

## 电击穿对 K 562、NS-1 和小鼠脾脏细胞存活率的影响

胡 汛 陈万源

余 海 郁琳琳 郭一书

(浙江医科大学肿瘤研究所 杭州 310009) (中国医学科学院浙江分院)

电融合是细胞融合技术之一。运用高频交变电场使细胞紧密接触,再加直流脉冲使细胞膜发生瞬间可逆性电击穿即可使相邻细胞融合。此技术比之聚乙二醇(PEG)融合法虽有融合率高,融合条件易控制等优点,然而至今尚未被广泛应用,其原因之一是对此法缺乏明确的生物学评价。

根据 Zimmermann 的电击穿模型<sup>[1]</sup>,当细胞膜所受到的电压为 1 伏时,细胞膜即可出现可逆性电击穿,此电压被称之为临界击穿电压,大于此电压时细胞膜可出现不可逆的电击穿。

临界击穿电压与细胞直径有关,细胞直径越大,细胞膜击穿所需外加电场越小,反之亦然。

电融合时,击穿电压的选择和决定对于提高细胞的融合率,保证融合后细胞的活性是至关重要的。为验证 Zimmermann 理论的适用性,为正确选择适宜的击穿电压提供实验数据,本研究选用 3 种直径不等的细胞做电击穿试验,然后用 MTT 法和 <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入法测定各种细胞对电击穿的耐受性。现将结果报道如下。

## 材 料 和 方 法

**细胞** 人红白血病细胞株 K 562,小鼠骨髓瘤细胞株 NS-1, Balb/C 小鼠脾脏单细胞悬液<sup>[2]</sup>。

**试剂** <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷,比度 22 Ci/mmol(中科院上海原子核研究所)。脂多糖 LPS(Sigma),溴化四氮甲基唑蓝 MTT(为 Serva 公司产品)。

**电融合仪** XR-1 型电致细胞融合仪,由浙医大临床医学工程系设计,技术指标详见参考文献<sup>[3]</sup>。

**电击穿试验** 50 $\mu$ l 含  $1 \times 10^6$  细胞,介质为 0.3mol/L

甘露醇,置于电融合小室,给交流电场(200 V/cm, 1 MHz),1 分钟后给一单个直流脉冲,脉幅范围 2000—6000 V/cm,脉宽范围 10—90  $\mu$ s。电击穿在室温(25 $^{\circ}$ C)下操作。

**MTT 试验**<sup>[4]</sup> 电击穿后, K 562 或 NS-1 细胞移入 96 孔板,每孔  $5 \times 10^4$  细胞。培养 12 小时后,加入 MTT(1 mg/ml)50  $\mu$ l/孔,继续培养 12 小时后,活细胞内具有活性的琥珀酸脱氢酶使黄色的 MTT 还原成为蓝色的甲臜结晶颗粒。移去液体,加入酸化异丙醇 100  $\mu$ l,振荡 10 分钟,待蓝色结晶完全溶解后,在自动酶标仪上 570 nm 处读 OD 值。每一标本做 4 个复孔。

<sup>3</sup>H 胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-Tdr)掺入试验<sup>[5]</sup>:小鼠脾脏单细胞悬液经电击穿后移入 96 孔板,  $5 \times 10^5$ /孔,加入 LPS 至 20  $\mu$ g/ml。培养 48 小时后加入 <sup>3</sup>H-Tdr,加入量为 1  $\mu$  Ci/ $1 \times 10^6$  细胞,掺入 12 小时后收集细胞,液闪计数 cpm 值。每一标本做 3 个复管,取 cpm 值平均数。

脉宽、脉幅与细胞生存率的相关性试验用 Fig-P 软件(美国 Fig-P 软件公司)在 IBM-PC 微机机上处理。

## 结 果

## 1. 电击穿对 K 562 细胞存活率的影响

图 1 所示,当脉幅为 2—6 kV/cm,脉宽为 10—90  $\mu$ s 时, K 562 细胞的存活率均在 80% 左右波动,与脉幅或脉宽均无显著的相关性(表 1, 表 2)。

## 2. 电击穿对 NS-1 细胞存活率的影响

图 2 所示,固定脉宽,改变脉幅,细胞存活率与脉幅呈负相关,并具显著性(表 1)。固定脉幅,改变脉宽,发现脉幅为 2 kV/cm 时,脉宽变化对细胞生存率无显著影响;当脉幅为 3—5 kV/cm 时,细胞生存率与脉宽呈显著性负相关。再增加脉幅,细胞生存率均在 20%

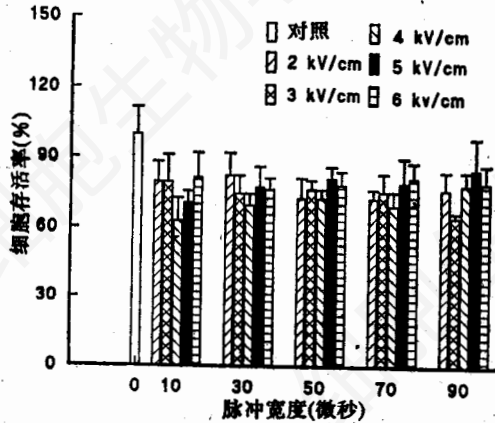


图 1 K 562 细胞存活率与脉幅和脉宽的关系

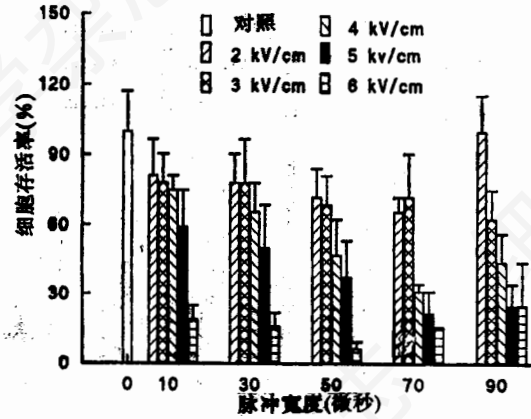


图 2 NS-1 细胞存活率与脉幅和脉宽的关系

表 1 脉幅与 NS-1、K 562 及小鼠脾细胞生存率、<sup>3</sup>H-Tdr 掺入的相关性检验

	脉宽(μs)	n	相关系数(r)	t 值	P
NS-1	10	5	-0.90	-4.06	<0.05
	30	5	-0.94	-5.42	<0.01
	50	5	-0.98	-8.89	<0.01
	70	5	-0.96	-5.61	<0.01
	90	5	-0.94	-5.60	<0.01
K 562	10	5	-0.66	-1.76	>0.05
	30	5	-0.77	-2.44	>0.05
	50	5	-0.56	-1.36	>0.05
	70	5	-0.56	-1.33	>0.05
	90	5	-0.40	-0.88	>0.05
鼠脾细胞	10	5	-0.98	-8.16	<0.01
	30	5	-0.86	-2.88	<0.05
	50	5	-0.96	-6.60	<0.01
	70	5	-0.96	-6.69	<0.01
	90	5	-0.97	-7.75	<0.01

表 2 脉宽与 NS-1、K 562 及小鼠脾细胞生存率、<sup>3</sup>H-Tdr 掺入的相关性检验

	脉幅(kV/cm)	n	相关系数(r)	t 值	P
NS-1	2	5	-0.14	-0.29	>0.05
	3	5	-0.85	-3.27	<0.05
	4	5	-0.90	-4.11	<0.05
	5	5	-0.89	-3.97	<0.05
	6	5	-0.53	-1.27	>0.05
	K 562	2	5	-0.72	-2.06
3		5	-0.82	-2.74	>0.05
4		5	-0.26	-0.55	>0.05
5		5	-0.15	-0.29	>0.05
6		5	-0.55	-1.34	>0.05
鼠脾细胞		2	5	-0.99	-9.99
	3	5	-0.76	-2.39	>0.05
	4	5	-0.63	-1.62	>0.05
	5	5	-0.51	-1.18	>0.05
	6	5	-0.67	-1.80	>0.05

左右摆动，与脉宽变化无显著相关性(表 2)。

### 3. 电击穿对小鼠脾细胞的影响

图 3 所示，当脉幅为 2 kV/cm 时，增加脉宽，<sup>3</sup>H-Tdr 掺入随之减少。增加脉幅至 4 kV/cm 以上时，<sup>3</sup>H-Tdr 掺入均降至对照的 40% 以下，改变脉宽对其无显著影响(表 2)。固定脉宽，改变脉幅，发现小鼠脾脏细胞 <sup>3</sup>H-Tdr 掺入与脉幅呈显著性负相关(表 1)。

### 讨 论

K 562 细胞与 NS-1 细胞大小相似，按理

论计算<sup>[1]</sup>，其临界击穿电压应一致。然而本实验结果显示 NS-1 细胞对电击穿的耐受性远小于 K 562 细胞，如当脉幅为 4 kV/cm，脉宽为 70 μs 时，NS-1 细胞的存活率仅为对照的 31%，而 K 562 细胞在同样条件下生存率与对照相比无显著变化，即使给一 6 kV/cm，90 μs 的电脉冲，K 562 细胞的生存率仍为对照的 85%。这说明两种细胞即使大小相等，对膜的不可逆电击穿的耐受性仍可有很大的差异。

用电融合法制备杂交瘤细胞时，由于骨髓

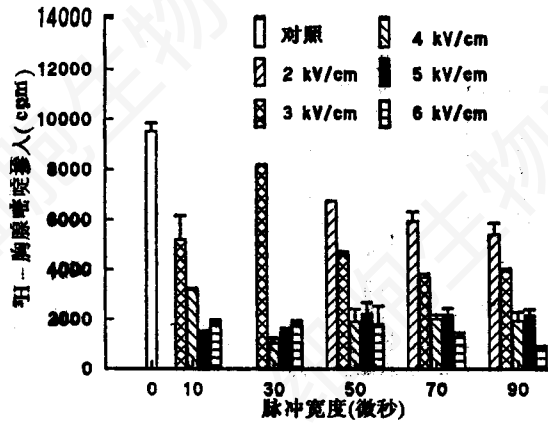


图3 BALB/C小鼠脾淋巴细胞<sup>3</sup>H-Tdr掺入与脉幅和脉宽的关系

瘤细胞的直径为淋巴细胞的一倍,按电击穿理论,使B淋巴细胞发生可逆性电击穿的电压已可造成骨髓瘤细胞的不可逆击穿<sup>[1]</sup>。我们的实验结果指出,在脉幅为2 kV/cm,脉宽为50 μs时,LPS诱导的B淋巴细胞转化已明显受抑制,而NS-1细胞生存率显著下降始于4 kV/cm,70 μs。这说明B淋巴细胞对电击穿的耐受性小于NS-1细胞。

虽然细胞膜的电击穿不仅仅与细胞直径有关,还与环境因素<sup>[6-8]</sup>如温度有关,例如在4℃为2V,20℃为1V,30-40℃时为0.5V。各实验室对细胞膜的击穿电压报道也并不一致<sup>[9,10]</sup>。但若环境条件恒定,从理论上推算细胞膜的击穿电压主要与细胞直径有关,但本实验结果并不符合此规律。临界击穿电压虽与细胞直径有关,也与膜电容有关。膜电容越小,临界击穿电压越小。我们过去的研究指出<sup>[12]</sup>,小鼠淋巴细胞的膜电容为0.8 μF/cm<sup>2</sup>左右,而SP-2、NS-1、G8等小鼠骨髓瘤细胞的膜电容为1.2 μF/cm<sup>2</sup>左右。Zimmermann的理论计算假设活细胞膜的电学性质与人工膜一致,但实际上同一种细胞在不同状态下膜的电学性质可有很大差异<sup>[11,12]</sup>,如淋巴细胞在激活前后,其膜电容和膜电导可至少相差二倍。此外,各种细胞膜的化学组成如脂类,膜蛋白的结构与特性以及膜骨架蛋白的结构等,细胞质的电导

都可有差异,而这些因素都可直接影响细胞膜对电击穿的耐受性。

### 摘 要

用一系列电融合参数(脉幅2-6 kV/cm,脉宽10-90 μs)处理K 562、NS-1及小鼠脾脏细胞。结果说明,在以上电脉冲范围内,K 562细胞的存活率不发生显著变化,其存活率均在80%左右波动。线性回归分析表明,其存活率与脉幅或脉宽变化均无显著相关性。NS-1细胞经脉幅为4 kV/cm,脉宽为70 μs的电脉冲处理,细胞存活率显著下降,仅为对照细胞的31%,并且细胞存活率与脉幅呈显著性负相关。小鼠脾脏细胞则在脉宽为50 μs,脉幅为2 kV/cm的电脉冲处理后,LPS诱导的B淋巴细胞<sup>3</sup>H-Tdr掺入明显受到抑制,并且<sup>3</sup>H-Tdr掺入与脉幅呈显著性负相关。3种细胞对电击穿的耐受性依次是K 562细胞>NS-1细胞>小鼠脾脏B淋巴细胞。根据Zimmermann的理论推导,细胞膜电击穿主要与细胞直径有关,细胞直径越大,细胞膜击穿电压所需外加电场越小,反之亦然。然而本实验结果并不符合此规律。本文探讨了影响细胞膜电击穿的其他因素。

### 参 考 文 献

- [1] Zimmermann, U., 1986, *Rev. Physiol. Biochem. pharmacol.*, 105: 175.
- [2] Parish, C. R., 1974, *Eur. J. Immunol.*, 4: 808.
- [3] 郭一书等, 1989, *浙江医科大学学报*, 18: 158.
- [4] Carmichael, J., et al., 1987, *Cancer Res.*, 47: 936.
- [5] Sondak, V. K., et al., 1984, *Cancer Res.*, 44: 1725.
- [6] Benz, R., et al., 1979, *J. Membrane Biol.*, 48: 181.
- [7] Coster, H. G. L., et al., 1975, *J. Membrane Biol.*, 22: 73.
- [8] Pilwat, G., et al., 1975, *Biochim. Biophys. Acta.*, 406: 424.
- [9] Crowley, J. M., et al., 1973, *Biophys. J.*, 13: 711.

(下转 126 页)