

脂质体与细胞的融合

侯 愉

(美国纽约罗斯维尔派克肿瘤研究所)

脂质体 (Liposome) 可以做成单层,也可做成多层像洋葱状。可以利用脂质体作载体和靶细胞融合。脂质体作载体,其成份单纯,不同于红血球的微量注入,而红血球内含有其它成份,如血红蛋白等。另一方面可用脂质体引入大分子,如信息核糖核酸,抗癌药物等。目前国际上正开展这一方面的工作。

细胞融合通常分以下几步进行:

单层培养细胞/35mm 小皿

↓
加外源凝集素 (Lectin) (刀豆球蛋白 (ConA)
或植物凝集素(PHA),蓖麻凝集素(RCA)等)

加 $2\mu\text{g}$ 以上/有钙、镁、磷酸缓冲盐溶液 (PBS (+))/ml

↓
在室温下 5 分钟

↓
加脂质体 ($200\text{m}\mu$) 制备, 30 分钟

↓
无钙、镁磷酸缓冲盐溶液 (PBS(-)) 洗涤三次

↓
加聚乙二醇 (PEG) 4000 (mW) (45% W/W)/
ml 1 分钟

↓
加 PBS(-) 2ml 轻轻摇动混合, 在室温下孵育 10 分钟

↓
加含有钙镁磷酸缓冲盐溶液 (PBS(+)) 洗 6 次,
 4°C

↓
在荧光显微镜下检查

脂质体的制备方法之一,是将卵磷脂、乳糖脑苷脂 (Lactosylcerebroside)、胆固醇、磷脂酰甘油 (Phosphatidylglycerol) 等加在一起,在旋转蒸发器中(真空)蒸发至干;停止旋转后,继续保持真空状态,进一步蒸发 30 分钟。充氮气后再加 PBS(-) 形成大的脂质体。在室温下经短暂的超声处理,便形成较小且均匀的脂质

体。以上步骤均在充满氮气条件下进行,以免氧化。用脂质体作载体,标记上预定物质或染料和选定好的靶细胞进行融合。 $3'$ -偶十六烷基羧基花青是一种类脂物,系较好的膜性染料。

融合必须添加助融剂。常用的助融剂分化学性与病毒性两种,化学性的以 PEG 使用较广泛。PEG 属于多糖类,具有吸水作用。

选定需要的融合细胞冲洗之,使细胞膜表面不滞留缓冲液。再添加 45% 的 PEG; 此步不得超过 1 分钟,否则对细胞有毒害作用。1 分钟后,立即用 PBS(-) 1ml 轻轻摇动混合稀释,弃去液体、再加 PBS(-) 1ml 重复 3 次(由于 45% 的 PEG 很稠需稀释冲淡)。第 4 次加 PBS(-) 1ml 后,于室温孵育 10 分钟,弃去液体。再用 PBS(+) 在冰上洗涤数次,把 PEG 全部洗脱。最后用荧光显微镜观察融合率。一般是 70—80%。

融合后,脂质体将 diI-C_{18} 带入细胞。在荧光显微镜下,细胞周围有荧光,说明细胞有融合。如果不加 PEG,细胞周围无荧光。

融合的结果是

1. diI -脂质体近于 0.25μ 。
2. 如果没有外源凝集素,则凝集很少。
3. 加 PEG 并且再稀释,荧光分布逐渐扩散。
4. 以 FPR (荧光漂白后复现)方法测定,然后根据 Axelrod 公式计算,可以得出分子扩散系数 $D(D = 8.5 \times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s})$ 。
5. %R (荧光恢复的百分数)可达 40—90%,而 %R 决定于不移动的脂体斑点。

如不动的脂体斑点少,则 %R 大,相反,不动的脂体斑点多, %R 则小。用 diI 检查融合后的脂分子应嵌入质膜上,可求其 D 值。如用 F-BSA 检查融合后的脂分子,应进入细胞质内。

在整个融合过程中有多种因素干扰。

1. 不同浓度的外源凝集素的影响

F-白蛋白进入细胞质内,作为融合的指标 diI-C_{18} 系具有荧光性质的类脂物。从表 1 可以看出外源凝集素的浓度大,可引起较多的融合。但是在融合中既要有足够的浓度,又要考虑其毒性,必须找出合适的

表 1 浓度的 RCA 对不同细胞融合率的影响

浓度 RCA-1 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞融合的百分比					
	BG-9		NiL-8		L-929	
	diI- C ₁₈ ⁽³⁾	F- 白蛋白	diI- C ₁₈ ⁽³⁾	diI- C ₁₈ ⁽³⁾	diI- C ₁₈ ⁽³⁾	F- 白蛋白
20	53	52	71	74	80—90	70
10	39	44	54	42	80	74
2	41	37	9	不融合	80	82
1.	未测定	33	未测定	未测定	50	41
0.2	未测定	20	未测定	未测定	不融合	19
0	不融合	未测定	不融合	不融合	未测定	3
	diI	F- 白蛋白	diI	F- 白蛋白	diI	F- 白蛋白
20	53 $\pm$ 3(12)	52 $\pm$ 2(2)	53 $\pm$ 9(3)	54(1)	74 $\pm$ 6(2)	70(1)
10	51 $\pm$ 7(3)	44 $\pm$ 5(4)	48 $\pm$ 6(2)	未测定	69 $\pm$ 4(4)	69 $\pm$ 2(3)

浓度。

2. PEG 的分子量大小对融合的影响

从表2看出分子量600的PEG其融合率在25%—33%。而1500的PEG均在60%以上,但大于1500的PEG其融合率下降至56%、42%、36%。6000的PEG融合率只有40%。这是因为PEG分子量越大,对细胞的伤害也越大。PEG6000的融合百分比少,1500以下也少。所以1500至4000是合适的。融合率达60—70%

表 2

PEG 分子量(千)	融合细胞百分比		
	BG-9	L-929	
	F-白蛋白	diI-C ₁₆ ⁽³⁾	F-白蛋白
20	未测定	未测定	48
6	36	40	61
4	42	67	66
3.4	56	60	68
1.5	59	未测定	74
0.6	17	25	33
0.4	<10	<8	不融合

3. 温度对融合率的影响

在低温下正常细胞生理活性低。如BG-9和NiL-

表 3

温 度	BG-9		NiL-8	
	diI-C ₁₈ ⁽³⁾	F-白蛋白	diI-C ₁₈ ⁽³⁾	F-白蛋白
37℃	50	49	86	未测定
24℃	32	33	43	45
0—4℃	13	9	32	35

8两种培养细胞分别在0—4℃、室温、37℃下进行实验,以胞膜和胞质作为指标。在4℃时,融合百分比<13%;室温时32%;37℃时50%(见表3)说明随着温度升高,融合率增大。

PEG作用之一可能是把细胞膜上的蛋白质分子排开,使脂质体插入与膜结合。如果细胞用胰蛋白酶处理,切去部分蛋白质,脂质体与细胞的融合率明显升高。表明膜上蛋白质是融合的障碍(见表4)。

表 4

细胞株及处理	融合标志	细胞融合百分比
BG-9	diI	24 $\pm$ 5(4)
BG-9	diI	82 $\pm$ 2(2)
胰蛋白酶消化		
BG-9	cF	58 $\pm$ 5(3)
NiL-8	diI	29(1)
NiL-8	diI	63 $\pm$ 3(4)
胰蛋白酶消化		
L-929	diI	51 $\pm$ 3(4)
L-929	diI	约100
胰蛋白酶消化		
L-929	F-球蛋白	44 $\pm$ 4(3)

胰蛋白酶消化浓度为: 0.0004% 乙二胺四乙酸二钠, 0.001% 胰蛋白酶。

融合后用¹PR(光淬灭荧光复现)测定,求出D值见表5。

表 5

	分子量	分子运动 $D(\times 10^{-8}\text{cm}^2/\text{s} \pm \text{SD})$
F-IgG	160000	0.8 $\pm$ 0.4 (35)
F-BSA	68000	1.0 $\pm$ 0.4 (19)
羧基荧光素	374	>4.0
F-BSA/缓冲液	6800	65.0

以下是F-牛血清白蛋白在5℃时,细胞质中的扩散系数。

处 理	$D(\times 10^{-8}\text{cm}^2/\text{每秒})$
4℃ 低于30秒对照	0.4 $\pm$ 0.2(6)
4℃ 大于60秒对照	0.6 $\pm$ 0.1(14)
10 ⁻⁴ M秋水仙碱处理	1.1 $\pm$ 0.4(1.0)

证明细胞仍处在正常状态下。

总之,细胞融合时,需注意外源凝集素加量应不少于2 $\mu\text{g/ml}$ 。才能将细胞相互聚拢,也可用胰蛋白酶处理,增加融合百分比。另外需在脂质体上加糖脂,以便使外源凝集素易被吸附。但两者之间比例要合适。

显微镜下检查,凡是融合的脂质体,显出的斑点有多有少,用FPR方法测定,不运动分子少时,其斑点小而少。在成纤维细胞上,这些斑点有的是在细胞膜上,有的在细胞质里,需加以区分。

表 6 是列举在某些条件下,检查细胞存活的情况

表 6

细胞处理后时间	0 小时	4 小时	24 小时
对照	95%	95%±5(2)	100%±1(2)
蓖麻凝集素 2μg/ml	89%	92%	83%
融合	94%±2(3)	91%±3(3)	44%±3(3)

表 6 说明实验时应考虑引入分子后一段时间的细胞存活情况。

4. 关于细胞融合的机制问题

有一种假说认为细胞上有许多凝集素受体,当外源凝集素和受体结合,然后加入脂质体便可与之融合。而脂质体在制备时也有凝集素受体,因而增加了脂质体与细胞的结合。脂质体膜被荧光标记,脂质体里面也用水溶性分子标记。在外源凝集素作用下,凝集素与细胞表面的相应受体结合,再加上 PEG 将两类细胞

膜拉得更近,使类脂融合起来。因此脂质体里的分子也能进入细胞内。

脂质体和细胞融合的工作,国内外都在广泛开展。很多人想用脂质体载上药品或预定的物质进入预定的靶细胞。这些脂质体加上一些受体或抗体在外源凝集素的作用下,和靶细胞的受体相结合,或和靶细胞直接结合,或以内胞饮方式使这些药物在进入靶细胞,在结合或进入之前,不被破坏、消失或冲淡。而一旦进入靶细胞与溶酶体作用后,脂质体裂解,于是内含物被释放出来,达到有效治疗目的。这是研究治疗肿瘤的方向之一。在探讨用各种指标负载分子进行融合的机制时,要特别注意凝集素对靶细胞的毒害问题,必须找出它们对细胞合适的最低浓度。外源性凝集素有很多种,当前用 PEG 较为普遍。至于基本理论问题,尚有很多待于解决。

[北京市肿瘤研究所王代树、梁云燕整理]

会议简讯

1982 年英国生物物理学会年会

英国生物物理学会 (British Biophysical Society, BBA) 于 1982 年 4 月 5—7 日在约克大学举行了主题为《生物分子间结合的能量学》(Energetics of Intermolecular Associations in Biology) 的年会。英国生物化学学会的分子酶组的成员、美、西德、法和以色列的生物物理学家出席并作了报告。到会共一百多人。笔者在牛津大学进修时作为正式代表参加了会议。现将所了解的情况介绍如后。

大会报告分为六个专题进行: 1. 理论背景。报告题目有原子间作用力的计算; 疏水相互作用; 液体水在结构中的有限无序; 配位体—大分子相互作用中溶剂的作用; 肽和蛋白质的结构、能量关系和动力学。2. 配位体和大分子的挠性。报告题目有在晶态中、溶液中与脱氢酶键合中 NAD^+ 的结构; 在界面上荷电的可挠性基团的重要性。3. 结构与能量学的实验室研究。报告有配位体—蛋白质作用的量热研究; 配位体—蛋白质作用的结晶学研究; 配位体与二氢叶酸酶键合特异性的 NMR 研究; 药物插入核酸。4. 配位体—大分子相互作用的计算。报告有配位体—蛋白质相互作用的计算机图形研究; 分子在药物受体上的识别和定向。5. 适合于键合位置的配位体设计。报告有配位体与血红素的结合; 用作治疗的某些肽酶抑制剂的设计。6. 亚单位体系。报告有亚单位酶的折叠和缔合; 病毒堆砌的结构特点; 胰岛素的 3D 结构和亚单位缔合; 在亚单位

表面上的配位体键合; 蛋白质亚单位间的“对话”。

此外, 美国加州大学的 A. T. Hagler 和英国里兹大学的 A. J. Geddes 分别放映了按照他们计算和实验结果所摄制的彩色电视录像影片, 生动而形象地显示了配位体、肽和蛋白质这些分子间相互作用的轨迹和过程, 引起了与会者的极大兴趣。

研究论文的大字报的题目是: 蛋白质的静电相互作用—蛋白质中的离子对; 胆素激性催动肌组分的分子相互作用研究; 围绕螺旋或伸展构象的聚丙烯酸水结构的 Monte-Carlo 计算; 磷酸酶 A_2 的挠性和刚性; 与糖相连的苷类恒定核的挠性 (^1H 和 ^{13}C NMR 研究); 兔肌肉肌氨酸激活酶的亚单位的缔合; 血红素协同效应的分析; 蛋白质晶体的计算机模型; 膀胱纤维糖蛋白的自身缔合, 多散性 (polydispersity) 和非理想热力学行为; 肌凝蛋白碱性轻链中 α -N-三甲基丙氨酸的发现和它在肌动蛋白键合中的地位; 人体子宫内膜组织的改型雌激素受体的作用; 正癸酸磺酸钠和催化酶的相互作用; 水合蛋白的中子 (Time-of-Flight) 光谱; 氧化型磷酸化的非平衡态热力学和动力学分析; 苯甲二氮葸—人血清蛋白结构的高性能液相色谱 (HPLC) 和极谱测定; 球蛋白终端羟基和胺基的作用; 组织蛋白—DNA 缔合的能量关系; 二氢叶酸还原酶与胺基甲基叶酸和 NADPH 的吸收光谱和 CD 光谱 (理论分析)。

[复旦大学化学系黄仲贤]