DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.007

质膜脂质构成对淋巴细胞 CD71蛋白表达及其分子特性的影响

糜漫天* 朱锡华 (第三军医大学基础部免疫学教研室)重庆, 630038

提 要 通过磷脂酰胆碱/胆固醇(PC/Ch)摩尔比不同的小单片层人工脂双层膜(SUV)与淋巴细胞孵育,将外源性脂质导入淋巴细胞,进而研究质膜脂质组成的变化对淋巴细胞膜 CD71蛋白表达、CD71分子与配体结合特性及内在化运动的影响,结果显示,SUVs处理后质膜 Ch增加,磷脂/Ch比降低,ConA刺激培养48 h,CD71阳性细胞百分率、膜表面 CD71配体可结合位点增加,受体配体复合物内在化运动加快,但 CD71与配体亲和力下降;加用 HMG-CoA还原酶抑制剂抑制内源性胆固醇合成,CD71分子数量明显减少,但其与配体亲和力升高,后者可能是质膜 Ch降低,膜脂液相区增加,CD71蛋白易于形成高亲和性配体结合位点结构的缘故,斑点杂交分析表明,CD71 mRNA的变化趋势与膜 CD71蛋白表达分析结果基本吻合,提示 SUVs处理细胞膜 CD71分子数量的变化可能主要缘于基因转录活性的改变。

关键词 膜脂质;淋巴细胞;CD71蛋白

中图法分类号 Q54;R392.12

生物膜上约有 70%的蛋白质是与膜脂关系密切的内在膜蛋白,如淋巴细胞膜上的 CD71、MHC-I抗原、细胞因子受体、细胞表面的一些粘附分子和膜结合酶等[1]。它们通常是两性的,疏水区与脂双层内部脂分子的疏水尾相作用,而亲水区则暴露于水相中。嵌入脂相的膜蛋白其功能有赖于它合适的构象,而一定的构象又与其周围微区脂质分子的物理状态有关。有的膜蛋白只有在特定的磷脂头部基因存在时,才有功能。它受膜脂质影响更明显。大多数膜蛋白需经过构象转变才成为有活性成份,如载体蛋白跨膜转运前"解折叠(Unfolding)",使蛋白疏水内核暴露,因此膜脂质微环境改变将影响多种膜蛋白结构、功能,以及在膜上的侧向运动和跨膜转运[2]。

CD71分子为淋巴细胞膜上一重要的分化抗原,由 90×10^3 u两亚单位组成,它与 Fe^{++}饱和的铁传递蛋白结合,内在化介导细胞对 Fe^{++}的摄取,因此 CD71分子的功能状态与淋巴细胞增殖能力密切相关。现已证实 CD71分子为一膜内在糖蛋白,跨膜部分由 28个疏水性氨基酸构成α-螺旋结构。推测淋巴细胞膜脂质组成的变化可能对 CD71蛋白分子结构与功能有重要影响。本实验通过人工脂膜与淋巴细胞孵育,将外源性脂质导入淋巴细胞,人为改变淋巴细胞膜脂质组成,进而研究其对 CD71分子表达、CD71与配体亲和特性及内在化运动的影响,目的在于更好地认识膜脂质与膜蛋白的相互作用,同时也有助于在亚细胞及分子水平上阐明脂代谢异常所致免疫功能改变的可能机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PTfr质粒(Kuhn教授惠赠)、66Ig10单抗(Tauber博士惠赠)、Ber-T9单抗(DAKO公司产品)、FITC标记荧光抗体(武汉生物制品研究所产品)、Dig标记试剂盒(Boehringer Mannheim公司产品)、HindⅢ Marker、ECORI(华美公司产品)、ConA FITC(Sigma公司产品)、Lovastatin(Merck公司产品)。

1.2 仪器

FACstar plus流式细胞仪(Becton Dickinson公司)、Olympus荧光显微镜,超声波发生器。

1.3 实验方法

1.3.1 不同摩尔比 PC/Ch小单片层人工脂膜(SUVs)制备及与淋巴细胞的相互作用:另文报告。

1.3.2 ^{125}I-Tf制备及 CD71放射受体分析

1.3.2.1 Tf的 I标记 铁传递蛋白(Tf)为 CD71分子天然配体,用氯胺 T法标记制备^{125}I-Tf 用此^{125}I-Tf及非标记 Tf与活化 48 h淋巴细胞进行竞争抑制试验,确认 I-Tf具有良好活性。

1.3.2.2 淋巴细胞膜 CD71分子放射受体分析 参照 Richard等[3]方法,在饱和试验基础上采用单点法测定膜 CD71分子数量,淋巴细胞处理同前,细胞用 ConA活化,同时加 Lovastatin抑制内源性胆固醇合成,48 h后进行放射受体分析,膜

* 预防医学系营养卫生学教研室 重庆, 630038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表面 CD71数量 (实为配体可结合位点)及与配体亲和特性变化与 Scatchard分析求出。

1.3.2.3 CD71分子与配体复合物内在化运动检测 按 Yasuhiro等[4]方法进行。

1.3.3 淋巴细胞膜 CD71间接免疫荧光分析 参照 Jan[7]方法。SUVs处理、ConA刺激培养 48 h细胞经间接免疫荧光染色后,用流式细胞仪分析 10000个细胞 CD71阳性细胞百分率。

1.3.4 CD71 mRNA斑点印迹杂交分析

1.3.4.1 PTfR质粒扩增、酶切、cDNA片段回收、纯化 参照“Molecular cloning”一书。

1.3.4.2 Dig标记的 CD71 cDNA探针制备 按 Dig试剂盒说明进行。

1.3.4.3 淋巴细胞总 RNA提取 用异硫氰酸胍法提取 1×10^7个细胞总 RNA。

1.3.4.4 斑点印迹杂交 按常规的方法点膜、预杂交、杂交,洗膜及显色,温膜用 CS9000型薄层色谱扫描仪扫描定量。

2 结果

2.1 人工脂双层膜与淋巴细胞的相互作用

本研究采用间断超声法制备的包裹有 Calcein的荧光脂质体在 37℃与淋巴细胞温育 1、3、5、7、9 h后,取细胞涂片、固定,结果显示在 37℃条件下 SUVs与淋巴细胞温育 3 h,即可见部分淋巴细胞膜、胞内有荧光 (图片略),7 h后约有 65%淋巴细胞带有荧光,提示人工脂膜与淋巴细胞膜发生了融合,部分 SUVs被内吞入胞浆。

SUVs处理细胞 7 h后,淋巴细胞磷脂 (PL)和胆固醇含量及两者摩尔比的变化见附表。

附表 SUVs处理淋巴细胞胆固醇/磷脂 (Ch/PL)摩尔比

Table Ch/PL molar ratios of SUVs treated lymphocytes

SUVs	PL (nmol)	Ch (nmol)	Ch/PL
Control	3.900± 0.432	2.150± 0.366	0.551± 0.047
1∶0.0	4.885± 0.731	1.918± 0.360	0.395± 0.066*
1∶0.5	5.198± 0.458*	3.085± 0.494	0.591± 0.062
1∶1.0	6.083± 0.500*	4.355± 0.564*	0.715± 0.062*
1∶1.5	6.125± 0.240*	5.048± 0.300*	0.825± 0.066*

*: $P<0.05$ *vs* control

2.2 淋巴细胞膜 CD71分子数量,其与配体结合特性及内在化运动的变化

图 1,2分别是对照细胞,1∶0和 1∶1 SUVs处理 7h和加用 Lovastatin后细胞经 ConA活化 48h的 Scatchard作图分析,结果显示未加 Lovastatin对照及两种不同 SUVs处理的细胞 CD71与配体解离常数 (Kd值)分别为 1.5,0.5,1.9(nm),每个细胞表面 CD71分子数量平均为 5.742×10^4,3.530×10^4和 7.060×10^4个;加用 Lovastatin后,Kd值分别为 0.6,0.4,0.7 (nm),每个细胞表面 CD71分子数量平均为 4.153×10^4,2.817×10^4和 5.045×10^4个。本研究同时还观察了以上三组细胞 (未加 Lovastatin)^{125}I-Tf与 CD71分子结合后内在化效率 (图 3),结果显示:1∶1 SUV的作用使 CD71分子与其配体复合物快速内在化,两者结合后于 37℃ 5 min即有 38%复合物进入细胞,而 1∶0 SUV处理的细胞该复合物内在化既慢量又低,对照细胞 CD71与配体结合内在化运动较慢,但进入细胞的复合物并不比 1∶1 SUV处理的细胞少,10 min后,平均有 40%进入细胞。

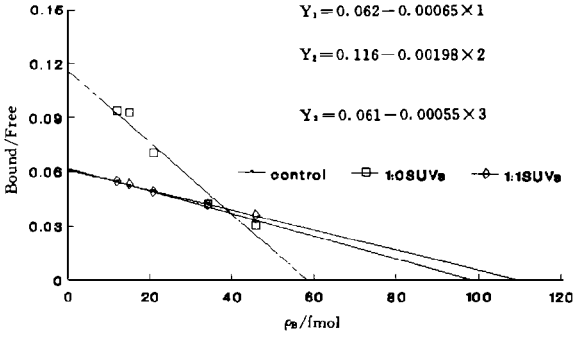


图 1 CD71分子 Scatchard作图分析 (未加 Lovastatin)

Fig 1 Scatchard plot analysis of CD71 (with no Lovastatin)

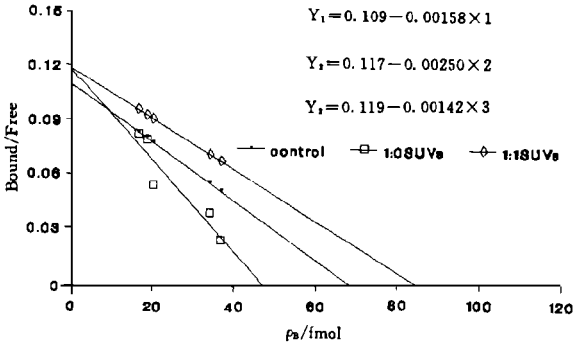


图 2 CD71分子 Scatchard作图分析 (加 Lovastatin)

Fig 2 Scatchard plot analysis of CD71 (with Lovastatin)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

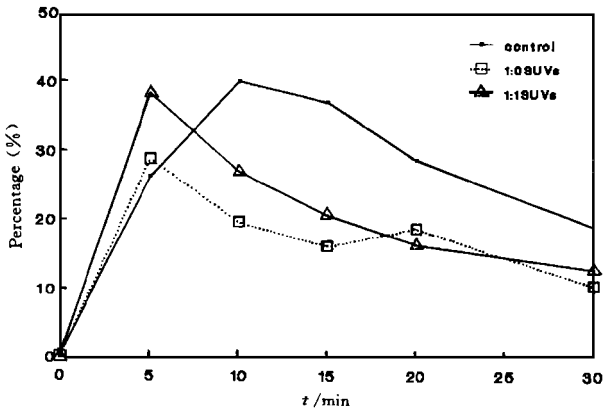


图 3　CD71与配体复合物内在化效率 (n= 6)

Fig 3　Internalization efficiency of CD71-ligand complex (n= 6)

2.3　SUVs处理后淋巴细胞 CD71阳性细胞百分率变化

图 4显示 1∶0.5及 1∶1 SUVs的作用使 CD71阳性细胞明显增加,而 1∶1.5 SUVs却不能有效提高 CD71阳性细胞比例,1∶0 SUV处理后 CD71阳性细胞无明显变化;加用 Lovastatin抑制内源性胆固醇合成后各处理组 CD71阳性细胞均相应减少。

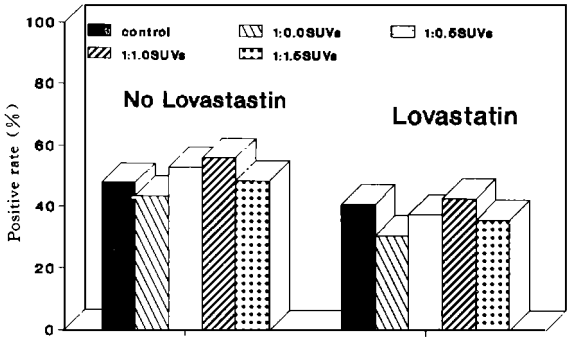


图 4　CD71阳性淋巴细胞百分率 (n= 6)

Fig 4　Changes of percentage of CD71 positive lymphocyte (n= 6)

2.4　CD71 mRNA含量的斑点印迹杂交分析

图 5为 PTfR-2质粒的限制性酶切图谱,图 6显示 PC/Ch摩尔比分别为 1∶0.5, 1∶1和 1∶1.5三种 SUVs处理的淋巴细胞,Con A活化 48 h后,CD71 mRNA含量有所增加,尤以 1∶1.5 SUV作用后变化明显(定量分析 CD71 mRNA为 48.18 pg/1× 10^7细胞,而对照为 19.02 pg/1× 10^7细胞),1∶0 SUV处理的细胞 CD71mRNA含量降低。



图 6　CD71 mRNA斑点印迹杂交分析

1~ 20标准(从左到右),21~ 50为样品(21~ 30无 Lovastatin, 31~ 40加 Lovastatin, 41~ 50加 Lovastatin和 rIL-2)标准和样品均为复点

Fig 6　Analysis of CD71 mRNA by dot blot hybridization

No. 1~ 20 standards (from left to right), No. 21~ 50 samples (21~ 30 with no Lovastatin, 31~ 40 with Lovastatin, 41~ 50 with Lovastatin+ rIL-2), standards and samples are in duplicate

3　讨论

生物膜上存在着不同的脂区,脂区的形成可能与脂质侧向相分离有关,功能各异的蛋白质位于特定脂区,细胞膜中最重要的脂区是与蛋白质临近的"脂壳"(Shell of lipids),疏水性物质对蛋白质功能的干扰可能通过与此区作用而介导。现发现膜脂组成及膜生物物理特性改变,与细胞的许多功能变化有关,它可控制不同的细胞膜特性,调节物质转运,膜结合酶活性,配体与膜受体的结合,跨膜信号传递,细胞分化与细胞识别。另外膜受体和膜上的一些表面标志的表达、结构与功能,以及在膜上的运动均可受膜脂组成的影响[6]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

本研究显示经 PC/Ch不同摩尔比小单片层人工脂双层膜(SUVs)处理的淋巴细胞其脂质组成明显改变,1∶1 SUV作用后淋巴细胞经 ConA活化 48 h CD71阳性细胞及每个细胞表面 CD71分子数量增加,而 1∶0 SUV处理细胞 CD71阳性细胞及每个细胞表面 CD71分子均减少,加用 Lovastatin抑制内源性 Ch合成后,各处理组细胞 CD71表达也降低。用^{125}I标记 CD71配体 Tf,进行放射受体分析显示,膜 PL/Ch摩尔比升高,淋巴细胞表面 CD71分子数量减少,但与配体亲和力却增加,而且这种改变与膜上 Ch比例明显相关。亲和特性的变化提示膜脂微环境改变可能影响了 CD71分子的空间构象。膜中 Ch增加,膜脂流动性降,CD71分子配体结合位点可能不易形成高亲和力的结构。Jan[5]发现膜 Ch增加,PL/Ch降低,EGF-R与其配体亲和力升高,并认为此变化可能是 Ch的直接作用所致,另外也可能是 Ch改变了膜脂质微粘滞性,使 EGF-R在膜上旋转和侧向运动改变的原因。作者证实 EGF-R配体亲和特性的变化与磷脂极性头部,碳氢链长度都无明显关系,并推测 EGF-R周围有特殊的脂质环境,它有利于 EGF-R维持一定空间构象和发挥其功能活性。以上 Ch对 CD71和 EGF-R两种膜蛋白截然相反的作用提示它们可能位于不同的脂区。目前认为 Ch诱导的侧向相分离对脂区产生不同影响,同时 Ch在膜上的分布是不均一的,有的脂区 Ch含量较少,膜脂呈"液相"。另外两种功能各异的膜蛋白其一级结构,空间构象以及其与配体结合位点均不同,所以即使两者处于同一脂质微环境中,Ch也可对它们产生不同影响。

斑点杂交分析显示:CD71 mRNA的变化趋势与细胞增殖变化及受体分析结果基本吻合,提示膜上 Ch比例增加,CD71数量的改变主要与基因转录活性升高有关,而非 CD71分子在膜上的重新分布或 CD71配体可结合部位的暴露明显变化所致。另外还发现膜 PL/Ch摩尔比降低,CD71分子与配体复合物内在化运动加快。有研究证实膜脂质微环境改变可影响淋巴细胞膜表面免疫球蛋白的"成帽",膜中 PL/Ch升高,"成帽"作用受抑,增加 Ch后"成帽"作用恢复,并认为与"成帽"作用有关的蛋白质位于"凝胶相"区,Ch去除使这些区域特性改变,从而抑制"成帽"。点突变分析显示与 CD71分子内在化有关区域定位于 7~26 aa,以 Tyr-X-Arg-Phe序列为重要,另外该序列邻近氨基酸残基跨膜螺旋区与膜脂的作用,均可以影响 CD71折叠及其与配体复合物内在化过程[8]。推测本研究 CD71与配体内在化运动的变化可能主要与膜特性改变有关。

参考文献

1 Abhijit C, Janos M, Noorul AR. Self-association of class I major histocompatibility complex molecules in liposome and cell surface membranes. Biochemistry, 1992; 31(17): 7182

2 Starling AP, East JM, Lee AG. Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the (Ca^{2+}-Mg^{2+} ATPase). Biochemistry, 1993; 32(4): 1593

3 Richard CH, Riley R, Yih SY. Alterations in the transferrin receptor of human erythroleukemic cells after induction of hemoglobin synthesis. J Biol Chem, 1984; 259(15): 9944

4 Yasuhiro T, Masaki Y, Vincent CH. Recycling of transferrin receptors and heparan sulfate proteoglycans in a rat parathyroid cell line. J Biol Chem, 1992; 267(21): 14685

5 Jan C. Cholesterol and phosphoinositides increase affinity of the epidemal growth factor receptor. Biochemica et Biophysica Acta, 1993; 1148(2): 249

6 Francesa MM, Selma D, Peter MM. Influence of lipid lateral distribution on the surface charge response of the phosphatidylcholine headgroup as detected using ^{2}H nuclear magnetic resonance. Biochimica et Biophysica Acta, 1993; 1146(1): 21

7 Printen JA, Woodard SL, Herman JR. Membrane changes in lipopolysaccharide stimulated murine B lymphocytes associated with cell activation. Biochemica et Biophysica Acta, 1993; 1138(1): 91

8 Steen HH, Kirsten S, Deurs B. Internalization efficiency of the transferrin receptor. Exp Cell Res, 1992; 199(1): 19

(收稿:1995-05-16;修回:1996-03-08)

(编辑 刘 鹏)

Effects of membrane lipids on expression and molecular properties of CD71 protein in lymphocytes

Mi Mantian, Zhu Xihua (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract After a series of artificial membranes known as small unilaminar vesicles (SUVs) with different phosphatidylcholine (PC)/cholesterol (Ch) molar ratios were constructed, SUVs were incubated with

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

human lymphocytes from peripheral blood to transfer the ectogenous PC and Ch into the lymphocytes. Then the expression, binding properties to its ligand and internalization of CD71 protein were investigated. The findings were as follows: (1) Ch content was increased while PC/Ch ratio decreased in the artificial membrane after the incubation of SUVs with the lymphocytes. (2) The percentage of CD71 positive cells and number of available sites of CD71 ligand on the membrane were increased and the internalization of receptor-ligand complex was accelerated but the affinity of CD71 with its ligand was decreased on the 48 h after the incubation was stimulated with ConA. (3) After cholesterol synthesis was blocked with HMG-CoA reductase inhibitor, the number of CD71 molecules was significantly decreased while its affinity increased. (4) Dot blot hybridization revealed that the tendency of changes of CD71 mRNA was similar to that aquired from the analysis of expression of CD71 protein. These findings suggest that the change of the number of CD71 melocules in the membrane after the incubation of SUVs with the lymphocytes might be due to the change of activitry of gene transcription.

Key words membrane lipid; lymphocyte; CD71 protein

母女二人同患急性白血病

个案与短篇

Acute leukemia attacking mother and her daughter—— case report

王 劲 张书模 (第三军医大学附属大坪医院血液科) 重庆, 630042

我科于 1993年、1995年先后收治母女二人,均患急性白血病,报告如下:

例 1:女, 13岁,学生,因头昏乏力、反复鼻衄 1月。于 1993年 5月 7日入院,查体: T: 38.3℃,急性病容,重度贫血貌皮肤无紫癜,颌下、腋窝、锁骨上下可扪及肿大淋巴结;胸骨压痛(+),呼吸音粗糙,无 音;心率: 124次/分,律齐,无杂音;肝肋下 4 cm,脾肋下 5 cm,肝脾区叩痛(+);父母非近亲结婚,既往史无特殊。血象: WBC: 132.8×10^9/L;分类:原始淋巴细胞: 0.77,幼稚淋巴细胞: 0.15,成熟淋巴细胞: 0.04,嗜中性分叶粒细胞: 0.03,嗜酸性粒细胞: 0.01; Hb: 55 g/L, Plt: 60×10^9/L;骨髓象:增生明显活跃+,粒系、红系、巨核系重度受抑,原始、幼稚淋巴细胞: 0.915,成熟淋巴细胞: 0.06, POX:阴性。诊断:急性淋巴细胞白血病(L_3型)。治疗:以"COAMP"方案联合化疗,辅以支持治疗。 1疗程后,患者自动出院, 3月后因颅内出血死亡。

例 2:女, 42岁,农民,例 1的母亲。因头昏乏力 2月,于 1995年 11月 13日入院。查体: T: 36.6℃,慢性病容,中度贫血貌,皮肤无紫癜,浅表淋巴结不大,胸骨压痛(-),心肺无异常,肝脾不大,既往史无特殊。血象: WBC: 1.6×10^9/L, Hb: 84g/L, Plt: 37×10^9/L,骨髓象:增生明显活跃,红系: 0.085,粒系: 0.710,原始粒细胞: 0.665,早幼粒细胞: 0.025,胞体大小不均,,胞浆量多,有空泡,可见 Auer小体,核仁大, 1~ 2个,中幼粒以下细胞少,全片见巨核细胞 5个, POX阳性率: 0.54。诊断:急性非淋巴细胞白血病(M_2a型)。治疗:以 DA方案联合化疗, 1疗程后,患者自动出院。

讨论

家族性白血病并不少见,包括母(父)子(女),(孪生)兄弟、姐妹等。白血病流病学调查发现,白血病患者家庭中,其成员患白血病的机率远高于无白血病患者的家庭,单卵双生子中,一人患白血病后另一人再患病的机率高达 25% [1]。从发病时间看,家庭性白血病先后发病时间间隔 2~ 10年不等,有报道孪生姐妹同时[2]或仅相距 1月[3]即发病;部份病例发现均有"肝炎"病史[4],而多数病例则无明显诱因可查;共患病类型可以同是急淋或急非淋,亦可分别患急淋与急非淋、或急淋与慢淋等[1]。李玉珍等[5]曾报道母亲与孪生兄弟均患急性早幼粒细胞白血病,而国外统计表明共患病类型以急性白血病与慢淋多见。本文 2例患者,即往史无特殊,虽务农,但极少接触农药,亦无毒物、放射线物接触史;女儿为急淋 L_3型,母亲为急非淋 M_2a型;发病时间相隔 2年半。白血病发病与多种因素有关,遗传因素在家庭性白血病发生中右重要地位,包括染色体异常、白血病相关抗原的携带等;在人类,由于不可能获得纯的人种,遗传机理的论证困难较大,家庭性白血病的易患机理尚不清楚。

关键词 急性白血病

中图法分类号 R733.7

参考文献

1 邓家栋. 临床血液学. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 662
2 陈加华. 孪生姐妹同患急性淋巴细胞性白血病. 中华血液学杂志, 1994; 15(4): 218
3 王永平. 单卵孪生姐妹同患急性单核细胞白血病 2例. 临床血液学, 1994; 7(4): 187
4 曹国强. 姐妹白血病 2例. 临床血液学, 1994; 7(4): 185
5 李玉珍,李亭山. 母子三人均患急性中幼粒细胞白血病. 中华血液学杂志, 1994; 15(1): 27

(收稿: 1995-12-11;修回: 1996-05-26)

(编辑 刘 鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net