

定方法方面目前仍存在问题：(1) 培养的肾小球细胞(如 GEC)，缺乏特定酶或抗原标记物，主要靠形态学鉴定，这就难以确定是否存在其它肾小球细胞的污染；(2) 目前所采用的肾小球细胞培养基中，均含有 10—20% FBS，而且常常补加胰岛素。在这样的条件下研究各种肾小球细胞的代谢调节是难以得到肯定的结果的，应努力为各种肾小球细胞建立无血清培养基；(3) 在体外培养肾小球细胞多是将细胞种植于塑料瓶、玻璃瓶或是包被后的培养瓶中，这种环境与体内迥然不同。例如，MC 在体内存在于系膜区，由系膜基质包围。研究表明^[10]，系膜基质对 MC 的表型及代谢过程影响很大。若能模拟体内环境培养 MC，研究其结构与功能将更有意义；(4) 尚存在一些矛盾的结果，如 MC 是否有吞噬活性，GEC 膜上是否存在 C3b 受体等。

总之，肾小球细胞培养方法的研究虽已有 20 多年的历史，但目前仍处于不断发展阶段，还需要很多工作使之进一步完善和发展。

摘 要

种植完整的肾小球或用胶原酶消化后的肾小球残体，借助细胞自肾小球向外生长的能力，已培养出三种肾小球细胞，即肾小球表皮细胞、系膜细胞和肾小球内皮细胞。应用细胞及分子生物学技术研究单一类型肾小球细胞的结构与功能，发现这些细胞能合成和分泌多种细胞因子和生长因子，这些因子以自分泌或旁分泌方式调节肾小球细胞的代谢过程。

参 考 文 献

- [1] Harper, P. A., 1984, *Kidney Int.*, 26: 875—880.
- [2] 于力方等, 1990 年, 中华肾病杂志, 6: 70—74.
- [3] LauLajainen, T. et al., 1993, *Lab. Invest.*, 69: 183—192.
- [4] Abrahamson, D. R., 1987, *Am. J. Physiol.*, 253: F 783—F 794.
- [5] Nakamura, T. et al., 1992, *Kidney Int.*, 41: 1213—1221.
- [6] Abrass, C. K. et al., 1994, *Kidney Int.*, 46: 613—620.
- [7] Stow, J. L. et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3296—3300.
- [8] Abboud, H. E. 1992, *Kidney Int.*, 41: 581—583.
- [9] Davies, M., 1994, *Kidney Int.*, 45: 320—327.
- [10] Jaffer, F. E. et al., 1990, *Kidney Int.*, 38: 1193—1198.
- [11] Ruef, C. et al., 1990, *Kidney Int.*, 38: 249—257.
- [12] Lamas, S. et al., 1991, *Am. J. Physiol.*, 261: C 634—C 641.
- [13] Marsden, P. A. et al., 1991, *Am. J. Physiol.*, 261 (1 Pt 2): F 117—F 125.
- [14] Dekan, G. et al., 1990, *Am. J. Physiol.*, 137: 913—927.
- [15] Gary, E. S. et al., 1985, *Lab. Invest.*, 53: 122—131.
- [16] Striker, G. F. et al., 1984, *J. Exp. Med.*, 160: 323—326.
- [17] Barbara, K. et al., 1989, *Am. J. Physiol.*, 256: C 182—C 189.
- [18] Green, D. F. et al., 1992, *Kidney Int.*, 41: 956—960.
- [19] Marx, M. et al., 1993, *Kidney Int.*, 43: 1027—1041.

抗冻蛋白与细胞的低温和超低温保存

王君晖 黄纯农

(杭州大学生命科学学院 杭州 310012)

抗冻蛋白(AFP, Antifreeze Proteins)最早发现于极地海洋鱼类，它能非连续地降低体液冰点，并通过吸附于冰晶的特殊表面有效阻

止和改变冰晶生长。现已证明，一些陆生节肢动物、维管植物、非维管植物、真菌和细菌等，也存在抗冻蛋白^[1]。鱼类抗冻蛋白一般分成四

类(AFP-I, AFP-II, AFP-III和抗冻糖蛋白AFGP), 对它们的生化组成、基因结构和抗冻机制等已有一定认识。最近, 费云标等还从雪莲和沙冬青中发现了抗冻蛋白^[2]。

抗冻蛋白有多方面应用价值。将它应用于生物材料的低温和超低温保存, 是90年代研究和开发抗冻蛋白的活跃领域之一。

一、基本背景

动物器官的超低温保存很难成功。传统冻存方法中胞外冰晶引起血管破裂, 导致器官整体性功能丧失。80年代中期出现的玻璃化法冻存技术给器官的长期保存带来了希望, 但保护剂毒性、降温方式和去玻璃化等问题影响着研究进程。冻存后的植物器官, 往往只是一部分细胞存活, 引起恢复生长时的局部增生或次生长^[3]。低温敏感的动物细胞、顽拗型植物的种质, 也是低温和超低温保存的难点。已经知道, 胞内冰晶、溶液效应和胞外冰晶是引起冻存损伤的主要因素。

AFP能和冰晶作用, 改变冰晶的结构、大小和数目; AFP能和细胞膜作用, 封闭离子通道, 阻止溶质渗漏, 保护膜完整性^[4,5]。基于这些特征, 将它应用于生物样品的低温和超

低温保存, 预期能够提高细胞的存活率并使原先不能冻活的样品冻存成功。实际使用效果如何, 其中的细胞生物学和生物化学机制如何, 是本文要评述的主要内容。

一般来说, 从低于某生物的正常生理温度至干冰温度(-79°C)叫低温; 从低于干冰温度至液氮温度(-196°C)甚至更低叫超低温。本文中涉及的低温多为 5°C 至 -20°C , 超低温均为 -196°C 。文中的低温保存大多为样品经过预处理后直接放于某一低温处贮存; 也有缓慢降温至某一温度, 再在该温度处贮存。文中的超低温保存涉及三种方法, 快冻法是将样品直接投入液氮贮存; 预冻法是样品先在某一低温或液氮蒸汽中停留若干时间, 再投入液氮贮存; 玻璃化法是指样品用一定配方的极高浓度的复合保护剂处理后快速投入液氮贮存。

二、AFP有利于低温保存及其机制

表1是几例AFP有助于低温保存的报道。Rubinsky等认为, AFP能稳定膜电位, 阻止离子流失, 保护卵膜完整, 从而使之保持成熟能力和受精能力^[4,5]。Taylor等报道, AFP能稳定人红细胞膜, 减少膜碎片, 利于血液低温

表1 AFP有利于低温保存的例子

样 品	AFP 类型, 组份	浓 度 (mg/ml)	冷冻温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (h)	冷冻效果
猪卵细胞	AFGP (1—8)	0	4	24	存活率 0%
	AFGP (1—8)	1	4	24	65%
	AFGP (1—8)	40	4	24	59%
	AFGP (1—5)	40	4	24	0%
	AFGP (7—8)	40	4	24	0%
牛卵细胞	AFP-I	0	4	24	授精率 0%
	AFP-I	20	4	24	44%
	AFP-II	20	4	24	38%
	AFP-III	20	4	24	48%
绵羊胚	AFP-III	0	2—4	96	孵化率 47%
	AFP-III	1	2—4	96	57%
	AFP-III	10	2—4	96	45%
	AFP-I	1	2—4	96	73%
	AFP-I	10	2—4	96	60%

贮存^[6]。除表 1 所列, AFP 还有助于大鼠肝脏^[7], 人淋巴细胞和血小板^[8]的低温贮存。AFP 利于低温贮存的机制, 一般认为是: 在零上低温, AFP 充当质膜离子通道封闭剂, 阻止了电解质渗漏; 在零下低温, AFP 也同时改变了冰晶形状, 减少了冰晶数目, 减轻了冰晶损伤。Rubinsky 等在猪的粒细胞上找到了 AFP 封闭 Ca^{2+} 和 K^{+} 离子通道的证据^[9]。AFP 对冰晶生长行为的改变可以用低温显微镜观察。

三、AFP 有利于超低温保存及其机制

表 2 是 AFP 有利于超低温保存的几个例子^[10-14]。注意, 表中一些对照的存活率为零, 即表明 AFP 使原先不能冻活的样品冻存成功。其他类似的报道还有, 猪和小鼠的二细胞胚^[13]、大鼠脾细胞^[15]、牛早期胚胎^[12]等。Rubinsky 等的专利中还提到了兔心脏、大鼠的肝、心、肾, 甚至整只大鼠都因添加抗冻蛋白而存活^[8]。

生物材料冰冻保存过程中, 重冰晶是引起

表 2 AFP 有利于超低温保存的例子

样品	AFP 类型, 浓度 (mg/ml)	冷冻方法	冷冻效果
山羊精子	AFP-I 0	预冻法	游动性 36%
	AFP-I 0.01		45%
	AFGP 0.01		43%
人红细胞	AFP-I 0	快冻法	复温损伤
	AFP-I 0.06		减轻损伤
	AFP-I 1.50		加剧损伤
绵羊胚	AFP-I 0	玻璃化法	孵化率 0%
	AFP-I 40		65%
猪卵细胞	AFGP 0	玻璃化法	存活率 0%
	AFGP 40		25%
	AFP 40		0%

细胞损伤的主要原因。AFP 能阻止冰晶生长, 故可以减轻重冰晶造成的伤害。Bronshstein 和 Steponkus(1992)认为, 差示扫描量热法适合于检测小于 $1\ \mu\text{m}$ 的冰晶; 在含 30—55%的

丙二醇、甘油、乙二醇或羟乙基淀粉的保护剂中加入 AFP-I, 当浓度大于等于 3mg/ml 时, 可以改变重冰晶温度, 减少小于 $1\ \mu\text{m}$ 的重冰晶; 当浓度低于 1mg/ml 时, 能减少大于 $1\ \mu\text{m}$ 的重冰晶^[16]。Hansen 和 Carpenter 进一步指出, AFP 不是改变重冰晶的启动, 而是抑制重冰晶的生长^[17]。

AFP 的这个功能比较确认, 实际使用时浓度较低。浓度过高, 虽然能阻止溶液重冰晶, 但膜表面却有大量冰晶出现, 其机理不明。

去玻璃化是玻璃化法冷冻中的主要危险, AFP 被认为可以抑制去玻璃化, 从而提高细胞的存活率。差示扫描量热法检测发现, 2,3-丁二醇溶液中加入 1mg/ml AFP-I, 可以提高溶液去玻璃化点, 使临界降温速率下降 7000 倍; 聚乙二醇的添加无此效果; 10mg/ml AFP-I 的添加效果相似(Sutton 等, 1992)^[18]。由于减小了对降温速率的制约, 玻璃化保护剂的浓度可以降低, 对细胞的毒性可以减小, 被冻样品的体积可以增大。所有这些将有利于克服玻璃化法冷冻中的难题。

AFP 改变胞外冰晶行为, 使血管不易破裂, 导致器官保存中的整体存活^[8]。

AFP-III 和 AFGP 都能阻止冰晶生长, 但前者对猪卵细胞超低温保存无效, 后者却有效。故不能用与冰晶有关的机制来解释^[13]。因此, AFP 有助于超低温保存还有其他机制, 有待于进一步研究。

四、AFP 使用中存在的问题

AFP 的使用效果有时与人们的期望相反。表 3 是 AFP 不利于低温保存的几个例子^[10,19,20]。其中的机理非常值得我们去探讨。根据有关的文献报道, 再结合我们的分析, 可以归纳为以下几点: (1) AFP 充当质膜离子通道封闭剂的功能可能不具普遍性。有证据表明, AFGP 不能作用于培养的蛙肾管状细胞的 Na^{+}

表3 AFP不利于低温保存的例子

样 品	AFP 类型, 组份	浓 度 (mg/ml)	冷冻温度 (°C)	时间 (h)	冷冻效果
牛肌纤维	AFGP (1—8)	0.1	-5—-20	72	胞内冰晶形成
大鼠心脏	AFGP (1—8)	0	-1.4	3	有活性
	AFGP (1—8)	0.01	-1.4	5	活性低于对照
	AFGP (1—8)	10	-1.4	3	全部死亡
山羊精子	AFP-I	0.0001	5	3	降低游动性
	AFGP (1—8)	0.0001	5	3	降低游动性

离子通道。AFP对鱼类本身就不是离子通道封闭剂,所以,它这个功能可能仅限于表1中的那类细胞,而对表3中的细胞无效。(2)可能因为膜脂成分和表1中细胞迥异,使AFP不能和膜作用,影响了AFP功能发挥。(3)AFP可能对一些样品的膜性成分有解体作用。Hincha等认为,AFGP对菠菜类囊体膜的毒害是由糖基部分引起,由多肽链部分放大^[21]。Payne等认为,AFP分子的集聚和解离是个动态过程,受其浓度影响,AFP在解离时的毒性来自于这个两性分子与细胞膜的相互作用^[10]。(4)在一些样品中,AFP阻止降温时水分子从胞内外迁,使胞内冰晶增加。用冷冻替代法制备牛肌纤维镜检样品,观察到了许多胞内空隙^[19]。(5)AFP存在时形成的特殊的骨针状的胞外冰晶对一些样品有强烈的机械损伤效应。这在大鼠心脏保存中很明显^[20]。

表4是AFP不利于超低温保存的二个例子^[15,22]。Bronshsteyn和Steponkus报道,5—6 mg/ml的AFP-I对乙二醇、丙二醇和甘油没有任何的阻止重冰晶形成的特征^[19]。Hansen和Capenter报道,0.1 mg/ml AFP-I不改变溶液的去玻璃化行为。样品类型、AFP类型、AFP浓度、冷冻体系等多方面因素,影响了AFP改善重冰晶和去玻璃化的能力,导致

表4 AFP不利于超低温保存的例子

样品	AFP类型	浓 度 (mg/ml)	冷冻方法	冷冻效果
人前髓细胞	AFP-I	0.025-1	慢冻法	DNA合成下降
人红细胞	AFP-I			解体作用

了AFP不利于超低温保存。

AFP在低温时就表现出对一些样品的损害作用,即膜解体作用,也是AFP不利于一些样品超低温保存的原因^[15]。因为在一般冷冻程序中,样品进入超低温前必经历了低温。

另外,AFP存在时的特异冰晶生长,可能构成对一些样品超低温冻存中的机械损伤^[22]。我们认为,冰晶生长行为的改变,也可能改变了样品的脱水速度和脱水程度,进而影响冷冻效果。

五、小结和展望

尽管AFP对生物材料低温和超低温保存效果的改善具有复杂性,但基本上可以得出下列结论:(1)浓度为1—40 ml/ml,利于多种样品的低温保存(表1);(2)浓度为0.01—0.06 mg/ml,利于克服重冰晶(表2);(3)浓度为20—40 ml/ml,利于一些样品的玻璃化法贮存(表2);(4)在一些情况下,AFP有可能不利于一些样品的低温和超低温保存(表3,表4),其中机理尚需继续探讨。

AFP可能与质膜相互作用,在一些样品中呈保护效应,在一些样品中呈解体效应;这些效应既受到温度、AFP类型、组份和浓度等因素的影响,也可能改变了冰冻保护剂(如甘油、二甲亚砜等)与细胞膜的相互作用,从而使AFP对低温和超低温保存的效果呈现复杂性。AFP与水分子相互作用,所产生的特异冰晶对不同样品影响不一,这也导致了AFP使用效果的复杂性。前一种相互作用的机理尚未明

确,从分子水平认识 AFP 与膜的相互作用,将是以后研究的热点。

低温和超低温保存技术在医学以及近年来蓬勃发展的动植物生物工程具有重要的实用价值,简化冻存程序和改善冻存效果已日显重要。本文所评述的内容,丰富了低温生物学的理论和应用研究。

文中所使用的抗冻蛋白,有直接提取的,有固相合成的,也有重组 DNA 技术生产的。其在人工低温和超低温保存中使用效果的复杂性,也向我们预示了靠转移 AFP 基因来提高动植物抗冻性的研究也将是复杂的,会有颇多曲折的。当然,引起后者复杂性的因素远远不止这一方面。

参 考 文 献

- [1] Duman JG, Olsen TM. 1993, *Cryobiology*, 30: 322—328.
- [2] 费云标等, 1994, 植物学报, 36 (8): 649—650.
- [3] 王君晖等, 1994, 园艺学报, 21 (3): 277—282.
- [4] Rubinsky B, Arav A, Mattioli M et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, 173: 1369—1374.
- [5] Rubinsky B, Arav A, Fletcher GL, 1991 *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 180: 566—571.
- [6] Taylor L, Stringer K, Black JB et al., 1993, *Cryobiology*, 30: 557—571.
- [7] Lee CY, Rubinsky B, Fletcher GL., 1992, *Cryo-letter*, 13: 59—66.
- [8] Rubinsky B, DeVries AL., PCT/US 91/00351.
- [9] Rubinsky B, Mattioli M, Arav A et al 1992, *Am. J. Physiol.*, 262: R 542—545.
- [10] Payne SR, Oliver FE, Upreti GC., 1994, *Cryobiology*, 31: 180—184.
- [11] Carpenter JE, Hansen TN., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89: 8953—8957.
- [12] Arav A, Ramsbottom G, Baguisi A et al., 1993, *Cryobiology*, 30: 621—622.
- [13] Rubinsky B, Arav A, DeVries AL., 1992, *Cryobiology*, 29: 69—79.
- [14] Rubinsky B, Arav A, DeVries AL., 1991, *Cryo-letter*, 12: 93—106.
- [15] Pegg DE., 1992, *Cryobiology*, 29: 774.
- [16] Bronshteyn VL, Steponkus PL., 1992, *Cryobiology*, 29: 782.
- [17] Hansen TN, Carpenter JF., 1992, *Cryobiology*, 29: 730.
- [18] Sutton RL, Pegg DE., 1992, *Cryobiology*, 29: 781.
- [19] Sandford D, Young OA, Wilson P., 1992, *Cryobiology*, 29: 730.
- [20] Wang T, Zhu Q, Yang X., 1994, *Cryobiology*, 31: 185—192.
- [21] Hinch DR, DeVries AL, Schmitt JM. 1993, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1146: 258—264.
- [22] Hansen TN, Smith RM., 1993, *Cryobiology*, 30: 646.

电场对生物细胞的作用及其实际应用

马志章 蒋承浚

(杭州大学生命科学学院 310012)

电场对细胞作用的研究是细胞生物物理学传统领域之一。近年来由于引入了新的技术和方法,使电场在生物与医学的实际应用方面开辟了广阔的途径。在所应用的电场中,无论是高电压强脉冲或是弱的交变电场电脉冲都能对生物细胞的活动产生作用,并伴随许多后续的影响(见表1)

表1 电场对细胞的一般作用^[1]

	强的单脉冲 E>0.5 kv/cm		弱的交变电场 E<10mv/cm
	细胞壁	细胞膜	细胞代谢
电场作用对象 电场发生的作用 后续作用	电损伤	电穿孔	电刺激
	物质释放		生物高分子合成
	细胞融合和掺合		酶活化
	转染 转化 插入		膜通透性 细胞增殖