

## STUDY ON THE p 53 GENE IN HUMAN HEPATOMA CELL LINE QGY-7703 AND ITS EXPRESSION

WANG Hou Yi HUANG Qing Shan CHEN Cui Wei LUO Zu Yu et al.  
(Department of Physiology and Biophysics Fudan University Shanghai 200433)

### ABSTRACT

p 53 gene in human hepatoma cell line QGY-7703 was studied with following methods: 17 p alleles analysis, PCR-SSCP, RT-PCR/sequencing, Northern blot, immunohistochemistry, Western blot and immunoprecipitation. There may exist allelic loss in the vicinity of p 53 gene on chromosome 17 p. Whereas no any point mutations were found in the coding region of p 53 gene in the cell, Northern blot and immunoprecipitation experiments showed its expression is quite low, which may be relative with the malignancy of the cell.

**Key words:** Tumor suppressor gene p 53 PCR/SSCP RT-PCR/sequencing Northern blot Immunoprecipitation

## 肾小球系膜细胞株的建立及其生长的因素\*

刘静芳 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生化室 石家庄 050017)

肾小球系膜细胞(MC)属于特化的可收缩的平滑肌细胞类,能合成并分泌多种参与肾小球结构与功能调节的蛋白因子<sup>[1]</sup>。已经证明,多种类型的肾小球疾病均与MC异常增殖有关<sup>[2]</sup>。因此确定影响MC增殖的因素及其作用机制有助于阐明多种肾小球疾病的发病机理,并为该疾病的防治提供理论依据。

MC的体外培养是研究其增殖调控的首要步骤。虽然有关MC的培养方法国内外均已报道<sup>[3-5]</sup>,但不同实验室所采用的培养条件差别较大,且均未详尽描述培养过程。本文探讨

了体外培养MC的适宜条件,在成功建立MC株后,观察了多种肽类因子对其增殖的影响,并首次报道胰岛素对多种肽类因子的促MC增殖效应具有协同作用。

### 材料和方法

#### 一、材料

胰岛素系Sigma公司产品,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和肿瘤坏死因子(TNF $\alpha$ )购于北京邦定生物工程公司,RPMI 1640系GIBCO公司产品。<sup>3</sup>H-

\* 河北省自然科学基金资助项目

本刊1998年定价不变,全年4期共计人民币拾捌元整。请就近向当地邮局办理订阅(邮发代号4—296)。

TdR 为中国原子能研究院产品, 其它试剂为国产分析纯。

## 二、MC 的分离与培养

1. 肾小球的分离 无菌条件下分离 SD 大鼠肾皮质, 剪碎后于 100 目不锈钢网筛上用橡皮塞轻轻碾压, 并不时用 PBS 冲洗。被滤过的肾小球及破碎细胞再经 150 目网筛过滤后, 用 250 目网筛收集肾小球。所得肾小球纯度可达 98% 左右。

2. MC 的培养 采用两种不同的方法培养 MC<sup>[3]</sup>。

(1) 种植完整的肾小球: 用含 20% 小牛血清 (FCS)、15 mmol/L Hepes 和 2 mmol/L Gln 的 RPMI 1640 培养液将肾小球悬浮于培养瓶中, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养, 6 天后首次换液, 以后每 2—3 天换液一次, 以除去脱落死亡的肾小球表皮细胞 (GEC)。4 周左右 MC 接近铺满后, 按常规方法传代<sup>[6]</sup>, 消化液为 0.25% 胰蛋白酶—0.02% EDTA 液。

(2) 种植肾小球残体: 用 IV 型胶原酶 (300 U/ml) 消化肾小球 (37℃, 20—30 min), 离心得肾小球残体后, 按上述方法进行培养。2 周左右 MC 接近铺满后即可传代培养。

## 三、MC 的鉴定<sup>[3-5]</sup>

1. 免疫组化方法鉴定 将二分之一盖玻片置入培养瓶中, 接种 MC。待 MC 铺满, 取出盖玻片, 用 PBS 洗涤后以甲醇固定 5 分钟, PBS 冲洗 3 次。用抗 Thy-1 抗体进行免疫组化染色。

2. 透射电镜检查 用 2.5% 多聚甲醛固定离心收集的 MC 团块, 制成透射电镜标本, 观察 MC 内的微丝结构。

## 四、<sup>3</sup>H-TdR 参入实验

将 2—5 代 MC 接种于 96 孔板内, 待其铺满 80% 瓶底后, 换成含 0.5% FCS 的培养液饥饿培养 24 小时, 然后, 换为含 5% FCS 的培养液, 同时分别加入不同浓度的胰岛素、bFGF、内皮素-1 (ET-1) 和 TNF $\alpha$ , 对照组加等体积 PBS, 继续培养 24 小时收集细胞。于收集细胞前 6 小时加 <sup>3</sup>H-TdR, 每孔加入量为 0.2  $\mu$ Ci/100  $\mu$ l 培养液。按传代方法收集细胞, 用 LKB-1211 液闪仪测定 <sup>3</sup>H-TdR 参入值 (cpm 值), 每组实验重复 5 次, 取平均值。与对照组比较, 实验组 cpm 值所增加的百分率按下列公式计算:

cpm 值增加百分率 (%) =

$$\frac{\text{实验组 cpm 值} - \text{对照组 cpm 值}}{\text{对照组 cpm 值}} \times 100\%$$

将胰岛素 (0.6 U/ml) 和 bFGF (5—200 ng/ml)、ET-1 (10<sup>-9</sup>—10<sup>-6</sup> mol/L) 或 TNF $\alpha$  (30—1000 U/ml) 同时加入 MC 培养液, 按上述方法观察胰岛素对肽类因子促 MC 增殖的影响。

## 五、统计学分析

用 SAS (SAS Institute Inc, 1989) 中的一般线性模型 (GLM) 方法对所得各项数据进行统计学分析。

# 结 果

## 一、MC 的培养与鉴定

1. 种植完整的肾小球 一般在种植后 2—3 天自肾小球周围长出多边形或卵圆形的 GEC, 6—8 天铺满瓶底 (图版图 1), 10 天左右死亡脱落, 之后, 不规则星形或纺锤形的 MC 开始生长, 4 周左右铺满瓶底 (图版图 3)。

2. 种植肾小球残体 一般于种植后 3—5 天, MC 自肾小球残体周围长出 (图版图 2), 15—20 天铺满瓶底 (图版图 3)。

MC 铺满后进行传代。第一次传代后常有少量肾小球相伴随, 但基本上可去除 GEC。用上述两种方法培养的 MC 均已传到 35 代。

本文培养的 MC 在相差显微镜下呈不规则星形、三角形或长纺锤形, 胞质向外伸出长短不等的突起, 胞核明显 (图版图 2 和 3), 透射电镜检查可见细胞内有微丝结构 (图版图 4), 抗 Thy-1 抗体染色阳性 (图版图 5), 说明该细胞为 MC。

## 二、肽类因子对 MC 增殖的影响

如表 1 所示, bFGF、胰岛素、ET-1 和 TNF $\alpha$  均显著提高 MC 的 cpm 值 (P < 0.01), 说明四者均能显著促进 MC 增殖。其作用强度与剂量有关: 胰岛素、ET-1 和 TNF $\alpha$  的最有效剂量分别为: 1.2 U/ml, 10<sup>-8</sup> mol/L 和 250 U/ml; 在所测定的浓度范围内 (5—200 ng/ml), bFGF 的促 MC 增殖作用与浓度呈正相关。与对照组比较, 胰岛素、ET-1、TNF $\alpha$  在其最有效剂量和 bFGF 浓度为 200 ng/ml 时, MC 的 [<sup>3</sup>H]-TdR 参入值增加的百分率是: bFGF 为

表 1 不同浓度肽类因子对 MC DNA 合成的影响

组别	[ <sup>3</sup> H]-TdR 参入量 (cpm)	组别	[ <sup>3</sup> H]-TdR 参入量 (cpm)
	5		16907.7 ± 984.2
bFGF (ng/ml)	10	胰岛素 (U/ml)	0.1
	20		0.3
	100		0.6
	200		1.2
	30		2.4
TNF $\alpha$ (U/ml)	60	10 <sup>-9</sup>	
	120	10 <sup>-8</sup>	
	250	10 <sup>-7</sup>	
	500	10 <sup>-6</sup>	
	1000	对照	

n = 5, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (与对照比较)。

166.8%，胰岛素为 61.5%，ET-1 为 35.2%，TNF $\alpha$  为 17.8%。由此可见，在四种肽类因子中，bFGF 作用最强，分别是胰岛素、ET-1 和 TNF $\alpha$  的 2.7 倍、4.7 倍和 9.4 倍 (见表 1)。

### 三、胰岛素对 bFGF、ET-1 和 TNF $\alpha$ 促 MC 增殖效应的协同作用

胰岛素 (0.6 U/ml)、bFGF (5—200 ng/ml) 或 TNF $\alpha$  (30—1000 U/ml) 单独作用于 MC 时，与对照比较，MC 的 cpm 值所增加的百分率是：胰岛素为 44.2%，不同浓度的 bFGF 分别为 9.5%，40.3%，151.7%，158.3% 和 166.8%，不同浓度的 TNF $\alpha$  分别为 -0.68%，2.8%，2.2%，17.8%，8.9% 和 -3.5%。胰岛素和不同浓度的 bFGF 或 TNF $\alpha$  共同作用于 MC 时，与对照组比较，MC 的 cpm 值所增加的百分率是：胰岛素与 5—200 ng/ml bFGF 分别为 105.5%，266.6%，287.8%，300.5% 和 303.5% (图 1)；胰岛素与 30—1000 U/ml TNF $\alpha$  分别为 45.7%，66.0%，83.6%，98.9%，59.7% 和 33.2% (图 2)，由此可见，胰岛素与 bFGF 或 TNF $\alpha$  同时作用于 MC 时，MC 的 cpm 值与对照组比较所增加的百分率大于两者单独作用之和。提示胰岛素与 bFGF 或 TNF $\alpha$  促 MC 增殖具有显著的正协同作用 (图 1, 图 2)。

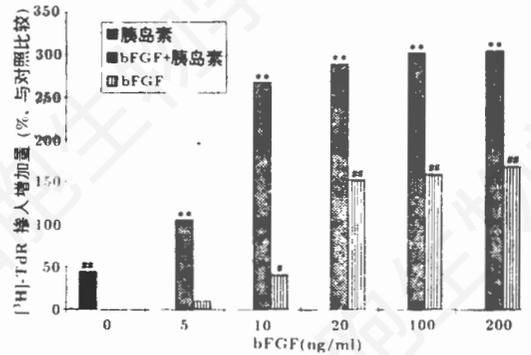
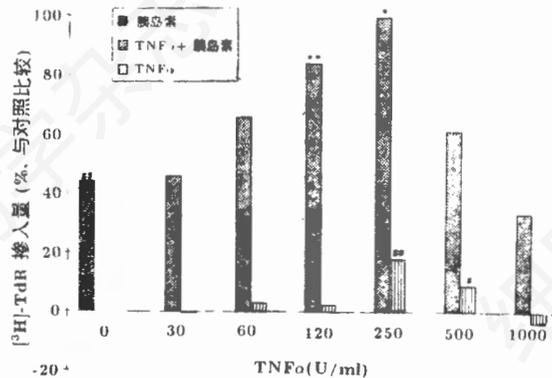


图 1 胰岛素与 bFGF 促 MC 增殖的协同效应

注：\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (与单因素作用之和比较)

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (与对照比较)

图 2 胰岛素与 TNF $\alpha$  促 MC 增殖的协同效应

注：\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (与单因素作用之和比较)

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (与对照比较)

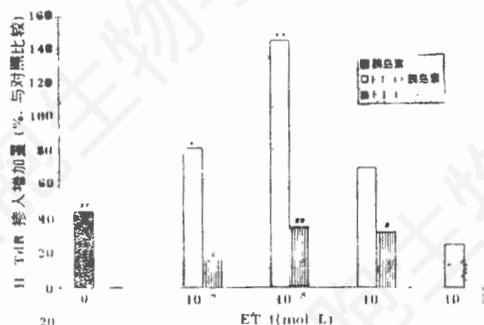


图3 胰岛素与ET-1促MC增殖的协同效应

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ (与单因素作用之和比较)

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ (与对照比较)

胰岛素对ET-1促MC增殖的影响具有两种不同的作用。当胰岛素(0.6 U/ml)和不同浓度的ET-1( $10^{-8}$ — $10^{-6}$  mol/L)单独作用于MC时, MC的cpm值与对照比较所增加的百分率是:胰岛素为44.2%,不同浓度的ET-1分别为16.1%, 35.2%, 32.2%和-10.2%。当胰岛素与不同浓度的ET-1共同作用于MC时,其cpm值较对照增加的百分率分别是81.3%, 144.6%, 69.6%和25%(图3)。由此可见,胰岛素与低浓度ET-1( $\leq 10^{-8}$  mol/L)共同作用于MC时,其促增殖效应大于两者单独作用之和( $P < 0.01$ ),呈现正协同作用;与高浓度ET-1( $\geq 10^{-7}$  mol/L)共同作用于MC时,其促增殖效应小于两者单独作用之和,表现为负协同作用,但无显著差异( $P > 0.05$ )。

比较胰岛素和bFGF、ET-1或TNF $\alpha$ 促MC增殖的协同效应,可见胰岛素和bFGF的协同作用最强。

## 讨 论

肾小球细胞是一个复杂的细胞群,包括MC, GEC, 肾小球内皮细胞(EC)和肾小球壁层表皮细胞。因此,从肾小球中分离与培养MC的条件不好掌握,难度较大。本实验室经一年多时间的摸索,对MC的分离与培养积累了一定的经验,我们体会培养MC成功与否,

关键在于两点:第一,原代及第3—5代是MC培养的关键时期,要顺利通过这一时期,首先在原代培养时要尽可能提高肾小球的贴壁率,使肾小球细胞易于向外生长:(1)分离肾小球时操作要轻。在100目网筛上碾压肾皮质碎块时,要不时用PBS冲洗,以防网眼堵塞;(2)用胶原酶消化肾小球要适度,以肾小球结构松动,不破碎为宜;(3)用250目网收集肾小球时,要用大量PBS冲洗,尽量去除散在细胞和组织碎渣;(4)接种肾小球后前5天勿摇动培养瓶,更不要换液,以免影响肾小球贴壁。第3—5代MC生长很慢,传代时接种密度宜大一些。第二,正确掌握传代手法对MC培养尤为重要。MC体积大,而且贴壁紧密。因此,适度的消化和吹打是其传代的关键,过分的吹打会造成MC严重损伤。预提高消化效果,可在消化前用PBS洗MC数次,并用含EDTA的胰蛋白酶液作为消化液以充分分散细胞。

研究表明,MC在维持肾小球正常的结构和功能方面起着重要作用。它能合成并分泌多种参与肾小球结构与功能调节的蛋白因子。这些因子可以自分泌或旁分泌方式作用于MC,引起其收缩,增殖和合成系膜基质增加<sup>[1]</sup>。MC增殖是多种进行性肾小球疾病的共同病理改变基础<sup>[2]</sup>。因此,研究影响MC增殖的因素及其作用将有助于阐明该类型疾病的发病机理,并为其治疗提供理论依据。已经证明,胰岛素、ET-1和TNF $\alpha$ 均显著促进MC增殖,并参与肾小球疾病的发生和发展<sup>[7-9]</sup>。本文<sup>3</sup>H-TdR参入实验结果显示,这三种肽类因子均能显著提高MC的cpm值,是MC的促分裂原,与前人的研究结果一致。近年发现,bFGF是成纤维细胞的强效促分裂原<sup>[10]</sup>。MC属于成纤维细胞类,bFGF对MC的影响及其与其它生长因子的关系方面的研究报道尚少。本文观察了bFGF对MC增殖的影响,并对四种多肽因子的作用强弱进行了比较。发现bFGF促MC增殖作用最强,分别是胰岛素、ET-1和TNF $\alpha$ 的2.7倍,4.6倍和9.4倍,说明bFGF是MC

的强效促分裂原。提示 bFGF 在进行性肾小球疾病的发生发展过程中,可能扮演着重要角色,拮抗 bFGF 的作用可能是治疗该类疾病的有效途径之一。

目前,国内外有些实验室为解决 MC 体外培养生长缓慢,培养较为困难这一问题,常采用下述两种方法:第一,在培养液中加入 0.6—1.0 U/ml 胰岛素。本文结果表明胰岛素在促 MC 增殖方面与多种肽类因子具有协同作用,提示在研究 MC 功能,特别是研究其增殖调控机理时,应使用不含胰岛素的培养液。MC 生长缓慢可通过提高培养液中 FCS 浓度和增加接种 MC 密度的办法加以解决;第二,用细胞克隆法培养 MC 时,常选用条件培养液,即处于对数生长期的 3T3 成纤维细胞培养液。这就给 MC 培养工作带来很多麻烦。本文结果表明 bFGF 是 MC 的强效促分裂原,胰岛素也具有显著促 MC 增殖作用,两者对 MC 生长又具有很强的正协同作用 ( $P < 0.01$ )。因此,我们认为若用细胞克隆法培养 MC, bFGF 和胰岛素联合使用可代替条件培养液。

总之,虽然体外培养 MC 的方法已日趋成熟,但随着对其功能调节机制研究的不断深入,其培养方法,特别是培养条件有待进一步改进,以便真正阐明所研究因素对 MC 功能的影响。

### 摘 要

利用肾小球细胞外生长能力的差异,从

SD 大鼠肾小球中成功分离肾小球系膜细胞 (MC) 后,探索了培养 MC 的适宜条件;观察了胰岛素、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、内皮素 (ET-1) 和肿瘤坏死因子 ( $TNF\alpha$ ) 对 MC 增殖的影响。结果表明,四种因子均可显著促进 MC 增殖 ( $P < 0.01$ ), 其中 bFGF 作用最强。当胰岛素和 bFGF、 $TNF\alpha$  或低浓度 ET-1 ( $\leq 10^{-8}$  mol/L) 共同作用于 MC 时,其促 MC 增殖显示正协同作用 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 与高浓度 ET-1 ( $\geq 10^{-7}$  mol/L) 共同作用于 MC 时,呈负协同作用 ( $P > 0.05$ )。

关键词: 肾小球 MC 细胞培养 细胞增殖

### 参 考 文 献

- [1] 江黎明等, 1995, 《国外医学》泌尿系统分册, 15: 130—133.
- [2] Floege J, et al., 1992, *Kidney Int.*, 43: 369—374.
- [3] Kreisberg J. I., et al., 1983, *Kidney Int.*, 23: 439—447.
- [4] Harper P. A., 1984, *Kidney Int.*, 26: 875—880.
- [5] 于力方等, 1990, 中华肾病杂志, 62: 70—74.
- [6] 鄂征, 1995, 组织培养和分子细胞学技术, 北京出版社, p. 96.
- [7] Conti F. G., et al., 1988, *Endocrinology*, 122: 2788—2795.
- [8] Marsen T. A., et al., 1994, *Kidney Int.*, 45: 336—344.
- [9] Baud L. et al., 1992, *Kidney Int.*, 41: 600—603.
- [11] 郭庆、温进坤, 1997, 生命科学, 9: 15.

## ESTABLISHMENT OF GLOMERULAR MESANGIAL CELL LINES AND EFFECT FACTORS ON ITS GROWTH

LIU Jing Fang WEN Jin Kun

(Section of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

### ABSTRACT

According to the differential growth capacities of glomerular cells, glomerular mesangial cells (MCs) were successfully isolated from the glomeruli of rat. The optimum conditions for

the culture of MCs were investigated. The effects of insulin, bFGF, ET-1 and TNF $\alpha$  on the proliferation of the cultured MCs was determined. The results showed that insulin, bFGF, ET-1 and TNF $\alpha$  significantly stimulated the proliferation of MCs ( $P < 0.01$ ), of them, the effect of bFGF on the proliferation of MCs was the strongest; insulin exhibited synergetic stimulatory effect with bFGF, TNF $\alpha$  or lower concentration of ET-1 ( $\leq 10^{-8}$  mol/L) ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), synergetic inhibitory effect with higher concentration of ET-1 ( $\geq 10^{-7}$  mol/L) ( $P > 0.05$ ) on the proliferation of MCs.

**Key words:** Glomerulus MC Cell culture Cell proliferation

## 利用静电场提高 IVF 小鼠胚胎发育率的研究\*

何牧仁 高 飞 旭日干

(内蒙古大学实验动物中心 呼和浩特 010021)

自从 1951 年张明觉<sup>[1]</sup>教授和 Austin<sup>[2]</sup>发现了哺乳类精子获能现象以来,家畜体外受精(in vitro fertilization, IVF)技术的发展十分迅速,现已成为畜牧业生产中应用的高科技生物技术。目前在家畜 IVF 技术中,有关卵母细胞及 IVF 胚培养系统的研究工作得到了人们的普遍关注。在现行的培养条件下,家畜 IVF 卵囊胚发生率大多只能达 30%—40% 左右<sup>[8,11]</sup>,且这些胚胎在质量上与体内发育胚胎相比差异较大。为了缩小这种差异,人们除了改善各种培养基以外,还对培养系统温度<sup>[4]</sup>、气相<sup>[5]</sup>等物理因子进行了系统的研究,然而很少有人把电场对 IVF 过程的影响作为一个必要的物理因子来研究和应用。因为,动植物一直生长在地球这个巨大的静电场中,其漫长的发展史造就了它们对环境的适应以及利用环境因素促进自身发展的遗传特性。生物体也有一个复杂的电磁场,可以说,只要有生命运动,就伴随着生物电发生。Cross 证明小鼠未成熟卵母细胞在成熟过程中伴随膜电位变化<sup>[9]</sup>,这个电位差是细胞进行新陈代谢不可缺少的条件。新近的研究表明,电流控制生物体的极性,极性则控制着生物体生长和发育的方向。适当地控制或改变生物体的极性,就有可能影响和刺激有机体的生长发育。外加电场在一定程度上也

是通过影响和控制细胞的极性而影响生长发育的<sup>[7]</sup>,所以本研究将用小鼠 IVF 胚作为生物模型,探讨静电生物学效应,为今后静电场在牛、羊、猪等家畜 IVF 中的应用提供有价值的科学依据。

### 材 料 和 方 法

#### 1. 实验动物

本研究采用内蒙古大学实验动物中心饲养的昆明系小鼠,雌鼠为 8—10 周龄,雄鼠为 10—12 周龄,均为清洁级标准化实验动物(合格证书:京动字 8806 M 35)

#### 2. 精子的准备

将供精雄鼠处死后取出附睾,剪开附睾管,用无菌玻璃针挑取一滴精液,放入预先平衡于 CO<sub>2</sub> 培养箱中的、液体石蜡(sigma)覆盖的 0.3 ml 受精用培养液 TYH<sup>[6]</sup>中,将精子扩散后取出玻璃针,放入 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 湿度 84%—99% 条件下的 CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 1.5 h,以备受精时用。

#### 3. 卵子的准备

将供卵雌鼠皮下注射 PMSG(天津实验动物中心) 5 iu, 48 小时后腹腔注射 5 iu 的 HCG(宁波激素制品厂)进行促排处理, HCG 注射 12—16 h 后取出输卵管,放入覆盖受精用培养液滴的液体石蜡中,以小刀将输卵管膨大部切下,用解剖针将卵块引入 0.2 ml 受

\* 国家自然科学基金资助项目(59567001)。