



凝集素与细胞凝集

Ⅲ. 放射受体法测定正常鼠肝及腹水型肝癌细胞的 ConA 受体

朱正美 顾天爵

(上海第一医学院生物化学教研室)

近年来,用放射受体法研究激素与受体的相互作用取得不少进展。用同位素标记的凝集素测定细胞表面膜的凝集素受体,文献也有不少报道^[1-2],其中尤以 ConA 为材料者较多,但多数结果不能说明受体与凝集素强度之间有对应关系。不过,这些数据都是用饱和分析法测定细胞与 ConA 的最大结合量,而未作受体与 ConA 间结合常数(Ka)的测定,可是 Ka 是受体分析中最关重要的一项数据。因为专一性的受体和其配基之间的结合一般表现为高亲和力与低容量,所以结合容量(受体数R)的大小并不足以说明配体—受体结合能力的强弱,而结合常数 Ka 可显示这一特性^[3]。

本文用放射受体法测定受体与 ConA 的结合,数据用 Scatchard 作图^[4],算出受体的结合常数 Ka 及结合容量 R。所用材料为小鼠正常肝细胞及小鼠腹水型肝细胞肝癌。

材料和方法

(一) **细胞悬液** CJR 小鼠正常肝脏按 Anderson 及 Steer 等方法^[5-6]略加改良制成细胞悬液,相差镜下观察形态完整,台盼蓝排斥试验检测存活率在 89~95%。HepA 细胞接种于 CJR 小鼠腹腔,7—9 天后抽取腹水,分离出肿瘤细胞,经充分洗涤后作为测定样品。上述细胞均悬于磷酸缓冲生理盐水(PBS)或无糖、无钙 Hanks 液中。

(二) **¹²⁵I-ConA 的制备** ConA (Sigma) 按乳过氧化物酶法进行碘标^[8],标记物经 Sephadex G-25 柱分离游离 Na¹²⁵I,再用 Sephadex G-50 柱作为亲和层析柱,除去无活性成分,用 0.2M 葡萄糖/0.05MPB-1MNaCl 混合液洗脱,洗脱液对 0.05MPB-1MNaCl 液(pH7.2)透析。产率约 90%,比放射性 10⁷cpm/mg 蛋白质,加入 1 毫克/毫升血红蛋白,在 -20℃ 冰箱

保存可用一个月。

(三) **结合试验** 反应体系为 ¹²⁵I-ConA 5~10 微升(最终浓度 2~4.25 微克/毫升),细胞悬液 100 微升(正常肝细胞数为 4×10⁵, HepA 为 5×10⁶),加无糖 Hanks 液至总体积为 200 微升。反应在小玻璃试管中进行,每测定组均为三复管。作结合竞争试验时加入未标记 ConA 2~240 微克,充分混和,置 37℃ 保温 15 分钟后细胞用冷 PBS 洗 3 次,在 FH₄₀₈ 定标器中测定结合的 ¹²⁵I 量。

结果与讨论

(一) **保温时间、pH 与细胞浓度对结合作用的影响** ConA 和细胞的结合受时间的影响。在 37℃ 保温 10 分钟结合率已近最高峰,到 30 分钟尚保持高结合率,以后逐渐下降(图 1a)。pH 对结合反应的影响也十分显著,其最适 pH 在 7.0~7.4 之间(图 1b)。细胞与 ¹²⁵I-ConA 的结合和细胞浓度成正比关系,浓度过低结合量太少;浓度过高,加入未标记 ConA 时抑制效应不显著(图 2)。在 37℃ 时,正常肝细胞浓度以 4×10⁶/毫升, HepA 细胞以 5×10⁷/毫升较为适宜,本文实验中均采用上述两种细胞浓度。

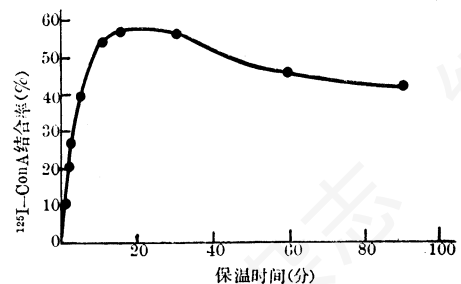


图 1a 保温时间对细胞与 ConA 结合的影响

反应体系: ¹²⁵I-ConA 0.4 微克, HepA 细胞 1×10⁷/100 微升, PB(pH7) 中保温。总体积 200 微升

○——○ 根据实验数据(三次测定结果平均值)所作曲线

●——● 根据 Buller 作图渐近线参数计算法所得理论曲线

反应体系: ¹²⁵I-ConA(0.4 微克) 10 微升, 不同浓度未标记 ConA(2—100 微克) 90 微升, HepA

可以设想对凝集素凝集效应强的细胞,其表面可能具有容量虽少但亲和力强的受体,它易与凝集素结合,并且在它与凝集素结合后使表面上受体易于发生聚集,细胞发生凝集。

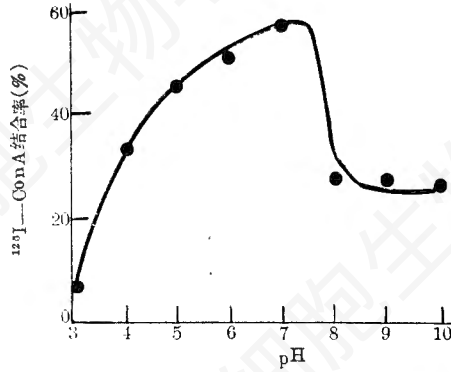


图 1b pH对细胞与 ConA 结合的影响

反应体系：¹²⁵I-ConA 0.4 微克，HepA 细胞 $1 \times 10^7/100$ 微升（在 0.5M NaCl 含 1mM CaCl₂ 及 1mM MnCl₂ 溶液中），加 pH 3—10 不同 pH 缓冲液，体系总量 200 微升，37℃ 保温 15 分钟

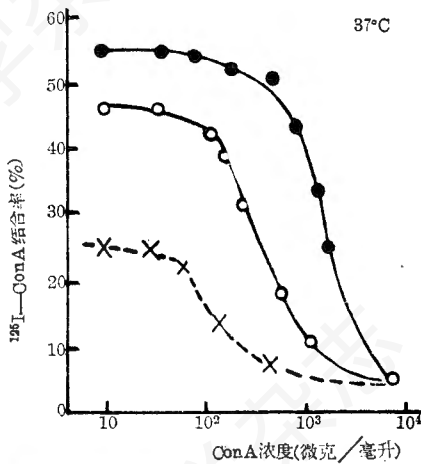


图 2 细胞浓度对 ¹²⁵I-ConA 与细胞结合的影响

- 1 × 10⁷/毫升肝细胞
- 4 × 10⁶/毫升肝细胞
- ×---× 2 × 10⁶/毫升肝细胞

(二) 结合常数与结合容量(受体数)的测定

配体与受体结合有特异性和非特异性结合两部分。实验时先用结合试验法测得总结合量，再在过量未标记 ConA (10⁴ 倍于 ¹²⁵I-ConA 量) 存在下，求得细胞与 ConA 的非特异性结合率 (HepA 为 2.7%，正常鼠肝细胞为 4.3%)，总结合量减去非特异性结合量为特异性结合量。配体与受体特异性结合应具有饱和性，当反应体系中加入 ConA 近 400 微克时，

特异性结合达饱和，结合曲线成水平延伸线 (图 3a 及 b)。

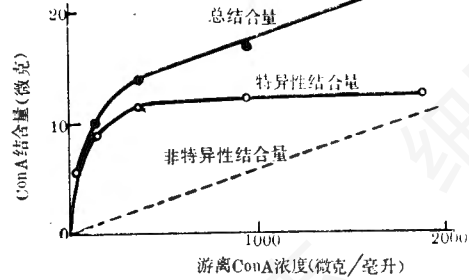


图 3a HepA 与 ConA 特异性及非特异性结合曲线

反应体系： 5×10^7 /毫升 HepA 细胞与 3 微克/毫升 ¹²⁵I-ConA 及 0—2 毫克/毫升不同浓度未标记 ConA 在 200 毫升总体积，37℃ 保温 15 分钟

总结合量 = ¹²⁵I-ConA 结合百分率 × ConA 总浓度

非特异性结合量 = 在反应体系中加入 2 毫克未标记 ConA 后的 ¹²⁵I-ConA 结合率 (2.7%) × 各管 ConA 总浓度

特异性结合量 = 总结合量 - 非特异性结合量

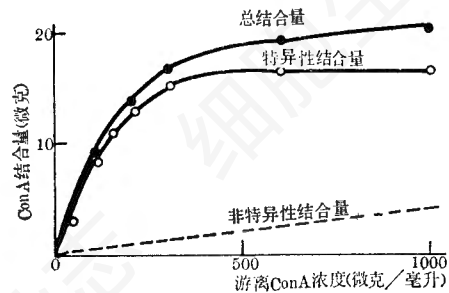


图 3b 正常肝细胞与 ConA 特异性及非特异性结合曲线

反应体系： 4×10^6 /毫升肝细胞与 2.65 微克/毫升 ¹²⁵I-ConA 及 40μg-1 毫克/毫升未标记 ConA 在 200 μl 总体积中，37℃ 保温 15 分钟。非特异性结合率 4.3%

取上述特异性结合数据按 Scatchard 作图，正常鼠肝细胞为一直线 (图 4)，直线的负斜率即为 ConA 与细胞表面膜上受体的结合常数 ($K_a = 7.89 \times 10^5$)；直线在 X 轴上的交点为结合容量 ($R = 4.01 \times 10^8$)。这是一种配体和细胞膜上一种均一的、亲和力恒定的受体，在稳态下反应的典型曲线，HepA 的结果按

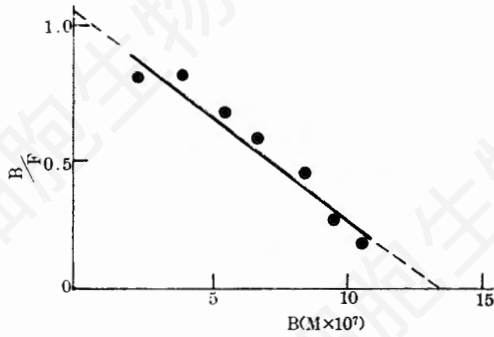


图4 肝细胞与 ConA 特异性结合的 Scatchard 作图

$$K_a = 7.89 \times 10^5 M^{-1} \quad R = 4.01 \times 10^8$$

反应体系： ^{125}I -ConA(0.53 微克)10 毫升，不同浓度 ConA(8~200 微克)

90 微升，肝细胞(4×10^5)100 微升，37℃ 保温 15 分钟。

注： K_a = 直线的负斜率

$$R = \frac{\text{直线 } x \text{ 轴的截距} \times 6.022 \times 10^{23}}{4 \times 10^5 \times 5000}$$

B: 结合量 F: 游离量

M: 克分子浓度

计算中 ConA 分子量取 100,000 (后同)

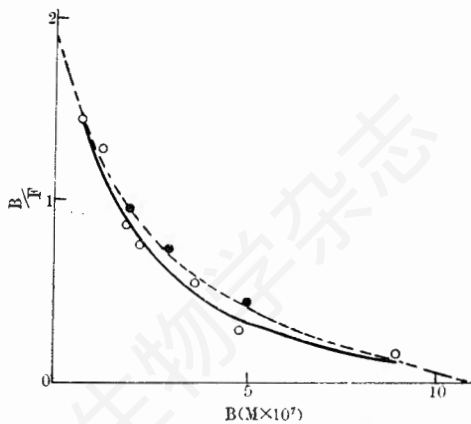


图5 HepA 细胞与 ConA 特异性结合的 Scatchard 作图

$$K_{a_1} = 6.72 \times 10^6 M^{-1} \quad q_2 = 8.85 \times 10^{-7} M$$

$$K_{a_2} = 5.00 \times 10^5 M^{-1} \quad R = 2.6 \times 10^7$$

$$q_1 = 1.95 \times 10^{-7} M$$

○——○ 根据实验数据(三次测定结果平均值)所作曲线

●-----● 根据 Buller 作图渐近线参数 计算法所得理论曲线

反应体系： ^{125}I -ConA(0.4 微克)10 微升，不同浓度未标记 ConA(2—100 微克)90 微升，HepA 细胞(5×10^6)100 微升，37℃ 保温 15 分钟

Scatchard 作图得一凹面向上的曲线(图5)。

可见正常小鼠肝细胞与 HepA 细胞的 Scatchard 图形差别十分显著。有多种情况使得 Scatchard 图形呈凹线，其中之一是有两类不同亲和力的受体同时存在，它们的结合常数和受体数可用 Buller 渐近线法结合计算得出^[7-8]。HepA 上两类 ConA 受体的 K_a 、 q (反应体系中所具有结合位点的克分子浓度)及 R 值见表 1。由表 1 可见在 HepA 表面膜上有一类高亲和力、低容量受体，这种受体不存在于正常肝细胞。如果比较两类细胞的受体数，以单个细胞为单位，则正常肝细胞反比 HepA 高达 15 倍。上述结果表明两类细胞凝集强度的不同可能是由于在 HepA 表面膜上有一类高亲和力受体之故。

关于细胞表面与凝集素结合的位点数和细胞对凝集素的凝集效应之间的关系已有许多报道。如小鼠 3T3 细胞不被 ConA 凝集，而经胰蛋白酶处理，经 SV₄₀ 病毒或多瘤病毒转化后则可发生明显凝集。细胞在处理或转化前后用放射受体法测定其单位细胞的 ConA 受体数，彼此都无甚差异^[11]。此外，有的转化细胞凝集效应强，其受体数却反而比不易凝集的亲体细胞少^[11]。虽亦有易凝细胞受体数较多的报道^[12]，但绝大多数结果表明细胞的受体数与其凝集效应间无一定相应关系。本文用正常肝细胞与 HepA 细胞进行测定的结果也是如此。

Christopher 报道：促甲状腺素 (TSH) 不仅能和其靶细胞—甲状腺结合，还能和非靶细胞结合，从结合容量看两者没有统计学上的显著差别。但若分析两类细胞与 TSH 的结合常数 K_a ，则发现甲状腺细胞表面膜上有高低两类亲和力的受体，而非靶细胞和 TSH 的结合只具有一类低亲和力的受体，可见 K_a 更能反映配体、受体间专一性结合的能力^[3]。

可以设想对凝集素凝集效应强的细胞，其表面可能具有容量虽少但亲和力强的受体，它易与凝集素结合，并且在它与凝集素结合后使表面膜上受体易于发生聚集，细胞发生凝集。本文用 ConA 及同一实验室用 SBA^[13] 对

表 1 正常小鼠肝及肝癌细胞 ConA 受体的比较

细胞种类	Scatchard 作 图	受体结合常数 (M^{-1})	受 体 数	
			单位细胞	单位表面积(μ^2)
正常肝细胞	直 线	$K = 7.89 \times 10^5$	4.01×10^8	2.46×10^5
HepA	凹形曲线	$K_1 = 6.72 \times 10^6$ $K_2 = 5.00 \times 10^5$	$R_1 = 4.69 \times 10^6$ $R_2 = 2.13 \times 10^7$ $R_1 + R_2 = 2.60 \times 10^7$	5.68×10^4

注: HepA 为大小不等的球形细胞, 在测微仪下测定 60 个细胞直径, (平均约 12μ) 再按球形计算其表面积, 取其均数为 $458\mu^2$ 。肝细胞形态多样, 测量 100 个细胞的长径与短径, 以 $\frac{\text{长径} + \text{短径}}{2}$ 为细胞直径, 均数为 22.9μ , 此数值与 Drochmas 等^[9]报道的大鼠肝细胞的平均直径 (22.78μ) 相同, 故肝细胞表面积按该文报道的大鼠肝细胞表面积 $1629\mu^2$ 计算。

HepA 细胞进行放射受体测定, 所得数据 Scatchard 分析的结果都支持上述设想。但以上结果仅得自一类细胞, 还有待更多的证实。此外, 这种在动力学上表现出的强的亲和力, 是否由于有特殊的糖蛋白质受体存在于癌及胚胎细胞膜上, 或是癌细胞及胚胎上的受体在质上和正常细胞相同而仅是聚集状态、空间排列有异, 以致表现不同的亲和力, 还是由于其它因素的影响, 都还待进一步探讨。

小 结

用放射受体法测定正常鼠肝细胞和腹水型肝癌细胞表面膜上 ConA 受体, 发现正常鼠肝细胞仅表现为一类低亲和力受体, 而肝癌细胞则表现有高低两类亲和力的受体。受体数不论以单个细胞还是单位面积计算, 正常肝细胞都显著多于肝癌细胞。结果提示肝癌细胞对 ConA 凝集强度高, 可能是由于存在高亲和力受体的关系。

参 考 文 献

[1] Biology Handbooks I, Cell Biology Com-

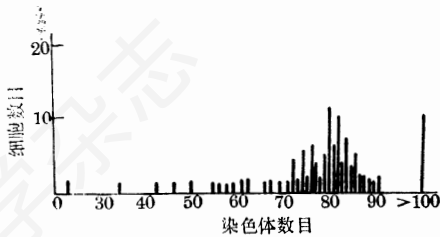
pild and Edited by Ajtman, P. L., and Katz, D. D. pp. 100—104 1976 (Bethesda, Maryland).

- [2] Sharon, N., and Lis, H. in Method in Membrane Biology Vol. 3 p. 158 Edt. Korn, D. D. 1975 (New York and London).
- [3] Christopher, H. J. et al., 1980 *J. Biol. Chem.* 255: 4001.
- [4] Scatchard, G., 1949 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51: 660.
- [5] Anderson, N. G., 1953 *Science* 117: 627.
- [6] Steer, C. J., and Clarenburg, R., 1979 *J. Biol. Chem.* 254: 4457.
- [7] Ozanne, B., and Sanbrook, J., 1971 *Nature (New Biol.)* 232: 156.
- [8] Buller, R. E., et al., 1976 *J. Steroid Biochem.* 7: 321.
- [9] 罗荣生 1980 生物化学与生物物理进展 3: 40.
- [10] Drochmans, P. et al., 1975 *J. Cell Biol.* 66: 1.
- [11] Sela, B. et al., 1971 *Biochem. Biophys. Acta* 249: 564.
- [12] Boldt, D. H., and Lyons, R. D., 1979. *Cellular Immun.* 43: 82.
- [13] 任锡麟、林钧材、顾天爵(未发表资料)。

实验结果

一、CBRH-7919 大鼠肝癌细胞染色体数

本实验对 102 个肝癌细胞 (第 35 代) 的分裂中期细胞进行了观察和计数。染色体呈明显的非整倍性, 数目变化范围很广, 从近单倍体 (23 条) 到超八倍体 (196 条) 都有, 多数在三倍体到超四倍体的范围间。众数峰不很明确。染色体在 80—86 条范围的细胞占 48.7%, 具 80 条染色体的细胞占 16.7% (见图)。



二、CBRH-7919 大鼠肝癌细胞的组型变化

根据大鼠 (*Rattus norvegicus*) 染色体标准核型委员会的规定及 G. Lavan 对大鼠染色体 G 带命名的建议, 对 CBRH-7919 细胞系的染色体进行核型分析 (见表 1), 结果显示各组染色体均有增加, 但增加比例不等。D 组增加最多, 为正常的 1.96 倍; B 组为 1.83 倍; C 组为 1.42 倍; A 组增加最少, 为 1.35 倍。各号染色体大部分为多体 (multisomy), 幅度波动

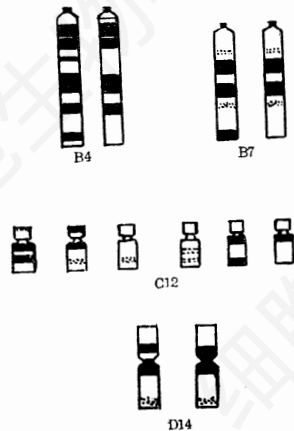


图 3 多形性同源染色体

表 1 大鼠肝癌细胞各组号染色体数目变化情况

组号	核 型										平均增 合 计	增 长 数 (%)								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X										
A	1	2	2	2	1	2	2	3	2	3	2	81	35							
	2	4	4	4	5	4	4	4	4	3	4									
	3	2	1	2	2	2	2	2	2	3	2									
B	4	3	7	2	5	7	4	2	4	2	4	256	83							
	5	2	1	3	5	3	2	5	4	4	2									
	6	4	3	3	5	4	5	4	4	4	6									
	7	6	4	8	5	4	4	5	3	4	4									
	8	3	4	4	5	4	5	4	3	4	4									
	9	2	4	2	3	2	1	3	4	3	3									
	10	2	2	4	3	3	2	3	4	4	2									
C	11	1	4	5	5	6	5	4	4	4	1	87	45							
	12	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2									
	13	4	3	2	1	4	6	5	4	3	3									
D	14	6	4	3	5	3	5	4	2	3	6	266	90							
	15	2	2	1	4	2	4	2	2	2	3									
	16	7	3	5	4	9	4	4	4	2	8									
	17	3	4	4	3	3	5	6	6	5	3									
	18	7	7	5	4	4	5	2	3	4	5									
	19	3	2	5	6	1	3	3	2	4	2									
	20	2	4	3	6	1	4	4	3	2	3									
	X	1	4	3	3	1	4	4	2	4	2			28	40					
M	8	13	13	12	10	9	7	7	9	10										
每个细胞染色体数											75	82	84	92	80	86	82	74	78	81

大, 最多的达八体、九体, 个别亦有单体、二体出现。A 组染色体比较恒定, 其中 1、3 号基本上为二体, 2 号多为四体。C 组 12 号染色体多为单体。X 染色体为三体、四体, 也有单体存在。异常染色体数波动于 6—12 之间 (见表 1)。

三、染色体形态结构的重组

从 G 带核型中可以观察到众多的染色体结构重组形式, 如缺失、重复、易位、插入等。同源染色体中常有一个或两个产生变异, 有时甚至难以辨认其所属组号。关于大鼠正常细胞的 C12 染色体带纹的多形性曾有报道, 而 CBRH-7919 大鼠肝癌细胞的 G 带核型中不但观察到 C12 同源染色体带纹的多形性, 而且发现诸如 B4、B7、D14 同源染色体带纹也出现

表 2 大鼠肝癌细胞(第 35 代)染色体数目与标记染色体数目的分布

染色体数目	分裂相数	具标记染色体 SM	细胞数具标记染色体 M ₁ M ₂ 细胞数
21~30	2	2	
31~40	1	1	
41~50	4	1	
51~60	4	3	2
61~70	7	2	2
71	1	1	
72	3	3	2
73	1	1	1
74	5	3	4
75	1		1
76	5	4	3
77	3	2	3
78	1	1	
79	5	4	4
80	12	12	9
81	6	5	2
82	10	9	6
83	3	3	2
84	6	6	2
85	2	2	1
86	5	5	4
87	2	3	1
88	2	2	1
89	1		1
90	1		
91~100	1	1	1
100以上	9		

变异(见图 3)。如果所分析的 G 带核型标本多些,多形性同源染色体的类型可能进一步增多^[5]。

更加纷繁复杂的变化是不同的易位与缺失的出现,形成了频率不一的多种异常染色体。

四、CBRH-7919 大鼠肝癌细胞的标记染色体

在染色体计数观察和核型分析中我们发现两条同源的巨大的亚中央着丝点染色体和两条着丝点不清楚的微小染色体,前者的出现频率为 82%,后者为 53.9%。它们在不同染色体数细胞中的分布情况见表 2。这四条染色体我们认为 CBRH-7919 肝癌细胞的标记染色体,并将亚中央着丝点的两条同源染色体称为



图 4 标记染色体

SM,微小染色体分别称为 M₁、M₂。

经 G 带分析, SM 由 1 号染色体长臂与 6 号染色体易位而成,可写为 t(1,6) 或 6qter→6cen::1cen→1qter。M₁ 是很小的亚中央着丝点染色体, M₂ 更小,具顶端着丝点,染色都很浅,可能分别由某一号染色体上断裂而来(图 4)。

CBRH-7919 细胞中还有相当数量频率不等的异常染色体,这是肿瘤细胞群体核型多样性的因素之一,是伴随肿瘤进程发生的^[6]。大部分是易位的结果,由 C 组、D 组染色体的一臂与 A 组、B 组染色体的一臂易位组成(图 1)。在异常染色体中还有一类短小的亚中央着丝点染色体,有的是 1 号染色体末端缺失,有的是 3 号染色体末端缺失。

讨 论

大量细胞遗传学的工作表明:肿瘤细胞通常具有染色体数目与结构的变异,而正常细胞显示染色体异常性的则甚为罕见。然而,不同的肿瘤类型、组织来源及病因都可能使肿瘤细胞染色体变异具有各不相同的特点,而实体瘤的移植接种,肿瘤细胞的体外培养等过程又进一步会使它发生次生性的变化。

迄今为止,大鼠肿瘤染色体普遍被认为是非整倍体,但各种肿瘤的染色体数很不一致。

即以肝癌而言, Grover 等^[4]用二乙基亚硝酸胺 (DNA) 诱发的大鼠肝癌, 染色体数接近二倍体的 (40—43) 占 67%。Olah 与 Weber 等^[8]在 Morris 移植性肝癌的研究中指出, 生长缓慢的 8999 株大部分为二倍体, 而生长迅速的 3924A 株, 染色体数的分布由 54 至 120, 干系数为 60。强家模^[9,10]用二乙基亚硝酸胺 (DNA) 诱发的大鼠移植性肝癌 BERH-2, 大部分染色体为亚四倍体, 众数为 72 条。本实验所用的 CBRH-7919 大鼠肝癌细胞系有近半数细胞在四倍体范围内, 与移植性肝癌 BERH-2 的染色体数接近 (比其它肝癌高得多), 是否与使用同一化学诱变剂 DNA 有关还不清楚。此外, 正常大鼠肝实质细胞内往往有多倍体核占优势的现象, 其形成机制据认为与异常的有丝分裂有关^[11]。CBRH-7919 细胞来自成年大鼠体内诱发的肿瘤, 在制备染色体标本过程中观察到核内复制现象比较多, CBRH-7919 细胞染色体近半数近四倍体, 是否与上述原因相关还无足够依据。而染色体数目分布的广泛, 众数峰的不明确, 则可能是体外培养过程中核型的不稳定性的增加。至于 CBRH-7919 细胞标记染色体稳定而高频地出现又说明了什么, 是否与该系细胞的恶性特征的稳定有关, 还待进一步说明。

CBRH-7919 细胞系在染色体组型的增减方面与 BERH-2 移植性肝癌也相似^[10]。A 组 C 组染色体增加较少, B 组 D 组染色体增加较多, 因而细胞原有染色体组型之间的平衡被破坏。

在标记染色体方面, CBRH-7919 肝癌细胞与 BERH-2 移植性肝癌有较大的差异, 不但显示了形态的不同, 类别的增加, 而且在组成上主要涉及到 1 号染色体的片段, 差异的原因值得进一步探讨。

综上所述, CBRH-7919 肝癌细胞系染色体畸变与 BERH-2 移植性肝癌相似之处甚多。这可能是实验动物和化学诱变剂相同, 因而得到的肿瘤类型一致的结果^[10]。至于标记染色体的差异能否归诸于体外培养过程中次生性的变化还有待进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] 朱德厚、叶秀珍、陈瑞铭, 1980, 实验生物学报, 13(1): 113—117.
- [2] Seabright, M., 1971. *Lancet* 30: 971—972.
- [3] Committee for a standardized karyotype of *Rattus norvegicus* 1973. Standard karyotype of the Norway rat, *Rattus norvegicus*. *Cytogenet. Cell Genet.* 12: 199—205.
- [4] Levan, G., 1974. *Hereditas* 77: 37—52.
- [5] 陈汉源、朱季美、丛笑倩, 1978, 实验生物学报, 11: 171—182.
- [6] Levan, G., 1974. *Hereditas* 78: 273—289.
- [7] Grover, S. and P. Fischer, 1971. *Cancer* 7: 77—82.
- [8] Edith Olah and George Weber, 1979. *Cancer Research* 39: 1708—1717.
- [9] 强家模、季闻行、孙兰英、徐永华, 1978, 实验生物学报 11(1): 78—93.
- [10] 强家模, 1981. 实验生物学报, 14(1): 65—75.
- [11] Carriere, R., 1967. *Exp. Cell Res.* 46: 533—540.

大鼠膈肌去神经后终板形态结构及胆硷酯酶活力 在体与在器官培养下的变化的比较

周振华 于长亮 陈春仙

(中国科学院上海生理研究所)

在体骨骼肌去神经后, 终板形态结构退变, 胆硷酯酶活力迅速下降^[1~3]。而 Miledi