

温度 (40—45°C) 对 MGc 80-3 人胃腺癌细胞表面电荷的影响

郑正炯 徐淑蕙 鲍仕登

(武汉大学生物工程研究中心)

早在 1956 年 Ambrose 就发现肝癌细胞与肾癌细胞的电泳率 (EPM) 明显地高于相应的正常细胞^[1]。1964 年 Forrester^[2]指出, 仓鼠正常成纤维细胞经病毒转化并克隆化的细胞表面负电荷高。接着, Kuhensro 又证明人类白血病骨髓细胞电泳率高于正常细胞。1980 年 Denet 用铁硫蛋白标记的方法也证明癌细胞膜表面负电荷增高^[3]。虽然对负电荷增高的原因众说纷云^[4-6], 有的认为是由于癌细胞表面唾液酸含量的增高, 有的认为是膜的透明质酸含量上升, 有人则认为是癌细胞表面蛋白磷酸化增加之故, 但大家一致认为细胞表面负电荷高是癌细胞的重要特性之一。本实验的目的是通过测定高温 (40—45°C) 对膜电荷的影响, 了解 40—45°C 温度对癌细胞作用的膜生物学效应, 为适度加温治疗癌肿的临床应用提供确切的依据。

材 料 和 方 法

1. 细胞 人体胃腺癌细胞系 MGc 80-3 为山东师范大学生物系所建^[7], 常规培养在 37°C 含 20% 小牛血清的 1640 培养液中。

2. 细胞的温度处理 细胞传代后 48 小时选择生长均匀而良好的细胞, 经过不同温度 (40°C、43°C、45°C 等) 及不同时间 (15', 30', 60', 120') 的处理; 处理后把细胞从瓶壁上打下来, 直接用 9% 蔗糖溶液制成细胞悬液, 供细胞电泳测定用。对 43°C 温度处理组还分三种不同条件进行测定 EPM: ① 43°C 处理后立即进行细胞电泳, 测定 EPM 值; ② 43°C 处理后立即放回 37°C 中培养 24 小时后测定 EPM 值; ③ 43°C 处理后立即置于 4°C 冰箱中 24 小时以

后测定 EPM 值。

3. 细胞电泳率 (EPM) 的测定^[8] 在封闭的方形毛细管静止层中进行。电泳率与管径互成抛物线关系, 即毛细管中心电泳最快, 管边缘最慢, 根据流体力学定律, 在封闭条件下可找到电渗等于零的地方, 这地方是纯净的电泳; 称静止层。在静止层上的细胞电泳结果才是真实的电泳率。方形毛细管的静止层是通过正方形截面两对边中心点连结线上离管壁 9% 的内径处。细胞电泳率的测定温度控制在 25°C ± 0.5°C, 两电极间距离为 4.7 cm, 电极间的工作电压为 20 V, 电泳所用盐桥为含 2% 琼脂的 10% NaCl 溶液, 每个样品测量 10 个细胞的来回泳动, 每个细胞泳动的单程距离为 5 格 (目镜中围棋盘式测微器), 10 个细胞来回的总时数为 T, 平均时间为 T/20。

$$\text{电泳率 (EPM)} = \frac{\text{电泳速度}}{\text{电压梯度}}$$

$$= \frac{U(\mu\text{m})/t(\text{sec})}{V(v)/r(\text{cm})}$$

U = 细胞泳动距离 (μm)

t = 细胞泳动 μm 距离所需的时间 (sec)

V = 两电极间的工作电压 (v)

r = 两电极间的距离 (cm)

结 果

1. 不同的温度 (40°C、43°C、45°C) 及不同的时间 (15'、30'、60'、120') 处理胃腺癌细胞后其电泳率的变化, 如表 1。在处理 15 分钟时, 只有 45°C 组 EPM 值下降稍明显, 而用 40°C 处

理 15 分钟其 EPM 值反有升高现象, 在处理 30 分钟时, 随着处理温度的升高, 其 EPM 值逐渐下降, 其中 43℃ 处理组的 EPM 值下降显著, 其次为用 40℃ 处理组, 而 45℃ 的 EPM 值与 43℃ 组无明显差异。43℃ 处理时间延长到 1 小时, 其 EPM 值与处理 30 分钟的 EPM 值相比稍有降低, 如图 1 所示。

2. 43℃ 温度处理不同时间后细胞电泳率的变化 (见表 1)。细胞经 43℃ 处理不同时间 (15'、30'、60'、120') 后, EPM 值下降, 其中以 15'—30' 段 EPM 值下降最显著, 如图 2 所示。处理时间延长到 60 分和 120 分钟时其 EPM 值继续下降但不明显, 表明 43℃ 处理 30 分钟可能是胃腺癌细胞 EPM 变化的转折点。

表 1 用不同温度处理不同时间癌细胞 EPM 值的变化

	37℃	40℃	43℃	45℃
15'	2.71±0.022	2.83±0.030	2.65±0.019	2.34±0.052
30'	2.70±0.026	2.51±0.018	2.23±0.041	2.21±0.060
60'	2.71±0.032	2.49±0.029	2.11±0.033	2.09±0.048
120'	2.71±0.031	2.42±0.034	2.09±0.054	2.07±0.062

43℃ 及 45℃ 处理的 EPM 值与对照组有明显差异 (P<0.01) (n=6)

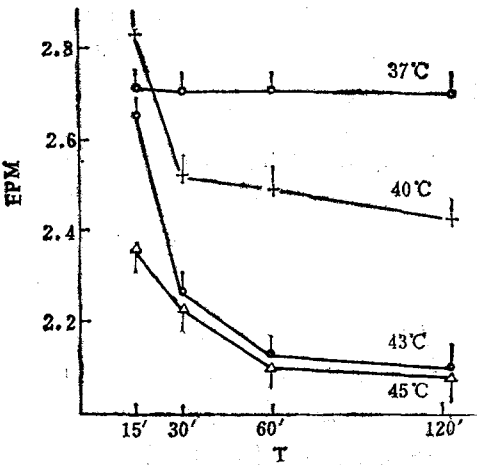


图 1 用不同温度处理不同时间癌细胞 EPM 值的变化

3. 人胃腺癌细胞经 43℃ 处理后又经不同条件处理, 其 EPM 的恢复情况 (表 2)。癌细胞经 43℃ 处理不同时间 (15'、30'、60'、120') 后立即培养于 37℃ 中, 经 24 小时后打下细胞测定其 EPM 值。结果表明处理 15' 和 30' 者其

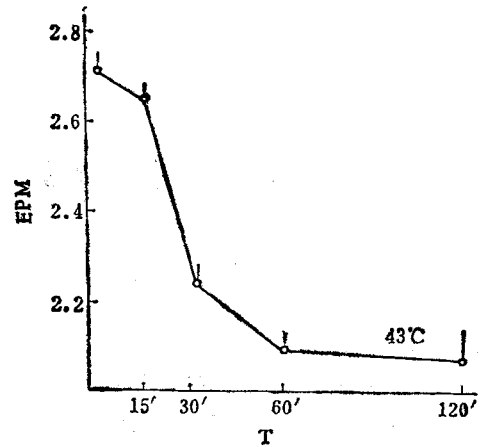


图 2 癌细胞经 43℃ 处理不同时间后 EPM 值下降 (与对照组相比 P<0.01)

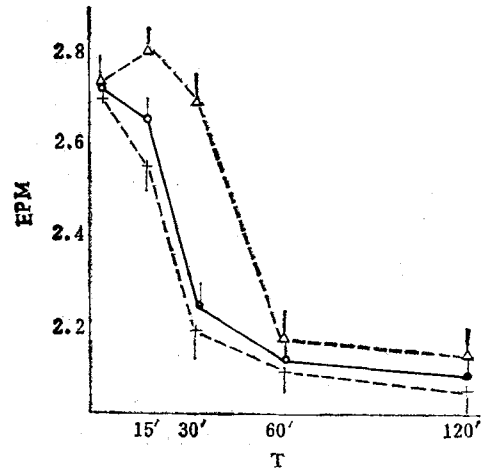


图 3 细胞经 43℃ 处理后放入不同条件处理 24 小时后的 EPM 值变化

○—○ 为 43℃ 处理后立即测定的 EPM 值 △---△ 为 43℃ 处理后放到 37℃, 24 小时后的 EPM 值 ×---× 为 43℃ 处理后放至 4℃, 24 小时后的 EPM 值

EPM 值在回到 37℃, 24 小时后有明显的恢复, 但是用 43℃ 处理 1 小时和 2 小时的再回到 37℃、24 小时其 EPM 值就不能恢复 (图 3 所示)。如果用 43℃ 处理不同时间后的癌细胞置于 4℃ 保存 24 小时后再测定其 EPM 值, 结果表明 EPM 值基本上都不能恢复。

讨 论

1. 胃癌细胞经 43℃—45℃ 温度处理后其 EPM 值均有不同程度的下降。对下降原因有

表2 癌细胞经43℃处理不同时间,又经不同条件处理的EPM值

温度 \ 时间	0'	15'	30'	60'	120'	备 注
43℃	2.71±0.030	2.65±0.019	2.23±0.041	2.11±0.033	2.09±0.054	处理后立即测定
43℃→37℃	2.71±0.030	2.80±0.037	2.69±0.045	2.15±0.051	2.13±0.039	43℃处理后放到37℃24小时后测定
43℃→4℃	2.71±0.030	2.54±0.048	2.19±0.060	2.09±0.046	2.05±0.065	43℃处理后放到4℃24小时后测定

不同的看法:有人认为是高温作用后癌细胞表面带负电基团的脱落,特别是表面唾液酸的脱落;高温还可使细胞释放更多的唾液酸酶,使表面唾液酸解脱而使负电荷降低;膜表面带电物质的移位以及膜通透性的增加而导致细胞周围正离子浓度增加也可使EPM下降^[9,10]。但是,上述都不是高温作用细胞的直接效应。我们认为,高温作用使细胞EPM值下降的直接原因应该是高温破坏了膜结构的液晶态^[11],因为癌细胞具有较正常细胞膜更大的流动性,因此在43℃作用下它们更快地趋向于无序的真液态。膜表面物质的脱落、移位和膜通透性的增大等只是膜流动性增高的继发效应。

2. 根据EPM值来看,随43℃处理时间的延长其逐渐下降的结果与Sato等用乳腺癌细胞所做的结果是一致的^[12],不过Sato报道的EPM值下降最明显的是15分钟,而我们实验用的胃癌细胞EPM下降最明显是30分钟,这可能是由于彼此所用细胞不同所致,表明胃腺癌细胞比乳腺癌细胞具有更大的耐热性,这也可能是由于人体不同部位的细胞膜具有不同的相变温度所致。

3. 用40℃处理15分钟,其EPM值反有升高的现象,与我们以前所做温度对细胞分裂的刺激作用结果是一致的^[11]。

癌细胞经40—45℃作用后EPM值的恢复,即细胞表面电荷的恢复,也就是细胞表面分子结构的修复。Sato证实,细胞在生理温度下24小时其EPM值不能明显恢复的就是失去了克隆化的能力^[12]。因此EPM值的恢复也提示我们在进行加温治癌时必须处理一定的时间,如胃腺癌细胞经43℃加温处理必须在半小时

以上,以1小时为宜。1小时处理后膜结构损伤已较严重,所以无法恢复。

4. 癌细胞膜表面负电荷的增加,可导致细胞粘着力降低,接触抑制消失,细胞间斥力增强,从而促进癌细胞的增殖、浸润和转移。因此,加温作用后癌细胞表面电荷下降,对于控制癌症具有重要意义,如适度加温处理适当时间使癌细胞膜表面负电荷不可逆的降低,能使癌细胞的增殖减慢、转移减少,并有助于免疫细胞接近而吞噬癌细胞。同时,由于加温使膜流动性增大而产生的负电荷不可逆的下降,也能直接致癌细胞死亡。有人在大鼠腹水癌AT-7974的实验中发现,癌细胞在对数生长期其表面负电荷最高。有人甚至用一些能够降低癌细胞膜表面电荷的物质,也可使癌细胞由于表面电荷下降而逐渐死亡。因此,加温治癌从降低膜表面负电荷上看,不仅可以探讨加温治癌的机理,同时也可以深入了解癌细胞的特性与膜表面的关系。

参 考 文 献

- [1] Ambrose, E. T. et al.: *Nature*, **177**, 576, 1956.
- [2] Forrester, J. A. et al.: *Nature*, **201**, 945, 1964.
- [3] Denet, J. F. et al.: *Journal of Ultrastructure Research*, **71**, 203, 1980.
- [4] 程符生:《国外医学(生理病理学分册)》3, 1983.
- [5] Von Beek, W. P.: *Cancer Research*, **33**, 2913, 1973.
- [6] 凌义和:《生理科学进展》**13**, 345, 1982.
- [7] 王凯华:《实验生物学报》**16**, 257, 1983.
- [8] 梁子钧:《生物化学与生物物理进展》**1**, 59, 1976.
- [9] Bosmann, H. B. et al.: *Nature*, **246**, 487, 1973.
- [10] Hagmar, B. et al.: *Int. J. Cancer*, **5**, 72, 1970.
- [11] 徐漱意等:《生物化学与生物物理进展》**5**, 30, 1982.
- [12] Sato, C. et al.: *Cancer Research*, **41**, 4107, 1981.

[本文于1986年1月8日收到]