

综述。

参 考 文 献

- [1] Speleman F, et al., 1991, *Cytogenet Cell Genet*, 56:14.
 [2] Vanni R, et al., 1997, *Genes Chromosom Cancer*, 18:155.
 [3] Sonoda G, et al., 1997, *Genes Chromosom Cancer*, 18:115.
 [4] Kolvrás S, et al., 1991, *Clinical Genetics*, 39: 278.

- [5] 张 杰等, 1997, *中华病理学杂志*, 26(6), 356.
 [6] Hopman A. H. N, et al., 1991, *Cancer Research*, 52:644.
 [7] Waldman F. M, et al., 1991, *Cancer Research*, 51:3807.
 [8] Zhou J. Y, et al., 1993, *Cancer Genet Cytogenet*, 69:1.
 [9] 张杰等, 1997, *中华病理学杂志*, 26(1), 46.
 [10] Zhang Y, et al., 1997, *Genes Chromosom Cancer*, 18:310.

研究工作

P-gp 和细胞容积调节

陈丽新 王立伟

(广东医学院生理教研室 湛江 524023)

细胞容积调节对细胞代谢、分泌、增殖等功能有着广泛的影响。近年来,人们对细胞容积调节进行了广泛、深入的研究,但其调节机制目前尚不清楚。资料表明,MDR1^[1]、pI_{Cl_a}^[2]、ClC-2^[3]、ClC-3^[4]等基因可能与细胞容积调节有关。MDR1 基因产物 P-gp (P-glycoprotein) 在睫状体非色素上皮(NPE)细胞容积调节中的作用如何仍未确定。本研究用基因阻抑技术(Antisense knock-down Technique)^[5]阻断 NPE 细胞的 MDR1 基因表达后,细胞容积调节受抑制,表明 MDR1 基因与细胞容积调节有关。

材料和方 法

1. 细胞分离和培养

睫状体上皮细胞分离和培养的方法见文献^[6]。从当地屠宰场获得新鲜牛眼,分离出睫状体尖部,胰酶(0.25%)消化 30-40min, E199 (Sigma) 培养液吹吸,离心、漂洗二次。细胞悬液接种在 24 孔培养板中的玻片上,用含 10% 小牛血清的 E199 培养液,置于 37℃ 孵箱中培养 14-18h 后,更换培养液,按不同组别分别进行处理。

2. 反义寡核苷酸处理细胞

高压液相层析法提纯的两种 MDR1 反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide) 由 Severn Biotech Ltd (UK) 合成。其中鼠源 MDR1 反义寡核苷酸(简称鼠反义 MDR1) 与小鼠 MDR1 基因^[7]mRNA 起始码区(第 101-115 碱基)互补(5' CTC CAT CAC CAC CTC 3'), 人源 MDR1 反义寡核苷酸(简称人反义 MDR1) 与人类 MDR1 基因^[8]mRNA 起始码区(第 416-430 碱基)互补(5' ATC CAT CCC GAC CTC 3')。为降低反义寡核苷酸对核酸酶的敏感性,减少反义寡核苷酸分解,两种 MDR1 反义寡核苷酸的两端头三个碱基加上保护基团硫代磷酸脂(phosphorothioate)。为促进细胞对反义寡核苷酸的摄取,在反义寡核苷酸中加入阳离子脂质体 Lipofectin 20mg/L (Gibco BRL, USA)。

新鲜分离的细胞培养 14-18h 后,吸弃培养液,对照组用 E199 培养液继续培养 48h, 各处理组用含药物的 E199 培养液继续培养 48h, 然后进行 P-gp 免疫荧光标记和测定,或测量细胞在低渗液刺激下容积的改变。各处理组如下: Lipofectin 组 (Lipofectin 20mg/L); 鼠反义 MDR1 组 (Lipofectin 20mg/L 加 200mg/L 鼠反义 MDR1); 人反义 MDR1 组 (Lipofectin 20mg/L 加 10、50、100 或 200mg/L 人反义 MDR1)。

3. P-gp 免疫荧光测定

为了解反义 MDR1 作用后 MDR1 基因被阻抑的程度,用免疫荧光法检测 MDR1 基因产物 P-gp 的水

平。

在本项实验中,对照组又分为抗 P-gp 抗体 JSB-1 阴性组、JSB-1 阳性组。除 JSB-1 阴性对照组外,其他各组均加入 JSB-1。免疫荧光标记主要步骤:下述各有关溶液均用磷酸盐缓冲液(PBS, Sigma)配制。PBS 溶液漂洗细胞,4%聚甲醛(Paraformaldehyde)(加 0.12mol/L 蔗糖)固定,0.5% Triton X-100 浸浴,10% 羊血清浸浴,加入(JSB-1 阳性组)或不加入(JSB-1 阴性组)P-gp 特异抗体(单克隆小鼠抗 P-gp 抗体 JSB-1, Monosan, Sanbio, Netherlands),浓度 1:10,置于冰箱中(4℃)过夜(14-16h)。PBS 漂洗,加入 FITC (Fluorescein isothiocyanate)标记的羊抗鼠 Ig-G 的荧光标记抗体(Sigma),浓度 1:100,置暗处温育 1h, PBS 漂洗,玻片反向安放在专用介质中,以防荧光分解。用透明指甲油封口,在激光共聚焦显微镜(Noran Instruments, Middleton, WI, USA)下拍摄图像,用 Metamorph 图像分析系统(Universal Imaging Corporation, USA)检测荧光,测得每个细胞荧光强度(grey level)后,再求每组的荧光强度均数。荧光强度均数单位以 Unit 表示,0Unit=黑,255Unit=白,数值越大,表示荧光越强。本文结果中有关荧光强度数据均为荧光强度均数值。

4. 细胞容积测量

应用反射-散射技术测量细胞在低渗液中容积变化。当细胞在低渗液中肿胀时,体积增大,散射光增加,被收集的光度下降。而细胞通过自身调节使其容积减小,趋向恢复正常时,散射光减弱,光度回升。实验用 luminescence spectrometer 50B(perkin Elmer, UK)连续记录对照组,鼠反义 MDR1 200mg/L 组,人反义 MDR1 200mg/L 组的细胞容积变化。入射光以 45 度角照射细胞,激发光波长 345nm,发射光波长 392nm。用

等渗液灌流 10-20min 后,改灌低渗液 10min,再灌等渗液 10min,用配套软件对所测光度值进行标准化处理分析。本文以标准化光度值的倒数表示细胞相对容积。

5. 灌流液

低渗灌流液内含(mmol/L):105 NaCl, 0.5 Mg-Cl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES。等渗灌流液除增加 70mmol/L D-manitol 外,其他成份及浓度与低渗灌流液相同。低渗灌流液和等渗灌流液分别用蔗糖调至渗透压 230 mosm/L 和 300 mosm/L,并分别用 Tris 液调至 pH 7.40。

6. 统计方法

本文数据均以均数±标准误表示,均数差异显著性检验用 t 检验。图中圆括号内数据是实验细胞数。

结 果

1. MDR1 基因在 NPE 细胞的表达

P-gp 是 MDR1 基因产物。为检测 MDR1 基因的表达水平,在激光共聚焦显微镜下,拍摄 P-gp 免疫荧光图像,并测量和分析 P-gp 荧光强度值。镜下可见没有加入 P-gp 特异抗体 JSB-1 的阴性对照组细胞只显示微弱的自发荧光,而分别加入 JSB-1 的阳性对照组细胞和 Lipofectin 组细胞显示较强的荧光(本文没有显示图像)。用 Metamorph 图像分析系统分析图像,获得荧光强度均数如表 1。此结果表明 NPE 细胞表达 MDR1 基因,并存在着 P-gp 蛋白。而 Lipofectin 对细胞 MDR1 基因的表达没有影响。

表 1 NPE 细胞的 P-gp 免疫荧光

组别	细胞数	荧光强度(Unit)		P 值
		均数	标准误	
JSB-1 阴性对照组	88	13.3	1.3	
JSB-1 阳性对照组	80	89.0	3.8	<0.01
Lipofectin 组	32	92.2	3.6	<0.01

2. 人反义 MDR1 抑制 P-gp 的表达

在人反义 MDR1 处理 48h 后,激光共聚焦显微镜荧光图像显示 NPE 细胞的 P-gp 免疫荧光明显减弱。如图 1 所示,人反义 MDR150、

100、200mg/L 组(h50、h100、h200)与加入 JSB-1 的阳性对照组(Ctrl)相比,均有显著性差异(P<0.01)。P-gp 的表达与人反义 MDR1 的浓度有关,随着反义寡核苷酸浓度的增加,对

P-gp 表达的抑制逐渐增强,两者高度正相关($r=0.95, P<0.01$)。即人反义 MDR1 对 P-gp 表达呈剂量依赖性抑制作用(图 2)。200mg/L 组免疫荧光强度值为 32.0 ± 2.9 , 免疫荧光抑制率达 64%。此结果表明人反义 MDR1 有效地抑制 NPE 细胞 MDR1 基因表达,减少其产物 P-gp 蛋白合成。

3. 鼠反义 MDR1 对 P-gp 表达的影响

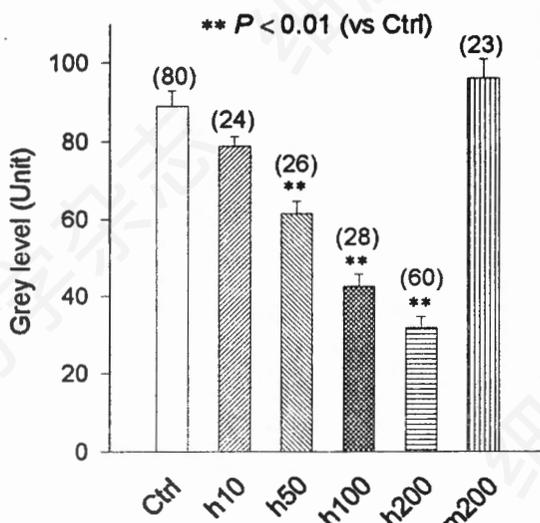


图 1 反义 MDR1 对 NPE 细胞 P-gp 免疫荧光量的影响

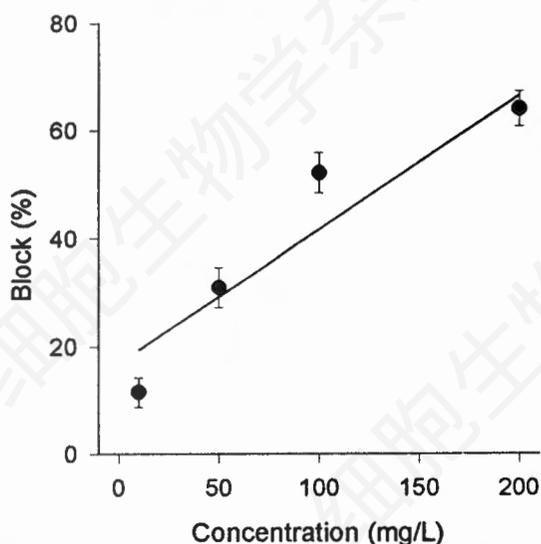


图 2 人反义 MDR1 对 P-gp 的剂量依赖性抑制作用

鼠反义 MDR1 200mg/L 组(m200)NPE 细胞的 P-gp 免疫荧光值为 96.1 ± 4.9 ($n=23$),与 JSB-1 阳性对照组相比,无显著性差异($P>0.05$;图 1)。表明鼠反义 MDR1 不能阻抑 NPE 细胞 MDR1 基因表达,P-gp 量没有显著性改变。

4. 低渗液作用下的 NPE 细胞的容积

图 3 所示是对照组($n=10$)在低渗液灌流前后细胞容积变化。在等渗液灌流期间(600s),细胞容积不变。然后用低渗液(hypotonic)灌流,在低渗液灌流约 20s 后,细胞开始肿胀,容积增大,约 50s 时(图 3 时间座标为 650s)容积达到最大值。随后细胞容积回缩,300s 时(图 3 时间座标为 900s)完全恢复至等渗液灌流的对照水平。此结果显示 NPE 细胞有较强的自身容积调节性回缩能力,在细胞发生渗透性肿胀时,细胞可通过自身调节使容积恢复正常。

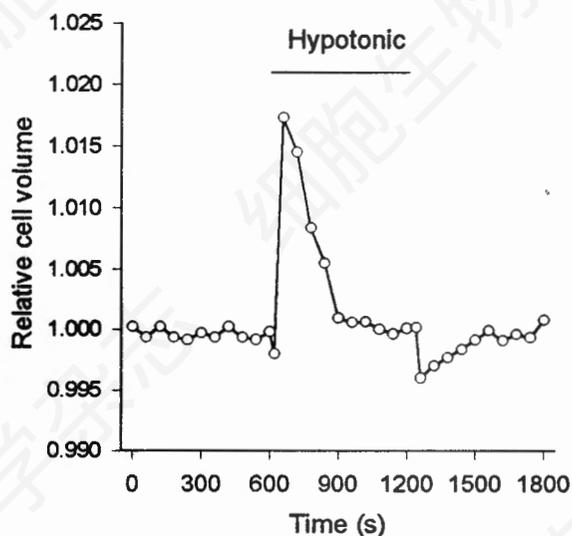


图 3 低渗液刺激下的 NPE 细胞容积反应

5. 反义 MDR1 对细胞调节性容积回缩的影响

如图 4 所示,鼠反义 MDR1 200mg/L 组(m200; $n=8$)在低渗液刺激下的 NPE 细胞容积反应与对照组相似。无论细胞容积增加幅度、自身容积恢复时间及恢复程度等均与对照组非

常接近($P>0.05$),表明鼠反义 MDR1 对 NPE 细胞自身调节性容积回缩能力无影响。

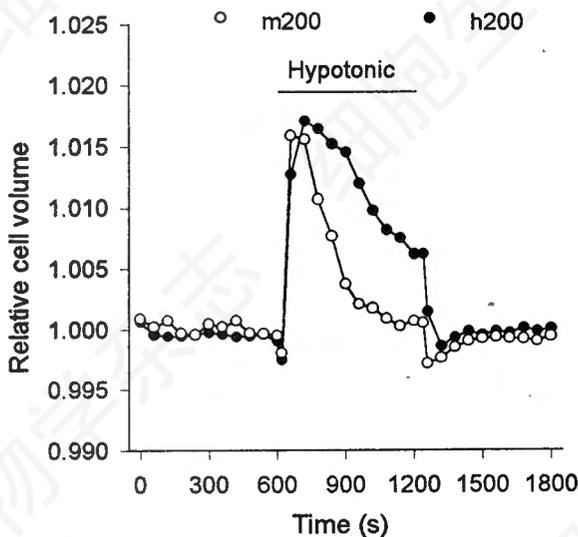


图 4 反义 MDR1 对 NPE 细胞 RVD 的影响

人反义 MDR1 200mg/L 组(h200; n=8)细胞在低渗液灌流刺激下,细胞开始肿胀的时间和细胞容积增加的幅度与对照组相似。但细胞容积维持在接近最大值的时间比较长,约 150s(图 4 时间座标 700—850s),而且细胞容积回缩缓慢,在低渗液灌流 450s(时间座标 1050s)时容积才恢复 50%,与对照组相比仍有显著性差异($P<0.01$),此后一直到重新灌流等渗液为止,基本维持在此水平,不能完全恢复正常。此结果显示人反义 MDR1 抑制 NPE 细胞调节性容积回缩,使细胞在低渗刺激条件下不容易通过调节性容积回缩使细胞容积恢复正常。

讨 论

细胞容积调节是细胞基本功能之一。细胞能够通过自身容积调节过程抵抗容积变化。例如,当细胞肿胀时,诱发细胞自身容积调节过程使细胞容积回缩,趋向于肿胀之前的容积,即调节性容积回缩(RVD)。相反,细胞皱缩诱发细

胞容积调节使细胞容积回升,趋向于皱缩之前的容积,此为调节性容积回升(RVI)。在细胞 RVD 过程中,容积激活性 Cl^- 通道起着重要的作用。细胞肿胀激活细胞膜某些离子通道,如容积激活性 Cl^- 、 K^+ 通道,使细胞失去某些离子如 Cl^- 、 K^+ 等,并伴随水外流,从而使细胞由肿胀状态向正常容积状态恢复。眼睫状体色素上皮和非色素上皮细胞分泌房水,房水分泌机制与细胞容积调节有关^[9]。眼睫状体非色素上皮细胞容积激活性 Cl^- 通道起着调控房水分泌速率的重要作用。一般认为, Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 通过协同转运从血管侧进入色素上皮细胞后,通过细胞间的缝隙连接进入 NPE 细胞,引起 NPE 细胞容积增大,进而激活细胞膜离子转运系统, Na^+ 、 K^+ 外流,同时水伴随移动而形成房水。容积激活性 Cl^- 通道蛋白的分子本质尚不清楚。候选通道蛋白有 P-gp, CLC-3, pI_{Ca} 等。本结果表明人反义 MDR1 抑制 NPE 细胞的 RVD,提示 P-gp 可能与容积激活性 Cl^- 通道有关。

本实验结果显示,人反义 MDR1 作用于 NPE 细胞后,细胞的 P-gp 免疫荧光量明显降低,人反义 MDR1 对 P-gp 表达呈剂量依赖性抑制,两者高度正相关,表明人反义 MDR1 可特异性阻抑 NPE 细胞 MDR1 基因表达,使 MDR1 基因产物 P-gp 生成减少。同时,人反义 MDR1 抑制低渗液刺激引起的细胞 RVD,细胞容积恢复过程缓慢,且增大的细胞容积不能完全回降至正常,容积恢复率仅达 50%,即细胞在低渗环境中的自身容积调节能力减弱。表明 MDR1 基因与细胞容积调节有关,MDR1 基因通过其产物 P-gp 参与 RVD。反义寡核苷酸是一种人工合成的寡核苷酸,可特异性地与相应的靶 mRNA 结合,占据相应 mRNA 空间,阻抑该 mRNA 表达,妨碍该基因产物蛋白质翻译,导致相应蛋白质减少而不影响其他基因的表达。本实验设计的人反义 MDR1 在 1,8,10 位置上三个碱基与鼠反义 MDR1 不相同,这两种反义 MDR1 作用后,细胞的 P-gp 免疫荧光量和细胞 RVD 反应完全不同,表明反义寡核苷

酸阻抑有较强的特异性,人反义MDR1可特异性地阻抑NPE细胞MDR1基因的表达,而鼠反义MDR1则不能。

P-gp由MDR1基因编码,在哺乳类细胞,P-gp的过度表达与细胞抵抗一系列结构不相关的细胞毒性化合物有关。它是膜上一种药物泵,分解ATP供给能量,将细胞毒性化合物泵出细胞外,以减少细胞内药物浓度(多重耐药性)。后来,实验发现P-gp cDNA转染的细胞容积激活性Cl⁻电流增加^[1]。奎尼丁等药物能够抑制P-gp转运药物,也能抑制细胞容积激活性Cl⁻电流。P-gp抗体阻断容积激活性Cl⁻电流^[10],因此认为P-gp同时也是一种容积激活性Cl⁻通道,参与细胞的容积调节。但另有一些实验结果不支持上述看法^[11]。对P-gp在容积激活性Cl⁻电流及细胞容积调节中的作用,目前还有许多争论。本实验用基因阻抑技术,抑制MDR1基因的表达,使其基因产物P-gp减少,导致细胞的RVD减弱,因此证明P-gp参与细胞的容积调节。P-gp可能作为一种容积激活性Cl⁻通道参与细胞的RVD。但200mg/L的人反义MDR1并不能完全抑制RVD,其原因之一可能是还有其他基因参与RVD,这有待于进一步证实。

摘 要

本实验用基因阻抑技术阻抑牛眼睫状体非色素上皮(NPE)细胞MDR1基因表达,在激光共聚焦显微镜下检测细胞MDR1基因产物P-

gp免疫荧光,研究MDR1基因及P-gp与细胞容积调节的关系。结果表明:NPE细胞表达MDR1基因,存在P-gp蛋白。人反义MDR1特异性阻抑NPE细胞MDR1基因表达,剂量依赖性抑制P-gp免疫荧光($r=0.95, P<0.01$),减少P-gp合成,导致细胞容积调节减弱,鼠反义MDR1对NPE细胞MDR1基因表达及容积调节没有影响。结果提示P-gp在细胞容积调节中起重要作用。

关键词:反义寡核苷酸 MDR1 P-glycoprotein
免疫荧光 容积调节

参 考 文 献

- [1] Gill, D. R. et al., 1992, *Cell*, **71**: 23-32.
- [2] Paulmichl, M. et al., 1992, *Nature*, **356**: 238-241.
- [3] Grunder, S. et al., 1992, *Nature*, **360**: 759-762.
- [4] Duan, D. et al., 1997, *Nature*, **390**: 417-421.
- [5] Schlingensiepen, R. et al., 1997, *Antisense-From Technology to Therapy*, Blackwell science, Berlin.
- [6] Jacob, T. J. C. 1991, *Am. J. Physiol.*, **261** (Cell Physiol., 30), C808-C813.
- [7] Gros, P. et al., 1986, *Cell*, **47**: 371-380.
- [8] Chen, C. J. et al., 1986, *Cell*, **47**: 381-389.
- [9] Jacob, T. J. C. and Civan, M. M., 1996, *Am. J. Physiol.*, **271** (Cell Physiol., 40), C703-C720.
- [10] Wu, J. et al., 1996, *J. Physiol. (Lond.)*, **491**: 743-75.
- [11] Rasola, A. et al., 1994, *Biol. Chem.*, **269**: 1432-1436.

P-GLYCOPROTEIN AND VOLUME REGULATION

CHEN Li Xin WANG Li Wei

(Department of Physiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524023)

ABSTRACT

An antisense "knock down" technique has been used to inhibit the expression of MDR1 gene in bovine non-pigmented ciliary epithelial cells (NPE). The immunofluorescence of P-glycoprotein (P-gp), the product of MDR1 gene, was monitored with a real-time laser confocal microscope. The relationship between P-gp and the volume regulation was studied. The results showed that MDR1 gene was expressed in N-PE cells. Human MDR1 antisense inhibited specifically the expression of MDR1 gene in the cells, reduced P-gp immunofluorescence in a dose-dependent manner

($r=0.95, P<0.01$) and suppressed the cell volume regulation. There was no effect of mouse MDR1 antisense on the expression of MDR1 gene and the volume regulation in NPE cells. The results suggest that P-gp plays an important role in the cell volume regulation.

Key words: Antisense oligonucleotide MDR1 P-glycoprotein Immunofluorescence Volume regulation

人肾小球系膜细胞葡萄糖转运蛋白的研究

李颖健 刘志红 章 精 陈朝红 黎磊石

南京大学医学院临床学院

(南京军区南京总医院 解放军肾脏病研究所 南京 210002)

肾小球系膜细胞在维持肾小球正常结构与功能方面起着非常重要的作用。其主要生理功能包括: (1) 合成多种细胞外基质; (2) 通过其收缩与扩张作用, 参与肾小球血流动力学的调节; (3) 通过其吞噬作用, 参与肾小球系膜区大分子物质的清除。此外, 系膜细胞可产生多种细胞因子, 通过自分泌或旁分泌途径参与肾小球炎症反应, 进而使细胞外基质 (ECM) 产生增加。肾小球系膜细胞 ECM 合成增加在糖尿病肾病肾小球硬化中起关键作用。增高培养液中葡萄糖浓度能直接刺激体外培养的系膜细胞 ECM 净合成增加^[1], 但葡萄糖是如何进入系膜细胞并调节 ECM 合成的目前还不清楚。国外对于大鼠系膜细胞研究表明, 葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 是系膜细胞葡萄糖转运蛋白的主要类型^[2,6], 而对于人系膜细胞 GLUT1 的研究国内外尚无报道, 本文首次研究了 GLUT1 在人肾小球系膜细胞的表达与功能。

材料和方法

1. 系膜细胞的培养和鉴定

取不适合肾移植的供肾, 按常规方法^[3]用机械网筛法分离收获肾小球, 镜检小球纯度 >95%, 用 0.1% 的 IV 型胶原酶 (Sigma) 37℃ 消化 20min 后, 置于含 20% 小牛血清 (杭州四季青生物工程研究所) 的 DMEM/F-12 (Promega) 中培养, 2-3 天后可见卵圆形的上皮细胞长出, 以后上皮细胞逐渐死亡, 代之以梭形

或星形的系膜细胞, 3 周后铺满瓶底。用 0.25% 胰蛋白酶消化, 传代培养。间接免疫荧光鉴定, 抗结蛋白、Thy-1 染色阳性, 抗角蛋白、因子 VIII 阴性, 证实为系膜细胞。实验采用第 10-15 代培养细胞。

2. 原位逆转录和 PCR

胰蛋白酶消化, 收集细胞, 取 1×10^5 细胞用 PBS 洗涤后, 加入 30 μ l 2% Triton 溶液 (4% Triton 50 μ l, RNasin 10 μ l, 1mmol/L DTT 1 μ l, DEPC 水 39 μ l), 液氮中反复冻融 3 次。将其分装成 4 管。按照逆转录试剂盒 (Promega) 操作要求进行逆转录^[4]。用于扩增人 GLUT1 的正引物序列为 5'-CATGTGCTTCCAGT-ATGTGG, 负引物序列 5'-GTCAGGTTTGGAAGT-CTCAT。PCR 扩增产物为 313bp。PCR 反应条件为 94℃ 1min, 65℃ 1min, 72℃ 1min, 共 35 个循环^[5]。3% 琼脂糖溴乙锭电泳, 紫外灯下判断结果。PCR 扩增产物的特异性用限制性内切酶 BstO 1 进一步鉴定。PCR 试剂及限制性内切酶均购自 Promega 公司。

3. 免疫染色荧光

每孔 2×10^4 系膜细胞接种至纤连蛋白预先包被的 Chamber Slides 培养过夜, PBS 洗 3 次。用 2% 多聚甲醛固定。正常山羊血清处理后加入 GLUT1 多克隆抗体 (CALBIOCHEM $\text{\textcircled{R}}$), 室温温育 30min, PBS 洗涤 3 次, 加 FITC-猪抗兔 IgG (DARKO), 室温温育 30min, PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜下观察结果^[7]。

4. 流式细胞仪分析

用 Versene (含 0.2% EDTA 的 PBS) 消化, 收集细胞。取 1×10^6 细胞, 用预冷的 0.1% PBA (PBS+0.1% BSA) 洗涤细胞后, 加入 GLUT1 多克隆抗体 (CAL-

本课题为国家自然科学基金资助项目, 39870288。