

正常和淋巴白血病淋巴细胞膜的 DPH 荧光偏振度和对 PHA 及 CaBP 刺激的反应*

——细胞膜的流动性和信息识别的研究

刘树森 韦美福 李清焕 法祥光**

(中国科学院动物研究所,北京)

董志伟 万文徽 王杰 李宪周

(北京市肿瘤研究所)

生物膜磷脂双分子层的流动性是生物膜的基本特性之一。随着环境和生理条件的变化,生物膜伴随有相变和分相的现象^[1]。研究生物膜的这一特性,有助于阐明膜的动态结构,各种生理,病理状态下膜流动性的变化及其控制机制,在理论与实践上均有重要意义^[2]。

荧光偏振度测定是研究生物膜流动性的手段之一。1974年, M. Inbar 等将一种疏水性的荧光探针—DPH (1,6-二苯基 1,3,5-己三烯) 嵌入于完整淋巴细胞表面膜的类脂双分子层区域,然后通过对 DPH 在膜脂中的荧光偏振度的测定可定量监测膜脂层的流动性^[3],并证明膜流动性的高低与膜胆固醇的水平有关^[4],同时也证明膜的流动性还受血清中某些组分的调控^[5]。1978年,美国 S. Yanorish 等同 DPH 研究正常的和白血病人的外周血及骨髓淋巴细胞膜脂动力学的差异,用于诊断和预告白血病的复发,具有灵敏度高和精确性好的优点^[6]。在前文中,我们根据 Cercek (1974) 的方法^[7],利用测定 FDA (荧光素二乙酸) 在淋巴细胞浆中的荧光偏振度,即细胞浆结构性的改变 (The Structuredness of Cytoplasmic Matrix, SCM),作为诊断肿瘤的指标,也证明了在 PHA (植物凝集素) 和 CaBP (肿瘤碱性蛋白) 分别刺激淋巴细胞时,正常人和非恶性疾病患者,与恶性肿瘤患者的

外周血淋巴细胞浆“SCM”有不同的识别反应^[8]。

本文是进一步应用 DPH 标记正常人、实验小鼠和对应的淋巴白血病患者的淋巴细胞膜测定其荧光偏振度技术及 PHA 和 CaBP 刺激前后的反应,以研究细胞膜的流动性和细胞信息识别问题,并为临床肿瘤诊断提供指标。现将这一研究结果介绍如下:

材料与方 法

一、材料

1. 样品 正常“615”小鼠,淋巴白血病小鼠(断奶后体重 20g 左右的“615”小鼠,接上 L7212 瘤种)均为医科院药物所供给。

正常人和急性、慢性淋巴白血病人血样取自临床,均经病理诊断,采取新鲜外周血,分离其淋巴细胞。

2. 试剂 DPH (1,6-二苯基, 1,3,5-己三烯, Sigma 产品),母液浓度为 $2 \times 10^{-3}M$,以四氢呋喃为溶剂,于棕色瓶中低温保存。一般可使用一个月。工作液浓度为 $2 \times 10^{-6}M$,以 PBS 稀释,用时配制,猛烈振摆 10—15 分钟。

* 本文的部分结果曾在 1979 年 5 月第一届全国生化代表大会(杭州)上宣读

** 中国医科院血液研究所进修人员

PHA (植物血凝素, Difco 产)每瓶干粉溶于 5ml 双蒸水中,再稀释 10 倍 (1:10 稀释),在低温下保存备用。

CaBP (肿瘤碱性蛋白), 参照 Dickinson^[9] 等人方法从 Ehrlich 腹水癌细胞中和人胃癌组织块中分别提取。经细胞电泳法证实其活性。

Tris-HCl-0.83% NH_4Cl 按常规配制^[10]。

PBS 使用 “Dulbecos” 氏磷酸盐缓冲液^[11]。其他试剂均为 A·R 级,用灭菌注射用水配制。

二、方法

1. 淋巴细胞的分离 正常的和淋巴白血病人的淋巴细胞取自 14 例健康和 7 例病人的外周血,前者取血 10ml, 后者取血 2—3ml。新鲜血样用前文报道的 Ficoll-Hopaque 密度梯度离心法分离^[12], 用 PBS 洗 2 次后,悬浮成细胞浓度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 。

正常“615”小鼠的和淋巴白血病人小鼠(接种 L 7212 瘤种后约 7—10 天),取其脾淋巴细胞。即放血取出脾脏后,在 PBS 中匀浆,并经 Tris-HCl-0.83% NH_4Cl , 在 37°C 溶胀 5 分钟,以去除红细胞,再经 200 目尼龙网过滤,最后均匀悬浮于 PBS 中。细胞浓度为 $1-2 \times 10^7/\text{ml}$ 。操作均在 4°C 下进行。

2. 淋巴细胞的 DPH 荧光标记 按 Yanovis 等人的方法进行^[6], 并用荧光显微镜监测标记结果。

未标记的细胞悬液作参考样品。

3. DPH 及细胞的荧光强度测定 DPH 在 PBS 中,本身的荧光本底 $< 5\%$ (图 1)。

淋巴细胞在悬浮浓度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ (人)和 $1-2 \times 10^7/\text{ml}$ (鼠脾)时,其荧光本底分别 $< 5\%$ 和 $< 10\%$ (图 1)。

DPH 标记的细胞膜的荧光强度约 30 分钟后达到最高峰 (图 2)。

对 DPH 标记的淋巴细胞进行荧光显微镜观察证明,荧光反应仅出现在细胞外周膜的部分。

4. 荧光偏振度及细胞膜的流动度 用 RF-502 荧光分光光度计测定荧光偏振度。激发光

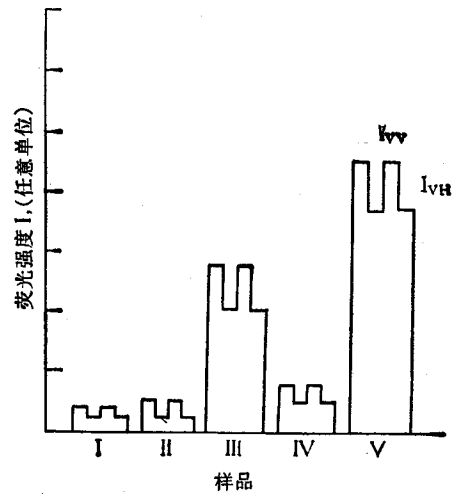


图 1 DPH 对淋巴细胞膜的标记

- (I) 测试溶液中只含 DPH
 - (II) 正常人外周血淋巴细胞 ($4 \times 10^6/\text{ml}$)
 - (III) 正常人外周血淋巴细胞 ($4 \times 10^6/\text{ml}$) 加 DPH
 - (IV) 小鼠脾脏淋巴细胞 ($1-2 \times 10^7/\text{ml}$)
 - (V) 小鼠脾脏淋巴细胞 ($1-2 \times 10^7/\text{ml}$) 加 DPH
- I_{VV} 凸起部分表示起偏振镜和检偏振镜均为垂直方向时的荧光强度
 I_{VH} 凹陷部分表示起偏振镜为垂直方向, 检偏振镜为水平方向时的荧光强度。

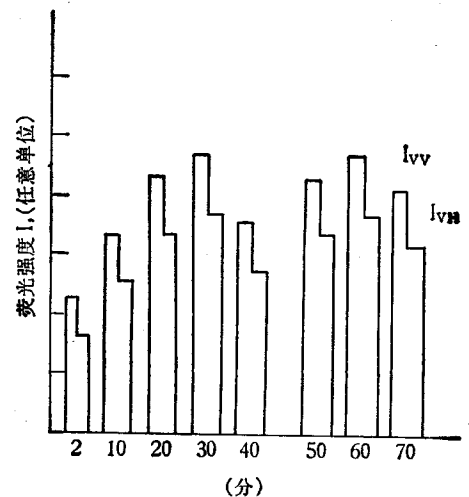


图 2 DPH 对正常人外周血淋巴细胞膜标记的时相反应 (I_{VV} 和 I_{VH} 的说明同图 1)

波长 393 nm, 发射光波长 430 nm, 光电倍增管负高压 800 伏, 激发光狭缝 19 nm, 荧光狭缝 7 nm, 记录仪灵敏度 100 mV。用恒温水浴控制测试温度。根据下列公式计算荧光偏振度(P):

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

I_{HH} 表示起偏振器和检偏振器均为水平方向时测出的荧光强度。 I_{VH} 表示起偏振器为垂直方向, 检偏振器为水平方向时测出的荧光强度。 G 为荧光单色器的校正因子。

细胞膜的流动度 (LFU) 根据 Einstein 硬粒子溶液粘度公式计算^[6]。

$$LFU = \frac{\frac{P_{max}}{P_r} - 1}{P_r}$$

P_r 和 P_{max} 分别代表荧光偏振度 (P) 的测量值和理论极限值 ($P_{max} = 0.5$), 当 $P_r = 0$ 时, LFU 为 ∞ , 当 $P_r = P_{max} = 0.5$ 时, $LFU = 0$, 即理论上荧光偏振度的上限值是 0.5, 下限值为 0。

以上荧光测定均在 25℃ 下进行。

5. PHA 和 CaBP 对膜流动性影响的测定 将人或实验动物的淋巴细胞 (分别为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 或 $1-2 \times 10^7/\text{ml}$) 按 v:v 为 10:1 之比, 加入 PHA (10:1) 或 CaBP (100r/ml), 于 37℃ 下保温 30 分钟后, 再按 1:1 (v:v), 分别加入 DPH, 然后同上置 25℃ 下保温 30 分钟, 用 PBS 洗 2 次后, 立即用于荧光偏振测定。

结果与讨论

正常人和淋巴白血病人的外周血淋巴细胞

膜的荧光偏振度 (P), 细胞膜的流动度 (LFU) 以及淋巴细胞在接受 PHA 和 CaBP 刺激后, 其 P 值和 LFU 的影响结果列于表 1。

由表 1 可见, 14 例正常人外周血淋巴细胞膜的平均荧光偏振度 $\bar{P} = 0.33 \pm 0.01$, 平均膜的流动度 $\bar{LFU} = 1.65$ 。经 PHA 刺激后, 膜的流动性有较明显的升高, 虽然增高的程度随不同血样有较大的变化 (116—271%), 但同一血样的对照与刺激组的流动性的差别则是明显的, 即 PHA 刺激后, LFU 均有升高。然而, 正常人淋巴细胞对 CaBP 刺激作用则表现出不甚敏感, 平均增高率仅为对照组的 109.6%。

由表中 7 例淋巴白血病人淋巴细胞膜的平均荧光偏振度 $\bar{P} = 0.26 \pm 0.03$, 平均膜的流动度 $\bar{LFU} = 3.77$, 比正常人淋巴细胞膜流动度增高二倍多 (228%), 但与正常人相反, 淋巴白血病人经 CaBP 刺激后, 膜的流动性有一定程度的升高, 平均增高率为 136%。但对 PHA 刺激作用表现不甚敏感 (或略有升高或略有降低, 见表 1)。

正常“615”小鼠和淋巴白血病人小鼠 (L7212) 脾淋巴细胞膜的荧光偏振度 (P), 细胞膜的流动度 (LFU), 以及淋巴细胞在接受 PHA 和 CaBP 刺激后, 对其 P 值和 LFU 的影响结果亦分别列于表 2。

由表 2 可见, 10 例正常 L“615”小鼠淋巴细胞膜的平均荧光偏振度 $\bar{P} = 0.18$, 平均膜的流动度 $\bar{LFU} = 11.42$ 。经 PHA 刺激后,

表 1 两种淋巴细胞膜的 P 和 LFU 的比较及其对 PHA 和 CaBP 刺激后的反应

样品来源	例数	DPH 标记 (对照)			PHA 刺激后			CaBP 刺激后		
		P 值	LFU	$LFU\%$	P 值	LFU	$LFU\%$	P 值	LFU	$LFU\%$
正常人	14	0.33 ± 0.01 (0.3— 0.35)	1.65 (1.19— 2.14)	100	0.26 ± 0.08 (0.2— 0.34)	3.33 (1.38— 7.91)	195.26 (116— 271)	0.33 ± 0.02 (0.3— 0.35)	1.72 (1.2— 2.2)	109.6 (101— 141)
淋巴细胞白血病患者	7 (急淋 5 例 慢淋 1 例 淋巴白血 病 1 例)	0.26 ± 0.03 (0.22— 0.30)	3.77 (2.33— 5.64)	100	0.28 (0.22— 0.29)	3.23 (2.33— 5.64)	86	0.21 (0.18— 0.28)	5.14 (2.7— 10.0)	136

注: 括号内数据为变动范围

表 2 两种小鼠脾脏淋巴细胞膜的 P 和 LFU 的测定比较及其对 PHA 和 CaBP 刺激后的反应

样品来源	例数	DPH 标 记 (对照)			PHA 刺 激 后			CaBP 刺 激 后		
		P 值	LFU	$LFU\%$	P 值	LFU	$LFU\%$	P 值	LFU	$LFU\%$
正常 L615 小鼠	10	0.18 (0.12—0.21)	11.42 (6.66—26.8)	100	0.15 (0.12—0.20)	16.96 (7.4—28.5)	160.6 (104—277)	0.18 (0.12—0.21)	11.9 (6.5—26.8)	101.6 (100—104)
淋巴白血 病小鼠 (L 7212)	10	0.15 (0.12—0.19)	16.0 (9.0—28.0)	100	0.15 (0.12—0.19)	16.0 (9.0—28.6)	102 (100—104)	0.15 (0.11—0.18)	17.8 (9.6—30.3)	112.5 (101—128)

注：括号内数据为变动范围

膜的流动性有一较明显的增高，平均增高率为 160.6%。但正常小鼠淋巴细胞对 CaBP 刺激作用则表现不敏感，平均变化率仅为对照组的 101.6%。

由表 2 十例淋巴白血病小鼠淋巴细胞膜的平均荧光偏振度 $\bar{P} = 0.15$ ，平均膜的流动度 $\overline{LFU} = 16.0$ ，比正常小鼠高 40%。而且与正常小鼠相反，经 CaBP 刺激后，淋巴白血病小鼠淋巴细胞膜的流动性有一定程度的升高，平均增高率为 112.5%。而淋巴细胞对 PHA 的刺激作用则表现不敏感，平均增高率仅为对照组的 102%。

由以上实验结果可见，除个别病例外，无论是人或实验小鼠，伴随着正常淋巴细胞的恶性转化，淋巴白血病的淋巴细胞膜表现出有更高的流动性，平均为正常对照细胞的 2.28 倍（人）和 1.4 倍（小鼠）。这和 Yanorish^[6] 等人报道 1.9 倍的结果（正常人 $LFU = 2.58 \pm 0.24$ ，白血病人 $\overline{LFU} = 5.03 \pm 0.56$ ）基本相似。这说明癌变后细胞膜流动性的增高，是癌细胞的特性之一。而 DPH 标记法有可能为研究与临床诊断提供一个较灵敏的手段。

以上结果还说明正常的淋巴细胞膜对 PHA 刺激有信息识别反应。表现为荧光偏振度（ P ）的下降和膜流动性（ LFU ）的增高，而对 CaBP 的刺激不敏感，即不能识别；但白血病的淋巴细胞则对 CaBP 刺激有识别反应，表现为 P 值的下降和膜流动性的增高。而相反对 PHA 刺激

不敏感，这一差别提示细胞癌变后，不但膜流动性有很大增高，而且其表面抗原成份和表面结构也有较大的变化。因而造成它们对不同的抗原刺激物有不同的识别反应。这一结果如果与我们前文^[8]报道的研究结果联系起来，则可以看出，细胞膜流动性和识别反应似与细胞浆内的结构（或功能）的相应变化有一定联系，说明抗原刺激物的信息的识别传递与膜流动性的改变有关。

据文献报道，细胞膜流动性的变化还与癌发展的阶段有关。当癌患者在缓解期时，其淋巴细胞膜的 P 值和 LFU 值可接近正常人的相应测定值。并且，在临床形态学诊断尚未发现有淋巴母细胞的骨髓或外周血淋巴细胞群体中，能测出 P 值下降和 LFU 值升高，而且也能从那些将要复发的完全缓解人的外周血淋巴细胞中测出了 P 值下降和 LFU 值的升高^[6]。这表明膜流动性的异常又能用于诊断并预告癌症的复发。因此，利用荧光偏振法测定正常与癌细胞膜流动性的变化及其和细胞浆内“结构性”（SCM）变化的相互联系，不仅对研究发癌机理、探索细胞膜与细胞内之间的信息传递有一定意义，而且对肿瘤早期诊断及疗效检查也提供了可利用的灵敏指标。本文仅是这一系统研究的初步结果，进一步的肯定结论尚有赖于更多病例临床验证和更深入的研究。

本工作承北京市人民医院，天津市河西医院，北京市输血站等单位太力支持，北京大学周继兰同学也参

加了部分实验工作,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 刘树森:《生物学参考资料(生物膜专集)》,第十三集,第69—91页,1981,科学出版社。
- [2] 刘树森:《动物学报》,23(4),380—399,1977。
- [3] Inbar, M. et al.: *FEBS Letters*, 38, 3, 1974。
- [4] Shinitzkg, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 85, 603—615, 1974。
- [5] Inbar, M. et al.: *Cancer Res.*, 37(9), 3037—3041, 1977。

- [6] Yanovich, S. et al.: *Cancer Res.*, 38(12), 4654—4661, 1978。
- [7] Cercek, L. et al.: *Br. J. Cancer*, 29, 345, 1974。
- [8] 董志伟、刘树森等:《生物物理与生物化学进展》(即将发表)。
- [9] Dickinson, J. P. et al.: *Br. J. Cancer*, 27, 99, 1973。
- [10] 吉永秀:日本免疫实验操作法Ⅲ, P. 692, 1973。
- [11] 韦美福等:《细胞生物学杂志》,3, 31—34, 1980。

[本文于1982年4月26日收到]

Ehrlich 腹水癌细胞表面负电荷与 ConA 受体分布的定量电子显微镜研究

樊景禹 卫之湄 刘 智

(北京医学院生物物理教研组)

一、引 言

细胞表面电荷在细胞分化^[1,2],细胞识别^[3],细胞间的粘附^[4,5],细胞吞噬^[6]以及正常细胞向肿瘤细胞的转化中起重要作用^[7-9]。研究的方法主要有细胞电泳和电镜下的标记。最初用胶体氢氧化铁作表面电荷标记物^[10],但它只能在pH 1.8的介质中使用,其结果难以代表生理条件下细胞表面的性质。1972年 Danon 等人提出用正电荷铁蛋白标记细胞表面负电荷的方法^[11],它可在生理 pH 下使用,因而可用来研究活细胞。现已用于某些正常细胞或肿瘤细胞表面电荷的分布与运动的研究^[4,7,8,12-15]。

细胞表面电荷主要是由末端含有唾液酸的糖蛋白产生的。同时,这些糖蛋白可构成某些抗原或受体,如植物凝集素受体;其中以刀豆球蛋白 A (ConA) 受体研究得比较深入。在电镜下研究 ConA 受体通常用铁蛋白或辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 ConA,但是铁蛋白与 ConA 的结合常会影响 ConA 的活性,而对过氧化物酶反应难以进行精确的定量分析。Geoghegan 等^[16]提出先用胶体金吸附过氧化物酶,再经亲和法与 ConA 结合,研究 ConA 受体的方法,

克服了上述困难。

鉴于细胞表面负电荷与植物凝集素受体间可能存在的联系,本文一方面用正电荷铁蛋白作为标记物,重新考察了 Ehrlich 腹水癌细胞(简称 EAT 细胞)表面负电荷的分布,另一方面,又用胶体金-过氧化物酶法分析了该细胞表面的 ConA 受体,并且首次在定量的基础上,对两者的分布进行比较研究。

二、材料与方法

正电荷铁蛋白 (Miles Yeda Ltd 产品) ConA (Pharmacia Fine Chemicals 产品),辣根过氧化物酶 (II 型 Sigma) 氯化金合盐酸和聚乙二醇(分子量 20,000, E. Merck 产品)。

1. 细胞表面电荷标记方法 取 EAT 细胞悬浮于 2ml PBS (pH 7.2—7.4) 中,离心 1 分钟 (1000 rpm),除去悬液中的蛋白质。上述过程重复一次。细胞用 0.2% 戊二醛(溶于 PBS 内)在室温下固定 10 分钟, PBS 洗两次,将最后一次离心所得细胞重新悬浮于 2ml PBS 中,使细胞数约为 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 。在细胞悬液中加入正电荷铁蛋白至所需浓度(分别为 0.2mg/ml 和 0.05 mg/ml),充分摇动 1 分钟,离心除去游离铁蛋