

water solution at lower temperature. If the side chains are removed by periodate oxidation, the proportion of multiple-helical conformation will increase. The helical conformation

changes into disorder coil in acid, base, and at slightly higher temperature.

Key words schizophyllan, configuration, conformation

神经节苷脂 GM₃ 对 J6-2 细胞蛋白质磷酸化的影响*

董 征 马克里 韩 锐** 崔肇春

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116023)

摘要 通过研究神经节苷脂 GM₃ 对国人单核样白血病细胞系 J6-2 细胞蛋白质磷酸化的影响, 在 [γ -³²P] ATP, GM₃, ATP, Mg²⁺ 与 J6-2 细胞液及颗粒两部分共同反应, 10min (30℃) 体系中, 观察到 GM₃ 对两部分蛋白质磷酸化的调节作用. GM₃ (100 μmol/L) 促进颗粒部分分子量为 180 000, 87 000, 78 000, 67 000, 43 000 及 31 000 的蛋白质磷酸化, 促进胞液部分分子量为 87 000 及 56 000 的蛋白质磷酸化, 而且能抑制 70 000 及 43 000 蛋白质磷酸化. 由于 GM₃ 已被前人证实能对 J6-2 细胞起分化作用, 其作用时间长达 4—6d, 很可能 GM₃ 对蛋白质磷酸化作用的调节是 GM₃ 促分化作用的早期信号.

关键词 神经节苷脂 (GM₃), 白血病细胞, 蛋白质磷酸化

神经节苷脂 (ganglioside, Gls) 广泛存在于各种脊椎动物细胞质膜的外侧面. 它不仅是细胞膜的构件单位, 而且可能在细胞的物质代谢、分化、增殖及肿瘤发生方面担任重要角色^[1]. Gls 对白血病细胞系促分化前后形态、功能、组织化学方面以及某些生化指标已有所报导^[2], 但对其促分化的机制仍属未知. 由于 Gls 对蛋白激酶 C 作用的影响, 以及蛋白激酶 C 在信息传递中的重要作用, 有理由进一步探讨 GM₃ 对蛋白质磷酸化作用的影响, 尤其还应找出有磷酸化变化的蛋白质, 为进一步探讨 GM₃ 对蛋白质的生物学功能的影响奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

单核样白血病细胞系 J6-2 细胞 (中国医学科学院天津血液病研究所), 新生小牛血清 (大连旅顺龙头检验试剂厂), RPMI 1640 培养基 (美国 GIBCO 公司), [γ -³²P] ATP (北京福瑞

生物工程公司), GM₃ 为自行提取纯化^[3] (层析纯).

1.2 方法

1.2.1 J6-2 细胞培养 用含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 37℃, 5% CO₂ 孵育箱中培养.

1.2.2 J6-2 细胞胞液及颗粒部分的制备^[4]

收集对数生长期 J6-2 细胞, 用冷 PBS 洗两遍, 再用冷提取缓冲液 (β -glycerophosphate 80mmol/L; EGTA 20mmol/L; MgCl₂ 15mmol/L; Na₃VO₄ 1mmol/L; NaF 10mmol/L; PMSF 1mmol/L; pH 7.6) 洗两遍. 匀浆液以 1000r/min 离心 10min, 去掉沉淀, 上清液以 100 000g 离心 1h, 上清液作为胞液部分, 沉淀溶解在含 0.1% Triton-X100 的提取缓冲液中, 作为颗粒部分. 用 Hartree 氏法^[5]测定各部分

* 国家自然科学基金资助项目.

** 大连医科大学附属二院.

收稿日期: 1994-01-07, 修回日期: 1994-07-11

蛋白质浓度。

1.2.3 蛋白质磷酸化 反应体系:总体积 50 μ l, 内含 25 μ l 样品液(样品蛋白浓度 2—6 g/L), 5 μ l GM_3 , 加入 20 μ l 缓冲液(100mmol/L Tris-HCl pH7.6, 25mmol/L MgCl_2 , 1.25mmol/L ATP, 4—5 μ Ci $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP), 反应液于 30℃ 培养 10min, 加入等体积 50 μ l 电泳样品缓冲液, 100℃ 处理 3min, 终止反应。样品进行 SDS-PAGE, 然后进行放射自显影。

1.2.4 SDS-PAGE 按文献 [6] 进行、考马斯亮蓝法染色时, 蛋白质上样量为 100 μ g/上样孔; 银染时^[7], 上样量为 15 μ g/上样孔。

1.2.5 放射自显影 按常规进行, 在凝胶与感光胶片之间放一保鲜薄膜, 磷酸化的条带由 X 光感光胶片上曝光的条带所显示。

2 结 果

2.1 GM_3 对 J6-2 细胞蛋白质成分的影响

SDS-PAGE 结果显示, GM_3 对 J6-2 细胞颗粒及胞液部分的蛋白质组分在电泳中没有观

察到明显质和量的差别, 没有出现特异性蛋白条带(图 1)。

2.2 GM_3 对 J6-2 细胞颗粒部分蛋白质磷酸化的影响

结果显示, 在 GM_3 , $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, Mg^{2+} 同颗粒部分共同反应 10min (30℃) 条件下, GM_3 能明显促进相对分子量分别为 180 000, 87 000, 78 000, 67 000, 43 000 及 31 000 的蛋

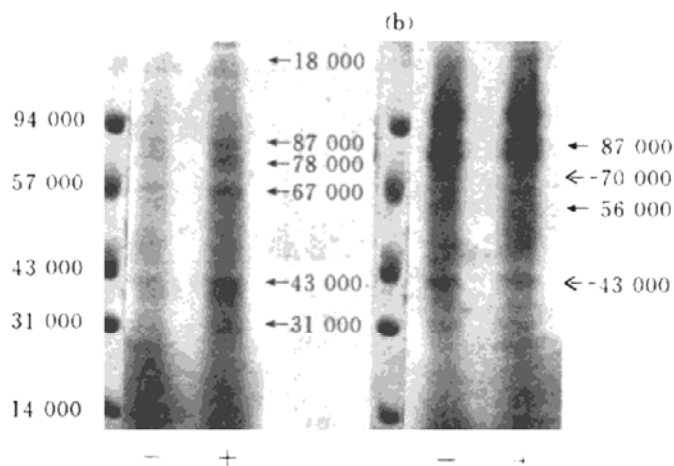


图 2 GM_3 (100 μ mol/L) 对 J6-2 细胞蛋白质磷酸化影响的放射自显影图谱

(a) 颗粒部分; (b) 胞液部分, 实线箭头表示磷酸化程度增加; 虚线箭头表示磷酸化程度减弱。

表 1 GM_3 对 J6-2 细胞蛋白质磷酸化的影响

GM ₃ 引起的蛋白质 磷酸化变化 (Mr)	放射自显影扫描面积		GM ₃ /对照组
	对照组	GM ₃ 处理组	
颗粒部分			
180 000	62.5	136.5	2.5 (+) ¹⁾
87 000	144.3	384.6	2.7 (+)
78 000	152.0	768.4	5.1 (+)
67 000	279.9	381.5	1.4 (+)
43 000	360.1	549.9	1.5 (+)
31 000	80.8	140.7	1.7 (+)
胞液部分			
87 000	179.6	324.3	1.8 (+)
70 000	18.6	7.0	0.4 (-) ²⁾
56 000	43.7	112.4	2.6 (+)
43 000	228.2	212.5	0.9 (-)

¹⁾ 代表磷酸化程度增加, ²⁾ 代表磷酸化程度减弱。

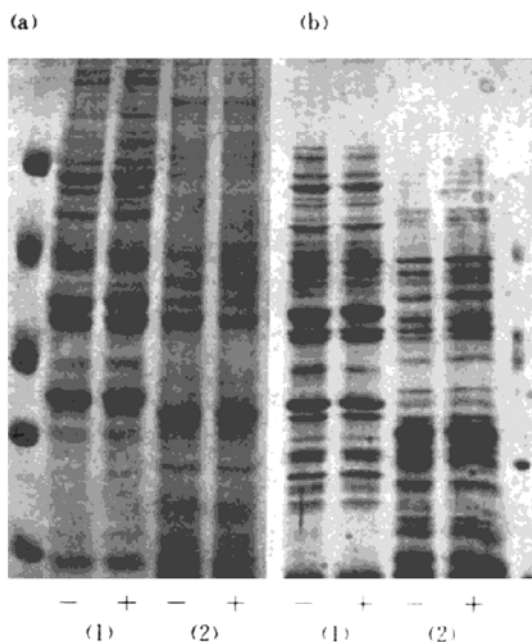


图 1 GM_3 (100 μ mol/L) 对 J6-2 细胞胞液 (1) 和颗粒部分 (2) 蛋白质组分的影响

(a) 考马斯亮蓝染色, 蛋白上样量 100 μ g/上样孔; (b) 银染法, 蛋白上样量 15 μ g/上样孔, “-”表示对照组; “+”表示实验组。

白质磷酸化程度(图2). 从放射自显影密度扫描(图3)和表1可见GM₃处理组峰1, 3, 4, 5, 7及8的面积比对照组大, 其对应分子量分别为180 000, 87 000, 78 000, 67 000, 43 000及31 000.

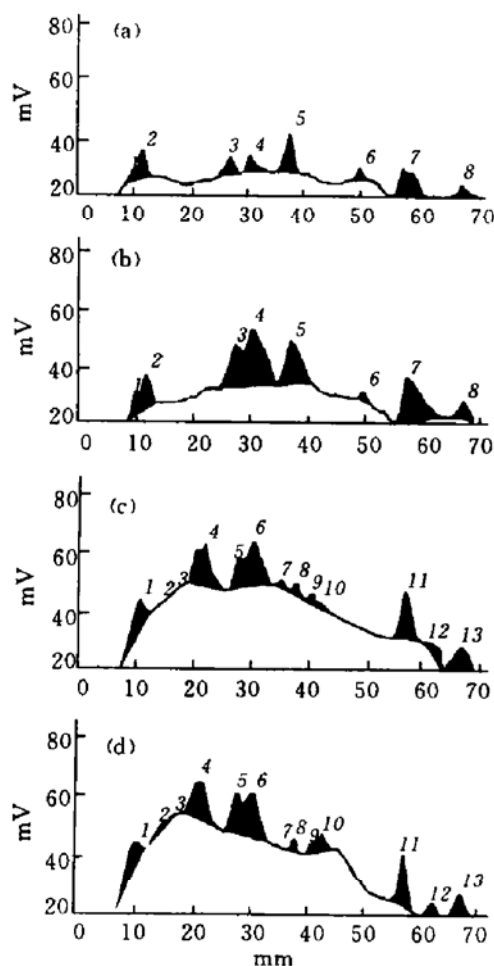


图3 J6-2细胞蛋白质磷酸化放射自显影扫描图谱

(a)、(b)为颗粒部分;(c)、(d)为胞液部分;(a)、(c)为对照组;(b)、(d)为GM₃处理组.

2.3 GM₃对J6-2细胞胞液部分蛋白质磷酸化的影响

结果显示, GM₃能促进相对分子量分别为87 000及56 000蛋白质磷酸化程度, 而且GM₃还能抑制相对分子量为70 000和43 000蛋白质磷酸化(图2), 从密度扫描(图3)和表1可看出GM₃处理组峰5和峰10面积比对照组大, 对应分子量为87 000及56 000, 峰10在对照组只有少量存在; 而GM₃处理组峰7及峰13面积比相应对照组小, 其对应分子量为

70 000及43 000, 且峰7在GM₃处理组只有少量存在.

3 讨论

目前认为蛋白质磷酸化是细胞外各种调节因子调节细胞活动的共同环节^[8]. 蛋白质磷酸化是由细胞内存在的种类繁多的蛋白激酶来完成的. 细胞外调节因子主要通过影响各种蛋白激酶活性来调节蛋白质磷酸化水平, 最终实现对细胞活动的影响. 近年来的研究发现, Glc在细胞生长、增殖、分化等过程中起重要的调节作用^[9-11]. 对其作用机制的进一步研究表明, Glc对细胞内多种蛋白激酶活性具有调节作用. Goldenring等^[12]曾报导, Glc可增加大鼠脑中一些蛋白质的磷酸化水平, 其作用依赖于Ca²⁺存在. Tsuji等^[9]也发现神经节苷脂GQ1b能普遍促进神经母细胞瘤GOTO细胞质膜一些蛋白质的磷酸化, 还进一步证实了在GOTO细胞质膜上存在着一种GQ1b/Ca²⁺依赖性蛋白激酶^[13]. 此外, Chan^[14]报导存在于豚鼠脑膜上的一种蛋白激酶(J kinase)可受Glc的激活, 其激活作用不依赖Ca²⁺的存在. 该激酶被活化后可发生自身磷酸化, 其底物是一种分子量为68 000的蛋白质. GM₃是含有一个唾液酸基团的神经节苷脂的一种. 近年来做为生理性促分化剂受到人们的关注. Nojiri等人^[15]报导GM₃可诱导HL-60细胞分化. 我们的研究工作也证实了GM₃对HL-60细胞和J6-2细胞均有诱导分化作用^[16]. 对GM₃的促分化机制研究表明, GM₃可抑制细胞蛋白激酶C(PKC)活性^[17]. 蛋白激酶活性的变化必然反映为细胞蛋白质磷酸化水平的改变, 弄清GM₃对细胞蛋白质磷酸化的影响, 有利于揭示GM₃的促分化机制. 本研究分别观察了GM₃对J6-2细胞颗粒部分和胞液部分蛋白质磷酸化的影响, GM₃对J6-2细胞颗粒部分和胞液部分蛋白组分和含量均未见显著影响(见图1), 但对照组和GM₃处理组蛋白质电泳的放射自显影图谱具有明显差异. GM₃对J6-2细胞颗粒部分和胞液部分可发生蛋白质磷酸化的作用不同. GM₃对颗粒部分可

发生磷酸化的蛋白质普遍表现为促进磷酸化作用(见图 2a), 这一结果和 Tsuji 等人的研究相一致. GM_3 对 J6-2 细胞胞液部分蛋白质磷酸化的影响表现为两方面的作用, GM_3 促进 87 000 和 56 000 蛋白质磷酸化, 抑制 70 000 和 43 000 蛋白质的磷酸化. 上述结果提示 GM_3 对 J6-2 细胞蛋白质磷酸化的作用是复杂的. 推测 GM_3 不仅能抑制 J6-2 细胞的 PKC 活性; 也可能激活其它蛋白激酶或抑制磷酸蛋白磷酸酶的活性, 从而使有些蛋白质组分的磷酸化加强; 也有可能 GM_3 抑制某些蛋白激酶或激活磷酸蛋白的磷酸酶, 从而使有些蛋白组分的磷酸化减弱. GM_3 诱导 J6-2 细胞分化需 4—6d, 而蛋白质磷酸化水平的改变发生在细胞分化早期. 推测磷酸化水平的变化可能是细胞分化的早期信号之一.

参 考 文 献

- 1 Hakomori S. Ann Rev Biochem, 1981; 50: 733
- 2 张新波, 崔肇春, 汤乃梅等. 生物化学与生物物理进展. 1992; 19 (2): 123
- 3 崔肇春, 侯卫红, 朱正美. 生物化学与生物物理进展. 1990; 17: 206
- 4 Chan K F J. J Biol Chem, 1987; 262 (11): 5248
- 5 Hartree M M. Anal Biochem, 1976; 72: 248
- 6 Lamml U K. Nature, 1970; 227: 680
- 7 凌 俊. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17 (5): 407
- 8 Greengard H. FASEB J, 1989; 3: 1583
- 9 Tsuji S. J Biochem, 1985; 97: 969
- 10 Ledeen R W. J Neurosci Res, 1984; 12: 147
- 11 Nakajima J, Tsuji S, Nagai Y. Biochim Biophys Acta, 1986; 876: 65
- 12 Goldenring J R, Otis L C, Yu R K *et al.* J Neurochem, 1985; 44: 1229
- 13 Tsuji S, Yamashita T, Nagai Y. J Biochem, 1988; 104: 498
- 14 Chan K F J. J Biol Chem, 1988; 263: 568
- 15 Nojiri H, Takaku F, Tereui Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 782
- 16 Tsui Z C, Hou W H, Yang L *et al.* In Vivo, 1990; 4: 205
- 17 张新波, 汤乃梅, 朱正美等. 大连医学院学报, 1991; 13 (4): 63

Effect of Ganglioside GM_3 on Protein Phosphorylation of a Human Monocytoid J6-2 Leukemic Cells. Dong Zheng, Ma Keli, Han Rui, Cui Zhaochun (*Biochemistry Department, Dalian Medical University, Dalian 116023, China*).

Abstract The effect of ganglioside GM_3 on the endogenous protein phosphorylation of human monocytoid leukemia cell line J6-2 cells was studied. Addition of 100 $\mu\text{mol/L}$ GM_3 to the particulate fraction of J6-2 cells enhanced the endogenous phosphorylation of several proteins whose relative molecular mass were 180, 87, 78, 67, 43 and 31kD while addition of 100 $\mu\text{mol/L}$ GM_3 to the cytosol fraction of J6-2 cells stimulated the phosphorylation of several proteins whose relative molecular mass were 87 and 56kD, but could inhibit the phosphorylation of 70 and 43kD proteins. Because GM_3 has been reported to be able to induce J6-2 cells to differentiate along the monocyte/macrophage route by long term incubation with GM_3 (up to six days), so the authors postulated that protein phosphorylation induced by short term GM_3 treatment might be the early signal of differentiation of J6-2 cells.

Key words ganglioside GM_3 , protein phosphorylation, leukemic cells