

## MOLECULAR BIOLOGICAL EVIDENCE ON PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF MURINE HEMATOPOIETIC STEM CELLS

Liu Cunren He Fuchu Wu Chutse  
(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

### ABSTRACT

By PCR amplification of Y chromosome specific sex-determining region (Sry) as a new cytogenetic marker, the characteristics of proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells had been studied. The results indicated that this technique had advantages in simplicity, sensitivity, and specificity. When bone marrow cells or 13 day-spleen colony-forming unit (CFU-S<sub>13</sub>) derived from male mice were injected into female recipient mice, Sry PCR results showed that all the CFU-S<sub>13</sub> and some of cells from bone marrow, spleen, thymus, and lymph node in recipient mice were originated from donor with XY genotype. These data above gave the direct molecular biological evidence that CFU-S could proliferate and differentiate into various hematopoietic cells in vivo during CFU-S transplantation.

Key words: CFU-S Hematopoietic stem cell SRY PCR

## 亚硝酸盐对培养心肌细胞周期的影响\*

王光武\*\* 赵轶卓 王凡 赵勇

(白求恩医科大学应用基础医学研究所 长春 130021) (卫生部放射生物重点实验室)

亚硝酸盐类药物已广泛地用于治疗冠心病等缺血性心脏病,其机理可能主要是由于此类药物能使末梢动、静脉血管扩张,减少回心血量,使收缩期心室壁张力降低、心肌耗氧量减少,从而起到缓解心肌缺血性损伤的作用<sup>[1]</sup>。但是,临床上曾有因应用此类药物不当而导致心肌梗塞区扩大的报道<sup>[2]</sup>。作者曾给大白鼠经胃连续灌入较大剂量亚硝酸钠(NaNO<sub>2</sub>),使其心肌产生坏死性改变<sup>[3]</sup>。本文研究的目的是利用细胞体外培养的方法,观察 NaNO<sub>2</sub> 对大鼠心肌细胞周期的影响。

### 材料与方 法

#### 一、动物

新生1—2天的Wistar乳鼠(白求恩医科大学实验动物部提供)。

#### 二、试剂

胎牛血清(卫生部长春生物制品研究所制品), MEM干粉培养基(美国GIBCO公司产品), 胰蛋白酶(美国Sigma公司产品), NaNO<sub>2</sub>(北京化学试剂厂

\* 国家“八五”攻关课题(85-917-01-01)。

\*\* 现在中国医学科学院心血管病研究所 北京 100037。

产品,分析纯), [ $^3\text{H}$ ]胸腺嘧啶核苷([ $^3\text{H}$ ]TdR)(中国原子能研究所制品)。

### 三、心肌细胞培养

参照 Laarse 方法<sup>[4]</sup>, 无菌状态下取 Wistar 乳鼠心室肌, 用胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 利用差速贴壁法分离纯化制备心肌细胞悬液, 用含 20% 胎牛血清的 MEM 培养液稀释成细胞密度为  $3 \times 10^5$  细胞/ml, 接种于 25 ml 培养瓶或 96 孔培养板内, 置于  $36.5^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  温箱内培养。

### 四、细胞周期分析

于 25 ml 培养瓶中进行培养的心肌细胞俟生长接近汇合状态时, 换入含  $10^{-8}\text{mol/L}$ 、 $10^{-6}\text{mol/L}$   $\text{NaNO}_2$  的培养液, 分别继续培养 1、2、3 天后, 按 Pailavicini 方法<sup>[5]</sup>进行细胞周期分析测定。主要步骤为: 生长在培养瓶内的心肌细胞经 0.1% 胰蛋白酶消化、PBS 洗涤后制备成单细胞悬液, 400 目网过滤、调整密度为  $2 \times 10^6$  细胞/ml。取其 250  $\mu\text{l}$  细胞悬液置测样管中, 加入等体积的 RNA 酶(500u/L),  $37^\circ\text{C}$  水浴 30 分钟, 再加入含 0.03% Triton X-100, 5 mg% 的 PI 染液 0.6 ml, 置  $4^\circ\text{C}$  避光染色 30 分钟, 应用 FACScan 流式细胞仪(美国 Becton-Dickson 公司产品), 15 mW 气冷式氩离子激光器做为激光光源, 激光波长为 488 nm。用鸡红细胞核调整仪器光电倍增电压和线性状态, 以鳖红细胞做为内标准, Cell-Fit 软件收集样品, List Mode 形式储存于计算机硬盘。测样结束后, 用 HP 310 计算机、Cell-Fit 软件进行分析计算。

### 五、 $^3\text{H}$ TdR 掺入率的测定

96 孔板培养的细胞生长至接近汇合状态时, 换入含 0.5% 胎牛血清的 MEM 培养液, 48 小时后加入不同浓度的  $\text{NaNO}_2$ , 再温育 3 小时, 然后加入 [ $^3\text{H}$ ]TdR ( $18.5 \times 10^3\text{Bq/L}$ )。2 小时后去除培养液并用 10% 三氯醋酸于  $4^\circ\text{C}$  固定 30 分钟, 洗涤后用 1% SDS-0.1 mol/L NaOH 溶液使细胞裂解,  $37^\circ\text{C}$  放置过夜后, 用 LKB 1217 液闪计数器测量 [ $^3\text{H}$ ]TdR 掺入量 (cpm)。

### 六、过氧化脂质测定

采用 Tanizawa 方法<sup>[6]</sup>, 以 0.5 nmol/L 1,1,3,3-四甲氧基丙烷为标准品, 岛津 RF-540 荧光分光光度计测定心肌细胞及培养液中丙二醛的浓度。

### 七、统计学处理

结果表示为均数士标准误 ( $\bar{X} \pm \text{SE}$ )。应用非配对  $t$  检验进行资料分析,  $P$  值小于 0.05 有统计学意义。

## 结 果

### 一、 $\text{NaNO}_2$ 对心肌细胞周期的影响

图 1 为正常对照组(1天)心肌细胞周期中各时期细胞的直方图。

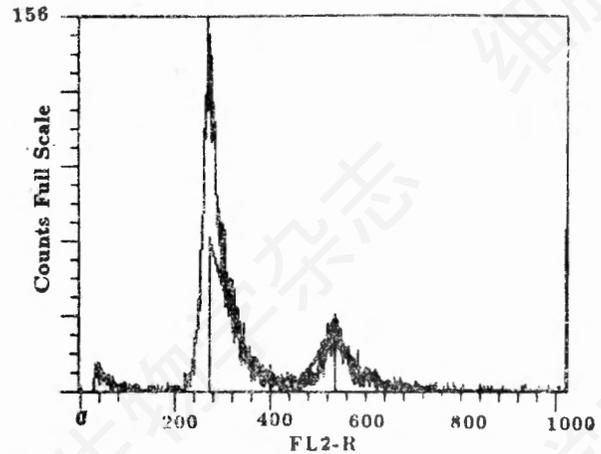


图 1 对照组(1天)心肌细胞周期分析的直方图

时期	百分率
G <sub>1</sub>	50.5
S <sub>1</sub>	32.2
G <sub>2</sub> +M <sub>1</sub>	17.3
Total	100.0

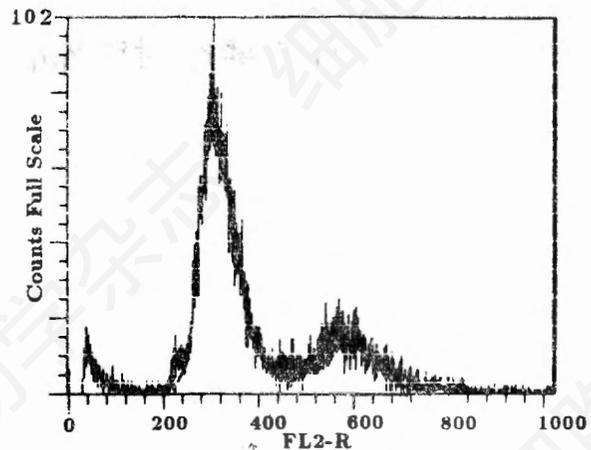


图 2  $10^{-6}\text{mol/L}$   $\text{NaNO}_2$  处理 1 天后心肌细胞周期的变化

时期	百分率
G <sub>1</sub>	59.9
S <sub>1</sub>	18.8
G <sub>2</sub> +M <sub>1</sub>	21.3
Total	100.0

培养液中加入  $10^{-6}\text{mol/L}$   $\text{NaNO}_2$  1 或 3 天

表1  $\text{NaNO}_2$  对培养的心肌细胞周期的影响

组别	n	百分率( $\bar{x} \pm \text{SE}$ )		
		$G_0G_1$ 期	S期	$G_2+M$ 期
对照组(1天)	10	48.85 $\pm$ 0.79	32.81 $\pm$ 1.15	18.32 $\pm$ 0.87
对照组(3天)	10	46.62 $\pm$ 0.55	36.33 $\pm$ 0.96	11.13 $\pm$ 1.72
$10^{-8}\text{mol/L NaNO}_2$ (1天)	10	44.72 $\pm$ 1.24	36.76 $\pm$ 1.09	18.46 $\pm$ 0.96
$10^{-8}\text{mol/L NaNO}_2$ (3天)	10	42.65 $\pm$ 1.46	38.47 $\pm$ 2.68	18.91 $\pm$ 2.75
$10^{-6}\text{mol/L NaNO}_2$ (1天)	10	57.99 $\pm$ 2.38	19.35 $\pm$ 1.82*	22.59 $\pm$ 2.41
$10^{-6}\text{mol/L NaNO}_2$ (3天)	10	60.72 $\pm$ 2.54	14.53 $\pm$ 2.45*	24.81 $\pm$ 1.91

\* $P < 0.05$ , 与相应对照组比较。

后, 细胞周期中各时期细胞数发生变化, 其中S期细胞的减少与相应对照组相比有显著差异( $P < 0.05$ ), 见图2。

$10^{-8}\text{mol/L NaNO}_2$  处理后心肌细胞周期未见明显改变(表1)。与相应对照组相比, 其中S期细胞数略有增加, 但未达到显著差异( $P > 0.05$ )。

## 二、 $\text{NaNO}_2$ 对心肌细胞 $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 掺入率的影响

如图3所示,  $\text{NaNO}_2$  对  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  掺入率的影响, 依其  $\text{NaNO}_2$  所施剂量不同而异,  $10^{-9}$ — $10^{-7}\text{mol/L}$  的  $\text{NaNO}_2$  能刺激心肌细胞对  $[^3\text{H}]\text{TdR}$  的摄取, 其中以  $10^{-8}\text{mol/L}$  浓度的  $\text{NaNO}_2$  作用最强; 而  $10^{-6}\text{mol/L}$  的  $\text{NaNO}_2$  则呈现出明显的抑制作用。

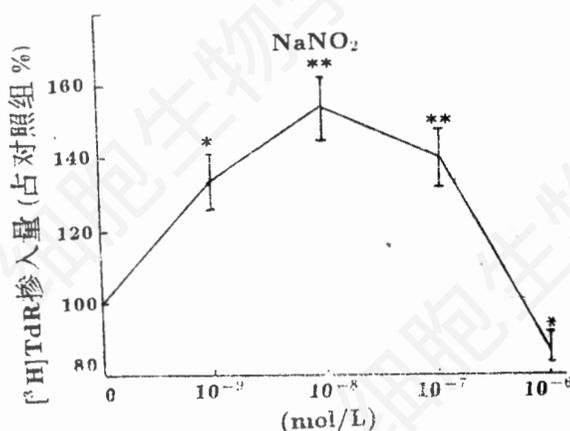


图3  $\text{NaNO}_2$  对心肌细胞 DNA 合成的影响  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

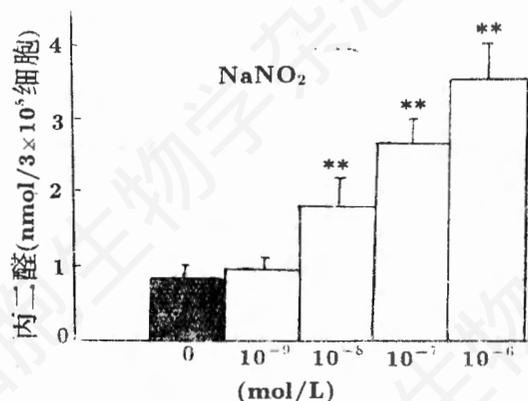


图4  $\text{NaNO}_2$  对心肌细胞丙二醛含量的影响  
■对照组 \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

## 三、 $\text{NaNO}_2$ 对心肌细胞及培养液中丙二醛含量的影响

图4为  $\text{NaNO}_2$  处理后心肌细胞及培养液中丙二醛水平, 表明  $\text{NaNO}_2$  能引起其丙二醛含量的增加, 提示心肌细胞发生了脂质过氧化过程。

## 讨论

过量的亚硝酸盐能使血红蛋白氧化形成高铁血红蛋白, 因而丧失运输氧的能力, 造成全身缺氧。临床上曾有很多由于亚硝酸盐中毒引起高铁血红蛋白血症的报道<sup>[7]</sup>。但是, 关于亚硝酸盐对心脏的损伤作用, 尚未引起足够重视。作者曾观察到急性  $\text{NaNO}_2$  中毒能引起大白鼠心肌坏死性改变<sup>[8]</sup>。本文利用体外培养技术首次观察到  $10^{-8}\text{mol/L NaNO}_2$  能引起心肌细

胞 S 期细胞明显减少(图 2)、抑制细胞增殖(图 3),同时其过氧化脂质含量亦明显增加(图 4)。

关于  $\text{NaNO}_2$  导致心肌细胞损伤的机理,尚待进一步证实。鉴于  $\text{NaNO}_2$  的分解产物氧化氮是一种活性氧自由基。在体内,  $\text{NaNO}_2$  能使大白鼠心肌组织谷胱甘肽过氧化物酶活性下降及过氧化脂质含量增加<sup>[8]</sup>, 本文也观察到  $\text{NaNO}_2$  能引起体外培养的心肌细胞丙二醛含量增加。因此, 作者推测,  $\text{NaNO}_2$  可能通过引发自由基链锁反应, 导致脂质过氧化, 从而造成心肌细胞的损伤变化。

### 摘 要

本文用流式细胞仪测定了  $\text{NaNO}_2$  对体外培养的 Wistar 乳鼠心肌细胞周期的影响。结果表明,  $10^{-6}\text{mol/L}$   $\text{NaNO}_2$  引起 S 期细胞明显减少( $P < 0.05$ );  $10^{-8}\text{mol/L}$   $\text{NaNO}_2$  对其作用不显著( $P > 0.05$ )。应用  $[^3\text{H}]$  TdR 掺入法测定了  $\text{NaNO}_2$  对心肌细胞增殖的作用。实验发现,  $10^{-8}\text{mol/L}$   $\text{NaNO}_2$  明显抑制细胞增殖, 而

$10^{-9}$ — $10^{-7}\text{mol/L}$  的  $\text{NaNO}_2$  则促进细胞增殖, 以  $10^{-8}\text{mol/L}$  的  $\text{NaNO}_2$  作用最强。  $\text{NaNO}_2$  还能引起心肌细胞过氧化脂质含量增加。

**关键词:** 心肌细胞的培养    亚硝酸钠  
细胞周期

### 参 考 文 献

- [1] Mason, D. T. et al., 1971, *Chest.*, 59: 296—305.
- [2] Flaherty, J. T. et al., 1975, *Circulation*, 51: 132—139.
- [3] 王凡等, 1977, 吉林医科大学学报, 4: 25—29.
- [4] Van der Laarse, A. et al., 1979, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11: 501—510.
- [5] Pailavicini, M. G. et al., 1981, *Cytometry*, 2: 54—58.
- [6] Tanizawa, H. et al., 1981, *Chem. Pharm. Bull.*, 29: 2910—2914.
- [7] Walley, T. and Flanagan, M., 1987, *Postgraduate Medical Journal*, 63: 643—644.
- [8] 杨青和王凡, 1989, 中国地方病学杂志, 8: 164—165.

## EFFECT OF SODIUM NITRITE ON CELL CYCLE IN CULTURED NEONATAL RAT MYOCARDIOCYTES

Wang Guangwu et al.

(Institute of Preclinical Sciences, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021)

### ABSTRACT

In our previous work we have demonstrated that sodium nitrite caused acute myocardial necrosis in rats in vivo. The direct effect of sodium nitrite on cell cycle in cultured neonatal rat heart cells and its mechanism were investigated with the following results: (1) large doses of sodium nitrite ( $10^{-6}\text{mol/L}$ ) could decrease the percentage of S phase of myocytes ( $P < 0.05$ ) (2) The effects of sodium nitrite on  $[^3\text{H}]$ TdR incorporation into DNA of myocytes were: small doses ( $10^{-9}$ — $10^{-7}\text{mol/L}$ ) was stimulatory, while large dose ( $10^{-6}\text{mol/L}$ ) was inhibitive. (3) Sodium nitrite ( $10^{-8}$ — $10^{-6}\text{mol/L}$ ) could increase the malondialdehyde contents of myocytes. These results suggested that the changes of myocytes induced by sodium nitrite were relative to lipid peroxidation.

**Key words:** Cultured myocardiocytes    Sodium nitrite    Cell cycle