

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)。

心肌细胞分离 按 Tom Borg 氏方法^[1], 简单讲, 即大鼠皮肤消毒, 断头, 迅速取出心脏, 剪碎放入 KRB 液, 经胶原酶消化 6 次后, 收集第 2 次以后细胞, 加入 F₁₂K 培养液, 接种于预先置入盖玻片的 35 mm 塑料培养基, 接种密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 所用平皿预先用各种不同细胞外基质包被, 用量: C I / III 为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 其余各为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。培养 1、4、8、12、24、48、72 小时, 每组取出 2 个平皿, 用 2% 多聚甲醛液固定 10 分钟。

免疫荧光染色 固定后的平皿, 以 PBS 液冲洗, 加入 Triton-X 100, 10 分钟, PBS 冲洗, 滴加兔抗大鼠 α -肌动蛋白, 37°C 45 分钟, 冲洗后, 加入羊抗兔 Rhodamine, 37°C 45 分钟, 用甘油稀释液封固, 荧光显微镜下洗行形态学观察, 并用测微器测量细胞面积, 随机测量不相接触的、孤立的心肌细胞的最大直径及横径, 每组随机测量 50 个细胞, 计算其均值, 并进行比较。

结 果

一、细胞形态 细胞在接种后 1 小时贴壁, 轮廓清楚, 大部呈圆形、三角形, 4 小时开始有突起, 12 小时可见细胞内应力纤维出现, 呈束状, 伸向突起, 24 小时出现明显的横纹, 说明细胞收缩装置开始形成, 48 小时则横纹极为清晰(图版图 1—3)。

二、不同种类的细胞外基质对心肌细胞铺展面积的影响 分离的新生大鼠心肌细胞, 接种后迅速贴附于各种不同细胞外基质, 接种 1 小时后达到饱和水平, 细胞开始铺展, 其铺展面积因不同基质而不同, 培养 8 小时已能看到

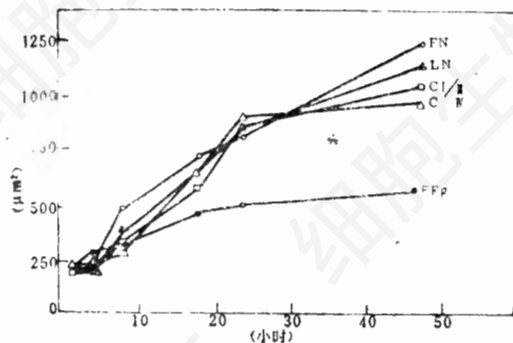


图 不同细胞外基质对心肌细胞铺展的影响

表 1 不同细胞外基质对培养 48 小时心肌细胞面积的影响

组别	细胞面积 $\bar{x}(\mu\text{m}^2) \pm \text{SD}$
FN	1251.98 ± 89.79*
LN	1129.26 ± 84.09*
C IV	991.68 ± 68.79* ^Δ
C I / III	1051.40 ± 86.2* ^{ΔΔ}
FFg	513.12 ± 38.83 ^{ΔΔ}

注: 与 FFg 相比 * $p < 0.001$

与 FN 相比 ^Δ $p < 0.05$ ^{ΔΔ} $p < 0.001$

各种不同基质间的差别(见图), 48 小时后, 各种不同细胞外基质间铺展面积有明显统计学意义(表 1)。细胞铺展的过程较为复杂, 涉及到细胞骨架的重组, 可能还有细胞内、外新合成的成分的影响。结果表明 FN 包被的基质在 8 小时细胞铺展范围较其他基质包被者增加, 到 48 小时, 除与 LN 未算出统计学差异外, 与其他种基质比较差异均非常显著。FN 的片段 FFg 对细胞铺展作用最小。

讨 论

脊椎动物细胞的发生发展与细胞外基质有极密切的关系, 新分离的大鼠心肌细胞在不同的细胞外基质中发生附着、铺展, 其形成率及形态大小因不同基质成分而不同, 表明特异的细胞外基质影响心脏形态的发生。细胞外基质与心肌细胞表面的相互作用是以受体为中介^[4], 由于细胞表面对不同种类基质的受体数目不同, 影响对细胞粘附及铺展。从本实验结果看, FN 对心肌细胞铺展影响最大。FN 早已被人称为粘连因子, 它与大多数细胞的粘附、铺展有关, 其粘附机制可能是: (1) 与细胞表面神经甾脂等作为受体相连; (2) FN 通过 140 KD 糖蛋白连接于细胞表面。细胞外基质与细胞骨架关系密切, 有人将 FN、胶原、蛋白多糖(PG)看做是细胞外骨架, 其与细胞的关系为, FN 的二个亚单位与胶原纤维相连, 再与邻近细胞或支持物相连, FN 的内端通过糖脂和 PG 与细胞质膜交联, 部分可嵌入膜结

构, 细胞外骨架与细胞膜下的细胞内骨架(肌动蛋白、中间丝、微管)相对, 并呈平行交错排列, 细胞内、外骨架相互连接相互作用, 使细胞在支持物上形成支撑点而向前铺展及移动^[5]。

FN 分子上具有许多功能区, 可分别结合纤维蛋白、胶原、糖胺多糖、DNA、透明质酸、肌动蛋白、细菌及细胞表面^[6], 构成细胞与细胞外基质相互间的复杂结合。FN 片段对心肌细胞铺展作用小于 FN, 可能是其功能单位减少所致。

摘 要

本研究用分离的新生大鼠心肌细胞, 观察不同的细胞外基质, 在培养不同时间对心肌细胞铺展的影响。结果表明, 不同的细胞外基质影响心肌细胞铺展, 在培养 8 小时即出现差别, 48 小时差异明显, 其中 FN 促进心肌细胞铺展, 而 FN 的片段延缓心肌细胞的铺展。

实验技术

细胞培养中支原体污染的检测*

吕沅圃 喻峰

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

支原体是细胞培养中常见的污染源, 能影响培养细胞的各项参数^[1]。其个体微小(0.3—0.8 μm), 能透过 0.45 μm 孔径的滤膜, 且对大多数抗生素不敏感^[2], 致使对污染的防治仍颇为困难。

American Type Culture Collection(ATCC)和日本理化研究所细胞银行等提供标准化细胞系的细胞库/细胞银行都制订了细胞培养物的支原体污染的检测条例。中国科学院细胞库也把对支原体污染的检测作为最基本的质量控制项目之一。

图 版 说 明

1. 新生大鼠心肌细胞, 培养 1 小时, 细胞贴壁, 呈圆形或多角形。α-肌动蛋白免疫荧光染色 × 400
2. 新生大鼠心肌细胞, 培养 12 小时后, 细胞铺展, 呈三角形或梭形, 出现应力纤维。α-肌动蛋白免疫荧光染色 × 400
3. 新生大鼠心肌细胞, 培养 48 小时后, 细胞出现明显的横纹。α-肌动蛋白免疫荧光染色 × 400

参 考 文 献

- [1] Borg TK, 1982, *Anat Rec*, 165: 435—444.
- [2] Borg TK, et al., 1984, *Dev Biol*, 104: 86—96.
- [3] Rubin K, et al., 1981, *Exp Cell Res*, 135: 127—135.
- [4] Hynes RO, 1987, *Cell*, 48: 549—554.
- [5] 马学惠等, 广州医药, 1989, 3: 40—43.
- [6] Yamada KM, et al., In: *The Role of Extracellular Matrix in Development*, Ed by Trelstad RL, Alan R, Liss, Inc, New York, 1985, 89—121.

我们采取了以应用指示细胞培养物的 DNA 荧光染色为主, 辅之以微生物培养(支原

* 本工作属于“七五”中科院生物学重大课题“细胞库的建立及技术研究”的内容之一。工作中得到沈鼎武、吕淑霞、葛锡锐、朱德厚、洪龙生等老师的指导和周翠堤老师的指点, 特此致谢!

** 在 90 ml 超纯水中溶解 5 g 葡萄糖, 1 g 精氨酸, 2 mg DNA, 92.2 mg 氯化胆碱, 2 mg 盐酸吡哆醛, 11 mg 肌醇, 2.4 mg 烟酰胺, 2.4 mg 泛酸钙, 1.3 mg 叶酸, 1 mg 核黄素, 0.3 mg 维生素 B₁₂, 0.2 mg 生物素, 1 mg 维生素 B₁, 37°C 溶解后定容至 100 ml, 用 0.22 μm 滤膜过滤, -70° 保存。

*** 均由中国兽药监察所提供, 特此致谢。