

正电荷铁蛋白在 Ehrlich 腹水癌细胞表面的重新分布

樊景禹 卫之涓 刘 智

(北京医学院生物物理教研组)

一、引言

某些配体与细胞表面受体结合后,会引起后者在细胞膜平面内的运动而重新分布,出现成簇、成斑以及成帽现象^[1,2]。研究这些现象对于认识细胞膜结构以及细胞膜成分的运动规律具有重要意义。

本文用正电荷铁蛋白作为标记物研究了 Ehrlich 腹水癌细胞(简称 EAT 细胞)表面的负电荷,并用测形学方法定量分析铁蛋白结合负电荷后在细胞表面的分布,以期了解正电荷铁蛋白作为一种非特异性多价配体,是否会引起细胞表面负电荷的再分布,以及这种再分布现象的特征。

二、材料和方法

1. 细胞的处理 按文献[6]方法制备成 EAT 细胞数约为 $2 \times 10^7/\text{ml}$ 的悬浮液后,加入正电荷铁蛋白(Miles Yeda Ltd.),至最终浓度为 $0.05\text{mg}/\text{ml}$ 在室温下充分摇动悬浮液 1 分钟,离心除去游离铁蛋白。沉淀的细胞用 PBS 洗两次,最后悬浮于 2ml PBS 内。在 37°C 下分别温育 1, 5 和 30 分钟后,离心除去上清,在沉降的细胞内加入 3% 戊二醛 (0.1MPBS) 固定 1 小时。然后按文献[6]方法作电镜观察前处理。

2. 资料的搜集与分析 同文献[6]。求得每一温育时间点细胞表面 M 区与 N 区铁蛋白颗粒密度之比以及整个细胞表面铁蛋白颗粒的相对密度。

三、结果

1. EAT 细胞的形态学特征 图 1(封 2)

是低倍放大下的 EAT 细胞。细胞核大略呈椭圆。胞浆内散在中等数量的线粒体和少量粗面内质网。游离的核糖体充满整个胞浆。细胞周围可见胞浆突起和长短不等的微绒毛突出于细胞表面。微绒毛平均直径为 120nm ^[6], 其中除微丝外不含其它有形成份。微绒毛一般随机分布于细胞周围,但即使在用戊二醛预固定的细胞中亦可偶见少数细胞的微绒毛集中于细胞之一端。

2. 铁蛋白颗粒的聚集 图 1 显示了细胞表面的成簇的铁蛋白颗粒,在高倍放大下,大小不等(图 2 见封 2)。按铁蛋白簇中颗粒多少分为三组,即: $a = 1-5$ 颗粒/簇, $b = 6-10$ 颗粒/簇, $c > 10$ 颗粒/簇。在温育的每一时间点,检查 200 个颗粒簇,并计算三组颗粒簇的百分比。图 3 表示了 EAT 细胞表面的负电荷与正电荷铁蛋白结合后逐渐聚集成较大的簇的过程。

3. 铁蛋白颗粒分布的变化 在三个时间点,细胞表面的 M 区和 N 区都可看到铁蛋白颗粒,但分布似有不同(图 2a, b, c, 见封 2)。温育 1 分钟时,铁蛋白颗粒选择性结合于微绒毛

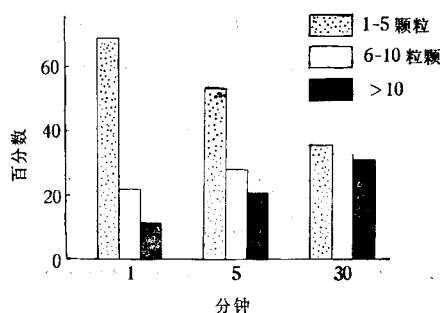


图 3 温育不同时间下细胞表面铁蛋白簇大小分布的变化

表面, M 区的颗粒密度较 N 区高 50% 以上。随温育时间延长, M 区的颗粒密度迅速下降, 在 5

分钟时已略低于N区的颗粒密度,而在30分钟时,M区的颗粒密度仅为N区的30%左右(图4)。当细胞与铁蛋白温育5分钟时(图2b)在高倍的电镜下可以看到M与N区的交界处有成簇的铁蛋白颗粒,说明,温育开始时,EAT细胞表面的负电荷选择性分布于微绒毛表面。与正电荷铁蛋白结合后,负电荷从M区向N区迁移,导致两区标记物密度之比的倒置。

4. 细胞表面铁蛋白颗粒密度的变化 根据每张照片上结合于细胞表面的铁蛋白颗粒数及细胞表面的相对面积,可以计算出在不同温育时间下细胞表面铁蛋白的相对标记密度(图4)。可以看到,细胞表面的铁蛋白颗粒密度随温育时间而下降,而在温育开始时尤为显著。细胞表面标记物的丢失可能是:①经胞饮作用进入细胞或脱落于周围介质中;②在EAT细胞的胞浆内很少看到含有铁蛋白的吞饮囊泡或溶酶体结构。相反,在细胞周围却常能看到成团的铁蛋白颗粒游离于介质中(图2c)。因此,十分可能,在本实验条件下,细胞表面成份的丢失主要通过脱落。

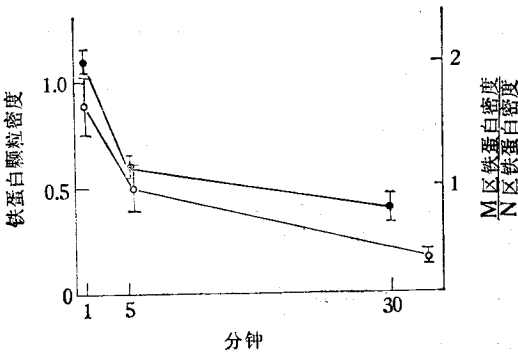


图4 铁蛋白颗粒的相对密度及其在细胞表面M区与N区密度之比随温育时间的变化

5. 铁蛋白颗粒的成帽 随温育时间延长,结合于细胞表面的铁蛋白颗粒逐渐聚集于细胞一端——成帽。图5、6(见封2)表示成帽的过程。某些细胞在成帽端常出现胞浆突起(图6见封2)。EAT细胞表面负电荷在正电荷铁蛋白作用下的成帽特点是,成帽部位多在细胞核所在一侧,而高尔基体和其它细胞器则集中于成帽部位的对侧。如果把超薄切片上铁蛋白集

中于细胞表面的二分之一以内定义为成帽(图5见封2),计算在不同温育时间下成帽细胞的百分比,发现,成帽细胞数随温育时间而成正比增加(图7)。

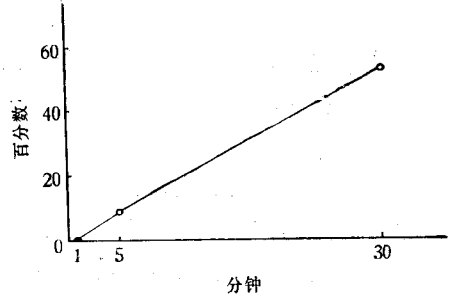


图7 成帽细胞百分数随时间的变化

四、讨 论

1. 成帽 自从Taylor等人的工作^[1]发表以来,对淋巴细胞,上皮细胞和成纤维细胞的成帽现象进行了广泛的研究。1980年Butman等人首次报告,正电荷铁蛋白在淋巴细胞上可引起成帽现象^[7]。本文报告了这种非特异性多价配体引起成帽现象的又一个例子。

关于成帽现象的解释有两种:①多价配体可使细胞膜受体交联,这些受体是细胞膜的固有蛋白,它们穿过脂双层,一端暴露于细胞外表面,另一端暴露于细胞膜的胞浆侧。配体与受体的结合(可能经过由这种结合而产生的交联)以某种方式激活了受体,使其与胞浆中的收缩成分偶联起来。这些胞浆成份的收缩牵动受体在膜平面内运动到细胞一极,这就是成帽^[8]。②一个运动细胞的细胞膜成份在定向的连续的流动过程中,在细胞的一极解体(主要通过胞饮作用),而在细胞的另一极重新组装起来。配体-受体复合物正是在这种细胞膜成分的流动中被驱向细胞的一极,从而成帽^[9-12]。本文的结果似乎支持后一种理论。因为动物细胞产生细胞表面负电荷的主要成分是糖基末端,特别是唾液酸^[13]。这些糖基可能构成糖蛋白的一部分,亦可构成糖脂的一部分。此外,磷脂也对表面负电荷有所贡献^[14],因此正电荷铁蛋白可以结

合于细胞膜的蛋白质,也可结合于脂类。值得注意的是产生负电荷的这些脂类分子仅仅参与构成质膜脂双层的外叶,它们并不穿过脂双层,因此没有可能与胞浆内的细胞骨架发生偶联。如果按第一种理论,正电荷铁蛋白与细胞表面结合后,将不会发生所有铁蛋白颗粒向细胞一极聚集的成帽现象,因为那些与脂类分子结合的铁蛋白颗粒将因与胞浆收缩成分没有联系而继续散在细胞表面。

细胞膜成分的定向流动假说并不排除胞浆收缩成分可能起的作用。事实上,十分可能是配体与受体的结合以某种方式(比如通过第二信使)激活了细胞的收缩成分,从而使细胞从静止状态转变为运动状态。这反映在细胞膜上,就是细胞膜成分开始向细胞一极定向流动。

2. 铁蛋白颗粒从微绒毛表面向非微绒毛区的迁移 Grunnell 等发现,当幼鼠肾细胞与正电荷铁蛋白一起温育时,铁蛋白开始选择性结合于微绒毛表面,但在 37℃ 下温育几秒钟后,即行消失,提示标记物从微绒毛表面移向非微绒毛质膜区^[15]。我们在研究 ¹²⁵I-胰岛素与 3T3-L1 脂肪细胞相互作用时亦证明,标记物在温育开始时选择性结合于微绒毛;随温育时间延长,这种选择性结合消失^[16]。上面的发现与本文结果表明,配体受体复合物从微绒毛区向非微绒毛区的迁移可能具有普遍意义。值得指出的是,这种迁移过程与标记物在某些细胞伪足上的运动有类似处。在培养的上皮细胞^[17]、成纤维细胞^[18]以及精母细胞瘤上进行的研究表明,标记物在这些细胞的伪足或前导板上均可发生移动。其共同特点是(1)运动是向心的,从这些结构的顶端向着基底部(即向着细胞体)运动;(2)标记物的定向迁移局限于运动结构本身。此外,Roberts 等还证明,在精母细胞伪足的顶端,新的细胞膜成分迅速而不断地渗入到细胞膜结构中去,因而认为,标记物在伪足上的向心性运动是伪足上细胞膜成分的定向流动造成的^[12]。标记物从微绒毛向非微绒毛表面的迁移也是一

种向心性运动。这可能是细胞膜从微绒毛顶端向基底定向流动的结果。这就是说,细胞膜成分的定向流动可能存在两种形式:在整个细胞静止时,流动从微绒毛端部向着基底,这时,微绒毛顶端是新的细胞膜成分渗入到细胞膜的部位;在整个细胞运动时,定向流动是从细胞的一极到另一极,这时,新细胞膜组装的部位是细胞的一端(帽的对侧)。配体与受体的结合可能促使细胞从静止状态转变为运动状态,而微丝微管则可能以某种方式参与这一转变过程。上述假设是否正确有待进一步证明。

参 考 文 献

- [1] Taylor, R. B. et al.: *Nature New Biol.*, **233**, 225, 1971.
- [2] Shriener, G. F. et al.: *Adv. Immunol.*, **24**, 37, 1976.
- [3] Gasie, G. T. et al.: *Lab. Inverst.*, **18**, 63, 1968.
- [4] Danon, et al.: *J. Ultrastr. Res.*, **38**, 500, 1972.
- [5] Williams, M. A. et al.: in *Practical Methods in Electron Microscopy* (Glauert, A. M. Ed.) Vol. 6. Part 2, North-Holland Publishing Company, 1977. p. 41.
- [6] 樊景禹: 待发表。
- [7] Butman, B. T. et al.: *J. Cell Physiol.*, **105**, 7, 1980.
- [8] Bourguignon, L. Y. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5031, 1977.
- [9] Abercrombie, M. et al.: *Exp. Cell Res.*, **62**, 389, 1970.
- [10] Bray, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **65**, 905, 1970.
- [11] Harris, A. K.: *Nature (London)*, **263**, 781, 1976.
- [12] Roberts, T. M. et al.: *J. Cell Biol.*, **92**, 132, 1982.
- [13] Langley, O. K. et al.: *Biochem. J.*, **102**, 367, 1976.
- [14] Walker, D. G.: *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 255, 1981.
- [15] Burry, R. W. et al.: *J. Cell Biol.*, **82**, 726, 1979.
- [16] Grunnell, F. et al.: *J. Cell Biol.*, **66**, 470, 1975.
- [17] 樊景禹: 《生理科学》, 1982年, 第2期, 23页
- [18] Dipasquale, A.: *Exp. Cell Res.*, **94**, 191, 1975.
- [19] Harris, A. K. et al.: *Exp. Cell Res.*, **73**, 519, 1972.
- [20] Isenberg, G. et al.: *Exp. Cell Res.*, **121**, 406, 1979.

[本文于1982年10月6日收到]

“正电荷铁蛋白在 Ehrlich 腹水癌细胞表面的重新分布”一文的图

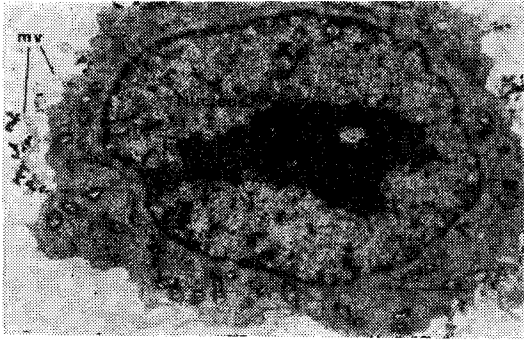


图 1 Ehrlich 腹水癌细胞的一般形态学特征

细胞与 0.05mg/ml 正电荷铁蛋白在 37°C 下温育 1 分钟。铁蛋白颗粒随机分布于细胞表面。标尺: 1 μ m

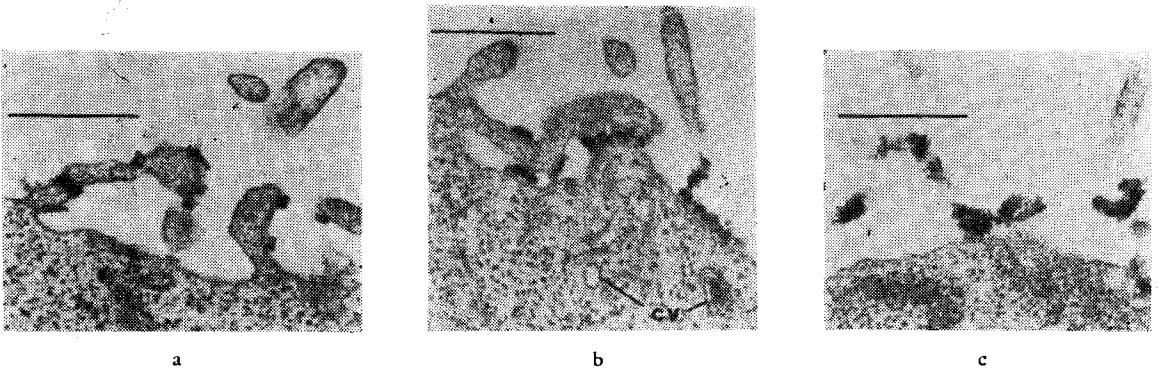


图 2 温育不同时长铁蛋白颗粒在细胞表面的分布

a: 37°C 下温育 1 分钟, 标记物选择性分布于微绒毛; b: 37°C 下温育 5 分钟, 铁蛋白在微绒毛上的选择性分布降低。CV 为含铁蛋白颗粒的覆衣囊泡; c: 37°C 下温育 30 分钟, 成簇的标记物位于非微绒区表面, 细胞周围可见游离的铁蛋白簇。标尺: 0.5 μ m

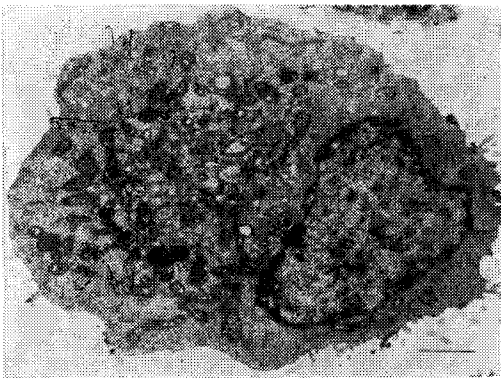


图 5 铁蛋白颗粒成帽过程之一

颗粒集中于细胞表面二分之一范围内, 标尺: 1 μ m

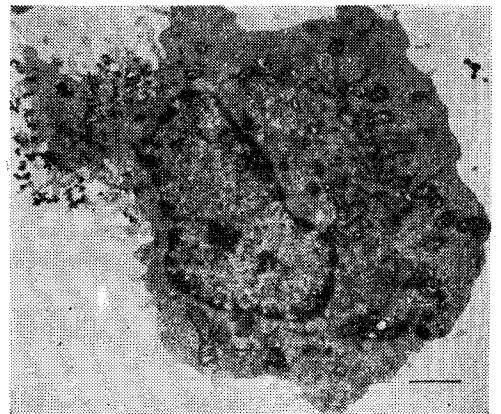


图 6 铁蛋白颗粒的成帽过程之二

在成帽的一极常有胞质突起, 标尺: 1 μ m