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

QI Jian-Hua LÜ 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 μ 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，形成三元复合体，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。

30天，观察裸鼠成瘤性。

材料与方法

一、材料

秋水仙素 北京怀柔生化研究所生产。

t-PA工程细胞系 为t-PA F区突变、K1及K2区双糖基化位点去除及PAI-1结合位点去除的组合突变体在CHO-dhfr⁻细胞中表达。由本组构建[4]。

t-PA工程细胞表达产物 细胞培养上清经柱层析纯化获得的纯品。

CHO-dhfr⁻细胞 为二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)缺陷型中国仓鼠卵巢细胞，由中国预防医学科学院病毒所惠赠。

人宫颈癌细胞(Hela细胞) 由军事医学科学院微生物流行病研究所提供。

裸鼠 4周龄，由中国科学院肿瘤所动物室提供。其它试剂均为分析纯。

二、方法

1. 染色体分析[5,6]

在细胞分裂中期，胞体呈圆形，染色体集中在赤道板上，形态清晰。此时，易进行染色体研究。我们利用秋水仙素破坏纺锤丝以阻抑细胞于分裂中期，可截获更多的中期分裂相以便进行染色体分析。

(1) 向指数生长期的单层细胞培养液中加入秋水仙素至终浓度为0.2 μg/ml。37℃继续培养3 h。

(2) 用吸管轻轻吹打细胞，将细胞悬液于1000 rpm离心5 min，收集细胞，即分裂相细胞。

(3) 低张处理：用0.075 mol/L KCL溶液于37℃温浴30 min。离心1000 rpm、5 min收集细胞。

(4) 固定处理：将甲醇与冰醋酸混合液(3:1)加到细胞中，轻轻吹打均匀，37℃温浴15～20 min，重复固定三次。

(5) 制片。

(6) Giemsa染色，自然干燥。

(7) 用普通光学显微镜观察、计数，分析畸变类型，计算畸变率。

2. 成瘤性试验

我们将20只4周龄裸鼠分为4组，每组5只。第一组皮下接种2×10^6/0.15 ml/只的Hela细胞作为阳性对照；第二组皮下接种1×10^7/0.15 ml/只的CHO-d^{hfr}-细胞作为阴性对照；第三组皮下接种1×10^7/0.15 ml/只的t-PA工程细胞；第四组皮下接种300 μg/0.2 ml/只t-PA工程细胞表达产物。裸鼠按照二级动物无菌喂养，观察30天。

结果与讨论

1. 我们对t-PA工程细胞进行染色体分析，同时以CHO-dhfr⁻细胞为对照，结果见表1，染色体形态示于图1、2、3。

表1 细胞染色体分析

细胞系	染色体数目(条)	计数细胞(个)	畸变细胞数(个)	畸变率(%)	畸变细胞类型								
					断裂	裂隙	环状	断片	异着丝粒体	微小体	四倍体	染色体互换	百分率
CHO-dhfr⁻细胞	20	100	5	5	0	2	0	3	0	0	1	0	6
t-PA工程细胞	20	100	15	15	2	1	0	2	9	1	4	0	19

由此可知CHO-dhfr⁻细胞和t-PA工程细胞系均存在各种类型的畸变，包括裂隙、断片、异着丝粒和四倍体等，CHO-dhfr⁻细胞的畸变率约为5%，t-PA工程细胞系染色体畸变率为15%，由于t-PA工程细胞始终处于MTX压力之下，而且外源基因整合到染色体上，染色体发生一定程度的畸变属于正常现象[7]。

2. 对裸鼠进行成瘤性试验，皮下注射t-PA工程细胞及其表达产物，并以人宫颈癌细胞(Hela细胞)作为阳性对照，CHO-dhfr⁻细胞作为阴性对照，结果示于图4、5。试验表明接种Hela细胞的五只裸鼠均成瘤，接种CHO-dhfr⁻细胞、t-PA工程细胞及t-PA工程

图 1 CHO-dhfr⁻ 细胞染色体

图 2 t-PA 工程细胞正常染色体

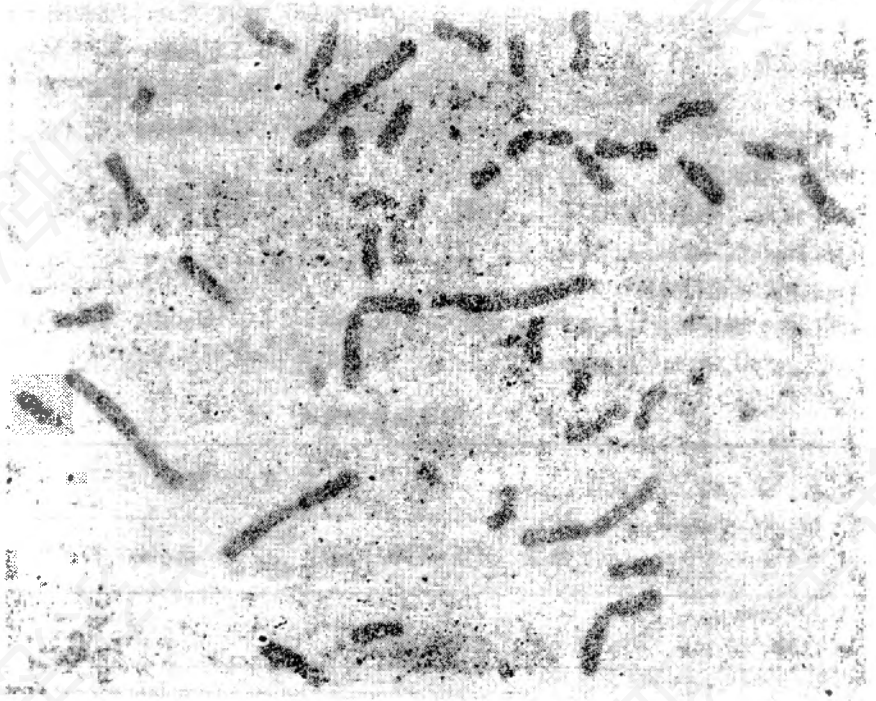

图 3 t-PA 工程细胞畸变染色体

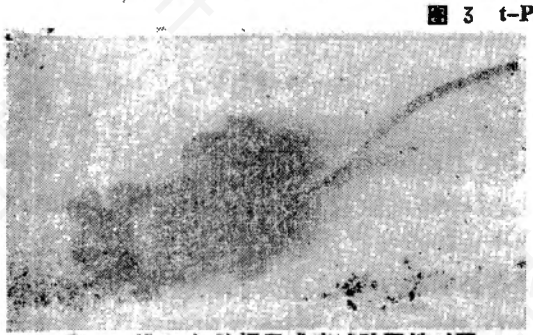

图 4 Hela 细胞裸鼠成瘤试验阳性对照

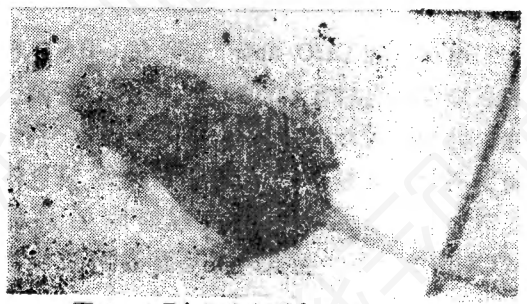

图 5 t-PA 工程细胞裸鼠成瘤试验

细胞表达产物的小鼠均不成瘤，由此可知t-PA工程细胞及其表达产物无成瘤性，是安全可靠的。

摘 要

组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)因其在防止血栓形成中起重要作用而受到人们的重视。但由于t-PA在血液中半衰期很短，作为溶栓药，一时难于推广。为了延长半衰期、增强其特异活性，本组构建了t-PA突变体并在CHO-dhfr⁻细胞中获得了高效表达。我们在细胞培养基中加入秋水仙素，通过低张、固定、染色，进行染色体分析，结果表明，t-PA工程细胞系染色体条数为20条，畸变类型有异着丝粒。四倍体、裂隙、断片，畸变率为15%，属于正常范围。同时我们对该细胞系进行成瘤性试验，选用4周龄裸鼠作为试验鼠，以Hela细胞为阳性对照，CHO-dhfr⁻细胞为阴性对照，试验表明：t-PA工程细胞及表达产物对裸鼠均无成瘤性。

关键词：t-PA工程细胞系 遗传特性 成瘤性

参 考 文 献

[1] Alessi MC. et al., 1990, *Thromb Res.*, 60: 509—516.
[2] Emeis JJ. et al., 1985, *Thromb Haemost.*, 54: 661—664.
[3] Nilsson T. et al., 1984, *Scand J Haematoll.*, 33: 49—53.
[4] 刘士辉等，1995，生物工程学报，11 (1)：289—295.
[5] Randal J. Kaufman. et al., 1985, Molecular and Cellular Biology, 1750—1759.
[6] 鄂征主编，1982，组织培养技术，P. 236—239.
[7] Barsoum J. et al., 1990, *DNA and Biology*, 9(4): 293—300.

THE ANALYSIS OF HEREDITARY FEATURE AND ONCOGENICITY FOR THE TISSUE-TYPE PLASMINOGEN ACTIVATOR (T-PA) ENGINEERING CELL LINE

Chen lin Xu xiu ying Liu shi hui Zhu heng qi Huang pei tang
(Institute of Biotechnology, Academy of military Medical sciences, Beijing 100071)

ABSTRACT

Recombinant t-PA is a new thrombolytic agent, it has a high affinity for fibrin. But as a new thrombolytic agent, it has some disadvantages, such as rapidly eliminated by the hepatic cells from the circulation and inhibited by plasminogen activator inhibitor-1, these results in its shorter half-life in human plasma and needing a high concentration in vein by continous infusion. In order to prolong its half-life and increase resistance to PAI-1, We constructed t-PA engineering cell line. The results of hereditary feature and oncogenic analysis show that t-PA engineering cell line have normal hereditary feature and don't produce tumour in nude mice.

Key words: t-PA engineering cell line Hereditary feature Oncogenicity