

腹水癌细胞膜脂胆固醇含量对膜流动性及恶性程度的影响

林克椿 聂松青 薄惠卿 乔玉兰

(北京医学院生物物理教研室)

一、引言

细胞膜流动性与结构、功能密切相关。细胞膜上蛋白分子的运动、酶的活性以及各种物质的运输都直接受到细胞膜脂成分、组成及流动性的影响^[1-2]。因而,细胞膜脂流动性的研究已成为细胞膜研究中的一个重要方面。关于肿瘤细胞膜流动性的研究报道也日益增多。M. Inbar 等报道细胞膜脂的流动性可以作为诊断急性淋巴细胞白血病的定量手段^[3-4]。

细胞膜脂流动性的改变和许多因素有关。本文用不同比例的卵磷脂:胆固醇所制成的脂质体与细胞温育,改变膜中胆固醇的相对含量,研究腹水癌细胞膜表面胆固醇的相对含量对膜脂流动性的影响,并初步探讨了由于膜脂胆固醇水平不同所引起的腹水癌细胞恶性程度的改变,为进一步研究癌细胞膜表面成分、组成与功能的关系提供一些资料。

二、材料与方法

1. 艾氏腹水癌细胞及其处理方法如前所述^[5]。悬浮在含有 10% 小牛血清的 Eagle 溶液(每毫升加 500 单位青霉素、500 单位链霉素)中的腹水癌细胞,其浓度为 10^7 /毫升,准备用不同克分子比的卵磷脂-胆固醇制作的脂质体分别进行温育。

2. 脂质体的制备 腹水癌细胞膜表面卵磷脂-胆固醇克分子比(PL/C、Mole/Mole)约为 $1:0.4$ ^[6]。本实验共制备三种不同卵磷脂-胆固

醇克分子比的脂质体,即 $1:1.5$ 、 $1:0.4$ 、 $1:0$ 。分别称取 80 mg 卵磷脂*三份及 60 mg、16 mg 胆固醇**二份($1:0$ 的脂质体不含胆固醇),分别将二者对应地溶解在 2 ml 甲醇、氯仿溶液中(V/V=1:2)。然后在电动抽气泵上抽干。加 10 ml 0.15 M NaCl 溶液振摇,使已抽干的胆固醇、卵磷脂悬浮。然后用 MSE 超声波发生器处理 20 分钟(冰浴)。再用 MSE 高速离心机以 15,000 转/分离心 20 分。由于药物中含少量杂质,离心后沉淀于管底,而在上面部分则因脂质体颗粒较大,因而只取出中间部分备用。电子显微镜观察,多数为直径 250—1000 Å 的单个脂质体,也有部分多层的直径约为 1000—2000 Å 的脂质体。于棕色瓶中室温保存。最多能用三天。时间过长脂质体被破坏甚至重新分层。

3. 细胞与脂质体的温育 取已经准备好的腹水癌细胞 2 ml,分别加三种不同 PL/C 克分子比的脂质体 1 ml, 37°C 温育过夜,温育时间为 22 小时。温育过程中,用继电器控制,每隔 20 分振荡 30 秒,使癌细胞不致沉淀,而尽可能增加其与脂质体接触的机会,便于和细胞膜进行融合。温育完毕,离心,再用 PBS 洗一次,离心,细胞即可用于进行荧光标记和荧光偏振度的测量。用于研究恶性程度的细胞,用脂质体温育以后,用含 10% 小牛血清的 Eagle 液洗一次,最后以 2×10^7 /ml 的浓度悬浮在 Eagle 液中。

* 上海禽蛋二厂生化试剂。

** 上海市食品公司制药厂、化学纯。

4. 荧光标记和荧光偏振度的测定 取已温育好并用 PBS 液洗过的细胞,加 2 ml 2×10^{-6} M DPH, 25℃ 温育 30 分, 离心去上清, 再用 PBS 液洗一次, 最后悬浮在 4 ml PBS 溶液中, 按下式测量荧光偏振度 P , 计算微粘度 $\bar{\eta}$ 。测量条件和方法如前所述^[5]。

$$P = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + GI_{VH}}$$

$$\bar{\eta} = \frac{2P}{0.46 - P}$$

5. 将用三种不同的卵磷脂-胆固醇克分子比的脂质体温育过的腹水癌细胞, 浓度为 2×10^7 /ml, 分别给三组小鼠腹腔注射 0.5 ml。每组小鼠 17 只, 每只小鼠体重为 18—20 克。观察小鼠死亡情况及存活日期。

三、结果与讨论

1. 用不同克分子比的 PL/C 脂质体和腹水癌细胞温育后, 膜脂 P 值即微粘度明显不同。用 PL/C 为 1:1.5 的脂质体温育后, P 值最大即微粘度最大, 1:0.4 的脂质体温育后, P 值较小即粘度变小, 1:0 的脂质体温育后, P 值最小, 粘度最小。表 1 统计了 10 次实验结果。图 1 说明不同 PL/C 克分子比脂质体温育以后粘度的变化。

从实验结果可以看出: 当卵磷脂-胆固醇

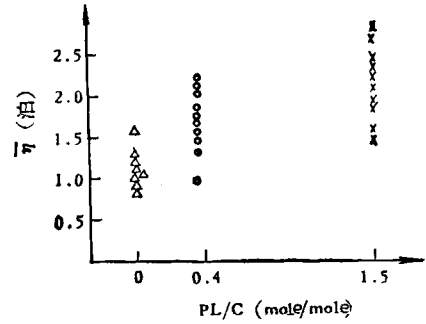


图 1 25℃ 三种不同 PL/C 克分子比的脂质体温育腹水癌细胞后微粘度 $\bar{\eta}$ 的变化
横坐标 0 表示 $PL/C = 1:0$ 0.4 表示 $PL/C = 1:0.4$ 1.5 表示 $PL/C = 1:1.5$

作成脂质体时, 它和膜上的成分进行融合, 脂质体颗粒越小, 融合越容易进行。实验中我们曾用普通振荡器代替超声发生器, 所制备的脂质体在光学显微镜下即可看到囊泡 (直径为数微米)。这样的脂质体和细胞温育不能得到以上结果。只有当脂质体颗粒在 1000 Å 左右时, (即用超声制备), 才能得到比较满意的结果。此外, 我们曾在比较低的温度 4℃^[7], 用超声制备的脂质体和腹水癌细胞温育过夜, 也曾在较高的温度 25℃、37℃, 较短的温育时间, 4 小时、6 小时^[6,7]进行过实验, 发现以上条件所得结果均不稳定。后来采用了较高的温度 (37℃), 较长的温育时间 (22 小时), 而且对样品进行不断的振荡, 这样才能使癌细胞和脂质体有充分的

表 1 不同 PL/C 克分子比脂质体温育后腹水癌细胞的 P 值

样 品 号	1:1.5	1:0.4	1:0	1:1.5	1:0.4	1:0	1:1.5	1:0.4	1:0
	15℃			25℃			35℃		
1	—	—	—	0.207	0.176	—	—	—	—
2	0.265	0.266	0.200	0.240	0.234	0.145	0.244	0.235	0.149
3	0.271	0.248	0.162	0.264	0.238	0.176	0.224	0.211	0.127
4	0.251	0.237	0.205	0.208	0.210	0.155	0.175	0.183	0.111
5	0.245	0.227	0.197	0.176	0.172	0.112	0.214	0.223	0.213
6	0.253	0.215	0.176	0.221	0.217	0.161	0.212	0.186	0.124
7	0.243	0.223	0.206	0.225	0.197	0.169	0.253	0.202	0.175
8	0.260	0.234	0.199	0.233	0.190	0.159	0.199	0.185	0.139
9	0.170	0.167	0.149	0.164	0.136	0.140	0.142	0.151	—
10	0.266	0.249	0.218	0.256	0.213	0.199	0.226	0.206	0.180
平 均	0.247	0.229	0.190	0.219	0.198	0.142	0.210	0.198	0.152
S、E	0.009	0.009	0.007	0.009	0.010	0.008	0.011	0.008	0.011
P		<0.002	<0.001		<0.005	<0.002		<0.1	0.01

接触机会,使交换反应便于进行,从而得到比较好的结果。

曾有不少作者报道,用不同 PL/C 克分子比的脂质体和正常淋巴细胞,恶性淋巴细胞^[9],红血球^[8,12]、支原体^[10],血小板^[11]进行温育后,由于外源性胆固醇引入膜表面,可以使膜微粘度发生变化。用生化方法同时证明^[12],不同克分子比 PL/C 脂质体和细胞温育以后,膜上磷脂、胆固醇比发生相应变化。可见膜微粘度与膜脂成分密切相关。本实验证明,当所用的脂质体 $PL/C = 1:1.5$ 即大于 $1:0.4$ 时(腹水癌细胞 $PL/C = 1:0.4$),外源性胆固醇可掺入到膜表面使膜上胆固醇所占比例增加,从而膜微粘度增加,当所用的脂质体 $PL/C = 1:0$ 即小于腹水癌细胞膜 PL/C 时,膜上胆固醇所占比例减小,从而使膜微粘度降低。图 2 表明三种脂质体温育后,腹水癌细胞膜微粘度和温度的关系。可以看出,当实验温度为 15°C 、 25°C 、 35°C 即相变温度 (39°C) 以下时,胆固醇在膜表面可减小双脂层中碳氢链分子的随意转动,使分子排列更加有序即增加微粘度,起到凝固作用。这和胆固醇在其他细胞的膜流动性中所起的作用是完全一致的^[7,9,11,12]。

用 Arrhenius 公式^[5]可以分别求得三种脂质体温育过的腹水癌细胞的流动活化能 $\Delta E_{(1:1.5)} = 3.6 \text{ Kcal/mole}$, $\Delta E_{(1:0.4)} = 4.0 \text{ Kcal/mole}$ $\Delta E_{(1:0)} = 4.6 \text{ Kcal/mole}$ 。

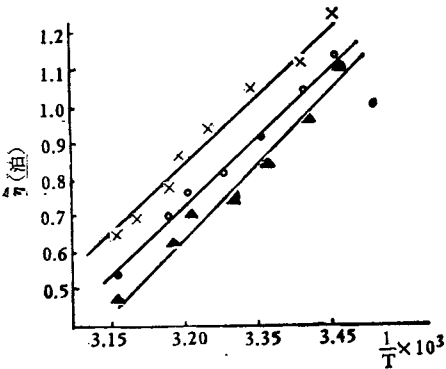


图 2 三种脂质体与腹水癌细胞温育后,膜微粘度和温度的关系

×: PL/C (克分子比) $1:1.5$ o: PL/C (克分子比) $1:0.4$ ▲: PL/C (克分子比) $1:0$

表 2 三组小鼠死亡时间及平均存活天数

组别	脂质体 PL/C Mole/Mole	实验动物只数	开始死亡时间(天)	平均存活天数±SD	P	与对照比显著性
1	1:1.5	17	15	17.6±0.3	<0.001	**
2	1:0.4	17	13	17.7±0.5	<0.001	**
3	1:0	17	8	15.0±0.3	>0.5	—
4	对 照	17	9	14.5±0.6		

2. 腹水癌细胞膜胆固醇含量不同时恶性程度不同。表 2 说明三种脂质体和腹水癌细胞温育 (37°C 、22 小时),浓度为 $2 \times 10^7/\text{ml}$,分别给三组小鼠腹腔注射 0.5 ml 细胞后,实验动物开始死亡时间及平均存活天数。

从表 2 可以看出,用胆固醇含量多的脂质体 ($1:1.5$)温育后的癌细胞,恶性程度降低,平均存活时间比较长,与对照比较有显著性差异,而用与胆固醇含量低的脂质体 ($1:0$)温育后的癌细胞,恶性程度升高,平均存活时间缩短,与对照比较无显著性差异。 $1:0.4$ 的脂质体温育过的癌细胞,与对照比较有显著性差异,但与 $1:1.5$ 的脂质体温育过的癌细胞比较,恶性程度似乎差别不大,仅仅开始死亡日期稍有提前。

从本文结果和讨论的第一部分可以看出,不同克分子比的脂质体与腹水癌细胞温育后,膜流动性明显不同, $1:1.5$ 的脂质体温育过的癌细胞膜流动性最小(微粘度最大), $1:0.4$ 的脂质体温育过的癌细胞次之, $1:0$ 的脂质体温育过的癌细胞膜流动性最大。而本实验结果则进一步说明,腹水癌细胞的恶性程度是与膜流动性有关的。膜流动性愈小,恶性程度愈小,膜流动性愈大恶性程度愈大。但用 $1:1.5$ 脂质体温育过的癌细胞其恶性程度为什么与 $1:0.4$ 的脂质体温育过的癌细胞相差不大,还待今后进一步探讨。

根据以上情况,作者认为 M. Inbar 等人用荧光偏振技术,测量细胞膜的流动性(或微粘度)并将其用于恶性淋巴瘤白血病的诊断和判断治疗效果,是有其实验根据的。本实验用腹水癌细胞也证明了这一点。(下转第 30 页)

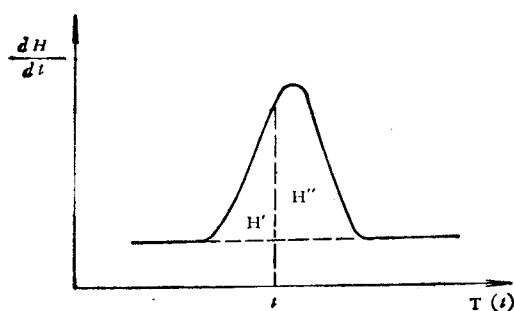


图5 化学反应的 DSC 曲线

线。其结果，每单位重量样品的放热峰面积随预先恒温放置时间的增加而减小。这个减小的程度就是衡量在原放置温度下的反应速率的尺度。改变不同的放置温度就可以得到反应速率与反应温度间的动力学关系^[9]。

采用温度扫描方式时，是将样品通过进行反应的温度范围，并记录其 DSC 曲线，如图 5。设在反应中某时刻 t 的反应程度为 α ，则

$$\begin{aligned}\alpha &= H'/H_0 \\ H_0 &= H' + H'' \\ \frac{d\alpha}{dt} &= \frac{1}{H_0} \frac{dH'}{dt}\end{aligned}$$

从上式可知，一个化学反应在某时刻 t 的反应速率 $(d\alpha/dt)$ ，等于此时时刻的峰高除以峰的总

面积。

采用温度扫描方式，不仅可以测出反应速率，还可探知反应机理。因为它可以求出反应动力学的另外三个参数，即活化能 E ，反应级数 n 和频率因子 A 。

我们知道，一般的化学反应速率可以用下列微分方程加以描述：

$$\frac{d\alpha}{dt} = K(T) \cdot f(\alpha) = K(T) \cdot (1 - \alpha)^n$$

此处， $\frac{d\alpha}{dt}$ 为反应速率， $K(T)$ 是取决于温度的反应速率常数， $f(\alpha)$ 是反应机制的假设模型函数。一般假设的函数是 $(1 - \alpha)^n$ ， α 为反应程度，也可视为反应物的浓度。

就一般动力学测量而言，速度常数 K 为：

$$K = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

经过数学推导后，便可由化学反应的 DSC 曲线上求出 E 、 n 和 A 。根据不同的数学处理，便有不同的求动力学参数的方法。主要有 Freeman-Corral 法^[10]或差减微分法，图解微分法^[11]及积分法^[12]等。由于所采用的反应机制的假设模型的不同，也还有不同的解析方法和结果^[13]。

(未完待续)

(上接第 33 页) 从表 2 还可以看出，用 1:0 的脂质体温育过的腹水癌细胞，其实验动物开始死亡时间与平均存活天数十分相近，由此看来，腹水癌细胞用 1:0 的脂质体温育后，其膜卵磷脂与胆固醇之比没有改变。

参 考 文 献

- [1] Shinitzky, M. et al.: *International Review of Cytology*, **60**, 121, 1979.
- [2] Giorgio Lenaz: *The molecular Biology of membranes*, Chapter 6. (Sindney Fleischer et al eds.), p. 137, Plenum Press, New York, 1978.
- [3] Inbar, M. et al.: *Europ J. Cancer*, **13**, 1231, 1977.
- [4] Shinitzky, M. et al.: *Biochimica et Biophysica*

Acta, **515**, 367, 1978.

- [5] 林克椿等:《生物化学与生物物理进展》, 1981 年, 第 6 期。
- [6] Christopher, J. et al.: *Biochemical Society Transaction*, **3**, 1009, 1975.
- [7] Shinitzky, M. et al.: *J. Molecular Biology*, **85**, 603, 1974.
- [8] Richard, A. et al.: *J. Clinical Investigation*, **25**, 115, 1975.
- [9] W. J. Van Blihserswijk et al.: *Biochemica et Biophysica Acta*, **467**, 309, 1977.
- [10] Rottem, S. et al.: *Biochimica et Biophysica Acta*, **604**, 65, 1980.
- [11] Sanford Shaffil, J. et al.: *Biochemistry*, **15**, 4832, 1976.
- [12] Cooper, R. A. et al.: *Biochemistry*, **17**, 327, 1978.

[本文于 1981 年 2 月 25 日收到]