

钙调素拮抗剂小柏胺衍生物对成纤维细胞增殖和功能的影响

刘杰文 刘为民 华国勳 崔衍贞 黄慧 赵轶轩 褚雁

(中国医学科学院血液病学研究所 天津 300020)

徐友涵 张遂坡 吴隽平 张金红

(南开大学分子生物学研究所)

自70年代发现了Ca²⁺的受体蛋白——钙调素(CaM)以来,对Ca²⁺和CaM的生物学功能进行了深入和广泛的研究,许多学者证明CaM直接影响细胞的生长和增殖。双苄基异喹啉类化合物具有抗钙调素的作用,在天然的异喹啉生物硷中,汉防己碱和小柏胺是较好的钙调素拮抗剂,O-(4-ethoxyl-butyl)berbarmine(EBB)则是我国学者合成的小柏胺衍生物中最强的钙调素拮抗剂之一^[1]。本研究以家兔角膜斑痕中培养出来的成纤维细胞为实验对象,观察了EBB对培养的这种细胞生长增殖的影响,并探讨了其作用机理。

材 料 和 方 法

主要试剂 RPMI 1640 培养液购于GIBCO公司,EBB由南开大学分子生物所提供。³H-TdR和³H-脯氨酸为北京401所产品。ABTS[2,2'-amino-di(3-ethylbenzthiazoline-sulphonic acid)ammonium salt]购于德国Boehringer Mannheim GmbH公司。

方 法

1. 成纤维细胞的培养和传代

成纤维细胞取自烧伤3个月后的兔角膜斑痕组织。在加有18%新生牛血清(18% CS)的RPMI 1640常规培养液中,置含5%CO₂、37℃的培养箱中培养。传2—3代后,移入24孔板或培养瓶中供药理学研究。

2. EBB对成纤维细胞生长的影响

在常规培养条件下生长的成纤维细胞,经台盼蓝染色,计数活细胞,然后加入不同浓度的EBB(1.375—6.0 μg/ml),每组5个样品,分别于24, 48, 72和96小时做细胞计数。取培养时间相同未加药的细胞作为对照。

在³H-TdR掺入实验中,对照组和用药组的成纤维细胞浓度为1.5×10⁴/ml,每组3个样品,培养24

小时后加入³H-TdR(1 μci/ml)过夜,然后收集细胞作液闪测定。

3. 钙调素水平的检测

按文献[2]方法将钙调素与牛血清白蛋白用戊二醛交联后免疫家兔,制备钙调素抗血清。培养的成纤维细胞加入EBB(4.5 μg/ml),72小时后计数,并取数量相同未加药的细胞作为对照。细胞经匀浆及超声破碎后,离心取上清液,加热至沸腾,冷却后再离心取上清液。用ELISA检测两组细胞上清液中的钙调素水平(XZ-88酶联免疫检测仪610 nm测定O.D值)。

4. EBB对常规培养成纤维细胞生长周期影响的检测

培养的成纤维细胞加EBB(8 μg/ml)72小时后,收集细胞,充分洗涤,固定及碘化丙锭染色,取未加药组为对照。用流式细胞光度计(EPICS V 541)检测两组细胞DNA时相的分布。

5. EBB对培养的成纤维细胞³H-脯氨酸掺入的影响

培养的成纤维细胞加入EBB(5 μg/ml)12小时后,加入³H-脯氨酸(10 μci/ml)过夜,以未加药组为对照,收集细胞做液闪测定。

结 果

一、EBB对成纤维细胞生长的影响

EBB对成纤维细胞增殖具有直接的抑制效应,当植入的细胞数为1.5×10⁴时,EBB对成纤维细胞的半抑制量为4.5 μg/ml。细胞生长曲线的变化与EBB浓度呈剂量依赖关系(图1)。

EBB对成纤维细胞³H-TdR掺入的影响也有如上的规律。当EBB的浓度从0.1增至10 μg/ml时,³H-TdR掺入的抑制率从8.8%增至

注:国家自然科学基金资助项目。

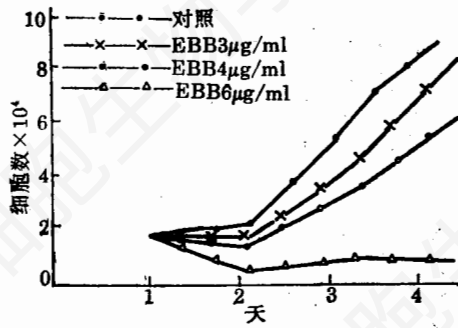


图1 EBB对成纤维细胞生长的影响

表1 EBB对培养成纤维细胞³H-TdR掺入的影响

EBB (μg/ml)	CPM × 10 ⁴ (X̄ ± SD)	抑制率 (%)
0.0	5.85 ± 0.07	
0.1	5.53 ± 0.04	8.8
0.5	4.94 ± 0.61	15.5
1.0	4.79 ± 0.18	18.1
10.0	2.46 ± 0.27	57.9

57.9%(表1)。

二、EBB对成纤维细胞钙调素水平的影响

在细胞数相同的各组中,实验组成纤维细胞的钙调素水平均明显低于对照组(图2)。

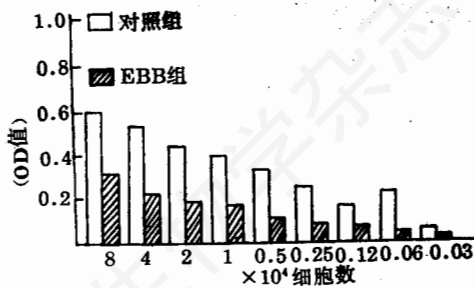


图2 EBB对成纤维细胞钙调素水平的影响

三、EBB对成纤维细胞DNA含量的影响

流式细胞分光光度计测试表明,培养的成纤维细胞加入EBB后,G₀+G₁期DNA含量明显高于对照,G₂+M期的DNA含量则低于对照(表2)。

四、EBB对成纤维细胞³H-脯氨酸掺入的影响

当EBB浓度为5 μg/ml时,³H-脯氨酸的

表2 EBB对成纤维细胞增殖周期的影响

	(G ₀ +G ₁)% (X̄ ± SD)	S% (X̄ ± SD)	(G ₂ +M)% (X̄ ± SD)
对照组 (n=10)	44.10 ± 5.09	25.20 ± 5.57	30.70 ± 8.76
EBB组(8 μg/ml) (n=11)	52.82 ± 6.01**	23.91 ± 5.38	23.09 ± 4.06*

**P<0.01, *P<0.05。

掺入受到明显抑制,抑制率为31%(表3)。

表3 EBB对³H-脯氨酸掺入的影响

	n	CPM (X̄ ± SD)	抑制率 (%)	P
对照组	3	394 ± 19.75		
EBB组 (5 μg/ml)	3	272 ± 10.29	31.0	<0.01

讨论

钙调素是Ca²⁺的受体蛋白,在细胞的生长代谢中起着重要的作用^[3-6]。在细胞分裂周期中钙调素的浓度随着细胞周期时相而变化。钙调素拮抗剂能特异地延迟细胞进入和通过S期。钙调素在DNA合成早期是必不可少的成分^[7,8]。已证明外源性钙调素也能刺激人体淋巴细胞的DNA合成。加入钙调素能逆转药物抑制的DNA合成^[10]。EBB是最强的钙调素拮抗剂之一,其拮抗钙调素的IC₅₀值比粉防己碱要低100倍以上,与R₂₄₅₇₁属同一数量级^[11]。大量的实验研究证明汉防己甲素对实验性矽肺以及矽肺患者均有良好的疗效^[12]。为了研究EBB是否具有抗纤维化的作用,我们在细胞水平上探讨了EBB对成纤维细胞增殖和功能的影响以及该作用与钙调素水平和细胞增殖周期的关系。实验结果表明EBB对成纤维细胞的生长具有直接的抑制作用,在细胞增殖周期中,G₀+G₁期细胞中DNA含量明显增加,而G₂+M期的DNA含量则减少,表明EBB使细胞停滞于G₀+G₁期,而进入合成和分裂期的细胞明

显减少。经 EBB 作用后,胞内钙调素水平的减少,我们认为可能是由于 EBB 抑制细胞增殖,细胞停滞于生长周期中的静止期,导致胞内钙调素合成受阻,含量减少。而钙调素含量的下降,又进一步阻碍细胞增殖。EBB 明显地抑制成纤维细胞的 ^3H -脯氨酸掺入,表明 EBB 具有抑制胶原的合成作用。关于 EBB 的作用机制,我们推测是直接抑制 Ca^{2+} -CaM 复合物对其靶酶的激活调节作用,使其靶酶处于失活状态,从而抑制成纤维细胞的增殖。

摘 要

为了研究钙调素拮抗剂 EBB 对成纤维细胞增殖和功能的影响,我们观察了经 EBB 作用后成纤维细胞的生长曲线、 ^3H -TdR 掺入、钙调素水平的变化以及细胞增殖周期中 DNA 的改变和 ^3H -脯氨酸掺入。结果表明 EBB 直接抑制细胞增殖,使钙调素水平下降, DNA 合成受阻,并使细胞停滞于生长周期中的 $G_0 + G_1$ 期。另外,胶原合成也受到阻抑。

参 考 文 献

- [1] Xu YH, et al., 1986, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40: 461.
- [2] 徐宜为, 1979, 免疫学技术, 科学出版社, 北京, pp. 245.
- [3] Cheung WY, et al., 1980, *Science*, 207 (4): 19.
- [4] Means AR, Dedman JR, 1980, *Nature*, 285: 73.
- [5] Sasaki Y, et al., 1982, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104: 451.
- [6] Rasmussen CD, Means AR, 1988, in *Calcium Signal and Cell Response*. ed: by Yagi K & Miyazaki T, PP. 254, Japan Scientific Societies Press.
- [7] Chafouleas JG, et al., 1982, *Cell*, 28: 41.
- [8] Chafouleas JG, et al., 1984, *Cell*, 36: 73.
- [9] Boynton AL, et al., 1980, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95: 745.
- [10] Neil SM, et al., 1984, *J. Invest. Dermatol.*, 83: 15.
- [11] Gietzen K, et al., 1981, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 101: 418.
- [12] 全国矽肺研究协作组, 1982, 矽肺研究论文专集。

机械性刺激对体外培养心肌细胞形态的影响

马学惠 赵元昌 尹 镭

(山西医学院 太原 030001)

有机体细胞对外界刺激的(包括机械的、化学的)反应是当前细胞生物学领域广泛研究的课题之一。机械刺激对心血管系统功能具有特殊重要性,因为正常人体心血管不断接受着血容量及压力改变的机械性刺激。过去曾有人研究过机械作用对内皮细胞形态的影响^[1],但机械性刺激对心肌细胞形态的影响尚未见报道。本实验则是将体外培养的心肌细胞进行机械性刺激,观察其对心肌细胞形态的影响。

材 料 与 方 法

一、心肌细胞分离与培养 方法同以前报道的^[2]

稍加改进。简单讲,采用出生后 4—5 天 S.D 大鼠, 75%酒精消毒皮肤,断头,迅速取出心脏,剪碎放入三角瓶中,加入 0.05%胶原酶 10 ml,于 37℃水浴中震荡(100 周期/分) 10 分钟,待自然沉淀后取出上清液。于原三角瓶中再加入 10 ml 新鲜胶原酶液,如此反复 6 次后,弃掉前两次上清液,第 3 次以后上清液中分别加入 20 ml KRB 液,离心(500×g, 8 分钟)沉淀。所得沉淀物混悬于 30 ml KRB 液中,用 250 μm 尼龙网过滤,再用 5 ml 液体清洗网上细胞,浓缩混悬于 10 ml 缓冲液,作细胞计数。调整细胞密度为 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$,接种于 100 mm 培养皿,培养皿事先放入硅胶片(每个培养皿放两块,每块大小为 4cm × 7 cm),然后用层粘连蛋白包被(10 μg/ml)。培养液用 F 12 K,加