

Escherichia coli. The results showed that such protein was successfully prepared and its bispecific activities were testified by affinity blot and Western blot. The biotin binding and immunocytochemistry assay indicated that the expressed fusion protein was

capable of binding biotin molecule and CEA antigen respectively. This protein has the potential application when combined with the corresponding tests.

Key words single chain antibody, fusion protein, gene expression

肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体的流式细胞分析

李文新 张荣军 谭 成 陶永辉 金 坚

(江苏省原子医学研究所, 核医学国家重点实验室, 无锡 214063)

摘要 建立肝细胞表面去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 的流式细胞分析方法 (FCM), 对正常及损伤鼠肝细胞、肝癌细胞 (BEL-7402) 表面的 ASGPR 作同步比较分析. 以异硫氰酸荧光素标记的新半乳糖白蛋白 (FITC-NGA) 为 ASGPR 的特异性配体, 以培养的正常肝细胞 (L-02) 为靶细胞, 建立肝细胞表面 ASGPR 的 FCM. 测定并计算正常及损伤鼠肝细胞, BEL-7402 细胞与同一浓度的 FITC-NGA 同步反应后的平均荧光强度 (MIF) 值. FITC-NGA 与 L-02 细胞表面 ASGPR 趋近饱和结合的浓度为 0.4 mg/L, 该浓度下正常及损伤鼠肝细胞, BEL-7402 细胞的 MIF 值分别为 228.7、5.81、1.13. 该结合可以被至少 50 倍于 FITC-NGA 的 NGA 或 10 mmol/L 的 EDTA 完全抑制. FCM 能够良好地揭示 FITC-NGA 同 ASGPR 之间的受配体结合特性. 该方法证实 BEL-7402 细胞表面几乎没有 ASGPR, 损伤鼠肝细胞表面 ASGPR 的数量较正常鼠肝细胞显著减少.

关键词 肝细胞, 新半乳糖白蛋白, 去唾液酸糖蛋白受体, 流式细胞分析, 荧光强度

学科分类号 Q24

去唾液酸糖蛋白受体 (ASGPR) 是一种完全由肝细胞表达的膜表面蛋白. 它能够识别带有半乳糖残基的糖蛋白并将这些循环系统中潜在的毒性物质经受体介导的胞吞作用加以清除. 作为肝细胞特有的, 且在肝细胞表面大量存在的膜受体, 其数量的多寡、功能的好坏直接反映出肝细胞的正常与否^[1]. 体内受体显像及体外放射配体结合实验均证实, 经半乳糖修饰的人血清白蛋白——新半乳糖白蛋白 (NGA) 能够被 ASGPR 识别并为之特异性结合, 是理想的 ASGPR 配体^[2,3]. 流式细胞技术 (FCM) 是一种简单、快速的细胞分析技术, 它最大程度地保证了细胞的完整性, 为细胞膜受体的分析提供了适宜的条件^[4]. 本文用异硫氰酸荧光素标记的 NGA (FITC-NGA) 作为标记配体, 以 L-02 为靶细胞, 建立了肝细胞表面 ASGPR 的 FCM; 并利用 FCM 能够对大量细胞进行逐个监测, 对不同细胞进行同步分析的特性, 对正常鼠肝细胞, 损伤鼠肝细胞及肝癌细胞 (BEL-7402) 表面的 ASGPR 进行了同步比较分析.

1 材料与方法

1.1 材料

肝细胞 (L-02) 和肝癌细胞 (BEL-7402) 由中国科学院上海细胞生物研究所提供; RPMI1640 培养液为 GIBCO 产品; SD 大鼠由本所实验动物中心提供 [动物环境及质量合格证号为苏动 (环) 97020、苏动 (质) 97028]; Ficoll 分离液由中国医学科学院天津血液病研究所提供; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 为 Sigma 公司产品; PD-10 柱为 Pharmacia 公司产品; NGA 冻干品由本室合成^[5]; 人血清白蛋白 (HSA) 由无锡市血站提供; 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 NGA 和 HSA 的荧光标记

以 100 mmol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH 9.0) 分别溶解 FITC 和 NGA (或 HSA), 按摩尔比 3:1 混合, 37℃ 振荡反应 50 min, PD-10 分离,

Tel: (0510) 5514482-3532, E-mail: jsnm@public1.wx.js.cn

收稿日期: 1999-07-02, 修回日期: 1999-11-03

25 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl_2 和 5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.5) 洗脱, 收集蛋白质峰. 标记物的鉴定采用 F/P 比值法.

1.3 慢性肝损伤大鼠模型的建立

SD 大鼠 10 只, 体重约 250 g, 将大鼠放入底部盛有 10 ml CCl_4 的干燥器中, 使其每天吸 CCl_4 约 10 min, 连续吸 2 个月, 并经病理分析证实.

1.4 大鼠肝细胞的提取

参照文献 [6] 方法. 取正常大鼠和慢性肝损伤模型鼠, 放血处死, 取出肝脏, 去结缔组织后, 剪成小块, 以冷 Hanks' 液快速浸洗三遍, 尽量洗去血液. 0.03% 胶原酶消化 15 min; 200 目钢网过滤. 大量 Hanks' 液清洗终止消化后, 用 Ficoll 分离液分离细胞. 加入两倍于肝细胞体积含 10 mmol/L EDTA 的培液, 0~4℃ 静置 45 min, 以置换鼠肝细胞表面原先结合着的去唾液酸糖蛋白. 然后用大量不含 EDTA 的冷 Hanks' 液快速清洗两遍. 相差显微镜观察肝细胞形态并计数后, 用培液稀释肝细胞至 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$, 0~4℃ 备用.

1.5 饱和结合和结合抑制分析

取 L-02 细胞悬液 ($0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$) 300 μl , 加 50 μl 不同浓度的 FITC-NGA, 进行饱和结合分析; 固定上述反应体系中 FITC-NGA 浓度于 0.4 mg/L, 再加入 50 μl 不同浓度的 NGA 或 EDTA, 进行结合抑制分析. 4℃ 反应 60 min, 200 g 离心 5 min, 沉淀经 Hanks' 液清洗两遍后用 0.5 ml PBS 稀释上 Brite HS 流式细胞仪 (美国 Bio-Rad 公司) 检测. 检测前以 FITC-HSA 作为阴性对照, 调节本底荧光的平均荧光道数 (MCF_0) 处于 15 左右.

1.6 平均荧光道数及平均荧光强度的计算方法

计算方法参照文献 [7], $MCF = MCF_d - MCF_0$ (MCF_d 为实测 MCF 值), MIF (平均荧光强度) = $10^{[4 \times MCF / (\text{道数分辨率} - 1)]}$.

1.7 不同肝细胞表面 ASGPR 的同步比较分析

分别配制浓度为 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ 的 L-02 细胞和正常鼠肝细胞或正常鼠肝细胞、慢性肝损伤鼠肝细胞和 BEL-7402 细胞的等比混合悬液. 取上述细胞混悬液 300 μl , 加 50 μl FITC-NGA (终浓度 0.4 mg/L). 以在上述反应体系加入终浓度为 10 mmol/L 的 EDTA 为阴性对照. 其余步骤同 1.5.

1.8 数据处理

MCF_d 值由 Winbryte 软件自动生成. 所有试验均采用三复管, 结果为三管均值.

2 结 果

2.1 FITC-NGA 的鉴定结果

FITC-NGA 的 F/P 值为 2.5, 适用于 FCM 分析.

2.2 L-02 细胞与 FITC-NGA 的结合情况

从图 1 可以看出 L-02 细胞表面 ASGPR 同 FITC-NGA 之间的结合呈明显的可饱和性, 近饱和结合的浓度为 0.4 mg/L, 选用此浓度作为后继的结合抑制及同步比较分析试验的反应用 FITC-NGA 的浓度. 结合抑制试验表明, 50 倍于 FITC-NGA 的 NGA 或 10 mmol/L 的 EDTA 可以使 L-02 细胞的 MIF 值降至以 FITC-HSA 为阴性对照时的值. 因 HSA 在未经半乳糖修饰前不会与肝细胞表面的 ASGPR 发生特异性结合, 故可以据此判断 FITC-NGA 同 L-02 细胞表面 ASGPR 的特异结合已被 50 倍于 FITC-NGA 的 NGA 或 10 mmol/L 的 EDTA 完全抑制.

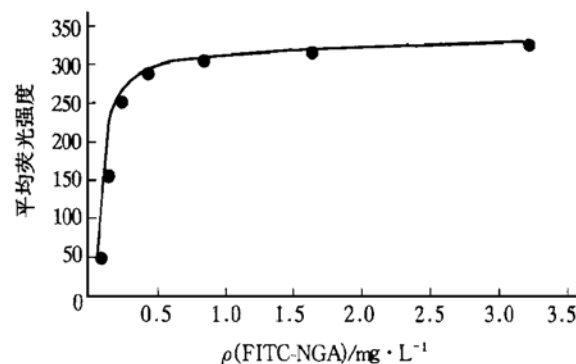


图 1 L-02 细胞表面 ASGPR 与 FITC-NGA 的饱和结合曲线

2.3 正常鼠肝细胞与 L-02 细胞的比较

L-02 细胞与正常鼠肝细胞同步反应体系的 MIF 值为 263.3. 单一细胞反应体系时, L-02 细胞的 MIF 值为 290.6, 正常鼠肝细胞的 MIF 值为 228.7, 两值较为接近. 在同步反应体系中表现为相互拉近的一个单一峰. 上述结果说明 L-02 细胞同正常鼠肝细胞表面的 ASGPR 数量相近, 也说明对正常鼠肝细胞表面原来可能结合着的去唾液酸糖蛋白的解离是成功的. 从近饱和浓度 0.4 mg/L 推算, L-02 细胞与正常鼠肝细胞表面的 ASGPR 数量均处于 10^6 数量级.

2.4 正常、损伤及 BEL-7402 肝细胞的比较

从图 2 可以看出, BEL-7402 细胞的荧光峰几乎接近阴性对照的荧光峰, 损伤鼠肝细胞的荧光峰介于 BEL-7402 细胞和正常鼠肝细胞的荧光峰之间, 且较正常鼠肝细胞的荧光峰有明显左移. *MIF* 值的差异也反映出三种不同功能状态下的肝细胞表面 ASGPR 数量的不同, BEL-7402 细胞表面几乎没有 ASGPR, 损伤鼠肝细胞表面 ASGPR 的数量较正常鼠肝细胞显著减少. 这说明肝细胞表面 ASGPR 数量的多少能够反映肝细胞功能的正常与否, 对肝细胞表面 ASGPR 的分析不失为一种有效的区分不同功能状态肝细胞的方法.

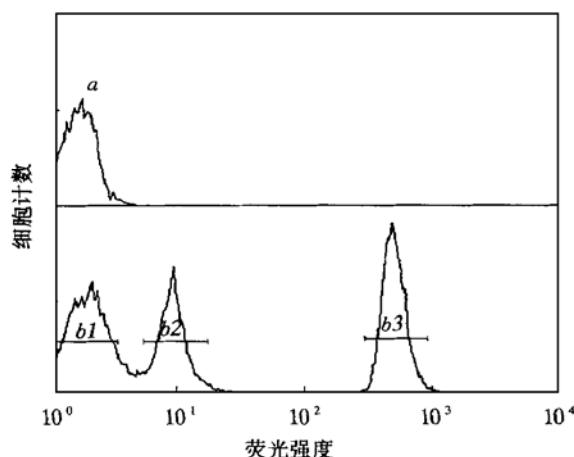


图 2 与 0.4 mg/L FITC-NGA 反应后的三种肝细胞荧光强度的比较

a: 阴性对照的荧光峰 (*MIF* 1.02); *b1*: BEL-7402 细胞的荧光峰 (*MIF* 1.13); *b2*: 损伤鼠肝细胞的荧光峰 (*MIF* 5.81); *b3*: 正常鼠肝细胞的荧光峰 (*MIF* 228.7).

3 讨 论

ASGPR 是哺乳动物肝细胞表面特有的参与受体介导的胞吞过程的膜受体. 它是由两种同源多肽 (HL-1, HL-2) 以非共价结合的方式构成的杂合寡聚体, 以一次穿膜的方式结合在肝细胞膜上, 胞内肽链的长度仅为胞外部分的 1/5. HL-1 和 HL-2 正是以其较长的胞外部分共同构成了配体结合位点. 该结构极易受细胞外环境中损伤性因素的影响. 叠氮化物、秋水仙素、莫能菌素和氯喹均可使其失活, 从而导致肝细胞表面 ASGPR 数量减少, 进而影响到由 ASGPR 介导的胞吞过程^[1]. Casey 等^[6]用碘标去唾液酸血清粘蛋白 (¹²⁵I-ASOR) 对投服酒精与正常饮食大鼠的肝细胞表面 ASGPR 进行的体外放射配体结合分析的结果显示, 乙醇也会导致肝细胞表面 ASGPR 的减少. 此外, 通过对^{99m}Tc-

NGA 体内清除情况的观察发现, 四氯化碳 (CCl₄) 致肝损伤模型鼠对^{99m}Tc-NGA 的清除时间延迟, 并推测 CCl₄ 致肝细胞表面 ASGPR 减少是造成该结果的直接原因^[8]. 除在受体介导的胞吞过程中发挥作用外, 肝细胞表面 ASGPR 也是肝细胞分化完全的一种标志. 具有反分化能力, 且分裂旺盛的肝癌细胞表面没有 ASGPR, 这种缺失使肝癌细胞不具备清除血液中去唾液酸糖蛋白的能力, 这是导致肝癌患者血液中糖蛋白 (尤其是去唾液酸糖蛋白) 含量居高不下的主要原因. Virgolini 等用^{99m}Tc-NGA 经体外配体结合及体内受体显像证实了肝癌细胞表面 ASGPR 的缺失, 并以此对肝局部的良性增生和恶性病变作出了鉴别诊断^[2]. 我们利用 FCM 在受体分析上不仅与放射配体分析方法良好吻合, 而且能够对受体含量不同的大量细胞进行逐个监测, 同步分析的特性^[4]; 通过对正常及损伤鼠肝细胞, BEL-7402 细胞膜表面 ASGPR 的同步比较分析, 将原来用不同标记配体、不同分析方法所得出的结论或推测, 用同一种标记配体、同一个反应体系、同步比较分析的方式加以证实、明确和统一. BEL-7402 细胞表面几乎没有 ASGPR, 损伤鼠肝细胞表面 ASGPR 的数量较正常鼠肝细胞显著减小的结论提示肝细胞表面 ASGPR 是理想的研究和评判肝细胞功能的靶物质.

正常肝细胞表面 ASGPR 的 FCM 的建立是上述同步比较分析实验得以开展的前提. 膜受体 FCM 的关键因素有两个: 首先要有合适的荧光素标记配体. FITC-NGA 同正常肝细胞表面 ASGPR 的结合呈可饱和性 (近饱和结合浓度为 0.4 mg/L) 以及该结合可以被至少 50 倍于 FITC-NGA 的 NGA, 或 10 mmol/L EDTA 完全抑制的结果说明, 用 FITC-NGA 建立起的 FCM 能够良好地揭示 FITC-NGA 同 ASGPR 之间的受配体结合特性. 其次要有合适的阴性对照. 用 FCM 所得到的 *MIF* 值仅是一个相对值, 只能相对地反映受体量的多少. 因此选择合适的阴性对照, 无论是在测试前的仪器校正, 还是在测试后的结果处理上都十分重要. 因 FCM 的分析对象为完整细胞, 而我们对完整细胞膜表面成分认识上的局限性加之特异性受配体结合的非绝对性, 使得选择无关细胞和无关配体作为阴性对照变得十分困难. 而采用抑制受配体结合的方式建立阴性对照不仅较易做到, 而且能够保证实验方法的一致性. 因此实验中我们采用了以 10 mmol/L EDTA 抑制 FITC-NGA 同 ASGPR 结合

的方式作为阴性对照, 取得了令人满意的效果。

从该实验可以看出, FCM 简便、迅速、直观以及无放射性污染和损伤的特性使其在进行诸如配体的筛选, 靶细胞的寻找等初期工作方面有着放射配体结合分析方法所不及的优势, 这为在受配体领域开展一些于基础研究和临床工作都有指导意义的前瞻性研究提供了便利条件。

参 考 文 献

- 1 Stockert R H. The asialoglycoproteins receptor: relationships between structure, function and expression. *Physiol Rev*, 1995, **75** (3): 591~ 609
- 2 Kurtaran A, Muller C, Novacek G, *et al.* Distinction between hepatic focal nodular hyperplasia and malignant liver lesions using technetium-99m-galactosyl-neoglycoalbumin. *J Nucl Med*, 1997, **38** (12): 1912~ 1915
- 3 Vera R, Krohn K A, Stadlnik R C, *et al.* Tc-99m-galactosyl-neoglycoalbumin: *In vitro* characterization of receptor-mediated binding. *J Nucl Med*, 1984, **25** (7): 779~ 787
- 4 Yen C F, Kalunta C I, Chen F S, *et al.* Flow cytometric evaluation of LDL receptors using DiI-LDL uptake and its application to B and T lymphocytic cell lines. *J Immunol Methods*, 1994, **177** (S1~ 2): 55~ 67
- 5 Zhong R J, Jin J, Liang G L, *et al.* Preparation and preclinical studies of a hepatic receptor imaging agent. *Nucl Sci tech*, 1998, **9** (2): 189~ 192
- 6 Casey C A, Kragoskow S L, Sorrel M F, *et al.* Chronic ethanol administration impairs the binding and endocytosis of asialo-orosomucoid in isolated hepatocyte. *J Bio Chem*, 1987, **262** (6): 2704~ 2710
- 7 Chianelli M, Signore A, Hicks R, *et al.* A simple method for the evaluation of receptor binding capacity of modified cytokines. *J Immunol Methods*, 1993, **166** (2): 177~ 182
- 8 Hazama H, Sawamura T, Kumada H, *et al.* Delayed hepatic clearance of technetium-99m-galactosyl-neoglycoalbumin with decrease of asialoglycoprotein receptor in tetrachloromethane-induced cirrhosis. *Acte Academiae Medicinae Kansai*, 1990, **41** (suppl): 131~ 141

Flow Cytometric Evaluation of Asialoglycoprotein Receptor on the Surface of Hepatocytes. LI Wen-Xin, ZHANG Rong-Jun, TAN Cheng, TAO Yong-Hui, JIN Jian (*Jiangsu Institute of Nuclear Medicine, National Laboratory of Nuclear Medicine, Wuxi 214063, China*).

Abstract To establish a flow cytometric method (FCM) for simultaneous evaluation of asialoglycoprotein receptor (ASGPR) on the surface of normal rat hepatocytes, injured rat hepatocytes and hepatoma cells (BEL-7402). FCM for ASGPR was established using normal hepatocytes (L-02) and FITC-conjugated galactosyl-neoglycoalbumin (FITC-NGA), the specific ligand for ASGPR. The mean intensity of fluorescence (*MIF*) of the three different hepatocytes were determined and calculated after simultaneously incubated with FITC-NGA at the same concentration. The concentration of FITC-NGA for saturating ASGPR on the surface of L-02 was 0.4 mg/L, at which the *MIF* of the three different hepatocytes were 228.7, 5.81 and 1.13 respectively. The saturated combination can be completely inhibited by 50-fold NGA or 10mmol/L EDTA. FCM can display soundly the characteristic of the receptor-ligand combination between ASGPR and FITC-NGA. Compared with normal rat hepatocytes, there is no ASGPR on the surface of BEL-7402, and the quantities of ASGPR on the surface of injured rat hepatocytes decreases significantly.

Key words hepatocyte, galactosyl-neoglycoalbumin, asialoglycoprotein receptor, flow cytometry, mean intensity of fluorescence

五氯酚对人胎盘碱性磷酸酶抑制的研究*

耿芳宋 王秀丽 童家明¹⁾ 刘洪明

(青岛大学医学院生物化学教研室, 青岛 266021)

摘要 监测人胎盘碱性磷酸酶在不同浓度五氯酚溶液中活力与荧光光谱的变化; 测定五氯酚对其抑制的类型及 pH 对其抑制的影响。结果显示: 低浓度的五氯酚 (< 1.0 mmol/L) 使酶活力及其荧光强度迅速下降, 发射峰位

* 山东省卫生厅资助项目 (95036). ¹⁾ 青岛大学医学院物理教研室。

Tel: (0532) 3839121, E-mail: mcqd@public.qd.sd.cn 收稿日期: 1999-07-20, 修回日期: 2000-03-08