

stimulating factors. Science, 1987, **236**: 1229~ 1237

15 Petraglia F, Gallinelli A, Grande A *et al.* Local production and action of follistatin in human placenta. J Clin Endocrinol Metab, 1994, **78** (1): 205~ 210

Regulation of Follistatin Messenger Ribonucleic Acid in Human Choriocarcinoma Cell Line Jar by Epidermal Growth Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. YANG Ming, ZHANG Zhiwen (*Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*); HOU Weimin (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China*).
Abstract The experiments were designed to test follistatin mRNA expression and regulation by EGF and GM-CSF in human choriocarcinoma

cell line Jar using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. The results showed as follows: 1. EGF induced a dose-dependent accumulation of follistatin mRNA level, with maximal increase at a dose of 1.0 nmol/L. 2. Although GM-CSF did not affect the follistatin mRNA expression alone, it could reduce the follistatin mRNA level enhanced by EGF in a dose-dependent manner, the maximal effect dose was 10 nmol/L, the rate of inhibition could reach 62.3%. Those results indicated that follistatin gene expression was regulated by both hormones and growth factors in endocrine and paracrine/autocrine manner.
Key words follistatin, gene expression, EGF, GM-CSF

C₆₀对体外培养癌细胞的光致作用研究*

钱凯先 严庆丰 黄文栋
(浙江大学生物科学与技术系, 杭州 310027)

李文铸
(浙江大学物理学系, 杭州 310027)

摘要 研究结果表明用 C₆₀ 磷脂酰胆碱与体外培养的 HeLa 细胞融合后, 以 4 000 lx 光强度激发 C₆₀ (C₆₀ 浓度 20 mg/L) 对 HeLa 细胞具有显著的光致杀伤作用. 生化测定证实光激发 C₆₀ 导致膜蛋白巯基含量减少、膜脂过氧化、丙二醛含量增高, SDS-PAGE 证明膜蛋白交联, 荧光偏振显示膜流动性降低, 电镜超微膜结构破坏, 经 MTT 法检测, 大部分细胞死亡. C₆₀ 的强烈光致作用证实了 Arbogast 等认为光激发 C₆₀ 可产生单线态氧的观点.

关键词 富勒烯 (C₆₀), 癌细胞, 自由基, 光致作用

富勒烯 C₆₀ 是碳的第三种分子形态, 它的发现和制备是 90 年代最重要的科技成就之一. 1990 年 Krätschmer 等^[1] 宏观量制备 C₆₀ 取得成功以来, 揭示了许多重要而奇特的性质, 并迅速开创了一个新兴研究领域——富勒烯 C₆₀ 研究. Arbogast 等^[2] 报道, 光激发 C₆₀ 可使其从基态跃迁为三重态, 这是一种有效的电子受体系统, 具很高的电子传递效率; 另一方面, 激发态³C₆₀ 能被氧分子 (O₂) 有效猝灭, 可产

生量子产额高达 0.96 的单线态氧 (¹O₂), 并预言 C₆₀ 在生命系统中可能存在重要作用. 然而, 由于 C₆₀ 水不溶性等障碍, 它在生命科学领域的研究进展缓慢, 目前仅见个别研究报告, Sijbesma 等^[3~5] 合成的 C₆₀ 衍生物可以有效抑制爱滋病毒蛋白酶和逆转录酶的活性, Tokuyama 等^[6] 发现富勒烯羧酸能专一性剪切

* 浙江省自然科学基金资助项目.
收稿日期: 1996-05-24, 修回日期: 1996-10-27

DNA 链的鸟嘌呤 G 基团, Tsuchiya 等^[7]报道光激发 C₆₀可促进小鼠肢芽培养细胞的软骨形成. 1992 年以来, 我们开展了 C₆₀生物学的实验, 研究成功制备水溶性 C₆₀ 磷脂酰胆碱包结物^[8], 为 C₆₀生物学研究提供了方法基础. 本文研究报道了光激发 C₆₀ 磷脂酰胆碱对体外培养癌细胞的光动力学作用, 主要研究对膜蛋白和膜脂分子的一系列反应和变化, 并初步探讨了这一作用机制.

1 材料和方法

1.1 实验材料

HeLa 细胞 (人子宫颈癌细胞株), 由浙江省肿瘤医院提供. 人新鲜血液, 由浙江省中心血站提供.

1.2 主要试剂

RPMI 1640 培养基, Gibco 公司. 胰蛋白酶, Difco 进口分装. 噻唑蓝 (MTT), Sigma 公司. DPH (1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯) Fluka 公司. 二甲亚砜 (DMSO), Merck 公司. DTNB (5, 5-二硫代双 [2-硝基苯甲酸]), Fluka 公司. 2-巯基乙醇 (2-ME), Fluka 公司. Sepharose 4B, Pharmacia 公司. 胎牛血清, 杭州四季青生物工程公司. 卵磷脂, 华东师范大学等. 所有溶液配制均用三蒸水.

1.3 主要仪器

超声波细胞破碎器, B-30 型, Branson Ultrasonics Co. USA. 紫外-可见分光光度计, Du-50 型, Beckman Co. USA. CO₂ 自动细胞培养箱, VWR model 1720, Forma Co. USA. 石墨电弧蒸发装置, 浙江大学物理系自制. 酶联免疫检测仪 (ELISA), DG 3022 型, 华东电子管厂. 高速离心机, ZOPR-52 型, Hitachi Co. Japan. 电泳仪, Bio-Red Co. Sweden. 荧光分光光度计, 850 型, Hitachi Co. Japan.

1.4 C₆₀及 C₆₀ 磷脂酰胆碱的制备纯化

1.4.1 C₆₀的制备、纯化: 分别采用改良的电弧法^[1]和柱色谱分离法^[9], 得到纯度 > 99% 的黑色固体粉末.

1.4.2 C₆₀ 磷脂酰胆碱的制备, 纯化: 采用 Li 等^[8]的方法, 得到 C₆₀ 含量约为 300 mg/L 的 C₆₀ 磷脂酰胆碱包结物, 经 $\Phi 0.22 \mu\text{m}$ 的硝酸纤维膜过滤, 灭菌后, 于隔绝空气条件下, 低温贮藏备用.

1.5 光激发 C₆₀处理 HeLa 细胞

1.5.1 HeLa 细胞的培养: 用 RPMI 1640 培养液 (加 10% 胎牛血清, 100 单位/ml 青霉素-链霉素双抗液和 2 mmol/L L-谷氨酰胺), 在 5% CO₂, 37 °C, 相对湿度 95% 的自动细胞培养箱中培养 HeLa 细胞, 每 4 天继代一次. 选择培养 2~3 d 时生长良好的细胞作为实验材料.

1.5.2 光激发处理: 经 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 加入等体积的 C₆₀ 磷脂酰胆碱-RPMI 1640 作用液, 在培养箱中共育 1 h 后, 置于碘钨灯下隔热照射 30 min. 按此方法分别作不同 C₆₀ 浓度和不同光照强度的处理.

1.5.3 MTT 检测: 参照 Mosmann^[10]的方法. 将以上处理过的 HeLa 细胞转接到 96 孔板上 (200 μl /孔) 继续培养 4 h. 酶标仪测定 490 nm 光吸收.

1.6 光激发 C₆₀处理红细胞膜

1.6.1 红细胞膜的制备: 制备参照 Steck 和 Kant 方法^[11], 蛋白含量的测定参照 Brandorf 的方法^[12]. 取含膜蛋白为 1 g/L 的红细胞膜液, 加入适量的 C₆₀二硫化碳溶液 (C₆₀浓度 $2 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), 经氮气吹干 CS₂ 后, 于 37 °C 恒温水浴 1 h, 使红细胞膜重新封闭, 同时 C₆₀结合到红细胞膜上.

1.6.2 膜蛋白巯基 (—SH) 含量的测定: 参照 Ellman 的方法^[13]. 测定 412 nm 处的光吸收, 按公式 $C = D \times A / \varepsilon$ 计算巯基含量. 其中 C 为样品中 —SH 含量, ε 为摩尔消光系数 $1.14 \times 10^4 / (\text{mol} \cdot \text{cm})$, A 为 412 nm 处光吸收值, D 为稀释倍数.

1.6.3 膜脂丙二醛 (MDA) 含量测定: 参照 Brownlee 等^[14]的方法. 测定 534 nm 处的光吸收, 公式同上, 其中 MDA 摩尔消光系数为

$1.52 \times 10^5 / (\text{mol} \cdot \text{cm})$.

1.6.4 膜流动性的测定: 按照 Yonei 等的方法^[15]. 发射波长 430 nm, 激发波长 362 nm, 分别测定 I_{vv} 、 I_{vh} 、 I_{hv} 、及 I_{hh} 四个方向的荧光偏振值, 并按下列公式计算校正因子 G , 荧光偏振强度 P 、和微粘度 η ^[16]:

$$G = I_{hv} / I_{hh};$$
$$P = (I_{vv} - GI_{vh}) / (I_{vv} + GI_{vh});$$
$$\eta = 2P / (0.42 - 0.92P).$$

2 结 果

2.1 光激发 C₆₀处理对 HeLa 细胞存活率影响

2.1.1 C₆₀浓度: 取培养 3 d 的 HeLa 细胞, 加入 C₆₀ 磷脂酰胆碱-RPMI 1640 作用液, 使 C₆₀ 终浓度分别为 0、10、20、30、40、50 mg/L, 经共育和 6 000 lx 光激发处理后, 进行 MTT 检测. 以未经任何处理的正常生长细胞作阴性对照, 不含细胞的 RPMI 1640 培养液作空白对照, 计算得到上述处理细胞的相对存活率分别是 (86 ± 5)%、(70 ± 6)%、(6 ± 3)%、(7 ± 2)%、(4 ± 3)% 和 (0 ± 2)% (图 1). 结

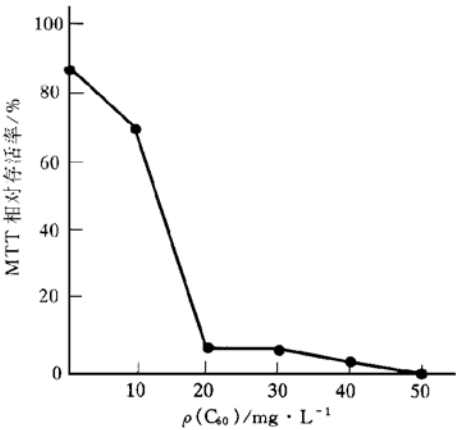


图 1 C₆₀浓度对 HeLa 细胞存活率的影响

果表明, 随着 C₆₀浓度的升高, 光激发 C₆₀对 HeLa 细胞的损伤加剧; 当 C₆₀浓度达到 20 mg/L 时, 则产生十分显著的细胞杀伤效应, 细胞的存活率仅 6% 左右. 另一方面, 虽然 C₆₀浓度为 0, 但经 6 000 lx 光照处理的细胞,

其相对存活率也仅为对照的 86%, 表明高光强对细胞的正常生长具有一定的抑制作用.

2.1.2 光激发强度: 当 C₆₀浓度为 30 mg/L 时, 比较了不同光照强度激发 30 min 后, HeLa 细胞相对存活率的变化 (图 2). 当光照强度为 0 时 (黑暗培养), 细胞相对存活率仍高达 (90.2 ± 8.8)%, 与正常生长细胞没有显著差异, 表明未经光照激发的 C₆₀, 其细胞毒性很小. 分别以 1 000、2 000 lx 光激发处理, 细胞存活率急剧下降, 分别为对照组的 (25.1 ± 5.5)% 和 (10.0 ± 5.5)%; 进一步将光照强度提高到 4 000 lx、7 000 lx, 则细胞完全死亡. 结果表明, 光照激发, 对于 C₆₀的细胞杀伤作用是必需的条件, 就是说 C₆₀对细胞具有光致效应.

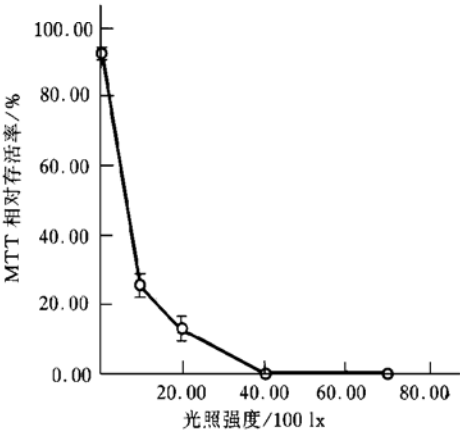


图 2 光照强度对 HeLa 细胞存活率的影响

2.2 光激发 C₆₀处理对红细胞膜的作用

2.2.1 膜蛋白巯基含量: 以未经光照的 C₆₀ 红细胞膜巯基含量为正常对照, 分别以 1.33×10^4 lx 光激发 C₆₀ 红细胞膜 5、10、20、30、40 min, 结果, 其膜蛋白巯基含量分别为对照组的 73%、67%、64%、61% 和 57%. 可见只要给予短时间 (5 min) 光照激发, 膜蛋白巯基含量即有显著降低, 并随光照时间的增加而继续下降, 但下降速率趋于平缓. 这表明 C₆₀的光敏激发反应十分灵敏 (图 3).

2.2.2 丙二醛含量: 丙二醛含量是衡量膜脂

过氧化的指标产物. 正常红细胞膜的丙二醛含量为 5.4 微摩尔每克膜蛋白, 以 5 min 光照激发 C₆₀, 丙二醛含量很快升高到 10.2 微摩尔每克膜蛋白, 当光照激发时间延长到 10 min、30 min, 丙二醛含量变化不大, 分别为 11.5 微摩尔每克膜蛋白和 12.1 微摩尔每克膜蛋白, 继续延长光照至 50 min, 丙二醛则进一步提高到 13.4 微摩尔每克膜蛋白. 实验表明光照 C₆₀使细胞膜中丙二醛含量随光照时间增加而增大 (图 4).

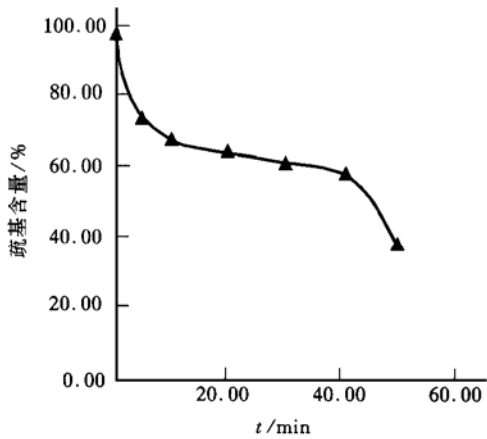


图 3 光照时间对膜蛋白巯基含量的影响

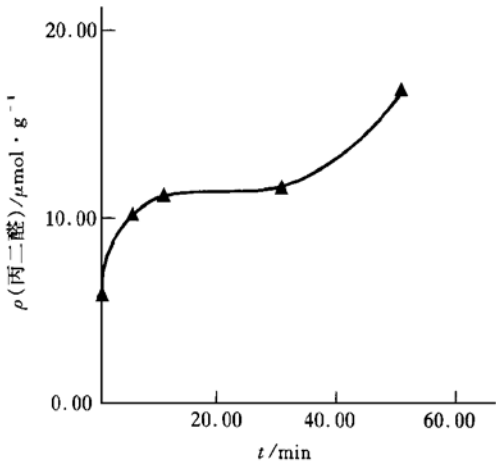


图 4 光照时间对丙二醛含量的影响

2.2.3 膜的流动性: 如图 5 所示, 比较了不同光照时间处理对细胞膜荧光偏振强度、微粘度的影响. 未经光照处理的对照组, 荧光偏振强度 (P) 和微粘度 (η) 分别为 0.127 和

1.511, 光照处理 10、20、30 min 后, 其 P 分别为 0.297、0.298 和 0.301, η 分别为 4.029、4.079 和 4.207. 可见, 光照激发 C₆₀, 红细胞膜的荧光偏振强度和微粘度都有显著的提高, 但是光照时间从 10 min 延长到 30 min, 无论是荧光偏振强度, 还是微粘度, 虽然都有一定程度的提高, 但差异不显著.

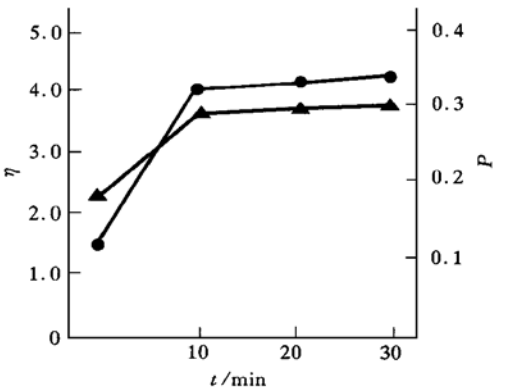


图 5 光照时间对膜流动性的影响

● — ●: 微粘变, ▲ — ▲: 荧光偏振强度.

3 讨 论

Arbogast 等报道, 在有氧气存在时光照激发 C₆₀, 可使处于基态的 C₆₀分子吸收光子后变成单线激发态 (¹C₆₀), 它的寿命很短, 很快发生系间窜越, 使电子自旋方向反转, 成为三线激发态 (³C₆₀), 然后通过能量转移, 激发氧分子产生单线态氧 (¹O₂), 它比分子氧具有更为活泼的化学反应性, 能攻击细胞蛋白质、类脂和核酸等生物大分子, 导致细胞损伤. 本研究在成功制备水溶性 C₆₀磷脂酰胆碱的基础上, 研究了光照激发 C₆₀磷脂酰胆碱对癌细胞株的生物学效应. 结果表明, 在黑暗条件下, C₆₀磷脂酰胆碱的细胞毒很小, 而在光激发条件下, C₆₀具有强烈的细胞杀伤作用, 并且与光照强度和 C₆₀浓度正相关, 说明这是一种光致损伤. 以本文 1.6.1 制备的 C₆₀红细胞膜为材料, 经光照激发 C₆₀处理后, 膜蛋白巯基含量急剧减少, 形成分子内或分子间二硫

键 (—S—S) 使膜蛋白分子交联. 由于巯基主要存在于蛋白质的活性中心, 它的破坏总会引起功能蛋白的活性丧失. 与此同时, 丙二醛含量的急剧增高, 表明膜脂产生过氧化反应. 膜蛋白和膜脂分子的变化, 也直接表现出膜的荧光偏振度和微粘度提高, 膜流动性降低, 脆性增加, 并导致膜结构破坏, 细胞死亡. 上述结果表明, 细胞膜是光激发 C₆₀的作用主要部位之一, 膜蛋白质和脂是其作用的靶分子. 这种光致作用主要是通过 C₆₀的三重态进行的, 它是否还存在其他氧自由基的作用, 尚有待进一步的研究和顺磁共振检测.

综上所述, C₆₀对 HeLa 细胞株的杀伤是一种光致作用, C₆₀是一种新型光敏剂, 它的单线态氧量子产额高, 而本身的细胞毒小, 在肿瘤治疗中具有潜在临床应用价值.

参 考 文 献

1 Krätschmer W, Lamb E D, Fostiropoulos K *et al.* Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature*, 1990, **347** (27): 354 ~ 358

2 Arbogast J W, Darmanyan A P, Foote C S *et al.* Photophysical properties of C₆₀. *J phys chem*, 1991, **95**: 11~ 12

3 Sijbesma R P, Srdamov G, Wudl F *et al.* Synthesis of a fullerene derivative for the inhibition of HIV enzymes. *J Am Chem Soc*, 1993, **115**: 6510~ 6512

4 Friedman S H, de Camp D L, Sijbesma R P *et al.* Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivates: Model building studies and experimental verification. *J Am Chem Soc*, 1993, **115**: 6505~ 6509

5 Schinazi R F, Sijbesma R P, Srdamov G *et al.* Competitive inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Antimicrobiol Agents and Chemotherapy*, 1993, **37**: 1707~ 1710

6 Tokuyama H, Yamago S, Nakamura E. Photoinduced biochemical activity of fullerene carboxylic acid. *J Am Chem Soc*, 1993, **115**: 7918~ 7919

7 Tsuchiya T, Yamakoshi Y N, Miyata N. A novel promoting action of fullerene C₆₀ on the chondrogenesis in rat embryonic, Limb bud cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **206** (3): 885~ 894

8 Li W Z, Qian K X, Huang W D *et al.* Water soluble C₆₀ liposome and the biological effect of C₆₀ to human cervix cancer cells. *Chim Phys Lett*, 1994, **11** (4): 207~ 210

9 Hare J P, Kroto H W, Taylor R. Preparation and UV/visible spectra of fullerenes C₆₀ and C₇₀. *Chem Phys Lett*, 1991, **177**: 394~ 398

10 虞冠华, 龙 娜, 施风霞等. MTT 法快速测定 TNF 活性. *细胞生物学杂志*, 1994, **3**: 48

11 Steck T L, Kant J A. Preparation of imperable ghosts and inside out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods in Enzymol*, 1974, **31**: 172~ 179

12 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biochem*, 1951, **193**: 265~ 269

13 Ellman G L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959, **82**: 70~ 77

14 Brownlee N R, Huttner J J, Panganamala R V *et al.* Role of vitamin E in glutathione-induced oxidant stress: Methemoglobin, Lipid peroxidation, and hemolysis. *J Lipid Res*, 1977, **18** (5): 635~ 644

15 Yonei S, Kato M. X-ray-induced structural changes in erythrocyte membranes studied by use of fluorescent probes. *Radiat Res*, 1978, **75**: 31~ 45

16 Skinitzky M, Barenholz Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta*, 1978, **515**: 367~ 394

Studies on the Photoaction Effect of C₆₀ on Cancer Cells *in vitro* and Its Mechanism.

QIAN Kaixian, YAN Qingfeng, HUANG Wendong (*Department of Bioscience and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*); LI Wenzhu (*Department of Physics, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*).

Abstract After the fusion between the C₆₀ phosphatidylcholine liposome (C₆₀ concentration as 20 mg/L) and HeLa cells and illumination with the Tungsten-Halogen lamp (4 000 lx, 30 min), the most of cells were killed by the evaluation of MTT assay (3- (4, 5-dimethythiazol-2-yl) -2, 5-diphenyl tetrazolium bromide). Biochemical test showed that photoexcited C₆₀ led to the decrease of the sulfhydryl content of the membrane protein and the increase of the malonaldehyde (MDA) with the peroxidation of the membrane lipid. SDS-PAGE showed the conjugation of the membrane protein. Fluorescence polarization (FP) indicated that the fluidity of the cell membrane increase.

Key words fullerenes (C₆₀), cancer cell, singlet oxygen, photodynamics