

表3 K 和 G^0

例号	对照组		病人组	
	K	G^{0**}	K	G^{0**}
1	0.081	1488	1.22	-722
2	0.482	432	1.50	-592
3	0.176	1029	3.71	-776
4	0.200	952	4.01	-882
5	0.175	1032	0.74	178
6	0.292	728	0.48	432
7	0.212	918	3.22	-692
8	0.257	804	8.17	-1244
9	0.251	818	0.67	237
10	0.251	818	1.22	-118
11	0.290	733	4.01	-822
平均	0.234	887	2.63	-455
标准差	± 0.107	± 261	± 2.31	± 545
*			$P < 0.05$	$P < 0.05$

* 病人与对照组相比

** 单位为卡·克分子⁻¹·度⁻¹

ADP 混合时,判断可否自发进行的程度, G^0 是负值时表示反应可自发进行;负的绝对值愈大,表明自发进行程度愈高。 K 和 G^0 的结果如表3。

从表3可见,对照组的 K 值比病人的小,即达平衡时,血小板的凝聚数与分散数的比值,对照组小,病人组大。从自由能看,对照组为正值,平均为 887 卡·克分子⁻¹·度⁻¹,而病人多数是负值,平均 -445 卡·克分子⁻¹·度⁻¹。可见病人的反应容易自发进行,对照组与之相

反。

四、讨 论

我们首次用动力学和热力学的观点,研究了血小板与 ADP 的反应并计算了正、逆反应速度常数 K_1 和 K_{-1} ,平衡常数 K 和标准自由能 G^0 。其中 K_1 、 K 和 G^0 能区别正常人和缺血性疾病的界限,可用它们在临床上判断血小板功能异常,同时也为血小板功能异常变化提供了符合实际的理论依据。正常人和病人的血小板在本实验条件下对 ADP 的反应曲线,每个人都不相同,大致可分为三种类型,大多数遵循 $A \rightleftharpoons B$ 的可逆型,少数凝聚发生最大值后略有下降,另有少数呈两次凝聚型,但用 χ^2 检验,仍符合 $A \rightleftharpoons B$ 的可逆曲线。但是否有更为精密的模型以及在其他 ADP 浓度下的凝聚曲线的表达,还有其他致聚剂(如肾上腺素、胶原等)表现,这些均是值得进一步探讨的问题。

参 考 文 献

- [1] 施永德等:《生物化学与生物物理进展》,4,49,1982。
- [2] 陈松鹤等:《上海第一医学院学报》,9(2),87,1982。
- [3] Velaskar, DS et al: *Am. J. Clin. Pathol.*, 77 (3), 267, 1982。
- [4] Minnear, FL et al: *Am. J. Physiol.*, 242 (4), H 645, 1982。

[本文于1983年2月2日收到]

融合细胞质膜内化与过剩的估算

郑富盛 唐智琴 岳丽清

(北京医学院生物物理教研室、生物教研室)

细胞相融合时,一部分质膜内化,一部分质膜过剩。我们在电镜观察的基础上,提出了细胞融合时质膜变化的数学模型,估算了质膜的内化率与过剩率,并对电镜下见到的质膜形态

变化做出了适当的解释。

一、材料与方 法

1. 融合系统 小鼠 Ehrlich 腹水癌(以下

简称艾癌)细胞与成熟的鸡红细胞悬液,加入经紫外线灭活的仙台病毒^[1]的鸡胚尿囊液,先在冰水中摇动,然后在 37℃ 下融合 1 小时。

2. 电镜方法 融合细胞经戊二醛及锇酸固定,丙酮脱水,环氧树脂包埋,超薄切片经醋酸铀及枸橼酸铅染色, H-500 电镜观察。其中一部分标本经铂噬啉兰^[2]块染,使细胞表面的质膜带着一层染色剂,而与内化质膜相区别。

二、电镜观察结果

在本实验系统中,可以见到各种融合细胞,包括①艾癌细胞自融的同核体;②鸡红细胞自融的同核体,细胞膨胀,胞浆密度变小(图 1 见封 3);③融合红细胞的血影,其中有大量的内化质膜(图 2 见封 3);④艾癌细胞与鸡红细胞相融合形成的异核体(图 3 见封 3)。在以艾癌细胞为主的大融合细胞的局部表面,可见到胞浆微突增多与密集(图 4 见封 3),而在只含两三个核的小融合细胞中,细胞表面与单个艾癌细胞无明显差别。

三、数学模型

细胞融合是一个复杂的生物学过程。为了运用数学方法分析它的某些特征,有必要做一些简化。我们主要考虑同种细胞的融合。设细胞为大小一致的球体(艾癌细胞本来就近似球体;鸡红细胞在融合初期,在仙台病毒作用下,也膨胀起来,近乎球体),其体积以 V_1 表示。暂不考虑细胞表面的微绒毛,视球体的表面积为质膜的面积,以 A_1 表示。 n 个细胞相融合时,若胞浆密度不变,则融合细胞的体积 V_n 为:

$$V_n = nV_1 \quad (1)$$

若融合细胞成一球体,则其表面积 A_n 为:

$$A_n = n^{2/3} A_1 \quad (2)$$

n 个细胞原有质膜的面积为 nA_1 , 与 (2) 式相比,就有多余。多余的质膜,若进入胞浆,则称为内化(内化质膜一般都解体,但有时能看到残迹);若留在表面,则称为过剩。

我们设想三种情况。

(1) 质膜不内化,即融合后,原有的质膜全部留在细胞表面上。我们把过剩质膜的面积对融合细胞应有的面积之比值称为过剩率 e , 则

$$e = \frac{nA_1 - A_n}{A_n} = n^{1/3} - 1 \quad (3)$$

从表 1 中的数据可以看到,在质膜完全不内化的情况下,大融合细胞质膜过剩可达 2、3 倍。

(2) 质膜不过剩,即融合后质膜的面积为 A_n , 多余的质膜全部内化。我们把内化质膜的面积对原有质膜面积之比值称为内化率 f , 则

$$f = \frac{nA_1 - A_n}{nA_1} = 1 - n^{-1/3} \quad (4)$$

从表 1 中的数据可知,在质膜完全不过剩的情况下,大融合细胞可有 2/3 以上的质膜内化。

上述两种情况是两个极端。实际情况介乎两者之间。我们对实际融合结果提出如下的数学模型。

(3) 单次融合质膜内化率恒定。

设想两个细胞融合时,每个细胞质膜各内化 kA_1 , 即融合一次后,融合细胞的表面质膜比融合前减少 $2kA_1$ 。以后,再与另一个细胞相融合时,表面质膜又减少 $2kA_1$ 。以此类推,则 n 个细胞组成的融合细胞,表面质膜面积为:

$$A'_n = nA_1 - (n-1)2kA_1 = n'A_1 \quad (5)$$

表 1 融合细胞质膜的内化率与过剩率

n	1	2	3	5	8	15	27	64
e	0	0.260	0.442	0.710	1.000	1.466	2.000	3.000
f	0	0.206	0.307	0.415	0.500	0.595	0.667	0.750
n'	1	1.59	2.18	3.35	5.12	9.23	16.3	38.0
e'	0	0	0.046	0.146	0.279	0.518	0.810	1.38
f'	0	0.206	0.275	0.330	0.361	0.385	0.397	0.406

式中 $n' = n - 2k(n-1)$ 。我们把 k 称为单次融合的质膜内化率,并视 k 为常数,即 k 与 n 无关。因此,此模型可称为单次融合质膜内化率恒定模型。

k 值的大小,可估算如下。从融合细胞的电镜图象看,小融合细胞的表面与单个未融合细胞表面形态无显著差异。据此,我们假设两个细胞融合时,质膜无过剩,即

$$A'_2 = A_2 \quad (6)$$

将(2)、(5)两式中的 n 代以 2,再代入(6)式中,得 $k = 0.206$,即单次融合的质膜内化率为 20.6%。

在这种情况下,融合细胞质膜的内化率为:

$$f' = \frac{nA_1 - A'_n}{nA_1} = 1 - \frac{n'}{n} = 2k \left(1 - \frac{1}{n}\right) \quad (7)$$

在(7)式中, n 越大, f' 也越大,内化率的最大值为 41.2%。

同时,质膜的过剩率为:

$$e' = \frac{A'_n - A_n}{A_n} = \frac{n'}{n^{2/3}} - 1 \quad (8)$$

从表 1 中 e' 的数据可知,在大融合细胞中,虽然内化率 f' 增加,质膜的过剩仍比较明显。

四、讨 论

由我们的数学模型得出的主要结论是:单次融合的质膜内化率为 20.6%,融合细胞的质膜内化率在 20.6% 至 41.2% 之间,小融合细胞的质膜无明显过剩,大融合细胞的质膜过剩率可达 80% 以上。由于这些结论是在简化的条件下得到的,因此这些数据只可能与实际情况相近似。然而,它们是否反映了细胞融合质膜变化的基本特征,仍可以根据电镜观察的结果,做一些初步的估算。

以鸡红细胞的同核体为例,它的特点是胞浆膨胀。如果质膜变化按上述模型,而膨胀的胞浆把融合的红细胞撑成球形,则融合细胞的体积为:

$$V'_n = n^{3/2} V_1 \quad (9)$$

表 2 是原有细胞体积与膨胀后体积的比较。我们用立体学方法^[3]对鸡红血球自融多核体进行分析,结果与本文基本符合,将另行发表。

表 2 融合细胞膨胀前后体积的比较

V_n/V_1	1	2	3	5	7	10	15	20
V'_n/V_1	1	2	3.21	6.14	9.64	15.8	28.1	42.5

再从融合红细胞的血影看,由于溶血,内化质膜保存下来,可以看到内化质膜的量是很大的。从形态看,一个球,切去面积为 20% 的球冠,切圆的直径应为球直径的 80%,剩下的球缺,通过它作任意截面,所得截圆的周长,最多可缺少 30%。我们看到,在融合红细胞的血影中,质膜内化后,表面质膜所占的比例,基本上符合这种几何关系。

至于以艾癌细胞为主的融合细胞,胞浆无明显的膨胀,内化质膜只能看到残迹,但在大融合细胞的情况下,的确看到了明显的质膜过剩现象,它的表现形式是在表面局部地区出现大量密集的胞浆微突。在建立模型之初,我们没有考虑微绒毛,因此,若融合细胞表面有与未融合的艾癌细胞同样分布的微绒毛,不能看做质膜过剩。但大量密集的胞浆微突,将使细胞表面积增加很多,则是质膜过剩的表现。只是定量的计算,目前尚有困难。

Okada^[4] 在研究病毒被膜与细胞膜融合后产生的效应时,发现艾癌细胞经仙台病毒处理后,能够在细胞的一端形成大量的胞浆微突,但那是在融合之后,温育 3 至 4 小时,病毒抗原聚集所造成的现象。我们现在融合仅 1 小时,在大融合细胞中就见到了大量密集的胞浆微突,我们认为这用融合后质膜过剩来解释较为恰当。

综上所述,我们对融合细胞质膜变化提出的数学模型,能够解释电镜下所见到的现象。

参加本实验技术工作的还有卫之涓、刘智、王晶等同志

参 考 文 献

- [1] Okada, Y.: *Exptl. Cell Res.*, 26, 98, 1962.
- [2] 郑富盛等:《北京医学院学报》, 15, 3, 1983.
- [3] Williams, M. A.: *Practical Methods in Electron*

胆酸盐对蟾蜍皮肤静息电位的影响

李宏钧 周汉清

(复旦大学生物系)

近年来一些学者研究了胆酸盐对各种组织和细胞作用的理化效应^[1-3]。他们特别感兴趣的是这种物质对细胞透性、离子通道的影响,及胆酸盐同细胞膜蛋白之间的相互作用和溶解过程的分子特性。这类研究在理论和实践上都具有广泛意义。例如,将胆酸盐作为一种微扰探针,以获得有关离子通道和膜脂肪成分,即蛋白-脂肪相互作用的信息;或者用于膜蛋白的分级分离制备程序,借以提取某些受体^[6]和 Na-KATP 酶^[7]。

本文目的是结合我们原有上皮细胞透性的研究,进一步探索胆酸盐对蟾蜍离体皮肤跨皮静息电位(Transepithelial potential)的影响,并对作用的途径和机理进行讨论。

一、材料和方法

实验以上海郊区产中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)为材料,体重在30—90克之间,雌雄兼有。离体皮肤的制备是:毁动物脑脊髓,从腹部中央分离一块面积约10平方厘米皮肤,浸任氏液内平衡一小时左右,以减少损伤电位的干扰,然后固定在测量小室截面上。实验用测量皮肤电势的装置是根据 Ussing 和 Zerahn^[8](1951)的设计,并略作修改,以适应我们测量跨皮电位的需要。

跨皮电位(以下简称 TEP)系用函数记录仪记录,并以数学电压表监测。为满足本实验需要,特在函数记录仪输入级前加一只源跟随器(输入直流电阻 $\geq 10^9\Omega$,输入电容 $\leq 8\text{pf}$,栅

流 $\leq 5 \times 10^{-11}\text{A}$),以提高系统的输入阻抗值。测量采用自制甘汞电极,极间电势差小于0.5mV。测量时先在任氏液中校测电极电位,然后接入系统测量标本处于任氏液环境的 TEP 对照水平。待电位稳定后,用微型注射器从小室上方小孔注入一定浓度和体积的胆酸盐溶液,同时记录反应至读数恢复或接近原来水平方告一段落。

任氏液成分按下列比例配制: NaCl-115mM, KCl-2.0mM, CaCl_2 -1.1mM, NaHCO_3 -2.4mM, NaH_2PO_4 -0.1mM。室温下 pH 为 6.5—7.0。实验通常在 18—28℃ 条件下进行。

实验用牛胆酸钠试剂为包头生物化学制药厂产品。我们将这种胆酸盐晶体用任氏液配成 1 克/升的贮藏液放冰箱中备用,使用时根据需要稀释成相应浓度。pH6.4—7.0。

二、实验结果

1. 胆酸盐处理蟾蜍皮肤外表面时 TEP 的变化

为了确定施药前蟾蜍皮肤静息电位的正常水平,我们反复测试了处于任氏液内的皮肤标本因性别、年龄和温度差异带来的可能变化。实验结果表明上述因素对 TEP 的基础水平并无明显影响。虽然动物个体之间的 TEP 值存在着差异,但当测试条件一致,且采用自身对照实验方法,则检测的效应规律还是比较满意的。在获得皮肤 TEP 背景值之后,即着手胆酸盐的处理实验。用 $8 \times 10^{-4}\text{M}$ 牛胆酸盐处理蟾

〈融合细胞质膜内化与过剩的估算〉一文的图

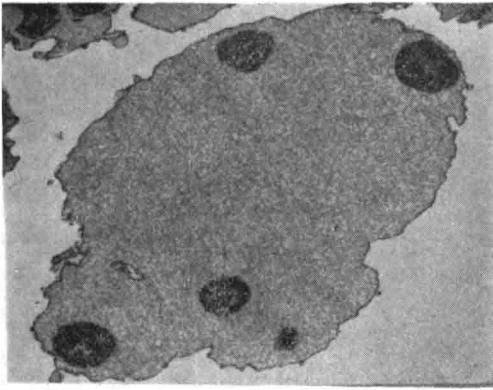


图1 鸡红细胞自融的同核体,(胞浆膨胀)
(4100 $\times$)。

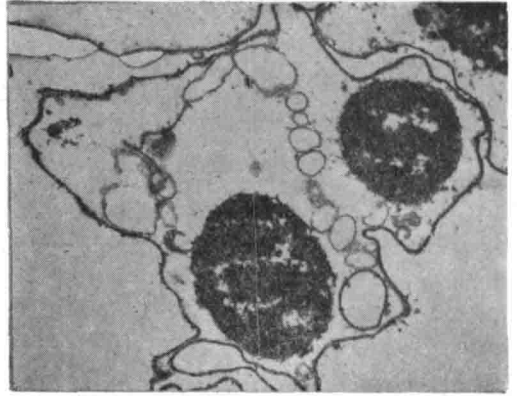


图2 鸡红细胞融合形成的血影(内化质
膜明显可见)(11000 $\times$)。

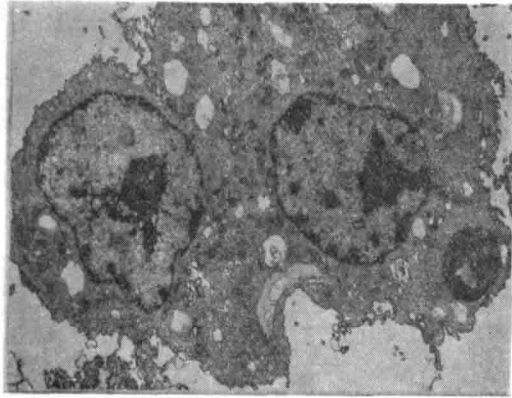


图3 艾癌与红细胞的异核体(融合过程尚未完成)
(4450 $\times$)。

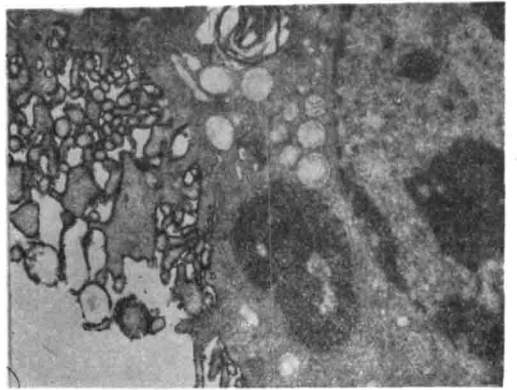
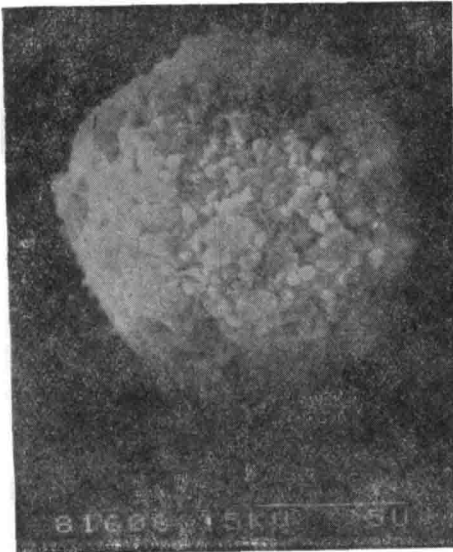
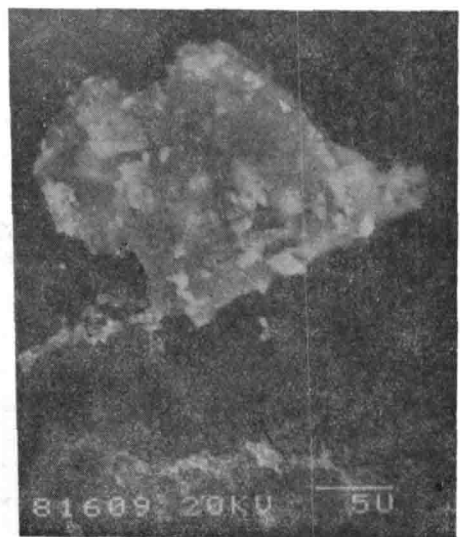


图4 大融合细胞局部表面的胞浆微突
(14000 $\times$)。

〈L₇₈₁₁ 白血病细胞质膜的分离和鉴定〉一文的图



A
A: L₇₈₁₁ 细胞 (9600 $\times$)



B
B: L₇₈₁₁ 细胞质膜片段 (9600 $\times$)

图1 L₇₈₁₁ 细胞及质膜扫描电镜图