

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] Kreisderj, 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, *Pro Notl 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 × 100, 0.1

mmol/L PMSF, 0.3 mol/L 乳糖, 1 mmol/L 二巯基苏糖醇, 0.15 mol/L NaCl 和 0.2 mol/L KCl), 高速匀浆 15 分钟。15000 转冷冻离心 30 分钟取上清液, 用平衡液 (pH 7.8 25mmol/L Tris-HCl 含 20 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L 二巯基苏糖醇, 0.05% Triton × 100 和 0.15 mol/L NaCl) 充分透析后上亲和层析柱。用平衡液洗涤至无杂蛋白流出后改用 0.3 mol/L 乳糖洗涤, 收集蛋白峰。将蛋白峰合并浓缩, 经 Sephadex G 50 柱层析, 收集血凝活性峰。并用 PAGE 检测纯度。

细胞悬液的制备 1. 人胃癌细胞: 将新鲜人胃癌标本瘤体部分洗净剪碎, 用 0.25% Trypsin 和 4 mmol/L EDTA 37°C 消化 2 小时, 再用不锈钢筛过滤收集单个细胞, 基本全部为癌细胞。生理盐水洗涤后备用; 2. 小鼠脾细胞和小鼠胸腺细胞: 取小鼠 4 只, 脱颈椎处死, 分别取脾和胸腺, 用不锈钢筛过滤收集单个

细胞, 生理盐水离心洗涤, 0.1% 戊二醛室温固定 1 小时, 然后用 0.7% 甘氨酸溶液离心洗涤 3 次备用; 3. 兔外周血红细胞的消化固定按文献[7]。

结合 LBP 的琼脂糖颗粒的制备 将纯化的 LBP 用 pH 8.3 的碳酸缓冲液充分透析后, 按商品说明与溴化氰活化的 Sepharose 4 B 结合。结合 LBP 后的琼脂糖颗粒用瑞氏染液染 1 分钟, 离心洗净。染色后的琼脂糖颗粒镜下呈蓝色。

LBP 对兔红细胞、小鼠脾细胞和胸腺细胞凝集作用的检测 在“V”型孔板中每孔加入缓冲液 50 微升, LBP 溶液 (100 μg/ml) 50 微升, 检测细胞 15 微升 (0.5 - 1.0 × 10⁹/ml), 混匀后室温静置 90 分钟观察结果。凝集孔呈片状, 非凝集孔呈点状。无色的小鼠脾细胞和胸腺细胞经台盼蓝染色后能够象红细胞一样进行检测 (图 1)。

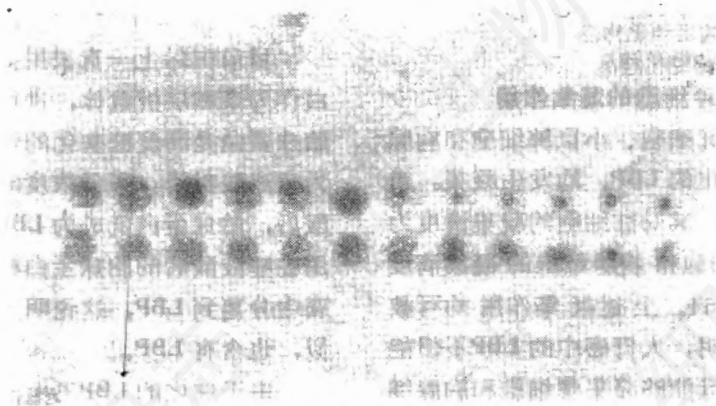


图 1 兔红细胞和蓝染后小鼠脾细胞在 LBP 作用下的凝集图像
上下两行 LBP 含量相等, 从左向右用缓冲液连续等倍稀释
上行: 蓝染后小鼠脾细胞
下行: 兔红细胞

LBP 对混合细胞凝集作用的检测 将小鼠脾细胞分别与兔红细胞及人胃癌细胞混匀, 然后分为对照组、实验组和糖抑制组。对照组为混合细胞加缓冲液, 实验组为混合细胞加 LBP 溶液, 糖抑制组为混合细胞加 LBP 溶液和 0.3 mol/L 乳糖溶液。混匀后分别涂片, 室温凉干, 瑞氏染液染色, 镜下观察结果。

结合 LBP 的琼脂糖颗粒对兔红细胞吸附作用的检测 在平底孔的组织培养板中进行, 分糖抑制组和实验组。糖抑制组加 0.3 mol/L 乳糖溶液 50 微升, 红细胞 25 微升和结合 LBP 的琼脂糖颗粒 25 微升; 实验组加缓冲液 50 微升, 红细胞 25 微升和结合 LBP 的琼脂糖颗粒 25 微升, 混匀后静置 1 小时镜下观察结果。

结 果

一、两次层析后的 LBP 达电泳纯

将人溃疡型胃癌匀浆透析去除乳糖和去垢剂, 经去唾液酸后的胎球蛋白柱进行亲和层析, 再进行凝胶过滤层析, 合并血凝活性峰, 浓缩后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)。电泳结果显示样品为单一条带 (图 2)。

应用此种方法从 12 例典型人溃疡型胃癌组织中 (1200 g), 分离得到约 12 mg 纯化的 LBP, 并用以进行以下研究。

PS₂ PS₁ RS



图2 人胃癌LBP的PAGE图谱

RS: 未纯化样品
PS₁: 浓缩后纯化样品
PS₂: 未浓缩纯化样品

二、LBP对3种细胞的凝集作用

将醛化固定的红细胞、小鼠脾细胞和胸腺细胞中分别加入纯化的LBP,均发生凝集。当LBP的含量一定时,其对红细胞的凝集滴度为1:256,对小鼠脾细胞和胸腺细胞的凝集滴度分别为1:128和1:64。上述凝集作用均可被乳糖抑制。结果说明,人胃癌中的LBP不但能够凝集红细胞,而且能够凝集脾细胞和胸腺细胞。由于后两种组织富含淋巴细胞,提示如果人胃癌细胞能够向其生存环境中释放LBP,将对免疫活性细胞产生一定作用。

三、LBP促进3种细胞间的凝集作用

无LBP存在时,混合后的兔红细胞和小鼠脾细胞均匀散在分布(图版I图1A);有LBP存在时,兔红细胞和小鼠脾细胞相互凝集(图版I图1B);存在LBP同时加入乳糖,则混合后的兔红细胞和小鼠脾细胞无凝集现象。结果说明这种不同细胞间的凝集作用是由LBP引起的。

将人胃癌细胞和小鼠红细胞混匀,人胃癌细胞能够自发地吸附红细胞(图版I图2A),不过这种吸附量不多,同型细胞之间(红细胞与红细胞,胃癌细胞与胃癌细胞)无凝集;在人胃

癌细胞和红细胞中加入LBP,不但同型细胞之间明显凝集,而且异型细胞(胃癌细胞与红细胞)之间也明显凝集(图版I图2B);在含有LBP的混合细胞悬液中加入乳糖,则凝集作用减弱,但不消失(即不象红细胞和脾细胞那样完全散开)。

四、结合LBP的琼脂糖颗粒对红细胞也有吸附作用

将兔红细胞与结合LBP的琼脂糖颗粒混匀,镜下见琼脂糖颗粒表面吸附了大量的红细胞(图版II图3)。若将兔红细胞与结合LBP的琼脂糖颗粒混合的同时加入乳糖,则吸附现象减弱。

讨 论

目前国际上一直采用去唾液酸后的胎球蛋白作为亲和层析载体,进行LBP的分离纯化。胎球蛋白是高度糖基化的蛋白质,其糖链末端为唾液酸封闭。经低浓度的硫酸加热去除唾液酸后,胎球蛋白就成为LBP的天然配体^[8]。使用去唾液酸后的胎球蛋白柱能够从人溃疡型胃癌中分离到LBP,这说明人胃癌与其它肿瘤类似,也含有LBP。

由于纯化的LBP不但能够促进同类细胞间的凝集,而且能够促进异型细胞间的凝集,特别是这种凝集作用能够被乳糖完全抑制或减弱,说明人胃癌所含的LBP确实参与并介导了细胞间的粘附。同时LBP-琼脂糖颗粒能够大量吸附红细胞,乳糖也能够减弱这种吸附作用,则是LBP介导细胞间粘附的直接证据。

细胞表面的结构是复杂的,正常细胞恶变后,细胞表面粘附分子和配体的含量及结构常有很大变化^[9],这必然要影响到细胞间的识别和联接。因此不难设想,LBP介导的兔红细胞和小鼠脾细胞间的凝集完全被乳糖抑制,而人胃癌细胞和兔红细胞之间可以不同,其凝集作用只能被乳糖部分抑制。由于乳糖只能抑制由LBP引起的凝集,所以加入乳糖只减弱人胃癌细胞和兔红细胞之间的凝集,而不能使之完

全消失。

人胃癌细胞对兔红细胞的粘附能力增强及其LBP表达量增高(待发表资料),则提示如果某些器官或组织中含有大量能够与LBP结合的配体,那么脱落到循环中去的胃癌细胞将有可能通过其表面的LBP分子定向种植或转移到这些组织或器官中。

摘 要

本文使用去唾液酸胎球蛋白柱从人溃疡型胃癌中分离纯化出一种对 β 半乳糖苷键有高亲和力的凝集素(LBP)。乳糖是其有效抑制剂。研究表明,LBP既能促进正常细胞间的凝集,又能促进或介导人胃癌细胞与正常细胞间的粘附,共价结合LBP的琼脂糖颗粒对红细胞的吸附能力增强。而这些作用都可以被乳糖完全或部分抑制。结果提示,LBP可能是在人胃

癌细胞定向转移中起作用的一种重要分子。

参 考 文 献

- [1] Lotan, R. et al., 1988, *J. Cell. Biochem.*, 37: 107.
- [2] Stojanovic, D. et al., 1983, *J. Cell. Biochem.*, 21: 119.
- [3] Raz, A. et al., 1987, *Int. J. Cancer*, 39: 353.
- [4] Meromsky, L. et al., 1986, *Cancer Res.*, 46: 5270.
- [5] Lotan, R. et al., 1985, *cancer Res.*, 45: 4349.
- [6] Allen, H. J., 1986, *Immun. Invest.*, 15: 379.
- [7] Barondes, S. H. et al., 1976, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68: 856.
- [8] Baenziger, J. U. et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254: 789.
- [9] Nicolson, G. L., Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis. *Semin. Cancer Biol. (United States)* 1991; 2 (3): 143.

裸小鼠人脑胶质瘤模型NHG-1的细胞染色体分析

徐庚达 马文雄 谢学顺 杜子威

(苏州医学院脑神经研究室 215006)

接种人肿瘤组织后,荷瘤鼠肿瘤细胞染色体检测技术是一项鉴别人移植瘤或鼠自发瘤的灵敏、可靠方法^[1,2]。本实验将我室建立的SHG-44人脑胶质瘤细胞系第67代细胞、及由该细胞系接种于裸小鼠以后建立的NHG-1第1、22、35、40、45和50代移植瘤进行了染色体的初步分析,探讨该模型的一些细胞遗传学特征。

材 料 与 方 法

一、实验动物 1981年从日本引进NC裸小鼠,在本室NASA 1000级裸鼠房内饲养繁殖。将SHG-44细胞系第67代细胞^[3],按 1×10^7 /只鼠进行裸小鼠皮下接种。移植成功后继续以移植瘤组织进行裸小鼠接

种传代^[4]。

二、染色体制备 将液氮中保存的SHG-44第67代细胞,及NHG-1第1和22代移植瘤原代培养细胞解冻复苏,在含有新生小牛血清20%、条件培养基10%、双抗常规量的RPMI-1640培养液中(GIBCO)培养,其它条件同以往报道^[5,6]。待细胞生长旺盛时加入秋水仙素(最终浓度 $0.07 \mu\text{g/ml}$),NHG-1模型第35、40、45和50代实验鼠,颈椎脱臼处死后取移植瘤组织,用机械分离法分离过滤,使成单细胞悬液^[6],加入秋水仙素(最终浓度 $0.5 \mu\text{g/ml}$)。然后分别置 37°C 二氧化碳培养箱2—3h,收集细胞,作染色体制备。

三、染色体显带技术 将待制备的染色体标本置室温下1—2天,G显带按Seabright法^[7],用0.25%胰酶,pH 7.2处理标本1.5—2min,Giemsa染色8—10min。选择分散良好,带纹清晰的细胞,摄影及放