pm$ 1.72	0.75 $\pm$ 0.04*
3	8.51 $\pm$ 2.20	0.77 $\pm$ 0.05*
4	9.82 $\pm$ 2.06	0.95 $\pm$ 0.06*
5	11.24 $\pm$ 1.62	1.01 $\pm$ 0.09*
6	13.16 $\pm$ 1.47	1.05 $\pm$ 0.07*
7	14.73 $\pm$ 1.51	1.19 $\pm$ 0.10*

\*与 A 组相比,  $P < 0.05$ 。

### 5. G-6-Pase 活性

A 组肝细胞的 G-6-pase 活性较 B 组肝细胞为低; 两组肝细胞培养当天 G-6-Pase 活性最高, 第 1 天明显下降, 然后稍稍升高, 维持在较低的水平。

### 6. 形态学

两组新分离的肝细胞形态学上完整, 放入培养瓶中很快贴壁生长并形成小的聚集团块, 然后铺满瓶壁。TEM 显示高密度培养的猪肝细胞具有正常的培养肝细胞的超微结构, 可见丰富的粗面内质网

(图1)。

表5 培养肝细胞 G-6-Pase 活性 (nmol/L/10<sup>10</sup> cells)  
( $\bar{X} \pm SD$ )

培养天数	A 组	B 组
0	14.19 ± 2.41	12.90 ± 0.30
1	5.10 ± 1.86	3.06 ± 0.34*
2	4.43 ± 1.10	4.05 ± 0.39
3	4.87 ± 1.40	6.38 ± 1.38
4	4.33 ± 0.97	5.14 ± 0.62
5	4.78 ± 0.97	5.48 ± 0.95
6	4.58 ± 0.90	5.68 ± 0.46*
7	4.58 ± 0.93	6.48 ± 0.87*

\*与 A 组相比,  $P < 0.05$ 。

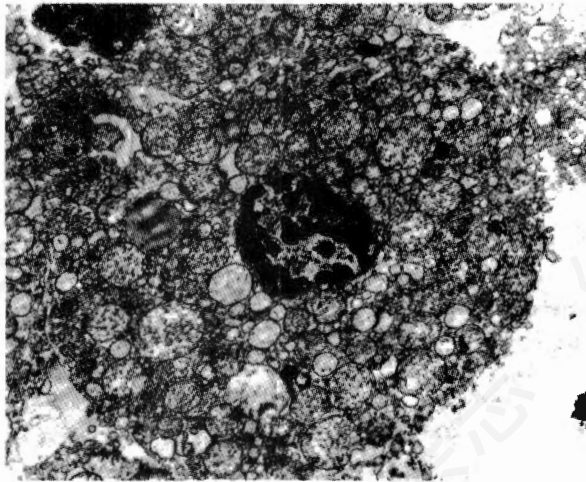


图1 透射电镜示 A 组肝细胞超微结构 (×5000)

## 讨 论

理想的 BAL 应当包含大量有功能的肝细胞。这种装置应当能暂时提供高水平的肝功能,包括血浆蛋白的合成及生物转化和解毒过程中一些酶的活性;这种装置也应该体积较小且使用方便。因而,肝细胞必须以高密度培养。由于 BAL 中肝细胞是培养在无血清培养基中,因此,本文研究了乳猪高密度肝细胞在无血清培养条件下的形态和功能。

Yuasa<sup>[11]</sup>证实细胞的密度是调节生长和表达分化功能的极为重要的因素,在高密度培养条件下,肝细胞表达完全的分化能力,但它们的生长受到抑制。Nyberg<sup>[4]</sup>发现高密度(1.0 × 10<sup>7</sup>/ml)培养的包裹在凝胶中的大鼠肝细胞在 24h 时活率最低、尿素产量最低,并观察到在活细胞数量与尿素产量之间有直接相关关系。这些结果强调了细胞活率对 BAL 的代谢能力的重要性及为了维持和改善肝细胞的活率

采取细胞保护措施的必要性。后者的观察也提示氧气是降低高密度培养肝细胞活率的潜在因素。肝细胞活率随着时间的延长逐渐下降限制了 BAL 的效果及持续时间。本研究显示肝细胞在含有多种生长因子和化学元素的激素限定的无血清培养基中高密度培养 7 天,其活率虽逐渐下降,但均超过 90%,主要功能低于低密度培养肝细胞。这可能与高密度培养时缺乏足够的氧气和营养、代谢产物的堆积以及细胞间的接触抑制有关,本实验结果与文献报告一致。较高的肝细胞活率与我们采用的原位肝灌注法有关<sup>[12]</sup>。

Joly<sup>[13]</sup>报告培养肝细胞在 4 天内的蛋白质合成逐渐增加。本研究表明蛋白质合成功能在 7 天内能较好地维持,并略有增加。TEM 显示细胞丰富的粗面内质网,提示血浆蛋白质的主动合成和分泌比较旺盛。

G-6-Pase 是调节血糖、保持内环境稳定的一种关键酶。文献报告乳猪肝细胞以 1.0 × 10<sup>5</sup>/ml 在含血清培养基中培养,其 G-6-Pase 随时间延长而增加<sup>[14]</sup>。本组结果显示 A 组肝细胞 G-6-Pase 高峰在 0 天,其后在低水平维持。

在常规培养条件下,存在于内质网或线粒体内膜的细胞色素 P450 和其它负责异种代谢的一些酶很早就失去活性,这限制了 BAL 的应用。安定转化功能反映细胞色素 P450 的活性,本研究表明 A 组肝细胞的安定转化功能在第 2、3 天最强。

LDH 是细胞损害的最敏感的指标。本组结果显示前 3 天 LDH 漏出量最高,说明由于酶造成的新分离细胞膜的损害需要 3 天才能得到恢复,与文献报告一致<sup>[15]</sup>。

因此,本研究表明无血清培养高密度猪肝细胞在 7 天内能较好地维持其形态、蛋白质合成及安定转化功能,肝细胞活率均高于 90%,分离当天的肝细胞 G-6-Pase 活性最高,高密度培养肝细胞的功能较低密度培养时为低。

## 摘 要

本文研究了无血清培养高密度猪肝细胞的形态和功能变化。将分离的肝细胞以高密度(1 × 10<sup>7</sup>/ml)培养在含激素、多种生长因子和营养成分的无血清培养基中,动态观察培养 7 天中肝细胞形态、活率、蛋白质合成功能、G-6-Pase 活性、安定转化功能及 LDH 含量;同时以无血清培养低密度(5 × 10<sup>5</sup>/ml)肝细胞作为对照组。研究结果表明:高密度培养的

肝细胞各项功能较低密度培养的肝细胞为低;高密度培养的肝细胞的形态、蛋白质合成功能在培养7天中保持稳定;活率随着培养时间的延长而下降,但均高于90%;安定转化功能在培养第2、3天最强;G-6-Pase活性在培养1天后明显下降,然后维持在较低水平;LDH含量在第1、2、3天较高。

关键词:肝细胞 培养 生物人工肝

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Stange J, et al., 1996, *Semin Liver Dis.*, 16: 435 - 455.
- [ 2 ] Kamihira M, et al., 1997, *Ann NY Acad Sci.*, 831: 398 - 407.
- [ 3 ] Kobayashi N, et al., 2000, *Transplant Proc.*, 32: 237 - 241.
- [ 4 ] Nyberg SL, et al., 2000, *Surgery.*, 127: 447 - 455.
- [ 5 ] Hughes RD, et al., 1996, *Semin Liver Dis.*, 16: 435 - 444.
- [ 6 ] Neuzil DF, et al., 1993, *Surgery.*, 113: 340 - 343.
- [ 7 ] Nakamura T, et al., 1985, *Cell Struct Funct.*, 10: 1 - 16.
- [ 8 ] Sakai Y, et al., 1999, *Cell Transplant.*, 8: 531 - 541.
- [ 9 ] Pahernik SA, et al., 2001, *Cell Tissues Organs.*, 168: 170 - 177.
- [ 10 ] Seglen PO. 1976, *Cell Biol.*, 13: 29 - 83.
- [ 11 ] Yuasa C, et al., 1993, *J Cell Physiol.*, 156: 522 - 530.
- [ 12 ] Chen Z, et al., 2001, *Ann Clin Lab Sci.*, 31: 391 - 398.
- [ 13 ] Joly A, et al., 1997, *Transplantation*, 63: 795 - 803.
- [ 14 ] 刘树人,等, 1999, 世界华人消化杂志, 7: 375 - 377.
- [ 15 ] Kardassis D, et al., 1999, *Transplant Proc.*, 31: 668 - 669.

## CHANGES IN MORPHOLOGY AND FUNCTIONS OF SUCKING PIG HEPATOCYTES CULTURED IN SERUM-FREE MEDIUM AT HIGH-DENSITY

CHEN Zhong DING Yi Tao

(Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing 210008)

ZHANG He Yun

(Department of Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

### ABSTRACT

In the present study, we assessed the dynamic changes in morphology and functions of porcine hepatocytes cultured in serum-free medium at high-density. Isolated hepatocytes were cultured in serum-free medium at high-density. Morphology, viability, protein synthesis, G-6-Pase activity, diazepam transformation of hepatocytes and LDH in supernatant was evaluated during 7 days of culture. The hepatocytes cultured in serum-free medium at low-density were served as a control group. The results showed that morphology, protein synthesis of hepatocytes cultured at high-density were stable over the course of 7 days. High viability (>90%) was obtained though it declined with time. Diazepam transformation was higher on days 2 and 3. G-6-Pase activity of the hepatocytes declined apparently after 1 day of culture, and it was maintained at low level for 7 days. LDH in supernatant was higher on days 1, 2 and 3. The functions of hepatocytes cultured at high-density were lower than at low-density culture.

Key words: Hepatocyte Culture Bioartificial liver

## 热休克反应中小鼠肾 HSP70 和乳酸脱氢酶同工酶表达变化的研究\*

魏纪东 张顺利\*\* 张新胜 张文学 徐存拴

(河南师范大学生命科学学院 河南省生物工程重点实验室 新乡 453002)

热休克反应以热休克蛋白(Heat Shock Protein, HSP)的合成成为主要标志。用 Western blotting 或放射自显影方法,以体外培养的细胞为材料对 HSP 的研究已较深入<sup>[1-3]</sup>,并明确了 HSP70 的细胞保护功能,但对整体动物的同类研究却很少报道。迄今,体温升高诱导肾表达 HSP 及其间乳酸脱氢酶(LDH)

同工酶变化的资料尚未见到。进一步研究揭示了

本文 2001 年 10 月 22 日收到,2002 年 5 月 28 日接受。

\* 中法先进技术合作项目(B96-11)及河南省动物学重点学科资助。

\*\* 通讯作者。