

细胞膜糖蛋白的研究

——分光光度法定量研究刀豆球蛋白 A 与小鼠腹水癌细胞的凝集反应

胡朝彬 丰美福

(中国科学院北京动物研究所)

前 言

糖蛋白是细胞表面的重要成份,在细胞识别、粘着性、药物和激素的反应、病毒结合和物质传递诸方面的作用已基本肯定。很可能还与细胞的分裂控制有关。近年来受到日益广泛的重视,建立了一些测定其组成、分布和生化特性的技术。

从植物提取的某些蛋白质,能高度特异地、牢固地与细胞膜的受体结合并使细胞凝集,因而可作为膜的分子“探针”来研究膜结构和空间配置等情况。受体的性质是糖蛋白,可能还有糖脂在内。据报道,大约已有 50 种以上的转化和癌变细胞株、红、白细胞、淋巴细胞、血小板、生殖细胞、肝和脂肪细胞等和多种凝集素作过凝集试验,其中刀豆球蛋白 A (Con A) 是最常用的品种之一。

虽然过去十多年来国外做了大量工作,但迄今仍缺少简单而又客观的定量方法。早期是用肉眼或显微镜作定性或半定量观察。近年来常用同位素或荧光标记法进行研究,这些方法虽较准确,但不经济。使用电动血球计数器或自动恒温分光光度计测量的方法,虽属简化,但限于条件,一般实验室也不易做到。

本实验中采用的是国产通用仪器,选择的材料为实验肿瘤学中和新药筛选中常用的小鼠

腹水癌细胞,目的在于使这一有用的研究手段能得到更广泛的应用。

材 料 和 方 法

刀豆球蛋白 A 瑞典 Pharmacia 产品。分子筛层析纯,冰干,碳水化合物 $<0.1\%$ 。临用前配制。

胰蛋白酶(猪) 二次重结晶。

脱氧胆酸钠 Sandoz 出品。

以上均配制于无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 PBS 中。

葡萄糖,分析试剂 溶于 Krebs-Ringer 液中。

六硫代嘌呤 北大制药厂出品,配于消毒生理盐水中。

其余试剂都是分析纯。以去离子水配制。

癌细胞 小鼠按常规接种艾氏腹水癌 (EAC)、肉瘤-180 腹水型细胞,6—8 天后收集腹水,用 10—15 倍体积的 Tris-HCl 缓冲的生理盐水稀释,经 JLD-G 型离心机离心 1 分钟 (400 转/分),用上述溶液重复洗涤沉淀 3 次,洗去红细胞,最后使沉淀悬浮于缓冲液中。

缓冲液 (1) Tris-HCl 生理盐水: 0.9% NaCl 溶液,含 5 mM Tris-HCl, pH 7.2;

(2) 无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS: 8.0 克 NaCl, 0.2 克

KCl, 2.16 克 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 克 KH_2PO_4 , 总体积 1,000 毫升, pH 7.4。

(3) Krebs-Ringer 液: 0.12M NaCl, 0.013M KCl, 0.01 M KH_2PO_4 , 1mM CaCl_2 , 0.65 mM MgSO_4 以 NaOH 调至 pH 7.4。内含丙酮酸钠 20 mM。葡萄糖分别为 0.1mM, 1mM 和 20 mM。

凝集反应的测定 细胞与 ConA 结合、凝集后,凝块由小变大,逐渐下沉,因而悬液中单个细胞逐渐减少,细胞数在波长 546 毫微米下进行比浊测定。测定前,将洗好的细胞用弯头毛细吸管充分打匀。以缓冲液将 EAC 和 S-180 细胞分别稀释成 13×10^6 和 6×10^6 细胞/毫升 (O. D. 值为 1.4)。吸取悬液 4 毫升,放入光径长度 10 毫米的比色杯中,加 ConA 50 微升(相当于 30 微克/毫升),加完最后一滴 ConA 起记录时,并立即将比色杯上下翻倒五次,迅速放回 72 型分光光度计暗箱,读取 546 毫微米波长下的光密度值,定时记录从起始至 20 分钟的变化。空白对照不加 ConA。特殊处理于各段分别叙述。

比浊法结合目测和镜检进行。镜检按 Aub 法进行。定时将上杯以适量 PBS (一般 1—2 倍) 稀释,取约 0.03 毫升置玻片中央,立即盖入凹玻片小室,悬滴于相差镜下观察。凝集状态按 0 到 ++++ 分级。“0”——无凝集;“+”——只有少数细胞凝集;“++”——较多细胞凝集;“+++”——所有细胞聚成小块;“++++”——出现大结块。

活瘤细胞按白细胞计数法计数。

结 果

细胞数与光密度的关系

图 1 示细胞数从 2.6×10^6 增到 1.3×10^7 , 光密度从 0.58 增到 1.4, 细胞数的对数与波长 546 毫微米的光密度呈线性关系。

ConA 与细胞的凝集

EAC 和 S-180 细胞与 ConA 凝集的过程中,光密度随时间而下降,Con A 浓度高的,沉降速度快。在 1.3×10^6 EAC/毫升,在 Con A 的

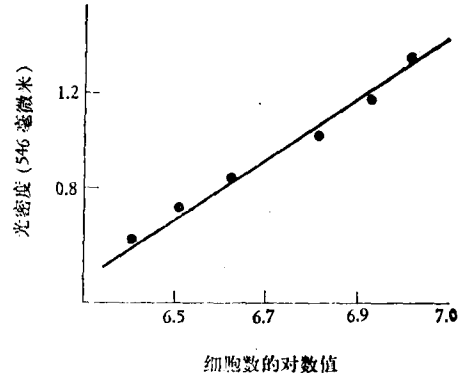


图 1 细胞数的对数值与 546 毫微米波长下光密度值的关系

浓度相当于 30 微克/毫升的条件下,反应时约在 2.5—3 分钟。前 5—6 分钟反应较快,往往难以准确按时记录。随后始转平稳。

在观测时间内,对照杯上端数毫米处渐清,但未影响吸收值。初步观察, S-180 细胞的凝集反应比 EAC 要弱(图 2)。镜检结果(见图 3, 在封二)与光密度变化大体相符。

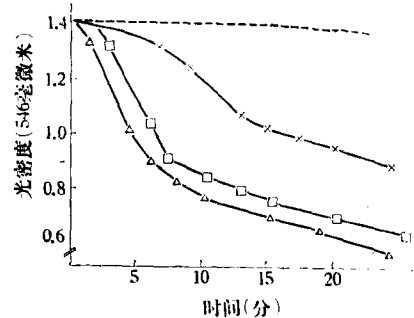


图 2 细胞凝集的动态过程

□——□ EAC, 1.3×10^7 细胞/毫升, ConA 浓度, 30 微克/毫升;
 △——△ EAC, 1.3×10^7 细胞/毫升, ConA 浓度, 60 微克/毫升;
 ×——× S-180 细胞, 6×10^6 细胞/毫升, ConA 浓度, 30 微克/毫升;
 空白杯 20 分钟内无明显变化, 以虚线表示。

理化因素、酶和抗癌药物对凝集作用的影响

温度 EAC 按 1.3×10^7 细胞/毫升悬于 PBS 中,分 3 组分别置于 0°C , 室温($\sim 20^\circ\text{C}$)和 36°C 条件下保温半小时,而后按前法加入相当于 30 微克/毫升的 ConA, 室温下测定,测完立即放回原保温环境。图 4 表示温度升高,反应

时提前, 反应速度加快。36°C 组, 5 分钟即出现较大结块, 15 分钟基本澄清。

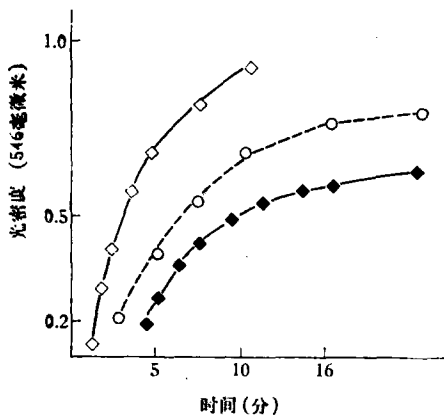


图4 温度对凝集作用的影响
(纵座标以光密度起始值与反应值之差表示)
◇—◇—36°C;
◆—◆—0°C;
○—○—常温对照

脱氧胆酸钠 (DOC) EAC 按需要浓度悬于 8—10 毫升配有 DOC 的无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} PBS 中, 37°C 保温 30 分钟并振荡之, 然后再用 PBS 洗 3 次, 按常规比浊和镜检。经 0.01% 和 0.05% 二种浓度的脱氧胆酸钠处理后, 凝集均受抑, 浓度高的抑制更明显, 反应时分别推迟到 6 和 12

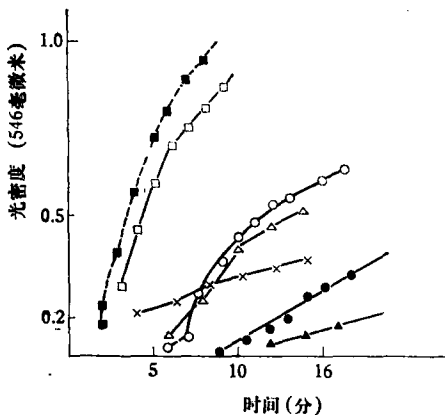


图5 几种因素对凝集作用的影响
(纵座标以光密度起始值与反应值之差表示)
■—■—胰酶, 5 微克/毫升;
□—□—胰酶, 2.5 微克/毫升;
○—○—脱氧胆酸钠, 0.05%;
●—●—同上, 0.01%;
△—△—葡萄糖, 0.1 mM;
▲—▲—葡萄糖, 20 mM;
×—×—六硫代嘌呤, 5×10^{-4} 克/毫升

分钟 (图 5)。【当浓度高达 0.1% 时, 则因过于粘稠, 细胞很难再用新鲜缓冲液重新分离出来。

胰蛋白酶 按 2.5 微克和 5 微克/毫升酶量直接加于已有 4 毫升细胞悬液的比色杯中, 上下翻转 4 次。图 5 示细胞经酶处理后, 凝集易感性大增。5 微克/毫升时, 速率约比对照组提高 1 倍。按常规加凝集素后, 立即见到反应。

葡萄糖 配于 Krebs-Ringer 液中。浓度在 0.01 mM 以下, 影响不显。0.1 mM 显示抑制作用。浓度高至 20 mM, 显著抑制 (图 5)。20 分钟后用显微镜检查, 只见到多数小结块。

为了检查抑制作用是否由于在保温过程中, 因细胞代谢产生了乳酸、导致盐液 pH 值下降而引起的, 我们把细胞悬于最高糖浓度组的盐液中, 在室温下放置半小时, pH 值下降 0.1, 1 小时后下降 0.2, 可见 pH 值变化不大, 抑制作用的产生与乳酸无关。

抗癌剂 六硫代嘌呤按 5×10^{-4} 克/毫升配于无菌生理盐水中, 于取腹水前 3 天进行腹腔给药, 前 2 天 0.4 毫升/只; 第 3 天 0.15 毫升/只。我们只作了 2 只动物, 看来对细胞还是有影响的。

讨 论

本实验根据细胞数与光密度的关系, 对 ConA 与细胞的凝集反应进行定量研究, 方法简易。通过温度、特异和非特异性凝集抑制剂、酶等对这一过程影响的研究表明, 只要各种因素控制严格, 此法可以反映细胞表面受体与 ConA 结合的大体情况, 从而反映不同生理或病理状态下细胞膜糖蛋白的量和质的差异。这对检查膜的特殊变化或寻找能改变细胞膜异常性的药物等方面有一定意义。现将几个影响因素和注意事项讨论如下:

温度 Weber (1973 年) 报道, 在 0—37°C 范围内, 凝集素和细胞结合速度随温度增高而增快。但也有不同的结果。我们明显地看到温度促进凝集的作用。在一次 45°C 和 50°C 保温 20 分钟的实验中, 看到细胞经 45°C 处理后仍有增强反应的趋向, 50°C 则减弱, 看来 37°C 并

不是反应最高温度界限,但也要注意细胞代谢状态和温度增高增加了非特异性结合的机会。实验研究中以生理温度较合适,特殊情况可适当增减。

非特异性抑制剂 DOC 等表面活性剂,一般不破坏共价键,但可使疏水键和离子键断裂,经 DOC 轻度处理的细胞表面,蛋白和糖链可能不全,引起受体数目减少,因而特异性凝集反应减弱。Robert 等(1973年)研究了正常和癌变细胞线粒体和 Con A 结合的差异,他们在线粒体中加入 10% Triton X 100,以助于线粒体和 Con A 之间形成混浊复合体,防止快速沉降。我们作过几种浓度的类似实验,结果都不理想,即使加微量,也会造成不均匀沉淀。这类表面活性剂对膜的非特异性破坏,往往会造成对比上的困难,在严格的对照实验研究中是否适用?有待进一步探讨。

特异性抑制剂 许多研究者报告过 Con A 与单糖及糖脂的结合,以间接推知膜受体中糖的性质。一般认为和 D-葡萄糖或 D-甘露糖构型的 α 链糖结合常数最高,因细胞保温盐液中经常含有葡萄糖,故我们选用不同糖浓度的盐液,也看到 D-葡萄糖与膜糖受体的竞争抑制作用。从 pH 测定结果看来,葡萄糖浓度在 20 mM 以下,保温半小时左右测定,明显的抑制不是乳酸引起的。这可作为体外实验选择盐液的参考。

胰蛋白酶 经这种酶处理过的正常细胞和多种植物凝集素的凝集效价大为增强,这已是熟知的事实。早期认为,水解酶暴露了正常细胞表面上被遮蔽的受体位置,使垂直于膜表面

的蛋白分子重排。Nicolson (1972年)提出,由于膜流动性改变,造成水平面上膜受体聚集的理论。看来这一复杂过程还未搞清。EAC 经我们使用中度酶处理后,反应增强,说明腹水癌细胞亦能表现出如正常细胞样的特点,但变化幅度不如前者大。从分子水平上探讨这一过程的本质,对了解细胞膜蛋白和类脂的流体镶嵌特点是有意义的。

抗癌药物 六硫代嘌呤是抗白血病药物,作用原理还不太清楚。Hwag (1974年)研究过它对 S-180 腹水细胞表面结构的影响。结果证明,细胞经六硫代嘌呤体外处理 6 小时后,表面上二种 Con A 亲和位置被抑制。我们处理了 2 只动物,有初步结果。但未作其他指标,究竟是由于细胞代谢状态,表面特性改变引起的?抑或细胞部分坏死引起?有待进一步证实。

我们作过几种细胞和 Con A 浓度试验。大体上,细胞数在 2.5×10^6 /毫升以下,用通常的 Con A 浓度,重复性差;细胞数达 $10-13 \times 10^6$ /毫升,Con A 浓度从 10—300 微克/毫升均可。考虑到记录的方便,避免太快不准,太慢费时的缺点,我们选用了 13×10^6 细胞/毫升,Con A 浓度相当于 30 微克/毫升,总容量 4 毫升作为常规标准。试验中要把细胞洗净和打匀,记录 Con A 浓度和配制时间、缓冲液类型、温度、振荡情况、去除气泡,等等。若不太稳定,可多作几个浓度,对比不同浓度下凝集反应时和动态变化。如有条件,建议进行定温连续测定。我们的工作还是初步的,希望在应用中进一步提高。

[本文于 1976 年 12 月 15 日收到]

· 科技消息 ·

尿液蛋白质治癌的研究

寻找能够有选择性的杀死癌细胞而对正常细胞无害的药物,是研究工作者多年的希望。1976年4月 Burzynski 等初步报道了从正常人尿液中,分离出一类很小的蛋白质类物质,有干扰癌细胞分裂的能力,同时不影响正常细胞分裂。他们首先从血液中筛选,找到了一组只含 10 至 15 个氨基酸单元的小蛋白质类,继而从 105 加仑正常人尿中成功的分离出四种这样的蛋白质,可以抑制三种类型癌细胞的分裂,效率可达 96—97%。其中一种尿液蛋白质对这三种癌细胞都能

抑制。另三种能比较专一的抑制一种癌细胞的分裂。

同年 12 月他们又检验了这四种尿液蛋白质对培养中的另外三种癌细胞分裂的抑制能力,获得 100% 的抑制。将这些蛋白质注射给患路氏肉瘤的鸟类,使患鸟的死亡率从 100% 下降到 20%。由于他们在离体条件的实验中,已证实这四种尿液蛋白质对人体的结肠癌、子宫癌、骨肉瘤和白血病细胞有抑制分裂的作用,他们准备在条件成熟时,试用于这四种癌症患者的治疗。