

(Eichele, 1989)以及对同源异型框基因复合体的表达都有很大影响(Simeone et al, 1990)。在发育中的鸡翅芽中植入一颗含维生素A酸的小球,能使XIH box I表达梯度扩展很大,伴随这一现象的是在牺牲肢芽其余部分的情况下,形成过多前肩结构的畸形(它们是XIHbox I——表达细胞的正常命运)(Oliver et al, 1990)。就Hox 4复合体而言,在鸡翅芽前端植入一颗含维生素A酸的小球能诱发一系列同源异型框基因的活性。它导致Hox 4表达的镜像重复(mirror image duplication),这与维生素A酸引起的趾的重复正相关联(Izpisua-Belmonte et al, 1991; Nohno et al, 1991)。

很多其他分子也可能有关, N-CAM、肽生长因子,胞外蛋白Wingless(脊椎动物中是int-1)都已提到过。很多配体尚未搞清的受体已被分离出来(Evans 1988)。在果蝇中参与核调节蛋白激活(如notch, sevenless和bride-of-sevenless,参阅Banerjee和Zipursky, 1990)的细胞表面分子具有(Coffman et al, 1990)或者设想具有脊椎动物的同源分子。已经知道约有50种突变影响小鼠肢体的发育,也许有些突变就影响这个细胞间信号系统。表达与同源异型框基因的启动子融合的报告基因(reporter genes)梯度的转基因小鼠有助于这类分析。

这篇文章中,我们主要阐述了XIH box I基因,

脊椎动物约有40种不同的Antennapedia型同源异型框基因,没有理由认为它们的表达模式会没有多少意义。XIH box I之所以特殊,是因为较早的就有了与多种脊椎动物的同源基因存在交叉反应的抗体。

在胚胎发生中,XIH box I在具有很不同发育潜能的几个区段表达。首先,它在躯体前部将体轴分成一个同源异型区蛋白表达带,包含中胚层、中央神经系统和神经嵴,能观察到它沿着身体末端逐渐减少。其次,它在随着肢芽的发育产生的前肢的侧板中胚层中表达,在中胚层核中形成一个A-P表达梯度。最后,在羽毛的发育中,真皮中的环形区表达之后是羽芽的生长,并在每个羽芽中产生新的A-P梯度。这样,实验胚胎学称为形态发生梯度场区(Harrison, 1918; Huxley和de Beer, 1934)似乎具有一定分子基础,能够用可见的抗体标记物追踪。看来对于脊椎动物建立模式的问题已在胚胎发生中被一再应用,也许是在这些进行模式形成的细胞场区内提供了A-P极性。

我们已经讨论了同源异型区蛋白的梯度表达和移植实验中所表明的形态发生场区行为之间的相互关系。我们也强调了目前还没有直接的证明连接二者的因果关系。本文的目的在于激励大家思考和探索梯度场区——一个时机已经成熟地开展分子水平研究的发育问题。

(王莹译,曾弥白、姚曾序审校)

研究工作

人血管内皮细胞生长因子的提取及活性测定

张 惕 金慰芳 朱涵能 盛民立

(上海医科大学放射医学研究所 200032)

由单层内皮细胞组成的血管内膜,形成血液和组织之间的分界面^[1,2],成为有选择性的屏障。内皮细胞的结构及功能的改变在创伤愈合^[3],血栓的形成^[2]、动脉粥样硬化^[4,5]和辐射引起的出血^[6,7]等方面都起一定的作用。然而,进行这些方面的研究需要大量体外培养的内皮细胞,但是人脐静脉内皮细胞(HUVEC)一直被证实很难进行长期离体培养,因此要解决

这个问题必须要有一种能提高体外培养HUVEC的有丝分裂能力的物质。

1979年,Maciag.T^[8]等人在低温条件下,从新鲜牛脑中提取出一种分子量约为75KD,对热不稳定,能刺激HUVEC在体外生长的酸性蛋白,并称它为内皮细胞生长因子(EGCF),从而有效地解决了这个问题。本实验根据我室的条件,从新鲜小牛脑中提取出内

皮细胞生长因子(ECGF), 并对该 ECGF 的促 HUVEC 增殖的作用进行证明。

材料与 方法

一 试剂

硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, AR 级(上海金山化工厂产), 丙烯酰胺, 双丙烯酰胺(Fluka 公司产), 十二烷基磺酸钠(SDS), L-谷氨酰胺(Merck 公司产), 低分子量标准蛋白(中科院上海生化所东风试剂厂产), I 型胶原酶(SIGMA 公司产), 胰蛋白酶(DIFCO 公司生产), TC-199 培养基(日本产), 其余试剂均为 AR 或 CP 级。实验过程用水均为去离子水, 再经全玻璃蒸馏器重蒸后使用。

二、方法

1. ECGF 的提取。 本实验参考 Maciag, T 等人的方法^[1], 采用新鲜的小牛脑约 1 Kg, 经生理盐水漂洗后, 加入 0.15 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, 放在高速组织捣碎机中匀浆。在 4℃ 条件下匀浆 1 小时后, 再经 8,000 rpm, 4℃ 下离心半小时。上清液按每 100 ml 加入 22 克的比例加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 搅拌 10 分钟后, 仍以同样条件下离心半小时。其上清液再按每 100 ml 加入 50 克的比例加入过量的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 搅拌 20 分钟后呈饱和状态, 同样条件下再次离心半小时, 然后取沉淀物。将沉淀物在 4℃ 条件下用去离子水透析约 24—48 小时后, 在西德 Christ 公司的 ALPHA 2-5 型冷冻干燥机中冻干。所得到的 ECGF 在 -20℃ 中保存备用。

参考 Laemmli^[9] 的方法, 将所得到的 ECGF 用分离胶浓度为 11% 的垂直板式 SDS-PAGE 进行分析, 上样量如照片(1)所示, 电极缓冲液为含 1% SDS 和 0.192 mol/L 甘氨酸的 0.025 mol/L Tris 缓冲液 pH 8.3, 维持电流 30 mA 左右, 电泳 5 小时后, 取出凝胶用考马斯亮蓝 G 250 显色后观察电泳图谱。

2. ECGF 对 HUVEC 生长的影响。 1) HUVEC 的制备。 取新鲜胎儿的脐带经 D-Hank's 液冲洗后, 用 0.1% 的 I 型胶原酶灌注静脉, 结扎后, 37℃ 消化 15 分钟。消化液离心后, 弃去上清部分的酶液, 沉于试管底部的即为 HUVEC。用台盼蓝染色, 计数活细胞。然后用含 20% 小牛血清(NBS)的 199 培养液在含 5% CO_2 的 37℃ 培养箱中培养数天后, 用 PAP 法鉴定细胞内的因子 VIII R: Ag。 2) ECGF 促 HUVEC 增殖作用的最适剂量的选择。 将 HUVEC 按照每孔 4.0×10^4 的活细胞数接种于 6 孔培养板内, 分别加入溶解于培养液中经灭菌过滤的含不同浓度(0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/$

ml, 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 450 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 ECGF, 每个剂量 5 个孔, 每孔加 3 ml, 仍置于含 5% CO_2 的 37℃ 培养箱中培养。每两天分别换一次含相应浓度 ECGF 的培养液, 8 天后弃去培养液, 加入 1 ml 0.25% 胰蛋白酶液和 1 ml 的 0.04% DETA, 消化 2 分钟, 每个剂量 5 个孔, 共取 20 个样本作活细胞计数, 取平均值为该剂量的细胞数。 3) ECGF 作用后 HUVEC 增殖率的测定。 将 HUVEC 按每孔 4.0×10^4 的活细胞数接种于 6 孔培养板内, 分别以经过灭菌过滤的含 20% NBS 的 199 培养液和含 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGF 的 20% NBS 的 199 培养液培养。每组 15 孔, 以上述同法培养。分别在 4, 7, 10 天时每组取 5 孔, 消化后, 每组取 20 个样本进行细胞计数。取其平均值为该组该时相的细胞数, 并计算出该时相的 HUVEC 增殖率。 4) ECGF 对 HUVEC 长期培养作用的观察。 将 HUVEC 用含 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGF 的 20% NBS 199 培养液稀释, 使细胞密度达到 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 。以 4 ml 细胞悬液接种于 50 ml 的培养方瓶中, 每两天换一次同样的培养液。待细胞完全汇合, 用 0.25% 的胰蛋白酶液和 0.04% EDTA 以 1:1 混匀, 37℃ 下消化 1—3 分钟, 1000 rpm 离心后, 用 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGF 和 20% NBS 199 培养液稀释细胞达到上述相同的细胞密度数。接种培养瓶, 并用 PAP 法鉴定传代细胞。 5) 双酶抗酶(PAP)法则定因子 VIII R: Ag 鉴定 HUVEC。 培养的 HUVEC 细胞片经中性福尔马林固定后, 先与兔抗人因子 VIII R: Ag 血清在 4℃ 下孵育 48 小时, 再逐步分别与羊抗兔 IgG 血清和兔 PAP 血清和试剂在 37℃ 下孵育 30 分钟, 然后避光与底物二氨基联苯胺(DAB)在过氧化氢的作用下反应 10—15 分钟, 蒸馏水冲洗、干燥, 透明, 封片, 显微镜下观察。对照组 1 用 Balb/C313 细胞代替 HUVEC, 对照组 2 用 PBS 代替兔抗人因子 VIII R: Ag 血清。

结 果

从小牛脑匀浆中粗提取的内皮细胞生长因子(ECGF)是一种浅黄色的絮状物, 溶于培养液后略有沉淀, 经灭菌过滤后不影响 HUVEC 的促进生长效应。其胆固醇含量为 0.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。估计沉淀的主要成份为脑磷脂。 ECGF 粗提物的 SDS-PAGE 分析(图版图 1), 可见其中成份复杂。但在相当于标准蛋白 Mr 67Kd—Mr 94 Kd 带谱区域出现 ECGF 的特异性条带,

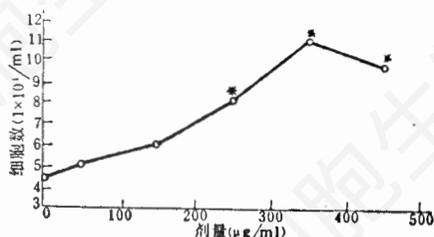


图1 不同剂量 ECGF 对 HUVEC 的增值作用

*: $p < 0.01$

(图中箭头所示), 用迁移率法测定其分子量约为 75 Kd, 与 Maciag. T^[8] 报道的结果相符。

图1显示了不同剂量的 ECGF 对 HUVEC 的促进增殖作用。随着 ECGF 浓度的增大, 细胞数亦呈上升趋势, 在 350 µg/ml 时, 细胞增殖数达到峰值, 而大于此剂量时, 细胞数又略有下降。可见当所用培养液中含 350 µg/ml ECGF 时, 内皮细胞生长最为旺盛, 此浓度可视为 ECGF 促进 HUVEC 增殖作用的最适剂量。

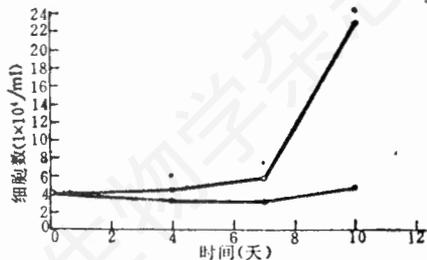


图2 ECGF 添加组与一般培养液中原代 HUVEC 增值的比较

*: $p < 0.01$

图2的结果显示, 培养液中加入最适剂量的 ECGF 后, 随着培养日期的增加, 细胞数增长幅度不断提高, 在培养至第4天时使用 ECGF 组的细胞数比对照组提高 39%, 至第10天时使用了 ECGF 组的细胞数比对照组提高了 398.4%, ($p < 0.01$) 有非常显著性意义。

由于图1、图2两组实验均使用原代 HUVEC 进行, 并且细胞的接种密度大大低于正常 HUVEC 体外培养所要求的高密度条

件^[10-12], 因此对照组的细胞未见增殖, 而在其他条件均相同的情况下, 在 ECGF 添加组中 HUVEC 的增殖率则更为显著 ($p < 0.01$)。

在倒置相差显微镜下观察, 相同的培养条件下, 含有最适剂量的 ECGF 培养液培养的原代 HUVEC 6 小时后贴壁生长, 24 小时后呈单层小集落, 分裂细胞较多, 细胞呈长多角形; 换液后 48 小时细胞集落继续增大, 一般 2—3 天后形成排列密集的单层细胞; 连续传代培养至第二十四代, 细胞形态均无明显变化 (图版图 2、3), 第 3 天细胞亦基本汇合; 但培养至第二十五代时, 细胞增长速度减慢, 胞浆增多, 细胞间隙较大, 培养第 3 天时细胞仍没有汇合 (图版图 4); 上述各代细胞用 PAP 法鉴定因子 VIII R: Ag, 结果均为阳性, 棕色颗粒均主要分布于胞浆内, 近核部位更加明显, 说明上述细胞均有 HUVEC 的特性, 是 HUVEC。Balb/C 313 组的结果为阴性; 以 PBS 代替兔抗人因子 VIII R: Ag 血清组亦为阴性。

在倒置显微镜下观察, 用不含 ECGF 的培养液培养的原代 HUVEC, 最初的生长情况与前者相似, 但细胞较小, 汇合所需时间较长 (5—7 天); 传代培养到第三代时细胞非常瘦小, 胞浆稀少; 连续培养十多天也不汇合 (图版图 5), 无法继续传代培养。这种情况符合国内外有关文献的报道^[10-12]。这三代细胞均用 PAP 法鉴定因子 VIII R: Ag, 结果均为阳性。

讨 论

60 年代 Maruyama^[13] 开始了血管内皮细胞培养工作。70 年代 Jaffe^[14] 用人脐静脉培养成功并可传代的 HUVEC, 同时建立了脐静脉内皮细胞鉴定方法。80 年代 Gordon^[15] 用牛脑匀浆提取 ECGF 成功地将 HUVEC 体外传代培养至 28 代。近期国内也有 HUVEC 细胞系 15 代和 6 代的研究报道^[16-17], 而我们自己提取的 ECGF 粗制品已经传代培养至 25 代, HUVEC 体外存活可达四个月。培养过程中我

们观察了 ECGF 对原代培养细胞的影响,发现在相同的细胞接种密度下,不加 ECGF 的 HUVEC 呈小多角形,增殖速度慢,一般需体外培养 5—7 天汇合。添加 ECGF 的体外培养 HUVEC 接种后细胞贴附率高,形态呈长多角形。双核分裂相细胞较多,有明显椭圆形核,伴有 2—5 个核仁,细胞增殖速度快,一般培养 2—3 天汇合。这两种培养效应似乎提示, ECGF 作为 HUVEC 特异性有丝分裂原,在促进内皮细胞分化和增殖的同时,可引起相应形态学上的某些改变,但并不会影响 HUVEC 的生物学特性^[12-13]。为了证实这一点,我们又进一步比较了 ECGF 对传代细胞的影响,结果表明不加 ECGF 的 HUVEC 传代后贴附率低,生长稀疏,不能继续传代。这种情况与 HUVEC 体外只能传至 1—2 代的报道^[18]相一致。而加 ECGF 的细胞贴附增殖良好,可以继续作传代培养的结果与 Gordon 的报道^[15]相比较也支持了上述的推测,说明 HUVEC 具有体外长期传代培养的生物学特性,其生长需要 ECGF 的支持,而 ECGF 的活性浓度则是 HUVEC 生长、增殖、分化的关键。ECGF 在 20% NBS 199 培养液中的浓度低于或高于 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,都会直接影响 HUVEC 生长和传代培养。只有当 ECGF 为最适活性浓度时,才具有刺激静止期 HUVEC 增殖的作用。因此 ECGF 是 HUVEC 体外分化,增殖和维持长期传代培养的重要物质。

本实验采用的 ECGF 是一种粗制品,经测定其中含有分子量为 75 Kd 的蛋白成份。由于提取方法简便,制备得率高,而且不影响 HUVEC 生长所必须的条件,在实际培养 HUVEC 中有着一定的实用价值。本文应用的 ECGF 粗制品,对于 HUVEC 的生物学特性和生理功能,以及心血管疾病、血管再生等方面的影响将有待于进一步的研究。

摘 要

本文报道了一种从牛脑匀浆中提取的

ECGF 粗制品,在 20% NBS 199 培养液中含量达到 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,具有刺激静止期 HUVEC 增殖能力,并可使 HUVEC 在体外传代培养至 25 代。这个结果说明 ECGF 是 HUVEC 体外分化、增殖和维持长期传代培养的关键物质,并为研究 HUVEC 的生物学特性和生理功能,心血管疾病和血管再生等提供了一个重要的条件。

图 版 说 明

1. ECGF 粗制品经 SDS-PAGE 分析后的电泳照片。
 - a. 为低分子量标准蛋白带谱,上样量为 2 μg 。五种分子量的蛋白自上而下依次为: 酸磷化酶 B (Mr 94 Kd), 牛血清白蛋白 (Mr 67 Kd), 肌动蛋白 (Mr 43 Kd), 碳酸酐酶 (Mr 30. Kd), 烟草花叶病毒外壳蛋白 (Mr 17.5 Kd)。
 - b. 为 ECGF 粗制品的蛋白带谱,上样量为 25 μg , 经迁移率法测定,图中箭头所指的 G 条带 Mr 约为 75 Kd。
2. 用含 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGF 的培养液培养的第四代 HUVEC 第 3 天的生长情况。(倒置相差显微镜 $\times 100$)
3. 用含 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGF 的培养液培养的第十四代 HUVEC 第 3 天的生长情况。(倒置相差显微镜 $\times 100$)
4. 用含 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGF 的培养液培养的第二十五代 HUVEC 第 3 天的生长情况。(倒置相差显微镜 $\times 200$)
5. 不含 ECGF 的培养液培养的第 3 代 HUVEC 第 10 天的生长情况。(倒置相差显微镜 $\times 100$)

参 考 文 献

- [1] Aursnees, I. 1974, *Microvas. Res.* 7: 283—295.
- [2] Stemerman, M. B. and Spaet, T. H. 1972, *Bull. N. Y. Acad. Med.* 48: 289—301.
- [3] Schoefl, G. E. Studies on inflammation. III. *Virchows Arch. Path, Anat.* 337: 94—141; 1963.
- [4] Ross, R.; Glomset, J. A.; *Nature Engl. J. Med.* 295: 369—377; 1976. a.
- [5] Ross, R.; Glomset, J. A.; *Nature Engl. J. Med.* 295: 420—425; 1976. b.

- [6] Cavallo, T.; Sade, R.; Folkman, J.; Cotran, R. S.; *J. Cell Biol.* 54: 408—420, 1972.
- [7] Flokman, J., Merler, E., Abernathy, C.; Williams, G., *J. Exp. Med.* 133: 275—288, 1971.
- [8] Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P. R., Forand, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 5674—5678, 1979.
- [9] Laemmli, U. K., *Nature*, 227: 680—685, 1970.
- [10] 盛国立等,《上海医科大学学报》第14卷,第一期,71—73, 1987.
- [11] Gimbrone, M. A. Jr., 1976, New York. Grune and Stratton 3: 1—28.
- [12] Gimbrone, M. A. Jr. and Cotran, R. S., 1975, *Lab. Invest.*, 33: 16—27.
- [13] Maruyama, Y. 1963, *Mikrosk. Anat.*, 60: 69.
- [14] Jaffe, E. A. et al., 1973. *J. Clin. Invest.*, 52: 2745.
- [15] Gordon, P. B. et. al. 1983. *In Vitro*. 19: 661.
- [16] 何红兵等,《第一军医大学学报》,9(4): 236, 1988.
- [17] 魏少敏等,中国病理生理杂志,3(3): 188, 1987.
- [18] 梁明达等,昆明医学院学报,2:1, 1988.

γ-干扰素对人大肠癌细胞系的生长抑制作用和对细胞周期的影响

王 聆 戴人杰 周光炎
(上海市免疫学研究所 200025)

刘新垣
(中国科学院上海生物化学研究所)

我们发现人大肠癌细胞倍 HLA 抗原异常表达和肿瘤细胞 DNA 含量(倍性)有关,而且 HLA 抗原的表达率愈高则肿瘤转移率愈低^[1]。为了了解 HLA 抗原表达与肿瘤生长增殖及预后的内在联系,我们还用 r 干扰素(IFN γ)在体外成功地诱导了三株大肠癌细胞系使其 HLA 抗原及癌胚抗原(CEA)表达增强^[2]。在此基础上,本文进一步测定肿瘤生长增殖状态和细胞周期的分布,目的是揭示与肿瘤细胞 HLA 抗原表达相关的某些因素间的变化的规律及意义,为肿瘤免疫治疗提供依据。

材 料 与 方 法

一、人大肠癌细胞系 LoVo(结肠癌,引自美国 ATCC), HR 8348(直肠癌)和 HCl(结肠癌)。后两者由浙江省肿瘤所建系^[3]。

二、IFN 抑制实验 将 LoVo、HR 8348 和 HCl 分别以每孔 10^3 、 10^4 和 10^5 细胞数加入 96 孔平底细

胞培养板,细胞贴壁生长 24 小时后,各孔加入含基因重组 IFN γ (中科院生化所制)的培养液 0.3 ml,浓度依次为 10 、 10^2 、 10^3 、 10^4 和 10^5 U/ml,对照孔加无 IFN γ 的培养液,再培养 48 小时后检测 IFN γ 的抑制作用。另用 IFN γ 10^3 U/ml 分别与细胞培养 24、48、72 和 96 小时,观察 IFN γ 作用的时间效应。

三、同位素掺入 肿瘤细胞经 IFN γ 作用后,吸去培养液,各孔中加入不含 IFN γ 的培养液 0.2 ml 和 $^3\text{H-TdR}$ (上海原子核所,比度 23 mCi/ml)0.5 uCi。实验对照未经 IFN γ 培养孔,空白对照为无细胞孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 培养 4 小时后, Hanks 液洗板,各孔用 0.1 N KOH 0.1 ml 和 5%三氯醋酸 0.1 ml 处理,收集细胞,β 液闪仪测各孔 cpm 值,并计算生长抑制率:

$$\text{生长抑制率(\%)} = \left(1 - \frac{\text{加 IFN}\gamma \text{ 孔 cpm 值} - \text{空白对照孔 cpm}}{\text{不加 IFN}\gamma \text{ 孔 cpm 值} - \text{空白对照孔 cpm}} \right) \times 100\%$$

细胞 DNA 含量测定承上海肿瘤医院曹世龙教授领导的 FCM 实验室大力协助,谨致谢意。