

- [3] Stein, CA. et al., 1993, *Science*, **261**:1004-1012.
 [4] Milligar, JF. et al., 1993, *J. Med. Chem.*, **36**:1923-1937.

- [5] Iversen, PL. et al., 1992, *Antisense Res. Devel.*, **2**:211-222.
 [6] Stein, CA., 1996, *Trends in Biotechnology*, **14**:147-149.

GROWTH OF HL-60 CELLS AFFECTED BY THE BCL-2 ANTISENSE PHOSPHOROTHIOATE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

LIN Yan Juan LU Lian Huang

(Fujian Institute of Hematology, Union Hospital Affiliated Fujian Medical University, Fuzhou 350001)

ABSTRACT

To observe the effect of the BCL-2 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ASPO) inhibition on HL60 cells growing, we investigated the cell viability determined by trypan blue exclusion and the colony forming activity (CFU-HL60) after incubation of HL60 cells with ASPO at different concentration (5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L) or with sense-PO(SPO) at 20 μ mol/L or with none of them. The result demonstrated that in the presence of ASPO, the inhibition of HL60 cells viability could occur in 24 hours and became more prominent as the concentration increasing ($P < 0.01$). That was not found in the presence of SPO. There was no significant differences among ASPO, SPO and the control after 72 hours. These findings indicated that BCL-2 ASPO could inhibit the HL60 cells proliferation and this effect was sequences-specific and concentration-dependent.

Key words: Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides BCL-2 oncogene HL60 cell line

细胞外基质对培养咽癌细胞增殖及 p53、PCNA 基因表达的影响

张桂茹 * 王小明 郭晓峰

(白求恩医科大学第一临床学院耳鼻喉科 * 预防医学院毒理教研室 长春 130021)

随着近年来细胞生物学研究工作的进步,人们对细胞外基质(extracellular matrix ECM)的功能有了新的认识。ECM 作为细胞的自然环境物质,在细胞的分化、增殖、发育、基因的表达、癌细胞的浸润、转移等多方面起着重要的调节作用^[1-3]。

I 型胶原蛋白(type I collagen)是 ECM 的主要成分,并且在体外能够重新聚合形成三维立体结构的 ECM 构造,将细胞在这种物质上进行体外培养,可使细胞处于近似于体内环境生长,能真实地反映细胞在体内具有的功能状态。

我们将两种咽癌细胞在 I 型胶原胶表面

进行培养,对细胞的增殖及 p53、PCNA 蛋白表达情况运用免疫荧光染色,激光扫描共焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope LSCM 410)以及 Western 印迹杂交定量方法进行了研究。

材料和方法

1. 细胞系

FaDu 下咽癌细胞系,是 S. R. S. Rangan 于 1968 年建立的,取自于人下咽鳞癌活检组织。购自美国。

Detroit 562 鼻咽癌细胞系。是由 W. D. Peterson 等于 1971 年建立的,取自成人鼻咽鳞癌胸腔转移

后胸水内的癌细胞。购自美国。

2. 细胞培养

(1) I 型胶原的制备 将由猪皮肤提取的 I 型胶原(日本和光制药公司),浓度为 30mg/ml 与 1×MEM 培养基按 1:1 充分混合,均匀铺于培养皿上,37℃ 聚合 30min。

(2) 培养条件 使用含 10% 小牛血清、500U/ml 青霉素、250μg/ml 两性霉素 B, pH 为 7.4 的 MEM 培养基,在 37℃, 5%CO₂, 湿润无菌条件下培养。

(3) 培养方式 将 FaDu 和 Detroit 562 细胞用培养基稀释,计数后接种于铺有 I 型胶原或聚苯乙烯 SLCM 显微镜观察用直径为 5cm 的培养皿上或普通同样大小的培养皿上。培养 24h、48h、72h、96h 时观察细胞增殖状况。

3. 双重标记的免疫荧光染色

取培养的细胞弃培养液, PBS 洗三次,用含 0.1% Triton X-100 的 4% 中性福尔马林溶液固定 15min, 0.5% BSA 温育 10min, 1:400 PCNA 或 1:200 p53 单克隆抗体(鼠抗人, Sigma 公司)室温下摇床上作用 1h, PBS 洗三次, 1:100 稀的 FITC 标记的羊抗兔 IgG, PBS 洗三次, TRITC 标记的伞毒素反应 30min, PBS 洗三次, 激光扫描共焦显微镜(LSCM 410 德国)观察。

4. Western 印迹杂交

用硫氰酸胍裂解液(Hepes 10mmol/L, KCl 10mmol/L, EDTA 1mmol/L, PMFS 0.5mmol/L, DTT 1mmol/L, Aprotinin 35μg/mL, Leupatin 0.5μg/ml, NP-400.02%)总蛋白提取后,紫外分光光度计测 595nm OD 值,计算蛋白含量,行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,各样品上样量均为 100μg,电转移法将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上,用 PCNA 或 p53 单克隆抗体检测蛋白表达量。

结 果

1. 细胞的增殖状态

我们将 FaDu 及 Detroit 562 细胞分别以 1.3×10^5 /ml 密度接种在聚苯乙烯、I 型胶原胶表面上,在培养的第 1—4 天,每 12 小时观察一次细胞的生长状态。我们发现同一细胞系在不同表面上其增殖速度不同,在 I 型胶原胶上细胞增殖快,在同一物质表面 FaDu 细胞

较 Detroit 562 细胞增殖速度快。另外,在不同物质表面上细胞的形态及生长方式也不同,在聚苯乙烯表面上细胞呈扁平样,形成单层结构(图版图 1);在 I 型胶原胶上细胞最初聚集成团,细胞间界限不清,当增殖较多时则形成复层类鳞状上皮样结构(图版图 2)。

2. 免疫荧光染色

FaDu 细胞培养 48 小时, Detroit 562 细胞培养 72 小时后,行双重标记的免疫荧光染色,激光扫描共焦显微镜(LSCM410)观察, PCNA、p53 蛋白均表达于细胞核,在不同物质上培养的细胞两种蛋白表达的多少不同,与在聚苯乙烯的物质上培养的细胞相比,在 I 型胶原胶上的细胞 PCNA 阳性细胞多(图版 3、4),形成复层结构的上下层细胞 p53 蛋白的表达情况不同,表层中 p53 阳性细胞多,而基底层中阳性细胞极少(图版图 5、6)。

3. Western 印迹

将上述相同密度、相同时间培养的细胞总蛋白提取,用 Western 印迹定量检测了 PCNA、p53 蛋白的表达量,如图所示, FaDu 及 Detroit 562 两个细胞系在 I 型胶原胶上,两种蛋白的表达量相似,与在聚苯乙烯上培养的细胞相比, PCNA 表达量增加, p53 表达量无明显变化(图 1)。

讨 论

1. ECM 对咽癌细胞增殖、分化的诱导

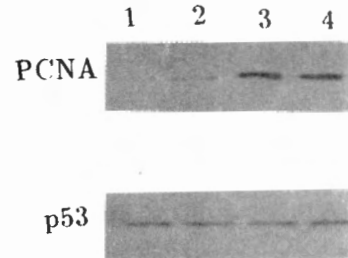


图 1 Western 印迹杂交结果

1、2: 培养在聚苯乙烯上的细胞 1:FaDu 2: Detroit 562
3、4: 培养在 I 型胶原上的细胞 3:FaDu 4: Detroit 562

FaDu 和 Detroit 562 是下咽部及鼻咽部鳞状上皮恶变而来的细胞,在机体内其生长、增殖最初是在基底膜上(原位癌),随后浸润至粘膜下组织中,并在结缔组织中形成癌巢。这就是说,在机体内这两种咽癌细胞是在与 ECM 分子的接触及相互作用下增殖的,为了观察两种咽癌细胞在近似体内的环境下增殖及功能状态,本实验将两个咽癌细胞在结缔组织中含量最多的 ECM 成分的 I 型胶原物质上进行了培养,结果发现,ECM 成分对两个咽癌细胞系均有促进其增殖的作用,且在 I 型胶原胶上细胞形成复层类鳞状上皮或网状结构,这与聚苯乙烯上培养的细胞形成单层结构不同,说明前一种培养条件下,细胞的生长方式更接近于体内。这也充分证明了 ECM 成分对咽癌细胞的分化起诱导作用。Brinkmann 1995 年^[4]也报告了类似现象,作者将 SW 1222 结肠癌细胞系在胶原胶中培养,在肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor HGF)的存在下,细胞形成类腺管样结构。Capaz 2 胰腺癌细胞系在胶原内培养后,细胞环形排列成类杯状结构(cup-like structures),且细胞顶端形成纤毛构造。Toda 等 1995 年^[5]证明 ECM 成分 IV 型胶原对甲状腺滤泡细胞的粘附、增殖起促进作用。Woodley 等^[6]证明 IV 型胶原促进皮肤角化细胞的增殖。这些报告和我们的研究结果均证明 ECM 成分作为细胞生存的自然环境物质对细胞的形态、增殖及分化起极为重要的调节作用。

2. ECM 对 PCNA、p53 基因表达的调节

我们的实验结果显示, I 型胶原及对两种咽癌细胞系的蛋白表达有明显影响。使 PCNA 蛋白表达量增加, p53 在表层细胞表达多而在基底层细胞表达少。PCNA 是细胞增殖活性的标志,它表达的增多,说明细胞增殖活跃,这与我们观察到的细胞在 ECM 成分上长满 5cm 培养皿所需时间明显较对照快这一结果相一致。培养的细胞形成复层结构,表层细胞和基底层细胞 p53 表达量不同,在机体内鳞状上皮 p53 表达的特点是基底层细胞表达多,表面角

化细胞表达少。培养细胞正在增殖的细胞位于表层,而基底层是相对静止的细胞。因此, p53 的表达也接近于体内鳞状上皮。Sakakura 等^[7]最近的研究证明 ECM 成分对甲状腺滤泡细胞的癌基因 c-fos 表达起调节作用,他们的实验结果表明, I 型胶原和层粘连蛋白均诱导 c-fos 的表达。

ECM 的详细作用机理目前尚在探索之中。现已明确 ECM 是通过与细胞膜上的受体-整联蛋白(integrin ITG)相结合,将环境信息向细胞内传递,从而调节细胞功能^[8]。ITG 能与 ECM 多种成分相结合,它由 α 、 β 亚基构成二聚体,贯通于细胞膜,每个亚基都由胞外段、胞内段构成,其胞内段于细胞骨架相连,胞外段与 ECM 分子相接触,ITG 有将信息双相传递的功能。

摘 要

为探讨细胞外基质(ECM)对咽癌细胞生物学行为的影响,将两种咽癌细胞在 ECM 成分 I 型胶原胶上进行细胞培养,通过免疫荧光染色及 Western blot 法对细胞增殖及 p53、PCNA 基因表达进行了研究。在 I 型胶原上培养的细胞增殖活跃,并形成鳞状上皮样结构。PCNA 表达量增加, p53 表达阳性细胞主要分布于表层细胞,而基底层细胞表达少。结果说明 ECM 成分对咽癌细胞增殖及基因表达有调节作用。

关键词:ECM 咽癌 细胞增殖 基因表达

参 考 文 献

- [1] Hynes, R. O. et al., 1992, *Cell*, 69:11-25.
- [2] Juliano, R. L. et al., 1993, *J. Cell Biol.*, 120:577-585.
- [3] Lin, C. Q. et al., 1993, *FASEB. J.*, 7:773-743.
- [4] Brinkmann, V. et al., 1995, *J. Cell Biol.*, 6:1573-1577.
- [5] Toda, S. et al., 1995, *Cell Structure and function.*, 20:345-350.

- [6] Woodley, D. T. et al., 1990, *J. Lmest Pharmacol.*, 94:139-143.
 [7] Sakakura, T. et al., 1991, *Int. Rev. Cytol.*

- 125:165-202.
 [8] Hanamura, Y. et al., 1994, *Ann. Otol. Rhinol Laryngol.*, 103:890-897.

PCNA, P53 GENE EXPRESSION IN CULTURED PHARYNX CANCER CELLS: MODULATION BY EXTRACELLULAR MATRIX

(Zhang Guiru Wang Xiaoming Guo Xiaofeng

1st Hospital of Norman Bethune Medical University, Changchun 130021)

ABSTRACT

We examined the cell growth and the expression of PCNA, p53 in pharynx cancer cell lines, FaDu and Detroit 562 cells cultured on polystyrene surface, or on type I collagen gel by immunofluorescent histochemistry, western blotting. In the presence of type I collagen gel used as a substratum, both cell lines showed rapid cell proliferation and formed multiple cell layers with fine cellular meshwork, mimicking in vivo structure. PCNA and p53 protein levels were reversely altered in the presence of type I collagen gel. PCNA level decreased, p53 protein was located to the basal layer cells. These results suggest that PCNA and p53 expression and localization were changed in the proliferating basal to the upper layers of these cell lines, and in the presence of extracellular matrix components.

Key words: ECM Pharynx cancer Cell proliferation Gene expression

氨对脑星状胶质细胞形态结构的影响

李夏青 韩德五 赵元昌

(山西医科大学病理生理教研室 太原 030001)

氨与肝性脑病的关系早已为人们所重视^[1,2]。据文献报道,在门腔分流性肝性脑病及暴发性肝衰时,脑氨浓度可达 2-5mmol/L^[3]。在高氨浓度影响下,神经细胞可以发生多种功能代谢紊乱。然而,氨在脑内的代谢是有区域性的。实际上,进入中枢的氨首先在脑星状胶质细胞内谷氨酰胺合成酶的作用下与谷氨酸结合形成谷氨酰胺而被解毒。星状胶质细胞是氨在脑内唯一的解毒场所^[4]。高氨状态下星状胶质细胞所出现的功能、代谢,乃至形态结构的变化应该是氨中毒的前提,出现也最早。但是,由于人们以往对氨中毒的研究主要侧重于对神经细胞的影响,而对高氨状态下胶质细胞的变化了解甚少。为此本实验拟通过体外培养观察氨对星状胶质细胞的影响。

材料与方 法

1. 星状胶质细胞培养:

参照 Kim 等人的方法,并略作改动^[5]。大致步骤如下:取 1-2 天龄 Wistar 乳鼠大脑(去除脑干)置冰冷的无菌 Hanks 液内洗涤 2-3 次,小心剥去表面脑膜及血管,剪碎成糊状,加入适量 0.25% 胰蛋白酶液,37℃ 消化 10 分钟。终止消化后加入适量 DMEM 液(内含 10% 新生牛血清、NaHCO₃ 1.3g/L、青霉素 100 单位/毫升、链霉素 100 微克/毫升、Hepes 15 mmol/L, pH7.3),75μm 不锈钢滤网过滤、离心(1000r/min × 3min)。沉淀用 DMEM 重新悬浮。台盼蓝染色 95% 以上的细胞为活细胞时,调整细胞浓度为 1×10⁶/ml,接种入已铺被胶原的 50mm 玻璃培养皿内,每个培养皿内放 2ml,置 5%CO₂温箱内,37℃ 培养 3 周。每隔 3 日