论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0982-02

D-gal 对鼠成纤维细胞端粒长度的影响

肖 航[1],刘 玮[2],孟 刚[3],司良毅[1] (第三军医大学西南医院:[1]老年病科,[3]病理学研究所,重庆 400038;[2]第四军医大学西京医院眼科,西安 710032)

提 要:目的 明确 D-gal 是否可以导致乳鼠心脏成纤维细胞端粒长度缩短。**方法** 使用流式荧光原位杂交法(Flow-Fish)检测成纤维细胞端粒长度的变化。**结果** 经过 D-gal 处理过的成纤维细胞端粒明显缩短。**结论** 通过 Flow-Fish 法证实了 D-gal 能缩短成纤维细胞端粒的长度。在细胞水平明确了 D-gal 致衰老的作用,为建立心脏成纤维细胞衰老模型奠定基础。

关键词:细胞;衰老;端粒

中图法分类号:R322.11;R329.27;R343.35 **文献标识码**:A

Effect of D-gal on mouse fibroblast telomere shortening

XIAO Hang[1], LIU Wei[2], MENG Gang[3], SI Liang-yi[1] ([1]Department of Geriatrics, [3]Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **Objective** To verify that the length of mice fibroblast telomere can be shortened by D-gal. **Methods** The fibroblasts were from the heart tissue and passaged for 3 – 5 generations. After the fibroblasts were mixed with $(C_3TA_2)_3$PNA labeled with FITC, the variation of fibroblast telomere length was detected by Flow-Fish. **Results** The length of fibroblast telomere can be shortened by D-gal. **Conclusion** D-gal can lead to the fibroblast telomere shortening. It demonstrates that D-gal can cause cellular senescence, which establishes the foundation for the senescence model of heart fibroblast.

Key words: cell; senescence; telomere

端粒是保护染色体末端稳定的结构,作为复制性衰老的触发器目前越来越受到重视。在人细胞增殖的过程中,发现端粒的长度不断缩短,端粒的磨损在细胞衰老过程发挥重要作用[1]。D-半乳糖(D-galactose,D-gal)能加速细胞的衰老,作为致老剂在国内广泛应用[2-4]。本研究拟观察 D-gal 对乳鼠心脏成纤维细胞端粒长度的影响,为建立心脏成纤维细胞老化模型,提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SD 乳鼠(出生3d以内)5只,购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 试剂和仪器

D-gal 购自 Sigma;FACSCalibur 型流式细胞仪为 BD 公司产品,异硫氰荧光素(FITC)肽核酸 $(C_3TA_2)_3$ 端粒序列特异探针(PNA 探针)为生工合成,碘化丙啶(PI)为美国 Sigma 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 心脏成纤维细胞的培养 出生 3 d 以内的 SD 乳鼠,乙醇消毒后处死,剪取心尖组织,DMEM 洗 3 次,剪碎,1 g/L,Ⅱ型胶原酶消化 3 次,每次 8 min,消化后收集上清,加入 10% 胎牛血清,离心后重悬细胞,于 5% CO_2, 37 ℃孵箱中培养 2 h,吸去上清,重新加入培养液培养,原代培养细胞生长成细胞单层。用 0.25% 胰蛋白酶消化以后,以 1∶2 的比例传代培养。每隔 2 天用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液换液 1 次,待细胞铺满瓶底后传代。经 3 次传代后,已纯化为心脏成纤维细胞,实验选用 3 ~ 5 代细胞。

1.3.2 流式荧光原位杂交法(Flow-Fish)检测端粒长度的变化[5,6] 以含 10 g/L D-gal 培养基培养细胞 72 h。将细胞消化后制成悬液,计数细胞 5×10^5,置 1.5 ml EP 管中,离心去培养介质,将细胞重新悬浮于 100 μl 杂交液中,加入 FITC 标记的 $(C_3TA_2)_3$PNA 探针。阴性对照组以相同体积的三蒸水代替 FITC 标记的 $(C_3TA_2)_3$PNA 探针。将样品避光室温杂交 2 h。之后,细胞用洗液 1 洗 2 次,3 000 r/min 离心 7 min。洗液 2 洗 1 次,2 000 r/min 离心 5 min。洗液 1 含有 70% 去离子甲酰

作者简介:肖 航(1976 –),男,黑龙江省齐市人,硕士研究生,医师,主要从事老年医学方面的研究,发表论文 6 篇。电话:(023)68765233,E-mail: atlas21st@yahoo.com.cn

通讯作者:司良毅,电话:(023)68754151

收稿日期:2005-10-28;修回日期:2006-01-17

胺、10 mmol/L Tris · HCl 、0.1% BSA 和 Tween-20 。洗液 2 为含有 0.1 % BSA 和 Tween-20 的 PBS。将细胞重悬于 300 μl 含碘化丙锭(PI) 的磷酸缓冲液中，于 4 ℃下放置过夜，上流式细胞仪。为进行数据分析，细胞控制为单一二倍体细胞。端粒平均荧光强度表示为 FITC 标记的$(C_3TA_2)_3$PNA 探针杂交细胞的平均荧光强度减去无探针杂交细胞的平均荧光强度。端粒长度与端粒平均荧光强度成正比，因此用端粒平均荧光强度检测端粒长度的变化。

1.4　统计学处理

使用 SPSS 11.0 软件分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用 t 检验。

2　结果

Flow-Fish 法检测细胞端粒长度变化的原理在于细胞端粒由高度重复序列 C_3TA_2组成，其长度越长，所含重复序列数目越多，所结合的 FITC-$(C_3TA_2)_3$ PNA 探针就越多，其荧光也就越强。因此对同一种细胞而言，Flow-Fish 法检测的单个细胞端粒平均荧光强度与端粒长度成正比。基于 PI 荧光和前向散射光(FSC) 而控制检测细胞在 R1 区(即二倍体细胞区)，测定该区细胞端粒特异性的 FITC 荧光。端粒平均荧光为与 FITC-$(C_3TA_2)_3$ PNA 探针杂交的细胞的平均荧光减去阴性对照细胞(即与不含探针杂交液作用的细胞) 的平均荧光的差值。在 SD 乳鼠心脏成纤维细胞培养基中加入 10 g/L D-gal，细胞端粒平均荧光强度(1.91 ± 0.06)与不加 D-gal 的细胞的荧光强度(4.77 ± 0.12)相比有明显降低($P < 0.01$)，($n = 3$)。说明 D-gal 能导致 SD 乳鼠心脏成纤维细胞端粒的缩短。

3　讨论

端粒是真核细胞内染色体末端的 DNA 重复片断，由富含 G 的核酸重复序列和许多蛋白质组成，经常被比做鞋带两端防止磨损的塑料套，是保护染色体末端稳定的结构，在细胞增殖的过程中，发现端粒的长度不断缩短[7]，被看成细胞复制的“计时钟”和细胞寿命的“指示剂”，端粒越短，表明细胞经历的分裂次数越多，其分化复制潜能越差，细胞越老[8]。端粒作为复制性衰老的触发器目前越来越受到重视。

Flow-Fish 的测定原理主要根据端粒由高度重复序列$(C_3TA_2)_3$组成，其长度越长，所含重复碱基数目越多，所结合的 FITC-$(C_3TA_2)_3$ PNA 探针就越多，其荧光也就越强。因此，Flow-Fish 中的荧光强度直接反映了端粒长度的变化。本研究通过 Flow-Fish 法证实了 D-gal 能缩短 SD 乳鼠心脏成纤维细胞端粒的长度。在细胞水平显示了 D-gal 致衰老的作用，为建立动物心脏成纤维细胞衰老模型提供了一个新的方法。

参考文献：

[1] VON-ZGLINICKI T, PILGER R, SITTE N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28(1): 64 - 74.

[2] 王　晶，姬志娟，赵志炜，等. APP17 肽对 D-半乳糖性脑老化模型小鼠学习、记忆功能和海马神经元 NT-3、NGF 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(6): 545 - 548.

[3] 李　亚，王建军，陈启盛. β-淀粉样蛋白对 D-半乳糖致衰大鼠海马线粒体膜流动性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(1): 73 - 75.

[4] 丁秀云，刘谟焓，王　琳，等. D-半乳糖对幼鼠心脏成纤维细胞拟衰老作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(8): 1505 - 1506, 1526.

[5] BATLIWALLA F M, DAMLE R N, METZ C, *et al*. Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsilar B cells[J]. J Immunol Methods, 2001, 247(1 - 2): 103 - 109.

[6] RUFER N, DRAGOWSKA W, THORNBURY G, *et al*. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(8): 743 - 747.

[7] HARLEY C B, FUTCHER A B, GREIDER C W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts[J]. Nature, 1990, 345(6274): 458 - 460.

[8] FRENCK R W, Jr., BLACKBURN E H, SHANNON K M. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(10): 5607 - 5610.

（编辑　栾　嘉）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有 1 个、2 个或 3 个，但“姓”只有 1 个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 PUBLIC J Q。

本刊编辑部