

量也不尽相同,所以我们又采用了用胶原酶直接消化组织小块的方法。应用该方法不仅可以很快获得实验所需的大量较纯的胚肝上皮样细胞,并且由于细胞的接种数量易于掌握,便于对各种实验因素进行分组比较。从15例人胚肝上皮样细胞成功培养的经验看来,标本新鲜及营养条件适宜对于上皮细胞的生长很重要。由于L-15液不含碳酸氢钠缓冲系统,而以碱性氨基酸及磷酸盐等保持pH值的恒定,又含有多种营养成分⁽⁶⁾,所以在组织的存放、剪切及洗涤等操作过程中应用L-15液对保存细胞活力很有助益。另外,在消化液中添加PVP对细胞也具有保护作用⁽⁷⁾。在培养液中增加适当的生长刺激因子可促进胚肝上皮细胞的生长,低血清或无血清培养则利于控制成纤维细胞的生长。本文所报道的实验结果,为探索人胚细胞体外培养方法方面提供了可借鉴的途径。同时人胚肝上皮细胞的较长时间体外培养的成功,也可为研究肝细胞的细胞生物学以及癌变等问题提供了一个新的实验模型。

摘 要

用胶原酶直接消化人胚肝组织小块,可以简便、快速地获得大量活率较高和较纯的肝上皮样细胞。在低钙、低血清浓度加有多种因素

的培养液中,胚肝上皮样细胞可以体外培养一月以上。原代培养的胚肝上皮样细胞一次传代后,仍可保持一定的生长能力。表皮生长因子、霍乱毒素、转铁蛋白及肝细胞生长因子等均对培养的胚肝上皮样细胞具有一定的生长刺激作用。

本文还用r-GT染色、AFP和白蛋白测定,以及³H-TdR掺入等指标观察了培养过程中胚肝上皮样细胞的生长、增殖和生物学功能。

人胚肝上皮样细胞的较长期体外培养,可望成为研究肝细胞生长、分化及癌变的一个有用的实验模型。

参 考 文 献

- [1] J. F. Lechner et al., 1981, *Cancer Res.* 41: 2294—2304.
- [2] W. D. Hillis and F. B. Bang 1962, *Exp. Cell Research* 26: 9—36.
- [3] G. M. Williams et al., 1971, *Exp. Cell Research* 69: 106—112.
- [4] 裴许芳等, 1985, *中华病理学杂志* 14 (3): 169—171.
- [5] A. M. Rutenburg et al., 1969, *J. Histochemistry and Cytochemistry* 17: 517—526.
- [6] A. Leibovitz, 1963, *A. J. Hygiene* 78: 173—180.
- [7] A. Leibovitz, 1986, *Cancer Genetics and Cytogenetics* 19: 11—19.

低密度脂蛋白的酶标和免疫酶标的定位研究*

楼定安 钱 浩

(浙江医科大学病理解剖学教研室)

Brown和Goldstein(1974)提出细胞表面存在着特异性的高亲和力的低密度脂蛋白(low density lipoprotein, 简称LDL)受体^[1,2]。一般研究者多用放射性配体(¹²⁵I-LDL)结合法来研究LDL受体的功能,也曾有人用荧光素、铁蛋白标记或冰冻蚀刻等方法进行了形态学的研究^[3-5]。考虑到酶标技术比较稳定而易行,又

无放射性污染,既可作为形态观察,也可用分光光度计作定量测定等优越性,故本实验室采

* 本文摘要见“中国细胞生物学学会1983年会议”
《论文摘要汇编》, p.84-85。

“Abstracts of the Papers Presented at the Third International Congress on Cell Biology” August 26-31, 1984, Tokyo, Japan, p. 321.

用酶标配体和免疫酶标的方法观察 LDL 受体的定位和功能活性。现将定位工作的结果报道如下。

材料和方法

1. 人 LDL 的分离和兔抗人 LDL IgG 的制备 人血清用溴化钾调整密度为 1.3mg/ml, 日立 80-p 型超速离心机(RP-50 T 型角式转头, 50,000 rpm, 176,600 × g)10℃离心 6 小时, 取聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定为纯 LDL 组分, 经磷酸缓冲液透析后备用^[6,7]。

将 LDL 给家兔免疫, 以琼脂双向扩散法测得血清抗体效价为 1:64, 用硫酸铵沉淀法提取抗体^[8]。

2. 辣根过氧化物酶(HRP)标记人 LDL 或兔抗人 LDL IgG 用过碘酸钠氧化 HRP 高效果标记法将 HRP(Sigma VII 型, RZ=3)标记人 LDL 或兔抗人 LDL IgG^[9]。标记物 LDL-HRP 或兔抗人 LDL IgG-HRP 经 50% 硫酸铵洗涤, PBS 透析, 以分光光度计测定结合物中酶含量, 用 Kjeldahl 氏定氮法测得标记物总蛋白含量, 减去酶含量即为 LDL-蛋白质含量。以兔抗人 LDL IgG 或人 LDL 作包被, 用酶联免疫吸附检测法(ELISA)鉴定证明, HRP 标记在 LDL 和 IgG 上, 都有生物活性。

3. 人胚肺细胞的培养和分组实验 取健康小剖腹产或水囊引产的胎儿肺组织, 剪碎成 1 mm³ 大小, 用 0.25% 胰蛋白酶(Difco)4℃消化 12 小时。以 20 万/ml 细胞数分别接种于培养瓶中, 培养液为 Eagle 液中含 15% 小牛血清、0.0013% 水解乳蛋白及青霉素、链霉素各 100 单位/ml, 细胞传两代后, 使长成单层, 换入无脂培养液(Eagle 液 2.7 ml, 10% BSA 0.3 ml), 继续在 37℃ 培养 24 小时。然后置 4℃ 半小时, 弃去培养液, 用冷 Hank's 液洗, 按下述分组继续培养, 每组 3—4 瓶。

(1) 酶标配体(LDL-HRP)组(分下列两小组)

(A) 含 LDL-HRP(30 μg/ml LDL-蛋白质)的 Eagle 液, 于 4℃ 培养 2 小时。

(B) 按上述同样条件 2 小时后移置 37℃ 30 分钟。

(2) 免疫酶标组(分下列六组)

细胞在含 LDL(30 μg/ml)的 Eagle 液中, 4℃ 2 小时后, 分下列三组培养:

(A) 含兔抗人 LDL IgG-HRP(2 μg/ml)的 Eagle 液。

(B) 在含未标记的兔抗人 LDL IgG 的 Eagle 液中 2 小时, 再入含兔抗人 LDL IgG-HRP 的培养液。

(C) 经兔抗人 LDL IgG 作用 2 小时后, 换入含羊抗兔 IgG-HRP* 的培养液。

以人无脂血清代替上述培养液中的 LDL, 4℃ 2 小时后, 再分下列两组:

(D) 以含兔抗人 LDL IgG-HRP 的 Eagle 液培养。

(E) 含 LDL 的 Eagle 液 4℃ 2 小时后, 再以兔抗人 LDL IgG-HRP 培养。

(F) 以 5 mg/ml BSA(不含 IgG 和 LDL)代替无脂血清, 然后在兔抗人 LDL IgG-HRP 液中培养。

(3) 游离 HRP 组

以含游离 HRP(15 μg/ml, 与上述 LDL-HRP 的培养液中浓度一致)Eagle 液代替含 LDL-HRP 的培养液。

(4) LDL-HRP + 肝素组

细胞在含 LDL-HRP + 肝素(5 mg/ml)的 Eagle 液中培养。

(5) 高脂组(分下列两组)

(A) 含 LDL-HRP + 高浓度 LDL(1500 μg/ml)的 Eagle 液。

(B) 在高脂培养液(含 LDL-胆固醇 375 μg/ml)中 37℃ 24 小时后, 换入 LDL-HRP 培养液。

(6) 空白对照组

Eagle 液 + 15% 小牛血清。

以上各组细胞经 4℃ 2 小时后, 倾去培养液, 按标准洗涤法清洗⁽¹⁰⁾(于 4℃ 以含 0.2% BSA 的 PBS 洗六次, 再用 PBS 洗三次), 洗去非特异性粘附。以 2.5% 戊二醛 4℃ 固定 45 分钟, PBS 洗三次, 经 pH 7.6 Tris-HCl 缓冲液洗一次, 以 0.05% DAB-0.01% H₂O 显色 10 分钟, Tris-HCl 缓冲液洗, 1% O₃O₄ 固定 1 小时, 经水洗, 系列酒精脱水, 环氧树脂 812 包埋, LKB 超薄切片机切片。切片分别以不染色、醋酸铀或醋酸铀-枸橼酸铅染色, 以日立 H-600 透射电镜观察。

结果和讨论

1. 酶标配体(LDL-HRP)组

细胞质膜表面常见直径约 50~200 nm 成丛的颗粒状电子致密的 HRP 反应产物沉着, 少数直径达 230—360 nm, 这种产物大多存在于有茸毛状外被的质膜表面, 有的已形成不同

* 羊抗兔 IgG-HRP 由浙江省卫生防疫站中心实验室提供。

程度的凹陷,但很少在细胞内见到,因为在4℃时吞饮作用被抑制,故结合在受体上的LDL很少能进入细胞内(图1,2)。若把4℃培养的细胞移置37℃,使吞饮作用活跃,数分钟后就可见结合于表面受体上的HRP标记物被摄入细胞,吞饮泡和次级溶酶体内都可见到酶反应产物(图3)。这一现象与Anderson等以铁蛋白标记LDL所见一致^[3,4]。

把培养在盖玻片上的细胞,经LDL-HRP和DAB-H₂O₂处理,在光学显微镜下观察,细胞略呈淡棕色,仅见一些模糊不清的棕色颗粒(未经处理的细胞无色)。这可能是因为结合在受体上的LDL-HRP反应产物,直径多在200nm之下。如果不是集中或融合在一起,光学显微镜不易分辨。

2. 免疫酶标组

细胞在低浓度LDL的培养液中4℃2小时后,LDL与受体结合,再与兔抗人LDL-HRP产生免疫反应,在质膜表面可见HRP反应产物沉着。若细胞经LDL培养后,先以未标记的兔抗人LDL IgG处理,再与兔抗人LDL-HRP作用,后者的作用已被阻断,则质膜表面未见酶反应产物(图4);如果在LDL培养后,经兔抗人LDL IgG处理,再与羊抗兔IgG-HRP作用,则在细胞表面可见HRP反应产物。与LDL-HRP组的反应产物相比较,免疫酶标组反应产物的电子密度更高,颗粒较粗大(图5),但有时在质膜上可见弥漫性、中等电子密度的非特异性产物沉着。

经无脂血清或BSA培养的细胞,与兔抗人LDL IgG-HRP作用,质膜上无酶反应产物;而在无脂培养后再以LDL培养,与兔抗人LDL IgG-HRP作用,质膜表面又可见酶反应产物。这都表明兔抗人LDL IgG-HRP是与结合在受体上的LDL起作用。

3. 游离HRP组

经低浓度游离HRP培养的细胞质膜表面未见酶反应产物(图6)。Anderson等曾将成纤维细胞分别在高浓度游离HRP(5mg/ml)和铁

蛋白标记的LDL培养,发现HRP反应产物与LDL-铁蛋白的分布不同,前者在有外被和无外被的吞饮泡内都可见到,而未见HRP与细胞表面相结合^[4]。本实验细胞在15μg/ml的游离HRP中也未发现HRP与细胞表面结合,这似乎说明这些细胞表面没有特异性的、高亲和力的HRP受体,细胞只能在一定浓度时以非特异性方式摄取HRP。

4. LDL-HRP + 肝素组

本组极大多数细胞表面酶反应阴性,仅在个别细胞表面偶见阳性产物。硫酸氨基多糖如肝素等带阴电荷的硫酸根能与LDL蛋白质中带阳电荷的氨基结合,形成可溶性复合物。故肝素能与LDL受体产生竞争作用,抑制受体与LDL的结合;肝素也能使已结合在受体上的LDL脱落^[10]。

5. 高脂组

不论是在LDL-HRP + 高浓度LDL 4℃2小时或预先在高脂培养液中37℃24小时后,再以LDL-HRP作用,两组细胞的质膜表面都极少见到酶反应产物。前者培养液中高浓度LDL对LDL-HRP与受体的结合产生竞争性抑制;后者细胞在高脂培养液中37℃24小时后,通过LDL受体途径,细胞已摄取了足量的LDL,产生反馈性抑制,受体的合成减少^[11,2]。

6. 空白对照组

培养液中不含LDL-HRP,细胞表面酶反应阴性。

现将各组所见列表于下。

上述结果表明,LDL是结合在细胞质膜表面有外被区具有特异性的、高亲和力的LDL受体上,其理由如下:

(1) 培养液中仅含LDL 30μg/ml(空腹血浆中含LDL 422—458mg%),在如此低浓度条件下LDL-HRP能与细胞表面特定部位结合,表明这种结合的高亲和力和特异性。

(2) 经LDL培养的细胞,与兔抗人LDL IgG-HRP作用,在细胞表面LDL结合的部位产生抗原与酶标抗体的反应;如果事先以未标

组别	处 理				结 果	
	1*	2	3	4		
酶标配体组 (LDL-HRP)	A	LDL-HRP	DAB-H ₂ O ₂		+	
	B	LDL-HRP	37°C 30分	DAB-H ₂ O ₂	+(吞饮)	
免 疫 酶 标 组	A	LDL	抗 LDL-HRP	DAB-H ₂ O ₂	+	
	B	LDL	抗 LDL	抗 LDL-HRP	DAB-H ₂ O ₂	-
	C	LDL	抗 LDL	羊抗兔IgG-HRP	DAB-H ₂ O ₂	+
	D	无脂血清	抗 LDL-HRP	DAB-H ₂ O ₂		-
	E	无脂血清	LDL	抗 LDL-HRP	DAB-H ₂ O ₂	+
	F	BSA	抗 LDL-HRP	DAB-H ₂ O ₂		-
HRP 组		HRP	DAB-H ₂ O ₂		-	
LDL-HRP + 肝素组		LDL-HRP + 肝素	DAB-H ₂ O ₂		±***	
高脂组	A	LDL-HRP 高浓度 LDL	DAB-H ₂ O ₂		±***	
	B	高浓度 LDL**	LDL-HRP	DAB-H ₂ O ₂	±***	
空白对照组		小牛血清	DAB-H ₂ O ₂		-	

注: * 4°C 2小时。

** 37°C, 24小时。

*** 极大多数细胞阴性, 只在个别细胞表面偶见酶反应产物。

记的兔抗人 LDL IgG 处理, 已与受体结合的 LDL 表面的抗原决定簇被占据, 则兔抗人 LDL IgG-HRP 的反应被阻断, 而酶标羊抗兔 IgG 的抗体能与之发生阳性反应, 证明 LDL 结合部位的特异性。不论在含 IgG 或不含 IgG, 但凡不含 LDL 的培养液中生长的细胞, 兔抗人 LDL IgG-HRP 都不能产生阳性反应, 可见此反应是与结合在受体上的 LDL 起作用, 血清中 IgG 不能阻断这种作用。

(3) 肝素或高浓度的 LDL 对 LDL-HRP 与受体的结合产生竞争性抑制; 预先经高脂培养的细胞, 与 LDL-HRP 的结合受到“LDL 受体途径”的反馈性抑制。

(4) 低浓度游离 HRP 不与细胞表面结合; 在不含 LDL-HRP 的培养中生长的细胞质膜表面酶反应阴性, 表明这种特异性的结合与 LDL-HRP 有关。

摘 要

以辣根过氧化物酶标记人 LDL、兔抗人 LDL IgG 或羊抗兔 IgG 抗体作为示踪剂, 作用于培养的人胚肺细胞, 经 DAB-H₂O₂ 显色, 超薄切片, 电镜观察, 结果表明:

(1) 细胞能与很低浓度 LDL-HRP 产生特异性结合, 显示 LDL 受体的高亲和力。

(2) 兔抗人 LDL IgG-HRP 与已结合在受体上的 LDL 的结合可被未标记的兔抗人 LDL IgG 封闭, 而封闭后以羊抗兔 IgG-HRP 作用又显示特异性反应, 这种反应只能在已有 LDL 结合的细胞膜上显示, IgG 不能阻断这种反应。

(3) 肝素或高浓度 LDL 对 LDL-HRP 与受体的结合产生竞争性抑制; 事先经高脂培养, 这种结合也受到抑制(反馈性抑制)。

(4) 细胞对游离 HRP 不显示特异性高亲和力的结合。

(5) 生长在不含 LDL-HRP 是培养液中的细胞也无这种特殊性反应。

上述结果说明, LDL-HRP 是结合于质膜表面有外被区特异性的、高亲和力的 LDL 受体上。

参 考 文 献

- [1] Goldstein, J. L. and M. S. Brown., 1977, *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 897—930
- [2] Brown, M. S. et. al., 1980, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 384: 48—66.
- [3] Anderson, R. G. W. et al., 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73: 2434—2438.
- [4] Anderson, R. G. W. et. al., 1977, *Cell*, 10: 351—364.
- [5] Orci, L. et. al., 1978, *Exp. Cell Res.*, 113: 1—13.
- [6] Chung, B. H. et. al., 1980, *J. Lipid Res.* 21: 284—291.
- [7] 赵祖谟等, 1982, 浙江医科大学校庆七十年学术论文汇编摘要, 27—28.
- [8] 西安市医学科学研究所情报室, 1979, 医学情报资料, p. 4—5.
- [9] 骆加里, 1982, 全国免疫学专题学术会议论文摘要汇编, p. 80.
- [10] Goldstein, J. L. et. al., 1976 *Cell* 7: 85—95.

甲₂巨球蛋白的丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳分析

范佩芳 沈芝芬

(上海医科大学放射医学研究所)

鉴定一种蛋白质的性质和纯度有多种方法, 而利用丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳来鉴定蛋白质, 并测定其分子量, 具有设备简单, 操作简便, 样品量少, 分辨率高和可重复性等优点, 因此已成为蛋白质分子量测定的常用方法。

甲₂巨球蛋白(简称 α_2M)是存在于人和动物血清中一种分子量很大的糖蛋白, 是天然蛋白酶抑制剂, 其分子量为 725,000。分子结构的特点之一是内部存在许多二硫键, 使肽链连成一个具有空间结构的大分子。天然的有抑制蛋白酶活性的 α_2M 和失去抑制活性的 α_2M , 经 SDS 热引导和巯基乙醇还原分解成的亚基分子量是特异的, 有明显差别的^[1,2]。不同来源的 α_2M 经上述相同处理后, 亚基分子量也略有差异^[3]。我们利用这些性质, 采用 3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳来鉴定纯化过的猪 α_2M , 大鼠 α_2M (两者均为本实验室制品) 和人 α_2M 制剂(上海市生物制品所 85 年产

品)。通过与进口的人 α_2M 和其他球蛋白分子量比较, 可鉴定上述几种制品的质量(包括纯化程度和抑制活性)。并从亚基分子量和对热诱导敏感性来比较不同来源的 α_2M 种属之间的异同。由于 α_2M 有上述的特有的分子结构, 因而采用丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶电泳法来鉴定 α_2M 远远胜于琼脂电泳、Tris-甘氨酸-丙烯酰胺凝胶电泳、等电点聚焦凝胶电泳等方法, 使实验得到理想结果。

材 料 和 方 法

猪 α_2M 和大鼠 α_2M (本实验室制备, 均取血浆经过 Sephacryl S-300 和琼脂电泳分离纯化)、人 α_2M 制剂(上海生物制品所 1985 年产品) 和人丙种球蛋白制剂(上海生物制品所)、进口人 α_2M 与人 IgM(均为 Calbiochem, Behring 公司)、丙烯酰胺(Fluka 公司)、甲叉双丙烯酰胺(Aldrich 公司)、TEMED(B. D. H 公司)、标准高分子量蛋白质药箱(Pharmacia 公司)。

一、3—25% 丙烯酰胺梯度 SDS 凝胶板电泳

1) 蛋白质样品电泳前的预处理 蛋白质样品溶