

简 报

神经生长因子对成纤维细胞生长的负调节作用*

王丽辉 童坦君

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

关键词 神经生长因子, 生长负调节, 成纤维细胞

从小鼠颌下腺分离所得的神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是分子量为 130000 的多肽, 其沉降系数为 7S, 由三种亚基 α , β , γ 组成, 化学式为 $\alpha_2\beta\gamma$, 其中 β 亚基可以完全表现 NGF 的生理效应。NGF 的生物学效应比较广泛, 它对神经系统的发育、分化有重要促进作用, 在神经系统损伤后起修复、营养作用^[1]。另外, NGF 对免疫系统^[2]、生殖系统^[3]也有一定作用。近年来, NGF 与肿瘤关系的研究尤其引人注意, 这对探讨肿瘤的发生发展机制有所裨益。

我室曾报道鼠胚成纤维细胞 ($C_3H_{10}T_{1/2}CL8$, 简称 NC_3H_{10}) 经射线转化为恶性细胞 (简称 TC_3H_{10}) 后, 对表皮生长因子的敏感性明显降低^[4]。且表皮生长因子对其染色质蛋白激酶活性的促进作用明显下降^[5]。为了解其它肽类生长因子对转化细胞有何生长调节作用, 我们观察了 NGF 对 TC_3H_{10} 与 NC_3H_{10} 细胞生长的影响, 意外地观察到 NGF 对鼠胚成纤维细胞及其射线转化细胞两者的生长都具有抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

7S NGF 为 Sigma 公司生产; DMEM 干粉为 Sigma 及 Gibco 公司生产; 小牛血清为北京西郊奶牛厂提供; 3H -TdR (脱氧胸苷) 为上海原子核研究所生产。二氧化碳孵箱为日本 Yamata 产; 液闪计数仪为 Beckman LS-8000; 96 孔细胞培养板为 Gibco 公司产品 (约 0.3 ml/孔)。

1.2 细胞培养^[6]

小鼠胚胎成纤维细胞 $C_3H_{10}T_{1/2}CL8$ (NC_3H_{10}) 和用 3H -TdR 转化的 $C_3H_{10}T_{1/2}CL8$ 细胞株 (TC_3H_{10})^[7] (由中国预防医学中心工业卫生实验所朴长青和北京师范大学生物系王小良赠送), 用含 10% 小牛血清的 DMEM 于 37℃, 5% CO_2 , 100% 湿度培养箱中培养。传代时以 0.02% EDTA 消化 1min 左右, 倒掉 EDTA, 用 0.2% 胰蛋白酶消化 3—5 min, 倒去胰蛋白酶溶液,

加入含 10% 小牛血清的 DMEM, 吹散细胞, 分装后于 37℃ 二氧化碳孵箱中培养。

1.3 NC_3H_{10} 和 TC_3H_{10} 细胞 DNA 的 3H -TdR 参入

采用 Pierson^[8] 等的方法, 稍有改动。

细胞生长状态良好、布满瓶底时, 0.02% EDTA, 0.2% 胰蛋白酶消化后, 吹散细胞, 镜下计数, 按每孔 2.5×10^4 细胞接种到 96 孔细胞培养板中, 继续用 10% 小牛血清的 DMEM 培养。24—48 h 后细胞已互相紧密接触, 贴于培养孔中 (各孔间的细胞数基本相同, 文献曾用测定蛋白质的方法证明各孔之间的差异小于 1%^[9])。小心吸出培养液, 换以含 1% 小牛血清的 DMEM, 37℃ 培养 24 h, 使之达同步化状态, 然后向实验组加入用 1% 小牛血清 DMEM 配制的 NGF 样品液, 对照组加入 1% 小牛血清的 DMEM, 各自于 37℃ 温育 8 h 后, 每孔加 3H -TdR 0.4 μ Ci (终浓度为 2 μ Ci/ml), 继续 37℃ 温育 4 h, 将细胞取出培养箱, 吸去培养液, 并用冷 10% 三氯乙酸洗三次, 乙醇乙醚混合液 (1:1) 洗一次, 待晾干后, 加入 88% 甲酸 0.2 ml, 消化 10—20 min, 然后将消化液吸出溶于 5 ml 闪烁液中 (每 500 ml 1, 4-二氧六环中加 0.5 g POPOP, 3 g PPO 和 60 g 蔡), 摇匀后液闪计数。

2 实验结果

NGF 对 NC_3H_{10} 和 TC_3H_{10} 两种细胞均有抑制效应, 并随 NGF 浓度增大, 抑制效应更明显, (见表 1, 图 1) NC_3H_{10} 和 TC_3H_{10} 细胞对 NGF 的敏感性不同, 当 $NGF \geq 50 ng/ml$ 时 NC_3H_{10} 较 TC_3H_{10} 敏感 (如图 2)。

我们以细胞敏感指数 (IOS) 表示不同细胞对生长调节因子的感受性:

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-07-13 修回日期: 1991-11-23

表 1 TGF 对 NC₃H₁₀ 和 TC₃H₁₀ 细胞 DNA 的 ³H-TdR 参入的影响

NGF ng/ml	NC ₃ H ₁₀			TC ₃ H ₁₀		
	计数率 cpm±SD	%	IOS	计数率 cpm±SD	%	IOS
0	18857±1964			24679±2839		
40	16384±1301	-13.1	0.87	19835±1824	-19.6	0.80
60	12358±1216	-34.5	0.66*	19693±2877	-20.2	0.80
80	12361±1599	-34.5	0.66*	18114±3388	-26.6	0.73*
100	10212±1548	-45.8	0.54**	18192±2065	-26.3	0.74*
120	9041±1645	-52.1	0.48**	15906±2101	-35.5	0.65**

注: (1) 接种细胞数: 2.5×10^4 ;

(2) 统计处理中 $n=3$, 统计处理中各组均与对照组 (NGF 浓度为 0) 比较;

(3) “*”: $P<0.05$, “**”: $P<0.01$, “-”: 抑制作用;

(4) $IOS = \frac{\text{实验组 (cpm)}}{\text{对照组 (cpm)}}$;

$$\% = \frac{\text{实验组 (cpm)} - \text{对照组 (cpm)}}{\text{对照组 (cpm)}} \times 100.$$

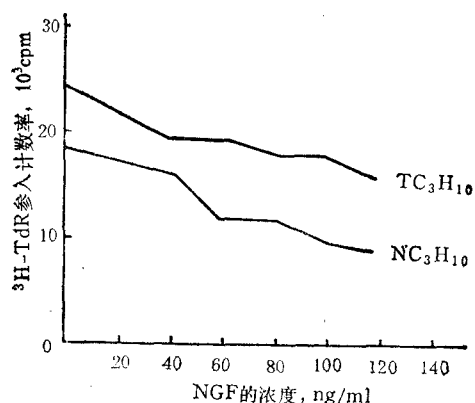


图 1 NGF 对 NC₃H₁₀ 和 TC₃H₁₀ DNA 的 ³H-TdR 参入计数率的影响

$$IOS = \frac{\text{实验组 (cpm)}}{\text{对照组 (cpm)}}$$

当 $IOS > 1$ 时, 为促进效应;

$0 \leq IOS < 1$ 时, 为抑制效应;

$IOS = 1$ 时, 无作用。

对细胞的抑制效应而言, IOS 值越大, 该细胞的敏感性越差。

3 讨 论

NGF 同其它多肽生长因子一样, 在体内多处合成, 作用于特定的细胞且在细胞分化中起作用。目前已有文献报道, NGF 对多种特定的细胞起作用而且不同细胞作用效应不同, 如 NGF 对 T 细胞、B 细胞^[2]、肾上腺嗜铬细胞有促增殖作用, 同时 NGF 抑制大鼠嗜铬细胞瘤细胞、人黑色素瘤细胞、人结肠直肠癌细胞

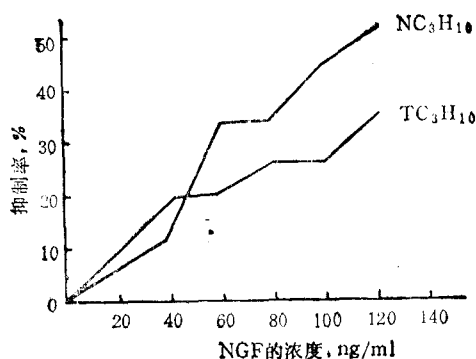


图 2 不同浓度 NGF 对 NC₃H₁₀ 和 TC₃H₁₀ DNA 的 ³H-TdR 参入的抑制效应

增殖^[10]。有人认为, NGF 在细胞分化中起重要作用, NGF 对终末分化的细胞有促增殖作用, 如对神经细胞、心肌细胞有明显促增殖作用, 但对不完全分化的细胞有抑制增殖作用^[11]。

本实验观察到 NGF 对 NC₃H₁₀ 和 TC₃H₁₀ 细胞均有抑制效应, 并随 NGF 浓度增大, 这种抑制效应更明显, 这可能与 NC₃H₁₀ 和 TC₃H₁₀ 细胞均来源于小鼠胚胎的不完全分化细胞有关。另外, TC₃H₁₀ 细胞对 NGF 的反应性似较 NC₃H₁₀ 细胞低, 这一现象与表皮生长因子的作用^[4,5]有相似之处。

参 考 文 献

- 1 Thoenen H, Bärder Y A. *Physiol Rev*, 1980; 60 (4): 1284
- 2 Paola P. *Brain Behavior and Immunity*, 1988; 2 (4): 311
- 3 Jane V. *PNAS*, 1988; 85: 9474
- 4 Xu L, Tong T. *J Cell Biochem*, 1988; 12A: 140

- 5 黄平等, 生物化学杂志, 1989;5(6): 461
- 6 鄂征, 组织培养技术, 第二版, 北京: 人民卫生出版社, 1988:128
- 7 朴长青等, 实验生物学报, 1985;18(4): 463
- 8 Pierson R W. *J Cell Physiol*, 1972; 79:319
- 9 Mollenberg M D. *PNAS*, 1973; 70:2964
- 10 Ewa M. *Biochem and Biophysiol Res Commun*, 1989; 163(1):649
- 11 Levi-Montalcini R. *TINS*, 1986; 9:473

亚铁盐诱发谷氨酸降解的自由基机理

李 忌 郑荣梁*

(兰州大学生物系, 兰州 730000)

关键词 亚铁离子, 谷氨酸, 自由基, 丙二醛类似物

铁是生物体中一种极为重要的金属元素, 但从铁蛋白释放的铁, 在特定情况下可诱发体内不饱和脂肪酸发生过氧化反应。Gutteridge 报道了离体实验中亚铁盐尚能降解几种常见氨基酸和糖^[1], 生成丙二醛(MDA)样物质, 因而可与硫代巴比妥酸(TBA) 发生反应, 生成粉红色产物。我们观察了亚铁盐诱发谷氨酸降解, 并对其自由基机理进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

谷氨酸购自上海试剂二厂; 过氧化氢酶(CAT) 为 Sigma 公司产品, 超氧化物歧化酶(SOD) 购自夏河生化制剂厂; 其它试剂均为分析纯。

1.2 亚铁盐对谷氨酸的降解

将要检测的试剂均溶于 0.1mol/L pH7.4 的磷酸缓冲液(PBS) 中, 按浓度要求加到盛有 0.5 ml 10mmol/L 谷氨酸的离心管中, 然后向离心管中加入 0.1 ml FeSO_4 (10mmol/L)。谷氨酸和 FeSO_4 的终浓度分别为 4.5mmol/L 和 0.9mmol/L。37℃水浴中温育 15min, 对照组不加 FeSO_4 , 以等量 PBS 代替。

1.3 MDA 样物质的测定

向温育过的样品中加入 1ml TBA 溶液(1%, 溶于 50 mmol/L NaOH 中), 然后加入 1 ml 36% 冰醋酸, 沸水浴 30min, 迅速冷却至室温, 3 000r/min 离心 10min, 于 532nm 测光密度。

2 结果与讨论

据 Gutteridge 报道, 亚铁盐所诱发谷氨酸降解的程度较强^[1], 我们的实验结果表明这种降解作用受到羟自由基清除剂二甲基亚砷(DMSO), 苯甲酸和甘露醇, 以及抗氧化剂谷胱甘肽(GSH) 和抗坏血酸的显

著抑制, 且表现出浓度依赖关系。(图 1)

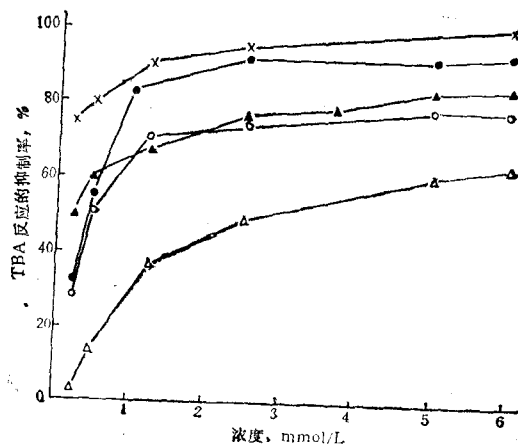
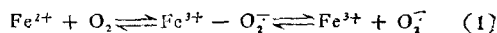


图 1 羟自由基清除剂和抗氧化剂对亚铁盐诱发谷氨酸降解的影响

×——二甲基亚砷 ●——抗坏血酸 ▼——苯甲酸
○——谷胱甘肽 △——甘露醇

CAT 对谷氨酸的降解也表现出抑制效应, 而 SOD 却稍促进降解。热灭活的 CAT 和 SOD 均无相应的效应。 H_2O_2 能十分强烈地促进降解。用氮气将该系统中的 O_2 除去后, 谷氨酸的降解程度明显减弱(表 1)。

由以上结果我们可得出以下重要结论: 亚铁盐对谷氨酸的降解作用与羟自由基($\cdot\text{OH}$) 有关, 亚铁盐在非酶系统中诱发产生 $\cdot\text{OH}$ 的机理可表示为下列反应式:



* 通讯联系人

收稿日期: 1991-09-28

修回日期: 1991-11-04