

[7] Baraldi, A. Et al., 1992, *Nephron*, 62: 382-388.

[8] Lachappelle, M. Et al., 1991, *Virchows Archiv. B Cell Pathol.*, 60: 105-111.

## EFFECT OF MAC SUBLYTIC INJURY ON FOCAL ADHESION OF CULTURED HUMAN GLOMERULAR VISCERAL EPITHELIAL CELL

GUO Xiao Hua    LIAO Li Sheng

(Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Chongqing, 400037)

### ABSTRACT

It is now well established that proteinuria can be mediated by membrane attack complex of complement (MAC). This mechanism, however, is not understood. This in vitro study was performed to define the change of focal adhesion and adhesion-associated proteins upon cultured human glomerular visceral epithelial cells (GVEC) to MAC sublytic injury. The results show that this injury brings on imbalance of extracellular matrix protein production, cytoskeleton rearrangement, decrease of integrin and cell surface sulfate proteoglycan, with change of GVEC adhesion, which associate with simplification of the foot process, even detachment of GVEC from the GMB, consequent the onset of proteinuria in vivo.

Key words: Membrane attack complex of complement    Focal adhesion    Glomerular visceral epithelial cell

## 热损伤诱导单核细胞株 Raw264.7 凋亡及其分子机制的初步研究

张璐 张琳 赵克森

(第一军医大学全军休克微循环重点实验室 广州 510515)

业已知道,重症烧伤后机体易出现细胞、免疫功能紊乱<sup>[1]</sup>。导致烧伤的致热源对机体的热辐射作用,可以引起一系列的病理生理变化。已查明烧伤和创伤以后出现了白细胞功能不全(dysfunction),表现为它的趋化性、吞噬力、产生超氧阴离子和过氧化氢能力及杀灭细菌能力均减弱,导致机体免疫力下降和容易发生感染<sup>[2,3]</sup>。凋亡概念的提出为研究烧伤开拓了一个新的领域。我们曾用在体动物模型研究表明,烧伤后外周血单个核细胞凋亡率明显增加,并随时间的推延呈增高趋势,它可能是烧伤后白细胞功能不全发生的机制之一<sup>[4]</sup>。为了进一步研究烧伤后单核细胞凋亡发生的机制,需要对离

体单核细胞用分子生物学方法进行基因转染和传代研究,此时用一般活体动物分离的细胞难以完成,为此我们拟建立一个单核细胞株的热损伤模型,探讨热损伤是否诱导其凋亡及相关基因表达情况,为进一步深入研究打下基础。

### 材料和方 法

#### 1. 细胞培养

单核细胞株 Raw264.7 由美国 Scripps 研究所惠赠。将  $1 \times 10^6$  个细胞接种在含 5% 小牛血清的 DMEM 培养液中培养(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)。

#### 2. 热损伤反应

将对数生长期的单核细胞株 Raw264.7 置于温度为 43℃ 的水浴中温育 30 分钟,然后置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下继续培养,于 3、6、12 小时收集细胞。

### 3. 细胞形态观察

将收集的细胞用 2.5% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定,按常规漂洗、脱水、渗透,环氧树脂包埋,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,透射电镜观察。

### 4. DNA 凝胶电泳

采用快速法<sup>[5]</sup>抽提细胞的 DNA,进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

### 5. 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集的细胞于 4℃,70% 乙醇固定 24 小时以上,50μg/ml RNA 酶 (Promega) 37℃ 消化 1 小时,100μg/ml 碘化丙锭 (PI, Sigma) 染色 1 小时,流式细胞仪进行细胞周期分析,低于 G1 期细胞 DNA 含量出现二倍体峰的细胞为凋亡细胞。

### 6. 流式细胞仪检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

收集的细胞于 4℃,1% 多聚甲醛固定 15 分钟,PBS 清洗,羊血清封闭 10 分钟,加入鼠抗人 Bcl-2 或 Bax 单抗,空白对照组加入无关抗体,37℃ 温育 30 分钟,PBS 清洗,加入羊抗鼠 IgG-FITC,黑暗中 37℃ 孵育 30 分钟。Elite 流式细胞仪检测。

## 结 果

### 1. 形态学观察

透射电镜下,细胞表现为胞体缩小,胞浆浓缩,细胞核碎裂,呈现比较典型的细胞凋亡形态学改变,见图 1。

### 2. 流式细胞仪鉴定凋亡细胞

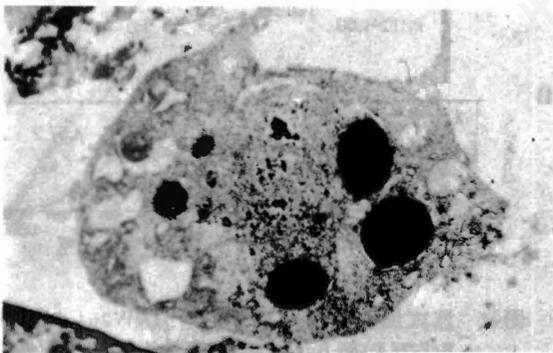


图 1 凋亡细胞超微结构(6000×)

流式细胞仪检测热休克(43℃,30min)后各个时间点(3h,6h,12h)的 DNA 分布,结果显示典型的凋亡细胞群特征:DNA 含量低于 G1 期细胞,出现亚二倍体峰,热休克 3 小时后,细胞凋亡即明显增加,由刺激前的  $2.8 \pm 0.5\%$  增加为  $16.5 \pm 1.2\%$  ( $P < 0.01$ ),通过连续观察提示其为渐进性过程,随着时间延长,凋亡细胞比例明显增加,见图 2。

### 3. DNA 凝胶电泳

凋亡细胞由于内源性核酸内切酶的作用,其 DNA 在核小体之间的连接处被切断,降解为 180—200bp 或其整倍数的寡核苷酸片段,经琼脂糖凝胶电泳呈现阶梯状条带。热损伤后 12 小时,大鼠单个核细胞的 DNA 电泳出现明显的阶梯状条带,而对照组 DNA 电泳未发现阶梯状条带,见图 3。

### 4. Bcl-2 与 Bax 蛋白表达

Raw264.7 细胞稳定表达 Bcl-2 与 Bax 蛋白,细胞平均荧光强度分别为 41.0 与 44.0。热损伤后 12 小时 Bcl-2 蛋白表达下调,其平均荧光强度为 31.7 ( $P < 0.05$ ),而 Bax 蛋白表达显著上调,细胞平均荧光强度为 57.2 ( $P < 0.01$ ) 见图 4。

## 讨 论

细胞在外界应激刺激作用下,可呈现出不同的死亡方式:凋亡及坏死。细胞凋亡(编程性细胞死亡)是由基因调控的细胞有序的死亡,表现为细胞皱缩、染色质边移、细胞核裂解形成凋亡小体,DNA 断裂为 180—200bp 整倍数的 DNA 片段;而细胞坏死是非基因调控的,表现为细胞肿胀、细胞膜通透性增强,DNA 随机断裂。上述细胞死亡方式受多种因素的影响,包括细胞周期、细胞类型及应激刺激的强度与时间。

热损伤作为一项外界应激刺激,其对组织细胞产生的生物学效应已有广泛的研究,并主要集中于以下几方面:研究细胞在不同热损伤温度下的生长繁殖功能的完整性;研究细胞生长对其生长条件的依赖性;研究细胞在热损伤

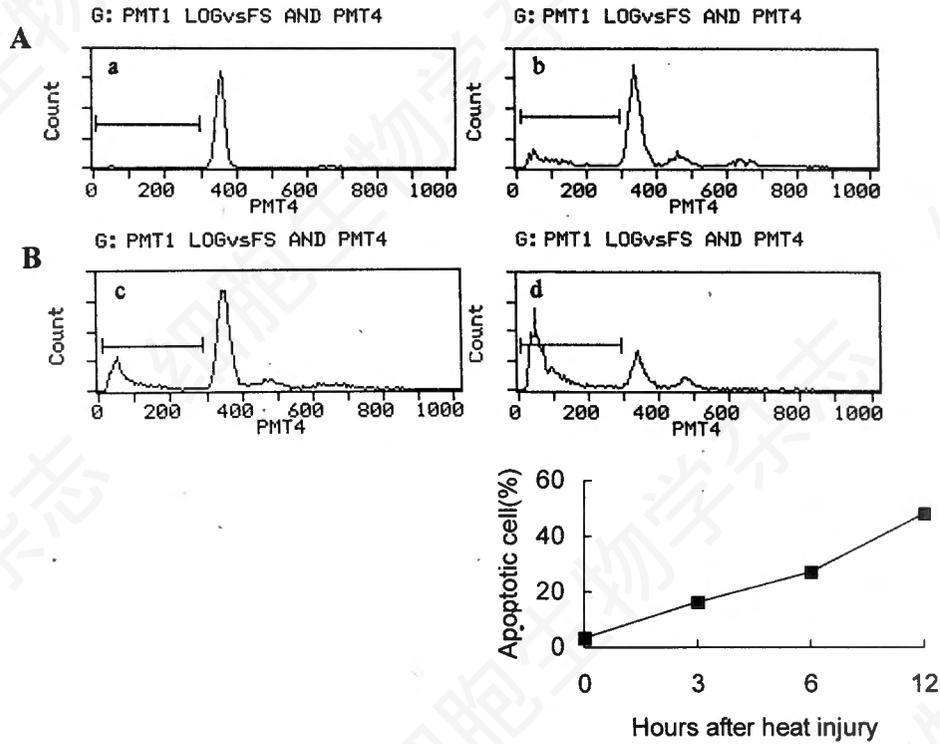


图2 热损伤后 RAW264.7 凋亡发生率的变化

A. 流式细胞仪检测 43℃热损伤后 RAW264.7 细胞凋亡。对照组(a),热损伤后 3 小时(b),6 小时(c),12 小时(d)。B. 43℃热损伤后 RAW264.7 凋亡百分率曲线图。



图3 RAW264.7 细胞 DNA 凝胶电泳图谱

1. 43℃热损伤温度。2. 对照组 RAW264.7 DNA。  
3. 分子量标准 λDNA/Hind III + EcoRI。

下亚细胞结构的改变。近年来热损伤诱导细胞凋亡的研究引人注目。诸多的研究表明,多种细胞在热刺激下(42.5—45℃, 20min—1h)可以

发生凋亡,这些细胞包括淋巴瘤细胞株 L5178<sup>[6]</sup>、小鼠胸腺细胞<sup>[7]</sup>、HL-60<sup>[8]</sup>、淋巴源性

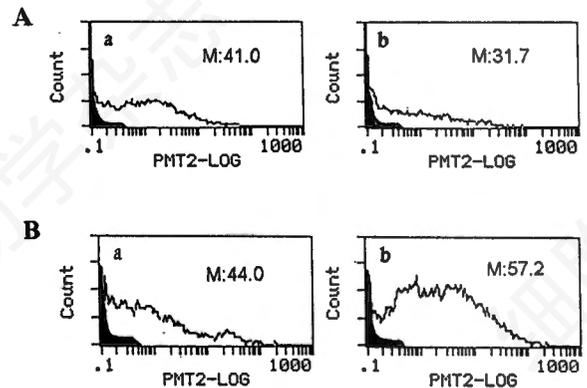


图4 流式细胞仪检测热损伤后 RAW264.7 细胞 Bcl-2(A)与 Bax(B)蛋白表达水平

正常对照组(a),热损伤后 12 小时(b),M 表示细胞平均荧光强度。图中阴影示背景染色(空白对照组)。

细胞株 CEM-C7 和 BM13674 等,但关于热损伤对单核细胞的效应,鲜有报道。我们的在体动物模型研究表明,烧伤后外周血单个核细胞凋亡率明显增加,它可能是烧伤后白细胞功能不全发生的机制之一<sup>[4]</sup>。业已证明,导致烧伤的致热源对机体的热辐射作用,可以引起一系列的病理生理变化。为了进一步研究烧伤后单核细胞凋亡发生的机制,我们建立了一个单核细胞株的热损伤模型,探讨热损伤是否诱导其凋亡及其发生机制。本研究观察了 43℃,30 分钟的热损伤条件对单核细胞株 Raw264.7 凋亡的诱导作用,结果发现热损伤作用下,Raw264.7 细胞呈现出特征性的形态学变化,DNA 电泳出现阶梯状条带,流式细胞仪检测显示亚二倍体峰,表明此时的细胞死亡属于细胞凋亡。

细胞凋亡是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程。多种基因如 bcl-2、p53、c-myc、bax、bad 等参与凋亡的调控<sup>[10]</sup>。其中 bcl-2 尤为重要,它被认为是细胞凋亡调控的最后通路之一。Bcl-2 的抗凋亡机制尚未完全阐明,但新近的资料提示 Bcl-2 能与几种 Bcl-2 相关蛋白,尤其是 Bax 形成异二聚体,Bcl-2 的效应有赖于与 Bax 的相互作用<sup>[11]</sup>。本实验发现未受刺激的 Raw264.7 细胞稳定表达 Bcl-2 及 Bax,热损伤后 12 小时,bcl-2 基因表达下调,而 bax 基因表达上调,其结果是 bcl-2/bax 比例减少,这可能是热损伤诱导单核细胞株 Raw264.7 细胞凋亡的分子机制之一。进一步的研究尚在进行中。

## 摘 要

为探讨热损伤诱导细胞死亡的模式与分子机制,采用流式细胞仪、DNA 凝胶电泳、透射电镜观察热损伤诱导单核细胞株 Raw264.7 凋亡发生的动力学变化及分子机制。结果显示热损伤能显著诱导单核细胞株 Raw264.7 凋亡;有效降低 Bcl-2 蛋白表达,而上调 Bax 蛋白表达。这说明细胞凋亡是离体细胞在热损伤作用下重要的死亡方式之一,bcl-2/bax 比例减少可能是热损伤诱导单核细胞株 Raw264.7 细胞凋亡的分子机制之一。

关键词:热损伤 凋亡 基因表达

## 参 考 文 献

- [1] Maldonado MD, et al., 1991, *Burns*, 17: 188-192.
- [2] Mozingo DW, et al., 1994, *Current Opinion in Surgical Infections*, 2: 69-75.
- [3] Cioffi WG, et al., 1993, *Arch Surg*, 128: 1260-1267.
- [4] 张璐等,重症烧伤大鼠早期外周血单个核细胞凋亡的实验研究(待发表).
- [5] 张亚历,1996,分子生物学常用实验方法,姜泊主编,pp176-177,人民军医出版社,北京.
- [6] Vander Waal R, et al., 1997, *Radiation Research*, 148: 455-462.
- [7] Sellins K, et al., 1991, *Radiation Research*, 126: 88-95.
- [8] HeL, et al., 1997, *Experimental Cell Research*, 232: 64-71.
- [9] Read RA, et al., 1984, *Radiation Research*, 98: 491-505.
- [10] Kolesnick RN, et al., 1998, *Annu. Rew. Physiol.*, 60: 643-665.
- [11] Reed JC., 1993, *J. Cell. Biol.*, 75: 241.

## PRELIMINARY STUDY ON THE HEAT-INDUCED RAW264.7 CELL APOPTOSIS AND ITS MOLECULAR MECHANISM

ZHANG Lu ZHANG Lin ZHAO Ke Sen

(Key Lab for Shock and Microcirculation Research of PLA,  
The First Military Medical University, Guangzhou, 510515)

### ABSTRACT

To elucidate the possible modes and molecular mechanisms of heat-induced cell death, Raw264.7 was used for in

in vitro studies. The effect of heat on Raw264.7 cells was detected by flow cytometric analysis and DNA electrophoresis. The data show that heat can induce Raw264.7 cells apoptosis and effectively down-regulate the expression of bcl-2 gene and up-regulate bax gene. It was suggested that apoptosis is an important cell death pathway taken by the heat-injured Raw264.7 cells in vitro, the decrease of Bcl-2/Bax ratio may be one of the molecular mechanisms of heat-induced cell death.

Key words: Heat Apoptosis Gene expression

## 吐温 80 对体外 HeLa 细胞的杀伤抑制\*

朴文姬 杨虎川 杨耀琴 陶惠红 陈斌

(上海铁道大学医学院肿瘤细胞研究室 上海 200070)

吐温 80 作为一种表面活性剂,是一种安全、低毒的细胞质膜作用药物,对正常细胞组织无明显毒性<sup>[1]</sup>,并可作为助溶剂用于临床治疗。本室已在细胞、动物实验中证实其为良好的温热治疗肿瘤协同药物,即为温热增敏剂<sup>[2]</sup>。有报道吐温 80 有轻度肿瘤细胞抑制作用<sup>[1]</sup>,但由于不同肿瘤细胞株对药物敏感度都不尽相同,本实验研究了不同浓度吐温 80 对 HeLa 细胞株(人宫颈癌细胞株)的抑制作用,并通过检测 HeLa 细胞 HSP70——肿瘤细胞增生、生长所必需的保护性蛋白<sup>[3]</sup>,进一步探讨吐温 80 对 HeLa 细胞抑制性杀伤机制,同时研究 LPS、PGE1 及其与吐温 80 协同对 HeLa 细胞 HSP70 表达影响。

### 材料和方法

#### 一、材料

吐温 80(上海大众制药厂,批号 84001);HeLa 细胞(人宫颈癌细胞株,日本札幌医科大学病理研究室赠);标准 HSP70(Sigma. Co.);兔抗人 HSP70 多克隆抗体(日本札幌医科大学病理研究室赠);碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 抗体(华美公司);LPS(E.coli. 026:B6, Sigma. Co.);PGE1(长春白求恩医科大学制药厂,批号 95001);MTT(Thiazocyl blue, Sigma. Co.)

#### 二、方法

1. 细胞抑制实验(MTT 法)<sup>[4]</sup> HeLa 细胞以含 10%FCS RPMI1640 培养液常规培养(含 25mmol/L HEPES; 16mmol/L 葡萄糖; 100U/ml 青霉素,

100μg/ml 链霉素),以 0.25%胰酶消化制成细胞悬液( $2.5 \times 10^5$ /ml),均匀铺入 96 孔细胞培养板:100μl/孔,第一列孔加生理盐水作对照,余列孔加不同浓度吐温 80(0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.04%)、LPS(终浓度:0.1μg/ml)及 PGE1(终浓度:10mg/ml),继续置 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱温育 24 小时,加 25μl/孔 MTT(5mg/ml in PBS)37℃2 小时,500×g 离心 10 分钟,去上清液,加 100μl/孔溶解缓冲液(SDS 溶于 50%DMF:20% W/V, pH: 4.7),37℃1 小时,于微孔读数仪(516MC 型,上海三分厂)下以 570nm 读取 OD 值。细胞抑制率按以下公式表示:抑制率(%)=[1-样品 OD 值/对照 OD 值]×100%<sup>[5]</sup>。

2. 细胞裂解液制备 HeLa 细胞同前制成悬液( $1 \times 10^6$ /ml)均匀铺入 24 孔细胞培养板:1ml/孔,培养 48 小时后加入不同浓度吐温 80、LPS 及 PGE1(加法同上),继续置 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱温育 24 小时,细胞经冷 PBS 冲洗三次(死亡脱落细胞需离心取细胞),加 0.5% NP-40 裂解液(50mmol/L Tris. HCl pH6.8、15mmol/L NaCl、5mmol/L EDTA、0.5% NP-40、1mmol/L PMSF, 临用配制),冰浴 20 分钟,将裂解液及刮下的细胞残渣移入离心管, 12000rpm 离心 5 分钟,取上清液-20℃贮存备用。

3. SDS-PAGE 蛋白电泳及 Western-blotting 蛋白鉴定<sup>[6]</sup> 将上述细胞裂解液及标准 HSP70 以加样缓冲液 2:3 稀释后等量加样在 7%的聚丙烯酰胺凝胶中垂直电泳(夹心式电泳槽),凝胶以 0.2%考马斯亮蓝 R250 染色显示外,另一相同加样凝胶继续转膜,以半

\*国家自然科学基金和上海市科技发展基金资助课题(编号 39176825, BB03801)。