

免疫脂质体对白血病细胞杀伤的扫描电镜观察

褚嘉佑* 吴旻

(中国医学科学院肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

沈子威 赵南明

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 采用脂质体技术包裹中华眼镜蛇膜毒素 (CT) 并与抗人 T 细胞单克隆抗体结合制备成 pH 敏感型免疫脂质体。它在 pH8.0~7.0 间十分稳定, 但在接近细胞浆微酸性环境 (pH<6.0) 时很容易破裂而释出包裹之内容物。用这一免疫脂质体处理人白血病 T 淋巴细胞系 CEM 细胞并用扫描电镜观察脂质体对靶细胞的作用, 显示这一免疫脂质体可特异性杀灭靶细胞而对抗原阴性细胞影响不大。

关键词 免疫脂质体, 扫描电镜, 眼镜蛇膜毒素, 白血病细胞

我们利用硬脂酰噻唑硫酮作为偶联剂, 在脂质体双层结构中嵌入抗人 T 细胞单抗 Wu71, 用中华眼镜蛇膜毒素作为“弹头”药物, 制备成免疫脂质体, 观察了其在体外实验中对人 T 淋巴细胞白血病 CEM 细胞的靶向杀灭作用, 并以示差扫描量热技术和荧光检测研究了免疫脂质体的稳定性及其包含物的释放过程。结果显示这一免疫脂质体可特异性杀灭靶细胞而对抗原阴性细胞影响不大^[1]。为进一步了解其作用机制, 本文应用扫描电镜动态观察了免疫脂质体对白血病细胞的杀伤情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗人 T 细胞单抗 Wu71, 为卫生部武汉生物制品研究所史良如教授惠赠, 为 IgG1 亚类单抗, 相当于国际命名的 CD5, 识别全部人外周血 T 细胞, 相应的抗原分子量为 67 000^[2]。

1.1.2 中华眼镜蛇膜毒素, 即细胞毒素 (cytotoxin, CT), 为中国科学院昆明动物研究所何其伟同志惠赠, 提取方法见文献 [3]。

1.1.3 二油酰磷脂酰乙醇胺 (dioleoylphosphatidylethanolamine, DOPE) 和油酸 (oleic

acid, OA) 为美国 Sigma 公司产品。

1.1.4 偶联剂硬脂酰噻唑硫酮 (N-hydroxy-succinimide ester of stearic acid, NHSS) 由北京大学化学系合成。

1.1.5 细胞系: 以人 T 淋巴细胞白血病 CEM 细胞为靶细胞, 人 B 淋巴细胞 Raji 细胞为对照细胞。

1.2 方法

1.2.1 免疫脂质体的制备: 详见文献 [1, 4, 5]。取溶于氯仿中的 DOPE 1 mg, 氮气吹干氯仿, 加入 OA, 使 DOPE : OA = 8 : 2 (摩尔比)。真空干燥 30 min, 加入衍化之抗体 Wu71 0.1 mg 及待包裹之 CT (12 g/L, 溶于 pH8.0 PBS) 50 μ l, 加入适量 PBS 使总体积为 250 μ l, 在水浴式超声波发生器 (Laboratory Supplis CO., G112 SPIT) 上间歇超声数次 (每次超声 5 min, 静置 10 min 以避免温度过高破坏抗体) 以得到均匀透明的液体, 脂质体形成后, 经过 Bio-gel A 0.5 M 层析柱 (1.1 cm $\times$ 30 cm) 平衡和洗脱, 除去游离 CT 及未与脂质体连接的抗体, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

* 现在中国医学科学院医学生物学研究所工作, 昆明 650107。

收稿日期: 1994-10-17, 修回日期: 1994-12-17

1.2.2 脂质体与细胞的作用:靶细胞 CEM 和对照细胞 Raji 均培养在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,待细胞处于对数生长期,活细胞 $\geq 95\%$ 时调整细胞浓度为 1×10^6 个/L,加入免疫脂质体,浓度为 50 g/L,培养 2 h,以无血清 1640 培养液洗细胞两次,换新鲜培养液 37℃ 继续培养 4~24 h,间隔一定时间滴片在荧光显微镜以吖啶橙/溴化乙啶 (AO/EB) 染色,观察靶细胞及对照细胞的死亡情况.

1.2.3 游离单抗对免疫脂质体的阻断作用:在 CEM 细胞悬液中按 10 mol 加入游离单抗 Wu71, 37℃ 培养 30 min,以 1640 液洗涤细胞一次,加入新鲜培养基,然后按上述方法加入免疫脂质体,观察靶细胞被杀灭的情况.

1.2.4 扫描电镜动态观察免疫脂质体对靶细胞的杀伤作用:在免疫脂质体对靶细胞作用时,间隔一定时间取出细胞离心,以 0.6% 高锰酸钾固定 15 min,加入少量双蒸水,离心,去上清,在 75%~95% 系列乙醇内脱水,喷金,在 HITANCH S-450 扫描电镜下观察并摄影.

2 结果与讨论

本实验获得的脂质体是超声制备的小单层脂质体,经透射电镜观察,直径为 27.7~100 nm (图 1). 这一免疫脂质体在 pH 7.0~8.0 间十分稳定,当 pH 降至 6.0 以下时,脂质体破裂,导致包裹之 CT 大量泄漏. 包裹 CT 的

免疫脂质体与 CEM 细胞共同孵育 8 h 后,78.4% 的靶细胞被杀死,胞膜破溃,而同样条件下的 Raji 细胞仅死亡 20.4%,提示抗体介导的 CT 免疫脂质体对靶细胞的特异杀灭作用.

预先用游离单抗同靶细胞作用后加入免疫脂质体,则 CEM 细胞仅 30% 被杀灭,此结果显示游离单抗可以部分阻断免疫脂质体对靶细胞的作用,证明免疫脂质体依赖于其所连接的抗体与靶细胞表面抗原位点的结合,当游离单抗占据了靶细胞上的抗原位点后,免疫脂质体向靶细胞释放内容物的机会即下降^[1].

本实验制备的脂质体为小单层脂质体,制备时必须注意超声时间,太短不易得到均匀的脂质体,一次时间太长则易发热使抗体失活,我们采用的是间歇超声法. 比起用超声-冰冻干燥-水化法制备的较大脂质体,本方法简便、快速,且小单层脂质体更容易与细胞融合. 这种脂质体的缺点是包裹率不够高.

除了用 DOPE 制备脂质体外,亦可用二油酰磷脂酰胆碱 (dioleoylphosphatidylcholine, DOPC) 代替 DOPE,或在用 DOPE 时加入少量 DOPC. 但 DOPE/OA (油酸) 制备的脂质体对酸性环境更为敏感,故在制备 pH 敏感型脂质体时采用 DOPE 更为适宜.

本实验应用扫描电镜动态观察的免疫脂质体与靶细胞作用的过程见图 2~4,从图中可见,免疫脂质体到达靶细胞后,由于靶细胞上

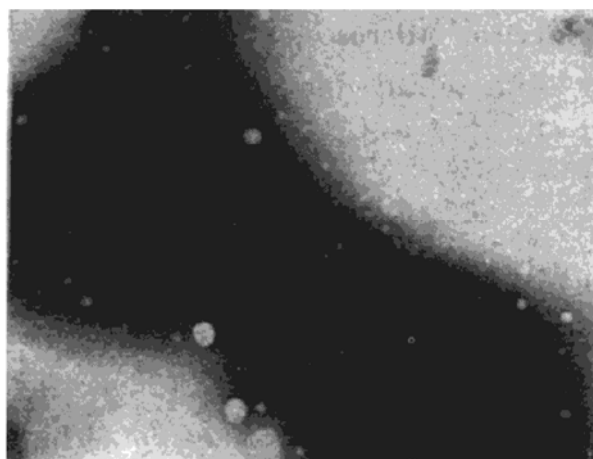


图 1 透射电镜下的免疫脂质体
直径为 27.7~100 nm.

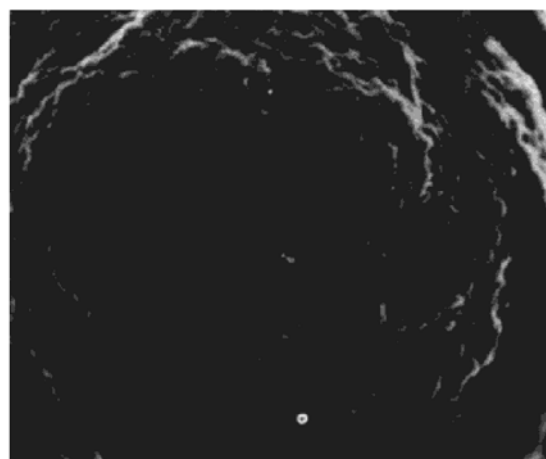


图 2 扫描电镜下的白血病 CEM 细胞

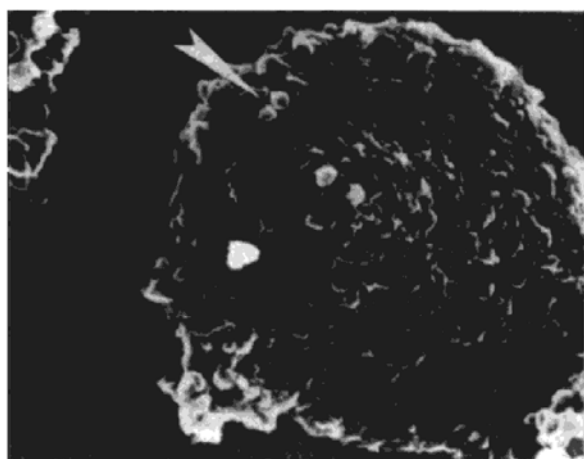


图3 免疫脂质体由于抗原抗体结合而附着于靶细胞表面
(箭头示脂质体)。

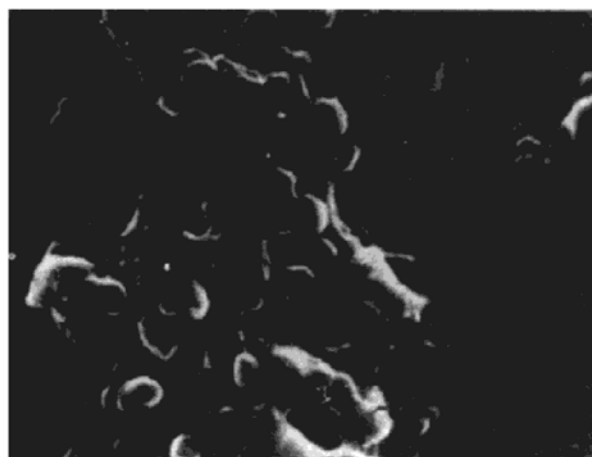


图4 CT从脂质体中释放出来, 靶细胞破溃、死亡

的抗原与免疫脂质体上的单克隆抗体结合, 脂质体特异地与靶细胞结合(图3)。在细胞表面适宜的pH值下, 脂质体破裂, 释放出CT, CT直接作用于靶细胞膜, 使细胞膜破溃, 这种破溃仅限于免疫脂质体直接作用的靶细胞而周围细胞没有炎性反应, 在这一点上类似于细胞凋亡(apoptosis)。

CT是一种由60个氨基酸组成, 分子量为6000的碱性多肽, 等电点约12, 有人认为其作用如同阳离子清洁剂, 带正电荷的阳离子头与细胞膜的阴离子部位结合而定位, 亲脂性基团进入细胞膜而发挥作用, 使细胞膜破坏。1967年Braganca^[6]发现印度眼镜蛇中的一个成分选择性破坏吉田氏肉瘤细胞的能力比破坏人或大

鼠红细胞的能力强上千倍, 将其称为细胞毒素(cytotoxin), 亦称膜毒素^[6]。以后杜雨苍^[7]亦通过实验证明中华眼镜蛇膜毒素对吉田氏肉瘤细胞有强烈杀伤作用。据研究, CT可直接穿透磷脂单分子层, 改变膜通透性, 破坏膜上的许多酶, 还能抑制细胞膜的运转机制, 干扰膜结构, 使细胞膜破裂、溃烂和溶解。值得注意的是, 我们的实验^[1]表明CT对细胞生物膜有强烈的损害作用却不损伤脂质体膜。即CT对细胞生物膜和脂质体作用效果不同, 因此它可能是通过生物膜上的蛋白质或酶来发挥作用的。CT通过单克隆抗体介导用于靶细胞的杀灭是一种新的尝试, 本实验所用免疫脂质体为pH敏感型, 其在白血病及其他恶性肿瘤的导向治疗中可能具有潜在价值。

参 考 文 献

- 1 褚嘉佑, 吴 旻, 沈子威等. 科学通报, 1992; 37: 73
- 2 史良如, Schneider M, Ziegler A 等. 中华微生物和免疫学杂志, 1984; 4: 141
- 3 何其伟, 龚潮良. 动物学研究, 1986; 7: 385
- 4 Huang A, Kennel S J, Huang L. J Biol Chem, 1983; 258: 14034
- 5 Connor J, Huang L. J Cell Biology, 1985; 101: 582
- 6 Braganca B M, Patel N T, Badrinath P G. Biochim Biophys Acta, 1967; 136: 508
- 7 杜雨苍. 生物化学与生物物理学报, 1980; 12: 349

Specific Killing of Human Leukemic Cells by Anti-leukemic Immunoliposomes Under Scanning Electron Microscopy. Chu Jiayou, Wu Min (National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China); Shen Ziwei, Zhao Nanming (Department of Biological Science and Technology, Qinghua University, Beijing 100084, China).

Abstract Anti-leukemic T-cell immunoliposomes entrapping cytotoxin from Chinese Cobra (CT) were prepared using dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and monoclonal antibody (McAb) against human

pan-T lymphocyte Wu71. The immunoliposomes is pH-sensitive, it is stable in pH7.0~8.0 but easy to release its contents in the slightly acidic environment of target cell plasma, below pH6.0. Treatment of the human T-leukemic cell line CEM with these immunoliposomes and using scanning electron mi-

croscopy to observe its dynamic killing action. The result shows that it was highly target-sensitive to the target cells while little cytotoxicity to the human non-target cells.

Key words immunoliposome, scanning electron microscopy, CT, leukemic cells

磷脂酶A₂激活对中性粒细胞趋化和粘附的作用*

颜光涛 郝秀华 李振甲

(解放军总医院基础医学研究所, 北京 100853)

摘要 外源性磷脂酶 A₂ (I 型 PLA₂) 和钙离子载体 (A23187) 可明显促进中性粒细胞对 TNF, FMLP 的趋化及同玻璃球的粘附. PLA₂ 抑制剂二溴苯乙酮 (PBPB) 和 PLA₂ 抗体对 PLA₂ 诱发的趋化和粘附具有浓度相关的抑制作用, 而对 A23187 的相同作用并无影响. 提示 PBPB 和 PLA₂ 抗体可能通过直接同 PLA₂ 作用而抑制 PMN 趋化和粘附, A23187 诱导的促趋化及粘附作用可能不同于 PLA₂.

关键词 磷脂酶 A₂, 中性粒细胞, 趋化, 粘附

磷脂酶 A₂ (PLA₂) 于创伤、失血性休克后明显激活, 伴有细胞功能不同程度的损伤^[1]. 究其原因, 中性粒细胞 (PMN) 在创伤后感染及缺血再灌注过程中的损伤作用同 PLA₂ 激活密切相关^[2]. 研究表明 PMN 可合成、贮存及分泌各类 PLA₂, 参加自身功能调节^[3]. 因此, 我们拟探讨 I 型 PLA₂ 和 A23187 对 PMN 趋化粘附的影响, 以期进一步说明 PLA₂ 激活对机体损伤的机理.

1 材料和方法

1.1 试剂

人重组 TNF (军事医学科学院基础医学研究所), 猪胰 PLA₂、A23187、PBPB 和 FMLP 均为 Sigma 产品. PLA₂ 抗体由本室制备.

1.2 提取 PMN

采用 250 g Wistar 大鼠肝素抗凝血, 按文献 [4] 分离 PMN, 台盼蓝染色显示活细胞达 95% 以上.

1.3 实验分组

提取的 PMN 分为 PLA₂、PLA₂+PBPB、PLA₂+PLA₂ 抗体; A23187、A23187+PBPB、A23187+PLA₂ 抗体等不同处理组. 分别置于 24 孔板, 经 37℃ 培养 60 min, 分别测定 PMN 趋化及粘附效应.

1.4 PMN 趋化

取各组处理的 PMN 10 μ l (大约 10 000 个细胞), 按文献 [5] 所述测定 PMN 在琼脂糖中向 TNF 或 FMLP 趋化的变化.

1.5 PMN 粘附

制备装填直径 2 mm 玻璃球的粘附柱, 将不同处理的 PMN (10^7 个细胞) 过柱, 计数流出液中 PMN 的数目, 比较 PMN 粘附的变化^[6].

* 总后勤部“八五”攻关课题.

收稿日期: 1994-11-27, 修回日期: 1995-01-24