

R-藻红蛋白介导的光敏反应对 DNA 分子的生物学效应*

李冠武^{1)*} 王广策²⁾ 李振刚¹⁾ 曾呈奎²⁾

(¹⁾中国科技大学生命科学学院分子细胞生物学系, 合肥 230027, 汕头大学医学院生物化学及分子生物学研究室, 汕头 515031;

²⁾中国科学院青岛海洋研究所, 青岛 266071)

摘要 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 是海藻中的重要捕光色素蛋白, 具有强荧光性, 易溶于水. 在藻体内能将捕获的光能传递给光合反应中心; 在体外则能将光能传递给周围环境中的氧分子, 产生如单线态氧等活性氧组分, 可用来介导光动力效应治疗癌症. 将纯化的藻红蛋白加入到瘤细胞培养基中, 数小时后, 采用 488 nm 波长的氩离子激光辐照, MTT 法检测细胞存活数, 计算细胞存活率. ³H-TdR 掺入实验观察细胞 DNA 的合成. 结果表明, 藻红蛋白介导的光动力反应能够有效地抑制肿瘤细胞 DNA 合成并杀伤癌细胞. 随着藻红蛋白浓度增加, DNA 合成下降, 瘤细胞存活率降低. 将藻红蛋白加入到 pUC18 质粒溶液中, 随之进行激光辐照, 琼脂糖电泳结果可见 pUC18 构象由超螺旋 (supercoiled) 向带切口的环形构象 (relax) 转换. 结果提示: 通过改变或影响 DNA 构象, 抑制细胞 DNA 合成可能是藻红蛋白介导肿瘤光动力治疗的途径之一.

关键词 藻红蛋白, 肿瘤光动力治疗, DNA 合成

学科分类号 R71

肿瘤光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 是以光敏剂的光敏化反应为基础而发展起来的很有前景的治疗肿瘤新手段. 藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 是海洋藻类中重要的捕光色素蛋白之一. 具有光敏作用, 是一种新型的高效、无毒副作用的光敏剂^[1], 可望开发为有实用价值的新型光动力药物. 一般光敏剂经适宜波长的光激发后可以产生单线态氧及其他的氧自由基^[1,2], 杀伤生物大分子. 但关于藻红蛋白介导肿瘤光动力治疗的分子机理尚未见报道. 本文报道藻红蛋白介导光敏作用对质粒 DNA 的构象的改变和体外培养的瘤细胞 DNA 合成的影响. 阐明了藻红蛋白介导光动力治疗与其对生物大分子的直接作用紧密相关.

1 材料、仪器和方法

1.1 材料、仪器

多管藻 (*Polysiphona urceolata*) 采自青岛海滨汇泉湾潮间带. S180 小鼠腹水癌细胞株购于上海细胞生物研究所; FJ 2100 双光光电倍增管液体闪烁计数谱仪 (核工业部西安 262 厂产品).

1.2 方法

1.2.1 R-藻红蛋白 (R-phycoerythrin, R-PE) 的提取按文献 [3] 进行.

1.2.2 S180 细胞于 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度下, 用含 10% 小牛血清的 RMPI 1640 培养液培养. 收

集对数期生长的 S180 细胞, 无血清培养液离心洗涤三次, 去除培养液中的血清. 以含藻红蛋白的无血清培养液稀释细胞至 10⁶/ml, 接种 96 孔板, 每孔 50 μl 含细胞 5 × 10⁴ 个. 培养液中藻红蛋白的浓度分别为 1、10、25、50、100 mg/L. 培养 4 h 后, 用波长为 488 nm, 25.6 J/cm² 的氩离子激光逐孔辐照. 各孔补加 50 μl 含 20% 牛血清的培养液, 继续培养 24 h. MTT 法^[4]测定各孔细胞数. 各组细胞生存率, 以其存活细胞数与空白对照组存活细胞数的百分比表示. 不加藻红蛋白, 无激光辐照培养的细胞作为空白对照. 单用 R-PE 和单用激光作为阴性对照. *t* 检验法判定各组间的差别显著性 ($\alpha = 0.005$).

1.2.3 ³H-TdR 掺入测定细胞 DNA 合成: 取培养的生长旺盛期小鼠 S-180 细胞, 用无血清的 1640 培养基稀释成 10⁷/ml (10⁶/100 μl). 分别加入藻红蛋白 (R-PE) 使终浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 mg/L. 各组浓度细胞接种在 96 孔细胞培养板, 各四孔. 每孔 100 μl. 于 5% CO₂, 饱和湿度, 37℃, 培养 6 h, 488 nm 激

* 国家“863”计划资助项目 (819-Q-12).

** 通讯地址: 广东省汕头市新陵路 22 号汕头大学医学院生物化学及分子生物学研究室, 汕头 515031.

Tel: (0754) 8900413, E-mail: gwli@mailserv.stu.edu.cn

收稿日期: 1999-10-19, 修回日期: 2000-03-07

光辐照, 功率为 200 mW, 累积能量为 25.6 J/cm^2 . 以只加 PE, 只进行激光辐照, 和既不加藻红蛋白, 同时不进行激光照射的作为对照. 各组细胞数和接种孔数均为四孔. 处理后的细胞转移到 12 孔细胞培养板中, 每孔含 2 ml 10% BS 1640 培养基, 加入 ^3H 标记的胸腺嘧啶脱氧核糖核苷 (TdR), 终浓度为 $7.4 \times 10^4 \text{ Bq/ml}$, 继续培养 8 h. 取各孔细胞, 并用 0.125% 胰酶消化分离部分贴壁的细胞, 吹散混匀后, 滴于“9999”滤纸上真空抽滤, 20 ml 双蒸水洗三遍, 10% 三氯醋酸洗一遍, 然后用 5 ml 无水乙醇抽洗一遍, 60°C 烘箱干燥 1 h. 加入 PPO (2, 5-二苯基噁唑) 闪烁液 (PPO 3.0 g, POPOP (1, 4-双(5-苯基-2-噁唑基)苯) 0.2 g, 乙二醇独乙醚 400 ml, 甲苯 600 ml), 于液体闪烁仪上测定 ^3H 放射活性. 用 DNA 合成百分率 S 来表示细胞的受损程度, 结果取四孔平均值, 按下面的公式进行计算:

$$S = \text{实验组 cpm 值} / \text{对照组 cpm 值} \times 100\%$$

1.2.4 对质粒 DNA 的作用: pUC18 质粒按常规碱法制备. 溴化乙锭染色法测定 DNA 浓度, 并稀释至等浓度. 取制备好的质粒加入到 10 个 Eppendorf 管中, 每管各 20 μl , 加入藻红蛋白使各管终浓度分别为 1、10、25、50、100、200 和 400 mg/L, 加水到 30 μl . 于 488 nm 波长的氩离

子激光辐照, 累积能量为 25.6 J/cm^2 . 样品辐照完毕后, 取适量上述 DNA 溶液于 0.7% 的琼脂糖中电泳. 紫外灯下观察、照相.

2 结 果

2.1 R-PE 介导的 PDT 对 S180 细胞生存率的影响

不同浓度藻红蛋白处理 S180 细胞后, 经 25.6 J/cm^2 的氩离子激光辐照, 细胞存活率随藻红蛋白浓度的增加逐渐下降. 1、10、25、50 和 100 mg/L 藻红蛋白相对应的细胞生存率分别为 70%、50%、35%、28% 和 24%. 各浓度之间及与阴性对照之间均有显著性差异 ($P < 0.001$, 详细资料未列出).

2.2 R-PE 介导 PDT 对质粒 DNA 构象的改变

如图 1 示, pUC18 质粒 DNA 在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳图谱上可见三条泳带, 由后往前分别是带切口环形 (relax, II)、线性 (linear, III; 由于量极少, 条带很弱不易观察清楚) 和超螺旋 (supercoiled, I) 分子构象的 DNA. 随着藻红蛋白浓度由 1 mg/L 至 400 mg/L 的递增, 可见 II 型带切口环形构象的 DNA 条带亮度逐渐增大; 而超螺旋 DNA 表现为逐渐减少的趋势. 中间的 III 型条带没有改变. 单用藻红蛋白和单用激光辐照的未见有条带亮度的改变.

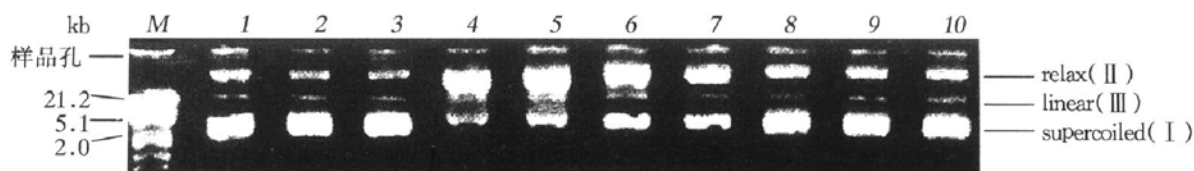


图 1 藻红蛋白介导的光动力反应对 pUC18 质粒 DNA 的切割作用

M: $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III} + \text{EcoRI}$; 1: 无激光辐照, 无 R-PE; 2: 单用激光辐照; 3: 单用 R-PE; 4: 400 mg/L R-PE; 5: 200 mg/L R-PE; 6: 100 mg/L R-PE; 7: 50 mg/L R-PE; 8: 25 mg/L R-PE; 9: 10 mg/L R-PE; 10: 1 mg/L R-PE.

2.3 R-PE PDT 对瘤细胞 DNA 合成的抑制

当藻红蛋白的浓度为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 mg/L, 细胞 DNA 合成率分别为: $(72 \pm 4)\%$ 、 $(67 \pm 4)\%$ 、 $(51 \pm 3)\%$ 、 $(51 \pm 3)\%$ 、 $(31 \pm 2)\%$ 、 $(28 \pm 3)\%$; 藻红蛋白浓度为 1、10、25、50 和 100 mg/L 时, 细胞 DNA 合成率均为 0%. 只含藻红蛋白, 而不进行激光辐照组细胞 DNA 合成率不受影响. 只激光辐照的为 $(87 \pm 3)\%$ (图 2).

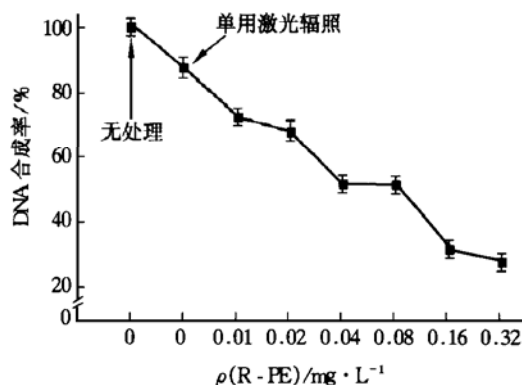


图 2 藻红蛋白介导的光动力反应对培养的肿瘤细胞 DNA 合成的影响

3 讨 论

肿瘤光动力治疗是利用光敏剂的光敏化产生活性氧组分 (reactive oxygen species, ROS), 包括: 氧自由基和单线态氧等. 它们对癌细胞有杀伤性, 对生物大分子有破坏和分解作用^[5,6]. 作者的前期工作曾经证实藻红蛋白的光敏化可以杀伤肿瘤细胞, 而且口服无毒副作用, 是一种很有前途的新型光敏剂. 本研究中, 藻红蛋白介导的光动力治疗对体外的质粒 DNA 的构象有明显的影响, 作用后, pUC18 的构象组成, 随着藻红蛋白浓度的增加, 而表现为带切口环形结构增多, 超螺旋减少的趋势. 由于反应体系中只有 TE (10 mmol/L Tris-EDTA) 缓冲液, 提示, 藻红蛋白的光敏反应对质粒 DNA 有直接的作用. 已经证实, 藻红蛋白的光敏化可以产生单线态氧和氧自由基, 这两种途径是藻红蛋白介导光动力治疗杀伤癌细胞的光化学分子基础. 单线态氧和氧自由基可以在 DNA 磷酸核糖骨架上制造切口, 导致 DNA 分子的断裂或分子构象的改变, 本文中, 单线态氧等活性氧组分作用于 pUC18 质粒 DNA 的超螺旋结构, 制造切口后导致超螺旋的松解, 产生带切口的环形 DNA 分子. 同时, 本文结果显示藻红蛋白介导的光动力反应对细胞 DNA 合成, 具有强的抑制作用. 与之相对应, 在对细胞的杀伤上, 藻红蛋白的浓度要求较高. 表明: 只要 0.01 mg/L 的藻红蛋白即可引起细胞 DNA 合成的抑制 (合成率 72%); 而用 MTT 法检测细胞存活率时, 当细胞存活率为 70% (与 DNA 合成率 72% 相对应), 藻红蛋白浓度却需要 1 mg/L, 远较前者要高. 二者的差别说明, 即使是 0.01 mg/L 的藻红蛋白也可引起细胞活性的改变, 但并不一定导致细胞死亡, 因此, MTT 法尚不能检测到细胞存活率的下降. 同样, 当藻红蛋白浓度同体外用量相同时, 尽管细胞 DNA 合成完全受到抑制, 细胞存活率却在 24% 到 70% 之间. 藻红蛋白能够进入肿瘤细胞, 与细胞核结合^[7]. 因而可以推测: 藻红蛋白光敏化反应产生的活性氧组分对细胞 DNA 合成的影响可能与它们对细胞基因组 DNA 的构象改变有关. 至于, 是通过何种方式发生作用的尚有待于研究.

参 考 文 献

- 1 李冠武, 王广策, 陆 雷, 等. 多管藻 R-藻红蛋白的激光光敏作用对体外培养的肿瘤细胞生存率的影响. 激光生物学学报, 1997, 6 (3): 1119~ 1121

- Li G W, Wang G C, Lu L, *et al.* Acta Laser Biology Sinica, 1997, 6 (3): 1119~ 1121
- 2 He J A, Hu Y Z, Jiang L J. Photodynamic action of phycobiliproteins: *in situ* generation of reactive oxygen species. Biochim Biophys Acta: Bioenergetics, 1997, 1320 (1): 165~ 174
- 3 Wang G C, Zhou B C, Tseng C K. Studies on the excitation energy transfer of an artificial C-phycoerythrin-R-Phycocyanin conjugate, Botanica Marina, 1997, 40 (4): 325~ 328
- 4 Mosmann J J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immuno Methods, 1983, 65 (1): 55~ 63
- 5 Phillips D. Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. Progress in Reaction Kinetics, 1997, 22 (1): 175~ 300
- 6 Granville D J, Levy J G, Hunt D W C. Photodynamic treatment with benzoporphyrin derivative monoacid ring A produces protein tyrosine phosphorylation events and DNA fragmentation in murine P815 cells. Photochemistry and Photobiology, 1998, 67 (3): 358~ 362
- 7 李冠武, 王广策, 齐 媛, 等. R-藻红蛋白光动力杀伤的形态学机制研究. 中国科学技术大学学报, 1999, 29 (5): 560~ 564
- Li G W, Wang G C, Qi Y, *et al.* Journal of China University of Science and Technology, 1999, 29 (5): 560~ 564

Biological Effect of R-Phycocyanin-mediated Photosensitization on DNA. LI Guan-Wu, LI Zhen-Gang (*Department of Molecular and Cellular Biology, School of Life Sciences, University of Sciences and Technology of China, Hefei 230027, China*; Department of Molecular Biology and Biochemistry, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China); WANG Guang-Ce, ZENG Cheng-Kui (*Institute of Marine Biology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China*).

Abstract R-phycoerythrin (R-PE) is one of important proteins involved in capturing light during photosynthesis in red algae, and it is highly fluorescent, and water-soluble chromophores. *In vivo*, it can transfer the light energy into photosynthetic center, however, it can deliver the captured light energy captured to the surrounding oxygen *in vitro* and produce reactive oxygen species such as singlet oxygen, which is toxic to tumor cells. R-PE was added to the culture medium of tumor cells, subsequently with irradiation of 488 nm, Argon laser of 25.6 J/cm². The result by MTT assay showed that the survival rate decreased with the increase of R-PE concentration from 1 to 100 mg/L.

The result from ^3H -TdR incorporation demonstrated that the synthesis of DNA reduced when the concentration of R-PE increased from 0.01 to 0.32 mg/L. Besides, pUC18 DNA showed a conversion from supercoiled into linear conformation. The conclusion comes that R-PE mediated PDT can

influence the conformation of DNA, and it may be one of the mechanisms of R-PE mediated photodynamic therapy.

Key words phycoerythrin, photodynamic therapy, DNA synthesis

大豆液泡膜 H^+ -ATPase 功能与构象关系的初步研究*

董彩华 王志强 王延枝¹⁾

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要 大豆液泡膜 V 型 H^+ -ATPase 是 ATPases 中的一种, 它在植物细胞的生长发育中有重要的作用. 利用竹红菌乙素 (HB) 和 KI 这两种分别猝灭蛋白质疏水区域内源荧光和亲水区域内源荧光的荧光猝灭剂, 在不同 pH 值、温度条件下对纯化的大豆液泡膜 V 型 ATPase 进行荧光猝灭实验, 初步探讨了 V 型 H^+ -ATPase 的水解活性同其蛋白质折叠状态间的关系. 研究表明, 通过比较不同 pH 值、温度条件下蛋白质疏水区域和亲水区域内源荧光的荧光猝灭常数 (K_{SV}), 发现当环境 pH 值、温度偏离酶的最适 pH 值和温度时, 蛋白质的内源荧光强度降低且疏水区域和亲水区域内源荧光的荧光猝灭常数 (K_{SV}) 降低, 说明伴随着酶的水解活性降低, 蛋白质的折叠状态发生了变化. 我们认为蛋白质在膜内的折叠状态变化是酶失活机制的一个重要方面, 为植物的抗冻和抗盐研究提供了一定的参考.

关键词 V 型 H^+ -ATPase, 竹红菌乙素, 荧光猝灭

学科分类号 Q731

V 型 H^+ -ATPase 的生物功能是消耗 ATP, 跨膜向液泡内转运质子从而产生质子跨膜梯度, 为各种离子和代谢物的跨膜运输提供动力. 它的生物功能是最基本的生命活动之一. 但 V 型 H^+ -ATPase 的生物功能很大程度上受到 pH 值、温度的影响, 因此它同植物的抗盐性和抗冻性有密切的关系^[1]. 荧光猝灭技术是一种利用蛋白质的自身发光基团, 通过在水溶液中加入荧光猝灭剂而获得许多关于膜蛋白质构象的光生物学技术^[2]. 蛋白质的内源荧光和标记于蛋白质上染料发射的荧光对其周围环境参数 (例如温度和 pH) 极端敏感, 而这些环境参数的改变影响着环绕荧光发射基团附近的蛋白质动力学行为. 另外, 利用外加荧光猝灭剂进行荧光猝灭技术的测定比直接荧光测定法更为灵敏和更具有选择性. 因此, 荧光猝灭技术对获得蛋白质动力学的信息, 推导其构象是强有力的工具^[3]. V 型 H^+ -ATPase 是一种大分子复合物, 具有较强的内源荧光, 并且是由处于膜外亲水区 V_1 部分和疏水区 V_0 部分共同组成的^[4], V 型 H^+ -ATPase 的 V_1 、 V_0 部分可以分别被不同性质的荧光猝灭剂猝灭.

竹红菌乙素 (HB) 主要猝灭膜内蛋白质内源荧光而 KI 主要猝灭膜外蛋白质内源荧光. 这两种荧光猝灭剂的猝灭都是动态过程并满足 Stern-Volmer 方程^[2]. 我们通过测定不同 pH 值、温度条件下 HB、KI 的荧光猝灭常数 (K_{SV}), 对 V 型 H^+ -ATPase 的膜内外构象在不同条件下发生的变化进行了分析, 进一步探讨了 V 型 H^+ -ATPase 的生物活性同它在生物膜内的折叠状态间的关系. 完善了 V 型 H^+ -ATPase 因 pH、温度引起的失活机制.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料: 大豆 (由中国农业科学院粮食作物研究所提供) 置于生化培养箱 25℃ 闭光萌发, 3~5 d 后取芽, 称重后用预冷的无离子水漂洗.

* 国家自然科学基金资助项目 (39570434), 中国科学院生物物理研究所大分子国家重点实验室外部课题.

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (027) 87684232, E-mail: yzwang@whu.edu.cn

收稿日期: 1999-11-07, 修回日期: 2000-04-10