

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 T3)
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]

在荧光灯源下,生长停滞的系膜细胞与特异性 PKC 抑制剂 Calphostin C (0.6 $\mu\text{mol/L}$, Biomol, USA) 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中共温育 3 h, 然后加入 U 46619 (1 $\mu\text{mol/L}$) 温育 18 h, 再测定 [^3H]TdR 掺入量, 如上述。

4. 系膜细胞 DAG 定量

将系膜细胞培养于 60 mm 的培养皿中 (1×10^6 细胞/皿), 在生长停滞 48 h 后加入不同浓度的 U 46619 或 10% 小牛血清, 在对照组中仅加入 PBS。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 15 min 后收集细胞, 按 Bligh 法抽提细胞脂质^[5], 有机相用于 DAG 定量及总磷脂定量^[6]。在干燥脂质中加入携带溶液, 在超声水浴中振荡 5 min 后加入 DAG 激酶 (Amersham, USA)、反应缓冲液、Dithiothreitol 及 [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP 进行反应。将抽提后的脂质点加于 Silica Gel 60 薄层色谱板上层析。将色谱板上 [^{32}P]磷酸斑块切下后置于闪烁液中测定其放射性。用标准底物二油酸脂按上述方法层析并制备标准曲线。结果表示为 DAG pMol/nMol 磷脂。

5. 系膜细胞 IP₃ 测定^[1,4]

将细胞培养于 60 mm 的培养皿中 (1×10^6 细胞/皿), 当细胞生长至汇合时, 去除培养液, 加入无血清、无肌醇的 DMEM/F-10 培养液 (Gibco, USA), 含有 [^3H]肌醇 (3 $\mu\text{Ci/ml}$, NEN)。温育 40 h 后加入 U 46619, 在刺激后第 10 秒加入三氯醋酸终止反应, 每试验组用 4 个培养皿。将细胞抽提物加样于 HPLC 阴离子交换层析柱中 (Whatman Partisil SAX)。应用磷酸铵梯度洗脱法分离磷酸肌醇的同分异构体。将洗脱液在 LKB 1217 液闪计数器上测定其放射性。IP₃ 测定结果表示为对照组放射性 (cpm) 的百分比。

6. 统计学处理

结果表示为均数士标准差。应用非配对 t 检验进行资料分析。对 [^3H]TdR 掺入法测定资料应用单因素方差分析, 其中每两组数据的比较应用 Student-Newman-Keuls 方法。

结 果

1. U 46619 对系膜细胞 DNA 合成的作用

在图 1 上方, U 46619 刺激生长停滞的系膜细胞对 [^3H]TdR 的摄取, 其作用呈剂量依赖方式, 对照组 100% 是生长停滞系膜细胞的 [^3H]TdR 掺入量。15% 小牛血清可使生长停滞的系膜细胞 [^3H]TdR 摄取升高至 172.6 $\pm$

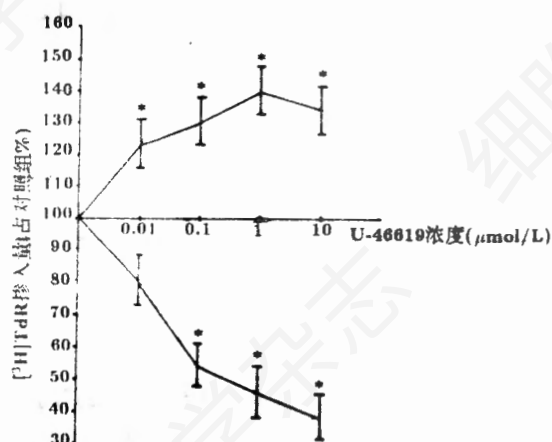


图 1 不同浓度的 U 46619 对生长停滞的系膜细胞(上方)或生长旺盛的系膜细胞(下方)DNA 合成的作用

* $P < 0.05$ [与对照组 (100%) 比较]。

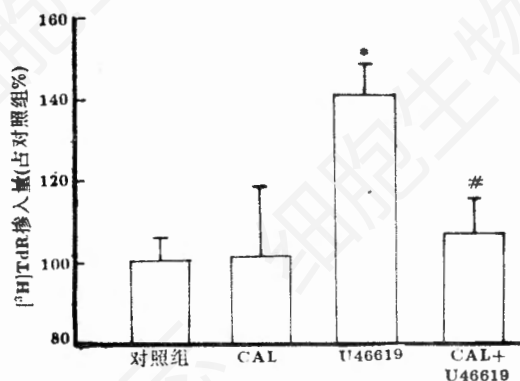


图 2 PKC 抑制剂 Calphostin C (CAL) 对 U 46619 所致的系膜细胞增殖的作用

* $P < 0.05$ (与对照组相比较)。

$P < 0.05$ (与 U 46619 组相比较)。

18.4%。在图 1 下方, 对照组 100% 为含 15% 小牛血清培养液中, 生长再汇合时系膜细胞的 [^3H]TdR 掺入量, U 46619 抑制 15% 血清所致的系膜细胞 DNA 合成, 呈剂量依赖方式。

2. PKC 抑制剂对 U 46619 作用的影响

如图 2 所示, 在生长停滞的系膜细胞, 特异性 PKC 抑制剂 Calphostin C 抑制了 U 46619 (1 $\mu\text{mol/L}$) 的促进 DAG 合成的作用。

3. U 46619 对系膜细胞 DAG 合成的作用

如表 1 所示, U 46619 促进生长停滞的系膜细胞的 DAG 合成, U 46619 的三种浓度作用后的 DAG 水平之间无显著差异 ($P > 0.05$),

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

表 1 U 46619 及血清对大鼠系膜细胞 DAG 合成的作用

	对 照 组	U 46619 ($\mu\text{mol/L}$)			10% 血清
		1	10	100	
DAG (pMol/nMol 磷脂)	0.99 $\pm$ 0.28	1.81 $\pm$ 0.31*	2.08 $\pm$ 0.39*	1.63 $\pm$ 0.28*	1.97 $\pm$ 0.30*
培养皿数	7	4	4	10	3

* $P < 0.05$ (与对照组相比较)

其作用与 10% 血清促进 DAG 合成的作用相近 ($P > 0.05$)。

4. U 46619 对系膜细胞合成 IP_3 的作用

如图 3 所示, U 46619 促进生长停滞的系膜细胞合成 1,4,5- IP_3 , 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时的作用大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时的作用 ($P < 0.05$)。

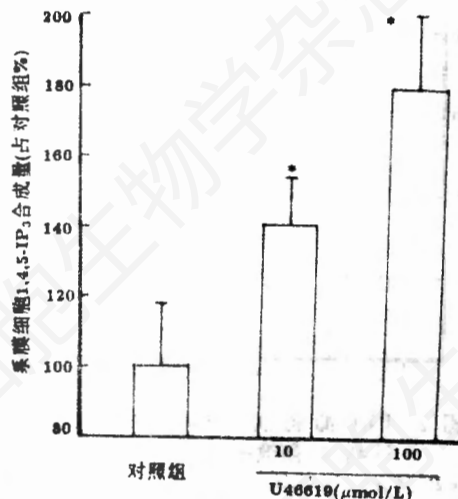


图 3 U 46619 对系膜细胞 1,4,5- IP_3 合成的影响

* $P < 0.05$ (与对照组比较)。

讨 论

系膜细胞增殖是许多肾小球疾病的病理特征。在多种肾小球疾病的病人及动物模型中, 均发现肾小球合成的 TXA_2 增多^[7,8]。 TXA_2 可收缩系膜细胞及肾小球血管, 从而减少肾小球有效滤过面积, 使肾小球滤过率下降, 说明

剂 SQ 27427, 可阻断 U 46619 与系膜细胞的结合^[2]。Mene 报道, U 46619 可促进生长停滞(即 G_0/G_1 期)的人的系膜细胞 DNA 合成及细胞增殖^[2]。本实验用大鼠系膜细胞进行测定, 结果与 Mene 报道相似。Mene 研究了 U 46619 促增殖作用的机制, U 46619 与 TXA_2 受体结合后, 活化 PLC, 从而增加 IP_1 、 IP_2 、 IP_3 的合成, 先促进细胞内质网 Ca^{2+} 库释放 Ca^{2+} , 使胞质中游离 Ca^{2+} 一过性升高, 再促进细胞外 Ca^{2+} 进入细胞内, 造成第二次细胞内游离 Ca^{2+} 的升高, 但仍不清楚在此之后是否使 PKC 活化^[1-3]。本实验中也证实 U 46619 使细胞的 1,4,5- IP_3 合成增多, 虽然本实验中所测 1,4,5- IP_3 是在 U 46619 作用后 10 秒的水平, 但已有报道在人及大鼠系膜细胞中, U 46619 持续刺激 IP_3 合成直到作用 15 分钟以后^[1]。本文首次证实 U 46619 也可促进 DAG 的合成。DAG 来源于各种 IP 的循环, 也可由磷脂酶 D 产生的磷脂酸转化而来, 是内源性 PKC 活化剂。本文首次用 PKC 抑制剂 Calphostin C 预处理系膜细胞, 可阻断 U 46619 促进系膜细胞 DNA 合成的作用, 证实 U 46619 诱生的 DAG 通过活化 PKC 而促进生长停滞的系膜细胞的 DNA 合成。

然而, 本实验发现, 在血清所致的生长旺盛的鼠系膜细胞中, 加入 U 46619 却引起 DNA 合成的减退(图 1), 这一结果与 Mene 在人系膜细胞实验中的结果相同^[2], 均呈剂量依赖方式。这一抑制作用的机制尚不清楚, 可能与以

Mene用血清或佛波醇肉豆蔻乙酸(PMA)预先活化系膜细胞的PKC,可抑制U 46619所致的IP合成及细胞内 Ca^{2+} 的升高^[1],提示PKC预先活化后,可对再次活化PLC-PKC的物质起负反馈抑制作用。血清中含有血液凝固时血小板释放的血小板源性生长因子(PDGF),可活化PLC及PKC,可能对U 46619的作用起负反馈抑制,使U 46619促增殖作用丧失。第三,TXA₂可能直接或间接刺激前列腺素(PG)E₂或PGI₂的合成,而后两者有抑制细胞增殖的作用^[2]。不论何种机制参与,U 46619这种抑制作用在病理上可能有积极意义:在正常状态下,体内肾小球系膜细胞为静息状态,肾小球合成的PG及TX极少,当肾小球产生炎症时,肾小球白细胞及血小板浸润增多,合成的PG、TX及PDGF增多^[3],这时TX的升高可能有抑制PDGF所致细胞增殖的作用。

摘 要

本实验用^[3H]TdR掺入法测定TXA₂类似物U 46619对大鼠系膜细胞DNA合成的调节作用,测定系膜细胞合成的DAG及1,4,5-IP₃量,用PKC抑制剂Calphostin C预处理系膜细胞,观察其对U 46619促增殖作用的影响。结果表明,U 46619促进生长停滞的系膜细胞

的DNA合成及IP₃的生成。本文首次证实U 46619也促进DAG的生成并发现PKC抑制剂可抑制U 46619的促增殖作用,提示U 46619使生长停滞的系膜细胞的PLC活化,促进IP及DAG生成,进而激活PKC,促进系膜细胞DNA合成。此外,U 46619也抑制血清所致的系膜细胞DNA合成,对其机制作了三点推测。U 46619这种双向调节系膜细胞DNA合成的作用有一定意义。

关键词: U 46619 血栓素 系膜细胞
细胞分裂

参 考 文 献

- [1] Mene, P. et al., 1988, *Am. J. Physiol.*, 255: F 1059—F 1069.
- [2] Mene, P. et al., 1990, *Kidney Int.*, 38: 232—239.
- [3] Mene, P. et al., 1992, *Kidney Int.*, 41: 554—556.
- [4] 吴升华, 1994, *细胞生物学杂志*, 16 (4): 185—188.
- [5] Bligh, E. G. et al., 1959, *Can. J. Biochem.*, 37: 911—917.
- [6] Wright, T. M. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 9374—9380.
- [7] Wu, S. H. et al., 1994, *Immunopharmacology*, 28: 125—136.
- [8] Lianos, E. A., 1989, *Kidney Int.*, 35: 985—992.

DUAL MODULATORY EFFECTS OF U 46619 ON DNA SYNTHESIS OF MESANGIAL CELLS

Wu Sheng-Hua, et al.

(The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029)

ABSTRACT

Dual modulatory effects of thromboxane A₂ mimetic U 46619 on DNA synthesis of rat mesangial cells were assessed by ^[3H] thymidine incorporation. U 46619 increased DNA synthesis, inositol triphosphate production and diacylglycerol mass levels in growth-arrested mesangial cells. Protein kinase C inhibitor Calphostin C inhibited the enhanced DNA synthesis of growth-arrested mesangial cells induced by U 46619. On the other hand, U 46619 inhibited fetal bovine serum-stimulated DNA synthesis of mesangial cells. Dual modulatory effects of U 46619 may be of significance in the control of mesangial cell proliferation.

Key words: U 46619 Thromboxane Mesangial cells Cell division