

## 用毛细管区带电泳方法测定胰腺癌单细胞内 5-氟尿嘧啶浓度\*

刘胜利 王晶敏 鞠煌先<sup>1</sup> 朱广华<sup>1</sup> 杜丹<sup>1</sup> 朱春富 徐皓 黄海

(东南大学医学院附属中大医院普通外科,南京 210009)

**Determination of 5-Fluorouracil concentration in single pancreatic cancer cell based on capillary zone electrophoresis**

LIU Sheng-Li, WANG Jing-Min, JU Huang-Xian, ZHU Guang-Hua, DU Dan, ZHU Chun-Fu, XU Hao, HUANG Hai

(Dept of General Surgery, Affiliated Zhong-Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009)

中国图书分类号 R 313;R 736.8;R 979.1

文献标识码 A 文章编号 1001-1978(2004)06-0717-02

关键词 5-氟尿嘧啶;毛细管区带电泳;胰腺癌;化疗;药物浓度;细胞株

KEY WORDS 5-fluorouracil; capillary zone electrophoresis; pancreatic cancer; chemotherapy; drug concentration; cell line

胰腺癌细胞对 5-FU(5-fluorouracil)存在固有或获得性阻抗<sup>[1]</sup>,5-FU 能否在胰腺癌细胞内达到有效药物浓度仍不清楚。文献报道的同位素标记法仅适合于测定体外悬浮生长细胞内的化疗药物浓度。对于贴壁生长的细胞内化疗药物浓度目前尚无较合适的测定方法。本文选用有贴壁生长特性的胰腺癌细胞株为研究对象,建立了以毛细管区带电泳法为基础的一套测定细胞内 5-FU 浓度的方法。

### 1 材料与方法

1.1 化学试剂 均为分析纯。HEPES、5-FU、茶碱为美国 Sigma 公司生产,BCA 试剂盒美国 Pierce 公司生产,乙腈(Acetonitrile, CAN)为上海凌峰化学试剂公司生产,胎牛血清由杭州四季青公司提供,胰蛋白酶由武汉中健科技发展有限公司生产。HP<sup>3D</sup>CE 型毛细管区带电泳仪及毛细管柱(硅胶填充,柱长 61.8 cm、内径 50  $\mu$ m)德国 Agilent 公司产品。

1.2 细胞准备 胰腺癌细胞株 PANC-1 由德国乌尔姆大学赠送。待细胞用高糖 DMEM 培养达  $2 \times 10^7$  后,在含 5-FU

(100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)的培养基中分别孵育 0、15、30 min、1、2、4 h。冷 PBS (4  $^{\circ}$ C, pH 7.2)冲洗 3 遍,细胞用橡皮刮下收集。取等量细胞悬液 100  $\mu$ l 两份,用于测定细胞内 5-FU 浓度和作平行样本。

1.3 5-FU 含量测定 毛细管区带电泳(Capillary zone electrophoresis, CZE)测定样本 5-FU 条件:检测电压 25.0 kV、电流 48.7  $\mu$ A、温度 30  $^{\circ}$ C、波长 200 nm。检测前将毛细管柱用 1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaOH、0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaOH、双蒸水分别洗 20 min。茶碱作内标(25 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>),确定 5-FU 出峰位置。测定并计算已知 5-FU 系列浓度为 20~100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的细胞培养液的峰高与峰面积,求得 5-FU 与茶碱的峰面积比值校正曲线<sup>[2]</sup>。

细胞悬液与 ACN 比值为 1:2 震动混合后离心(9 000  $\times$  g, 3 min)去除蛋白,上清液与硼酸钠缓冲液(0.03 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, pH=9.2)以 1:1 混匀,用 CZE 测定 5-FU 含量。取 3 次读数的平均值,据校正曲线求得样本中 5-FU 含量。

1.4 平行样本中细胞蛋白与细胞数测定 用 BCA 法(Bicinchoninic acid protein assay)测定蛋白浓度为 25~2 000 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的系列溶液,求得吸光度与蛋白含量的校正曲线。平行样本以 16 加入细胞裂解液混匀<sup>[2]</sup>,置冰上 30 min 让细胞完全裂解,14 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,4  $^{\circ}$ C 离心 30 min。测定上清液蛋白量。

0.25%胰蛋白酶消化 PANC-1 细胞,用 PBS 液定容后计数,求得蛋白量与细胞数校正曲线。根据平行样本蛋白量求得细胞数量,计算单细胞内 5-FU 含量。

1.5 细胞平均体积测定 PANC-1 细胞酶消化后用 0.4% 台盼蓝染色,借助显微镜联机图像程序随机选取 46 个细胞测定直径,用公式  $V=(4/3)\pi r^3$  计算细胞平均体积。

各 5-FU 浓度点实验均重复 3 次,数据用 Excel(Version 2000)和 SPSS (Version 10.0)处理,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

### 2 结果

茶碱和 5-FU 在加样后 3.5 min 和 5.5 min 出峰,无杂波干扰(Fig 1)。5-FU 浓度与峰面积比值的校正曲线为  $\hat{Y}=17.285X+0.257$  ( $R=0.998$ ,  $F=961.5$ ,  $P<0.01$ ),峰面积比值在 0.1~5.5 之间线性关系良好。5-FU 最低检出浓度为 1.64 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>。变异系数  $CV<1\%$  ( $n=6$ )。测得 100  $\mu$ l 细胞刮取悬液内 5-FU 含量为 2.039~4.106  $\mu$ g。

吸光度与蛋白含量的校正曲线为  $\hat{Y}=0.0004X+0.011$  ( $R=0.996$ ,  $F=305.6$ ,  $P<0.01$ ),蛋白含量与细胞数量的校正曲线为  $\hat{Y}=426.1X+11.15$  ( $R=0.998$ ,  $F=7448$ ,  $P<$

2003-12-12 收稿,2004-02-08 修回

\* 铁道部科技基金资助课题, No J2000Z094

<sup>1</sup> 南京大学化学化工学院分析化学教研室,南京 210018

作者简介:刘胜利,男,46岁,硕士,主任医师。研究方向:肝胆胰肿瘤诊断与外科治疗。Tel: 025-83272195, E-mail: lsl88408@jlonline.com

Tab 1 Data in time point(n=3)

Exposure time/min	Area ratios of 5-FU vs IS	5-FU contents / $\mu\text{g}$	Optical densities	Protein contents/ $\mu\text{g}$	Cell numbers / $\times 10^6$	5-FU content in a cell/ $\text{pg} \cdot \text{cell}^{-1}$	5-FU concentrations in cell/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
15	0.12 $\pm$ 0.04	2.79 $\pm$ 0.45	1.52 $\pm$ 0.02	3778 $\pm$ 47.5	8.84 $\pm$ 0.11	0.32 $\pm$ 0.05	67.0 $\pm$ 10.2
30	0.20 $\pm$ 0.02	3.57 $\pm$ 0.24	1.55 $\pm$ 0.01	3868 $\pm$ 19.8	9.05 $\pm$ 0.05	0.39 $\pm$ 0.03	83.8 $\pm$ 5.33
60	0.18 $\pm$ 0.01	3.42 $\pm$ 0.05	1.34 $\pm$ 0.01	3349 $\pm$ 12.3	7.83 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.01	92.9 $\pm$ 1.60
120	0.26 $\pm$ 0.01	4.23 $\pm$ 0.11	1.83 $\pm$ 0.01	4556 $\pm$ 31.3	10.70 $\pm$ 0.07	0.397 $\pm$ 0.01	84.3 $\pm$ 2.33
240	0.13 $\pm$ 0.01	2.92 $\pm$ 0.07	1.26 $\pm$ 0.01	3128 $\pm$ 25.4	7.32 $\pm$ 0.06	0.400 $\pm$ 0.01	85.0 $\pm$ 2.37

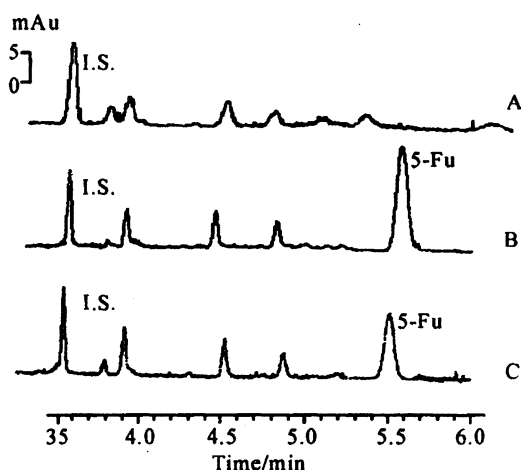


Fig 1 Electropherograms of A; blank PANC-1 cell with theophylline (I.S. 0.14 mmol · L<sup>-1</sup>); B; blank cell fortified with 5-FU (100 mg · L<sup>-1</sup>) and theophylline; C; PANC-1 cells incubated for 15 min in a culture medium containing 5-FU (100 mg · L<sup>-1</sup>)

Voltage used 25 kV, current 48.7  $\mu\text{A}$ , Sample injection 2 s, Temperature 30 $^{\circ}\text{C}$

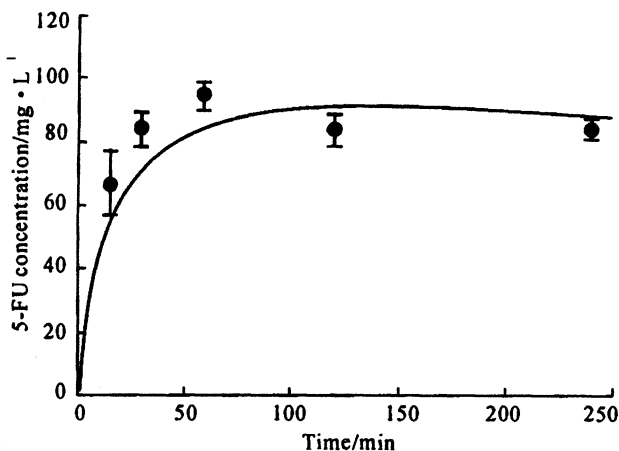


Fig 2 Intracellular concentration of 5-FU in PANC-1 cells vs exposure time to a medium containing 5-FU (100 mg · L<sup>-1</sup>)

Each data point represents the mean $\pm$ SD(n=3) and the solid lines were determined using non-linear regression. CZE analysis conditions were as in Fig 1

0.01)。平行样本蛋白含量范围为 1683.8~4555.5  $\mu\text{g}$ ,所含细胞数为  $3.925 \times 10^6 \sim 10.665 \times 10^6$ ,单细胞内 5-FU 含量为 0.2414~0.4428 pg (Tab 1)。

PANC-1 细胞平均直径为  $(20.79 \pm 1.58) \mu\text{m}$ ,平均体积为  $(4704.2 \pm 1092.4) \mu\text{m}^3$  ( $0.004704 \pm 0.001092$ ) nl。单细胞内 5-FU 浓度为 53.99~92.86  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Tab 1)。

PANC-1 细胞内 5-FU 浓度在 15 min 内上升较快,达  $(66.99 \pm 10.16) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,为培养基中 5-FU 浓度的 67%,30 min 为  $(83.75 \pm 5.333) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞内 5-FU 浓度于 60 min 达高峰  $(92.86 \pm 1.604) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,为培养基中 5-FU 浓度的 93%,以后处于平台 (Fig 2)。

### 3 讨论

由于 PANC-1 细胞贴壁生长,收集细胞时用刮下法因部分细胞将被破坏而不能准确计数;CEZ 测定 5-FU 后,检测样本中细胞蛋白已无法再被检测。因此,本研究设计了平行样本。

PANC-1 细胞经含 5-FU 的培养液温育后,细胞内 5-FU 浓度 15 min 内迅速升高  $(67.0 \pm 10.16) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,30 min 达  $(83.75 \pm 5.333) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,60 min 时达高峰浓度  $(92.86 \pm 1.604) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。若扣除细胞核,60 min 时胞浆中 5-FU 浓度近似于培养液中浓度。此后 5-FU 浓度不再上升,药物曲线处于平台 (Fig 2)。这提示 5-FU 可进入细胞,细胞内 5-FU 浓度可达到细胞外水平,5-FU 主要以细胞内外浓度差为动力向细胞内转移,细胞膜对 5-FU 存在饱和现象。

本研究所建立的检测方法适合检测贴壁生长细胞的细胞内药物含量和浓度,细胞内 5-FU 浓度可用  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  表述,有利于细胞内 5-FU 浓度与培养液中浓度比较。该方法简便,样品无须萃取,进样量少,灵敏度高。

### 参考文献

- 1 刘胜利, Friess H, Kleeff J *et al.* 胰腺癌细胞株对 5-FU 存在固有抗性. 中国药科大学学报, 2002;33(6):492~5
- 2 Procházková A, Liu SL, Friess H *et al.* Determination of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate in pancreatic cancer cell line and other biological material using capillary electrophoresis. *J Chromatogr A*, 2001;916(1~2):215~24