

细胞膜的研究(一)

——大白鼠肝细胞质膜的制备

中国科学院北京动物研究所细胞室生物膜组

现代细胞生物学的研究证明,生物膜体系是一切真核细胞的基本结构之一^[1],而细胞的质膜则是原核细胞的生命活动中心^[2]。因此,可以说细胞的膜系是同生命的本质密切相关的重要结构。

恩格斯最先指出:“生命的起源必然是通过化学的途径实现的。”列宁又进一步指出,“化学的东西向有生命的东西的转化——这显然是问题的实质所在。”要阐明介于化学进化和生物进化二者之间的关键性问题——细胞起源问题,必须搞清各种高分子物质和生物膜的起源、代谢、增殖和遗传的机理等。

细胞的质膜是一切细胞必不可少的重要结构,最原始的细胞可以没有线粒体等细胞器,但不能没有细胞质膜。事实上,原始地球上细胞质膜的形成宣告了原始细胞的诞生,亦标志了由非细胞的原始有机物走向细胞生物的一个重要的转折点。

细胞的质膜既是细胞与外环境相隔离的界面,又是细胞同外环境进行物质和信息交流的接触面。越来越多的事实证明,质膜绝不仅仅起到限定空间区域的作用,而是直接或间接地参与为维持生命所必须的重要代谢活动及其调节。譬如,细胞的质膜同细胞之间的粘着性、细胞分裂、物质转运、识别与信息的受理、适应性防御反应、抗原性及其他许多重要功能相关联。近年来已有许多事实证明,细胞的癌变及癌细胞的浸润、转移和细胞的质膜有着密切关系。

由于对肿瘤特异抗原的分离纯化的迫切要求,人们正致力于质膜分离制备技术的改进,以期获得更加纯净的质膜样品。

可以认为,自然界的长期进化过程,使得细胞在其第一线——质膜上具备了反映生物学特性的重要分子。因此,对原核细胞和真核细胞的质膜的深入研究,不仅会给细胞起源的阐明提供理论依据,而且也必将有力地推动整个细胞生物学的发展,并为解决生物学及医学上的实际问题做出贡献。

我们认为,从分子比较生物学的角度出发,对处于不同进化水平的各种细胞的质膜的组分进行比较分析,找出其内在规律性,这对细胞质膜的结构与功能的演化、生物膜系的起源是具有重要意义的。鉴于前人在哺乳动物肝细胞和红细胞质膜的分离制备方面已有一定经验,我们先摸索了这些细胞的质膜的分离方法,作为今后一系列研究的开端和基础。

自从 Nevill 于 1960 年最先报道了大白鼠肝细胞质膜的分离方法以来,已做了大量改良。1964 年 Emmelot 等的改良法,至今仍为人们所应用。在破碎细胞的步骤中,有人改用等渗液操作,另一些人则仍采用在低渗液中破碎细胞。然而,尽管做了许多改良,仍不能说所得到的质膜样品是完全纯粹的。

目前肝细胞质膜分离方法的主流,主要是从匀浆的粗核分部分离,其具体方法大致可归纳为三点:首先,以尽可能温和的条件进行肝

组织的匀浆,使质膜保持较大的膜片;其次,应用低速离心使质膜片与细胞核一起从匀浆中分离出来;最后,利用质膜与细胞核之间的密度差异,在密度梯度离心中把质膜从低速离心获得的粗核分部中分离出来。关于质膜的制备方面的进展,已有若干综述^[4,5],在此不拟赘述。

我们根据自己的工作条件,对现有肝细胞质膜的分离方法的优点做了综合,并做了一定的改进,取得了较好的结果。

材 料 和 方 法

大白鼠肝细胞质膜的制备

试验动物体重为150—200克的雄性 Wister 大白鼠。在断头处死之前,停食18小时。剖腹后,立刻在原位自肝门静脉灌注冰冷的38毫克分子柠檬酸钠溶液(pH = 7.4,以无钙 Hanck's 平衡盐溶液配制),直至肝脏呈淡黄色,以减少血球混杂,将肝脏取出后,用同上溶液洗涤若干次,以锐利剪刀把肝脏细切成约3立方毫米大小的小块。

以下操作,均在4℃左右的环境中进行。匀浆时所用的介质为1毫克分子 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ —0.5毫克分子 CaCl_2 (pH = 7.4,以无离子水配制,见 Dorling 等1973年),按1克肝组织9毫升介质的比例,使用自制 Dounce 型匀浆器(径向间隙约0.35毫米)将聚四氟乙烯杵垂直上下研磨25—30次,制备10%的肝细胞匀浆,以磨碎90%的细胞为准。

使用介质将匀浆稀释成肝重的100倍(即配制1%的匀浆),温和地搅拌5分钟,使破碎细胞内的细胞质流失,然后用三层尼龙纱绢(规格为 GG66)过滤,除去结缔组织。滤液置于高速离心机中,以500转/分的转速离心10分钟。弃沉淀,上清液用滴管吸出,再以2500转/分的转速离心20分钟。用虹吸方法吸去上清液弃之,沉淀用匀浆器研磨5次后,用介质稀释至原来体积,再以2500转/分的转速离心15分钟,弃去上清液,沉淀经研磨5次后,用介质稀释至原来体积的二分之一,以2500转/分的转速离心10分钟。重复离心洗涤4—5次。最后,将沉淀研

磨5次,用适量介质稀释,以5000转/分的转速离心15分钟,弃上清液,沉淀中加入适量冰冷的70%(W/W)的蔗糖溶液,经研磨后,将悬浮液的最最终蔗糖浓度调至48%(W/W, $d_{20} = 1.22$,以下所记述之比重均指20℃时的数值)。在进行不连续的密度梯度离心时,若使用 MSE 40型超速离心机,则将调配好浓度的沉淀悬浮液均分于3×5水平转头的离心管中,每管装1.2毫升,在此层上面分别铺上45%(W/W, $d = 1.20$)、41%(W/W, $d = 1.18$)和37%(W/W, $d = 1.16$)的蔗糖溶液1.0毫升、2.0毫升和0.8毫升;若使用 Omega 70型超速离心机,则将调配好浓度的沉淀悬浮液均分于6×10水平转头的离心管中,每管装2.4毫升,在此层上面分别铺上45%(W/W, $d = 1.20$)、41%(W/W, $d = 1.18$)和37%(W/W, $d = 1.16$)的蔗糖溶液2.0毫升、4.0毫升和1.6毫升。二者均以35000转/分的转速离心120分钟。

质膜分部出现在37%和41%两层蔗糖溶液($d = 1.16$ — 1.18)之间的界面上,形成纸片样的薄层。以针头弯曲的注射器吸出膜样品,加到适量介质中,充分冲散,以7000转/分的转速离心20分钟。所获得的膜样品,可用介质离心洗涤1—2次,最后用适量介质稀释成膜蛋白浓度约为2毫克/毫升,冰冻保存。若翌日即进行形态观察,不应冻结,可在4℃下过夜。

形态鉴定

在质膜制备的全过程中,均以相差显微镜观察监视。最终膜样品则先以相差显微镜观察有无细胞核、线粒体及其它颗粒的混杂,再进而制作超薄切片,以电子显微镜进行观察。将质膜用锇酸固定,经梯度酒精脱水 and Epon 812 包埋及超薄切片后,再以醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色。最后用电子显微镜观察和摄影。

生化鉴定

蛋白质测定是以结晶牛血清白蛋白(上海生化所制药厂)为标准,按 Hartree 对 Lowry 法的改良法(1972)进行。无机磷的测定,按 Sumner 法(1944)进行。5'-核苷酸酶(以下简称5'-AMP 酶)的活性,按 Ray (1970)的方法,在

0.6 毫升保温液中含 50 微克分子三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、10 微克分子 MgCl_2 、10 微克分子 5'-AMP 和 30—40 微克膜蛋白 ($\text{pH} = 7.5$), 在 37°C 保温 15 分钟, 以 10% 三氯醋酸溶液中中止反应。测定释放的无机磷。酶活性单位为每毫克蛋白每小时释放 1 微克分子无机磷为一活力单位。 Mg^{++} -腺三磷酸酶活性, 按 Dunnick (1972) 方法测定, 其活力单位同前 5'-AMP 酶。葡萄糖-6-磷酸酶 (以下简称 G-6-P 酶) 活性, 按 Morjorie (1950) 方法, 从葡萄糖-6-磷酸为底物, 在 $\text{pH} = 6.5$ 的柠檬酸缓冲液中测定。活力单位同前 5'-AMP 酶。

结果和讨论

在肝细胞质膜的制备中, 取材之前一般都使用生理盐溶液自肝门静脉进行灌注。尽管对灌注的利弊存在不同的意见, 但是为了尽可能避免血红蛋白和红血球膜的混杂, 还是进行灌注为佳。在前人的工作中, 灌注液通常用普通的生理盐溶液, 我们则采用冰冷的含 38 毫克分子柠檬酸钠的无钙 Hanck's 溶液 (见 Garard 等 1974) 和 Tyrode 溶液灌注, 均取得了较好的结果。通过无钙生理盐溶液的灌注, 细胞之间的粘合性减弱, 使肝实质细胞 (约占整个肝脏的 65—80%) 更容易游离, 同时亦大大减少了红血球和血红蛋白的污染。在灌注操作中, 选用 8 号注射针头, 并在注射器与针头之间连接一段软胶管 (图 1——见图版 I)。

在破碎肝细胞和制备肝细胞匀浆的步骤中, 许多人都使用 1 毫克分子 NaHCO_3 溶液作为介质。根据我们的经验, 细胞核在该溶液中极易凝集成堆, 并往往把许多质膜片裹到其中, 从而不利于质膜的分离和纯化。我们用 1 毫克分子 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -0.5 毫克分子 CaCl_2 溶液 ($\text{pH} = 7.4$), 无论在分离过程的任何阶段, 均未发现细胞核严重的凝集现象, 有利于质膜自粗核分部的分离。相差显微镜的观察表明, 细胞核在该介质中呈分散状态 (图 2——见图版 I)。硼酸盐介质的效应, 很可能是由于硼酸盐与质膜表面的糖类残基相结合从而增加其表面电荷而有

助于相互排斥所致。

脊椎动物肝细胞质膜分离制备的关键步骤是肝细胞的破碎与匀浆的制备。既要使 90% 的肝细胞破碎, 又不能将它破碎过甚。根据匀浆器研磨次数与细胞破碎情况之间关系的预备试验, 研磨 25—30 次较为适宜, 既保证了大部分肝实质细胞破裂, 又使质膜保持了较大的膜片 (图 3—6——见图版 II), 是获取相对完整的大片质膜的重要前提。

根据 Ray (1970) 的经验, 在制备匀浆的介质中, 加入钙离子 (以 0.5 毫克分子 Ca^{++} 为宜) 可稳定膜结构, 防止变脆, 确保其在蔗糖密度梯度离心中按正常的密度平衡分配, 从而有利于膜的纯化。同时, 肝细胞匀浆的大幅度的稀释, 可降低匀浆的粘度, 有利于细胞质成份的洗涤去除与大块膜片在离心洗涤过程中的下沉。我们与 Ray 不同, 未采用 1 毫克分子 NaHCO_3 溶液而采用 1 毫克分子 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液 ($\text{pH} = 7.4$), 其中含 5 毫克分子 CaCl_2 , 并以 1:100 的匀浆稀释度 (即将肝匀浆稀释至肝湿重的 100 倍), 亦取得了良好的分离效果。

在稀释 100 倍的匀浆液经三层尼龙纱绢过滤后, 为了除去未破碎的完整细胞及部分细胞核, 安排了一次非常低速 (500 转/分, 10 分钟) 的离心步骤。5'-AMP 酶活性的测定表明, 约有 35% 的酶活性随沉淀丢失。相差显微镜的观察证明, 该沉淀主要是未破碎、半破碎的细胞和一部分细胞核 (图 7——见图版 II), 但亦有相当一部分质膜。低速离心步骤对减少蔗糖密度梯度离心的负担和提高最终膜样品的纯度是必要的。

试验观察表明, 含有质膜的粗核分部中的线粒体和其他细胞内成份, 不经 7—8 次离心洗涤 (2500 转/分) 是大部分不易被除去的。在这些离心洗涤步骤中, 由于质膜是在沉淀的上面部分, 极易飘起, 所以上清液不能采取倾泻的办法倒去而需用虹吸方法吸出, 并且每次应留下少许沉淀上部的上清液, 以免搅乱沉淀。否则, 在这一系列的反复洗涤中将丢失大量质膜, 减少膜产率。

试验结果表明,粗核分部中的质膜经不连续的蔗糖密度梯度离心后,绝大部分上浮至比重为 $d = 1.16$ 和 $d = 1.18$ 两层蔗糖液之间的界面上(称 F_1 分部),构成白色的纸片状的薄膜层(图 8-a——见图版 III)。在 $d = 1.18$ 和 $d = 1.20$ 两层蔗糖液之间的界面上(称 F_2 分部),主要含细胞质中的一些大颗粒(例如糖原)和少量线粒体。其中,也含有一些质膜。这不仅可以从 F_2 分部的第二次蔗糖密度梯度离心的结果看出(图 8-b、图 9-a——见图版 III),亦可以从 5'-AMP 酶活性的测定得到证明。在 $d = 1.20$ 和 $d = 1.22$ 两层蔗糖液之间的界面上(称 F_3 分部),主要是线粒体。最底层沉淀主要是细胞核及少许完整或部分破裂的细胞。第一次蔗糖密度梯度离心获得的 F_1 分部的第二次蔗糖密度梯度离心结果表明,一次蔗糖密度梯度离心分离所得到的质膜是相当纯的,只有极少量的 F_2 分部,完全没有 F_3 分部出现(图 9-b——见图版 III)。

我们仅以 F_1 分部作为纯化的质膜样品,并且主要讨论一次梯度离心所得到的 F_1 分部。最终样品的相差显微镜观察表明,本方法制备的质膜是相当大片的,存在象顾国彦^[6]等所描述的典型的 Y 型和 L 型的结构,没有细胞核和线粒体的污染(图 10——见图版 IV)。肝细胞质膜所固有的特定的形态学和亚显微结构的外观,可以作为鉴定的可靠标志。电子显微镜的

观察表明, F_1 分部中无细胞核、线粒体、溶酶体和糙面内质网的污染。它主要由大片的质膜组成,并含有由微绒毛状突起物所形成的光滑的束泡状质膜。其中,有相当比例的质膜是成对的(图 11——见图版 IV),可以观察到相邻两个细胞之间连接起来进行物质交换的紧密接合、保持得较好的间隙接合和桥粒。

户田等(1973)曾经指出,围绕肝细胞的质膜,可以依其功能不同而分为三部分。面向窦状隙和血液不断进行物质交换的部分;构成毛细胆管的部分以及相邻两个细胞彼此接触而构成的紧密接合;间隙接合和桥粒部分。作为肝细胞质膜的标志,现今广泛应用的有 5'-AMP 酶、硷性对硝基苯磷酸酶、 Mg^{++} -ATP 酶和 Na^+-K^+-ATP 酶等。其中 5'-AMP 酶已被定位于肝细胞膜的胆小管部位和窦状隙部位,以及融合接合部位,因此,它是一种较广泛地分布于肝细胞质膜并能代表其完整性的可靠的标志酶。在纯化的质膜样品中 5'-AMP 酶的相对比活(即细胞质膜样品与匀浆液的 5'-AMP 酶的比活的比值)有较大的幅度,一般为 12—30 倍。当然,并非所有的酶活性测定都是在同一条件下进行,因此,并不一定都是可比的。本方法获得的纯化质膜样品的 5'-AMP 酶的相对比活为 16.7,即质膜的 5'-AMP 酶的比活约为匀浆中该酶比活的 17 倍(见表)。在质膜样品中

大白鼠肝细胞质膜分部中标志酶的活性

组 份	5'-AMP 酶			Mg^{++} -ATP 酶		G-6-P 酶	
	比 活 ¹⁾	回 收 率 ²⁾	相对比活 ³⁾	比 活	相对比活	比 活	相对比活
匀 浆	1.21 ± 0.52 (8)	100	1	4.16 ± 1.64 (3)	1	3.21 ± 2.23 (7)	1
细胞质膜样品	20.25 ± 6.28 (8)	13.42 ± 4.17 (5)	16.73	41.55 ± 18.09 (3)	10	2.94 ± 1.17 (7)	0.91

1) 活性单位: P_i 微克分子/小时/毫克膜蛋白

2) 回收率: 质膜样品 5'-AMP 酶总活性/匀浆 5'-AMP 酶活性

3) 相对比活: 质膜样品与匀浆的 5'-AMP 酶比活的比值,括弧内数字为测定次数

Mg^{++} -ATP 酶的相对比活为 10,亦即质膜的 Mg^{++} -ATP 酶的比活约为匀浆液中该酶比活的 10 倍。膜产率为 0.44—1.16 平均为 0.80 毫克膜蛋白/每克鲜肝重。据报道,各种制备方

法所获得的平均膜产率是 0.41—1.3 毫克膜蛋白/每毫克鲜肝重^[5]。通常, G-6-P 酶作为内质网的标志酶,以此酶的比活来估计内质网的污染程度。目前,肝细胞质膜样品中 G-6-

P 酶的比活是在 0.9—3.05 之间^[5], 本方法得到的结果是 2.94。鉴于迄今尚无证明质膜上不存在 G-6-P 酶或其他可催化 G-6-P 水解的酶的确切证据,故将 G-6-P 酶作为内质网污染率的唯一指标,在考虑到细胞内膜体系之间连续性的可能性的问题时,是值得商榷的。

在本文方法成为常规之后,我们尝试了用等渗介质(0.25M 蔗糖-0.5 毫克分子 CaCl_2 -5 毫克分子 Tris-HCl, pH = 7.4) 制备肝细胞质膜的方法。结果表明,在同样的匀浆器情况下,研磨次数需达 100 次,在用该介质进行的低速离心的反复洗涤过程中,线粒体可以去除得较彻底,但 G-6-P 酶活性则不如使用低渗介质时那

么容易去掉。另外,我们发现使用等渗介质中破碎细胞时,不象有些报道所说的那样,仍可以获得较大片的质膜。如两种介质并用,也许可以获得更好的结果。

主要参考资料

- [1] 伊藤明夫: 蛋白质·核酸·酵素, 别册 生体膜实验法(上), 20, 1974。
- [2] 中村 遼: 细胞, 7, 283, 1975。
- [3] S. W. Fox et al: 蛋白质·核酸·酵素, 别册 生命の起源と進化, 116, 1972。
- [4] J. W. De Pierre et al: *J. Cell Biol.* 56, 275, 1973。
- [5] 南部滋郎等: 蛋白质·核酸·酵素, 别册 生体膜实验法(上), 274, 1974。
- [6] 顾国彦等: 实验生物学报, 1963 年, 第 8 卷, 第 390 页。

细胞膜的研究(二)

——大白鼠红血球膜的制备

中国科学院北京动物研究所细胞室生物膜组

哺乳动物的红血球膜在分离的状态下, 一般称为“血影”或“基质”。由于: (1) 在哺乳动物的成熟红血球中没有通常真核细胞内所含有的任何细胞器, 容易得到纯粹的细胞质膜; (2) 可以借助低渗溶血等简便操作除尽细胞内容物获得膜样品; (3) 来源方便; 因此多年来广泛应用它作为研究细胞膜的材料。

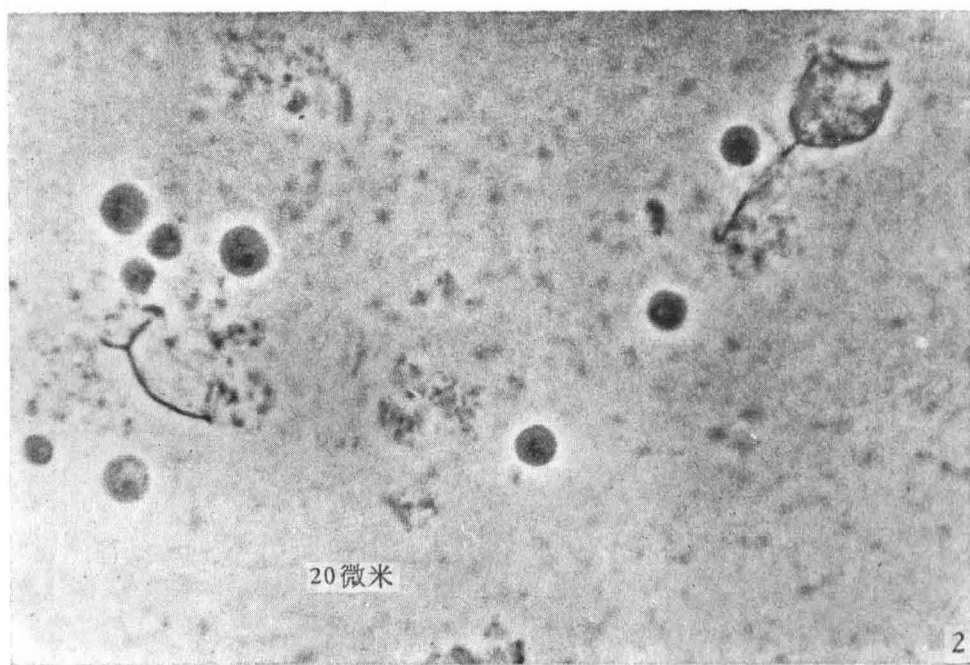
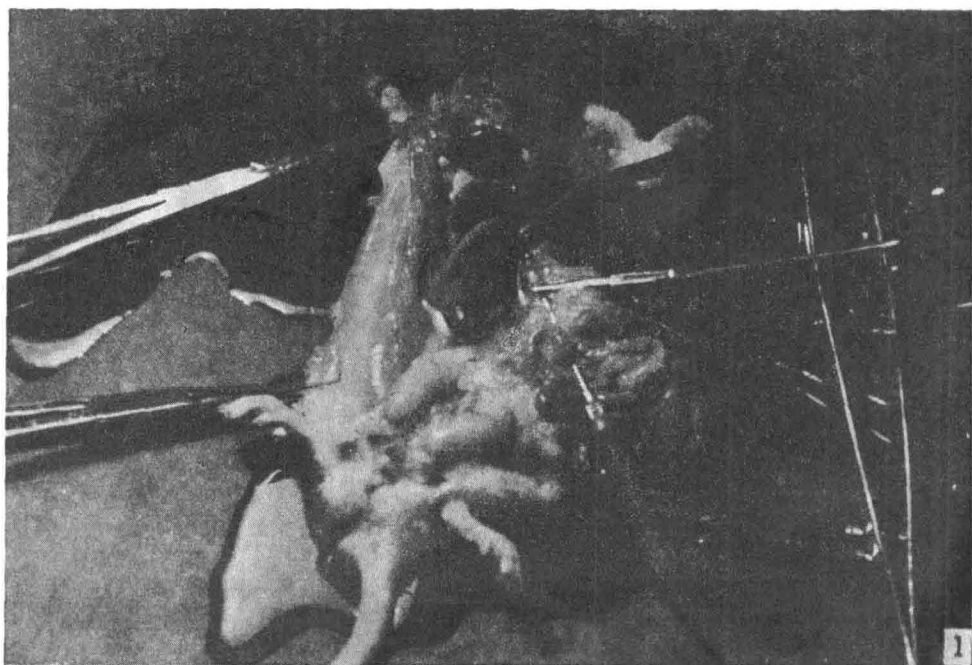
事物都是“一分为二”的, 在把红血球膜作为细胞膜的一般模型时, 必须充分估计到它的局限性: (1) 红血球是极端分化了的特殊细胞, 它作为单独的细胞行动, 已失去了细胞器和许多代谢系统, 它的膜同一般组织细胞的细胞膜可能会有很大的差异; (2) 由于不同动物种属间分化程度的差别, 在膜的组成和功能上的种属间差异非常显著; (3) 红血球在体内的寿命约 120 天, 故在血液中的红血球是各种老幼血球的群体, 即在年龄上是不均一的; (4) 制备得到的膜样品同无损伤的红血球膜比较, 在膜结构和性质上可能有若干变化。

当我们想研究最单纯的细胞的细胞质膜保持什么样的最低限度的膜功能时, 或者想查明随着分化过程在膜上发生了什么变化时, 红血球膜无疑还是较好的研究材料。目前已经知道有许多疾病同细胞膜系的结构和功能的异常有关。红血球膜的异常也会造成某些疾病(例如遗传性球状红血球症)。因此七十年代有关红血球膜研究的资料日益增多。

我们在生物膜蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析工作中需要大量纯净的生物膜材料, 因此对人及大白鼠红血球膜的制备进行了研究。现将我们对大白鼠红血球膜的常规制备法报道如下:

基本条件

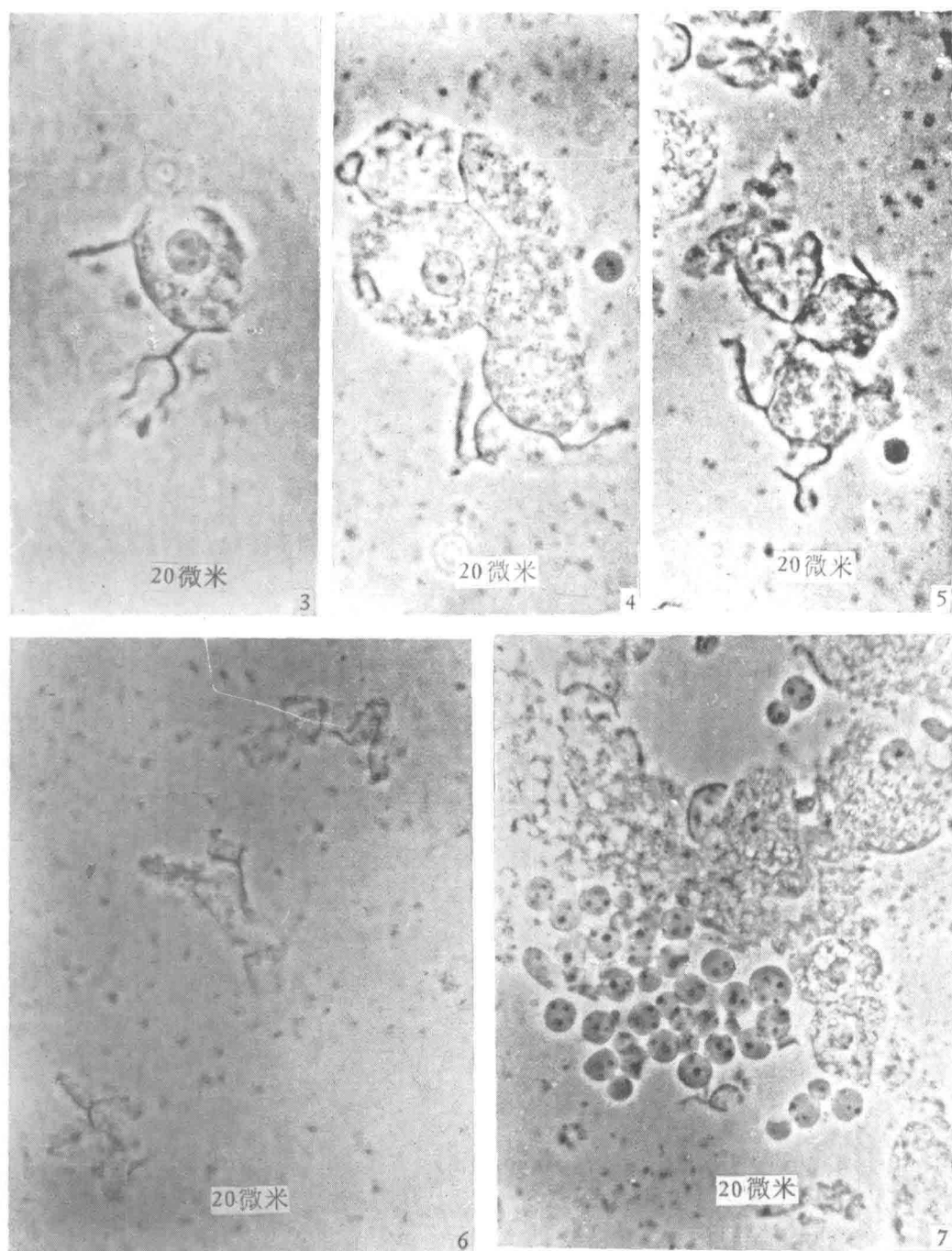
红血球经溶血作用可以将其内容物(即细胞质成分)释放出来, 通过洗涤除去附着于膜上的内容物后, 即可获得红血球的细胞质膜。这种极其简单的细胞质膜制备方法只适用于哺乳



图版 I

图 1 用含 38mM 柠檬酸钠的冰冷的无钙 Hanck's 溶液自肝门静脉进行肝脏的灌注
图示被生理盐水胀立起来的肝脏。经灌注之后,肝脏内的血液被排除,呈淡黄色

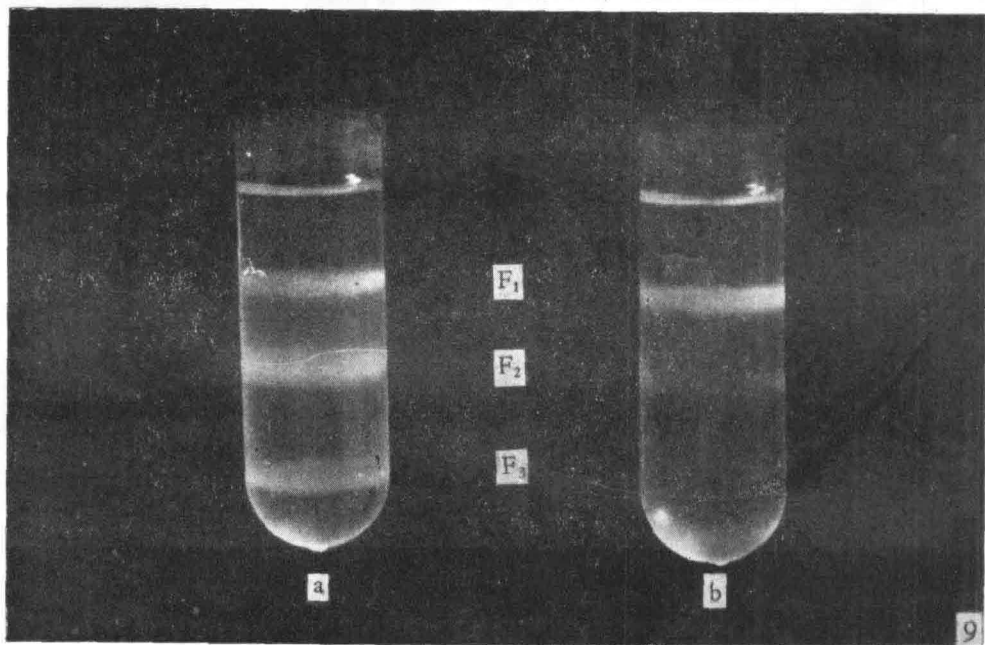
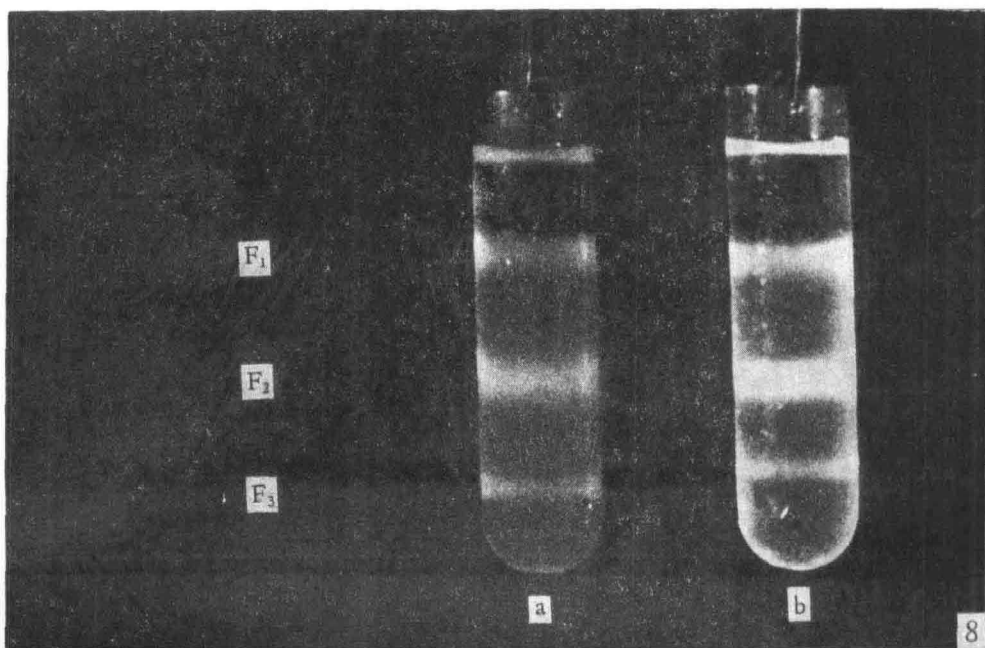
图 2 肝细胞匀浆 在 $1\text{mMNa}_2\text{B}_4\text{O}_7-0.5\text{mM}\text{CaCl}_2$ 溶液 ($\text{pH} = 7.4$) 中,细胞核不发生凝集现象,而呈分散状态,有利于细胞质膜自粗核分部的分离



图版 II

图 3—6 用自制 Dounce 型匀浆器研磨 25—30 次，既可以使大部分肝实质细胞破裂，又可以使细胞质膜保持较大膜片

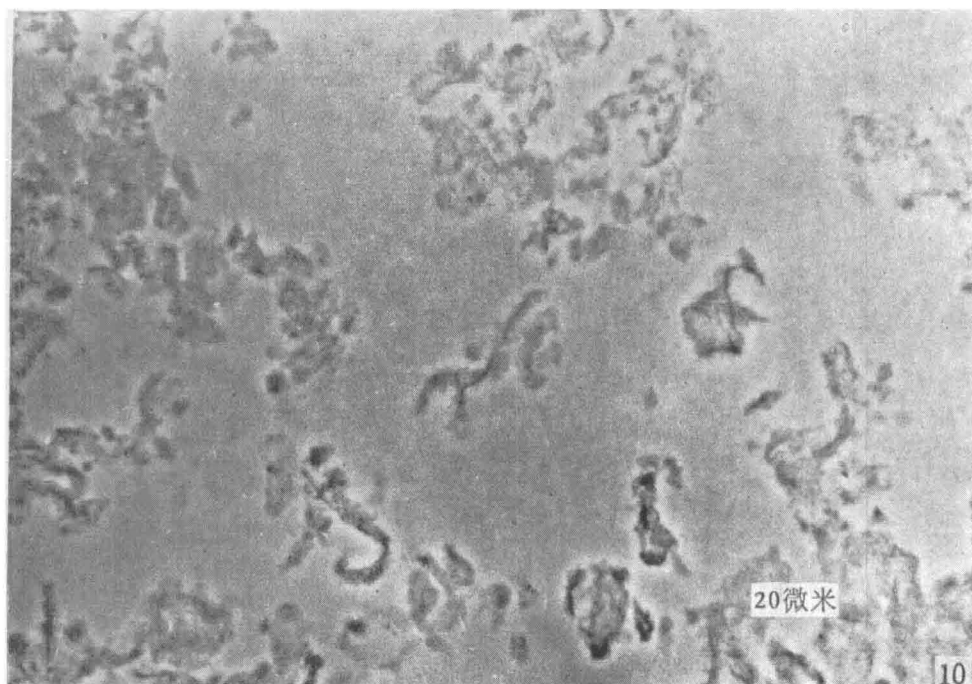
图 7 肝细胞匀浆的低速离心 (MSE 18 型高速离心机, 500 r. p. m, 离心 10 分钟) 的沉淀示该沉淀主要由未破裂的完整细胞、半破裂的细胞、一部分细胞核和少量细胞质膜组成



图版 III

图 8 用 **MSE 40** 型超速离心机进行不连续蔗糖密度梯度离心的结果 (3×5 水平转头, $35,000$ r. p. m., 离心 120 分钟) 自上至下的各分部为 F_1 ($d = 1.16-1.18$)、 F_2 ($d = 1.18-1.20$) 和 F_3 ($d = 1.20-1.22$)。其中 F_1 为细胞质膜分部(详见文内说明)。a. 肝细胞匀浆粗核分部的蔗糖密度梯度离心的结果。b. F_2 分部的第二次蔗糖密度梯度离心的结果,说明第一次蔗糖密度梯度离心后的 F_2 分部中,尚有一部分细胞质膜存在。

图 9 用 **Omega 70** 型超速离心机进行不连续蔗糖密度梯度离心的结果 (3×30 水平转头, $30,000$ r. p. m., 离心 120 分钟)。a. 肝细胞匀浆粗核分部的第一次蔗糖密度梯度离心的 F_2 分部的第二次蔗糖密度梯度离心结果。说明第一次蔗糖密度梯度离心后的 F_2 分部中尚有一部分细胞质膜。b. 第一次蔗糖密度梯度离心后的 F_1 分部的第二次蔗糖密度梯度离心结果。说明 F_1 分部是相当纯的,只含极少量的 F_2 分部的成分,根本不含 F_3 分部的成分



图版 IV

- 图 10** 细胞质膜纯化样品 (F, 分部) 的相差显微镜观察 图示该样品中无细胞核、线粒体及其他颗粒的污染, 细胞质膜是相当大片的, 保持许多肝细胞质膜所特有的典型的 L 型和 Y 型结构
- 图 11** 细胞质膜纯化样品 (F, 分部) 的电子显微镜观察 图示该样品中无粗糙内质网的污染, 可见有相当比例的细胞质膜是成对的, 并保有间隙接合和桥粒等相邻两细胞间的连接结构