

• 研究论文 •

人宫颈癌细胞(Hela)内的 ^{31}P 核磁共振研究

梁晓东 黄荣清* 骆传环 肖炳坤 赵 焱

(中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100085)

摘要 建立了无损性 ^{31}P NMR 研究细胞内物质的实验方法, 并对人宫颈癌细胞(Hela)的 ^{31}P NMR 谱中含磷小分子代谢物的谱峰进行了分析; 细胞内无机磷(Pi)的化学位移对 pH 非常敏感, 通过测定其化学位移可间接确定细胞内的 pH, Hela 细胞内 Pi 峰的化学位移为 5.88 ± 0.01 ($n=3$), 计算得到细胞内 pH 值为 7.05 ± 0.01 ; 通过测量 Hela 细胞的 ^{31}P NMR 谱中 ATP 的 α 磷和 β 磷及 γ 磷的化学位移差值, 得出 Hela 细胞内 Mg^{2+} 与 ATP 结合的复合物 MgATP 和整个 ATP 量的比值, 计算得到 Hela 细胞内游离 Mg^{2+} 浓度为 (253.3 ± 0.13) mmol/L ($n=3$), 与其它分析方法相比, ^{31}P NMR 测定细胞内游离 Mg^{2+} 浓度具有对细胞样品无损伤的优点.

关键词 ^{31}P NMR; 人宫颈癌细胞; 化学位移; 游离镁离子

Study on Intracellular of Hela Cells by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance

LIANG, Xiao-Dong HUANG, Rong-Qing* LUO, Chuan-Huan

XIAO, Bing-Kun ZHAO, Yan

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences,
The Peoples Liberation Army of China, Beijing 100850)

Abstract A ^{31}P nuclear magnetic resonance (NMR) method has been established to noninvasively measure intracellular condition of Hela cell, stable ^{31}P NMR spectra of living cells were obtained and intracellular metabolite in Hela of phosphorized small molecule cell was analyzed. The chemical shift of intracellular inorganic phosphate (Pi), which is very sensitive to cytosolic pH, can be shifted on the ^{31}P NMR spectrum as pH is changed and cytosolic pH can be derived from chemical shift of Pi peak. Intracellular pH 7.05 ± 0.01 was calculated based on the chemical shift of Pi peak (5.88 ± 0.01) in Hela cells. Based upon a measurement of chemical shift differences between the α and β -phosphoryl resonances in the ^{31}P NMR spectrum of intracellular adenosine triphosphate (ATP) in Hela cell, the fraction of total ATP complexed to Mg^{2+} was estimated, while cytosolic free magnesium ion concentration in Hela cells was measured nondestructively to be 253.3 mmol/L. ^{31}P nuclear magnetic resonance method has noninvasive virtue in measuring intracellular Mg^{2+} compared with other technique.

Keywords ^{31}P NMR; Hela cell; chemical shift; free magnesium

近 20 年来, 国际上许多实验室建立了生物核磁测试方法, 进行了各种体内和体外的生物学和医药学研究, 开创了用核磁共振谱技术进行生命科学研究的领

域^[1,2]. ^{31}P NMR 技术是目前 NMR 应用最多的研究细胞样品的手段, ^{31}P NMR 灵敏度较高, 并且活细胞的 ^{31}P NMR 共振谱线简单, 容易识别^[3~5], 所以, 它已成为在

* E-mail: llxxddoo75@sohu.com

Received November 16, 2005; revised February 13, 2006; accepted February 27, 2006.

国家自然科学基金(No. 30271608)和北京市自然科学基金(No. 7042048)资助项目.

接近生理条件下研究细胞代谢的重要方法^[6]. 我们在建立了完整活细胞的 NMR 实验方法的基础上, 又建立了人宫颈癌细胞(Hela)内 pH 的 ^{31}P NMR 的分析测定方法, 同时定量地测定了细胞内游离的 Mg^{2+} 浓度, 为生化分析及细胞代谢的研究提供了一种接近生理状况下的无损伤性的分析测试方法, 为深入开展细胞代谢及药物的作用机制研究提供了一种可资借鉴的无损伤性的分析手段.

1 实验部分

1.1 仪器与材料

核磁共振实验在日本 JEOL 公司 JNM-GX400 型超导 NMR 仪上进行; ^{31}P NMR 工作频率为 161.83 MHz. 人宫颈癌细胞(Hela)在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 (GIBCO, USA)培养液中, 置 37 °C 含 5% CO_2 的空气和饱和湿度二氧化碳培养箱中培养.

1.2 实验方法

1.2.1 Hela 细胞的处理

收集并用台盼蓝染色, 显微镜下计数; 4 °C, 1200 r/min, 离心 10 min, 倾去培养液; 细胞沉淀重悬于生理盐水中洗涤, 离心 5 min, 得细胞沉淀, 用同样方法再重新处理一次, 然后将细胞重悬于 300 μL 的生理盐水中, 移入 5 mm 经过消毒处理的核磁共振样品管内, 整个处理过程在 30 min 内完成.

1.2.2 NMR 的测试

细胞经处理后使细胞个数为 1.2×10^8 左右, 4 °C 条件下进行 NMR 测试并进行信号累加, 累加时间 1 h. ^{31}P NMR 采用单脉冲低功率双水平去偶脉冲序列测定, 谱宽 10000 Hz, 测定细胞内游离 Mg^{2+} 时的谱宽为 4000 Hz, 数据点 16384, 脉冲宽度 22.5 μs (45), 弛豫延迟 2.2 s, 线加宽因子 20 Hz, 累加 1200 次. 用液氮降温的方法使被测细胞保持在 4 °C.

1.2.3 模拟细胞内离子强度和 pH 条件下 ATP 的 α 磷和 β 磷共振峰的化学位移值($\delta_{\alpha\beta}^{\text{ATP}}$)测定

配置 4 mmol/L ATP, 20 mmol/L Tris (pH 7.2), 0.14 mol/L NaCl 的模拟细胞内离子强度和 pH 条件下的 ATP 溶液, 进行 ^{31}P NMR 测试, 谱宽为 4000 Hz, 得 $\delta_{\alpha\beta}^{\text{ATP}}$.

1.2.4 模拟细胞内离子强度和 pH 条件下 MgATP 的 α 磷和 β 磷共振峰的化学位移值($\delta_{\alpha\beta}^{\text{MgATP}}$)测定

配置含 10 mmol/L Mg^{2+} , 4 mmol/L ATP, 20 mmol/L Tris (pH 7.2), 0.14 mol/L NaCl 的模拟细胞内离子强度和 pH 条件下的 MgATP 溶液, 进行 ^{31}P NMR 测试, 谱宽为 4000 Hz, 得到 $\delta_{\alpha\beta}^{\text{MgATP}}$.

2 结果与讨论

2.1 Hela 细胞的 ^{31}P NMR 谱分析

Hela 细胞的 ^{31}P NMR 谱见图 1. 根据文献中含磷化合物的化学位移数值^[7~11]进行分析, 对 Hela 细胞的 ^{31}P NMR 谱谱峰进行了指认. Hela 细胞的 ^{31}P NMR 谱主要由磷酸单酯(PME)、磷酸双酯(PDE)、无机磷(Pi)、磷酸肌酸(PCr)、三磷酸核苷(ATP)和双磷酸双酯(DPDE)的共振峰组成(图 1), DPDE 峰被认为是 UDP (uridine diphosphate, 尿苷二磷酸)-葡萄糖、NADP(H)和 UDP-*N*-乙酰半乳糖胺等组成. ATP 的峰主要来源于 ATP 的 3 个磷核, 因此在化学位移约 -7.32, -12.20 和 -21.02 处分别出现 3 个磷的共振峰(γ -ATP, α -ATP, β -ATP). Pi 峰的化学位移随酸碱环境的不同而改变, 这样根据 ^{31}P NMR 的 Pi 值就可以求算细胞内的 pH; PME 峰包括磷酸胆碱(PC)和磷酸胆胺(PE), PC 和 PE 通过合成胆碱激酶和胆胺激酶产生. 因此利用它们的变化情况可以观察到细胞内糖蛋白和糖脂的代谢, 以及反映细胞能态的 PCr/ATP/Pi 的量的变化.

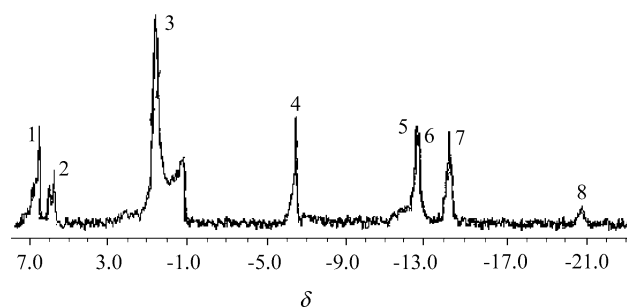


图 1 Hela 细胞的 ^{31}P NMR 图谱

Figure 1 ^{31}P NMR spectrum of Hela cells

(1) 磷酸单酯(PME); (2) 无机磷(inorganic phosphate, Pi); (3) 磷酸肌酸(phosphocreatine, PCr); (4) γ 和 β 三磷酸核苷(γ -ATP+ β -ADP); (5) α 和 β 三磷酸核苷(α -ATP+ β -ADP); (6,7) 双磷酸双酯(DPDE); (8) β 三磷酸核苷(β -ATP)

2.2 Hela 细胞的 pH 测定

细胞 ^{31}P NMR 谱中只能看见细胞内处于快速运动的含磷小分子的信号, 大分子(如 DNA 等)因为分子运动受到限制, 因此, ^{31}P 谱中不出现它们的信号. 细胞内以及通过外界引入细胞内的某些化学成分(如 Pi, ATP, 2,3-二磷酸甘油酯, 6-磷酸葡萄糖等)的化学位移对 pH 非常敏感, 通过测定其化学位移并进行相关计算可得到细胞内的 pH. ^{31}P NMR 用来测定细胞内的 pH 时常利用的成分是 Pi, 这是因为存在于细胞的无机磷化合物 ^{31}P NMR 谱有较强的 Pi 峰出现. 在近中性条件下 Pi 以 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} 两种形式存在($\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_3\text{O}^+ +$

HPO_4^{2-} , pK_a 约为 7), 这两种形式的磷原子化学位移 δ 差约为 2.3. 在溶液中 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} 中的磷原子会发生快速转换, 交换速度($10^9 \sim 10^{10}/\text{s}$)大大快于两者共振频率的差值, 因此, ^{31}P NMR 谱中仅能观测到单一的 Pi 峰. 在不同 pH 值条件下, Hela 细胞提取物的 ^{31}P NMR 谱中 Pi 峰化学位移不同. 以 pH 为横坐标, 以不同 pH 值时 Pi 峰的化学位移为纵坐标, 得到 Hela 细胞内 pH-Pi 化学位移的标准曲线, 推算出计算细胞内 pH 值的公式. 实验得出计算 Hela 细胞内 pH 的公式为: $\text{pH} = 6.77 + \lg[(\delta - 3.19)/(7.12 - \delta)]$, δ 为 Hela 细胞 Pi 峰的化学位移. Hela 细胞 Pi 峰的化学位移为 5.88 ± 0.01 ($n=3$), 因此, 计算得到细胞内 pH 值为 7.03 ± 0.01 [12~14].

2.3 Hela 细胞内 Mg^{2+} 的测定

细胞内的游离 Mg^{2+} (未与细胞内 ATP 结合的 Mg^{2+}) 是影响细胞许多生理变化的一个重要的生理学参数, 它的变化可导致能量代谢、膜离子通透性、神经递质功能及第二信使系统等方面的多种生理变化 [15]. Mg^{2+} 能调节由其参与的酶系统的催化活性, 对大多数需要 ATP 参与的生化反应来说, 三磷酸腺苷的活性形式是镁离子与 ATP 结合的复合物 MgATP , 而细胞内 ATP 的 α -P 和 β -P 的化学位移随 ATP 与 Mg^{2+} 的结合程度而变化; 因此用 ^{31}P NMR 测量细胞内 ATP 的 α -P 和 β -P 的化学位移之差即可确定细胞内 Mg^{2+} 的水平. 首先测定细胞内 ATP 的 α 磷和 β 磷的 ^{31}P NMR 化学位移之差($\delta_{\alpha\beta}$). 不同量的 Mg^{2+} 与 ATP 结合使 ATP 的磷化学位移变化的大小与 MgATP 和 ATP 的比值成比例. 因此, 从 ^{31}P NMR 谱能直接得到 MgATP 和全部 ATP 的比值. 根据模拟细胞内离子强度和 pH 条件下 MgATP 的解离常数 K_D^{MgATP} , 计算出细胞内游离镁离子浓度 [16~18].

根据 $\text{MgATP} = \text{ATP}_f + \text{Mg}_f^{2+}$ (MgATP 实际为“ MgATP^{2+} ”; ATP_f 表示未与镁离子结合的 ATP, Mg_f^{2+} 为自由镁离子)可得:

$$K_D^{\text{MgATP}} = [\text{ATP}_f][\text{Mg}_f^{2+}]/[\text{MgATP}]$$

$$[\text{Mg}_f^{2+}] = K_D^{\text{MgATP}} [\text{MgATP}]/[\text{ATP}_f]$$

$$[\text{MgATP}] = [\text{ATP}_t] - [\text{ATP}_f] \quad (\text{ATP}_t \text{ 为全部 ATP})$$

$$[\text{Mg}^{2+}] = K_D^{\text{MgATP}} \frac{[\text{ATP}_t] - [\text{ATP}_f]}{[\text{ATP}_f]}$$

$$[\text{Mg}_f^{2+}] = K_D^{\text{MgATP}} \frac{[\text{ATP}_t] - [\text{ATP}_f]}{[\text{ATP}_f]}$$

设 $\phi = \frac{\text{ATP}_f}{\text{ATP}_t}$, 它可由 ^{31}P NMR 谱计算得到:

$$\phi = \frac{\delta_{\alpha\beta}^{\text{cell}} - \delta_{\alpha\beta}^{\text{MgATP}}}{\delta_{\alpha\beta}^{\text{ATP}} - \delta_{\alpha\beta}^{\text{MgATP}}} \quad (1)$$

如果用 β 磷和 γ 磷共振峰的化学位移差值来表示, 即为下式:

$$\phi = \frac{\delta_{\gamma\beta}^{\text{cell}} - \delta_{\gamma\beta}^{\text{MgATP}}}{\delta_{\gamma\beta}^{\text{ATP}} - \delta_{\gamma\beta}^{\text{MgATP}}} \quad (2)$$

$$[\text{Mg}^{2+}] = K_D^{\text{MgATP}} (\phi^{-1} - 1) \quad (3)$$

按公式(1)或(2)就可计算出细胞内游离的镁离子浓度, 即 $[\text{Mg}_f^{2+}]$.

$\delta_{\alpha\beta}^{\text{cell}}$, $\delta_{\alpha\beta}^{\text{MgATP}}$, $\delta_{\alpha\beta}^{\text{ATP}}$, $\delta_{\gamma\beta}^{\text{cell}}$, $\delta_{\gamma\beta}^{\text{MgATP}}$, $\delta_{\gamma\beta}^{\text{ATP}}$ 分别表示 Hela 细胞、 MgATP 和 ATP 的 α 磷、 β 磷和 γ 磷共振峰的化学位移差值. K_D^{MgATP} 大多数研究认为是 $51 \mu\text{mol/L}$.

人宫颈癌细胞的 ^{31}P NMR 谱显示 ATP 的 α 磷、 β 磷和 γ 磷共振峰分得很开, ATP 与 Mg^{2+} 结合导致 ATP 的 α 磷、 β 磷和 γ 磷移向低场, 产生位移变化最大的是 β 磷. 测量出人宫颈癌细胞 ^{31}P NMR 谱中 ATP 的 α 磷和 β 磷的化学位移差值以及在模拟细胞内离子强度和 pH 条件下 ATP 和 MgATP 的 α 磷或 γ 磷与 β 磷的化学位移差值(表 1). 根据式(1)或(2)计算出 ^{31}P NMR 内未与 Mg^{2+} 结合的 ATP 与整个 ATP 量的比值 ϕ . 按式(3)计算人宫颈癌细胞内游离 Mg^{2+} 浓度. 人宫颈癌细胞内游离 Mg^{2+} 浓度计算结果见表 1.

表 1 Hela 细胞内 ATP 和纯 ATP, MgATP 溶液 ^{31}P 化学位移及计算出的 $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}}$

Table 1 Content of $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}}$ and chemical shifts of the phosphoryl resonances of intracellular ATP in Hela cells with noncellular ATP and MgATP controls

Sample	δ_α	δ_β	δ_γ	$\delta_{\alpha\beta}$	$\phi_{\alpha\beta}^{-1}$	$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}\alpha\beta}$ (mmol/L of cell H_2O)	$\delta_{\beta\gamma}$	$\phi_{\beta\gamma}^{-1}$	$[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}\beta\gamma}$ (mol/L of cell H_2O)
ATP	-10.5230	-21.1915	-6.3215	10.6685			14.8700		
MgATP	-10.1633	-18.4516	-4.9975	8.2883	5.967	253.3 ± 0.13	13.4541	15.550	742.1 ± 0.35
Hela cell	-12.5741	-21.0154	-7.3240	8.4413			13.6914		

MgATP 是 Mg^{2+} 与 ATP 中的磷结合形成的复合物, Mg^{2+} 主要是与 ATP 的 β 磷和 γ 磷结合, 而 Mg^{2+} 与 β 磷结合的程度较之与 γ 磷相比更紧密^[19,20]. ^{31}P NMR 图谱显示 Mg^{2+} 与 ATP 结合后 ATP 的 β 磷的化学位移变化最大, 因此实验中一般不用 $\delta_{\beta\gamma}$ 或 $\delta_{\alpha\gamma}$ 来计算细胞内游离 Mg^{2+} 浓度是考虑到在 pH 近中性时 pH 的微小变化将使 $\delta_{\beta\gamma}$ 和 $\delta_{\alpha\gamma}$ 变化, 而 $\delta_{\alpha\beta}$ 则不受影响^[21], 这一点, 从我们的计算结果中也可以看出, $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}}$ 为 (253.3 ± 0.13) mmol/L 是比较可信的.

2.4 HeLa 细胞内代谢物研究

^{31}P NMR 通过无创伤地检测细胞内 ATP 水平, 可以对比外界条件改变时定性地了解 ATP 代谢的状态变化. 试验中我们发现, PCr/Pi, PME/ β -ATP, β -ATP/Pi 可以反映细胞内能量的变化, 但并没有得出很好的定量关系, 再加上在核磁仪器中, 活的生理细胞也很容易失去生理活性, 因此这项工作还在进一步研究中. 目前研究最多的是在给药情况下观察肿瘤细胞的能量代谢情况, 从而推断肿瘤细胞产生及发病机理.

3 结论

以上研究表明, ^{31}P NMR 避免了对细胞等生物样品的破坏和损伤, 减少了其他一些分析方法复杂的分离纯化等, 在不影响细胞代谢变化的条件下, 给出了细胞内 ATP, Pi, PC 和 PE 等含磷化合物的信号, ^{31}P 实现了一次可同时监测活细胞内多种含磷代谢物, 为进一步开展深入的代谢研究提供了技术支持. 利用 Pi 的变化可监测细胞内 pH 的变化, 同时利用 γ -ATP, α -ATP, β -ATP 化学位移的变化计算了细胞内 $[\text{Mg}^{2+}]_{\text{free}}$ 的含量.

References

- 1 Leach, M. O. *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1503.
- 2 Chenevert, T. L.; Mckeever, P. E.; Ross, B. D. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *70*, 1457.
- 3 Jino, M. *J. Gen. Physiol.* **1989**, *10*, 269.
- 4 Tailor, C. W. *Trends Pharmacol. Sci.* **1990**, *11*, 269.
- 5 Rink, T. J. *FEBS Lett.* **1960**, *2*, 381.
- 6 Gorenstein, D. G. *Phosphorus-31 NMR: Principles and Applications*, Academic Press, Orlando, Florida, **1984**, pp. 549~591.
- 7 Evans, F. E.; Kaplan, N. O. *Biochemistry* **1977**, *11*, 4909.
- 8 Ojcius, D. M.; Degani, H.; Mispelter, J.; Dautry-Varsat, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7052.
- 9 Navon, G.; Navon, R.; Shulman, R. G.; Yamane, T. *Biochemistry* **1978**, *17*, 891.
- 10 Evans, F. E. *Biochem. Biophys.* **1979**, *153*, 63.
- 11 Sri-Pathmana, R. M.; Braddock, P.; Brindle, K. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1021*, 131.
- 12 Yoshizaki, K.; Nishikawa, H.; Yamada, S. *J. Jpn. Physiol.* **1979**, *29*, 211.
- 13 Huang, R.-Q.; Yan, X.-Z.; Luo, C.-H.; Du, Z.-H. *Chin. J. Anal. Chem.* **2003**, *31*, 201 (in Chinese).
(黄荣清, 颜贤忠, 骆传环, 杜泽涵, 分析化学, **2003**, *31*, 201.)
- 14 Zhang, J.-Z.; Du, Z.-H. *Magnetic Resonance Spectroscopy in Bio-Medicine*, Science Press, Beijing, **2003**, pp. 175~177 (in Chinese).
(张建中, 杜泽涵编著, 生物医学中的磁共振, 科学出版社, 北京, **2003**, pp. 175~177.)
- 15 Leube, M. P.; Grill, E.; Amrhein, N. *FEBS Lett.* **1998**, *424*, 100.
- 16 Willcocks, J. P.; Mulquaney, P. J.; Ellory, J. C.; Veech, R. L.; Radda, G. K.; Clarke, K. *J. Biol. Chem.* **2002**, *51*, 49911.
- 17 Zhang, J.-Z.; Du, Z.-H. *Magnetic Resonance Spectroscopy in Bio-Medicine*, Science Press, Beijing, **2003**, pp. 200~203 (in Chinese).
(张建中, 杜泽涵编著, 生物医学中的磁共振, 科学出版社, 北京, **2003**, pp. 200~203.)
- 18 Book, B. J.; Wenz, B.; Gupta, R. K. *Blood* **1985**, *6*, 1526.
- 19 Huang, S. L.; Tsai, M. D. *Biochemistry* **1982**, *21*, 951.
- 20 Takeuchi, H.; Murata, H.; Harada, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 392.
- 21 Gupta, R. K.; Benovic, J. L.; Rose, Z. B. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 6172.

(A0511161 ZHAO, X. J.; FAN, Y. Y.)