

血卟啉衍生物对红细胞膜的光辐射损伤

傅乃武 全兰萍 叶树勇 张 谨

司徒义 赵淑芳 贾德强

(中国医学科学院肿瘤研究所,北京)

Kessel^[1]曾观察到血卟啉衍生物(HPD)对癌细胞膜的转运功能有深刻影响,我们的工作^[2]也证实了这一点,由此推测,细胞膜可能是HPD的初始作用部位。细胞膜的磷脂内含有大量的不饱和脂肪酸,很容易受到自由基的攻击,红细胞由于直接与分子氧接触对脂质过氧化作用很敏感。我们用小鼠红细胞和提纯的红细胞膜,观察两种HPD对它们的光辐射效应,以便探讨HPD杀伤癌细胞的作用机理及其引起的光溶血效应。

一、材料和方法

1. 材料 动物:昆明种小鼠,雄性,18—23克。

BHPD:北京医药工业研究所供给,批号820929,YHPD:扬州制药厂生产(批号840426),氯化乙酰胆碱(Sigma公司产),Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)系Roth公司产品。⁸⁶RbCl中国科学院原子能所生产,放射比强度17.2mci/ml。其他均为北京试剂厂生产。

2. 光溶血效应 小鼠断头取血,红细胞压积加入生理盐水,1:40倍稀释。取被稀释的红细胞液1ml,加入不同浓度的HPD 50 μ l,37 $^{\circ}$ C温育10分钟;光照10分钟;离心,取上清0.5ml,加蒸馏水1.5ml;波长550nm测定。另取稀释的红细胞液1ml加蒸馏水1ml,离心取上清0.5ml加蒸馏水1.5ml,以波长550nm测定值作为100%溶血度。

3. K⁺释放 红细胞用113mM MgCl₂溶液

洗3次,红细胞压积以1:20稀释。取红细胞稀释液1ml,加入HPD,37 $^{\circ}$ C温育10分钟;光照10分钟;离心,取上清0.5ml测定K⁺释放。用岛津CIM-101钠-钾离子测定仪。

4. Rb⁺主动转运 基本按De Luise方法^[3]。

5. 丙二醛(MDA)测定 按Placer等方法^[4]。

6. 乙酰胆碱酯酶测定 按Ellman等方法^[5]。

7. 红细胞膜提纯和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 按Fairbanks等方法^[6]。

8. 蛋白质测定 按Lowry等方法^[7]。

照射光源系黑光灯管(北京灯泡厂),两支20W灯管并排,被照样品距光源1cm,光照强度为0.2m Watt/cm²。放射光谱主峰3650 $\text{\AA}$ 。

二、结 果

1. HPD的光溶血效应

BHPD和YHPD加量是5 μ g/ml,光照10分钟,红细胞溶血度稍有增加,BHPD和YHPD增加到10 μ g/ml时,光照10分钟,溶血度显著增加(表1)。

2. 红细胞K⁺释放

不同浓度BHPD和YHPD,光照20分钟,红细胞内K⁺释放比对照组显著增多。只光照不加HPD或不光照只加HPD的两组K⁺的释放均无显著变化;加5 μ g/ml HPD时,红细胞K⁺释放为2.541meq/L(BHPD组)和2.290

表 1 HPD 的光溶血效应

组 别	HPD($\mu\text{g/ml}$)	溶血度(%)*
对 照	—	3.6
照 光	—	8.0
BHPD	10	5.8
BHPD + 光	10	23.3
BHPD + 光	5	12.2
BHPD + 光	2.5	6.6
BHPD + 光	1.25	7.1
YHPD	10	6.0
YHPD + 光	10	27.6
YHPD + 光	5	10.1
YHPD + 光	2.5	7.0
YHPD + 光	1.25	7.0

* 溶血度是与红细胞 100% 溶血值比较而得。光照时间 10 分钟。

上表数值是三次实验平均值。

表 3 HPD 加不同照光时间对红细胞 K^+ 释放的光辐射效应*

组 别	照光时间(分)	K^+ 释放 (meq/L)**	P 值
对 照	—	$1.446 \pm 0.228(4)$	
光	20	$1.726 \pm 0.467(4)$	>0.05
BHPD	—	$1.538 \pm 0.124(4)$	>0.05
BHPD + 光	5	$1.854 \pm 0.234(4)$	<0.02
BHPD + 光	10	$2.278 \pm 0.243(4)$	<0.01
BHPD + 光	20	$2.988 \pm 0.174(4)$	<0.001
对 照	—	$1.348 \pm 0.149(3)$	
光	20	$1.360 \pm 0.126(3)$	>0.05
YHPD	—	$1.492 \pm 0.185(3)$	>0.05
YHPD	5	$1.520 \pm 0.225(3)$	>0.05
YHPD	10	$2.035 \pm 0.066(3)$	<0.05
YHPD	20	$2.900 \pm 0.244(3)$	<0.02

* HPD 浓度: $10\mu\text{g/ml}$ 。

** 与 P 值同表 2。

meq/L (YHPD 组);随着剂量增加($10-20\mu\text{g/ml}$), K^+ 的释放也随之增加(表 2)。这说明 K^+ 的释放与所加 HPD 的剂量有关。此外,固定 HPD 的浓度在 $10\mu\text{g/ml}$,光照 5、10、20 分钟,红细胞 K^+ 释放量随照光时间增加而增多,这说明 K^+ 释放多少也与照光时间有关(表 3)。

表 2 不同浓度 HPD 加照光对红细胞 K^+ 释放的光辐射效应*

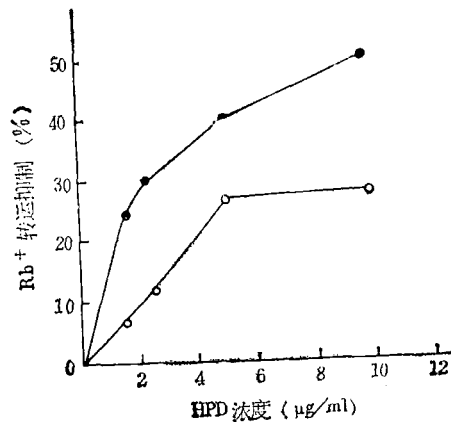
组 别	剂 量 ($\mu\text{g/ml}$)	K^+ 释放** (meq/l)	P 值***
对 照	—	$1.688 \pm 0.123(4)$	
光	—	$1.800 \pm 0.113(4)$	>0.05
BHPD	20	$1.586 \pm 0.238(4)$	>0.05
BHPD + 光	5	$2.541 \pm 0.294(4)$	<0.01
BHPD + 光	10	$3.075 \pm 0.132(4)$	<0.01
BHPD + 光	20	$3.593 \pm 0.346(4)$	<0.01
对 照	—	$1.608 \pm 0.396(3)$	
光	—	$1.533 \pm 0.195(3)$	>0.05
YHPD	20	$1.525 \pm 0.287(3)$	>0.05
YHPD + 光	5	$2.290 \pm 0.208(3)$	>0.05
YHPD + 光	10	$3.347 \pm 0.869(3)$	<0.05
YHPD + 光	20	$3.588 \pm 0.329(3)$	<0.01

* 光照时间:20 分; ** 均数士标准差, 括号内数字是实验次数, 每次实验平行二管; *** P 值是各实验组与对照组比较。

3. Rb^+ 主动转运

红细胞悬液中加入不同浓度 HPD($1.25\mu\text{g/}$

$\text{ml}-10\mu\text{g/ml}$), 照光 30 分, 随 HPD 浓度增加, 红细胞膜对 ^{86}Rb 转运受到抑制的程度显著增加(图 1), BHPD 的抑制作用大于 YHPD。

图 1 不同浓度 HPD 加照光对红细胞 Rb^+ 转运的抑制

●—● BHPD ○—○ YHPD
照光 30 分, 曲线上各点是二次实验平均值

4. 红细胞膜乙酰胆碱脂酶活性

表 4, BHPD 和 YHPD 剂量为 $1.25\mu\text{g/ml}$ 时, 它们对乙酰胆碱酯酶活力的抑制分别是 37.5% 和 39.3%, 当剂量增加到 $5\mu\text{g/ml}$, 其抑制率分别是 84.6% 和 51.1%。这说明红细胞膜的乙酰胆碱酯酶对 HPD 的光辐射效应是很敏感的。

表4 HPD对红细胞膜乙酰胆碱脂酶的光辐射效应

组别	HPD ($\mu\text{g/ml}$)	ChEs 活力 ($\mu\text{mole/mg 蛋白/分}$)	抑制率 (%)
对照	—	$3.66 \pm 2.59^*$	
光照	—	3.02 ± 2.80	18
BHPD	5	3.18 ± 2.00	13.6
BHPD + 光	5	0.57 ± 6.10	84.6
YHPD	5	3.30 ± 2.19	0
YHPD + 光	5	1.80 ± 1.55	51.1
对照	—	4.38 ± 1.87	
光照	—	3.24 ± 0.80	26.1
BHPD	2.5	4.32 ± 1.26	1.4
BHPD + 光	2.5	2.89 ± 1.00	34.1
BHPD + 光	1.25	2.74 ± 0.91	37.5
YHPD	2.5	4.51 ± 1.58	0
YHPD + 光	2.5	3.06 ± 1.51	30.2
YHPD + 光	1.25	2.66 ± 1.03	39.3

* 均数士标准差,三次试验的均值。
光照: 10 分钟。

5. 红细胞膜脂质的过氧化作用

小鼠红细胞膜分别加入 $5\mu\text{g/ml}$ BHPD 和 $10\mu\text{g/ml}$ YHPD, 光照 20 分钟, 细胞膜的 MDA 含量比对照组显著增多, 只光照或只加 HPD, 对 MDA 含量无明显影响(表 5), 说明在上述试验条件下红细胞膜脂质不饱和脂肪酸发生了明显的过氧化作用。

表5 HPD对红细胞膜脂质的过氧化作用*

组别	HPD 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	MDA (n mole/mg 蛋白)	P 值
对照	—	$130.3 \pm 21.5(3)^{**}$	
光	—	$126.8 \pm 16.9(3)$	>0.5
BHPD	10	$152.0 \pm 37.7(3)$	>0.5
BHPD + 光	10	$498.6 \pm 45.4(3)$	<0.01
BHPD + 光	5	$496.0 \pm 112.4(3)$	>0.5
YHPD	10	$134.2 \pm 11.2(3)$	>0.5
YHPD + 光	10	$456.8 \pm 84.1(3)$	<0.02
YHPD + 光	5	$489.9 \pm 104.5(3)$	<0.02

* 光照时间: 20 分。

** 均数士标准差, 括号内数字是实验次数。P 值是各实验组与对照组比较。

6. 红细胞膜 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

图 2 是红细胞膜 SDS 电泳图谱, 第 1 管未经任何处理, 膜蛋白可区分为 8 个区带。第 2 管光照 10 分钟, 第 3 管加 BHPD $10\mu\text{g/ml}$ 。

2 及 3 管膜蛋白的 SDS 电泳图谱与第一管无明显差别。第 4 管则发生显著改变。区带 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 明显减小或消失, 区带 5 减小且模糊不清。在凝胶顶部有高分子聚合物 (HMP) 出现。我们还观察了 $2.5\mu\text{g/ml}$ 和 $5\mu\text{g/ml}$ 的 BHPD, 以及相同剂量的 YHPD 对红细胞膜的光辐射效应。 $2.5\mu\text{g/ml}$ HPD 加光照 10 分钟, 膜蛋白 SDS 电泳图谱的改变与图 2 的第 4 管相同。

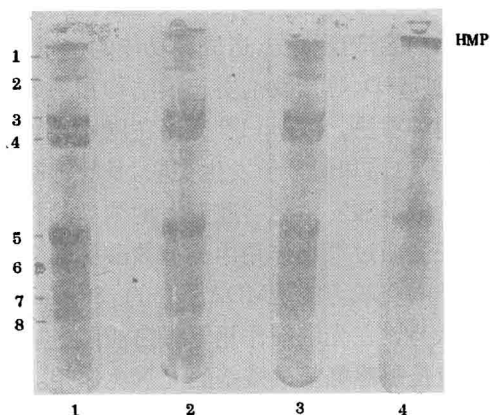


图2 正常红细胞膜经 BHPD 加光辐射后 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

1. 未经处理 2. 光照 10 分钟 3. BHPD $10\mu\text{g/ml}$
4. BHPD $10\mu\text{g/ml}$ + 光照 10 分钟。

三、讨 论

血卟啉衍生物杀伤癌细胞的光辐射作用机理不很清楚, 近年来的研究发现^[1,2,8], 细胞膜是 HPD 光辐射作用的一个敏感部位, 它与杀死癌细胞的作用有密切关系, 本文的材料表明, HPD 对细胞膜的光辐射损伤是多方面的, 两种 HPD 都使红细胞产生明显的光溶血作用, 溶血发生与红细胞膜脂质结构损伤^[9] 以及正离子的通透性改变有关。我们发现红细胞膜脂质过氧化产物 MDA 受到 HPD 光辐射作用后显著增多, 并且红细胞 K^+ 释放明显增加。MDA 可交联蛋白质和磷脂的氨基, 生成 Schiff 氏碱, 使红细胞脆性增加, 变形性减低, 发生溶血。另外, 由于膜通透性改变而使 K^+ 释放增加, 因而导致胶体渗透性溶血^[10]。

Rb^+ 的主动转运对 HPD 光辐射也很敏感。

Rb⁺ 主动转运代表了细胞膜的 Na⁺-K⁺ 泵作用, 对维持细胞的渗透压和能量代谢有重要作用。乙酰胆碱脂酶是细胞膜的标志酶, 对 HPD 光辐射作用也很敏感, 从红细胞膜的 SDS-PAGE 电泳分析看, 经 HPD 光照的样品其蛋白质主要区带消失或模糊不清, 在分离胶前端出现高分子聚合物 (HMP)。有人^[11,12]报道, 红细胞膜蛋白区带 3 包括有乙酰胆碱脂酶和与负离子转运有关的蛋白质, 区带 6 代表 3-磷酸-甘油酸脱氢酶, 区带 1 和 2 都代表收缩蛋白。这些膜蛋白结构的广泛损伤, 造成膜功能的严重障碍。目前对 HPD 等光敏剂引起膜结构和功能的损伤有两种看法, Tappel^[9] 认为在脂质过氧化作用下, 蛋白质和酶分子发生交联, 多肽键断裂以及单个氨基酸发生化学改变。他列举的材料说明, 在脂质过氧化作用中核糖核酸酶 A 分子内和分子间交联可能是 MDA 引起的。Steveninck^[12] 等则认为, 在光敏剂作用下蛋白质照光后的原始效应是敏感氨基酸残基的光氧化作用。这些光氧化的氨基酸残基与蛋白质分子中反应基团相互作用生成共价键。因此, 交联是继发于光氧化作用。我们认为, HPD 对细胞膜的光辐

射作用是多方面的, 其作用机制是错综复杂的。随着研究的不断深入, 我们相信 HPD 的分子药理学机理必将被阐明。

参 考 文 献

- [1] Kessel. D.: *Biochemistry*, 6, 3443, 1977.
- [2] 傅乃武等: 《中华肿瘤杂志》, 6, 232, 1984.
- [3] Luise, M. De, et al.: *The New Engl. J. of Medicine*, 303, 1017, 1980.
- [4] Placer, Z. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 16, 359, 1966.
- [5] Fillman, G. L. et al.: *Biochem. Pharmacology*, 7, 88, 1961.
- [6] Fairbank, G. et al.: *Biochemistry*, 10, 2606, 1971.
- [7] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [8] Kohn, K. et al.: *Biochem. Pharmacol.*, 28, 2465, 1979.
- [9] Tappel, A. L.: *Fed. Proc.*, 32, 1870, 1973.
- [10] Schothorst, A. A. et al.: *Clinica Chimica Acta*, 33, 207, 1971.
- [11] Steck, T. L.: *J. Mol. Biol.*, 66, 295, 1972.
- [12] J. Van Steveninck, et al.: in *Porphyrin Photosensitization* (ed. by D. Kessel and T. J. Dougherty), p. 227, 1983, Plenum Press, New York and London.

[本文于 1985 年 5 月 24 日收到]