

- Res, 1998, **26** (7): 1551~ 1559
- 9 Smider V, Chu G. The end joining reaction in V (D) J recombination. Immunology, 1997, **45** (1): 189~ 197
- 10 Osipovich O, Durum S K, Muegge K. Defining the minimal domain of Ku80 for interaction with Ku70. J Biol Chem, 1997, **272** (43): 27259~ 27265
- 11 Cary R B, Chen F, Shen Z, *et al.* A central region of Ku80 mediates interaction with Ku70 *in vivo*. Nucleic Acids Res, 1998, **26** (4): 974~ 979

ku80 Gene Mutation of Radiosensitive Cell Line and Its DNA Binding Activity. JIANG Guo-Chun, YUAN Li-Zhen, GUO Xue-Min, WEI Kang, ZHANG Xue-Feng, JIA Xiang-Xu (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical*

Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract ku80 gene of radiosensitive cell line SX-9 was cloned by RT-PCR. Compared cDNA of the radiosensitive cell line with its parental cell line, it was found that there were two mutation sites in ku80 gene which could interact with DSB DNA and Ku70. It was confirmed by EMSA and Southwestern blot that the DSB end binding activity of Ku80 in the nucleus extract of the radiosensitive cell decreased greatly, which inferred that the radiosensitivity of the cell line is caused by dysfunction of its Ku80 protein.

Key words ku gene, DNA-PK, cell radiosensitivity, gene mutation

脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用的 ESR 谱研究*

孙润广¹⁾ 张 静 王永昌¹⁾

(陕西师范大学实验中心, 西安 710062)

摘要 用电子自旋共振 (ESR) 技术对液晶态多烯脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用进行了研究. 并探讨了其在抑制和杀伤癌细胞过程中可能具有的生物学意义. 实验发现: 油酸多相脂质体的影响使自旋标记物在 E_c 腹水肝癌细胞膜上的强固定化作用减弱, 弱固定化作用增强, 使自旋标记物运动自由度增加. 亚油酸多相脂质体的影响使自旋标记物在乳腺癌细胞膜上的强固定化作用增强, 弱固定化作用减弱, 使自旋标记物运动自由度受到限制. 蓖麻酸多相脂质体的影响使自旋标记物在 S₁₈₀ 实体瘤细胞膜上的强固定化作用增强, 弱固定化作用减弱, 使自旋标记物运动自由度受到限制. 结果表明, 多烯脂肪酸多相脂质体作用于膜蛋白引起了膜蛋白构象的变化.

关键词 液晶态, 生物膜, 脂质体, 多烯脂肪酸

学科分类号 Q6.3

多烯脂肪酸作为抗癌药物一直是一个十分活跃的研究领域^[1~8]. 有关多烯脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用的研究, 对进一步了解其杀伤癌细胞的机理, 具有非常重要的意义. 本文用电子自旋共振 (ESR) 技术, 研究了多烯脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用, 阐明药物作用于生物膜的分子机制, 探讨了多烯脂肪酸多相脂质体的液晶态结构在抑制和杀伤癌细胞过程中可能具有的生物学意义. 有助于从结构和功能上理解液晶态多烯脂肪酸多相脂质体抗癌活性的机理. 从生物膜的液晶态来认识、探索细胞膜的功能与肿瘤细胞的治疗之间的关系是一个令人鼓舞的途径, 有重要的学术价值和意义.

1 实验材料与方法

1.1 材料与试剂

油酸 (oleic acid)、亚油酸 (linoleic acid)、蓖麻酸 (ricinoleic acid)、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE)、非离子表面活性剂 (polysorbatum-80)、高效分散剂 (polyvinylpyrrolidone, PVP)、胆固醇 (cholesterol) 等从美国 Sigma 公司购买. Na₂HPO₄ (AR), NaH₂PO₄ (AR)、乙醚 (ether, AR) 等均为国产分析纯

* 国家自然科学基金资助项目 (29672042); 西安交通大学博士论文基金资助项目 (DFXJU 1998-9).

¹⁾ 西安交通大学理学院, 西安 710049.

Tel: (029) 5307620, E-mail: sunrun@pub.xjonline.sn.cn

收稿日期: 1999-05-04, 修回日期: 1999-10-28

试剂.

1.2 方法

1.2.1 脂质体的组分与制备: 由于脂肪酸不溶于水, 所以, 为了使脂肪酸均匀地分散于脂质体的双分子层中, 必须先将脂肪酸与磷脂酰乙醇胺、胆固醇及非离子表面活性剂共溶于乙醚中, 配成溶液, 然后将 PVP 溶于 M/15 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 过滤. 滤液置于三角具塞烧瓶中, 将该烧瓶放在磁力加热搅拌器上, 将温度控制在 60~70℃ 的范围内, 高速搅拌, 用微量注射器将溶有药物的乙醚溶

液缓慢加入, 加完后在上述温度范围内继续搅拌 90 min, 在显微镜下观察脂质体达到要求后, 将所制脂质体用 100℃ 流通蒸汽灭菌 30 min. 冷后振摇, 密闭保存待用. 多相脂质体的组分见表 1. 三种脂质体的稳定性用包裹标记物释放的半寿期决定. 当温度 $t = 37^\circ\text{C}$ 时, 脂质体包裹标记物释放的半寿期 $t_{1/2} = 202$ h. 当温度 $t = 22^\circ\text{C}$ 时, 脂质体包裹标记物释放的半寿期 $t_{1/2} = 198$ h. 油酸、亚油酸、蓖麻酸与 PE、胆固醇的比例为 PE: 胆固醇: 油酸 (亚油酸、蓖麻酸) = 2: 1: 1.

表 1 脂质体的组分

编号	名 称	组 分
样品 A	PE 脂质体	PE, PVP, PBS
样品 B	空白脂质体	PE, PVP, PBS, 胆固醇
样品 C	油酸脂质体	PE, PVP, PBS, 胆固醇, 油酸
样品 D	油酸多相脂质体	PE, PVP, PBS, 胆固醇, 油酸, 非离子表面活性剂
样品 E	亚油酸脂质体	PE, PVP, PBS, 胆固醇, 亚油酸
样品 F	亚油酸多相脂质体	PE, PVP, PBS, 胆固醇, 亚油酸, 非离子表面活性剂
样品 G	蓖麻酸脂质体	PE, PVP, PBS, 胆固醇, 蓖麻酸
样品 H	蓖麻酸多相脂质体	PE, PVP, PBS, 胆固醇, 蓖麻酸, 非离子表面活性剂

1.2.2 细胞培养和马来酰亚胺自旋标记 (maleimide spin labeling, MSL) 标记细胞的条件: 试验选用肝癌细胞、乳腺癌细胞、实体瘤细胞和正常肝细胞. 将上述几种细胞培养于 RPMI 1640 (Gibco) + 10% 小牛血清的培养基中, 并置于 37°C 5% CO_2 及饱和水蒸汽的二氧化碳培养箱中培育. 实验时称好自旋标记化合物, 用少量无水乙醇溶解, 加入磷酸缓冲液 (pH 7.4) 配制成 10^{-5}mol/L 的溶液. 倒掉培养液, 在每个正常和癌变细胞培养瓶内各加入 5 ml 自旋标记溶液, 在培养箱内 (37°C) 培养 10 min 左右. 取出细胞, 用磷酸缓冲液洗涤 5 次, 上清液已检测不出游离自旋标记信号, 说明实验中测量的 ESR 波谱是由插入细胞膜的自旋标记贡献的.

1.2.3 ESR 谱测定: 在标记好的癌细胞中加入不同体积的脂肪酸多相脂质体, 室温反应 15 h 后, 将其吸入石英毛细管中, 用 ESR3000 顺磁共振仪测定 ESR 波谱, X 波段, 微波功率为 20 mW, 100 kHz 高频调制, 振幅为 0.1 mT. 室温测量记录波谱.

2 结 果

2.1 ESR 波谱分析

马来酰亚胺自旋标记物可以特异地与蛋白质和细胞膜上的巯基结合^[9]. 如果巯基处在两种不同的环境中, 即一种处于细胞膜的表面; 另一种处于细胞膜的深层, 则可出现两种 ESR 谱. 当自旋标记物结合到细胞膜的表面巯基上, 其 ESR 谱是弱固定化的, 以 W 表示. 当自旋标记物结合到细胞膜的深层巯基上, 其 ESR 谱是强固定化的, 以 S 表示. 实验谱经常是这两种谱的叠加. 因此, 通过测量谱上弱固定化成分和强固定化成分的比值 W/S 可以近似表征癌细胞膜上巯基结合位置的性质, 反映细胞膜的状态 (图 1a, b).

2.2 PE 分子运动对 MSL 化合物 ESR 谱的影响

当自旋标记化合物溶在非粘性介质中时, 其 ESR 谱表现为等强度、等间隔的三重峰. 随着介质粘度的增加, 三条谱线呈现出不同的加宽. 当粘度增加到一定程度时, 得到强固定化谱. 图 1a 给出了马来酰亚胺自旋标记化合物在不同浓度的磷脂

酰乙醇胺水溶液中的一组 ESR 谱. 1、2 和 3 为弱固定化波谱, 4 为强固定化波谱. 与文献 [10] 报道的结果一致.

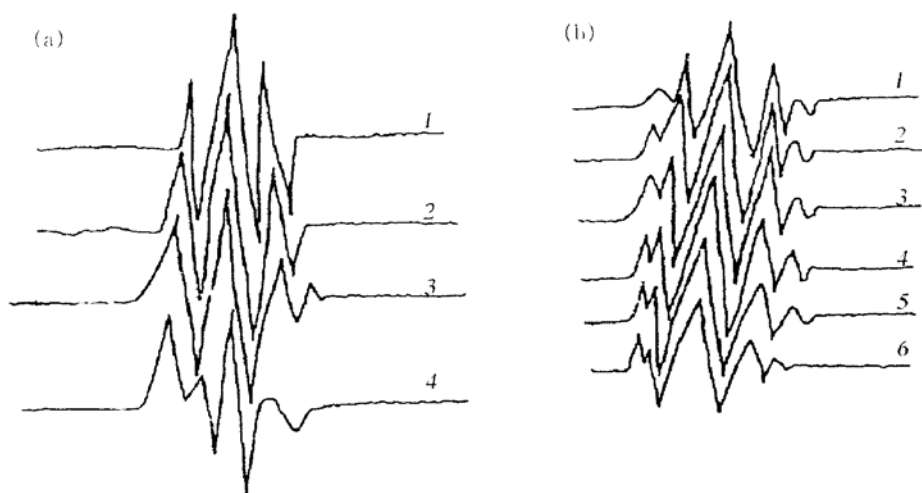


图 1 磷脂酰乙醇胺和正常细胞对马来酰亚胺自旋标记化合物 ESR 谱的影响

(a) 在不同浓度的磷脂酰乙醇胺水溶液中自旋标记物的 ESR 谱. 1: 50% PE (质量比); 2: 80% PE (质量比); 3: 90% PE (质量比); 4: 98% PE (质量比). (b) MSL 标记的正常细胞的 ESR 谱. 1: MSL 标记正常细胞; 2~6: 在 MSL 标记的正常细胞中加入不同含量的油酸多相脂质体的 ESR 谱 (含量分别为 1.11×10^{-4} 、 2.23×10^{-4} 、 3.34×10^{-4} 、 4.45×10^{-4} 、 $5.57 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.3 脂肪酸多相脂质体与正常细胞及癌细胞膜的相互作用对 MSL 化合物 ESR 谱的影响

在 MSL 标记的正常细胞 ESR 波谱中, 随着浓度的增加, 强弱固定化成分比 S/W 变化不明显, 说明多烯脂肪酸多相脂质体对正常细胞影响较小

(图 1b). 在 MSL 标记癌细胞的 ESR 波谱中, MSL 的 ESR 谱是由弱固定化作用和强固定化作用两种谱的叠加组成, 表明在癌细胞上存在着不同环境的两种巯基, 膜表面巯基和膜深层巯基, 而 MSL 可以与这两种巯基结合 (图 2a, b, c).

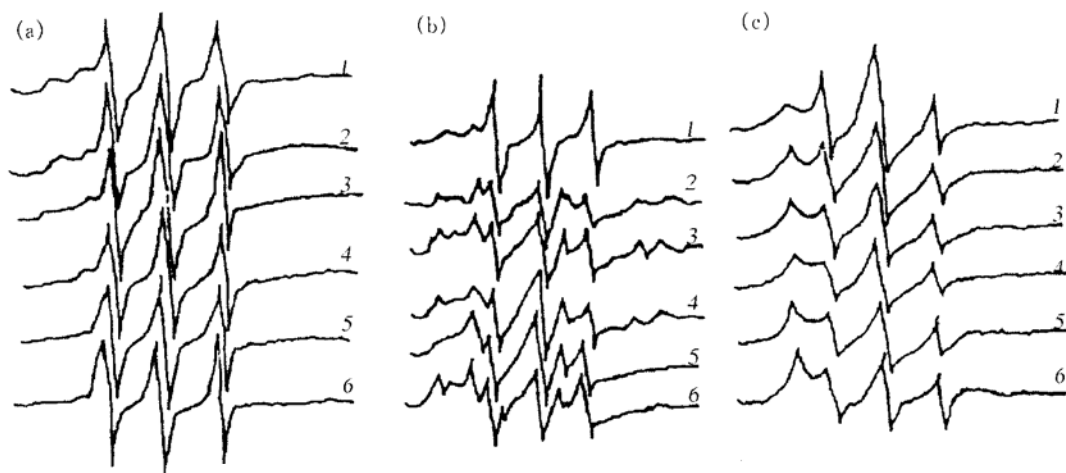


图 2 液晶态多烯脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用的 ESR 谱

(a) MSL 标记 EC 腹水肝癌细胞的 ESR 谱. 1: MSL 标记 EC 腹水肝癌细胞, 2~6: 在标记好的癌细胞中加入不同含量的油酸多相脂质体的 ESR 谱 (含量分别为 1.11×10^{-4} 、 2.23×10^{-4} 、 3.34×10^{-4} 、 4.45×10^{-4} 、 $5.57 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). (b) MSL 标记的乳腺癌细胞的 ESR 谱. 1: MSL 标记乳腺癌细胞, 2~6: 在标记好的癌细胞中加入不同含量的油酸多相脂质体的 ESR 谱 (含量分别为 1.11×10^{-4} 、 2.23×10^{-4} 、 3.34×10^{-4} 、 4.45×10^{-4} 、 $5.57 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). (c) MSL 标记 S₁₈₀ 实体瘤细胞的 ESR 谱. 1: MSL 标记 S₁₈₀ 实体瘤细胞, 2~6: 在标记好的癌细胞中加入不同含量的油酸多相脂质体的 ESR 谱 (含量分别为 1.11×10^{-4} 、 2.23×10^{-4} 、 3.34×10^{-4} 、 4.45×10^{-4} 、 $5.57 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.4 液晶态脂肪酸多相脂质体与癌细胞膜的相互作用

ESR 谱参数的改变量 $\Delta W/S$ 对脂肪酸多相脂质体的浓度关系见表 2、表 3 和表 4。可见油酸多相脂质体的存在使 MSL 标记 EC 腹水肝癌细胞的 W/S 值改变。变化的趋势是油酸多相脂质体使 MSL 标记 EC 腹水肝癌细胞的 W/S 值增加, 表明油酸多相脂质体的影响使自旋标记物在癌细胞膜上的强固定化作用减弱, 而弱固定化作用增强。这说明当油酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用时, 使自旋标记物运动自由度增加。而亚油酸多相脂质体的存在使 MSL 标记乳腺癌细胞的 W/S 值改变。变

化的趋势是亚油酸多相脂质体使 MSL 标记乳腺癌细胞的 W/S 值减小, 表明亚油酸多相脂质体的影响使自旋标记物在癌细胞膜上的强固定化作用增强, 而弱固定化作用减弱。这说明当亚油酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用时, 使自旋标记物运动自由度受到限制。同理, 蓖麻酸多相脂质体的存在使 MSL 标记 S₁₈₀ 实体瘤细胞的 W/S 值减小。表明蓖麻酸多相脂质体的影响使自旋标记物在癌细胞膜上的强固定化作用增强, 而弱固定化作用减弱。这说明当蓖麻酸多相脂质体与癌细胞膜相互作用时, 使自旋标记物运动自由度受到限制。

表 2 W/S 与液晶态油酸多相脂质体含量之间的关系

c (油酸多相脂质体) $/10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MSL 标记 EC 腹水肝癌细胞		MSL 标记乳腺癌细胞		MSL 标记 S ₁₈₀ 实体瘤细胞	
	W/S	$\Delta W/S$	W/S	$\Delta W/S$	W/S	$\Delta W/S$
0	3.67	0	3.50	0	3.63	0
1.11	3.85	0.18	1.93	- 1.57	1.95	- 1.68
2.23	3.89	0.22	1.79	- 1.71	1.86	- 1.77
3.34	4.26	0.50	1.68	- 1.82	1.74	- 1.89
4.45	4.42	0.75	1.56	- 1.94	1.69	- 1.94
5.57	4.46	0.79	1.45	- 2.05	1.53	- 2.10

表 3 W/S 与液晶态亚油酸多相脂质体含量之间的关系

c (亚油酸多相脂质体) $/10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MSL 标记 EC 腹水肝癌细胞		MSL 标记乳腺癌细胞		MSL 标记 S ₁₈₀ 实体瘤细胞	
	W/S	$\Delta W/S$	W/S	$\Delta W/S$	W/S	$\Delta W/S$
0	3.67	0	3.50	0	3.63	0
1.11	3.87	0.20	1.85	- 1.65	1.84	- 1.79
2.23	3.92	0.25	1.68	- 1.82	1.78	- 1.85
3.34	4.00	0.33	1.59	- 1.91	1.67	- 1.96
4.45	4.12	0.45	1.44	- 2.06	1.56	- 2.07
5.57	4.26	0.59	1.38	- 2.12	1.42	- 2.21

表 4 W/S 与液晶态蓖麻酸多相脂质体含量之间的关系

c (蓖麻酸多相脂质体) $/10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MSL 标记 EC 腹水肝癌细胞		MSL 标记乳腺癌细胞		MSL 标记 S ₁₈₀ 实体瘤细胞	
	W/S	$\Delta W/S$	W/S	$\Delta W/S$	W/S	$\Delta W/S$
0	3.67	0	3.50	0	3.63	0
1.11	3.89	0.22	1.95	- 1.55	1.98	- 1.65
2.23	3.98	0.53	1.81	- 1.69	1.89	- 1.74
3.34	4.36	0.69	1.73	- 1.77	1.78	- 1.85
4.45	4.53	0.86	1.64	- 1.86	1.72	- 1.91
5.57	4.65	1.84	1.53	- 1.97	1.61	- 2.02

3 讨 论

不饱和脂肪酸在组织培养中能阻碍腹水瘤的生长, 对肿瘤细胞的生长有抑制作用, 将油酸、亚油酸引进膜后, 能引起肿瘤细胞膜的严重破坏, 其中以亚油酸和亚麻酸作用较强。

我们研究发现, 在相变温度以上, 膜呈液晶态时, 脂类中的胆固醇含量增加, 具有增大有序性, 降低流动性的作用。但在低于相变温度时, 胆固醇却能扰乱脂类分子的有序排列阻止凝胶态的形成。对生物的生长和发育, 前者作用是消极的, 后者作用是积极的。但在治疗癌症中胆固醇却发挥了它的双重作用。这种作用有可能在癌细胞和正常细胞之间建立起某种关系, 为抗癌药物与癌细胞发生融合作用、交换作用、吞噬作用提供理想的生物微环境。电子自旋共振的实验结果表明, 多烯脂肪酸多相脂质体作用于膜蛋白引起了膜蛋白构象的变化, 使自旋标记物的运动自由度增加。它可能与某些生理或病理过程有关。这种现象是一个有趣的问题, 有可能在新的角度揭示生命的奥秘, 对深入认识生命的本质, 不断促进生物学的发现具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Ip C, Singh M, Tompson H J, *et al.* Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res*, 1994, **54** (6): 1211~1215
- 2 Ip C, Chin S F, Scimeca J A, *et al.* Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res*, 1991, **51** (9): 6118~6124
- 3 孙润广, 张 静, 王永昌. 亚油酸铂靶向脂质体抗肿瘤特性的研究. *生物物理学报*, 1996, **12** (3): 419~427
Sun R G, Zhang J, Wang Y C. *Acta Biophysica Sinica*, 1996, **12** (3): 419~427
- 4 朱友平. 脂肪酸的抗癌作用. *国外医学肿瘤学分册*, 1990, (3): 133~136
Zhu Y P. *Foreign Medicine (Phymatology)*, 1990, (3): 133~136
- 5 顾学裘, 马竹卿, 李焕秋, 等. 抗癌药物新剂型——多相脂质体的研究 (1): 多相脂质体 139 等抗癌活性的筛选. *中草药*, 1982, **18** (1): 13~19
Gu X Q, Ma Z Q, Li H Q, *et al.* *Chinese Herbal Medicine*, 1982, **18** (1): 13~19
- 6 张 静, 孙润广. 液晶态油酸脂质体与癌细胞膜相互作用的理化特性. *物理学报*, 1994, **43** (9): 1495~1501
Zhang J, Sun R G. *Acta Physica Sinica*, 1994, **43** (9): 1495~1501
- 7 陈建智, 顾学裘. 多不饱和脂肪酸与癌. *沈阳药学院学报*, 1982, **16** (3): 104~108
Chen J Z, Gu X Q. *Journal of Shenyang Medical University*, 1982, **16** (3): 104~108
- 8 孙润广, 王德华, 张 静, 等. 对液晶态亚油酸脂质体抗癌机理的研究. *科学通报*, 1993, **38** (4): 333~336
Sun R G, Wang D H, Zhang J, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 1993, **38** (4): 333~336
- 9 陈宝卫, 王 夔, 杨正红, 等. 顺铂与癌细胞膜相互作用的电子自旋共振自旋标记研究. *北京医科大学学报*, 1991, **23** (4): 321~323
Chen B W, Wang K, Yang Z H, *et al.* *Journal of Beijing Medical University*, 1991, **23** (4): 321~323
- 10 忻文娟, 赵保路, 张建中. 中国地鼠正常细胞 V₇₉ 和癌变细胞 V₇₉B₁ 膜上巯基结合位置的性质. *中国科学 (B 辑)*, 1984, **14** (5): 429~433
Xin W J, Zhao B L, Zhang J Z. *Science in China (Series B)*, 1984, **14** (5): 429~433

Study on the Interaction Between the Liposomes Containing Unsaturated Fatty Acid and Cancer Cell Membrane by the Technique of ESR. SUN Run-Guang¹⁾, ZHANG Jing, WANG Yong-Chang¹⁾ (*Experimental Center, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; ¹⁾ School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China*).

Abstract A study by the technique of electron spin resonance (ESR) has been made on the interaction between the liposomes containing unsaturated fatty acid and cancer cell membrane, and probed into that they have may be biological significance in damaged and inhibited cancer cells. Experimental results showed following: the effect of the oleic heterogeneous liposomes causes that the powerful fixed effect of the spin probe is weakened that the weak fixed effect of the spin probe is strengthened, and that the free direction of the spin probe movement is increased. The effect of linoleic heterogeneous liposomes causes that the powerful fixed effect of the spin probe is strengthened, and the weak fixed effect of the spin probe was weakened on the membrane of mammary tumor, and that the free direction of the spin probe movement is impeded. The effect of ricinoleic heterogeneous liposomes is the same with linoleic heterogeneous liposomes on the neoplasm cell. The result indicates that the unsaturated fatty acid can react with mercaptan groups and change the conformations of membrane proteins of tumor cells.

Key words liquid crystal structure, biomembrane, liposomes, unsaturated fatty acid