

SMMC-7721肝癌细胞膜上 β_2 糖蛋白 I 受体的表达

高沿航, 高普均, 王丹, 时阳, 李玉琴, 朴云峰, 杨翰仪

高沿航, 高普均, 王丹, 时阳, 李玉琴, 朴云峰, 吉林大学第一医院消化内科 吉林省长春市 130021
杨翰仪, 吉林大学基础医学院生物化学教研室 吉林省长春市 130021

国家自然科学基金资助项目, No. 30572106

通讯作者: 高普均, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学第一医院消化内科. pujun-gao@163.com

电话: 0431-5612162

收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-04-30

Expression of beta-2-glycoprotein I receptor on membranes of hepatoma cell line SMMC-7721

Yan-Hang Gao, Pu-Jun Gao, Dan Wang, Yang Shi, Yu-Qin Li, Yun-Feng Piao, Han-Yi Yang

Yan-Hang Gao, Pu-Jun Gao, Dan Wang, Yang Shi, Yu-Qin Li, Yun-Feng Piao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Han-Yi Yang, Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30572106

Correspondence to: Dr. Pu-Jun Gao, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China. pujun-gao@163.com
Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-04-30

Abstract

AIM: To further study the interaction between beta-2-glycoprotein I (β_2 GP I) and the membrane of hepatoma SMMC-7721 cells, and to explore the mechanism of hepatitis B virus (HBV) infection.

METHODS: Fluorescence microscopy and fluorescence activated cell sorter (FACS) was used to observe the interaction of β_2 GP I with the hepatoma cell line SMMC-7721, gastric carcinoma cell line SGC-7901 and lymphoma cell line HL-60.

RESULTS: Fluorescence microscopy revealed specific binding of FITC- β_2 GP I to SMMC-7721 cells, but neither to HL-60 nor SGC-7901 cells. FACS analysis demonstrated that the binding rate of FITC- β_2 GP I (20 μ L) to SMMC-7721 cells

was significantly higher than that in HL-60 or SGC-7901 cells (19% vs 1.7%, 1.9%, both $P < 0.01$). When 50 μ L FITC- β_2 GP I was used, the binding rate of FITC- β_2 GP I to SMMC-7721 cells was 20.8%, which was not significantly higher than 19%. The binding rate to SMMC-7721 cells did not increase with the increasing amounts of FITC- β_2 GP I.

CONCLUSION: There exists the specific β_2 GP I binding protein in the membrane of SMMC-7721 cells.

Key Words: Hepatoma; SMMC-7721 cell line; Beta-2-glycoprotein I; Hepatitis B virus; Receptor; Fluorescence activated cell sorter

Gao YH, Gao PJ, Wang D, Shi Y, Li YQ, Piao YF, Yang HY. Expression of beta-2-glycoprotein I receptor on membranes of hepatoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(17):1731-1734

摘要

目的: 研究 β_2 糖蛋白 I (β_2 GP I) 与 SMMC-7721 肝细胞膜的相互作用过程, 探讨乙型肝炎病毒(HBV)嗜肝性的发生机制。

方法: 采用荧光显微镜及流式细胞仪分析的方法, 检测 SMMC-7721、HL-60 及 SGC-7901 三种细胞膜与 FITC- β_2 GP I 相结合的情况以及二者的结合特性。

结果: 仅 SMMC-7721 细胞膜表面附有大量荧光, 其余 2 种细胞无此现象。加 FITC- β_2 GP I 20 μ L 时, SMMC-7721 与 FITC- β_2 GP I 的结合率为 19%, 明显高于 FITC- β_2 GP I 与 HL-60 的结合率 (1.7%) 及与 SGC-7901 的结合率 (1.9%) ($P < 0.01$)。加 FITC- β_2 GP I 50 μ L 时, SMMC-7721 与 FITC- β_2 GP I 的结合率为 20.8%, 与 20 μ L 的结合率无差异 ($P > 0.05$), 说明 SMMC-7721 与 FITC- β_2 GP I 的结合率不随 FITC- β_2 GP I 量的增加而增高。

结论: 在 SMMC-7721 肝细胞膜表面存在能与 β_2 GP I 特异结合的蛋白。

■背景资料

β_2 -糖蛋白 I 是血浆中较为丰富的糖蛋白, 他主要由肝细胞合成, 因其具有亲脂特性, 参与脂肪的转运及代谢, 故又称为载脂蛋白 H (ApoH)。HBV 有选择性地感染肝细胞的机制一直是研究的热点问题, 提出了一些学说, 如 HBV 与肝细胞受体直接结合, 聚入血清白蛋白桥联双受体嗜肝作用等, 但都无法很令人满意地解释乙肝病嗜肝性问题。Mehdi *et al* 提出了 β_2 GP I 与 rHBsAg 具有结合特性, 这成为了我们科研的切入点。由于 ApoH 与脂质有联系, 特别是乳糜微粒 (CM) 和高密度脂蛋白 (HDL), HBV 很有可能连接到这些脂质颗粒表面的 ApoH 上。在血流中, CM 部分被脂蛋白脂酶所降解, 导致 CM 残余, 这个残余部分被肝脏摄取, HDL 在胆固醇的运输过程中也被肝脏摄取, 提示感染的 HBV 可能与 CM 或 HDL 颗粒结合, “免费搭车”带进肝细胞。

■ 研究前沿

HBV吸附、入侵肝细胞,是病毒感染肝细胞并引起病变的第一步,也是HBV嗜肝性的原因之一。一直以来,HBV吸附肝细胞的机制都是研究的热点。目前,提出的主要观点有:HBV与肝细胞受体直接结合,HBV对肝细胞受体的相应配体存在于pres1(21-47)多肽部分。但不仅肝细胞膜,外周血和造血系的B细胞膜也含有pres1(21-47)肽段的特异性受体,pres1(21-47)这种广泛的结合很难解释HBV的嗜肝性;HBV能与戊乙醛聚合人血清白蛋白(PHSA)结合,肝细胞表面有PHSA受体,HBV包膜上也有此受体,推测HBV以PHSA为桥梁吸附至肝细胞表面。但不用戊乙醛处理的人血清白蛋白则不表现为与HBV包膜结合的特性,而血清中并不存在此种大分子。HBsAg与 β_2 GP I可特异结合,此复合物与HBV感染肝细胞的关系是目前的研究热点之一。

关键词: 肝癌; SMMC-7721细胞系; β_2 糖蛋白 I; 乙型肝炎病毒; 受体; 流式细胞术

高沿航, 高普均, 王丹, 时阳, 李玉琴, 朴云峰, 杨翰仪. SMMC-7721肝癌细胞膜上 β_2 糖蛋白 I 受体的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(17):1731-1734

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1731.asp>

0 引言

β_2 -糖蛋白 I (beta-2-glycoprotein I, β_2 GP I)是血浆中较为丰富的糖蛋白,人血浆中的含量为150-200 mg/L,他主要由肝细胞合成^[1-2]。因其具有亲脂特性,参与脂肪的转运及代谢,故又称为载脂蛋白H(apolipoprotein H, ApoH)^[3-4]。他是含326个氨基酸的单链糖蛋白, M_r 55 000。有关 β_2 GP I的研究文献大部分着眼于 β_2 GP I参与凝血^[5-7]、纤溶系统的调节^[8-9]及其与系统性红斑狼疮和抗磷脂抗体综合征等自身免疫性疾病的相关性方面^[10-13],虽成果丰硕,但对于其受体的研究鲜有报道。我们通过酶联免疫吸附试验及Western blot方法验证了 β_2 GP I与rHBsAg具有结合特性,认为 β_2 GP I可能介导HBV感染肝细胞^[14]。为了进一步明确乙肝病毒- β_2 GP I复合物与肝细胞建立联系的途径,或者说,在肝细胞膜上是否存在有 β_2 GP I的受体,我们利用Western blot技术对来自多种细胞(肝癌细胞株SMMC-7721、白血病细胞株HL-60及胃癌细胞株SGC-7901)的蛋白提取成分进行了筛选,在肝癌细胞株SMMC-7721的40 kDa处,出现一特异的显色带,这可能是特异的 β_2 GP I结合蛋白。在本研究中,我们拟探讨这种蛋白是否定位于肝细胞膜上以及明确他与 β_2 GP I的结合情况。

1 材料和方法

1.1 材料 BSA和FITC购自美国Sigma公司;人 β_2 GP I由吉林大学基础医学院张桂荣教授惠赠。肝癌细胞株SMMC-7721及白血病细胞株HL-60由吉林大学第一医院血液研究所提供;胃癌细胞株SGC-7901由吉林大学第一医院中心研究室提供。液氮中冻存的细胞在37℃恒温水浴箱中迅速融化,先用无血清IMDM洗涤,700-800 r/min,离心5 min,然后用含100 mL/L胎牛血清的IMDM于37℃,饱和湿度,50 mL/L CO₂孵箱内培养,第2天换液1次,继续培养并观察,培养条件不变,3-4 d后待细胞长满后传代1次,此后每3-4 d传代1次, SMMC-7721及SGC-7901为贴壁细胞, HL-60为悬浮细胞。实验前收获细胞:取

生长良好的SMMC-7721及SGC-7901,弃去旧培养液,用冷PBS轻轻洗1次,再用2.5 g/L胰蛋白酶消化,待大部分细胞从壁上脱落后用胎牛血清终止反应,加入少许PBS,用滴管反复吹打至细胞完全从壁上脱落,离心,弃上清,再用冷PBS洗涤2次,再离心,弃上清,沉淀下来的细胞即为下一步实验所用。取生长好的HL-60,用冷PBS洗涤2次,离心弃上清,沉淀下来的细胞用作实验。FITC 1 mg溶于1 mL 0.5 mol/L NaHCO₃ (pH 9.0), β_2 GP I 50 μ g溶于0.9 mL PBS (pH 7.4),加入1 g/L FITC 0.1 mL, 4℃搅拌反应8 h。 β_2 GP I-FITC对PBS透析, 4℃ 24 h,中间换液3次,除游离FITC。标记物加入500 mL/L甘油, -20℃保存(避光)。

1.2 方法

1.2.1 荧光显微镜观察 分别将SMMC-7721、HL-60及SGC-7901细胞各约 1×10^6 离心回收后,用冷0.1 mol/L PBS洗2次,1000 r/min离心回收,每次5 min。细胞悬浮于0.1 mol/L PBS 1 mL中,加入FITC- β_2 GP I 20 μ L, 4℃反应10 min。标记后的细胞离心回收,用冷PBS洗2次,1000 r/min离心5 min。细胞重悬于PBS 0.5 mL中,取适量进行荧光显微镜观察摄影记录。检测时用单色激发块: FITC; 三色激发块: DAPI/FITC/TRITC。FITC波长400-500 nm,油镜检测镜头。检测细胞是否存活时,用40 g/L台盼蓝,1:1(V/V)滴片在显微镜下观察,活的细胞不着色,为亮圆形,而死亡的细胞则为蓝色。

1.2.2 流式细胞仪分析 分别将SMMC-7721、HL-60和SGC-7901各约 3×10^6 细胞离心回收,用冷0.1 mol/L PBS洗2次,1000 r/min离心回收,每次5 min。细胞悬浮于0.1 mol/L PBS 3 mL中,分别将SMMC-7721、HL-60和SGC-7901平均分为3管。第1管分别加入FITC- β_2 GP I 20 μ L,第2管分别加入FITC- β_2 GP I 50 μ L,第3管不加FITC- β_2 GP I,作为对照,4℃反应10 min。反应后离心回收用冷PBS洗2次,1000 r/min离心5 min。细胞重悬于PBS 1 mL中。取少许细胞用40 g/L台盼蓝检测存活率。用Coulter Elite分析,激发波长488 nm,发射波长513 nm,计数5000个细胞。

统计学处理 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 表示有统计学差异性, $P < 0.01$ 表示有显著差异性。

2 结果

2.1 荧光显微镜观察 (1)细胞与FITC- β_2 GP I



图 1 荧光显微镜观察FITC- β_2 GP I 与SMMC-7721细胞的结合 (IF $\times 400$).

作用, 荧光显微镜观察前, 检测细胞是否存活, SMMC-7721细胞, 细胞圆而亮, 不被台盼蓝着色, 表明细胞状态好, 可以进行荧光显微镜观察或流式细胞仪分析. (2)SMMC-7721与FITC- β_2 GP I 作用后, 细胞膜附有大量荧光, 说明SMMC-7721与FITC- β_2 GP I 能特异结合(图1). (3)HL-60和SGC-7901与FITC- β_2 GP I 作用, 载玻片全部视野未见带有荧光的细胞.

2.2 流式细胞仪分析 (1)SMMC-7721加FITC- β_2 GP I 20 μ L的分析图(图2A). 二者的结合率为19%, 明显高于FITC- β_2 GP I 与HL-60的结合率(1.7%)及与SGC-7901的结合率(1.9%)($P < 0.01$). (2)SMMC-7721加FITC- β_2 GP I 50 μ L的分析图(图2B). 在(2)中, SMMC-7721与FITC- β_2 GP I 的结合率为20.8%, 与(1)比较(19%), 二者无差异($P > 0.05$), 说明SMMC-7721与FITC- β_2 GP I 的结合率不随FITC- β_2 GP I 量的增加而增高, 表明二者结合有饱和性.

3 讨论

长久以来, HBV有选择性地感染肝细胞的机制困扰着临床和基础研究人员, 先后提出了几种学说^[15-17], 但都无法很令人满意地解释乙肝病毒嗜肝性问题. 我们在前期工作中也证实了 β_2 GP I 能与重组的乙肝疫苗特异性结合, 认为 β_2 GP I 可能介导HBV感染肝细胞^[14]. β_2 GP I 作为一种血浆蛋白, 他如若介导乙肝病毒感染肝细胞的过程, 中间似乎缺少一个重要的环节, 这一环节将乙肝病毒- β_2 GP I 的复合物与肝细胞联系起来, 他可能是分布于肝细胞的膜蛋白, 是 β_2 GP I 的受体. 我们的研究小组在初期工作的基础上, 对肝细胞膜上究竟是否存在 β_2 GP I 受体, 进而介导了乙肝病毒感染肝细胞进行了研究. 我们采用蛋白印迹技术对来自3种细胞的蛋

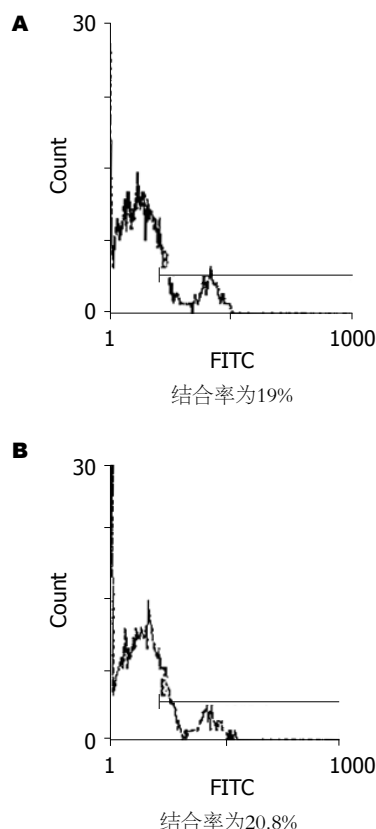


图 2 FACS分析FITC- β_2 GP I 与SMMC-7721细胞的结合情况. A: SMMC-7721加20 μ L FITC- β_2 GP I; B: SMMC-7721加50 μ L FITC- β_2 GP I

白提取成分进行筛选, 在肝癌细胞SMMC-7721的40 kDa处, 出现一特异的显色带, 这可能是一种特异的 β_2 GP I 结合蛋白. 这种蛋白究竟定位于肝细胞中的哪个部位, 他与 β_2 GP I 又具有怎样的结合特性? 在本研究中, 我们进行了进一步的探讨. 为了证明这一特异蛋白的位置, 我们使用FITC标记的人 β_2 GP I 为探针, 同SMMC-7721细胞作用, 实验中使用活的细胞, 避免了死亡细胞质膜外翻对结果的干扰, 同时探针与细胞的反应是在4 $^{\circ}$ C进行, 且作用时间短(5-10 min), 避免了探针的内化, 然后立即取出少量细胞用台盼蓝染色, 证明是存活状态良好的细胞, 并用荧光显微镜观察. 结果表明, FITC- β_2 GP I 与SMMC-7721有特异结合反应, 但与HL-60及SGC-7901细胞无反应, 说明了这一反应的特异性及这种未知蛋白的膜结合特性.

细胞表面受体的生物学特性一般应具有受体与配体结合的特异性. 这种结合力极强, 具有高亲和性, 细胞表面受体的数目有限, 一般 10^3 - 10^5 个/细胞, 故细胞外低浓度的配体与受体结合即可使受体处于饱和状态. 受体与配

■相关报道

Mehdi *et al*的系列研究发现, β_2 GP I 可与HBV表面结构相结合, 这种结合具有饱和性, 可以被过量的rHBsAg、抗HBsAg及抗 β_2 GP I 抗体所阻断, 还原以后的 β_2 GP I 结合活性被破坏, 表明 β_2 GP I 中22个二硫键的一个或一个以上在与HBsAg的结合中是必需的. 这一工作为开展HBV吸附肝细胞的机制的研究提供了新的思路. 同时, 研究发现在血管内皮细胞膜上存在 β_2 GP I 受体, 但对于在肝细胞膜上是否存在其受体尚无报道.

■创新盘点

本文在验证了HBsAg与 β_2 GP I 可特异结合的基础上, 深入探讨二者形成的复合物与肝细胞之间的联系, 从一个新的角度阐释乙肝病毒嗜肝性的机制, 国内外未见相关报道.

应用要点

如能阐明HBV嗜肝性机制,即可据此制定干预性的治疗措施,阻断HBV吸附、入侵肝细胞的过程。同时,关于HBsAg与 β_2 GP I联合感染肝细胞机制的研究也为探讨肝细胞癌发生机制打下基础,进而为提高肝癌的防治水平提供理论依据。

体呈非共价结合,其结合具有可逆性。我们进行了FACS分析,以FITC标记的人的 β_2 GP I为探针,同HL-60,SGC-7901和SMMC-7721细胞作用,通过Coulter Eliter检测,FITC- β_2 GP I与SMMC-7721的结合率明显高于FITC- β_2 GP I与HL-60及SGC-7901的结合率,表明 β_2 GP I与SMMC-7721细胞膜结合的特异性及高亲和性。FITC- β_2 GP I与SMMC-7721的结合率不随FITC- β_2 GP I浓度的增加而升高,推测二者的结合具有饱和性。综合以上结果,我们认为,在SMMC-7721肝细胞膜上存在着特异的结合蛋白,该蛋白很可能是 β_2 GP I的受体,参与了乙肝病毒对肝细胞的感染过程。目前,我们已继续开展对与 β_2 GP I特异结合蛋白的基因克隆,重组克隆载体鉴定和目的基因序列测定,应用GenBank数据库对测序结果进行同源性分析,由此来发现与此 β_2 GP I特异结合蛋白的基因片段具有高度同源性的物质;通过质谱分析确定其成分;再通过竞争抑制实验等最终明确 β_2 GP I与其是否为配体与受体的关系。在未来的工作中,我们将对该蛋白的功能做深入的研究。

参考文献

- Kamboh MI, Ferrell RE, Sepehrnia B. Genetic studies of human apolipoproteins. IV. Structural heterogeneity of apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Am J Hum Genet* 1988; 42: 452-457
- Gries A, Nimpf J, Wurm H, Kostner GM, Kenner T. Characterization of isoelectric subspecies of asialo-beta 2-glycoprotein I. *Biochem J* 1989; 260: 531-534
- Wurm H, Beubler E, Polz E, Holasek A, Kostner G. Studies on the possible function of beta 2-glycoprotein-I: influence in the triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1982; 31: 484-486
- Nakaya Y, Schaefer EJ, Brewer HB Jr. Activation of human post heparin lipoprotein lipase by apolipoprotein H (beta 2-glycoprotein I). *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 1168-1172
- Brighton TA, Hogg PJ, Dai YP, Murray BH, Chong BH, Chesterman CN. Beta 2-glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant. *Br J Haematol* 1996; 93: 185-194
- Sorice M, Ferro D, Misasi R, Pittoni V, Longo A, Circella A, Garofalo T, Gradini R, Violi F, Gruenberg J, Valesini G. Evidence for anticoagulant activity and beta2-GPI accumulation in late endosomes of endothelial cells induced by anti-LBPA antibodies. *Thromb Haemost* 2002; 87: 735-741
- Nojima J, Kuratsune H, Suehisa E, Futsukaichi Y, Yamanishi H, Machii T, Kitani T, Iwatani Y, Kanakura Y. Anti-prothrombin antibodies combined with lupus anti-coagulant activity is an essential risk factor for venous thromboembolism in patients with systemic lupus erythematosus. *Br J Haematol* 2001; 114: 647-654
- Yasuda S, Bohgaki M, Atsumi T, Koike T. Pathogenesis of antiphospholipid antibodies: impairment of fibrinolysis and monocyte activation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Immunobiology* 2005; 210: 775-780
- Yasuda S, Atsumi T, Ieko M, Koike T. Beta2-glycoprotein I, anti-beta2-glycoprotein I, and fibrinolysis. *Thromb Res* 2004; 114: 461-465
- Bertolaccini ML, Atsumi T, Escudero Contreras A, Khamashta MA, Hughes GR. The value of IgA antiphospholipid testing for diagnosis of antiphospholipid (Hughes) syndrome in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28: 2637-2643
- Tsutsumi A, Matsuura E, Ichikawa K, Fujisaku A, Mukai M, Koike T. IgA class anti-beta2-glycoprotein I in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998; 25: 74-78
- Harel M, Aron-Maor A, Sherer Y, Blank M, Shoenfeld Y. The infectious etiology of the antiphospholipid syndrome: links between infection and autoimmunity. *Immunobiology* 2005; 210: 743-747
- Atsumi T, Amengual O, Yasuda S, Matsuura E, Koike T. Research around beta 2-glycoprotein I: a major target for antiphospholipid antibodies. *Autoimmunity* 2005; 38: 377-381
- 高普均, 郭延军, 曲立科, 时彤, 张洪雁, 董春娥, 杨翰仪. β_2 糖蛋白 I 与重组乙型肝炎表面抗原的结合特性. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 31-33
- Neurath AR, Strick N, Sproul P, Ralph HE, Valinsky J. Detection of receptors for hepatitis B virus on cells of extrahepatic origin. *Virology* 1990; 176: 448-457
- Seriolo B, Accardo S, Fasciolo D, Sulli A, Bertolini S, Cutolo M. Lipoprotein (a) and anticardiolipin antibodies as risk factors for vascular disease in rheumatoid arthritis. *Thromb Haemost* 1995; 74: 799-800
- Moestrup SK, Schousboe I, Jacobsen C, Lehestre JR, Christensen EI, Willnow TE. beta2-glycoprotein-I (apolipoprotein H) and beta2-glycoprotein-I-phospholipid complex harbor a recognition site for the endocytic receptor megalin. *J Clin Invest* 1998; 102: 902-909

电编 张敏 编辑 潘伯荣