

用细胞电泳技术检测化疗药物电性^①

梁基选 陈宝璇 李庆阁 赵一兵
(抗癌研究中心) (化学系)

摘要 细胞电泳技术可用于研究氟尿嘧啶(5FU), 甲氨喋呤(MTX)和环磷酰胺(CP)等药物的电性. 用戊二醛化绵羊红细胞(SRBC)为载体, 分别吸附 3 种化疗药物, 均可以导致细胞表面电荷下降致使电泳缓慢率为: 5FU 14.55%, MTX 13.77%, CP 12.21%. 这 3 种药物均带正电荷. 此研究对电化学疗法结合化疗治疗恶性肿瘤有参考价值.

关键词 细胞电泳, 电荷, 化疗药物

应用细胞电泳测定细胞表面电荷性质的方法, 可在显微镜下直接观察细胞在液相介质中的泳动, 通过测定细胞的泳动速度, 对各种药物、代谢产物、抗原、病毒引起的变化进行定量分析. 癌细胞比同类正常组织细胞电泳率高, Ambrose 等用大鼠肝癌细胞为材料, 观察到癌细胞恶性程度愈高其电泳率亦高, 癌细胞恶性程度与表面负电荷之间存在平行关系^[1].

研究抗癌药物的电性, 对于肿瘤的临床治疗及基础理论有重要价值. 一种新的电化治疗肿瘤方法是在通电治疗的同时加入化疗药物, 应用此法必须了解药物的电性及电荷与细胞结合的变化. 因此, 本文作者设计一项实验方法, 用戊二醛处理绵羊红细胞作为载体, 检测化疗药物的电性.

1 材料与方法

稀释与洗涤液: 均用 0.01 mol/l 磷酸盐缓冲液(pH=7.4, 双蒸水配制).

样品制备: a) 红细胞取自健康雄性绵羊, 颈静脉抽血, 肝素 25 IU/ml 抗凝, 洗 4 次, 存 4℃ 冰箱中备用. b) 用洗净绵羊红细胞配成 5% 压积悬液 4 ml, 加入 2.5% 戊二醛 1 ml, 24℃ 条件下振荡处理 45 min, 洗 4 次, 备用. c) 醛化红细胞配成 5% 浓度悬液, 加入鞣酸溶液终浓度为 0.02%, 4℃ 振荡 10 min, 洗 4 次, 备用^[2].

药物浓度及实验条件: 氟尿嘧啶 2.5 g/l, 环磷酰胺 6.32×10^{-2} g/l、甲氨喋呤 9.44×10^{-2} g/l, 以上 3 种药物均为市售针剂, 用 0.01 mol/l 磷酸盐缓冲液溶解, 加入实验细胞液中, 10 min 后测定电泳速度.

仪器测量条件: 上海医科大学生产 XN-5 型细胞电泳仪, 输出电压 20 V, 载物台恒温 25℃ ± 0.5℃. 介质用 pH7.4 磷酸盐缓冲液, 观测距离 33 μm(两格), 观测界面进深 100 μm. 记录系统 MQ-1200 型计算器累积.

数据统计分析, 按下式^[3]定量计算:

$$W = \frac{U}{E} \quad (1)$$

式中 W 为细胞电泳率, U 为细胞电泳速度, 用 μm/s 表示; E 为外加电场强度.

① 本文 1992-10-06 收到

$$E = \frac{V}{r} \quad (2)$$

式中 V 为电压; r 为两个电极间的距离(cm), 电场强度一般用 V/cm 表示. 因此, 细胞的电泳率表示单位为 $\mu m \cdot cm/s \cdot V$, 表示细胞在单位电场强度、单位时间内移动的距离. 另外, 测量层: 选择测量管深为 $1/4$ 界面, 静止层: 选择测量管深为 $1/10$ 界面.

2 结果

1) 在相同电压条件下, 同批测定电泳速度, 未处理绵羊红细胞(SRBC)泳动最快. 经戊二醛化处理后, 细胞表面负电荷无明显改变($P > 0.05$). 经鞣酸处理后, 表面负电荷降低, ($P < 0.01$), 差异显著. 每组样品测 10 个细胞左右移动二格($33 \mu m$)所需时间、均值(\bar{X})及标准偏差(SD)见表 1. 3 种不同处理绵羊红细胞电泳率及电泳速度比较见表 2.

2) 固化处理细胞和对照组细胞各加入适当浓度(2.5 mg/ml)氟尿嘧啶, $25^\circ C$ 作用 10 min, 然后测定细胞电泳时间, 计算均值(\bar{X})及标准差(SD), 见表 3. 5FU 对 3 组细胞的电泳速度有不同程度的影响, 以戊二醛固化细胞做载体效果最好, $P < 0.01$, 差异显著.

表 1 固化处理前后 SRBC 电场泳动时间比较

Tab. 1 Electrophoretic times of SRBC treated with glutaraldehyde and tannic acid (t/s)

| 对照组 | | 戊二醛组 | | 鞣酸组 | |
|------------------------------------|-----|------------------------------------|-----|------------------------------------|-----|
| 左移 | 右移 | 左移 | 右移 | 左移 | 右移 |
| 3.8 | 3.6 | 4.0 | 3.9 | 3.8 | 4.0 |
| 3.7 | 3.6 | 3.8 | 3.8 | 4.2 | 3.9 |
| 3.5 | 3.9 | 3.8 | 3.8 | 4.0 | 4.2 |
| 3.5 | 3.7 | 3.7 | 4.0 | 4.0 | 4.0 |
| 3.6 | 3.9 | 3.9 | 3.8 | 4.1 | 4.0 |
| 3.8 | 3.5 | 3.8 | 4.1 | 4.1 | 4.0 |
| 3.8 | 3.8 | 4.0 | 3.7 | 4.1 | 4.0 |
| 3.5 | 3.9 | 3.7 | 3.9 | 4.0 | 4.1 |
| 3.7 | 3.9 | 3.8 | 3.8 | 3.8 | 4.1 |
| 3.8 | 3.8 | 3.7 | 4.0 | 4.0 | 4.2 |
| $\bar{X} \pm SD = 3.715 \pm 0.416$ | | $\bar{X} \pm SD = 3.850 \pm 0.119$ | | $\bar{X} \pm SD = 4.030 \pm 0.113$ | |

表 2 固化处理 SRBC 电泳速度及电泳率

Tab. 2 Electrophoretic velocities and electrophoretic rates of SRBC treated with glutaraldehyde and tannic acid

| 分 组 | 电泳速度 ($\mu m/s$) | 测量层电泳率 ($\mu m \cdot cm/s \cdot V$) | 静止层电泳率 ($\mu m \cdot cm/s \cdot V$) |
|------|-----------------------|--|--|
| 对照组 | 8.883 | 1.998 | 1.398 |
| 戊二醛组 | 8.572 | 1.928 | 1.350 |
| 鞣酸组 | 8.189 | 1.842 | 1.290 |

表3 加入5FU对固化SRBC电泳时间的影响

Tab.3 The electrophoretic time of 5-FU-bound on the SRBC treated with glutaraldehyde or tannic acid (t/s)

| 对照组 | | 戊二醛组 | | 鞣酸组 | |
|------------------------------------|-----|------------------------------------|-----|------------------------------------|-----|
| 左移 | 右移 | 左移 | 右移 | 左移 | 右移 |
| 4.1 | 4.0 | 4.5 | 4.6 | 4.4 | 4.1 |
| 4.1 | 3.8 | 4.6 | 4.4 | 4.3 | 4.2 |
| 4.1 | 4.1 | 4.3 | 4.3 | 4.1 | 4.3 |
| 4.2 | 4.1 | 4.4 | 4.3 | 4.0 | 4.2 |
| 4.2 | 4.2 | 4.7 | 4.4 | 4.1 | 4.4 |
| 3.9 | 4.0 | 4.4 | 4.3 | 4.3 | 4.0 |
| 4.1 | 4.0 | 4.1 | 4.4 | 4.1 | 4.4 |
| 4.2 | 4.2 | 4.4 | 4.3 | 4.0 | 4.2 |
| 4.0 | 4.3 | 4.3 | 4.6 | 4.1 | 4.3 |
| 4.1 | 3.9 | 4.5 | 4.4 | 4.3 | 4.2 |
| $\bar{X} \pm SD = 4.080 \pm 0.124$ | | $\bar{X} \pm SD = 4.410 \pm 0.141$ | | $\bar{X} \pm SD = 4.200 \pm 0.134$ | |

加入药物5FU处理后,3组细胞的平均致缓时间及标准差、相对缓慢百分率见表4.表中致缓时间=加药物后泳动时间-加药物前泳动时间,相对缓慢率=致缓时间/加药前泳动时间.

表4 加入5FU的STBC电泳致缓时间及相对缓慢率

Tab.4 Effect of 5-FU on reducing electrophoretic time and rates treated SRBC

| 5FU+SRBC | 致缓时间 $\bar{X} \pm SD(s)$ | 相对缓慢率(%) |
|----------|--------------------------|----------|
| 对照组 | 0.365 ± 0.114 | 9.83 |
| 鞣酸组 | 0.170 ± 0.084 | 4.22 |
| 戊二醛组 | 0.560 ± 0.105 | 14.55 |

3)3种化疗药物都可以与戊二醛固化细胞结合,并导致细胞表面负电荷降低,电泳速度减慢.说明3种化疗药物在pH7.4磷酸缓冲溶液中均带正电荷.计算电泳速度、电泳时间、电泳率等见表5.

3 讨论

日本学者松岛康等^[4]曾在家兔肺部进行直流电导向化疗,由耳静脉注入博莱霉素,通电后处死动物,取电极周围肺组织分别测定药物浓度,阳极浓度是对照组织的3倍,阴极浓度是对照组织的4倍,电场周围药物浓度高于其它组织^[4].肿瘤局部用药受多种因素影响,如浓度梯度、注射途径、药物通透性等.我们用醛化SRBC做载体,从细胞水平模拟生物体内变化.分别

从组织学和细胞学不同角度进行电化学治疗配合化疗的研究.

表5 3种化疗药物电荷分析

Tab. 5 Electronic characteristics of the three antimetabolites bound on the treated SRBC

| 药物 | 速度($\mu\text{m/s}$) | 时间(s) | 电泳率 | 致缓率(%) | 电性 |
|------|-----------------------|-------|-------|--------|----|
| 生理盐水 | 8.572 | 3.850 | 1.928 | | |
| 5FU | 7.483 | 4.410 | 1.683 | 14.55 | + |
| MTX | 7.543 | 4.380 | 1.695 | 13.77 | + |
| CP | 7.639 | 4.320 | 1.719 | 12.21 | + |

1)在选择固化载体细胞方面,用戊二醛处理后 SRBC 有以下优点:a)在生理盐水或缓冲溶液中性质稳定,易于保存. b)大小均匀,无自身凝集与沉淀倾向. c)不表现化学或生物学活性. d)可以与小分子药物结合,而不影响药物的活性. e)来源方便,价廉易得.

2)未经处理 SRBC 电泳率最高,做为载体使用,细胞膜不稳定,加入药物后易引起细胞溶解.用鞣酸处理后 SRBC 表面负电荷明显降低,高倍镜下可观察到加药后聚集现象,不宜做载体细胞,而用戊二醛处理的 SRBC 则无上述缺点.

3)在相同电泳条件下,用戊二醛处理 SRBC 后,分别加入氟尿嘧啶、甲氨喋呤、环磷酰胺,电泳速度减慢,细胞表面电荷降低的主要原因是吸附了带正电荷的药物.我们用离子交换-荧光检测的方法测定上述3种药物电性,所得结果一致.

4)细胞电泳实验操作较复杂,易受温度、介质、浓度、pH 等因素的影响,但是在肿瘤学、免疫学、药理学等领域有较高应用价值^[5].肿瘤细胞带有很高的负电荷,在电疗的同时注入带正电荷化疗药物,可以防止肿瘤的扩散和转移,造成肿瘤内外微环境改变,从而达到抗肿瘤的目的^[6].我们认为直流电场导向化疗药物对肿瘤有较好的疗效,为治疗肿瘤提供了新的途径.

参 考 文 献

- 1 Ambrose E J et al. Differences between the electrical charge carried by normal and homologous tumor cells. *Nature*, 1956, 177: 576~577
- 2 北京医学院微生物教研组编. 实验免疫学. 北京:人民卫生出版社, 1981. 406~414
- 3 施永德等. 生物物理化学定量计算. 上海:上海医科大学出版社, 1984. 69~73
- 4 松岛康等. 直流电疗法与化疗结合的临床前期研究及临床经验. 首届国际电化学治癌研讨会论文集, 1992. 34~35
- 5 梁子钧等. 医用生物物理技术(三). 上海:上海医科大学出版社, 1982. 21~26
- 6 宋之乙等. 直流电治疗恶性肿瘤的进展. 国外医学肿瘤学分册, 1990, 5: 257~259

Cell Electrophoretic Determination of Electric Charge of Three Antimetabolites

Liang Jixuan Chen Baoqian Li Qingge Zhao Yibing

(*Cancer Res. Center*)

(*Dept. of Chem.*)

Abstract Using cell electrophoretic technique the electric characteristics of 5-fluorouracil (5-FU), methotrexate (MTX) and cyclophosphamide (CP) were analyzed, which were bound to the sheep red blood cells (SRBC) treated with glutaraldehyde. The three drugs significantly reduced the net negative electric charges on the surfaces of SRBC and slowed the electrophoretic velocities of SRBC. The electrophoretic slowing rates of 5-FU, MTX and CP were 14.55%, 13.77% and 12.21% respectively, indicating that all the three antimetabolites carry positive electric charges. This paper provided the information for the application of electrochemotherapy to the clinical treatment for carcinomas.

Key words Cell electrophoresis, Electric charges, Antimetabolites