

· 基础研究 ·

胶体金对 K562 细胞影响的研究*

梅建生 屈晓超 张 顶

(1 西安交通大学生命学院生物工程系 西安 710049)

摘要:本文论述了有关人类白血病细胞系 K562 细胞的体外培养的特点,以及胶体金纳米颗粒独特的物理性质,并应用胶体金治疗肿瘤的原理和意义,成功的在体外条件下培养出生长状态稳定的 K562 细胞,最后通过观察、记录体外生长的状况,绘制了细胞生长曲线,并计算出细胞的倍增时间。利用柠檬酸三钠来还原氯金酸的方法制备了胶体金,通过紫外/可见分光光度计和电子透射显微镜检测了胶体金的吸收光谱以及它的颗粒直径、形状,进行了胶体金颗粒对 K562 细胞的影响研究。实验结果表明,加入胶体金和没加胶体金的细胞生长状况基本相同。

关键词: k562 细胞; 细胞生长曲线; 细胞倍增时间; 胶体金

中图分类号: Q279 **文献标识码:** B

Research on Impact of Colloidal Gold on K562 Cells

MEI Jian-sheng, QU Xiao-diao, ZHANG Ding

(Department of Biological Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shanxi, China)

ABSTRACT: In this paper, we first discussed the characteristics about the culture of the K562 cell (a kind of human leukaemia cell line) in vitro and the principle of applying colloidal gold in cancer treatment. Then, we described the experiment of the culture of K562 cell in vitro and the research about the influence of colloidal gold on this kind of cell. In the experiment of cell culture, we studied the nutrition and aseptic condition needed by the K562 cell culture in vitro, constructed the external environment, and cultured out the K562 cell which was in good living status. Then we found out the growth and division cycle of the cell by observation, and also made out the cell growth curve by experiment of cell count and live cell detecting. Through the cell growth curve, we figured out the doubling generation time. Colloidal gold is a suspension of gold particles whose diameter range is from 1 to 100 nanometres. We prepared it through liquid reduction with sodium citrate as reducing agent. Transmission electron microscopy (TEM) and UV/visible absorption spectrophotometer were used to check the particle diameter and the shape of colloidal gold. We also investigated the influence of the colloidal gold on K562 cell. We added some of the colloidal gold into the cell culture liquid and observed the cell status. In the experiment, we set a control group which did not add the colloidal gold to compare the result. The result indicated that the colloidal gold had no influence on the living K562 cells.

Key words: K562 cells; Cell growth curve; Cell doubling generation time; Colloidal gold

前言

近年来,恶性肿瘤的发病率和病死率逐年升高,对人们的生命和健康造成了严重的危害。而白血病是造血系统的恶性肿瘤,发病率也愈来愈高。日前对白血病的治疗采用联合化疗、放射治疗、免疫治疗及骨髓移植等方法。基于 ALA 脂类衍生物的光动力疗法对血液中的肿瘤—白血病细胞进行体外灭活的方法已经取得了一些成绩^[1],但是由于光敏剂会对正常细胞也产生毒性,因此发展一种新的生物光子学技术用于肿瘤细胞的灭活将具有很大的意义和很好的前景。

利用金纳米颗粒吸收激光的热效应灭活肿瘤细胞,是近年来的研究热点之一^[2]。与光动力疗法相比,这种方法不会产生光毒性,选择不同的激光脉宽可以实现对特定范围内的细胞灭活,正常细胞成活率高^[3]。

在研究中,我们首先培养出生长状态稳定的 K562 细胞,并制备出实验所需的胶体金颗粒。然后设计了胶体金对 K562 细胞影响的实验方案。通过这些实验的研究来探讨胶体金对癌细胞的影响及其所需的条件。对胶体金在癌细胞方面的应用有一定的启示意义。

1 K562 细胞的培养及生长观察

K562 细胞是一种白血病细胞,它的全称为:慢性粒细胞白血病急性红白血病细胞系 K562 细胞株。它是一种血液中的癌细胞,在体外培养要模拟体内血液的环境,温度、pH 值、无机离子浓度、渗透压等都要与血液相似^[4]。它在液体培养基中悬浮生长,但由于重力原因一般都沉于底部,只要轻轻吹打便会重新悬浮于培养液中。

1.1 材料与仪器

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(60578026)

作者简介:梅建生,(1954-),女,大学本科,工程师,主要研究方向:生物技术

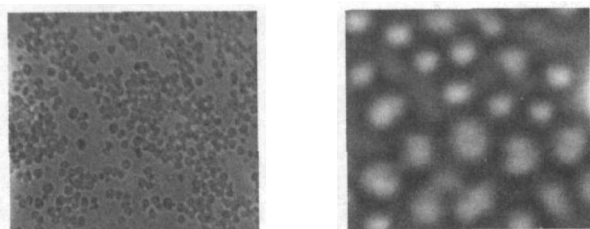
(收稿日期 2006-09-16 接受日期:2006-10-10)

K562 细胞株由西安交通大学医学院提供; 培养基为 RMPI-1640 (GIBCO, Invitrogen Corporation); 优级新生牛血清 (兰州民海生物工程有限公司); 超净工作台 (SW-CJ-1D); 二氧化碳培养箱 (FORMA); 倒置显微镜 (重庆光学仪器厂)。

1.2 K562 细胞的培养和传代

按照细胞体外培养的方法^[1]操作, 将 K562 细胞的培养瓶的瓶盖适度拧紧, 放入调节好温度、湿度和二氧化碳浓度 (37℃、5%CO₂) 的培养箱中培养。用倒置显微镜观察, 当细胞生长到布满培养瓶底部一层时, 即传代。一般 3 天传代 1 次。

传代前的细胞, 沉在培养瓶底部, 比较密铺满底层。细胞圆且饱满, 呈亮黄色, 如图 1(a, b) 所示



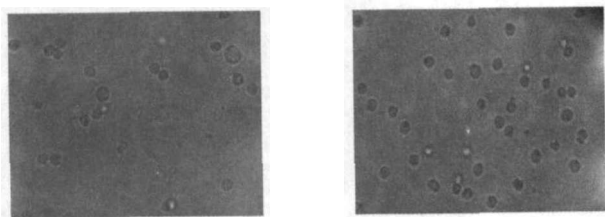
a. 放大 100 倍 (100×) b. 放大 150 倍 (500×)

图 1 K562 细胞传代前照片 (100×)

Fig.1 K562 cells before passage

(a. 100 times magnification) (b. 500 times magnification)

图 2 为传代后的细胞照片, 刚开始细胞稀少, 而且部分悬浮于培养液中。大概 2 小时后, 细胞渐沉底部 (图 2 a)。4 小时后细胞完全沉到底部 (图 2 b)



a. 传代 2 小时后
(2 hours after passage) b. 传代 4 小时后
(4 hours after passage)

图 2 传代后的细胞照片 (100×)

Fig.2 K562 cells after passage (100 times magnification).

1.3 K562 细胞的生长曲线

细胞生长曲线是观察细胞生长基本规律的重要方法。只有具备自身稳定成长特性的细胞才适合在观察细胞变化的实验中的应用。本研究利用细胞计数法进行了 K562 生长曲线的测定。

取生长状态良好的 K562 细胞, 经计数后精确地将细胞分别接种于 7 个大小一致的培养瓶内 (10ml 培养瓶)。每天取出一瓶细胞进行计数和细胞活力检测, 以培养时间为横轴, 细胞数为纵轴 (对数), 绘制的 K562 细胞的生长曲线见图 3。

标准的细胞生长曲线近似“S”型, 一般在传代后存在数小时的潜伏适应期, 然后进入指数生长期, 最后达到平台期后最终衰老。

在生长曲线上细胞数量增加一倍的时间称为细胞倍增时间。依据细胞群体倍增时间公式:

$$TD = \frac{\log 2}{\log N_t - \log N_0}$$

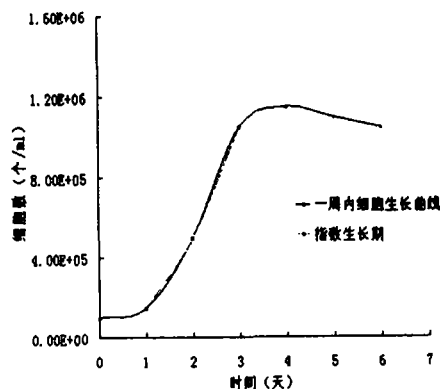


图 3 细胞一周内的生长曲线

Fig.3 The growth curve of cells in one week.

TD 为细胞倍增时间, N_0 及 N_t 分别代表接种后和培养 t 小时后的细胞数。将第一天的细胞数作为 N_0 , 第二天和第三天的细胞数分别作为 N_t , 代入上述公式分别算出 TD 并取平均, 最后得出 K562 细胞处于指数增长期的平均群体倍增时间为 15.5 小时^[4]。

2 胶体金的制备与检测

胶体金 (Colloidal Gold) 是一种金颗粒悬液, 颗粒的大小多在 1-100 纳米之间, 稳定、均匀呈单一分散状态悬浮在液体中, 成为胶体金溶液^[5]。胶体金在可见光范围内有吸收峰, 其吸收波长随胶体金颗粒大小而稍有变化, 本研究采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金^[7]。

2.1 材料与仪器

lg 的氯化金溶解于 100ml 三蒸水; lg 柠檬酸三钠溶解于 100ml 三蒸水; 8H 型加热磁力搅拌器 (上海司乐仪器厂); 紫外/可见分光光度计 (Bacman Du640); 透射电子显微镜 (JEM-200CX)。

2.2 制备胶体金

将 1% 氯金酸稀释 100 倍, 配制成 0.01% 的水溶液, 取 100ml 加入到锥形瓶中, 并置于加热磁力搅拌器上加热直到沸腾。放入磁力搅拌子, 并用刻度吸管加入 1% 柠檬酸三钠, 粒径的大小与加入量相关。继续搅拌加热煮沸 15 分钟, 可观察到氯金酸水溶液在柠檬酸钠加入后很快从淡黄色变浅蓝色, 继而转成紫色, 随后逐渐稳定成橘红色。

2.3 胶体金的特性检测

2.3.1 紫外吸收检测

以去离子水为空白对照, 对制备的胶体金溶液进行紫外/可见分光扫描, 扫描范围 400nm-600nm。分别测得 15 粒径和 40 粒径的胶体金在 520nm 和 528nm 处有最大吸收峰。

2.3.2 胶体金的电镜检测

将胶体金溶液滴在覆有 Formvar 膜的铜网上, 白炙灯烤干。透射电镜下观察到胶体金颗粒大小基本均匀呈圆球形, 图 4 是 6.8 万倍和 10 万倍透射电镜下粒径为 20nm 的胶体金照片。

3 胶体金对 K562 细胞生长的影响

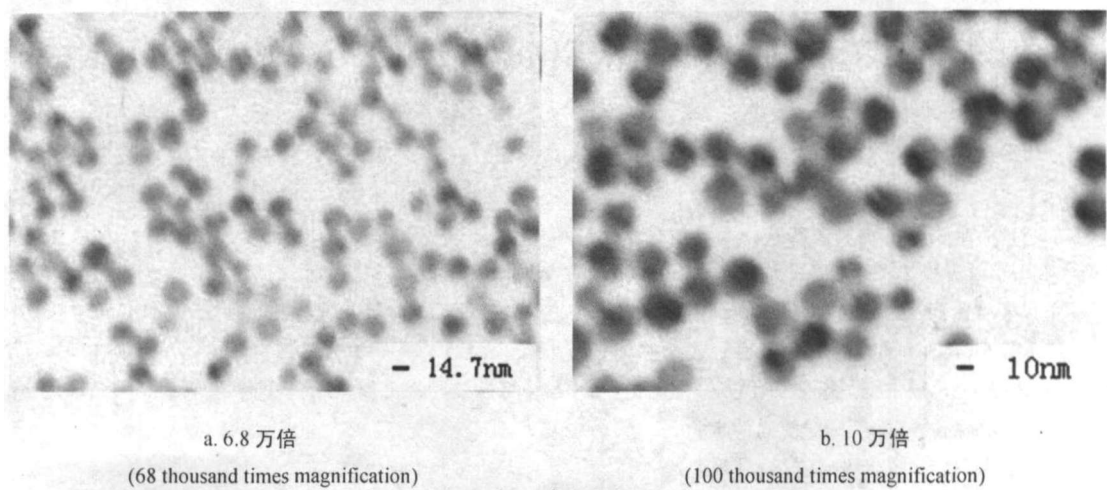


图 4 胶体金的电镜图片

Fig.4 TEM figures of Colloidal gold.

选用制备好的粒径在 37-40nm 之间的胶体金。按照 1:1 的比例将胶体金加入到细胞培养液中,在细胞传代时,将这种培养液加入到 K562 细胞中。令细胞培养的其他条件不变。观察细胞的生长状态,并用台盼蓝排斥实验检测细胞的存活率^[9]。

3.1 检验步骤

当细胞达到正常传代时,去掉旧培养基,加入 10ml 新鲜培养基,用吸管吹打细胞,使之均匀的悬浮于培养液,然后等体积分装到两个培养瓶中。分别向两个培养瓶中各加入 5ml 无菌水和 5ml 胶体金溶液,在瓶上做上标记。将两瓶细胞同时放入 CO₂ 培养箱中培养。每天观察细胞的生长状况,培养三天后做台盼蓝排斥实验。

3.2 检验结果

通过观察和对比,发现加入无菌水和加入胶体金细胞的生长状况基本一样,区别仅在于加入胶体金的细胞沉到瓶底的时间比对照瓶的时间长,实验结果见表 1。

表 1 加入无菌水与胶体金培养细胞三天的细胞计数

Table 1. Survival rate of K562 cells with and without colloidal gold

	计数板中五个 中格细胞数	死亡 细胞数	细胞浓度 (个/ml)	存活率
对照组	9	0	4.5E+05	100%
试验组	10	0	5.0E+05	100%

由上表可以看出, 对照组和试验组的试验结果大致一样, 说明胶体金对 K562 细胞生长没有影响,或者说影响很小以至于用这种方法检测不出来。

4 讨论

本文介绍了培养 K562 细胞的方法, 并获得该细胞生长、增殖的一系列数据,做出细胞生长曲线,计算出细胞的倍增时间;采用柠檬酸三钠还原法,制备出一定颗粒直径的胶体金;通过检验得出,胶体金本身对生长的 K562 细胞的生长并没有

影响;

以上结果,对胶体金在治疗肿瘤细胞方面的应用有一定的启示意义。要进一步研究,还需要设计和进行在激光照射条件下胶体金对细胞的影响,主要是在激光照射条件下,结合胶体金的 K562 细胞的死亡率,以及死亡率随外界条件改变后的变化情况。另外,胶体金要在体内特异性的与肿瘤细胞相结合,还需要特异性的单克隆抗体的辅助。以上两个方面的实验研究是将胶体金应用于治疗肿瘤细胞所必需进行的研究,这也是今后所要研究的主要方向。

参考文献

[1] Henderson BW, Busch TM, Vaughan LA. Photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment depending on fluence rate [J]. Cancer Res, 2000,60:525-529

[2] Ivan H.El-Sayed, Xiaohua Huang, Mostafa A. El Sayed. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles [J]. Cancer Letters, 2005: 1-7

[3] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,1996

[4] 沈萍.微生物学[M].北京:高等教育出版社,2003

[5] 江龙.量子化尺寸纳米颗粒及其在生物体系中的作用 [J].无机化学学报,2000,16:185-194

[6] Elghanian R, Storhoff J, Mucic R C, et al. Selective colorimetric detection of polynucleotide based on the distance dependent optical properties of gold nanoparticles [J]. Science, 1997, 277 (5329):1078

[7] 贺昕,熊晓东,梁敬博.免疫检测用纳米胶体金的制备及粒径控制[J].稀有金属,2005,29:471-474

[8] Faulk W, Taylor G.A.Immunocolloid method for the electron microscope [J]. Immunochemistry, 1971,8:1081

[9] Costas M Pitsillides, Edwin K Joe, Xunbin Wei. Selective Cell Targeting with Light-Absorbing Micro particles and Nanoparticles [J]. Biophysical, 2003,84:4023-4032