参 考 文 献

- 1 Gantt E, Lipschultz C A. Energy transfer in phycobilisomes from phycoerythrin to allophycocyanin. *Biochim Biophys Acta*, 1973, 292: 858~ 861
- 2 Glazer A N, Lundell D J, Yamanaka G, et al. The structure of a simple phycobilisome. *Annu Microbiol*, 1983, 134B: 159~ 180
- 3 Holzwarth A R. Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae. *Physiol Plant*, 1991, 83: 518~ 528
- 4 Gillbro T, Sandstrom V, Wendler J, et al. Picosecond study of energy transfer kinetics in phycobilisomes of *Synechococcus* 6301 and mutant AN112. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 808: 52~ 65
- 5 Suter G W, Mazzola P, Wendler J, et al. Fluorescence decay kinetics in phycobilisomes from the blue-green alga *Synechococcus* 6301. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 766: 269~ 276
- 6 Piter R R, Edington M D, Beck W F. Protein matrix solvation dynamics in the α subunit of C-phycoerythrin. *J Phys Chem*, 1996, 100: 14 198~ 14 205
- 7 Debreczeny M P, Sauer K. Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycoerythrin 1. Monomers. *J Phys Chem*, 1995, 99: 8 412~ 8 419
- 8 Debreczeny M P, Sauer K. Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycoerythrin 2. Trimers. *J Phys Chem*, 1995, 99: 8 420~ 8 431
- 9 Holzwarth A R, Wendler J, Wehrmeyer W. Picosecond time resolved energy transfer in isolated phycobilisomes from *Rhodospirillum rubrum* (*Rhodospiraceae*). *Photochem Photobiol*, 1982, 36: 479~ 487
- 10 蒋丽金, 马金石, 何慧珠, 等. R-藻红蛋白的某些特征研究. *海洋与湖沼*, 1983, 14: 315~ 323
- 11 Xia A D, Zhu J C, Jiang L J. Energy transfer kinetics in C-phycoerythrin from cyanobacterium *Westiellopsis prolifica* by pump-probe techniques. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 179: 558~ 564
- 12 Carlsson J, Drevin H, Axen R. Proteinthiolation and reversible protein-protein conjugation: N-succinimidyl 3-(2-pyridylidithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem J*, 1978, 173: 723~ 737
- 13 喻玲华, 曾繁杰, 蒋丽金, 等. 海洋多管藻 R-藻红蛋白的亚基组成和发色团含量. *生物化学与生物物理学报*, 1990, 22: 221~ 227
- 14 MacColl R, Guard-Friar D. *Phycobiliproteins*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987. 64~ 67
- 15 赵继全, 赵井泉, 杨紫萱, 等. 藻胆蛋白复合物的合成及其分子内能量传递. *生物化学与生物物理进展*, 1997, 24: 435~ 440

(1997-12-17 收稿, 1998-03-10 收修改稿)

应激大鼠肠壁提取物对淋巴细胞转化的影响

黄庆军 周先锁 范少光

(北京医科大学生理学系, 北京 100083)

摘要 从功能、分子量及组织学定位 3 个方面证明了应激大鼠小肠肠壁中的淋巴细胞也可产生应激免疫抑制蛋白。

关键词 应激免疫抑制蛋白 淋巴细胞转化 HPLC 凝胶过滤 免疫组化

在应激条件下, 大鼠和小鼠的血清中存在一种应激免疫抑制蛋白, 它在中枢神经系统的控

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-14-1504>

制下由脾脏和淋巴结中产生并释放入血,其分子量为155和370 ku,生物作用的半寿期为 $21.3\text{ h}^{[1-6]}$. 本工作证明小肠肠壁中的淋巴细胞也能产生这种应激免疫抑制蛋白.

1 材料与方法

SD 雄性大鼠,体重180~220 g,由本校实验动物部提供. 大鼠的束缚应激方法见文献[3],应激组大鼠束缚应激12 h,对照组大鼠在笼中不予惊动,正常饲养. 应激后大鼠断颈椎处死,开腹剪取小肠(胃后4~8 cm),用蒸馏水冲洗肠腔10次,洗净肠腔内容物,剪成小段,按每克组织加入10 mL 0.005 mol/L 的盐酸并在冰浴中匀浆,匀浆液经 $1\,500\times g$ 离心30 min,取上清液冷冻干燥. 干粉以4倍于原体积的磷酸缓冲液(PBS, 0.2 mol/L, pH=7.4)复溶, $8\,000\times g$ 离心30 min,上清液用40%硫酸铵沉淀,沉淀再以PBS复溶,经截留分子量为30 ku的超滤膜(Millipore 公司)超滤,保留样品中分子量大于30 ku的物质.

HPLC 凝胶过滤进一步纯化样品并测定分子量,HPLC 分离方法与文献[4]相同,简述如下:选用GF-250 凝胶柱(WATERS 公司),进样500 μg (200 μL),以上述PBS洗脱,速度为1 mL/min,紫外光检测样品的吸光率 $A_{280\text{ nm}}$. 自进样后第6 min开始收集样品,每管0.5 mL,共16管,检测每管的活性. 与标准分子量样品比较,确定提取物中具有淋巴细胞转化抑制活性组分的分子量.

应激免疫抑制蛋白的活性检测,方法同文献[2]. 其原理是以不同稀释度的应激及正常对照大鼠的提取物检测对由Con A 诱导的小鼠淋巴细胞转化的影响,结果以 ^3H -TdR 掺入的cpm值表示. 以对照组淋巴细胞转化的cpm值为100%,计算应激大鼠肠壁提取物对小鼠淋巴细胞转化抑制率,作为活性指标.

肠壁免疫抑制蛋白的免疫组织化学观察,采用SP法^[7]. 应激及正常大鼠小肠肠壁经福尔马林固定,石蜡切片,DAB显色. 抗应激免疫抑制蛋白单克隆抗体由本室制备. 生物素标记的二抗及辣根过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白均由中山生物制品公司提供.

2 结果

2.1 大鼠血清及小肠肠壁提取物对淋巴细胞转化的影响

血清稀释度分别为1:16,1:32和1:64时对照组的cpm值分别为 $25\,860\pm1\,579$, $36\,677\pm2\,986$ 和 $40\,756\pm4\,537$;应激组的cpm值分别为 $1\,2476\pm1\,579$, $33\,407\pm4\,843$ 和 $40\,467\pm4\,362$. 肠壁提取物稀释度分别为1:160,1:320和1:640(即1 g组织分别用160,320和640 mL的1640培养液稀释)时对照组的cpm值分别是 $27\,770\pm5\,454$, $55\,224\pm8\,963$ 和 $66\,531\pm7\,813$;应激组的cpm值分别为 $6\,113\pm1\,011$, $25\,347\pm5\,697$ 和 $52\,851\pm4\,983$ (图1). 结果表明:与对照组相比,应激大鼠血清及肠壁提取物对淋巴细胞转化均有显著的抑制作用. 稀释度为1:16时,应激血清的抑制率为49%;稀释度为1:160时,应激小肠肠壁提取物的抑制率为72%.

2.2 小肠肠壁提取物中抑制活性组分的分子量测定

经HPLC 凝胶过滤分离后,应激大鼠肠壁提取物的第18管(第9 min)与对照大鼠肠壁提取物相比,明显抑制淋巴细胞转化,抑制率为40%,与标准分子量样品比较,该组分分子量为150 ku.

2.3 肠壁中应激免疫抑制蛋白的免疫组织化学观察

结果表明小肠肠壁粘膜的淋巴细胞阳性着色,说明此处淋巴细胞含有应激免疫抑制蛋白(图2).

3 讨论

本工作揭示在束缚应激后大鼠的肠壁也可以产生一种抑制淋巴细胞转化的物质. 为了进一步比较这一抑制物与我们过去报道的抑制蛋白是否同一物质,我们以HPLC凝胶过滤测定这种抑制物的分子量,发现其分子量为150 ku,与我们以前报道的血清和淋巴结的抑制蛋白相似^[1, 3]. 肠壁的组织结构复杂,究竟这一抑制物由哪种组织产生,我们应用应激免疫抑制蛋白的单克隆抗体,进行了免疫组织化学观察,表明肠壁中的淋巴细胞呈明显阳性.

图1 应激大鼠血清及肠壁提取物对小鼠淋巴细胞转化的影响

经方差分析,应激血清及小肠肠壁提取物对小鼠淋巴细胞转化均有显著的抑制作用, $p < 0.01$, 方差分析 $n = 6$

图2 肠壁组织中应激免疫抑制蛋白的免疫组织化学染色

SP法, DAB显色, 小肠粘膜的淋巴细胞阳性着色

因此,本工作从功能、分子量及组织学定位3个方面证明,在应激状态下,肠壁中淋巴细胞也可以产生与淋巴结和脾脏淋巴组织相似的应激免疫抑制蛋白. 我们推测在机体组织中,凡富含淋巴组织的器官可能也都具有产生这种抑制蛋白的能力. 目前我们正利用肠壁作为提取和纯化该蛋白的原料进一步纯化该蛋白.

参 考 文 献

- 1 范少光, 查宏斌, 李小蕊. 束缚应激小鼠血清中产生的免疫抑制因子及其调节. 科学通报, 1989, 34(20): 1 584~ 1 587
- 2 汪静雪, 陈 微, 范少光, 等. 束缚应激动物血清中免疫抑制因子产生部位的初步研究. 生理学报, 1992, 44(6): 541~ 548
- 3 邵 黎, 高 珊, 丁桂凤. 束缚应激引起淋巴结产生淋巴细胞转化的因子. 科学通报, 1995, 40(2): 164~ 167
- 4 汪静雪, 梅 林, 范少光, 等. 脑内 GABA 能神经元对抗应激后血清淋巴细胞转化抑制因子的产生. 科学通报, 1992, 38(7): 767~ 768
- 5 Zuo Y C, Li Y F, Fan S G. Interleukin 1 in the brain is involved in generation of the serum suppressive factor induced by restraint stress in mice. Neuroimmunomodulation, 1995, 4(2): 82~ 87
- 6 黄庆军, 蒋 灿, 范少光. 应激免疫抑制蛋白在血清中的作用时间. 科学通报, 1998, 43(13): 1 411~ 1 413
- 7 倪灿荣. 亲和免疫细胞组织化学技术. 见: 免疫组织化学新技术及应用, 北京: 科学技术出版社, 1993. 122~ 127

(1997-10-21 收稿, 1998-02-20 收修改稿)

表达反义蛋白激酶 C ζ 亚类的人角朊细胞模型的建立及初步分析

张晓艳^(四) 柳惠图 马圣清^④ 蔓晓红^(四)

(北京师范大学生物系, 北京 100875; ④北京医科大学第一医院皮肤科, 北京 100034;

(四)北京中日友好医院西医皮肤科, 北京 100029)

摘要 蛋白激酶 C(PKC) 是一种多功能蛋白激酶, 至少由 12 种亚类所组成, 每种亚类的功能互不相同. 近年的研究表明, PKC ζ 亚类在细胞增殖的调控中起关键作用. 为探讨该亚类在角朊细胞增殖调控中的作用, 构建了反义 PKC ζ 的真核表达质粒, 通过基因转染的方法将其导入角朊细胞株 Colo16 中, 建立了表达反义 PKC ζ 的人角朊细胞模型, 通过生长曲线和细胞周期时相的测定, 对该细胞模型的生长特性进行了分析, 并通过周期蛋白 CyclinD1 的免疫印迹分析对 PKC ζ 与 CyclinD1 的相互关系机制进行了初步探讨.

关键词 蛋白激酶 C ζ 人角朊细胞 增殖

自 1977 年以来, 大量研究表明, 蛋白激酶 C(PKC) 信号通路在细胞生长、分化等多种功能的调节中起关键作用^[1,2]. 迄今为止已发现 PKC 至少由 12 亚类组成^[3], 各亚类在细胞信号传导过程中的作用互有差异^[4]. 近年的研究表明, PKC ζ 亚类参与多种细胞增殖的调节, 但是在角朊细胞增殖中的作用目前尚不清楚, 本研究通过基因转染和细胞周期时相测定等方法探讨了 PKC ζ 亚类在人角朊细胞株_Colo16 增殖调控中的作用及其作用机理, 为深入研究 PKC ζ 亚类在人角朊细胞增殖调控中作用的分子机理提供了有效的细胞模型.

1 材料与方法

() 材料. 质粒 PTB_PKC ζ 由日本神户大学 Ono 教授惠赠, 质粒 PcDNA3 由北京医科

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1998-43-14-1504>