DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.09.025

本身就难于进入细胞浆的外源 DNA通过跨膜运动使既得 DNA又外出丢失,进而提高了细胞的基因转移效率。

pSVβ这种瞬时表达载体进入细胞内的表达情况主要与载体的属性相关,转染方法主要影响表达载体进入细胞内的数量,选择 Lipofect AMINE结合 10%甘油休克转染 pSVβ,观察表皮细胞内 pSVβ表达情况。图像处理结果表明,基因转染后细胞表达报告基因的高峰时期在 72 h。统一将 72 h作为检测报告基因表达载体的不同转染方法的转染效率是最佳的时相点,能够得到真实的转染率。

实验证明,脂质体结合 10%甘油休克转染表皮细胞是一种高效率的表皮细胞基因转染方法,同时也证实了甘油,二甲亚砜等的应用对原有方法的转染效率均有明显的影响。

关键词 表皮细胞;基因转染
中图法分类号 R394-3

参考文献

1 Hawley N P, Ciccarone V, Gebeyhu G, *et al*. Lipofect AMINE reagent a new higher efficiency polycationinc liposone transfection reagent. Focus, 1993, 15: 73
2 Felgner P L, Gadek T P, Holm M, *et al*. Lipofection A highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(21): 7413
3 Jiang C K, Connolly D, Blumenberg M, *et al*. Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol, 1991, 97(6): 969
4 Sheila C D, Thomas R B, Louisue T C, *et al*. Regulation of human papiuomavirus type 11 E6 promoter by viral and host trarscription factors in primary human keratinocytes. Journal of Virology, 1993, 67(3): 1722
5 Nead N A, Micheel A N. Dennis J M, *et al*. Poly-L-ornithine-mediated transfection of human keratincytes. J Invest Dermatol, 1995, 105(5): 688
6 Staedel O, Cathys, Jean, S R, *et al*. High-efficiency transfection of Primary human keratinocytes with positively charged lipopolyamine. DNA Complexes. Jinvest Dermatol, 1994, 102(5): 769
7 Harper J R. Greenhalgh B A. Yuspa S H, *et al*. Expression of transfected DNA by primary murine keratinocytes. J Invest Dermatol, 1988, 91(2): 151

(收稿: 1998-06-21;修回: 1999-01-18)
(编辑 冷怀明)

荧光探针法测定原代培养家兔肾脏内髓集合管细胞内 pH

Fluorenscent measurements of intracellular pH in primary cultured inner medullary collecting duct cells of rabbit kidney

夏前明* 黄 坚 赵志强 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸研究所) 重庆, 400037

提 要 目的:建立稳定的原代培养肾脏内髓集合管(Inner medullary collecting duct, IMCD)细胞的pHi测定方法,为进一步研究 IMCD细胞功能奠定基础。方法:将家兔肾脏 IMCD细胞用盖玻片培养成细胞单层,制备 IMCD细胞 pHi标准曲线,然后测定 IMCD细胞的 BCECF/AM的荧光强度比值(FIR),进而将 FIR转换为 IMCD细胞的 pHi。结果:本实验观察到 IMCD细胞的 FIR在 pH 6.8~7.8范围内呈显著正相关,回归方程为 $Y = 0.848 \pm 1.089X$ ($r = 0.988$, $P < 0.01$)。15份标本的 pHi结果为 7.255±0.030,与 Mankus等报告的结果最接近。结论:以上结果表明 BCECF/AM荧光探针法测定 IMCD细胞的 pHi,具有简单、可靠、经济等优点,IMCD细胞 pHi测定是研究 IMCD细胞功能的基础测定之一。

细胞功能活动的许多过程是 pH敏感的,全面评价细胞内 pH(pHi)变化对细胞功能活动的影响需要了解 pHi详细的调节机制。反之,通过测定 pHi的快速变化,也可推知细胞的功能活动。因而,pHi测定久已为人们所重视[1,2]。肾脏内髓集合管细胞是哺乳动物肾小管的最末节段,有"尿液 pH的最终调节器"之称。IMCD细胞的 pHi测定是研究 IMCD细胞多种离子交换功能的基础[3~5],国内尚未见报道。我们采用 2′,7′-双(2羧乙基)-5(6)羧基荧光素三乙酰甲酯酶[2′,7′-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxy-fluorescein triacetoxymethyl ester, BCECF/AM]荧光探针,成功地进行了 IMCD细胞的 pHi测定,现将结果报告如下。

* 夏前明,男,43岁,副主任医师,博士,现在成都军区总医院呼吸内科 成都, 610083

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

台式常温离心机(上海医用分析仪器厂),CO_2恒温孵箱(美国 Shell-Lab公司),PE-50型荧光磷光分光光度计(美国 PE公司),Nigericin、HEPES和氯化胆碱(美国 Sigma公司),BCECF/AM(美国 Eugene公司),DMEM/F12(美国 Gibco公司)。其余试剂为国产分析纯产品。

1.2 IMCD细胞培养

按本实验室方法进行,方法略。

1.3 溶液的配制

pH标准缓冲液(A液)和稳态液(B液)的组成如表 1所示,A液 pH分别为 6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8,B液 pH为 7.40,溶液配好后置 4℃冰箱保存。

表 1 溶液的组成(mmol/L)

	溶液	
	A	B
NaCl	0	135
KCl	133	5
Cholin-Cl	7	0
$CaCl_2$	1	1.8
$MgCl_2$	1	0
$MgSO_4$	0	0.8
KH_2PO_4	2	0
Glucose	5	5
HEPES	6	10

Nigericin用双蒸水稀释为 14μmol/μl,-20℃冰箱保存,测定时 1 ml A液或 1 ml B液加 Nigericin储备液 1μl;BCECF/AM用二甲基亚砜稀释为 1μg/μl,-20℃冰箱避光保存,测定时 1 ml A液或 1 ml B液加 BCECF/AM储备液 1μl。

1.4 pHi标准曲线的制备

1.4.1 无菌条件下取出培养好的 IMCD细胞单层,用小镊子轻轻插入专用支架(荧光磷光分光光度计配套用于细胞单层测定的支架,以下简称支架),旋紧固定螺钉。

1.4.2 将支架放入无菌比色杯中,用 B液漂洗 2次,每次 5 min。

1.4.3 将支架置于盛有 B液(含 BCECF/AM 1μg/ml)的另一无菌比色杯中,37℃、5% CO_2孵育 1 h。

1.4.4 取出支架,将其分别放入不同的 pH(6.6、6.8、7.0、7.2、7.4、7.6、7.8)A液中,漂洗 2次,每次 5 min。

1.4.5 分别将支架放入步骤 1.4.4相应的 A液中(含 Nigericin 14μl/ml),37℃、5% CO_2孵育 15 min。

1.4.6 测定杯中加入与步骤 1.4.4相应的 A液 1 ml,将孵育好的支架插入测定杯中。

1.4.7 将测定杯放入荧光磷光分光光度计的测定室,应用荧光磷光分光光度计配套的 FLMINLAB程序测定荧光强度。激发光波长 495 nm、440 nm,发射光波长 530 nm,狭缝 10 nm,每份标本测定时间设定为 1 min。

1.4.8 采用 FLMINLAB程序,将 495 nm/440 nm荧光强度比值(FIR)与相应的 A液 pH进行直线回归和相关分析,制成 pHi标准曲线。

1.5 稳态 pHi测定

测定的操作过程与标准曲线基本相同只是将步骤 1.4.4、1.4.5、1.4.6的 A液换为 B液,步骤 1.4.8为将测定的 FIR,查出其相应的 pHi,即为该标本的 pHi。

2 结果

2.1 IMCD细胞 pHi标准曲线

pHi在 6.6~7.8范围内与 FIR呈显著正相关,回归方程为:$Y = 0.848 \pm 1.089X$($r = 0.988$, $P < 0.01$),见图 1。

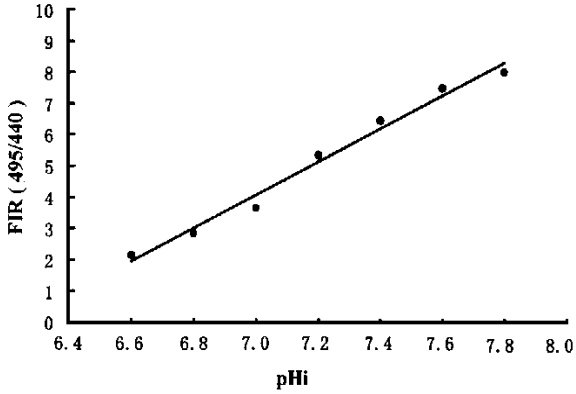


图 1 IMCD细胞的 pHi标准曲线

激发波长 495 nm和 440 nm荧光强度在 7种不同 pH的 A液中获得。495 nm与 440 nm比值作为细胞内 pH(pHi)的函数作图

2.2 IMCD细胞稳态 pHi结果

测定 IMCD细胞稳态 pHi标本 15份,结果为 7.255±0.030。

3 讨论

BCECF是一种 pH敏感的双激发荧光探针,为多电荷螯合剂,不能穿透非极性的细胞膜。它与乙酰氨基甲酯(AM)结合成非离子型的 BCECF/AM,能迅速透过细胞膜进入细胞内,立即被细胞内的非特异性酯酶水解为有活性的激离型 BCECF,就能与 H^+结合,而不能通过细胞膜而被扣押在细胞内。当用 495 nm和 440 nm两个波长的激发光轮流照射时,均可发射 530 nm的荧光。但用 440 nm照射时,产生的荧光很弱,对 pH不敏感。而用 495 nm光激发时,发射 530 nm,其强度与 pH成正比[7]。采用计算机辅助的荧光信号 495 nm/440 nm的 FIR测定,不仅增加了信号强度使测定更准确,易于识别可能出现的假信号,而且还具有以下优点:① FIR与细胞内探针总浓度无关;② FIR与探针负

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

载程度无关;③ FIR与细胞厚度无关;④ FIR可减少因探针泄漏及光漂白作用等导致的误差。因此,目前荧光探针法大多采用 FIR来测定 pHi

在一定范围内,每一 pHi对应与一个 FIR 通过这一对应关系建立 FIR对 pHi的回归方程,即可得到 pHi标准曲线。本实验用 K^+ 通道开放剂 Nigericin打开细胞膜 K^+ 通道,使细胞内外 K^+ 平衡,同时 H^+ 也达到平衡。当 BCECF/AM负载入细胞内,洗去细胞外 BCECF/AM,在已知 pH的系列溶液中,加入一定量的 Nigericin,使细胞内外的 H^+ 相平衡,测定此时的 FIR就可得知相应的 pHi,由此建立的 FIR对应于 pHi的回归方程,得出 pHi标准曲线

荧光探针法测定 IMCD细胞的 pHi的关键是准确配制标准 pH溶液,我们采用酸度计和血气分析仪双重校正,以确保标准溶液的 pH准确。由于 BCECF/AM溶液的荧光自动衰减,测定时均需制备当天的标准曲线。此外,配制标准溶液一般不要存放一月以上。

原代培养 IMCD细胞的稳态 pHi,各家报告的结果不一致。 Weil等[5]报告的家兔 IMCD细胞 pHi为 7.00± 0.03, Kraut等[3]报告的大鼠 IMCD细胞 pHi为 7.33± 0.06, Mankus等[7]报告的大鼠 IMCD细胞 pHi为 7.25± 0.04,可能与测定条件的差异有关。本实验测定的家兔 IMCD细胞 pHi为 7.255± 0.001,与 Mankus的结果最接近, IMCD细胞的稳态 pHi似乎与种属关系不大。

由上可见,荧光探针法测定 IMCD细胞的 pHi,具有操作简便、稳定可靠、经济安全等优点。此外, BDECF荧光探针无放射性污染,购买、保存和测定均较方便。以往虽有多种 pHi测定方法,除核磁共振外,均因各种问题而受限。如微电极法要求所测定的细胞体积较大,电极插入部位渗漏较少。溶细胞液法需要破坏细胞,测定的 pHi为整个细胞 pH的平均值,不能反映 pHi的变化过程。标记同位素弱酸(或弱碱)分布法反映的是稳态 pH的跨膜梯度,也不能反映 pHi的变化过程[2]。因此,开展荧光探针法测定 IMCD细胞的 pHi具有重要的意义。

关键词 家兔;肾脏;内髓集合管细胞;细胞内 pH
中图法分类号 R322.61; R394

参考文献

1 Chaillet J R, Amsler K, Boron W F. Optical measurements of intracellular pH in single LLC-PR1 cells: Demonstration of Cl-HCO_3 exchange. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(3): 522
2 夏前明.肺泡上皮细胞 pHi的研究进展.国外医学:生理病理科学与临床, 1997, 17(4): 368
3 Kraut J A, Hart D, Nord E P. Basolateral Na-independent Cl/HCO_3 exchange in primary cultures of rat IMCD cells. Am J Physiol, 1992, 263(2 Pt 2): 401
4 Ono S, Gunlupalli J, DuBose T D Jr. Role of H-K-ATPase in pHi regulation of inner medullary collecting duct cells in culture. Am J Physiol, 1996, 270(5 Pt 2): 852
5 Weil A E, Tisher C C, Conde M F, *et al*. Mechanisms of bicarbonate transport by cultured rabbit inner medullary collecting duct cells. Am J Physiol, 1994, 266(3 Pt 2): 466
6 孙 冰,张 敏.心肌细胞内 pH调节.生理科学进展, 1995, 26(3): 253
7 Mankus R, Schwartz J H, Alexander E A. Acidification adaptation in cultured inner medullary collecting duct cells. Am J Physiol, 1993, 264(4 Pt 2): 765

(收稿: 1998-12-15;修回: 1999-07-21)
(编辑 王 红)

(上接 673页)

2 讨论

本例寒冷季节急性起病,发热、头痛、呕吐、昏迷、脑膜刺激征及病理反射阳性,有口唇疱疹,加之外周血象和脑脊液呈化脓菌感染样改变,诊断暴发性流行性脑脊髓膜炎脑膜脑炎型依据较充分。并根据呼吸功能恶化及血气改变,考虑合并了 ARDS[1]。目前普遍认为, ARDS的发生是在严重感染等条件下产生大量炎性介质进入肺循环作用于血管壁,使其通透性显著增加,大量血浆外尖,产生肺泡间质水肿;缺氧、酸性代谢产物等对肺血管及Ⅱ型肺泡上皮细胞损害,导致血管通透性升高,表面活性物质产生减少,从而使肺顺应性降低。本例患者属流行性脑膜炎重型,易导致 ARDS。维生素 E是一种天然的抗脂质过氧化物质,具有还原性,极易与氧及自由基结合,防止生物膜上不饱和脂肪酸被氧化,稳定细胞膜,阻止Ⅱ型肺泡上皮细胞的破坏,增加表面活性物质的合成,提高肺顺应性;维生素 E具有保护血管壁,使其通透性降低,减少血浆外渗,阻止肺泡间质水肿,维生素 E具有增强免疫功能作用,有利于机体对病原体的清除[2]。本例患者加用维生素 E乳剂治疗,起到了明显的疗效。

关键词 维生素 E;流行性脑脊髓膜炎;成人呼吸窘迫综合征(ARDS)
中图法分类号 R515.2; R563.8; R977.25

参考文献

1 孙传兴 编.临床诊断依据治愈好转标准.北京:人民军医出版社, 1998.45~46
2 Packer L. Protective role of Vitamin E in biological system. Am J Clin Nutr, 1991, 53(Suppl 4): 1050

(收稿: 1999-06-05;修回: 1999-07-31)
(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net