

研究观察了不同剂量 γ -射线照射后, AHH-1 细胞凋亡的发生规律。结果表明, 不同剂量照射后 24 h 是淋巴细胞死亡的高峰期, 3—12 Gy 照射范围内, 凋亡是 AHH-1 细胞死亡的主要

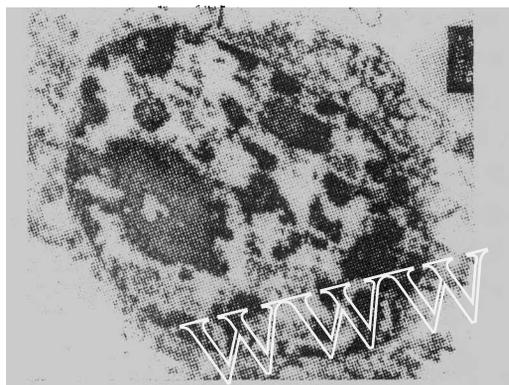


图4 坏死前期细胞(部分胞膜溶解, 细胞器破坏严重, 核碎裂)

方式, 且呈现较好的量效关系; 15、20 Gy 照射后, 除凋亡外, 坏死可能也是 AHH-1 细胞死亡的主要途径。不同

剂量照射后细胞活存率的下降规律与细胞凋亡率呈现较好的对应关系。20 Gy 照射后 6 h, 细胞活存率 OD 值与其他 6 个剂量组比较有明显下降(其他各组均在 1.5 左右, 而 20 Gy 组为 1.18), 推测该剂量对 AHH-1 细胞有较强的瞬时杀伤作用, 其作用机制有待进一步探讨。这些结果为电离辐射诱发的淋巴细胞凋亡和坏死剂量界限方面的研究提供了参考依据。

本研究还发现, 促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的比例决定了细胞是否发生凋亡。本研究发现, 经不同剂量照射后, AHH-1 细胞中 Bcl-xl、Bcl-2 抗凋亡蛋白表达量降低, Bax 促凋亡蛋白表达量升高(另文发表), 且均呈现较好的量效关系, 因而, 推测 Bcl-2、Bcl-xl 和 Bax 蛋白参与了辐射诱发淋巴细胞凋亡的调控^[3]。

〔参考文献〕

- 1 崔玉芳, 杨红, 高亚兵, 等, 小鼠脾淋巴细胞辐射死亡与凋亡的关系. 辐射研究与辐射工艺学报, 1999; 17: 101—105
- 2 崔玉芳, 高亚兵, 杨红, 等, 小鼠胸腺淋巴细胞损伤特点和机理的研究. 中国体视学与图象分析, 1998; 3: 208—213
- 3 Atan G, et al. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes & Development, 1999; 13(15): 1899—1911

2002年9月23日收到

全军医药卫生科研基金(02M1010)资助

R735.7

03010016

不同细胞周期肝癌细胞 Integrin β_1 的表达

Expression of Integrin β_1 on Hepatocellular Carcinoma Cells in Different Cell Cycle

宋关斌 秦建 赵彦华¹ 龙勉² 蔡绍哲 (重庆大学生物工程学院, 重庆 400044; 重庆一中¹, 重庆 400030; 中国科学院力学研究所², 北京 100080)

SONG Guanbin, QIN Jian, ZHAO Yanhua¹, LONG Mian², CAI Shaoxi (College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044; No. 1 Middle School of Chongqing¹, Chongqing 400030, Institute of Mechanics, Chinese Academy of Science², Beijing 100080)

【摘要】探讨人肝癌细胞(SMMC-7721)的同步化方法及粘附分子 integrin β_1 在不同周期肝癌细胞上的表达。采用胸腺嘧啶脱氧核苷、秋水仙碱顺序阻断和胸腺嘧啶脱氧核苷双阻断后释放培养的方法分别获得 G₁ 期和 S 期的肝癌细胞, 用流式细胞仪进行周期分析; 采用抗体阻断技术和流式细胞仪检测肝癌细胞上 integrin β_1 的表达。结果发现未同步化肝癌细胞 integrin β_1 表达的荧光强度为 95.70; G₁ 期和 S 期细胞的同步率分别为 74.09% 和 98.29%, integrin β_1 表达的荧光强度相应为 76.90 和 94.09。得知药物胸腺嘧啶脱氧核苷和秋

水仙碱能较好地肝癌细胞同步于 G₁ 期和 S 期; 粘附分子 integrin β_1 在 SMMC-7721 肝癌细胞上高表达, 但表达水平呈现周期差异。

【Abstract】To investigate the synchronous methods of human hepatocellular carcinoma cells (SMMC-7721) and expression of integrin β_1 on hepatocellular carcinoma cells in different cell cycle, the synchronous G₁ and S phase cells were achieved through thymine-2-desoxyriboside and colchicines sequential blockage method and double thymine-2-desoxyriboside blockage method, respectively. Expression of integrin β_1 on hepatocellular carcinoma cells was

detected with mono-antibody blockage technique and flow cytometer. The fluorescent intensity of integrin β_1 expression in general human hepatocellular carcinoma cells is 95.70; The synchronous rates of G_1 and S phase SMMC-7721 cells amount to 74.09% and 98.29%, respectively. The fluorescent intensity of integrin β_1 expression of G_1 and S phase cells are 76.90 and 94.09, respectively. It is concluded human hepatocellular carcinoma cells (SMMC-7721) could be synchronized in G_1 and S phase by thymine-2-desoxyriboside and colchicines sequential blockage method and double thymine-2-desoxyriboside blockage method; SMMC-7721 cells have higher expression rate of integrin β_1 , but this expression level showed cycle difference.

【关键词】 肝癌细胞 细胞周期 integrin β_1 同步化

【Key words】 hepatocellular carcinoma cell cycle integrin β_1 synchronization

肿瘤细胞的血道转移是一个多环节、多步骤的复杂过程,其中肿瘤细胞的粘附是肿瘤转移的决定性步骤之一,而粘附分子的表达则是决定细胞粘附行为的重要因素^[1]。整合素是肿瘤细胞与内皮细胞粘附过程中锁定阶段起主要介导作用的粘附分子^[2],许多恶性肿瘤的发展和转移均与整合素的表达异常或结构改变相关。

原发性肝癌是世界十大常见癌症之一,严重地危害着人类健康。在我国,肝癌的发病率仅次于胃癌或肺癌,列第二位。但不同细胞周期肝癌细胞上整合素的表达情况,尚未见详细报道。为此,本文从细胞周期的角度出发,考察肝癌细胞的同步化方法及粘附分子 integrin β_1 在不同周期肝癌细胞上的表达,为临床上肝癌的预防和治疗提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞

人肝癌细胞株(SMMC-7721),购于第二军医大学,在本实验室以 RPMI-1640 + 10% 小牛血清按常规方法传代培养。

1.1.2 试剂

细胞培养试剂购自德国 Hyclone 公司,秋水仙碱(Colchicine)为 Serva 公司进口分装,胸腺嘧啶脱氧核苷(Thymidine)购自重庆化学试剂公司,Monoclonal mouse anti-human CD₂₉ (integrin β_1)/FITC、Monoclonal Mouse IgG1k/FITC 购自 Ancell 美国公司。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞的同步化^[3,4,5]

G_1 期细胞采取胸腺嘧啶脱氧核苷和秋水仙碱顺序阻断后释放培养的方法获得,其简要步骤如下:取对数生长期的细胞加入胸腺嘧啶脱氧核苷至其终浓度 2 mmol/L,在 37℃、

5% CO₂ 潮湿空气中培养 12 h,弃培养液,清洗后加入新鲜培养液和秋水仙碱至其终浓度 1 μ g/mL,继续培养 10 h,横向轻摇培养瓶收集中期细胞,800 r/min 离心 3 min,收集细胞继续培养 3 h,以 0.02% EDTA + 0.25% 胰酶消化收集细胞,用 50% 冷乙醇固定。

S 期肝癌细胞采用胸腺嘧啶脱氧核苷双阻断后释放培养获得,其简要操作步骤如下:取对数生长期的细胞加入胸腺嘧啶脱氧核苷至其终浓度 2 mmol/L,在 37℃、5% CO₂ 潮湿空气中培养 12 h,弃培养液清洗后加入新鲜培养液培养 10 h,再次加入胸腺嘧啶脱氧核苷至其终浓度 2 mmol/L,培养 12 h 弃培养液,加入新鲜培养液培养 2 h,消化收集细胞,冷乙醇固定。

1.2.2 同步率检测

将收集固定的细胞分别以 pH7.4 PBS 液清洗,碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)染色 30 min,根据周期时相细胞 DNA 含量不同,利用流式细胞仪(美国 BD 公司)检测,进行细胞周期分析。

1.2.3 肝癌细胞上 integrin β_1 粘附分子的表达

(1) 取一定量肝癌细胞加入 1.5 mL EP 管中,1500 r/min,离心 5 min,弃上清。(2) 用 pH7.4 PBS 液在同样条件下洗涤细胞 2 次,倒掉上清后留约 200 μ L 溶液。(3) 混匀,将细胞悬液均分到两支 1.5 mL EP 管中。(4) 向一支 EP 管中加入 2.5 μ L Monoclonal mouse IgG 1k/FITC (阴性对照),向另一 EP 管中加入 2.5 μ L Monoclonal mouse anti-human integrin β_1 /FITC,于 4℃ 冰箱中避光反应 30 min。(5) 同前方法用 PBS 液洗涤细胞悬液 2—3 次,用流式细胞仪检测肝癌细胞上 integrin β_1 的表达。

2 结果

(1) 肝癌细胞的周期同步结果见表 1。

表 1 SMMC-7721 肝癌细胞周期同步化结果

	细胞周期		
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对比	53.51	35.48	11.01
G_1 期	74.09	16.23	9.67
S 期	1.71	98.29	0

(2) 不同周期肝癌细胞上粘附分子 integrin β_1 的表达,见表 2。

3 讨论

细胞增殖分裂是细胞最基本的生理活动。生长因子、激

素及癌基因产物等均可诱导或抑制细胞的增殖,归根到底是影响细胞周期的运行。细胞周期失控的超常快速运行,将导致癌瘤;停止不前则常是细胞衰老、凋亡的前奏。因此,从细胞周期的角度把握细胞的增殖、分裂等行为特征,显得尤为重要。

表2 不同细胞周期肝癌细胞上 integrin β_1 的表达

	integrin β_1 表达
Control SMMC-7721	95.70
G ₁ phase SMMC-7721	76.90
S phase SMMC-7721	94.09

细胞同步化是研究细胞周期各时相形态、结构、功能等相关性质差异的重要方法,体外培养细胞同步化方法有多种,可根据细胞来源不同选用不同的方法^[6,7]。本文在初步测量人肝癌细胞(SMMC-7721)周期长度的基础上,通过胸腺嘧啶脱氧核苷和秋水仙碱顺序阻断法以及胸腺嘧啶脱氧核苷双阻断法对该细胞进行同步,其G₁期和S期的同步率分别为74.09%和98.29%。本研究发现,G₁期的同步率低于S期的同步率,其原因可能与同步方法的差异有关。G₁期细胞的同步是采用胸腺嘧啶脱氧核苷和秋水仙碱顺序阻断于M中期,撤去药物后收集中期细胞培养使之进入G₁期。在收集M中期细胞时,采取摇晃振荡细胞培养瓶,使M中期细胞脱落,这样的操作影响因素较多,可能会有其它非中期细胞脱落,因此导致G₁期细胞的百分比偏低。

整合素是肿瘤细胞粘附过程中起主要介导作用的粘附分子。本实验从周期角度考察了肝癌细胞上 integrin β_1 粘附分子的表达,发现 integrin β_1 在 SMMC-7721 肝癌细胞上高表达。比较而言,G₁期肝癌细胞 integrin β_1 的表达有所降低,

而S期肝癌细胞的相应值与未同步化实验组几乎相等,这种结果反映了 integrin β_1 在肝癌细胞上表达的周期差异。

由于肿瘤实际上是一种细胞周期疾病,因此,各类抗癌药物的机理多是特异地阻断细胞周期的特定阶段。例如阻断S期的羟基脲、氮甲喋呤;阻断在G₂期的抗癌药有烷化剂(环磷酰胺及卡氮芥等)、表鬼白毒素以及顺式铂氨;阻断在M期的抗癌药有紫杉醇(taxol)及长春花碱(vinblastine)^[8]。故在抗癌药的联合用药时,宜选择阻抑在不同细胞周期阶段的抗癌药物,以对细胞周期的不同环节加以阻断,这将更有效地扼杀癌细胞。

[参考文献]

- 1 吴泽志,邵开峰,宋关斌,等.肝癌细胞在IV型胶原被衬表面的粘附特性.中华医学杂志,1999;79(5):369-372
 - 2 Timens W. Cell adhesion molecular express and homing of hematologic malignancies. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 1995; 19: 111-129
 - 3 蔡有余,李淑华,罗会元.人体肝癌细胞株(7402)的细胞同步化和中期染色体分离方法.解剖学报,1984;15(1):77-80
 - 4 章进波.细胞生物学实用方法与技术,第一版.北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1996;54-55
 - 5 宋关斌,俞为群,龙勉,等.大鼠肝癌细胞株HTC细胞的同步化及其检测.重庆大学学报(自然科学版),2000;23(4):80-82
 - 6 Galavazi G, Bootsma M. Synchronization of mammalian cells in vitro by inhibition of the DNA synthesis. Exp Cell Res, 1996;41:428-430
 - 7 Bootsma M. Studies on synchronous division of tissue culture cell initiated by excess thymidine. Exp Cell Res, 1964;33:301-304
 - 8 鲁朋,杜国光.细胞周期的失控与疾病.国外医学分子生物学分册,1997;19(3):134-137
- 2002年10月18日收到 国家自然科学基金(19972077)资助

R749.05

03010017

ACE 基因缺失型与 I 型、II 型精神分裂症的关系及临床意义

Relationship and Clinic Significance between ACE Gene Deletion Type and I Type and II Type of Schizophrenia

曾丽苹 冯方波 梅桂森 高金来 徐涛 (解放军 261 医院,北京 100094)

ZENG Liping, FENG Fangbo, MEI Guisen, GAO Jinlai, XU Tao (261 Hospital, PLA, Beijing 100094)

【摘要】 应用阳性症状量表(SAPS)和阴性症状量表(SAVS)确定 93 例精神分裂症患者临床分型并与 63 例对照者进行 ACE 基因多态

性检测,探讨 ACE 基因多态性与临床分型的关系。结果表明,精神分裂症组 ACE 基因缺失型(DD)明显高于对照组($p < 0.01$)。DD 基