

der reaction dynamics rule. The perseed luminescence induced by perdose correlate significantly with the seedling relative height, and the perseed or pergram seed luminescence at the soaking begining time correlate extremely significantly or significantly with the seedling relative height, these suggest that the higher radiosensitivity of the seed the higher intensity

of seed luminescence induced by γ radiation. After germinating, the luminescence intensity of the irradiated seed is lower than that of the no-irradiated seed, this is because of the radiation inhibit the seedling growth.

Key words radiation induced luminescence, radiosensitivity, γ -ray, seed

GM₃ 抑制人白血病 J6-2 细胞 肌醇磷脂代谢循环*

马克里 刘彦 崔肇春**

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027)

摘要 采用无载体³²P 和 [³H] 肌醇标记磷脂, 观察了促分化剂神经节苷脂 GM₃ 对人单核样白血病 J6-2 细胞肌醇磷脂代谢的影响. GM₃ 抑制 [³²P] Pi 和 [³H] 肌醇掺入 J6-2 细胞磷脂酰肌醇 (PI), 促进 [³²P] Pi 和 [³H] 肌醇掺入磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP₂), 抑制 [³²P] Pi 掺入磷脂酸 (PA), 抑制 [³H] 肌醇掺入三磷酸肌醇 (IP₃). GM₃ 的上述作用均为浓度依赖性的, 随 GM₃ 浓度的提高而增强. 上述结果表明, GM₃ 抑制 J6-2 细胞的肌醇磷脂代谢循环.

关键词 神经节苷脂 GM₃, 白血病, 肌醇磷脂代谢

神经节苷脂 GM₃ 是近年来受到关注的一种生理性促分化剂. 对其促分化机制, 一些作者从不同角度进行了探讨^[1-3], 也提供了一些有价值的资料. 但迄今为止, GM₃ 的促分化机制仍未被阐明. 我们在研究 GM₃ 诱导白血病 J6-2 细胞分化工作中发现, GM₃ 在诱导 J6-2 细胞分化过程中, 细胞的磷脂代谢发生显著的变化, 其主要表现为细胞的磷脂酰胆碱 (PC) 合成增加, 其它磷脂组分合成受到抑制^[4]. 其中对 PI 合成的抑制尤为显著. 已知细胞质膜肌醇磷脂代谢在细胞信息传递及代谢调控中发挥重要作用, 尤其是细胞的增殖程度与肌醇磷脂代谢速率密切相关. 转化的恶性细胞失去正常控制表现为无限制的增殖, 细胞肌醇磷脂基础转

换率也随着加快, 而抑制肿瘤增殖, 同时也抑制肿瘤细胞肌醇磷脂转换率. 鉴于肌醇磷脂代谢在细胞增殖中的重要作用, 本文对 GM₃ 影响 J6-2 细胞肌醇磷脂代谢的作用机制进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料

人单核样白血病 J6-2 细胞系, 由中国医学科学院天津血液病研究所提供^[5]; 神经节苷脂 GM₃, 从狗红细胞中自行制备^[6], 纯度 89%,

* 国家自然科学基金 39370363 资助课题的一部分.

** 通讯联系人.

收稿日期: 1994-06-20, 修回日期: 1994-10-18

TLC 一条带; 高效层析薄板, 购自德国 E. Merck 公司; 无载体 ^{32}P , 购自中国原子能研究院同位素研究所; $[\text{}^3\text{H}]$ 肌醇, 14k Ci/mol , 购自中国科学院上海原子核研究所; 阴离子交换树脂 Dowex-1 (100—200 目)、磷脂酰肌醇、磷脂酸、磷脂酰肌醇-4-磷酸、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸及其它磷脂标准品, 均购自美国 Sigma 公司; RPMI 1640 及 DME/F 12 培养基系 Gibco 产品; X 光感光胶片系天津市感光胶片厂产品; 其它试剂均为国产分析纯. 液体闪烁计数器, 型号为 Beckman LS-5801.

1.2 方法

1.2.1 GM_3 对 $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 和 $[\text{}^3\text{H}]$ 肌醇掺入 J6-2 细胞肌醇磷脂及磷脂酸的影响 实验方法按文献 [7] 和 [8] 并加以综合改进, 概述如下: J6-2 细胞于含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中传代培养. 收集细胞后, 以 DME/F12 培养液洗两次. 离心收集细胞, 分别加入不同浓度 GM_3 的无血清 DME/F12 培养液 (对照组不含 GM_3), 使细胞密度为 1.0×10^{10} 个/L, 加入 $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 至 100mCi/L 或 $[\text{}^3\text{H}]$ 肌醇 2mCi/L , 于 5% CO_2 孵箱中 37°C 掺入 1h. 收集细胞, 以 pH 7.4, 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗两次, 加入氯仿 (C): 甲醇 (M): 水 (W) (8:4:3, 体积比) 7.0ml, 混匀后静置分层. 收集下相, 上相再加入 4.5ml 氯仿重新提取一次, 收集下相与第一次下相合并, 用氮气吹干, 得非多磷酸肌醇磷脂组分 (含 PI 和 PA). 将上相再加入 4.5ml C:M:HCl (100:50:1, 体积比) 再次提取, 收集下相, 用氮气吹干, 得多磷酸肌醇磷脂组分 (含 PIP 和 PIP_2). 将两部分磷脂样品分别溶于 $50\mu\text{l}$ 氯仿中, 点样于高效层析薄板. 非多磷酸肌醇磷脂样品于 C:M:乙酸:甲酸:W (70:30:12:4:2, 体积比) 溶剂体系展开. 多磷酸肌醇磷脂样品于 C:M:W: NH_4OH (40:48:10:5, 体积比) 溶剂体系展开. 将层析板放射自显影后以碘蒸气显色, 刮下肌醇磷脂及 PA 条带处硅胶, 液闪计数测放射强度 ($[\text{}^3\text{H}]$ 肌醇掺入实验样品经薄层层析后不做放射自显影, 直接将层析板以碘蒸气显

色, 刮下相应肌醇磷脂条带处硅胶, 进行液闪计数测放射强度).

1.2.2 GM_3 对 $[\text{}^3\text{H}]$ 肌醇掺入 J6-2 细胞磷酸肌醇的影响 方法按文献 [9] 和 [10] 并加以改进: J6-2 细胞于含 2mCi/L $[\text{}^3\text{H}]$ 肌醇的 DME/F12 培养液中 37°C 标记 10h. 收集细胞, 以无血清 DME/F12 培养液洗两次. 离心收集细胞, 然后加入含不同浓度 GM_3 , 10mmol/L LiCl 的无血清 DME/F12 培养液 (对照组不加 GM_3), 使细胞密度为 1.0×10^{10} 个/L, 置 5% CO_2 孵箱中 37°C 孵育 30min. 离心收集细胞, 再加入 C:M:浓 HCl (100:100:1, 体积比) 4.0ml 及蒸馏水 1.0ml, 混匀后静置分层. 3000r/min 离心, 收集上相. 上相用 1.5mol/L KOH- 75mmol/L Hapes 调至中性, 加蒸馏水至 1.0ml, 以 0.5ml/min 的流速上 Dowex-1 阴离子交换柱 ($0.6\text{cm} \times 3\text{cm}$, 树脂预先处理成甲酸型). 先以 10ml 蒸馏水洗出肌醇, 5ml 60mmol/L 甲酸钠- 5mmol/L 硼酸钠洗出甘油磷酸肌醇. 然后依次用 4.0ml 0.2mol/L 甲酸钠- 0.1mol/L 甲酸洗出磷酸肌醇 (IP), 4.0ml 0.4mol/L 甲酸钠- 0.1mol/L 甲酸洗出二磷酸肌醇 (IP_2), 4.0ml 1mol/L 甲酸钠- 0.1mol/L 甲酸洗出三磷酸肌醇 (IP_3). 收集各部分洗脱液, 液闪计数测定放射强度.

2 结 果

2.1 GM_3 对 $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 和 $[\text{}^3\text{H}]$ 肌醇掺入 J6-2 细胞肌醇磷脂和磷脂酸的影响

以 $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 做为放射性前体, 观察了 $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 向不同浓度 GM_3 处理组 J6-2 细胞肌醇磷脂和 PA 的掺入情况. 图 1a 为不同浓度 GM_3 处理组非多磷酸肌醇磷脂样品经高效薄层层析后的放射自显影图谱. 由图 1a 可见, 与对照组相比, $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 掺入 PI 和 PA 受 GM_3 的抑制 (GM_3 同时抑制 $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 向 PE 的掺入, 促进 $[\text{}^{32}\text{P}]$ Pi 向 PC 的掺入, 这将另文讨论). 提高 GM_3 浓度, 抑制作用增强. 图 1b 为不同浓度 GM_3 处理组 J6-2 细胞多磷酸肌醇磷脂样品经高效薄层层析后的放射自显影图谱. 由图 1b

可见, GM_3 显著促进了 $[^{32}\text{P}]$ Pi 向 J6-2 细胞 PIP_2 的掺入. GM_3 浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 时促进作用最大, 继续提高 GM_3 浓度, 促进作用减小, 但仍大于对照组.

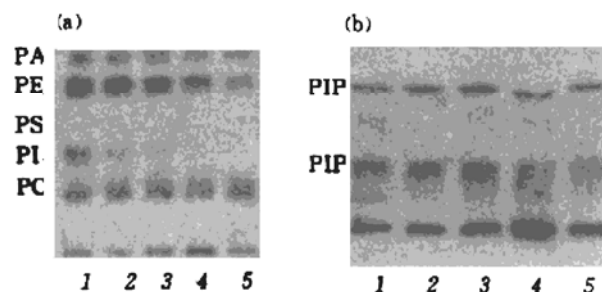


图1 不同浓度 GM_3 处理组 J6-2 细胞磷脂高效薄层层析后放射自显影图谱

(a) 磷脂酰肌醇和磷脂酸; (b) 磷脂酰肌醇-4-磷酸和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸. 1: 为对照组; 2、3、4、5: 分别为 25、50、100 和 $200\mu\text{mol/L}$ GM_3 处理组样品.

图 2a 为 $[^{32}\text{P}]$ Pi 掺入实验 J6-2 细胞 PI 和 PA 液体闪烁计数结果. 图 2b 为 PIP 和 PIP_2 计数结果.

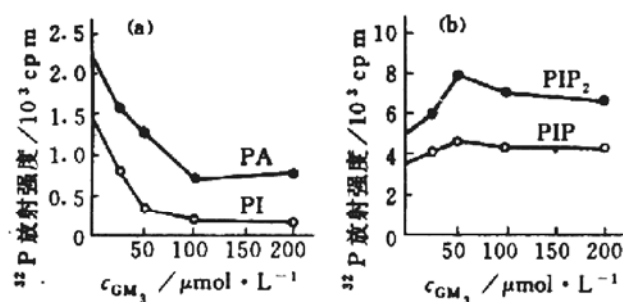


图2 不同浓度 GM_3 处理后 J6-2 细胞肌醇磷脂和磷脂酸放射强度液体闪烁计数结果

(a) 磷脂酰肌醇和磷脂酸; (b) 磷脂酰肌醇-4-磷酸和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸. 图中数据为图 1 相应磷脂组分液闪计数结果, 每组样品细胞数为 10^7 个.

$[^3\text{H}]$ 肌醇掺入实验得到的结果和 $[^{32}\text{P}]$ Pi 掺入实验结果一致. 图 3 为肌醇磷脂各组分液闪计数结果. GM_3 抑制 $[^3\text{H}]$ 肌醇掺入 PI, 促进 $[^3\text{H}]$ 肌醇掺入 PIP_2 , 同时也促进 $[^3\text{H}]$ 肌醇向 PIP 的掺入, 但没有对 PIP_2 的促进作用明

显.

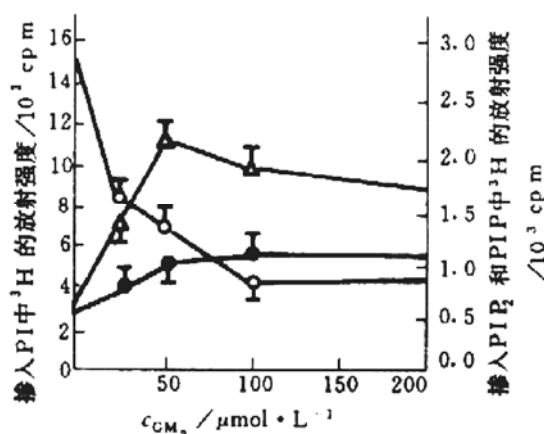


图3 不同浓度 GM_3 对 $[^3\text{H}]$ 肌醇掺入 J6-2 细胞肌醇磷脂的影响

○—○, 磷脂酰肌醇; ●—●, 磷脂酰肌醇-4-磷酸; △—△, 磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸. 图中数据为三次相互独立实验的平均值. 每组样品细胞数为 10^7 个.

2.2 GM_3 对 $[^3\text{H}]$ 肌醇掺入 J6-2 细胞磷酸肌醇的影响

图 4 为不同浓度 GM_3 处理组 J6-2 细胞磷酸肌醇各组分液体闪烁计数结果. GM_3 抑制

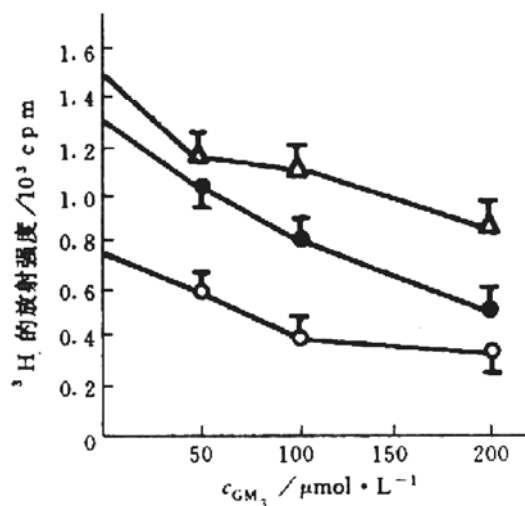


图4 不同浓度 GM_3 对 $[^3\text{H}]$ 肌醇掺入 J6-2 细胞磷酸肌醇的影响

△—△, IP_2 ; ●—●, IP_3 ; ○—○, IP. 图中数据为三次相互独立实验的平均值. 每组样品细胞数为 10^8 个.

[^3H] 肌醇向 IP_3 、 IP_2 和 IP 的掺入, 提高 GM_3 浓度, 抑制作用增加。

3 讨 论

已知细胞肌醇磷脂代谢循环的途径为: PI 在 PI 激酶和 PIP 激酶的相继作用下, 经 PIP 生成 PIP_2 ; PIP_2 受磷脂酶 C (PLC) 作用生成二脂酰甘油 (DAG) 和 IP_3 ; IP_3 经 IP_2 及 IP 重新生成肌醇; DAG 可在 DAG 激酶作用下生成 PA, 然后重新利用 PA 和肌醇合成 PI, 从而完成肌醇磷脂代谢循环。影响肌醇磷脂代谢循环速率的关键环节之一是 PIP_2 特异的 PLC 活性。各种细胞外调节因子主要通过对 PLC 活性的影响来调节细胞肌醇磷脂代谢速率。 GM_3 抑制 [^3H] 肌醇向 IP_3 的掺入 (图 4), 提示 GM_3 抑制了 J6-2 细胞 PLC 的活性, 其结果使 PIP_2 降解受阻, 细胞内 PIP_2 积累, IP_3 、 IP_2 及 IP 水平降低, PA 生成减少以及细胞重新利用 PA 和肌醇合成 PI 受阻。从而表现为 [^{32}P] Pi 和 [^3H] 肌醇掺入 PI 减少, 掺入 PIP_2 增加, [^3H] 肌醇掺入 IP_3 、 IP_2 和 IP 减少以及 [^{32}P] Pi 掺入 PA 减少。

细胞肌醇磷脂代谢速率与细胞的增殖程度关系密切。转化的细胞常伴随着细胞肌醇磷脂基础转换率的加快。现已证明, 至少有两类癌基因的产物与肌醇磷脂转换有关。一类是以 PP60^{src} 为代表的酪氨酸蛋白激酶, 它既可促进 PI 磷酸化生成 PIP, 又可促使 DAG 磷酸化生成 PA 进而参与 PI 的合成^[11]。另一类是以 P21^{ras} 为代表的 GTP 结合蛋白, 其作用是使细胞在无外界刺激条件下, PLC 持续处于较高的活性状态^[12]。两类癌基因产物作用的结果都是使细胞在无外界刺激条件下加快肌醇磷脂的基础转换率, 使细胞持续受到生长信号的刺激, 从而表现为过度的增殖。这被认为是细胞恶性转化的基础之一。

一些促分化剂抑制肿瘤细胞增殖, 常同时抑制细胞的肌醇磷脂基础转换率。促分化剂视黄酸 (RA) 诱导神经母细胞瘤 LAN-1 细胞分化, 同时抑制细胞肌醇磷脂转换, 而对 RA 不敏

感的细胞株, 其肌醇磷脂转换也不受影响。这提示肌醇磷脂代谢与细胞分化有关^[13]。神经节苷脂 GM_3 可诱导 J6-2 细胞沿单核/巨噬细胞途径分化^[14]。细胞形态上的分化出现在 GM_3 处理细胞 4-6d 以后, 而肌醇磷脂代谢的改变出现在细胞分化早期, GM_3 短期处理细胞后就发生。这提示肌醇磷脂代谢的改变可能牵涉到 GM_3 的促分化机制。本文结果提示, GM_3 抑制 J6-2 细胞肌醇磷脂代谢循环是抑制了 J6-2 细胞 PLC 活性。已知 PLC 属于 G 蛋白调节的磷脂酶。 GM_3 是否通过 G 蛋白或其它途径影响 J6-2 细胞 PLC 的活性, 以及肌醇磷脂代谢的改变是否与 GM_3 促分化的机制有关, 这都是值得进一步探讨的问题。

参 考 文 献

- 1 Kreutter D, Kim J Y H, Goldenring J R *et al.* J Biol Chem, 1987; **262**: 1633
- 2 Xia X J, Gu X B, Santorell A C *et al.* J Lipid Res, 1989; **30**: 181
- 3 Bremer E G, Hakomori S-I, Bowen-pope K P *et al.* J Biol Chem, 1984; **259**: 6818
- 4 崔肇春, 张新波, 汤乃梅等. 生物化学杂志, 1992; **8**: 724
- 5 Wu K F, Zhang Y Q, Song B Z *et al.* Proc CAMS PUMC, 1986; **1**: 218
- 6 崔肇春, 侯卫红, 朱正美等. 生物化学与生物物理进展, 1990; **17** (3): 206
- 7 Ferrel I E, Huestis W H. J Cell Biol, 1984; **98**: 1992
- 8 Vance J E, Pan D B, Vance D E *et al.* J Cell Biol, 1991; **115**: 1061
- 9 Camps M, Hou C, Jakobs K H *et al.* Biochem J, 1991; **271**: 743
- 10 Bone E A, Fretten P, Palmer S *et al.* Biochem L, 1984; **221**: 803
- 11 Sugimoto Y, Whitman M, Cantley L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; **81**: 2117
- 12 McGrath J P, Capon D J, Goeddel D V *et al.* Nature, 1984; **310**: 644
- 13 Lanciotti M, Longone P, Cornaglia-Ferraris P *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 1989; **161**: 284
- 14 张新波, 崔肇春, 汤乃海等. 生物化学与生物物理进展, 1992; **19** (2): 123

Ganglioside GM₃ Inhibits Phosphatidylinositol Turnover of Human Leukemia J6-2 Cell Line.

Ma Keli, Liu Yan, Cui Zhaochun (*Department of Biochemistry, Dalian Medical University, Dalian 116023, China*).

Abstract The effect of ganglioside GM₃ on the metabolism of phosphoinositides of human monocytoid leukemia J6-2 cells has been studied using the incorporation of [³²P] Pi and [³H] inositol into them. The results show that GM₃ inhibited the incorporation of [³²P] Pi and [³H] inositol into phosphatidylinositol

(PI), stimulated the incorporation of those into phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂) and [³²P] Pi into phosphatidylcholine (PC), inhibited the incorporation of [³H] inositol into inositol phosphates (IP₃, IP₂, IP), and of [³²P] Pi into phosphatidic acid (PA) in a dose-dependent manner. These results suggest that GM₃ inhibits the PI turnover of J6-2 cells.

Key words ganglioside GM₃, leukemia, phosphoinositides, inositol phosphates

急性重复性缺氧小鼠脑神经节苷脂含量的研究

黄如彬 杨典洱 李爱华 潘颖 金有豫

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

贺建宇

(上海医科大学生物化学教研室, 上海 200032)

摘要 以昆明鼠为实验对象, 用 CS-9000 薄层扫描仪测定急性重复性缺氧小鼠脑组织中神经节苷脂 GM1、GD1a、GD1b 和 GT 的各个组分相对百分比及唾液酸的含量。结果发现: 与未经缺氧处理的空白对照组 (A) 比较, 缺氧一次的实验对照组 (B) 及急性重复缺氧 4 次后饲养 2d (天) 实验对照组 (D) 等 3 组小鼠比急性重复缺氧 4 次实验组 (C) 小鼠脑组织中的唾液酸含量显著下降, 神经节苷脂 GM1 与 GD1b 相对百分比明显降低; 神经节苷脂 GT 相对组分百分比明显上升, 神经节苷脂 GD1a, 还没发现有统计学差异。结果提示脑组织中神经节苷脂可能参与急性重复缺氧小鼠的耐缺氧能力的形成, 而且是一个短时间内不能恢复的过程。

关键词 重复缺氧, 神经节苷脂, 小鼠, 薄层扫描

神经节苷脂是一类含唾液酸的鞘糖脂, 特别集中于突触部位, 是与膜活性极有关的物质。有文献报导^[1-4], 缺血或缺氧条件下, 均会导致神经节苷脂总量的降低及组分比例的明显变化, 尤其 GM1、GD3 的降低比较明显; 这提示神经节苷脂在缺血/缺氧性损伤的病理生理过程中有作用。但是, 在急性重复性缺氧条件下, 对神经节苷脂的影响至今尚未见报道。本文选择了急性重复性脑缺氧小鼠为动物模型, 研究急性重复性缺氧情况下, a. 小鼠脑组织中神经节苷脂含量和单个组分的相对百分比的变化,

b. 缺氧次数与神经节苷脂含量和组分的关系, 通过本实验以期了解急性重复性缺氧对动物的神经节苷脂的影响规律, 并为进一步全面阐明急性重复性缺氧所致的耐缺氧机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

随机挑取体重为 18g 左右的昆明小鼠, 雌雄不限。