

in vitro studies. The effect of heat on Raw264.7 cells was detected by flow cytometric analysis and DNA electrophoresis. The data show that heat can induce Raw264.7 cells apoptosis and effectively down-regulate the expression of bcl-2 gene and up-regulate bax gene. It was suggested that apoptosis is an important cell death pathway taken by the heat-injured Raw264.7 cells in vitro, the decrease of Bcl-2/Bax ratio may be one of the molecular mechanisms of heat-induced cell death.

Key words: Heat Apoptosis Gene expression

## 吐温 80 对体外 HeLa 细胞的杀伤抑制\*

朴文姬 杨虎川 杨耀琴 陶惠红 陈斌

(上海铁道大学医学院肿瘤细胞研究室 上海 200070)

吐温 80 作为一种表面活性剂,是一种安全、低毒的细胞质膜作用药物,对正常细胞组织无明显毒性<sup>[1]</sup>,并可作为助溶剂用于临床治疗。本室已在细胞、动物实验中证实其为良好的温热治疗肿瘤协同药物,即为温热增敏剂<sup>[2]</sup>。有报道吐温 80 有轻度肿瘤细胞抑制作用<sup>[1]</sup>,但由于不同肿瘤细胞株对药物敏感度都不尽相同,本实验研究了不同浓度吐温 80 对 HeLa 细胞株(人宫颈癌细胞株)的抑制作用,并通过检测 HeLa 细胞 HSP70——肿瘤细胞增生、生长所必需的保护性蛋白<sup>[3]</sup>,进一步探讨吐温 80 对 HeLa 细胞抑制性杀伤机制,同时研究 LPS、PGE1 及其与吐温 80 协同对 HeLa 细胞 HSP70 表达影响。

### 材料和方法

#### 一、材料

吐温 80(上海大众制药厂,批号 84001);HeLa 细胞(人宫颈癌细胞株,日本札幌医科大学病理研究室赠);标准 HSP70(Sigma. Co.);兔抗人 HSP70 多克隆抗体(日本札幌医科大学病理研究室赠);碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 抗体(华美公司);LPS(E.coli. 026:B6, Sigma. Co.);PGE1(长春白求恩医科大学制药厂,批号 95001);MTT(Thiazocyl blue, Sigma. Co.)

#### 二、方法

1. 细胞抑制实验(MTT 法)<sup>[4]</sup> HeLa 细胞以含 10%FCS RPMI1640 培养液常规培养(含 25mmol/L HEPES; 16mmol/L 葡萄糖; 100U/ml 青霉素,

100μg/ml 链霉素),以 0.25%胰酶消化制成细胞悬液(2.5×10<sup>5</sup>/ml),均匀铺入 96 孔细胞培养板:100μl/孔,第一列孔加生理盐水作对照,余列孔加不同浓度吐温 80(0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.04%)、LPS(终浓度:0.1μg/ml)及 PGE1(终浓度:10mg/ml),继续置 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱温育 24 小时,加 25μl/孔 MTT(5mg/ml in PBS)37℃2 小时,500×g 离心 10 分钟,去上清液,加 100μl/孔溶解缓冲液(SDS 溶于 50%DMF:20% W/V, pH: 4.7),37℃1 小时,于微孔读数仪(516MC 型,上海三分厂)下以 570nm 读取 OD 值。细胞抑制率按以下公式表示:抑制率(%)=[1-样品 OD 值/对照 OD 值]×100%<sup>[5]</sup>。

2. 细胞裂解液制备 HeLa 细胞同前制成悬液(1×10<sup>6</sup>/ml)均匀铺入 24 孔细胞培养板:1ml/孔,培养 48 小时后加入不同浓度吐温 80、LPS 及 PGE1(加法同上),继续置 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱温育 24 小时,细胞经冷 PBS 冲洗三次(死亡脱落细胞需离心取细胞),加 0.5% NP-40 裂解液(50mmol/L Tris. HCl pH6.8、15mmol/L NaCl、5mmol/L EDTA、0.5% NP-40、1mmol/L PMSF, 临用配制),冰浴 20 分钟,将裂解液及刮下的细胞残渣移入离心管, 12000rpm 离心 5 分钟,取上清液-20℃贮存备用。

3. SDS-PAGE 蛋白电泳及 Western-blotting 蛋白鉴定<sup>[6]</sup> 将上述细胞裂解液及标准 HSP70 以加样缓冲液 2:3 稀释后等量加样在 7%的聚丙烯酰胺凝胶中垂直电泳(夹心式电泳槽),凝胶以 0.2%考马斯亮蓝 R250 染色显示外,另一相同加样凝胶继续转膜,以半

\*国家自然科学基金和上海市科技发展基金资助课题(编号 39176825, BB03801)。

干转膜电泳槽(TE70, Hoefer)在含甲醇的转膜电泳液(50mmol/L Tris·HCl, pH 8.3; 40mmol/L 甘氨酸)中将凝胶蛋白转至硝酸纤维素薄膜, 经脱脂蛋白非特异性阻断, 以抗 HSP70 多克隆抗体(1:100)37℃温育 2 小时, 0.1% Tween-20PBS 洗涤 3 次, 碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG(1:200)37℃45 分钟, 以底物 NBT/BCIP(50mg/ml, 2:1)显色, 15-30 分钟后中止显色, 结果

拍照。

## 结 果

### 1. 吐温 80、LPS 及 PGE1 对 HeLa 细胞的抑制作用(表 1.)

表 1 吐温 80、LPS 及 PGE1 对 HeLa 细胞的抑制作用

组 别	OD 值	抑制率(%)
对照(正常 HeLa 细胞)	0.80±0.01	
吐温 80(0.005%)	0.74±0.11	7.50
吐温 80(0.01%)	0.71±0.17	11.25
吐温 80(0.02%)	0.35±0.05	56.25
吐温 80(0.04%)	0.27±0.03	66.25
吐温 80(0.02%)+LPS(0.1μg/ml)	0.43±0.05	46.25
吐温 80(0.02%)+PGE1(10mg/ml)	0.41±0.11	48.75
LPS(0.1μg/ml)	0.78±0.13	2.50
PGE1(10mg/ml)	0.79±0.17	1.25

0.02%吐温 80 即对 HeLa 细胞有明显杀伤抑制(抑制率为 56.25%), 且光镜下显示大量死亡悬浮细胞, 0.1%吐温 80 使 HeLa 细胞大部分死亡崩解(资料未显示); 而<0.01%吐温 80 对 HeLa 细胞无显著抑制作用。LPS 及 PGE1 对 HeLa 细胞无显著影响, 且与吐温 80 亦无明显协同抑制癌细胞作用。

### 2. 吐温 80、LPS 及 PGE1 对 HeLa 细胞 HSP70 表达的影响

浓度>0.02%吐温 80 即可明显抑制甚至无 HSP70 表达(图 1B), 且随浓度增加, 细胞内 70kDa 蛋白堆积物亦有增多(伴有大量细胞悬浮死亡), 同时其 HSP70 蛋白表达逐渐减少以致消失(图 1A)。

LPS 和 PGE1 对 HSP70 表达无明显影响, 且与吐温 80 无协同抑制或促进 HSP70 表达作用(图 2B), 但 LPS 与吐温 80 协同作用较单独吐温 80 处理细胞后细胞内 70KD 蛋白表达有所增加(图 2A)。

## 讨 论

吐温 80 是聚乙烯脱水山梨醇酐单油酸酯,

为含有烯键的多聚不饱和脂肪酸, 其作为一种表面活性剂, 能增加细胞膜流动性, 可使细胞膜

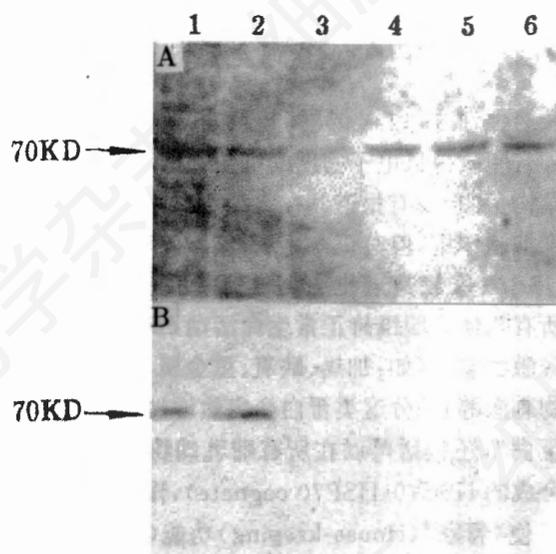


图 1 不同浓度吐温 80 对 HeLa 细胞 HSP70 表达影响

A. 考马斯亮蓝 R250 染色 SDS-PAGE 凝胶; 1. HeLa 细胞正常对照。2、3、4、5、6. 吐温 80 分别以浓度 0.01%、0.02%、0.04%、0.08%、0.1% 处理 HeLa 细胞 24 小时后细胞裂解液。B. Western-blotting 免疫沉淀薄膜图象; 各条带对应 A。

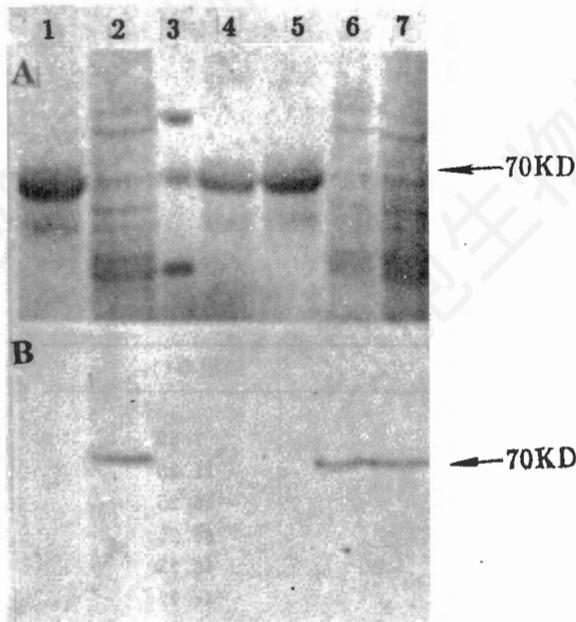


图2 吐温80、LPS、PGE1对HeLa细胞HSP70表达影响

A. 考马斯亮蓝R250染色SDS-PAGE凝胶: 1. LPS: 0.1 $\mu$ g/ml + Tween-80: 0.02%。2. PGE1: 10mg/ml。3. 标准分子量蛋白。4. Tween-80: 0.02%。5. PGE1: 10mg/ml + Tween-80: 0.02%。6. LPS: 0.1 $\mu$ g/ml。7. HeLa细胞正常对照。B. Western-blotting免疫沉淀薄膜图象: 各条带对应A。

通透性增加,如0.005%吐温80可使细胞膨胀,伴有胞质内低电子密度的沉积物堆积,胞膜外侧结构扭曲<sup>[7]</sup>。有报道其在常温下对肿瘤细胞有轻度抑制作用,但对正常组织、细胞无明显毒性<sup>[1]</sup>。HSP70家族是进化上高度保守的一组蛋白,是所有机体细胞维持正常生命活动不可缺少的,在应激状态下(如:加热、缺氧、重金属、氨基酸类似物刺激等)部分这类蛋白会突然增加,又称“应激蛋白”,还包括可以在所有哺乳动物细胞内持续合成的HSC70(HSP70 cognate),作为分子伴侣行使“看家”(House-keeping)功能(确保蛋白质正确折叠、组装及解离、降解错叠多肽等)<sup>[8]</sup>。HSP70蛋白是肿瘤细胞在正常情况下进行增殖和生存所必需,且通过抑制其表达可诱发肿瘤细胞编程死亡并抑制肿瘤增殖<sup>[3]</sup>。亦有人认为HSP70作为一种肿瘤转化抗原参与抗肿瘤免疫<sup>[9]</sup>。本实验结果显示,吐温80对HeLa细胞有

显著杀伤作用同时明显抑制HSP70蛋白表达,而同样浓度吐温80对正常细胞如人肺成纤维细胞及胃癌细胞株BGC-823无甚影响<sup>[2]</sup>。尤其吐温80导致靶细胞内某种单一70kDa的蛋白堆积的应激现象是否与作为分子伴侣的HSPs不足以处理细胞内变性蛋白有关,或是否与某些因子参与的翻译前机制有关则皆有待深入研究。有人以LPS(0.1 $\mu$ g/ml)在体外诱导单核细胞,发现有持续表达的HSC70升高,而应激性诱导形式的HSP70的表达没有改变。本实验用同样浓度的LPS虽对HeLa细胞HSP70表达无影响,但有一定程度促进吐温80对70kDa蛋白堆积作用。以上表明,吐温80对HeLa细胞HSP70表达抑制是其对HeLa细胞的杀伤机制之一,当然不排除其他蛋白因子的参与调节,尤其在体内环境。另外HSP70据认为与热耐受性产生有关<sup>[10]</sup>,吐温80通过抑制由热诱导产生的HSP70表达更有效地促进温热杀伤肿瘤细胞,亦为温热治疗肿瘤中良好的协同合并作用药物。

## 摘要

研究吐温80对体外培养HeLa细胞的杀伤抑制。通过MTT法检测并观察了不同浓度吐温80、大肠杆菌内毒素(LPS)及前列腺素E1(PGE1)对体外培养HeLa细胞作用后细胞抑制率;将作用后细胞裂解液经SDS-PAGE及Western-blotting法测定其热休克蛋白70(Heat Shock Protein70, HSP70)表达。结果:0.02%吐温80具有明显杀伤HeLa细胞的作用,且作用后的HeLa细胞几乎无HSP70蛋白表达(正常HeLa细胞有一定量HSP70蛋白表达),但却有一种分子量为70kDa的蛋白高表达,表明吐温80显著抑制HSP70表达,以至HeLa细胞死亡,同时促使某一种蛋白大量堆积。大肠杆菌内毒素、前列腺素E1对HeLa细胞无明显抑制杀伤作用,且与吐温80无明显协同效应,同时亦对HeLa细胞HSP70表达无显著影响。推测:吐温80对HeLa细胞HSP70表达的显著抑制作用可能是其杀伤HeLa细胞的

作用机制之一,为理想的温热治疗肿瘤的协同合并作用药物,但其使细胞内大量某 70kDa 蛋白堆积现象有待进一步探讨。

关键词:吐温 80 HeLa 细胞 HSP70  
Western-blotting LPS PGE1

### 参 考 文 献

- [1] 宓容钦,1981,生物化学与生物物理学报,13:245.
- [2] 杨虎川等,1992,中华肿瘤杂志,14:179.
- [3] Wei-YQ. et al.,1995,*Cancer Immunol. Immunother.*,40:73.
- [4] Carmichael,J. et al.,1987,*Cancer Res.*,47:936.
- [5] Malek TR. et al.,1983,*Proc Natl Acad Sci UL. S. A.*,80:5694.
- [6] Davis LG. et al.,1994,*Basic Method in Molecular Biolog.*,P680-690.
- [7] Naik SP., Samsonoff WA. and Ruck RE. 1988,*Diagn-Microbiol-Infect-Dis.*,11:11-9.
- [8] Kaufmann S. H. E.,1990,*Immunol. Today*,11:29.
- [9] Tamura Y. et al.,1993,*Journal of Immunology*,151:5516.
- [10] Ohtsuka K. and Laszlo A.,1992,*Exp. Cell Res.*,202:507.

## THE INHIBITIVE EFFECTS OF TWEEN80 ON THE HELA CELL LINE IN VITRO

PIAO Wen Ji YANG Hu Chuan YANG Yao Qin TAO Hui Hong CHEN Bin  
(Tumor Cell Lab., Medical College, Shanghai Tiedao University, Shanghai 200070)

### ABSTRACT

The inhibitive effects of Tween80 on the HeLa cell line in vitro were studied. The inhibition rates of the Tween80 in different concentrations, Lipopolysaccharide (LPS) and ProstaglandinE1 (PGE1) to the cultured HeLa cells were observed through the MTT cytobiological method and the Heat Shock Protein70 (HSP70) expression of the treated cell lysates was detected with the methods of SDS-PAGE and Western-blotting. The HeLa cells were killed by 0.02% Tween80 significantly, which had almost no expression of HSP70, while the HeLa cells in ordinary condition has a constitutive level of HSP70 expression, moreover, a certain unknown 70kD protein was accumulated in the Tween80-treated HeLa cells, implicating that the inhibitive effects of Tween80 to HSP70 expression cause the death of HeLa cells, with a kind of 70kD protein accumulating; LPS and PGE1 had no inhibitive or cytotoxic effects to the HeLa cells which had no changes of HSP70 expression and even no synergistic effects with Tween80. The significant inhibitive effects of Tween80 to the HSP70 expression may be the one of the cytotoxic mechanisms of Tween80 on the HeLa cell line. In combination with the other therapeutic method, especially the hyperthermia, Tween80 may play an important role in clinical anti-tumor therapy. But the phenomena of the accumulation of the 70kD protein in HeLa cell requires further investigation.

KEY WORDS: Tween80 HeLa cell HSP70 Western-blotting LPS PGE1

## mdr-1 和 bcl-2 基因在 K562/ADM 多药耐药细胞中的共表达\*

卢步峰\*\* 朱正美 于丽敏 王淑婷 杨佩满

(大连医科大学辽宁省细胞分子生物学重点实验室 大连 116027)

肿瘤细胞对化疗药产生多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是临床肿瘤化疗失败的主要原因之一。已确认 mdr-1 基因及其编码

\*国家自然科学基金资助项目 No. 39170853.

\*\*现在中科院上海细胞所。