用非去污剂法从鼠肺中分离细胞质膜微囊

姜 艳 潘 最 陈建文 黄 芬
(中国科学院生物物理所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101)

摘要 细胞质膜微囊(Caveolae)是质膜上直径 50~ 100 nm 的烧瓶状的内陷微区, 行使多种生物学功能, 并且与细胞信号转导及疾病有关. 用非去污剂法首次从组织中分离出 Caveolae, 电子显微镜下观察为单独或成串出现的脂双层结构的小囊泡. 电泳结果显示这种方法与 TritonX-100 法相比, 能够更多地保留 Caveolae 上的蛋白成分. 免疫印迹实验验证, 在 Caveolae 上存在特异蛋白 Caveolin 以及重要的参与信号传递的激酶 PKC-α.

关键词 细胞质膜微囊 非去污剂法 信号转导

细胞质膜微囊(Caveolae)是直径为 50~ 100 nm 的烧瓶状质膜内陷微区. 这种结构广泛存在于各种类型的细胞中, 在内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞中尤为丰富[1]. 到目前为止, Caveolae 的确切生理功能尚不十分清楚, 但各方面的实验结果表明, 它参与多种生物学过程: 不依赖包涵素的液饮(potocytosis)、胞吞转运(transcytosis)、胆固醇转运、信号转导以及细菌、病毒的内化等[2, 3]. 虽然早在 40 多年前 Yamada[4] 已发现了这类囊泡, 但直至 90 年代才得到人们的重视. 这是一个崭新的研究领域, 国际上投以极大的兴趣并期待着从中挖掘出丰富的宝藏.

目前, Caveolae 的分离提纯主要根据它在低温下不溶于非离子去污剂 TritonX-100 的性质[1]. 利用这种方法, 人们已发现 Caveolae 的脂成分主要是鞘磷脂、胆固醇和糖基鞘磷脂等, 此外其中还富含 Caveolin、GPI-锚蛋白、G 蛋白的 α 亚基、蛋白激酶 C 的 α 亚型等一系列与信号转导密切相关的蛋白[5]. 但是, 这一方法也存在一些缺点, 如分离提纯过程中去污剂有可能将部分本位于 Caveolae 上易溶于 TritonX-100 的脂成分或蛋白质除去, 或者去污剂会使更多的 GPI 锚蛋白、糖基鞘磷脂或酰化蛋白的疏水酰链在抽提过程中与胆固醇聚集被一起分离下来. 为了克服这些不利因素, Anderson 等人发展了一种新的非去污剂法[5]. 他们利用这种膜结构具有密度低, 在密度梯度离心中可漂浮的特性, 从培养的人成纤维细胞中获得了高纯度的 Caveolae. 本工作首次应用这种非去污剂法从组织中直接分离出 Caveolae, 并对其形态及蛋白成分做初步研究.

1 材料与方法

( ) 材料. 实验用昆明鼠 4 只, 体重 18~ 22 g. Percoll 和 Optiprep 分别购自 Pharmacia 和 GIBCO. Tricine 为 Sigma 产品. 硝酸纤维素纸购自 Whatman. 抗 PKC-α IgG(1∶1 000)单克隆抗体, Rockford(美国)产品; 抗 Caveolin IgG(1∶1 000)单克隆抗体, 王平原博士(美国 Texas 大学西南医学中心)惠赠; HRP-羊抗鼠 IgG(1∶1 000), 北京挚诚生物工程研究所. 其他试剂均为国产分析纯.

( ) Caveolae 的分离提纯. 所有操作均在 4 ℃进行. 取小鼠肺(湿重约 750 mg), 用剪刀剪碎, 置于 5 mL 冰冷的缓冲液 A 中(0.25 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tricine, pH= 7.8). 用组织匀浆器充分匀浆后装入 10 mL 离心管中, 1 500 × g 离心 10 min. 上清液

为不含细胞核的组分, 约 4. 8 mL, 将上清液置于 0 ℃冰浴中超声 60 min. 在 6 个 5 mL 的离心管(下同) 中加入含 30% Percoll 的缓冲液 A 各 3. 7 mL, 再将均为 0. 8 mL 的上清液小心加载其上. 84 000 × g (Beckman SW55 Ti, 下同) 离心 60 min, 细胞质膜在距离心管底部约 3 cm 处形成 1 条明显的白色环带, 合并各管中质膜组分共得 3 mL, 置于 0 ℃冰浴中超声 3 h. 超声后在样品中加入 2. 76 mL 50% OptiPrep(预先以 0. 25 mmol/ L 蔗糖, 6 mmol/ L EDTA, 120 mmol/ L Tricine, pH = 7. 8 的缓冲液 B 稀释) 和 0. 24 mL 缓冲液 A 使 OptiPrep 的终浓度为 23%. 然后将混合液均分, 置于 4 个离心管底部, 上铺 20% 到 10% 的 OptiPrep 连续梯度. 52 000 × g 离心 120 min. 收集每管上部 1. 5 mL 的白色漂浮物组分, 用 50% OptiPrep 和缓冲液 B 将其终浓度调为含 20% OptiPrep, 转至 4 个离心管中, 上面小心铺上 1. 5 mL 的 5% OptiPrep. 52 000 × g 离心 90 min, 收集在 5% OptiPrep 部分中距交界面约 3 mm 处的浊带, 此即富含细胞质膜微囊的组分. 我们获得的 Caveolae 的蛋白总量为 360 μg. TritonX-100 抽提法参照文献[1] .

( ) 电子显微镜观察. 按照透射电子显微镜的常规操作: 样品经不含蔗糖的缓冲液 A 稀释 10 倍后超速离心, 浓缩成小块, 先用 2. 5% 戊二醛加以固定, 再以 OsO_4 进一步固定. 用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色. 样品在 Philip 410 透射电子显微镜下观察.

( ) 电泳及 Western 免疫印迹分析. 样品经不连续 SDS-PAGE(10% 丙烯酰胺) 分离区带, 转移到硝酸纤维素纸上. 对照条带经考马斯亮蓝染色, 其余则在一抗处理后, 加入 HRP-羊抗鼠 IgG 的二抗. 底物邻苯二胺被氧化后显色. 蛋白含量测定采用 Lowry 法. OptiPrep 对测量有影响, 故样品先经不含 OptiPrep 的缓冲液稀释后离心浓缩再测量.

2　结果和讨论

非去污剂法的关键步骤是超声处理细胞质膜, 使之变成小的碎片, 从而达到让 Caveolae 与其他质膜部分脱离的目的. 因此, 这一步的超声必须完全和充分. 由于 Caveolae 的膜脂组分主要是鞘磷脂类和胆固醇, 所以它的相对密度较轻, 在密度梯度离心中它漂浮在上部, 比较容易分离获得. 图 1(a) 是用这种方法分离提纯的细胞质膜微囊超薄电镜照片. Caveolae 形态上

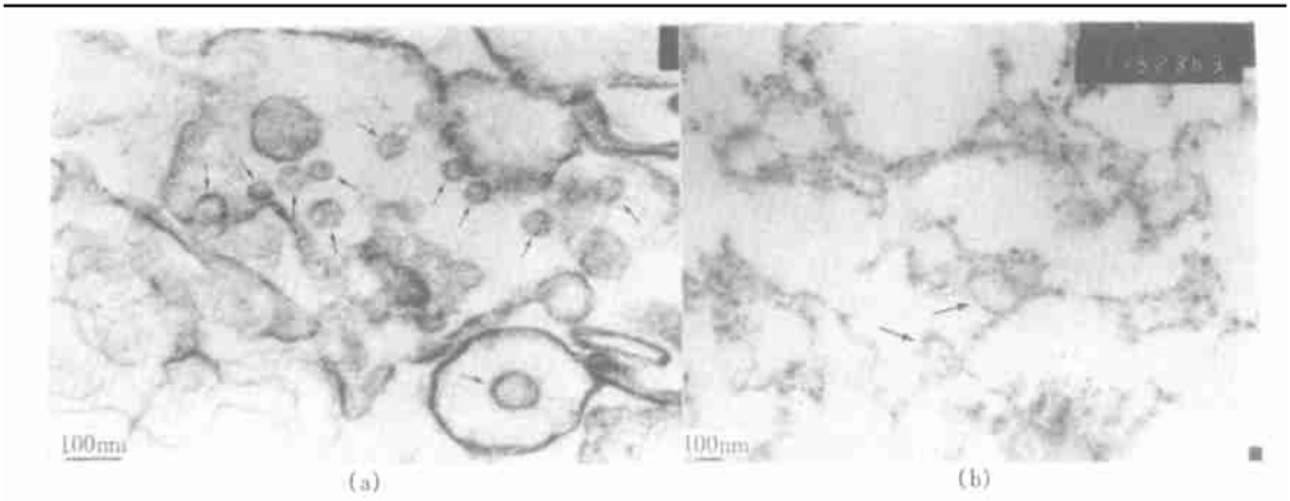

图 1　小鼠肺上皮细胞质膜电子显微镜超薄切片照片

(a) 非去污剂法提取(× 80 000) ; (b) TritonX-100 法提取(× 33 000) . 箭头所示为 Caveolae

呈现 50~ 100 nm 的囊泡状结构. 这些囊泡或单独或成串的出现, 并且可以明显看到有少量仍然挂在残存的质膜上. TritonX-100 抽提法得到的细胞质膜微囊常常可以看到的 U 形或不完整的弧形结构[1](图 1(b)). 而用非去污剂方法提取, 却没有观察到这种现象. 这可以解释为, 超声处理后的质膜碎片由于没有去污剂的影响, 在疏水相互作用下在水溶液中自动重新形成小的完整囊泡. 细胞质膜微囊呈现典型的脂双层结构.

为了分析我们所提纯的细胞质膜微囊的蛋白组成, 进行了 SDS-PAGE 电泳和免疫印迹实验(图 2, 3). 图中每个电泳道均加入 30 μg 蛋白量的样品. Caveolin 是 Caveolae 的标记蛋白, 为一类含磷的膜蛋白, 有 33 个氨基酸残基跨膜, 分子量为 21~ 24 ku. 图 2 给出的 TritonX-100 法(图 2_1) 和非去污剂法(图 2-2) 所提纯的细胞质膜微囊电泳图谱均可见明显的 1 条分子量为 23 ku 的区带. 图 2-2 与 2-1 的蛋白区带不完全一致, 用非去污剂法提纯的 Caveolae 中包含的蛋白成分更加丰富.

蛋白的免疫印迹实验中, 两种方法所提纯 Caveolae 的 23 ku 蛋白都与抗 Caveolin 的单抗有明显阳性反应(图 3(b)), 说明这条带的确是 Caveolin. 质膜组分中也存在 Caveolin 带(图 3(b)-1), 但浓度要远远小于在 Caveolae 中. 细胞质膜微囊中富集 PKC-α. PKC-α 和蛋白磷酸酯酶被认为是控制 Caveolae 内在化的主要调节因子, 可以磷酸化 Caveolae 上的一个 90 ku 的底物蛋白[6]. 图 3(a) 的抗 PKC-α 单克隆抗体的免疫印迹实验证实: 两种方法得到的细胞质膜微囊中都存在 PKC-α, 并且与质膜相比, 浓度更大.

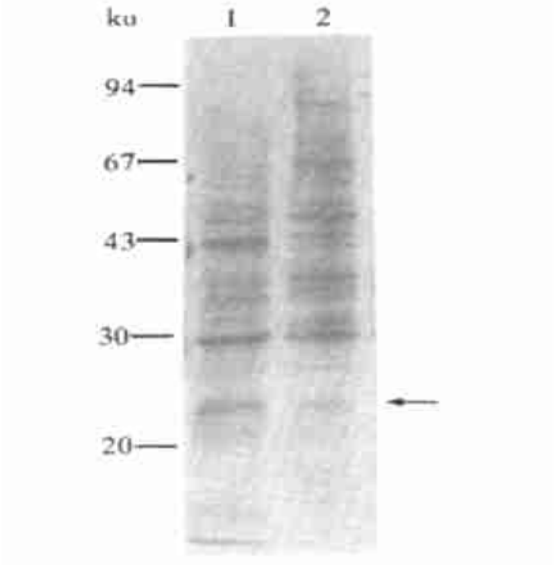

图 2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 Caveolae 的蛋白组成

1——Triton X-100 法提取, 2——非去污剂法提取. 箭头所示条带即为 Caveolin, 分子量为 23 ku

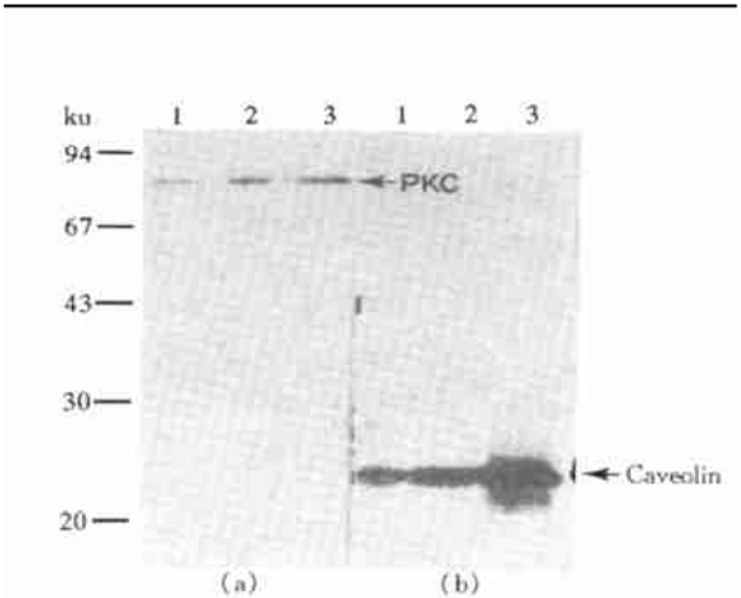

图 3 蛋白免疫印迹实验

(a) 抗 PKC-α 的免疫印迹; (b) 抗 Caveolin 的免疫印迹. 1——质膜, 2——非去污剂法提取的 Caveolae, 3——Triton X-100 法提取的 Caveolae

越来越多的研究表明, 细胞的质膜上存在一特殊的微区, 它们富含糖基鞘磷脂、胆固醇和鞘磷脂, 在低温下(4 ℃) 不溶于 Triton X-100. 虽然去污剂不溶的糖鞘磷脂区(DIG) 与 Caveolae 并非完全等同[7], 但可以肯定的是, 这些微区中富含各种与信号转导有关的蛋白质和脂第二信使, 预示它们将与细胞外信号的跨膜传递过程密切相关. Lisanti 等人[8] 提出的“Caveolae

信号假说”认为, Caveolae 为某些信号分子提供了隔离的空间, 以便于信号转导独立而有序地进行. 采用 Triton X-100 法和非去污剂法提取, 都发现 Caveolin 与某些脂调节的信号分子(如 G 蛋白, V-Src 家族酪氨酸激酶, Ha-Ras 等) 被共同提纯出来, 而且 Caveolin 作为 V-Src 的主要底物, 参与酪氨酸磷酸化的过程[9]. Couet 等人[9] 认为 Caveolin 可能是 Caveolae 内的一种“脚手架”蛋白(scaffolding protein), Caveolin 相互之间, 它与某些特殊脂以及其他蛋白之间都能够发生联系, 对维持 Caveolae 的结构以及调控信号传递过程起着关键性的作用. 对细胞质膜微囊的研究已成为 90 年代以来生物膜和细胞生物学领域的一个新热点.

弄清 Caveolae 也有利于某些疾病的研究. Schnitzer[10] 发现, 在 Caveolae 上有两种新的“清道夫”受体, 它们与高血脂症和动脉粥样硬化有关. DIG 富含 GPI-锚蛋白, 而它在膜上停留时间越长, 越可能使朊病毒蛋白 PrP^{c} 转变成致病的 PrP^{Sc}. 糖尿病、Duchenne's 肌营养不良症, 甚至癌变等都可能与 Caveolae 相关[2].

提纯 Caveolae 的非去污剂法与 Triton X-100 法相比, 可以更完整地保留在 Caveolae 上的蛋白成分. 迄今为止, 报道过的采用非去污剂法提取 Caveolae 的原料均为多种类型的培养细胞, 鼠肺中由于存在着大量的结缔组织, 必然增加了分离 Caveolae 的难度. 我们应用非去污剂法成功地从小鼠肺组织中直接提纯了细胞质膜微囊, 为今后进一步在原位研究 Caveolae 与信号转导、Caveolae 与疾病的相互关系打下了一个坚实的基础.

致谢 本工作为国家自然科学基金(批准号: 39730130) 资助项目.

参 考 文 献

1 Lisanti M P, Scherer P E, Vidugiriene J, et al. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implication for human disease. J Cell Biology, 1994, 126: 111~ 126
2 黄 芬. 细胞质膜微囊与细胞信号转导. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24: 194~ 198
3 Hooper N M. Membrane biology: do glycolipid microdomains really exist? Current Biology, 1998, 8: R114~ R116
4 Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. J Biophys Biochem Cyto, 1955, 1(2): 445~ 458
5 Smart E J, Ying Y S, Minco C, et al. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 10 104~ 10 108
6 Smart E J, Ying Y S, Anderson K G W, et al. Hormonal regulation of caveolae internalization. J Cell Biology, 1995, 131(4): 929~ 938
7 Harder T, Simons K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. Current Opinion in Cell Biology, 1997, 9: 534~ 542
8 Lisanti M P, Tang Z T, Scherer P, et al. Caveolae purification and plycosyl_phosphatidylinositol_linked protein sorting in polarized epithelia. Methods Enzymol, 1995, 250: 655~ 668
9 Couet J, Li S W, Okamoto T, et al. Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. J Biol Chem, 1997, 272(10): 6 525~ 6 533
10 Schnitzer J. Update on the cellular and molecular basis of capillary exchange. Trends Cardiovasc Med, 1993, 3: 124~ 130
11 Hoessli D C, Robinson P J. GPI-anchors and cell membranes: a special relationship. Trends in Cell Biology, 1998, 8: 87~ 89

(1998-05-20 收稿, 1998-09-10 收修改稿)