

顺铂和反铂与红细胞膜糖蛋白的相互作用

李连之^{a*} 张万明^{b**} 李荣昌^b 王 夔^b

(^a聊城师范学院化学系, 聊城 252059, ^b北京医科大学无机化学教研室, 北京 100083)

用凝胶电泳法、荧光分光光度法和圆二色谱研究了顺铂和反铂与人红细胞膜糖蛋白的作用。结果表明, 顺铂在糖蛋白上的结合量明显高于反铂, 顺铂对糖蛋白构象的影响也大于反铂, 这提示顺铂的抗癌作用可能与膜糖蛋白的作用有关。

关键词: 顺铂 反铂 细胞膜 糖蛋白

一直认为抗癌药物顺铂 [$cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$] 作用的主要靶分子是核 DNA, 可是愈来愈多的证据表明细胞中存在着 DNA 以外的一些靶分子。王夔曾指出顺铂的抗癌作用是它与细胞各组分相互作用的总体结果⁽¹⁾, 苏雅娴等报告顺铂对癌细胞膜结构和微丝网络均有影响⁽²⁾, 一系列研究证明顺铂及其类似物对细胞膜蛋白、膜磷脂均有作用⁽³⁾。膜糖蛋白在细胞的分子识别、信息传递等方面起着重要作用, 且肿瘤细胞膜表面比正常细胞膜表面上的糖蛋白含量高。药物的作用可能是作用于膜上作为“天线”的糖蛋白的糖基上引起糖蛋白构象的变化, 从而破坏整个细胞。作为顺铂几何异构体的反铂 [$trans\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$] 却无抗癌活性, 而且这两种异构体跨膜传递的速率相差较大⁽⁴⁾。因此, 为进一步探求顺铂抗癌作用机理, 本实验研究了顺铂 (CDDP) 和反铂 (TDDP) 与人红细胞膜糖蛋白相互作用的差异。

实验及其结果

一、试剂及仪器

CDDP、TDDP 由北京医科大学实验药厂研究室窦培埏教授提供; 血红细胞购自北京红十字血液中心; 其他试剂均为分析纯。低温高速离心机 (J2-21M 型, Beckman); 原子吸收分光光度计 (AA40P, Varian); 荧光分光光度计 (RF540, 岛津); 圆二色谱仪 (J-20C, 日本)。

二、实验方法及其结果

1. 红细胞膜糖蛋白的提取与鉴定

按 Dodge 方法提取人工红细胞膜⁽⁵⁾。将新鲜膜于低温冰浴中匀浆, 加入 $5\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液制成含膜蛋白浓度为 $2\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的悬液, 然后取 1 体积膜蛋白悬液加到 9 体积的膜糖蛋白抽提液中 (氯仿与甲醇按体积比为 2:1 的混合液), 在室温下剧烈搅拌 30 分钟, 并以 2000rpm 离心 10min, 分离得水相, 再离心得澄清水相。将水相于 37℃ 旋转蒸发浓缩, 最后冷冻

收稿日期: 1994-10-05。

国家自然科学基金及国家教委博士点基金资助项目。

* 通讯联系人。

** 现在张家口医学院化学教研室。

第一作者: 李连之, 男, 31 岁, 讲师。研究方向: 生物无机化学。

干燥得膜糖蛋白干粉。用十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS—PAGE)鉴定⁽⁶⁾。分别以考马斯亮兰和过碘酸—Schiff试剂染色对照,证明为糖蛋白。用这种方法提取的是血型糖蛋白(glycophorin)。

2. 红细胞膜糖蛋白中的铂结合量测定

将 CDDP 和 TDDP 分别作用于洗过的人血红细胞。1 体积 $2\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的铂配合物加 1 体积血红细胞,于 37°C 缓慢振荡反应 10h,离心去除未反应的铂配合物,再用等渗液洗涤两次红细胞,立即溶血提取细胞膜,按(1)提取糖蛋白,用 SDS—PAGE 法鉴定,并观察铂对糖蛋白聚合度的影响。将所得到的铂结合膜糖蛋白配成 $0.1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的溶液,采用石墨炉原子吸收法测定铂在膜糖蛋白上的结合量。

实验结果表明, CDDP 和 TDDP 在糖蛋白上的结合量分别为 $9.11\mu\text{g Pt} / \text{mg}$ 糖蛋白和 $3.22\mu\text{g Pt} / \text{mg}$ 糖蛋白,且 SDS—PAGE 法说明它们均未引起糖蛋白聚合度的改变。

3. 凝胶电泳法研究铂在膜糖蛋白上的结合量

取一定量的细胞膜和铂配合物溶液,在恒温 37°C 下进行反应,其介质用 $\text{pH}7.40$ 含 $0.1\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}\text{NaCl}$ 的 $0.05\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 Tris—HCl(Tris: 三羟甲基氨基甲烷)缓冲体系。反应一定时间后,高速离心弃去上清液得膜沉淀,用反应介质洗涤两次。将膜沉淀进行 SDS—PAGE 分离膜蛋白,分别用考马斯亮兰和过碘酸—Schiff 试剂染色显示蛋白质和糖蛋白带。然后将凝胶上的蛋白区带和糖蛋白区带切下烘干,用 H_2O_2 溶解后采用石墨炉原子吸收法测定各带中的铂含量。其结果见表 1(这里测得的是同等量蛋白上的相对铂结合量)。

表 1 膜总蛋白和膜糖蛋白对顺铂和反铂的结合量

Table 1 Amount of Pt Bound to Membrane Total Proteins and Membrane Glycoproteins Treated by CDDP and TDDP

platinum complexes	proteins	
	glycoproteins	total proteins
CDDP	0.083	0.493
TDDP	0.020	0.496

4. 荧光分光光度法研究铂配合物与膜糖蛋白的作用

取一定量铂配合物溶液在 37°C 时作用于膜糖蛋白,10h 后测得其荧光光谱。膜糖蛋白中蛋白质含量为 $10\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,测量条件为激发光波长 $\lambda_{\text{ex}} = 282\text{nm}$,激发光和发射光狭缝均为 10nm ,室温下测定。其测定结果如图 1。

5. 圆二色法研究铂配合物与膜糖蛋白的作用

取一定量铂配合物溶液在 37°C 时作用于膜糖蛋白。10h 后测其圆二色谱。膜糖蛋白中蛋白浓度为 $84\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,测定波长为 $200 \sim 250\text{nm}$,灵敏度 $5\text{m}^\circ \cdot \text{cm}^{-1}$,光径为 5mm 比色杯,于室温(24°C)测定,取计算机两次累加平均结果。测定结果如图 2。

结 果 讨 论

一、顺铂和反铂与糖蛋白结合量的差异

铂(II)为 d^8 电子构型,可极化性强为路易斯软酸,与配体成键的共价性强,所以铂(II)配合

物可和细胞组分中的生物大分子等多种亲核物质作用。可与细胞膜磷脂头部的磷酸基、蛋白质中氨基酸侧链的-SH、-SCH₃、-COO⁻、-NH₂ 以及杂环氮等结合。还可和膜糖蛋白上糖链中的糖羟基结合。从实验结果表 1 可看出, 顺铂和反铂与细胞膜蛋白作用时, 反铂在膜总蛋

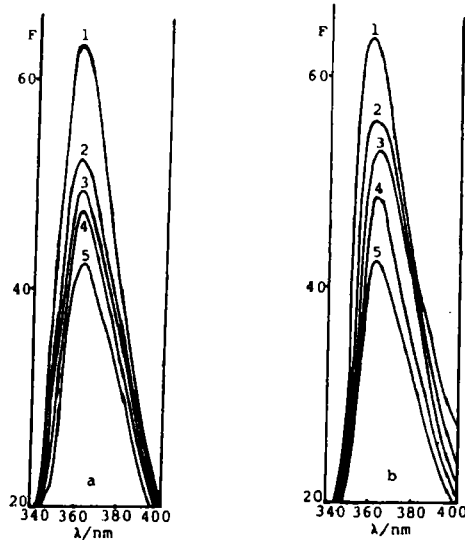


图 1 顺铂(a)和反铂(b)对膜糖蛋白的荧光淬灭谱

Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of RBC membrane glycoproteins by CDDP(a) and TDDP(b)
concentration of CDDP and TDDP ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) 1—0; 2— 1.0×10^{-4} ,
3— 1.5×10^{-4} ; 4— 2.5×10^{-4} ; 5— 4.0×10^{-4}

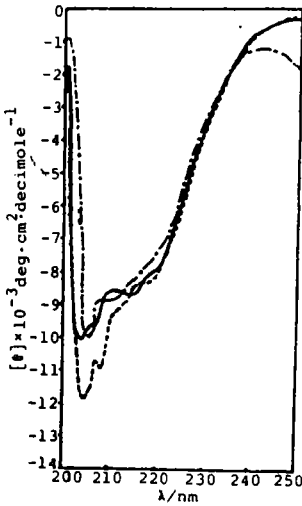
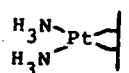


图 2 顺铂和反铂作用前后的圆二色谱

Fig. 2 CD spectra of RBC membrane glycoproteins effected by CDDP and TDDP
concentrations of CDDP and TDDP are $4.0 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
—control CDDP - - - - TDDP

白上的结合量不低于顺铂, 但是顺铂在膜糖蛋白上的结合量却为反铂结合量的 3-4 倍。造成这些差别的主要原因是其顺反异构体的结构差异所致, 由于反式异构体的反位效应, 反铂与膜总蛋白的结合量往往大于顺铂, 这与 Gonias, S. L. 等的研究结果一致^[7]。顺铂和反铂与膜糖蛋

白作用时其结合量的差异可能有以下几个原因:其一,由于立体化学因素的限制,反铂往往不能键合于顺铂的某些反应位置,如顺铂和反铂与白蛋白作用时,其结合量和结合部位是不同的⁽⁷⁾,顺铂对入血浆中 α_2 -巨球蛋白的受体识别的拮抗效应比反铂更为有效⁽⁸⁾,这说明顺铂较反铂

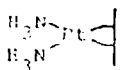
更具有选择性。其二,顺铂是双功能基团,与糖蛋白作用时可形成“糖蛋白”样

的整合结构,这种整合结构的稳定性要比反铂与糖蛋白的单点键合结构的稳定性高。其三、糖蛋白对顺铂和反铂物质的分子识别或选择性可能不同,糖蛋白可能优先选择顺铂并与之结合。

值得注意的是,膜糖蛋白在细胞识别、信息传递及与外来物质作用时起重要作用,且肿瘤细胞膜表面的糖含量比正常细胞高。顺铂对膜糖蛋白的这种特殊亲和性可能与它的抗癌活性密切相关。

二、顺铂和反铂对膜糖蛋白构象的影响

由图 1 中的荧光光谱可以看出,顺铂和反铂均能导致膜糖蛋白的内源性荧光淬灭,并且随着配合物浓度的增加荧光强度逐渐下降,但是峰位没有改变。这说明顺铂和反铂与膜糖蛋白之间存在着明显的相互作用,但是它们不是直接作用于荧光基团如色氨酸、酪氨酸等残基上,而是作用于糖蛋白的糖链上或其他氨基酸残基上引起糖蛋白构象的变化。导致荧光强度的下降。顺铂和反铂比较,两者的荧光淬灭曲线无明显差别,只是顺铂的荧光淬灭强度略大些(图 1 中的第 1, 2, 3 条曲线相比较),按文献[9]的方法处理,求得两者与糖蛋白结合的解离常数分别为 $K_{\text{CDNP}} = 3.58 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $K_{\text{TDDP}} = 7.62 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, 这种差别也与顺铂可以形成“

糖蛋白”的整合结构有关。由图 2 可以看出,顺铂和反铂作用于膜糖蛋白后

使其圆二色谱有所改变(216nm 左右变弱),但顺、反铂两个反应体系的 CD 谱差异较小,只是顺铂使 α -螺旋含量增加(208nm 谷增强)的更大些,这说明顺铂对糖蛋白构象的影响比反铂大些,这也与顺铂可和糖蛋白形成整合结构有关,CD 谱与荧光光谱的研究结果是一致的。

顺铂和反铂对膜糖蛋白构象的影响不如它们与糖蛋白结合量的差别表现得明显,但这并不矛盾。这是由于糖蛋白的结构所致,糖蛋白中糖链在蛋白质的一端向外伸展远离肽链中的荧光基团,故结合在糖链上的铂对荧光基团的影响较小,表现为对荧光强度影响很小。荧光强度的下降主要取决于铂对糖蛋白中肽链上的氨基酸残基的结合,由表 1 中的数据可知顺铂和反铂在膜总蛋白上的结合量相近,可推测两者在糖蛋白肽链上的结合相似。因此,顺铂虽然在糖蛋白上的结合量明显大于反铂,但对荧光强度的影响却相近。据文献⁽¹⁰⁾报道,膜糖蛋白上的糖链对糖蛋白的 CD 谱无显著的影响。因此,结合在糖链上的铂对 CD 谱的影响较小,这就是为什么顺铂和反铂作用于膜糖蛋白后其 CD 谱基本相同的原因。

从以上讨论可以看出,顺铂和反铂与膜糖蛋白的结合量有显著差别,而两者对糖蛋白构象的影响基本相同,只是顺铂的强度大些。据此可以推断顺铂和反铂都可作用于膜糖蛋白肽链上的氨基酸残基,但两者在糖蛋白糖链上的结合是不同的,顺铂对糖链具有更强的特殊亲和作用。这种差异可能是两者生物活性差异的关键所在,鉴于膜糖蛋白在细胞活动中的重要作用,因此值得深入研究。

参 考 文 献

- [1] Wang Kui, *Pure and Appl. Chem.*, **60**(8), 1279(1988).
- [2] Su, Y. X. et al, *J. Mol. Sci.*, **6**, 110(1990).
- [3] 王 斐等, 自然科学进展—国家重点实验室通讯, **6**, 481(1991).
- [4] 张万明等, 高等学校化学学报, **14**(10), 1351(1993).
- [5] Dodge, T. J., *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 119(1963).
- [6] Hamaguchi, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 271(1972).
- [7] Gonias, S. L. et al, *J. Biol. Chem.*, **258**, 5764(1983).
- [8] Pizzo, S. V. et al, *J. Inorg. Biochem.*, **33**, 67(1988).
- [9] 杨曼曼等, 科学通报, **39**(1), 31(1994).
- [10] Rolan, V. D. et al, *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 52(1975).

INTERACTIONS OF CISPLATIN AND TRANSPLATIN WITH MEMBRANE GLYCOPROTEINS OF ERYTHROCYTE

Li Lianzhi

(Department of Chemistry, Liaocheng Teachers College, Liaocheng 252059)

Zhang Wanming Li Rongchang Wang Kui

(Department of Inorganic Chemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083)

The interactions of cisplatin and transplatin with membrane glycoproteins of human erythrocyte were studied by using SDS—PAGE and fluorescence spectrophotometry and circular dichroism spectra. The results show that the amount of cisplatin is more than that of transplatin in glycoproteins, and the influence on the configuration of glycoproteins by cisplatin is bigger than that by transplatin. These results indicate that the anticancer action of cisplatin is relative to membrane glycoproteins possibly.

Keywords: cisplatinum transplatinum cell membrane membrane glycoprotein