

电化学对人宫颈癌细胞系 Hela-S 生物学作用的实验研究

唐步坚 李 力 赵恒毅 古明华 陈心秋 黄玲莎 唐东平

摘要 本实验采用体外实验并利用 MTT 法和放射自影技术, 观察在不同电压和电量组合的 ECT 作用下对人宫颈癌细胞系(Hela)的杀伤率、细胞的增殖曲线、核分裂指数以及细胞增殖周期影响, 旨在了解 ECT 是否对 Hela 细胞的生物学行为有影响。其结果显示: (1) ECT 对 Hela 细胞的增殖率有明显的抑制作用, 其中以 5V10C 组的抑制率最为明显。(2) ECT 对 Hela 细胞有较强的杀伤作用, 而且这种杀伤作用, 在电压一定时, 与电量成正比。(3) ECT 对 Hela 细胞的增殖周期有明显的影晌, 这对揭示 ECT 治癌机理和为临床选择适当有效的治疗参数均有重要的意义。

关键词 电化学治疗; 子宫颈癌; Hela 细胞; 细胞动力学

宫颈癌是我国常见的八大恶性肿瘤之一, 严重地危害广大妇女的身体健康。电化学疗法(Electrochemical therapy, ECT)治疗晚期宫颈癌, 在临床上已经取得了良好的效果。本研究以人宫颈癌细胞系(Hela-3)为对象, 进行体外实验, 通过测定其在不同的电化学实验条件下的生长曲线, 核分裂指数, 杀伤实验及细胞增殖周期的动态观察, 以期对有关问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 人宫颈癌细胞系(Hela-S), 由中国军事医学科学院提供。

1.1.2 试剂 RPMI-1640 美国 GIBCO 产品; 小牛血清 华美生物工程产品; 胰酶(1:250) 美国 GIBCO 产品; 噻唑兰 美国 SIGMA 产品; 二甲基亚砷 美国 SIGMA 产品; 秋水仙素 德国 SERVA 产品; H-TDR 由中国原子能科学研究院提供

1.1.3 实验仪器 SDZLY-3 电化学治疗仪; 广西柳州地区无线电总厂产品

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与实验分组

人宫颈癌细胞系(Hela-S)常规培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 加青霉素各 100u/ml, 取处于指数增殖的细胞, 用 0.25% 的胰酶消化细胞并收集细胞备实验用。

将等量接种的 24 孔细胞培养板按随机原则分

为(1)对照组, 除不通以直流电外, 其余条件均与实验组相同。(2)实验组, 按电压、电量组合分为 4 组: 5V5C; 5V10C; 10V5C; 10V10C(V 为电压, 单位伏特; C 为电量, 单位库仑)。实验时将预先钻好小孔的培养板盖换上, 通过小孔插入铂金电极, 通以平稳电流, 两电极以 1.0cm 间距浸入细胞培养液 1.5cm 深。

1.2.2 细胞增殖速度的测定

取对数生长期的细胞, 以 1×10^4 /ml 接种细胞于 24 孔培养板中, 放入 37℃ 培养箱静置贴壁培养 12h, 取出细胞进行实验, 分组实验处理后每隔 24h 于各组取 2 孔细胞计数, 取其均值, 连续记录 6 天, 以细胞数为纵坐标, 实验天数为横坐标, 绘出各组细胞的生长曲线。

1.2.3 细胞核分裂测定

取上述实验中各组细胞, 每组 2 孔分别于实验后 24h、48h、72h 将细胞悬液离心后, 取细胞涂片, 瑞氏染色后镜下数 1000 个细胞, 求出分裂指数(MI): $MI = \frac{\text{核分裂细胞数}}{\text{计数细胞总数}} (\%)$

1.2.4 ECT 对 Hela-S3 细胞杀伤率的测定(MTT 法)

与增殖速度测定同步, 每天取各组 2 孔细胞计数后剩余悬液 200μl, 加于 96 孔培养板中, 每孔再加 5μl MTT(噻唑兰), 一起培养 4h(37℃)后取出, 吸去上清液, 再每孔加入 DMSO(二甲基亚砷), 轻轻混匀后在分光光度仪上测 OD 值, 再据公式算出杀伤率。杀伤率 = $\frac{\text{对照组值 OD} - \text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}}$

1.2.5 细胞周期进程测定: 采用放射自影法, 方

法参考文献,其中 G-S 期采用连续标记法、S 期采用脉冲标记法、S-G-M 期采用秋水仙素刺激法,制片的后涂布核-乳胶置 4℃ 冰箱内曝光 2 周后显影、定影。Giemsa 染色后 40× 显微镜下见细胞核内有 4 个以上直径在 1-2 微米黑色圆形颗粒的为标记细胞,计数标记上的和未标记上的细胞。G-S、S 期标记指数(LI)按 $LI = \frac{\text{标记细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 1000\%$ 计算。S-G-M 期有丝分裂指数(PLM)按 $PLM = \frac{\text{标记的有丝分裂相细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 1000\%$ 。

1.3 数据处理 各组间数据的比较采用 F-q

2 结果

2.1 ECT 对细胞增殖速度的影响

各组 6 天内 Hela 细胞增长倍数分别为:对照组 15 例;5V5C 组 1.9 倍;5V10C 组 0.8 倍;10V5C 组 8.1 倍;10V10C 组 3.8 倍。经统计学处理,对照组与各治疗组间差异极为显著($P < 0.01$);5V10C 组与各治疗组间差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 ECT 对 Hela 细胞核分裂指数的影响(图 1)

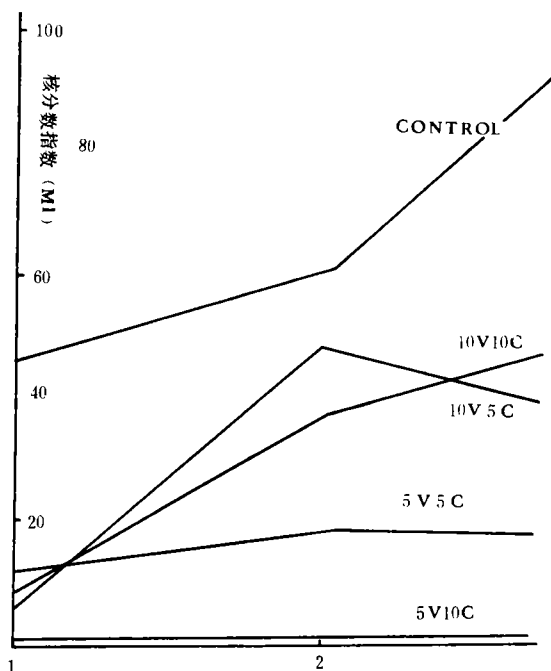


图 1 不同组合 ECT 对 Hela 细胞核分裂指数的影响

从图 1 可见,经 ECT 处理后,各实验组的分裂指数均低于对照组,经统计学处理,差异均有显著性($P < 0.01$),其中以 5V10C 实验组的核分裂指数最低,它与各实验组间相比较,差异有显著性($P <$

0.05)。

2.3 不同组合的电压与电量对 Hela 细胞杀伤率的比较

实验组 6 天内的平均杀伤率是:5V5C 组 38.67%;5V10C 组 45.87%;10V5C 组 19.83%;10V10C 组 31.61%,各实验组在 6 天内的杀伤率是不同的,总的趋势是第一天最小,第六天最大,从平均杀伤率来看,5V10C 组最高,与其它各组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

2.4 ECT 对 Hela 细胞生长周期动力学的影响

2.4.1 G-S 期(连续标记):见图 2。

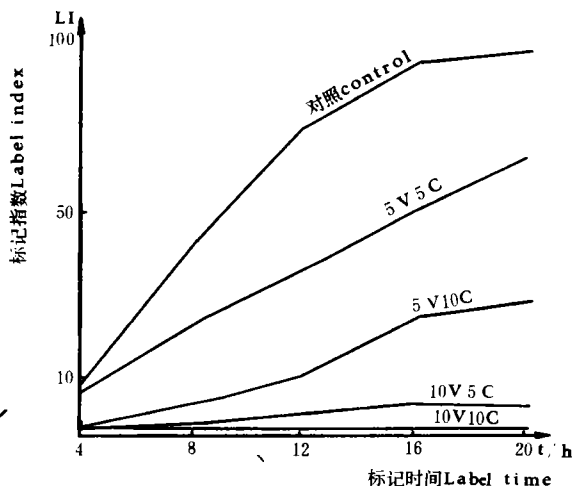


图 2 不同组合 ECT 对 G₁-S 期 Hela 细胞标记指数的影响

各实验组的标记指数 LI 均低于对照组,经统计学处理有极显著性差异($P < 0.01$)在各实验组中,以 10V10C 标记率最低,依次为 10V5C、5V10C 和 5V5C;高电压两组分别与低电压两组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。

2.4.2 S 期(脉冲标记):见图 3。

各实验组的标记指数 LI 均低于对照组且 24h 内的标记指数和也处于一个低水平,经统计学处理,有极显著性差异($P < 0.01$);各实验组间:以 10V5C 和 10V10C 标记率最低,与其它两组相比,有显著性差异($P < 0.05$)。

2.4.3 S-G-M(秋水仙素刺激法):见图 4。

各实验处理组的标记有丝分裂指数均低于对照组,统计学处理有极显著的差异($P < 0.01$);各实验处理组内,5V5C 标记率较高,与其它组相比较有显著性差异($P < 0.05$)。余各组间两两比较无差

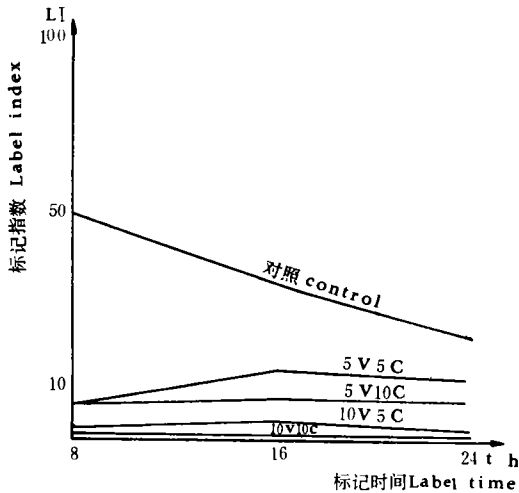


图 3 不同组合 ECT 对 S 期 HeLa 细胞标记指数的影响

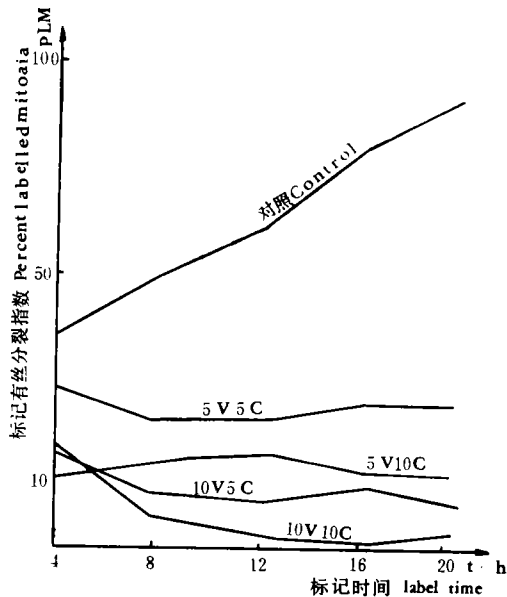


图 4 不同组合 ECT 对 S-G₂-S 期 HeLa 细胞标记有丝分裂指数的影响

异, 另外第一个 4 小时的标记有丝分裂指数 PLM 所有组均较高。

3 讨论

3.1 ECT 对 HeLa 细胞生长的增殖率和杀伤率的影响

从我们的实验结果来看, ECT 对 HeLa 细胞的增殖影响非常明显, 各实验组与对照组相比细胞增殖减少, 倍增时间延长, 对细胞的杀伤率明显增高, 这表明 ECT 对 HeLa 细胞具有杀伤及抑制生长

作用, 这与已有的 ECT 临床治疗结果相符合。我们在实验研究中, 发现 ECT 对 HeLa 的细胞生长增殖生物学行为影响主要有两大特点:

3.1.1 在各实验组中, 电压不变, 则杀伤率随电量增大而升高, 这与已有的报道一致。但是, 电量不变时, 电压在一定范围内与杀伤率成正比, 超出一定范围, 杀伤率则下降, 本研究中以 5V10C 组的杀伤率最高, 我们认为电化学治疗是利用电流对组织液中的电解质进行电解而产生效应的, 电压太小, 不足以抵消电解质的阻抗, 不会产生电解作用; 而电压太大, 在一定的电量限制下, 电解作用时间太短, 不能解离大量的电解质, 所以对细胞生存的环境破坏不大, 在一定的电压条件下, 杀伤率取决于电量(库仑)的大小。细胞核分裂指数的结果得到进一步的证实, 这一实验结果表明电化学治疗必须在适当的电压和电量时才能对癌细胞产生影响。

3.1.2 从 ECT 对 HeLa 细胞的杀伤率来看, 各实验组第一天的杀伤率较低, 随着培养天数的增加, 杀伤率逐渐升高, 同时细胞的增殖率也逐渐降低, 这一过程进一步说明电化学的作用不是单纯的物理过程, 而是在直流电作用下, 局部的化学效应对癌细胞的生物学行为产生影响, 使之逐步死亡的过程。

3.2 ECT 对 HeLa 细胞增殖周期的影响

为了进一步观察 ECT 对 HeLa 细胞增殖周期的影响, 我们采用了放射自显影技术对 HeLa 细胞在体外电场作用下从 DNA 合成前期(G)至有丝分裂(M)进行动态观察。

肿瘤细胞生物学研究已表明: DNA 与肿瘤细胞增殖分裂有密切关系, 核酸增多是肿瘤迅速生长的物质基础, 而反映肿瘤迅速生长的指标是细胞增殖周期中的 G-S 和 S-G-M 期的细胞的比率增高, 我们通过对指数生长期的 HeLa 细胞进行 ECT 作用, 结果发现:

1. 在 G-S 过程中, 各实验组的标记指数 LI 均低于对照组 ($P < 0.01$), 说明 ECT 阻滞了 G-S 过渡, 在各实验组内大电压组 LI 比小电压组低 ($P < 0.05$), 其机理我们认为在短时间内, 电压较大, 电流强度较大, 对细胞的物理作用较强, 使细胞处于“休克”状态的 G 期细胞又可变成 G 细胞重新进入 S 期, 这一点可以从生长曲线中看出, 第 3.4 天后大电压组的细胞增殖倍数明显高于小电压组; 而小电压组虽然作用时间长, 但细胞受小电流的作用, 短时间内电化学产物的效应不明显, 所以由 G 期至

S 期的过渡仍然存在, LI 就高。

2. S 期为细胞的 DNA 合成期, 由于 ECT 作用, 各实验组的细胞 DNA 合成受抑制, 因而标记低于对照组, 但在各实验组中, 小电压组的标记率高于大电压组, 这表明小电压组仍存在少量的 DNA 合成, 这与我们所观察的 G-S 期的结果相一致其机理可能与短时间内电化学的延迟效应未显示出来, 因而使部分细胞的 DNA 合成抑制不彻底有关。

3. M 期标记由于有了秋水仙素的刺激, 在第一个 4 小时内, 细胞分裂增加, 标记率就高, 但随时间推移, 标记有丝分裂指数 PLM 逐渐受到抑制。

综上所述, ECT 对 Hela 细胞生物学行为有明显的影 响, 而且这种影响与 ECT 的电压、电量及作用时间有关, 而这种影响的分子机理尚不得而知, 需要更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 唐步坚, 李力, 古明华, 等. 电化学对宫颈癌治疗的临床价值探讨. 广西医学, 1994, 16(1): 4.
- 2 吴克林, 刘树林, 李亚琪, 等. 电化学治疗, 介入性化疗及放射综合治疗宫颈癌近期疗效. 肿瘤防治研究, 1994, 21(1): 48.
- 3 刘鼎新主编. 放射自显影. 科学出版社, 1997: 123.
- 4 Nordenstrom BE. biologically closed electric; activation of vascular interstitial closed electric circuits for treatment of inoperable cancers. J Bioelec, 1984, 3: 137.
- 5 Nordenstrom BE. An additional circulatory system; vascular-intestinal closed electric circuits (VICC). J Biol Phys, 1987, 15: 43.
- 6 李建人. 直流电对 Lewis 肺癌细胞杀伤作用的实验研究. 中华理疗杂志, 1992, 2(2): 74
- 7 Erbe E, Vaghi M, Pepe S, et al. DNA index of ovarian carcinoma sfrom 56 patients: in vivo in vitro studies. Br J cancer, 1985, 52: 565.

Experiment study of Biological action of Electrochemistry on Human cervical carcinoma Hela-S3 colon

Tang Bu-Jian, et al

Guangxi Medical University Affiliafed Tumor Hospital

The effect of ECT combined by different voltage and electric quantity on killer rate of Human cervical carcinoma Hela-S3 colon. proliferating rate of cells, karyokinesis inde and cells proliferating period was observed by MTT method and autoradiography.

The purpose of the experiments is to find out the effect of ECT on the bilogical act of Hela-S3 colon. The results showed ECT has the following action: (1) Obvious inhibition action on the proliferating of Hela-S3 colon. The inhibiting rate of 5V10C is the most obvious one. (2) Killer action on Hela-S3 colon. It has direct rate with electric quatity under the same vltage. (3) Obvious effect on the cells proliferating period, mainly on G1-S period and M period is observed, and it is related with voltage, electric quantity.

The above results showed ECT has obvious effect on the bilogioal behavior. The results also contribute to the treatment of human cervical carcinoma, they play an important part when doctors are selecting effective ways of treating patients.

Key words: electrochemistry; cervical carcinoma; Hela cell; celldynamic