

- Cancer Res Br J Cancer Res, 1990, **62** (1): 425~ 471
- 12 Nickell K A, Halper J, Moses H L. Transforming growth factors in solid human malignant neoplasms. Cancer Res, 1983, **43** (5): 1966~ 1971
- 13 Browder T W, Dunder C E, Nienhui A W, *et al.* Private and public autocrine loops in neoplastic cell. Cancer Cell, 1989, **1** (1): 9~ 12

Preliminary Studies on Mechanism of Inhibition of Gangliosides on BT325 Line Growth. LI A-Hua, YANG Dian-er, CHEN Hong, HUANG Ru-Bin (*Department of Biochemistry, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China*).

Abstract Radioligand binding assay and competitive radioassay of ^{125}I -EGF on plasma membrane EGF receptor and radio-receptor assay when ^{125}I -EGF was

incubated with human glioblastoma multiforme cells were carried out. The results showed that there is a high affinity binding site on BT325 cells plasma membrane, exogenous GM3 could not alter the affinity (K_d) of EGF binding with cell-surface receptors, but decrease the receptor number. GM3 could significantly prolong the endocytosis process of EGF-EGFR complex. The concentration of EGF in culture medium was unchanged by GM3 and BBG, but that of EGF in cytoplasm was increased by GM3. It suggested that GM3 might inhibit the secretion of EGF.

Key words human glioblastoma multiforme cell line BT325, ganglioside GM3, bovine brain gangliosides, EGF, inhibition, mechanism

H_2O_2 对红细胞抗原性与 LPO 影响的 FCM 研究

符乃阳 张尔贤¹⁾

(汕头大学理学院生物学系, 汕头 515063)

摘要 用流式细胞计 (flow cytometry, FCM) 测定 H_2O_2 损伤后的红细胞 (RBC) 与 IgG 的结合能力, 并直接检测细胞自发荧光的变化, 以研究 H_2O_2 对 RBC 抗原性和脂质过氧化 (LPO) 荧光产物生成的影响. 结果表明 RBC 抗原性和自发荧光变化与 H_2O_2 浓度和作用时间有关, 抗原性变化对 H_2O_2 更敏感, 比引起自发荧光明显增强所需 H_2O_2 浓度低两个数量级; 还发现了 RBC 抗原性和自发荧光的变化与细胞的散射光有相关性.

关键词 红细胞, 活性氧, 细胞膜损伤, 流式细胞计, 抗原性

学科分类号 Q73, Q26, R392.12

已有文献^[1~4]报道地中海贫血症、镰刀型贫血症患者的红细胞 (RBC) 膜上结合了 IgG; 衰老、损伤、储存的 RBC 与 IgG 结合能力也提高, 其机制可能是由于这些细胞膜上暴露出与 IgG 特异结合的新抗原 (neoantigen), Kay^[2] 建议把该抗原命名为“衰老细胞抗原 (senescent-cell antigen)”. 关于活性氧损伤使 RBC 抗原性改变, 已有人做过一些研究^[2~4], 但机理尚未清楚, 也还需用新的研究手段和仪器提供更多的证据. 检测 RBC 的脂质过氧化 (LPO), 以往常用的方法需破碎细胞, 分离产物再测定, 其结果是大量细胞的总体产物, LPO 产生的羰基化合物可继续和蛋白质或氨基磷脂的氨基基团生成一种发荧光的西夫碱 (Schiff's base)^[1], 可能会导致细胞的自发荧光增强. 本实验旨在用流式细胞计 (FCM) 从细胞水平上, 检测 H_2O_2 使 RBC 抗原性变化和发生 LPO 时

荧光产物生成, 并对两者关系做进一步的探讨研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

SD 大鼠由中国中医研究院实验动物中心提供, 体重 220~300 g, 雌雄随机.

1.2 主要试剂

纯 SD 大鼠 IgG (军事医学科学院微生物流行病研究所), SOD (华东理工大学), Sephadex G-25 (Pharmacia), FITC (Sigma), H_2O_2 (上海桃浦化工厂), 透析袋 (m. w. cutoff 12 000~14 000, 美国碳素公司), 其余试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-01-23, 修回日期: 1998-05-04

1.3 方法

1.3.1 FITC 标记 IgG 或 SOD: 按文献 [6, 7] 方法标记完后, 上 Sephadex G-25 柱 (20 cm × 1 cm), 用 pH 7.4 的生理盐水 PBS 洗脱, 先下来的绿色液为 FITC-IgG 或 FITC-SOD 液, 置透析袋中, 4℃ 冰箱中对 100 倍体积洗脱液透析 36 h, 中间换三次透析液。

1.3.2 RBC 的获得: SD 大鼠颈动脉取血, 肝素抗凝, 生理盐水 800 r/min 离心冲洗, 轻轻弃白细胞和最底层红细胞, 重复离心冲洗 3~4 次。

1.3.3 H₂O₂ 对 RBC 的损伤作用: 冲洗干净 RBC, 用含 0.5 mmol/L 的 NaN₃ 生理盐水配成 10% 细胞悬液, 室温作用 1 h, 以抑制过氧化氢酶 (catalase) 的活力, 0.3 ml 预处理 RBC 悬液, 加入 5 ml 含不同浓度 H₂O₂ 的 A 液 (含 0.5 mmol/L NaN₃, 0.9% NaCl, pH 7.4 的 PBS) 中, 37℃ 水浴 2 h, 或在某一 H₂O₂ 浓度下作用不同时间, 离心冲洗 4 次 (1 500 r/min, 5 min), 除去 H₂O₂, 压积细胞配成 1% 的悬液。

1.3.4 H₂O₂ 损伤 RBC 与 FITC-IgG 或 FITC-SOD 的结合: 1 ml 经 H₂O₂ 处理的 RBC 1% 悬液与 40 μl FITC-IgG 或 FITC-SOD 液混合, 4℃ 冰箱中作用 1 h, 1 500 r/min 离心 5 min, 重复 2~3 次, 洗掉未标记上的 FITC-IgG 或 FITC-SOD。

1.3.5 FCM 分析: FCM (型号 FACS420, 美国 Becton Dickinson 公司产品) 分析细胞的荧光和散射光的变化, 激发光波长 488 nm, 发射光波长 (530 ± 15) nm, 荧光强度用对数荧光分析, 每个样品收集 10 000 个细胞。

2 实验结果

2.1 RBC 溶血与 H₂O₂ 浓度的关系

同一动物个体的红细胞由不同年龄的细胞组成, 年龄不同的红细胞生理性质不同。文献 [5] 报道 H₂O₂ 可致使 RBC 发生溶血, FCM 是从细胞水平进行研究的仪器, 部分细胞溶血可能对 FCM 测定 RBC 抗原性和 LPO 荧光产物的生成有一定影响, 为此首先对 RBC 溶血与 H₂O₂ 浓度的关系进行研究。图 1 表明致使 RBC 溶血的 H₂O₂ 浓度范围很窄 ($6.0 \times 10^{-5}\%$ ~ $6.0 \times 10^{-4}\%$), 更低或更高 H₂O₂ 浓度都不能使 RBC 发生溶血。以下主要在不致使 RBC 溶血的 H₂O₂ 浓度范围, 研究其对红细胞抗原性和 LPO 荧光产物生成的影响。

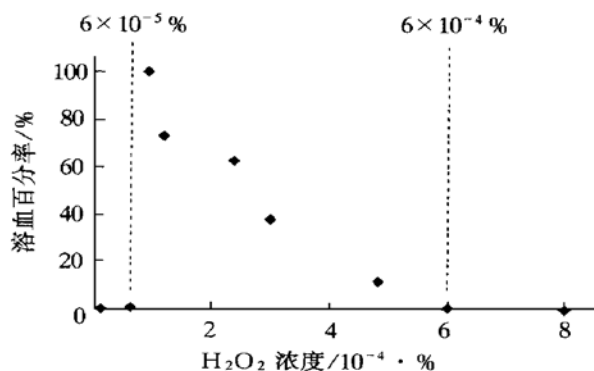


图 1 RBC 溶血与 H₂O₂ 浓度关系

RBC 在不同浓度 H₂O₂ 中作用 2 h, 离心, 测定上清液 A₅₄₀, 以 RBC 在水中完全溶血 A₅₄₀ 为 100%, 图上各点为三次独立实验的平均值。

2.2 H₂O₂ 对 RBC 抗原性的影响

图 2 为 H₂O₂ 处理 RBC 结合 FITC-IgG 的细胞数与对数荧光强度关系的组方图, 横纵坐标分别为对数荧光强度和细胞个数, R1 群细胞为阴性细胞, R2 群细胞为氧化损伤后与 FITC-IgG 结合使细胞荧光增强的阳性细胞, 在 $3 \times 10^{-6}\%$ ~ $3 \times 10^{-5}\%$ H₂O₂ 浓度范围, 阳性细胞百分率随 H₂O₂ 浓度升高而增加 (图 2b~ 图 2d); 在致使 RBC 部分溶血的 H₂O₂ 浓度范围 (图 2e), 阳性细胞又分为两个亚群; 浓度大于 $6 \times 10^{-4}\%$ 时, 阳性细胞消失, RBC 不再与 IgG 结合, 表明 IgG 与氧化损伤 RBC 结合是非常精细的反应, 细胞过度损伤反而丧失与 IgG 结合的能力。为了探讨 H₂O₂ 损伤 RBC 与 IgG 的结合并非由于细胞膜结构变化而与一般蛋白质的简单的物理吸附作用, 也非由于细胞膜通透性改变 FITC-IgG 通过扩散作用进入细胞内, 作者以损伤 RBC 与 FITC-SOD ($M_r = 32\ 000$) 的结合为比较, 结果发现所有 H₂O₂ 浓度处理的 RBC 都不与 FITC-SOD 结合 (图未出示)。

2.3 RBC 脂质过氧化荧光产物的检测

浓度低于 $6.0 \times 10^{-4}\%$ 的 H₂O₂ 处理 RBC, 用 FCM 不能检测到细胞的自发荧光有明显的变化; 在 $6 \times 10^{-4}\%$ ~ $2.4 \times 10^{-2}\%$ 的 H₂O₂ 浓度范围, RBC 自发荧光随 H₂O₂ 浓度升高而增强, 并达到最高, 表明 H₂O₂ 使 RBC 发生 LPO, 而且随 H₂O₂ 浓度升高有更多的荧光产物在 RBC 内生成和积累; 但 H₂O₂ 浓度继续升高, 细胞的自发荧光反而降低 (表 1)。当 H₂O₂ 的浓度为 $6.0 \times 10^{-3}\%$, RBC 的自发荧光随作用时间延长而增强 (图 3)。

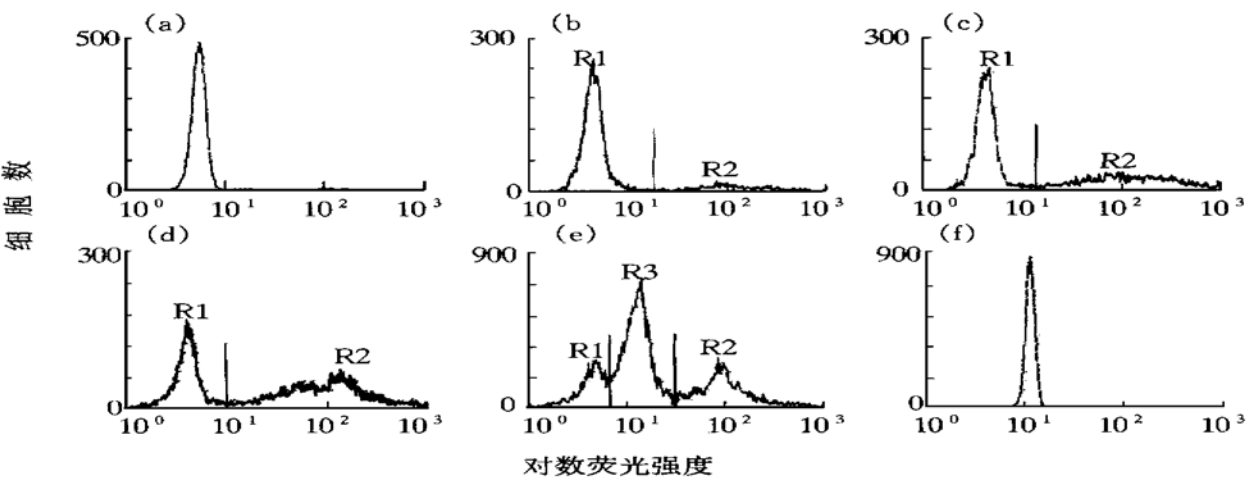


图2 H₂O₂ 浓度对 RBC 与 IgG 结合的影响

H₂O₂ 的浓度分别为 (a): 0%, (b): $3 \times 10^{-6}\%$, (c): $6 \times 10^{-6}\%$, (d): $3 \times 10^{-5}\%$, (e): $3 \times 10^{-4}\%$, (f): $2.4 \times 10^{-2}\%$, (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 中阳性细胞的百分率分别为 0.8%, 16.2%, 34.9%, 61.8%, 82% 和 0.3%.

表 1 H₂O₂ 浓度对 RBC 自发荧光的影响

H ₂ O ₂ 浓度/%	lg (平均荧光强度)
0	0.413±0.03
6×10^{-4}	0.477±0.07
1.2×10^{-3}	0.58±0.11
3.6×10^{-3}	0.766±0.14
6.0×10^{-3}	0.977±0.10
2.4×10^{-2}	1.01±0.09
7.2×10^{-2}	0.874±0.18
6.0×10^{-1}	0.684±0.06
1.2	0.599±0.10

注: $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

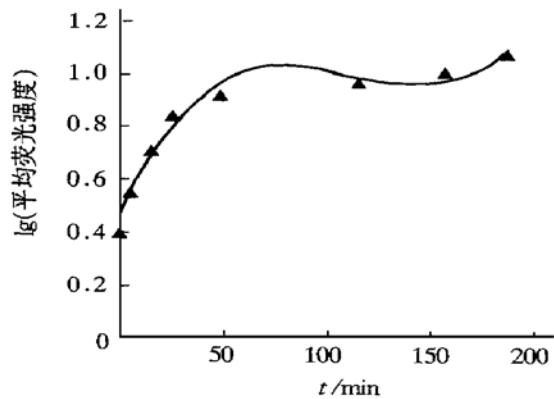


图3 H₂O₂ 使 RBC 自发荧光增强的时间曲线

图上各点为三次独立实验的平均值, H₂O₂ 浓度为 $6 \times 10^{-3}\%$.

2.4 RBC 抗原和自发荧光变化与其散射光的关系

FCM 除了测定细胞的荧光外, 还可测定细胞的散射光, 散射光的强弱与细胞的大小、形态、细

胞膜结构、胞内折射、细胞流动取向等有关^[8]. H₂O₂ 处理 RBC, 前向角散射光 (FSC) 发生明显的变化, 而且与 RBC 抗原性和自发荧光变化有对应的关系. 图 4 为细胞散射光的散点图, 图上每一点代表一个细胞, 横纵坐标分别表示 SSC 和 FSC. 图 4 细胞 FSC 的变化可分为三个阶段, 第一阶段 (H₂O₂ 浓度为 $3 \times 10^{-6}\%$ ~ $3 \times 10^{-5}\%$, 图 4 a~ 图 4d) RBC 从 FSC 相对集中的一群 (图 4a) 分为两群 (R1, R2) (图 4b 和图 4c), 尽管 R2 细胞群的 FSC 很小, 但图 1 的溶血表明在此 H₂O₂ 浓度范围 RBC 尚未溶血, 所以 R2 群细胞并不是发生溶血的细胞碎片, 而可能主要是由于细胞膜的结构改变造成 FSC 的下降; 在致使 RBC 部分溶血的 H₂O₂ 范围, 损伤细胞进一步分为三群 (图 4d). 从 RBC 与 FITC-IgG 结合的对数荧光强度和 FSC 的散点图上分析 (图未出示), 我们发现图 2 和图 4 的细胞群有对应关系, 也即 FITC-IgG 选择性地与图 4 的 R2 和 R3 群细胞结合; 第二阶段 (H₂O₂ 浓度为 $6 \times 10^{-4}\%$ ~ $2.4 \times 10^{-2}\%$, 图 4e → 图 4g) 细胞 FSC 变的很分散, R2 群细胞消失, 细胞不再与 IgG 结合, 但其自发荧光随 H₂O₂ 浓度升高而明显增强, 从对数荧光强度与 FSC 关系的散点图上分析 (图未出示), 发现尽管细胞 FSC 分散, 但细胞的荧光强度很集中, 表明每个细胞的 LPO 荧光产物的量是相近的; 第三阶段 (H₂O₂ 浓度为 $7.2 \times 10^{-2}\%$ ~ 1.2%, 图 4g~ 图 4i), 细胞的散射光又变得相对集中, 相应于表 1 细胞自发荧光下降.

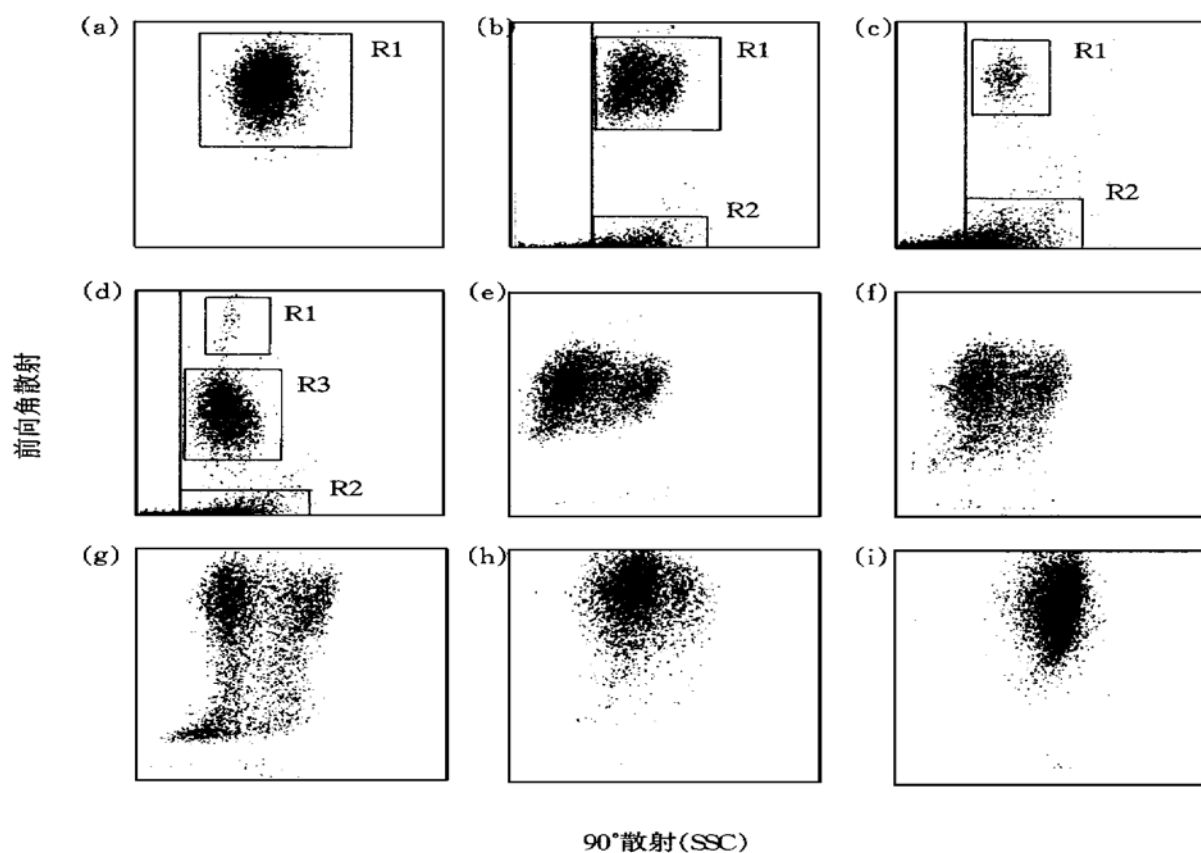


图4 H_2O_2 浓度对 RBC 的散射光的影响

H_2O_2 浓度分别为 (a): 0%, (b): $3 \times 10^{-6}\%$, (c): $3 \times 10^{-5}\%$, (d): $3 \times 10^{-4}\%$, (e): $6 \times 10^{-4}\%$, (f): $3.6 \times 10^{-3}\%$, (g): $2.4 \times 10^{-2}\%$, (h): 0.3%, (i): 1.2%, (b)、(c)、(d) 图中间的竖线为设门取右方的细胞进行图 2 组方图分析。

3 讨 论

关于氧自由基与 RBC 衰老和损伤关系的研究很受关注^[2-4], 我们的结果也表明氧化损伤确实促进了 RBC 与 IgG 的结合能力, 而且 RBC 抗原性变化对 H_2O_2 的浓度非常敏感, 为 RBC 衰老和损伤的“氧自由基学说”提供了新的证据. Beppu^[9]以 $\text{ADP}/\text{Fe}^{2+}$ 作为氧自由基产生体系, 用酶联检测和放射自显影两种方法研究氧化损伤 RBC 与抗带 3 蛋白的 IgG 结合能力, 也观察到仅有轻度氧化损伤 RBC 能与 IgG 免疫结合, 与我们的结果一致. 目前, 关于老化和损伤 RBC 与 IgG 结合能力增强的机理, 主要有两种看法^[3], 在此, 我们还要提出另一种可能性: 带 3 蛋白氧化修饰后, 被对氧化修饰蛋白质有高度的特异性的“氧化修饰蛋白水解酶 (macroxyproteinase, MOP)”识别降解成与 IgG 结合的小片段. MOP 是从 RBC 中分离纯化到的一种新的蛋白水解酶^[10], 与红细胞的抗原性是否有关, 据作者所知, 国内外至今未有报道, 是一个很

有价值的研究课题.

Makigiorgos^[11]等最近提出用荧光标记 RBC 膜, 然后用 FCM 来研究 RBC 的 LPO 损伤, 这种方法需要特定荧光试剂作为探针, 而且是一种间接的方法, 无法排除氧自由基对探针的影响. 我们的结果表明, 用 FCM 直接测定 RBC 自发荧光的变化, 从细胞水平上检测细胞的 LPO 荧光产物的生成是灵敏度高, 重复性好的可靠方法. $\cdot\text{OH}$ 是 LPO 的主要引发剂, RBC 富含铁离子, H_2O_2 使细胞的自发荧光增强, 可能主要是通过 H_2O_2 穿过细胞膜, 在细胞内铁离子的催化下发生 Fenton-Haber Weiss 反应生成大量 $\cdot\text{OH}$, 再引发 LPO 反应, 所以需要在较高浓度的 H_2O_2 作用 LPO 反应才能发生. H_2O_2 达到一定浓度后, 细胞的自发荧光下降, 我们推测或许是 LPO 荧光产物进一步氧化成其他物质, 也可能是高浓度的 H_2O_2 对细胞有固定或封闭细胞膜的作用, 使 H_2O_2 不能通过细胞膜, 从而不能进入细胞内与铁离子作用, 没有 $\cdot\text{OH}$ 生成, 不能引发 LPO 链式反应.

一般认为 RBC 发生严重的 LPO 反应后才导致细胞溶血, 但我们的实验结果表明细胞溶血先于可以用 FCM 检测到的明显的荧光产物生成; 抗原性变化、细胞溶血、LPO 荧光产物生成有先后的顺序, 这可能是机体的一种自我保护机制, 在细胞溶血和发生 LPO 生成大量的毒性产物前, RBC 的抗原性变化, 被吞噬细胞识别和吞噬, 从而降低 RBC 进一步氧化损伤生成的毒性产物对机体的损害, 当然这还有待于进一步的研究. 此外, FCM 测定的细胞散射光反映的是多因素的综合指标, 还需借助共聚焦显微镜、电镜等对 H_2O_2 损伤的 RBC 抗原性和自发荧光的变化与细胞形态、大小、膜结构等之间的关系进行深入研究.

致谢 本实验在中国中医研究院基础所完成, 庞大本和池旭生两位老师给予了热情的帮助和指导, 在此深表谢意!

参 考 文 献

- 1 李 强 (Li Q) 节译. 人类红细胞的脂质过氧化. 国外医学: 输血及血液学分册 (Foreign Medical Science: Blood Transfusion and Haematology), 1990, **13** (5): 270~ 272
- 2 Kay M M B, Bosman G J C G M, Shapiro S S, *et al.* Oxidation as a possible mechanism of cellular aging: vitamin E deficiency causes premature aging and IgG binding to erythrocytes. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83** (9): 2463~ 2467
- 3 吴其夏. 体液因素和血液循环病理生理学. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社 (Wu Q X. Humoral factor and morbid physiology of blood circulation. Beijing: Beijing Medical University & Peking Union Medical College Press), 1991. 222~ 234
- 4 陈 瑗, 周 玫. 自由基医学. 北京: 人民军医出版社 (Chen Y, Zhou M. The free radical medicine. Beijing: People Army Surgeon Press), 1991. 297~ 313
- 5 张尔贤, 俞丽君, 肖 湘, 等. 青竹梅清除活性氧作用的研究. 见: 方允中, 郑荣梁主编. 自由基生命科学进展, Vol 1. 北京: 原子能出版社 (Zhang E X, Yu L J, Xiao X, *et al.* Studies on *prunus mume* [Sieb.] sieb. et Zucc for its ability to scavenge active oxygen species. In: Fang Y Z, Zheng R L eds. Advances in free radical life sciences, Vol1. Beijing: Atomic Energy Press), 1993. 108~ 117
- 6 徐宜为. 免疫检测技术. 北京: 科技出版社 (Xu Y W. Immune test technique. Beijing: Science and Technology Press), 1991. 35~ 40
- 7 Beckman J S, Minor R L, *et al.* Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. J Biol Chem, 1988, **263** (14): 6884~ 6892
- 8 左连富. 流式细胞术与生物医学. 辽宁: 辽宁科学出版社 (Zuo L F. Flow cytometry and biology medicine. Liaoning: Liaoning Science Press), 1996. 10~ 13
- 9 Beppu M, *et al.* Binding of anti-band 3 autoantibody to oxidatively damaged erythrocytes: formation of senescent antigen on erythrocytes surface by an oxidatively mechanism. J Biol Chem, 1990, **265** (6): 3226~ 3233
- 10 Salo D C, Pacific R E, Lin S W, *et al.* Superoxide dismutase undergoes proteolysis and fragmentation following oxidative modification and inactivation. J Biol Chem, 1990, **265** (20): 11919 ~ 11927
- 11 Makrigiorgos G M, Kassis A I, Mahmood, *et al.* Novel fluorescent-based flow-cytometric method for detection of liperoxidation. Free Radical Biology and Medicine, 1997, **22** (1~ 2): 93~ 101

Studies on the Effect of H_2O_2 on the Antigenicity and LPO of RBC by FCM. FU Nai-Yang, ZHANG Er-Xian (Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China).

Abstract Using flow cytometry (FCM) to measure IgG binding to red blood cells (RBC) exposed to H_2O_2 and their autofluorescence directly, in order to study the effect of H_2O_2 on the antigenicity and the production of fluorescent product of LPO of RBC. The results showed that the changes of both antigenicity and autofluorescence were dependent on the H_2O_2 concentration and the time of RBCs exposed to H_2O_2 , and the change of antigenicity was more susceptible to H_2O_2 than that of autofluorescence. At 10^2 fold lower H_2O_2 concentration than that made autofluorescence significantly increase, IgG bond to RBC. Furthermore, it was found that the changes of antigenicity and autofluorescence were related to forward scatter (FSC).

Key words erythrocyte, flow cytometry, damage of cellular membrane, oxygen free radical, antigenicity