

## 布比卡因合并高温不同序贯对 HeLa 细胞表面电荷的影响

王建一 阎新文\*张苏玲 张天泽\*

(南京解放军八一医院)

### 提 要

用细胞电泳技术对布比卡因合并高温不同序贯所致癌细胞表面电荷密度的变化进行了测定,并就这种变化与细胞热杀伤效应之间的关系进行了探讨。结果表明,先给药后加温实验组细胞电泳减慢率明显高于相反处理序贯;各组细胞集落形成率测定结果与细胞电泳速度呈正相关。

局部麻醉药与高温合并应用后可产生一定的热增敏效应已为离体和整体实验所证实<sup>[1,2]</sup>。我们最近的实验也证实局部麻醉药布比卡因具有较强的热增敏效应,该效应与药物和高温联合应用的不同序贯有关<sup>[3]</sup>。细胞电泳技术是近年来研究肿瘤细胞膜生物学效应的一种较新的生物物理学方法,它能使细胞在完整无损的自然状态下,在外来因素减少到最低限度的相对稳定环境中,通过测定活细胞的表面电荷,对各种因素引起的细胞膜结构、组成和功能的变化,进行精密的研究和定量分析<sup>[4,5]</sup>。本文采用这一技术对布比卡因合并高温不同序贯效应所致细胞表面电荷密度的变化进行了测定,初步探讨了布比卡因热增敏的可能机制,为今后临床应用选择最佳治疗方案提供了一定的理论依据。

### 材 料 与 方 法

**一、细胞** 人体宫颈癌细胞系 HeLa, 常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中。实验用细胞浓度为  $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。

**二、药物** 布比卡因注射液,上海第十制药厂生产,实验用最终浓度为  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  细胞悬液。

**三、加温** 恒温水浴箱内加温。

### 四、实验分组

1. 对照组 (C): 常规培养的 HeLa 细胞。
2. 药物组 (B): 布比卡因  $37^\circ\text{C}$  处理细胞 60 分钟,换入新培养液。
3. 高温组 (H): 细胞经  $44^\circ\text{C}$  水浴加温 30 分钟。
4. 先给药后加温组 (BH): 布比卡因处理细胞后换入新培养液,加温  $44^\circ\text{C}$ , 30 分钟。
5. 先加温后给药组 (HB): 高温处理后的细胞与布比卡因作用( $37^\circ\text{C}$ ) 60 分钟,换入新培养液。

**五、细胞电泳测定** 在封闭式外方内圆形毛细管静止层中进行。电泳池(毛细管)内径为  $1.222\text{mm}$ , 长  $60\text{mm}$ 。测定时温度控制在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 两电极间距  $80\text{mm}$ , 工作电压  $40\text{V}$ , 电泳所用盐桥为含 1.5% 琼脂的 10% NaCl。每组样品测定 10 个细胞往返  $32 \mu\text{m}$  距离所需时间,结果以电泳速度  $\mu\text{m}/\text{s}$  表示,同时按下列公式计算电泳减慢率:

$$\text{减慢率}(\%) = \frac{T_{\text{实}} - T_{\text{对}}}{T_{\text{对}}} \times 100\%$$

式中  $T_{\text{实}}$  和  $T_{\text{对}}$  分别为试验管内和对照管内 10

\* 天津市肿瘤研究所。

个细胞往返泳动  $32\mu\text{m}$  所需秒数的平均值。

**六、细胞集落形成率测定** 为证实经实验处理后细胞膜表面电荷改变对细胞存活率的影响,对各组细胞进行了集落形成率测定。将处理后的细胞经连续稀释后接种于直径  $5\text{cm}$  平皿内,  $150$  个细胞/平皿,每组细胞双样品,  $5\%$   $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  培养  $10$  天后,甲醇固定, Giemsa 染色,以  $50$  个细胞以上为一形成集落,记录平均值。

## 实 验 结 果

**一、单纯药物和单纯加温对 HeLa 细胞电泳速度的影响** C 组平均电泳速度为  $5.13 \pm 0.19\mu\text{m/s}$ , B 组为  $3.77 \pm 0.15\mu\text{m/s}$ , H 组为  $3.50 \pm 0.08\mu\text{m/s}$ 。B 组、H 组与 C 组相比,电泳速度均有非常显著差异 ( $P < 0.001$ ),而 B 组与 H 组之间无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

**二、布比卡因与高温合并应用的不同序贯对细胞电泳速度的影响** 如表 1 所示, BH 组细胞电泳速度为  $2.89 \pm 0.09\mu\text{m/s}$ , HB 组为  $3.13 \pm 0.13\mu\text{m/s}$ ,不同序贯的两组相比,其电泳速度有非常显著差异 ( $P < 0.01$ )。

**三、细胞集落形成率测定结果** 各组细胞集落形成率分别为: C 组,  $78.33\%$ ; B 组,  $73.00\%$ ; H 组,  $59.33\%$ ; BH 组  $37.33\%$ ; HB 组,  $49.33\%$ (图 1)。统计学处理表明,细胞电泳速度与细胞集落形成率呈正相关 ( $r = 0.876$ ,  $P < 0.05$ )。

表 1 布比卡因合并高温不同序贯对细胞电泳的影响

| 组 别  | 电泳速度 ( $\mu\text{m/s}$ ) | 减慢率 (%) |
|------|--------------------------|---------|
|      | $\bar{x} \pm SD$         |         |
| 对 照  | $5.13 \pm 0.19$          |         |
| 布比卡因 | $3.77 \pm 0.15$          | 36.0    |
| 高 温  | $3.50 \pm 0.08$          | 46.4    |
| 先药后热 | $2.89 \pm 0.09$          | 79.2    |
| 先热后药 | $3.13 \pm 0.13$          | 64.0    |

各实验组与对照组间电泳速度均有高度显著差异, BH 与 HB 序贯处理的电泳速度及减慢率均有显著差异 ( $P < 0.01$ )。 ( $n = 10$ )。

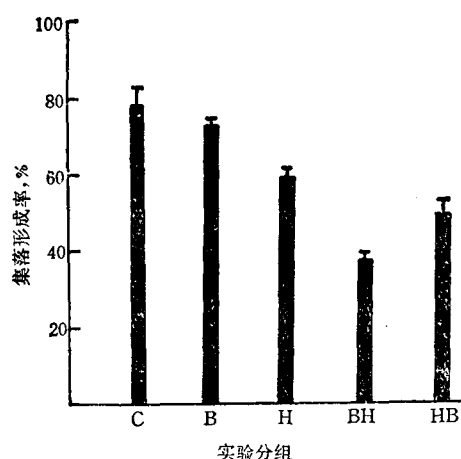


图 1 布比卡因合并高温不同序贯的集落形成率比较 药组 (B) 与对照组 (C) 相比,无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 高温组 (H)、先药后热组 (BH)、先热后药组 (HB) 与 C 组间均有显著差异, BH 与 HB 不同序贯间有显著差异 ( $P < 0.01$ )。 ( $n = 2$ )

## 讨 论

应用细胞电泳技术测试加温合并热增敏剂对癌细胞表面电荷的作用,不仅可以探讨加温治癌的作用机制,而且亦可对高温合并药物热杀伤的体外序贯效应作出客观评价。我们用自制的细胞电泳简易装置,对局部麻醉药布比卡因合并高温不同序贯所致的癌细胞表面电荷变化进行了测定,初步结果证实,高温与药物联合应用的不同顺序所致的细胞电泳速度改变各异,且不同实验组的细胞电泳减慢率与热增敏强度有关。

一般认为,局部麻醉药的药理作用是通过竞争性地取代细胞膜结合部位的钙离子,影响钾、钠离子进出细胞膜<sup>[6]</sup>。本实验结果表明,单用布比卡因组与对照组相比,电泳速度明显减慢(减慢率  $36\%$ ),提示局部麻醉药可致癌细胞表面电荷下降。这种改变虽无直接杀伤效应,但却可导致细胞热敏感性的增加,其依据是单纯用药时集落形成率未见明显改变,但合并高温后则由单纯高温组的  $59.33\%$  降至  $37.33\%$  (BH 组)。

对于高温作用后,癌细胞电泳速度改变的机制众说纷纭,郑正炯等<sup>[7]</sup>最近指出,高温作用

(下转第 439 页)

好。

**四、荧光染液浓度影响荧光强度的分析结果** 由图2可看出, PI最佳的染色浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ , 其荧光强度最强(130道),  $5-50\mu\text{g/ml}$ 的浓度, 荧光强度逐渐增强, 当浓度高于 $50\mu\text{g/ml}$ 时, 其荧光强度反而减弱。本结果与Schutte等<sup>[5]</sup>报道一致。EB的最佳浓度在 $10-20\mu\text{g/ml}$ 的范围, 文献中多用 $10\mu\text{g/ml}$ 的浓度<sup>[7]</sup>。从图2所示结果表明, 在用流式细胞术定量分析荧光强度时, 为了选择最佳的染色方案, 掌握好荧光染色剂的浓度是很重要的, 在样品染色过程中, 必须确定所用荧光染料的浓度是否与荧光强度有直接的比例关系。对选用的荧光染料, 要首先找出荧光发射最强的浓度。如盲目增加染料浓度, 不仅不会使荧光继续增强, 还会造成荧光猝灭, 这种现象称为浓度猝灭现象。

以上几种影响因素在流式细胞术定量分析生物细胞DNA荧光强度是较为重要的, 如在相同的仪器条件和同样的实验样品的情况下, 出现荧光分布不稳定, 就要追究其变异的原因,

(上接第441页)

的直接原因是高温破坏了膜结构的液晶态, 而引起膜表面物质脱落、移位和膜通透性改变, 这些继发性改变使癌细胞表面电荷下降而致电泳速度减慢。我们的实验亦显示HeLa细胞经 $44^\circ\text{C}$ , 30分钟处理后, 电泳速度减慢(减慢率46.4%)。

先药后热与先热后药的热增敏机制不同, 前者是由于药物使细胞膜发生一系列生理生化改变而致其热敏感性增强, 后者则与药物对热损伤的固定有关。对细胞生长曲线、细胞存活率、细胞死亡率和形态学变化等项指标观察结果业已表明, 先给药后加温的治疗序贯可达最高热杀伤效应<sup>[3]</sup>。本实验结果亦证实, BH组细胞电泳减慢率(79.2%)明显高于HB组(64.0%), 两组间有非常显著差异( $P < 0.01$ )。

细胞集落形成率结果可见, 先药后热序贯集落形成率最低, 先热后药序贯次之, 各实验组

应更多地考虑由于样品制备而引入的误差, 应特别注意各样品间的细胞数、固定剂以及固定时间等方面的影响, 以避免在检测中造成人为假象的测定值。本文结果表明, 新鲜不固定的细胞样品DNA荧光强度稳定, 其荧光发射强度、CV值均优于固定后的细胞。因此对于样品的保存采用不固定的保存方法(即低温保存细胞)作为流式细胞术的分析是理想的<sup>[8]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Ault, K. A. et al.: *Diagnostic Immunology*, 1983, 1, 2.
- [2] Shapiro, H. M. et al.: In *Parameters and Probes*, Alar R. Liss Inc. New York, 1985, 95.
- [3] Crissman, H. A. et al.: In *Flow Cytometry and Sorting*, McIameed MR, et al. eds., John & Wiley Sons, New York, 1979, 243—258.
- [4] Clevenger, C. V. et al.: *Cytometry*, 1985, 6, 208.
- [5] Schutte, B. et al.: *Cytometry*, 1985, 6, 26.
- [6] Darzynkiewicz Z. et al.: *Cytometry*, 1984, 5, 355.
- [7] Fossa, S. D. et al.: *Path. Res. Pract.*, 1986, 181, 200.
- [8] Vindelov, L. L. et al.: *Cytometry*, 1983, 3, 317.

[本文于1987年10月31日收到]

集落形成率与细胞电泳速度之间均呈良好的相关性, 提示在高温合并热增敏剂及其不同序贯效应中, 细胞膜表面电荷密度变化与热杀伤效应有关。

## 参 考 文 献

- [1] Antonius W. T. Konings: *Cancer Research*, 1985, 45, 2016.
- [2] Robins, H. I. et al.: *Cancer Research*, 1983, 43, 3187.
- [3] 阎新文等: 《中国肿瘤临床》, 1988, 15(5), 259.
- [4] 梁子钧等: 《生物化学与生物物理进展》, 1976, (1), 54.
- [5] 孙玲: 《生物化学与生物物理进展》, 1985, (1), 68.
- [6] 杨藻宸: 《医用药理学》, 第二版, 人民卫生出版社, 北京, 1986, 105页.
- [7] 郑正炯等: 《生物化学与生物物理进展》, 1986, (6), 27.

[本文于1987年9月16日收到]