

- and gels of hemoglobin S. *Biophysical Journal*, 1987, (50): 1015~1020
- 5 黄耀熊 (Huang Y X). 对盐和 C8-卵磷脂水溶液的准弹性激光散射研究. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1991, 7 (2): 140~144
 - 6 Peetermans J, Tanaka T, Nishio I, *et al.* Microscope laser light scattering spectroscopy of single biological cells. *Cell Biophysics*, 1985, (7): 91~105
 - 7 Peetermans J, Nishio I, Ohnishi S T, *et al.* Light-scattering study of depolymerization kinetics of sickle hemoglobin polymers inside single erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83 (1): 352~356
 - 8 Tishler R B, Carison F D. Quasi-elastic light scattering studies of membrane motion in single red blood cells. *Biophysical Journal*, 1987, 51 (6): 993~997
 - 9 Tishler R B, Carison F D. A study of the dynamic properties of the human red blood cell membrane using quasi-elastic light-scattering spectroscopy. *Biophysical Journal*, 1993, 65 (6): 2586~2600
 - 10 王江成, 黄耀熊, 谭润初, 等 (Wang J C, Huang Y X, Tan R C, *et al.*). 一新型显微准弹性光散射装置. *生物物理学报 (Acta Biophysica Sinica)*, 1998, 14 (1): 170~178
 - 11 Schindler M, Koppel D, Sheet Z M, *et al.* Modulation of membrane protein lateral mobility by polyphosphates and polyamines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77 (3): 1457~1461
 - 12 郝刚, 冯玮 (Hao G, Feng W). 红细胞衰老过程中临床血液参数、红细胞免疫粘附功能的改变及其临床意义. *中华老年学杂志 (Chinese Journal of Gerontology)*, 1995, 15 (5): 262~263

Microscope Laser Light Scattering Studies on Red Cells of Thalassemia with Image Processing and Analysis. LI Ping-Yang, WANG Jiang-Cheng, TAN Run-Chu, LI Yong-Long, HE Qi-Cai

(*Department of Physics, Sun-Yat Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China*); HUANG Yao-Xiong (*Institute of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China*).

Abstract Microscopic quasi-elastic laser light scattering technique and image processing and analysis technology were used to study thalassemia erythrocytes. The mean hydrodynamic radius and average diffusion coefficient of hemoglobin polymers in the intact red cells, the membrane motion frequency, cross area, regular form factor, longest axis, shortest axis and mean gray were measured for thalassemia erythrocytes and normal red cells. It is found that, compared with normal red cells, the mean hydrodynamic radius and its variance of thalassemia erythrocytes are larger, the membrane motion frequency is slower and the cross area of the cell is smaller. This suggests that thalassemia erythrocytes have large hemoglobin polymers and worse deformability.

Key words microscopic quasi-elastic laser light scattering (MQLS), image processing and analysis, erythrocyte membrane, dynamic properties of hemoglobin

神经节苷脂类抑制 BT325 细胞系生长机理的初步探讨

李爱华 杨典洱 陈红 黄如彬

(首都医科大学生物化学教研室, 北京 100054)

摘要 用¹²⁵I-EGF 与人多形胶质细胞瘤 BT325 细胞系膜上 EGF 受体的饱和结合实验, 竞争抑制实验研究 GM3, BBG (bovine brain gangliosides) 对 EGF 受体最大结合量, 亲和常数及受体数目的影响; 放射受体法观察 EGF-EGFR 复合物内吞过程, 测定胞质和培养液中 EGF 含量. 结果表明: BT325 细胞质膜上存在高亲和力 EGF 结合位点, GM3 对 EGF 与其受体的亲和力无明显抑制作用 ($P > 0.05$), 但能明显减少其受体的数目 ($P < 0.05$); GM3 能明显延长 EGF-EGFR 复合物内吞过程; GM3 处理的胞质中 EGF 浓度比对照组显著升高 ($P < 0.05$), 培养液中无明显差异, 这可能是由于 GM3 抑制 EGF 分泌所致.

关键词 多形胶质细胞瘤 BT325 细胞系, 神经节苷脂 GM3, 牛脑神经节苷脂, 表皮生长因子, 抑制作用, 作用机理

学科分类号 Q546

神经节苷脂是细胞膜的组分之一,其基本生理功能有: a. 介导细胞与细胞,细胞与基质间的相互作用; b. 调节细胞质膜中蛋白质(如生长因子受体,离子通道)的功能. Hakomori^[1]实验室首次发现 GM3, GM1 抑制细胞生长是通过抑制膜表面生长因子磷酸化来完成的; 夏霞娟等认为促进 HL-60 分化可能是通过调节细胞内 PK-C 活性实现的; Tsuji 等^[2]认为促进神经母细胞瘤细胞系 GOTO 增殖及突触生长可能与细胞外侧的蛋白激酶有关; 我们以前的研究已证明 GM3、BBG 能抑制人多形胶质母细胞瘤 BT325 的生长,并能抑制 EGF 对该细胞生长的促进作用. 本文将报告 GM3、BBG 是通过何种机理对抗 EGF 的作用.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

GM3, BBG (我室提取)^[3], EGF (Sigma 公司产品), IMDM 培养基 (GIBCO), BT325 细胞株 (北京天坛医院神经外科研究所), ¹²⁵I-EGF (比活性: 4.14×10^{13} Bq/mmol) (英国 Amersham 公司), 24 孔细胞培养板 (NUNC, 丹麦), XH-6010 g 放射免疫计数器 (国营二六二厂, 北京), RS-20 III 型低温高速离心机 (日本), ZT-II 型细胞收集器 (浙江).

1.2 方法

1.2.1 GM3, BBG 对 BT325 细胞增殖的影响见参考文献 [4].

1.2.2 质膜标志酶活性的测定参照文献 [5].

1.2.3 GM3, BBG 对质膜上 EGF 受体的亲和常数, 总结合量和受体数目的影响^[6]:

a. 取对数期的 BT325 细胞, 用 Hank's 液洗之, 0.5% 胰酶消化, 1% 血清+IMDM+ 双抗全培养基吹打, 计数, 按 1×10^4 /孔接种于 24 孔细胞培养板.

b. 待细胞贴壁后, 换成含有 100 μmol/L 的 GM3, BBG 处理, 对照组用 IMDM 处理, 相应各设一平行组作为细胞计数用.

c. 72 h 后用冰冷的 IMDM 洗二遍, 然后进行受体竞争抑制实验: 反应液为 IMDM + 0.1% BSA, 然而加入不同浓度的 ¹²⁵I-EGF (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 nmol/L), 总体积为 400 μl, 非特异性结合管提前 10 min 加入未标记的 EGF 200 ng, 混匀后 4℃ 作用 12 h, 弃孔中液体, 然后用含 0.1% BSA Hank's 液洗 4 遍.

d. 加入 1 mol/L NaOH 1 ml/孔, 37℃ 温育 1h

使细胞溶解, 分别转移各试管中, 进行 γ 计数.

1.2.4 GM3, BBG 对 BT325 质膜上 EGF 受体内存过程的影响^[7]:

a. 步骤同 1.2.3a 与 1.2.3b.

b. 72 h 后用预冷的无血清的 IMDM 洗二遍, 然后加入反应液 IMDM + 0.1% BSA 300 ml, ¹²⁵I-EGF 100 μl (每分钟放射性计数约 5 000) 非特异性结合管加未标记的 EGF 200 ng, 混匀后于 37℃ 分别温育 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min, 然后弃培养液, 再于每孔加入 pH 4.0 50 mmol/L 盐酸甘氨酸+ 100 mmol/L NaCl 缓冲液于 4℃ 反应 10 min, 弃反应液, 用预冷的含 0.1% BSA 的 Hank's 液洗 4 遍, 加 1 mol/L NaOH 1 ml 温育 1 h, 分别转移至各测试管中进行 γ 计数.

1.2.5 GM3, BBG 对 BT325 培养液及胞质内 EGF 含量变化的影响^[8,9]:

a. 样品的制备: (I) 培养液样品: 分别取经 GM3, BBG 处理过的和对照组的培养液各 400 μl. (II) 胞质样品: 分别将 GM3, BBG 处理后的及对照组的细胞, 弃培养液, Hank's 洗三遍, 0.5% 胰酶消化, 用 1.0 ml 提取液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA), 吹打, 并转移至小试管中超声粉碎, 4℃ 20 000 g 离心 30 min, 取上清, 即可.

b. 大鼠肝细胞膜的制备: 参照文献 [9], 膜蛋白含量用考马斯亮蓝法测定.

c. 胞质及培养液内 EGF 含量的测定: 按表 1 顺序测定. 在 50 mmol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲体系内 (内含 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% BSA) 加入约 50 mg 肝膜蛋白和 0.03~4 ng 的 EGF, 后加入每分钟放射计数 50 000 的 ¹²⁵I-EGF, 非特异管在上述相同条件下加入约 200 ng EGF, 25℃ 保温 60 min, 总反应体积为 0.4 ml, 玻璃纤维滤膜用 pH 7.4 Hank's + 1% BSA 浸润, 反应结束后立即用细胞收集器收集, 然后用 10 ml PBS 洗尽游离的 ¹²⁵I-EGF, 取下滤膜放入测试管中待测.

表 1 肝细胞膜测定 EGF 加样顺序

	ml			
加样顺序	总结合管	标准管	样品管	非特异管
缓冲液	0.25	0.15	0.15	0.15
肝细胞膜	0.1	0.1	0.1	0.1
标准品	—	0.1	—	0.1
样 品	—	—	0.1	—
¹²⁵ I-EGF	0.05	0.05	0.05	0.05

注: 非特异管加未标记的 EGF 200 ng.

2 实验结果

- 2.1 膜标志酶5'-腺苷酸酶活性为 38.5 mg/mg·h.
- 2.2 GM3, BBG 对 BT325 膜上 EGF 受体的亲和力, 结合量和受体数目的影响见图 1、图 2 和表 2:

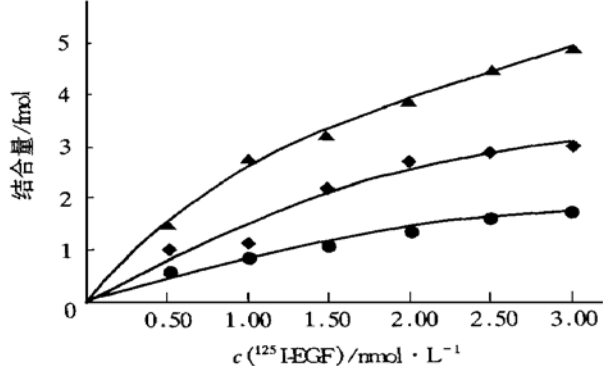


图 1 放射配基结合实验

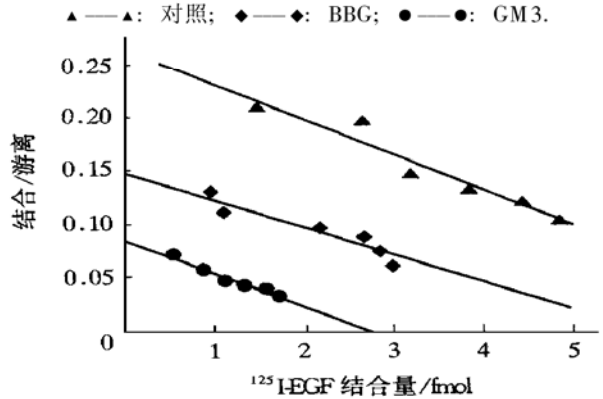


图 2 Scatchard 分析

▲ — ▲: 对照; ◆ — ◆: BBG; ● — ●: GM3.

以上实验数据可以归纳为表 2.

表 2 GM3、BBG 对 BT325 膜上 EGF 受体亲和力结合量和受体数目的影响

	$K_d/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	每个细胞上受体数目
对照组	3.125×10^{-11}	3.68×10^4
BBG	$3.571\times 10^{-11\ 1)}$	$3.39\times 10^4\ 1)$
GM3	$3.333\times 10^{-11\ 1)}$	$2.52\times 10^4\ 2)$

注: 1) $P>0.05$, 2) $P<0.05$.

结果表明: BT325 细胞膜上存在高亲和力的 EGF 受体结合位点, 其 K_d 分别为 3.33×10^{-11} , $3.57\times 10^{-11}\text{ mol/L}$, 经统计学分析与对照无明显差异 ($P>0.05$). 而 GM3 组每个细胞上的 EGF 受体数目却明显下降, 与对照组相比下降了 31.52%, 即由 $3.68\times 10^4/\text{细胞}$ 减至 $2.52\times 10^4/\text{细胞}$ ($P<0.05$), 而 BBG 组无明显变化 ($P>0.05$).

2.3 GM3, BBG 对 EGF 受体内吞过程的影响: 由图 3 可知, 在 37℃ 时, 对于 BT325 细胞, 未加神经节苷脂培养的细胞膜内 ^{125}I -EGF 受体在 40 min 时达到最大, 随后开始降解, 加 BBG 培养的细胞内吞过程与对照相比无明显差异, 而加 GM3 培养的细胞内吞较对照组延长, 在 50 min 以后胞内 ^{125}I -EGF 受体含量才开始明显升高.

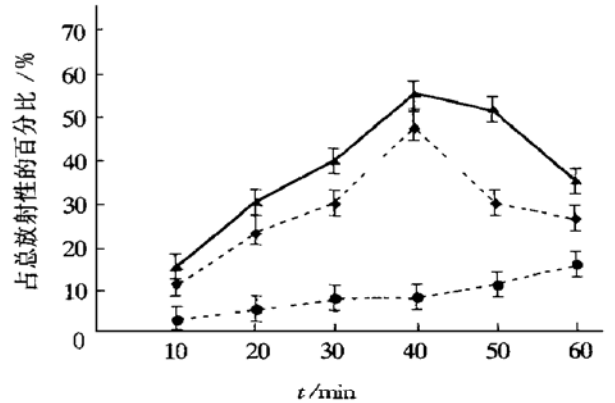


图 3 GM3, BBG 对 BT325 细胞膜上 EGF/EGFR 复合物内吞过程的影响

▲ — ▲: 对照; ◆ — ◆: BBG; ● — ●: GM3.

2.4 GM3, BBG 对培养液与胞质内 EGF 含量的影响见表 3 和图 4. 以 $\rho(\text{EGF})$ 为横坐标, B/B_0 为纵坐标作一标准曲线 (图 4) (B/B_0 为不同浓度时占总放射性的百分比). 直线回归统计, 得直线方程为: $Y=-0.426X+0.399$, $r=0.996$.

表 3 标准曲线数据

$\rho(\text{EGF})/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.06	0.10	0.20	0.40	1.80	1.00	1.60	3.00
$(B/B_0)/\%$	89.8	81.2	71.8	61.1	45.3	38.1	30.2	18.5

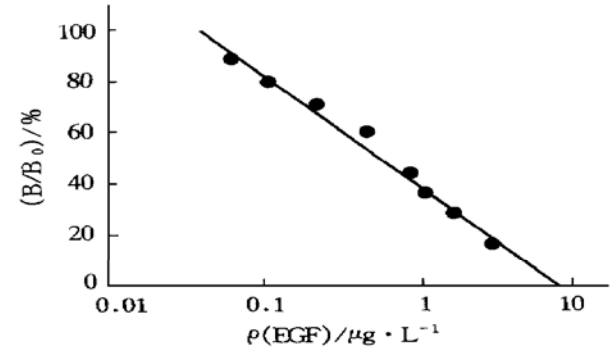


图 4 EGF 测定的标准曲线

由表 4 看到, 我们从胞液与培养液中均能检测到 EGF, 且培养液中含量各组之间没有明显差异 ($P>0.05$), 而 GM3 组胞质中每 1×10^4 个细胞中 EGF 含量比对照组明显升高 ($P<0.05$).

表4 GM3, BBG 对 BT325 胞质和培养液中 EGF 浓度的影响

	胞质/ $\text{pg} \cdot 10^{-4}$	培养基/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
对照组	23 ± 12	66 ± 9
GM3	$85 \pm 26^{2)}$	$87 \pm 36^{1)}$
BBG	$30 \pm 10^{1)}$	$68 \pm 6^{1)}$

¹⁾ $P > 0.05$, ²⁾ $P < 0.05$.

3 讨 论

神经节苷脂在体外实验及临床中与肿瘤的关系已有不少报道, 本文选择人的多形胶质母细胞瘤 BT325 为模型, 研究 GM3 在抗肿瘤方面的作用. cDNA 克隆方法证明胶质细胞质膜上存在 EGF 受体, 本文主要研究 GM3 是如何通过 EGF 来调节细胞生长. 在我们的实验中, 放射受体分析表明 BT325 细胞膜上也表达 EGF 受体, 在低血清培养的多形胶质母细胞中加入 $100 \mu\text{mol/L}$ GM3 能明显地抑其细胞增殖, 而 $100 \mu\text{mol/L}$ BBG 作用则明显减弱, 这种抑制作用与 EGF 受体的内容及数目表达有关, 这与 Bremer 的实验相符^[10]. 事实上, GM3 使细胞膜上 EGF 受体的表达数目减少, 但对 EGF 与其受体的亲和力无影响, 并且抑制 EGF 受体内存和降解, 这就表明 GM3 与 EGF 受体在调节细胞生长方面有着密切的关系. 外源性 GM3 能迅速地掺入细胞膜外表面与 EGF 受体的结合功能区作用, 阻碍 EGF 受体形成二聚体或多聚体, 而 EGF 受体的聚合是受体激酶功能区作用和受体内存的前提.

BT325 对 EGF 有较好的敏感性, 随着 EGF 的浓度增加, 细胞生长速度加快, GM3 与 EGF 共同作用后, GM3 能抑制 EGF 刺激的生长作用, 因为 GM3 减少膜上 EGFR 的表达. 而 EGF 能刺激膜上 EGFR 的表达, 所以在较高浓度的 EGF 作用下能逆转 GM3 的效应, 但它不同于竞争性抑制, GM3 不与 EGF 竞争 EGF 受体, 而是抑制结合 EGF 后的 EGFR 的聚合.

近年来发现很多肿瘤细胞能自分泌转化生长因子 α (TGF α)^[11, 12], 一种与 EGF 结构相似的多肽, 或 EGF 样物质, 它们与 EGF 作用于同一个受体, 并且在恶性肿瘤的生长调节中取代 EGF; 但是对肿瘤细胞是否能自分泌 EGF 还没有被普遍接受. Chen 用放射免疫的方法测定人的胃癌和胰癌细胞能产生和分泌 EGF. 最近研究发现有些肿瘤细胞自分泌的生长因子不需要分泌到细胞外, 就在细胞内的某个部位激活细胞生长调节的信号系统而引起细

胞增殖^[13], 我们的实验采用放射受体分析法更灵敏地检测到 GM3 与 BBG 作用后的细胞, 培养液与胞质中均有 EGF, 说明 BT325 细胞能产生和分泌 EGF. GM3 处理的培养液中每毫升 EGF 含量与对照组无明显差别, 但 1×10^4 细胞的胞质中 EGF 的量却高于对照, 我们推测可能是 GM3 迅速掺入质膜上, 引起质膜上脂质成分或比例的变化, 降低质膜的通透性, 使胞内合成的 EGF 分泌减少, 而且 GM3 处理的 BT325 细胞培养基中相当于 1×10^4 个细胞的 EGF 较对照高, 所以负反馈 EGF 的产生减少, 因而我们更有理由认为 GM3 处理的 BT325 胞内 EGF 含量增高是由于分泌减少所致. 至于培养液中 EGF 含量无明显差异是由两方面原因所致: a. EGF 分泌减少; b. 膜上结合的 EGF 受体数目也减少, 而游离的 EGF 相对增多, 所以总量不变.

我们进行的 GM3 对 EGF 产生和分泌及受体内存过程这方面的研究, 说明 GM3 的抑制作用可能是影响细胞多个代谢环节的综合效应 GM3 对 BT325 生长的调节, 其关键何在, 还有待于进一步探索.

参 考 文 献

- 1 Bremer E G, Hakomori S. Ganglioside-mediated modulation of growth, growth factor binding and receptor phosphorylation. *J Biol Chem*, 1984, **259** (11): 6818~ 6825
- 2 Tsuji S, Yamashita T, Nagai Y. A novel carbohydrate signal-mediated cell surface protein phosphorylation: ganglioside GQ1b stimulates ECTO-protein kinase activity on the cell surface of a human neuroblastoma cell line GOTO. *J Biochem*, 1988, **104** (4): 498~ 503
- 3 黄如彬, 潘 颖, 王泽生, 等 (Huang R B, Pan Y, Wang Z S, et al). 猪脑中提取高纯度神经节苷脂. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1994, **21** (5): 444~ 446
- 4 李爱华, 黄如彬, 杨典洱, 等 (Li A H, Huang R B, Yang D E, et al). 神经节苷脂类抑制 BT325 细胞系的生长. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1997, **24** (3): 242~ 245
- 5 吕宝珊, 田 英. 受体学概论. 北京: 科学出版社 (Lu B Z, Tian Y. Outline of Receptors. Beijing: Press Science), 1991. 27~ 38
- 6 Trouster O, Aronson N N, Dulancy J T, et al. Isolation of rat liver plasma membranes. *J Cell Biol*, 1970, **47** (3): 604~ 618
- 7 Claire L, Martin R G. Quantitation by ligand binding or FACS analysis. In: McKay I, Leigh I ed. Growth Factors. Oxford: IRL Press, 1993. 220~ 223
- 8 Carpenter G. Binding assays for epidermal growth factor. In: Birnbaumer L eds. Methods in enzymology. Orlando: Academic press, 1985, **109**: 101~ 110
- 9 贺师鹏, 郭淑英, 黄天贵, 等 (He S P, Guo S Y, Huang T G, et al). 放射受体法测定表皮生长因子. 生物化学与生物物理进展 (Prog Biochem Biophys), 1993, **20** (3): 220~ 224
- 10 Bremer E G, Schlessinger J. Ganglioside mediated modulation of cell growth. *J Biol Chem*, 1986, **261** (5): 2434~ 2440
- 11 Liu C. Expression of TGF in human colon and lung carcinomas.

- Cancer Res Br J Cancer Res, 1990, **62** (1): 425~ 471
- 12 Nickell K A, Halper J, Moses H L. Transforming growth factors in solid human malignant neoplasms. Cancer Res, 1983, **43** (5): 1966~ 1971
- 13 Browder T W, Dunder C E, Nienhui A W, *et al.* Private and public autocrine loops in neoplastic cell. Cancer Cell, 1989, **1** (1): 9~ 12

Preliminary Studies on Mechanism of Inhibition of Gangliosides on BT325 Line Growth. LI A-Hua, YANG Dian-er, CHEN Hong, HUANG Ru-Bin (*Department of Biochemistry, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China*).

Abstract Radioligand binding assay and competitive radioassay of ^{125}I -EGF on plasma membrane EGF receptor and radio-receptor assay when ^{125}I -EGF was

incubated with human glioblastoma multiforme cells were carried out. The results showed that there is a high affinity binding site on BT325 cells plasma membrane, exogenous GM3 could not alter the affinity (K_d) of EGF binding with cell-surface receptors, but decrease the receptor number. GM3 could significantly prolong the endocytosis process of EGF-EGFR complex. The concentration of EGF in culture medium was unchanged by GM3 and BBG, but that of EGF in cytoplasm was increased by GM3. It suggested that GM3 might inhibit the secretion of EGF.

Key words human glioblastoma multiforme cell line BT325, ganglioside GM3, bovine brain gangliosides, EGF, inhibition, mechanism

H_2O_2 对红细胞抗原性与 LPO 影响的 FCM 研究

符乃阳 张尔贤¹⁾

(汕头大学理学院生物学系, 汕头 515063)

摘要 用流式细胞计 (flow cytometry, FCM) 测定 H_2O_2 损伤后的红细胞 (RBC) 与 IgG 的结合能力, 并直接检测细胞自发荧光的变化, 以研究 H_2O_2 对 RBC 抗原性和脂质过氧化 (LPO) 荧光产物生成的影响. 结果表明 RBC 抗原性和自发荧光变化与 H_2O_2 浓度和作用时间有关, 抗原性变化对 H_2O_2 更敏感, 比引起自发荧光明显增强所需 H_2O_2 浓度低两个数量级; 还发现了 RBC 抗原性和自发荧光的变化与细胞的散射光有相关性.

关键词 红细胞, 活性氧, 细胞膜损伤, 流式细胞计, 抗原性

学科分类号 Q73, Q26, R392.12

已有文献^[1~4]报道地中海贫血症、镰刀型贫血症患者的红细胞 (RBC) 膜上结合了 IgG; 衰老、损伤、储存的 RBC 与 IgG 结合能力也提高, 其机制可能是由于这些细胞膜上暴露出与 IgG 特异结合的新抗原 (neoantigen), Kay^[2] 建议把该抗原命名为“衰老细胞抗原 (senescent-cell antigen)”. 关于活性氧损伤使 RBC 抗原性改变, 已有人做过一些研究^[2~4], 但机理尚未清楚, 也还需用新的研究手段和仪器提供更多的证据. 检测 RBC 的脂质过氧化 (LPO), 以往常用的方法需破碎细胞, 分离产物再测定, 其结果是大量细胞的总体产物, LPO 产生的羰基化合物可继续和蛋白质或氨基磷脂的氨基基团生成一种发荧光的西夫碱 (Schiff's base)^[1], 可能会导致细胞的自发荧光增强. 本实验旨在用流式细胞计 (FCM) 从细胞水平上, 检测 H_2O_2 使 RBC 抗原性变化和发生 LPO 时

荧光产物生成, 并对两者关系做进一步的探讨研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

SD 大鼠由中国中医研究院实验动物中心提供, 体重 220~300 g, 雌雄随机.

1.2 主要试剂

纯 SD 大鼠 IgG (军事医学科学院微生物流行病研究所), SOD (华东理工大学), Sephadex G-25 (Pharmacia), FITC (Sigma), H_2O_2 (上海桃浦化工厂), 透析袋 (m. w. cutoff 12 000~14 000, 美国碳素公司), 其余试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水.

¹⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1998-01-23, 修回日期: 1998-05-04