

血卟啉衍生物合并照光对腺苷转运和在肝癌细胞内转化的影响

傅乃武、全兰萍、张立生 (中国医学科学院肿瘤研究所药理室, 北京 100021)

提要 血卟啉衍生物(hematoporphyrin derivatives, HPD)合并照光对肝癌细胞腺苷的转运和摄取有很强的抑制,对腺苷摄取始初速度的抑制作用也很显著.抑制作用的大小与HPD的剂量和照光时间呈正比关系. [^3H]腺苷参入肝癌细胞内酸溶和酸不溶物质中的量受到同等抑制.对癌细胞内腺苷的磷酸化反应没有明显影响.

关键词 血卟啉光辐射; 腺苷; 腺苷磷酸化作用; 肝癌细胞;

细胞膜脂质中含有较丰富的多不饱和脂肪酸,很易受活性氧和自由基的攻击,发生脂质

1986年1月23日收稿 1987年2月17日修回
本文是中国科学院科学基金资助课题 No 197

过氧化作用,破坏其结构和功能,HPD对癌细胞膜,亚细胞器膜和正常红细胞膜的光动力作用很敏感,细胞膜可能是HPD光辐射损伤的始初作用部位⁽¹⁻⁴⁾.腺苷是合成DNA的重要前体,也是合成ATP的重要原料,本文报道在HPD光动力作用下腺苷在癌细胞膜的转运、摄取和细胞内代谢.

材 料 和 方 法

材料 昆明种小鼠,♀,体重 $20 \pm \text{SD}$ 1.4 g,腹水肝癌(Hep A)每7d传代一次,本实验所用系接种后d7腹水、用PBS稀释至所需

浓度、HPD(B)系北京医药工业研究所生产(批号 820929), HPD(Y)系扬州生化制药厂生产(批号 840426), HPD(B)中聚合体含约 30%, HPD(Y)中聚合体含约 15%, 美国的 Photofrin II 中聚合体含约 50%。腺苷(纯度 98%), 5'-ATP(Na₂)(含量 101.5%), 为西德 GMBH 产品, 5'-AMP(Na₂)(含量 98%以上)和 5'-ADP(Na₂)(含量 98%)均为 Calbiochem 产品。其它试剂是北京化工厂产品, 分析纯。[³H]腺苷(1.33 kBq/mmol)为上海原子核研究所产品, 为 50%乙醇水溶液。

癌细胞处理 在稀释好的癌细胞悬液内加入 100 μl HPD 溶液, 内含所需浓度。37℃放 30 min, 取出照光, 光源为黑光灯管(北京灯泡厂), 平行二支灯管共 40 W。发射光谱主峰 365 nm, 光源距离癌细胞悬液为 1 cm, 光照强度为 0.2 mW/cm²。照光后用 PBS 洗涤癌细胞 2 次, 加入转运基质将癌细胞稀释至所需浓度。

转运和摄取 应用“油-终止(oil-stop)⁽³⁾法”测定细胞膜对腺苷的转运。癌细胞经转运基质稀释成 1 × 10⁷/ml 的细胞悬液。转运基质的组成 (mmol/L): NaCl 17, KCl 20, MgCl₂ 1.5, CaCl₂ 1.3, NaH₂PO₄ 1, Tris-HCl 75, pH 7.4。腺苷的摄取试验用核素法⁽⁵⁾。腺苷参入肝癌细胞内酸溶和酸不溶物质试验按核素法⁽⁶⁻⁸⁾。

细胞内腺苷酸库的分离和测定 肝癌细胞用转运基质稀释成 2 × 10⁷/ml 的细胞悬液。取此悬液 0.2 ml, 加入 1.5 ml 塑料离心管内。此管内含有 MgCl₂(5 mmol/L) 0.2 ml, 腺苷(20 mmol/L)0.3 ml 和转运基质 0.2 ml, 37℃温育 3 min, 取出, 冰水中冷却。加入 5% TCA 0.1 ml, 4℃放置 40 min。离心,(9700 × g, 3 min)。取上清点样, 用 Whatman 1 号滤纸, 展开剂为异丁酸:浓 NH₄OH(28%):H₂O (28.85:1:10, vol:vol, pH 4.0)。在层析缸内放 20 h。另用腺苷, AMP, ADP 和 ATP 层析作为定性对照。uv 显色。剪下层析斑块, 用

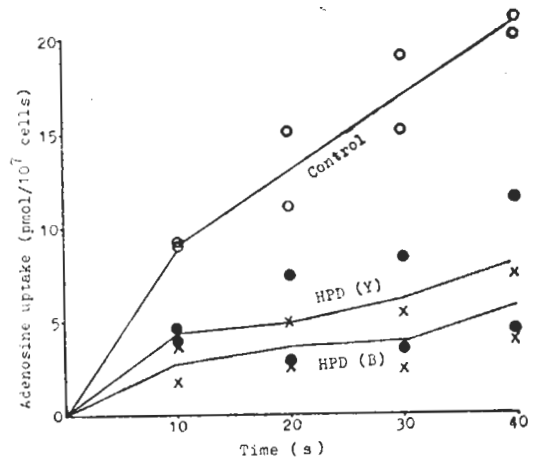


Fig 1. Photodynamic action of hematoporphyrin derivatives (HPD) 5 μg/ml on adenosine transport in hepatoma cells. n = 2 expts. Irradiation time 10 min, cancer cells 1 × 10⁷/ml, [³H]adenosine 370 GBq.

HCl 0.1 mol/L 浸泡 4 h, 离心, 取上清液在岛津分光光度计 260 nm 波长处测定各核苷酸的光吸收。另外制作腺苷和三种腺苷酸的标准曲线, 以确定样本中各腺苷酸的含量。

结 果

腺苷转运 用“油-终止法”测定腺苷摄取的始初过程。在 40 s 内腺苷的摄取呈正比关系(图 1)。HPD(B)和 HPD(Y)在 5 μg/ml, 照光 10 min, 腺苷的转运大受抑制。

腺苷摄取 HPD (B) 和 HPD (Y) 在 1.25 μg/ml, 照光 10 min, 对腺苷摄取的抑制分别是 39 和 20%, 随剂量增加而增加。在 10 μg/ml, HPD(B)和 HPD(Y)的抑制分别是 70 和 69% (图 2)。在 2.5 μg/ml, 腺苷摄取随照光时间延长而抑制程度增加(图 3)。

腺苷摄取动力学 见图 4, 对照组肝癌细胞对腺苷的摄取速度随细胞外基质中腺苷浓度增加而加快。当腺苷 < 50 pmol/L, 摄取速度随浓度加大呈直线增加, 当 > 50 pmol/L, 摄取速度变慢、HPD(B)和 HPD(Y)在 5 μg/ml, 照光 10 min, 腺苷摄取速度显著被抑制, HPD(B)的抑制率为 92%–92.6%, HPD(Y)的抑制率是

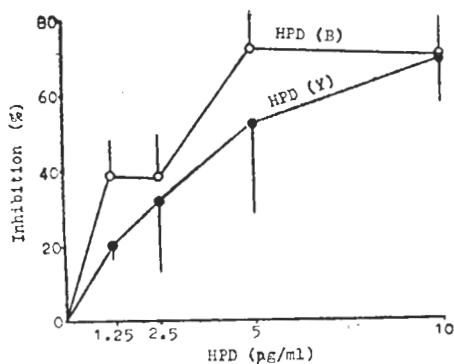


Fig 2. Photodynamic action of HPD 10 µg/ml on adenosine uptake. $n=3$ expts, $\bar{x}\pm SD$. Irradiation time 10 min, cancer cells 1×10^7 /ml. Exposure time of $[^3H]$ adenosine with cancer cells 3 min.

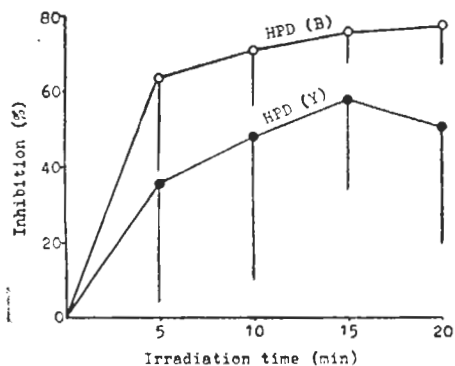


Fig 3. Inhibition of adenosine uptake by HPD 2.5 µg/ml + irradiation. $n=3$ expts, $\bar{x}\pm SD$. Cancer cells 1×10^7 /ml. Exposure time of $[^3H]$ adenosine with cancer cells 3 min.

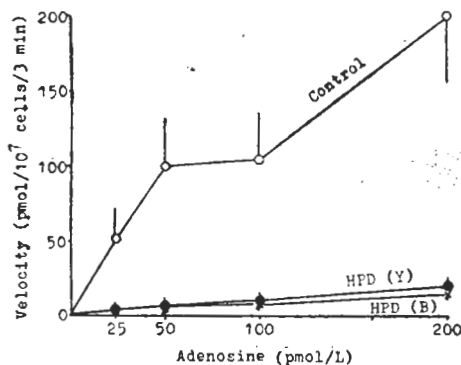


Fig 4. Adenosine uptake and photodynamic action of HPD 5 µg/ml. $n=3$ expts, $\bar{x}\pm SD$. Irradiation time 10 min. Cancer cells 1×10^7 /ml.

90%–92.6%.

HPD 对腺苷参入肝癌细胞内酸溶和酸不

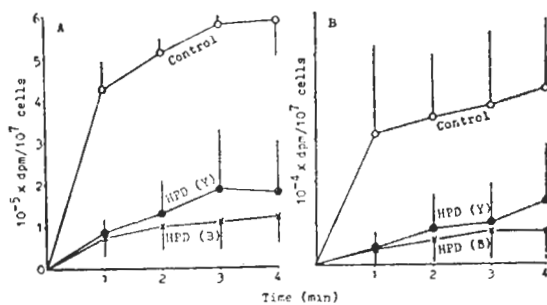


Fig 5. Photodynamic effect of HPD 5 µg/ml on adenosine incorporation into acid-soluble materials in hepatoma cells. $n=3$ expts, $\bar{x}\pm SD$. Irradiation time 10 min. Cancer cells 1×10^7 /ml. A) TCA-soluble material. B) TCA-insoluble material.

溶物质中的光动力效应 从图 5 A 和 5 B, $[^3H]$ 腺苷参入肝癌细胞内酸溶物质和酸不溶物质的量都显著受到抑制, 从第 1 min 和 4 min 腺苷的摄取量计算, HPD(Y)对酸溶部分腺苷摄取的抑制率分别是 79.1%和 69.5%, HPD(B)的抑制率分别是 81.4%和 79.7%, 对酸不溶部分第 1 min 和 4 min 的抑制率, HPD(Y)是 87.1%和 51.7%, 而 HPD(B)是 81.7%和 74.2%。

肝癌细胞内腺苷磷酸化反应 HPD(B)和 HPD(Y)在 10 µg/ml, 照光 10 min, 对细胞内腺苷磷酸化产物的量(AMP, ADP 和 ATP)没有明显影响。

讨 论

文献中对细胞摄取核苷前体的减少一般认为是由于核酸的合成受到抑制。本文对腺苷在细胞膜的转运和摄取以及 HPD 对这些过程的光动力作用进行了分析。所用的两种 HPD 对腺苷转运有很强的抑制作用, 对腺苷参入癌细胞内酸溶和酸不溶物质中去都同样使之减少。但是癌细胞内腺苷磷酸化产物没有明显变化。说明腺苷参入细胞内酸溶物质中的减少不由于在细胞内的磷酸化反应受阻, 而由于在细胞膜部位阻止了腺苷的转运。至于 $[^3H]$ 腺苷参入细胞内酸不溶物质中的减少, 则涉及到核酸合成。

文献(7,8)报道, HPD 合并照光对哺乳动物细胞和其它细胞的 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶有明显抑制作用, 从而抑制核酸合成。本实验观察到 $[^3\text{H}]$ 腺苷参入到细胞内酸不溶物质的减少, 除了在细胞膜水平阻止其进入细胞外, 还与核酸合成受抑制有关。细胞膜在细胞的增殖、分化和进行正常活动中起重要作用, 对细胞膜的损伤必将破坏细胞活动和功能并最终导致细胞死亡。

参 考 文 献

- 1 Kessel D. Effects of photoactivated porphyrins at the cell surface of leukemia L1210 cells. *Biochemistry* 1977; 16 : 3443
- 2 傅乃武、叶树勇、张谨、赵秀花、张立生。血卟啉衍生物对肝癌细胞线粒体酶活性的光辐射效应。中国医学科学院学报 1985; 7 : 442
- 3 傅乃武、全兰萍、赵秀花、张立生。血卟啉衍生物对癌细胞膜的核苷转运和核苷激酶活性影响的研究。中华肿瘤杂志 1986; 8 : 35
- 4 傅乃武、全兰萍、叶树勇, 等。血卟啉衍生物对红细胞膜的光辐射损伤。生物化学与生物物理进展 1986; 2 : 33
- 5 Steck TL, Nakata Y, Bader JP. The uptake of nucleosides by cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1969; 190 : 237
- 6 Mizel SB, Wilson L. Nucleoside transport in mammalian cells. Inhibition by colchicine. *Biochemistry* 1972; 11 : 2573
- 7 Munson BR. Photodynamic inactivation of mammalian DNA-dependent RNA polymerase by hematoporphyrin and visible light. *Int J Biochem* 1979; 10 : 957
- 8 李占荣、冯剑波、韩锐。血卟啉衍生物-光辐射对 L1210 白血病细胞核酸生物合成的影响。药理学报 1985; 20 : 17

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Nov; 8 (6) : 551-554

Photodynamic action of two hematoporphyrin derivatives on transport and intracellular metabolism of adenosine in hepatoma cells¹

FU Nai-Wu, QUAN Lan-Ping, ZHANG Li-Sheng

(Department of Pharmacology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

ABSTRACT The initial rate of adenosine uptake was markedly inhibited by HPD photosensitization. The inhibition of adenosine uptake depends on HPD concentration and irradiation time. At the dose of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and irradiation for 10 min, the inhibitions of adenosine uptake by HPD (B) and HPD (Y) were 70 and 69%, respectively. At 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and light exposure for 10 min, the incorporation of $[^3\text{H}]$ adenosine into acid-soluble and acid insoluble material of hepatoma cells were equally reduced. The phosphorylation of adenosine in hepatoma cells was not influenced by HPD plus light. This suggests that the reduced incorporation of $[^3\text{H}]$ adenosine in acid-soluble

material is not due to the impairment of intracellular transformation, but due to the inhibition of adenosine transport at membrane level. From these results and our previous experiments, it is concluded that the cell membrane and the nucleoside transport process are very sensitive to HPD photodynamic action.

KEY WORD hematoporphyrins; $[^3\text{H}]$ adenosine; adenosine phosphorylation; hepatoma cells; photochemotherapy

¹ Project supported by the Science Fund of the Chinese Academy of Sciences, No.197