

双嘧达莫对胰腺癌细胞内抗肿瘤药物 6-巯基嘌呤浓度的影响及 6-巯基嘌呤的荧光分光光度法测定

郑 洪¹, 鞠焯先², 朱广华^{*1}

(1. 东南大学公共卫生学院, 南京 210009; 2. 南京大学化学化工学院, 南京 210093)

摘 要:建立了细胞内抗肿瘤药物 6-巯基嘌呤的荧光光度分析新方法,系统地研究了在 KMnO_4 氧化条件下酸度、温度、时间等因素对 6-巯基嘌呤相对荧光强度的影响。在荧光激发波长 310 nm 和发射波长 413 nm 下,溶液中 6-巯基嘌呤的荧光强度与其浓度在 $4.0 \times 10^{-11} \sim 4.0 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系,方法的检出限为 8.2×10^{-12} mol/L。用建立的方法研究了不同浓度核苷载体阻断剂(双嘧达莫)对胰腺癌细胞内 6-巯基嘌呤浓度的影响情况。统计学检验结果表明,细胞膜上核苷载体的阻断能提高细胞内抗肿瘤药物的浓度。

关键词:双嘧达莫;胰腺癌细胞;6-巯基嘌呤;荧光分光光度法;核苷载体

中图分类号:O657.32 文献标识码:A 文章编号:1000-0720(2004)08-0001-04

双嘧达莫是一种用于治疗心血管疾病的血管扩张性药物^[1,2]。这种药物也可以作为阻断剂和哺乳动物细胞膜上 ENT (equilibrative nucleoside transporter) 核苷载体结合,阻断核苷及核苷类药物的跨膜转运^[3]。通过提高细胞内核苷类药物的浓度,进而提高其治疗效果。6-巯基嘌呤是一种核苷类抗肿瘤药物,可以通过核苷载体进入肿瘤细胞内发挥抗肿瘤效应。为了了解细胞内核苷类抗肿瘤药物的浓度水平,有必要建立肿瘤细胞内核苷类药物的测定方法。

目前对于 6-巯基嘌呤的分析方法有高效液相色谱法^[4]、室温磷光法^[5]以及毛细管电泳法^[6,7],而细胞内 6-巯基嘌呤的测定方法尚未见报道。因为细胞内药物的浓度相对较低,所建立的方法须有较高的灵敏度,而上述所列方法的灵敏度均不能达到要求。本文建立的 6-巯基嘌呤荧光光度法,灵敏度高,方法检出限达 8.2×10^{-12} mol/L。本法操作简单、快速,可用于细胞内 6-巯基嘌呤的直接测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Varian Eclipse 荧光分光光度计,附精密控温附

件(美国 Varian 公司);NAPCO Series 5400 CO₂ 培养箱(美国 Nuair 公司);Olympus CK40 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);

双嘧达莫(美国 Sigma 公司);6-巯基嘌呤(中国医药集团上海化学试剂公司);Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 干粉(美国 Gibco 公司);新生牛血清(杭州四季青公司);胰蛋白酶(上海华美公司);其它试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

1.2 细胞培养

胰腺癌 Panc-1 (Pancreas-1) 细胞株(德国 Ulm 大学赠送)。从 -70℃ 冰柜中取出细胞冻存管,迅速放入 37℃ 水浴中,融化后(1000 r/min)离心 5 min。用体积分数 20% 新生牛血清的完全培养液接种细胞至密度 2×10^5 个/mL,24 h 换液,传代培养。待培养瓶中细胞达 90% 亚融合状态时,收集细胞备用。

1.3 实验方法

1.3.1 6-巯基嘌呤贮备液及工作液的制备和测定

准确称取 15.2 mg 6-巯基嘌呤标准品,加乙腈水溶液 ($V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 2 : 1$) 置于 100℃ 水浴中至 6-巯基嘌呤完全溶解,定容至 100 mL,得到 1.0

* 收稿日期:2003-11-08;修订日期:2004-02-27

作者简介:郑 洪(1974-),男,硕士研究生

mmol/L 的贮备液。6-巯基嘌呤工作液由贮备液加乙腈水溶液稀释制得。6-巯基嘌呤溶液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 1.0 mL KMnO_4 溶液, 1.0 mol/L NaOH 溶液调节 pH 12.8 后定容到 10 mL 至 6-巯基嘌呤的终浓度为 2.5 mmol/L。在荧光分光光度计上绘制荧光激发光谱及发射光谱, 测定荧光强度值并绘制工作曲线。实验过程中激发和发射通带均设为 10 nm, 测定温度为 20 。

1.3.2 孵育时间对细胞内 6-巯基嘌呤浓度影响试验 取 1×10^7 个 Panc-1 细胞于 10 mL PBS 中, 含 6-巯基嘌呤 40 $\mu\text{mol/L}$, 培养 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90 和 120 min。取 1 mL 该溶液, 1000 r/min 离心, PBS 洗 3 次, 加入 3 mL 上述乙腈水溶液, 超声裂解细胞 2 h。1600 r/min 离心 20 min 取上清液, 加 50 $\mu\text{mol/L}$ KMnO_4 溶液 1 mL, 10 min 后加 10 mmol/L NaOH 溶液调节 pH 12.8, 乙腈水溶液定容至 10 mL。以乙腈水溶液为空白, 于荧光分光光度计上测定其相对荧光强度。本试验重复 5 次, 计算其均值及标准偏差。

1.3.3 双嘧达莫对胰腺癌细胞内 6-巯基嘌呤浓度影响试验 取对数生长期的 Panc-1 细胞 2.5×10^7 个培养于体积分数 20% 新生牛血清的 DMEM 完全培养液 25.0 mL 中, 用滴管轻轻吹打至细胞呈均匀状态, 每次取 1.0 mL (含 1×10^6 个细胞) 分别装在 25 个培养瓶中, 随机分成 5 组。每组分别加双嘧达莫至终浓度为 0, 25, 50, 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 。60 min 后加入 6-巯基嘌呤至终浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 。孵育 60 min 后, 1000 r/min 离心终止反应, 预冷 PBS (KCl 0.2, KH_2PO_4 0.2, NaCl 8.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.56 g/L) 洗 3 次, 细胞内 6-巯基嘌呤用乙腈水溶液提取, 超声裂解细胞 2 h。1600 r/min 离心 20 min 取上清液, 定容后以乙腈水溶液为空白测定 6-巯基嘌呤的浓度。

2 结果与讨论

2.1 荧光激发光谱和发射光谱

6-巯基嘌呤的荧光激发光谱和发射光谱如图 1 所示。在乙腈水溶液溶液中, 6-巯基嘌呤的激发和发射波长分别为 310 nm 和 413 nm。

2.2 酸度对 6-巯基嘌呤测定条件的影响

图 2 表明在乙腈水溶液中, 6-巯基嘌呤相对荧光强度值随溶液 pH 的不同而变化。在 pH 12.5 ~ 13.0 时达最大且相对荧光强度的变化较小。实验

选择 pH 12.8。

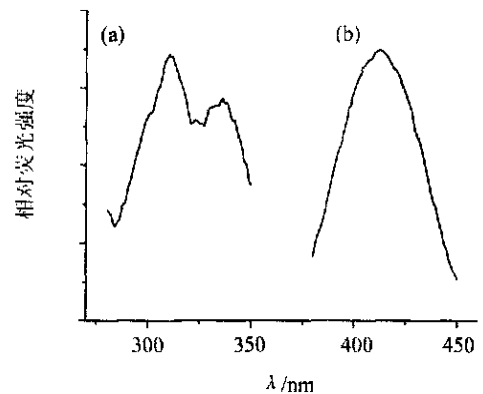


图 1 6-巯基嘌呤的荧光激发光谱(a)和发射光谱(b)
Fig. 1 Excitation (a) and emission (b) spectra of 6-thiopurine

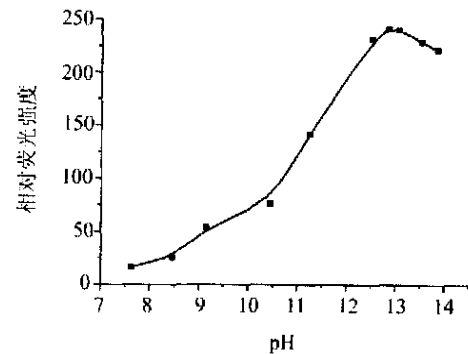


图 2 pH 对荧光强度的影响
Fig. 2 Effect of pH on fluorescence intensity

2.3 氧化剂浓度选择

如图 3, 实验考察了 0 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ KMnO_4 溶液对 1 $\mu\text{mol/L}$ 6-巯基嘌呤的氧化作用。氧化产物的荧光强度随 KMnO_4 溶液浓度的增加而变大, KMnO_4 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 6-巯基嘌呤的荧光强度达最大值并趋于稳定, 因而实验中选用 KMnO_4 溶液的浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4 温度和时间对测定条件的影响

测定过程中, 温度对 6-巯基嘌呤的荧光强度有很大的影响。实验结果表明 6-巯基嘌呤的荧光强度随温度的升高而减小, 温度每升高 5 荧光强度下降 6.6%。本试验选用 20 作为测定温度。

6-巯基嘌呤氧化产物的相对荧光强度随时间变化不明显。在 80 min 内相对荧光强度基本保持不变, 本实验选用 10 min 作为测定时间。

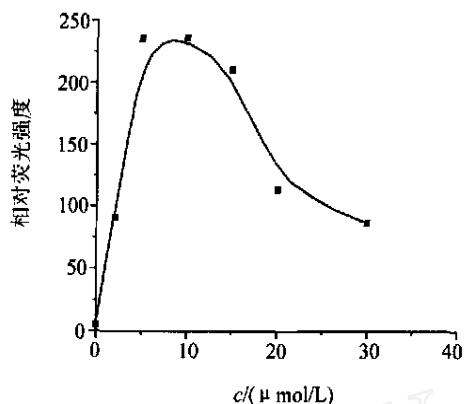


图 3 氧化剂浓度对荧光强度的影响

Fig. 3 Effect of concentration of oxidizing agent on fluorescence intensity

2.5 工作曲线及方法的检出限

移取浓度为 100 nmol/L 的 6-巯基嘌呤标准溶液 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 分别加入 1.0 mL 5 μmol/L 的 KMnO_4 溶液, 10 min 后加入 0.5 mL 1.0 mol/L NaOH 调节 pH, 乙腈水溶液定容到 10 mL。在激发波长 310 nm 和发射波长 413 nm, 激发和发射通带均为 10 nm, 20 时测定标准溶液的荧光强度。溶液中 6-巯基嘌呤的荧光强度与其浓度在 $4.0 \times 10^{-11} \sim 4.0 \times 10^{-6}$ mol/L 范围内呈良好的线性关系, 校准曲线方程为 $F = 95.8c + 1.6$ ($r = 0.9997$, 浓度单位: 10^{-9} mol/L)。方法的检出限为 8.2×10^{-12} mol/L (以空白溶液的 3 倍标准偏差计算)。

2.6 孵育时间对细胞内 6-巯基嘌呤浓度影响试验结果

实验结果表明, 细胞内 6-巯基嘌呤的浓度随孵育时间的延长而增加。40 min 以前, 细胞内 6-巯基嘌呤的浓度迅速上升; 40 min 后, 细胞内 6-巯基嘌呤的浓度趋于稳定。此时, ENT 核苷载体运载 6-巯基嘌呤出入细胞的速率相等。在考察双嘧达莫对细胞内 6-巯基嘌呤的浓度影响时选择 60 min 作为终止反应的时间。

2.7 双嘧达莫浓度对胰腺癌细胞内 6-巯基嘌呤浓度影响试验

图 4 为双嘧达莫浓度对胰腺癌细胞内 6-巯基嘌呤浓度影响试验结果。从图中可以看出培养液中加入双嘧达莫可以提高细胞内 6-巯基嘌呤的浓度。细胞内 6-巯基嘌呤的浓度随加入的双嘧达莫

浓度的增加而增加, 双嘧达莫浓度大于 100 μmol/L 后细胞内 6-巯基嘌呤的浓度处于稳定。双嘧达莫的浓度为 100 μmol/L 时, 细胞内 6-巯基嘌呤的浓度与不加双嘧达莫时相比增加 0.49 倍, 二者之间有显著统计学差异 ($P < 0.05$)。

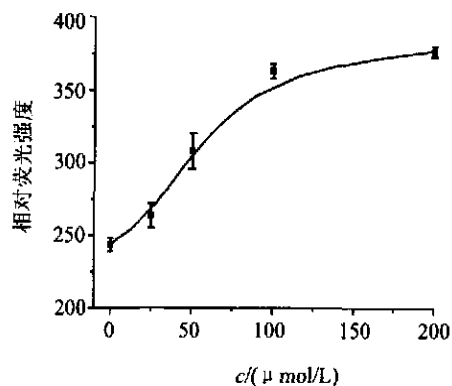


图 4 双嘧达莫浓度对胰腺癌细胞内 6-巯基嘌呤浓度的影响

Fig. 4 Effect of dipyrindamole on concentration of 6-Thiopurine in Panc-1 tumor cells

3 结论

本文建立了细胞内 6-巯基嘌呤的荧光光度分析方法, 方法线性范围宽, 灵敏度高。方法用于细胞内 6-巯基嘌呤的实际测定。

用建立的方法研究了不同浓度核苷载体阻断剂双嘧达莫对胰腺癌细胞内 6-巯基嘌呤浓度的影响情况, 统计学检验结果表明, 双嘧达莫阻断细胞膜上 ENT 核苷载体后能提高细胞内核苷类抗肿瘤药物 6-巯基嘌呤的浓度。

参考文献

- [1] Marshall R J, Parat J R. Br J Pharmacol, 1973, 49: 391
- [2] Marchandt E, Prichard A D, Casanegra P. Am J Cardiol, 1984, 53: 718
- [3] Sano N. Jpn. J Pharmacol, 1974, 24: 471
- [4] 汤建林, 周世文, 黄林清. 色谱, 1998, 16(6): 513
- [5] 黎海彬, 赵颖怡, 张海蓉. 药物分析杂志, 2001, 21(5): 357
- [6] 赵涛, 刘绮萍, 程介克. 高等学校化学学报, 1996, 17(6): 883
- [7] Wang A B, Zhang L, Zhang S. J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2000, 23: 429

Influence of dipyrindamole on 6-thiopurine con-

centration in Pancreas-1 tumor cells and the fluorimetric determination of 6-thiopurine ZHENG Hong , ZHU Guang-hua (Public Health College , Southeast University , Nanjing 210009) and JU Huang-xian (Department of Chemistry , Nanjing University , Nanjing 210093) , Fenxi Shiyanshi ,2004 ,23(8) :1 ~ 4

Abstract :A fluorimetric method for the determination of 6-thiopurine in tumor cells was developed. The main factors affecting the fluorescence of 6-thiopurine were

studied. The linear relationship between the fluorescence intensity and the concentration of 6-thiopurine was in the range of $4.0 \times 10^{-11} \sim 4.0 \times 10^{-6}$ mol/L with a detection limit of 8.2×10^{-12} mol/L. The proposed method was applied to the determination of 6-thiopurine in Pancreas-1 cell. Influence of dipyridamole on 6-thiopurine concentration in Pancreas-1 tumor was also studied.

Key words: 6-Thiopurine ; Dipyridamole ; Fluorimetry ; Equilibrative nucleoside transporter