

munopathology, 8, 90, 1977.

- [2] Debari, V. A. and Needle, M. A.: *J. Immunol. Methods*, 40, 89, 1981.
- [3] Schultz-Ellison, G. et al.: *J. Immunological Methods*, 31, 31, 1979.
- [4] Greene, Barry S., et al.: *J. Appl. Biochem.*, 3,

337, 1981.

- [5] 左渠, 黄吉甫, 胡永中等:《多功能激光散射装置及应用》(鉴定会资料), 1982, 10, 南开大学。
- [6] Dehari, V. A. and Needle, M. A.: *J. Histochem. Cytochem.*, 26, 40—46, 1978.

[本文于 1984 年 6 月 30 日收到]

NaN₃ 血清等对血卟啉衍生物光敏致溶血作用的影响

张绍斌 宋兰芳 常金珍

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

含有血卟啉衍生物(HPD)的细胞在红光照射后,其光动力学过程的主要产物是一些 HPD 的自由基和单态氧^[1]等。这些极为活泼的物质使膜或其它细胞器上的重要大分子因过氧化而损伤,并进而可引起癌细胞或正常细胞死亡。

人血红细胞材料容易得到,其死亡指标(溶血)容易测量,是一个研究光敏作用的良好模型^[2]。已有人用红细胞研究原卟啉^[3]等光敏机理。本文用人红血球为材料,探讨 HPD 的光动力学过程,以及某些 ¹O₂ 的淬灭剂对这一过程的影响及血清等的保护效应。

一、材料与方 法

1. HPD: 北京制药工业研究所制。NaN₃: 国产分析纯, α -生育酚为国产。小牛血清上海产,人血清白蛋白及人纤维蛋白元(纯度约 20%)是北京红十字中心站产品。

2. 人红细胞: 将自北京红十字会中心血站购来的新鲜压积红血球,按 Hanahan 和 Ekhelm 法以 310mOsm Tris 缓冲液(pH7.6)洗三次,最后以同样缓冲液或生理盐水稀释成 2×10^7 细胞/毫升的悬液待用。

3. 加 HPD 保温并照光: 在暗处加 HPD 于红细胞悬液后, 25℃ 恒温水浴保温 10 分钟。用 400 瓦溴钨灯 630nm 截止滤光片产生红光,将样品放在水平方向距光源 30cm 处,用电磁搅拌器边搅拌边照光;或用透过窗玻璃的阳光直接照射盛有样品的试管(同时在旁边放一

光度计测光强度,本文因只作相对效应的比较,故省略)。

4. 溶血程度及完全溶血时间测定: 按 sik^[5]方法,将含 HPD 的红细胞悬液照光后,立即在 751 型分光光度计上测 650nm 的透光率。在所用浓度范围内,红细胞悬液的透光率与溶血程度基本是一直线关系,所以本文均以透光率直接表示溶血的相对程度。完全溶血的透光率为 78—80%,不溶血为 12%。

在 NaN₃ 和血清等的实验中,以照光开始到完全溶血所需的照光时间(以下称完全溶血时间)作为判定光敏损伤程度的指标。

二、实 验 结 果

1. 图 1 和图 2 分别表示 HPD 浓度相同,光照时间不同,以及光照时间相同、HPD 浓度不同的红细胞溶血曲线(图 1,图 2)。

由图 1 及图 2 可以看出,只加 HPD 不照光,或只照光不加 HPD 的红细胞悬液的透光率,和既不照光也不加 HPD 的红细胞悬液的透光率相同,这表明两种情况均无溶血。图 1 的溶血曲线是二级反应的“S”型曲线,即一开始随着光敏剂量增加溶血速度较小;光照近 20 分钟时,溶血速度急剧增加。由图 2 可见,光照 30 分钟,HPD 达到 20 μ g/ml 时完全溶血,低于此剂量,溶血程度与 HPD 浓度增加呈直线关系。

以上的实验样品,光敏后立即测量,没有一个出现完全溶血,在暗处放 3 小时或更多时间,

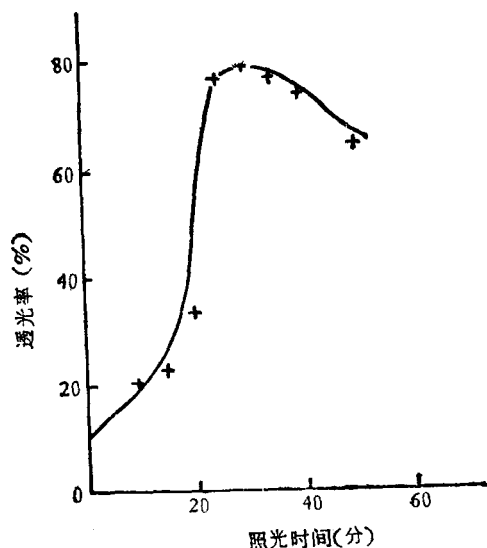


图1 不同照光时间 HPD 光敏致溶血曲线
HPD 2.5 μ g/ml, 400W 溴钨灯产生的红光照光

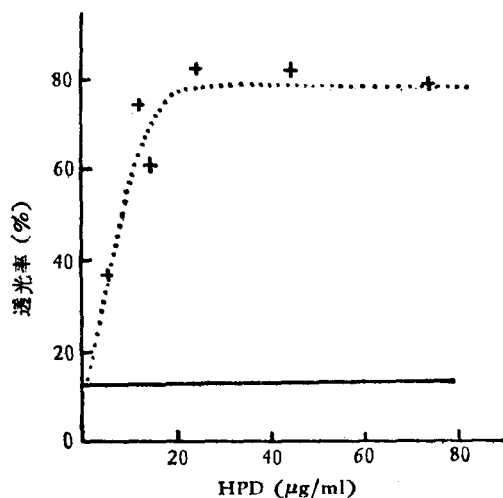


图2 不同浓度的 HPD 光敏致溶血曲线
条件同图1; ——: 对照(不照光);: 照光 30 分钟

最后均可完全溶血。这表明光敏致溶血具有延迟的后效应。

2. NaN_3 和 α -生育酚 (V_E) 的抗光敏致溶血作用: 我们用血球悬液完全溶血所需的照光时间(图 3, 4 中的纵坐标)标定光敏作用的大小。图 3 表示实验组均加 1M NaN_3 , 用生理盐水溶解, 使最终浓度为 20mM, 加不同量的 HPD, 然后照光(透过玻璃的阳光); 对照组以等量的生理盐水代替 NaN_3 。结果实验组未能阻

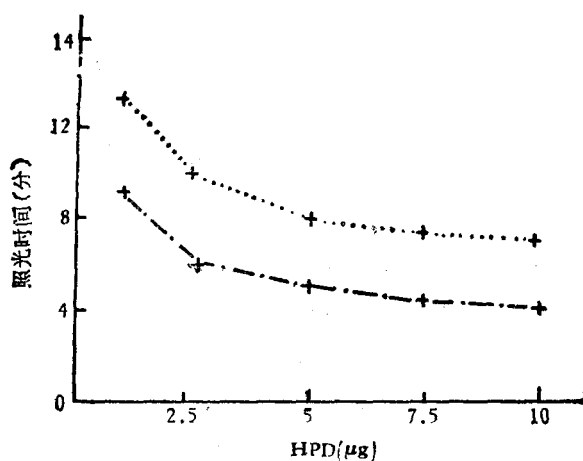


图3 NaN_3 的抗光敏致溶血作用

——: 对照
.....: NaN_3 (20mM)
纵坐标: 照光时间(分)

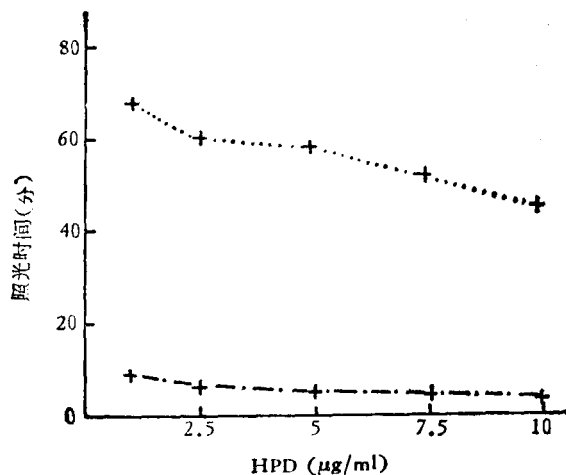


图4 α -生育酚抗光敏致溶血作用

——: 对照;
.....: V_E (1mg/ml)
纵坐标: 照光时间(分)

止溶血发生, 只是使完全溶血时间延迟 3 分钟。 NaN_3 浓度小于 10mM 时, 基本看不出和对照组的差别, 而 NaN_3 浓度大于 20mM 时, 随着浓度增加, 抗光敏致溶血作用越来越小。上述结果说明, 作为 $^1\text{O}_2$ 特异淬灭剂的 NaN_3 [6], 在我们的实验条件下, 只有很弱的抗光敏致溶血作用。

图 4 示 α -生育酚 (V_E) 抗光敏致溶血作用, 实验组加 V_E (1mg/ml), 对照组加同量的无水乙醇。结果实验组也完全溶血, 但所需照光

时间均比对照长约 10 倍。在预实验中, V_E 浓度为 $200 \mu\text{g/ml}$, 即可看到明显的延迟溶血作用, 当 V_E 浓度大于 1mg/ml 时, 则血球悬液明显加浊(因 V_E 不溶在水悬液中), 光敏作用便无法观察。

3. 从图 5 可以看出, 小牛血清、人血清白蛋白和人纤维蛋白元都有很强的抗 HPD 光敏致溶血作用。当 HPD 为 $2.5 \mu\text{g/ml}$ 时, 不加任何保护剂的对照样品, 光照 12 分钟即开始完全溶血。而上述三者浓度为 1.5% 时, 就可使溶血时间推迟 3—4 倍; 到浓度为 2.5% 时, 完全溶血时间均为 3 小时, 比对照组推迟了 15 倍; 到 5% 时, 完全溶血时间延长, 人血清白蛋白和纤维蛋白元分别为 5, 5.7 和 6 小时。三者的浓度为 10% 时, 照光 6 小时放在暗处至第二天仍未见溶血。这说明, 小牛血清、人血清白蛋白以及粗制人纤维蛋白元均具有强的抗 HPD 光敏致溶血的保护效应。

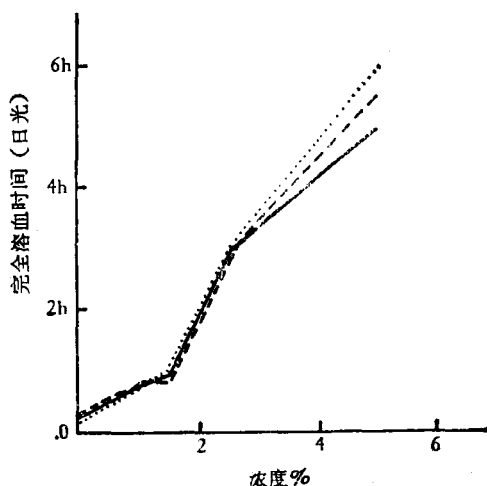


图 5 小牛血清等对 HPD 光敏致溶血的保护效应
HPD $2.5 \mu\text{g/ml}$, 透过玻璃窗的日光照光, 红血球生理盐水悬液为 2×10^7 细胞/ml。
---: 小牛血清; —: 人血清白蛋白;
.....: 人纤维蛋白元

讨 论

本文所用直接测溶血的方法, 省去了测光密度的麻烦。虽然不能直接测量溶血的程度, 但用完全溶血时间可以反映光敏作用的大小。

图 1 的不同光照时间的溶血曲线, 在 20 分钟处有一拐点, 在此点后反应速度陡然加大。同样以直接观测法观察其光致溶血时, 也看到溶血速度突然加大的过程, 这可能反映了红细胞在膜上的损伤积累由量变到质变(表现为溶血)的时间过程^[7]。在加入淬灭剂的实验中, 单态氧的特异淬灭剂 NaN_3 具有一定的保护作用, 说明光动力学过程中确有 $^1\text{O}_2$ 产生, 但 NaN_3 只是推迟了一小段溶血时间, 未能阻止最终溶血发生, 这表明在本实验条件下, 光动力学过程中除了产生 $^1\text{O}_2$ 外, 可能还有 NaN_3 不能淬灭的自由基中间产物。

据文献报道, 血清中含有白蛋白^[8,9]和另一蛋白因子血红素结合蛋白^[10]能同卟啉类化合物非共价键结合, 通常它们主要是运输体内的卟啉类化合物。本实验结果说明, 血清和血清白蛋白抗 HPD 光敏的保护作用, 可能是由于 HPD 与白蛋白结合, 阻断了 HPD 的光动力学过程, 因而没有或很少有 $^1\text{O}_2$ 和 HPD 的中间自由基产物等细胞毒性物质产生。接受 HPD 光敏治疗的肿瘤病人之所以没有溶血的毒副作用, 很可能与血清白蛋白等这一保护作用有关。当然不排除白蛋白与 HPD 复合物经光照射后产生有害的光毒物质^[11]。所以让 HPD 的病人避阳光是完全必要的。人纤维蛋白元也具有和白蛋白同等的防护效果, 究竟是因为粗制人纤维蛋白元中含有较多的白蛋白乃至血红素结合蛋白, 还是人纤维蛋白元本身也具有抗 HPD 光敏作用, 须进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Jori, G.: *Lasers in Photomedicine and Photobiology* (Ed. by Pratesi, R. et al.), 58, 1979, Berlin, Springer, 1980.
- [2] Dezeil, M. R. et al.: *Photochem. Photobiol.*, 31, 593, 1980.
- [3] Lamola, A. A. et al.: *Photochem. Photobiol.*, 31, 597, 1980.
- [4] Hanahan, D. J. et al.: *Methods in Enzymology*, XXXI Part A, 168, 1974.
- [5] Sik, B. H. et al.: *Photochem. Photobiol.*, 38, 411, 1983.
- [6] Tomio, L. et al.: *Lasers in Photomedicine and Photobiology*, 78, 1979 (Ed. by pratesi, R.),

- Berlin, Springer, 1980.
- [7] Takashi, Ito.: *Photochemical and Photobiological Reviews*, 7, 141 (Ed. by Smith, K. C.), Plenum Press, New York and London, 1983.
- [8] Reddi, e. et al.: *Int. J. Rept. Protein Res.*, 18, 408, 1981.

- [9] Jori, G. et. al.: *Tomori*, 65, 425, 1979
- [10] Sery, T. W.: *Cancer Res.*, 39, 96, 1976.
- [11] Jori, G. et al.: *Lasers in Photomedicine and Photobiology*, 49, 1979 (Ed. by pratesi, R. et al.), Berlin, Springer, 1980.

[本文于 1984 年 6 月 5 日收到]

γ 射线对大鼠脾细胞核体外转录活性的影响

周建新 易禄康

(第三军医大学生物化学教研室,重庆)

细胞核体外转录模型比较接近于体内的生理状态,既能保持转录的忠实性,又便于人为精细地控制实验条件^[1,2],是研究电离辐射影响真核细胞转录过程的较理想的方法。以前有关的工作主要见于以胸腺为实验材料^[3,4]。脾脏也是辐射敏感的淋巴组织,研究其辐射损伤早期细胞转录过程的变化,可为辐射引起淋巴细胞损伤死亡、放射病的发病机理,以及辐射遗传效应等研究提供有意义的资料。

我们选用大鼠脾细胞核为材料,择其转录活性的最适条件,建立了体外转录的模型,了解亚致死剂量 γ-射线全身照射后早期转录活性的变化及特点。

一、材料和方法

1. 材料

健康雄性大白鼠,杂种,体重 180—220 克。

试剂: ³H-UTP (18 居里/毫克分子) 系中国科学院上海原子核研究所产品。GTP、CTP、ATP、UTP、甲苯磺酰氟 (PMSF) (上海东风生化试剂厂),放线菌素 D (上海第八制药厂),鹅膏蕈碱 (α-Amanitin) 西德 Boehringer 公司产。

2. 方法

(1) 细胞核的制备 采用 Ueno 等人^[6]的方法并加以改进。将大鼠断头处死,迅速取出脾脏(以下操作在 0—4℃ 进行),置冰冷的磷酸缓冲液 (0.15M, pH7.4) 中,纵向剪开,用镊

子挤压,使脾细胞释出,每组收集 4 只大鼠的脾细胞悬液,经 200 目的尼龙布过滤。滤液经 800 × g 离心 5 分钟,弃去上清,将沉淀的细胞按 1:10(V/V) 悬于低渗液 (1mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 5mM β-巯基乙醇) 中,置冰浴 5 分钟,使细胞肿胀后,用带有 Teflon 杆的玻璃匀浆器温和地匀浆数次,加入适量的 A 溶液 (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.33M 蔗糖, 3mM Mg (CH₃COO)₂, 2mM CaCl₂, 5mM β-巯基乙醇, 0.025% (V/V) Triton X-100, 0.1mM PMSF) 以提高匀浆液的渗透压接近等渗。混匀后迅速将匀浆液 800 × g 离心 5 分钟,弃去上清,将白色核沉淀以 1:10 (V/V) 重新悬于 A 溶液中,用同一匀浆器匀浆数次,所得的匀浆液以每 6ml 铺于 10ml B 溶液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 2M 蔗糖, 5mM Mg (CH₃COO)₂, 5mM β-巯基乙醇) 垫上,于 4℃, 29000 × g 离心 1 小时,弃去上清,将沉淀的细胞核悬于 C 溶液 (50mM Tris-HCl, pH8.0, 25% (V/V) 甘油, 2mM Mg (CH₃COO)₂, 12mM β-巯基乙醇) 中,调整细胞核浓度约为 2mg DNA/ml,分装后 -20℃ 或液氮保存。核 DNA 测定参考 Burton^[7]方法进行。

(2) RNA 聚合酶活性的测定 参考 Dauphinais^[8]方法, 100μl 反应体积中含: 75mM Tris-HCl, pH8.0, 12.5% (V/V) 甘油, 12mM β-巯基乙醇, ATP、GTP、CTP 各 0.5mM, 0.02 mM UTP, 2μCi ³H-UTP, 200mM (NH₄)₂SO₄,