

巯基蛋白酶抑制肽对体外培养细胞生长的影响

孙 谔 冯建芳 汪淑荣 程改花 陈明哲

(北京医科大学第三医院心血管研究室 100083)

自1981年Barrett^[1]从鸡卵清中分离纯化了巯基蛋白酶抑制肽C(命名为Cystatin C或简称CPIc)。CPIc在动植物体内的分布^[2],理化性质以及其分子结构已得到较深入的研究^[3],近年来CPIc的基因结构和基因工程也取得了很大进展^[4]。而CPIc的生物学功能,尤其是细胞生物学功能方面却知之甚少。

1986年Suhari^[5]曾发现CPIc对仓鼠肺成纤维细胞生长有微弱的促进作用,1988年Korbelik^[6]发现CPIc对肿瘤细胞有轻微的抑制作用,而对非肿瘤细胞则有轻微的促进作用。1989年Sun^[7]研究了CPIc的Form I(CPIc-I)和Form II(CPIc-II)对细胞的增殖作用。发现CPIc-II对小鼠3T3成纤维细胞有较强的促生长作用,而Kirsten鼠肉瘤病毒转化的细胞K-3T3成纤维细胞对其更为敏感。而CPIc-I的作用则不明显。本文研究了CPIc-II对NC3H10, TC3H10, 2BS, SHR和WKY大鼠主动脉血管平滑肌细胞以及大鼠乳鼠心肌细胞生长的作用。

材料与 方法

一、材料 polybuffer 74, polybuffer exchanger 94, Sepharose 4B(pharmacia公司), papain, 碘乙酸, 溴化氰(sigma公司), Trypsin(Difco)。³H-TdR(中国科学院原子能所)。DMEM(GIBCO, Grand Island, NY)。小牛血清(北京北郊农场血清组)。96孔, 48孔培养板(Nunc)。其他化学试剂均为AR试剂。

Cm-papain-Sepharose 4B按Anastasi^[3]方法制备。

小鼠成纤维细胞C₃H₁₀T_{1/2}CL8(简称NC3H10),其特点是转化率低。有相应的由³H-TdR转化的恶性细胞(简称TC3H10)(中国预防医学中心朴长清提供),人胚肺成纤维细胞株2BS(北京生物制品所提供),大鼠主动脉血管平滑肌细胞SHR和WKY(医科院心血管研究所),Wister大鼠乳鼠心肌细胞制备按前文^[8]。

二、鸡巯基蛋白酶抑制肽C二型——CPIc-I-II制备和纯化 以鸡卵清为材料,具体程序按Anastasi^[3]方法进行。主要有三步:(1)以pH3.0的甲酸钠缓冲液调pH至6.5,沉淀卵粘蛋白。(2)用Cm-papain-Sepharose 4B进行亲和层析,结合鸡卵清中的CPIc。(3)用polybuffer exchanger 94进行聚焦层析,分离纯化CPIc-I和CPIc-II。所得制品以饱和硫酸铵沉淀形式,存于-5℃以下。使用前进行透析脱盐并与适当的培养基透析平衡。

三、细胞培养 所有细胞一般都接种在含10%小牛血清的DMEM培养液——10%CS-DMEM的培养板或培养瓶中,培养在37℃、5%CO₂的培养箱内。细胞传代均以胰酶(merck)EDTA溶液消化,消化时间和所用胰酶浓度视不同细胞而定。

四、细胞计数及蛋白定量 将细胞接种于24孔培养板,每孔400μl,密度2×10⁴/cm²左右。在亚最适条件(suboptimum)下,以1%CS-DMEM为培养液,37℃,5%CO₂培养,实验组加入浓度为200μg/ml CPIc-II,培养不同时间后,吸去培养液,用胰酶EDTA溶液消化,制成细胞悬液,镜下计数。或用冻融法使细胞裂解,溶液以考马斯亮蓝G250显色法^[9]测定其OD₅₉₅,以BSA为标准,求得相应蛋白含量。

五、³H-TdR参入DNA测定 细胞接种于96孔培养板,每孔200μl,密度1×10⁴/cm²,以DMEM-10%CS为培养液,37℃,5%CO₂培养至细胞未完成

全融合单层(subconfluent layer)。移去培养液, 换用无血清 DMEM, 继续培养 28 小时, 使细胞同步进入 G_0 期, 然后换用低浓度血清 DMEM-0.5-4%CS 37°C, 5%CO₂ 培养, 启动细胞周期, 实验组加入不同浓度的 CPIc-II, 培养 20 小时后, 每孔加入 0.4 μ Ci ³H-TdR, 再培养 2-3 小时, 吸去培养液, 用 10% 冷 TCA 固定细胞 3 分钟, 以冷 DMEM 轻轻涮洗三次。最后加入 200 μ l 1%SDS, 0.1 mol/L NaOH 溶液在 37°C 保温 10 分钟溶解细胞。将细胞溶解液转移入闪烁瓶, 加入 4 ml 闪烁液(21 g PPO, 1L Tritonx-100, 2 L 甲苯), 在闪烁仪上测定 CPM。

结 果

1. CPIc-II 对 TC 3 H 10 细胞呈现明显的生长刺激作用, 其作用表现为以下三方面:

(1) 促进 ³H-TdR 参入细胞 DNA, 其参入量随 CPIc-II 浓度增高而增加, 呈剂量相关性(图 1)。(2) 促进细胞蛋白质合成。在 DMEM-1%CS 的亚最适条件下, 实验组细胞蛋白质合成均高于对照, 接种后 72 小时达最高峰(图 2)。(3) 促进细胞数增加, 在上述条件下实验组 24 h、48 h、72 h、96 h 的细胞数都高于对照。(图 3)。

2. 对不同组织来源的几种细胞的影响。用 NC 3 H 10, TC 3 H 10, 2 BS, SHR 和 WKY 主动脉平滑肌和心肌细胞, 培养在亚最适条件下, 研究它们对 CPIc-II 的促生长作用的敏感性。实验表明 CPIc-II 普遍地刺激所研究的全

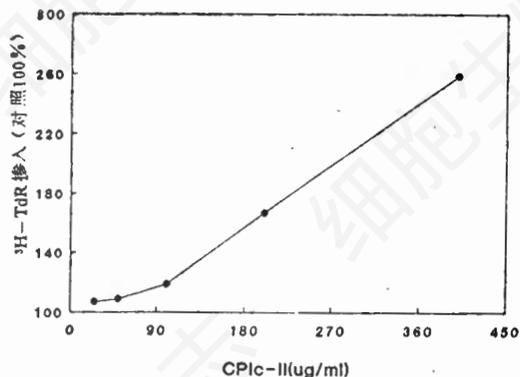


图 1 CPIc-II 促进 ³H-TCR 参入 TC₃H₁₀ 细胞的剂量曲线

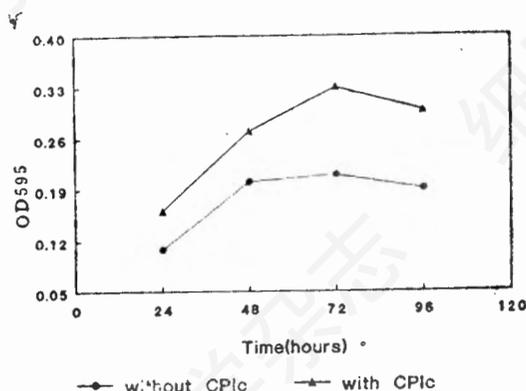


图 2 CPIc-II 促进 TC 3 H 10 细胞蛋白质合成的动态曲线(以考马斯亮蓝 G 250 显色, 测定其 OD₅₉₅, 表示总蛋白的相对量)

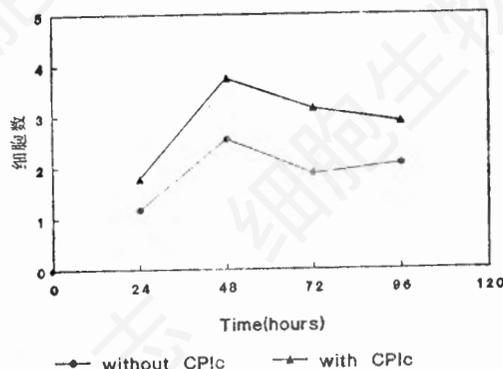


图 3 CPIc-II 促进 TC 3 H 10 细胞数增加

部细胞的生长和增殖。且呈明显的剂量依赖关系(图 4), 没有发现抑制作用。但不同细胞其敏感性有所不同。对 CPIc-II 的增殖作用: TC 3 H 10 大于 NC 3 H 10, 在实验浓度范围内 TC 3 H 10 的 ³H-TdR 参入均高于 NC 3 H 10, 在较高浓度时其参入量是 NC 3 H 10 的 1.5 倍(图 5)。

SHR 大鼠主动脉平滑肌细胞(增殖力强、类似肿瘤细胞)其 ³H-TdR 参入也高于 WKY(图 6)。人的 2 BS 成纤维细胞 ³H-TdR 参入也高于 NC 3 H 10 细胞。

讨 论

本研究室所用 CPIc-II 制品, 均按 Anast-

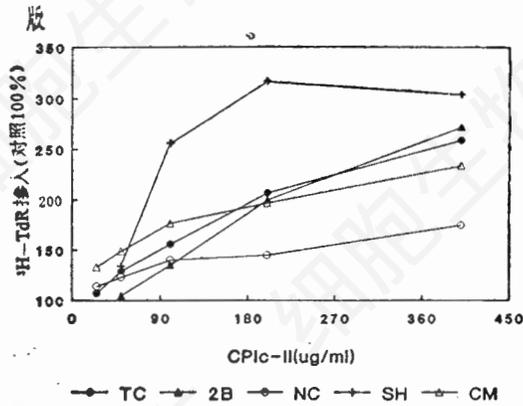


图4 CPIc-II 对不同细胞生长的影响
NC-小鼠成纤维细胞 NC 3 H 10
TC-³H-TdR 转化的 NC 3 H 10 细胞
2B-人胚肺成纤维细胞 2 ES
SH-大鼠主动脉平滑肌细胞 SHR
CN-大鼠乳鼠心肌细胞

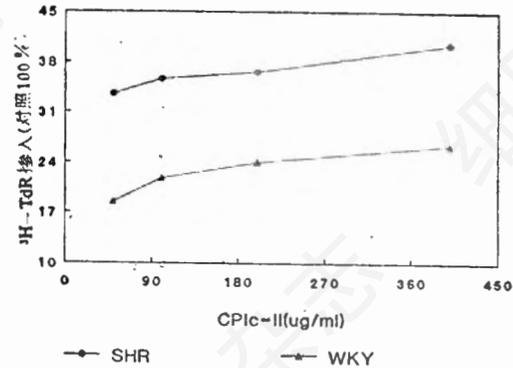


图6 CPIc-II 对 SHR 和 WKY 大鼠主动脉平滑肌细胞的作用

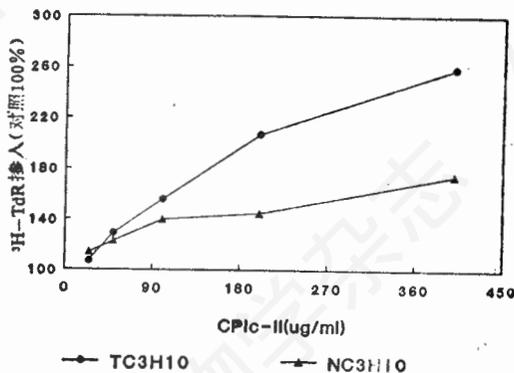


图5 CPIc-II 对 TC 3 H 10 和 NC 3 H 10 的作用比较

asi^[9]程序制备,在 SDS-PAGE 上只有一条带^[7],纯度在前文^[7,9]已检验和讨论过,无可检测的其他生长因子存在。

CPIc-II 对不同细胞生长的影响。本文研究了 6 种细胞,综合前文^[7,8]研究过的小鼠 3 T 3 和 K-3 T 3 成纤维细胞的结果,共研究过 8 种细胞。从细胞类型方面看有成纤维细胞、肌细胞;从来源看有鼠、大鼠和人的;从性质方面看有正常培养细胞、及其转化细胞、和原代培养的心肌细胞。CPIc-II 均显示是促进生长作用。对较深入研究过的 3 T 3、

TC 3 H 10 和乳鼠心肌细胞, CPIc-II 的促生长作用表现在以下三方面:(1) 促进细胞 DNA 合成,(2) 促进细胞数增加,(3) 促进细胞蛋白质合成。因此可以得出结论:CPIc-II 对于体外培养细胞均能促进其增殖。在细胞代谢方面起正调节作用。

分析正常细胞和转化细胞对 CPIc-II 的敏感性可以看出,转化细胞 K-3 T 3, TC 3 H 10 的敏感性高于对应的 3 T 3 和 NC 3 H 10,而且 SHR 细胞的敏感性也高于 WKY 细胞。似乎 CPIc-II 对肿瘤或肿瘤样细胞的促增殖作用更为明显。1989 年,Laber 等^[10]研究指出:CPIc-II 和 CPIc-I 在蛋白质一级结构方面和免疫学活性方面,均无明显差别,只是 CPIc-II (PI 5.6)的 pI 低于 CPIc-I (pI 6.5),是 CPIc-I 的磷酸化型式。Laber 分子结构这方面的研究和我们细胞生物学方面的研究结果是相呼应的。众所周知大多数的活性蛋白在磷酸化后才显示其生物学活性。

关于 CPIc-II 促进细胞增殖的机理,推测有两种可能:(1) 像一般生长因子作用一样,作用于细胞受体,从而促进细胞增殖。(2) 不是生长因子,它只是存在于培养液中,抑制蛋白酶活性,防止有限浓度的生长因子被水解,从而延长了生长因子的作用,显示了促增殖作用。但目前所获得的证据,还有矛盾之处,不

足以做肯定的结论, 还需做进一步的工作。

摘 要

本文研究了鸡巯基蛋白酶抑制肽 C 二型——CPIc-Ⅱ对 NC 3H 10, TC 3H 10, 2BS, SHR, WKY 和乳鼠心肌细胞的生长的影响, 发现 CPIc-Ⅱ对所有研究过的细胞都有促生长作用, 无一例外。促进作用表现为三方面: (1) 促进细胞总蛋白量增加; (2) 促进 DNA 合成; (3) 促进细胞数增加。并且转化细胞均比相应的正常细胞对 CPIc-Ⅱ更敏感, 至此可以得到初步的结论, CPIc-Ⅱ在细胞代谢调节方面是一个正调节因素。

参 考 文 献

[1] Barrett A. J., 1981, *Methods Enzymol.*, 80, 771—778.

- [2] 孙 诤、童坦君, 1991, 国外医学, 分子生物学分册, 13: 1—3.
- [3] Anastasi A. et al., 1983, *Biochem J.*, 211: 129—138.
- [4] Abrahamson M. et al., 1988, *FEBS-Lett.*, 236: 14—18.
- [5] Suhar A. et al., 1986, in "CYSTEINE PROTEINASE AND THEIR INHIBITORS" edt. by Wolter de Gruyter et al. Co. Berlin/New York PRESS, pp. 283—291.
- [6] Korbely M. et al., 1988, *Neoplasma*, 35: 555—563.
- [7] Sun Q., 1989, *Exp. Cell Res.*, 180: 150—160.
- [8] 孙 诤等, 1991, 北京医科大学学报 (待发表).
- [9] Marion M. et al., 1976, *Anal Biochem.*, 72: 248—254.
- [10] Laber B. et al., 1989, *FEBS-Lett.*, 246: 162—168.

细胞外基质对体外培养心肌细胞铺展作用的影响

马 学 惠

(太原, 山西医学院 030001)

多数哺乳类动物体内实质细胞与细胞外基质有密切关系。心脏的细胞外基质是复杂的, 由各种不同的巨分子成分组成, 包括 I、Ⅲ、Ⅳ型胶原, 糖胺多糖, 糖蛋白如纤维连接蛋白、层连接蛋白等。心肌细胞表面有各种细胞外基质成分的特异受体。

细胞外基质对心脏的发生发展起重要作用, 近年研究表明^[1,2], 细胞外基质成分在调节心肌细胞行为上起重要作用, 其中包括识别、移动与粘附等。细胞粘附于固体物方能增殖, 不同种类及不同浓度的细胞外基质, 影响细胞的粘附, 但只粘附还不够, 为了增殖, 细胞还要铺展, 有人研究了细胞外基质对成纤维细胞、肝细胞铺展的影响^[3], 但对心肌细胞铺

展的影响尚未见报道, 本实验研究了不同种类的细胞外基质在不同的培养时间, 对体外培养心肌细胞铺展的影响。

材 料 与 方 法

实验动物 SD 大白鼠, 出生后 4 天。

实验药物 胶原酶(Ⅳ型), F 12 K 细胞培养粉, 兔抗大鼠 α -肌动蛋白, 羊抗兔 Rhodamine (罗达明), (以上均购自美国 Sigma 化学试剂公司)。各种细胞外基质抗体, 包括 I、Ⅲ型胶原(C I/Ⅲ)、Ⅳ型胶原(C Ⅳ)、纤维连接蛋白(FN)、层连接蛋白(LN) (以上均由美国南卡罗来那大学医学院 Tom Borg 博士馈赠), 纤维连接蛋白的片段 FFg, 分子量为 105000 D (Kristofer Rubin 博士赠送, Uppsala University, Sweden)。