

溴氰菊酯对兔红细胞内 Na^+ 浓度影响的 ^{23}Na NMR 研究*

丛蓉娟 周 哲 洪水根** 吴钦义

(厦门大学化学系, 厦门 361005)

关键词 ^{23}Na NMR, 兔红细胞, 配位竞争

细胞内 Na^+ 浓度 $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 的大小具有重要的生理意义。位移试剂 $\text{Dy}(\text{PPP})_2^-$ [二(三聚磷酸)合镝(III)离子] 能使细胞外 Na^+ (Na_{out}^+) 共振频率向高场位移, 使得 ^{23}Na NMR 在不破坏细胞结构的条件下直接观察 Na_{in}^+ 成为可能, 国内这方面的研究甚少。有研究指出, 新型杀虫剂拟菊酯能与细胞膜组成成分相互作用, 如 Na^+ 通道。溴氰菊酯是一种高效低毒、且具有较长残效的拟菊酯。因此本文用 ^{23}Na NMR 研究溴氰菊酯对新西兰兔红细胞 $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 的影响。

^{23}Na NMR 测试在 Varian FT-80A 核磁共振谱仪上进行。发射频率 21.04 MHz, 谱宽 1000 Hz, 取数时间 0.25 s, 90° 脉宽 15 μs , Hct 为 24—25%, 累加 200—3000 次。

向兔红细胞悬浮液中直接加入 $\text{Dy}(\text{PPP})_2^-$, Na_{out}^+ 和 Na_{in}^+ 共振峰分开, 由 ^{23}Na NMR 积分强度与 Na^+ 浓度的标准曲线及细胞的压积比, 得 $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 为 $13.5 \pm 0.8 \text{ mmol/L}$ (对 $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 而言, mmol/L 系指每升细胞所含的毫摩尔数) ($n=3$)。细胞与不同浓度的溴氰菊酯(浓度为 7.4, 37.2 和 139.5 $\mu\text{mol/L}$) 作用 16 h 后, $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 分别为 14.1 ± 0.1 , 12.5 ± 0.9 和 $14.3 \pm 2.9 \text{ mmol/L}$ ($n=3$)。可见在此时间内, 溴氰菊酯对兔红细胞 $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 基本无影响, 这就说明对 Na^+ 通道也基本无影响。细胞放置 112 h 后, ^{23}Na NMR 峰总积分量不变, Na_{in}^+ 峰明显增强, $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 升至 28.1 mmol/L; Na_{out}^+ 峰明显减弱, 且 Na_{out}^+ 峰积分强度的减小等于 Na_{in}^+ 的增加。说明兔红细胞内所有 Na^+ 都是 NMR

可见的。本文还发现, 细胞放置后 Na_{in}^+ 化学位移 (δ) 基本不变, Na_{out}^+ 的 δ 向低场移动 2.1 ppm, Na_{out}^+ 峰半高宽增加 9.5 Hz。细胞与溴氰菊酯 (37.2 $\mu\text{mol/L}$) 作用 112 h, ^{23}Na NMR 峰积分总量也基本不变, 但 Na_{in}^+ 峰面积明显增加, $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 为 26.7 mmol/L, Na_{out}^+ 峰面积明显减小, 其减小量基本上等于 Na_{in}^+ 的增加量, Na_{in}^+ 的 δ 基本不变, Na_{out}^+ 的 δ 向低场移动 3.0 ppm, Na_{out}^+ 峰半高宽增加 11.0 Hz。长时间放置, 细胞膜可能会损伤, 细胞膜的损伤会导致 Na^+ 从细胞外流入细胞内, $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$ 增加, 同时引起部分 K^+ 及血红蛋白漏出, 漏出的 K^+ 可能与 Na^+ 竞争 $\text{Dy}(\text{PPP})_2^-$, 使得 Na_{out}^+ 峰向低场移动, 血红蛋白与 Na_{out}^+ 相互作用, Na_{out}^+ 弛豫加快, Na_{out}^+ 峰变宽。尽管溴氰菊酯并不明显影响 $[\text{Na}_{\text{in}}^+]$, 但它的存在使得 Na_{out}^+ 峰向低场移动及半高宽增加的量均增加, 说明溴氰菊酯长时间与细胞作用, 会加剧细胞膜的损伤, 使得 K^+ 和血红蛋白的漏出量增加。

许多研究表明, Na^+ 与 $\text{Dy}(\text{PPP})_2^-$ 的作用常受其它二价阳离子的干扰, 如 Mg^{2+} , Ca^{2+} , 这些干扰离子与 PPP^{5-} 结合, 产生沉淀, 位移试剂失效。为证实 K^+ 与 Na^+ 竞争 $\text{Dy}(\text{PPP})_2^-$ 这一尚无人报道的现象, 本文设计了如下实验: 在 10 mm 管中配制含 5 mmol/L $\text{Dy}(\text{PPP})_2^-$, 200 mmol/L Na^+ 和不同量的 KI 溶液 1 ml, 以 150 mmol/L NaCl (50% D_2O , V:V) 的 5 mm

* 福建省科学基金 4000736 项目资助。

** 厦门大学生物系。

收稿日期: 1992-04-20

修回日期: 1992-06-15

管为外标 (0ppm) 和锁场管, 测其 ^{23}Na NMR 谱. $[\text{K}^+]/[\text{Na}^+]$ (mol:mol) 分别为 0.000, 0.150, 0.375, 0.600, 0.750 和 0.900 时, ^{23}Na 化学位移 δ 为 -5.42 , -4.67 , -3.54 , -3.14 , -2.74 和 -2.48ppm , ^{23}Na NMR 信号的 δ 随

K^+ 量的增加而向低场移动. 计算机回归得

$$\delta = -5.41 + 5.57 \frac{[\text{K}^+]}{[\text{Na}^+]} - 2.63 \frac{[\text{K}^+]^2}{[\text{Na}^+]^2}$$

这一竞争机理正在探讨中.

人工设计的 Ribozymes 体外切割 HPV16 E6 和 E7 mRNA 的研究*

何玉凯 祁国荣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

关键词 ribozyme, 人乳头状瘤病毒 (HPV), HPV16 E6 和 E7 mRNA

人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 是一类感染人体的皮肤粘膜并引起乳头状瘤病变的病毒. 目前发现的 HPV 已有 63 型, 不同型的 HPV 引起人体不同部位的病变. HPV 16 主要与生殖系统的肿瘤尤其是子宫颈癌有密切关系. 近年来的实验表明 HPV 16 E6 和 E7 基因在宫颈癌的发生发展中起着非常重要的作用. 体外实验表明 E6 和 E7 基因可以转化宿主细胞 (包括细胞系和初级培养细胞). 而在宫颈癌组织及其细胞系中 E6 和 E7 基因都有高水平的表达. 近两年有实验表明 HPV 16 E6 和 E7 蛋白可以分别与肿瘤抑制基因产物 p53 蛋白及 RB 蛋白结合而抑制其功能. Ribozyme (酶活性 RNA) 是具有催化功能的 RNA 分子. 利用 Symons 提出的锤头状结构, 人们可以设计合成 ribozymes. 我们的工作是通过阻断 HPV16 E6 和 E7 基因的表达而逆转 HPV16 阳性的宫颈癌细胞系的肿瘤表型. 本文报道了人工合成的 ribozymes 体外切割 HPV16 E6 和 E7 mRNA 的研究.

HPV16 E6 和 E7 基因首先被亚克隆到 pTZ19R 质粒的 T7 启动子的下游. 用内切酶

线性化后作为 T7 RNA 聚合酶的模板进行体外转录制备靶 mRNA. 转录时参入 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -UTP. 标记的 HPV16 E6 (568nt) 和 E7 (171nt) mRNA 片段用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化.

Ribozyme 的设计主要参考锤头状结构并考虑到另外两个因素. 1. 在靶 mRNA 上切点及其旁侧序列呈松散结构便于与 ribozyme 结合; 2. Ribozyme 与靶 mRNA 的结合强度要适当. Ribozymes 的合成和纯化类似于 DNA 的合成.

体外切割反应条件如下: 50mmol/L Tris pH7.5, 20 mmol/L MgCl_2 , 20mmol/L NaCl, ribozyme 和靶 mRNA 适量. 结果表明体外切割非常特异, ribozyme HR2 在 597 位 (此序号是采用 HPV16 基因组上 DNA 的序号, 下同) 切割 E7mRNA 产生 86 核苷酸 (简称 nt, 下同) 和 85 nt 两个片段. Ribozyme HR7 在 240 位切割 E6 mRNA 产生 311nt 和 257nt 两个片段 (见图 1). 而 HR2 不能切割 E6 mRNA 片段, 反之 HR7 也不能切割 E7mRNA

* 本工作是 863 和国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1992-06-19