

研究工作

几种促分化剂对人早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞膜流动性的影响

侯卫红* 崔肇春 朱正美
(大连医学院生化教研室)

细胞膜流动性受质膜组分的影响,反过来膜流动性也影响质膜的功能^[1,2]。众所周知,细胞的癌变伴有膜组分明显的变化,从而也导致膜流动性的变化^[2]。Shinitzky 对肿瘤细胞膜流动性的变化进行过综述^[2];根据已有的资料可概括地说:对流动性肿瘤细胞(如腹水型肝癌细胞和淋巴细胞白血病细胞)其膜流动性比其相应的正常细胞的高,而对实体瘤细胞(如肝癌细胞)其膜流动性则比其对应正常细胞的低。

HL-60 细胞系是 70 年代末期建立的一个早幼粒白血球细胞系,它是研究白细胞分化与癌变的一个较为理想的模型^[3]。能促进 HL-60 细胞分化的化合物已发现有近 30 种^[3,4],研究在促分化过程中细胞质膜的组分的变化与膜流动性的关系将有助于阐明促分化的机制。本文研究了佛波酯 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)^[5,6]、二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)^[7]、及神经节苷脂 GM₃^[8,9] 对 HL-60 细胞膜流动性的影响。结果表明,上述三种促分化剂都能降低 HL-60 细胞膜的流动性。

材料与方 法

一、材料和试剂

培养基 DME/F12、铁转运蛋白、TPA 及 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯 (DPH), Sigma 产品;胰岛素,丹麦 Nordisk 产品; DMSO, 北京化工厂产品(分析纯); GM₃ 系自行纯化(层析纯);小牛血清购自卫生部长春生物制品研究所; HL-60 细胞由中国医科院天

津血液病研究所提供。

二、细胞培养及给药处理^[8,10]

以 DME/F12 培养基培养细胞,培养液中另加胰岛素 5 μg/ml、铁转运蛋白 5 μg/ml、小牛血清 2%,置 37°C、5% CO₂ 培养箱中悬浮培养。收集对数生长期细胞,以细胞数为 1.5 × 10⁵/ml 活细胞接种,培养 24 小时后加入促分化剂。DMSO、TPA 和 GM₃ 的终浓度分别为 1.25%、4 nmol/L 及 50 μmol/L。

三、以 DPH 为探针测定 HL-60 细胞的荧光偏振度^[11]

取已准备好的细胞悬液,离心,用 PBS 洗涤一次,然后加 1ml 2.0 × 10⁻⁶ mol/L 的 DPH,在 25°C 保温 45 分钟,再以 PBS 洗涤一次,最后悬浮在 2 ml PBS 溶液中,用日立 650-60 型荧光分光光度计测定各向荧光强度(F),计算出荧光偏振度^[11]。计算公式为:

$$P = (I_{V_V} - GI_{V_H}) / (I_{V_V} + GI_{V_H})$$

式中 P 为荧光偏振度;

I_{V_V} 为起偏器光轴为垂直方向,检偏器光轴也为垂直方向时所测得的荧光强度;

I_{V_H} 为起偏器光轴为垂直方向,检偏器光轴为水平方向时所测得的荧光强度;

G 为校正因子,等于 I_{H_V}/I_{H_H}

I_{H_V} 为起偏器光轴为水平方向,检偏器光轴为垂直方向时所测得的荧光强度;

I_{H_H} 为起偏器光轴为水平方向,检偏器光轴也为水平方向时所测得的荧光强度。

P 值可通过下式反映膜的微粘滞度 (η):

$$\eta = 2P / (0.46 - P)$$

本文系中科院自然科学基金(3880209)资助的部分工作。

* 现工作单位: 郑州河南医科大学生化教研室。

微粘滞度越小，膜流动性越大。测定中所用的激发波长 $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ ，发射波长 $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$ 。

结果

一、实验条件的选定

1. 波长的选择 DPH 溶液与 HL-60 细胞保温后，其激发光谱与发射光谱如图 1 所示。

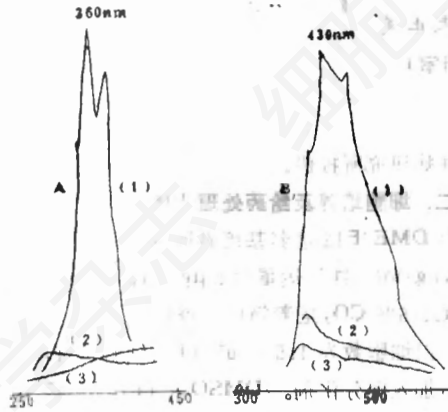


图 1 DPH 与 HL-60 细胞保温后荧光光谱的变化
 A. 激发光谱、激发峰值 $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ (狭缝 3, 4 nm, $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$)
 B. 发射光谱、发射峰值 $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$ (狭缝 4, 3 nm, $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$)
 1. DPH 标记的 HL-60 细胞; 2. 单独 HL-60 细胞; 3. 单独 DPH 溶液

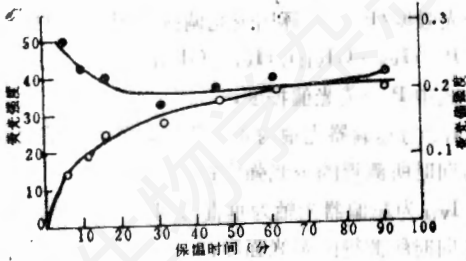


图 2 荧光强度 F 与荧光偏振 P 与保温时间的关系
 ○—○, 荧光强度; ●—●, 荧光偏振度; 狭缝: 10, 10 nm
 $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$ $F = I_{VV} + 2I_{VH}$

从该图可见其激发峰值为 360 nm, 发射峰值为 430 nm, 其荧光强度比单纯 DPH 溶液和单纯的 HL-60 细胞悬液要大几十倍。

2. DPH 与 HL-60 细胞保温时间的选择 测定了不同保温时间时荧光强度与荧光偏振度

的变化, 其结果列于图 2。由图 2 可以看出, 荧光强度与荧光偏振度在 45 分钟以前不断变化, 45 分钟以后基本不变, 故选定的保温时间为 45 分钟。

3. 细胞数的选择 测定了不同细胞数时的 F 值与 P 值, 其结果列于图 3。由图 3 可见

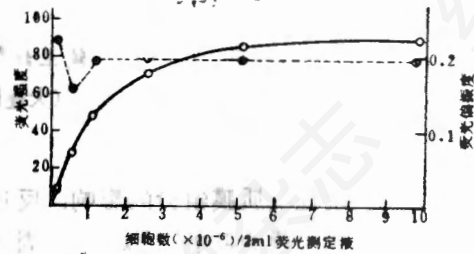


图 3 荧光强度 F 和荧光偏振度 P 与细胞数的关系

○—○, 荧光强度; ●—●, 荧光偏振度
 狭缝: 10, 10nm; $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$

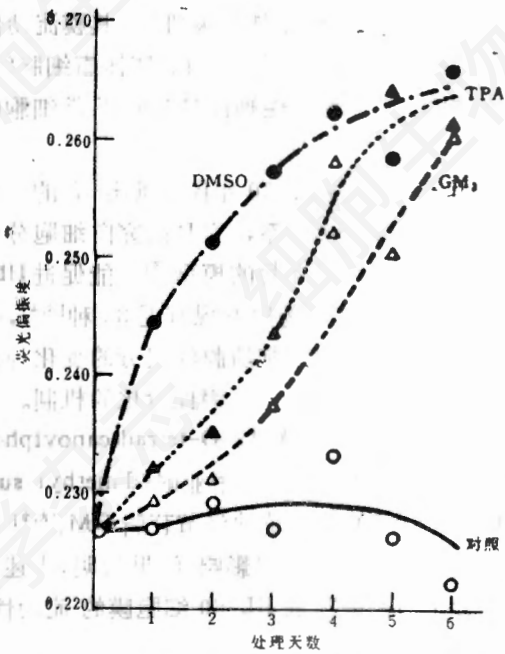


图 4 DMSO、TPA 与 GM₁ 对 HL-60 细胞膜荧光偏振度的影响

DMSO: ●—●; TPA: ▲—▲; GM₁: ▽—▽; 对照: ○—○; 促分化剂处理批数 = 3。

起初 F 值随细胞数的增多而不断升高, 当细胞数达 $5.0 \times 10^6 / 2 \text{ ml}$ 后, 再增大细胞数, F 值不再升高。P 值在细胞数为 $1.0 \times 10^6 - 1.0 \times$

$10^7/2\text{ ml}$ 时基本不变。据此我们选定的细胞数为 $5.0 \times 10^6/2\text{ ml}$ 。

二、 GM_3 、TPA、DMSO 对 HL-60 细胞膜流动性的影响

荧光偏振度 P 值可反映出膜流动性的大小^[11]： P 值越大，膜流动性越小； P 值越小，膜流动性越大。图 4 列出了三种促分化剂对 HL-60 细胞 P 值的影响。从图 3 可见 1.25% DMSO 降低膜流动性的作用最强，自第一天起即表现出明显的作用。TPA 和 GM_3 第一天的作用不明显，从第二天起 (TPA) 和第三天起 (GM_3) 才表现出明显的作用，而且 TPA (4 nM) 比 GM_3 (50 $\mu\text{ mol/L}$) 的作用要强。

讨 论

在本研究中，经三种促分化剂分别作用 6 天后，HL-60 细胞都发生了与分化相应的形态与组织化学变化。例如促使 HL-60 细胞沿单核-巨噬细胞途径分化的 TPA 与 GM_3 ^[4,8,9]，使核质比变小，吞噬功能显著增强，非特异性酯酶为阴性，硝基四氮唑还原反应为弱阳性，过氧化物酶为阴性。促使 HL-60 沿粒细胞途径分化的 DMSO，使硝基四氮唑还原反应及过氧化物酶反应为强阳性。在分化的同时，HL-60 的膜流动性显著下降，这与预期的结果一致。这个结果是单纯促分化剂直接作用于膜的可能性可以排除。若这种可能性确在起作用，那图 4 所示 P 值在 6 天实验期内的持续上升就难于解释。因为促分化剂参入膜内影响 P 值绝不需要 6 天，通常 24 小时即足以使参入膜内的量达稳定水平。不过从第一天 (分化尚未达明显阶段) 的结果看，单纯的参入也导致 P 值的轻度上升。可以肯定，到第六天 P 值大幅度地上升是 HL-60 细胞分化的结果。

三种促分化剂使质膜流动性降低的机制尚不清楚。有作者报道 TPA 诱发 HL-60 细胞分

化时，细胞的 GM_3 明显增加^[12]，也有可能 TPA 降低膜流动性的作用部分地通过 GM_3 实现的。TPA 众所周知的作用是激活蛋白激酶 C。蛋白激酶 C 如何影响膜的组分并进而影响膜流动性的，是值得进一步研究的课题。

摘 要

本文探讨了以 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯 (DPH) 作为探针测定人早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞膜流动性的最适实验条件。在此基础上研究了促分化剂 DMSO、TPA 及 GM_3 对 HL-60 细胞膜流动性的影响。结果表明三种促分化剂都能明显地降低 HL-60 的膜流动性。作者们对膜流动性降低的可能机理进行了初步的讨论。

参 考 文 献

- [1] 杨福愉, 1981, 生物化学与生物物理进展(5): 1-6.
- [2] Shinitzky, M., 1984, *Biochem. Biophys. Acta* 738:251-261.
- [3] Collins, S. J., 1987, *Blood*. 70(5):1233-1244.
- [4] Lübert, M. and Koefler, H. P., 1988. *Blood Reviews*, 2:121-133.
- [5] Rovera, G., O'Breine, T. A. and Diamond, L., 1979, *Science*, 204: 868-870.
- [6] Pagararo, L., et al., 1980, *Blood*, 55:859.
- [7] Collins, S., et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75(5): 245-862.
- [8] Nojiri, H., et al., 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 782-6.
- [9] Saito, M., Terui, Y., and Nojiri, H., 1985, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 132: 223-31.
- [10] Breitman, T. R., et al., 1980, *Exp. Cell Res.*, 126: 494-8.
- [11] 林克椿等, 1981, 生物化学与生物物理进展 (6):32-5.
- [12] Nojiri, H., et al., 1984, *Blood*, 64:534-41.