

**Purification and Characterization of Saporins.**

YANG Yuan-De, ZHOU Kang-Jing, PAN Ke-Zhen (*Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, The Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China*); ZHANG Rong-Zhen, CHEN Ru-Ming, RAO Ping-Fan (*Biotechnology Institute, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China*).

**Abstract** Three saporins, SO3a, SO3b and SO6, were separated and purified from the seeds extracts of *Saponaria officinalis*. The molecular weights of

SO3a and SO3b are about 22 500, 19 400, respectively, and their *pI* values are about 8.4 and the amino acid components are analysed. The contents of the secondary structure of SO3a and SO3b are determined by laser Raman spectrum. In the experiment it was also found by reverse phase capillary chromatography that SO6 which was reported by stripe to be a purified protein, contain two components in fact.

**Key words** RIPs, saporin, laser Raman spectrum, secondary structure

## 佛波酯 (TPA) 促进 NIH3T3 细胞 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白的合成\*

贺建宇<sup>1)</sup> 方新初 曹立环 查锡良<sup>2)</sup>

(卫生部糖复合物重点实验室, 上海医科大学生化教研室, 上海 200032)

**摘要** 佛波酯 (TPA) 是潜在促肿瘤剂, 也是蛋白激酶 PKC 激活剂. TPA 能在极低浓度下替代 DG 激活 PKC, 从而导致一系列细胞功能变化. 应用 100 nmol/L TPA 作用于 NIH3T3 细胞, 观察 NIH3T3 细胞的粘附变化, 发现 TPA 可促进 NIH3T3 细胞与基质纤连蛋白的粘附, 进一步研究 Fn 的主要受体  $\alpha_5\beta_1$  整合蛋白在细胞表面含量, 发现 TPA 作用 24 h 使  $\alpha_5$  及  $\beta_1$  含量分别增加 52.3% 和 51.6%. 应用 <sup>3</sup>H-甘露糖标记 N-糖链和凝集素柱层析方法分析 TPA 作用后细胞 N-糖链总量和组分比, 结果均与对照组相仿, 说明是通过增加细胞合成整合蛋白  $\alpha_5$  及  $\beta_1$  亚基含量实现的. 在 TPA 作用于细胞的同时, 加入 PKC 抑制剂 Sphingosine, 发现  $\alpha_5$ 、 $\beta_1$  含量和细胞与 Fn 的粘附均回复至对照组水平, 提示 TPA 增加  $\alpha_5\beta_1$  整合蛋白合成而增加的细胞与 Fn 粘附作用, 是由 PKC 介导完成的. 此外还发现酪氨酸蛋白激酶抑制剂也阻断 TPA 增加  $\alpha_5\beta_1$  整合蛋白含量的作用.

**关键词** 整合蛋白, 细胞粘附, 蛋白激酶 C, 佛波酯  
**学科分类号** Q5

蛋白激酶 (protein kinase)<sup>[1]</sup> 主要有三类, 即蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、和酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, TyPk), 它们参与胞外信号跨膜传递, 通过蛋白质丝/苏氨酸或酪氨酸磷酸化, 在调节细胞代谢、分化、生长、增殖及癌变过程中具有十分重要的作用. PKC 是一种广泛分布的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 催化底物蛋白 Ser/Thr 残基磷酸化. PKC 活化后, 可催化多种底物蛋白质磷酸化, 包括  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换泵磷酸化而使细胞内 pH 升高. 最终导致 DNA 合成增加. PKC 还催化胰岛素受体、表皮生长因子受体 (EGFR), 钙调蛋白等多种重要的生理活性蛋白的 Ser/Thr 残基磷酸化, 影响细胞内生物信息的传递, 发挥重要的生物学功能<sup>[2]</sup>.

佛波酯 (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, TPA) 是已知的潜在促肿瘤剂 (tumor promotor), 实验证实 PKC 是 TPA 的直接作用受体. 结构分析提示 TPA 具有甘油二酯样结构, 因此 TPA 能在极低浓度下替代 DG 激活 PKC, 并能大大地增加 PKC 和  $\text{Ca}^{2+}$  的亲合力, 导致细胞内无法觉察的  $\text{Ca}^{2+}$  流动时, 而 PKC 已完全被激活<sup>[2-6]</sup>.

由于 TPA 能通过激活 PKC 导致细胞内一系列生化反应, 产生细胞众多生理功能, 但 TPA 能否引起细胞粘附变化, 目前尚不明确, 这值得进一步

\* 国家自然科学基金 (39570169) 和上海市教委重点学科资助项目.

<sup>1)</sup> 上海医科大学肝癌研究所.

<sup>2)</sup> 通讯联系人.

Tel: (021) 64041900-2696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

收稿日期: 1998-12-26, 修回日期: 1999-05-24

探索.

本实验采用 TPA 作用于 NIH3T3 细胞, 观察细胞的粘附变化, 探讨 TPA 对整合蛋白表达的影响以及可能的作用途径.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

NIH3T3 细胞引自中国科学院上海细胞生物学研究所. TPA 购自美国 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品. 多聚赖氨酸、ConA、DSA、Sepharose 4B 系 Sigma 公司产品.  $^3\text{H}$ -甘露糖 ( $^3\text{H}$ -Man)、 $^3\text{H}$ -胸腺嘧啶核苷 ( $^3\text{H}$ -TdR) 为上海原子能研究所产品. 小牛血清为上海市第六人民医院产品. 抗  $\alpha_5$ 、 $\beta_1$  mAb 系美国华盛顿大学郑明哲博士惠赠. 人血浆 Fn 系本教研室自制. 其余试剂均为国产分析纯.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养:** 细胞生长于含 10% 已灭活小牛血清、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、pH 7.2 的 RPMI-1640 培养液中, 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  的条件下培养. 细胞贴壁生长至 70% 融合时, 用含不同浓度 TPA 的培养液继续培养 24 h, 然后收获细胞. 用血球计数板计数.

**1.2.2 TPA 处理和  $^3\text{H}$ -TdR 的掺入:** 细胞生长至实验设计时间时, 加 TPA, 2 h 后加  $^3\text{H}$ -Man  $3.7 \times 10^5$  Bq, 再培养 24 h.

**1.2.3 细胞粘附测定:** 方法参照文献 [7].

**1.2.4 细胞表面  $^3\text{H}$ -Man 标记 N-糖链及其提取:**

方法参照文献 [8].

**1.2.5 ConA-Sepharose4B 层析方法及 DSA 层析方法分析糖链结构:** 方法参考文献 [9].

**1.2.6 整合蛋白  $\alpha_5$  和  $\beta_1$  亚基含量测定:** 按细胞培养收集细胞, 将细胞分成  $1 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ /ml 14 管, 每管 1 ml, 于 1 000 r/min 离心 5 min, 再用 10 mmol/L pH 7.4 PBS 淋洗 3 遍. 7 管依次加抗  $\alpha_5$  整合蛋白单抗 0、50、75、100、200、300、400 mg/L 各 20  $\mu\text{l}$ , 另 7 管也依次加抗  $\beta_1$  整合蛋白单抗 0、50、75、100、200、300、400 mg/L 各 20  $\mu\text{l}$ , 于 4℃ 下作用 30 min, 然后 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加兔抗鼠荧光标记 IgG 二抗 40  $\mu\text{l}$ . 作用 30 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加 10 mmol/L pH 7.4 PBS 0.5 ml 混匀, 用流式细胞仪测荧光强度, 以荧光强度表示  $\alpha_5$  及  $\beta_1$  整合蛋白的量. 将细胞分别用 TPA 及 TPA+ Sphingosine 处理 24 h 后, 按此方法测其荧光强度.

## 2 结果与讨论

### 2.1 NIH3T3 细胞粘附与时间和 Fn 浓度关系

NIH3T3 细胞经 EDTA 消化后, 在 Fn 包被板上作粘附时间曲线 (图 1a), 从图 1a 中可知, NIH3T3 细胞与 Fn 粘附随着作用时间增加而增加, 并在 90 min 时, 粘附率达到最大, 说明 NIH3T3 细胞与 Fn 于 90 min 已完全结合. 图 1b 可见, 细胞与 Fn 的粘附效应随着 Fn 的浓度增加而增加, 并在 50 mg/L Fn 时出现高峰 (计数率为  $3.2 \times 10^{-4}$ ), 100 mg/L Fn 浓度时不再上升.

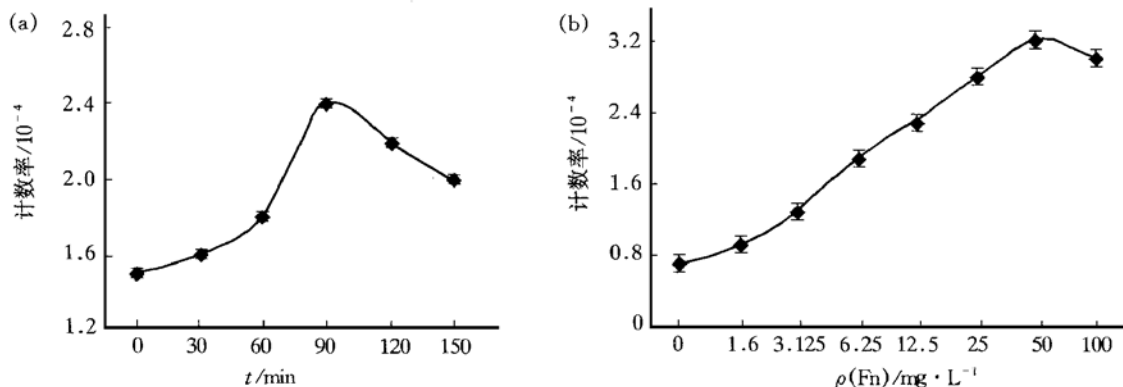


图 1 NIH3T3 细胞粘附的时间曲线和剂量反应

### 2.2 TPA 增加细胞与 Fn 的粘附

100 nmol/L TPA 处理 24 h, NIH3T3 细胞对 Fn 粘附增加了 37% ( $P < 0.05$ ), 而对 Poly-lysine

包被板粘附则不变 ( $P > 0.05$ ). 说明 TPA 促进 NIH3T3 细胞粘附是通过细胞与 Fn 特异性结合实现的 (图 2).

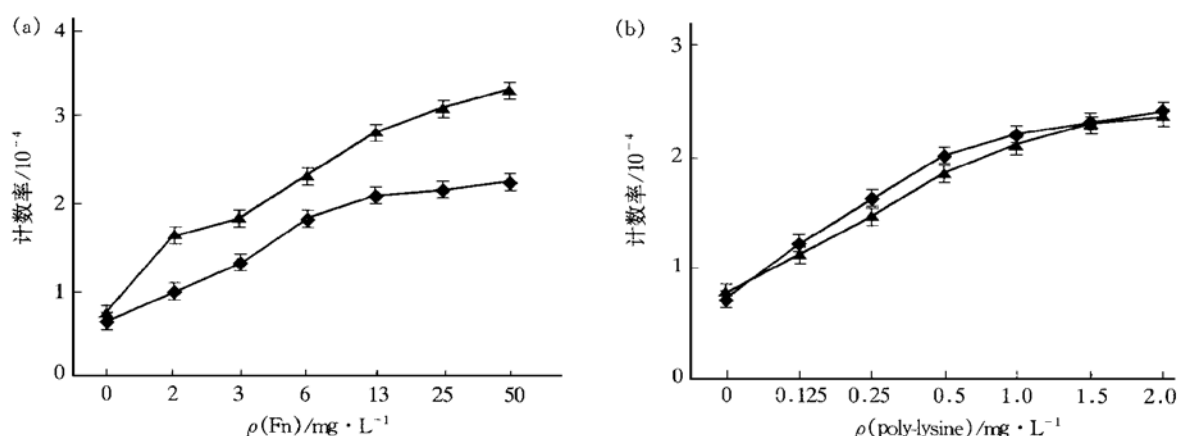


图2 TPA对NIH3T3细胞对Fn和poly-lysine粘附的影响

NIH3T3细胞用100 nmol/L TPA处理24 h再用以实验. ◆—◆: 对照组; ▲—▲: TPA处理组.

### 2.3 TPA与糖蛋白糖链

TPA这种促进细胞粘附的作用是通过改变细胞表面膜糖蛋白的糖链结构, 还是促进可与Fn结合的整合蛋白合成而实现的, 值得进一步研究. 已知细胞表面 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白是Fn特异受体,  $\alpha_5\beta_1$ 的含量或其与Fn的亲合力均可影响细胞与Fn的粘附能力. 我们已发现糖链结构对细胞粘附有一定的影响, 去糖链可影响整合蛋白的亲合力<sup>[10]</sup>. 结果发现TPA处理NIH3T3细胞24 h, <sup>3</sup>H-Man掺入量

无明显变化(表1), 表示N-糖链合成量并未增加. ConA为能区分N-糖链主要类型的常用凝集素. 经ConA亲和层析, 发现TPA处理组的三个层析组分的百分比与对照组也无明显差异( $P > 0.05$ )(表2), DSA是能吸附多天线糖链的凝集素. DSA亲和层析行为, 在TPA处理前后也无变化( $P > 0.05$ )(表3), 结果显示TPA处理与否, 其N-糖链含量及组百分比无改变. 提示TPA促进细胞粘附作用并非通过改变糖链结构而实现的.

表1 TPA对NIH3T3细胞<sup>3</sup>H Man掺入作用

c (TPA) / nmol·L <sup>-1</sup>	0	12.5	25.0	50.0	100.0
计数率/10 <sup>-4</sup> ·μg <sup>-1</sup> <sup>1)</sup>	4.9 ± 0.5	5.8 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5.3 ± 0.5	5.1 ± 0.3
%	100	118.9	113.0	107.5	105.1

注: NIH3T3细胞在含不同浓度TPA培养基中培养24 h. <sup>1)</sup>为三次实验的 $\bar{x} \pm s$ .

表2 ConA对TPA处理的NIH3T3细胞的糖蛋白糖链的亲亲和层析

	对照组 <sup>1)</sup>	%	TPA (100 nmol/L) <sup>1)</sup>	%
不结合	2.5 ± 0.2	79.5	1.8 ± 0.3	78.8
弱结合	0.4 ± 0.06	11.5	0.7 ± 0.03	9.5
强结合	0.3 ± 0.01	9.0	0.3 ± 0.02	11.7

注: NIH3T3细胞在含TPA (100 nmol/L) 培养基中培养24 h. 蛋白酶消化后用ConA-Sepharose4B柱提取糖蛋白.

<sup>1)</sup>为计数率×10<sup>-4</sup>, 是三次实验的 $\bar{x} \pm s$ .

表3 DSA对TPA处理的NIH3T3细胞的糖蛋白糖链的亲亲和层析

c (TPA) / nmol·L <sup>-1</sup>	0	12.5	25.0	50.0	100.0
结合的计数率 <sup>1)</sup>	81.1 ± 0.7	82.8 ± 0.8	79.6 ± 0.5	83.6 ± 0.6	79.9 ± 1.5
%	100	102.1	98.2	103.1	98.6

注: NIH3T3细胞在含不同TPA浓度的培养基中培养24 h. 蛋白酶消化后用DSA-Sepharose4B柱亲和层析. <sup>1)</sup>为计数率×10<sup>-4</sup>, 是三次实验的 $\bar{x} \pm s$ .

2.4 TPA 诱导整合蛋白合成

采用抗  $\alpha_5$  mAb 和抗  $\beta_1$  mAb, 经流式细胞仪定量分析 TPA 处理后的 NIH3T3 细胞表面  $\alpha_5$ 、 $\beta_1$  亚基的含量. 100 nmol/L TPA 作用 NIH3T3 细胞不同时间 (表 4),  $\beta_1$  亚基的合成随时间增加呈上升趋势, 至 24 h 增加至 151.5% ( $P < 0.05$ ), 同样

100 nmol/L TPA 作用 NIH3T3 细胞 24 h, 可使  $\alpha_5$  亚基增加至 152.3% ( $P < 0.01$ ) (表 5), 此结果提示 TPA 作用后增加了整合蛋白  $\alpha_5\beta_1$  的合成. 已知  $\alpha_5\beta_1$  整合蛋白是 Fn 的特异受体, 说明 TPA 通过促进此受体合成而增加 NIH3T3 细胞与 Fn 的粘附作用.

表 4 TPA 对  $\beta_1$  亚基合成的作用

t/h	0	0.5	1.0	2.0	4.0	24.0
荧光强度 <sup>1)</sup>	68.0	74.0	76.0	79.0	83.0	103.1
%	100.0	108.8	111.8	116.2	122.1	151.5

注: NIH3T3 细胞在含 TPA 100 nmol/L 的培养基中作用不同时间. <sup>1)</sup>为三次实验的平均值.

2.5 TPA 增加整合蛋白合成的机制

本文发现 100 nmol/L TPA 增加  $\beta_1$  亚基含量作用, 具有时间依赖性, 当 TPA 作用 4 h 时, 增加 22.1%, 24 h 增加 51.5%, 但 0.5 h 时无作用, 推测 TPA 首先激活 PKC, 然后引起  $\alpha_5\beta_1$  整合蛋白基因表达增加所致. 因此进一步用 PKC 专一性抑制剂 Sphingosine 与 TPA 同时作用于细胞 24 h, 观察  $\alpha_5$  和  $\beta_1$  亚基含量, 结果发现 (表 5)  $\alpha_5$  亚基含量由 TPA 单独作用时的 152.3% 下降至 116.1%,  $\beta_1$

亚基由 TPA 单独作用时的 151.6% 下降至 106.3%, 提示 TPA 引起  $\alpha_5\beta_1$  整合蛋白含量增加是通过 PKC 介导的, 本文还应用酪氨酸蛋白激酶抑制剂——Genistein 与 TPA 同时作用细胞 24 h, 结果显示 Genistein 同样明显抑制了 TPA 的诱导作用 (表 5), 说明酪氨酸蛋白激酶也参与了 TPA 诱导的复杂过程, 其间是否有信号传递通路之间的交叉传递现象存在, 目前尚不得而知, 其详细过程有待深入研究.

表 5 PKC 和/或 TPK 抑制剂对 TPA 诱导的  $\alpha_5\beta_1$  亚单位合成的作用

	对照组 (%)	TPA (%)	TPA+ SPG (%)	TPA+ GEN (%)
$\alpha_5$ 亚基	59.7 (100)	91.2 (152.3)	69.4 (116.1)	63.4 (106.1)
$\beta_1$ 亚基	95.0 (100)	144.0 (151.6)	101.0 (106.3)	98.0 (103.2)

注: NIH3T3 细胞在含 100 nmol/L TPA 的培养基及 100 nmol/L TPA+ Sphingosine (SPG) 及 100 nmol/L TPA+ Genistein (GEN) 中培养 24 h. 然后用 FCS 测量细胞表面的  $\alpha_5$  和  $\beta_1$  亚单位. 以上数据为三次实验的荧光强度值的平均值.

参 考 文 献

- 1 Kikkawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y. The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu Rev Biochem*, 1989, **58**: 31~ 44
- 2 Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 1986, **233** (18): 305~ 312
- 3 Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 1984, **308** (19): 693 ~ 698
- 4 Vuori K, Ruoslahti E. Activation of Protein Kinase C precedes  $\alpha_5\beta_1$  Integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J Biol Chem*, 1993, **268** (29): 21459~ 21462
- 5 Herbert J M. Protein Kinase C, A key factor in the regulation of tumor cell adhesion to the endothelium. *J Biochem Pharmacology*, 1993, **45** (3): 527~ 537

- 6 Richard O, Hynes, Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in cell Adhesion. *Cell*, 1992, **69** (1): 11~ 25
- 7 贺建宇, 曹立环, 查锡良, 等. 视黄酸促进 NIH3T3 细胞与纤连蛋白粘附的机制研究. *生物化学与生物物理学报* (He J Y, Cao L H, Zha X L, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*), 1998, **30** (1): 59~ 62
- 8 查锡良, 艾兆伟, 陈惠黎. 视黄酸对皮肤上皮基底培养细胞表面膜糖蛋白 N-连接型糖链结构的影响. *生物化学杂志* (Zha X L, Ai Z W, Chen H L. *Chin Biochem J*), 1991, **7** (1): 67~ 73
- 9 Regnault V, Rivat C, Stoltz. Affinity purification of human plasma fibronectin on immobilized gelatin. *Chromatography*, 1988, **432** (18): 93~ 102
- 10 贺建宇, 曹立环, 查锡良. N-糖链合成抑制剂对 NIH3T3 细胞粘附作用和整合蛋白表达的影响. *中国生物化学与分子生物学报* (He J Y, Cao L H, Zha X L. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1999, **15** (1): 105~ 108

**TPA Stimulates the Synthesis of  $\alpha_5\beta_1$  Integrin.** HE Jian-Yu, FANG Xin-Chu, CAO Li-Huan, ZHA Xi-Liang (Department of Biochemistry, Shanghai Medical University, Ministry of Public Health Key Laboratory of Glycoconjugates Research, Shanghai 200032, China).

**Abstract** TPA is a potential tumor promotor and an activator of protein kinase C (PKC). TPA can activate PKC as a substituter of DG in a very low concentration, thus causing a serial of changes of cells' function. Observing the change in adhesion of NIH3T3 cell after using 100 nmol/L TPA to act on NIH3T3 cell, it was discovered that TPA increase NIH3T3 cell adhesion to Fn by increasing synthesis of integrin  $\alpha_5$ 、 $\beta_1$  subunits. Further study on the content of integrin  $\alpha_5$ 、 $\beta_1$  subunits—the major receptor of Fn on the cells' surface showed that after the TPA acts on cell for 24 hours, the content of integrin  $\alpha_5$ 、 $\beta_1$  subunits increased 52.3% and 51.6%

respectively. To analyze the total content of N-oligosaccharides and its constituent propertion after TPA acts on cell,  $^3\text{H}$ -mannose incorporation into N-oligosaccharides and lectins chromatography were used. The result has no difference from that of control. It can be said that increasing adhesion is induced increasing the syntheses the content of  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  subunits of the cells. The PKC inhibitor Spingosine was added during TPA acting on cell, it was found that both the  $\alpha_5$  and  $\beta_1$  content and the adhesion of cells to Fn recovered to the control level. It proved that increasing  $\alpha_5\beta_1$  synthesis thus increasing adhesion of cell to Fn by TPA is mediated by PKC. Besides the inhibitor of tyrosine protein kinase also can block the action of TPA increasing the content of  $\alpha_5\beta_1$  integrin syntheses.

**Key words** integrin, cell adhesion, protein kinase C, TPA

## 营养成分与培养时间对极端嗜盐菌紫膜合成的影响\*

迪丽拜尔·托乎提 惠寿年 徐晓晶

(新疆师范大学生物系, 乌鲁木齐 830053)

周培瑾

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

**摘要** 紫膜是极端嗜盐菌细胞的一大特征, 它是一个简单而精巧的光能转换器. 它的生物合成过程与选用培养基的营养成分、培养时间有关, 实验结果表明紫膜生物合成的最适培养基为合成培养基 (SM) 最适合合成时间为 7 d.

**关键词** 营养成分, 培养时间, 紫膜, 生物合成

学科分类号 Q936

视紫红质 (rhodopsin) 是蛋白质和视黄醛 (retinal) 的结合体, 是动物成视过程的物质基础. 1971 年, Oesterhelt 和 Stoekenins 研究发现, 嗜盐杆菌 (halophilic bacteria) 中存在着一种和视紫红质很相似的蛋白质, 这种被称作细菌视紫红质 (bateriorhodopsin, bR) 的光敏感蛋白质存在于嗜盐菌的细胞膜中, 也是蛋白质和视黄醛组成的, 由于这种蛋白质颜色呈紫色, 因此也称紫膜 (purple membrane)<sup>[1]</sup>. 这项研究结果引起了人们的极大兴趣, 此后紫膜的研究取得了许多进展, 其中包括它的结构与功能、基因调控等.

紫膜是一种光驱动的质子泵, 它吸收光子, 把膜内的 H<sup>+</sup> 质子泵到膜外, 从而形成一种跨膜的 H<sup>+</sup> 质子电化学梯度, 这种化学能可以催化产生 ATP, 即将化学能转化成生物能量, 也就是说, 由光驱动形成化学能, 在质子泵的结构中将化学能转化成生物能量<sup>[2]</sup>. 所以有人形象地描述说, bR 在细菌的生命活动中, 扮演着一个光能电池的角色.

与此同时, 对 bR 结构的研究也取得了很大的进展. 早期研究一般认为, bR 是紫膜中唯一的一

\* 国家自然科学基金资助项目 (39760004).

收稿日期: 1998-11-16, 修回日期: 1999-03-18