

- [9] Wolosewick, J. J., 1979, In *Practical Tissue Culture Application*, pp. 59—85, Academic Press, New York.
- [10] Capco, D. G. et al., 1984, *J. Cell Biol.*, 98: 1978—1885.
- [11] Franke, W. W. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 5034—5038.
- [12] Laemmli, U. K. et al., 1970, *Nature*, 213: 421—422.
- [13] Towbin, H. et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350—4354.
- [14] Miller, C. A. et al., 1991, *Carcinogenesis*, 12(2): 269—276.
- [15] 高健刚等, 1994, *实验生物学报*, 27(4): 463—474.

LTD₄ 对系膜细胞促增殖作用机制的研究

吴升华 林致华 练棣华

(南京医科大学第一附属医院 南京 210029)

花生四烯酸 5 脂氧化酶产物白三烯 D₄ (LTD₄) 可使血管、支气管及胃肠道平滑肌收缩, 增加血管壁对大分子物质的通透性, 在免疫炎症反应中起重要作用。近来发现 LTD₄ 可使肾小球毛细血管及肾小球系膜细胞收缩, 促进系膜细胞增殖, 因此参与肾小球疾病的发病^[1]。本文应用 [³H] 胸腺嘧啶核苷 ([³H]TdR) 掺入法测定 LTD₄ 对大鼠系膜细胞增殖的作用, 测定系膜细胞二脂酰甘油 (DAG) 及磷酸肌醇 (IP) 的合成量, 对 LTD₄ 的促增殖作用机制作一探讨。

材料与方 法

一、系膜细胞的培养及鉴定

用系列过筛的方法从 SD 雄性大鼠 (体重 80—100g) 的肾皮质中分离肾小球。将肾小球混悬液与 IV 型胶原酶共孵育后, 用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤混悬液, 将肾小球在 37℃、5% CO₂ 条件下培养于 RPMI-1640 培养液中 (15% 小牛血清, 0.75 U/ml 胰岛素)。每两周细胞传代一次, 在第 4 次传代后得到较纯的系膜细胞, 该细胞在相差显微镜下呈卫星状或纺锤状, 用抗系膜细胞 Thy1 抗原的抗体进行间接免疫荧光染色, 95% 以上的细胞呈阳性。

二、[³H]TdR 掺入法测定细胞增殖^[2]

将系膜细胞培养于 24 孔培养盘中, 每孔细胞数 1 × 10⁴。在细胞生长再汇合 (Subconfluence) 时除去培养液, 加入含 0.5% 小牛血清的培养液。细胞生长停

滞 48 h 后, 加入不同浓度的 LTD₄ (Cayman Chemical), 再孵育 18 h, 然后加入 [³H] TdR (2 μCi/孔, 84.8 Ci/mmol, NEN)。6 h 后去除培养液, 细胞经收集及洗涤后在 LKB 1217 液闪计数器测定 [³H]TdR 掺入量。每试验组由 6 孔组成, 对照组中细胞仅与培养液及 [³H]TdR 共孵育。结果表示为:

$$\frac{\text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100\%$$

三、蛋白激酶 C (PKC) 抑制试验

在荧光灯源下, 生长停滞的系膜细胞与特异性 PKC 抑制剂 Calphostin C (0.6 μmol/L, Biomol) 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中共孵育 3 h^[3]。然后加入 LTD₄ 孵育 18 h, 再测定 [³H]TdR 掺入量, 如上述。

四、系膜细胞 DAG 定量

将系膜细胞培养于 60 mm 的培养皿中 (1 × 10⁶ 细胞/皿), 在生长停滞 48 h 后加入 LTD₄ (1 μmol/L)、表皮生长因子 (EGF, 10 nmol/L) 或 10% 小牛血清, 在对照组中仅加入 PBS。在 37℃ 下孵育 15 min 后收集细胞, 用 Bligh 法抽提细胞脂质^[4], 有机相用于 DAG 定量及总磷脂定量^[5]。在干燥脂质中加入携带溶液, 在超声水浴中振荡 5 min 后加入 DAG 激酶 (Amersham)、反应缓冲液、Dithiothreitol 及 [³²P]ATP 进行反应。将抽提后的脂质点加于 Silica Gel 60 薄层色谱板上层析。将 [³²P] 磷酸斑块置于闪烁液中测定其放射性。用标准底物二油酸脂按上述方法层析并制备

本研究得到美国威斯康辛医学院的 Dimitris P. Kelefiotis 博士支持, 特此致谢。

标准曲线。结果表示为 DAG pMol/nMol 磷脂。

五、系膜细胞 IP 测定^[2]

将细胞培养于 60 mm 的培养皿中(1×10^6 细胞/皿), 当细胞生长至汇合时(confluence), 去除培养液, 加入无血清无肌醇的 DMEM/F-10 培养液(Gibco), 含有 $[^3\text{H}]$ 肌醇($3 \mu\text{Ci/ml}$, NEN)。孵育 40 h 后加入 LTD_4 , 在刺激后的 0、7、15、30 秒分别加入三氯醋酸终止反应, 每个时间点用 2 个培养皿。将细胞抽提物加样于 HPLC 阴离子交换层析柱中(Whatman Partisil SAX)。应用磷酸铵梯度洗脱法分离磷酸肌醇的同分异构体。将洗脱液在 LKB 1217 液闪计数器上测定其放射性。IP 测定结果表示为对照组放射性(cpm)的百分比。

六、统计学处理

结果表示为均数士标准差。应用非配对 t 检验进行资料分析。对 $[^3\text{H}]$ TdR 掺入法测定资料应用单因素方差分析, 其中每两组数据的比较应用 Student-Newman-Keuls 方法。P 值小于 0.05 有统计学意义。

结 果

一、 LTD_4 对系膜细胞的促增殖作用

如图 1 所示, LTD_4 刺激生长停滞的系膜细胞对 $[^3\text{H}]$ TdR 的摄取, 其中 $0.01 \mu\text{M}$ 浓度的 LTD_4 作用最强。

二、 LTD_4 促进系膜细胞的 DAG 合成

在表 1 中; LTD_4 ($1 \mu\text{mol/L}$) 处理的系膜细胞的 DAG 合成量高于对照组且与 EGF 组相近, 虽然稍低于 10% 血清组的 DAG 水平, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

三、 LTD_4 促进系膜细胞合成 IP

图 2 为 LTD_4 ($0.01 \mu\text{mol/L}$) 处理后系膜细胞合成的各种 IP 水平。在作用后 7 秒, 1, 4, 5- IP_3 、1, 4- IP_2 及 4- IP_1 合成达到高峰, 以 1, 4, 5- IP_3 最多, 在 15 秒后降至对照组水平。

图 3 为不同浓度 LTD_4 对两种 IP_3 合成的

表 1 LTD_4 ($1 \mu\text{mol/L}$)、血清及 EGF (10nmol/L) 对系膜细胞 DAG 合成的作用

	对照组	LTD_4	EGF	10% 血清
DAG (pMol/nMol 磷脂)	0.99 ± 0.28	$1.64 \pm 0.25^*$	$1.53 \pm 0.14^*$	$1.97 \pm 0.30^*$
培养皿数	7	4	3	3

* $p < 0.05$, 与对照组相比较

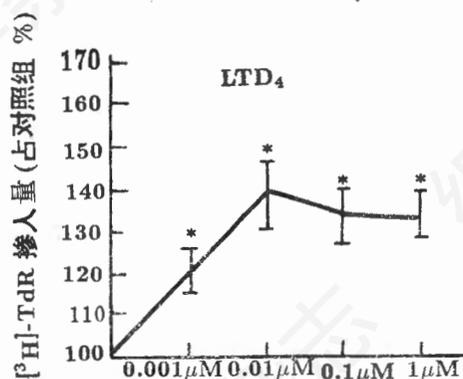


图 1 不同浓度的 LTD_4 对系膜细胞 DNA 合成的作用

* $p < 0.05$, 与对照组比较。

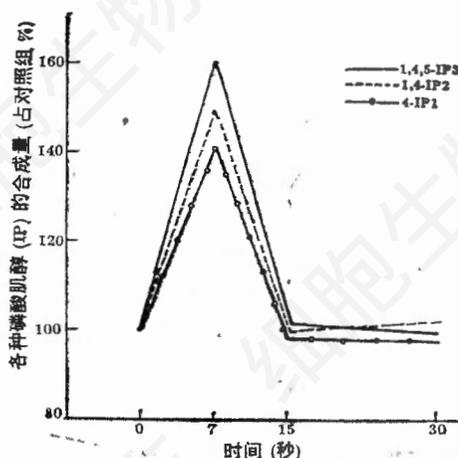


图 2 LTD_4 ($0.01 \mu\text{mol/L}$) 作用后系膜细胞 IP 合成的动态变化

作用, 设 IP 总放射性为 1, 将两种 IP_3 水平表示为占 IP 总量的相对值。可见在 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 浓度时系膜细胞合成的 1, 4, 5- IP_3 最多, 随着 LTD_4 浓度增大其合成量逐渐下降; 而 1, 3, 4- IP_3 的合成在 $1 \mu\text{mol/L}$ LTD_4 刺激时最多, 在 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 的 LTD_4 刺激时次之, 在 $0.1 \mu\text{mol/L}$ LTD_4 刺激时最少。1, 3,

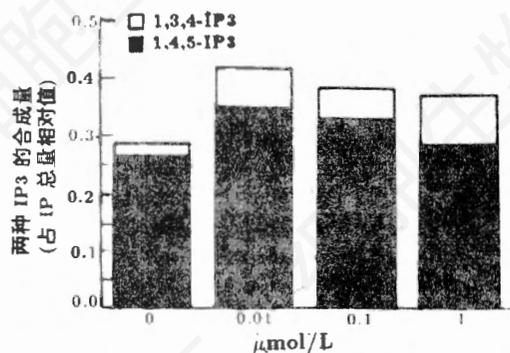


图3 不同浓度的LTD₄对系膜细胞IP₃合成的作用

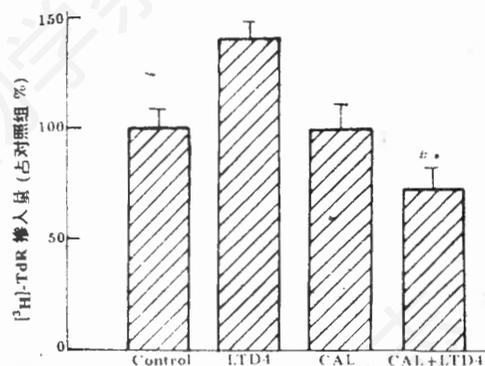


图4 PKC抑制剂Calphostin C(CAL)对LTD₄所致的系膜细胞增殖的作用

*: $P < 0.05$, 与对照组相比较。

** : $P < 0.05$, 与LTD₄组相比较。

4-IP₃水平均少于1,4,5-IP₃合成量。因实验中系膜细胞合成的1-IP₁及3,4-IP₂数量不稳定,未作图示。

四、PKC抑制对LTD₄促增殖作用的影响

图4为特异性PKC抑制剂Calphostin C对LTD₄(0.01 μmol/L)所致系膜细胞增殖作用的影响。可见Calphostin C明显抑制了LTD₄所致的系膜细胞增殖。

讨 论

系膜细胞增殖是许多肾小球疾病的病理特征。LTD₄是花生四烯酸5脂氧化酶的产物之一,可促进肾小球系膜细胞增殖^[2],还可收缩系膜细胞,使肾小球有效滤过面积减少,从而

减少肾小球滤过率^[9],这些均提示LTD₄参与肾小球疾病的发病。

人及大鼠的系膜细胞膜均有LTD₄受体^[2,7],用LTD₄受体拮抗剂SKF 104353预处理系膜细胞,可阻止LTD₄与系膜细胞的结合^[2]。细胞膜受体活化后可产生多种形式的细胞内信息传递。虽然有人报道LTD₄可抑制豚鼠气管平滑肌细胞的腺苷酸环化酶,但其他学者无类似发现^[7]。LTD₄受体与系膜细胞的cAMP/cGMP信息系统无关,LTD₄不影响系膜细胞的cAMP合成^[7]。相反,LTD₄受体与Ca²⁺信息系统及Na⁺-H⁺交换系统相关联,LTD₄可先促进系膜细胞内质网Ca²⁺库释放Ca²⁺,再促进细胞外Ca²⁺进入细胞内,从而使胞浆内Ca²⁺升高^[7]。LTD₄也活化Na⁺-H⁺交换,使Na⁺进入细胞,使细胞内pH增加^[7]。但细胞内Ca²⁺升高及Na⁺-H⁺交换活化的原因尚不清楚^[7]。

Badr最近发现,LTD₄可使大鼠系膜细胞的IP合成增多,0.01 μmol/L的LTD₄的促增殖及促IP合成的作用最强,其中,1,4,5-IP₃的合成在刺激后5秒钟达到高峰,以后急剧下降,15秒时已接近对照组水平,而IP₁的合成在15秒后逐渐上升,IP₂的合成量不稳定^[2]。本文结果与此相似,0.01 μmol/L的LTD₄有最大的促增殖作用(图1)及促1,4,5-IP₃合成的作用(图3),在0.01 μmol/L的LTD₄刺激后7秒钟,各种IP的合成均达到高峰,以后急剧下降,15秒钟已恢复至对照组水平(图2)。这些结果有力的证实,LTD₄受体与磷脂酶C(PLC)相关联,从而使IP合成增多。本文首次发现LTD₄也促进系膜细胞的DAG合成(表1),其作用程度与EGF(10 nmol/L)相近。用PKC抑制剂Calphostin C预处理系膜细胞,可阻断LTD₄对系膜细胞的促增殖作用(图4)。本文结果结合上述其他学者的发现,我们可以推测LTD₄受体与PLC相连接,LTD₄作用于系膜细胞后使PLC激活,IP₃合成增多,可进一步使内质网及细胞膜的Ca²⁺通道活化,使细

胞内 Ca^{2+} 升高而收缩系膜细胞, 各种 IP 的循环也促进合成 DAG, 从而活化 PKC, 使 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ 交换激活, 细胞内 pH 升高, PKC 的活化也促进其他 DNA 合成的调节基因/调节蛋白的活化, 从而促进系膜细胞的 DNA 合成及增殖。

摘 要

本实验应用 [^3H]TdR 掺入法测定 LTD_4 对大鼠系膜细胞的促增殖作用, 测定系膜细胞合成的 DAG 及 IP_1 、 IP_2 、 IP_3 量, 用 PKC 抑制剂 Calphostin C 预处理系膜细胞, 观察其对 LTD_4 促增殖作用的影响。结果表明, LTD_4 促进系膜细胞的增殖及 DAG 合成、IP 合成。以 $0.01 \mu\text{mol/L}$ 的 LTD_4 作用最强。Calphostin C 可抑制 LTD_4 的促增殖作用, 证实 LTD_4

使 PLC 活化, 促进 IP 及 DAG 的生成, 从而活化 PKC, 促进系膜细胞的 DNA 合成及增殖。

参 考 文 献

- [1] Badr. K. F., 1992, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 3: 907—915.
- [2] Badr, K. F. et al., 1989, *Am. J. Physiol.*, 257: F 280—F 287.
- [3] Bruns, R. F. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176: 288—293.
- [4] Bligh, E. G. et al., 1959, *Can. J. Biochem.*, 37: 911—917.
- [5] Wright, T. M. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 9374—9380.
- [6] Simonson, M. S. et al., 1986, *Kidney Int.*, 30: 524—531.
- [7] Simonson, M. S. et al., 1988, *Am. J. Physiol.*, 255: C 771—C 780.

HeLa 细胞和 BHK 细胞实验交叉污染消涨规律的探讨

张荣兴 林晓旭 朱德厚

(中国科学院细胞库 上海 200031)

细胞系(株)间的交叉污染, 严重地威胁着细胞系(株)的质量控制。特别是 HeLa 细胞的污染是世界性的棘手问题。美国模式培养物保存中心(ATCC)用 A 型 G 6 PD 同功酶法, 染色体 G 带分析和 Y 染色体的奎纳克林荧光技术证明, 许多人细胞系已被 HeLa 细胞污染。如口腔表皮样癌细胞(KB)、人胚肺细胞(L-132)、张氏肝细胞系(Chang Liver)、人胚小肠细胞系(Intestin 407)和 3 个人羊膜细胞系(W:sh FL和AV₃)等 15 个细胞系均带有两个或更多的 HeLa 细胞标志染色体、A 型 G 6 PD 同功酶和无 Y 染色体。强烈证明这些细胞已被 HeLa 细胞所污染^[1-3]。Nelson-Rees 等也用类似的方法证明: 胚肾细胞系(HEK)、乳房癌细胞系(HBT-3)和转化的前列腺瘤(MA 160)等细胞

系事实上是宫颈癌来源的 HeLa 细胞^[4]。众所周知, 被广泛应用的 HeLa 细胞具有很高的生长速率, 这或许是它们淘汰被污染细胞的主要原因。但是, 是否还有其他因素促进此现象的发生? 为此, 我们通过抗中间丝蛋白荧光染色和观察条件培养液下的生长状况, 对 HeLa 细胞和 BHK-21 细胞的实验交叉污染规律进行了初步探讨。

材 料 和 方 法

一、细胞

HeLa 细胞和 BHK-21 细胞来自本细胞库。培养液为含 20% 小牛血清的 RPIM-1640。

二、抗中间丝蛋白免疫荧光染色方法见张荣兴等^[5]

兔抗角蛋白抗体的制备法见张荣兴等^[5]。兔抗结