

primates with GM1 ganglioside treatment. *Science*, 1992, **256**: 843~ 846

2 Hakomori S I. Biofunctional role of glycosphingolipids: modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interaction. *J Biol Chem*, 1990, **256**: 18713~ 18716

3 Chandrabose K A, Graham J M, Macpherson I. Glycolipid glycosyl transferase of a hamster cell in culture. *Biochim Biophys Acta*, 1976, **429**: 112~ 122

4 Langenbach R, Kennedy S. Gangliosides and their cell density-dependent changes in control and chemically transformed C3H/10T1/2 cell. *Exp Cell Res*, 1978, **112**: 361~ 372

5 邵文钊, 郑玉书, 历俊华等. 人脑多形胶质母细胞瘤细胞系 BT325 的建立及生物学特性. *中华神经外科杂志*, 1988, **64** (2): 103~ 107

6 黄如彬, 潘颖, 王泽生等. 猪脑中提取高纯度神经节苷脂. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21** (5): 444~ 446

7 Gillied R T, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer culture. *Anal Biochem*, 1986, **159**: 109~ 111

8 Bremer E G, Hakomori S. Ganglioside-mediated modulation of cell growth factor binding and receptor phosphorylation. *J Biol Chem*, 1984, **259**: 6818~ 6825

9 Bremer E G, Schlessinger J. Ganglioside-mediated modulation of cell growth. *J Biol Chem*, 1986, **261**: 2434~ 2440

10 Werner K H. Growth effects and monoclonal antibody against the EGF receptor on four glioma cell. *Acta Neuropathol*, 1988, **77**: 196~ 201

Gangliosides Inhibit Growth of Human Glioblastma Multiform Cell Line BT325. LI

Aihua, HUANG Rubin, YANG Dianer, JIN Youyu¹⁾ (*Department of Biochemistry, Capital University of Medical Science, Beijing 100054, China;* ¹⁾ *Institute of Pharmaceutics, Capital University of Medical Science, Beijing 100054, China*).

Abstract Ganglioside GM3 and bovine brain Gangliosides (BBG) were added exogenously to human glioblastma multiform cell line BT325 to observe their effects on BT325. The results showed that GM3 and BBG inhibited BT325 cell growth. The maximum of cell proliferation inhibition rate of GM3 and BBG were 60.28% and 19.33%, respectively. GM3 and BBG were added to medium which has different concentration of EGF. Both GM3 and BBG inhibited the EGF-stimulated BT325 cell growth and the effects of GM3 is far stronger than BBG.

Key words ganglioside GM3, bovine brain gangliosides, inhibition, human glioblastoma multiform cell line BT325, epidermal growth factor (EGF)

细胞周期和骨架在 CNE-2Z 细胞凋亡中的变化*

何志巍 陈南岳 廖新波¹⁾ 蔡康荣²⁾
(广东医学院病理生理学教研室, 湛江 524023)

摘要 采用 DNA 电泳、PI 染色流式细胞仪 (FCM) 分析和激光共聚焦显微镜 (LCM) 观察, 检测了蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂诱导 CNE-2Z 细胞凋亡时细胞周期和骨架的改变. PKC 抑制剂 staurospoine (ST)、sphingosine (SS), 终浓度分别为 1×10^{-6} mol/L 和 4×10^{-5} mol/L, 诱导细胞 24 h. 结果发现处理组细胞均有典型的 DNA 亚二倍体峰, DNA 电泳有梯状图谱; 细胞周期百分比 SS 组较对照组 S 期增加及 G1 期减少明显 ($P < 0.05$); ST 组 G2 期增加、G1 和 S 期显著减少 ($P < 0.01$). 对照组细胞染色质分布均匀; 胞质微丝呈细颗粒状, 均匀分布. 诱导细胞染色质碎裂呈不规则缺损; 胞质微丝散乱, 颗粒粗大, 排列不均. 结果表明, SS、ST 可诱导 CNE-2Z 细胞凋亡, 细胞周期和骨架在细胞凋亡时, 均发生了明显改变.

关键词 蛋白激酶 C, 抑制剂, 鼻咽肿瘤, 凋亡, 细胞周期, 骨架

* 广东省科委课题资助 (950661). ¹⁾ 广东医学院病理教研室, 湛江 524023.
²⁾ 广东医学院中心实验室, 湛江 524023. 收稿日期: 1996-05-07, 修回日期: 1996-10-14

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种 Ca^{2+} 及磷脂依赖的蛋白激酶, 广泛分布在哺乳动物组织细胞中, 发挥着重要的生理功能^[1]. PKC 与鼻咽癌 (NPC) 细胞的生长与增殖关系密切, 抑制 PKC 活性可明显抑制低分化鼻咽癌上皮细胞系 CNE-2Z 细胞生长^[2,3]. 我们已发现不同 PKC 抑制剂能使 CNE-2Z 细胞出现凋亡, 但作用机制尚不清楚. 生长因子、调节基因表达的核蛋白及细胞周期等多种因素介导凋亡的调节, 其中细胞周期起重要作用^[4]. 细胞微丝骨架参与维持细胞形态与运动、细胞分裂及核膜信号传导等生理功能^[5]. 而目前对细胞凋亡的机制还缺乏完整的认识, 尤其是细胞骨架与凋亡的关系还知之甚少, 本文将从细胞周期和骨架两方面, 探讨 PKC 抑制剂诱导 CNE-2Z 细胞凋亡时的变化.

1 材料和方法

1.1 CNE-2Z 细胞培养及凋亡的诱导

参照文献 [2], 人低分化鼻咽癌上皮细胞系 CNE-2Z 细胞用 RPMI-1640 培养液加 15% 灭活小牛血清培养. 对数生长期细胞传代培养, 同时放置玻片在培养瓶内. 细胞贴壁后分别加入已被证实可抑制 CNE-2Z 细胞生长的 PKC 抑制剂 (Sigma 产品) staurosporin (ST)、sphingosine (SS) 使其终浓度分别为 1×10^{-6} mol/L 和 4×10^{-5} mol/L, 对照组加入终浓度为 0.1% DMSO, 24 h 后, 取出玻片并收集瓶中细胞. 玻片用丙酮: 甲醇 1: 1, -20°C 固定 5 min, 凉干备用.

1.2 DNA 电泳

常规酚抽提法提取细胞 DNA. 取 10 μg DNA 样品和 5 μl 载样缓冲液混匀, 在含有溴化乙锭的 2% 琼脂糖中电泳, 电压 5 V/cm, 电泳 2 h 后于紫外灯下观察并摄影记录.

1.3 DNA 染色及 FCM 检测

参照文献 [6], 测定凋亡细胞 DNA 数量及细胞周期的变化. 细胞用 70% 乙醇在 4°C 条件下固定 60 min, PBS 洗一次后加入 PI 染液 (其中含 PI 100 mg/L, RNase 100 mg/L,

0.1% Triton-X 100, 0.1% 醋酸钠), 4°C 冰箱过夜, 用流式细胞仪 (美国 Coulter 公司生产的 EPICS XL 型) 检测.

1.4 细胞骨架和胞核的观察

1.4.1 荧光染色: 将 PI 染料滴加于固定的细胞上, 室温下孵化, PBS 冲洗, 再将 FITC-Phalloidin (Sigma 产品; 1: 10) 滴加在固定细胞上, 室温孵化, PBS 冲洗, 凉干封片. 取固定细胞分别作 PI-DNA 染色和 FITC-Phalloidin 微丝骨架染色.

1.4.2 激光共聚焦显微镜 (LCM) 扫描: 采用 LSM-410 型 (德国 ZEISS 公司产品) 观察染色质 DNA 及细胞微丝骨架. 在第一通道对 PI 标记核 DNA 扫描, 从核顶至底按 Z 轴方向进行, 步移为 0.3~0.6 μm , 波长为 488 nm. 双重荧光标记选用波长为 488 nm/514 nm, 在第二通道扫描微丝骨架成像, 然后在第一通道扫描核成像, 二者再重叠成像, 以观察细胞整体形态.

1.5 统计检验

细胞周期中各期百分比的均数比较用 t 、 t' 检验.

2 结 果

2.1 PKC 抑制剂诱导后细胞 DNA 的断裂

由图 1 可知, 经 SS、ST 诱导 24 h 后, 均可见细胞 DNA 发生断裂, 形成以 200 个碱基为最小单位的梯状 DNA 图谱, 对照组无梯状 DNA 条带.

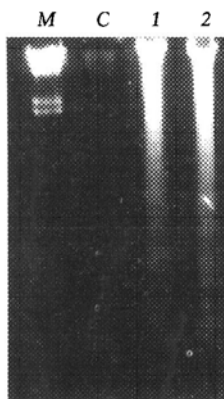


图1 CNE-2Z细胞经不同 PKC抑制剂诱导后, 提取其 DNA 作电泳图谱
M: DNA 分子质量标记 (λ Hind III), C: 对照组; 1: SS 组; 2: ST 组.

2.2 细胞倍体的异常改变

经 ST、SS 诱导细胞 24 h 后，均在 G1 期前出现明显的亚二倍体峰即凋亡峰，且较对照组细胞有明显的周期异常 (图 2)。

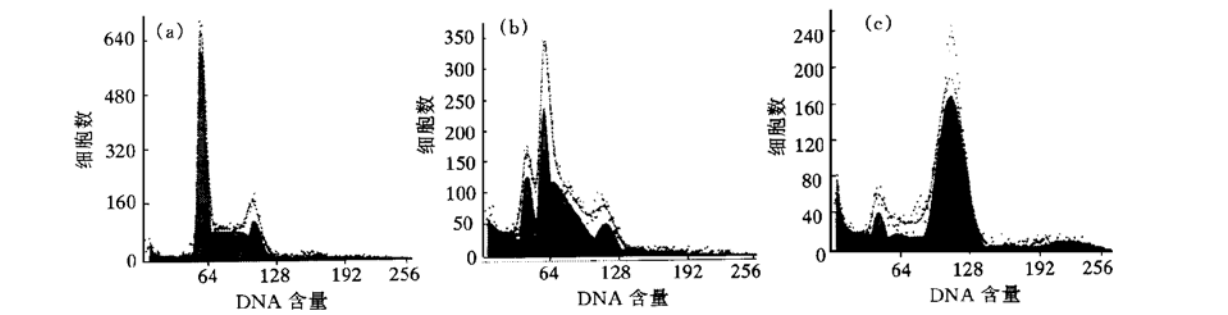


图 2 不同 PKC 抑制剂对 CNE-2Z 细胞周期的改变
(a) 对照组; (b) SS 处理组; (c) ST 处理组, 细胞计数均在10 000以上.

2.3 细胞周期百分比的变化

经 FCM 细胞周期各期百分比分析, ST 诱导后细胞周期较对照组 G1、S 期均明显减少 ($P < 0.01$), G2 期较对照组显著增加 ($P < 0.01$), 而经 SS 诱导后细胞 S 期较对照组明显增加 ($P < 0.05$), G1 期则明显减少 ($P < 0.05$), G2 期改变不大 (表 1)。

表 1 不同 PKC 抑制剂对 CNE-2Z 细胞周期百分比的影响

组别	n	细胞周期百分比/%		
		G1	S	G2
对照	8	58.96 ± 4.17	26.60 ± 3.82	14.26 ± 3.89
SS	8	52.30 ± 7.36	40.65 ± 5.52 ¹⁾	7.13 ± 2.51 ¹⁾
ST	8	8.07 ± 0.21 ²⁾	0.61 ± 0.06 ²⁾	91.30 ± 0.26 ²⁾

与对照组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; n: 实验次数.

2.4 凋亡细胞 DNA 及骨架的改变

对照组细胞生长良好, 细胞间界限清楚, 有较多突起; DNA 荧光分布均匀, 胞核边缘平滑无裂缺; 胞质微丝呈细颗粒状, 大小一致, 均匀分布, 按一定方向排列. 凋亡细胞间界限模糊; 核切面积较对照细胞变小, DNA 荧光分布不均而形成缺损或碎裂成块状; 胞质微丝散乱, 排列不规则, 荧光强度较对照细胞明显增强, 组成粗大的、散乱的强荧光团 (图 3)。

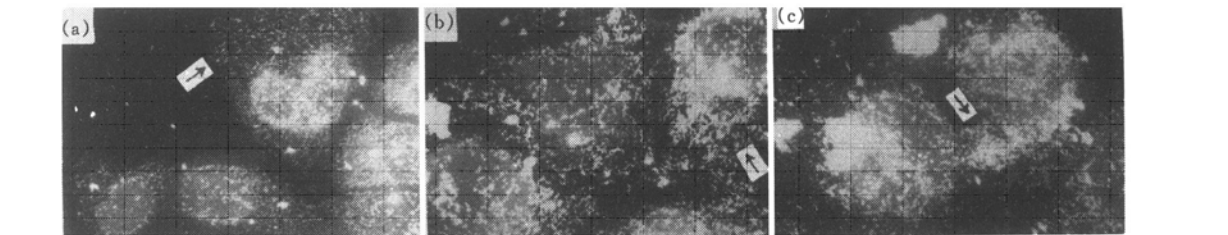


图 3 CNE-2Z 细胞在 PKC 抑制剂诱导后, 细胞核和微丝结构形态的变化
(a) 对照组 PI、Phalloidin 双重染色, 显示胞核 DNA 和微丝结构 (↑). 核形呈分叶或椭圆形; 微丝均匀致密, 按一定方向排列呈多角状. 放大倍数: 441. (b) SS 处理组 PI、Phalloidin 双重染色显示细胞核 DNA 和微丝结构. 核有不规则缺损, 微丝粗大散乱 (↑), 放大倍数: 441. (c) ST 处理组 PI、Phalloidin 双重荧光染色显示细胞核 DNA 和微丝结构, 核内空洞形成, 微丝粗大紊乱 (↑), 放大倍数: 441.

3 讨 论

细胞凋亡是由基因编码控制的程序性细胞死亡,有典型的形态特征和生化异常^[4].采用不同 PKC 抑制剂诱导人 CNE-2Z 细胞 24 h, DNA 电泳表现出典型的梯状图谱; LCM 观察到细胞核 DNA 成块状不均匀分布; FCM 分析发现在 G1 期前有典型的 DNA 亚二倍体峰; 这些典型的胞核形态学和生化改变,说明处理组有细胞发生凋亡.

凋亡细胞 DNA 的改变,一般认为是由于细胞内内源性核酸内切酶活性增加,从而使 DNA 链断裂所致^[7]. 但该酶在 PKC 抑制剂诱导细胞凋亡时所起的作用尚有争议^[8]. 已发现细胞周期依赖的蛋白激酶所致的细胞周期改变在细胞凋亡中起重要作用^[9], 对细胞周期的调控在肿瘤的发生和治疗中已引起学者相当的重视^[10,11]. 本实验结果表明, PKC 催化区的抑制剂 ST 和调节区的抑制剂 SS 作用于 CNE-2Z 细胞诱导凋亡时,使细胞周期发生明显异常改变. ST 使细胞阻滞于 G2 期; SS 使细胞 G1 期减少,并阻滞在 S 期. 因此, SS、ST 引起的细胞周期的改变对 CNE-2Z 细胞的凋亡起重要作用.

细胞骨架纤维是细胞生长增殖过程中必备的胞内支架成分,并参与与细胞生理功能密切相关的粘连质的形成^[12],是凋亡细胞形成凋亡小体的必需物质^[13]. 用胞质微丝特异的荧光素染料 Phalloidin 染色,在 LCM 油镜下观察到诱导的凋亡细胞均表现为细胞间界限不清,胞质微丝骨架散乱,排列不规则,组成粗大的强荧光团. 这与对照组细胞微丝颗粒细小、分布均匀、排列规则的细胞骨架有明显的差异. 这可能与 PKC 抑制剂可使细胞内 Ca^{2+} 水平增加,引起蛋白酶类释放增加,从而使微丝蛋白水解断裂有关^[7]. 细胞骨架的改变导致细胞迁移及粘附能力降低,使贴壁细胞易于脱落,从而有助于细胞凋亡.

本工作表明,不同 PKC 抑制剂阻断 CNE-2Z 细胞 PKC 活性区域后,可以诱导细胞凋亡,

同时改变了细胞周期和骨架. 这不仅进一步阐明 PKC 在该细胞的生长增殖调控中具有重要作用,而且深入了对细胞凋亡的机制和形态特征的认识.

参 考 文 献

- 1 Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 1988, **334**: 661~ 667
- 2 陈南岳,赵明伦,鲍波. 蛋白激酶 C 亚型在鼻咽癌细胞中的分布及在增殖中的作用. *中国病理生理杂志*, 1994, **10** (6): 566~ 570
- 3 陈南岳. 蛋白激酶 C 在细胞生长与恶变中的调控作用. *生物化学与生物物理进展*, 1991, **18**: 269~ 273
- 4 David E F. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, 1994, **78**: 539~ 544
- 5 林仲翔. 微丝骨架蛋白重组与细胞转化. *细胞生物学杂志*, 1990, **12** (3): 97~ 101
- 6 Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immun Methods*, 1991, **139**: 271~ 279
- 7 Gaido M L, Cidlowski J A. Identification, purification and characterization of a calcium dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes; NUC18 is not histone H-B. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 18580~ 18585
- 8 David J W, Turner A J, Povirk L F *et al.* Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Research*, 1994, **54**: 1707~ 1714
- 9 Shi L, Nishioka W K, Thing J *et al.* Premature P34cdc2 activation required for apoptosis. *Science*, 1994, **263** (25): 1143~ 1145
- 10 Leland H H, Michael B K. Cell cycle control and cancer. *Science*, 1994, **266**: 1821~ 1828
- 11 Zoltan N O, Stanley J K. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*, 1994, **79**: 189~ 192
- 12 Michael W K, Brian P. The body language of cells: the intimate connection between cell adhesion and behavior. *Cell*, 1995, **83** (1): 5~ 12
- 13 Pittman S M, Gepy M, Tynen S J *et al.* Tublin in apoptotic cells. In: Lavin M eds. *Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis*. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. 315~ 323

Study on the Changes of Cell Cycle and Cytoskeleton of the CNE-2Z Cell Apoptosis Induced by the Inhibitors of Protein Kinase C.
HE Zhiwei, CHEN Nanyue, LIAO Xinbo, CAI Kangrong (*Department of Pathophysiology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China*).

Abstract By using DNA electrophoresis, flow

cytometry (FCM) analysis and laser confocal microscopy (LCM), the change of cell cycle and cytoskeleton of CNE-2Z cells induced by the inhibitors of protein kinase C (PKC) were observed. Cells were respectively treated by staurospine (ST) and sphingosine (SS) at the concentration of 1×10^{-6} mol/L and 4×10^{-5} mol/L, and cocultured for 24 hours. Ladders of DNA electrophoresis and hypodiploid peaks were discovered in the two treated groups. Compared with the control groups, the cell cycle percentage of S in treated groups by SS was much increased, but the percentage of G1 was significantly decreased ($P < 0.05$), and the percentage of G2 in ST treated groups was much

increased, but both the percentage of S and G1 were much decreased ($P < 0.01$). The well distributed chromatin DNA was seen in untreated cells, but fragmentary DNA in treated cells. The granuliform microfilament regularly lined along and formed the intact cell morphology in untreated group cells. The microfilament clustered in disorder and formed clusters in induced cells. The results showed that the cell cycle and cytoskeleton may contribute to the CNE-2Z cells apoptosis induced by the inhibitors of protein kinase C.

Key words protein kinase C, inhibitor, nasopharyngeal carcinoma, apoptosis, cell cycle, cytoskeleton

外源基因在耻垢分枝杆菌中表达效率的研究*

程继忠 皇甫永穆 海 涛¹⁾

(同济医科大学实验医学研究中心, 武汉 430030)

摘要 将外源基因——日本血吸虫26K抗原(*Schistosoma japonicum* 26K antigen, Sj26GST) 基因克隆到大肠杆菌-分枝杆菌穿梭质粒 pBCG-2000 中, 构建四个不同的表达载体, 研究了它们在耻垢分枝杆菌中的表达效率。首先将含人结核杆菌热休克蛋白 70 (heat shock protein, hsp70) 启动子的质粒 pMT-70 用 Nco I 切, 进行两种不同的修饰, 得到不同的 SD 序列, 将 Sj26GST 基因克隆进去; 再将含 hsp70 启动子和 Sj26GST 的基因片段克隆到 pBCG-2000 中, 筛选出不同 SD 序列、不同方向和不同拷贝数的分枝杆菌表达载体四个。所表达的天然重组 Sj26GST 在 SDS-PAGE 上分子质量为 26 ku 处可见明显的表达蛋白带。通过薄层扫描分析, 发现表达质粒中, 双拷贝启动子-外源基因组合表达效率最高, 是单拷贝组合的1.6倍。而不同的克隆方向和不同的SD序列(两者相差3个碱基) 对表达效率的影响不明显。

关键词 表达效率, 分枝杆菌, 外源基因

分枝杆菌因生长缓慢等原因而影响了人们对它们的深入研究。近年发展起来的分枝杆菌分子遗传学手段和方法可将外源基因转入卡介苗 (Calmette-Guérin bacillus, BCG) 和其他分枝杆菌^[1], 为将 BCG 和其他分枝杆菌发展为多价疫苗载体打下基础。目前, 国外一些学者将数十种外源基因在分枝杆菌中表达, 制备基因工程分枝杆菌多价疫苗。我国近年来在这方

面的研究也取得了很大的进展, 皇甫永穆等^[2,3]先后构建出两代大肠杆菌-分枝杆菌穿梭载体, 并将 Sj26GST 基因在分枝杆菌中得到表达。本文研究了不同因素对外源基因在耻垢分枝杆菌中表达效率的影响。

* 血吸虫病重点研究总理基金资助项目 (94-Y-19)。

¹⁾ 同济医科大学职业医学研究所。

收稿日期: 1996-06-04, 修回日期: 1996-09-19