

本法中 HA 质量和溶胞条件对结果影响很大。实验中发现有些批号 HA 分离效果较差,正常细胞 dsDNA % 也仅 30 % 左右。因此我们严格选用晶体大而完整,存放时间不超过二年的 HA。0.4—0.5g HA 分析细胞量为 10^5 — 10^7 个时对结果影响不大。此外 HA 离心法分离后的 DNA 单、双链亦可用荧光法测量,以检测不分裂细胞 DNA 链断裂。

溶胞过程中震荡或见光都可使 dsDNA % 减少,因此应尽量避免。本实验所用 L₇₇₁₂ 细胞溶胞后粘度很高,中和后稍加震荡则出现絮膜状物,对结果有影响。若中和后立即超声处理可降低粘度,絮膜状物也不再出现,且实验重复性好。

在严格控制溶胞及洗脱条件后,应用本法检测未照射细胞仍可测得 20—30 % 的单链 DNA,文献中也有类似报道^[9-11]。这可能是由于细胞 DNA 分子内存在对硷不稳定部位所致。此外在加液时不可避免的剪切作用也可能引起

单链 DNA % 的增加。但在同一实验条件下,对观察 DNA 链断裂的剂量效应关系以及重接过程影响不大。

参 考 文 献

- [1] Ahnström, G. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **23**, 285, 1973.
- [2] Kanter, P. M. et al.: *Anal. Bioch.*, **97**, 77, 1979.
- [3] 郑升等:《肿瘤》, **2**, 1, 1982.
- [4] 郑秀龙等:《第二军医大学学报》, **2**, 131, 1983.
- [5] Rydberg, B.: *Radiat. Res.*, **61**, 274, 1975.
- [6] Modig, H. G.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **26**, 493, 1974.
- [7] Roots, R. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **27**, 595, 1975.
- [8] Mitani, H. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **41**, 85, 1982.
- [9] Ahnström, G. et al.: *DNA Repair Mechanisms* (edited by Hanawalt, P. C. et al.), Acad. Pr. N. Y. p469, 1978.
- [10] Rydberg, B. and Johanson, K. L.: *Radiat. Res.*, **64**, 281, 1975.
- [11] Nilsson, S. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **39**, 107, 1981.

[本文于1983年11月5日收到]

假肥大型肌营养不良症患者红细胞膜流动性的 ESR 研究

卢 景 霁

(中国科学院生物物理所)

沈定国 董 伟

(解放军 301 医院)

假肥大型进行性肌营养不良症 (DMD) 是一种遗传性肌肉变性疾病。本病在 2—3 岁发病,表现为行走缓慢,奔跑困难,下蹲后出现严重肌肉乏力,肌腱挛缩,关节畸形,只能强迫卧床,并于 25 岁以前死亡。研究该病的发病机制对寻找治疗及预防措施是很有意义的。大量的材料说明,此症患者的肌膜异常在临床检查中有重要意义。膜的“缺陷”也出现在其他的膜系,如红细胞膜^[1,13]。

我们曾报道该病患者红细胞膜 ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATP 酶异常^[2,3]。本文报道用 ESR 技术进一步研究该病患者的红细胞膜的流动性。实验结果为患者的红细胞膜的 EPR 波谱的序参数较正常

对照组低,这表明膜流动性增加。

材 料 与 方 法

病人组为 5—16 岁 (平均 9.7 岁) 的假肥大型肌营养不良症患者,经肌电图,血清 CPK,肌红蛋白等检查确诊。对照组 7—13 岁 (平均 9.7 岁),其年龄和性别与病人组相对应。

红细胞膜的制备 抽取静脉血 2 毫升,用 EDTA 抗凝,经 510g 离心两分钟后用滴管吸出血浆层。红细胞用 50mM Tris-HCl-1mM EDTA 生理盐水 (pH7.4) 等渗溶液洗三次,每次 310g 离心两分钟。然后按 1:20 向洗净的红细胞中加入预冷的 10mM Tris-HCl 缓冲液,摇动数次后

使红细胞溶血,而后 5000g 离心 20 分钟,去掉上清液(含血红蛋白)及管底的残留物。将细胞膜层再用 100mM Tris-HCl 缓冲液 (pH7.4) 洗三次,相继离心三次,最后获得乳白色红细胞膜。悬浮于 50mM Tris-HCl 缓冲液中,分布贮存于 -10°C 冰箱内待用^[3]。

红细胞膜的标记和 ESR 波谱测定 实验用自旋标记物为 5NS (5-nitroxide stearic acid 即 2-(3-carboxypropyl)-4,4-dimethylloxazolidiayloxy) 取浓度 1mg/ml 的 5NS7 μl , 装入锥形试管底部,再加入适量重蒸乙醚,用玻璃棒轻轻搅拌数分钟,使自旋标记物溶解,静止干燥后使其均匀分布于试管底部备用。取浓度 1 mg/ml 的膜蛋白 30 μl ,放入上述锥形试管内,用棒轻轻搅拌 5 分钟,室温下保存,3 小时后在国产 404 型高频小调场式电子自旋共振波谱仪上进行测定。仪器的工作频率为 3 厘米微波波段。为防止饱和和调制加宽,采用微波功率 10mW,调制频率 100 KHz,调制幅度约 3 高斯。样品放在直径 1 mm 的石英毛细管内,在圆柱形 H_{102} 腔内常温下测量。为减少误差,测量重复多次。

结果与讨论

用 ESR 技术测量红细胞膜时,一般采用脂肪酸自旋标记物。在脂肪酸长链上有一个氮氧基,未成对电子定位在氮原子的 $2p\pi$ 轨道上。我们采用的 5NS 是脂肪酸自旋标记物的一种,其氮氧基处在羧基端第五个碳原子上,如图 1 所示。众所周知,在类脂双分子层中类脂分子的极性端在膜表面,非极性端在膜双层中间。一般认为^[4],当自旋标记物掺入细胞膜内,它的取向沿着分子长轴且垂直于膜表面,其极性头在膜表面,相当牢固地固定在脂-蛋白双层的极性部分,非极性头在膜双层中间,分子的疏水尾部受到的限制小,在双层内部不停地运动。加之氮氧基牢牢地受分子的碳氢链束缚,因此它的运动状态反映了邻近分子部分的运动信息。选用不同的自旋标记物,因其氮氧基在长链上的位置不同,标记到膜上后,可以观察膜类脂烃链不同部分的运动状况。5NS 标记到红细胞膜上

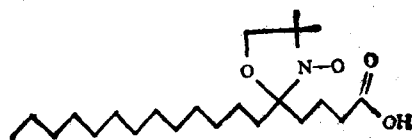


图 1 5NS 的分子结构式

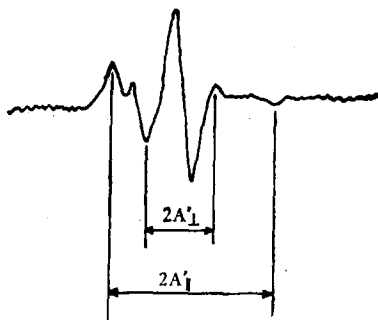


图 2 红细胞膜的 5NS 的典型 ESR 波谱

$2A'_1$ 是第一个最大峰和最后一个最小峰之间的波谱分裂;
 $2A_1$ 是第一个最小峰和最后一个最大峰之间的波谱分裂。

后,典型的 ESR 波谱及有关参数见图 2。

膜的流动性主要表现为类脂分子的旋转运动和空间摆动,它反映到 ESR 波谱的形状及其参数上。可用序参数 s 表征膜的流动性。脂肪酸自旋标记物 5NS, s 的近似计算公式:

$$s = 0.568 \times \frac{A'_1 - A_1}{a'}$$

$$a' = \frac{1}{3} (A'_1 + 2A_1)$$

这里, A'_1 、 A_1 为样品实际测得的超精细分裂常数(见图 1)。 $s = 0$ 为完全无序状态, $s = 1$ 为完全有序状态。一般 $0 < s < 1$, 序参数增大表明流动性减小,相反则流动性增大。

我们将 ESR 波谱参数的数值列于表 1。从表中可以看出,病人组序参数的平均值为 0.7066 ± 0.0116 , 对照组序参数的平均值为 0.7367 ± 0.0073 。可见 DMD 症患者的红细胞膜序参数减小,即流动性增大。实验表明自旋标记物 5NS 对环境的极性变化极为敏感,在患者和正常人的红细胞膜中,波谱分裂的情况不同。由于极性的改变,在两个不同的环境中, A'_1 和 A_1 数值不同, A'_1 比 A_1 变化更为明显。 A'_1 的减小意味着极性减小,分子运动的自由程度增

表1 实验的ESR波谱参数和序参数

对 照 组				病 人 组			
序 号	$2A_{\parallel}$	$2A_{\perp}$	S_N	序 号	$2A_{\parallel}$	$2A_{\perp}$	S_M
1	55	17	0.7276	1	52.5	16.5	0.7175
2	54	16.5	0.7345	2	53	17	0.7051
3	53	16	0.7417	3	50	15.8	0.7142
4	54.7	16.5	0.7422	4	51.2	16.2	0.7143
5	54.5	16.5	0.7400	5	54	17	0.7165
6	55	16.5	0.7455	6	52	16	0.6904
7	52	15.5	0.7493	7	53.5	17	0.7108
8	53.5	16.5	0.7289	8	51.5	17	0.6876
9	53	16.2	0.7343	9	50	16	0.7065
10	40.5	12.5	0.7284	10	36.5	11.5	0.7160
11	38	11.5	0.7403	11	37	12	0.6984
12	38	11.5	0.7403	12	36.8	11.5	0.7209
13	37	11.5	0.7242	13	39.5	13	0.6894
平 均 值	7367±0.0073			平均值	0.7066±0.0116		

加,伴随着流动性的增加。此外也可能是膜电荷的减小反映了自旋标记物所在病膜环境中极性的减小。这有待进一步研究。图3是我们测得的患者及正常人的红细胞膜的ESR波谱。

Butterfield 等^[5]曾报告患肌营养不良的四周龄的小鸡红细胞膜的流动性减小,与肌肉变得僵硬相一致。但是1981年他又^[6]报道对假肥大型病者的红细胞膜自旋标记后两天,进行ESR测量,发现膜流动性增大。多数文献^[6-9]报道用ESR测量患者红细胞膜流动性增加,与我们的

结果一致。但至今对流动性增大的原因和病理意义不很明了。有人认为^[10,11]红细胞膜流动性增加与膜上磷脂成份的改变有关,病变膜中磷脂酰胆碱下降,而磷脂酰胆碱由磷脂酰乙醇胺甲基化生成磷脂酰-N-甲基-2-醇胺(PME),PME可在红细胞双层脂层内被酶解甲基化转换成磷脂酰胆碱,PME减少引起膜流动性增大。

我们的实验进一步证明假肥大型肌营养不良症红细胞膜的流动性增加,同时还发现^[12]该病红细胞膜($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATP酶活下降,对乌本苷的敏感性增加。一般认为红细胞形态变化和阴离子通道及细胞骨架改变^[12]有关,因此我们推断假肥大型肌营养不良症可能存在膜的缺陷。

本文得到杨福瑜教授、沈淑敏教授和江丕栋教授的指教,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Samahaf: *Molecular Aspects of Medicine*, 2, 303, 1979.
- [2] 沈定国等:《假肥大型肌营养不良症红细胞($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATP酶的研究》, (待发表)。
- [3] 董伟等:《生物化学与生物物理进展》, 3, 34, 1980.
- [4] Lawrence, J. B.: *Spinlabeled theory and application*, London, 1979.
- [5] Butterfield, D. A. et al.: *Life Sci.*, 22, 1783, 1978.
- [6] Butterfield, D. A.: *J. Neur. Sci.*, 52, 61, 1981.

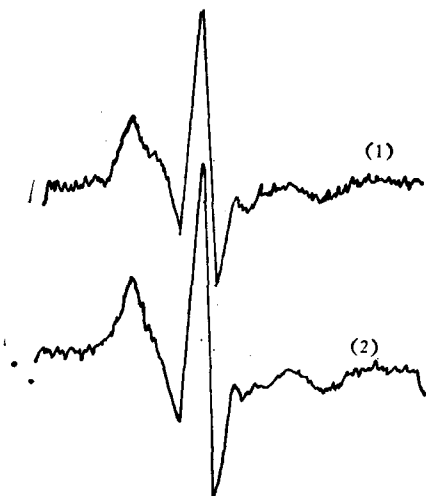


图3 红细胞膜的ESR波谱

(1) 病患者 (2) 正常人

- [7] Sato, B. K. et al.: *J. Clin. Invest.*, **61**, 251, 1978.
 [8] Wilkerson, L. S et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)*, **75**, 838, 1978.
 [9] Scarlato, G. et al.: *Acta Neur. Scand.*, **59**, 262, 1979.
 [10] Kalofoutis, A. G. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **74**, 85,

1977.

- [11] Hirata, J. et al.: *Nature*, **275**, 219, 1978.
 [12] Jones, G. E.: *J. Neur. Sci.*, **58**, 159, 1983.
 [13] Butterfield, D. A.: *J. Neur. Sci.*, **52**, 61, 1981.

[本文于1983年12月5日收到]

三类不同连接方式的双吲哚化合物对 核酸和蛋白质合成的影响

吴冠芸 刘敬忠 张 镭

(中国医学科学院, 基础医学研究所, 北京)

靛玉红是我国首先发现的治疗慢性粒细胞白血病的有效药物。它是两个吲哚环通过2位和3'位碳原子之间的双键相连而成。中国医学科学院药物研究所合成室合成了三类不同连接方式的双吲哚化合物十个, 其两个吲哚环分别以2,3', 2,2'或3,3'相连(图1)。本文比较研究了这些化合物对癌细胞核酸和蛋白质合成的影响, 对无细胞体系DNA合成的影响, 以及与小牛胸腺DNA(CT-DNA)体外结合情况, 并讨论了它们的作用与结构的关系。

一、材料与方 法

1. 可移植性动物瘤瓦尔克256(W256, 腹水型), 接种自中国医学科学院药物研究所药理室, 小鼠艾氏腹水癌接种自基础医学研究所病理室。取常规接种5—6天后的腹水细胞为实验材料。

2. 试剂和放射性核素标记前体: 培养基用日本进口RPMI 1640粉剂配制。CT-DNA购自中国科学院生物物理研究所。 ^3H -TTP(25Ci/m mole), ^3H -亮氨酸(119.5 mCi/m mole)分别购自中国医学科学院放射医学研究所及中国科学院原子能研究所。

3. 体外掺入实验在过去方法基础上^[1], 稍加改变。掺入放射性计数采用非均相液闪测定法。药物对 ^3H -标记前体掺入癌细胞酸不溶性

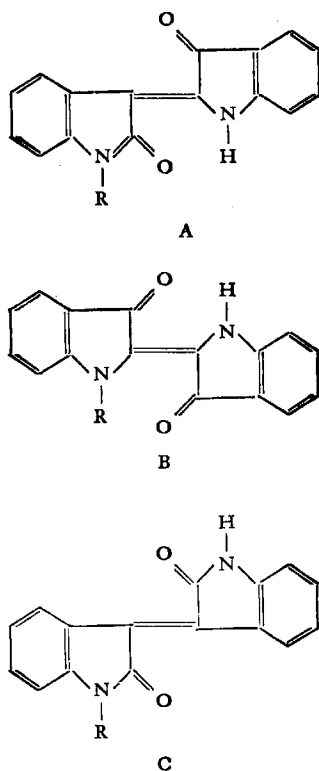


图1 三类不同连接方式的吲哚化合物

- A. 2,3'-系列化合物
 —R: —H, 靛玉红; —C₂H₅, 1[#]; —CH₂COOH, 2[#]; —C₁₀H₂₁, 4[#]; —C₁₈H₃₇, 5[#]; —CHO, 9[#].
 B. 2,2'-系列化合物
 —R: —CH₃, 6[#]; —C₂H₅, 7[#].
 C. 3,3'-系列化合物
 —R: —CH₃, 3[#]; —C₂H₅, 8[#].

部分的抑制率按下式计算: