

GM3 对 J6-2 细胞的促分化作用及对鞘糖脂与磷脂组分的影响*

张新波¹⁾ 崔肇春²⁾ 汤乃梅 朱正美

(大连医学院生化教研室, 大连市 116023)

提 要

本文在用形态学与组化手段证实神经节苷脂 GM3 促进国人白血病细胞系 J6-2 分化的基础上, 研究了分化前后细胞鞘糖脂及磷脂组分的变化。作者用自行提纯的 GM3 表明, J6-2 细胞在分化前后没有显著的神经节苷脂组分的改变, 中性鞘糖脂组分 CMH 在分化后明显增多。GM3 使 LPC、SPM 及 PI + PS 等磷脂组分减少, 但使 PC 组分增多。此项结果提示了神经节苷脂的一个新的功能——调节磷脂代谢, 但其具体机制尚待阐明。

关键词 白血病细胞, 神经节苷脂 GM3, 鞘糖脂, 磷脂, 促分化

神经节苷脂 (ganglioside, Gl) 是酸性鞘糖脂 (glycosphingolipid, GSL) 的一种, 其功能是近年来人们甚为关注的问题。Gl 在参与细胞间的识别、作为分化的标志物、作为某些信息的受体、影响细胞的代谢诸方面已有了不少综述^[1,2]。Gl 的促分化作用最早是在 1985 年由 Saito 与 Nojiri 等人^[3]报道的。他们发现外源性 GM3 能促使 HL-60 细胞沿单核/巨噬细胞途径分化。由于 GM3 是人体的生理组分, 上述发现受到了重视^[4,5]。迄今为止, 白血病细胞的促分化研究主要是用 HL-60 细胞进行的^[6]。为了观察 GM3 促分化作用的普遍性, 以及为了阐明 GM3 促分化作用的机制, 我们用国人建系的人单核样白血病细胞系 J6-2^[7,8] 进行了本研究。结果表明 GM3 确实能使 J6-2 细胞分化, 细胞分化后它的 Gl 组分没有明显改变, 而中性 GSL(N-GSL) 则以神经酰胺单己糖苷 (CMH) 的增加为明显的特征, 其磷脂组分则以溶血磷脂酰胆碱 (LPC)、鞘磷脂 (SPM)、磷脂酰肌醇 + 磷脂酰丝氨酸 (PI + PS) 的减少及磷脂酰胆碱 (PC) 的增多为明显的特征。

1 材料与方 法

1.1 材料 J6-2 细胞来自中科院天津血液病研究所, 本院林慧娴教授转赠; 小牛血清, 长春生物制品研究所; 胰岛素, Nordisk Gentofte, 丹麦; 谷氨酰胺, 上海东风试剂厂; RPMI 1640 培养基, Gibco, 美国; 佛波酯 (TPA), Florisil, 间-苯二酚, 硝基蓝四氮唑 (NBT), Sigma, 美国; DEAE-Sephadex A-25, DEAE-cellulose 22, Pharmacia, 瑞典; 高效 TLC (HPTLC) 板, Merck, 西德; 其它试剂均为国产分析纯。CO₂ 孵箱, Forma Scientific, 美国; TLC 扫描仪, Camag, 西德; 透射电镜, JEOL, 日本。GM3 为自行提取^[9]。

1.2 方法 1.2.1 细胞培养^[7]: 用含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。促分化剂的终浓度, GM3 为 50 μmol/L, TPA 为 10 ng/ml。GM3 处理

* 自然科学基金资助课题的一部分。1) 本文系博士论文的一部分, 现通信处: 北京医科大学生理教研室博士后流动站 2) 通信联系人。

收稿日期: 1990-12-30 收回日期: 1991-05-27

的细胞培养 6d, TPA 为 3d, 每两天换一次含促分化剂的培养液; 以下如不加说明, 培养条件均同此。

1.2.2 形态学检查: a) 光镜检查——细胞涂片, 用瑞氏-吉姆萨 (W-G) 染色后观察。做半薄切片时, 以测微器测核质比。b) 电镜检查——用石蜡包埋细胞后做超薄切片, 以透射电镜观察。

1.2.3 组化检查: 吞墨与硝基蓝四氮唑还原实验按常规方法^[10]进行。

1.2.4 GSL 的提取: a) 总 GLs 的提取^[11]——取 1.5×10^8 个细胞加 10 ml 氯仿 (C)/甲醇 (M) (1:1, v/v) 提取 3 次, 合并提取液, 得总脂提取液, 按文献^[11]分离 GLs; TLC 展开用 C/M/0.2% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60:40:9, 体积比), 以间-苯二酚试剂显色^[12]。b) N-GSL 的提取^[13]: 用分离总 GLS 后的溶液按文献^[13]进行提取。TLC 展开用 C/M/ H_2O (60:35:8, 体积比), 显色用二苯胺试剂^[14]。

1.2.5 磷脂的提取及其 HPTLC: 将 4×10^7 个细胞用 0.9% NaCl 洗三次, 加水 1.5 ml, 超声 3 min, 进行 Folch 分配 (即加 2:1 的 C/M 6 ml), 取下相浓缩, 进行高效 TLC, 展开剂为 C/M/冰乙酸/甲酸/水 (70:30:12:4:2, 体积比)。用乙酸铜试剂 (3% CuAc_2 在 8% 磷酸中) 显色。以 TLC 扫描仪扫描。

2 结 果

2.1 对细胞增殖的影响 GM3 对 J6-2 细胞的增殖表现出明显的抑制作用 (图 1), 但不如 TPA 阳性对照组的强。培养 6 天后, GM3 的抑制率为阴性对照组的 65.39%; 培养 3 天后, 为 60%。TPA 的抑制率在 3 天后为 80%。

2.2 对细胞形态的影响 光镜下可见, GM3 处理 4 天后, 细胞的核质比变小, 胞体变大, 细胞核仁消失或减少 (以上特点从电镜上都可可见到, 故光镜图片免)。电镜下还可见到胞浆中线粒体、内质网, 脂滴明显增多, 可见到次级溶酶体和糖原颗粒, 偶见高尔基体 (图 2 见封

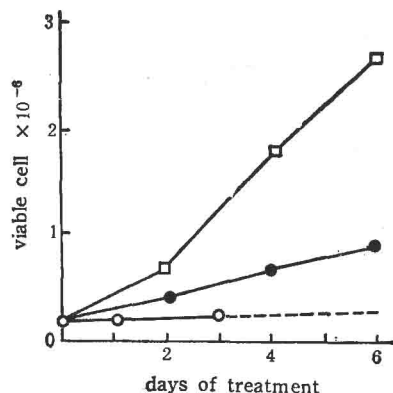


图 1 GM3 对 J6-2 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of GM3 on the proliferation of J6-2 cells

●—●: GM3 (50 $\mu\text{mol/L}$) 加至含有 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中; ○—○: TPA (10 ng/mL) 作为阳性对照; □—□: 对照组不加任何处理
GM3 (●—●, 50 $\mu\text{mol/L}$) was added to RPMI 1640 medium containing 20% calf serum; TPA (○—○, 10 ng/mL) was used as positive control; negative control (□—□) was without any treatment

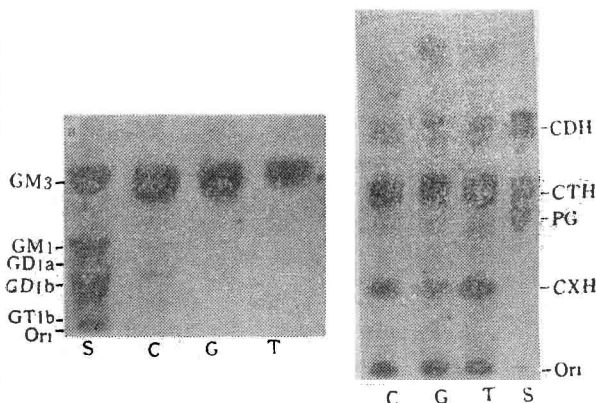


图 3 经 GM3 处理后, J6-2 细胞 GSL 的 HPTLC 图谱

Fig. 3 HPTLC patterns of GSL of J6-2 cells treated by GM3 and TPA.

□—□: control ●—●: GM3 ○—○: TPA

(a) GLs 图谱, GLs pattern; (b) NGSL 图谱, NGSL pattern. C: control; G: GM3 treated; T: TPA treated; S: standard; CDH: 神经酰胺二己糖苷, ceramidihexoside; CTH: 神经酰胺三己糖苷, ceramide trihexoside; PG: 副红细胞糖苷脂, paragloboside; CXH: 未知的多糖基 NGSL, NGSL with unknown number (>4) of hexoside; Ori = Origin

二)。经 TPA 处理后, 其形态学变化与 GM3

表 1 GM3 对 J6-2 细胞吞墨与 NBT 还原能力的影响

Table 1 Effects of GM3 on the phagocytosis and NBT reduction capacities of J6-2 cells

	对 照 control	处理 treatment	
		GM3	TPA
吞墨细胞(%) phagocytosing cells (%)	5.69±2.30	46.72±7.18 ²⁾	87.85±3.93 ²⁾
NBT 还原细胞(%) NBT-positive cells (%)	16.58±3.52	23.20±2.72 ¹⁾	80.71±4.48 ²⁾

吞墨及 NBT 还原阳性细胞的百分率系数至少 200 个细胞得来的。每组数字代表 4—6 个组计数的 $\bar{x} \pm SD$ 。1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (都与对照组相比)。

The percentage of phagocytosing and NBT positive cells were ascertained by counting at least 200 cells. Each value represents the mean $\pm SD$ of 4—6 sets of countings. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ (compared with control).

表 2 GM3 及 TPA 对 J6-2 细胞 GSL 组分%含量的影响

Table 2 The effects of GM3 and TPA on the % contents of GSL components of J6-2 cells

GSL species	No. of expts.	control 对照	处理 Treatment	
			GM3	TPA
Gls	2			
GM3		96.04±0.93	93.38±5.54 ²⁾	95.01±1.23 ²⁾
GD1a		3.96±0.63	6.62±5.54 ¹⁾	4.99±1.23 ¹⁾
NGSL	3			
CMH		5.79±1.91	19.83±2.16 ²⁾	11.75±1.81 ²⁾
CDH		14.37±4.24	15.48±4.47 ¹⁾	16.89±3.82 ¹⁾
CTH		42.98±3.34	35.61±6.69 ¹⁾	39.21±3.20 ¹⁾
PG		6.79±1.30	5.31±2.01 ¹⁾	8.50±0.66 ¹⁾
CXH		30.14±8.79	23.34±10.39 ¹⁾	23.64±8.76 ¹⁾

1) $P > 0.05$ 2) $P < 0.05$ (与对照组相比, compared with control)

的大致相同,但不如后者的明显。上述形态学观察表明 GM3 促使了 J6-2 细胞的分化。

2.3 对吞墨能力与 NBT 还原能力的影响 处理 4d 后, GM3 使吞墨率由对照组的 5.69% 上升到 46.72%, 但不如 TPA 组上升的高(达 87.85%); NBT 还原阳性细胞, GM3 组为 23.20%, 也不如 TPA 组上升幅度大(达 80.71%), 对照组为 16.58% (表 1)。

2.4 对 GSL 组分的影响 经 GM3 处理后, J6-2 细胞的 Glc 组分仍以 GM3 为主, 两组无显著差别; NGSL 中的 CMH 在分化后明显增多(图 3, 表 2)。

2.5 对磷脂代谢的影响 J6-2 细胞在 GM3 的作用分化后, LPC 的含量明显下降, 减少的组分还有 SPM、PI + PS, 含量增加的

表 3 GM3 及 TPA 处理 J6-2 细胞后磷脂各组分
的%含量Table 3. Percentage contents of phospholipids
of J6-2 cells treated by GM3 and TPA

磷脂 PLs	对照 control	GM3 处理 GM3 treated	TPA 处理 TPA treated
LPC	4.20±1.14	1.40±0.23 ²⁾	7.81±1.29
SPM	17.93±1.58	13.45±0.58 ¹⁾	17.62±2.27
PC	44.46±1.04	55.34±0.64 ²⁾	46.89±1.65
PI + PS	8.80±0.91	5.17±0.08 ¹⁾	7.00±0.43
PE	15.96±0.62	17.60±0.69	13.43±0.53 ¹⁾
CL	8.65±1.38	7.04±0.30	7.25±1.84

每个数据表示 3 回实验的平均值 $\pm SD$, 每回测 3 次。处理时间 GM3, 6d; TPA, 3 d, 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 。

Each value represents the mean $\pm SD$ of triplicate quantitation of three different experiments. Duration of treatment: GM3 for 6 days, TPA for 3 days. 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ 。

组分是 PC (图 4, 表 3)。

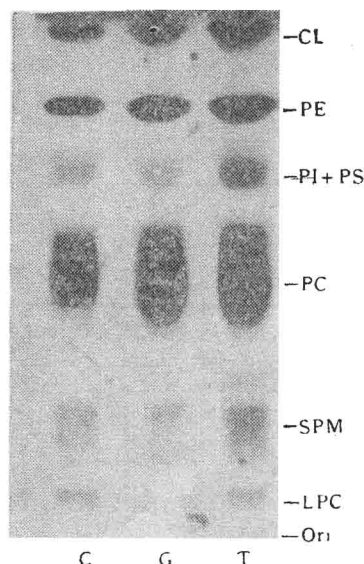


图 4 GM3 与 TPA 处理 J6-2 细胞后磷脂的 HPTLC 图谱

Fig. 4 HPTLC patterns of phospholipids of J6-2 cells treated with GM3 and TPA

C: 对照 control; G: GM3; T: TPA

3 讨 论

光镜及电镜所见的形态学变化都表明 GM3 使 J6-2 细胞发生了分化, 并表明 GM3 (50 $\mu\text{mol/L}$) 的促分化作用强于 TPA (10 ng/ml) 的, 但在吞墨、NBT 还原及增殖抑制能力等指标上, TPA 的促分化作用强于 GM3。由于 TPA 的促癌 (tumor promoter) 作用, TPA 不具备临床应用的前景。

本研究表明 J6-2 细胞在分化前, 其 GLs 组分中即以 GM3 为主, 其含量高达 96.04% (表 2), 但只有在外源性 GM3 (来自狗红细胞)^[9] 的作用下, 细胞才发生分化。这个结果十分有趣, 一个合乎逻辑的解释是外源性与内源性的 GM3 具有不同的生理作用, 其区别在于神经酰胺部分的组成不同。外源性 GM3 起作用的方式不外有两种: 一种是其糖链部分与细胞表面的糖受体结合, 经内吞将外源性 GM3 转至细胞内, 再触发导致分化的一系列反应; 另一种是以前神经酰胺部分直接插入双层质膜的外层, 去引发导致分化的一系列反应。作者们曾报道外源性 GM3 可降低 HL-60 细胞膜的流

动性^[9], 这支持通过神经酰胺直接插入质膜的看法。今后若用蛋白酶处理 J6-2 细胞后, GM3 的促分化作用丧失, 即支持 GM3 系通过与糖受体的结合而起作用的, 否则即可能为后一方式。

GM3 使 J6-2 细胞的 N-GSL 组分 CMH 含量明显增加, 其意义尚有待阐明。按 Nojiri 等人^[10]提出的看法, 即细胞分化中增加的组分可能具有促分化作用, CMH 是否具有促分化作用, 值得一试。至于 CMH 增加的机制, 也是有待阐明的问題。

GM3 对 J6-2 细胞的磷脂组分的影响是饶有趣味的。和对照组相比, GM3 处理组的 LPC, SPM, PI + PS 各组分明显减少, 而 PC 则明显增多。TPA 也促使 J6-2 细胞分化, 但不表现上述变化 (图 4、表 3)。这一结果第一次提示 GLs 对磷脂的代谢能产生深刻的影响, 这对 GLs 功能的研究提供了新的线索, 值得深入研究。

参 考 文 献

- 1 Hakomori S I. *Ann Rev Biochem*, 1981; 50: 151
- 2 Ledeen R W, Hogan E L, Tettamanti A J *et al. New Trends in Ganglioside Research*. Fidia Research Series, Vol 14, Padova: Liviana Press, 1988: 193—198
- 3 Saito M, Terui Y *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1985; 132(1): 223
- 4 Tsui Z C, Hou W H, Yang L *et al. In Vivo*, 1990; 4 (2): 205
- 5 Xia X J, Gu X B, Santorell A C *et al. J Lipid Res*, 1989; 30(2): 181
- 6 Lubbert M & Koeffler H P. *Blood Rev*, 1988; 2(1): 121
- 7 Wu K F, Zhang Y Q, Song Y H *et al. Proc Chinese Acad Med Sci, PUMC*, 1986; 1(4): 218
- 8 宋玉华, 代红, 林永敏等. *中华血液学杂志*, 1982; 3(3): 150
- 9 崔肇春, 侯卫红, 朱正美. *生物化学与生物物理进展*, 1990; 17(3): 206
- 10 王永才, 王东菊编著. *血液骨髓细胞检查*. 北京: 科学技术文献出版社, 1989: 90—91, 335—336
- 11 Ueno K, Ando, Yu R K. *J Lipid Res*, 1978; 19(7): 863
- 12 Ledeen R W, Yu R K. *Methods in Enzymol*, 1983; 53: 139
- 13 Vance D E, Sweeley C C. *J Lipid Res*, 1967; 8(6): 621
- 14 Smith I. *Chromatographic and electrophoretic Techniques*. 4th ed, Chicago: Year Book Medical Publishers, 1970: 353
- 15 Nojiri H, Takaku F, Tetsuka T *et al. Blood*, 1984; 64 (2): 534

THE DIFFERENTIATION OF J6-2 CELLS INDUCED BY GANGLIOSIDE GM3 AND THE COMPARISON OF GLYCOSPHINGOLIPID AND PHOSPHOLIPID COMPOSITION BEFORE AND AFTER DIFFERENTIATION

Zhang Xinbo Cui Zhaochun Tang Naimei Zhu Zhengmei

(Dept. of Biochemistry, Dalian Medical College, Dalian 116023, China)

ABSTRACT

By morphological and histochemical methods, the authors demonstrated the differentiation of J6-2 leukemic cells induced by exogenous ganglioside GM3, and studied the change of glycosphingolipid and phospholipid composition after differentiation. The results showed that the main ganglioside component was GM3, and no significant changes were seen after differentiation. The neutral GSL component CMH and phospholipid component PC were shown to increase after differentiation, and lyso-PC, sphingomyelin, PI+PS were shown to decrease. This study suggests a new function of ganglioside—regulation of phospholipid metabolism, the mechanism of which remains to be elucidated.

Key words Leukemic cells, Ganglioside GM3, Glycosphingolipids, Phospholipids, Differentiation inducer

血清胃泌素变化与急性胃粘膜病变关系的研究

吴 同 乐

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

提 要

对大白鼠血清中胃泌素水平的变化与急性胃粘膜病变的关系进行了初步的研究, 结果表明以消炎痛为诱因引起的急性胃粘膜病变大白鼠血清胃泌素水平明显增高。而维酶素可以抑制因消炎痛引起的急性胃粘膜病变时血清胃泌素的释放, 对胃粘膜具有保护作用。

关键词 消炎痛, 胃粘膜, 急性胃粘膜病变, 血清胃泌素, 维酶素, 前列腺素

急性胃粘膜病变 (acute gastric mucosal lesion, 简称 AGML) 是指以胃粘膜浅表性损伤为特征的一组急性胃粘膜出血性病变, 早在 1883 年 Beaumont 就曾报道由于过度饮酒而引起急性胃粘膜病变的实例^[1]。此后, 相继又

有人报道了某些药物如消炎痛可引起急性胃粘膜的出血性病变^[2-4], 并提出这种病变可能与胃酸分泌失调有关。而作为一种具有广泛生理作