

- Genet.*, 22: 631—667.
- [3] Gupta, R. S. et al., 1992, *J. Bacteriology*, Vol., 174: 4594—4605.
- [4] Gray, M. W., 1989, *Trends Genet.*, 5: 294—299.
- [5] Gupta, R. S. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol., 91: 2895—2899.
- [6] Nicholson, R. C. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol., 86: 1159—1163.
- [7] Sogin, M. L. et al., 1989, *Science*, 243: 75—77.
- [8] Craig, E. A. et al., 1993, *Microbiol. Rev.*, 57: 402—414.
- [9] Cavalier-Smith, T. et al., 1987, *Nature (London)*, 326: 332—333.
- [10] Reiner, D. S. et al., 1990, *Eur. J. Cell Biol.*, 53: 142—153.
- [11] Jacobson, L. M. et al., 1987, *J. Protozool.*, 34: 83—86.
- [12] Dillon, L. S., 1981, *Ultrastructure, Macromolecules and Evolution*, Plenum, N. Y.
- [13] Alberts, B. et al., 1989, *Molecular Biology of the Cell*, Garland, N. Y. 2nd., 408—409.
- [14] Gething, M. et al., 1992, *Nature* 355.

人脐静脉内皮细胞体外培养的影响因素

卞杰勇 周 岱

(苏州医学院附属第一医院脑血管病研究室 215007)

血管内皮细胞是位于循环血液与血管壁内皮下组织之间的单层细胞,是血管壁通透性的重要屏障,具有多种生理功能。脐静脉内皮细胞由于来源充足,取材、操作方便,因而成为血管内皮细胞体外试验的主要材料。自 Jaffe^[1] 首创脐静脉内皮细胞培养方法后,以血管内皮细胞的培养技术为基础的研究工作取得了突飞猛进的发展。1976年 Vane 发现了前列腺素,1980年 Furchgott 发现内皮细胞产生的舒张因子(EDRF),1987年 Moncede 证明一氧化氮就是 EDRF,以及 1988年 Yanagisawa 发现内皮素,这些成果都是在以脐静脉内皮细胞培养为代表的血管内皮细胞培养的基础上取得的,而脐静脉内皮细胞的体外培养受到许多因素的影响。

一、脐带离体时间的影响

脐带取材方便,一般取正常妊娠足月分娩的新生儿无菌脐带,立即浸入 4℃ 的脐带保存液中,保存 6 小时或更多时间会使细胞容易分

离,但最好不超过 48 小时^[2];有研究表明^[3],人脐静脉离体后,随着时间的延长,内皮某些物质的含量会发生变化,脐静脉离体后 6 小时内,因子Ⅷ相关抗原与抗凝血酶功能的变化比较平缓,单位面积内前列环素的生成量的变化亦不十分显著,而离体后 6 小时到 12 小时,内皮抗凝血酶功能,因子Ⅷ相关抗原释放量以及前列环素的生成量均随放置时间的延长而呈下降趋势,变化显著;还有研究表明^[4],脐带离体时间与细胞存活率呈负相关,脐带离体后 3 小时内,内皮细胞存活率达到 90%,离体 24 小时尚有 50% 的存活细胞。

二、不同消化酶的影响

目前,各种消化酶的应用已代替了机械刮取来获取脐静脉内皮细胞,它们各有优缺点。用胶原酶消化的细胞数最多,平均每根脐带可获取 2—5 × 10⁵ 个细胞,但有时混杂少量成纤维细胞;链球菌蛋白酶消化获取的细胞数略少于胶原酶,但很少混杂成纤维细胞;胰蛋白酶

对细胞有毒性作用,且消化获取的细胞数较少,不利于细胞生长^[4,5],在脐静脉内皮细胞培养时,现普遍使用0.1%的胶原酶,pH值调至7.4,作用10至15分钟后停止消化;但在传代培养时普遍用胰酶处理,因为用胰酶处理后,可以降低非内皮细胞的贴壁能力,内皮细胞的贴壁比平滑肌细胞、外膜细胞和成纤维细胞早,所以可以去除在接种4小时后仍未贴牢的细胞,而这些非内皮细胞的污染如不去除,将抑制内皮细胞的增殖^[2]。

三、不同培养液及血清的影响

MEM、M₁₉₉、RPMI₁₆₄₀培养液皆可供脐静脉内皮细胞生长繁殖,有研究发现^[4]MEM、RPMI₁₆₄₀液促进内皮细胞生长繁殖的速率无明显差异;亦有人使用条件培养液,认为条件培养基中含有平滑肌细胞和外膜细胞的生长抑制因子,可以防止污染细胞的生长^[2]。培养液用于培养时必须辅加血清,否则细胞贴壁、伸展能力较弱,贴壁细胞繁殖速度慢,且以后多悬浮、死亡^[4];血清的选择是很严格的,许多人认为胎牛血清效果较好,但盛国立等^[2]认为,最好使用人血清,如果没有,可用肝素抗凝的人血浆代替,用新生小牛血清的效果也比胎牛血清好,因为它们更能抑制非Ⅷ因子免疫反应细胞的生长;Gajdusek等^[9]认为培养液中须加入一定浓度血清的原因可能是血液凝固过程中血小板聚集时所释放的各种生长因子有刺激内皮细胞生长的作用,尤其是血小板能够释放一种血小板衍生的长因子(PDGF),促进内皮细胞的生长繁殖。

四、血管内皮细胞生长因子(ECGF)的影响

ECGF的发现亦使脐静脉内皮细胞的传代培养有了很大的发展。ECGF是一类新发现的生长因子^[7],对血管内皮细胞有高效特异的促有丝分裂作用,在体内可刺激血管的发生与生

长^[8]。1990年,何红兵等^[9]即利用牛下丘脑中所含ECGF的粗提物,将脐静脉内皮细胞在体外进行长期传代培养,又提取并纯化了该因子^[10],并成功地进行了脐静脉内皮细胞的单次传代,大规模培养^[11]。最近,他们还利用ECGF,打破了将内皮细胞以1:2—3的比例进行传代培养的一般方法,而是以1:26的比例将培养的静脉内皮细胞进行传代,15天内使细胞数量扩增了333倍,并保留了原代细胞的形态结构,保留了与原代细胞相似的对激素刺激的反应能力^[12]。

五、传代的影响

传代亦对脐静脉内皮细胞产生很大的影响,传代培养的优点在于在原代培养中很难去除单核——巨噬细胞,而巨噬细胞可产生白介素I和肿瘤坏死因子以激活内皮细胞,并使它们改变性状。但是巨噬细胞不能传代,故当内皮细胞传至2—3代后,基本可以去除这种细胞^[2]。有研究表明^[13],脐静脉内皮细胞体外培养后,对新的生存环境有一个适应过程,结果表现为细胞的形态及功能发生一定的变化,而且,随着培养时间的延长,这种改变愈加明显。因此作者认为脐静脉内皮细胞在体外培养20天左右,细胞呈典型的棱形或鹅卵石状,所培养的细胞有较好的分泌前列环素及Von Wille brand因子的功能,是进行有关基础医学研究的较佳时期。

六、排除污染

细菌、霉菌、支原体污染细胞培养物较常见,不但造成培养基等生物制品的极大浪费,且感染后的细胞在生理、生化、遗传等方面都已发生变化,只得废弃^[14];对于细菌、霉菌污染,常预防性地加入青霉素、链霉素和二性霉素B于细胞培养物中,当然,培养基应已过滤除菌;而支原体的污染一直是困扰细胞培养工作者的问题,Roulland-Doussoix^[15]检测各种细胞系,发现污染率为23%,而Kuppeve-

Id^[16]发现污染率为55%。检测支原体污染的方法中,逆转录PCR法、RFLPS(限制性片断长度多态)技术精确、灵敏^[17,18],而培养法、DNA荧光染色法因简单、快速、准确而更为常用^[19,20];支原体污染的清除仍是一个难题,目前仍推荐使用抗生素,如B-Mcyclyne、MRA、Ciprobey^[21-23];对于血清中支原体污染的去除,常采用56℃加热灭活20分钟或通过孔径0.1 μm的滤膜过滤的方法清除支原体,但因为这两种方法会降低血清的营养,故仍不成熟。

七、其他一些因素的影响

有文献报道肝素能增强内皮细胞生长因子对血管内皮细胞的增殖作用^[24];Rosebaum^[25]发现肝素单独作用于内皮细胞,在低浓度血清培养(<10%)时,抑制内皮细胞生长,当血清浓度升高后,其阻止内皮增殖的作用消失;当肝素和ECGF同时加入培养液时,肝素可显著增强ECGF对内皮细胞的增殖作用。

此外,培养箱的二氧化碳浓度亦对培养产生影响,有报道^[26],二氧化碳浓度变高,培养箱中猪脑血管内皮细胞产生花生四烯酸代谢产物的量亦在一定范围内增加;培养液的pH值、温度亦是影响细胞生长的重要因素。

总之,尽管因血管内皮细胞由于供体的年龄、性别、种属、来源器官及动脉抑或静脉等的不同,其特性有一定的差异,但它们仍有许多共同的特性^[27],且其他许多人体的血管内皮细胞来源困难,培养方法亦不很成熟,故人脐静脉内皮细胞的培养仍不失为一项重要的基本技术,随着该方法的日趋成熟,与血管内皮有关的许多基础医学研究必将得到进一步发展。

摘 要

脐静脉内皮细胞的体外培养,为深入研究该类细胞学特性,探讨与之有关的众多基础医学课题提供了较为理想的实验手段。其体外培

养主要受脐带离体时间、消化酶、培养液、血清、血管内皮细胞生长因子(ECGF)、传代、二氧化碳浓度等影响。

参 考 文 献

- [1] Jaffe, EA. et al., 1973, *J Clin Invest.*, 52: 2745.
- [2] 盛国立等, 1993, 血管内皮细胞与疾病, P 170—209, 上海医科大学出版社.
- [3] 王建明等, 1995, 第三军医大学学报, 17(1): 86.
- [4] 程满根等, 1990, 苏州医学院学报, 10(3): 224.
- [5] 魏少敏等, 1987, 中国病理生理杂志, 3(3): 188—191.
- [6] Gajdusek, C. et al., 1980, *J Cell Biol.*, 85: 467.
- [7] Ferrara, N. et al., 1989, *Biochem Biophys Res Commun.*, 161: 851.
- [8] Ferrara, N. et al., 1993, *J Clin Invest.*, 91: 160.
- [9] 何红兵等, 1990, 第一军医大学学报, 10(4): 321.
- [10] 何红兵等, 1992, 生物化学与生物物理进展, 19(6): 467.
- [11] 何红兵等, 1994, 全国血管外科学术交流会议论文集, 上海.
- [12] 何红兵等, 1995, 第一军医大学学报, 15(3): 198.
- [13] 何红兵等, 1992, 中国病理生理杂志, 8(5): 447.
- [14] Schaeffer, W. I. et al., 1991, *J Bacteriol.*, 173: 1382—1387.
- [15] Roulland-Dussoix, D. et al., 1994, *J Microbiol Methods.*, 19(2): 127—134.
- [16] Van Kuppeveld, F. J. et al., 1994, *Appl Environ Microbiol.*, 60(1): 149—152.
- [17] Van Kuppeveld, F. J. et al., 1992, *Appl Environ Microbiol.*, 58(8): 2606—2615.
- [18] Deng, S. et al., 1992, *PCR Methods Appl.*, 1(3): 202—204.
- [19] IRPOM/IOM Meeting Report. 1992.
- [20] Uphoff, C. C. et al., 1992, *J Immunol Methods.*, 149: 43—53.
- [21] Gignac, S. M. et al., 1992, *Leuk Res.*, 16(8): 815—822.
- [22] Uphoff, C. C. et al., 1992, *J Immunol Methods.*, 149: 55—62.
- [23] Coronator S. et al., 1994, *J Virol Methods.*, 46(1): 85—94.

- [24] Thronton, S. C. et al., 1983, *Science*, 222: 623.
- [25] Rosenbaum, J. et al., 1986, *Cell Biol Int Rep.*, 10: 437.
- [26] Pauline, H. S. U. et al., 1993, *Am J Physiol.*, 264: 1485-1492.
- [27] Gerritsen, M. E. 1987, *Biochemical Pharmacology.*, 3(17): 2701.

核糖体失活蛋白的结构功能与分布

李向东 刘望夷

(中国科学院上海生物化学研究所 200031)

植物核糖体失活蛋白 (Ribosome-Inactivating Protein, RIP) 是一种 RNA N-糖苷酶, 可作用于核糖体大亚基上最大的 RNA, 在其特定位点脱去一个腺嘌呤碱基, 使核糖体丧失蛋白质合成的功能^[1]。

现在已经纯化的 RIP 按一级结构的不同可分为两种类型: 单链 RIP 和双链 RIP, 分别称为 I 型和 II 型。I 型 RIP 由一条肽链组成, 在植物界比较广泛的存在, 目前已从 30 多种植物中鉴定、纯化出 I 型 RIP, 如天花粉蛋白 (trichosanthin), 美洲商陆抗病毒蛋白 (poke-week antiviral protein) 等。II 型 RIP 由两条肽链组成, 分别称为 A 链和 B 链, 两条链通过一个二硫键相连接。蓖麻毒蛋白 (ricin) 和相思子毒蛋白 (abrin) 是最早发现的 II 型 RIP。

I 型 RIP 分子量在 30 kDa 左右一般为强碱性蛋白质, pI 在 8—10, 少数在 10 以上, 多数为糖蛋白。少数不含糖, 如天花粉蛋白。单链 RIP 对无细胞体系的蛋白质合成有强烈抑制作用, ID₅₀ 大都在 1 nM 以下, 对完整细胞的毒性却很低, 其 ID₅₀ 常高达数千 nM。II 型 RIP 分子量一般为 60—65 kDa, pI 在 6—8 之间。A、B 链拆开, A 链变得不稳定。较小的 A 链是催化活性链, 和 I 型 RIP 一样具有 RNA N-糖苷酶活性, 专一水解大鼠 28 S rRNA 的 A 4324 位的 N-C 糖苷键, 使核糖体丧失蛋白质合成功能。A 链含糖量较 B 链少, 有

的甚至不含糖。在大肠杆菌中表达的蓖麻毒蛋白 A 链没有糖基化仍具有催化活性, 说明糖基化对它的催化活性并非必需。B 链较大, 具有糖结合活性, 相当于凝集素, 可识别细胞表面糖肽或糖脂受体末端 D-半乳糖。完整双链 RIP 对无细胞体系蛋白质合成的抑制活性较低, ID₅₀ 大都为数 10 nmol/L, 但若将连接 A、B 链的二硫键还原打开后, 其活性会大大提高。双链 RIP 对完整细胞的毒性很高, ID₅₀ 大都低于 10⁻² nmol/L。II 型 RIP 对动物的毒性很大。B 链不仅具有细胞识别功能, 还能协同 A 链进入细胞, 定位于高尔基体。在无细胞体系中, 双链 RIP 的活性较低。B 链的存在妨碍了 A 链的活力发挥。研究结果表明链间二硫键的断裂是启动 A 链活性的关键。若将蓖麻毒蛋白的二硫桥以非还原性的 N-N' -o-邻苯二顺丁烯亚胺代替, 蓖麻毒蛋白虽可进入细胞但不能抑制蛋白质的合成。从结构和遗传上看, I 型和 II 型 RIP 有共同的祖先, II 型 RIP 可能是由 I 型 RIP 进化来的。

RIP 在植物体内的生理功能一直没有弄清楚。对 RIP 研究的主要兴趣是由于它们具有重要的理论和应用价值。理论方面, RIP 是研究核糖体结构与功能的重要工具。应用方面, RIP 可以作为免疫毒素 (immunotoxin) 的弹头部分, 治疗人类的顽症如肿瘤等。一些 RIP 具有抗植物病毒或动物病毒的活性, 天花粉蛋白用