

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

缓冲液 (6.4mmol/L Na_2HPO_4 , 1.4mmol/L KH_2PO_4 , 137mmol/L NaCl 和 2.6mmol/L KCl , pH6.8)。混合后通入氮气和用 CQ50 型超声发生器(上海超声仪器厂产品, 25W) 超声处理, 直至这混合物放置 30min 不分层(超声时间一般为 5min), 然后移到旋转蒸发器上, 加热温度 30℃, 转速 150r/min, 水泵减压进行蒸发, 随着溶剂挥发, 溶液很快成浆糊状。当有机溶剂挥发完全, 糊状物变成均相液体, 即完成脂质体对 HA 的包封。

1.3 HA-脂质体的纯化 上述得到的均相液体为混合物, 用 Sepharose 4B 凝胶柱 ($\phi 2.5\text{cm} \times 30\text{cm}$) 层析进行纯化, 洗脱液为上述磷酸盐缓冲液, 洗脱液流速为 10ml/h, 未包封的 HA 因不溶于磷酸盐而保留在凝胶柱顶部。溶于磷酸盐的 HA-脂质体被洗脱下来, 且这一可见色带集中于柱层析外水体积部分, 据电镜观察所制的 HA-脂质体形态为均匀的球状物。

1.4 光谱测定 可见光谱和荧光光谱分别在 HP8451A 紫外可见分光光度计及 Perkin-Elmer Ls-5 型荧光光度计上测量。

HA-脂质体中 HA 的浓度测定: 用氯仿将 HA-脂质体中的 HA 萃取, 在紫外-可见光谱仪上测最大吸收处的光密度, 由相应体系测得标准曲线上读出所测脂质体中 HA 的浓度。

荧光猝灭实验: 脂质体中 HA 的浓度为 10^{-3}mol/L , 激发波长为 460nm, 每次加入 60mg KI, 避光放置 15min。检测 HA 的荧光强度变化 ΔF , 按 Stern-Volmer 方程 $F_0/\Delta F = 1 + (K_q\tau)^{-1}[Q]^{-1}$ 处理数据, 其中 K_q 为猝灭速率常数, τ 为荧光寿命, $[Q]$ 为猝灭剂浓度。

2 结果与讨论

2.1 HA-脂质体的光谱性质

HA 作为一种新型的光疗药物和光敏剂, 其自身的光物理和光化学性质随环境的变化情况对研究 HA 的光敏特性和光疗机制十分重要。

2.1.1 吸收光谱

表 1 和图 1 分别示出了 HA 在氯仿, 甲醇中及 HA-脂质体在磷酸盐缓冲液中的吸收光谱。从图 1 可以看出: HA 被脂质体包封制成水剂, 其峰型及位置发生变化。由茚醌环上的 $\pi\pi^*$ 电子跃迁所引起的 I 峰出现稍许红移且峰形变宽, 由茚醌环两端的羰基, 羟基发生质子传递所引起的 II 峰消失变成不明显的肩峰, 而 III 峰位置基本保持不变, 但 III 峰相对吸收强度比 II 肩峰要小。HA 在有机溶剂中情况却正好相反。这种现象可根据 Frank-Condon 原理进行说明, 即处于基态平衡态 S_0 的分子受辐照后被激发到 Frank-Condon 激发态 S'_1 , 然后经非辐射弛豫到激发平衡态 S_1 , 再经荧光辐射跃迁至 Frank-Condon 基态 S_0 , 最后再由 S'_1 弛豫到 S_0 基态平衡态。这种非辐射弛豫主要起源于溶

表 1 HA 在有机溶剂中和 HA-脂质体在磷酸盐缓冲溶液中的吸收光谱的比较¹⁾

溶剂体系	吸收峰			相对强度		
	I	II	III	I	II	III
HA · CHCl_3	464	542	582	1	0.455	0.470
HA · CH_3OH	466	538	580	1	0.441	0.484
HA-liposomes · PBS	472	540 ²⁾	580	1	0.602	0.457

1) HA 浓度约 $3.5 \times 10^{-5}\text{mol/L}$; 2) 肩峰

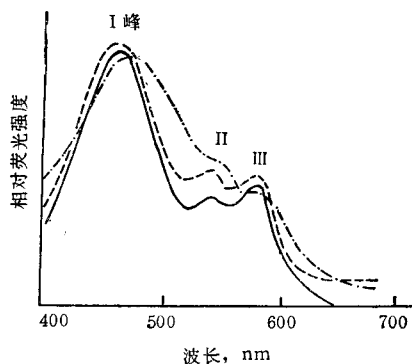


图 1 HA 在不同溶剂中的吸收光谱
氯仿(—); 甲醇(---); HA-脂质体在磷酸盐缓冲液中(- · -)

剂笼中分子的取向和溶剂与溶质分子间的相互作用, 在吸收光谱方面表现为峰形及位置的变化。HA 被脂质体包封后处于其亲脂层中, 水对 HA 的作用较小, HA 和卵磷脂分子间可通过偶极-偶极间的静电相互作用从而使源于

茚醌环上的 $\pi\pi^*$ 电子跃迁所形成的 I 峰出现红移且峰形变宽。由于水分子对 HA 的作用较小,因此来源于 HA 分子内质子传递的吸收带 II 和 III 的位置保持不变。

2.1.2 荧光发射光谱

HA 对癌细胞具有光动态作用,利用 HA 的荧光特性可做成探针分子来诊断癌组织,因此有必要了解环境对 HA 的影响。

图 2 所示为不同溶剂 (HA 浓度相同) 条件下,HA 的荧光发射光谱。HA-脂质体在 PBS 中荧光发射峰出现少许 (4nm) 红移且有增强效应。说明 HA 被脂质体包复后处于脂质体的油层中,环境的拘束减少了 HA 的非辐射跃迁几率和水的猝灭作用从而出现荧光增强

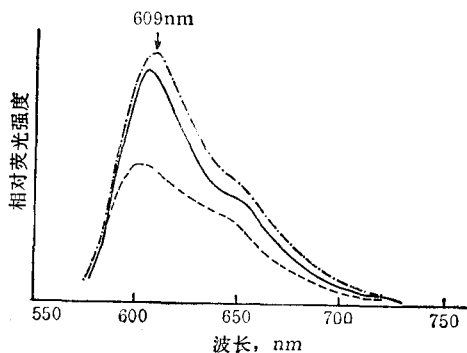


图 2 不同体系中 HA 的荧光光谱
甲醇(---);氯仿(—);HA-脂质体(-·-·-)
浓度为 $2.4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $\lambda_{\text{ex}} = 609 \text{ nm}$

效应。HA-脂质体的这种荧光增强现象更有利于体内病灶的荧光探针。

碘离子是一种负电水合性离子,常用作荧光猝灭剂来研究体系的微环境^[6,7]。根据实验,以 $F_0/\Delta F$ 对碘离子浓度的倒数作图,其中 F_0 为不加碘离子猝灭剂时的荧光强度, ΔF 为不加碘离子猝灭剂与加碘离子时的荧光强度之差,结果得到一条服从 Stern-Volmer 方程的直线(图示略)直线斜率 $[K_q\tau]^{-1}$ 为 0.42 mol/L , 根据 HA 的寿命 τ 为 $1-2 \text{ ns}$ ^[8], 可以求出碘离子在本体系中的猝灭常数 K_q 约为 $1 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 与扩散系数 ($K_{\text{diff}} \sim 1 \times 10^8 - 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)^[9] 相近,碘离子的猝灭过程可能为动态猝灭控制过程,被脂质体包封的

HA 只有处于外面疏水层其荧光才有可能被猝灭剂猝灭。

2.2 HA-脂质体的稳定性

制备的 HA-脂质体 (浓度 0.05 mg/ml) 分别在冰箱 4°C , 室温 24°C 避光, 室温日光灯 30 W 照射和加热 38°C 避光等条件下放置,测定在波长 472 nm 处吸光度随时间的变化及脂质体被破坏 HA 沉淀出现的时间。

图 3 给出了在上述条件下,HA-脂质体在 PBS 中的光密度随存放时间的变化趋势,从图中可以看出: a. 随着温度的升高,其光密度明显下降且随着时间的延续光密度变化更大,但在冰箱中保存密度变化较平稳,3d 后光密度下降仅为 5% 左右; b. 相同温度条件下,光照比不光照的光密度随时间而下降较快。

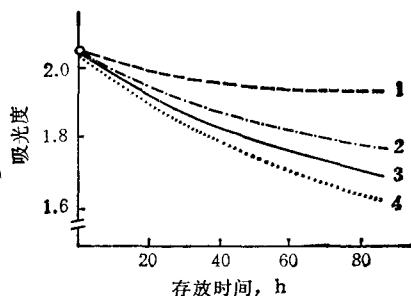


图 3 不同条件下 HA-脂质体的光密度随存放时间的变化趋势
1: 4°C , 2: 24°C , 3: 24°C 和光照, 4: 38°C

本实验还观察了在低浓度和较高浓度时,HA-脂质体的稳定性。低浓度 (0.025 mg/ml) 在 4°C 存放 100 h , 其光密度基本上不变化,因此低浓度的 HA-脂质体 PBS 体系是比较稳定的。当浓度大于 0.5 mg/ml 时,其光密度变化率较大随着时间的延续 I 峰出现紫移,同时还可观察到 HA 的沉淀,表明脂质体逐渐解体,HA 被释放。高浓度 (大于 1 mg/ml) 在冰箱中存放不能超过 24 h 。

基于 HA-脂质体在 PBS 中易被氧化且 HA 光照易产生单重态氧的特点,因此 HA-脂质体易在 N_2 中保护,低温和避光条件下存放。

根据文献[2],对带肿瘤的小鼠给药后,HA 在肝肺肾和瘤组织部位的含量最高;给药 24 h ,

HA 可代谢完毕。水不溶的 HA 经脂质体包埋变成水溶剂，在动物体内的代谢情况还有待于进行实验，不过可以预期 HA-脂质体若配上相应的抗体，很有可能实现靶体给药。本实验未能制备 HA 浓度大于 0.5mg/ml 的稳定脂质体体系并用于动物实验，这有待于深入研究。

参 考 文 献

- 1 Papahadjopoulos D ed, *Liposomes and their Uses in Biology and Medicine*, Ann N Y Acad Sci; 1978; 308: 345

- 2 傅乃武等. 中华肿瘤杂志, 1988; 10: 80
- 3 傅乃武等. 第二届全国光生物学讨论会论文集, 苏州: 中国生物物理学会编, 1988; 31
- 4 Singleton WS et al. *J Amer Oil Chem Sci*, 1965; 42: 53
- 5 Szaka F et al. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1978; 75: 4194
- 6 Lehrer SS. *Biochemistry*, 1971; 10: 3254
- 7 Einarsson R. *Int J Peptide Protein Res*, 1977; 10 (5): 342
- 8 刘景瑶等. 感光科学与光化学, 1986; (1): 36
- 9 Lakowicz JS. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* New York: Plenum press, 1983: 257—275

超氧化物歧化酶活性的肾上腺素自氧化紫外测定法

葛 春 华

(江南大学医学系, 无锡 214063)

提 要

实验表明肾上腺素自氧化过程的 325nm 吸收峰远比 480nm 吸收峰高和稳定, 并用超氧化物歧化酶 (SOD) 标准样品和人红细胞样品建立了 SOD 活性的肾上腺素自氧化紫外分光测定法 (A_{325})。方法简便、快速, 比用 480nm 的方法更为灵敏, 并有良好的定量性和重复性。

关键词 超氧化物歧化酶, 肾上腺素自氧化, 红细胞

肾上腺素在碱性溶液中自氧化产生的肾上腺素红在 480nm 有吸收峰。超氧化物歧化酶 (SOD, EC 1.15.1.1) 能抑制肾上腺素自氧化。基于此曾建立 SOD 活性肾上腺素自氧化测定法 (A_{480})^[1-3]。此方法简便、快速, 但在 Yoshihiko Oyanagui^[4] 评价的 8 种方法中其灵敏度居中。1978 年 Sun 和 Zigman^[5] 提出肾上腺素自氧化产物肾上腺素红不稳定、其 480nm 吸收峰低平, 而另有产物在紫外部分有稳定的更为明显的吸收区, 用于测定 SOD 活性其灵敏度可提高 6—10 倍。但他们没有建立实际应用的测定方法。本文在研究肾上腺素自氧化过程紫外吸收的基础上, 建立了 SOD 活性肾上腺素自氧化紫外测定法 (A_{325})。

1 材 料 和 方 法

1.1 试剂和仪器 L-肾上腺素是 Fluka 产品, 人红细胞 SOD 由上海生物化学研究所生产 (10000U/mg), 无水乙醇为保证试剂, 其它试剂皆为分析纯。用岛津 UV-265FW 紫外可见记录分光光度计。

1.2mmol/L 肾上腺素溶液用 2mmol/L HCl 现配。SOD 现配成 12 μ g/ml 的溶液。pH7.40 的等渗磷酸缓冲液是用 0.103mol/L 磷酸氢二钠和 0.155mol/L 磷酸二氢钠 7:1 混合再调 pH 而配成。另配 pH 为 7.70, 8.37, 8.73,