

- [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] Hanamure, 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

更换一次培养液。

星状胶质细胞的鉴定采用胶质纤维酸性蛋白(GFAP)免疫组化染色^[6]。当培养至第3周时,95%的细胞皆为GFAP染色阳性(图版图2)。

2. 实验过程

培养至第3周时向培养液内加入 NH_4Cl 造成高氨环境。氨的终浓度分别为2.5mmol/L、5mmol/L及10mmol/L,氨的作用时间分别定为24、48及72小时。在规定时间内弃去培养液终止氨的作用,用D-Hanks液洗涤2-3次后加入10%的中性福尔马林固定30分钟,然后进行染色(HE)观察。

结 果

未加 NH_4Cl 之前,胶质细胞贴壁生长良好,其胞浆丰富,核呈椭圆形,核仁清晰可见,细胞与细胞之间连接紧密,细胞周界不甚清晰(图版图1)。

当培养液内加入不同浓度的 NH_4Cl 造成高氨环境后,胶质细胞的形态变化在氨作用时间达24小时即可看出,主要表现为细胞体积肿大、胞浆内出现一些大小不等的空泡区域等(图版图3,4)。当氨的浓度达到10mmol/L时(24小时),细胞胞浆内空泡体积进一步增大,同时,细胞间出现宽大的间隙,细胞的星状或分支状突起显得十分明显,部分细胞胞浆除空泡增多外,还可见许多细小的嗜碱性颗粒。

当氨浓度为5mmol/L、作用时间延长至72小时,培养皿内的胶质细胞稀疏分布,细胞间空隙更为宽大,细胞浓缩,染色变深,形状或分支状突起粗大(图版图5);当氨浓度达到10mmol/L(72小时)时,大多数细胞不再能继续贴壁生长,漂浮于培养液表面;残留于培养皿上的细胞零散分布,细胞呈长梭形,胞浆内空泡减少甚至消失,整个胞浆呈浓缩状,部分细胞出现核浓缩,细胞间可见崩解的细胞碎片(图版图6)。

讨 论

如前所述,由于脑星状胶质细胞是氨在脑

内的唯一解毒部位,因此,当各种原因引起血氨升高,大量的氨在脑内蓄积时,有理由认为氨首先是在胶质细胞内大量集中进行解毒代谢。只有当胶质细胞解毒功能降低、脑内氨的清除障碍时,氨才可能对神经细胞造成影响。

在胶质细胞内,氨主要由谷氨酰胺合成酶催化、与谷氨酸结合形成谷氨酰胺而被解毒。氨的解毒过程是一个耗能过程,同时谷氨酸又是三羧酸循环中 α -酮戊二酸的前身物质。故大量的氨在胶质细胞内进行解毒时,可以导致细胞内能量消耗增多而产生减少,最终可使细胞内能量耗竭而影响整个细胞的功能及结构。

我们的实验结构表明,在培养液内加入 NH_4Cl 造成高氨环境时,胶质细胞本身在早期即可有一定的形态学变化:细胞内大量空泡形成(空泡变性),继而细胞内出现嗜碱性颗粒状物质;氨作用达到72小时(10mmol/L),在上述变化的基础上,细胞出现核浓缩及崩解坏死的迹象。胶质细胞在高氨环境下所表现出的形态特征提示,高氨可以造成胶质细胞不同程度的损伤,早期为可逆性损伤,而在氨的作用达到一定限度(10mmol/L,72小时以上)时,细胞则可发生不可逆性损伤。另外,在早期损伤发生的同时,胶质细胞本身可能也在进行着结构代偿,如细胞内出现大量的嗜碱性颗粒等。胶质细胞的这些结构变化无疑会对胶质细胞的功能代谢造成一定的影响

胶质细胞是中枢的间质细胞,代偿修复能力很强。因此,在一定程度损伤时,功能可能没有明显变化甚至由于代偿略有增强,但是,严重氨中毒情况下,胶质细胞发生不可逆性损伤时,其功能势必会降低或消失。

有文献报道,在门腔分流性脑病及实验性高氨血症时,可出现Alzheimer's I型细胞增生现象^[7]。这种增生是否为胶质细胞损伤基础之上继发的修复过度现象尚不清楚。我们在体外实验观察过程中尚未发现高氨环境下细胞的显著增生现象,是否与观察时间不够长有关还需进一步证实。

胶质细胞与神经细胞之间通过“谷氨酸—谷氨酰胺循环”保持着密切的功能相关关系^[6],而高氨状态下作为氨的代谢终产物——谷氨酰胺,其代谢在胶质细胞结构出现变化的同时也一定有改变。这些改变无疑会对神经细胞的功能代谢产生一定的影响,因此,值得我们对此进行更为深入的研究。

摘 要

本文就氨(氯化铵)对体外培养之星状胶质细胞形态结构的影响进行了初步探讨。结果表明,高氨环境下,胶质细胞首先出现空泡变性,之后胞浆内出现细小的嗜碱性颗粒,细胞之间的间隙随着氨浓度的增大及氨作用时间的延长不断增加,细胞的分支状或星状突起显得粗大、清晰。当氨浓度达 10mmol/L、氨作用时间延长至 72 小时时,可见胶质细胞出现核浓缩及崩解坏死现象。观察结果提示:高氨环境下胶质细胞的损伤与修复同时或相继出现,由此其功能

代谢也将发生相应变化,这些变化有可能与中枢神经系统在氨中毒时所出现的种种异常有关,其确切作用有待于今后深入研究。

关键词:氨 星状胶质细胞形态学

参 考 文 献

- [1] Yamamoto, H. and Sugihara, N., 1987, *Toxicol. Appl. Pharmol.*, **91**:461-468.
- [2] Mousseau, DD. and Butterworth, RF., 1994, *P. S. E. B. M.*, **206**:329-344.
- [3] Szerb, JC. and Butterworth, RF., 1991, *Prog. Neurobiol.*, **39**:135-153.
- [4] Norenberg, MD. and Martinez-Hernandez, A., 1979, *Brain Res.*, **161**:303-310.
- [5] Kim, SU et al., 1983, *Brain Res.*, **274**:79-86.
- [6] Raff, M et al., 1979, *Brain Res.*, **174**:283-308.
- [7] Bergeron, M et al., 1989, *Neurochem. Res.*, **14**:853-849.
- [8] Yudkoff, M et al., 1988, *J. Neurochem.*, **51**:843-850.

EFFECT OF AMMONIA ON THE MORPHOLOGY OF CULTURED ASTROCYTES

LI Xia Qing HAN De Wu ZHAO Yuan Chang

(Dept. of Pathophysiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

ABSTRACT

The effect of ammonia (ammonium chloride, NH_4Cl) on the morphology of primary cultured astrocytes in vitro was studied preliminarily. The results showed that some injuries were early developed after ammonia administration, such as the edema of whole cell, a lot of vacuole formation in the cytoplasm and so on. Following that was the appearance of some basophilic minigranules in the cytoplasm. Even occasional karyopycnosis and debris resulted from the cell disintegration after higher concentration of ammonia administration (10mmol/L) for 72h. The wider intercellular space and obvious thickened astroid or branched cytoplasmic processes were observed after the long time of exposure to ammonia or large dose of ammonia. The results implicate the astrocytes express injuries and repair activities simultaneously under hyperammonemia. Out of question, these morphological changes were the basis of the functional and metabolic abnormality of astrocytes, which may affect the neurons by the interaction between neuron and astrocyte finally.

Key words: Ammonia Morphology of astrocyte