

L₇₈₁₁ 鼠腹水肿瘤细胞 ³¹P 核磁共振的研究*

张乃忠 王凤茹 马丽英** 韩庆宏 王均衡 刘秀萍

(哈尔滨医科大学生物化学教研室)

吴家振 周淑华

(中国科学院生物物理研究所,北京)

提 要

用 ³¹P 核磁共振技术 (³¹P-NMR) 研究了 L₇₈₁₁ 鼠腹水肿瘤细胞和 615 系鼠胸腺细胞(正常对照细胞)。结果发现在肿瘤晚期阶段, L₇₈₁₁ 腹水肿瘤细胞的含磷化合物未进入完全不活跃状态。此外, 腹水肿瘤细胞的磷脂组成与含量亦有明显改变。因此, ³¹P-NMR 谱可做为观察肿瘤细胞内能量生成和某些磷脂合成宏观动态过程的一项参考指标。

关键词 ³¹P 核磁共振, 腹水肿瘤细胞, 胸腺细胞, 磷脂, 能量物质

由于傅里叶变换和超导磁场的引入, 使核磁共振 (NMR) 在医学生物学领域的应用得到迅速发展。因 ³¹P-NMR 有较高的灵敏度, 同时活细胞中重要能量化合物又都含有磷, 所以利用 ³¹P-NMR 技术研究活细胞中能量代谢过程是近年来一个重要研究领域^[1-4]。目前已应用 ³¹P-NMR 检测肿瘤^[4-7]、心血管疾病^[8-10]、代谢病^[11,12] 和骨骼肌线粒体病^[13] 组织细胞的磷酸化状态。

L₇₈₁₁ 淋巴细胞白血病腹水肿瘤鼠是中国医科院血液学研究所建立的白血病模型动物。本文以 615 系小鼠胸腺细胞(简称 615 胸腺细胞)为实验对照, 测定了 L₇₈₁₁ 鼠腹水肿瘤细胞(简称 L₇₈₁₁ 腹水细胞)的 ³¹P-NMR 谱。以期通过含磷化合物的相对浓度, 了解 L₇₈₁₁ 腹水细胞内能量代谢的宏观动态过程和线粒体结构与功能的有关信息。此外, 胸腺细胞有否磷酸肌酸(PCr)存在尚未见文献报道, 故本文用离子对高效液相色谱予以鉴定。

材 料 和 方 法

1. 实验动物

615 系小鼠和 L₇₈₁₁ 腹水肿瘤鼠分别由中国医科院血液学研究所实验动物中心和白血病实验动物研究室提供。

将平均体重为 20g (18—21g) 的正常 615 系小鼠断颈处死后, 立即取出胸腺放入冰浴的 Eagle's-tris-HCl 平衡盐缓冲液中(ETH 液), 去除血液, 剪碎。在冰浴中用少量 10% 高氯酸溶液在匀浆器中制成匀浆。20 只小鼠胸腺细胞制成终体积为 1.2ml 匀浆液。放置 30min 进行提取, 然后 5000r/min 离心 8min。上清液移置另一试管中, 用 0.5mol/L Na₂CO₃ 溶液中和至 pH7.0。将此溶液倒入 10mm 直径的 NMR 样品管中上机测试。再将发病的 L₇₈₁₁ 小鼠断颈处死, 用注射器吸出腹水, 立即放入冰

* 北京中关村地区联合分析测试基金资助课题。

** 心脏病理生理研究室。

浴的 ETH 液中稀释。1500r/min 离心 8min, 将沉降细胞用 10% 高氯酸溶液制成匀浆。以后操作同 615 系鼠胸腺细胞。

2. NMR 检测

试剂: (1) ETH 溶液 (内含 20% 小牛血清), pH7.4。(2) 10% 高氯酸溶液, 用 D_2O 配制。

测试条件见图 1。以 85% 正磷酸为外标, 通过各共振峰面积积分值, 计算对应成分的相对量。

3. 高效液相色谱 (HPLC) 检测

试剂: (1) 0.42mol/L 高氯酸溶液。(2) 1mol/L KOH 溶液。(3) 磷酸肌酸 (PCr) 标准溶液, PCr 为上海生物化学研究所制。

操作: (1) 用 1.0ml 0.42mol/L 高氯酸溶液制成胸腺组织匀浆液, (2) 然后用 0.36ml 的 1mol/L KOH 溶液沉淀, 再在 $4^{\circ}C$, 3000r/min 离心 15min, (3) 用微孔滤膜过滤, 取 $10\mu l$ 滤液上柱分柱。

结果与讨论

用 ^{31}P -NMR 测定这两种细胞含磷化合物的相对浓度, 结果如图 1。

根据文献以 85% 正磷酸溶液做外标, 其优点除可得单一共振峰外, 磷酸浓度配制精确与否, 并不是影响其化学位移的关键因素^[1]。

我们测定的 L_{7811} 腹水细胞样品溶液最终 pH 为 7.0, 其化学位移与 D. A. Adams 等人^[16]报道的 KHJJ 肿瘤细胞 ^{31}P -NMR 谱基本相似。由图 1 可见, 其中 $-19.06ppm$ 无疑是 β -ATP, $-10.69ppm$ 为 UDPDE (未知二磷酸二酯), $-9.97ppm$ 处有一较大共振峰是 α -ATP 和 α -ADP, 其右侧峰为 NAD, $-4.90ppm$ 为 γ -ATP, 其右侧 $-5.38ppm$ 峰为 β -ADP。一些研究者^[1,16]和我们均在 $0.459ppm$ 峰处发现一个磷酸二酯峰 (认为是磷酸甘油乙醇胺和磷酸甘油胆碱)。 $3.11ppm$ 处共振峰是细胞内、外中的磷酸共同形成的单一共振峰; $3.83ppm$ 处有磷酸乙醇胺和磷酸胆碱共振峰, 而在 $4.34ppm$ 处出现的共振峰为糖磷酸酯、

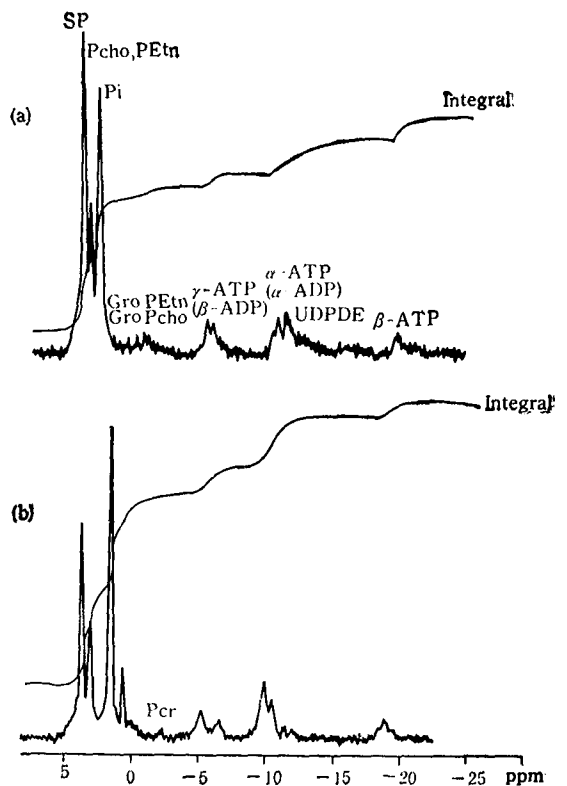


图 1 L_{7811} 腹水细胞和 615 系鼠胸腺细胞 ^{31}P -NMR 谱
Fig. 1 ^{31}P -NMR spectrum of L_{7811} ascites cell and thymic cells from 615 line mouse

^{31}P -NMR spectrum of L_{7811} ascites cells and thymic cells at 161.8 MHz on a Varian XL-400 spectrometer. Flip angle of 60° with repetition time of 1.31s was selected, temperature $19.7^{\circ}C$

(a) L_{7811} ascites cells (b) thymic cells from 615 line mouse

AMP 和 IMP 等化合物共同形成的, 其中主要为糖磷酸酯。由上述检测结果可见, 本文与文献报道基本一致^[4,16,17]。

值得注意的是 PCr 共振峰在 L_{7811} 腹水细胞中很弱, 而在 615 胸腺细胞的放大展开的 ^{31}P 谱中可明显地见到它的共振峰 (化学位移为 $-2.54ppm$)。这与 KHJJ 肿瘤细胞 PCr 化学位移是一致的^[16]。但是淋巴细胞有否 PCr 存在, 尚未见文献报道。为进一步证实淋巴细胞中 PCr 的存在, 采用离子对高效液相色谱对 615 胸腺细胞的高氯酸提取物进行分析。由图 2 可见, PCr 标准液和胸腺细胞提取液均在保留时间 $4.178min$ 附近处出现 PCr 特异的

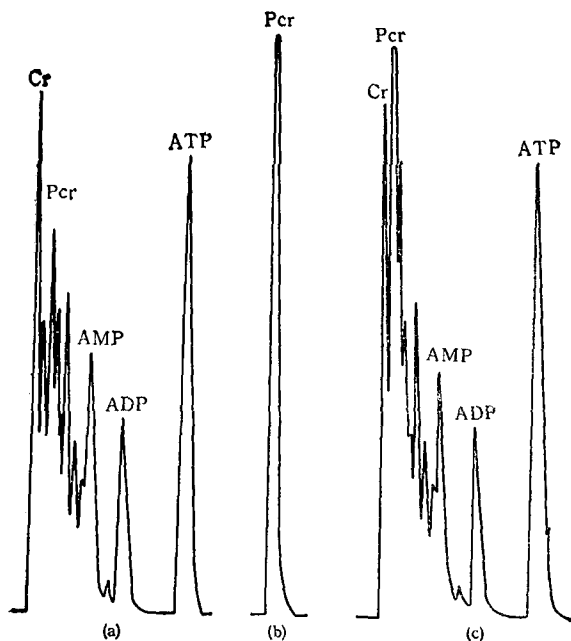


图2 615系鼠胸腺细胞提取液 HPLC 谱

Fig. 2 HPLC spectrum of thymic cell extract from 615 line mouse (on Shimadzu mode HPLC)

Ion-pair chromatographic condition: column, Spher-5, RP 18; mobile phase, KH_2PO_4 215mmol/L, TBAHS (tetrabutylammonium hydrogen sulfate) 2.3 mmol/L and 3.5% acetonitrile, pH 6.25; flow rate, 0.6 ml/min; column temperature 30°C; detection, UV at 206 nm (a) Thymic cell extract (b) PCr standard solution (c) Thymic cell extract plus the PCr standard solution

紫外吸收峰 (图 2b); 而在向胸腺细胞提取液加入 PCr 标准液后, 其 PCr 峰面积明显增加, 而其它吸收峰面积未见改变(图 2c), 说明淋巴细胞中存在 PCr。

为了比较两种细胞中含磷化合物相对含量间的关系, 分别计算了各共振峰面积积分值与 Pi 、 $\beta\text{-ATP}$ 和磷脂 (Pcho 和 PEtn) 峰面积积分值的比值 (见表 1 和表 2)。个别因信号弱未能积分的峰或几个合成的峰, 其各个峰面积采用峰面积称重法予以估算。

T. C. NG 等人^[4]在用 ^{31}P -NMR 监测不同生长阶段的小鼠肿瘤时发现, 随着肿瘤体积的增加, 肿瘤细胞内含磷化合物代谢发生一系列改变, 即肿瘤早期阶段肿瘤代谢活跃, 表现为

表 1 L_{7811} 腹水细胞和 615 系鼠胸腺细胞含磷

高能化合物 ^{31}P -NMR

Table 1 ^{31}P -NMR of high-energy phosphates for L_{7811} ascites cell and thymic cells from 615 line mouse

峰 Peak	615 系鼠胸腺细胞 thymic cells from 615 line mouse		L_{7811} 腹水细胞 L_{7811} ascites cell	
	峰面积比值 Peak area ratios		峰面积比值 Peak area ratios	
	I	II	I	II
Pi	1.000	5.447	1.000	9.809
PCr	0.046	0.250	0.015	0.149
γATP (βATP)	0.215	—	0.134	—
αATP (αADP)	0.390	—	0.222	—
βATP	0.184	1.000	0.102	1.000

注: 峰面积比值 I; 以 Pi 峰面积为 1.000 时, 各相应峰面积与 Pi 峰面积的比值。峰面积比值 II; 以 $\beta\text{-ATP}$ 峰面积为 1.000 时, 各相应峰面积与 $\beta\text{-ATP}$ 峰面积的比值。

Notes: Peak area ratio I: The ratio of appropriate peak area to Pi peak area, if Pi peak area is 1.000. Peak area ratio II: The ratio of appropriate peak area to $\beta\text{-ATP}$ peak area, if $\beta\text{-ATP}$ peak area is 1.000.

表 2 L_{7811} 腹水细胞和 615 系鼠胸腺细胞有关磷酸酯的 ^{31}P -NMR

Table 2 ^{31}P -NMR of correlation phosphoesters for L_{7811} ascites cell and thymic cells from 615 line mouse

峰 Peak	615 系鼠胸腺细胞 thymic cells from 615 line mouse	L_{7811} 腹水细胞 L_{7811} ascites cell
	峰面积比值 Peak area ratio III	峰面积比值 Peak area ratio III
Sp	1.598	5.030
Pcho, PEtn	1.000	1.000
GroPcho	—	—
GroPEtn	0.641	0.284

注: 峰面积比值 III 是以 Pcho 和 PEtn 峰面积为 1.000 时, 各相应峰面积与 Pcho、PEtn 峰面积的比值。

Notes: Peak area ratio III: The ratio of appropriate peak area to Pcho, PEtn peak area, if the peak area of Pcho and PEtn is 1.

有氧呼吸和无氧呼吸两种代谢途径; 随着肿瘤的生长, 无氧酵解成为能量生成的主要途径, 以

致在晚期阶段肿瘤细胞代谢进入不活跃状态, ^{31}P 谱显示的主要共振峰为 Sp 和 Pi, pH 明显减小。这说明肿瘤细胞处于低氧或无氧状态。肿瘤细胞的这种特有的代谢趋势称为 Gompertzian growth pattern^[4]。

实验结果表明,在 L_{7811} 腹水细胞中 α -, β -, γ -ATP 和 PCr 的峰面积比值 I 均比 615 胸腺细胞相应峰面积比值 I 明显减小。在比较峰面积比值 II 时,可发现 L_{7811} 腹水细胞 Pi 相对含量明显增加,而 PCr 明显减少。峰面积比值 III 数据表明 L_{7811} 腹水细胞中 Sp 相对含量明显高于 615 胸腺细胞 Sp 含量。这些结果说明 L_{7811} 腹水细胞在生长晚期,其含磷化合物能量代谢已由活跃状态进入不活跃状态,而未进入完全不活跃状态(此时仍能检出 ATP)。作者认为这可能是白血病腹水肿瘤细胞在能量代谢上与实质性肿瘤细胞的主要区别。 L_{7811} 腹水细胞 ^{31}P 谱第二个特点是 GroPEtn 和 GroPch 相对含量降低(见表 2)。说明肿瘤细胞某些磷脂合成代谢障碍,从而影响质膜和线粒体膜结构组成及其功能,这可能是肿瘤细胞氧化磷酸化作用发生障碍的一个因素。本文结果(Pcho, PEtn 和 GroPch, GroPEtn 均减少)与甘午君等^[14]分析结果相似,而与 G. Navon 等人^[18]结果相反。另外 L_{7811} 腹水肿瘤细胞也存在 UDPDE 峰,这与报道资料是一致的^[16,18,19]。但 UDPDE 的生理和病理意义尚不清楚,有待进一步探讨。

本工作得到中国医科院血液学研究所褚建新研究员提供的 L_{7811} 淋巴细胞白血病腹水肿瘤鼠和该所实验动物中心提供的 615 系小鼠,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Burt C T. *Phosphorus NMR in biology*. Florida: CRC Press Inc, 1987: 185
- 2 藏尾芳辉,村上政隆,亘弘. 代谢, 1986; 23(1): 83
- 3 Beall P T, Amtey S R, Kasturi S R. *NMR data handbook for biomedical application*. New York: Pergamon press Inc, 1984: 23
- 4 Ng T C, Evanochko W T, Hiramoto R N *et al.* *J Magn Reson*, 1982; 49: 271
- 5 Evanochko W T, Ng T C, Glickson J D *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1983; 109: 1346
- 6 Griffiths J R, Cady B, Edwards R H *et al.* *Lancet*, 1983; 1 (8334): 1435
- 7 Bore P. *Lancet*, 1983; 2(8147): 458
- 8 Bailey I A, Williams S R, Radda G K *et al.* *Biochem J*, 1981; 196: 171
- 9 Jacobus W E, Pores I H, Lucas S K *et al.* *J Mol Cell Cardiol*, 1982; 14(Suppl 3): 13
- 10 Flaherty J T, Weisfeldt M I, Bulkley B H *et al.* *Circulation*, 1982; 65: 561
- 11 Chace B, Eleff S, Bank W *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 7714
- 12 Ross B D, Radda G K, Gadian D G *et al.* *Ciba Found Symp*, 1982; 87: 145
- 13 Eleff S, Kennaway N G, Bvist N R M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984; 81: 3529
- 14 甘午君,温世鼎,褚建新等. 生物化学与生物物理进展, 1984; (1): 59
- 15 Sellevold O F M, Jynge P, Aarstad K. *J Mol Cell Cardiol*, 1986; 18(5): 517
- 16 Adams D A, Denardo G L, Denardo S T *et al.* *Magnetic Resonance in Medicine*, 1985; 2: 419
- 17 Lilly M B, Ng T C, Evanochko W T *et al.* *Cancer Research*, 1984; 44: 633
- 18 Navon R, Shulman R G, Yamane T. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; 75(2): 891
- 19 Христианович Д С, Кнубовец Т Л, Сибельдина Л А *et al.* *Биофизика*, 1985; 30(5): 905

[本文于1989年3月9日收到]

THE STUDIES OF CELL FROM L₇₈₁₁ LEUKEMIA MOUSE BY ³¹P-NMR

Zhang Naizhong Wang Fengru Ma Liying Han Qinzhong
Wang Junheng Liu Xiuping
(Harbin Medical University)

Wu Jiazhen Zhou Shuhua
(Institute of Biophysics, Academia Sinica Beijing)

ABSTRACT

Using ³¹P-NMR to study the high energy phosphates of mouse L₇₈₁₁ ascites cells with thymic cells from 615 line mouse as control. The results showed there was clear differences between them.

Even in the late stage of growth, L₇₈₁₁ ascites cells was not completely in an inactive state. For example, the ratio of phosphocreatine (PCr) and α -, β -, γ - adenosine triphosphate (α -, β -, γ -ATP) to phosphate (Pi) was greatly decreased but not completely inactive. The ratio of sugar phosphate (Sp) to phosphocholine (Pcho) plus phosphoethanolamine (PEtn) increased, while glycerol (3) phosphocholine (GroPCho) plus glycerol(3) phosphoethanolamine (GroPEtn) decreased.

Preliminary studies showed that ³¹P-NMR spectra are sensitive monitor to the progressive changes of the high energy phosphate metabolism of the L₇₈₁₁ ascites growth.

Key words ³¹P-nuclear magnetic resonance, ascites cell, thymic cell, phospholipid, high-energy phosphate

(上接第237页)

7. 重复性 取一份正常人血清,分四次测定 Mn-SOD 和 T-SOD 活力,每次4份,共测16次。Mn-SOD: $\bar{x} \pm SD = 17.1 \pm 1.18$, 变异系数 $CV = 6.9\%$, T-SOD: $\bar{x} \pm SD = 53.4 \pm 1.70$, $CV = 3.2\%$ 。

8. 回收率试验 正常人血清加入五份不同量 SOD 标准品,进行回收试验,得回收结果为 97.4—107.2%,平均回收率 101.9%。

二、临床应用

1. 正常值 对90例年龄为1—80岁的健康男女血清 Mn-SOD 和 T-SOD 活力进行测定,其中男46例,女44例,12岁以下和60岁以上各20人,13—59岁50人,经统计学处理,男女之间,各年龄组之间无明显差异。结果如下: Mn-SOD 活力为 17.0 ± 3.6 , T-SOD 活力为 52.4 ± 8.9 Cu,Zn-SOD 活力为 35.4 ± 7.9 。

2. 初步临床观察 对各种肿瘤、冠心病、糖尿病、肾病等病人的血清 SOD 进行了初步观察。其中变化较显著的有癌肿和肾衰病人。癌肿病人血清 Mn-SOD

活力显著升高,而 Cu,Zn-SOD 活力与正常人相比无明显差异。肾衰病人血清 Mn-SOD 和 Cu,Zn-SOD 活力均非常显著高于正常人。其详细结果将另文报道。

综上所述,本文报道的 SOD 活力测定方法,操作简便,快速,用血量少,不需特殊设备和试剂,测定性能良好,适用于临床和科学研究。

参 考 文 献

- 1 McCord JM *et al.* *J Biol Chem*, 1969; **244**: 6049
- 2 Nishikimi M. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976; **63**: 463
- 3 Oyanagui Y. *Biochem Pharmacol*, 1978; **27**: 777
- 4 Minami M *et al.* *Clin Chim Acta*, 1979; **92**: 337
- 5 Elstner E F *et al.* *Anal Biochem*, 1976; **70**: 616
- 6 Oyanagui Y *et al.* *Anal Biochem*, 1984; **142**: 290
- 7 McPhail L C *et al.* *J Clin Invest*, 1979; **63**: 648
- 8 李益新等. 生物化学与生物物理进展, 1983; (2): 59
- 9 赵厚安等. 生物化学杂志, 1988; **4**: 29

[本文于1989年5月15日收到]