

# 小鼠腹水型肝癌细胞对竹红菌乙素的摄取和滞留\*

孙继山 张 莉 乐加昌

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

## 提 要

采用 SDS 胶束增溶法较详细地研究了小鼠腹水型肝癌细胞对竹红菌乙素的摄取和滞留过程. 从实验结果表明: a. 细胞摄取乙素与弗伦德里希吸附等温式符合较好, 细胞的饱和吸附量为每个细胞吸附  $1.23 \times 10^8$  乙素分子. b. 摄取速度很快, 37°C 下 3min 即可达到饱和. c. 被细胞摄取的乙素较难重新释放到溶液, 而且未发生明显代谢变化. d. 血清可携带乙素在细胞间传递. e. 乙素趋向于进入细胞膜双分子层的深处. 还结合实验结果对所采用的 SDS 胶束增溶法进行了评述.

**关键词** 竹红菌乙素, 腹水型肝癌细胞, 细胞摄取

竹红菌素 (hypocrellin) 是我国首先发现并应用于临床的一种新型光敏化剂, 对某些皮肤病, 比如牛皮癣、白癫疯具有显著疗效, 近年来发现对癌细胞也有光敏杀伤作用<sup>[1,2]</sup>. 竹红菌乙素 (以下简称乙素, HB) 结构已鉴定清楚, 蒋丽金等人对其光化学性质做了大量研究<sup>[3,4]</sup>. 但至今, 活细胞对乙素的摄取和滞留尚未见公开报道, 而这项工作无论在理论上阐明细胞杀伤机理, 还是临床上改进药型及给药方式都是必不可少的. 本实验以小鼠腹水型肝癌细胞 (AH) 为材料, 主要就该细胞对乙素的摄取模型, 摄取和滞留过程予以研究, 为阐明竹红菌乙素光疗机制提供有益的信息.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 竹红菌乙素**由竹红菌甲素在碱性条件下转换<sup>[5]</sup>, 分离提纯后经 H-NMR 检验确认. 用二甲基亚砜将乙素配成 2mmol/L 储备液. 脂肪酸系列荧光探针 2AP, 7AS, 9AS, 12AS, 16AP 为分子探针公司产品, 其余均为国产分析纯试剂.

**1.1.2 AH 细胞接种**在小鼠腹腔内, 6—10 d 后抽取, 经磷酸缓冲液 (PBS; 0.15mol/L NaCl, 5mmol/L 磷酸盐, pH7.4) 洗涤数次去

除少量血细胞后, 细胞浓度为  $3 \times 10^6$  个/ml 备用.

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞摄取**由胶束增溶法测量: (1) 乙素上清液加 10% SDS (测定细胞外乙素浓度的变化); (2) 细胞悬液加 10% 的 SDS 溶液 (测定细胞内乙素浓度的变化); 两者均以同样 9:1 (V/V) 混合, 在 25°C 平衡 10min 后, 采用日立 850 分光光度计测定荧光强度, 激发波长 (Ex) 450nm, 发射波长 (Em) 620nm, 根据荧光强度, 由标准曲线求细胞摄取量. 该方法简单、可靠.

**1.2.2 乙素在细胞中滞留:**在细胞浓度为  $3 \times 10^6$  个/ml 的悬液中加入过量的乙素, 37°C 温育 10min 后, 用冷 PBS 洗 3 遍, 离心 2 000 r/min 后再加入 PBS 或含有 15% 小牛血清的 PBS 至原体积, 而后在 37°C 温度下温育, 于不同时间取 1.5ml 样品在 2 000 r/min 离心, 用胶束增溶法测上清液的乙素的荧光强度. 沉淀的细胞加 PBS 至 2.7ml, 再加入 0.3ml 10% 的 SDS 测其荧光强度, 此即滞留在细胞内的乙素.

\* 本项目为国家自然科学基金支持项目.

收稿日期: 1992-05-11 修回日期: 1993-02-03

1.2.3 能量转移法测乙素在膜中位置:在细胞悬液中加入  $4\mu\text{mol/L}$  的荧光探针,  $37^\circ\text{C}$  保温 1h 后, 加入  $2\text{mmol/L}$  的乙素至终浓度  $80\mu\text{mol/L}$ , 继续保温 10min, 用 PBS 洗 3 遍后测荧光强度 ( $\text{ex}=365\text{nm}$ ,  $\text{em}=449\text{nm}$ ).

1.2.4 荧光显微观察: 使用 OLYMPAS 荧光显微镜, 激发光源为氙灯, 光线通过 BG12 滤光片后激发细胞上的乙素, 发出的荧光通过  $510\text{nm}$  以上的通带滤光片后观察和照相记录.

## 2 结果和讨论

### 2.1 SDS 胶束增溶法的评价

测量细胞对光敏剂摄取有多种方法, 常用的是测定上清液中光敏剂的剩余量, 这需要光敏剂本身具有可检测的特性, 比如, 较强的吸收、荧光或显色反应; 也可以测细胞内的光敏剂含量, 通常将细胞用酸、碱或有机溶剂处理后再进行测定, 后一方法比较费时, 细胞碎片干扰较大, 而且操作时有一定危险性. 乙素因其疏水特性和平面结构, 在水溶液中易聚积成颗粒, 使其荧光量子产率下降, 难以直接测量, 这同某些疏水的卟啉化合物相似<sup>[6]</sup>. 但若用胶束将溶液中的疏水颗粒溶解在其疏水区, 可极大地提高荧光量子产率. 图 1 表示乙素在不含或含不同浓度 SDS 的溶液体系的荧光测定值,

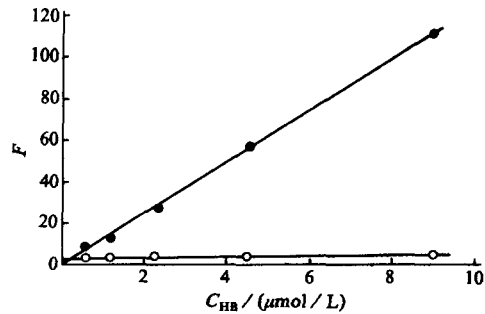


图 1 SDS 胶束对竹红菌乙素荧光的增强作用

Fig. 1 The enhancement of HB

fluorescence intensity by SDS vesicle

●—●: 加 SDS    ○—○: 不含 SDS  
 ●—●: in SDS    ○—○: no SDS  
 1% SDS (W/V); 激发波长: 450nm,  
 发射波长: 620nm

SDS concentration: 1%, Ex: 450nm; Em: 620nm

回归后二者的斜率分别为 12.3 和 0.23, 灵敏度提高 54 倍. 而且线性较好 ( $r=0.9998$ ), 温度影响不大, 在  $20-40^\circ\text{C}$  范围内, 温度系数为  $0.132$  荧光单位/ $^\circ\text{C}$ , 每度的相对误差小于  $0.3\%$ . 虽然也有用 CTAB(cetyltrimethylammmonium bromide) 胶束增溶光敏剂的报道, 但未作具体评价<sup>[7]</sup>. 除 SDS 外, 我们还检测了其它几种胶束, 比如, Tween-80, Triton-X100 对乙素增溶后乙素的荧光产率, 但均不如 SDS.

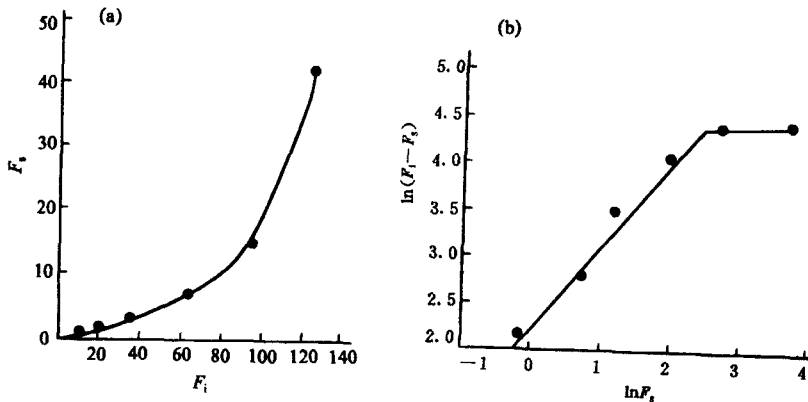


图 2 细胞摄取平衡后, 上清液荧光强度 ( $F_s$ ) 与初始荧光强度 ( $F_d$ ) 的关系

Fig. 2 After equilibrium on the uptake of HB by cells, the relationship between supernatant fluorescence intensity ( $F_s$ ) and initial fluorescence intensity ( $F_d$ )

a. 相分配关系图, b. 弗伦德里希吸附等温式作图

a. Phase equilibrium, b. Freundlich adsorption equilibrium

## 2.2 摄取形式

由于乙素的疏水特性,故当其与细胞接触时,可能产生两种效应:一种效应是由于细胞膜内疏水层的萃取,另一种是细胞表面对非水溶性颗粒的吸附.根据物理化学公式,如果属于萃取,那么由相分配公式所得平衡后上清液中的乙素浓度应与加入体系中的初始浓度成正比.如果属于吸附,可以根据情况选择某一类吸附公式验证.我们选择在溶液吸附中常见的佛伦德里希等温吸附公式.根据该公式可以推知,初始浓度与吸附后上清液浓度差的对数应与上清液浓度的对数成正比.实验结果将上面两个关系分别作图(见图2).由图2b可见,在初始浓度较低时,线性较好,所以AH细胞对乙素的摄取可能是吸附型的.相分配的前提是:溶质在互不相溶的两相中均能溶解,但正如前面提到的,乙素在水溶液中并未形成真溶液,所以不能满足这个前提.相反,佛伦德利希等温吸附式适用范围较宽,即可单层也可多层,即可物理吸附又可化学吸附.因而比较适合我们这个体系,实验结果也较好地证明了这一点.由图2b还可见,上清浓度增加到一定程度,细胞吸附量不再增加.这说明吸附饱和,根据折点计算出每个细胞在25℃时最多摄取约 $1.2 \times 10^8$ 个乙素.

## 2.3 吸附动力学过程

**2.3.1** 上述结果已证实,在平衡状态时AH细胞对于乙素的摄取属于吸附类型的摄取,但一项与临床关系密切的指标是摄取速率.我们应用SDS胶束增溶法测量了AH细胞在15℃和37℃条件下的摄取时间进程,并以半对数做图(图3).

由半对数坐标可见线性尚可,说明溶液中乙素的含量是按一级动力学过程下降.而且吸附位点足够多的情况下,那么溶液中乙素的含量可以符合一级动力学下降模式,实际上在吸附初期基本符合这些条件的.此外在37℃的3min和5min两个点明显与前面几个点偏离,这可能意味着吸附饱和,由此不难看出AH细胞吸附乙素的过程很快.由前面几个点作回归

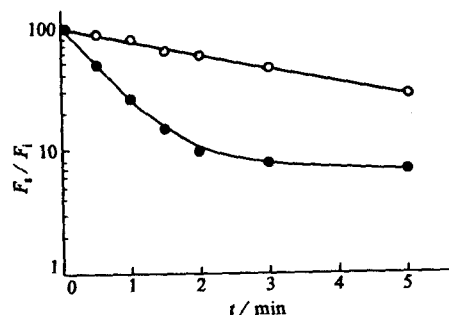


图3 AH细胞摄取乙素的时间进程

Fig. 3 The time course of uptake of HB by

AH cells

○—○: 15℃, ●—●: 37℃

乙素初始浓度:  $10 \mu\text{mol/L}$

The initial concentration of HB was  $10 \mu\text{mol/L}$

细胞浓度:  $3 \times 10^6/\text{ml}$

The Cell concentration was  $10^6/\text{ml}$

$F_s, F_i$  的意义见图2

The meanings of  $F_s$  and  $F_i$  were the same as in

Fig. 2

直线计算出15℃和37℃的摄取曲线的斜率分别为 $0.108 \text{min}^{-1}$ 和 $0.502 \text{min}^{-1}$ .

**2.3.2** 由于疏水物质可为插入膜脂双层的疏水区域,所以疏水的乙素颗粒一旦被膜吸附,可能进一步进入膜的疏水区并最终成为分散的乙素分子,从而提高荧光量子产率.事实正是这样,当将乙素加入膜悬液后,荧光强度要比在PBS中大的多.利用这一特点,我们可以连续监测乙素被AH细胞摄取过程.我们选取不同温度观察,得到荧光强度随时间的进程如图4所示.假设:a.解吸附速率远远小于吸附速率,b.溶液中乙素荧光量子产率远远小于膜中乙素荧光量子产率,经推导可得到:

$$I = I(1 - e^{-Kt})$$

根据上述公式用叠代法求出的各曲线的I和K值如表1所示.由于在推导时K表示吸附速率,所以用不同时间的K值可求吸附活化能,经计算活化能约为 $468 \text{J/mol}$ ,这数值很小,所以吸附在能力学上几乎不存在障碍.

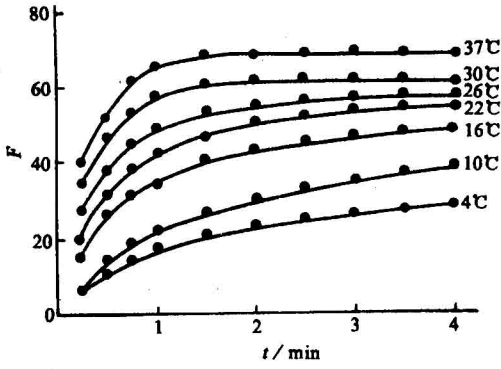


图4 不同温度下细胞摄取乙素的时间进程  
Fig. 4 The time course of uptake of HB by AH cells at different temperature

乙素初始浓度: 20 $\mu$ mol/L

The initial concentration of HB was 20 $\mu$ mol/L

细胞浓度同图3

the cell concentration was the same as in Fig. 3

表1  $I_0$ ,  $K$  和半饱和吸附时间  $t_{1/2}$  与温度的关系

Table 1 The dependence of  $I_0$ ,  $K$ , and half time of saturated adsorption ( $t_{1/2}$ ) on temperature

$t/C$	4	10	16	22	26	30	37
$I_0$	28.9	40.7	47.6	54.0	57.3	64.4	68.1
$K$	0.89	0.95	1.49	1.69	2.31	3.12	3.35
$t_{1/2}/min$	0.78	0.73	0.46	0.41	0.30	0.22	0.21

2.3.3 细胞摄取光敏剂另一重要特性是光敏剂在细胞的滞留。我们分别在 25 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 两个温度下观察滞留。从图 5 可以看到随着放置时间延长, 上清液中乙素量增加, 胞内乙素量减少, 且减少量与增加量几乎相同, 说明胞内乙素的减少是由于重新进入溶液造成的, 而非被细胞代谢。另外还可以看出在保温 60min 后溶液中乙素的量仍未达到饱和, 说明乙素自细胞中释放是一缓慢过程, 这与细胞摄取很快达到饱和不同。若在体系中加入血清(见图 5a), 细胞中乙素释放明显加快, 并在 20—30min 达到饱和, 这意味着血清可将乙素从一个细胞转移到另一个细胞。由于血清中含有多种可携带脂溶性分子的蛋白, 比如脂蛋白, 白蛋白等, 所以上述结果是合理的。

## 2.4 乙素在 AH 细胞中的位置

### 2.4.1 荧光显微镜观察: 加入乙素后经一

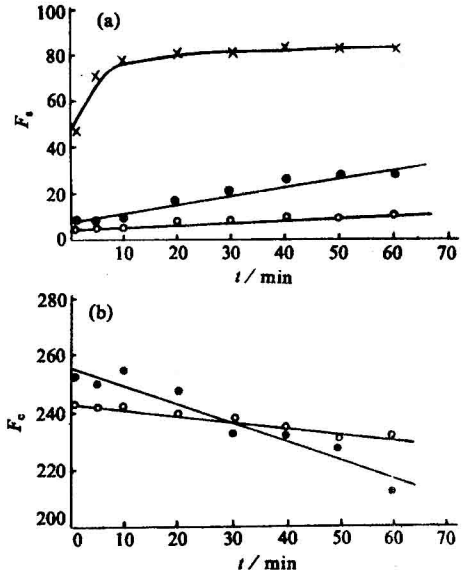


图5 乙素在细胞内的滞留

Fig. 5 The retention of HB in the cell

(a): 上清液中的乙素荧光强度 ( $F_s$ )

(b): 细胞内的乙素荧光强度 ( $F_c$ )

(a)  $F_s$ : the fluorescence intensity of supernatant

(b)  $F_c$ : the fluorescence intensity of HB within cells

●—●: 37 $^{\circ}$ C, ○—○: 25 $^{\circ}$ C,

×—×: 小牛血清 (CS)

×—×: Calf serum (CS)

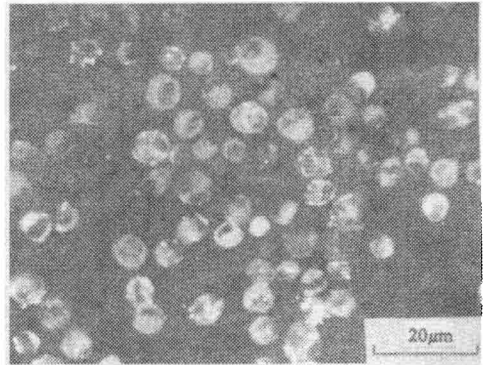


图6 胞和吸附乙素的 AH 细胞荧光显微镜照片

Fig. 6 The fluorescence micrography of AH cells saturated adsorption HB

段时间平衡, 从荧光显微镜照片(图 6) 可以看到两种情况: a. 发光均匀, 说明乙素被 AH 均匀摄取. b. 有较强的光点, 这可能是细胞吞噬颗粒或细胞存在乙素的高密度聚集区, 为了证

明细胞的吞噬作用是否存在, 我们用较强的 X 射线将细胞杀死, 或加入阻断细胞吞噬功能的药物心得安<sup>[8]</sup>后亮点并未见少, 所以亮点的形成与吞噬作用无关. 这不同于 Croce 观察草履虫对血卟啉摄取的结果<sup>[9]</sup>.

**2.4.2 荧光探针能量转移:**前已述及乙素进入 AH 后主要位于膜内, 但膜是由一定厚度的双层脂分子排列而成, 乙素究竟在哪一位置上较多呢? 鉴于乙素的激发波长和脂肪酸探针的发射谱有交叠, 根据辐射跃迁能量传递原理, 供体荧光猝灭效率与供体和受体之间的距离成反比. 因而可以借助荧光探针发射荧光强度的下降判断乙素在膜内的位置. 结果如表 2 所示, 不难看出乙素主要位于膜深处, 这与乙素的较强疏水性是一致的.

表 2 乙素对位于膜双分子层不同位置的系列脂肪酸荧光探针的猝灭<sup>1)</sup>

Table 2 The quenching of HB to fatty acid fluorescence probes which were labeled at different depths of cell membranes

	2AP	7AS	9AS	12AS	16AP
( $I/I_0$ )/(% )	76.2	60.8	58.1	55.9	44.7

1)  $I$  和  $I_0$  分别代表加和不加乙素时, 脂肪酸探针的荧光强度  
 $I$  and  $I_0$  represented the fluorescence intensity of probes in

the presence and absence of HB respectively

文中动力学常数的计算由本室张仲伦先生帮助完成, 在此深表感谢.

### 参 考 文 献

- 1 Chen Yuanteng, Wan Xiangyi. Hypocrellin A—a new drug for photochemotherapy. *Ke Xue Tong Bao*, 1981;26(11):1040—1042
- 2 董仓玉, 贾弘提, 张力等. 生物化学杂志, 1987;3(5):468—472
- 3 梁丽, 竺迺珏, 张曼华. 竹红菌乙素的晶体和分子结构. 科学通报, 1987;32(1):56—59
- 4 蒋丽金, 竹红菌素的结构、性质、光化学反应及反应机制. 科学通报, 1990;22:1681—1690
- 5 赵开弘, 蒋丽金. 竹红菌乙素在碱性和中性溶液中的结构变化. 有机化学, 1989;(9):252—254
- 6 Bottiroli G, Ramponi R, Equilibrium among hematoporphyrin *Photochem photobiol.* 1988;47(2):209—214
- 7 Kessel D, Smith K, Photosensitization with derivatives of chlorophyll. *Photochem Photobiol.* 1989;49(2):557
- 8 Wyroba E, Pharmacological specificity of beta blocker induced inhibition of paramecium phagocytosis, *Acta Protozool.* 1989;28:127—136
- 9 Croce A C, Wyroba W, Bottiroli G. Uptake and distribution of hematoporphyrin derivae in the unicellular eukaryote paramecium. *J Photobiol (B)*, 1990;6:405—417

## Uptake and Retention of Hypocrellin B by Murine Ascitic Hepatoma Cells

Sun Jishan Zhang Li Yue Jiachang

(Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101)

### ABSTRACT

The uptake and the retention of hypocrellin B (HB) by murine ascitic hepatoma (AH) cells was measured as function of incubation time. The data of uptake fitted the Freundlich adsorption isotherm very well over a wide range of hypocrellin B concentrations. The uptake occurred very quickly and reached the maximum in 3 min at 37°C. The adsorbed HB was quite difficult to be released to phosphate buffered solution whereas the releasing process was enhanced significantly by the addition of serum into the bath medium. The fluorescence quenching experiments using fatty acid probes located at different depths of cellular membranes indicated that the HB molecules have the trend inserting into the deep hydrophobic domains.

**Key words** hypocrellin B, hepatoma cells, cell uptake.