

大黄素对肾小球系膜细胞 PCNA 的影响

刘志红 黎磊石 胡伟新 周虹

(金陵医院解放军肾脏病研究所 南京 210002)

增殖细胞核抗原(proliferating cell nucleus antigen, PCNA), 是一种在 S 期开始在核内出现, 而在 S 期结束后消失的与细胞周期有关的蛋白质, 它的动态变化可以反映细胞由 G₁ 期进入 S 期的速率。在细胞周期调控机制中, c-myc 原癌基因的表达能够促使细胞由 G₁ 期进入 S 期^[1]。我们以往的工作已证实大黄素具有抑制肾小球系膜细胞 c-myc 基因表达的作用^[2]。为了进一步论证大黄素对 c-myc 基因的产物也有相应的减弱效应, 本文观察了大黄素对肾小球系膜细胞 PCNA 的影响。

材料和方法

1. 大黄素 (Emodin) 系从大黄生药中分离出的蒽醌衍生物, 化学名称为 8-甲基-1,6,8-三羟基蒽醌。由中国药科大学陈琼华教授惠赠。抗增殖细胞核抗原(PCNA) 单克隆抗体由美国华盛顿大学 William G. Couser 教授惠赠。

2. 肾小球系膜细胞培养 SD 大鼠经颈椎脱臼致死, 无菌条件下摘除肾脏。按常规方法^[3]用机械网筛法分离收获肾小球, 经 RPMI 1640 培养液洗 3 次, 镜检肾小球纯度大于 90%。将肾小球置于含 20% 灭活胎牛血清(FCS), 200 nm/ml 胰岛素的 RPMI 1640 培养液中, 在孵育箱 (37℃, 5%CO₂, 95%O₂) 中培养, 3 天左右肾小球周围长出形态为卵圆形的上皮细胞, 以后履满瓶底, 3 周左右上皮细胞逐渐死亡。代之以棱形或星状的系膜细胞, 经胰蛋白酶消化, 传代培养。

3. 实验分组及流程 取第四代系膜细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化后, 吸入到置有小载玻片的 6 孔板中 (2 × 10⁵ 细胞/孔)。待细胞贴壁后, 根据实验目的换以不同的实验培养液。实验培养液分为两组: A 组, 15% FCS + 1640 培养液做为对照; B 组, 15% FCS + 1640 培养液 + 大黄素 (25 μg/ml)。每组设两个

复孔。继续培养 24 小时后, 取出载玻片, 用 PBS 洗涤后进行 PCNA 染色。

4. 肾小球系膜细胞 PCNA 染色及计数 PCNA 在细胞中含量较少, 用直接法和间接法难以显示。我们选用敏感性高、背景染色好的 PAP 四步法染色。该法借助三层桥抗体 (其中第二、第三抗体均标有辣根过氧化物酶), 能使抗原信号逐级放大。其步骤可概括为, 将贴附有系膜细胞的载玻片用冷丙酮固定 10 分钟, 用 PBS 洗涤后, 加 PCNA 单克隆抗体, 37℃ 孵育 1.5 小时, 用 PBS 洗涤, 加辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠抗体 (Dako), 37℃ 孵育 40 分钟, PBS 洗涤, 加辣根过氧化物酶标记的猪抗兔抗体, 37℃ 孵育 40 分钟, 用 PBS 冲洗, 加兔 PAP, 37℃ 孵育 40 分钟后, 用 DAB-H₂O₂ 显色 5 分钟经苏木素复染细胞核后封片。每张染色玻片计数 250 个细胞及 PCNA 阳性和阴性细胞各自所占的绝对数, 结果以百分数表示。

结果

一、肾小球系膜细胞的鉴定 Thy-1 抗原是肾小球系膜细胞表面标志抗原之一^[4]。在相位差显微镜下观察系膜细胞呈梭形或星形。用抗-Thy-1 抗体以间接荧光法进行染色, 系膜细胞 Thy-1 抗原呈阳性反应。

二、肾小球系膜细胞 PCNA 染色结果 系膜细胞 PCNA 阳性细胞的着色特点并不均一, 可根据其着色类型将 PCNA 阳性细胞分为 S 期早期 (S₁ 期) 和后期 (S₂ 期)^[5]。S₁ 期细胞表现为细胞核内出现均匀的棕褐色小颗粒, S₂ 期细胞则核内上述颗粒数目减少, 但体积增大, 向核仁周围聚集。

从表 1 中可以看出, 对照组非 S 期细胞, 即 PCNA 阴性细胞占 6.8%, 大黄素组占 26.0%, 大黄素组非 S 期的细胞数明显多于对照组 (P < 0.001), 表明大黄素能够抑制肾小球

表 1 大黄素对肾小球系膜细胞 PCNA 的影响

	非 S 期细胞*	S 期细胞*	
		S ₁ 期	S ₂ 期
对 照 组	17(6.8%)	56(22.4%)	177(70.8%)
大黄素组	65(26.0%)**	96(38.4%)	89(35.6%)

* 计数 250 个细胞, PCNA 阴性(非 S 期)和 PCNA 阳性(S 期)细胞的绝对数, 括号内为其所占百分数。

** $p < 0.001$, Vs 对照组。

系膜细胞进入 S 期。不仅如此, 上述两组之间 S 期细胞中 S₁ 期细胞与 S₂ 期细胞所占的比例也存在着差异。对照组 S₂ 期细胞占 S 期细胞总数的 75.9%(127/233), 而大黄素组 S₂ 期细胞只占 S 期细胞总数的 48.1%(89/185)。说明大黄素不仅能抑制肾小球系膜细胞进入 S 期, 而且对于已进入 S 期细胞的进一步过渡也有一定的影响。

讨 论

一、PCNA 在细胞周期研究中的地位

增殖细胞核抗原 (PCNA) 是 Mi Yachi 等 1978 年首次报道的^[7], 此后有人证实 PCNA 系细胞核内分子量为 36 kD 的蛋白质。因为 PCNA 于 S 期在核中出现, 又在 S 期结束后消失, 故又称为细胞周期蛋白 (cyclin)^[8]。PCNA 是细胞 DNA 聚合酶系的附属蛋白, 能促进 DNA 聚合酶系延伸 DNA 链, 有增强 DNA 聚合酶 III 活性的作用, 并且不仅与 S 期 DNA 的复制有关, 还可以做为判断 S 期 DNA 含量以及细胞分裂增殖的一个标志^[5,9]。因此, PCNA 单克隆抗体组织化学技术已被广泛用于肿瘤细胞增殖特性和分化程度的研究^[10], 以及系膜增殖性肾炎系膜细胞增生程度的判断指标^[6]。

二、大黄素抑制肾小球系膜细胞 PCNA 表达的意义

研究大黄素在细胞周期调控中作用的设想源于我们最初的工作, 即大黄素能够抑制肾小球系膜细胞的增殖^[2]。为了对大黄上述作用的分子机制进行探讨, 我们继而观察了大黄素对肾小球系膜细胞 c-myc 原癌基因表达的影响,

发现大黄素能够明显抑制系膜细胞 c-myc 原癌基因的表达^[2]。大黄素在抑制 c-myc 原癌基因表达的同时, 对其基因产物是否也有同样的效应? 也就是说, c-myc 癌基因 mRNA 表达被抑制后, 细胞进入 S 期的速率是否也相应地减慢? c-myc 癌基因产物定位于细胞核内, 并且结合在双链或单链 DNA 上。虽然有报道用抗 c-myc 癌基因产物羧基末端不同部分的合成寡聚多肽的抗血清检测 c-myc 癌基因产物, 由于该基因产物不稳定, 给我们进一步分析大黄素与 c-myc 癌基因产物的关系带来了困难。PCNA 是出现在 S 期的特异性标志物, 观察细胞 PCNA 的变化能帮助我们了解细胞由 G₁ 期进入 S 期的速率, 对于判断 c-myc 癌基因产物的作用可能会提供一些间接的依据。在研究中我们发现大黄素组与对照组相比非 S 期细胞明显增多, 证明了在细胞周期活动中大黄素确实能够阻抑肾小球系膜细胞向 S 期的过渡, 而这一过程的产生很可能是通过抑制系膜细胞 c-myc 癌基因表达来完成的。此外, 在研究中我们还发现, 大黄素仅能抑制系膜细胞进入 S 期, 而且对于已进入 S 期细胞的进一步过渡也有影响。具有 S₂ 期特征的细胞不仅出现在 S 期后期, 并且标志着 DNA 的合成^[9]。对照组 S₂ 期细胞占 S 期细胞总数的 75.9%, 大黄素组 S₂ 期细胞只占 S 期细胞总数的 48%, 这一效应的产生可能同样是 c-myc 癌基因受到抑制的结果。在细胞癌基因中, c-fos 能促进细胞由 G₀ 期进入 G₁ 期, 但对其后的细胞周期活动不产生影响, 而 c-myc 则不同, 它除了在细胞由 G₁ 期向 S 期过渡时有高表达

外,在细胞周期的其它时限仍有基础水平的表达^[12]。那么在 c-myc 癌基因被大黄素抑制的情况下,势必对 S 期细胞的进一步过渡产生一定的影响。

摘 要

本文应用体外肾小球系膜细胞培养和免疫组化染色技术,以增殖细胞核抗原(PCNA)为标志抗原,观察了大黄素对肾小球系膜细胞周期调控的影响。发现大黄素能明显抑制系膜细胞从 G₁ 期进入 S 期,同时对已进入 S 期细胞的进一步过渡也有影响。

参 考 文 献

- [1] Kurki P, et al., 1986, *Ecp Cell Res.*, 166: 209.

- [2] 刘慈红等, 1992, 肾脏病与透析肾移植杂志, 1: 27.
[3] Kreisder, JI, et al., 1983, *Kidney Int.*, 23: 439.
[4] Paul LC, et al., 1984, *Kidney Int.*, 25: 771.
[5] Dierendonk JHV, et al., 1991, *Am J Pathol.*, 138: 1165.
[6] Floege J, et al., 1992, *Kidney Int.*, 41: 297.
[7] Miyachi K, et al., 1978, *J Immunol.*, 121: 2228.
[8] Bravo R, et al., 1980, *J Cell Biol.*, 84: 795.
[9] Celis JE, et al., 1985, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 82: 3262.
[10] Gerde J, et al., 1991, *Am J Pathol.*, 138: 867.
[11] Walf G, et al., 1991, *Kidney Int.*, 39: 401.

人胃癌结合 β 半乳糖苷凝集素对不同细胞的凝集作用

许凤浩 刘在贵

(滨州医学院生化教研室 山东 256603)

动物凝集素是细胞内或细胞膜上的一种糖结合蛋白,参与细胞间的识别联接,调节着细胞的生长发育。研究表明,细胞膜上的凝集素可以与相邻细胞膜的糖基结合,促进细胞之间的联接^[1]。仓鼠成纤维细胞中的凝集素能够促进仓鼠成纤维细胞间的粘附^[2];正常细胞被诱导恶变后,其表面凝集素不但表达量增高^[3],而且在肿瘤细胞转移中具有重要作用^[4];此外抗肿瘤细胞凝集素抗体能够抑制肿瘤细胞的聚集^[5]。人溃疡型胃癌是滨州地区的一种常见高发恶性肿瘤。最近,我们从该类型肿瘤中(包括鳞癌和腺癌),分离和纯化出对 β 半乳糖苷键有高亲和力的一种凝集素,称为 β 半乳糖苷凝集素,简称 LBP。乳糖是其有效的抑制剂。本文报道纯化的 LBP 对不同细胞的凝集作用。

材 料 和 方 法

材料

溴化氰活化的 Sepharose 4 B 和 Fetuin(Fluka), Sephadex G 50(pharmacia), PMSF(Merck), Trypsin(Difco), 乳糖(上海化学试剂一厂)。昆明种小鼠和家兔取自本院动物室。外科手术后的 人溃疡型胃癌标本均经本院病理科及滨州地区医院病理科确诊证实。

方法

LBP 的分离和纯化:按文献[6]制备亲和层析载体。简言之,取 250 mg 胎球蛋白,用 0.05 mol/L H₂SO₄ 80℃ 水解 1 小时去除唾液酸,并用 pH 8.3 0.1 mol/L NaHCO₃ 溶液充分透析后,按商品说明与 15 g 溴化氰活化的 Sepharose 4 B 偶合,装柱,再用缓冲液充分平衡。将人胃癌标本洗净、称重,剪碎,每克标本加 5 ml 抽提液(pH 7.8 25 mmol/L Tris-HCl 溶液,含 0.1% 脱氧胆酸钠,0.05% Triton X-100, 0.1