

还必须满足两个基本条件: a. 将反应液中的产物 ADP 与底物 ATP 分开; b. 定磷时, 使 ATP 中磷的非酶促酸水解的呈色反应降到最低限度。我们选用 Dowex-1 柱层析分离 ADP 和 ATP, 分离效果很好。在 1ml 柱中 ATP 的洗脱体积稳定在 2.0ml 以内, 所得产物与标准 ATP 有完全相同的 Dowex-1 柱层析洗脱曲线(图 2)和 TLC 图谱。文献报道用 0—5mol/L 甲酸梯度洗脱, 可有效地将 AMP 和 ADP 分开^[6], 本法只需得到分离纯化的 ATP, 因此, 在实际测定酶活力时可直接用 5mol/L 甲酸把除 ATP 以外的其它核苷和核苷酸类物质洗去, 再洗脱 ATP。用酸性磷酸酶水解 ATP 时, 应保证 ATP 中的 P_i 尽可能完全水解释放。酸性磷酸酶的活力及用量对该法的影响很大, 应特别注意不同来源、不同型号的酶的适宜用量。

本实验所用酶用量为每管 300 μ g, 35 $^{\circ}$ C 反应 30 min, ATP 的 P_i 水解可达最大值(见图 5)。此外, 由于 ATP 中的磷酸酯键也可被酸性定磷液水解, 使比色过程中 A 值不断增高。如果反应液中存在未酶解的 ATP, 则其非酶促水解将严重干扰酶活力测定。我们利用柠檬酸淬灭非酶促水解产生的 P_i 的颜色反应^[4], 磷显色后, 颜色至少在 3h 内十分稳定。

参 考 文 献

- 1 Takai Y, Kishimoto A, Kawahara Y *et al. Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1981; 14: 301
- 2 Nishizuka Y. *Nature*, 1984; 308: 693
- 3 Schatzman R C, Raynor R L, Fritz R B *et al. Biochem J*, 1983; 209: 435
- 4 徐友涵, 宋铿华. 生物化学与生物物理进展 1986;(4): 64
- 5 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72(1): 248
- 6 Cooper T G. *J Biol Chem*, 1971; 246(2): 3451

ATP 生物发光分析测量瘤细胞药物敏感性

康 建 董宝印 姜志明 初俊杰

(沈阳军区总医院医学实验科, 沈阳 110015)

提 要

基于细胞 ATP 水平与细胞存活率成正相关, 采用生物发光技术分析瘤细胞经药物作用后胞内 ATP 水平, 可反映药物对细胞的毒性程度, 且具有简单灵敏, 快速定量的特点。

关键词 ATP, 生物发光, 瘤细胞, 药敏试验

细胞药敏试验可反映细胞经不同药物作用后细胞动力学特征, 是基础和临床细胞生物学研究中的重要手段。迄今, 常用的药敏方法主要包括集落法、同位素掺入法和染料摄入法, 但这些方法都存在一定的问题。本研究基于细胞死亡后, 胞内 ATP 经酶促催化迅速降解, 用生物发光法测量细胞内 ATP 水平以监测药物对细胞的毒性效应。用 HL₆₀ 和 SMMC₇₇₂₁ 细胞株对实验条件及影响因素进行了探讨, 现报道如下。

1 材 料 与 方 法

1.1 细胞 细胞株系人早幼粒白血病细胞 (HL₆₀), 人肝癌细胞 (SMMC₇₇₂₁)。所有细胞均于 RPMI1640 培养液 (GIBC, USA) 加 10% FCS 中生长。

1.2 抗癌药及其对瘤细胞量效曲线的测定 选用药物为丝裂霉素 C (MMC, 日本 Ko-

gyo), 阿霉素 (ADM, 意大利 Famitalia), 顺铂 (*cis*-Pt, 锦州制药一厂), 长春新碱 (VCR, 南通勤奋制药厂), 甲氨喋呤 (MTX, 上海第十二制药厂), 卡氮芥 (BCNU, 天津人民制药厂)。上述每种药物分为相距 5 倍稀释的 5 种不同浓度组。经药物作用的细胞在 37℃, 5% CO₂ 48h 培养后作 ATP 含量测定, 分别计算不同浓度下细胞 ATP 水平, 并绘出反应曲线。

1.3 药敏试验方法 实验在 24 孔板上进行, 细胞数目为 $1 \times 10^5/\text{ml}$, 药物浓度见参考文献 [1], 在 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 1h, 随后用无酚红 Hank 平衡液 (HBSS) 洗弃药物, 重悬于 RPMI1640 培养液, 作 48h 培养, 每种药物设双份平行样品。

1.4 ATP 生物发光分析 将培养后细胞用无酚红 HBSS 洗涤两次, 以 pH7.8 Tris-甘氨酸缓冲液补至原体积, 于沸水浴中煮沸 5min, 冷至室温, 取 0.2ml 于发光试管内, 置 SHG-1 型生物化学发光仪 (上海技术监督局实验工厂产品) 内, 以同步进样装置加 3mg/ml 虫萤光素-萤光素酶 (中科院植生所产品) 0.5ml, 记录发光脉冲, 根据 ATP (Sigma 产品) 标准计算样品 ATP 含量。

1.5 活细胞计数测定 经药物培育的细胞用 0.167% (W/V) 台盼蓝染色 4min, 光镜下计数 200 个细胞, 从中计得活细胞拒染率^[2], 并与 ATP 发光分析法作相关分析。

1.6 药物对瘤细胞毒性程度的判别 依细胞经指定时间培养结束后与零时间之 ATP 水平增量 (ΔA) 为量纲。计算细胞经药物作用后 $\Delta A > 0$, 且较无药对照细胞 ATP 减少 30% 以上者为毒性抑制; 将 ATP 减少 80% 以上判为杀伤性抑制。

2 结 果

2.1 ATP 与细胞数的相关分析 将 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液按倍比方式稀释成 10 种不同浓度, 每一浓度设双份平行样本, 用生物发光法测定各浓度 ATP 含量并与细胞数作相关分析, 二者相关系数 $r = 0.983$, 回归方程 $\hat{Y} =$

$7.30 \times 10^{-15} X + 2.57 \times 10^{-11}$ 。最低检测下限为 $1 \times 10^{-11} \text{mol/L}$ 。

2.2 药物对细胞的毒性作用 本实验用不同浓度抗癌药对瘤细胞实施毒性试验, 以观察 ATP 含量变化。HL₆₀ 和 SMMC₇₇₂₁ 两种细胞株经同一药物 *cis*-Pt 不同浓度作用后, 其药效及 ATP 水平明显不同。参见图 1。

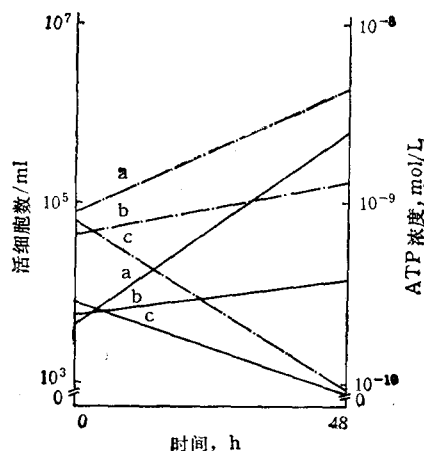


图 1 *cis*-Pt 对细胞的毒性作用

虚线示 HL₆₀ 株; 实线示 SMMC₇₇₂₁ 株。a, b, c 分别示 *cis*-Pt 浓度为 0, 1.0 及 20 μg/ml, 时间座标“0”定义为细胞经药物作用 1h, 洗去药物重悬培养之时间点

药物对细胞的毒性作用依其浓度可呈不同效应, 6 种常见药用本法测得的毒性剂量参见表 1。

表 1 不同药物对 HL₆₀ 细胞的毒性剂量

药物	毒性剂量 (μg/ml)	杀伤剂量 (μg/ml)
BCNU	5.0	20.0
VCR	0.1	0.5
ADM	1.0	20.0
MMC	2.0	12.5
MTX	0.2	1.0
<i>cis</i> -Pt	1.0	20.0

2.3 量效反应曲线的测定 本文以 5 组浓度 5 种抗癌药对 HL₆₀ 株作量效曲线测定, 结果如图 2。

由图 2 可见, 细胞对不同药物的敏感性不尽相同, 除 MTX 外, 各药物抑制率在第 3 个药物浓度与第 4 个药物浓度组之间处于半数抑制浓度 (IC_{50}) 的线性区域内, 对药物浓度的

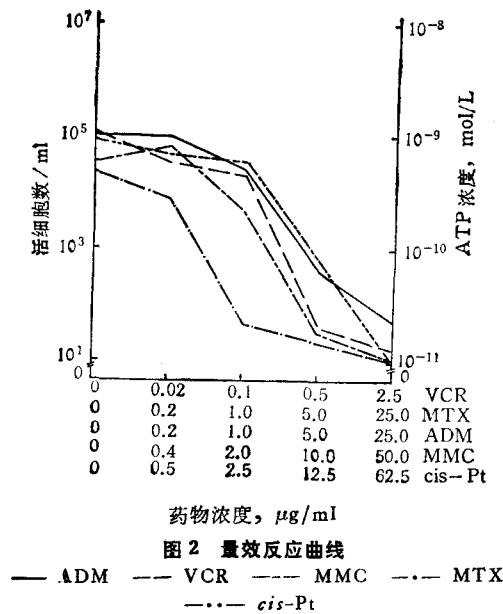
药物浓度, $\mu\text{g/ml}$

图 2 量效反应曲线

— ADM - - - VCR MMC - · - · - MTX
 cis-Pt

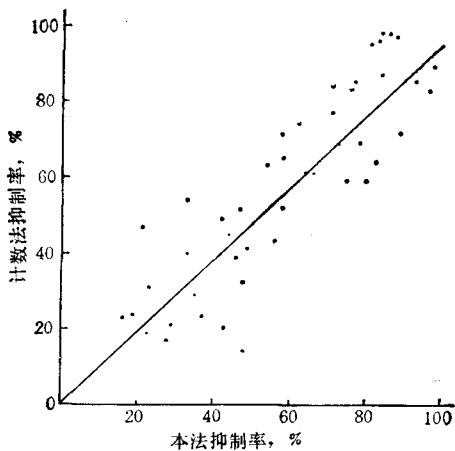


图 3 两种方法相关性比较

$$n = 46 \quad r = 0.865 \quad \hat{Y} = 0.021 + 0.944x$$

变化较为敏感, 因此药敏试验的剂量选择在此范围内能增加试验的敏感性和准确率。

2.4 时效反应与药物培育时间 取上述两种细胞株与 $10\mu\text{g/ml}$ cis-Pt 作用后, 分别作 24, 48 及 72h 培养, 并测定各时间样本 ATP 含量。结果表明 HL₆₀ 株的 ATP 含量在 48h 减少达 89%; SMMC₇₇₂₁ 株 48h 为 70%, 72h 为 79%。用 $2\mu\text{g/ml}$ MMC 与 HL₆₀ 细胞培养 24 h, ATP 减少为 73%, 而 1h 培养的 ATP 减少仅为 14%。表明随着药物培育时间的延长, 药物对细胞的毒性效应逐渐增大。

2.5 本法与活细胞计数法比较 46 份样本经不同药物作用后, 用本法和活细胞计数法作双份平行对照试验, 结果显示本法平均抑制率 $\bar{X} = 0.589$, $S = 0.236$; 活细胞计数法 $\bar{x} = 0.577$, $S = 0.257$, 二者相关良好, 相关系数 $r = 0.865$, 见图 3。

3 讨 论

ATP 是细胞代谢的主要能量来源, 细胞代谢过程中其 ATP 水平处于相对稳定的动态平衡, 当药物作用于细胞的某一增殖周期导致细胞死亡时, ATP 则迅速减少。残存的 ATP 水平与活细胞数呈正相关。因此测定 ATP 水平能显示细胞代谢的活跃程度, 间接地提供细胞增殖活力。

尽管人们已建立了多种细胞药敏试验的体外方法, 但因其成功率低和受试条件限制而较难推广应用, 而且对毒性剂量作用后处于静止状态的活细胞很难检出其活性。本方法与其他方法比较, 其优点在于对细胞增殖无依赖关系, 不受同位素掺入量影响, 培养时间短, 污染少, 成功率较高。Peng 等^[2]用本法与集落法对照比较, 结果显示两法符合率为 77%。本文用生物发光法与活细胞计数法比较, 两法亦有较好相关关系。在鉴别药物对细胞的抑制程度方面, 本法具有定量、客观等特点, 是药敏方法的一点重要改进^[3]。

鉴于药物对细胞的毒性作用与药物浓度有关, 因而区分某一浓度的药效作用十分必要。本实验观察到同一药物随其浓度不同, 其药效亦不相同。在毒性剂量范围内, 细胞 ATP 的 $\Delta A > 0$ 即细胞增殖部分受抑, 与无药对照比较细胞 ATP 仅在一定范围略有增加, 当药用浓度达杀伤剂量时, $\Delta A < 0$, 揭示 ATP 含量较药物培育前大幅度减低, 细胞增殖完全受抑。

量效曲线显示药物浓度在一定范围内与细胞 ATP 含量和细胞数有较好的相关性。在时间-药效反应测量中, 观察到 HL₆₀ 抑制率高于 SMMC₇₇₂₁, 此现象可能与细胞倍增时间有关。药物对细胞的毒性随其药物培育时间的延长而

增加。以毒性剂量的药物与细胞持续培养亦可达杀伤效应。但基于多数药物的药代动力学资料表明,经静脉给药后大致在第一小时内对瘤细胞的作用最大,故药物培育时间多选择 1h^[4]。

一个理想的细胞药敏试验应具有灵敏准确、简便实用的优点。本方法具有集落法的敏感性和准确性,且易推广普及。

参 考 文 献

- 1 Kuzmits R *et al.* *Clin Sci*, 1986; **71**:81
- 2 Peng Z L *et al.* *Cancer Res*, 1987; **28**(Suppl): 427
- 3 Garewal H S *et al.* *Jour Natl Cancer Inst*, 1986; **77**: 1039
- 4 Kimmel D W *et al.* *J Neurosurg*, 1987; **66**: 161

竹红菌甲素-脂质体的制备及其特性*

林启山 曾繁杰 蒋丽金

(中国科学院感光化学所,北京 100101)

提 要

利用反相蒸发技术制备了竹红菌甲素脂质体体系,测定了其光谱和稳定性,结果表明:在该体系中,竹红菌甲素的 I 吸收峰、荧光峰均出现红移且有荧光增强效应。竹红菌甲素-脂质体(浓度 0.05—0.5mg/ml)在 4℃ 下存放 2—3d,光密度下降 5% 左右。

关键词 竹红菌甲素-脂质体,光谱性质,稳定性

脂质体中药物的可控释放和靶向给药是近年发展起来的新领域,经脂质体包封后的药物作为一种生物活性物质在体内运载手段已广泛用于抗癌,抗肿瘤方面研究^[1],竹红菌甲素(Hypocrellin A,简称 HA)是一种新型外用光疗药物,临床上已用于治疗妇女外阴白色病变和肥厚性瘢痕,且疗效显著,最近研究表明:HA 对人癌细胞和动物移植肿瘤有明显的光动态效应^[2],HA 可以富集在癌细胞上,对体外肿瘤或从癌细胞 S-180 接种小鼠产生的实体瘤都有明显的抑制作用^[3],HA 有可能发展成一种临床上使用的花醌类抗癌药物。但是,HA 只溶于有机溶剂且毒性较大,为实现 HA 在临床体内上的应用,增强 HA 的光动力活性和对靶体的定位能力,减小副作用,需要对 HA 进行改性,本文报道用近似于体内环境的脂质体对 HA 的包封及 HA-脂质体的光谱性质和稳

定性的研究结果。

1 材 料 和 方 法

1.1 卵磷脂的纯化 卵磷脂,生化试剂(上海禽蛋二厂)按文献[4],用氧化铝层析进一步纯化。用甲醇:氯仿(1:9)为洗脱剂,收集混浊部分(硅胶 GF 板薄层层析检定只有一个斑点, $R_f = 0.28$)经旋转蒸发干燥,用氯仿溶解并通氮气密封后冷藏。

1.2 HA-脂质体的制备 用反相蒸发法^[5]制备,取 3ml 浓度为 50mg/ml 上述纯的卵磷脂放于 100ml 烧瓶中,加入 4mg HA 混合均匀后置于旋转蒸发器上,用水泵减压和加热(30℃)干燥成膜,待溶剂除尽后,加入 9ml 乙醚,将附于烧瓶上的膜溶解后加入 3ml 磷酸盐

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期:1991-02-06 修回日期:1991-07-16