

【论著】

心肌肌球蛋白及其重链的研制、特性鉴定和应用

宋娜玲, 赵启仁, 刘家慧, 张春明, 褚丽萍, 张桂华, 刘 洁, 谭文庆, 李 锐

中图分类号: R817.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-714X(2007)02-0129-03

【摘要】 目的 分离、提纯人心肌肌球蛋白(HCM)及其重链(HCMHC), 为心肌显像及其显像剂抗 HCMHC 抗体的研究打基础。方法 参考猪心肌肌球蛋白制备方法, 做了较大改进后, 提取了 HCM, 用盐酸胍裂解 HCM 制备了 HCMHC。用 SDS-PAGE(梯度)电泳测定分子质量, 用检测无机磷的方法测定 HCM 的 ATP 酶活力, 用 Elman 氏试剂测定游离巯基。将 HCMHC 免疫动物, 用 ELISA 法测定了血清抗体效价。结果 HCMHC 的相对分子量为 200×10^3 , 纯度大于 80%; 被免疫的 BALB/C 小鼠血清的抗体滴度最高达 10^7 , 细胞融合率达 80%。结论 研制的 HCMHC 具有良好的免疫学活性, 为下一步抗 HCMHC 单链可变区抗体(ScFv)及其放射性核素受体显像的研究打下了基础。

【关键词】 心肌肌球蛋白; 心肌肌球蛋白重链; 杂交瘤细胞

Studies on Preparation Characteristic Appraisal and Application of Human Cardiac Myosin and Human Cardiac Myosin Heavy Chain SONG Na-ling ZHAO Qi-ren LU Jia-hui et al *The key laboratory of molecular nuclear medicine institute of radiation medicine Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College Tianjin 300192 China.*

【Abstract】 Objective To isolate extract and purify human cardiac myosin (HCM) and human cardiac myosin heavy chain (HCMHC) for its next study of myocardial image and the antibody against HCMHC imaging reagent **Methods** First extract HCM from human heart muscle tissue and prepare HCMHC from the HCM, detect characteristics including protein concentration, molecular weight, enzymatic activity and free SH groups of the HCM and the HCMHC, prepare hybridoma cell lines of HCMHC, and examine the immunology activity of the HCMHC. **Results** 24mg HCM were extracted from 127g human cardiac muscle tissue, and 91mg HCMHC were prepared. Electrophoresis of SDS-PAGE (gradient) showed that the band of HCMHC located at 200 kD, which was the same of that of literatures, purity of HCMHC is higher than 80%. The specific activity of ATPase of HCM is good. The highest titer of anti-HCMHC serum is about 10^7 . The fusion rate was 80%. **Conclusions** HCMHC has good immunology activity for its next study of the antibody against HCMHC single chain fragment variable (ScFv) radionuclide receptor imaging.

【Key words】 Human Cardiac Myosin; Human Cardiac Myosin Heavy Chain; Hybridoma Cell

心肌显像能直接判断在急性心肌梗死等病理情况下, 心肌损伤的部位、面积与程度。而抗人心肌肌球蛋白重链(human cardiac myosin heavy chain HCMHC)抗体被认为是最有前途的放射免疫显像剂之一^[1,2]。在正常情况下肌球蛋白存在于心肌细胞质内。当心肌细胞坏死时, 细胞膜受损, 肌球蛋白重链暴露, 并能较长时间停留在坏死细胞内。用放射性核素标记的抗 HCMHC 抗体能特异地与 HCMHC 结合, 浓集于坏死心肌细胞处而显像, 并据此作出诊断。它的优点是显像时间长、特异性好和能早期诊断。抗 HCMHC 抗体能探测膜完整性的早期破坏, 能特异地区分死亡和存活的心肌细胞, 并可测定细胞活力大小。为了进一步改进抗 HCMHC 抗体的显像效果, 需要研制抗 HCMHC 单链可变区抗体^[3,4]。为此, 作为基础, 我们首先进行 HCM 和 HCMHC 的研制、特性鉴定和制备抗 HCMHC 的杂交瘤细胞株。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 5-腺苷三磷酸二钠盐(ATPN_{a3}·2H₂O), 华美生物工程公司; DEAE-Sephadex A-50 凝胶、高、低分子量标准蛋白 HMW-SDS Phast Gel Gradient 8-25 和 Phast Gel SDS Buffer Strips, 瑞典 Pharmacia 公司; 盐酸胍, 美国 Promega 公司; 十二烷基硫酸钠(SDS), 上海化学试剂采购站; 不完全福氏佐剂和完全福氏佐剂, 美国 GBCO 公司; DMEM 培养基,

HAT 选择培养基, 美国 Life technologies 公司。

1.1.2 主要仪器 1/10000 精密电子天平, 德国 Sartorius 公司; 低温高速离心机(SCR 20BA 型), 日本 Hitachi 公司; 超速低温离心机(L₇-80 型和 J₂-MC 型), 美国 Beckman 公司; UV-3000 紫外分光光谱仪, 日本岛津公司; Phast System 水平电泳系统, 瑞典 Pharmacia 公司; 垂直板电泳系统和 DOC1000 图像分析系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 HCM 的提取和纯化 取健康人意外死亡者心肌(经死者家属同意)127g 经过捣碎、先后三次匀浆、七次低温高速离心(其中一次超速离心, 且每步离心后都留样, 共留 7 个样品)、冰浴、多次不同离子浓度缓冲液溶解、二次饱和硫酸铵盐析等步骤, 得到 HCM 粗品。用 DEAE-Sephadex A-50 凝胶柱层析, 纯化 HCM 粗品。每次上样体积 41ml 含约 1% 粗品, 上样速度为 10ml/h, 约为洗脱速度的一半。上样后, 停 30min 以便吸附。然后用线性盐梯度(0.05mol/L~1.0mol/L KCl)洗脱液洗脱, 洗脱速度 4ml/12min⁻¹·管⁻¹。测定收集的各管样品在 280nm 处光密度(OD_{280nm})值, 绘制柱层析图谱, 据此收集蛋白峰。把收集的各蛋白峰溶液透析 40h 除盐。最后, 用 PEG-20000 进行浓缩。

1.2.2 HCM 及 HCMHC 的特性鉴定

1.2.2.1 蛋白浓度测定 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。在试管(均为双管)中分别加入 0.10 2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 μl 标准蛋白溶液, 用双蒸水补足到 60 μl 每管加 3ml 考马斯亮蓝染色溶液, 混匀, 室温下保温 15min 测定 OD_{595nm}, 作标准曲线。同法配制各待测样品并测定 OD_{595nm} 值。从标准曲线上求出待测值, 此法测定蛋白质量浓度范围为 0.01~1.0g/L。

基金项目: 国家自然科学基金项目(批准号: 39970223)
作者单位: 中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192
作者简介: 宋娜玲(1970~), 女, 助理研究员, 研究方向: 分子核医学。
通讯作者: 赵启仁(E-mail: zhaqiren98@yahoo.com.cn)

1.2.2.2 SDS-PAGE(梯度)凝胶电泳测定相对分子质量^[5]

在一瓶标准蛋白中加入 100 μ l 标准蛋白溶解液溶解,即标准蛋白工作液,4 $^{\circ}$ C 保存。在 20 μ l 待测样品中加入 20 μ l 样品溶解液和 60 μ l 蔗糖溶液 10 μ l 但终浓度应在 20~30ng/每种蛋白⁻¹· μ l⁻¹。将不同浓度的标准蛋白工作液 10 μ l 加入了溶解液的样品分别混匀,100 $^{\circ}$ C 加热 5min 在 Phast Gel 梯度 8~25% 凝胶片上样 1 μ l 电泳条件参照说明书并改进。染色和脱色各 2h 其间更换脱色液 4 次。加保护液保存。

1.2.2.3 HCM 的 ATPase 活力测定 先制作无机磷校正曲线,每个待测样品均为平行双管。每管中加反应液 100 μ l 加入待测样品(先稀释至约 1g/L 蛋白)80 μ l 再加入 5nmol/L ATP 溶液 20 μ l 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 15min 然后向每管加入 50 μ l 15% 三氯醋酸,冰浴 10min 再向每管加入 0.75ml 蒸馏水,将全部试管在 1000 η m 离心 10min 小心吸取上清液,用于待测磷。对各管的上清液分别加入下列各种试剂:0.5ml 15% 三氯醋酸、0.4ml 酸性钼酸钠溶液(0.1mol/L 钼酸钠和 24% 硫酸)工作液,摇匀后 15s 再加入 0.3ml 0.0185% 孔雀绿溶液,反应 2min 后,加入 2ml 17.8% 硫酸,室温放置 1h 用同上方法测定 OD_{625nm} 值。从校正曲线上查出对应的磷值,算出酶活力。

1.2.2.4 HCM 游离巯基的测定 把半胱氨酸系列标准溶液 50 μ l 分别加入不同的试管中,每管分别加入 50 μ l Ellmans 溶液和 900 μ l 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,混匀,室温放置 15min 测定 OD_{412nm},制作标准曲线。取各样品 50 μ l (蛋白质浓度约 1g/L),分别加入试管。每管再加入冰乙酸 13 μ l Ellmans 溶液 50 μ l 和 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液 900 μ l 室温放置 15min 测定 OD_{412nm}。

1.2.3 HCM 重链的制备^[7] 纯化后的 HCM 经 PEG-20000 浓缩至 8ml 边搅拌边缓慢加入固体盐酸胍至浓度为 5mol/L,再加入巯基乙醇至质量浓度为 0.01mol/L 在冷柜内冰浴下静置 3h 加入等体积冰预冷的双蒸水,再缓慢滴加 4 倍体积冰乙醇,沉淀,冰浴 20min 10000 η m 离心 20min 收集沉淀,用 0.6mol/L KCl 溶液充分溶解,然后加二巯基苏糖醇(DTT)和苯甲基磺酰氟(PMSF)使终质量浓度分别为 1mmol/L 和 0.1mmol/L 加 50% 甘油,分装,-20 $^{\circ}$ C 保存,此为 HCMHC 同时,离心后的上清透析除盐,用 PEG-20000 浓缩,制备 HCMLC,此 HCMLC 可用于制备抗 HCMLC 抗体^[8]。

1.2.4 抗 HCMHC 杂交瘤细胞的制备 采用经典杂交瘤技术原理,用 HCMHC 抗原免疫 BALB/C 小鼠,取出脾细胞与体外培养 SD2.0 的骨髓瘤细胞相融合。通过克隆化使阳性杂交瘤细胞成为纯一的单克隆系,进而获得单克隆抗体。

1.2.4.1 HCMHC 免疫小鼠和 ELISA 检测其血清抗体效价水平 选择 6~8 周龄的纯系 BALB/C 小鼠(雌雄不限)20 只,随机平分为两组。用 HCMHC 作为免疫原。免疫前用 0.025mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.6(含 0.03mol/L KCl 0.01mol/L 巯基乙醇),透析 HCMHC 24h 除去盐和甘油。初次免疫每只小鼠腹腔注射 40 μ g HCMHC 抗原量,注射体积为 500 μ l 3~4 周后第一次加强免疫,2 周后进行第二次加强免疫,均为 20 μ g 只 HCMHC,融合前 3d 进行冲击免疫,40 μ g 只 HCMHC。用 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay 酶联免疫吸附试验)检测血清抗体效价。

1.2.4.2 细胞融合 制备饲养细胞、脾细胞和 SP2.0 骨髓瘤细胞。将 1 $\times 10^8$ 脾细胞与 2 $\times 10^7$ ~3 $\times 10^7$ 骨髓瘤细胞在离心管中混匀,1000 η m 离心 5min 弃上清,在 37 $^{\circ}$ C 水浴中,均匀转动离心管,并轻轻加入 0.7ml 150% PEG-4000 进行细胞融合。静置 30s 后,缓慢加入无血清培养液,终止融合。离心弃上清,弹散细胞并重悬于 HAT(hypoxanthine 次黄嘌呤、aminopterin 氨基喋呤、thymidine 胸腺嘧啶核苷)培养液中,混匀,接种于铺有饲养细胞的 96 孔板中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 及饱和湿度下孵箱培养观察。

1.2.4.3 杂交瘤细胞的选择性培养及筛选 用 HAT 培养液培养 3~5d 后,融合的杂交瘤细胞成簇生长,成为小的细胞集落,此时非杂交瘤细胞几乎全部死亡。7~10d 后改用次黄嘌呤及胸腺嘧啶核苷(HT)培养液培养。14d 后改用普通培养液培养,此时杂交细胞可布满培养孔底部约 1/2 或 1/3 即可用 ELISA 方法对培养液作特异性抗体检测,确定抗体阳性孔并对抗体阳性高滴度细胞立刻进行单个细胞培养。

1.2.5 单克隆抗体制备及 HCMHC 免疫学活性检测 应用有限稀释法对杂交瘤细胞进行克隆化。把克隆化后仍分泌高滴度抗体的杂交瘤细胞用体外法进行大量繁殖。在液氮内冻存。用 ELISA 方法对 HCMHC 进行免疫学活性检测。对抗 HCMHC 杂交瘤细胞,经复苏、培养和传至培养瓶中扩大培养,再经 4~5d 后,取培养液待用。用样品缓冲液把 HCMHC 稀释成不同浓度(40mg/L, 20mg/L, 10mg/L),以 0.1ml 孔的量分别包被在 96 孔板上,4 $^{\circ}$ C 下过夜。弃去孔内液体并用洗涤液(KH₂PO₄ 0.2g Na₂HPO₄ 2.9g NaCl 18g Tween-20 0.5ml 定容至 1000ml 调 pH 至 7.4)洗板 3 次,然后按 ELISA 法对培养液进行检测。

2 结果

2.1 HCM 和 HCMHC 的研制 从 127g 人心肌组织中提取了约 24mg HCM 纯品,制备了 9.1mg HCMHC。图 1 为纯化 HCM 的柱层析图谱,图中蛋白峰清晰,第 I 和 II 峰为杂蛋白峰,III 峰为 HCM,而 V 峰可能为聚合蛋白峰。

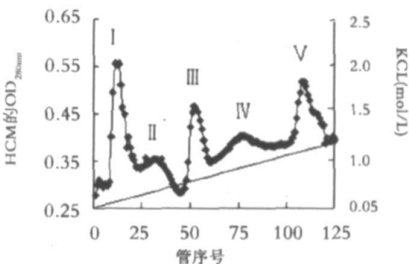


图 1 HCM 的 DEAE-Sephadex A-50 柱层析图

2.2 HCM 和 HCMHC 的特性鉴定

2.2.1 蛋白浓度的测定 用考马斯亮蓝法测得了提取过程中各步留样、HCM 和 HCMHC 等的蛋白浓度并计算了总蛋白量。从表 1 中可见,随着提取过程的进行,在杂蛋白逐渐去除的同时也伴随着 HCM 的损失,总蛋白量逐渐减少。

表 1 HCM 提取过程各步骤留样的蛋白测定结果

序号	样品名称	总体积 (ml)	总蛋白 (mg)
1	心肌捣碎液	777.0	6402.5
2	离 2 前匀浆液	500.0	2350.0
3	离 2 后过滤液	410.0	2464.1
4	离 3 后沉淀匀浆	280.0	1929.2
5	超速离心上清液	220.0	1644.2
6	离 5 沉淀匀浆液	270.0	689.0
7	离 7 后上清液	366.0	317.8
8	HCM 粗品	75.3	80.0
9	HCM 纯品	48.3	24.0
10	HCMHC	4.3	9.1

2.2.2 SDS-PAGE(梯度)凝胶电泳 用 SDS-PAGE(梯度)凝胶电泳测定了各留样蛋白的浓度,结果见图 2 图中可见:蛋白质高分子质量和低分子质量标准的各蛋白位置合理、清晰,说明本电泳方法可靠;1、2、3、5、6 和 8 号样品,正是从提取开始到结束顺序的留样,可见随提取过程的进行,各样品的杂蛋白成分越来越少,而目标蛋白 HCMHC 带越来越明显,所占

含量比越来越大,说明提取方法合理可行;HCMHC分子质量为 200×10^3 ,HCM LC分为两条,LC₁和 LC₂分子质量分别为 24×10^3 和 20×10^3 ,结果正确;这里要强调指出,HCM整分子质量为 470×10^3 ,但在 SDS—PAGE(梯度)凝胶电泳中,在 SDS作用下,本身分解为 HCMHC和 HCMLC,所以本电泳图中的 HCMHC就反映了 HCM,所以在 1、2、3、5、6和 8号样品中的电泳图中都有 HCMHC和 HCM LC 蛋白带出现;样品 8中只有 HCMHC蛋白带,但伴有少量 HCMLG 可能与分离 HCM LC 不完全有关。用电泳图像分析系统对电泳图进行了分析,结果显示,从最初捣碎液到最后的第 7次离心的上清液,HCMHC由 16.48%增至 63.42%,而 HCMHC样品中的 HCMHC纯度大于 80%。

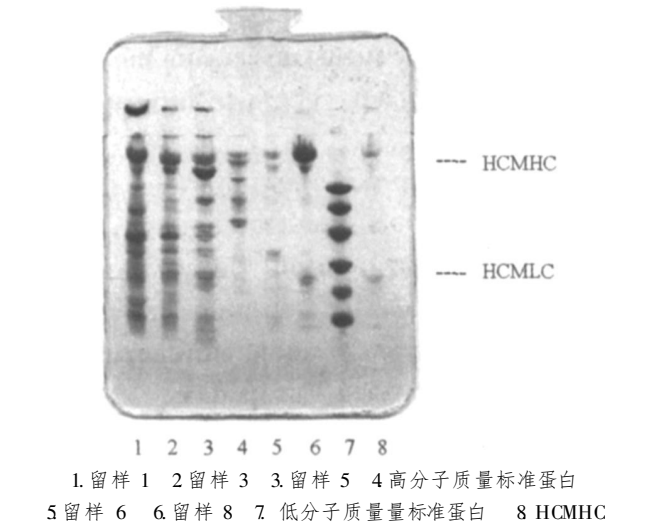


图 2 提取过程留样电泳图

2.2.3 HCM 的 ATP 酶活力测定 实验测得无机磷的校正曲线,其直线回归方程为 $y = -0.7156 + 34.4871x$, $r = 0.9956$ 。据此测定了 HCM 提纯过程全部留样的 ATP 酶活力,结果显示随提取过程的进行,ATP 酶的比活力总体上是逐渐增加的,并随 HCM 纯度增加而增加,而总活力随提纯步骤逐渐降低,这与 HCM 也在逐步减少是一致的。

2.2.4 HCM 游离巯基的测定 HCM 游离巯基测定结果为 10^5 g HCM 有 4 个游离巯基,表明所提纯的 HCM 分子的二硫键未破坏,基本保持了完整性。

2.3 HCMHC 杂交瘤细胞的制备

2.3.1 用 ELISA 方法测定免疫小鼠血清中抗 HCMHC 抗体的效价 实验结果见表 2。由表可见,第二组免疫小鼠血清中抗 HCMHC 抗体效价最高,为 10^7 ,一月后重测此组血清效价,无明显区别,这说明所提纯的 HCMHC 具有较好的免疫原性。

表 2 ELISA 法测定抗体效价结果

组别	免疫小鼠(只)	免疫剂量(μ g/只)	血清效价
第一组	10	40	最高达 10^5
第二组	10	40	最高达 10^7

2.3.2 细胞融合 参考经典的细胞融合技术,把体外培养的 SP2.0 骨髓瘤细胞与免疫小鼠的脾细胞进行融合,经过多次实验,融合率达 80%左右。

2.3.3 用 ELISA 法检测 HCMHC 免疫学活性 表 3 的实验结果表明:所制备的 HCMHC 样品的 OD 值已达到或超过阳性对照(+)的 OD 值,远高于阴性对照(-)和空白对照的 OD 值,差异均非常显著;三种不同包被浓度样品的 OD 值无明显差异,包被浓度可控制在 $5 \sim 10$ ng/L,最大不宜超过 10 ng/L;从表 3 测定结果与相应的电泳图谱综合分析证实所研制的 HCMHC 可满足实验要求,并具有良好的免疫学活性;实验结果还表明,样品中加入 50%甘油保护,对包被及测定结果无明显影

响,使用时可不必透析。

表 3 ELISA 法检测 HCMHC 免疫学活性的结果(OD_{280nm})

		包被浓度(mg/L)		
		40	20	10
样品	1	1.001	0.975	0.964
	2	1.051	1.039	1.018
	3	1.139	1.125	1.120
	4	0.932	0.918	0.919
	均值	1.031	1.041	1.005
阳性对照(+)	5	0.961	0.932	0.935
阴性对照(-)	6	0.147	0.121	0.126
	7	0.136	0.131	0.127
	均值	0.142	0.126	0.127
空白对照	8	0.077	0.078	0.066

3 讨论

3.1 HCM 的提取 人死后随着时间的推移,心肌细胞中的肌球蛋白分子会不断与肌动蛋白结合成肌动球蛋白。在肌球蛋白的提取过程中,虽然理论上肌动球蛋白分子可以被加入的 ATP 和 Mg^{2+} 逆转成肌动蛋白和肌球蛋白,但是在实际中有相当大的比例不能逆转。所以,最好是人死后短时间内取材,并 -18°C 下保存。提取的全过程必须保持在 4°C 环境下,否则,肌球蛋白的聚合作用极其显著。肌球蛋白分子随温度升高,分子间聚合率会明显增加,而且聚合一旦形成,极少有被逆转的可能。在提取中我们用缓冲液匀浆、补加 KCl 等方法,增加蛋白溶解度,防止聚合。在 HCM 纯化中,我们选择了磷酸钾缓冲液系统加 KCl 的线性梯度($0.05 \sim 1$ mol/L)洗脱液,这样不仅能充分溶解肌球蛋白,而且能有效地防止肌球蛋白的聚合。

在肌球蛋白提取的全过程中,肌球蛋白 ATP 酶经历进行性的变性,并且有可能水解生成两个片段。为防止或减少这种影响,我们在提取过程中的大多数溶液中加入 PMSF、DTT 和 EDTA。其中,PMSF 是丝氨酸蛋白酶抑制剂,能有效阻止肌球蛋白的水解作用。DTT 是还原蛋白质二硫键的试剂,在反应中 DTT 形成一个含分子内二硫键的稳定六元环,用作巯基保护剂。EDTA 作为络合剂和金属掩蔽剂,与金属离子结合,保护肌球蛋白的活性。

3.2 特性鉴定 近年来,有应用 MADI-TOF 质谱仪进行 HCMHC 的鉴定,这是一种相对和绝对定量蛋白异构体的特殊方法^[8]。本实验在对 HCM 和 HCMHC 鉴定中,首先进行 SDS—PAGE 不连续电泳,但由于 HCM 及其亚基分子质量较大,分离效果不好。考虑到 PAGE(梯度)凝胶电泳具有浓缩作用,可以直接测定天然状态蛋白质的分子质量。于是改用垂直板 SDS—PAGE(梯度)凝胶电泳,但因需时较长,温度升高,导致凝胶变性等原因,未获理想效果。又经过反复筛选认为水平电泳的凝胶可在冷却板上得到充分的冷却,又可在凝胶上加高压,使电泳时间大大缩短和分辨率明显提高。因此选用了 Pharmacia 公司的 Phast System 自动水平电泳系统。先进行了 PAGE(梯度)为 $8 \sim 25\%$ 的电泳,未获得理想结果,可能是由于 HCM 分子质量较大的原因。据此又进行了 SDS—PAGE(梯度)凝胶($8 \sim 25\%$)电泳,一方面利用梯度凝胶的分子筛作用,另一方面利用 SDS 将大分子 HCM 解离成重链和轻链亚基测定其分子质量,最终获得较为理想的结果,如图 3 所示。表明我们改进的电泳方法是非常有效的。

3.3 HCMHC 的制备 在 HCMHC 的制备中,由于盐酸胍的作用,使 HCM 次级键被破坏,引起其天然构象(下转第 134 页)

LDH系胞质酶,正常情况下不能透过细胞膜,但当细胞受到损伤时,细胞膜通透性增强,LDH会从细胞质内漏出,细胞质内LDH减少,培养液中LDH增多,测定培养液中LDH浓度可反映心肌细胞的损伤情况。结晶紫实验的原理是结晶紫染色可通过细胞的特定摄生法而选择性地被细胞核吸收,死亡的细胞几乎不吸收结晶紫染料,而被核(DNA)吸收的结晶紫又可为有机溶媒提取,通过测定提取液的光密度值(OD),就可测定活细胞的数量^[7]。MTT法亦可通过所测细胞的OD值不同反映活细胞数的变化。本研究中,照射后48h流式细胞仪检测细胞凋亡,结果显示不同剂量的⁶⁰Co γ 射线照射均可促进细胞凋亡,而且随着照射剂量的增加,细胞凋亡增加。照射后48h的心肌细胞的培养上清中的LDH浓度较未照射组明显升高,与照射剂量呈量效关系,说明⁶⁰Co γ 射线照射可对心肌细胞造成一定程度的损伤。结晶紫染色与MTT法得到的结果相类似,照射后48h各组细胞OD值间无明显差异,照射后120h照射组细胞的OD较为照射组明显降低,与照射剂量相关,亦说明⁶⁰Co γ 射线对体外培养的心肌细胞有毒性作用,照射后48h各组间OD值无明显差异考虑与在细胞的损伤早期结晶紫染色及MTT法不够敏感有关,在照射后48h时细胞活性下降,早期凋亡细胞增多,但仍可摄取结晶紫及MTT,故各组细胞所测OD值差异不明显,在照射后120h,细胞功能进一步受损,结晶紫及MTT摄取能力下降,导致OD值较为照射组明显下降。

上述结果均提示⁶⁰Co γ 射线照射体外培养的心肌细胞对其有直接损伤作用,降低细胞活性,促进凋亡细胞。根据放射生物学的理论,心肌细胞属于终末分化细胞,对辐射敏感性较低。本研究的实验结果则提示⁶⁰Co γ 射线照射可直接损伤体外培养的心肌细胞,促进细胞凋亡。体外培养的心肌细胞的放射损伤机理目前尚不明确。有报道心肌细胞放射损伤可致线粒体结构破坏,功能受损,导致能量代谢障碍^[8]。在本研究中

发现,照射后各组细胞的细胞周期未见明显差异,照射后48h细胞心肌细胞凋亡率增加,在照射后12h心肌细胞内质网和线粒体明显损伤(结果未在该文中显示),由此考虑,照射后线粒体及其他细胞器功能障碍受导致细胞功能障碍,细胞活力下降,细胞凋亡增多,但 γ 射线致心肌细胞损伤的机理仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 吴德昌.放射医学[M].北京:军事医学科学出版社,2001.

[2] Schultz-Hector S. Radiation-induced heart disease: review of experimental data on dose response and pathogenesis[J]. Int J Radiat Biol. 1992; 61(2): 149-160.

[3] Gaya AM, Ashford RF. Cardiac complications of radiation therapy[J]. Clin Oncol (R Coll Radio). 2005; 17(3): 153-159.

[4] Lauk S, Trott KR. Endothelial cell proliferation in the rat heart following local heart irradiation[J]. Int J Radiat Biol. 1990; 57(5): 1017-1030.

[5] Stewart JR, Fajardo LF, Gillette SM, et al. Radiation injury to the heart[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995; 31(5): 1205-1211.

[6] 杨晓宁,田宗文,黄焕斌,等.新生大鼠心肌细胞的体外培养[J].解剖学杂志,2005; 28(3): 361-362.

[7] 陈军,战洪生.结晶紫染色测定法在抗肿瘤药物筛选中的应用.癌症,1997; 16(3): 231-232.

[8] Cilliers GD, Hamper B, Lochner A. Radiation induced changes in the ultrastructure and mechanical function of the rat heart[J]. Radiother Oncol. 1989; 16(4): 311-326.

(收稿日期: 2007-01-15)

(上接第131页)

解体,但不涉及HCM共价键(肽键和二硫键等)的破裂,其一级结构HCMHC、HCMIC保持完好。盐酸胍变性剂存在时,变性的HCM保持溶解状态。为防止在溶液中加入乙醇时产生放热反应引起蛋白质变性,我们把乙醇进行了充分预冷,而且整个操作在4℃冰柜中进行。加入乙醇是为了使重链沉淀,再经离心将其分离出来。

3.4 HCMHC杂交瘤细胞的制备 为了使产生的杂交瘤细胞稳定,使用的SP2骨髓瘤细胞来自与被免疫动物同一个品系的BALB/C小鼠品系。一般认为,在最后一次加强免疫后第三日取脾进行融合为好。我们选用PEG作为融合剂。处于50%PEG浓度的的高渗环境中,细胞呈现交融和皱缩的状态,所以在用预温的无血清培养液稀释时,开始要缓慢,边加边轻轻地震荡,使细胞的渗透压与外环境逐步平衡,否则会由于突然处于低渗状态中,大量水分涌入细胞膜中而使细胞崩解。在融合过程中,必须选择合适的PEG分子质量、温度以及作用时间,以免影响融合效果。

4 结论

本实验取得了良好的结果,为下一步抗HCMHC单链可变区抗体及其放射性核素受体显像的研究打下了基础。

参与文献:

[1] Laroche-Traineau J, Clément-Sanchez G, Santarelli X, et al. Three-step purification of bacterially expressed human single-chain Fv antibodies for clinical applications[J]. J

Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000; 737(1-2): 107-117.

[2] Neddman MA, David JS, Baymond B, et al. Rapid infarct imaging with a technetium-99m-labeled antimyosin recombinant single-chain Fv: evaluation in a canine model of acute myocardial infarction. J Nucl Med. 1993; 34(2): 234-241.

[3] Mømer S, Richard B, Kazzam E, et al. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden[J]. J Mol Cell Cardiol. 2003; 35(7): 841-849.

[4] 惠海鹏,李小鹰,刘秀华,等.腺相关病毒介导心肌肌浆网Ca²⁺-ATPase 2a基因转导治疗大鼠慢性心力衰竭[J].中华心血管病杂志,2006; 34(4): 357-362.

[5] Warren CM, Greaser ML. Method for cardiac myosin heavy chain separation by sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis[J]. Anal Biochem. 2003; 320(1): 149-151.

[6] Piac S, Yu E, Mithun M J, et al. A simplified method for identification of human cardiac myosin heavy chain isoforms. Biotechnol Appl Biochem. 2003; 37(1): 27-30.

[7] 黄人健,彭宝珍,周国瑛,等.人心肌肌球蛋白轻链1与重链和肌动蛋白的结合[J].生物化学与生物物理学报,2000; 33(1): 41-45.

[8] Steve MH, Chia-Y, Krzysztof JG, et al. Simultaneous quantification of human cardiac α - and β -myosin heavy chain proteins by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. Anal Chem. 2004; 76(6): 1683-1689.

(收稿日期: 2007-04-02)