

THE POPULATION VARIANCE OF HUMAN NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CLONAL STRAIN (CNE-2 Z-5-2-B 7) DURING PASSAGES IN VITRO

Luo Jingwen et al

(Department of Pathology, Guangdong Medical College 524023)

ABSTRACT

The clonal strain (CNE-2 Z-5-2-B 7) which derived from human poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE-2 Z was serial cultured from primary to the 81th passage in vitro. The cell morphometric, nuclear DNA content and the proliferation in vitro of different passages were investigated. The results indicated (1) During culture passaged in vitro, the cell morphometric and nuclear DNA content showed their heterogeneity and construction by different subpopulations that would appeared or disappeared. (2) The subpopulation with large cellular and nuclear area but low N/C ratio, high DNA content reached the top on the 41th passage, which were similar to characteristics of the large nucleus type of poorly differentiated squamous carcinoma. (3) The cell population became mainly small cellular and nuclear area, high N/C and DNA content with higher proliferation on the 81th passage than that on primary clonal strain, which were as undifferentiated carcinoma.

Key words: nasopharyngeal neoplasm clonal cell culture in vitro population tumor progression

卡托普利对血管平滑肌细胞内皮素基因表达的影响

齐建华、陆 敏 王 军** 王新明 韩志朝

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031

**上海第二医科大学药理教研室 200025)

自从 Yanagisawa 等报道血管内皮细胞产生的内皮素(endothelin, ET)是体内最强的缩血管多肽以来^[1], ET的生物学意义及其表达调控机制日益引起人们的重视。已有文献报道,血管平滑肌细胞也可衍生 ET 并通过自身分泌作用参与高血压和动脉粥样硬化的发病过程^[2-5]。

卡托普利(captopril, Cap)为临床上有效的降压药,其作用机制主要是抑制转化酶,减少血管紧张素 II (Ang-II)的形成。然而这并不能充分解释 Cap 的某些作用如长期给药产生持续降压和阻止血管肥厚^[6,7]以及改善血管平

滑肌细胞的异常超微结构征象^[8]。近年来,国外研究者已注意到转化酶抑制剂与 ET 调节存在直接作用关系^[9]。但有关转化酶抑制剂对 ET 基因表达影响的研究尚未见有报道。故我们观察了转化酶抑制剂 Cap 对 Ang-II 诱导家兔血管平滑肌细胞 ET-1 基因表达的影响。

材料与方 法

1. 药品与试剂

Ang-II 购自 Sigma 公司。Cap 由中美施贵宝制药有限公司提供。反转录酶(AMV)购自 Promega。Taq DNA 聚合酶,限制性内切酶,oligo-dT, dNTP

以及单克隆肌动蛋白抗体(鼠抗人肌动蛋白单抗)和二抗荧光素(羊抗小鼠 IgG/FITC)均购于华美生物工程公司。

引物(中国科学院上海细胞生物学研究所合成):

Primer 1: 5'-CTGATGGACAAGGAGTGTG-TCTACTTC-3'

primer 2: 5'-GTTGTGGGTCACCTTCTGCT-CTCGGTG-3'

2. 细胞培养与鉴定

按组织块培养法培养家兔主动脉平滑肌细胞(ASMC)^[10]。用单克隆肌动蛋白抗体对平滑肌细胞特异性肌动蛋白的免疫细胞化学间接法^[11]显示所培养的细胞为阳性平滑肌细胞。即: 单抗 Actin 与已用 1.7%戊二醛固定的细胞一起孵育, 经洗涤后, 再加二抗荧光素 IgG/FITC, 充分洗涤后, 观察在荧光显微镜下产生的荧光细胞。

3. Ang-II 诱导 ET-1 mRNA 表达以及与 Cap 的相互作用

实验前用无血清培养基维持培养第 9—11 代 ASMC 48 h(无血清培养基含或不含 Cap, 培养 24 h 后换培养基一次), 使细胞生长停止。按 Resink 描述的方法^[2], 在无血清培养基加入 $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ Ang-II, 与 ASMC 分别孵育 1、3、5 和 7 h 后, 开始收集细胞。

4. 总 RNA 制备

用非超离心一步法(AGPC)微量提取 RNA。操作过程如下:

(1) RNA 提取 大约 10^7 细胞 1 ml^{-1} 的比例移至 1.5 ml 的塑料离心管中, 依次加 800 μl 的变性液 (4 mol L^{-1} 硫氰酸胍, 25 mmol L^{-1} 柠檬酸钠 pH 7.0, 0.5% 肌氨酸钠 0.1 mol L^{-1} β -巯基乙醇), 50 μl 2 mol L^{-1} 醋酸钠(pH 4), 0.5 ml 的水饱和苯酚和 200 μl 氯仿/异戊醇(49:1)。每加一种试剂后均充分振荡混匀, 于冰浴中静置 15 min, 以 $10000 \text{ g } 4^\circ\text{C}$ 离心 20 min。离心后 RNA 在水相, DNA 和蛋白质留在有机相及两相界面。

(2) 沉淀 RNA 取出离心后水相大约 0.5 ml, 加入等体积的异丙醇混匀, 于 -20°C 放置 1 h 以上, 以 $10000 \text{ g } 4^\circ\text{C}$ 再离心 20 min。去上清液, 沉淀的 RNA 溶于 0.15 ml 变性液, 再加等体积异丙醇轻轻混匀, 于 -20°C 放置 1 h 离心沉淀同上。去上清液, 沉淀用 0.5 ml 75% 冷乙醇洗 1 次, 反复摇几次, 以 $10000 \text{ g } 4^\circ\text{C}$ 离心 8 min。RNA 沉淀用真空干燥 10—15 min, 用 50 μl 0.1% 二乙基焦碳酸盐处理过的 ddH_2O 溶解

沉淀, 振荡几次, 然后在 60°C 水浴放置 10—15 min, 最后得到 RNA 溶液。

(3) 总 RNA 浓度测定 用紫外分光光度计重复测定 3 次。OD 260/OD 280 比值在 1.5—1.8 之间。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

5. ET-1 cDNA 的合成(RT)

取 4 μg 总 RNA, 在 65°C 变性 5 min, 依次加入 0.2 mmol L^{-1} dNDP, 100 pmol L^{-1} oligodT, 16 units/ μg AMV 和 pH 8.3, 50 mmol L^{-1} Tris-HCl, 50 mmol L^{-1} KCl, 10 mmol L^{-1} MgCl_2 , 10 mmol L^{-1} DTT, 0.5 mmol L^{-1} Spermidin 缓冲液。总反应体积为 20 μl 在 42°C 保温 120 min, 反应结束后, 加入 50 μl TE 缓冲液(pH 8, 10 mmol L^{-1} Tris-HCl, 1 mmol L^{-1} EDTA), 于 70°C 加热 10 min 终止反应。

6. ET-1 cDNA 的扩增(PCR)

(1) PCR 反应体系和流程

cDNA		7 μl
dNTP	0.2 mmol L^{-1}	10 μl
Primer 1	20 pmol L^{-1}	1 μl
Primer 2	20 pmol L^{-1}	1 μl
10 \times Taq 缓冲液		10 μl
Taq DNA 聚合酶	2 units	1 μl
ddH_2O		70 μl

混匀

↓

加液体石蜡(20 μl)

↓

93 $^\circ\text{C}$ (1 min)

↓

↑

55 $^\circ\text{C}$ (1min) → 72 $^\circ\text{C}$ (1.5 min)

↓

反复循环 35 次

↓

最后一次在 72 $^\circ\text{C}$ 保温 5 min

(2) PCR 产物的检查和定量 取 PCR 产物 10 μl 进行 1.7% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溴乙锭)分析, 以 pGEM-7 Zf(+)/Hae III 为分子质量标准, 电泳液为 IX TBE。电泳完毕后在紫外灯下拍照。用计算机图象处理技术^[10], 确定 ET-1 PCR 产物的灰度值。

7. 统计学处理

定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n=4$ 次实验。均值差异的

显著性用成组 t 检验法检测。

结 果

1. ET-1 cDNA 片段

总 RNA 反转录后经 35 次循环扩增的产物

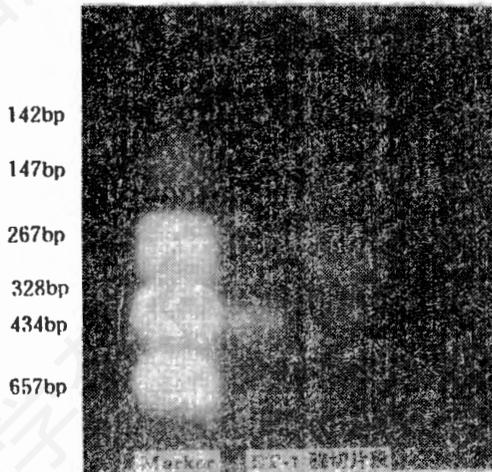


图 1 Marker 系 pGEM-7 Zf(+) Hae, ET-1 PCR 产物为 425 bp, 经 Hind III 酶切后为 279 bp 和 146 bp 两个片段

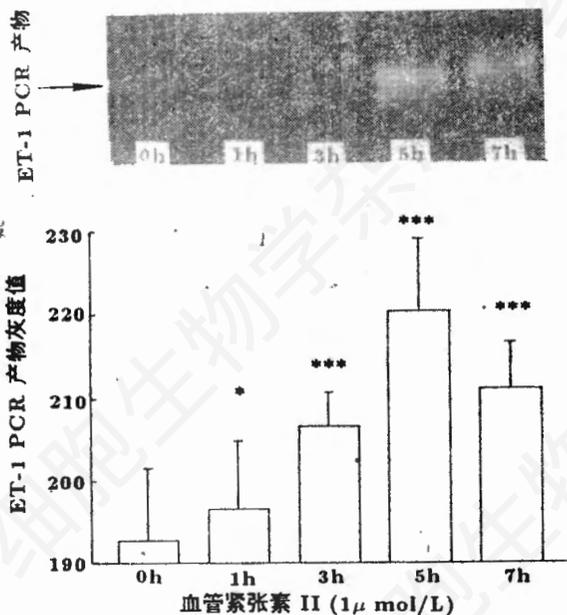


图 2 上: 血管紧张素 II (1 μmol/L) 刺激血管平滑肌细胞(ASM) 不同时间后的 ET-1 PCR 产物电泳图谱。下: 血管紧张素 II 刺激 VSMC 不同时间后的 ET-1 PCR 产物相对量(灰度值)。

(n=4, $\bar{x} \pm s$, *P>0.05, ***P<0.01 vs 对照组。)

见图 1 所示。以 Marker 系 pGEM-7 f(+)/Hae 为参照, 可见, PCR 产物为 425 bp, 经 Hind III 酶切后为 279 bp 和 146 bp。

2. Ang- II 诱导 ET-1 mRNA 表达

Ang- II 1 μmol L⁻¹ 与静止的 ASM 在无血清培养基一起孵育, 可引起一个时间依赖性 ET-1 mRNA 表达。孵育 1 h, 表达不明显, 孵育 3 h, 表达明显增加, 孵育 5 h, 表达达到高峰, 孵育 7 h, 表达开始下降, 但仍高于孵育 3 h ET-1 mRNA 的表达量(见图 2)。

3. Cap 对 Ang- II 诱导 ET-1 mRNA 表达的影响

预先用 Cap(1 和 10 μmol L⁻¹) 处理 ASM, 都明显抑制 Ang- II 刺激 5 h 引起的 ET-1 mRNA 表达(见图 3), 其抑制分别达 73% 和 84%。

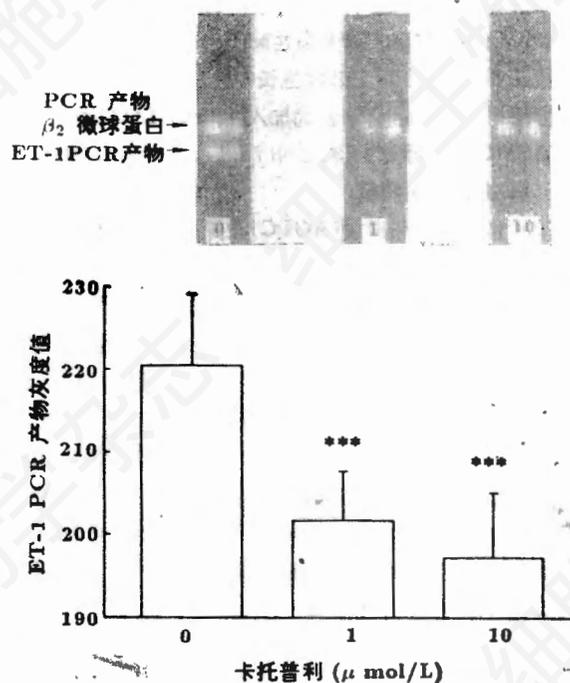


图 3 上: 卡托普利前处理血管平滑肌细胞后(ASM), 血管紧张素 II 刺激 5 h 后的 ET-1 PCR 产物的电泳图谱。(β₂ 微球蛋白 PCR 产物为内参照) 下: 卡托普利前处理 VSMC 后, 血管紧张素 II 刺激 5 h 后的 ET-1 PCR 产物的相对量(灰度值)。

(n=4, $\bar{x} \pm s$, ***P<0.01 vs 对照组。)

讨 论

根据 Philip 等人^[12]报道的 ET-1 全序列设计的一对引物可以扩增一条 425 bp 的 ETcDNA (在 -564 bp 处, 有一个 Hind III 酶切位点)。本实验在培养家兔主动脉平滑肌细胞成功扩增合成了一个 425 bp 的 cDNA 片断。经 Hind III 酶切得到 279 和 146 bp 两个片断。这个结果与设计相符。

本研究结果显示, 血管紧张素 II $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ 刺激家兔主动脉平滑肌细胞 3 小时, ET-1 mRNA 表达增加, 刺激 5 小时到达高峰, 这与血管紧张素 II 刺激人血管平滑肌细胞 ET-1 mRNA 表达相似^[2]。当血管紧张素 II 刺激 7 小时后, ET-1 mRNA 表达开始下降, 但仍高于刺激 3 小时 ET-1 mRNA 表达量。这与 Resink 等报道的血管紧张素 II 刺激人血管平滑肌细胞 7 小时后, ET-1 mRNA 表达迅速下降到基础水平有所不同^[2]。这个差异也许与不同种属或不同的实验方法有关, 因为 Resink 等使用的是 Northern Blot 分析, 本实验应用的是反向 PCR 结合计算机图象分析。

本实验结果也显示, 预先用卡托普利 (1 和 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) 处理家兔血管平滑细胞, 均明显抑制血管紧张素 II 诱导 ETmRNA 表达。Yoshida 等人^[9]证明转化酶抑制剂抑制血管紧张素 II 刺激培养的人脐静脉内皮细胞释放 ET-1。这些结果表明转化酶抑制剂对 ET-1 的影响不仅作用在调节释放过程而且也可直接作用在基因表达水平。

通常血管平滑肌细胞很少合成和释放 ET^[13]。当在病理状态下如动脉粥样硬化和高血压, 由于细胞表型改变成增殖和分泌型, 血管平滑肌细胞可合成和释放 ET^[2,5]。而血管紧张素 II 又诱发和维持这种病理型平滑肌细胞^[2]。本研究的卡托普利抑制血管紧张素 II 引起 ET 基因表达也许反映卡托普利可逆转病理型血管平滑肌细胞, 从而有效防治高血压和动脉硬化。然而本研究并未观察卡托普利对病理型血管平

滑肌细胞表型逆转的影响, 因此, 进一步实验是有必要的。

摘 要

用反向 PCR 结合计算机图象处理技术检测卡托普利 (Cap) 对培养家兔主动脉平滑肌细胞内皮素 -1 (ET-1) mRNA 表达的影响。扩增的 ET-1cDNA 为 425 bp, 经 Hind III 酶切后为 279 bp 和 146 bp。血管紧张素 II (Ang-II) 引起 ET-1 mRNA 表达, 诱导表达有时间依赖性 (作用 3 h, 表达明显增加, 作用 5 h, 表达达到高峰, 作用 7 h, 表达开始下降)。Cap (1 和 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) 明显抑制 Ang-II 引起的 ET-1 mRNA 表达, 抑制分别达 73% 和 84%。这些结果表明 Cap 能直接抑制血管平滑肌细胞的 ET-1 基因表达。

关键词: 内皮素 基因表达 血管紧张素 II
卡托普利 血管平滑肌细胞培养

参 考 文 献

- [1] Yanagisawa, M. et al., 1988, *Nature*, 332: 411-415.
- [2] Resink, T. et al., 1990, *Biochem Biophys Res Commun.*, 168: 1303-1310.
- [3] Luscher, T. F. et al., 1993, *J Hypertens.*, 11: 121-126.
- [4] Lerman, A. et al., 1991, *N Engl J Med.*, 325: 997-1001.
- [5] Yasuda, M. et al., 1990, *Am Heart J.*, 119: 801-806.
- [6] Kika, D. C. et al., 1982, *Hypertension*, 4: 118-124.
- [7] Antonaccio, M. J. et al., 1981, *Hypertension*, 3(suppl 1): I-54-I-62.
- [8] 齐建华等, 1996, 中国药理学通报, 待发表.
- [9] Yoshida, H. et al., 1992, *Life Sci.*, 50: 195-220.
- [10] Qi, J. H. et al., 1996, *Acta Pharmacol Sin.*, 17: 142-145
- [11] Bendhack, L. M. et al., 1992, *Hypertension*, 19 (suppl II): II-42-II-48.
- [12] Philip, A. et al., 1992, *Biochem Biophys Acta.*, 1129: 249-250.
- [13] Boulanger, C. et al., 1990, *J Clin Invest.*, 85: 587-590.

EFFECT OF CAPTOPRIL ON ENDOTHELIN GENE EXPRESSION IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS

QI Jian-Hua LU Min WANG Jun WANG Xin-Ming HAN Zhong-Chao

(Shanghai Institute of Cell Biology, Chinese Academy of Science 200031)

ABSTRACT

To investigate the effect of captopril (Cap) on expression of endothelin-1 (ET-1) mRNA in rabbit aortic smooth muscle cells using RT-PCR coupled with digital image processing techniques, a 425 bp ET-1 cDNA was synthesized by RT-PCR. Two fragments of 425 bp cDNA (279 bp and 146 bp) were obtained by Hind III enzymatic dissociation. Angiotensin II (Ang-II) induced ET-1 mRNA expression. Induction of ET-1 mRNA expression was exhibited transient kinetics (marked increase at 3 h, peak at 5 h, decline at 7 h). Cap (1 or $10 \mu\text{mol}^{-1}$) markedly inhibited the induction of ET-1 mRNA expression by Ang-II (73% and 84%). These results showed that Cap inhibited ET-1 gene expression in vascular smooth muscle cell directly.

Key words: Endothelin Gene expression Angiotensin II Captopril Vascular smooth muscle cell culture

组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)工程细胞系 遗传特性及成瘤性分析*

陈琳 徐秀英 刘士辉 朱恒奇 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

t-PA是由血管内皮细胞产生的,精氨酸特异性的丝氨酸类蛋白酶。在血栓形成时它可特异性的和血栓中纤维蛋白结合,纤溶酶原也通过赖氨酸残基与纤维蛋白结合,形成三元复合物,有助于t-PA激活纤溶酶原变为纤溶酶。这样t-PA可选择性溶解血栓中的纤维蛋白,而游离的纤溶酶则被 α 2-抗纤溶酶灭活,因此,t-PA以高效地溶解血栓且副作用小而受到人们的青睐。但由于t-PA进入血液后可迅速被血浆中1-型纤溶酶原激活剂抑制剂(PAI-1)抑制^[1]以及被肝细胞受体识别而降解使其在血液中的半衰期变短^[2,3],因此临床应用

时,需静脉大量滴注才能维持有效治疗浓度,花费昂贵,难于推广。为获得半衰期长、纤溶活性高的t-PA,本组构建了t-PA突变体并在CHO-dhfr-细胞中表达,获得了t-PA工程细胞系。对t-PA工程细胞系进行遗传特性分析及成瘤性试验是基因工程细胞特性鉴定的重要方面。我们用秋水仙素破坏纺锤丝阻抑细胞于分裂中期,并通过低张处理、固定、染色可清晰地显示细胞染色体形态。另外,我们将t-PA工程细胞注射于4周龄裸鼠皮下,无菌饲养

* 此工作得到本院放射医学研究所刘秀林老师的帮助,谨致谢意。