

中国细胞生物学学会第六届学术大会纪要

1995年11月23日至26日,中国细胞生物学学会第六届学术大会在安徽省黄山市花溪饭店召开。来自全国18个省市的161位代表出席了大会。许智宏、翟中和、薛绍白、宋今丹、裴钢、桂建芳、陈建国等七位同志分别就植物发育、细胞骨架、钙调素、内质网、受体、激酶、神经细胞骨架等领域动态在会上作了综述报告,另外大会还安排了14场分组报告会。23日上午大会开幕式由翟中和副理事长主持,黄山市市委副书记、副市长讲话,王亚辉教授的报告回顾了学会十五年的历史,徐永华教授向与会代表报告了学会近三年的工作,左嘉客教授向学会第三届青年论文奖获奖者颁奖,李文安教授报告了第六届理事会选举结果。会议期间,召开了六届一次理事会。本届理事会任期四年,共有64位理事,经讨论由姚鑫任理事长,许智宏、翟中和、薛绍白、郝水、贾敬芬、郭礼和任副理事长,徐永华任秘书长,周郑、甘荣兴任副秘书长,周柔丽、丰美福(北京)、陈瑞阳(天津)、宋今丹(辽宁)、白永延、朱治平、黄祥辉、汤雪明(上海)、黄立(江苏)、毛树坚(浙江)、刘兢(安徽)、洪水根(福建)、韩贻仁(山东)、李靖炎(云南,会后由云南学会上报)、杨弘远(湖北)、杨抚华、王忠喜(四川)、张小云、陈尊器(广东)任常务理事,章静波、陈楚楚、庄临之、孙敬三、杨世杰、章扬培、孙方臻、吴旻(北京)、张金忠(天津)、孙大业(河北)、黄百渠(吉林)、叶敏、薛京伦、史臻、傅继梁、何玉科(上海)、徐在宽(江苏)、陈宜峰(江苏,95年12月11日病故)、楼定安(浙江)、黄宗平(福建)、张士雅(山东)、牛富文(河南)、朱作言(湖北)、周青山(湖南)、李宝健(广东)、马庆生(广西)、张义正、李鸿雁、任正隆、余懋群(四川)、李德俊(遵义)、曾瑞光(云南)、袁仕取(陕西)、王子仁(甘肃)、李仁敬(新疆)为理事。会议决定《实验生物学报》、《细胞生物学杂志》主编仍分别由王亚辉、左嘉客续任,王亚辉教授任细胞生物学名词审定委员会主任委员,还确定了各专业委员会新的主任委员。会议确定我学会会员会费收取标准为高级职称的会员每人每年10元,其他会员每人每年5元。会议还就北京申办2000年第七届国际细胞生物学大会的可行性、96年在福州举办海峡两岸细胞生物学会议等事项进行了讨论。1999年我会第七届学术大会已有湖南长沙、广东深圳、山东威海三个城市提出申办,理事会请有关同志准备材料,在下次理事会议上决定。11月26日晚,大会顺利闭幕。(曹振民)

研究工作

人肺癌基因组 DNA 对 NIH/3T3 细胞的转化作用*

刘祥麟 马洁羽 孔颂阳 朱家光 李 英

(浙江医科大学肿瘤基因组 杭州 310006)

周筱梅 茅幼霞 钱莲芳 张予廉 顾健人

(上海肿瘤研究所生化与分子生物学室 上海 210032)

应用小鼠成纤维细胞(NIH/3T3)作受体进行DNA转染,用于鉴定某些人体原发性实体瘤中的转化癌基因,已被大家所公认^[1-3]。

来源于上皮的恶性肿瘤,其转化基因多数为ras癌基因家族成员^[4,5]。现有的研究报告大多限于对传代肺癌细胞株转化基因的探讨^[6-8],尚少关于人体肺癌转化基因的报道。

本文从人体非小细胞肺癌(Non small cell lung cancer NSCLC)临床手术标本(均来自嗜烟患者)提取细胞基因组DNA,用以转染NIH/3T3细胞,经两轮转染后接种在裸鼠中形成肿瘤,分离该肿瘤细胞体外培养传代存活。

应用已知人体特有的Alu重复序列DNA和癌基因ras家族DNA探针对两轮转染细胞

和裸鼠肿瘤细胞DNA作分子杂交检测,证实所获得的转化细胞DNA中含有来自人体的Ha-ras癌基因。

材 料 和 方 法

1. 材料及试剂

NIH/3T3细胞株由上海肿瘤研究所顾健人教授惠赠。人体肺癌(NSCLC)手术标本由浙江省人民医院及浙江医科大学附属二院提供。裸鼠(BALB/c)由上海肿瘤研究所动物室提供。限制性内切酶Bam HI及EcoRI购自美国Bio Lab公司。癌基因Ha-ras、Ki-

* 浙江省自然科学基金、省卫生厅资助项目。

浙江医科大学郭培蓉、王吉娜、陈卫星医师和来茂德教授参加了部分工作,特此致谢。

ras、N-ras 以及 Neo 基因均由上海肿瘤研究所提供, 本实验室扩增后再提取。人体 Alu DNA 购自华美生物工程公司。同位素 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (3000 ci/mmol, 10 mCi/ml) 购自英国 Amersham 公司。DMEM 培养基由 Gibco 公司购入。G 418 (Geneticin) 为 SIGMA 产品。

2. 细胞转染和软琼脂生长试验

从肺癌组织细胞中提取高分子量总 DNA, 用 Chen^[9] 等方法。DNA 对 NIH/3T3 细胞转染用磷酸钙共沉淀法, 参照 Shih^[10] 和 Krontiris^[11] 等方法。软琼脂生长按 Rapaport^[12] 等方法进行。

3. 裸鼠引癌^[13]及瘤细胞体外培养

在裸鼠(BALB/c)腹部皮下接种第二轮 NIH/3T3 转化细胞 (1.0×10^7)。约 5 周后于注射部位长出肿块。解剖取出作病理检查。部分贮液氮备用以提取 DNA。另在无菌条件下将肿瘤组织剪碎, 胰酶消化, 用 DMEM 培养液洗 3 次后换 RPMI-1640 培养液。用吸管吹打细胞, 吸取上层悬浮细胞, 调整 pH 至 7.0 左右, 分装小方瓶, 于 5% CO₂、37℃ 培养。4 天后细胞成片生长, 然后按常规方法传代培养。

4. NIH/3T3 转染细胞株和裸鼠肿瘤细胞 DNA 与人体 Alu 重复序列及癌基因 ras 家族 (Ha-ras、Ki-ras 及 N-ras) 探针的分子杂交

用 Bam HI 或 Eco RI 对所提取的高分子量 DNA 进行酶切后, 作 1% 琼脂糖凝胶电泳。行 Southern 印迹转移^[14]分子杂交。探针以 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dCTP 作缺口翻译标记^[15]。比放射性为 $5\text{--}10 \times 10^7$ CPM/ μg DNA。预杂交及杂交条件按 Sambrook^[16] 步骤进行。杂交后的膜片加盖 X 光底片在 -70℃, 曝光 18 h。

结 果

1. 肺癌细胞基因组 DNA 对 NIH/3T3 细胞的转染

取 3 份不同个体肺癌细胞基因组 DNA 30—60 μg ; 用鲑鱼睾丸 DNA 和正常 NIH/3T3 细胞 DNA 各 50 μg 作对照。加抗性标记 neo 基因 DNA 后对 NIH/3T3 细胞进行共转染。次日加入含有 G₄₁₈ 的培养液, 进行选择培养。对照组细胞于第 9 天全部死亡。实验组于 2—3 周后出现形态明显改变的转化细胞灶 (Foci)。灶细胞交叉重叠生长, 密度增大, 形态由梭形变成多角形, 且折光性增强 (图版

图 1)。总共获得 39 个转化灶。3 个实验组的转化灶形成率依次分别为 0.050、0.138 和 0.092。两个对照组转化灶形成率都是零。结果见表 1。

表 1 人肺癌细胞基因组总 DNA 对 NIH/3T3 细胞的转染*

No.	DNA	(μg)	No. of bottle	No. of focus	No. of focus/bottle/ DNA μg
1	NIH/3T3	50	3	0	0.000
2	Salmon testes	50	3	0	0.000
3	Lung ca. tissues A	30	2	3	0.050
4	Lung ca. tissues B	60	3	25	0.138
5	Lung ca. tissues C	40	3	11	0.092

* 肺癌组织 A、B、C 分别为不同个体, 病理证实均为中分化鳞癌, 其中 A、B 为 II 级, C 为 III 级。

从表 1 可见其中以 NO. 4 (II 级鳞癌 DNA) 转化率为最高 0.138。提示这可能与用于转染的 DNA 量的多少有关, 与病人肿瘤的恶性程度和病理分型无明显关联。

选取生长良好的第一轮转化灶细胞进行扩增培养。待细胞达 1.0×10^7 数量后, 提取其 DNA。按前法对正常 NIH/3T3 细胞行第二轮转染。用正常 NIH/3T3 细胞 DNA 作对照。约 2 至 3 周后第二轮转化灶出现, 总共获得 43 个转化灶, 其转化灶细胞形态与一轮细胞相比, 无大差异 (见图版图 2)。但是转化率高达 0.367, 是第一轮中最高的 0.138 的 2.7 倍。这表明经过两轮转染后, 来自肺癌 DNA 中的转化基因序列有进一步的扩增和浓集。而所设对照组却未见转化灶出现。见表 2。

2. 人体肺癌细胞及一轮和二轮转化细胞 DNA 中 Alu 序列的检测

分别提取人体肺癌细胞及一轮和二轮转化细胞的基因组 DNA, 按本文方法四与 ^{32}P 标记的人体 Alu 序列探针进行分子杂交。放射自显影后, 所获结果见图 1。从图 1 可见人体肺癌细胞基因组 DNA 和经该肺癌基因组 DNA 转染后的第一轮转化灶细胞和第二轮转化细胞的

表 2 第一轮转化细胞总 DNA 对
NIH/3T3 细胞的再转染*

No.	DNA	No. of (μg) of bottle	No. of focus	No. of focus/ bottle/ DNA μg
6	NIH/3T3	50	3	0
7	Transformant C-1	20	3	3
8	Transformant C-2	30	3	18
9	Transformant C-3	30	3	22

* 转化体 C-1, C-2, C-3 为同一肺癌组织 C 的细胞基因组 DNA。

DNA 中都含有与 Alu 序列探针杂交的区带。这表明人体特有的 Alu 重复序列在转染过程中已整合到转化细胞的基因组中,同时也说明在转染中所出现的转化细胞灶是由于来自人体肺癌基因组 DNA 中携有已活化的转化基因所致。

3. 二轮转化细胞在软琼脂生长行为的观察

把本实验所获之第二轮转化细胞接种到软琼脂进行培养观察。至第 4~5 天,即出现由单个细胞繁殖成透明团聚状细胞群,形成了新的转化细胞集落(图版图 3)。在显微镜下可见,集落的细胞数为 10~40 个不等,其中超过 30 个细胞的约占集落总数的十分之一。两周后细胞继续存活;而对照组未转化的 NIH/3T3 细胞则在同样条件下,培养至 4~5 天即固缩死亡。结果提示二轮转化细胞已获得肿瘤细胞的特性。

4. 转化细胞的致瘤性检测

取正常未经转染的 NIH/3T3 和经两轮转染后的 NIH/3T3 细胞,按本文方法三,分别接种裸鼠(BALB/c)腹部皮下。约 5 周后,两组 6 只实验接种鼠中有 3 只于注射部位长出了肿瘤;而 6 只对照接种鼠中无瘤出现。结果列于表 3 (图版图 4)。对裸鼠肿瘤组织切片检查发现,切片中心有坏死,周边有大量异形梭形细胞,类似纤维肉瘤细胞。这表明经人体肺癌 DNA 二轮转染后的 NIH/3T3 细胞具有较强



图 1 人体肺癌及一轮、二轮转化细胞 DNA 与人特有的 Alu 序列探针的分子杂交

1. 人体肺癌细胞 2. 一轮转化 NIH/3T3 细胞 3. 二轮转化 NIH/3T3 细胞

表 3 第二轮转化细胞(1.0×10^7)
接种裸鼠的成瘤性

No.	Group	No. of mouse	No. of bearing tumor	incidence rate (%)
1	Control	3	0	/
	Experiment	3	1	33.3
2	Control	3	0	/
	Experiment	3	2	66.6

的致瘤性,同时亦提示在人体肺癌细胞基因组 DNA 中含有能使细胞发生恶性变的转化基因,表明可能有某种癌基因的激活。

为了证实裸鼠长出的肿瘤是由于人体肺癌 DNA 转染所致。从两只裸鼠(A 和 B)肿瘤细胞中提取总 DNA。按上述同法与放射性 ^{32}P 标记的人体特有 Alu 序列探针进行分子杂交。结果见图 2。从图中可清楚看到 Alu 序列杂交产生的区带存在于裸鼠 A 和 B 的 DNA 之中,并与同图中用作阳性对照的第二轮转化细胞的杂交区带相类似。这确证了人体 DNA 序列在裸鼠长出的肿瘤中的存在。从而证明裸鼠长出之肿瘤是由于外源性转染了人体肺癌转化基因的 NIH/3T3 细胞所诱发,而非裸鼠本身自发所致。



图2 第二轮转化细胞和裸鼠肿瘤细胞 DNA 与人特有 Alu 序列探针的分子杂交

a. 第二轮转化细胞 b. 裸鼠肿瘤 A
c. 裸鼠肿瘤 B

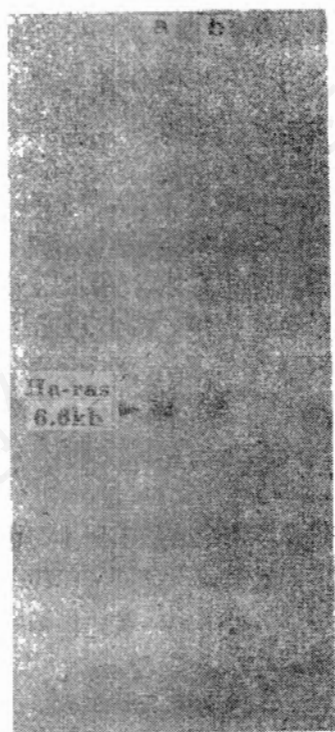


图3 两轮转化细胞总 DNA 与已知 Ha-ras (6.6 kb) 探针进行分子杂交

a. 第一轮转化细胞 DNA b. 第二轮转化细胞 DNA

图中可见两条在同一水平线上的杂交条带

5、转化细胞基因组 DNA 序列中癌基因 ras 家族的检测

提取一轮与二轮转化细胞的总 DNA, 用限制性内切酶 Bam HI 酶解后, 按本文方法四与 ^{32}P 标记的 ras 癌基因 (Ha-ras、Ki-ras、N-ras) 探针作分子杂交。放射自显影结果见图 3。从图中可清晰地看到在 6.6 kb 处有与 Ha-ras 杂交的 a、b 两条带。而与 ras 癌基因家族另两个成员 Ki-ras 和 N-ras 探针杂交均未见自显影杂交条带。这提示本实验所用之人肺癌细胞基因组 DNA 有潜在的 Ha-ras 癌基因的活化。

6、裸鼠接种瘤细胞体外培养传代存活

对已作病理切片 (图版图 5) 证实为纤维肉瘤的裸鼠接种瘤细胞按本文介绍的方法三培养传代。迄今已逾 30 代 (图版图 6), 其显微镜下形态与未转化的 NIH/3T3 细胞在外观上无明显差异, 生长稳定, 其生长特性也与 NIH/3T3 类同。对该细胞的进一步工作将另文介绍。

讨 论

从嗜烟患者未用抗癌细胞毒药物处理过的非小细胞肺癌 (NSCLC) 手术标本中提取基因组 DNA 转染小鼠成纤维细胞 (NIH/3T3)。经两轮转染后获得了具有恶性表型, 能在软琼脂中生长, 并能在裸鼠诱生肿瘤的转化细胞, 还证实这些细胞含有人体特有的 Alu 重复序列。我们从 6 例肺鳞癌病人的肿瘤细胞基因组 DNA 中选用了 3 例作转染, 结果 3 例都出现了转化灶。而所设的两个对照组无一出现转化灶。因此转化灶的出现表明在肺癌细胞中有原癌基因的激活。这与已有文献^[17]报道相一致。通过两轮转染实验, 发现转化灶出现的多少与用于转染实验 DNA 的量有一定关系, 而与所用肿瘤的恶性程度无明显关联。

用人体特有的 Alu 重复序列探针与一轮、二轮转化细胞及接种到裸鼠长出的肿瘤细胞的 DNA 作分子杂交证实此三种细胞基因组 DNA

中都有 Alu 序列的存在。这表明外源肺癌患者所特有的基因组 DNA 已整合于转化细胞的 DNA 之中,提示人体特有的 Alu 重复序列,虽经多次重复转染和接种后细胞间传递,却依然能保持其来源于人体的 DNA 标记。

第二轮转化细胞能在软琼脂培养基上生存活并形成透明团聚细胞集落群这一现象本身就表明该转化细胞具有了肿瘤细胞的特性。我们又把该细胞接种裸鼠,结果在部分裸鼠(3/6)中能形成肿瘤。这说明第二轮转化细胞具有强力的致癌活性。而对照组用正常 NIH/3T3 细胞接种动物无 1 只长瘤。这再次表明转化细胞内确已含有来自转染人体肺癌细胞基因组 DNA 的活化基因。而那些同样接种了二轮转化细胞却未能长出肿瘤的动物(3/6)事实,向我们表明:肿瘤的发生是一个十分复杂的事件,肿瘤的生长与否,受诸多因素的制约,除有癌基因的活化或抗癌基因的失活外,还涉及被接种动物本身的生理和免疫状态以及还要考虑抽样误差等影响因素。

我们选用了 ras 癌基因家族探针(Ha-ras、Ki-ras 和 N-ras)对转化细胞中活化基因的属性进行了鉴定。发现 Ha-ras 是本实验人肺癌细胞基因组 DNA 中使 NIH/3T3 细胞发生转化的一个重要癌基因。提示人体肺癌(NSCLC)中的鳞癌发生似与肺细胞中原癌基因(C-Ha-ras)的激活密切相关。但这并不排斥可能还有其他癌基因的激活。已有文献指出 ras 在体外诱发细胞发生恶变尚需 myc 癌基因的协同^[18];还可能涉及抗癌基因 P 53 的失活^[19]。计划在进一步的工作中开展有关的其他癌基因和抗癌基因的检测。但我们用第二轮转化细胞在裸鼠身上诱瘤成功的事实,说明在某些条件下,原癌基因(C-Ha-ras)的活化在人体肺鳞癌的发生上起重要作用。有报告指出人体肺小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC)中的肺腺癌常伴有 Ki-ras 的激活^[7,20]。而本实验选用的是非小细胞肺癌中的肺鳞癌标本,检测出是 Ha-ras 癌基因的活化。由于本实验所用之

肺鳞癌标本皆为长期吸烟患者(20—30年)。已有资料指出吸烟诱发肺癌的常见组织学类型是鳞癌^[21],与我们结果相符。还有报告^[22]表明肺鳞癌患者比肺腺癌和肺小细胞肺癌患者有较明显的 C-ras 癌基因产物 P 21 水平的升高。提示肺鳞癌有 ras 原癌基因的激活和过度表达。近有学者^[23]用大鼠做实验使其吸入香烟烟雾(40个星期),结果在鼠的肺和鼻粘膜组织 DNA 中有明显的 DNA 加合物(adducts)形成。Phillips 等报告:在吸烟者的肺细胞检测到有 DNA 加合物水平的升高并与吸烟的数量呈线性相关^[24]。已知 DNA 加合物是机体与环境(香烟等)中的化学致癌因子长期相互作用的产物。它可引起细胞染色体畸变或脆性点(fragile site)的断裂,还可激活原癌基因。因此本文认为患者长期吸烟可能是导致原癌基因(C-Ha-ras)活化和人体肺鳞癌发生的重要因素之一。

最后本实验中所建之二轮转化细胞株以及体外培养传代存活的裸鼠肿瘤细胞株可以用作研究人体肺鳞癌 Ha-ras 癌基因表达和调控的细胞模型。

摘 要

从未用过抗癌细胞毒药物的非小细胞肺癌(NSCLC)患者的手术标本(鳞状上皮癌)提取癌细胞基因组总 DNA。对小鼠成纤维(NIH/3T3)细胞行转染实验。获二轮转化细胞,发现二轮转化率是一轮的 2.7 倍。在转染过程中转化灶出现的多少,与所用 DNA 的量有一定关系。

二轮转化细胞能在软琼脂上存活生长,接种裸鼠能长出肿瘤,分离肿瘤组织细胞,体外培养传代存活。表明该二轮转化细胞具有肿瘤细胞的特性。

取一轮、二轮转化细胞和裸鼠肿瘤细胞的 DNA 分别与放射性 ³²P 标记的人体特有的 Alu 重复序列和 ras 家族基因探针进行 Southern 印迹转移和分子杂交。结果在三者细胞的 DNA 中都见有与 Alu 杂交的条带。这表明在转染过

程中人体特有的 Alu 重复序列已整合到转化细胞的基因组中。并确定了转化细胞中的转化基因之一的属性为 Ha-ras 癌基因。本工作提示吸烟可能是人肺鳞癌发生和 Ha-ras 活化的重要因素。

关键词: 非小细胞肺癌(NSCLC) 小鼠成纤维细胞(NIH/3T3) DNA 转染 Alu 序列 Ha-ras 癌基因

参考文献

- [1] Tabin, C. J. et al., 1982, *Nature*, 300, 143—149.
- [2] Pulciani, S. et al., 1982, *Nature*, 300, 539—542.
- [3] Feig, L. A. et al., 1984, *Science*, 223, 698—700.
- [4] Marshall, C. J. et al., 1982, *Nature*, 299, 171—173.
- [5] Cline, M. J. & H. Battifora, 1987, *Cancer*, 60, 2669—2674.
- [6] Kumar, R., S. Sukumar, M. Barbacid, 1990, *Science*, 248, 1101—1104.
- [7] Shimizu, K. et al., 1983, *Nature*, 304, 497—500.
- [8] Murray, M. J. et al., 1981, *Cell*, 25, 355—361.
- [9] Chen, J. H. et al., 1989, In "Advances in Applied Biotechnology. Series" Vol. 7. (Takis S. Papas Ed.) pp 107—121. Gulf publishing company.
- [10] Shih, C. et al., 1981, *Nature*, 290, 261—264.
- [11] Knontiris, T. G. & G.M. Cooper, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 78, 1181—1184.
- [12] Rapaport, E. et al., 1983, *Cancer Res.*, 43, 4402—4406.
- [13] Fasan, O. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 4404—4012.
- [14] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory. pp 9.31—9.46.
- [15] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory. pp 10.6—10.12.
- [16] Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory. pp 9.47—9.57.
- [17] Samon, D. J. et al., 1984, *Science*, 224, 256—262.
- [18] Land, H. et al., 1983, *Nature*, 304, 596—602.
- [19] Parada, L. F. et al., 1984, *Nature*, 312, 649—651.
- [20] Rodenhuis, S. et al., 1987, *N. Engl. J. Med.*, 317, 929—939.
- [21] 谢大业等, 1993, 肺癌: 现代肿瘤学(汤钊猷主编) p 611, 上海医科大学出版社.
- [22] Kurzrock, R. et al., 1986, *Cancer Res.*, 46, 1530—1534.
- [23] Gupta, R. C. et al., 1989, *Cancer Res.*, 49, 1916—1920.
- [24] Phillips, D. H. et al., 1988, *Nature*, 336, 790—792.

THE TRANSFORMATION OF GENOMIC DNA FROM HUMAN PRIMARY LUNG CARCINOMA ON NIH/3T3 CELLS

Liu Xiang-lin Ma Jie-yu Kong Song-yang Zhu Jia-guang Li Ying
(Cancer & Oncogene Research Laboratory Zhejiang Medical University, Hangzhou, 310006)
Zhou Xiao-mei Mao You-xia Qian Lian-fang Zhang Yu-lian Gu Jia-ren
(Biochemistry & Molecular Biology Laboratory Shanghai Cancer Institute, Shanghai, 200032)

ABSTRACT

High molecular weight genomic total DNA was extracted from the surgical samples of patients with human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) with the pathological report of squa-

mous cell carcinoma which were not treated by chemotherapy.

The two round transfection tests were carried out with NIH/3 T 3 cell system. The second round transformation was 2.7 times as efficient as that of the first one. It seemed that the number of transforming focus increase with the amount of DNA used.

The second round transforming cells were implanted into nude mice (BALB/c). The growing tumor cells were separated and cultured alive. It was showed that the cells possess the character of tumor cell.

The DNA of the primary and secondary transformed cells were analysed by Southern blot with ^{32}p labeled human Alu DNA sequence and ras family gene as probes. The findings indicated that the positive bands hybridizing with human Alu sequence were present in DNA extracted from both transformed and the tumor cells from nude mice. It was identified that human lung carcinoma genomic DNA was integrated into these cells. And Ha-ras gene was considered as the putative transforming sequence in this test.

Key Words: Non-small cell lung carcinoma (NSCLC) Murine fibroblast (NIH/3 T 3)
DNA transfection Alu sequence Ha-ras oncogene

U 46619 双向调节系膜细胞 DNA 合成的研究

吴升华 练棟华 林致华

(南京医科大学第一附属医院 南京 210029)

U 46619 是花生四烯酸环氧化酶产物血栓素 ($\text{TX})\text{A}_2$ 的内过氧化同型物, 结构为 9, 11-双去氧-11 α , 9 α -环氧甲醇 前列腺素 H_2 , 性能稳定。在体外试验研究 TXA_2 时, 常将 U 46619 代替 TXA_2 这一不稳定的化合物进行试验^[1-3]。U 46619 可与大鼠及人的肾小球系膜细胞膜的 TXA_2 受体相结合, 从而调节细胞的 DNA 合成, 这一受体与磷脂酶 C (PLC) 相关联, 受体活化后促进磷酸肌醇 (IP) 的合成^[1]。迄今为止, 尚不清楚 U 46619 是否通过活化 PLC 进而促进二酯酰甘油 (DAG) 的合成, 是否最终激活蛋白激酶 C (PKC)。本文应用 [^3H] 胸腺嘧啶核苷 ([^3H] TdR) 掺入法测定 U 46619 对大鼠系膜细胞 DNA 合成的作用, 测定系膜细胞 DAG 及三磷酸肌醇 (IP_3) 的合成量, 探讨其作用机制。

材料与方 法

1. 系膜细胞的培养及鉴定

用系列过筛法从 SD 雄性大鼠 (体重 80—100 g) 的

肾皮质中分离肾小球。将肾小球混悬液与 IV 型胶原酶共育后, 用生理盐水磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.3) 洗涤。将肾小球在 37℃、5% CO_2 条件下培养于 RPMI-1640 培养液中 (15% 小牛血清, 0.75 U/ml 胰岛素)。每两周细胞传代一次, 在第 4 次传代后得到较纯的系膜细胞, 该细胞在相差显微镜下呈卫星状或纺锤状, 用抗系膜细胞 Thy 1 抗原的抗体进行间接免疫荧光染色, 95% 以上的细胞呈阳性。

2. [^3H] TdR 掺入法测定细胞的 DNA 合成^[2]

将系膜细胞培养于 24 孔培养盘中, 每孔细胞数 1×10^4 。在细胞生长再汇合时, 一组直接加入不同浓度的 U 46619 (Cayman Chemical, USA), 温育 18 h, 另一组除去原培养液, 加入含 0.5% 小牛血清的培养液, 细胞生长停滞 48 h 后, 加入不同浓度的 U 46619, 再温育 18 h, 两组均加入 [^3H] TdR (2 μCi /孔, 84.8 Ci/mmol, NEN)。6 h 后去除培养液, 细胞经收集及洗涤后在 LKB 1217 液闪计数器测定 [^3H] TdR 掺入量。每试验组由 6 孔组成, 对照组中细胞仅与培养液及 [^3H] TdR 共温育。结果表示为:

$$[\text{H}] \text{TdR 掺入量} = \frac{\text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100\%$$

3. 蛋白激酶 C 抑制试验^[4]