

血卟啉光动力作用对小鼠腹水肝癌细胞膜损伤的 ESR 波谱研究

张清刚 黄宁娜 刘芳 蔡同茂

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

吴正贵

(扬州生化制药厂)

已知血卟啉衍生物(以下简称 HPD)能较长时间滞留在癌组织内,在可见光或低能量激光照射下受激,可以破坏生物分子和杀伤癌细胞^[1,2]。细胞膜在此过程中有肿胀和通透性发生改变等现象^[3]。然而,HPD 对细胞膜类脂分子的物理性质有何影响未见报道。为此,我们用脂肪酸噻唑氮氧自由基自旋标记小鼠腹水肝癌细胞及其空胞膜,研究 HPD 光动力作用对膜分子结构损伤的动态变化,进一步证明 HPD 除了损伤细胞膜外,细胞质也是其主要作用的靶物质。

一、材料和方法

实验用昆明杂种小白鼠(♂),体重 20—25 克,瘤株系用腹水肝癌(H₂₂)。细胞接种和回收参照前文^[4]。腹水肝癌的空胞膜按文献[5]制备。

脂肪酸噻唑氮氧自由基(10.3)FMSL 的合成,自旋标记细胞膜以及 ESR 波谱的解析详见前文^[6]。

HPD 为扬州生化制药厂产品,经荧光光谱等鉴定与美国商品 Photofrin II 号相同。实验用剂量除注明外一般为 10mg/kg。光源为 500W 碘钨灯,光距 50 厘米,光照强度 100 mW/cm²。实验前将 HPD 与自旋标记完毕的小鼠腹水肝癌细胞一起避光温育 30 分钟,然后将样品封装

入石英毛细管放入恒温(37℃)谐振腔中,在避光条件下连续测 ESR 波谱 30 分钟(每二分钟测一个谱);另一组则边照射边测谱。另设不加 HPD 的对照组进行同样测定。

404 型高频小调场式 ESR 波谱仪系我所四室自制,工作在 X 波段。样品测定均在 404 型 ESR 变温装置的控温下进行,样品温度与谐振腔温度误差小于 ±0.5℃。

实验结果经五次重复,趋势相似。

二、结果与讨论

1. HPD 对小鼠腹水肝癌细胞膜 ESR 波谱影响 图 1 为 HPD 对小鼠腹水肝癌细胞及其空胞膜的 ESR 波谱的影响。已知位于生物膜中的(10.3)FMSL,其噻唑氮氧自由基距膜表面的极性端较近,其 ESR 波谱的各向异性是比较明显的^[6],从图 1a 的 ESR 波谱比较中看到含有 HPD 的腹水肝癌细胞在光辐照下,其低磁场区和高磁场区的波谱均明显地加强,中场线振幅(b₀)则明显减弱,ESR 波谱的最大分裂 2T'₁ 则趋变窄。图 1b 中空胞膜 ESR 波谱的最大分裂 2T'₁ 却逐渐增宽。实验表明 HPD 光动力作用可以改变小鼠腹水肝癌细胞及其空胞膜的 ESR 波谱。

2 HPD 对小鼠腹水肝癌细胞膜流动性影响 从图 2 可见随 HPD 的浓度增高,序参数降

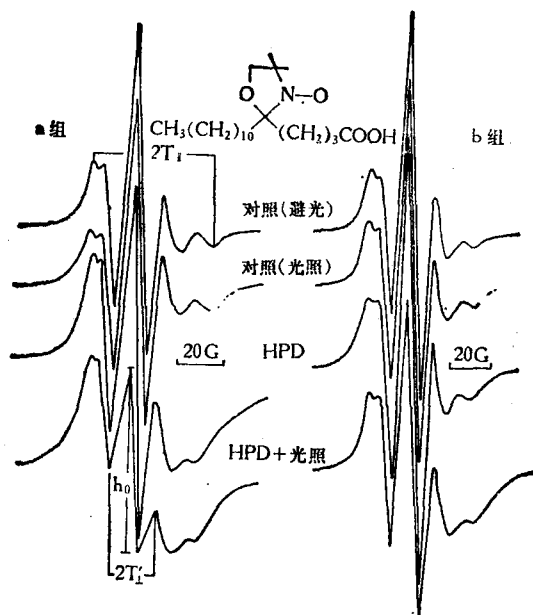


图1 HPD对小鼠腹水肝癌(a组)及其空胞膜(b组)的ESR波谱的影响

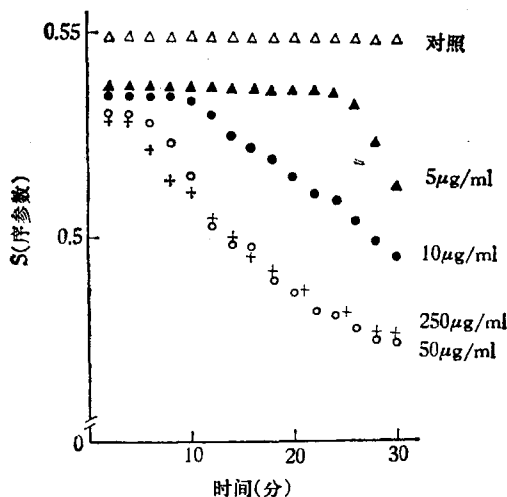


图2 不同浓度HPD对小鼠腹水肝癌细胞膜ESR波谱序参数的影响

低的时间提前,下降幅度也明显增加。当HPD浓度超过 $50\mu\text{g/ml}$ 时,其序参数变化趋于平稳。这可能与大剂量的HPD对细胞产生毒害作用有关系。因为HPD是一种低毒物质,对鼠的毒性试验证明其致死中量 LD_{50} 一般为 $100\text{--}300\mu\text{g/g}$ 左右。

从图3可以看出,对照组的序参数基本上

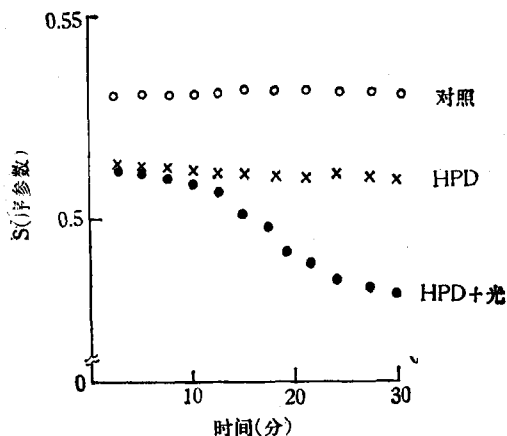


图3 HPD对小鼠腹水肝癌细胞膜流动性的影响

无变化。含有HPD的避光组,其序参数均比对照组低。在HPD加光辐照组中,序参数则随HPD光敏反应时间延长而降低,反映了细胞膜类脂流动性逐渐增加。此外,我们还计算了 τ_c 值(旋转相关时间),其变化趋势与序参数相似。上述结果表明HPD光动力作用可以降低膜类脂分子间的微观粘度,分子趋于无序,膜流动性明显加强。而在避光条件下,HPD本身对膜的流动性也有一定的增强作用。

为了排除细胞质内HPD的靶物质代谢作用对膜类脂物理性质的影响,我们用小鼠腹水肝癌细胞的空胞膜重复上述实验,结果见图4。

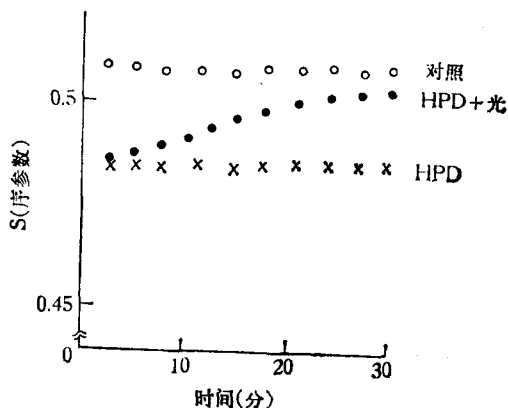


图4 HPD对小鼠腹水肝癌细胞空胞膜的流动性的影响

根据序参数的变化,对照组和HPD避光实验组与图3结果一致,进一步证实HPD本身即可在一定程度上降低膜的微观粘度,使膜流动

性增加。而 HPD 加光辐照组的结果与图 3 相反,即随光照时间延长,空胞膜的最大分裂 $2T_1$ 加宽,强固定化作用谱加强,序参数逐渐上升。表明在排除了细胞质内 HPD 的靶物质影响以后,HPD 光动力作用可使膜类脂分子的运动减弱。

总之,上述实验表明 HPD 本身可以降低小鼠腹水肝癌细胞的胞膜及其空胞膜的微观粘度,使膜流动性增加;但是,完整细胞的胞膜与空胞膜对 HPD 光动力作用的反应却相反,前者的膜流动性明显加强,后者则降低,其差异显然与细胞质的存在与否有关系。因此,完整的小鼠腹水肝癌细胞膜流动性继续增加,可能是 HPD 光动力损伤细胞质内靶物质以后对胞膜结构产生影响的结果。

3. HPD 对小鼠腹水肝癌细胞膜的损伤

在小鼠腹水肝癌细胞膜的 ESR 波谱测定过程中,我们发现 HPD 光动力作用能加速 ESR 波谱振幅 (h_0) 的衰减。为了进行比较,每次实验均用同一批细胞,取样量基本相同,FSR 仪器状态(如微波功率、调制和增益等)保持恒定下进行。发现 HPD 光动力作用过程,使 ESR 波谱振幅 (h_0) 衰减速率比对照组要快(图 5)。

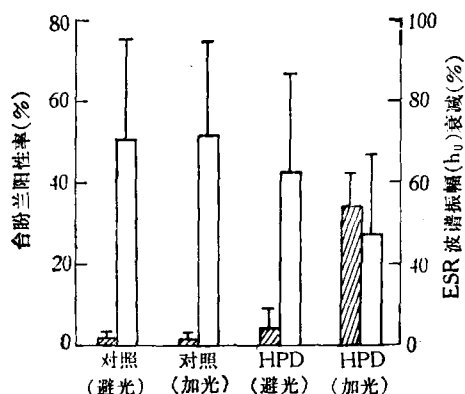


图 5 HPD 对小鼠腹水肝癌细胞膜损伤

■ 台盼蓝阳性率 □ ESR 波谱振幅衰减

已知自旋标记在生物膜中的脂肪酸噁唑氮氧自由基性质比较稳定,但是可被生物体系中的还原性物质还原,使自由基猝灭,ESR 振幅衰

减^[6]。上述结果表明 HPD 光动力作用确实损伤了细胞膜,加速细胞质内某些还原性物质外渗,将位于膜内的稳定的氮氧自由基还原。

为了比较 HPD 对腹水肝癌细胞膜的损伤,在进行 ESR 波谱测定的同时,我们对细胞活力进行观察,实验分组与图 3 完全相同。样品在超级恒温水浴中 ($37 \pm 0.1^\circ\text{C}$) 温育 30 分钟后,加入 2% 台盼蓝染料进行镜检,统计细胞的台盼蓝阳性率,其结果: 对照组平均为 2.4%; HPD 避光组为 6.5%; HPD 加光辐照组为 38.3% (图 5)。可见经过 HPD 光动力作用,细胞的台盼蓝阳性率明显地高于其它组。上述结果与 ESR 测定的结果是一致的。

三、小 结

本文使用 (10.3) FMSL 自旋标记小鼠腹水肝癌细胞及其空胞膜,研究了 HPD 对膜结构损伤的动态变化。发现 HPD 可降低腹水肝癌细胞膜的微粘度,增强膜的流动性。

在 HPD 光动力作用下,腹水肝癌细胞膜流动性一般随 HPD 浓度增加而加强。当 HPD 浓度在 $50 \mu\text{g/g}$ 以上时,对膜流动性影响趋于平稳。此外,它还使台盼蓝染料渗入细胞的阳性率明显增加;加速细胞质内还原性物质外渗,将稳定的脂肪酸氮氧自由基还原。

小鼠腹水肝癌细胞与其空胞膜的流动性变化对 HPD 的反应相似;但它们对 HPD 光动力作用的反应却相反。这可能与完整细胞中细胞质损伤后对膜结构的影响有关系。

参 考 文 献

- [1] Lipson, R. L. et al.: *Cancer*, **20**, 2255, 1967.
- [2] Gomer, C. J. et al.: *Cancer Res.*, **39**, 146, 1979.
- [3] Moan, J. et al.: *Tumor Res.*, **15**, 1, Sappora, 1980.
- [4] 张清刚等:《科学通报》, **28**, 560, 1983.
- [5] Colombini, M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 69, 1973.
- [6] 张清刚等:《生物化学生物物理学报》, **15**, 25, 1983.

[本文于 1984 年 2 月 14 日收到]