

研究工作

用荧光探针 DPH 研究腹水癌细胞膜脂流动性

林克椿 聂松青 薄惠卿 乔玉兰*

(北京医学院生物物理教研室)

研究细胞膜流动性是了解膜结构与功能关系的重要环节。可以用差示扫描量热法 (DSC)、X 射线衍射、电子自旋共振 (ESR)、核磁共振 (NMR) 及荧光偏振等方法从不同角度对膜流动性进行研究^[1,2]。其中荧光偏振方法^[3]比较简便, 理论解释比较容易, 所得参数——荧光偏振度能定量说明膜脂分子的运动情况或其微粘度。因而得到比较广泛的应用。

用于研究膜脂流动性的荧光探针有多种^[2,4,8], 其中 DPH (1, 6-Diphenyl-1, 3, 5 hexatriene) 被认为是一种比较敏感的常用探针。通过荧光偏振度的测定, 计算微粘度 η , 便可了解膜脂的流动性。但将 DPH 应用于完整细胞时, 由于探针本身将逐渐进入细胞内, 对测定结果的影响及其适用性都存在着不同的看法^[5]。为此, 我们以艾氏腹水癌细胞为实验对象, 探讨了 DPH 用于完整细胞的实验条件, 研究了某些因素对艾氏腹水癌细胞膜脂流动性的影响。实验结果证明 DPH 是研究完整细胞膜脂流动性的有效探针。

材料与方 法

艾氏腹水癌细胞 从已接种腹水癌细胞一星期后的小鼠腹腔中, 取腹水约 1ml, 用生理盐水约 10ml 洗涤一次, 1000 转/分离心 10 分钟, 再用约 10ml PBS** 溶液洗涤一次。若腹水中有红血球, 应多洗两次, 将红血球除去。然后将腹水癌细胞悬浮在含有 10% 小牛血清的 Eagle 液中, 细胞浓度 1 千万/ml。用胎盘蓝检查, 95% 以上细胞是活细胞。

DPH 的配制^[6-8] DPH (Sigma, USA) 使

用前先配成以四氢呋喃作溶剂、浓度为 $2 \times 10^{-3} M$ 的储备液, 低温保存在棕色瓶中, 一般可使用一个月。实验需要的 DPH 溶液, 于使用前新鲜配制, 用 PBS 稀释上述储备液, 使 DPH 浓度为 $2 \times 10^{-6} M$ 。因四氢呋喃为有机溶剂, 配制 $2 \times 10^{-6} M$ DPH 溶液时, 需猛烈振摇 5'—10'。

DPH 标记细胞及荧光显微镜观察^[5] 取以上准备好的细胞 2ml, 加 $2 \times 10^{-6} M$ DPH 溶液 4ml 于 25℃。分别温育 1'、5'、10'、30'、60'、90'。之后, 立即用 PBS 液洗涤两次, 然后将悬浮液滴在载玻片上, 在 MPV-1 荧光显微镜下观察。光源用 200W 汞灯, 第一滤片 UG5, 激发波长 365nm, 第二滤片 K410, 阻断小于 430nm 的光通过。仔细观察不同温育时间荧光所在位置。

用作荧光偏振度测量的细胞标记方法 取已准备好的细胞 2ml, 离心, 用 PBS 洗涤一次, 离心, 加 2ml $2 \times 10^{-6} M$ DPH, 25℃ 温育 30', 再用 PBS 洗涤一次, 最后悬浮在 4ml PBS 溶液中, 作出 DPH 标记的腹水癌细胞的激发光谱与荧光光谱。记录不同温育时间、不同温度与荧光强度、荧光偏振度的关系。

荧光偏振度的测量 测量仪器为 MPF-4 荧光分光光度计。光源为 150W 氙灯, 激发波长 362nm, 发射波长 432nm, 为了滤去其他散射光, 加 390nm 滤片。按下列公式计算荧光强度 I , 荧光偏振度 P 及各向异性 r

$$F = I_{VV} + 2I_{VH}$$

(I_{VV} 可写成 I_{11} , I_{VH} 可写成 I_1)

* 蒋桂森同志参加部分工作

** 0.01M PBS (磷酸缓冲液), 0.14M NaCl

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

$$\gamma = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}} = \frac{2P}{3 - P}$$

I_{VV} : 起偏器光轴为垂直方向, 检偏器光轴也为垂直方向时所测得的荧光强度。 I_{VH} : 起偏器光轴方向为垂直方向, 检偏器光轴为水平方向时的荧光强度。 G 为校正因子。 $G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$, 其中 I_{HV} 为起偏器光轴是水平方向, 检偏器光轴为垂直方向的荧光强度, I_{HH} 为起偏器光轴是水平方向, 检偏器光轴也为水平方向时的荧光强度。微粘度 η 按 Perrin 公式计算

$$\gamma_0/\gamma = 1 + C(\gamma) \frac{T \cdot \tau}{\eta}$$

式中, γ_0 为 γ 的极限值, T 为绝对温度, τ 为荧光寿命, C 为结构参数, 随 γ 稍有改变, 可根据 DPH 在液体石蜡中旋转去偏振的校正曲线得来。一般校正曲线接近于直线, $C(\gamma) = (8.6 \pm 0.4 \times 10^5) \text{Poise deg}^{-1} \text{s}^{-1}$, 在 25°C 下利用 $\gamma_0 = 0.362$, $\tau = 10 \text{nsec}$ 则

$$\eta = \frac{2P}{0.46 - P}$$

DPH 掺入到细胞膜脂的烃链区以后^[2], 介质粘度变大, 顺反异构化受到抑制, 成为全反构型即唯一能发荧光的构型。由于 DPH 分子长轴接近于和脂肪链分子长轴平行, 所以荧光偏振度能很好地反映膜脂区域的微粘度。 P 值越大, γ 越大, 微粘度越大, 流动性越小; P 值越小, γ 越小, 微粘度越小, 流动性越大。

结果与讨论

1. DPH 与腹水癌细胞结合以后荧光光谱的研究 $2 \times 10^{-6} \text{M}$ DPH 溶液, 激发光谱与荧光光谱如图 1 所示。激发峰值为 382nm , 荧光峰值为 442nm (图 1)。腹水癌细胞悬浮在 PBS 溶液中, 在 380nm 没有激发峰位, 420nm 处也没有荧光峰位 (图 2、图 3)。

腹水癌细胞和 DPH 溶液温育以后, 荧光光谱与激发光谱如图 2、图 3 所示, 激发峰值出现蓝移, 由 380nm 移至 362nm , 荧光峰值也出现

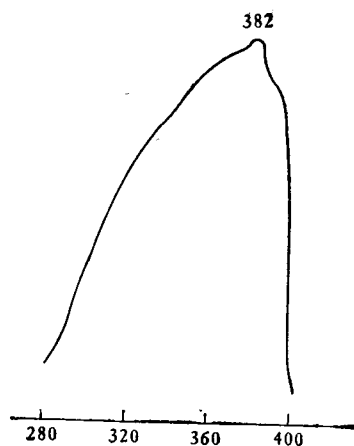


图 1a DPH 溶液激发光谱
狭缝 10, $10\lambda_{\text{em}}: 382 \text{nm}$

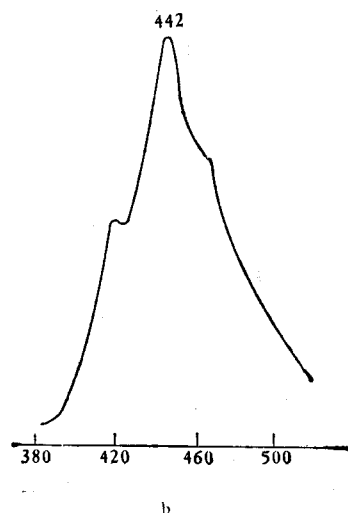


图 1b DPH 溶液荧光光谱
狭缝 10, $10\lambda_{\text{ex}}: 442 \text{nm}$

蓝移现象, 由 442nm 移至 432nm , 荧光强度比单纯 DPH 溶液增大 50 倍以上, 比单纯腹水癌细胞增大 50 倍以上。从荧光理论可知, 在极性溶剂中, 由于被激发分子处于 Franck-Condon 激发态很不稳定, 很快回到平衡激发态而消耗能量, 而在非极性溶剂中或极性较小的溶剂中, 无此现象或消耗能量较小。因此, 发荧光的分子, 当它由极性溶剂转到非极性溶剂或极性较小的溶剂时, 荧光峰值往往出现蓝移^[9]。由此可见, DPH 结合在脂肪分子上非极性的烃链区。

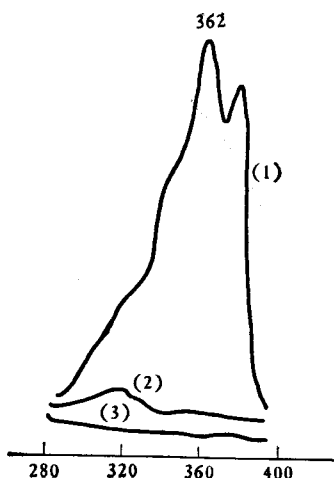


图 2

1. DPH 标记腹水癌细胞后激发光谱
2. 腹水癌细胞激发光谱
3. DPH 激发光谱, 狭缝 3, 4, $\lambda_{em} 1432 \text{ nm}$

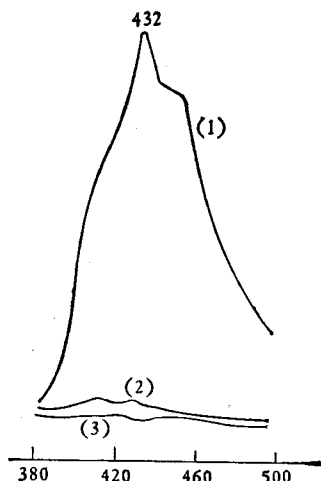


图 3

1. 腹水癌细胞用 DPH 标记后荧光光谱
2. 腹水癌细胞荧光光谱
3. DPH 荧光光谱, 狭缝 4, 3, $\lambda_{ex} 362 \text{ nm}$

2. 腹水癌细胞用 DPH 标记后荧光显微镜观察 样品与 DPH 温育 1' 后, 镜下可观察到细胞膜上出现一圈淡淡的天蓝色荧光, 温育 5'、10' 后膜上荧光逐渐增强, 温育 30' 后荧光更加清晰, 并且在胞浆内也可见到零星脂滴发出的荧光。30'—60' 之间膜上荧光强度不再发生变化, 胞浆内发荧光的脂滴逐渐增多, 90' 即达到饱和, 膜上荧光和胞浆内荧光均不再变化。由于荧光显微镜光源为 200W 汞灯, 汞灯的光谱

为线光谱, 波长为 365nm 的激发光特别强, 细胞膜与 DPH 温育后发出的荧光在强紫外光照射下迅速被猝灭, 不利于荧光照相, 因而未能取得照片。

3. 腹水癌细胞与 DPH 温育, 荧光强度 F , 荧光偏振度 P 与温育时间的关系 由图 4 可以看出, 荧光强度 F 在 30' 以前不断升高, 30'—60' 之间上升缓慢似乎第一次达到平衡, 60' 以后荧光强度继续增大, 大约到 120' 以后达到饱和。结合荧光显微镜观察 30'—60' 之间出现第一次平衡, 我们认为这段时间前 DPH 可能主要结合在膜上。60' 以后进入胞内 DPH 越来越多, 120' 以后达到饱和, 这点也与荧光显微镜下观察基本一致, 因此 DPH 与细胞结合, 看来它首先是与膜上的脂肪结合, 然后再与细胞浆内的脂肪结合。因此, 应用它作为研究膜脂流动性的荧光探针时, 以选择温育时间较短(小于 60') 的条件为适宜。

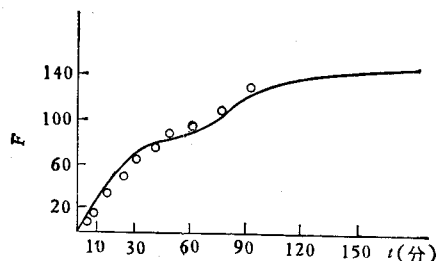


图 4 荧光强度与温育时间的关系

狭缝: 10, 10 $\lambda_{ex}: 362 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} 1432 \text{ nm}$ 温度: 25°C

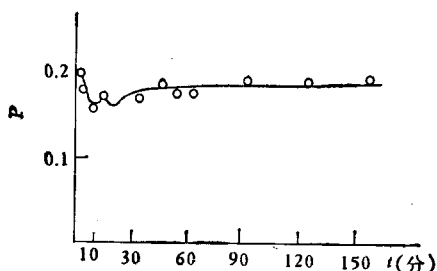


图 5 荧光偏振度与温育时间的关系

狭缝 10, 10. $\lambda_{ex}: 362 \text{ nm}$
 $\lambda_{em} 1432 \text{ nm}$ 温育时间 30'

图 5 表明, 荧光偏振度 P , 在 30' 以前不稳定(数值在 0.16—0.20 之间), 30' 以后基本上保

持不变(基本稳定在 0.19 左右)。因为 P 值比较稳定,并不因为 DPH 分子进入胞浆而升高或降低,因而荧光偏振度 P 值作为细胞膜脂流动性的参数是可靠的。为了尽量减小胞浆内脂滴所产生的影响,温育时间以 30' 为最适宜。

4. 腹水癌细胞与 DPH 温育以后荧光偏振度 P 与温度的关系 温度与 P 值关系用 $\ln \bar{\eta}$ 对 $1/T$ 作图表示。由图 6 可以看出,在 13℃—37℃ 之间 P 值即 $\bar{\eta}$ 变化缓慢,38℃ 开始发生转折,因此腹水癌细胞膜的相变温度可能在 37℃ 以上。根据 Arrhenius 公式

$$\bar{\eta} = Ae^{\Delta E/KT}$$

$$\ln \bar{\eta} = \ln A + \frac{\Delta E}{KT}$$

$\bar{\eta}$ 为微粘度, ΔE 为流动活化能 K 为波尔兹曼常数, T 为绝对温度, A 为常数。从图 6 可以计算出 ΔE 为 4Kcal/mole。

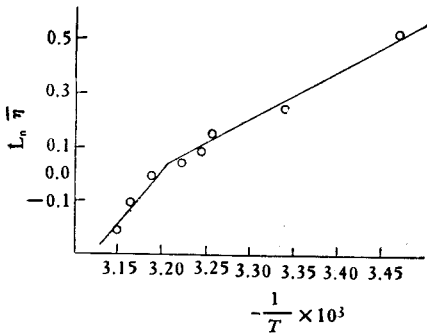


图 6 腹水癌细胞温度与微粘度的关系

结 论

荧光探针 DPH 和腹水癌细胞膜结合后,荧光光谱峰位比单纯 DPH 水溶液峰位蓝移,说明 DPH 结合在脂肪链的非极性区。DPH 和腹水癌细胞结合,30' 内主要结合在膜上,以后逐渐进入胞浆。荧光偏振度 P 不随时间延长而变化,因此,用荧光偏振方法测定完整细胞膜脂流动性,DPH 是一种有效的探针。荧光偏振度随温度变化而异,由此求得腹水癌细胞膜相变温度大约在 39℃。

参 考 文 献

- [1] Lenaz, G. et al.: *J. Bioenergetics*, **7**, 223, 1975.
- [2] Shinitzky, M. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **515**, 367, 1978.
- [3] 袁松青:《荧光偏振技术及其在分子生物物理学中的应用》中国第三届生物物理学会论文集 1980。(印刷中)
- [4] Vanderkooi, J. et al.: *Biochemical Fluorescence: Concepts*, **2**: 737, 1976, New York, Dekker.
- [5] Collard, J. G. et al.: *Experimental Cell Research*, **116**, 447, 1978.
- [6] Inbar, M. et al.: *Europ. J. Cancer*, **13**, 1231, 1977.
- [7] Ben-Bassat, H. et al.: *Cancer Res.*, **37**, 1307, 1977.
- [8] Watford, Road et al.: *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **76**, 869, 1977.
- [9] Pesce, A. J. et al.: *Fluorescence Spectroscopy an introduction for biology and medicine*, p. 87—91, 1971, New York Dekker.

[本文于 1981 年 2 月 25 日收到]

用“匀浆互补法”测试杂种优势的研究 (III)

杨福愉 邢菁如 陈文雯 王淑娅

(中国科学院生物物理研究所)

孙 鹤 雏

(辽宁省昭乌达盟农科所)

杂交育种是选育优良品种,从而提高粮食产量,改进粮食品质的一个有效途径。对农作物杂种优势的利用已经在粮食增产上取得显著

的效果,但强优势杂交种的获得一般都是建立在大量杂交组合与多年产量比较的基础上。为了减少育种工作的盲目性和减轻工作量。人们