

细胞内记录白血病人骨髓细胞膜的电学特性

陈学民 陈开浚

李孝光

(西安医科大学第一附属医院,西安)

(西安医科大学心血管研究所电生理学室,西安)

提 要

用玻璃微电极细胞内记录法和电流输入技术,测量了悬浮培养的白血病患者骨髓白血病细胞和非恶性血液病患者骨髓呈良性增生的幼稚造血细胞膜的电学参数。结果发现:白血病细胞膜电位、膜时间常数、膜电阻明显与非恶性血液病患者骨髓幼稚造血细胞不同。还观察到部分白血病细胞表现出电流-电压非线性关系(外向整流作用)和类似于神经细胞的动作电位样反应。

近年来,许多研究发现,非兴奋性细胞的膜电位变化也与细胞的许多功能活动密切相关,如体液的转运^[1]、细胞对激素物质的反应^[2]等,特别引起人们注意的是细胞膜电位与细胞的丝裂过程密切相关^[3]。自七十年代初 Cone 提出了细胞膜电位与细胞丝裂及癌变过程相关的学说后^[4],不断有学者用微电极技术对肿瘤细胞膜电位进行研究^[5],但造血细胞呈悬浮性生长,使微电极的应用受到限制。我们利用琼脂覆底和电流输入技术测量了白血病细胞和非恶性血液病幼稚造血细胞的膜电学参数。

材 料 及 方 法

1. 病例选择及分组 白血病人 110 个,取自 26 例白血病患者,其中急性非淋巴细胞性白血病(急非淋)13 例,急性淋巴细胞性白血病(急淋)7 例,慢性粒细胞性白血病(慢粒)6 例,均为初发未治患者。非恶性血液病患者骨髓幼稚造血细胞 31 个(非白血病细胞组),均取自骨髓呈良性增生的血液病患者的骨髓。

2. 细胞分离及培养 从待检对象髂前上棘抽取骨髓液 1.5—2ml,以肝素抗凝(终浓度为 20IU/ml)。采用自然沉降法分离出富含白细胞的血浆层,离心后以每毫升含 $1-4 \times 10^4$ 个细胞密度重悬于预加温的 RPMI1640 培养基

(pH7.4) 内,37℃ 条件下悬浮闭式培养 24 小时。

采用台盼蓝拒染试验测定细胞活度,要求培养后细胞活度大于 95%,实验结束时活度不小于实验前的 95%。

3. 电生理实验装置 如图 1 所示。

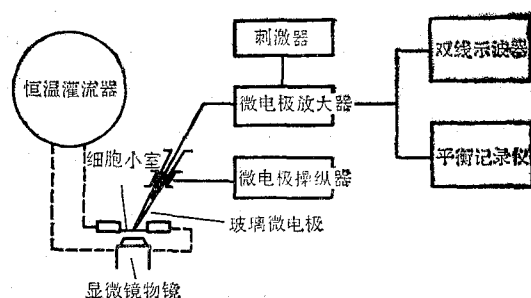


图 1 细胞膜电学参数测量仪器安装示意图
虚线示热循环线

图中示波器(COS5020 型,日本产)和记录仪(XYT-264,上海产)的 I 道联接于微电极放大器(MEZ-8201,日本产)的输出端和 Bucking 端,分别记录细胞膜电紧张电位和静息膜电位的变化。示波器和记录仪 II 道接于微电极放大器的电流监测端,记录与电紧张电位同步变化的电流强度。刺激器(JDS-731-C,国产)输出连于微电极放大器的刺激输入端。微电极放大器可将外源输入的电压脉冲转变成恒

流脉冲信号，通过记录电极输入细胞。图 2 为微电极与细胞小室关系的示意图。

4. 操作方法 实验前先在细胞小室底壁均匀覆盖一薄层融化的琼脂液，将培养后的细胞连同原培养液(或用实验液代替培养液)一起倒入细胞室内，液面上加盖一薄层矿物油以防液体蒸发和酸碱度改变，用超极恒温灌流器(500-型、国产)使小室内温度维持在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，将尖端直径 $\leq 0.25\mu\text{m}$ 内充 3mol/L 氯化钾溶液的玻璃微电极(电极电阻 $\geq 40\text{M}\Omega$) 固定在微

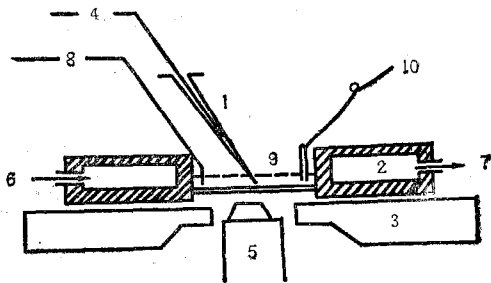


图 2 微电极与细胞小室关系示意图
1.玻璃微电极 2.水浴槽 3.载物台 4.Ag-AgCl 丝 5.倒置显微镜 6.进水口 7.排水口 8.参考电极 9.细胞小室 10.半导体点温计

电极操纵器 (LAB, 日本产)上。实验时先用粗调螺旋将电极尖端放入倒置显微镜(FIFTY-FIVE, 英国产)视野内，对准细胞小室底壁上分布均匀、折光强、体积大的细胞，然后以微电极推进器的微调螺旋小心推进电极，使电极尖以 45° 角穿刺待测细胞，当电极进入细胞后可从示波器、记录仪及微电极放大器数字显示盘上见到电位迅速下跳。经通电刺激后表现出特征性细胞膜充放电波型为穿刺成功标准。同时，经记录电极向细胞内输入波宽为 $200\text{--}300$ 毫秒的恒流电脉冲，观察细胞的电紧张电位变化，摄片记录。

5. 膜电学参数的测量和计算^[6,7]

测量指标：(1) 静息膜电位 (R_P)：以最早出现的负电位为所测细胞的静息膜电位值。(2) 电紧张电位 (V_m)：以小恒流脉冲刺激细胞后产生呈指数变化的电位最大振幅为所测电紧张电位值。(3) 电流强度 (I_m)：从示波器

记录的电位值按 $1\text{V} = 10^{-7}\text{A}(100\text{nA})^*$ 关系换算成电流强度。(4) 膜时间常数 (T_m)：表示电紧张电位指数上升的斜率，以电位变化到终值的 $63\% \left(1 - \frac{1}{e}\right)$ 时的时间表示。上述几个膜电学参数指标测定的示意图见图 3。

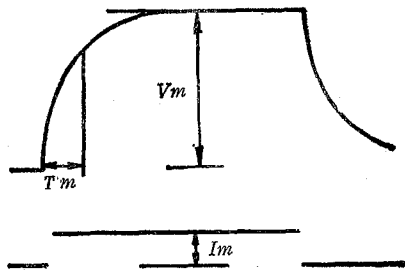


图 3 膜电学参数示意图
上线为通入一个电流脉冲后出现的电紧张电位变化，下线为电流脉冲

计算指标：(1) 膜电阻 (R_m)：按

$$R_m = \frac{V_m}{I_m}$$

公式计算，或按电流-电压关系曲线上上升的斜率计算。(2) 膜电容 (C_m)：按 $C_m = \frac{T_m}{R_m}$ 公式计算。(3) 电流-电压关系曲线：以电紧张电位为电流脉冲的函数关系作图，即可得到细胞的电流-电压关系曲线。

结 果

1. 白血病细胞与非白血病幼稚造血细胞静息电位

(1) 在原培养液条件下，所测急非淋、急淋及慢粒三型白血病细胞膜电位值见表 1。

表 1 三型白血病细胞膜电位的比较

	细胞数	膜电位 ($\bar{x} \pm SD$)	F 值	P 值
急非淋	35	-13.5 ± 3.0	0.21	>0.05
急淋	15	-13.9 ± 3.5		
慢粒	17	-14.2 ± 3.5		

* 微电极放大器特定的关系式。

图 4 为记录仪记录到的膜电位变化,当电极进入细胞时,电位水平迅速下降,同时伴随电阻值增加。

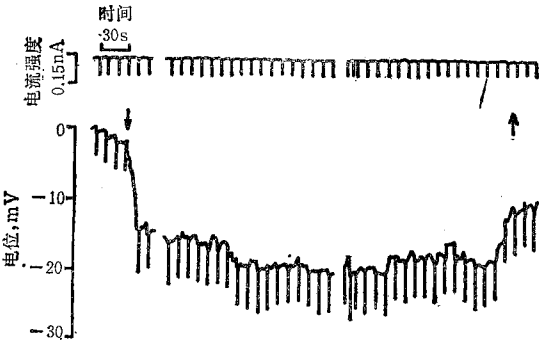


图 4 平衡记录仪记录的膜电位变化 ($R_m = 26 M\Omega$)
 上线: 以间隔为 10 秒的负电流脉冲进行刺激
 下线: 细胞膜电位变化, ↓ 示电极刺入细胞, ↑ 示拔出电极

(2) 白血病细胞与非白血病幼稚造血细胞膜电位均值的比较: 在培养基条件下所测 67 个白血病细胞膜电位为 $-13.5 \pm 3.4 mV$, 而 31 个非白血病幼稚造血细胞膜电位为 $-17.5 \pm 4.6 mV$, 白血病细胞膜电位较非白血病幼稚造血细胞明显降低 ($P < 0.005$)。

2. 膜电阻及电流-电压关系曲线 通过记录微电极向细胞内输入恒流电脉冲, 使细胞产生电紧张电位, 用微电极放大器充分平衡去除直流电脉冲对电反应信号的影响后, 可准确地记录到电流脉冲和电紧张电位的数值, 按此值即可计算出细胞膜电阻, 所测白血病细胞的电阻值范围为 $20.5-49.6 M\Omega$, $\bar{x} \pm SD = 34 \pm 7.35 M\Omega$ ($n = 43$)。而非白血病幼稚造血细胞膜电阻范围为 $10.9-30 M\Omega$, $\bar{x} \pm SD = 21.5 \pm 6 M\Omega$ ($n = 22$)。经统计学处理, 两组值有显著性差异 ($P < 0.001$)。

用不同强度和不同极性的电流刺激, 可得出所测细胞的膜电流-电压关系曲线。图 5 a 表示向白血病细胞内输入不同强度和不同极性的电流脉冲后引起的电紧张电位变化的示波器照像叠加图, 可见在电流强度相同而极性相反的情况下, 细胞表现出欧姆性的电压反应。图 5 b 为同一细胞的电流-电压关系曲线, 呈线性变化。其斜率代表膜的输入电阻 (R_m)。

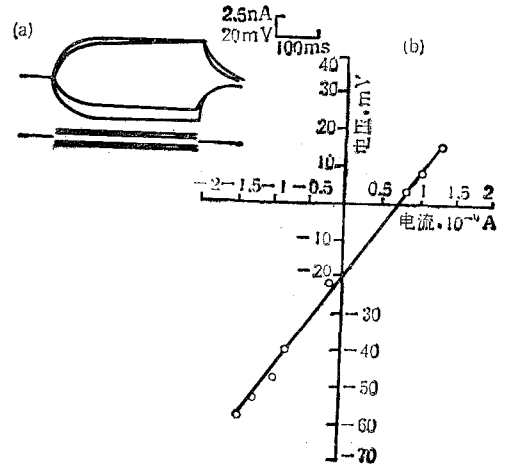


图 5 白血病细胞膜电流-电压曲线

3. 膜时间常数和膜电容 在与测量膜电阻相同的条件下, 所测两组细胞膜的时间常数和膜电容值见表 2。

表 2 白血病细胞和非白血病幼稚造血细胞膜电容和膜时间常数的比较

	白血病细胞组 ($n = 43$)	非白血病细胞组 ($n = 22$)	P 值
膜时间常数 (ms)	29.7 ± 8.70	20.9 ± 7.2	< 0.01
膜电容 ($10^{-12} F$)	0.97 ± 0.26	0.87 ± 0.16	> 0.5

4. 白血病细胞膜的整流作用 用不同强度和不同极性的电流刺激时, 18 个白血病细胞中有 7 个表现出非线性的电流-电压关系曲线。意味着细胞膜有一定的整流作用。图 6 a 为一急

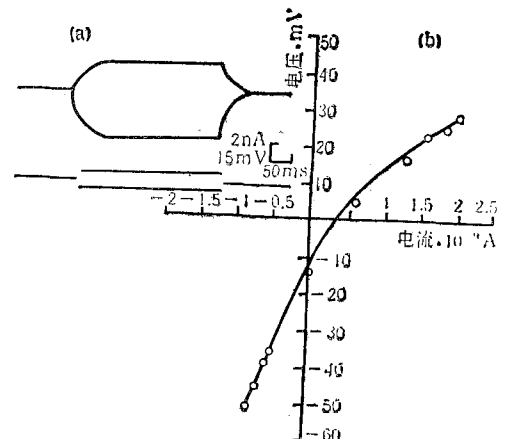


图 6 白血病细胞膜的整流作用

非淋患者细胞对恒流电脉冲表现出的外向整流作用 (Outward Rectification) 的示波图。图 6b 为同一细胞的电流-电压曲线。曲线表现为非线性变化。

5. 白血病细胞的主动性反应 像一些来源于中胚叶的哺乳动物细胞一样^[8,9], 当增大正电流脉冲的强度时, 部分白血病细胞可表现出膜主动反应, 如图 7 中箭头所示, 当电流脉冲在一定范围内变化时, 这种小的局部反应的形态和出现的时期似乎是不变的, 当电流强度增加到

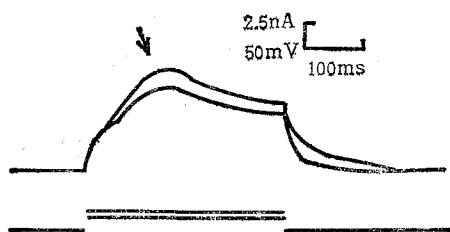


图 7 白血病细胞膜的局部主动反应

一定值时, 则可引出类似神经细胞的动作电位样变化, 这种电位变化表现为无明显的上升段延迟, 当电流断开时, 电位迅速下降, 表现为

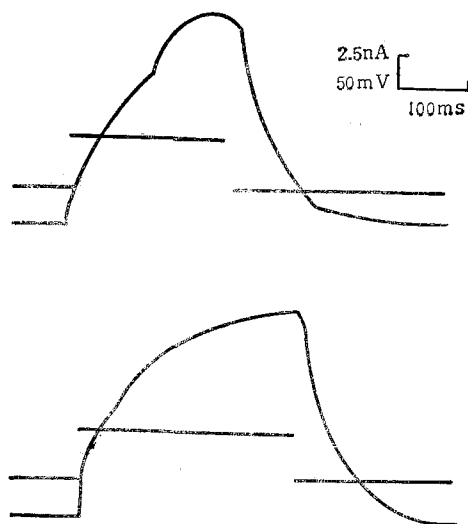


图 8 不同波宽的正电流脉冲对白血病细胞动作电位样反应的影响

上图为波宽 210ms 电流刺激引发的动作电位样反应
下图为波宽 300ms 电流刺激引发的动作电位样反应

与细胞膜放电过程一样的衰减, 增加电流脉冲的波宽似乎对下降段坡度无明显影响。见图 8。

讨 论

1. 近年, 随着设备和技术的更新, 用单电极输入电流法研究哺乳动物较小细胞的膜电学特性已成为可能^[10], 但悬浮培养的造血细胞呈游离状态, 给微电极穿刺增加了难度。Stone 等^[11]采用双套管微电极法测量两栖类动物的红细胞膜电位和膜电阻, 但此法繁杂不易掌握。而 Ferrier^[12]则用胶元基质将分离后的骨细胞重新包埋再进行穿刺。造血细胞在生理状态下呈悬浮生长, 完全包埋可能会影响到细胞的生理功能, 从而可能改变细胞膜的电学特性。我们在本实验室原有工作基础上, 采用琼脂覆底, 加大细胞与细胞小室底壁的阻力, 这样可在不影响显微镜透光度的情况下, 提高穿刺的成功率。此外, 琼脂层覆底后还可使电极在纵向水平有更大的活动范围而不易折断。当电极扎入琼脂层时, 表现为正电位变化或杂乱的波动, 依此与电极刺入细胞内的负电位变化相鉴别。

2. 目前, 对细胞分裂与膜电位相关的研究趋于增多。Rosenthal 等^[13]发现, EB 病毒可通过与 B 淋巴细胞膜上的受体结合, 引起靶细胞膜电位的变化。并出现类似于配位结合跨膜受体 (Ligand Binding to Transmembrane Receptor) 调节所表现的电反应活动, 因此认为: 膜电位的变化可能在引发靶细胞继发分裂中起重要的作用。有人还认为膜电位变化是细胞癌变发生的可能机制之一^[14]。本实验发现白血病细胞膜电位明显低于呈良性增生的非恶性血液病幼稚造血细胞, 与文献报道的肝癌细胞, 恶性纤维母细胞瘤细胞等较正常组织细胞膜电位为低的研究相一致^[5]。

3. 白血病细胞膜电阻和膜时间常数与非白血病细胞有显著差异, 意味着白血病细胞膜通透性与呈良性增生的幼稚造血细胞不同, 也说明白血病细胞膜上电信号的产生和时空传播过程可能不同于呈良性增生的非恶性血液病幼

稚造血细胞。

4. 白血细胞表现的主动反应和非线性电流-电压关系提示: 白血细胞膜上存在有电压依赖性电导 (Voltage-dependence conductance)^[15], 这种整流特性与 Gall 和 Miyazaki 报道的吞噬细胞^[8]和海星卵 (starfish oocyte)^[16,17] 的电流-电压曲线极为相似。对海星卵和吞噬细胞的研究发现, 其整流作用是与电压依赖性钾电导有关^[16]。相似的整流特性也曾在阿米巴的实验中发现^[18]。有人推测, 这些细胞内都富含收缩蛋白, 它们可能具有功能上的相似性。细胞内离子浓度的变化可能控制着与膜相关的活动。白血细胞的阿米巴样运动是否也受细胞膜对离子通透性变化过程的调控, 尚未见有文献报道。

同一患者中的不同肿瘤细胞对电流脉冲刺激表现出不同的电压反应(整流的和非整流的)是否意味着细胞分化程度和分化方向不同, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wilson, DB. et al.: *Rev. Biochem.*, 1978, 47, 933.
- [2] Nanberg, E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 844, 42.
- [3] Tsien, RY. et al.: *Nature (Lond)*, 1982, 295, 68.
- [4] Cone, CD.: *J. Theor. Biol.*, 1971, 30, 151.
- [5] Binggeli, R.: *Cancer Res.*, 1980, 40, 1830.
- [6] 李万德等: 《第一届全国应用生理学术会议论文摘要汇编》, 西安, 1986, 73。
- [7] Howell-Fulton.: *Physiology and Biophysics*, Saunders, Philadelphia, 1982, 68—69.
- [8] Gallin, EK.: *J. Cell Biology*, 1980, 85, 160.
- [9] Araujo, EG.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 856, 362.
- [10] Peltoranta, M. et al.: *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1983, 21, 731.
- [11] Stone, LC.: *J. Gen. Physiol.*, 1980, 76, 455.
- [12] Ferrier, J.: *J. Cell Physiology*, 1985, 122, 63.
- [13] Rosenthal, KS. et al.: *J. Cell Physiology*, 1983, 117, 39.
- [14] Shen, SS. et al.: *Cancer Res.*, 1978, 38, 1356.
- [15] Hall, JE. et al.: *Membrane Transport*, North-holland Biomedical Press, Elsevier, 1981, 107—112.
- [16] Miyazaki, SH. et al.: *J. Physiol.*, 1975, 240, 55.
- [17] Miyazaki, SH. et al.: *J. Physiol.*, 1975, 246, 37.
- [18] Tasaki, L. et al.: *J. Cell Comp. Physiol.*, 1964, 63, 365.

[本文于 1988 年 12 月 16 日收到]

(上接第479页)

谱相同, 依此求得的 Hb 含量显示不受胆红素干扰。2. 乳糜血浆: 乳糜所致浊度对 A 值的影响与波长有关, 即 A 值随波长减小而增加, 产生明显的基线漂移。本实验将 20mg、40mg 和 60mg Hb 参考液分别加至 Hb 含量为 1.22mg/dl 的稀释乳糜血浆内, 然后测绘微商光谱, 结果显示无基线漂移, 测得值分别为 22.56 mg、42.07mg 及 60.97mg/dl。

三、本法与酶法比较 30 份血浆样品经本法和改良酶法^[3]平行对照测定, 本法 $\bar{x} \pm SD$ 为 9.25 ± 8.95 , 酶法 $\bar{x} \pm SD$ 为 8.92 ± 6.96 , 回归方程

$$\hat{y} = 1.247x - 1.871, r = 0.970,$$

显著性检验 $t = 0.45$, $P > 0.05$ 。两法差相不显著。

四、线性与准确性 将 Hb 浓度为 10.31g/dl 参考液稀释成 6 种不同浓度, 平行测定三次, 测定浓度在 3—200mg/dl 范围内呈直线性。三种不同浓度 Hb 参考液加至 Hb 含量为 7.73mg/dl 的组合血浆内作回收试验, 结果回收率为 100.6—108.7%。

五、重现性 两种 Hb 浓度的组合血浆批内, 日间重复测定 10 次, 精密度见表 2。

二阶微商分光光度法是基于吸收光谱斜率变化而

表 2 本法精密度分析

项 目	Hb 水平($\bar{X}$)	n	SD	CV(%)
批 内	13.47	10	0.328	2.43
	35.75	10	0.498	1.39
日 间	13.41	10	0.543	4.05
	36.65	10	0.781	2.13

派生出的一种分光光度法, 本法有准确快速、减免浊度及特异性干扰等优点。测试中若用一标准滤光片或 Hb 参考液随测试样品同时校正每一波长 A 值, 则可减缓由手工调变波长产生的误差而获得更佳的重现性和准确性。

参 考 文 献

- [1] Crosby, W. H. et al.: *Blood*, 1956, 11, 380.
- [2] Sanderink, Ger-Jan, C. M. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 1985, 146, 65.
- [3] Tietz, N. W. et al.: *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1970, 269.

[本文于 1988 年 10 月 7 日收到]