

现唯一能抑制人 IL_3 与相应靶细胞结合的髓系单克隆抗体(单抗)。本文研究了此单抗对 IL_3 刺激人造血祖细胞增殖分化的作用, 结果发现 HI 98 可抑制 IL_3 诱导的 BFU-E 和 CFU-GM 集落形成, 最大抑制率分别为 55% 和 49%, 但对 CFU-E 的生长无影响。对 GM-CSF 诱导的 BFU-E 和 CFU-GM 也无作用。用 HI 98 单抗包被的 Sepharose 微球进行 IL_3 免疫吸附清除实验证明, 其抑制作用不是抗体与 IL_3 直接结合的结果。本文还对 HI 98 单抗识别的抗原分子与 IL_3 受体的关系进行了讨论。

参 考 文 献

- [1] Ihle, J. N., et al., 1983, *J Immunol.*, 131: 282.
 [2] Schrader, J. W., 1986, *Annu Rev Immunol.*, 4: 205.
 [3] Delwel, R., et al., 1987, *Blood*, 70: 333.
 [4] Berdel, W. E., et al., 1989, *Blood*, 73: 80.
 [5] Chang, J. M., et al., 1989, *Blood*, 73: 1487.
 [6] Sherr, C. J., et al., 1985, *Cell*, 41: 665.
 [7] Gearing, D. P., et al., 1989, *EMBO J.*, 12: 3667.

- [8] Bomsztyk, K., et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 86: 8034.
 [9] Chizzonite, R., et al., 1989, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 86: 8029.
 [10] Hatakeyama, M., et al., 1989, *Science*, 244: 551.
 [11] Mosley, B., et al., 1989, *Cell*, 59: 335.
 [12] Yamasaki, K., et al., 1988, *Science*, 241: 825.
 [13] Taga, T., et al., 1989, *Cell*, 58: 573.
 [14] 沈德诚等, 1989, HI_{98} : 一个抗人粒-单核细胞单克隆抗体制备鉴定和初步应用, *中华血液学杂志*, 10: 350.
 [15] Lewis, A. L., et al., 1989, *Tissue Antigen*, 33: 227.
 [16] Zuckerkman, K. S., et al., 1985, *J Clin Invest.*, 75: 722.
 [17] Knapp, W., 1939, *Leukocyte Typing IV*, Oxford Univ. press, 747.
 [18] Lopez, A. F., et al., 1988, *Blood*, 72: 1979.
 [19] Nicola, N. A., et al., 1986, *J Cell Physiol.*, 128: 180.
 [20] D'Andrea, A. D., et al., 1989, *Cell*, 57: 277.
 [21] Sawyer, S. T., et al., 1989, *Blood*, 74: 103.
 [22] D'Andrea, A. D., et al., 1989, *Cell*, 57: 1023.

伴刀豆球蛋白 A 与巨噬细胞膜受体结合引起 膜蛋白和膜脂分子运动及电荷的变化

魏新华 王文玉* 付士密* 杨正红** 卢景芬** 于桂芬*** 苏雅娴

(北京医科大学细胞生物学教研室 100083)

细胞膜上存在着多种生物活性物质的受体, 细胞膜受体与配体专一性结合后能启动信号的传递, 继而在细胞内产生多种生物学效应。伴刀豆球蛋白 A 特异性地与膜受体结合^[1], 从而导致膜受体蛋白和膜脂分子的电荷分布及运动状态的改变。这些变化是细胞膜受体感受外源性配体刺激后所产生的早期行为,

是启动细胞反应的信号^[2]。用生物物理技术来探讨各种配体与膜受体作用所发生的膜分子动力学变化均有重要生物学意义。

本研究为国家自然科学基金资助项目。

* 中国科学院生物物理研究所。

** 天然与仿生药物国家重点实验室。

*** 生物物理教研室。

本文研究小鼠腹腔巨噬细胞与外源性配体伴刀豆球蛋白A结合下膜生物物理性质改变,主要探讨膜蛋白分子的侧向扩散运动和膜脂流动性的变化以及细胞表面电荷的改变,从中为信息传递机制提供依据。

材料与方 法

一、材料、试剂、仪器

昆明种小鼠、雄性、25—30克,来自北京医科大学动物学部。伴刀豆球蛋白A(concanavalin A,简称ConA),异硫氰荧光素(Fluorescein-isothiocyanate,简称FITC),FITC-ConA,5NS(5-Doxylstearic acid)均购自美国sigma公司。蛋白胨,北京红星生物化学制品厂;生理盐水,北京制药厂;蔗糖、琼脂均为化学分析纯。荧光漂白恢复仪,中国科学院生物物理研究所研制。顺磁共振谱仪(ESR),西德Brücker公司产品。SX-2细胞电泳仪,上海医科大学研制。

二、实验方法

1、巨噬细胞悬液的制备^[3] 小鼠腹腔注射1ml 1%(w/w)的蛋白胨生理盐水溶液,18小时后断头处死小鼠,向其腹腔内注射生理盐水4ml,抽出腹腔液,经300目尼龙网过滤到培养皿中,37℃保温40分钟,使巨噬细胞贴壁,弃上清后除未贴壁的细胞,用生理盐水轻洗两次,吹打起已贴壁的细胞,经计数细胞浓度为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。

2、荧光漂白恢复仪测量^[4] 将细胞悬液分成两组,实验组中含两种样品,一种样品中加入ConA(1mg/ml)60 μl ,室温下作用15分钟使ConA与膜受体结合,8000rpm离心2分钟,弃上清液后,用生理盐水洗一次,加入FITC(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)0.2ml,室温下标记30分钟。另一种样品中直接加入FITC-ConA(0.8mg/ml)75 μl ,室温下作用15分钟。对照组样品中加入FITC(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)0.2ml,室温下标记30分钟。两种样品以上述离心条件洗四次,去除游离的荧光分子。两种样品分别滴在载玻片上,盖玻片封片(以生理盐水为介质),静置5分钟,在荧光漂白恢复仪上测定巨噬细胞膜上ConA与膜受体结合后膜表面蛋白分子(含ConA与其膜受体复合物)以及ConA与膜受体蛋白分子复合物的侧向扩散系数 \bar{D} 和恢复百分率 \bar{R} 。重复两批,并进行统计分析。激光束半径2.2 μm ,漂白时间为25ms,温度22℃。数据计算公式:

$$\bar{D} = \frac{\omega^2}{4\tau_{1/2}} \cdot r_D$$

式中 ω 为光斑的半径, $\tau_{1/2}$ 为从漂白后的最小荧光值恢复到稳定值的一半所需的时间。 r_D 为与光斑形状有关的一个常数。

$$\bar{R} = \frac{F(\infty) - F(0)}{F(i) - F(0)}$$

$F(\infty)$ 为漂白后荧光恢复的渐近强度, $F(0)$ 为漂白后的初始荧光强度, $F(i)$ 为未漂白前的荧光强度。

3. ESR测定^[5,6] 将一定量的5NS标记物用无水乙醇溶解后加磷酸缓冲液(pH 7.4)使自旋标记物浓度为 10^{-3}M ,其中乙醇浓度不超过0.5%(V/V)。

取巨噬细胞悬液分成五等份各1ml,实验组四个样品中分别加入ConA(1mg/ml)30 μl 、60 μl 、90 μl 、120 μl ,对照组只加60 μl 的生理盐水,室温下作用15分钟,使ConA与膜受体结合,800rpm下离心2分钟,弃上清液,用生理盐水洗一次;上述五种样品中各加入5NS(10^{-3}M)30 μl ,用于标记膜上脂肪酸,室温下作用40分钟后,用生理盐水以800rpm离心洗五次,去除游离的5NS,对第五次洗下的上清液进行测定,如无ESR信号则将已标记5NS的巨噬细胞立刻在ESR谱仪上进行测定,并将测得的数据代入序参数公式:

$$S = \frac{\bar{A}_{11} - \bar{A}_{\perp}}{A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} - A_{yy})} \cdot \frac{a}{a'}$$

\bar{A}_{11} 与 \bar{A}_{\perp} 是自旋标记样品的超精细分裂, A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} 为此标记物在单晶状态时超精细分裂常数(见图1)。得出膜脂分子序参数值,再推出膜脂流动性大小和变化。实验重复五批。测量条件为微波功率10mw,工作频率9.74GHz,扫描范围150G,调制频率100KHZ,温度23℃, $A_{xx} = 6.1\text{G}$, $A_{yy} = 6.0\text{G}$, $A_{zz} = 32.8\text{G}$ 。 $a = 1/3(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$, $a' = 1/3(A'_{11} + 2A'_{\perp})$ 。

4、细胞电泳测定^[7] 将细胞悬液分三等份各1ml,两实验组各加ConA(1mg/ml)30 μl 和60 μl ,一对照组加适量的生理盐水,室温下作用15分钟,将各组细胞分别以800rpm离心2分钟,弃上清液,用生理盐水洗一次,将沉下的细胞分别悬于0.3ml 9%蔗糖溶液中,充分振荡后,再分别装满测试管,放入电泳槽中,按常规操作,进行测量。按下列公式计算迁移率。以巨噬细胞泳动的能力大小,推测细胞电荷的变化,实验进行三批。

$$W = \frac{V}{E}$$

W——迁移率,V——移动速率,E——电场强度。

表1 巨噬细胞膜表面蛋白和 ConA-受体复合体的侧向扩散系数 \bar{D} 和 恢复百分率 \bar{R}

| 样品 | 细胞数 | $\bar{D} (\times 10^{-9} \text{cm}^2/\text{s})$ | $\bar{R} (\%)$ |
|-----------|-----|---|-----------------------|
| 对照 | 48 | 33.004 ± 3.943 | 30.175 ± 12.654 |
| ConA | 61 | $12.119 \pm 2.115^*$ | $42.113 \pm 16.887^*$ |
| FITC-ConA | 45 | $4.721 \pm 1.146^*$ | 36.085 ± 14.664 |

t 检验 * $p < 0.01$

结 果

一、ConA 对膜蛋白侧向扩散的影响

表1显示 ConA 与巨噬细胞膜受体结合前 (Control 组)、后 (ConA 组) 膜表面蛋白质分子及 ConA-膜受体蛋白分子复合物 (FITC-ConA 组) 侧向扩散系数 \bar{D} 和恢复百分率 \bar{R} 。结果表明, 与对照组相比, ConA 与巨噬细胞膜受体结合后, 膜表面蛋白质分子侧向扩散系数 \bar{D} 值减小, \bar{R} 值增大; ConA-膜受体蛋白分子复合物侧向扩散系数更小, \bar{R} 值无显著差异。

二、ConA 与膜受体结合后膜脂分子的序参数和流动性的变化

图1表示标记在巨噬细胞膜上的 5 NS 的 ESR 波谱; 以及从波谱所计算出的序参数 S 值。随着 ConA 浓度变化, S 值不同, 其量效关系见图2。对照组的巨噬细胞膜脂分子的有序性较弱, 即流动性大; 加入 ConA 作用后, 膜脂分子的有序性变强, 即流动性变小。当 ConA 的量达到 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 膜脂有序性改变达饱和度。

三、ConA 对巨噬细胞电泳行为的影响

表2显示 ConA 与膜受体结合后, 使巨噬

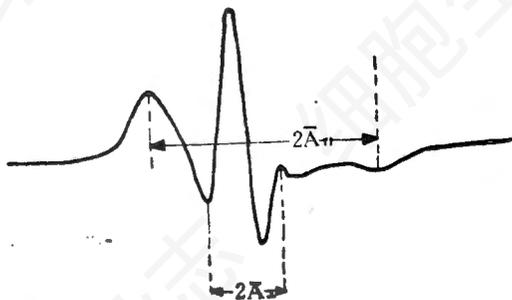


图1 巨噬细胞膜上 5 NS 标记物的 ESR 谱

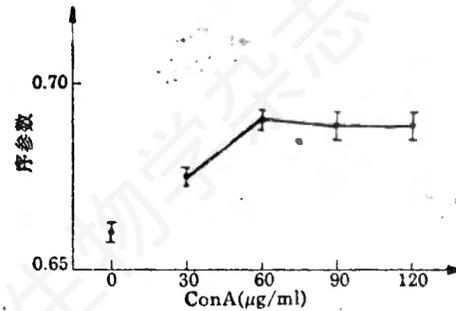


图2 ConA 对巨噬细胞膜脂的序参数的影响

表2 不同浓度的 ConA 与膜受体结合前后巨噬细胞的迁移率

| ConA ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 迁移率 ($\times 10^4 \mu\text{m}^2/\text{s.v}$) | t 检验 |
|----------------------------------|--|------------|
| 0 | 1.167 ± 0.051 | |
| 30 | 1.346 ± 0.064 | $p < 0.05$ |
| 60 | 1.249 ± 0.079 | $p < 0.05$ |

细胞的迁移率增加, 细胞泳动速度加快。ConA 量为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 细胞迁移率分别增加 13% 和 16%。

讨 论

1、ConA 与膜受体结合后导致巨噬细胞膜表面蛋白分子 (包括 ConA 与膜受体的复合物) 的侧向扩散速度的减慢。因为 ConA 与膜受体结合后可使巨噬细胞膜下微丝组装加快, 微丝量增多 (未发表资料), 而微丝与膜表面蛋白相连, 限制了膜表面蛋白分子的侧向扩散速度, 导致 \bar{D} 值减小^[8]。

从实验结果可以看出, 巨噬细胞膜表面蛋白质分子的侧向扩散系数 \bar{D} 值较大, 这可能是由于巨噬细胞具有吞噬功能, 其膜表面蛋白或脂分子的运动较活跃所致。

ConA 与膜受体结合后导致膜表面蛋白质分子侧向扩散的恢复百分率 \bar{R} 值增大,但还不能肯定是否会导致膜表面“可动”蛋白的分数较高,或“不动”蛋白质分子较低。出现这样结果,可能是因为在对照组中蛋白分子侧向扩散速度快,致使荧光漂白恢复所需的时间短,而在短的恢复时间内,会将一些侧向扩散非常慢的蛋白质分子当作“不动”分子。在实验组中,由于蛋白质分子侧向扩散速度慢,荧光漂白恢复所需的时间长,在长的恢复时间里,对照组中被当作“不动”蛋白分子而在实验组中就当作:“可动”分子,使 \bar{R} 值相对增大。其机制还应进一步研究。

对照组和实验组中 \bar{R} 值都偏差较大(表1),说明膜表面蛋白分子的大小,分布的不均匀以及“可动”能力的差异。这一点符合细胞膜的“液态镶嵌学说”。

2、由图2可知,ConA浓度为60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时膜脂有序性增加最大,或膜流动性减小得最明显。ConA浓度再高则出现饱和现象。

5NS标记在细胞膜上,与膜脂分子的脂肪酸链相结合,其极性基团朝向膜双分子脂层的表面,而氮氧自由基的部位接近于膜表层,故序参数S值的变化只反映膜表层的脂分子的运动情况。

ConA与膜受体结合后使膜下微丝组装加快,微丝量明显增多,膜内层脂分子又是与微丝相连的,可以通过脂分子之间的相互作用限制膜外层脂分子运动。另外,从膜表面蛋白分子的侧向扩散速度减慢说明运动自由度较大的部分减少,而运动自由度较小的部分增多,这可能进一步降低了膜脂流动性。

3、ConA与膜受体结合的细胞表现出迁移率比对照组增加。在较低浓度的ConA作用下迁移率增加得多,而在较高的ConA浓度作用下反而增加得少,这说明ConA与膜受体的结合不仅有与膜受体及膜脂电荷的相互作用,

而且可能改变了膜蛋白的分布。K. B. Sainis报道^[9], ConA与正常的AKR大鼠淋巴细胞相互作用也有类似结果。较高浓度的ConA与细胞作用时分两步进行:第一步,ConA的结合导致ConA受体的在膜上重新分布,并引起细胞电泳的迁移率增加;第二步,再装配的ConA的附加受体与ConA结合后减少了电荷密度。

摘 要

本文利用荧光漂白恢复,顺磁共振和细胞电泳等技术研究外源性配体伴刀豆球蛋白A与巨噬细胞膜受体结合后膜蛋白及膜脂分子运动以及细胞表面电荷变化,结果表明,细胞膜表面蛋白分子侧向扩散速度减慢;膜脂分子流动性减慢,烃链有序性增强;细胞电泳速度加快。此等对阐明伴刀豆球蛋白A作为外源信息导致细胞膜分子动力学变化以及电荷改变有重要的生物学意义。

参 考 文 献

- [1] Goldstein, I. J. et al., 1965, *Biochemistry*, 4: 876—881.
- [2] Cherenkevics, S. N. et al., 1982, *Biochimica et Biophysica Acta*, 686: 170—174.
- [3] Herscovitz, A. J. et al., 1981, In *Manual of macrophage Methodology*, New York and Basel, pp. 5—11.
- [4] 苏雅娴等, 1989, *生物物理学报*, 5 (2): 160—166.
- [5] 程龙生等, 1988, *生物化学与生物物理学报*, 20 (2): 155—159.
- [6] Gordon, L. M. et al., 1987, *Biochimica et Biophysica Acta*, 892(2): 202—213.
- [7] Sherbet, G. V. et al., 1978, In *The Biophysical Characterisation of The Cell Surface*, London, New York, San Francisco, Academic press, PP. 36—52, 101—104.
- [8] Niggli, V. et al., 1987, *J. Membrane Biol.*, 100: 97—121.
- [9] Sainis, K. B. et al., 1979, *Immunology*, 37: 563—568.