

专论与综述

胞浆基质结构性(SCM)

张人德 张惠珠

(上海第二医学院生化教研室上海市免疫学研究所)

近年来荧光技术如荧光偏振、能量转移和流动系统的荧光测定等的应用在我国日益广泛。这种技术可以提供膜流动性、大分子构象及单个细胞的鉴别分离等新的信息。例如利用荧光偏振技术作细胞胞浆基质结构性。SCM测定,在国外是一项新技术,国内试用也开始不久。SCM的测定在肿瘤诊断、细胞免疫功能及激素敏感细胞的检测方面已取得的进展令人鼓舞,具有潜在的发展前景。本文就SCM的研究现状作一简要介绍。

1966年 Rotman^[1] 发现将二醋酸荧光素(FDA)引入有核细胞后,能在荧光显微镜下见到被黄绿色荧光标志的细胞,他把这一现象命名为细胞的荧光着色性。

70年代初, Cercek^[2-6] 首先利用这一原理观察酵母菌和中国田鼠卵巢细胞中荧光偏振度 P 的变化。他发现在细胞 G_0 和 G_1 期 P 值最大,从 S 期开始 P 值降低, S 后期达到最低值。在受到外部物理作用时, P 值也有变化。由于 P 值一般反映的是荧光分子微环境的粘滞度,但细胞内由于有亚细胞结构而远非均一的粘度环境,所以1974年 Cercek^[7] 首先提出“胞浆基质结构性”这一概念,来表达细胞内环境对荧光分子的影响,并以测得的细胞内部 P 值作为SCM的参数。他认为 P 值的改变可以反映细胞内基质结构状态的改变,就是说 P 值高SCM也高,反之亦然。

由此可见,SCM是指细胞内不均一胞浆基质结构的某种有序性,其分子基础包括有细胞内大小分子之间的相互作用,这种作用通过细胞内荧光偏振性质表现出来。目前它的准确

定义和分子基础都尚在研究之中。

一、SCM测定的原理

取得SCM反应细胞是SCM测定中一个关键步骤。当用酵母菌等普通细胞作反应细胞时,必须使它们的生长同步;用淋巴细胞作为反应细胞时,必须用密度离心法取出密度为1.08(320mOsm)的那部分细胞。

当无荧光的FDA底物溶液与细胞接触时,非极性分子FDA进入细胞,被细胞内非特异性酯酶水解出具有荧光的荧光素分子。极性分子荧光素不能通过细胞质膜,但当细胞膜有缺损或荧光素被修饰成弱极性分子时,也会少量地漏出到周围介质中。所以测定细胞内荧光时,应首先测定细胞悬液的总荧光强度 F_t ,然后用过滤法去除细胞及其内部的荧光素分子,只测滤液中即周围介质的荧光强度 F_f ,于是得到细胞内荧光强度 F_i :

$$F_i = F_t - F_f$$

此测定过程示意如图1。

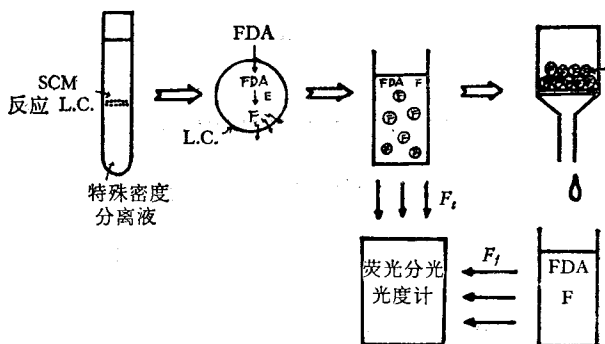


图1 SCM测定示意图

使用带有偏振附件的荧光分光光度计,即测得细胞内的荧光偏振度 P :

$$P = \frac{F_{VV} - F_{VH}}{F_{VV} + F_{VH}}$$

F_{VV} 和 F_{VH} 分别为激发偏振器和检测偏振器相互平行(光轴均为铅直方向)和垂直(前者铅直,后者水平)时的荧光强度。

二、SCM 本质的分析

当某些试剂作用于反应细胞,尤其是作用于淋巴细胞时,细胞的 SCM 会发生改变,有如细胞周期中的 P 值改变一样,我们称之为 SCM 反应。各家在研究 SCM 反应时对其分子生物学本质作了探讨,由于采用的方法和研究侧重点不同,取得的结果不一致,因此众说纷云。现择主要的介绍如后。

1. 蛋白质活性的改变引起 SCM 变化

Hashimoto^[8] 等发现 FDA 酶解时间越长,细胞内荧光素越多,荧光强度越大, P 值就越小。他们认为这可能是因为细胞内某些蛋白质或大分子上荧光素的结合点被饱和,游离的荧光素越来越多之故。这是因为小分子的荧光素弛豫时间 P 比其荧光寿命 τ 相对更短,所以退偏振作用也就更大。其他影响 FDA 酶解速度的因素,如离心力、刺激原(如 PHA、抗原等)都有可能通过荧光素产量的变化改变 P 值。

早期工作指出^[2-6], P 值与 FDA 的酶解速度常数 (k) 之间有很好的线性关系, k 大则 P 小,这与上述推论相符。当离心力、紫外线或 X 射线影响细胞内蛋白质分子的高级构象时,这一关系同样存在。Preece^[9,10] 等曾发现刺激原的存在能明显改变 FDA 酶解速度。因此可以推测,引起非特异性酯酶等有关蛋白质活性变化的因素会导致细胞内荧光素存在量的变化,这会进一步使 P 值发生变化。不过酶蛋白活性的改变引起 k 值的变化,与 SCM 的变化孰为因果,尚有待研究。

2. 细胞膜性质与 SCM

Blakeslee^[11] 做了用荧光素抗体淬灭细胞外游离荧光素的实验,目的是用这一方法代替

Cercek 经典的细胞过滤法,以排除周围介质对细胞内荧光强度的干扰。他同时发现,抗体浓度过大时,正常的 SCM 反应就消失,即 P 值不再降低。由于考虑到抗体不会进入细胞,但可能作用于细胞质膜,所以他推论 SCM 的变化是由细胞膜通透性改变所造成的。后来 Preece^[9,10] 等发现,在刺激原作用下细胞内荧光素经质膜的漏出率有明显增加,并指出了细胞膜的影响。由此看来,很可能是 SCM 反应时细胞膜性质发生某种变化,使附在其表面的一些荧光素荧光特性改变,从而造成 P 值的改变。而高浓度的抗体能淬灭这些荧光素,并抵消这些变化。很明显,有关细胞膜在此过程中的确切作用尚有待实验证实。

3. 线粒体代谢状态与 SCM

G_0 期细胞的 P 值在 510nm 处有一峰。在 S 期或 PHA 刺激下,此峰消失(即在 510nm 处 P 值降低),反映了这一条件下的 SCM 变化(图 2)。

Cercek^[12] 进一步从大鼠肝细胞中分离出各细胞器来进行实验,惊异地发现线粒体中荧光

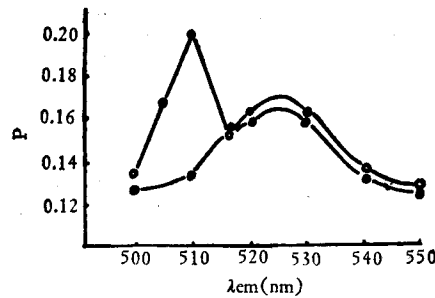


图 2 淋巴细胞的荧光发射偏振谱

$\lambda_{ex} = 470\text{nm}$, ○ 对照 ● PHA 或 CaBP 刺激的淋巴细胞

(引自 Cercek: *Biophys. J.*, 23, 395, 1978)

偏振谱的变化与完整细胞的这一变化是平行的。因此他认为,完整细胞的 SCM 变化是由于其线粒体内膜基质聚集了荧光素分子,当细胞被刺激时线粒体进入生产 ATP 的状态,使内膜基质内荧光素排列状态发生变化,并影响其跃迁偶极矩在吸收和发射时的状态,其偏振特性也发生变化,从而导致偏振谱亦即 SCM 的

变化。

关于 SCM 的本质还远远没有搞清楚。而且由于引起荧光分子退偏振作用的因素很多,所以在解释 SCM 反应现象时应考虑到各种可能性。正确的认识将有待于进一步设计精巧的实验。

三、SCM 反应的特点

不同来源的细胞,如血细胞、细菌、肿瘤细胞都具有 SCM 反应性,但是一般最常研究的是淋巴细胞。在外来试剂(如 PHA 等)作用下发生的 SCM 反应,而这一反应可能和淋巴细胞的活化有关,故具有理论和实际应用意义。下面列举淋巴细胞这一反应的一些特点。

1. SCM 反应要求特定细胞群

并非所有淋巴细胞,而是只有经特定密度分离方法得到的淋巴细胞群才具有 SCM 反应性。

Cercek^[13] 在人外周血淋巴细胞实验中得到这一特定密度范围在 1.080—1.086,作者^[14]又发现小鼠脾脏淋巴细胞的这一密度范围更窄,并且也绝不是通常对 PHA 或同种异型抗原反应最敏感的那部分密度的淋巴细胞(图 3)。它们是一群既能识别刺激原,又具有 SCM 反应能力的特殊细胞群。

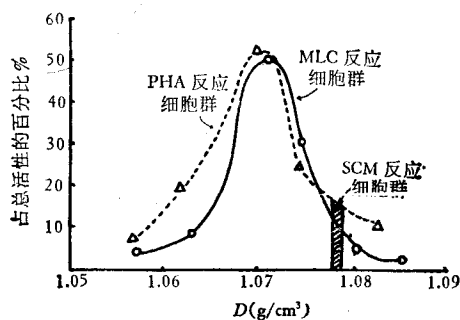


图 3 C₅₇BL 小鼠 SCM 反应细胞与 MLC、PHA 反应细胞的密度比较

许多工作者认为 SCM 反应阳性群细胞主要是 T 淋巴细胞,因为已知 T 细胞能被 PHA 活化,SCM 反应也可能是活化的一个环节。有作者^[15]单纯用 T 细胞诱出 SCM 反应;无胸腺小鼠的淋巴细胞对抗原和 PHA 都失去 SCM

反应,胸腺抽提物能促使无胸腺动物的骨髓细胞产生 SCM 反应^[16,17]。这些事实都说明了 T 细胞在 SCM 反应中的重要地位。用 Cercek 经典方法获得的 SCM 反应细胞中的 T 细胞可高达 87%。反之,非 T 细胞在 PHA 刺激之后 P 值会发生与 T 细胞相反的变化。但 B 前体细胞 Precursor cell 对 PPD 也能产生 15% 的 SCM 反应。我们的实验提示,一定比例的 T、B 细胞共同存在时可能有协同作用而产生较大的 SCM 反应。

另外,健康人和肿瘤患者外周血淋巴细胞的 SCM 反应是不同的(见后),但是这种差异实际上也许是由反应细胞百分数不同所引起的。经密度分离后,健康人 45—55% 的淋巴细胞对 PHA 有 SCM 反应,肿瘤患者只有 15—23%;但健康人对肿瘤碱性蛋白 (CaBP) 反应的淋巴细胞仅 3—5%,而肿瘤患者此数高达 36—45%。这一现象也提示肿瘤患者的一个重要特点是某一特征代谢的 T 淋巴细胞在数量上出现了显著改变。

2. SCM 反应的特异性

如上所述,一般能改变蛋白质高级构象的物理因素如离心力、X 射线、紫外线都能引起 SCM 的变化。此外,一些有特殊作用的生化试剂如 cAMP、4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone (R₀20-1724) 等也会诱导出 SCM 变化。

研究得较多的还是一些生物学制剂,如 PHA、ConA 等非特异性致分裂原 (Non Specific Mitogen),和 CaBP,主要组织相容性抗原等一些特异性抗原。有趣的是,不同刺激所引起的 SCM 改变程度都是接近的,即为对照组 SCM 值的 80% 或不足 80%。这给评定有无 SCM 反应提供了一个较稳定的客观标准。

非特异的致分裂原可引起正常淋巴细胞的反应,而特异的抗原只能引起特定细胞的 SCM 反应。如某一组织来源的肿瘤抗原只对该组织系统的肿瘤患者的淋巴细胞有较强的 SCM 刺激作用,而对其他系统肿瘤患者的淋巴细胞无此作用或作用甚小。某一成熟血细胞如粒细胞

的抑裂素 (Chalone), 只能特异地影响该细胞系祖先细胞 (Progenitor Cell) 的 SCM。当混合不同个体的淋巴细胞以诱导 SCM 反应时, 其结果与 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法测定的 MLC (Mixed Lymphocyte Culture) 反应 cpm 的变化相关, 说明组织相容性抗原是此反应的原因。

这些现象都提示了 SCM 反应并非一个简单的化学或者物理过程, 而是牵涉到分子生物学机理的一生物学重要作用。

3. SCM 反应的条件

SCM 反应要求严格的条件。缓冲液的 pH、 Ca^{++} 浓度、细胞周围介质的渗透压、FDA 浓度及酶反应的温度都对测知 SCM 反应至关重要。由此可见, SCM 反应是当细胞在某一严格特定条件下才发生的状态改变。这种对条件严格的要求是此种技术推广受到限制的一个主要原因。

四、SCM 的应用

1. 诊断肿瘤

目前的研究多是将 SCM 作为肿瘤疾病诊断的手段进行的。1974 年 Cercek^[7] 首先发现健康人、肿瘤病人和非肿瘤病人的外周血淋巴细胞在对 PHA、CaBP 及脑炎因子 EF 反应时, 它们的 SCM 呈不同性质的变化, 因此可以作

为肿瘤诊断的依据。

健康人外周血淋巴细胞与 PHA 共育 10 分钟后, P 值就下降到对照组的 80% 左右, 而肿瘤病人的外周血淋巴细胞对 PHA 不产生 SCM 反应; 反之, 肿瘤病人的外周血淋巴细胞对 CaBP 反应, 而健康人无此反应。以 SCM 反应比率 $RR_{SCM} = \frac{P_{CaBP}}{P_{PHA}}$ 作比较, 则健康人的 RR_{SCM} 值在 1.2—1.7 之间, 肿瘤病人在 0.6—1.0 之间。非肿瘤病人此值同健康人。EF 作用同 CaBP。

以后 Cercek 等还发现手术切除肿瘤病灶之后, 淋巴细胞的 SCM 在 24 小时后会恢复正常反应。良性肿瘤患者对 PHA 和 CaBP 都缺乏 SCM 反应。由此可见 SCM 测定有可能作为肿瘤良恶性的鉴别诊断和手术结果完满程度的指标。1981 年 Cercek^[17] 等发现用 Ehrlich 腹水癌细胞注射小鼠后, 在 1—2 小时内其外周血淋巴细胞即有了 SCM 反应的肿瘤倾向性改变, 从而雄辩地证明了 SCM 进一步作为癌症早期诊断指标的可能性。在这一实验中, Cercek 认为肿瘤患者血液中还存在着一种 56℃ 加温 15 分钟可被灭活的因子, 它可以使健康者的淋巴细胞发生类似肿瘤患者 SCM 反应特性的倾向。

表 1 用 SCM 测定鉴别诊断肿瘤疾病

作 者	年份	方 法	健康者		肿瘤患者		非肿瘤患者	
			例数	RR_{SCM}	例数	RR_{SCM}	例数	RR_{SCM}
Cercek	1974		71	1.28—1.60	41	0.63—0.9	17	1.29—1.59
Cercek	1977		270	1.46	269	0.76	77	1.78
高久史磨	1977		17	1.1—1.6	72	0.6—1.0	9	1.1—1.6
Takaku	1977		15	—	33	—	12	—
Kreutzman	1978	单用 PHA	32	73—90%*	20	99—106%*	18	74—105%*
Hashimoto	1979	测单细胞	5	1.17—1.34	5	0.61—0.96	5	1.17—1.26
φRJASAETER	1979	测 T 细胞	16	1.27	14	0.77		
Blakeslee	1979	A_b 淬灭法**						
Mitchell	1980		所有结果中 60% 与 Cercek 相同					

* 与空白对照组相比 ** 无具体数据报告

近年各国工作者所取得的测定结果可见表1。

也有的作者只获得与 Cercek 部分相同或完全不同的结果。譬如 Preece^[9,10] 等的实验结果表明健康者与肿瘤患者外周血淋巴细胞对 PHA 和 CaBP 的反应无差别,而发现荧光素从细胞中的漏出率和 FDA 的酶解率变化在这两者呈明显不同。这些观察都有待于今后进一步探讨。

2. 细胞表面移植抗原识别的检测

由于估计了 SCM 反应可能和淋巴细胞活化有关,本文作者^[14]试以小鼠脾淋巴细胞作为主要材料,将 SCM 测定用于移植免疫学的 MHC (Major Histocompatibility Complex) 配型方面,取得一定进展。

不同个体淋巴细胞表面组织相容性抗原的识别,以往只能借助于淋巴细胞活化后期 DNA 合成增高的原理,用同位素标记的 DNA 合成前体掺入这一方法来测知。实验费时较长,干扰也多。而测定细胞识别早期的生物物理状态改变即 SCM 测定方法,实验只需几小时,结果也较稳定可靠。我们以 $RR_{SCM} = \frac{P_{\text{实验}}}{P_{\text{对照}}}$ 表示其反应差异,则两细胞来自同品系时(即组织相容时) $RR_{SCM} > 0.95$, 两细胞来自不同品系时(即组织不相容时)为 0.7—0.8 之间。此结果与传统同位素方法平行。

除此以外, SCM 方法在激素敏感细胞及

细胞免疫功能的检测方面预计可得到成功的应用。

SCM 概念的提出至今尚不足十年,各方面工作都做得不够充分。由于 SCM 测定技术上的困难,成功地重复这一实验的作者还不很多。今后如能建立起精确可靠的 SCM 试验方法,则为医学临床应用和淋巴细胞活化的分子生物学水平机理等理论研究提供了一个新的途径。

参 考 文 献

- [1] Rotman, B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **55**, 134, 1966.
- [2] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **10**, 187, 1974.
- [3] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **9**, 105, 1973.
- [4] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **2**, 109, 1973.
- [5] Cercek, L., et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **21**, 445, 1972.
- [6] Cercek, L. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **22**, 539, 1972.
- [7] Cercek, L. et al.: *Br. J. Cancer*, **29**, 345, 1974.
- [8] Hashimoto, Y. et al.: *Br. J. Cancer*, **40**, 156, 1979.
- [9] Preece, A. W. et al.: *Br. J. Cancer*, **38**, 197, 1978.
- [10] Balding, P. et al.: *Br. J. Cancer*, **14**, 73, 1980.
- [11] Blakeslee, D.: *JNCL*, **23**, 325, 1979.
- [12] Cercek, L. et al.: *Biophys. J.*, **23**, 403, 1979.
- [13] Cercek, L. et al.: *Eur. J. Cancer*, **13**, 903, 1977.
- [14] 张人德: 研究生论文,上海第二医学院,1982.
- [15] RJASAETER, H. et al.: *Br. J. Cancer*, **40**, 628, 1979.
- [16] Cercek, L. et al.: *Immunology*, **29**, 885, 1975.
- [17] Cercek, L. et al.: *Eur. J. Cancer*, **17**, 167, 1981.
- [18] Cercek, L. et al.: *Br. J. Cancer*, **33**, 539, 1976.

[本文于1982年12月1日收到]

钙离子活化的磷脂依存性蛋白质磷酸化酶

于秉治

西塚泰美

(中国医科大学生化组)

(日本神户大学医学部第二生化)

多种多样的细胞机能,适应性及分化等现象均受激素或神经介质等生理活性物质所调节。其机理的研究从来就是生物学研究的主要课题。自发现了 cAMP 后,使人们产生了一种激素的作用原理似乎已完全清楚了的想

而 20 多年的研究表明 Ca^{2+} 也是激素及神经作用的机能调节上的一个不可缺少的物质。

我们在研究 cAMP 及 cGMP 所调节的蛋白质磷酸化酶的过程中偶然发现了一种新的蛋白质磷酸化酶(简称 C-激酶)。此酶的活化与