

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^[1-3],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。

HSP在胚胎发育^[4]、细胞增殖^[5]、激酶、受体和转录因子活性的调控^[6]等方面具有广泛的作用。同工酶是反映基因表达的良好标志,LDH同工酶又是糖代谢过程中的关键酶,研究它在热休克反应中的变化,不仅有助于了解此时细胞能量代谢方式与基因表达的改变,同时,亦可为阐明生物抗性的建立机制提供新的依据。

材料与方法

1. 实验动物及热休克处理

昆明种小鼠7-8周龄,体重22±2g,雌雄各半,购自河南省医学实验动物中心。随机分为正常对照组(6只)和实验组(20只)。对照组动物于室温下饲养,实验组动物参照文献^[7-8]实验条件置46℃恒温箱热休克处理30分钟,然后分别于室温恢复4h、12h取材(各10只)。

2. 切片标本制备和免疫组化染色

将小鼠放血处死,速取肾入10%福尔马林固定24h,常规石蜡切片,6μm连续切片,间隔60μm取一片,每只动物取6片,以免疫组化链霉亲和素标记的过氧化物酶(Streptavidin-peroxidase,SP,即三抗)法进行染色,全部标本在加一抗前均置0.01mol/L的枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中,于微波炉内做抗原修复10min。0.3% H₂O₂ 甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶活性。一抗为鼠抗HSP70(Sigma),1:800,4℃孵育24h;二抗(生物素化的羊抗鼠IgG)和三抗为Zymed产品,并均以1:200稀释,37℃孵育30分钟。DAB显色(镜下控制),苏木精复染,封片如常。以PBS取代一抗作阴性对照,反应结果为阴性。

3. 电泳样品制备

如上取材同时,将部分肾组织置匀浆器中,加适量生理

盐水,冰浴匀浆。然后离心(10 000rpm,TGL-16型高速冷冻离心机)10分钟,分装上清液置液氮备用。蛋白质浓度测定参照Neuhoff等^[9]方法进行。

4. 电泳及染色

电泳和染色基本按吴鹤龄等^[10]方法进行。浓缩胶浓度为2.5%,分离胶浓度为7%,加样量50μg/孔,置4℃冰箱内电泳,起始电压110V,样品到分离胶后调电压至200V,恒压维持5h。电泳结束后取出凝胶,置LDH染色液(氧化型辅酶I 12.5mg;氯代硝基四氮唑蓝 7.5mg;吩嗪二甲酯硫酸盐 0.5mg;1mol/L乳酸钠液 2.5ml;0.1mol/L NaCl 1.3ml;0.5mol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.5)3.8ml;加水至25ml)中,37℃保温20min。胶板染色后用双蒸水漂洗2-3次,7%醋酸中固定12h。

5. 图像分析

每只动物取5张切片,每张切片随机选取5个视野,用HPIAS彩色病理图像分析系统(同济医科大学)分别测算肾小球、近曲小管、远曲小管和肾髓质HSP70免疫反应阳性部位的平均密度。用GIS凝胶图像分析系统(Tanon公司)测算肾LDH同工酶电泳谱带的强度和面积。

6. 统计学分析

采用t检验。

结 果

1. HSP70在肾组织中的表达定位

HSP70免疫组化反应在对照组动物呈阴性,在实验组动物于热休克恢复期4h和12h均呈阳性,阳性部位呈黄色或棕黄色颗粒,主要分布在近曲小管、远曲小管和肾髓质各管壁的上皮细胞胞质内,核呈阴性反应(见插图3图版)。反应强度肾髓质强于肾皮质,肾小管强于肾小球。图像分析结果如表1。

表1 热休克反应中小鼠肾HSP70的免疫反应密度($\bar{X} \pm S$)

分 组	肾 皮 质			肾髓质
	肾小球	近曲小管	远曲小管	
对照组	-	-	-	-
4h组	0.011 ± 0.0026**	0.029 ± 0.0044**	0.032 ± 0.0045**	0.040 ± 0.0050**
12h组	0.016 ± 0.0021**	0.025 ± 0.0038**	0.023 ± 0.0039**	0.032 ± 0.0047**

** P < 0.01, 分别与对照组相比。

表2 热休克反应中小鼠肾LDH同工酶变化($\bar{X} \pm S$)

种 类	对 照 组		4h 组		12h 组	
	强 度	面 积	强 度	面 积	强 度	面 积
LDH ₁	180 ± 14.26	4126 ± 120.18	145 ± 9.77	3642 ± 138.98	196 ± 13.82	4307 ± 132.84
LDH ₂	124 ± 8.95	2973 ± 174.35	134 ± 9.28	3960 ± 187.66	200 ± 14.19*	5622 ± 139.71**
LDH ₃	201 ± 14.67	8932 ± 165.46	122 ± 8.47*	5385 ± 144.37**	190 ± 14.56	7155 ± 158.62
LDH ₄	153 ± 11.39	4243 ± 120.96	75 ± 5.45	2538 ± 115.78**	181 ± 14.60	7254 ± 163.19**
LDH ₅	0	0	88 ± 6.91	2459 ± 116.53**	186 ± 13.75**	8491 ± 164.32**

* P < 0.05, ** P < 0.01, 分别与对照组相比。

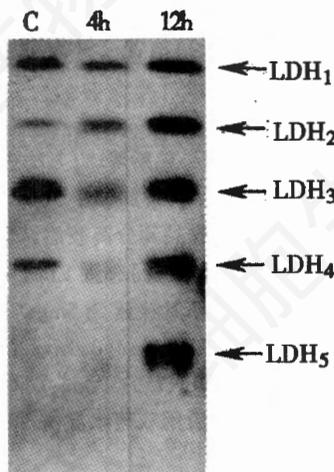


图1 热休克后肾 LDH 同工酶活性变化

2. 热休克反应中肾 LDH 同工酶的表达变化

对照组动物表达 LDH₁ - LDH₄; 热休克恢复期 4h LDH₁ - LDH₄ 活性稍减弱, 并出现 LDH₅ 的微弱表达; 12h 组可见到 LDH₁、LDH₂、LDH₄ 活性增强, LDH₅ 含量显著增加(表 2)。

讨 论

研究资料表明, 显微注射 HSP70 单克隆抗体的细胞将难以耐受短暂的热休克^[3], HSP27 的含量和磷酸化程度与细胞的热耐受力形成有关^[11], 因而认为 HSP 可保护细胞免受热应激的损伤。本文结果证实, 46℃、30min 可诱导小鼠肾近曲小管、远曲小管、肾小球及肾髓质细胞表达 HSP70, 反映了肾组织不同细胞提高热耐受性的共同分子机制——HSP 的诱导合成。我们也发现, HSP70 定位在上述各种结构管壁上皮细胞胞质中, 细胞核均呈阴性反应, 这与小鼠子宫^[5]、肝细胞^[8]中的结果相同。

热休克处理可直接引起机体呼吸和血液循环速率加快, 以及氧和能量的大量消耗, 此时细胞能量代谢方式和途径的改变也必然会影响到其正常生命活动的进行。LDH 同工酶是糖酵解过程中的重要酶, 它催化乳酸和丙酮酸间的相互转化, 是细胞厌氧条件下获取能量的主要方式。该酶由 α 和 β 亚基的四聚体构成, 亚基的合成分别由 A 基因和 B 基因控制, A 基因主要控制 LDH₅ 的合成, B 基因主要控制 LDH₁ 的合成。小鼠发育过程中肾 LDH 同工酶谱呈现明显变化, 至出生后 LDH₅ 几无活性, 并认为此时控制 LDH₅ 合成的 A 基因处于关闭状态^[10], 本文对照组实验结果与此一致。但我们也发现, 实验组小鼠肾在表达 HSP70 的同时, LDH 同工酶谱也发生明显

变化, 即热休克恢复期 4h LDH₁、LDH₃、LDH₄ 活性减弱, LDH₂ 活性虽然增强, 但与对照组相比无显著性差异, 这种变化可能与热休克处理对细胞功能的抑制性影响有关; 而随着恢复期的延长, 在 12h 组小鼠 LDH₁、LDH₂、LDH₄ 活性明显增强, 特别是与对照组相比, LDH₅ 在热休克后 4h 重新出现, 恢复至 12h 时其活性显著升高。早在对 HSP 基因调控的研究中就曾发现, HSP 可促进某些关键基因的表达和重要蛋白质的合成。因此, 作者推测, 上述结果的可能机制是 HSP70 参与了热休克反应中 LDH 同工酶表达的基因调控, 然而, 这一复杂的分子事件的详细过程有待更多的实验观察和进一步阐明。综合本文结果和作者先前的报道^[12], 我们认为, 热休克反应中细胞热耐受性的建立并非 HSP 的单独作用, 而很可能是多种蛋白质分子间的相互协同作用。如果说热休克反应中磷酸酶活性的增强是细胞提高热耐受力的重要途径之一, 并有助于细胞提高对物质的吸收与转运能力^[12]的话, 那么, LDH₅ 在小鼠肾组织中从出生后消失到热休克反应中重新表达, LDH₁、LDH₂、LDH₄ 在热休克反应中活性增强, 均提示着细胞通过该途径增强能量代谢, 从而维持正常生理功能。

摘 要

用免疫组织化学和聚丙烯酰胺凝胶同工酶电泳方法研究了小鼠肾在热休克(46℃, 30 分钟)恢复期(4h 和 12h)HSP70 的表达和乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的变化。结果表明:(1)HSP70 主要定位于肾小管上皮细胞胞质中, 细胞核内未见表达;(2)HSP70 免疫阳性反应在肾髓质较肾皮质强, 肾小管较肾小球强;(3)热休克诱导小鼠肾 LDH 同工酶活性增强。提示:LDH 同工酶可能对细胞热耐受性的建立有重要作用。

关键词:热休克蛋白 70 乳酸脱氢酶(LDH)同工酶
热休克反应 免疫组织化学 肾

参 考 文 献

- [1] Pratt, W. B. et al., 1993, *J Bio Chem.*, 268(29):21455 - 21458.
- [2] 徐存拴等, 1998, *生物化学与生物物理学报*, 30: 179 - 184.
- [3] Piabowol, K. T. et al., 1988, *Science.*, 241:433 - 436.
- [4] Hciikkila JJ. et al., 1993, *Developmental Genetics*, 14:87 - 91.
- [5] 张顺利等, 2002, *解剖学杂志*, 25(1):21 - 24.
- [6] Rutherford, S. L. et al., 1994, *Cell.*, 79:1129 - 1132.

- [7] Fujio, N. et al., 1987, *J Biochem.*, 101-106.
 [8] 张顺利等, 2000, 解剖学杂志, 23(4): 329-332.
 [9] Neuhoff, V. K. et al., 1979, *Z. Physiol Chem.*, 360: 1657-1670.
 [10] 吴鹤龄等, 1982, 遗传, 4(2): 22-24.
 [11] Chretien, P. et al., 1988, *J Cell Physiol.*, 137: 157-166.
 [12] 张顺利等, 1998, 上海实验动物科学, 18: 73-76.

STUDY ON THE EXPRESSION OF HSP70 AND THE CHANGES OF LDH ISOZYMES OF MOUSE KIDNEY IN HEAT SHOCK RESPONSE

WEI Ji Dong ZHANG Shun Li ZHANG Xin Sheng ZHANG Wen Xue XU Cun Shuan

(College of Life Sciences, Henan Normal University; Henan Bioengineer Key Laboratory; Xinxiang 453002)

ABSTRACT

The immunochemical method and PAGE were used to analyze the changes of the expression of HSP70 and lactate dehydrogenase (LDH) isozymes of mouse kidney during the recovery period of heat shock (46°C, 30min). The results showed that: (1) the HSP70 positive immunoreactivity was localized in the renal tubule epithelial cytoplasm, while the nucleus was negative; (2) The HSP70 positive immunoreactivity of the renal medulla was stronger than that of the renal cortex, and the HSP70 positive immunoreactivity of the renal tubule was stronger than that of the renal corpuscle; (3) Heat shock induced increase in the activities of LDH isozymes in kidney. The results suggested that LDH isozymes may be play an important role in the building of heat tolerance of cells.

Key words: Heat shock protein 70 (HSP70) LDH isozyme Heat shock response Immunohistochemistry Kidney

* China-France Advanced Technique Item (B96-11) and supported by Henan Province Zoology Key Subject

人神经干细胞的体外生物学特性*

刘 奔 李兰英 庞智玲

(天津医科大学内分泌研究所 天津 300070)

神经干细胞(NSCs)是一种具有分化潜能的原始细胞,其具备自我更新和增殖的能力,并在特定因素影响或诱导下,向神经元或胶质细胞(星形胶质细胞和少突胶质细胞)分化。某些具有丝分裂源活性的细胞因子可诱导神经干细胞的增殖,并影响其分化方向。碱性成纤维生长因子(bFGF)对胚胎海马、皮层,成年脑室下区、嗅球和脊髓的神经干细胞增殖均起重要作用^[1-4]。表皮生长因子(EGF)作用与bFGF相类似,但作用时间,影响方式不同^[5]。目前对bFGF和EGF的作用认识不一,且观察对象多为啮齿类动物,与人神经干细胞的生物学特性还存在一定差距。若要应用于临床,掌握人神经干细胞的诱导分化方法是必不可少的。

材料与方法

1. 材料

1) 人胎脑 取自因治疗目的引产的胎儿(经病人和家属同意并授权),胎龄10-22周,双亲无遗传性疾病。术后1h内无菌条件下,分离双侧大脑半球。

2) 主要试剂 粉剂培养基 DMEM/F12 (GIBCO); 胎牛血清(FCS)(中科院血研所); 胰岛素 (Insulin) (SIGMA); 转铁蛋白 (SIGMA); 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) (邦定公司); 重组人表皮生长因子(EGF) (GIBCO); 抗增殖细胞核抗原 PCNA (CALBIOCHEM); 抗胶质纤维酸性蛋白 (GFAP, BIOGENEX); 抗 Nestin、NF-200、Gal-C 由 Louisville 大学邱猛生博士惠赠; 兔 GFAP 多抗 (BIOGENEX); FITC-抗小鼠 IgG (博士德)。SABC 双标免疫组化染色试剂盒及既用型 SABC 免疫组化染色试剂盒均购自武汉博士德公司。

2. 方法

1) 人脑神经干细胞的诱导培养 于无菌条件下取人胎两侧大脑半球,剥除脑膜,机械分散细胞,经100目不锈钢滤网过滤后接种,培养于37°C,5% CO₂,饱和湿度培养箱内。培养液为 DMEM/F12 无血清培养基,并加入 N2 添加剂。于接种之日起添加促有丝分裂因子 EGF (20ng/ml), bFGF (20ng/ml), 单独或联合作用。以上各组 2-3 日半量

本文 2001 年 12 月 29 日收到,2002 年 5 月 28 日接受。

* 本课题承天津市自然科学基金资助,课题号 013611711。