

外源性环核苷酸衍生物 ax-cAMP-丁酯对 肿瘤细胞表面的影响*

樊景禹 张孙曦 徐家鸽

(北京医学院生物物理教研室)

3', 5'-环-腺苷酸 (cAMP) 作为一种第二信使广泛存在于各种细胞内, 对细胞的多种功能起着重要的调节作用。在多数情况下, 外源性环核苷酸可以抑制肿瘤细胞的生长^[1], 但其作用机制仍然不清。对某些肿瘤细胞, cAMP 可使细胞形态发生变化^[2,3,4], 但这些研究大多限于观察 cAMP 作用较长时间的肿瘤细胞。

我们曾报告, 环核苷酸衍生物 ax-cAMP-丁酯对几种腹水型肿瘤细胞 (包括 Ehrlich 腹水癌细胞) 的 DNA 和 RNA 合成具有明显抑制作用^[5]。本文将介绍的是用电镜下的定量形态学方法分析这种环核苷酸衍生物对 Ehrlich 腹水癌细胞作用所引起的早期细胞结构变化, 和借电镜下细胞表面电荷标记方法^[6]及细胞电泳技术研究上述条件下细胞表面电荷变化的结果。

材 料 和 方 法

细胞处理 取接种七天的 Ehrlich 腹水癌细胞, 用 Eagle's 液洗一次, 1000rpm 离心 5 分钟。弃去上清液, 将细胞重新悬浮于 Eagle's 液内。取自每只动物的细胞分为两组, 细胞数均为 2.5×10^6 个/ml, 并在实验细胞悬液中加入浓度为 1×10^{-6} M 的 ax-cAMP-丁酯, 对照细胞不加。两组细胞均在 37℃ 下温育 4 小时。

细胞电泳迁移率测定 细胞来自 8 只小鼠, 经上述处理后离心弃去上清液, 再用 9% 蔗糖水溶液 (pH7.4) 冲洗两次, 除去游离的环核苷酸衍生物。每次冲洗后, 离心 (1000rpm, 5 分钟) 使细胞沉淀, 并将最后一次沉淀的细胞悬

浮于 9% 蔗糖内, 使细胞浓度为 1.0×10^7 个/ml。

测量在 SX-2 型细胞电泳自动计时仪上进行, 电压 40V, 极间距离 5cm, 电泳小室为方形玻璃毛细管。每一样品在 25℃ 下测定 40—50 个细胞的迁移时间, 以其平均值作为该样品细胞的迁移时间, 由此计算出其平均电泳迁移率, 单位为微米/秒/伏特/厘米。计算方法详见文献^[7]。

细胞表面电荷的标记 经上述 ax-cAMP-丁酯温育后的细胞悬浮于 4℃ 的 PBS (pH7.2) 内, 离心 (1000rpm, 5 分钟), 并重复一次以漂洗细胞。最后一次沉淀的细胞在 0.2% 戊二醛 (0.1M 磷酸缓冲液, pH7.2) 内固定 10 分钟。再用 PBS 冲洗两次后, 悬浮于 2ml PBS 内。在悬液中加入正电荷铁蛋白 (Miles Yeda Ltd, Israel 产品), 使其浓度为 0.05mg/ml。使细胞充分混匀后, 在室温下温育 1 分钟。按前法用 PBS 冲洗细胞, 除去游离铁蛋白。最后, 按常规制备超薄切片, 在 H-500 电镜下观察。对照组的处理与实验组完全相同。用于标记表面电荷与以下形态计量分析的细胞均取自三只动物。

电镜资料的定量分析 包括两方面。

(1) 表面电荷密度测定

经正电荷铁蛋白标记的每个样品制备成三

* 部分结果曾分别在 1982 年 10 月北京生物膜的结构与功能学术讨论会和 1983 年 11 月第四届生物物理学术会议 (石家庄) 上摘要报告。

个组织块,从中任选两个;每块制备三个切片载网,随机选取一个,于电镜下拍照 10 张,各照片分别摄自 10 个细胞。为保证取样的随机性,一个细胞拍摄完毕,按顺序移动样品,拍摄下一个细胞进入取景框的第一个视野。每张照片均包括一部分细胞表面,放大倍数为 22,000 倍。用上述方法,每一样品拍照 20 张,实验组与对照组各 60 张。

在放大 44,000 倍的正片上,用测试线计量细胞表面微绒毛区与非微绒毛区的表面积方法同文献[6]。与此同时,计算与微绒毛及非微绒毛表面结合的铁蛋白颗粒数。

(2) 计量形态学测量

在电镜下对实验组与对照组细胞各拍照约 120 个。这 120 个细胞来自 3 只动物,每只动物的细胞来自 2—3 个组织块,每块制备一个载网。在电镜拍摄每一个进入视野的细胞,直至同一载网上摄得 15—20 个细胞为止。电镜放大 1,800 倍。将负片放大七倍,借测试点计量法^[8]测量与计算细胞核在细胞中的体密度及核仁在胞核中的体密度。

借多功能测试线测量各主要细胞器的体密度或面密度^[8]。此时,实验与对照细胞各拍电镜照片 30 张,它们分别来自 3 只动物的 6 个载网。各照片含有一个完整或近于完整的细胞。经光学放大后的正片为 37,800 倍。

上述电镜照片均不包括变性坏死或处在分裂过程中的细胞。

结 果

计量形态学研究 由电镜图(图 1,见封 2)可见, Ehrlich 腹水癌细胞大体呈椭圆形。核大而不规则,核仁明显。胞浆内线粒体数量中等,其大小和形态变异很大。在 Eagle's 液内于 37℃ 温育 4 小时后,两组细胞中均可见到部分线粒体的基质丢失,嵴的膜结构溶解。此外,在胞浆内尚能见到 Golgi 氏区、溶酶体和粗面内质网。

测量细胞核与核仁的体密度时选择的参照体积分别为整个细胞和细胞核的体积。结果显

示,不论实验与对照细胞,细胞核体积均为整个细胞的四分之一,而核仁体积则为胞核体积的十分之一左右,两组细胞间无显著差异。

计算了两组细胞中溶酶体结构, Golgi 氏区和线粒体的体密度。其中溶酶体结构系指形态学上由一层单位膜包围的电子致密小体, Golgi 氏区则指 Golgi 氏器扁平囊,附近的相关小泡和扁平囊与这些小泡间的胞液(均见图 1)。结果表明,实验与对照组细胞间,这三种细胞器的体密度无显著区别。

测量了粗面内质网的面密度(S_v),即单位体积细胞中所含粗面内质网的表面积,单位为微米²/微米³。计算公式:

$$S_v = 2 \times \frac{I}{L} \times \frac{\text{放大倍数}}{10,000}$$

L , 测试线总长度(单位为厘米); I , 测试线与内质网膜交点数。本实验中放大倍数为 37,800。测量结果显示,实验与对照细胞中的粗面内质网面密度亦无显著差异。

Ehrlich 腹水癌细胞表面散布着多少不等的微绒毛(图 1)。用计量形态学方法比较了两组细胞微绒毛区的表面积,结果示于图 2。由图可见,两组细胞的微绒毛区表面积均比非微绒毛质膜区表面积要大,不过,与对照相比,实验组细胞微绒毛区表面积所占比例下降,两者间有显著区别($P < 0.01$)。

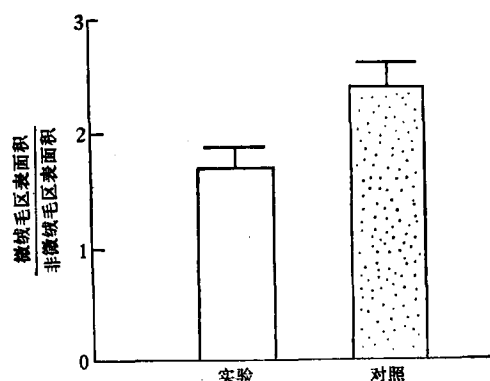


图 2 实验组与对照组细胞微绒毛表面面积的比较

细胞表面电荷密度 经戊二醛固定的 Ehrlich 腹水癌细胞与正电荷铁蛋白一起温育后,在电镜下可以看到结合于细胞表面的铁蛋白颗

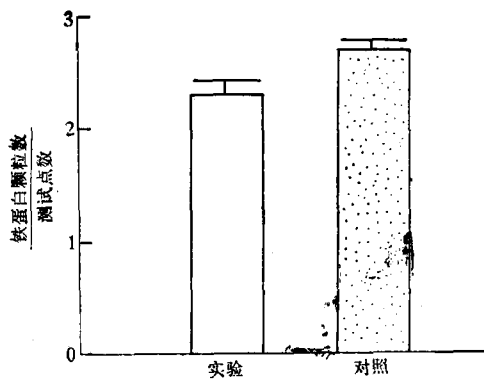


图4 实验组细胞与对照组细胞表面正电荷铁蛋白标记密度的比较

粒(图3,见封2)。比较了两组细胞表面铁蛋白分子的标记密度,结果示于图4。可以看到,在ax-cAMP 丁酯作用下,铁蛋白标记密度下降(与对照相比, $P < 0.05$),提示,这种环核苷酸衍生物可降低细胞表面电荷密度。

细胞电泳迁移率测定 从表1可以看到,除1号小鼠外,各小鼠的给药组细胞电泳迁移率均较对照组低,其平均值比对照细胞低12.6%,二者差异非常显著 ($P < 0.01$)。

表1 实验组与对照组细胞电泳迁移率*的比较

动物编号	实验组	对照组
1	2.16	2.09
2	1.92	2.08
3	1.65	2.08
4	1.58	1.88
5	1.51	1.89
6	1.59	2.02
7	1.79	1.96
8	1.61	1.81
均数±标准误	1.73±0.08	1.98±0.04

* 单位:微米/秒/伏特/厘米

讨 论

有证据表明,在某些肿瘤或转化细胞中,cAMP 含量降低^[3,9,10]。因此,研究 cAMP 含量变化与肿瘤细胞的哪些特征有直接关系,是人们广泛关注的问题。本文结果表明,外源性环核苷酸衍生物可使 Ehrlich 腹水癌细胞微绒毛区表

面积减少,表面电荷密度下降,但对胞内各种细胞器的形态与数量无显著影响。

cAMP 对肿瘤细胞形态影响的资料迄今仍十分有限,而且多为光学显微镜的研究结果。曾报告,cAMP 或其衍生物在使某些肿瘤细胞外形发生变化后,获得正常细胞的一些特征^[1,2],而在另一些肿瘤,则能使部分细胞死亡^[11]。Klein 等曾报告,cAMP 可使大鼠乳腺肿瘤细胞内质网膨大变短,Golgi 氏器增生^[4]。无疑,这些不同结果与细胞种类,药物剂量及作用时间不同等有关。Ehrlich 腹水癌细胞与生理浓度的 ax-cAMP-丁酯温育4小时细胞结构无明显变化,但这显然不能排除作用更长时间发生变化的可能性。由于此时细胞的某些生理功能已发生变化^[9],本实验结果至少说明,cAMP 对肿瘤细胞的细胞器结构即使有影响的话,也是一种出现较晚的继发变化。

与细胞器相反,细胞表面似乎是对 cAMP 含量变化比较敏感的部位。Willingham 等用暗视野显微镜发现,二丁酰-cAMP 处理24小时可使 L929 细胞表面微绒毛减少^[12]。本实验所用定量电镜形态学方法使我们有可能捕捉到在 cAMP 衍生物作用下细胞表面形态的早期变化,这种变化仅靠定性观察是常常难以判定的。我们的结果不但说明,cAMP 含量可影响肿瘤细胞微绒毛的数量,而且进一步证明,这种影响在 cAMP 作用的早期即可发现。微丝对微绒毛的形成可能起重要作用,而 cAMP 可通过激活肌球蛋白轻链蛋白激酶^[13]引起微丝收缩。这可能是 cAMP 对微绒毛影响的分子基础。

ax-cAMP-丁酯使 Ehrlich 腹水癌细胞表面负电荷密度下降的原因仍然有待研究。不过,已经证明,细胞膜内的某些酶可因 cAMP 的影响而改变活性^[14]。这种活性的变化可能伴有带电状态的改变,并影响细胞表面电荷的数量。表面电荷与细胞识别,粘着等多种功能有关^[15,16]。肿瘤细胞中 cAMP 含量的降低可能是导致细胞表面电荷增加的原因之一,而这种改变则可能与肿瘤细胞的扩散和转移有密切关系。

ax-cAMP-丁酯为我院药理学系王序教授提供; 本室卫之滔、于桂芬、白俊海等同志参加了有关技术工作, 谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Cho-Chung, Y. S.: in *Influences of hormones in tumor development*, Vol. 1, 55—94, CRC Press, Inc., 1979.
- [2] Prasad, K. N.: *Exp. Cell Res.*, **70**, 27, 1972.
- [3] Johnson, G. S. et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **185**, 413, 1971.
- [4] Klein, D. M. et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **58**, 813, 1977.
- [5] 张孙曦等: 《生物膜的结构与功能学术讨论会论文摘要汇编》126页, 1982, 北京。
- [6] 樊景禹等: 《生物化学与生物物理进展》, **2**, 40, 1983。

- [7] 樊景禹等: 《北京医学院学报》, **2**, 81, 1983。
- [8] Williams, M. A.: in *Practical methods in electron microscopy* (ed. by A. M. Glauret), Vol. 6, Part 2, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 1977.
- [9] Froehlich, J. E. et al.: *J. Cell Biol.*, **55**, 19, 1972.
- [10] Sheppard, J. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1316, 1971.
- [11] Coffino, P. et al.: *Am. J. Pathol.*, **81**, 199, 1975.
- [12] Willingham, M. C. and Pastan, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1263, 1975.
- [13] Trotter, J. A.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 8781, 1979.
- [14] Iuly, P. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **282**, 447, 1972.
- [15] Grinnell, F. et al.: *J. Cell Biol.*, **66**, 470, 1975.
- [16] Skutelsky, E. et al.: *J. Cell Biol.*, **43**, 8, 1969.

[本文于1983年12月5日收到]

^{60}Co γ 射线对人红血球光散射特性的影响

薛良琰 张仲伦

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

关于辐射引起红血球溶血以及膜的通透性和流动性增加方面的工作, 国内外已有很多报道^[1-3]。本文报道一种红血球膜受射线照射后发生变化的散射光强度测定法, 并探索散射光随剂量变化与细胞膜结构和功能变化之间的关系。

一、材料和方法

红血球取自健康的人血。离心除去血浆后, 再用 pH7.4 的缓冲液洗两次, 然后配制成红细胞压积为 0.50 的红血球悬浮液, 存放于冰箱中备用。

按程龙生等人^[3]的方法除去血红蛋白的红血球胞影 (ghost)。缓冲液用 PBS 溶液。

实验所用的缓冲液有四种: Tris-KCl 缓冲液 (即 153mM KCl + 17mM Tris), Tris-NaCl 缓冲液 (153mM NaCl + 17mM Tris), PBS 缓冲液 (5mM PO_4^{3-} + 150mM NaCl), 生理盐水 (0.9% NaCl)。

压积为 0.50 的红血球样品用缓冲液稀释

到适当浓度, 然后用 ^{60}Co γ 射线在室温下照射, 剂量率为 1Krad/min。浓度为 100 μg 膜蛋白/ml 的红血球胞影在同样条件下照射。照射后样品和对照样品在冰箱中存放 24 小时后测量光散射强度。

散射光强度是用生物物理所研制的荧光分光光度计在与入射光成 90 度方向上测量的。

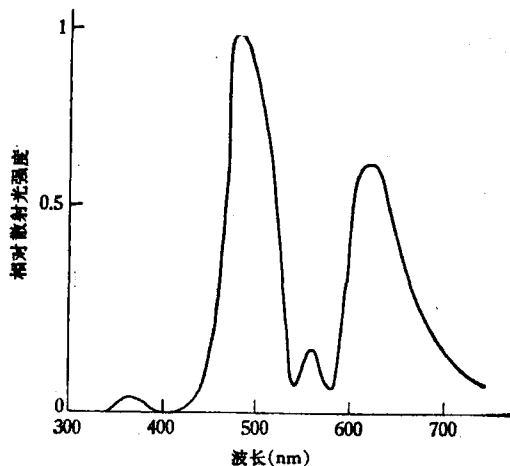


图 1 散射光强度随激发波长变化

“外源性环核苷酸衍生物 **ax-cAMP**- 丁酯对肿瘤细胞表面的影响”的图 1 及图 3

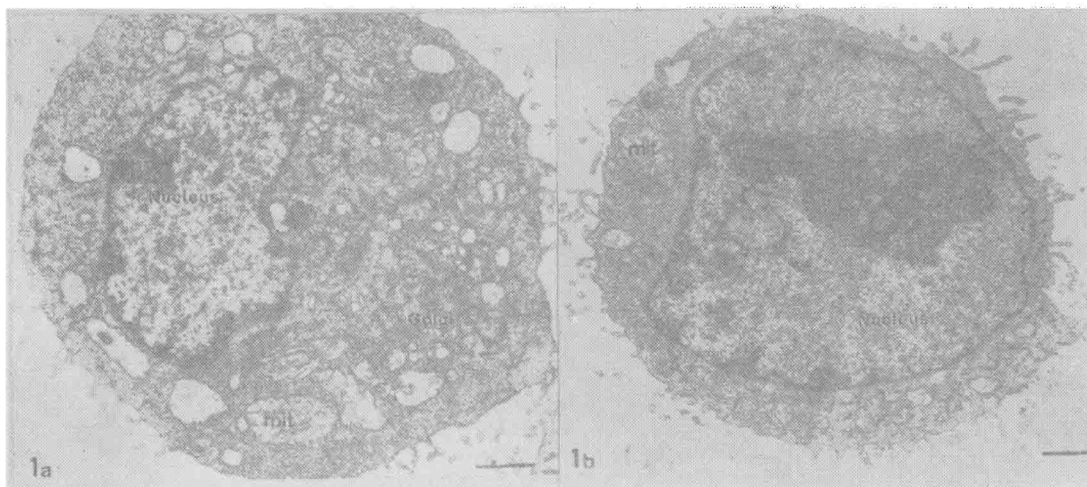


图 1 **ax-cAMP**-丁酯作用下 Ehrlich 腹水癌细胞(a) 和对照细胞(b) 的形态学特征

注意前者微绒毛数量较少,铁蛋白标记密度较低。mit: 线粒体; Golgi: Golgi 氏区; Nucleus: 细胞核。标尺: $1\mu\text{m}$ 。

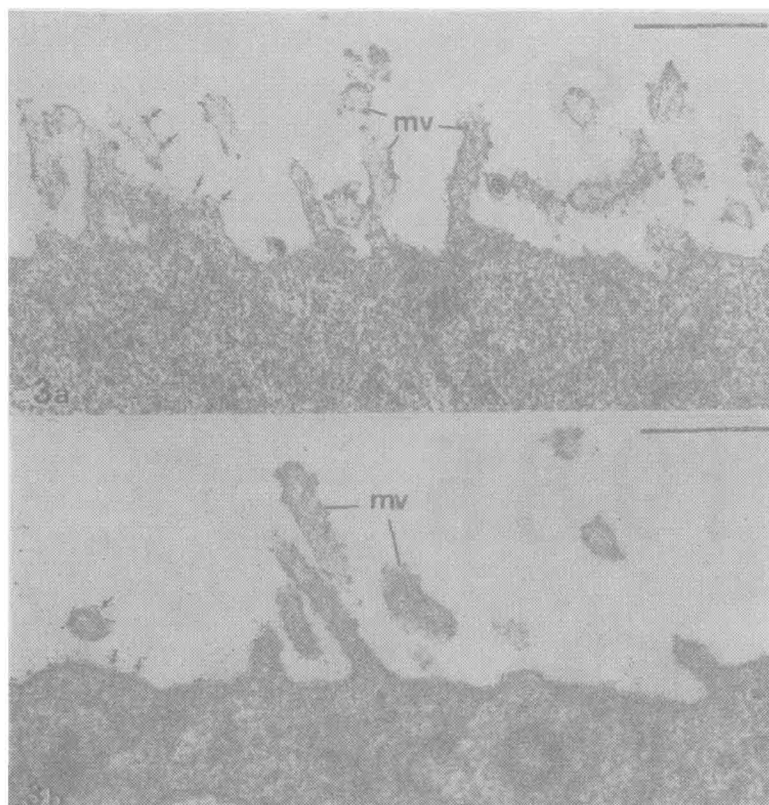


图 3 **ax-cAMP**-丁酯对 Ehrlich 腹水癌细胞表面铁蛋白标记密度的影响

a. 对照细胞; b. 给药细胞, 箭头表示结合于细胞表面的铁蛋白颗粒; mv: 微绒毛; 标尺: $0.5\mu\text{m}$ 。