

高温对 BEL-7402 肝癌细胞膜结构的作用

——肿瘤热疗机理的探讨

徐淑蕙 何亚娟* 郑正炯

(武汉大学)

适度高温选择性的抗癌效应,早在 1927 年就得到了研究和证实^[16]。无论是单一加热或与化疗结合^[15,10]都能使癌细胞的生长受到抑制、缩小、甚至全部被杀死。Stehlin^[6,15]等报道用区域性热血灌注和烷化剂合并治疗 165 例肢体黑色素瘤,显著地提高了患者生存率,降低了转移复发率。Leveen^[11]等用射频(13.56 兆赫兹)透热法对 21 例癌症患者(肺癌、结肠和头颈部等恶性肿瘤)进行一次或多次 30 分钟的热疗,多数患者症状改善,肿瘤有不同程度的坏死和消退。Kim^[10]等以热疗加放疗治疗皮肤恶性肿瘤,疗效明显提高。可见无论在动物(啮齿类)或人,高温抗癌治疗是一种有价值的方法^[6,13]。而且多数研究者发现癌细胞热敏感范围主要在 42℃—44℃^[13]。

为了探索人工加热到 40—44℃ 时癌细胞比正常细胞对热敏感的原因,以便阐明热疗肿瘤的机制,我们进行了以下研究。

一、材料与方 法

1. 细胞 人体肝癌体外细胞系 BEL-7402,为上海细胞生物研究所建立,常规培养在含 20% 小牛血清的 1640 培养液^[2]、37℃ 培养箱中。

2. 细胞的温度处理与制片摄影 (1) 传代后 48 小时将小瓶细胞放入不同温度(40℃—45℃, 50℃)的培养箱内进行温度处理,然后又按不同时间(0.5—9 小时)从高温中取出制片。

④光学显微镜制片:经温度处理后的培养

瓶中的玻片取出分为两组:一组经 Bouin 固定, Giemsa 染色观察细胞分裂相。另一组活体经苔酚兰染色观察死亡率、复活率。

②电子显微镜制片:经不同温度处理后的细胞离心(2000rpm10 分钟)收集,制超薄切片,作电镜观察。

③活细胞缩时显微电影的制备:传代后 48 小时对培养细胞,进行活体缩时显微电影观察。先在 37℃ 下拍摄,然后加温到 43℃(3 小时)继续拍摄。

二、实验结果

1. 高温对 BEL-7402 人肝癌细胞膜的影响:

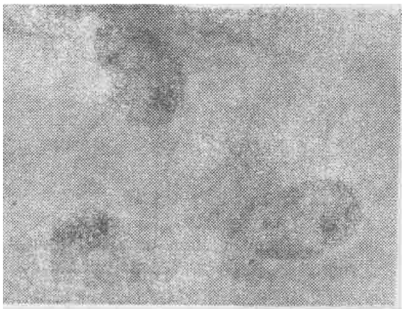
人肝癌细胞在高温作用后,首先是膜结构出现变化。42℃—44℃ 处理 0.5 小时后,核膨大、胞内形成许多大小不等的空泡(照片 1a。本文照片 1b—4b 均见封三),将热处理时间延长到 1—2 小时后,细胞膜开始局部破损,胞质外流、胞核外移(照片 2a、2b)。处理时间延长到 3、6、9 小时后,还出现核膨大、不同程度的核形不规则,内核膜与外核膜出现分离,核膜出现破损,胞质核质外流(照片 3a、3b),有的质膜消失,核膜界限不清,细胞处于解体状态(照片 4a)。分裂期细胞可观察到由于膜结构的损伤而细胞分裂过程滞留,有的在分裂过程中膜破裂而解体死亡(缩时显微电影中可见)。在温度为 45℃ 时细胞开始出现核染色质凝成团块,蛋

* 湖北省肿瘤医院科研室

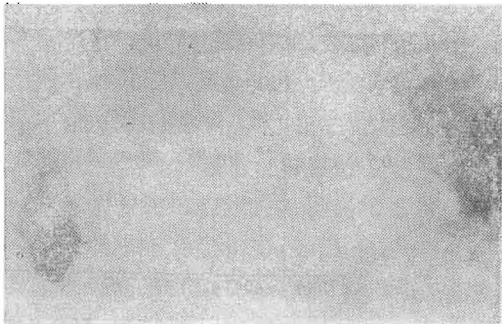
表 1 高温对 BEL-7402 人肝癌细胞膜结构的影响

处理温度	处理时间(小时)	胞浆内形成大小不等空泡	质膜破损或消失	细胞器结构不清或消失	胞浆外流	核膜破损核质外流	核染色质凝集成块
40℃	0.5	+	+				
	1	+	++		+	+	
	2	++	++	+	+	+	
41℃	0.5	+	+	+			
	1	+	++	+	+	+	
	2	++	++	+	++	+	
42℃	0.5	+	+	+	+		
	1	++	+	+	+	+	
	2	++	++	++	++	+	
	3	+++	++	++	++	+	
	6	+++	+++	++	++	++	
	9	+++	+++	++	++	++	
43℃	0.5	+	++	+	+	+	
	1	++	++	++	++	+	
	2	+++	+++	++	++	+	
	3	+++	+++	+++	++	+	
	6	+++	+++	+++	++	++	+
	9	+++	+++	+++	+++	++	+
44℃	0.5	++	++	+	++	+	
	1	++	+++	++	++	+	
	2	+++	+++	++	+++	++	
	3	+++	+++	+++	+++	++	
	6	+++	+++	+++	+++	+++	+
	9	+++	+++	+++	+++	+++	+
45℃	3	+++	+++	+++	+++	+++	++
	6	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
50℃	3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	9	+++	+++	+++	+++	+++	+++

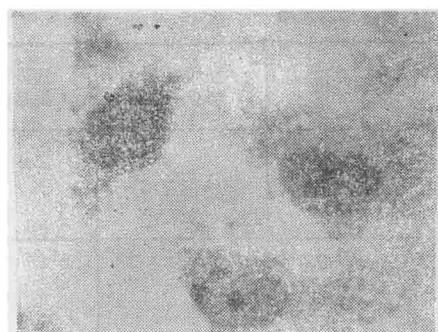
+ 不显著 ++ 显著 +++ 较显著 ++++ 很显著



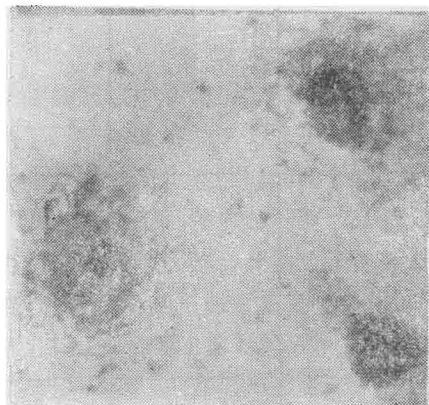
1a



2a



3a



4a



5a

白质凝集, 50℃ 时出现大量这类死亡细胞(照片 5a, 4b)。照片 1b, 是未受高温处理的正常肝癌细胞, 质膜, 核膜完整。在不同高温作用不同时间膜结构损伤程度见表 1。

2. 高温对 BEL-7402 人肝癌细胞 分裂的影响

以不同温度、不同时间处理细胞后固定, 染色、观察分裂相, 结果表明 42℃ 处理 0.5 小时组分裂相最高为 18%, 对照组为 14%, 随着温度升高至 43℃ 时, 细胞分裂相明显下降 (10%、9.5%、6%)。44℃ 时下降为 (7.8%、6.5%、5.6%), 间期细胞数相应增加。延长高温处理时间 (3、6、9 小时), 分裂相细胞数也随着降低, 间期细胞数上升(图 1)。

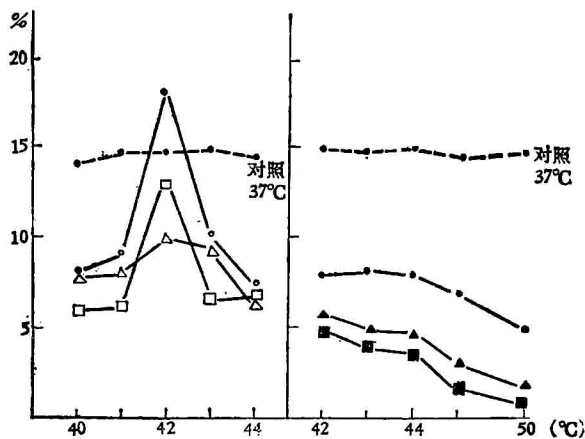


图 1 不同高温处理后细胞分裂率

○—○, 0.5 小时 ●—● 3 小时
□—□, 2 小时 ▲—▲ 6 小时
△—△, 1 小时 ■—■ 9 小时

3. 高温对细胞存活率的影响

处理 0.5 小时组, 对细胞的存活率影响不

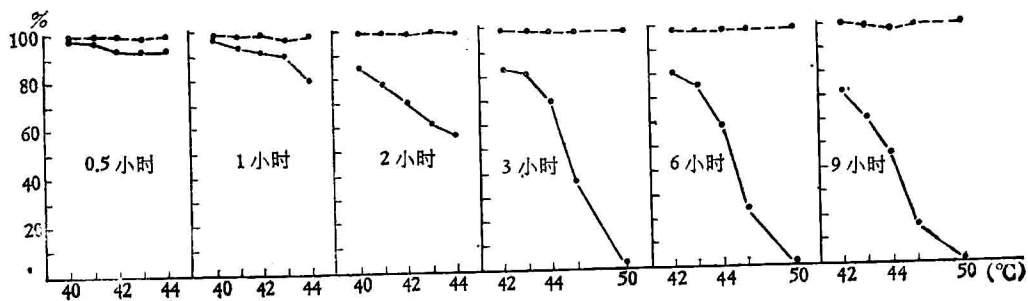


图 2 40—50℃ 处理 0.5—9 小时后细胞存活情况

●—● 处理组 ●---● 对照组

明显;处理 1 小时组从 43℃ 开始,温度越升高,对细胞的存活率影响越明显。处理 2—9 小时组,随着温度的升高(40—50℃),细胞的存活率明显降低(图 2)。

4. 高温对细胞复活率的影响

将不同高温处理后的细胞,放回 37℃ 培养,连续培养三天,观察其复活率,结果表明:40℃、41℃、42℃ 处理 0.5 小时的细胞其复活率下降不明显。处理 1 小时,复活率明显下降。处理温度超过 43℃ 复活率显著下降(图 3)。

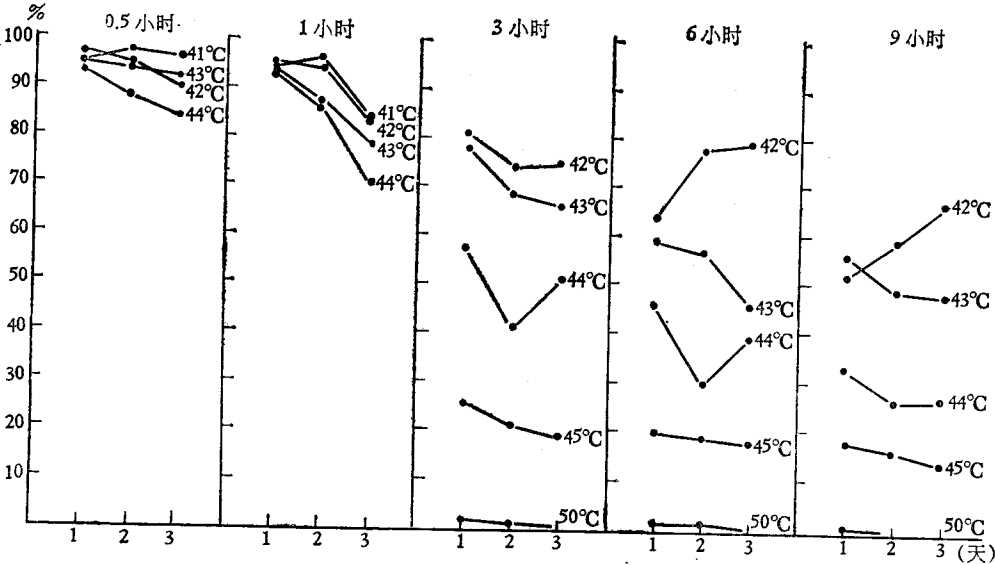


图 3 不同温度处理不同时间后三天复活率

5. 高温对细胞生长的影响:

将实验分成两大组:(1)间歇处理组:又分两个温度小组,各以 42℃、43℃,每天处理 1 小时,连续处理三天,(2)一次长时间处理组:分三个温度小组,各以 42℃、43℃、44℃ 处理两小时,仅处理一次。处理后两组均以胰酶消化,每日定时细胞计数,为期 7 天。结果表明:

一次长时间处理比间歇处理对细胞生长率的影响更明显。同时表明温度处理后 1—3 天各组长生率都有不同程度的上升,第四天开始明显下降,随着时间的延长生长率继续下降(44℃ > 43℃ > 42℃)(图 4)。

三、讨 论

在高温(40—45℃)作用下,首先观察到 BEL-7402 人肝癌细胞发生变化和破坏是细胞的膜结构。

为什么癌细胞比正常细胞更敏感?我们认为这是由于它们膜结构的差异所引起的。

膜的结构是以类脂双分子层为骨架的,而膜类脂在生理温度即 37℃ 左右时具有流动的液晶态结构^[12,14]。这是一种在分子水平上与膜功能密切相关的结构状态。但是很多因素都会使膜类脂液晶态发生相变,如温度、pH、胆固醇、两价阳离子(Ca⁺⁺、Mg⁺⁺),单价阳离子(Li⁺、Na⁺、K⁺)等。当温度超过相变温度继续升高时,类脂分子有序排列的液晶态就转向无

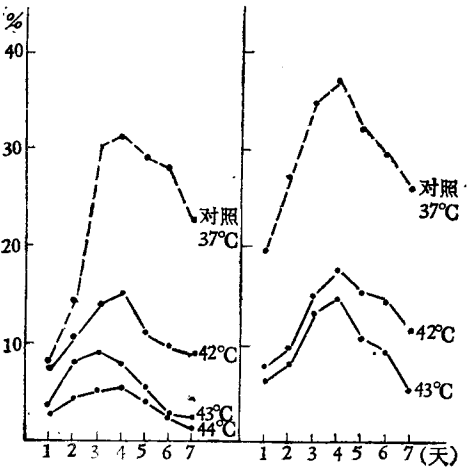


图 4 不同温度处理后的生长曲线

序排列的液态。如果温度低于相变温度继续下降时,液晶态就逐渐转变为凝胶态。液晶态相变一般是可逆的。但是导致相变的某一因素持续作用或一次强作用,可使液晶态的相变成为不可逆的,从而导致膜功能的改变^[3,5,7]。

研究证明:癌细胞膜的物理状态与正常细胞不同,其类脂双分子层已由液晶态趋向液态,具有较大的流动性。测定癌细胞膜中某些组份要比正常细胞膜中的同类组份移动得快^[3,5,8,12]。当温度升高时处于趋向液态的癌细胞的膜类脂比正常细胞更早更快的转变为真液态。而膜类脂处于液晶态的正常细胞则需要更高的温度才会转变成真液态。膜类脂处于真液态时,不仅膜的通透性屏障,与膜有关的酶活性等受到扰乱,而且作为膜结构骨架的类脂处于真液态时,流动性增大,极性基团松弛,通过静电作用和疏水键作用结合在类脂层上的膜蛋白等也发生移位,从而膜结构就逐渐出现松弛和破坏。这种松弛破坏过程可出现在细胞所有膜的结构上(线粒体等细胞器)。我们认为这可能是癌细胞比正常细胞对高温(40—45℃)敏感,而且导致癌细胞解体致死的原因。

其次,在本实验中,40℃—42℃处理0.5小时的细胞,对膜结构,细胞分裂,生存率影响都不明显,似乎还表现出一定的刺激作用;如42℃处理0.5小时后,细胞的分裂数还略高于对照组。这可能是因为40℃—42℃处理0.5小时,刺激较轻,而膜结构的物相变化又是可逆的,因此当刺激停止,细胞膜结构迅速恢复到原有的物态。如果处理时间超过0.5小时,就逐渐出现明显损伤。

另外,文献报道^[6],在动物躯体不同部位的癌细胞热敏感性是不同的,这与动物躯体不同部位细胞膜液晶态具有不同的相变温度特性是一致的。

高温杀灭肿瘤细胞的机理,至今尚未得到

阐明。目前的主要看法有^[9,10,16],①高温对细胞核的破坏。当肿瘤细胞较长时间处于41℃以上高温时,细胞核和染色质凝成团块,蛋白质凝固,细胞吸氧量减少,DNA和RNA的合成受到抑制,导致细胞死亡。而在我们的实验中,这种现象只发生在45℃以上,与文献报道一致^[13,16],②高温对胞浆的损伤。高温使癌细胞胞浆内的溶酶体活性增高,并产生新的溶酶体。我们认为这可能是因为癌细胞膜结构对高温更敏感,使膜的流动性增大,通透性改变而造成的。

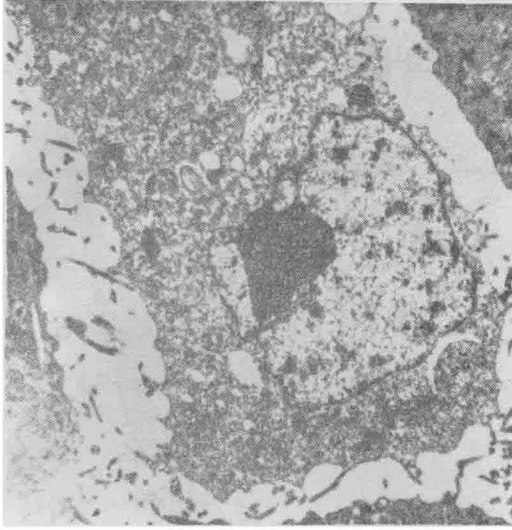
总之,对高温治癌机理的研究不仅为临床抗癌的治疗提供可靠的依据,且有助于了解癌细胞的特性及其形成。

承武汉大学病毒系电镜室谭先琴等同志帮助制作电镜照片,谨致谢意。

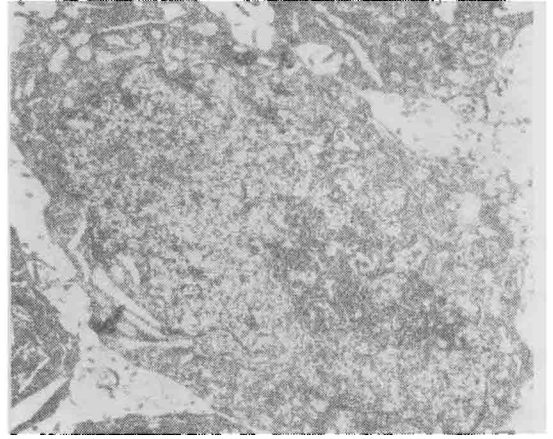
参 考 文 献

- [1] 郑正炯:《生物化学与生物物理进展》,1974年,第四期。
- [2] 陈瑞铭等:《实验生物学报》,1978年,第11卷,第1期。
- [3] 郑正炯:《自然杂志》,1979年,第5期。
- [4] 周信达:《国外医学肿瘤分册》,1980年,第4期。
- [5] Ambrose, E. J.: *Lyotropic Liquid Crystals*, 1976.
- [6] Beppino, C. Giovanella et al.: *Cancer Res.*, **39**, 2236, 1979.
- [7] Brown, G. H. et al.: *Liquid Crystals*, 243, 1965.
- [8] Chapman, D.: *Pure and Appl. Chem.*, **50**(7), 627, 1978.
- [9] Giovanella, B. C. et al.: *Cancer Res.*, **36**, 3944, 1976.
- [10] Kim, J. H., and Hahn E. W.: *Cancer Res.*, **39**, (Part II): 2258, 1979.
- [11] Leveen, H. H. et al.: *J. Am. Med. Assoc.*, **235**, 2198, 1976.
- [12] Shinitzky, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, **85**, 603, 1974.
- [13] Storm, F. K. et al.: *Cancer Res.*, **39**, 2245, 1979.
- [14] Singer, S. T. et al.: *Science* **175**, 720, 1972.
- [15] Stehlin, J. S. et al.: *Surg. Gynecol. Obst.*, **140**, 338, 1975.
- [16] Westermarck, H.: *Skand. Arch. Physiol.*, **52**, 257, 1927.

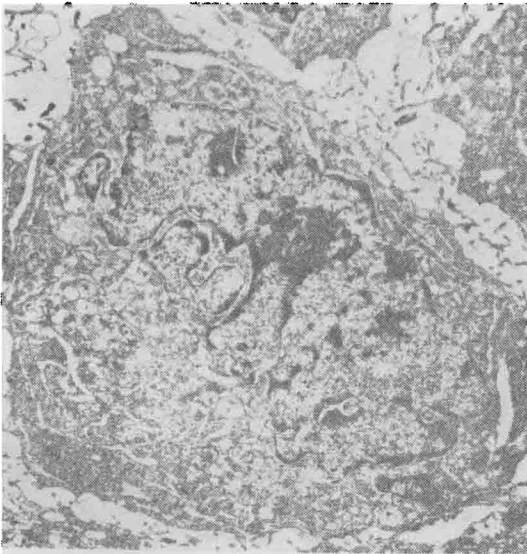
【本文于1981年12月19日】



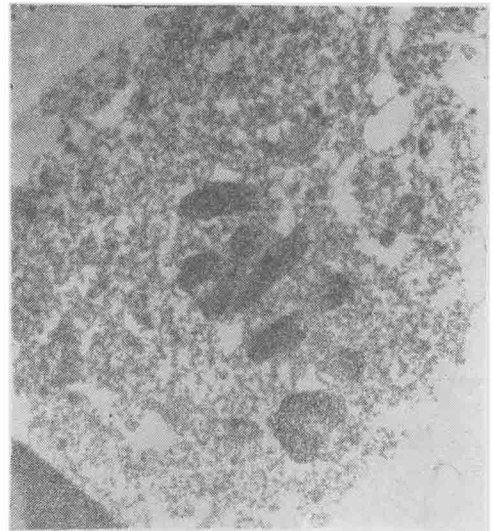
1b × 1500



2b × 3700



3b × 3700



4b × 4800

“高温对BEL-7402肝癌细胞膜结构的作用”一文的照片