

## 吐温 80 合并温热(39°-43°C)对 BGC-823 人胃癌细胞膜流动性及 EPM 的影响

杨虎川 杨耀琴 王永德 陶惠红  
(上海铁道医学院)

近年来已有不少有关温热和化学药物引起质膜结构与功能改变的报道,温热治疗肿瘤达到一定温度后可使细胞质膜发生相变<sup>[1]</sup>,导致细胞代谢紊乱,严重时可引起细胞死亡<sup>[2]</sup>。吐温 80 也可与细胞质膜结合,降低酶活化能和膜相变温度。本实验旨在用 DPH(1,6-二苯基 1,3,5-已三烯)荧光分子探针及细胞电泳(EPM)观察 BGC-823 细胞经吐温 80 合并温热作用后细胞膜物理特性的变化,以探讨其协同效果及机理。

### 材料与 方法

**一、细胞培养** 1. 肿瘤细胞 BGC-823 人胃癌细胞系(北京市人民医院建株);培养液用 85% RPMI 1640 + 15% 小牛血清,适量双抗, pH 7.0, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 温箱培养。2. 正常细胞:由于目前胃上皮细胞培养,增殖尚有困难,通常用人体二倍体细胞作为对照,本实验选正常人红细胞和人包皮成纤维细胞(7~9 代,本室建株)分别用于细胞膜流动性测定和 EPM 测定。培养液用 85% 1:1 Eagle: RPMI 1640 + 15% 小牛血清,其他条件同上。

以上各种细胞在接种培养至 24 小时进行分组实验。

**二、分组及实验方法** 两类细胞分组一致。

1. 细胞膜流动性测定 吐温 80 合并温热组(合并组):加吐温 80 溶液(上海大众制药厂产),最终浓度 0.1% (约 0.76 mmol/L),培养至 46 小时在高精度水浴箱中分别加温 39°C、41°C、43°C (±0.1°C),持续 20 分、60 分、100 分;加温组:加与吐温 80 等量的 Hanks 液,培养及加温方式同前;吐温组:加与合并组等量的吐温 80,置温箱中培养;Hanks 液组:加入与吐温 80 等体积的 Hanks 液,温箱培养。

以上各组分别在加温末和恢复常温后(即时组)随机取样测定,余下标本用 Hanks 液洗两次,换入新鲜培养液继续培养 48 小时进行测定(48 小时组),以观察其恢复情况。

**测定方法** 用细吸管将细胞从瓶壁上吹下,按照 Inbar 等<sup>[3]</sup>方法进行 DPH(sigma 产品)标记,荧光偏振度用日立 851 型荧光分光光度计测定,激发波长 362 nm,发射波长 432 nm,狭缝为 5 nm,测定温度除加温时组按相应温度测定外,其余均依 37°C 测定。按有关文献方法计算荧光偏振度 P 值和膜脂区微粘度  $\eta$ <sup>[4]</sup>。

2. EPM 测定 分组与上述实验相似。细胞从瓶壁上吹下后,用 Hanks 液(pH 7.2)制成细胞悬液,存放在 5% CO<sub>2</sub> 温箱内供细胞电泳测定。采用微量细胞电泳装置及测定方法。按公式计算出 FPM 值<sup>[5]</sup>。

### 结 果

#### 一、细胞膜流动性测定

肿瘤细胞经温热作用时,膜流动性较常温下有较大增加( $P < 0.01$ ),39°C 与 41°C 组作用相似,加温时间对膜流动性影响较小( $P > 0.05$ )。43°C 作用下膜流动性明显增加,并随加温时间延长而加强,以 100 分作用最显著,冷却后恢复亦慢(表 1)。正常人红细胞受温热作用后,膜流动性也有所增加,但较肿瘤细胞比例小,冷却后各温度组均明显恢复,48 小时各组均恢复正常。

吐温 80 使肿瘤细胞和正常红细胞膜流动性均明显增加,两者增加比例近似,但红细胞

本课题受国家自然科学基金 86030948 号、上海市科学技术发展基金项目 86-3430708 号资助。

表1 温热对BGC-823细胞膜流动性的影响( $\bar{X} \pm SD$ )

			39°C	41°C	43°C
20'	加热时	$\eta$	1.334±0.173	1.244±0.255	1.055±0.087
	冷却后	$\eta$	1.573±0.173	1.501±0.117	1.317±0.134
60'	加热时	$\eta$	1.241±0.117	1.194±0.187	0.817±0.107
	冷却后	$\eta$	1.413±0.259	1.321±0.141	1.177±0.172
100'	加热时	$\eta$	1.212±0.092	1.184±0.074	0.619±0.134
	冷却后	$\eta$	1.483±0.275	1.371±0.070	0.790±0.010
37°C $\eta = 1.661 \pm 0.121$					

表2 吐温80合并温热对BGC-823细胞膜流动性的影响( $\bar{X} \pm SD$ )

			39°C	41°C	43°C
20'	加热时	$\eta$	1.026±0.175	0.675±0.157	0.638±0.150
	冷却后	$\eta$	1.270±0.176	1.103±0.092	0.924±0.281
60'	加热时	$\eta$	0.920±0.194	0.621±0.067	0.458±0.046
	冷却后	$\eta$	1.224±0.042	1.086±0.157	0.704±0.080
100'	加热时	$\eta$	0.883±0.050	0.541±0.036	0.422±0.051
	冷却后	$\eta$	1.220±0.042	0.993±0.142	0.640±0.146
37°C吐温80 $\eta = 1.277 \pm 0.123$					

表3 吐温80合并温热对正常人红细胞膜流动性的影响( $\bar{X} \pm SD$ )

			39°C	41°C	43°C
20'	加热时	$\eta$	2.15±0.223	2.078±0.338	1.652±0.225
	冷却后	$\eta$	2.527±0.499	2.535±0.484	1.896±0.246
60'	加热时	$\eta$	2.07±0.477	1.654±0.434	1.357±0.369
	冷却后	$\eta$	2.389±0.637	2.482±0.493	1.797±0.493
100'	加热时	$\eta$	2.12±0.414	1.572±0.259	1.194±0.260
	冷却后	$\eta$	2.400±0.399	2.296±0.496	1.731±0.275
37°C合并吐温对照		$\eta$	2.192±0.287	37°C对照	$\eta$ 2.744±0.212

膜微粘度绝对值仍显著大于肿瘤细胞。去药后48小时,两种细胞膜流动性均可恢复到各自原来水平。

吐温80合并温热作用,各组膜流动性均较单独作用时明显增加,41°C各组增加最为显著,合并41°C,60分钟作用效果已达温热43°C 100分水平;41°C、43°C各组显示明显时间效应,41°C 100分和43°C各组恢复较其他组缓慢(表2)。去药后48小时均未能恢复到常温下肿瘤细胞膜流动性水平。43°C各组尤为突出。合并作用对正常人红细胞亦有促进膜流动性作用,但其值远低于肿瘤细胞组。去药后48小

时均可恢复(表3)。

## 二、EPM测定

常温下肿瘤细胞EPM明显高于正常细胞。

肿瘤细胞随作用温度升高、时间延长,即时EPM逐渐下降,43°C作用40分后急剧下降,与20分组有显著性差异( $P < 0.01$ ),加热后96小时,39°C、41°C 100分组恢复稍慢,43°C 60分及100分组恢复困难,其余组已接近正常( $P > 0.05$ )。正常细胞经加热后,即时各组EPM变化较小,处理后48小时已恢复到对照组水平(图1, 2)。

肿瘤细胞经吐温80作用24小时后可见

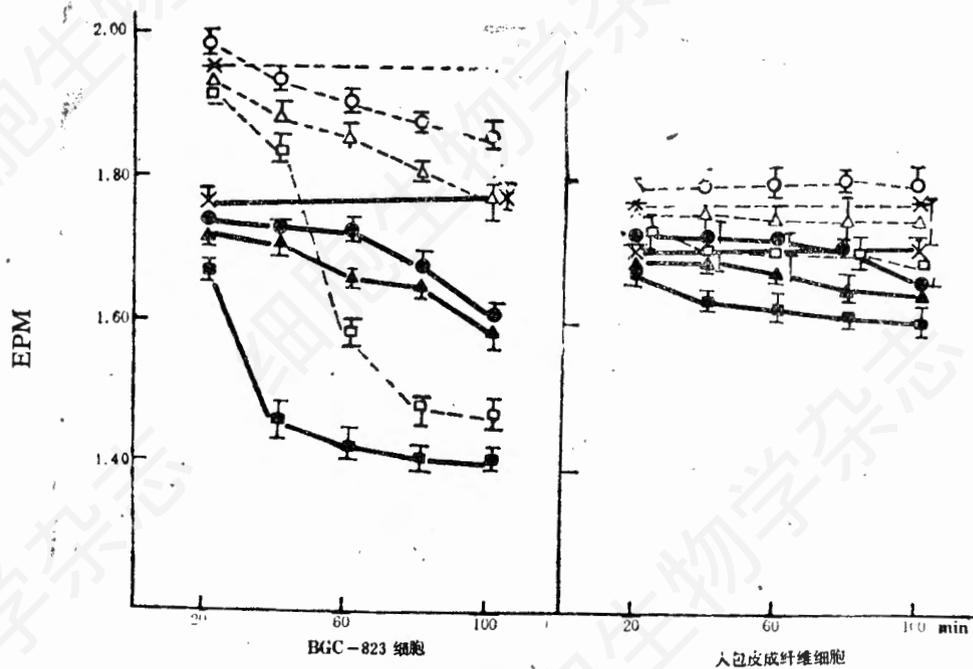


图 1 不同条件各即时组 EPM 的变化

\*...\* 37°C + Hanks 组    ○...○ 39°C 加温组    △...△ 41°C 加温组    □...□ 43°C 加温组  
 \*...\* 37°C + 吐温组    ●...● 39°C 合并组    ▲...▲ 41°C 合并组    ■...■ 43°C 合并组

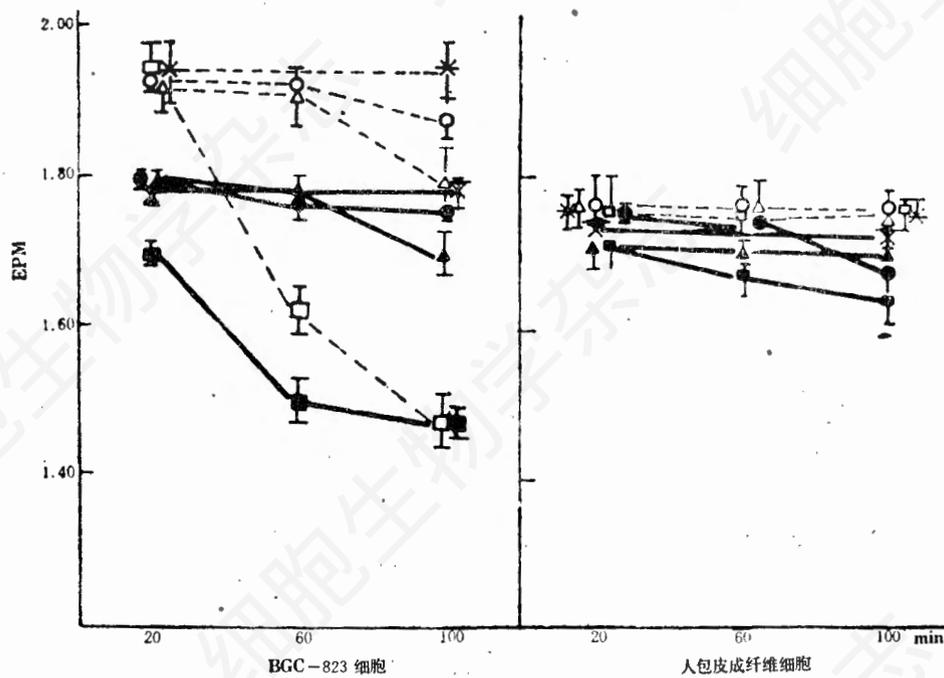


图 2 不同条件各 96 小时组 EPM 的变化

\*...\* 37°C + Hanks 组    ○...○ 39°C 加温组    △...△ 41°C 加温组    □...□ 43°C 加温组  
 \*...\* 37°C + 吐温 80 组    ●...● 39°C 合并组    ▲...▲ 41°C 合并组    ■...■ 43°C 合并组

EPM明显下降,接近正常细胞常温水平( $P>0.05$ )。96小时仍有持续效应,而正常细胞仅见即时有轻度EPM下降,96小时已恢复正常( $P>0.05$ ),

吐温80合并温热作用,肿瘤细胞即时各组EPM均明显较各相应加温组下降,合并41℃100分组EPM值与仅温热43℃60分作用相似( $P<0.05$ ),作用后96小时多数组EPM有一定恢复,但均未达到正常组或相应加温组水平( $P<0.01$ ),41℃100分恢复较慢,43℃各组则恢复困难(图1,2)。正常细胞合并作用后即时各组也稍低于相应加温组,但差别明显小于相应肿瘤细胞组,作用后96小时除43℃60分、100分两组恢复稍慢外,其余各组均接近正常。

## 讨 论

### 一、温热对肿瘤细胞膜流动性及EPM的影响

本实验显示肿瘤细胞膜流动性及EPM都明显高于正常细胞,这一结果和有关文献报道一致<sup>[6,7]</sup>。这可能与肿瘤细胞膜结构组成有关,肿瘤细胞膜中胆固醇含量较正常细胞低及卵磷脂比率较高等因素可致膜流动性高;肿瘤细胞普遍存在着的细胞表面糖蛋白和糖脂的唾液酸化则导致肿瘤细胞表面唾液酸增加,负电荷增多,而使EPM增高。有报道认为肿瘤细胞质膜的结构在常温下较正常细胞更趋向真液态,流动性较大,相变温度较正常细胞低,一般在43℃左右<sup>[8,9]</sup>;本实验结果表明,39℃、41℃对肿瘤细胞的作用相对较弱,冷却后也易恢复,当接近或超过43℃时,细胞膜流动性和EPM下降幅度均显著增加,与之相符。这与细胞膜发生相变有关。在相变温度以下,细胞可通过调节膜脂链的长度和饱和程度维持膜流动性等特性的相对稳定;当达到相变温度或以上时,细胞膜发生相变,使膜流动迅速增加,膜上附着的蛋白质、糖脂及唾液酸等结构松散、移位甚至脱落、故也难以恢复。

### 二、吐温80合并温热对肿瘤细胞和正常细胞的膜流动性及EPM的影响

吐温80为聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯,是一种安全、常用的非离子型亲水性表面活性剂<sup>[10]</sup>,含有多个烯键,当和脂膜结合后可使细胞膜流动性加强、相变温度降低、细胞膜通透性增加,并可增溶、抽提质膜上的蛋白和糖脂(包括唾液酸)等<sup>[11]</sup>。本实验显示吐温80可使细胞膜微粘度及EPM明显下降与之相吻合。吐温80与温热合并时具有明显的协同效果,合并41℃60分作用之细胞膜流动性已达43℃100分单独作用水平;统计处理显示41℃时两者协同效果最佳,超过了两者的加和作用,有相乘效应;EPM指标也显示有相似特点,推测这与吐温80降低了细胞质膜的相变温度有关,使合并作用在41℃时即可产生相变温度时的效应,降低了温热临界温度2℃。细胞膜流动度高达一定值后可致细胞死亡<sup>[12]</sup>,吐温80加强温热对质膜的影响可能是吐温80与温热合并提高温热对肿瘤抑制效应的重要因素。

正常细胞质膜结构为液晶态趋向晶态,相变温度较高、细胞膜流动性远低于肿瘤细胞,表面唾液酸等负电荷基团较少。由于相同条件下的胃上皮细胞培养、增殖尚难以进行,通常多采用人体正常二倍体细胞为对照,红细胞是测量膜流动性的最常用细胞,因此我们在实验中选择了成纤维细胞和正常人新鲜红细胞为对照,实验表明细胞膜流动性及EPM受到的影响较小,抵御温热和吐温80作用的能力较强。

## 摘 要

BGC-823人胃癌细胞经吐温80合并温热(39℃—43℃)处理后,用DPH作荧光分子探针观察细胞膜流动性的变化,并通过测定细胞电泳率(EPM)观察细胞膜表面电荷的改变,正常人红细胞及包皮成纤维细胞作为正常细胞对照。实验结果表明:常温下肿瘤细胞膜流动性及EPM明显高于正常细胞,吐温80和温热对肿瘤细胞及正常细胞均有促进膜流动性及降低

细胞电泳率作用。吐温 80 合并温热时这种作用显著增加, 合并作用 41°C60 分左右的效应已达到温热 43°C100 分作用水平, 有明显时间效应。冷却后各组有不同程度恢复, 但合并作用 41°C100 分以上各组恢复较慢。正常细胞对温热和吐温 80 作用的反应明显低于肿瘤细胞。

### 参 考 文 献

- [1] 郑正炯等, 1986, 生物化学与生物物理进展, 6:27—29。  
 [2] 小野山靖人ら, 1985, 医学のあゆめ, 135: 860—864。  
 [3] Inbar M. et al., 1977, *Europ. J. Cancer.*, 13:1231—1235。

- [4] 林克椿等, 1981, 生物化学与生物物理进展, 6:32—35。  
 [5] 梁子钧等, 1979, 生物化学与生物物理进展, 11:199。  
 [6] Haeffner, EH. et al., 1984, *Cancer Res.*, 44:2668—2776。  
 [7] Van Beek, W. P. et al., 1973, *Cancer Research*, 33:2913。  
 [8] Sato, C et al., 1981, *Cancer Res.*, 41: 4107—4112。  
 [9] Storm, FK. et al., 1979, *Cancer Res.*, 39:2254 (partII)。  
 [10] USP XVpp. 558, 1960, USP XX + NF XV pp. 1249, 1980。  
 [11] Tsuge, H et al., 1980, *Biochem. Biophys. Acta.*, 614:274。  
 [12] Yatvin, MB. et al, 1977, *Int. J. Radiat.*, 32:513—521。

## 人肺腺癌细胞 PI-PLC 活性的变化和转移表型的关系

彭愈生 马玉彦 任丽君 史 历

(哈尔滨医科大学肿瘤研究所)

癌细胞的转移是造成患者死亡的主要原因。只有找到转移赖以产生的细胞生物学基础, 才能在阻断转移上开辟新的有效途径。因此, 对转移生物学特性的研究已成为肿瘤细胞生物学领域内的重要课题之一。

转移是转移性癌细胞从原发灶分离、侵袭、破坏宿主屏障, 移向体内另一部位, 建立转移灶的过程。无论是分离还是侵袭均依赖于分解酶的作用。因此, 转移性癌细胞的许多分解酶活性明显高于无/低转移性癌细胞。如组织蛋白酶 B (Cathepsin B) 高转移性癌细胞 (B 16 F 10) 比无/低转移性癌细胞 (B 16 F 1) 高 3—4 倍<sup>[1]</sup>, Bosmann 发现前者  $\beta$ -半乳糖苷酶、乙酰氨基半乳糖苷酶、岩藻糖苷酶活性明显高于无/低转移性癌细胞<sup>[2]</sup>。一些酶分泌至细胞外, 破坏周围基质及其他屏障, 活化宿主与转移有关的某些因子, 促进转移。

磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (phosphatidylinositol specific phospholipase C, PI-PLC) 是一种分解酶, 具有多种功能, 它不仅可以破坏膜性屏障, 促进膜结合蛋白质(或酶)的释放, 还与癌的发生、发展以及信息传递密切相关<sup>[3,4]</sup>。但至今未见有关转移性癌细胞 PI-PLC 的报道。我们已经证实转移表型不同的肺腺癌细胞存在不同的肌醇磷脂代谢池 (PI-pool), PI-PLC 是其中的关键酶。本文于不同条件下, 测定不同转移表型肺腺癌细胞 PI-PLC 活性, 并对其与转移的关系进行初步探讨。

### 材 料 和 方 法

#### 一、材料

磷脂酰肌醇等为标准品, 苯甲基磺酰氟化物 (PMSF) (Sigma 公司), RPMI 1640 培养液 (GIBCO)、透析袋 (Serva 公司)、<sup>[3H]</sup>肌醇 (New England Nuclear), Hepes 缓冲液 (Sigma 公司), <sup>[32P]</sup>磷酸 (无载