

分子筛分离不同年龄红细胞膜*

唐传业 郑集

(南京大学生物系生化教研室)

制备红细胞膜,一般使细胞低渗溶血,然后低温超速离心分离。至于分离不同年龄的红细胞膜,则根据细胞比重的差异,先在适当介质中超速离心,然后将离心沉降的细胞分层取样,得到不同年龄的红细胞,再分别低渗溶血、低温超速离心以得到不同年龄的膜。最近,Fröman, G 等^[1]报道用分子筛琼脂糖凝胶成功地分离了红细胞膜。本实验对此法做了进一步研究,并利用此法分离了不同年龄的红细胞膜,我们证实,分子筛法与超离心法分离的膜在某些酶活性方面基本上是一致的。电子显微镜的研究还表明,用此法分离的膜在结构上存在着年龄差异。

一、方法和材料

1. 制备红细胞膜的一般过程 在盛有肝素或柠檬酸葡萄糖的容器中,收集健康人的新鲜血,用 310 imosM^{**}, pH7.4 的 Tris-HCl 洗三次,每次均于 $900 \times g$ 4℃ 离心十分钟,小心地将血浆和血块黄层 (Buffy coat) 吸去,洗好后的红细胞,用含有 2mM EDTA 的 20 imosM, pH7.4 的相同缓冲液溶血,上分子筛凝胶柱,用同样的低渗缓冲液洗脱,通过紫外吸收分析仪记录洗脱曲线,并用自动分部收集器收集。将无血红蛋白的高峰组分合并,于 $3000 \times g$ 4℃ 离心 20 分钟,即可得白色的红细胞膜制剂。

2. 不同年龄红细胞膜的分离 分三步进行: (1) 根据不同年龄红细胞的抗低渗能力不同,我们参照了前人^[2]的记载,找出使不同年龄红细胞溶血的低渗梯度溶液。具体做法是:取洗过的红细胞 0.5 ml, 分别置于 5ml pH7.4 并含有 2mM EDTA 的不同浓度的低渗 Tris-HCl

缓冲液中混匀,室温放置十分钟使溶血,于 $900 \times g$ 4℃ 离心十分钟,使溶血物和未溶血的红细胞分开,并测定各个梯度溶血物中的血红蛋白^[3]含量。以 0.5ml 红细胞在 5ml 20imosM 低渗溶液内完全溶血时的血红蛋白量,除每种梯度溶血物的血红蛋白量,即可求得各个低渗溶液中已被溶血的红细胞百分数。从这些溶血百分数中,可得到一定范围浓度的低渗缓冲液作为分离不同年龄红细胞的梯度溶液。

(2) 制取不同年龄红细胞的溶血物。将洗过的红细胞依次由高浓度到低浓度通过选定的梯度溶液。每通过一个梯度都用该梯度溶液洗两次,并按上法收集溶血物。合并溶血物和洗脱液,即可得到红细胞通过某梯度溶液时的溶血物,未溶血的红细胞又通过下一个梯度溶液,以制备下一个梯度的溶血物,按此进行就可分别得到不同梯度低渗溶液的溶血物,也即不同年龄红细胞的溶血物。

(3) 将上述溶血物分别上分子筛凝胶柱,按制备红细胞膜的一般过程进行操作,便能得到不同年龄的红细胞膜。

3. 红细胞膜的酶活性测定及电镜观察 分别测定了乙酰胆碱酯酶^[4]、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ATPase^[5]、和 Na^{+} 、 K^{+} ATPase^[6] 的活性,按 Lowry^[7] 测定膜蛋白。并将膜用戊二醛、锇酸固定, Epon 812 包埋, LKB 超薄切片机切片和 Philips EM400 型电镜照相。

试剂来源: ATP 二钠盐、上海东风厂产品; 氯化硫代乙酰胆碱, 上海试剂厂产品;

* 李世民, 和王艳林参加部分实验工作。

** imosM 系 ideal milliosmolarity 的缩写 1mM 约为 2imosM。

DTNB, 生化所周元聪先生惠赠, Sepharose 4B、Sephadex G-100, Pharmacia 产品; 皂素 Fluka 产品经 Dowex 50W $\times 8$ 去 Ca^{2+} 纯化; 乌本苷, Merck 产品; EGTA, Sigma 产品; Epon 812, 日本和光纯菜产品。其余试剂均为 A.R. 纯。

二、结 果

1. 葡聚糖和琼脂糖凝胶分离效果的比较

我们选择了排阻限度 (exclusion limit) 相当的葡聚糖 Sephadex G-100 和琼脂糖 Sepharose 4B, 将红细胞溶血物分别上柱以制取膜。图 1 是洗脱曲线。可以看出两种凝胶相比, Sepharose 4B 较好, 但使用 Sephadex G-100 时, 只要适当减少上样量, 也可达到分离膜的目的。表 1 说明两种凝胶介质制取的膜所测得的酶活性极为接近。

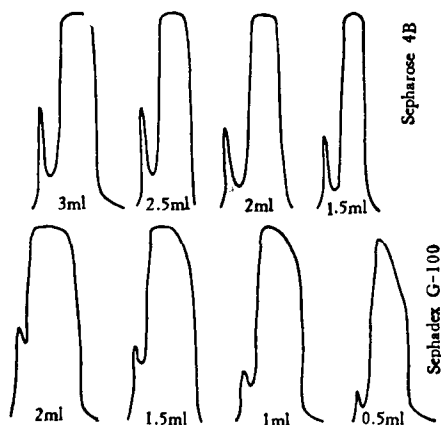


图 1 Sepharose 4B 和 Sephadex G-100 分离红细胞膜的洗脱曲线

柱体 $22 \times 1.5\text{cm}$, 流速 0.25 ml/分 。洗脱液, Tris-HCl pH7.4, 20mM 每个曲线小峰为膜, 大峰为血红蛋白, 曲线下部注有上样量 ml 数。

表 1 两种凝胶分离膜的酶活性比较

	Sepharose 4B	Sephadex G-100
乙酰胆碱酯酶 (μM 底物/分/mg 蛋白)	85	80
$\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPase}$ ($\mu\text{M Pi}/2$ 小时/mg 蛋白)	2.7	2.6
$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ ($\mu\text{M Pi}/2$ 小时/mg 蛋白)	4.3	3.7

2. 分子筛法和超离心法的比较 由于 Sepharose 4B 分离膜的效果较好, 我们比较了它与超离心法^[8]所分离的膜的酶活性, 结果见表 2

表 2 两种方法分离的膜的酶活性比较

	超离心法	分子筛法
乙酰胆碱酯酶 (μM 底物/分/mg 蛋白)	164	185
$\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPase}$ ($\mu\text{M Pi}/2$ 小时/mg 蛋白)	0.26	0.28
$\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ ($\mu\text{M Pi}/2$ 小时/mg 蛋白)	1.20	1.30

据报道^[5] 低钙环境可最大地表现出胞浆中调钙蛋白 (Calmodulin) 对 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ 的激活作用, 为此我们曾用低浓度的 EGTA 和 CaCl_2 分别测定超离心法和分子筛法分离的酶活性, 发现两法所制得的膜, 其 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ 被调钙蛋白的激活作用无明显差异 (见图 2)。

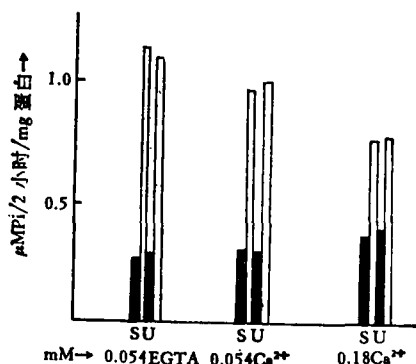


图 2 分子筛法 (S)、超离心法 (U) 分离的膜的 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ 在不同浓度钙离子介质中被调钙蛋白激活的比较

■ 表示未激活时的、□ 表示被调钙蛋白激活时的酶活性

3. 分子筛法和超离心法分离不同年龄红细胞膜的比较 为了排除个体差异 (见表 1 和表 2 中相应酶活性数值), 由同一人提供的鲜血液, 经等渗缓冲液洗后, 分别用超离心法^[9] 和分子筛法分离不同年龄的红细胞膜, 并测定其酶活性, 结果见表 3。可以看出, 不论用哪种方法分离的红细胞膜, 其乙酰胆碱酯酶、 $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ 的活性、均有随年龄增长而下降的趋势。但 $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ 受溶血物中调钙蛋白的激活百分数, 则

表3 分子筛法、超离心法分离的不同年龄红细胞膜的酶活性

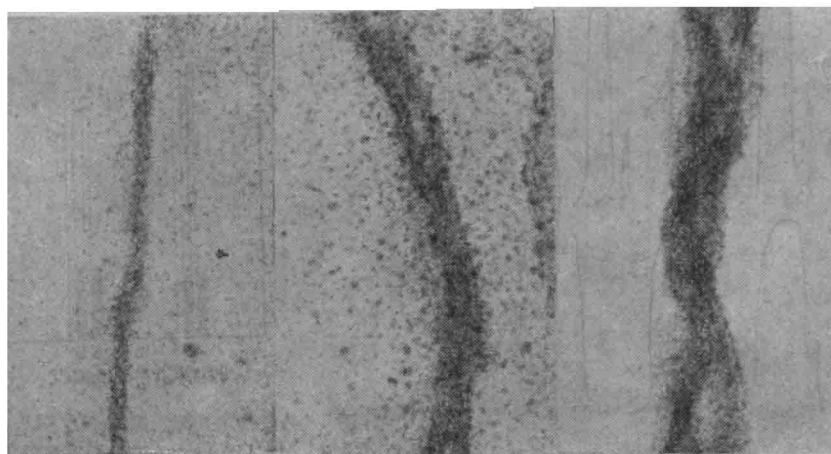
	分子筛法			超离心法		
	青	中	老	青	中	老
乙酰胆碱酯酶 (μM 底物/分/mg 蛋白)	192.9	189.8	151.2	173.5	161.5	154.6
Na^+ 、 K^+ ATPase ($\mu\text{M}\text{Pi}/2$ 小时/mg 蛋白)	0.76	0.47	0.29	0.66	0.64	0.52
Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ATPase $\mu\text{M}\text{Pi}/2$ 小时/mg 蛋白 未激活	0.37	0.22	0.21	0.23	0.71	0.11
Calmodulin 激活	2.04	1.52	1.51	1.02	1.00	0.99
激活 %	551	690	719	443	588	900

说明: 表中的青、中、老系指两种方法分离的不同年龄红细胞膜, 青、老各占 $20 \pm 5\%$, 中占 $60 \pm 5\%$, 测定 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ATPase 时, 系用 0.045mM EGTA 造成的低钙介质。

随年龄增长而增加。

4. 分子筛分离的不同年龄红细胞膜的电镜观察 用 imosM 分别为 140、120、和 20 的低渗梯度缓冲液, 制得老、中、青红细胞膜, 并

分别制成电镜照片。这些照片(图3)表明, 分子筛分离的各种年龄红细胞膜, 均可看到清晰的膜双层结构, 但老年膜不如青年膜致密, 整齐。



老 中 青

图3 不同年龄红细胞膜的电镜照片

放大 28 万倍。膜双层结构清晰可辨, 背景的颗粒, 斑点系 Epon 812 包埋剂不均匀所致。

三、讨 论

用分子筛分离红细胞膜具有设备简单, 便于操作的特点。用 SephadexG-100 分离红细胞膜时, 只要适当控制上样量, 也可达到与用 Sepharose 4B 同样的效果(图1, 表1)。

目前公认, 乙酰胆碱酯酶, Na^+ 、 K^+ ATPase 和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ATPase 是红细胞膜上膜蛋白的重要组成部分。这些酶活性往往可反映出膜的

结构和功能的状况, 特别是两种 ATPase, 它们分别承担细胞的 Na^+ 、 K^+ 泵和 Ca^{2+} 泵的作用, 这两种酶活性的年龄改变, 有过相互矛盾的报道。自从采用皂素溶解膜后^[6], 这两种 ATPase 活性随红细胞的年龄增长而下降的现象才得到确证。但他们是用超离心法分离膜。本实验用分子筛法分离的膜, 同样证实了皂素溶解膜的有效性。所测得的酶活性随年龄增长而下降的趋势和超离心法的结果是一致的。电

子显微镜的研究还说明,膜双层结构随年龄发生着变化。看来,这种变化和膜上酶活性的年龄改变存在一定联系。

很早就有人报道^[10]、不同年龄红细胞抗低渗的能力不同,认为可作为分离不同年龄红细胞的基础。以后由于超速离心技术的发展,人们大都把注意力集中到按比重差异来分离不同年龄的红细胞以制备膜。但离心法设备昂贵,往往耗时过长。分子筛方法却可有效而简便地利用抗低渗能力的差异这个特点而分离不同年龄的红细胞膜。

Luthra 等最近报道^[5],红细胞膜可能存在三种不同形式的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ATPase,其中只有两种能与胞浆中调钙蛋白结合而被激活,这两种形式的酶表现出最大活性的钙离子浓度是不同的,一为低钙浓度、一为中等钙浓度。随着红细胞衰老,可能由于丧失了低钙浓度表现出最大活性的 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} ATPase,使得酶活性随年龄而下降,但调钙蛋白的激活百分数却随年龄增加^[11],本实验结果说明,分子筛和超离心法一样都证实了这一事实(表3),这就进一步

说明两种方法分离的膜具有相同性质。

因此我们认为分子筛分离红细胞膜不仅简易可行,而且还可用来分离不同年龄的红细胞膜。

本文电镜样品的包埋由王浩副教授协助进行,照片、图版由张德宁、岳江和王竟成等同志制备,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Fröman, G. et al.: *Prep. Biochem.*, **10**, 59, 1980.
- [2] Fornaini, G.: *Eur. J. Biochem.*, **7**, 214, 1969.
- [3] Kachmar, S. F.: in *Foundamentals of Clin. Chem.*, (Tietz, N. ed) 268, 1970.
- [4] Ellman, G. D. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88, 1961.
- [5] Luthra, M. G. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **600**, 467, 1980.
- [6] Hanahan, D. J. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**(1), 170, 1978.
- [7] Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.*, **191**, 265, 1951.
- [8] Hanahan, D. J. et al.: *Methods in Enzymol.*, **31**, 168, 1974.
- [9] Murphy, J. H.: *J. Clin. Med.*, **82**, 334, 1975.
- [10] Mark, P. A. et al.: *J. Clin. Invest.*, **37**(11), 1542, 1959.
- [11] Luthra, M. C. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **600**, 480, 1980.

[本文于1983年5月11日收到]

L₇₈₁₁ 白血病细胞质膜的分离和鉴定

甘午君 温世鼎 褚建新 覃 智 刘扬椅 叶淑琴

(中国医学科学院血液学研究所)

近年来,许多研究表明细胞表面的变化对恶性肿瘤的发生起着重要的作用。在癌变过程中,细胞组分及酶系统的变化,反映在细胞膜的性质和抗原的改变最后导致细胞“接触抑制”的丧失及分化增殖异常。因此分离和鉴定细胞膜恶性标志物,可为探讨癌变机理提出一些线索;为临床诊断和治疗寻找新的途径;并可为生物膜分子生物学的研究提供资料和依据。

本文用小鼠腹水型 L₇₈₁₁ 白血病细胞为材料,以冻溶及蔗糖分级梯度离心法分离质膜,并对其 5'-核苷酸酶等膜结合酶的活性,膜蛋白组

分,胆固醇/磷脂克分子比以及磷脂类型等进行分析测定。结果显示一定的肿瘤细胞生化特征,其中有的变化可能是肿瘤细胞膜有关的标志物。

一 材 料 和 方 法

1. 质膜的分离

(1) 分离 L₇₈₁₁ 白血病细胞 采用近交系 615 小鼠接种 L₇₈₁₁ 白血病细胞,8天后取腹水,经 3000rpm 低温离心 15 分钟,分离细胞,用 0.15MNaCl 洗涤三次,含有少量红细胞用 0.05