

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 镛

(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

入8%马血清(Flow Laboratories, McLean, Va, U. S. A.), 3%小牛血清, 青霉素(100单位/ml), 链霉素(100 µg/ml), 二性霉素(Fungizone, 0.25 µg/ml)及阿糖胞苷(Cytosine Arabinoside, 10 µg/ml), 于CO₂培养箱内培养, 隔日换培养液一次。换液前显微镜下观察细胞生长情况。3天后将硅胶片放入特制的塑料框架上, 进行机械性刺激实验。

二、硅胶片 为市售硅胶片, 选用厚度为0.01吋(0.0254 cm)较为适合。其特点是: 容易拉长与回弹, 不变形, 无毒, 可高压消毒, 可重复使用, 而且无自发荧光。硅胶片半透明, 可透过足够的光线进行显微镜下观察。用前将硅胶片剪成4cm×7cm长方形, 用蒸馏水浸泡24小时, 然后高压消毒备用。

三、机械性刺激装置 取两个Pyrex玻璃缸(稍大些的切片染色缸), 盛有培养液。每缸内放有一个塑料框架。A缸内框架固定于玻璃缸。将培养3天的心肌细胞的硅胶片固定于框架两端, 其一端连接有拉杆与马达相连, 可将硅胶片作直线拉长、缓解的等速运动。B缸内框架不固定于玻璃缸, 它随拉杆作整体运动, 硅胶片不作拉长或变形运动, 作为摆动对照。另有正常对照, 硅胶片留在原培养皿中继续培养。机械刺激装置的震幅和速度可调节。拉长的幅度一般为10%, 运动的速度为10周期/分。将整个装置放入二氧化碳培养箱中作运动。分别于运动后6、24、48、72小时取材, 作免疫荧光染色, 观察细胞形态改变。

四、免疫荧光检查 将硅胶片取出, 切成4小片, 放于载玻片上, 标明运动方向。用Sorensen's缓冲液配制的2%多聚甲醛液固定10分钟, P.B.S.液洗三次, 每次5分钟, 然后用0.1mol/L glycine 10分钟, P.B.S.冲洗, Triton-X100 15分钟, P.B.S.洗, 常规间接免疫荧光染色。I抗用兔抗鼠肌动蛋白(actin), II抗用荧光素罗得明标记的羊抗兔抗体。抗体均系美国南卡罗来那大学医学院T. Borg教授馈赠。

结 果

对照组心肌细胞自由生长, 细胞呈星形, 肌动蛋白丝自中心向细胞突起呈放射状, 或直线连接两突起, 横纹清晰可见(图版图1)。作线性伸展运动的心肌细胞, 于运动后6小时开始发生变化, 细胞出现方向性改变。至运动24小时后, 大多数心肌细胞长轴变得与运动方向垂直, 细胞的突起减少, 在细胞接种稀疏区域,

细胞不相接触, 则这种变化明显(图版图2); 在细胞密集区, 细胞互相接触, 此种改变不明显。摆动对照组心肌细胞排列松散, 横纹不明显, 心肌细胞粗大, 但细胞内肌动蛋白未发生方向性改变(图版图3)。

运动拉长幅度在10%时, 变化最明显, 超过10%时, 细胞发生脱落, 若小于5%则无方向改变发生。

讨 论

文献报道曾发现血管壁平滑肌与内皮细胞在受到机械性刺激时, 发生细胞结构方向性改变^[1,3]。正常血管内皮细胞的长轴与血流方向相一致。以前人们认为这种一致与血流冲击有关, 因为体外培养的内皮细胞不受血流冲击, 所以长成多角形。经研究发现, 内皮细胞形态实际是与血管受到血容量及压力作用发生膨胀有关。长期膨胀的机械作用, 使其垂直于血管膨胀的方向, 因而内皮细胞变长, 与血管长轴相一致。当动脉壁发生粥样硬化时, 粥样斑块因丧失膨胀能力, 斑块表面的内皮细胞则呈多角形^[4]。由此可见, 当心肌细胞受到拉长的机械性刺激时, 所产生的肌动蛋白方向改变是不足为奇的。正常人体心肌细胞为多层, 呈不同方向排列, 当血容量增加及压力改变时, 心肌细胞会产生一定的反应。Spotnitz等曾提出在心脏肥大和心力衰竭时, 心肌细胞可发生方向和结构的改变^[5]。

低等生物的细胞对物理性刺激的反应, 在维持其生存上起重要的作用; 在高等生物则对化学性刺激的反应占统治地位, 但对物理刺激的反应仍然存在, 特别是心血管系统。在心血管系统的发生上及疾病时(如高血压病), 心肌细胞对机械性刺激的反应仍然起着重要的作用。

摘 要

体外培养新生大鼠心肌细胞于硅胶片上, 进行周期性、机械性刺激, 观察物理刺激对心

肌细胞形态的影响。结果表明,当用10%幅度拉长、松弛硅胶片,10周期/分,进行72小时机械性运动后,心肌细胞发生形态改变,其细胞内肌动蛋白垂直于运动方向,说明机械性刺激能影响体外培养心肌细胞形态。

图版说明

1. 硅胶片上生长的正常对照心肌细胞。细胞具有典型的星形,细胞内肌动蛋白丝呈放射状分布,横纹明显。间接免疫荧光染色肌动蛋白 $\times 400$

2. 硅胶片上经伸展与缓解的机械性刺激的生长心肌细胞。拉长幅度为10%,10周期/分。刺激24小时后的心肌细胞形态发生改变,细胞内肌动蛋白丝垂直于运动的方向,细胞突起减少(箭头所指为运动方向)。间接免疫荧光染色肌动蛋白 $\times 400$

3. 作摆动运动的对照心肌细胞。细胞内肌动蛋白丝排列松散,横纹不明显,心肌细胞稍粗大,但细胞未发生方向性改变。间接免疫荧光染色肌动蛋白, $\times 400$

参考文献

- [1] Ives CL et al., *In vitro*, 1986; 22: 500-507.
- [2] Borg TK et al., *Dev. Biol.*, 1984; 104: 86-96.
- [3] Dartsch PC et al., *Eur J Cell Biol.*, 1986; 41: 339-346.
- [4] Lewis JC et al., *Lab Invest.*, 1982; 46: 123-138.
- [5] Spotnitz HM et al., *Am J Carliol.*, 1973; 32: 398-406.

脑型肌酸激酶抗原的处理方法对小鼠免疫应答的影响

童春香 朱勇刚 孙斐均

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

肌酸激酶(creatine kinase, CK)同工酶是由M和B两种亚基组成的二聚体。CK-MM(肌型肌酸激酶)存在于骨骼肌等处,CK-BB(脑型肌酸激酶)则存在于脑组织。CK-BB和CK-MB在人血清中游离浓度的测定可分别作为脑损伤、心肌梗塞等疾病临床诊断的指标^[1,2]。

Thi man等人发现^[3],有的小鼠品系(如BALB/C)对天然状态的CK-MM的免疫应答反应很弱,而使用高聚状态的CK-MM免疫该品系小鼠,则最终可以获得对天然CK-MM高亲和力的单克隆抗体(McAb)。最近,我们在研制CK-BB的McAb过程中也观察到同样的现象。本文报道这方面的结果。

材料和方法

一、抗原处理 纯化的CK-BB由上海医科大学心血管研究所制备提供,浓度为3.3 mg/ml。第一种处理方法是样品置56℃水浴中变性2小时;第二种处理方法是参考Thi man等的报道^[3],但样品中加入

戊二醛的浓度为0.6%(W/V),室温下处理5小时后再加50 mmol/L赖氨酸,反应1小时,以封闭游离的戊二醛。

二、小鼠免疫 8周龄、体重18克左右的BALB/C小鼠和F₁(BALB/C \times ICR)小鼠均由本所动物饲养室提供,各分为CK-BB热变性组、戊二醛处理组和天然CK-BB对照组,每组均为3只小鼠。免疫剂量为每只100 μ g/只。第一次免疫抗原与等体积福氏完全佐剂混合乳化,以后各次免疫抗原与福氏不完全佐剂混合。皮下和腹腔注射。各次免疫间隔为4周,免疫次数见表1,2所列。

三、抗体检测方法 采用ELISA夹心法。96孔酶标板直接包被纯化抗原(CK-BB, CK-MM, CK-MB),抗原浓度为10 μ g/ml。第二抗体为抗鼠IgG-过氧化物酶结合物,底物是四甲基联苯胺。检测采用美国Bio-Rad公司生产的酶标仪,波长为450 nm。

四、杂交瘤细胞建株 取戊二醛处理组F₁小鼠脾细胞,与653小鼠骨髓瘤细胞按5:1融合(50%PEG, MW 4000),常规操作。检测到的阳性细胞孔,再经有限稀释法克隆5次,最后得到两株抗CK-BB的杂交瘤株。