

研究工作

镰刀菌 T-2 毒素对培养软骨细胞的影响*

李生广 孙 珊 吴莲英 及惠芬 洪 杰 林治焕

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

提 要

在含有不同浓度 T-2 毒素培养液中离体培养鸡胚软骨细胞, 当 T-2 浓度达到 0.01ppm 时, 可引起软骨细胞胞外基质胶原微原纤维减少, 线粒体细胞色素 c 氧化酶和 H^+ -ATP 酶的比活力下降, 表明此浓度 T-2 毒素引起了软骨细胞结构与功能的明显改变. 文章报道的方法可为检验大骨节病致病因子是否直接作用于大骨节病易侵蚀的软骨细胞提供了一种有效的实验手段.

关键词 T-2 毒素, 培养的软骨细胞, 胞外基质, 细胞色素 c 氧化酶, H^+ -ATP 酶

大骨节病是一种慢性、地方性骨关节病, 主要病变是骨端软骨变性坏死. 此病严重的危害着人民的健康, 在我国发病区域分布较广. 关于大骨节病的病因我国有三种学说, 其中之一是食物性真菌中毒致大骨节病的学说^[1]. 在永寿大骨节病考察中发现病区粮中镰刀真菌有较高的检出率^[2], 大骨节病区的玉米、小麦中也检测出了镰刀菌毒素^[3]. 在目前大骨节病致病因子尚未澄清的情形下, 为了探讨镰刀真菌毒素对大骨节病病变组织——软骨细胞的影响, 我们利用镰刀菌单端孢霉烯族毒素中毒性最强、最有代表性的 T-2 毒素^[4], 直接作用于离体培养软骨细胞, 观察其对软骨细胞结构与功能的影响. 发现一定浓度的 T-2 毒素对离体培养软骨细胞的胞外基质和线粒体细胞色素 c 氧化酶和 H^+ -ATP 酶均能产生一定的影响.

1 材料与方法

1.1 软骨细胞的培养

参照王维哲方法^[5]进行. 取孵化 13d 的鸡胚在无菌条件下剪取并剥离其两侧肢骨(股骨和胫骨)和胫骨, 用 Simm's 缓冲液(pH7.2)配制的 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 消化 15min. 用

Simm's 缓冲液洗 2 次, 截去骨干部, 取骨骺端与全部胫骨, 用剪刀剪碎, 再用胰蛋白酶消化 20min, 用培养液 Ham's F-12 pH7.2 (GIBCO Laboratories Life Technologies Inc. USA) 洗 2—3 次, 吸管吹打分散软骨细胞, 将分散后的软骨细胞分成 4 组, 一组为对照、另三组分别加入 0.004ppm, 0.01ppm 和 0.04ppm T-2 毒素, 然后分装培养瓶(培养瓶中预先放好消毒过的盖玻片), 密封, 37℃ 恒温培养箱中培养. 第 3 天在无菌条件下各组分别换一次培养液, 继续培养, 第 5 天取出盖玻片待制备电镜观察样品用, 倾去培养液, 刮取贴壁培养细胞待制备细胞匀浆用.

1.2 电镜样品的制备^[6]

在上述培养瓶中取出生长着细胞的盖玻片用 PEM (Pipes (piperazine-N, N'-bis [2-ethanesulfonic acid]) 100mmol/L, EGTA 1mmol/L, $MgCl_2$ 0.5 mmol/L, pH6.9) 缓冲液洗 2 次, 再用含 0.5% Triton X-100 的 PEM 缓冲液处理 15min 后, 用 PEM 缓冲液洗 3 次,

* 本研究得到“七·五”攻关项目 75-62-03-08 基金资助.

收稿日期: 1992-06-19 修回日期: 1992-07-20

然后用2%的戊二醛固定15min,再用PBS缓冲液pH7.2洗2次,再经含1% OsO₄的PBS缓冲液固定30min后,酒精逐级脱水,CO₂临界点干燥,真空喷金用JSM-35 CF扫描电镜观察。

1.3 软骨细胞匀浆液的制备

加缓冲液(Tris-HCl 10mmol/L,蔗糖0.25 mol/L, pH7.4)刮取含不同T-2毒素的各组培养细胞,再用缓冲液洗培养瓶2次,合并各次刮取液,在[X]-64-01型离心机上(北京医疗仪器修理厂出品)以2000 r/min离心7min,吸去上清液,加缓冲液后进行超声破膜处理。利用LABSONIC 2000 B. BRAUN型超声仪,以50W输出功率在冰浴中分两次进行超声处理,每次2min,中间间隔数分钟。超声破膜后在日

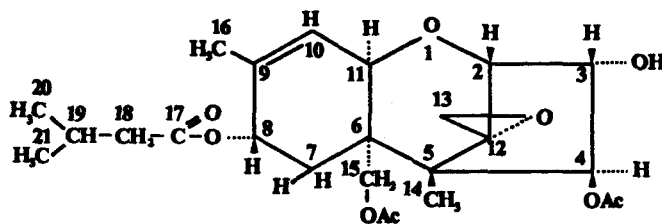
立离心机上(用RPR 20-3-849头)以2300 r/min离心7min,吸取上清,即得软骨细胞匀浆液。

1.4 酶活力测定

线粒体细胞色素c氧化酶活力测定参照文献[7]方法进行,琥珀酸脱氢酶测定参照文献[8]方法进行, H⁺-ATP酶测定参照文献[9]方法进行。此三种酶测定时均使用光径1cm的微型比色杯进行,反应体系均为0.7ml。

2 结果与讨论

T-2毒素与大骨节病区玉米、小麦中检出的镰刀菌毒素^[3]有类似的结构。T-2的结构式如下:



T-2毒素在室温环境下非常稳定,加温至200℃ 1h其毒力不减弱,该化合物结构中的氧环和双键是其活性部位。我们利用T-2毒素加入到培养液中观察其对软骨细胞的影响。

2.1 不同T-2毒素对培养软骨细胞胞外基质和细胞骨架网络的影响

选取0.004ppm, 0.01ppm和0.04ppm T-2毒素,分别加入到细胞培养液中培养离体软骨细胞,以不加毒素者为对照,观察不同浓度T-2毒素对细胞骨架和胞外基质中胶原微原纤维的影响。由于在电镜样品制备中加入了去污剂0.5% Triton X-100处理15min,使得细胞整个骨架的结构易于观察。此时质膜已消失,细胞内大部分细胞器均已流失,扫描电镜下细胞骨架能清晰地显示出来,同时细胞外基质中的胶原微原纤维也可清晰地显示。实验结果可见,对照组细胞骨架及胞外基质中胶原微原纤维自

身交错形成的丝状网络结构(图1a)。加入0.004ppm T-2毒素细丝状网络结构与对照组无明显差别,细胞骨架和胞外基质中胶原微原纤维均无明显变化(图1b),加入0.01ppm T-2毒素组,与对照组相比,发现胞外基质中胶原微原纤维明显减少,而细胞骨架未见明显变化(图1c),加入0.04ppm T-2毒素组后,不仅胞外基质减少,而且部分细胞骨架也有减少(图1d)。软骨细胞能合成胶原微原纤维。我们的实验结果说明,离体鸡胚软骨细胞培养过程中加入0.004ppm T-2毒素,还未使软骨细胞合成与分泌胶原微原纤维受到损害。而当T-2浓度增加到0.01ppm时,则损害了软骨细胞合成与分泌胶原微原纤维的能力,但在此浓度下细胞骨架仍处于正常状态。当加入的T-2浓度继续增高达0.04ppm时,则不但损害了软骨细胞合成与分泌胶原微原纤维,而且也开始影响到软

骨细胞的骨架蛋白。

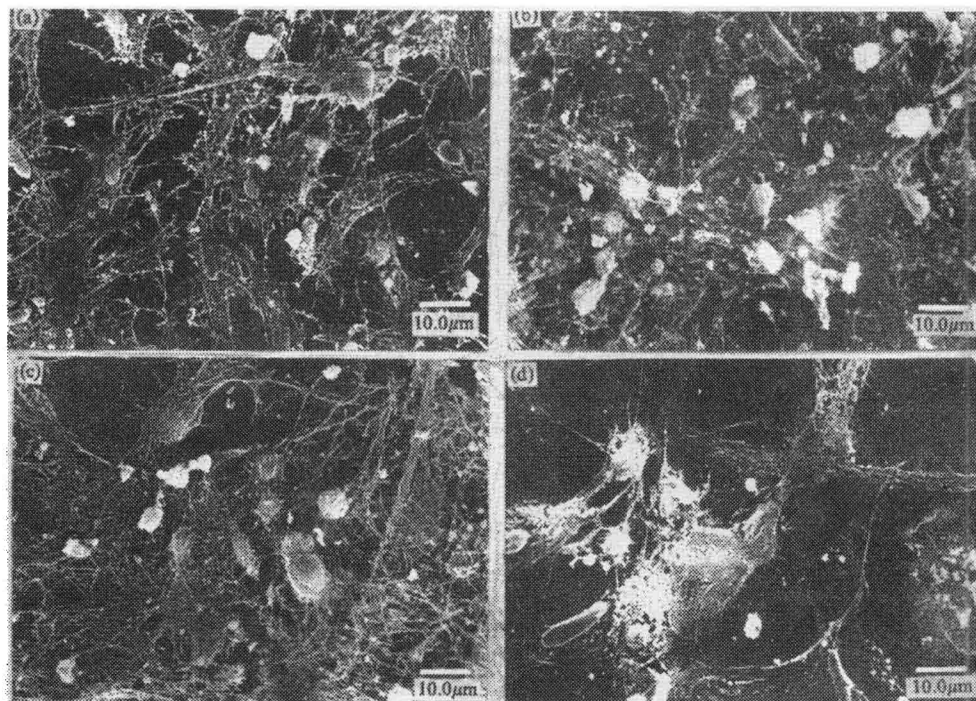


图 1 不同浓度 T-2 毒素下鸡胚软骨细胞超微结构

Fig. 1 The ultrastructure of chicken embryo chondrocytes in different concentration of T-2 toxin

样品在不同浓度 T-2 毒素中培养 4d

The specimens were cultured in media containing different concentrations of T-2 toxin for 4 days

(a)对照组:培养鸡胚软骨细胞骨架和胞外基质胶原微原纤维

Control: showing cytoskeleton and collagen microfibrils in extracellular matrix of chicken embryo chondrocyte

(b)加 0.004ppm T-2 毒素组:细胞骨架和胞外基质胶原微原纤维与对照组相似

Addition of 0.004 ppm T-2 toxin: showing similar cytoskeleton and collagen microfibrils compared with that of control

(c)加 0.01ppm T-2 毒素组:胞外基质胶原微原纤维减少

Addition of 0.01ppm T-2 toxin: showing a significant decreasing in collagen microfibrils of specimens

(d)加 0.04ppm T-2 毒素组:细胞密度降低,骨架受损,胞外基质胶原微原纤维减少

Addition of 0.04ppm T-2 toxin: showing the lower density of chondrocytes, the destruction of cytoskeleton and the decreasing in amount of collagen microfibrils in matrix

2.2 不同 T-2 毒素对培养软骨细胞线粒体呼吸酶和 H^+ -ATP 酶的影响

图 2 给出了加入不同 T-2 毒素培养的软骨细胞线粒体呼吸酶系和 H^+ -ATP 酶的变化情况。与对照组相比细胞色素 c 氧化酶在加入 0.004ppm T-2 毒素后,比活力就明显下降,当 T-2 毒素浓度继续加大到 0.01ppm 和

0.04ppm 时,比活力基本停留在同一水平,没有进一步降低。而琥珀酸脱氢酶在加入 0.004ppm T-2 时活力有所提高,当浓度增加到 0.01ppm 和 0.04ppm 时稍有降低,但由于用离体培养软骨细胞匀浆液测定琥珀酸脱氢酶活力时,测得的活力很低,偏差大,因此变化没有显著性。

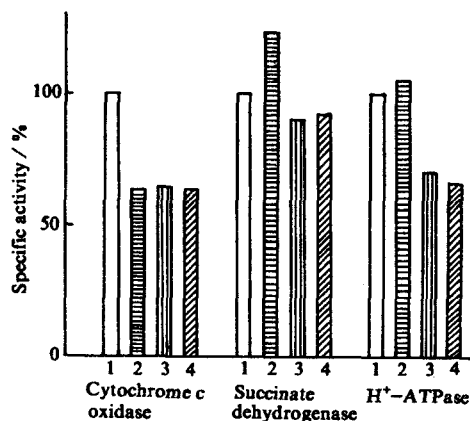


图2 不同浓度T-2毒素对培养软骨细胞线粒体细胞色素c氧化酶、琥珀酸脱氢酶和H⁺-ATPase的影响

Fig. 2 The effect of different concentrations T-2 toxin on mitochondrial cytochrome c oxidase, succinate dehydrogenase and H⁺-ATPase of cultured chicken embryo chondrocytes

1: Control (对照) 2: +0.004ppm T-2
3: +0.01ppm T-2 4: +0.04ppm T-2

线粒体H⁺-ATP酶复合体是线粒体氧化磷酸化偶联的“关键”装置。因而测定了不同T-2浓度下培养软骨细胞线粒体H⁺-ATP酶活力。从图2可见加入0.004ppm T-2毒素时,还没有引起H⁺-ATP酶的活力明显变化,当T-2浓度相继加大到0.01ppm和0.04ppm时H⁺-ATP酶比活力分别下降到对照组活力的69.9%和66.9%。

曾有文献^[10]报导T-2毒素对大鼠线粒体呼吸有抑制作用。体内实验表明,大剂量的T-2毒素可抑制大鼠肝线粒体对琥珀酸和丙酮酸的氧化作用,这些报导与我们的结果有一定的类似性,都表明T-2毒素对细胞的能量代谢有抑制作用。

综上所述可以看出在培养软骨细胞中加入

的T-2毒素大到0.01ppm时,对软骨细胞的胞外基质与线粒体内膜酶系均可产生明显的影响。这表明T-2毒素能够直接作用于软骨细胞,而引起软骨细胞结构与功能的改变。目前T-2毒素虽然在大骨节病病区粮中并未直接检出,但大骨节病区粮中却检出了与T-2结构类似的真菌毒素^[3]。本工作对病区粮中的毒素是否可直接作用于软骨细胞,有一定参考价值。为用软骨细胞直接检验大骨节病致病因子提供了实验方法。

军事医学科学院毒物药物研究所杨进生教授赠送T-2毒素,谨表谢意。

参 考 文 献

- 1 杨建伯. 镰刀菌毒素致大骨节病问题研究的进展. 中国地方病杂志, 1983; 3: 155
- 2 安美玉, 初琪珊, 关德明等. 永寿病区玉米、小麦中真菌检查结果. 见: 中共中央地方病防治领导小组办公室编永寿大骨节病科学考察文集. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 6—49
- 3 罗毅, 张矢远, 杨进生等. 大骨节病病区玉米、小麦中镰刀菌毒素的检测. 中国地方病防治杂志, 1992; 7 (2): 71
- 4 Ronald C S. Mycotoxins and N-nitroso compound. *Environmental Risks*, 1980; 2: 40
- 5 王维哲, 陈炳南, 乔有江等. 鸡胚长骨软骨细胞培养方法的研究. 中国地方病杂志, 1986; 1 (4): 271
- 6 周青山, 丁明孝, 王晓等. 应用电镜研究病毒与细胞骨架关系的几种简单方法. 电子显微学报, 1986; 5 (2): 6
- 7 Smith L. Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase. *Methods of Biochemical Analysis*, 1955; 2: 427
- 8 Kim I, Beattie D S. Formation of the Yeast Mitochondrial membrane 1. Effects of inhibitors of protein synthesis on the kinetics of enzyme appearance during glucose derepression. *Eur J Biochem*, 1973; 36 (2): 509
- 9 李生广, 孙珊. 利用分光光度法测定ATP酶水解活力. 生物化学与生物物理进展, 1983; (6): 70
- 10 李春德. 毒素的动力学及其中毒作用机制的研究. 预防医学情报, 1986; 2 (4): 197

The Effect of T-2 Toxin on the Extracellular Matrix and the Enzymes of Mitochondrial Inner Membrane of Cultured Chicken Embryo Chondrocytes

Li Shengguang Sun Shan Wu Lianying Ji Huifen Hong Jie Lin Zhihuan

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

ABSTRACT

The chicken embryo chondrocytes were cultured in the media containing different concentrations of T-2 toxin from *Fusarium tricinctum*, which was similar in structure with that from *Fusarium* species found in grains from Kaschin-Beck disease area. When the concentration of the T-2 toxin rose to 0.01 ppm, the collagen microfibrils in extracellular matrix of chicken embryo chondrocytes were significantly decreased, and the activities of cytochrome c oxidase and H^+ -ATPase of mitochondria were obviously lower than that of the control. The results showed that 0.01 ppm the T-2 toxin induced the changes of structure and function of chicken embryo chondrocytes. The methods reported provided an effective measure to examine if the factor which induced the Kaschin-Beck disease attacked on the target tissue——chondrocytes directly.

Key words T-2 toxin, cultured chicken embryo chondrocyte, extracellular matrix, cytochrome c oxidase, H^+ -ATPase

牛脑成纤维细胞生长因子的分离纯化与鉴定*

薛沿宁 王会信 周廷冲 邵宁生 王 芳

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

新鲜牛脑组织匀浆液经两步硫酸铵沉淀、CM-Sephadex C50 离子交换层析以及肝素-Sepharose 亲和层析, 可得到纯化的酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF 和 bFGF), 分子量分别为 13.2kD 和 15.2—15.8kD. 两种因子均可有效促进 3T3 细胞的 DNA 合成, ED_{50} 分别为 15.8ng/ml 和 0.32ng/ml. 进一步对 aFGF 的等电点及氨基酸组成做了分析.

关键词 成纤维细胞生长因子, 肝素亲和层析, DNA 合成

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是由 Gospodarowicz 等人发现的, 对中层及神经外胚层来源的细胞都有促分裂

活性的多肽生长因子^[1]. 根据等电点的不同,

*国家基金资助课题.

收稿日期: 1992-07-04

修回日期: 1992-11-10