

的特点。

### 摘 要

报告 34 例子宫正常平滑肌、平滑肌瘤和平滑肌肉瘤与五种凝集素的组化结合特性。在 11 例平滑肌肉瘤中, 刀豆素和麦胚素染色阳性的分别有 10 例(91%)和 8 例(73%), 豌豆素和花生素各有 2 例(18%)和 1 例(9%)阳性。除 1 例正常平滑肌中部分细胞刀豆素反应弱阳性外, 其余 11 例正常平滑肌和 11 例平滑肌瘤均未与任何一种凝集素结合。因此, 某些凝集素组化结合特性的改变, 对于了解平滑肌肉瘤细胞结构糖成分的精细变化、鉴别子宫平滑肌瘤的良恶性, 具有一定意义。

### 图 版 说 明

1. 子宫平滑肌瘤。刀豆素染色, ABC 法, 甲基绿复染。凝集素结合阴性。400×
2. 子宫平滑肌肉瘤。刀豆素染色, ABC 法, 1 mol/L  $\alpha$ -D 甘露糖和 1 mol/L  $\alpha$ -D-葡萄糖阻滞。甲基绿复染。

凝集素结合阴性。400×

3. 子宫平滑肌肉瘤。刀豆素染色, ABC 法, 甲基绿复染。凝集素结合阳性。400×

4. 子宫平滑肌肉瘤。麦胚素染色, ABC 法, 甲基绿复染。凝集素结合阳性。400×

### 参 考 文 献

- [1] Allison, R. T., 1986, *Med. Lab. Sci.*, 43: 369-376.
- [2] Damjanov, I., 1987, *Lab. Invest.*, 57: 5-9.
- [3] Walker, P. A., 1985, *Histopathology*, 9: 1121-1125.
- [4] Skultosky, E. et al., 1987, *Am. J. Pathology*, 126: 25-31
- [5] Kawai, T. et al., 1988, *Am. J. Pathology*, 130: 401-410.
- [6] Holthöfer, H. et al., 1982, *Lab. Invest.*, 47: 60-66.
- [7] Roholl, P. J. M. et al., 1985, *Human Pathol.*, 16: 763-769.
- [8] Pean, S. D. J. et al., 1981, *Histochem. Cytochem.*, 29: 542-546.
- [9] Lis, H. and Sharon, N., 1986, *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 35-43.

## 低 渗 介 质 对 影 泡 载 体 的 影 响

贾 丽 法祥光 范启修

(中国医学科学院血液学研究所)

应用脂质体或天然红细胞膜(影泡)包封基因、蛋白质等生物大分子使之与靶细胞融合把大分子物质导入靶细胞的载体技术是在膜分子生物学基础上发展起来的新技术。近年来, 生物大分子载体技术已与分子遗传学、免疫学和医学研究相结合并已显示其良好前景。国外已有把病毒、质粒、酶等生物大分子包封入影泡的成功例子<sup>[1-3]</sup>, 1981年叶秀珍、李昌本等曾用影泡装载大分子物质并导入靶细胞<sup>[4-5]</sup>。

制备影泡载体一直沿用重蒸水或低渗 PBS 作为溶胀红细胞、开放膜孔使大分子物质进入影泡的主要手段。在实践中我们发现这些方法存在膜结构损伤较大、弥合性差、包封率偏低

和稳定性差等缺点, 为此我们作了改进, 采用 HEPES-EDTA 系统并使用  $Mg^{2+}$ , 除研究了影泡装载牛血清白蛋白、L-天门冬酰胺酶实验技术外, 本文主要在包封量、形态、稳定性等方面比较了改进的 HEPES-EDTA 系统与常用的 PBS 系统制备的影泡载体的优缺点并探讨了影响包封率的主要因素。

### 材 料 和 方 法

血样用正常人肝素抗凝新鲜血。标准牛血清白蛋白(BSA, 分子量 67000)购自上海生化试剂厂, L-天门冬酰胺酶(分子量 141000)购自 Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.(TOKYO, JAPAN)。其他试剂均为分析纯。

## 一、影泡载体的制备

### 1. 磷酸缓冲系统影泡载体(P-Gs)

用修改的Furusawa法<sup>[4]</sup>。血样在常温下离心(1500 rpm, 5分钟), 去除上清液和白膜层后得红细胞, 用冷PBS[137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 8.1 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2]洗涤3次。取0.3毫升红细胞, 细胞数为3×10<sup>8</sup>。0.7毫升r-PBS(137 mmol/L KCl, 2.7 mmol/L NaCl, 8.1 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4), 1毫升BSA溶液(40毫克/毫升r-PBS)装入透析袋, 总体积为2毫升。BSA最后浓度为20毫克/毫升。将样品袋置480毫升稀释10倍的等渗r-PBS中, 在4℃透析30分钟。此时红细胞膨胀, 膜孔开放, 在血红蛋白渗出的同时BSA(或L-天门冬酰胺酶)进入影泡。最后达到平衡, 此为第一步。然后将样品袋置500毫升等渗PBS中, 在37℃保温30分钟使影泡在等渗条件下重新封闭弥合。内容物经2500 rpm离心5分钟, 沉淀部分即为影泡载体, 用冷PBS洗涤至洁净, 上清液中含有残余的BSA和血红蛋白(Hb)。备下述测定用。

### 2. HEPES-EDTA 缓冲系影泡载体(H-Gs)

除采用HEPES-EDTA缓冲液[120 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mmol/L 葡萄糖, 18 mmol/L HEPES-NaOH pH 7.4, 1 mmol/L EDTA]作为制备影泡载体的低渗介质外所用红细胞浓度, BSA及操作均与制备P-Gs相同, 并用无EDTA的HEPES缓冲液作再封闭等渗介质。BSA包封入影泡可通过在荧光显微镜下直接观察进入载体内的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的BSA而获知, 并可计算阳性率。

## 二、包封率测定

P-Gs、H-Gs在低渗下破裂后与原上清液同时用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术分离BSA, 用标准BSA作对照。BSA分离带经考马氏蓝染色后进行光密度扫描定量, 测得载体内和上清液中残留的BSA含量, 通过下列公式求得包封率:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\text{载体内 BSA}}{\text{载体内 BSA} + \text{外部残留 BSA}} \times 100\%。$$

## 三、不同稀释度的低渗缓冲液对包封率的影响

等渗r-PBS和HEPES-EDTA缓冲液分别稀释6、10和14倍作低渗介质制备相应的BSA载体, 用上述方法求得包封率并相互比较。

## 四、渗漏试验

将上述各条件下制备的载体样品置37℃保温20小时, 于第1、2、3、4和20小时取样, 离心后用Bradford法<sup>[7]</sup>测定上清液中渗漏出的蛋白质含量及20小时后影泡内蛋白含量。

## 五、稳定性试验

载体样品在4℃保存4周, 每周取样一次, 离心后用Marrion法测定上清液中总蛋白含量并比较H-Gs、P-Gs每周的渗出率。

## 六、扫描电镜标本制备

将红细胞影泡用生理盐水反复冲洗, 滴于玻片上, 经2-5%戊二醛、1%锇酸分别固定, 2%丹宁酸处理, 梯度乙醇脱水, 醋酸异戊酯置换, 临界点干燥器干燥, 离子溅射镀膜后, S-520扫描电镜观察。

## 七、影泡载体平均体积(MCV)和残留Hb测定

取0.2毫升影泡载体用缓冲液定容至0.5毫升, 用Cell-DYN 900型血细胞分析仪测定其MCV和Hb含量, 以正常红细胞作对照。

## 结 果

根据荧光显微镜观察影泡载体的结果(图版图1)BSA已进入影泡内, 其成体率可达98%。在红细胞和BSA浓度相同条件下, 10倍稀释的介质中H-Gs比P-Gs有较高的包封率, 其值分别为16.30±1.19%和12.45±0.63%。扫描电镜形态(图版图2)表明H-Gs大多为弥合较好的双凹形和口形影泡, 伴少量棘形, 没有漏型, 而P-Gs则以棘形居多并有一定数量的漏型, 表明H-Gs比P-Gs有较好的再封闭性能。

不同稀释度的低渗介质对包封量的影响见图1。在稀释度逐步增加到10倍时, H-Gs和P-Gs的包封率均随稀释度加大而增加。继续增加稀释度H-Gs的包封率可继续增加, P-Gs的包封率则因部分影泡破裂而下降, 在稀释14倍时H-Gs的包封率为16.3%, P-Gs则为6.5%, 表明H-Gs比P-Gs有较好的弥合性能和膜结构的完整性。

稳定性试验的结果见图2。结果表明载体中总蛋白的渗出率是存放时间的函数, 而且两周后的渗出率, P-Gs明显高于H-Gs。这表明以HEPES-EDTA系统制备的影泡载体, 其膜

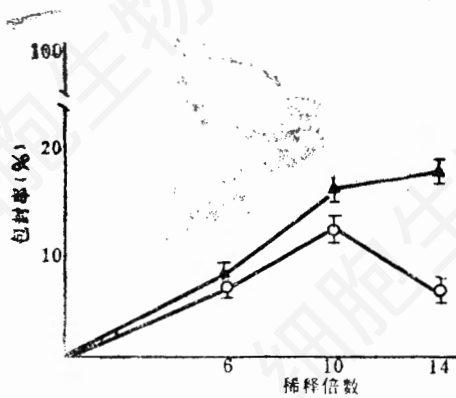


图 1 缓冲介质稀释度对包封率的影响  
▲——H-Gs ○——P-Gs

结构的完整性明显优于用 PBS 所制备的影泡。此点与形态观察等结果完全一致。

两种影泡载体渗漏试验的结果(表 1)表明,前 4 小时的渗出率两者无明显差异,以后逐渐改变,第 20 小时和 20 小时的平均渗出率 H-Gs 明显比 P-Gs 高,似与上列稳定性试验、电镜等 H-Gs 膜结构完整性优于 P-Gs 的结果不相同,我们将在讨论中分析。在稀释 10 倍、14 倍的低渗介质中制备的 P-Gs 和 H-Gs 其 20

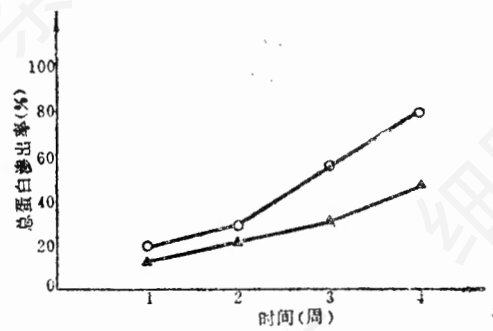


图 2 载体 4°C 稳定性试验  
▲—H-Gs ○—P-Gs

小时平均渗出率分别是 0.81、0.88 和 1.71、1.73,表明同一系统的影泡载体有相近的渗出率,也即渗出率与制备时介质的稀释度无关而与介质的性质有关

我们发现只有适量的天门冬酰胺酶才能获得较高的包封率,过量的酶浓度反而引起包封率的降低,如酶浓度为 7.4 毫克/毫升、11.1 毫克/毫升时相应包封率为 7.6% 和 12.4%,当酶浓度增至 14.8 毫克/毫升时包封率反而下降至 2.0%。这可能是由于过量的酶蛋白促使介

表 1 影泡载体渗漏试验(37°C)

载体类别	时间(小时)	1	2	3	4	20	20 小时平均渗出率
H-Gs		3.38±1.55	5.40±1.84	7.30±1.93	9.23±2.90	28.94±3.77	1.44
P-Gs		2.38±1.01	5.30±1.43	7.28±1.45	9.98±1.32	17.78±2.93	0.89

n=5  $\bar{X} \pm S.D.$

表 2 不同稀释度缓冲介质相应载体的微体积(MCV)

载体类别	缓冲介质稀释倍数	MCV( $\mu m^3$ )	相应溶血度*
正常红细胞	—	100	0
H-Gs	6	67.53±1.92	63
	10	50.16±6.91	80
	14	44.01±4.84	84
P-Gs	6	65.84±2.07	74
	10	50.40±7.82	76
	14	47.52±6.79	79

n=4  $\bar{X} \pm S.D.$ , \* 相应溶血度指介质中血红蛋白相对含量

质的胶体渗透压迅速提高,从而影泡内外渗透压差变小,降低了介质中酶蛋白进入影泡的有效量所致。

表2为在不同稀释度的低渗介质中制备的载体的平均体积(MCV),表明MCV随稀释度增加而减小,两种载体无明显差异。10倍稀释的介质,其相应载体的MCV约为正常红细胞的1/2,继续提高稀释度则MCV不再明显变小,而趋于稳定。

### 讨 论

本文采用两步透析法制备红细胞影泡载体,具有免疫相容性好、一次可制备大数量载体,操作简便不需复杂装置等优点。目前,用于制备影泡载体的缓冲介质以PBS居多,其优点是成体阳性率高、载体大小均一,但存在包封率较低、影泡完整性差等缺点。为此我们作了改进,采用HEPES-EDTA缓冲介质并加入 $Mg^{2+}$ ,其作用是促进大分子物质进入影泡后的弥合作用。EDTA可增强影泡对大分子物质的通透和红细胞内血红蛋白的逸出<sup>[9]</sup>,还可改善 $Mg^{2+}$ 引起膜僵紧的副作用<sup>[6]</sup>。根据包封率测定,扫描电镜观察和稳定性试验等实验结果H-Gs都比P-Gs有明显优点。37℃渗漏试验似表明H-Gs不如P-Gs,这可能是由于影泡上存有多肽酶和蛋白酶,在离体条件下,可以降低膜蛋白、使质膜消融(自溶解作用)。 $Ca^{2+}$ 对此有抑制作用<sup>[6]</sup>,4℃稳定性试验时自溶解作用可能处于抑制或低水平状态,膜结构尚完整,H-Gs的总蛋白渗出率就低于P-Gs,而在37℃渗漏试验时自溶解作用大大加快,由于H-Gs制备时介质中有EDTA使抑制自溶解作用的 $Ca^{2+}$ 丢失而P-Gs却保留某些 $Ca^{2+}$ ,因而H-Gs比P-Gs的渗漏作用强些。影泡内残留血红蛋白不影响载体的性质,残留胞液中也含有少量ATP可能有利于载体稳定。因为多次重复洗涤制备的“白”影泡因膜结构损伤和ATP

贫化而非常脆弱<sup>[10]</sup>。载体的体积一般小于原红细胞,约为原体积的1/2或1/3。这是由于细胞内容物丢失所致。体积小的载体群因有较大的表面积而有利于与靶细胞的接触,易于把内容物导入靶细胞。

### 摘 要

本文提供了利用低渗透析技术将生物大分子物质牛血清白蛋白、L-天门冬酰胺酶包封入人红细胞影泡制备载体的技术方法,并且比较了PBS、HEPES-EDTA两种缓冲系统制备的影泡载体的性能。发现以后一种缓冲系统制备的载体H-Gs无论在形态、包封率还是在稳定性等方面均比P-Gs有明显优点。为载体应用于实验研究提供了必要的参数。

### 图 版 说 明

- 1 a 普通显微镜下FITC-BSA影泡载体(P-Gs)
- 1 b 荧光显微镜下FITC-BSA影泡载体(P-Gs)
- 2 a P-Gs扫描电镜图片 2×2000
- 2 b H-Gs扫描电镜图片 2×2200

### 参 考 文 献

- [1] 古沢满, 1984, 蛋白质·核酸·酵素 创刊, 27: 364.
- [2] 带刀益夫, 1984(B), 生物物理, 24(5): 266.
- [3] DeLoach J. R. et al., 1988, *Biotech. Appl. Biochem.* 10: 359-364.
- [4] 叶秀珍等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(3): 19-22.
- [5] 李昌本等, 1981, 细胞生物学杂志, 3(3): 23-27.
- [6] Furusawa M. et al., 1974, *Nature*, 249: 449-450.
- [7] Bradford M. M., 1976, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- [8] Schwach G. et al., 1973, *Molecular and Biochemistry*, 2(2): 197-218.
- [9] Moore R. B. et al., 1981, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 211(1): 179-191.
- [10] 刘斯奇, 1985, 国外医学分子生物学分册 7(4): 179-183.