

- [23] 邹竹荣等, 1997, 生物技术通报, 3: 16-20.
- [24] BedBrook, J. R. 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73: 4309-4319.
- [25] Cheung, A. Y. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 391-395.
- [26] Takabashi Y. et al., 1991, *EMBO J.*, 10 (8): 2033-2040.
- [27] Svab Z. et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8526-8530.
- [28] Guang-ning Ye et al., 1990, *Plant Molecular Biology*, 15: 809-819.
- [29] Daniell, H. et al., 1991, *Plant Cell Reports*, 9: 615-619.
- [30] Timothy Golds, 1993, *Bio/technology*, 11: 95-97.
- [31] Carrer, H. et al., 1995, *Bio/technology*, 13 (8): 791-794.
- [32] Seki, M et al., 1995, *J. Plant, Res.*, 108: 235-240.
- [33] McBride, K. E. et al., 1995, *Bio/technology*, 13(4): 362-365.
- [34] Guda, C., 1996, *Plant Physiol.* 111(2), Suppl. -56.
- [35] Wilfrid, D. et al., 1997, *Nature*, 386: 29-30.
- [36] 沈桂芳等, 1996, 全英中国学人生命科学学会第五届年会报告集, 82-84.
- [37] 任延国等, 1995, 农业生物技术学报, 3(4): 78-83.
- [38] 任延国等, 1996, 农业生物技术学报, 4(1): 23-27.
- [39] 任延国等, 1997, 农业生物技术学报, 5(1): 47-53.
- [40] 范国昌等, 1998, 遗传, 20(1): 42-44.

研究工作

电离辐射对伤口巨噬细胞生长因子基因表达的影响及苯妥因钠的作用

宋述强

(广州军区广州总医院临床药理科 广州 510010)

程天民 林远

(第三军医大学全军复合伤研究所 重庆 630038)

巨噬细胞(Macrophages, $M\Phi$)在创伤愈合过程中起重要的调节作用, 耗竭伤口 $M\Phi$, 创伤愈合过程受到明显阻碍, 而增强 $M\Phi$ 功能能明显促进创伤愈合^[1,2]。我们先前的研究表明, 在机体受到全身辐射后, 伤口 $M\Phi$ 数量和功能的下降是造成愈合延迟的重要原因之一; 而苯妥因钠能提高伤口 $M\Phi$ 数量和功能, 促进伤口愈合^[2]。本实验以大鼠背部置入聚乙烯醇海绵的切口伤为模型, 进一步研究全身和局部辐射后伤口 $M\Phi$ 血小板源性生长因子-B(PDGF-B)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) mRNA 表达的变化以及苯妥因钠的作用。

材料与方 法

1. 动物

Wistar 大鼠, 雄性, 218±23.5g, 四川省中药研究所提供。

2. 试剂

DMEM 培养基: Gibco 公司; 苯妥因钠(Phenytoin Sodium PS); 江苏省盐城制药厂; DNA-地高辛标记试剂盒及显色系统: 宝灵曼(Boehringer Mannheim)公司。

3. 创伤模型^[3]

大鼠分三大组, 即单纯创伤组, 全身辐射合并创伤组, 局部辐射合并创伤组, 每组又分生理盐水对照组和苯妥因钠用药组。全身辐射合并创伤组大鼠装在一特制的笼子里, 在离⁶⁰Co源1.0米处接受 γ 射线6Gy的照射(剂量率61.64cGy, 照射时间9分50秒), 局部辐射合并创伤组大鼠预先麻醉后固定在一特制的铅盒子里, 背部皮肤从铅盒中间裂缝拉出固定, 形成2×8cm²的皮肤皱折, 在离⁶⁰Co源1.0米处接受 γ 射线20Gy的照射(剂量率136.5cGy, 照射时间14分48秒), 这样背部皮肤形成4×8cm²的局部辐射区域。正常大鼠和辐射后(不超过4h)的大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉, 在无菌条件下背部切开长约7cm的全皮层

切口,将10个直径1.0 cm,厚0.4 cm的聚乙烯醇(Polyvinylalcohol PVA)海绵置入切口皮下后缝合。PVA海绵置入前经流水漂洗过夜,而后煮沸30 min消毒,置入时先浸入无菌的生理盐水(对照)或10 mg/ml的PS(1.0 ml/10个海绵)。

4. 伤口MΦ的收集

于致伤后3天,取出PVA海绵,离心和洗涤两次,加入每孔放有盖玻片的培养皿培养2-3h,除去非贴壁细胞,MΦ便贴壁于盖玻片上。台盼蓝查细胞活力>95%,经瑞氏染色检查MΦ纯度>90%。

5. 探针的制备和标记

将含PDGF-B cDNA的PUC9质粒(美国Collins T博士赠)转入大肠杆菌JM 109中,按常规方法进行质粒扩增、提取及探针酶切(Pst I酶)回收,所得PDGF-B cDNA长约0.8 Kb。TGF-β₁ cDNA探针(约0.3 Kb)由重庆西南医院肝胆外科李勇博士惠赠。将PDGF-B cDNA和TGF-β₁ cDNA探针按地高辛探针标记试剂盒说明书进行标记。

6. 原位杂交^[4]

取出有MΦ贴壁的盖玻片,清洗固定后按文献上的方法进行原位杂交,并同时设三组阴性对照,即杂交时不加探针、杂交前RNase消化、杂交前先用未标记的探针杂交后再用标记探针杂交的对照,以及一组阳性对照,即杂交对象为伴刀豆凝集素A(ConA)刺激的大鼠腹腔MΦ,以提高杂交信号的特异性^[9]。杂交后用地高辛显色系统进行显色,阳性细胞内含蓝紫色颗粒,于光镜200倍下任选10个视野对阳性细胞定量计数,取其平均值为一个样本量。

结 果

1. 辐射对伤口MΦ TGF-β₁、PDGF-B mRNA表达的影响

在原位杂交实验中,三组阴性对照实验均无阳性反应,而在ConA刺激的大鼠腹腔MΦ阳性对照中,有明显的阳性细胞^[9]。动物实验组中,与单纯创伤组比较,全身辐射合并创伤组伤口MΦ TGF-β₁、PDGF-B mRNA表达阳性细胞百分率明显降低,但局部辐射合并创伤组无明显变化(表1,照片1-4)。

2. 苯妥因钠对伤口MΦ TGF-β₁、PDGF-B mRNA表达的影响

局部应用苯妥因钠后,单纯创伤组,全身辐

射合并创伤组,局部辐射合并创伤组中MΦ TGF-β₁、PDGF-B mRNA表达的阳性细胞百分率都有明显升高(表1)。

讨 论

在创伤愈合过程中,伤口MΦ可表达上皮生长因子、TGF-α、TGF-β、PDGF多种生长因子基因,这些生长因子的表达和分泌,明显促进

表1 电离辐射对伤口MΦ TGF-β₁ mRNA和PDGF-B mRNA表达的影响及苯妥因钠的作用(阳性细胞数/100个细胞)

分 组	TGF-β ₁	PDGF-B
单纯创伤组(SW)		
不加苯妥因钠	26±7	32±6
加苯妥因钠	43±12*	54±8*
全身辐射合并创伤组(TRW)		
不加苯妥因钠	10±5*	13±4*
加苯妥因钠	24±8*	28±6*
局部辐射合并创伤组(LRW)		
不加苯妥因钠	28±4	30±4
加苯妥因钠	40±9*	48±9*

注:各组n=6;全身辐射合并创伤组和局部辐射合并创伤组中的不加苯妥因钠组与单纯创伤组中的不加苯妥因钠组比较,*P<0.01;各组中加苯妥因钠组与不加苯妥因钠组比较,*P<0.01。

创伤愈合^[5]。大鼠受到6Gy全身辐射后,由于造血功能严重障碍,加上全身辐射后的恶病质、负氮平衡,致使机体细胞转录水平下降,因此伤口MΦ PDGF-B和TGF-β₁的mRNA表达明显减少,继而PDGF-B和TGF-β₁的合成和分泌减少,对创伤愈合的刺激作用减轻,这可能是伤口MΦ功能降低,伤口愈合延迟的原因之一。局部辐射也明显延迟伤口愈合,但主要是皮肤的成纤维细胞和上皮细胞受到直接损害的缘故^[6],我们的实验模型是先辐射后创伤,伤口MΦ主要是在组织受伤后从血管内迁移而来,因此,20Gy局部辐射后对伤口MΦ PDGF-B和TGF-β₁的mRNA表达无明显影响。

苯妥因钠能缩短创面愈合时间、促进肉芽组织生长、降低创面细菌污染,对多种病因如战

伤、烧伤以及麻风病引起的皮肤溃疡都有显著的疗效^[7],但是体外实验发现,苯妥因钠对皮肤上皮细胞和成纤维细胞并无直接作用^[8]。我们的实验表明,苯妥因钠对正常伤口、全身辐射伤口和局部辐射伤口的 M Φ PDGF-B 和 TGF- β_1 的 mRNA 表达有明显的提高。Dill 等的体外实验也表明,苯妥因钠可直接刺激 M Φ PDGF-B 的释放及其 mRNA 的表达^[9]。苯妥因钠刺激伤口 M Φ PDGF-B mRNA 和 TGF- β_1 mRNA 表达的增加,必然会使分泌到伤口周围的 PDGF-B 和 TGF- β_1 两个生长因子的蛋白水平增加,而 PDGF-B 和 TGF- β 是促进伤口愈合的两个主要的生长因子,它们对上皮细胞、成纤维细胞和内皮细胞的生物学活性都有广泛的调节作用,在动物实验中和临床前期试验中都已证实有很好的促进创伤愈合效果^[10]。因此,苯妥因钠促进创伤愈合的作用可能与其对加强 M Φ 生长因子的表达有关。

摘 要

研究了电离辐射全身和局部照射对伤口巨噬细胞(M Φ)生长因子基因表达的影响及苯妥因钠的作用。伤口 M Φ 从置入大鼠背部的聚乙烯醇海绵中收集,用原位杂交技术测定血小板源性生长因子-B(PDGF-B)和转化生长因子- β (TGF- β_1) mRNA 在 M Φ 表达的阳性细胞率。结果表明,6Gy 全身辐射后伤口 M Φ PDGF-B 和 TGF- β_1 mRNA 阳性表达率明显下降,20Gy

局部辐射后无明显影响;苯妥因钠对正常伤口、全身辐射和局部辐射后的伤口 M Φ PDGF-B 和 TGF- β_1 mRNA 表达的阳性率都有明显的提高。这说明伤口 M Φ 生长因子基因表达的降低与全身辐射后创伤愈合延迟有关;苯妥因钠明显增加伤口 M Φ 生长因子基因表达而有利于创伤愈合。

关键词: 辐射 巨噬细胞 生长因子 基因表达
苯妥因钠

参 考 文 献

- [1] Cromack DT, et al., 1990, *J. Trauma*, 30:S129-133.
- [2] 宋述强,等 1997, 中华医学杂志, 77:54-57.
- [3] Mateo RB, et al., 1994, *Am. J. Physiol.*, 266:R1840-1844.
- [4] 蔡文琴,王伯云主编,1994,实用免疫细胞化学与核酸与分子杂交技术. p. 415-481,四川科技出版社.
- [5] Rappolee DA, et al., 1988, *Science*, 241:708-712.
- [6] Tokarek B, et al., 1994, *Clin. Dermatol.*, 12:57-70.
- [7] Smith B, et al., 1988, *Int. J. Dermatol.*, 27:528-530.
- [8] Vijayasingham SM, et al., 1991, *Br. J. Dermatol.*, 125:136-139.
- [9] Dill RE, et al., 1993, *J. Periodontol.*, 64:169-173.
- [10] Pierce GF, et al., 1995, *Ann. Rev. Med.*, 46:467-481.

THE EFFECT OF RADIATION ON GENE EXPRESSION OF GROWTH FACTOR IN WOUND MACROPHAGES AND THE ROLE OF PHENYTOIN SODIUM

SONG Shu Qiang CHENG Tian Min LIN Yuan

(Department of Clinical Pharmacology,

Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010)

Abstract

The effect of systemic and local radiation on gene expression of growth factors in wound macrophages (M Φ) and

the role of phenytoin sodium (PS) were studied. Wound M Φ were collected by polyvinyl alcohol sponges which were implanted in a rat dorsum incision. The expressions of platelet-derived growth factor-B(PDGF-B) mRNA and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) mRNA in wound M Φ was determined by in situ hybridization. It were found that the percentages of positive M Φ expressed PDGF-B mRNA and TGF- β_1 mRNA were decreased after 6 Gy systemic irradiation, not after 20 Gy local irradiation, PS significantly increased the percentages of positive M Φ expressed PDGF-B mRNA and TGF- β_1 mRNA in both radiated wound and non-radiated wound. It suggested that the decrease of expressions of growth factors in wound M Φ play an important role in the impairment of wound healing by systemic irradiation and PS enhanced the expressions of growth factors in wound M Φ and helped improve wound healing.

Key words: Irradiation Macrophages Growth factor Gene expression Phenyton sodium

Bcl-2 反义硫代磷酸寡核苷酸对 HL60 细胞生长的影响

林艳娟 吕联煌

(福建医科大学附属协和医院 福建省血液病研究所 福州 350001)

目前发现 Bcl-2 癌基因的高表达,能抑制细胞的凋亡(Apoptosis),而凋亡障碍是某些肿瘤发生发展的原因之一。反义技术是基因治疗方法之一,其策略是将癌基因互补的反义核苷酸导入肿瘤细胞,使之与肿瘤细胞内 DNA 或 RNA 结合,阻断相应基因转录和表达^[1]。但天然的寡脱氧核苷酸(ODN),进入细胞困难,易被胞内核酸酶降解,若核苷之间的磷酸二酯键被硫代磷酸取代修饰后,则对核酸酶的敏感性远较原来为低^[1]。本文选用 Bcl-2 癌基因的反义硫代磷酸寡脱氧核苷酸(antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides, AS-PS-ODN, ASPO)作用于高表达 Bcl-2 癌基因的 HL60 细胞株,旨在了解作为药物的 ASPO 对 HL60 细胞生长的生物特性的影响。

材料和方法

1. 细胞及培养体系

HL60 细胞是急性早幼粒白血病细胞株(由福建省医学科学研究所提供)。复苏后用含 10% 胎牛血清(Gibco-BRL)的 RPMI 1640 培养液。细胞初始浓度为

1×10^5 /ml, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度的培养箱(日本),2 天传代一次。实验用的细胞均保持在 $0.1 - 0.5 \times 10^6$ /ml 密度,处于对数生长期。

2. PS-ODN 合成

反义 PS-ODN(ASPO)序列可读框:5'-CAGCGT-GCGCCATCCTTCCC-3' 为 Bcl-2 mRNA 可读框的头 13 个碱基及其前端的 7 个碱基,共 20nt^[2],并以 20nt 正义 PS-ODN(SPO)为反义序列特异性对照,序列为 5'-GGGAAGGATGGCGCAGCTG-3'。均由美国 ABI 公司 392 型 DNA/RNA 合成仪合成,用 OPC 柱纯化,紫外分光光度分析仪(DU640 型,BECKMAN)定量,分装冻干后保存于-40 $^{\circ}\text{C}$ 。

3. 细胞与 PS-ODN 共培养分组

PS-ODN 用不含血清的 1640 培养液溶解,HL60 细胞分为空白组(只含胎牛血清的 1640 培养基的细胞悬液),正义组、反义组。细胞终浓度为 1×10^5 /ml,AS-PO 终浓度分别为 $5\mu\text{mol/L}$ 、 $10\mu\text{mol/L}$ 、 $20\mu\text{mol/L}$,SPO 终浓度为 $20\mu\text{mol/L}$,种于 96 孔板(Costar),每孔 200 μl ,每次均同时做 3 个平行孔。正义、反义药物作用培养过程中不换液。分别于培养的 24h、48h、72h、96h 倒置显微镜下活体观察,并取细胞悬液 6 μl 用 2% 台盼蓝 6 μl 染色 3 分钟,在血球计数板上冲池、静置 5-10 分钟待细胞完全下沉后计数 4 大格的拒染细胞总数(R),再换算为每毫升活细胞数(换算公式:活细胞数