

ATP 对实验性肿瘤细胞凝集现象的作用

王祖武 周佩琴 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要 通过对实验性肿瘤细胞凝集的定量分析, 除证实 PHA, Con A 和 WGA 等凝集素可诱导细胞发生高度凝集之外, 还发现 ATP(4 mM)能增强 PHA 诱导 S180, ARS 及 HepA 的凝集约 20%。然而它却减弱 Con A 诱导的凝集作用 20% 以上, 但不能对 WGA 的作用有所影响。代谢抑制物 DNP 和 NaN₃ 对肿瘤细胞凝集现象未有影响, 数种抗癌药物也无作用。单层脂囊包裹 PHA, ConA 或 ATP 后, 原有诱导或增强凝集的作用消失。PHA 还能使游离的 S180 细胞核发生凝集(67±19%), 但 ATP 并不能增强此种作用。

关键词 ATP; 凝集素; 细胞凝集现象; 实验性肿瘤; 人工膜(单层脂囊)

肿瘤细胞能被多种凝集素诱导而产生比相应正常细胞强得多的细胞凝集作用, 这是恶性细胞质膜的重要生物学特征之一⁽¹⁾。凝集素受体蛋白的运动和重分布所导致的凝集现象与能量代谢物质 ATP 的细胞内、外水平有密切关系, 但结论不一⁽²⁻⁵⁾。ATP 能促进植物血凝素(PHA)诱导的红细胞凝集现象⁽²⁾。我们经实验证实, 此种加强作用因 ATP 能直接引起红细胞发生凝集并和 PHA 诱导的凝集相加所致⁽³⁾。ATP 能减弱伴刀豆素 A(Con A)所诱导的恶性细胞的凝集现象⁽⁴⁾。但也有报告 ATP 能提高 Con A 诱导大鼠腹水瘤细胞的凝集作用, 而且能量产生系统抑制物具有抑制凝集的作用⁽⁵⁾。因此, 我们研究 ATP 及有关生物活性物质对 PHA, Con A 和麦胚凝集素(WGA)等 3 种凝集素诱导的几种实验性肿瘤细胞凝集的作用, 以期了解 ATP 对凝集素诱导恶性细胞凝集的真正作用。为了说明它们在亚细胞水平的作用部位, 还运用了人工膜和游离细胞核来进行研究。

材料和方法

试验药物 ATP 和 PHA 系中国科学院上海生物化学研究所附属东风生化试剂厂出品。Con A 系英国 BDH Chemicals Ltd. 出

品。WGA 系美国 P-L Biochemicals Inc. 出品。AMP 系英国 L. Light & Co. Ltd. 出品。二硝基酚(DNP)和叠氮钠(NaN₃)系中国上海化学试剂厂出品。抗癌药系本所生物实验样品。大豆磷脂系上海医药工业研究院惠赠之生物实验样品。PHA, Con A 和 WGA 浓度分别为 100, 30 和 30 μg/ml, 其余都是 4 mM。

肿瘤细胞 选用 3 株腹水型小鼠实验性肿瘤细胞——S180, 肝癌(HepA)及网状细胞肉瘤(ARS), 均系本所长期稳定传代以供药理学实验的瘤株, 并经电子显微镜检查其超显微结构, 仍保持恶性特征。抽取接种 6—8 d 后生长旺盛的腹水用 1:9 生理盐水-磷酸缓冲液 pH 7 洗 2 次后作成 1×10⁸/ml 单细胞悬液待用。

凝集试验 采用分光光度法定量测试细胞凝集效价。2.5×10⁷/ml 细胞与凝集素或其它药物(总体积 2 ml)在 37°C 下温育 60—90 min 后使用 751 型分光光度计在 600 nm 测定光密度, 详细方法和细胞凝集(AR)% 的计算公式见文献(3)。

人工膜制备 1 ml(120 mg)纯化的大豆磷脂在充 N₂ 的圆底烧瓶中经真空泵抽干, 加入 0.15 M KCl 5 ml, 溶解后装入塑料小袋在 CSF-1A 水浴式超声发生器(21 kc)中处理 30 min(0—4°C), 待溶液完全透明后即制备成 200 nm 直径的单层脂囊(SLV)。若欲包裹或嵌插凝集素或其它物质, 则将大豆磷脂溶入药液进行超声制备。我们在用超声制备时, 作了一项改革, 即将磷脂密封在聚氯乙烯薄膜中, 直接放在超声发生部位上, 并用不锈钢环固定不使漂移, 而后进行处理, 使受超声波的振荡

强度增强，可直接制备较均匀的 200 nm 的单层脂囊，这对包嵌药物具有很大优点，目前尚未见这种方法的报道。经 $1 \times 10^5 \times g$ 超离心 1 h 后丢弃沉淀部分，用 1% 磷钨酸负染后作电子显微镜观察，检查形态，大小及均匀性是否良好。0—4℃保存待用，24 h 内用毕。

细胞核制备 抽取接种后 6—8 d 的 S180, 0℃ 下用 A 液洗 2 次， $800 \times g$ 离心 1 min 后将沉淀悬入 B 液，5—10 min 后如上法再悬入 C 液并用玻璃匀浆器上、下磨 5 次后再次离心，而后再悬入 A 液待用。并经光学镜及电子显微镜检查，完整和无细胞质污染的细胞核超过 95% 作为合格。A 液 (pH 6.8)：蔗糖 320 mM, MgCl₂ 1 mM, KH₂PO₄ 1 mM；B 液 (pH 6.8)：NaCl 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM；C 液 (pH 6.2—6.4)：蔗糖 320 mM, MgCl₂ 1 mM, KH₂PO₄ 1 mM, Triton X-100 0.5%。进行凝集试验时，细胞核浓度为 $2.5 \times 10^7 / ml$ ，与 PHA 125 μg 在 25℃ 温浴 60 min，而后在 600 nm 测光密度。

实验结果

一、ATP 对 PHA 诱导的肿瘤细胞凝集的作用 PHA 能诱导实验性肿瘤细胞产生较强的凝集作用。由表 1 可见，当 PHA 100 μg/ml 与 $2.5 \times 10^7 / ml$ 的 S180, ARS 或 HepA 在 37℃ 温育 90 min (S180 60 min) 后，可以分别产生 ($\bar{x} \pm SD$) 45±21%, 41±5% 和 75±21% 的细胞凝集率。ATP 4 mM 本身不能诱导瘤细胞出现显著凝集作用 (<10%, P>0.05)，但却可分别使 PHA 诱导上述 3 种瘤细胞的凝集率提高 22%, 15% 和 20%，与单用 PHA 组比 P<0.05。可见 ATP 具有增强 PHA 诱导这几种实验性肿瘤细胞凝集的作用。

二、ATP 对 WGA 和 Con A 诱导的 HepA 凝集的作用 当 $2.5 \times 10^7 / ml$ 的 HepA 与 WGA 或 Con A 30 μg/ml 在 37℃ 温育 10 min 后可以分别获得 74±23% 和 54±20% 的细胞凝集率。当加入 ATP 作用时，WGA 诱导的

表 1. Effects of ATP on lectin-mediated cell agglutination of experimental tumors

Tumors	Agents	No. of tests	AR% ($\bar{x} \pm SD$)	P value ^a
S180	PHA	4	45±24	<0.01
	ATP	4	2±4	>0.05
	PHA, ATP	4	65±19 ^b	<0.01
ARS	PHA	4	41±9	<0.01
	ATP	4	1±2	>0.05
	PHA, ATP	4	56±9	<0.01
HepA	PHA	3	75±5	<0.01
	ATP	3	11±8	>0.05
	PHA, ATP	3	95±3 ^b	<0.001
	WGA	3	74±4	<0.01
	WGA, ATP	3	68±8	<0.01
	Con A	3	59±16	<0.01
	Con A, ATP	3	32±6 ^c	<0.05

a) Compared with controls, b) Compared with PHA, P<0.05; c) Compared with Con A, P<0.05; AR% (Agglutination percentage):

$$\left(1 - \frac{O.D. (test)}{O.D. (control)} \right) \times 100\%$$

凝集率虽略有下降 (-6%)，但与单用 WGA 组间 P>0.05。然而，ATP 可使 Con A 的凝集作用下降 24% (P<0.05)。可见 ATP 对 PHA, WGA 和 Con A 这 3 种凝集素的作用不一样。

三、代谢抑制物和抗癌药物对 PHA 诱导的肿瘤细胞凝集的作用 为说明 ATP 的作用是否与细胞代谢直接有关，研究了电子传递抑制物 NaN₃ 和去偶联剂 DNP 的作用，它们在 4 mM 时无论对 PHA 诱导的 HepA 或 S180 的凝集都无显著作用 (P>0.05)。一些抗癌药物如羟基喜树碱、长春新碱、氧化石蒜碱、氧代赖氨酸和 8-Br-cAMP，浓度 ≥ 4 mM，都不能对凝集素诱导的 HepA 或 S180 凝集发生任何作用。其中，只有羟基喜树碱能直接使细胞发生 66±16% 的凝集作用 (P<0.01)。

四、SLV 包裹的 PHA 和 Con A 对凝集诱

表 2. Effects of SLV-PHA and SLV-Con A on HepA agglutination

Group	No. of tests	AR% ($\bar{x} \pm SD$)	P value ^a
PHA	3	75±5	<0.01
SLV-PHA	3	56±5 ^b	<0.05
SLV-ATP, PHA	3	31±18 ^b	<0.05
Con A	6	68±9	<0.01
SLV-Con A	6	43±9 ^c	<0.01
SLV	9	42±7	<0.01

a, b, c: The same as those in Table 1.

导能力的影响 为了证明凝集素的诱导作用和 ATP 增强凝集的作用是否仅发生于质膜上，而与细胞质无关，特将超声制备的 SLV 包裹和嵌插了 PHA 和 Con A 进行试验。结果发现，SLV-PHA 或 SLV-Con A 的凝集作用显然降低，分别为 55±7% 与 43±7%，比 PHA 组 (75±21%) 或 Con A 组 (68±19%) 减少 20% 以上 ($P < 0.05$)，而与单纯 SLV 的凝集率 (43±5%) 相仿。SLV 本身的这种作用仍因其诱导细胞融合的结果，而非真正的凝集作用。SLV-ATP-PHA 也同样只能达到接近 SLV 的凝集率。可见，无论 PHA、Con A 或 ATP 在嵌入 SLV 而被直接转运入细胞质后，其凝集作用或促进凝集的作用都消失了。

五、ATP 对 PHA 诱导的 S180 细胞核凝集的影响 为了说明在核膜上是否具有凝集素的结合部位，以及 ATP 的增强凝集作用是否仅局限于质膜，而与核膜无关，实验中分离取得 S180 细胞核后进行凝集试验，发现在 25℃ 下 PHA 能诱导 S180 细胞核凝集 67±19%，但 ATP 并不增强 PHA 的凝集作用。

讨 论

关于凝集素能诱导多种肿瘤或转化细胞发生较强的凝集作用这一现象已较肯定，本实验也再次证实 PHA 等 3 种凝集素均可诱导实验性肿瘤细胞产生 50% 左右或更高的凝集率。

本实验结果还说明，ATP 确实能影响某些凝集素的作用，但情况并不相同。它能增强 PHA 的诱导作用，无论对 S180、ARS 或 HepA 的影响趋势大体相仿。但相反，却减弱了 Con A 作用，这与 Vlodavsky 的报告^(4,6) 相一致，与 Kaneko 的结果⁽⁵⁾ 不同。然而对 WGA 不表现出显著作用。由此可以解释目前对 ATP 的作用上的不同看法一部分来自于所研究的凝集素不同。从我们所研究的 3 种凝集素中，唯有 PHA 是受到增强的。而且 ATP 对肿瘤细胞无直接引起凝集的作用，这与对红细胞的实验结果不一样⁽³⁾，更能确实地说明 ATP 协同 PHA 的作用。

DNP 和 NaN₃ 两种重要的代谢阻断剂未能引起 PHA 诱导细胞凝集的显著变化。Kaneko⁽⁵⁾ 的结果不一样，显然因为他用在 Con A 的诱导实验中，而且所影响的程度也并不大，仅分别为 11% 和 17%，并未注明是否具有统计学意义的差别。因此 ATP 的作用是否由于能量代谢的缘故值得怀疑，必需重新考虑它的机理。所研究的 5 种抗癌药物，不管其机理如何，也都对凝集现象没有作用，可见它们的抗癌作用与这一恶性表征无关。

实验结果还表明，当用 SLV 包嵌了凝集素或 ATP 后，其原有对细胞凝集的作用就消失了，可见，在细胞质内无凝集素的结合部位，ATP 也不能发挥其作用。然而 PHA 可以引起 S180 细胞核的凝集，提示在核膜上存在 PHA 的结合部位，但 ATP 并不能发挥其增强作用，可见 ATP 的作用必须通过质膜。

总之，ATP 对凝集素诱导肿瘤细胞凝集的影响不能简单地用能量代谢观点来解释，只有进一步探讨它们对各种凝集素的不同作用及机理，才能充分阐明肿瘤细胞的高度凝集现象与恶性增殖之间的联系，从而根据这一恶性细胞膜的生物学特征为肿瘤的防治提供新的依据。

参 考 文 献

2 Singer JA, Morrison M. *Biochim Biophys Acta*

1975 Nov 3; 406(3):553

3 王祖武、周佩琴、胥 彬. 生物化学与生物物理学报 1981 年 3 月; 13(1):111

4 Vlodavsky I, Sachs L. *Exp Cell Res* 1975 Nov;

96(1):202

5 Kaneko I, Hayatsu H, Satoh H, Ukita T.

Biochim Biophys Acta 1975 Dec 5; 411(2):334

6 Vlodavsky I, Inbar M, Sachs L. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973 Jun; 70(6):1780

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Dec; 2 (4) : 245—248

EFFECT OF ATP ON CELL AGGLUTINATION OF EXPERIMENTAL TUMORS

WANG Zu-wu, CHOU Pei-qin

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT ATP enhanced PHA-mediated cell agglutination of S180, ARS and HepA by 22, 15 and 20%, respectively ($P < 0.05$). ATP inhibited Con A-mediated agglutination of HepA by 24%, but did not induce any significant effect upon WGA-mediated cell agglutination.

The metabolic inhibitors (DNP and NaN_3) as well as several antitumor agents (10-hydroxycamptothecin, VCR, lycobetain, oxalysine and 8-Br-cAMP) showed no significant effects on lectin-mediated agglutination.

Both PHA-mediated cell agglutination and the enhancing effect of ATP disappeared when these two chemicals were en-

trapped by single layer lipid vesicles (SLV) which were prepared by sonication of phosphatidylcholine of soy bean.

PHA induced $67 \pm (\text{SD}) 19\%$ of agglutination of nuclei isolated from S180 by Triton X-100. But ATP exerted no effect on PHA-mediated nuclei agglutination.

It is surmised that, besides the receptor on plasmalemma, there are acceptors of PHA on nuclear envelope, whereas the effect of ATP occurs only on cell surface membrane.

KEY WORDS ATP; lectin; cell agglutination; experimental tumor; artificial membrane (single layer lipid vesicles)