

这一设备由细胞增殖用的第一培养罐,紫草宁生产用第二培养罐,置换培养基的细胞过滤器和含有生成紫草宁细胞的过滤器所组成。

(周荣仁译,周郑校)

### 参 考 文 献

- [1] Y. Fujita, Y. Hara, T. Ogino and C. Suga, 1981, *Plant Cell Reports*, 1; 59.  
 [2] Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto, 1981, *Plant Cell Reports*, 1; 61.  
 [3] Y. Fujita, M. Tabata, A. Nishi and Y. Yamada, 1982, *Proc. 5th Int. Congr.*

*Plant Tissue and Cell Culture*, p. 339.

- [4] 加藤陽, 1982, *醸酵工学*, 60: 105.  
 [5] A. Jones and I. A. Veloky 1981, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 84.  
 [6] 佐藤文彦, 渡边克美, 山田康之, 白井直规, 田中渥大, 福井三郎, 1983, 日本農芸化学会大会要旨集, P 543.  
 [7] 田中秀夫, 1980, 第7回植物组织培养シンポジウム讲演要旨集, P 48.  
 [8] F. Wagner and H. Vagelmann, 1977, *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, p 245. Springer-Verlag.

## 人胃癌细胞在丁酸钠的诱导下膜分子运动与膜相关骨架的关系

牛敏英 赵孟莲 方家椿 梁云燕 石永进 王代树

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学室)

丁酸是一种短链脂肪酸,对培养的哺乳类细胞的形态、生长速度和某些基因的表达有影响。丁酸钠在 0.5—3 mmol/L 时对培养的肿瘤细胞会产生可逆性的生长抑制作用<sup>[1]</sup>,也可以引起或促进新蛋白质的生物合成<sup>[2]</sup>,抑制细胞内 DNA 合成<sup>[3]</sup>,诱导纤维粘连蛋白的产生<sup>[4]</sup>。丁酸钠对细胞的一些生物学效应已经进行了广泛的研究。本文用荧光淬灭后的光复现(Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)方法研究细胞膜的运动,用免疫荧光方法测定细胞表面纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN)及染色反应研究细胞骨架微丝,以探讨丁酸钠对人胃癌细胞(MGc 80-3)的质膜与细胞骨架之间的相关性。

### 材 料 和 方 法

#### 一、细胞及细胞培养

人胃低分化粘液腺癌细胞系(MGc 80-3, 山东师

范大学建株),培养于含 15%小牛血清的 Eagle 培养液中。接种细胞于小培养瓶内,每瓶 4.5 万/1.5 毫升。24 小时后分三组处理:第一组换含有 2 mmol/L 丁酸钠(BDH)的培养液持续处理,第二组以含 2 mmol/L 丁酸钠的培养液处理 48 小时,再换为正常培养液继续培养,第三组为空白对照组。以上三组均隔日换液,自加药之日起每天从三组中各取三瓶进行细胞计数,以绘出细胞生长曲线。

#### 二、丁酸钠对细胞微丝及纤维粘连蛋白的影响

##### 1. 微丝骨架的显示

在盖玻片上生长的 MGc 80-3 细胞在含有 2 mmol/L 丁酸钠培养液中培养,24 小时及 48 小时分别取出,按 Pana 方法<sup>[5]</sup>用考马斯蓝 R 250(Coomassie Blue R 250)染色并略加改良<sup>[6]</sup>。

##### 2. 纤维粘连蛋白的显示

在进行显示微丝实验的同时,取出另一部分细胞分别用 3.5% 福尔马林固定 30 分钟,用 PBS 液洗涤后,加纤维粘连蛋白抗血清与细胞保温(37℃)45 分,经 PBS 液洗,稍干后再与二级荧光抗体避光保温(37℃)45 分,最后用 PBS 液充分洗去细胞上游离的荧光物质,9:1 甘油/PBS 封片,荧光显微镜下观察。

### 三、细胞膜蛋白分子侧向扩散运动的测定——

#### FRAP法

生长在盖玻片上的细胞用异硫氰荧光黄(FITC)标记的 ConA(F-ConA)与细胞表面相应受体糖蛋白结合,保温后,用 PBS 洗涤及封片,立即进行 FRAP 测定,以国产氩离子激光器为光源,激发光波长为 488 nm,光束经两次聚焦后通过显微物镜,在标记的细胞表面出现一个圆形光斑,直径为 3  $\mu\text{m}$ ,以衰减  $10^{-4}$  的弱激光测定光斑区内的初始荧光强度 ( $F_i$ )。采用脉冲强激光使这一区域中 ConA 受体复合物分子漂白,光漂时间为 30—40 ms,测得漂白后的荧光强度 ( $F_0$ )。随着时间的推移,其光斑区周围没有受到漂白的 ConA 受体复合物分子不断向光斑区扩散运动,使光斑区的荧光强度逐渐得到恢复,求得恢复荧光强度 ( $F_\infty$ )。最后根据 Axelrod<sup>[7]</sup>的平面扩散模型的推算,将恢复曲线中各个离散数据代入其计算公式,求得细胞表面 ConA 受体复合物分子侧向运动的扩散系数  $D$ 。

## 结果与讨论

### 一、丁酸钠对细胞生长抑制作用的影响

细胞用丁酸钠处理后,形态发生显著的变化,外形扁平且长,突起增多,类似于成纤维细胞,同时细胞生长也很快受到抑制。

从图 1 可以看出,加药后第三天至第四

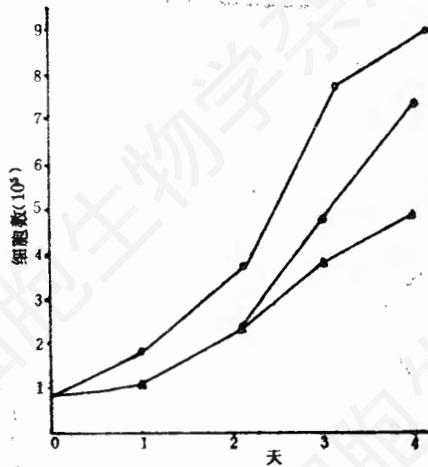


图 1 MGc 80-3 细胞生长曲线图

- 对照组
- ▲—▲ 丁酸钠组
- 去药组

天,抑制率达到高峰,分别为 46% 及 59%。

撤药后,细胞生长又明显加快,说明丁酸钠对细胞的生长抑制是可逆的。有人认为<sup>[8]</sup>,丁酸钠对细胞生长的抑制是阻抑在细胞周期的  $G_1$  期。也有人认为<sup>[1]</sup>,丁酸钠引起细胞致死性和生长抑制的部分原因是抑制了无氧糖酵解。这种小分子脂肪酸也可引起细胞内腺苷酸环化酶的活性增高,但是 cAMP 磷酸二酯酶的活性并不增加,因而导致细胞内 cAMP 水平提高,从而诱导细胞出现不同的去恶化表型<sup>[1]</sup>。

### 二、丁酸钠对细胞微丝及 FN 的作用

用 2 mmol/L 丁酸钠处理细胞 24 小时及 48 小时后,分别在光学显微镜及荧光显微镜下看到细胞内微丝束与细胞表面 FN 均增加。对照组的微丝稀疏存在于胞质内, FN 呈散在的纤丝‘线’状分布于细胞表面;而加药组微丝增多, FN 则呈密集的纤丝‘线’状分布(图版图 1)。Culp<sup>[9]</sup>用电镜研究观察到,肿瘤病毒转化的细胞皮质区域的大微丝束的数目显著减少,粘着斑的数目也减少。Boslchck<sup>[10]</sup>不仅在转化的鸡胚细胞中看到微丝束的减少或消失,并动态地观察微丝的改变,发现在微丝消失的同时,也看到细胞表面 FN 的减少。我们曾在正常二倍体小儿包皮成纤维细胞观察到细胞内微丝束及细胞表面 FN 均比癌细胞多。微丝是细胞骨架成分之一,与细胞的形态、运动及吞噬功能有关。FN 是细胞表面的主要蛋白质,在细胞粘着上起重要作用,亦可调节细胞的运动和细胞内微丝束组装。Yamada 等<sup>[11]</sup>在实验中看到,丁酸阻断大鼠 3Y1 成纤维细胞主要在  $G_1$  期,此时可见细胞内网状肌动蛋白明显积累,并且随阻断期的延长而增加。同时微丝明显地聚集在细胞边缘,微丝的应力纤维在细胞质中也清楚可见。大量报道指出,转化细胞及癌细胞表面的 FN 普遍减少。但是也有报道提出培养的转化细胞如乳腺细胞<sup>[12]</sup>、膀胱细胞<sup>[13]</sup>的 FN 并不减少。在我们的实验中看到人胃癌细胞表面 FN 明显减少,在丁酸钠的作用下可见 FN 增加。这是否可以认为,微丝及

FN的增加是恶性肿瘤细胞向正常细胞“逆转”的一个表型特征,仍待进一步确定。

### 三、丁酸钠对细胞膜蛋白质分子侧向扩散运动的作用

根据 Axelrod<sup>[7]</sup>公式计算,可以得出分子扩散系数  $D$

$$D = \frac{W^2}{4\tau 1/2} rD_{cm^2/sec}$$

$W$  为光斑半径,  $\tau 1/2$  为荧光半恢复时间,  $rD$  为  $K$  的函数(按 1.25 计算),将每个细胞测试曲线的各个数据代入以上公式经计算求得  $D$  值(表 1)。

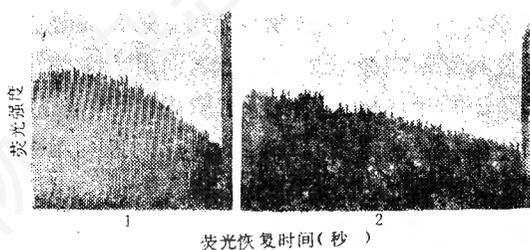


图 2 MGc 80-3 细胞膜 ConA 受体侧向运动恢复曲线记录图(单个细胞)  
1. 对照组 2. 丁酸钠组

表 1 MGc 80-3 细胞膜 ConA 受体复合物侧向扩散系数  $[D]$

组别	扩散系数 $[D] \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{sec}$		
对照组	1.23	( $n = 18$ )	$R = 62.8\%$
丁酸钠组	0.816	( $n = 10$ )	$R = 44\%$
	$P < 0.001$		

$n$  为测定的细胞个数。

$R$  为质膜内可动性 Con A 受体复合物百分比。

MGc 80-3 细胞经 2 mmol/L 丁酸钠处理后,细胞膜 Con A 受体复合物侧向扩散运动减慢。一般认为,在一定条件下,细胞膜分子侧向运动的快慢是细胞转化或癌变的重要表型之一。癌细胞的膜分子侧向运动较快,而正常细胞膜分子侧向运动较慢。用丁酸钠处理癌细胞后,不但其增殖速度及形态出现明显的去恶化改变,而且使 ConA 受体复合物侧向扩散运动减慢,这进一步说明丁酸钠对 MGc 80-3 细

胞具有“逆转”性作用。另一方面,与细胞膜相连的细胞骨架的变化也间接影响膜的分子运动。Singer<sup>[14]</sup>电镜研究表明微丝束的末端与 FN 是一种紧密的、有形的越膜连接;胞质微丝束与外部的 FN 相遇于质膜内,该部位呈现电子致密区称为粘着斑,即微丝束的末端与细胞膜的粘着斑相连。Weber 等<sup>[15]</sup>通过免疫荧光法观察到细胞骨架纤维与膜表面间存在一些交叉连接结构。这表明了细胞骨架系统在质膜组分运动的控制方面有重要作用。它们的分子排列及组装的变化可以间接影响和控制膜的分子运动,从而影响膜的功能状态及细胞形态。从我们的实验中可以看出,用丁酸钠处理后,在胞质微丝及细胞表面 FN 增加的同时,细胞膜 ConA 受体复合物侧向运动也明显地减慢。潘玉芝等<sup>[16]</sup>用垂直切片法电镜观察了用丁酸处理 CNE 细胞后,细胞粘着斑数目也增多。因此可以认为细胞骨架微丝、质膜粘着斑及细胞表面 FN 互相联系,它们三者的增多加强了对质膜分子的牵制作用,使肿瘤细胞膜分子的扩散运动减慢,从而使膜流动性趋向正常化。

### 摘 要

体外培养的人胃癌细胞,用丁酸钠处理后,显示细胞表面 FN 及细胞胞质微丝的变化,同时用荧光漂白恢复方法对细胞膜 ConA 受体复合物侧向扩散运动进行测定。结果表明,经丁酸钠处理后的细胞,胞质微丝及细胞膜表面 FN 均较对照组增加,而细胞膜分子侧向扩散运动减慢,说明与细胞膜相连的细胞骨架的变化对膜分子侧位运动具有牵制作用。

### 参 考 文 献

- [1] Prasad K N., 1980, *Life Sciences* 27(5): 1351.
- [2] Ghosh N K. et al., 1977, *Nature*, 267: 435.
- [3] Judy B de Haan. et al., 1986, *Cancer Res.*, 46: 713.
- [4] Milhaud P. et al., 1980, *J. Cell Physiol*,

- 104: 163.
- [5] Pana S D J., 1980, *Cell Biol. Inter. Rep.*, 4:149.
- [6] 赵孟莲等, 1983, 解剖学报, 14(2) 196.
- [7] Axelrod D. et al., 1976, *J. Biophys* 16: 1055.
- [8] Wintersberger E. et al., 1983, *J. Cell Biochem.* 21(3): 239.
- [9] Culp I A. et al., 1971, *J. Cell Biol.* 50: 691.
- [10] Boslchck C B. et al., 1981, *Cell* 14: 175.
- [11] Yamada K. et al. 1985, *J. Cell Physiol.*, 125: 235.
- [12] Taylor-papadimitriou J. et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 2491.
- [13] Wigley C G. et al., 1979, *Exp. Cell Res.* 118: 394.
- [14] Singer I I. 1979, *Cell* 16:675.
- [15] Weber K. et al., 1976, in *Contractile System and Non-Muscle Tissues* (Perry S V. et al. eds) Elsevier North-Holland Biomedical Press, 51-66.
- [16] 潘玉芝等, 1985, 实验生物学报, 18(3) 317.

## 用单宁酸作示踪剂观察上皮细胞间的紧密连接

江家婉 凌绍萍 俞永富 钟慈声

(上海医科大学细胞超微结构研究室)

镉、钨红和辣根过氧化酶<sup>[1-3]</sup>常作为示踪剂来研究质膜的结构和功能。运用单宁酸染色技术观察细胞膜和细胞膜特化结构的功能是新发展起来的一种示踪技术。用戊二醛和单宁酸的混合物固定生物组织, 能够提高各种类型细胞表面膜的电子密度和反差<sup>[4-7]</sup>, 可跟踪观察质膜的结构和功能。本文报道了利用单宁酸能提高细胞膜电子密度和反差的特性结合冰冻蚀刻技术, 观察了各种类型上皮细胞间紧密连接的发育程度, 分析了不同类型组织细胞间紧密连接发育程度与其功能的关系。

### 材 料 和 方 法

#### 一、戊二醛-单宁酸混合液的制备

在100 ml 0.2 mol/L二甲砷酸钠溶液中加入12克单宁酸, 60℃加热溶解, 过滤后即得12%单宁酸溶液; 用重蒸馏水配制成5%戊二醛(原液: 25%分析纯); 在临用时, 将两种溶液各对半均匀混合后, 即成含有6%单宁酸、2.5%戊二醛混合液, 用NaOH调整pH至7.2。

#### 二、生物样品制备

小鼠颈椎脱臼后, 立即取下肾脏、肝脏、小肠和

胃, 切成小块(1 mm<sup>3</sup>)。各种组织分成两部分。其中一部分用含有6%单宁酸的2.5%戊二醛(pH≈7.2) 4℃固定2小时, 然后用1%的锇酸后固定, 4℃, 2小时。随后用乙醇和丙酮分别进行常规系列脱水。\*618环氧树脂包埋。超薄切片不再用醋酸铀和枸橼酸铅染色, 直接在H-500型透射电镜下观察。

另一部分样品用2.5%戊二醛固定, 4℃, 2小时后, 再用30%生理盐水甘油浸泡约10小时, 然后将样品快速投入液氮中冷冻, 用日立HUS-5 GB型真空喷镀仪冷冻断裂, 真空度为 $1 \times 10^{-5}$  Torr, 温度控制在-100℃, 断裂后蚀刻5分钟, 然后在45°角方向喷铂金, 90°方向喷碳膜加固。喷镀铂金和碳膜均不旋转。最后将复型膜置于铜网上, 在H-500型透射电镜下观察。

### 结 果

从复型膜P面上可见, 肾近端小管上皮细胞近顶端处有向上突起的条索组成的网, 但数量少, 仅有1—2层, 某些区域甚至缺如(图1)。在小肠粘膜上皮细胞和胃粘膜上皮细胞近顶端以及肝毛细胆管附近的质膜上皆可见排列紧密的条索组成的网状结构, 其分布呈连续腰带状, 层数多, 有些部位甚至多达十几层(图