

GM₃ 在几种哺乳动物肝脏和狗红细胞中的含量及其分离纯化*

崔肇春 侯卫红** 朱正美

(大连医学院生物化学教研室)

提 要

从正常兔、猪和狗的肝脏及狗红细胞中分离纯化了总神经节苷脂,测定了脂结合唾液酸,进行了高效薄层层析,比较了上述四种组织中 GM₃ 的含量。结果表明狗红细胞中的 GM₃ 的含量较另三种的高,狗肝和兔肝次之,猪肝含量甚微。从狗红细胞中提取和纯化了 GM₃,其得量为每毫升压积红细胞 351.0 μg,纯度为 92.2%。

关键词 神经节苷脂, GM₃, 肝脏, 狗红细胞

神经节苷脂(ganglioside, Gl_s)是含唾液酸的酸性鞘糖脂。它由亲水的寡糖链与亲脂的神经酰胺两部分组成。Gl_s与其他的糖脂一样,分布在质膜脂双层的外层,其神经酰胺部分插入质膜中而糖链则游离在质膜外的水相中。目前认为 Gl_s 可做为信息分子,参与感知细胞外的信息,从而与细胞的相互识别、粘着、分化、癌变等过程有关^[1]。Gl_s 又按其糖链中糖基与唾液酸基的数目而分为多种,GM₃ 是含有两个己糖基与一个唾液酸基的 Gl_s。

近年发现 GM₃ 与某些细胞的增殖和分化密切相关。如外源性 GM₃ 能明显抑制 Swiss 小鼠 3T3 培养细胞的生长^[2]。当人的早幼粒白血病 HL-60 细胞和单核样白血病 U937 细胞在含 GM₃ 的无血清培养液中培养时,细胞的增殖受到抑制,并分化为成熟的单核细胞^[3,4]。这有可能为白血病的治疗提供新的手段。为了在国内开展这方面的研究,首先应寻找一种 GM₃ 含量高而且容易得到的组织或器官。已知 GM₃ 在人的肝脏含量十分丰富^[5],但取材困难。本文测定了四种容易得到的动物材料的 GM₃ 含量,其中以狗红细胞中 GM₃ 的含量最

高。我们综合了 Klenk 等^[6]与 Ledeen 等^[7]的方法,从狗红细胞中提取了 GM₃,得量与纯度都较满意。

材 料 和 方 法

一、材料 DEAE-Sephadex A-25 (瑞典 Pharmacia 产品), Iatrobeads (日本 Iatron 产品), 高效薄层层析板 (HPTLC 板, 西德 E Merck 产品), 标准 GM₃ (上海医大生化教研室惠赠), 标准牛脑 Gl_s (意大利 Fidia 实验室惠赠)。

正常兔肝、狗肝、狗血来自大连医学院动物供应室,猪肝购自大连市屠宰厂。

二、方法 总 Gl_s 的分离与纯化按文献

* 本文所使用的神经节苷脂的命名系采用 L. Svennerholm 系统(J Lipid Res, 1964; 5: 145), IUPAC-IUB 的推荐 (Lipids, 1977; 12: 455), 该推荐亦载于 J Biol Chem, 1982; 257: 3347. GM₃, II³NeuAc-LacCer; GM₁, II³NeuAc-GgOse₃Cer; GM₁, II³NeuAc-GgOse₄Cer; GD₁, II³(NeuAc)₂-LacCer; GD_{1a}, II³NeuAc-IV³NeuAc-GgOse₄Cer; GD_{1b}, II³(NeuAc)₂-GgOse₄Cer; GT_{1b}, II³(NeuAc)₂-IV³NeuAc-GgOse₄Cer。

** 现工作单位: 郑州河南医科大学生化教研室。

[7,8]的方法进行。用氯仿(C)/甲醇(M)混合液(2:1, 1:1, 1:2)依次提取得总脂质。经 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱处理,除去中性脂类。再经碱水解除磷脂、透析、Iatrobeads 吸附柱层析,即得总 GIs。以此纯化样品进行 HPTLC 分析,得 GIs 层析图谱,经薄层扫描,求得 GM₃ 的百分含量。

狗红细胞 GM₃ 的提取与纯化系参照 Klenk 等^[6]与 Ledeen 等^[7]的方法进行。经 C/M 混合液提取,反复 Folch 分配,保留水相。再经 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析分离出单唾液酸部分,经乙酰化、Florisil (一种硅胶)吸附柱层析、去乙酰化、透析、冻干,即得 GM₃ 纯品。

唾液酸的测定按文献 [9] 的方法,测得总 GIs 中的脂结合唾液酸 (LBSA),以此表示 GIs 的总量。

高效薄板层析按文献 [7] 进行。点样于 HPTLC 板上,以 C/M/0.2%CaCl₂·2H₂O (60:40:9, v/v/v) 展开,用间苯二酚试剂显色。薄层图谱扫描用岛津 CS-910 扫描仪。扫描光波长 500nm,速度 20mm/min,狭缝长×宽为 0.4×0.05mm。

结果与讨论

一、兔、猪、狗的肝脏组织和狗红细胞中 LBSA 的含量及其 GIs 的 HPTLC 图谱

上述四种组织中 GIs 的总量以 LBSA 的量来表示,其测定结果列于表 1,其总 GIs 图谱分别

表 1 兔、猪、狗肝及狗红细胞的 LBSA 的含量
Table 1 LBSA contents of the liver of rabbit, pig, and canine and of canine erythrocytes

样 品 sample	例数 numbers	LBSA 含量 LBSA content ($\bar{x} \pm SD$, $\mu\text{g/g}$ wet wt)
rabbit liver	4	52.8 $\pm$ 1.5
pig liver	4	36.3 $\pm$ 1.0
canine liver	4	66.4 $\pm$ 2.5
canine erythrocytes	3	59.7 $\pm$ 4.9

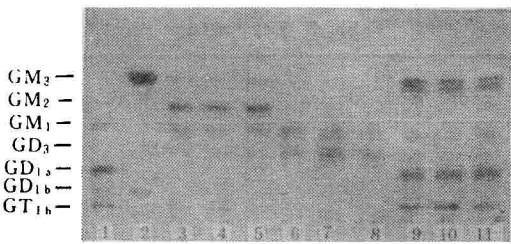


图 1 兔、猪、狗肝总 GIs 的 HPTLC 图谱
Fig. 1 HPTLC pattern of total gangliosides of the liver of rabbit, pig, and canine

1, Standard bovine brain gangliosides; 2, Standard GM₃; 3,4,5, rabbit liver; 6,7,8, pig liver; 9,10,11, canine liver. Developing system: C/M/0.2% CaCl₂·2H₂O = 60:40:9(v/v/v); visualized by spraying with resorcinol-HCl reagent

见图 1 和图 2。将 HPTLC 图谱进行扫描,求得各 GIs 组分的百分含量(见表 2)。从表 1 可见,狗肝的 LBSA 含量最高,狗红细胞次之。结合图 1,2 及表 2 可以看出就绝对量而言,狗红细胞中 GM₃ 含量最高,每克湿组织可达 57.2 μg ,而狗肝仅 21.6 $\mu\text{g/g}$ 湿组织。最后选定狗红细胞为提取 GM₃ 的材料。结果还表明,兔肝可做为 GM₂ 的丰富来源。文献报道^[10] Tay-Sachs 病人的组织含大量 GM₂,但材料难得到。另外猪肝也可做为 GM₁ 及 GD₃ 的丰富来源。在狗肝中,GD_{1a} 与 GT_{1b} 大量出现,也值得注意。

二、GM₃ 的提取和纯化 用两批狗红细

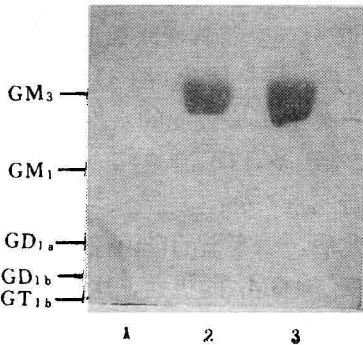


图 2 狗红细胞中 GIs 的 HPTLC 图谱
Fig. 2 HPTLC pattern of total gangliosides from canine erythrocytes

1, Standard bovine brain gangliosides; 2, Standard GM₃; 3, canine erythrocyte gangliosides

表 2 四种组织的 Gls 主要组分的%含量

Table 2 Percentage contents of the main gangliosides of different tissues

Gls 种类 ganglioside species	兔 肝 rabbit liver	猪 肝 pig liver	狗 肝 canine liver	狗红细胞 canine erythrocyte
GM ₃	14.3	—	32.5	95.8
GM ₂	47.5	—	—	—
GM ₁	20.0	40.9	12.7	—
GD ₃	15.2	33.6	—	—
GD _{1a}	—	—	22.9	—
GT _{1b}	—	—	15.2	—
others	3.0	25.5	16.7	4.2

胞,其压积各为 200ml 和 400ml。第一批得 GM₃ 65mg,纯度为 91.0%;第二批得 GM₃ 150 mg,纯度为 93.4%。第二批提取中各步骤 LBSA 的回收率列于表 3。以总脂质提取物中的 LBSA 含量为 100%,最后得率为 78.6%,结果满意。

表 3 GM₃ 提取各步骤中 LBSA 的回收率Table 3 LBSA recovery of different steps in GM₃ purification

步 骤 steps	总 LBSA total LBSA (mg)	回收率 recovery (%)
Total lipid extract	38.4	100
Pooled Folch partition upper phase	36.4	94.8
Ion exchange column chromatography	35.2	91.6
Deacetylated product	30.2	78.6

在 GM₃ 提取过程中,按文献[6]共进行了 5 次 Folch 分配。将各次水相定容至 190ml,取 20 μ l 点样,层析展开(图 3)。从层析结果可见,第一次 Folch 分配的水相中 GM₃ 含量甚微,第二次最多,以后递减,第五次含量很少,故不再进行第六次分配。

乙酰化后,糖基上的自由羟基都变为乙酰基从而改变了 GM₃ 的极性,这种改变有利于 GM₃ 在 Florisil 柱层析时与其他 Gls 的分离。分离后再用稀 NaOH 液处理,使脱乙酰化,又得到 GM₃。

Klenk 在文献[6]报道从 11.2 升狗全血中得 Gls 1.05g (其中 95% 以上为 GM₃),略算

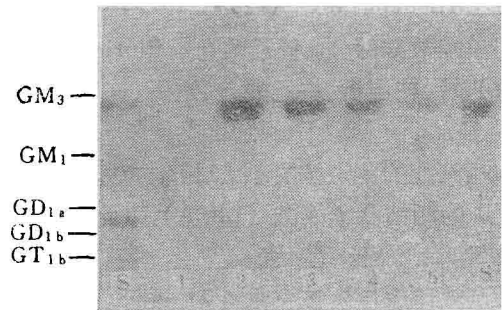


图 3 五次 Folch 分配水相的 HPTLC 图谱

Fig. 3 HPTLC pattern of gangliosides from the upper layers of 5 successive Folch partitions of canine erythrocyte total lipid extract

S, Standard gangliosides from bovine brain + Standard GM₃; 1,2,3,4,5, the 1st to 5th Folch partitions, respectively; S', Standard GM₃ only

其产率为每 500ml 压积红细胞得 GM₃ 80mg。本文作者的产率每 500ml 压积红细胞为 175 mg,约为 Klenk 的 2.2 倍。我们在部分工作中用国产 DEAE-纤维素代替进口的 DEAE-Sephadex A-25,效果也较满意。今后我们还将寻找更为廉价的 GM₃ 提取材料,为 GM₃ 的临床应用开拓更加广阔的前景。

参 考 文 献

- 1 Hakomori S -I. *Ann Rev Biochem*, 1981; 50: 733
- 2 Bremer E G et al. *J Biol Chem*, 1984; 259: 6818
- 3 Saito M et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 132: 223
- 4 Nojiri H et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 782
- 5 朱正美等. 上海第一医学院学报, 1983; 10: 3
- 6 Klenk E et al. *Deut Z Verdauungs Stoffwechselkrankh*

- kheiten*, 1960; 20: 180
- 7 Ledeen R W *et al. Methods in Enzymology*, 1983; 83: 139
- 8 Kanfer J N *et al. Handbook of lipid research*. Plenum Press, 1983: 9—16

- 9 Aminoff D. *Biochem J*, 1961; 81: 384
- 10 Li S -Ch *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1981; 101: 479

[本文于1989年3月18日收到]

ISOLATION AND COMPARISON OF GM₃ GANGLIOSIDE CONTENT IN THE LIVER OF SOME MAMMALS AND CANINE ERYTHROCYTES

Tsui Zhaochun Hou Weihong Zhu Zhengmei
(Dept. of Biochemistry, Dalian Medical College, Dalian)

ABSTRACT

Total gangliosides were isolated from the liver of healthy rabbit, pig, canine, and canine erythrocytes. After high performance thin layer chromatography of the total gangliosides, the chromatograms were scanned by TLC scanner, the percentage contents were obtained. On the basis of lipid-bound sialic acid contents, the authors found that canine erythrocyte had the highest GM₃ content. GM₃ isolated from compacted canine erythrocytes with a yield of 351.0 μ g per ml and the purity was 92.2%.

Key words ganglioside GM₃, liver, canine erythrocytes

(上接第 170 页)

显然是一个尚未解决的问题。

最后, 抗体酶是抗体与酶结合的产物, 它的发展有赖于抗体与酶的结构与功能的深入研究, 特别是对酶的作用机制的深入研究。而目前人们对抗体, 尤其是对酶的认识是极为肤浅的。

结 束 语

抗体酶作为一种新的生物工程技术已向人们展示了潜在的理论及应用价值。人们期望通过多学科的交叉协作, 随着单克隆抗体技术的发展及酶的作用机制的不断阐明, 抗体酶一定会给出更加令人振奋的成果。

参 考 文 献

- 1 Tramontano A *et al. Science*, 1986; 234: 1566
- 2 Schultz P G. *Science*, 1988; 240: 426
- 3 Williams W V *et al. Biotechnology*, 1989; 7: 471
- 4 Pollack S J *et al. Science*, 1988; 242: 1038
- 5 Pauling L. *Am Sci*, 1948; 36: 51
- 6 Lerner R A *et al. Sci Ame*, 1988; 258(3): 42
- 7 Slobin L I. *Biochemistry*, 1966; 5: 2836
- 8 Raso V *et al. Biochemistry*, 1975; 14: 591
- 9 Burd J F *et al. Analytical Biochemistry*, 1977; 77: 56
- 10 Kohen F *et al. Biochim Biophys Acta*, 1980; 629: 328
- 11 Royer G P. *Advances in Catalysis*, 1980; 29: 223
- 12 Pollack S J *et al. Science*, 1986; 234: 1570
- 13 Napper A D *et al. Science*, 1987; 237: 1041
- 14 Hilvert D *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 4953
- 15 Jackson D Y *et al. J Am Chem Soc*, 1988; 110: 4841

[本文于1989年9月22日收到]