

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

細胞電泳行為之研究：實驗、理論與應用--子計畫二:細胞 電泳行為之研究：理論與實驗測試(2/2) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型

計畫編號：NSC 95-2627-B-002-008-

執行期間：95年08月01日至96年07月31日

執行單位：國立臺灣大學化學工程學系暨研究所

計畫主持人：徐治平

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：葉禮賢、葉禮賢

碩士班研究生-兼任助理：陳旂瑩、丁和國、黃治華

博士後研究：鄒光耀

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 07 月 16 日

細胞電泳行為之研究：理論與實驗測試(2/2)

Electrophoretic Behaviors of Cells: Theory and Experimental (2/2)

計畫編號: NSC95-2627-B-002-008

執行期限: 95/08/01-96/07/31

主持人: 徐治平 臺灣大學化工系 教授

一、中文摘要

本研究以人類肝癌細胞 HepG2 為研究對象，同時進行細胞電泳實驗與數值模擬。實驗結果顯示，HepG2 肝癌細胞在 pH 值 4 附近存有一等電位點，這表示此種細胞表面至少各含有一酸性及鹼性官能基。數值模擬配合實驗量測的結果則顯示，忽略離子體積效應會低估細胞表面官能基的密度及二價陽離子與細胞表面官能基之鍵結常數，但不影響酸鹼官能基解離常數的大小。

關鍵詞: HepG2 肝癌細胞；電泳；離子體積效應

二、計畫緣由與目的

於亞洲大部份地區，肝癌為首三種致命癌症，預計全球每年均有 550,000 人死於肝癌，當中約 360,000 死亡病例來自東亞地區。因此，近年來的學者無不積極投入研究人類肝癌細胞 HepG2 的行列，以期待能研發出新的藥物來有效治療肝癌患者，降低死亡率。對於部份肝臟已被切除的肝癌患者，則必須使用生物性肝臟支持系統(BLSD)來輔助病人所餘肝臟的運作，以避免肝昏迷的情況發生。目前幾乎所有的生物性肝臟支持系統都包含三個部份：生物性元件、生物反應器及血液或血漿灌流系統。在生物性元件部份，理論上人類肝細胞是人工肝臟最理想的填充組織，但由於人肝短缺，科學家們便積極發展初代人肝細胞株。其中，最受到矚目且已被應用於臨床上的，就是由人類肝癌細胞 HepG2 經過 DNA 複製及改質所分化出的 C3A 細胞株。C3A 細胞株具有正常肝細胞功能、所需細胞增殖時間短等優點，但如果此種細胞在治療時不小心進入病人循環系統，則可能對病人造成危害。由上述可知，在發展正常人類肝臟細胞株未有顯著突破的同時，肝癌細胞 HepG2 所分化的細胞株可視為現今人工肝臟的細胞主要來源。

細胞電泳是指生物細胞於外加電場的作用下，在電解質溶液中產生相對於靜止流體移動的現象，通常用於鑑定生物細胞的表面特性。對於生物細胞而言，其表面電荷、表面電位和薄膜內官能基的解離程度有關，因此，傳統的電泳理論對於帶薄膜的生物細胞並不適用。^{1,2} 後期的學者，則同時以實驗和

模擬的方式分析生物細胞的電泳行為，並將所得的結果和 Smoluchowski 所導的電泳公式相比較，以探討之間的差異。³⁻⁶ 基於上述的觀察，Levine 首先嘗試以一平板表面帶有離子可穿透薄膜且有固定電荷分佈於內的模型來探討紅血球的電泳行為，其所得到的電泳遷移率較小於 Smoluchowski 公式所得到的結果。⁷ 接著 Ohshima 與 Kondo 改善此模型並推導出較簡單的解析解，但僅適用於對稱電解質溶液。⁸ Tseng 則加以考慮電荷可調整的模型，並討論 pH 值和離子強度對細胞電泳遷移率的影響。⁹ 然而，上述學者的研究結果皆以傳統 Gouy-Chapman theory (GCT) 假設為基礎，即將溶液中的離子視為點電荷。反之，要接近真實的情況則必須考慮了離子體積效應的影響，即 Modified Gouy-Chapman theory (MGCT)。Valleau 與 Torrie 在處理一帶電平板浸在完全解離的電解質溶液中的問題時，發現 MGCT 的結果和利用 Monte Carlo 方法模擬的結果相符。¹⁰

由於相關 HepG2 肝癌細胞表面性質的研究至今仍相當缺乏，本研究便以此細胞為研究對象，同時進行細胞電泳實驗與數值模擬以探討其表面特性，所獲得的結果將可提供我們另一種角度去預防或治療肝癌患者。

三、理論與實驗方法

1. 理論模型

如圖 1 所示，我們考慮一表面覆蓋有離子可穿透性薄膜的平板來模擬 HepG2 肝癌細胞，假設細胞薄膜內的固定電荷來自於薄膜內酸鹼官能基的解離，且緩衝溶液中存在一價和二價陽離子。

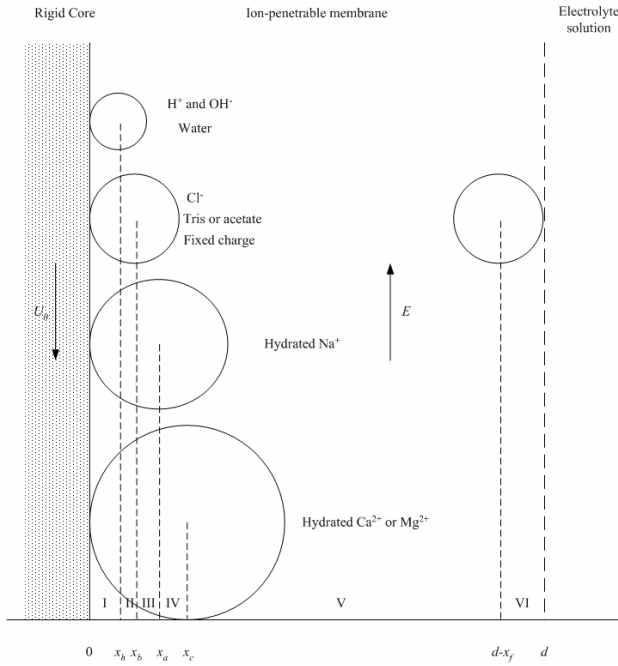


Figure 1. Schematic representation of the problem considered, where an electric field E parallel to the surface of a cell is applied, U_0 is the electrophoretic velocity of the cell, and d is the thickness of membrane layer. The direction of U_0 implies that the surface of the cell contains negative fixed charge. Ion sizes are considered, and the system contains Ca^{2+} or Mg^{2+} .

根據 Poisson 方程式，用來描述薄膜內外的電位方程式為

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{1}{\varepsilon_1}[\rho_{el}(x) + \alpha_f \rho_{fix}(x)] \quad , \quad 0 \leq x \leq d \quad (1a)$$

$$\frac{d^2\phi}{dx^2} = -\frac{\rho_{el}(x)}{\varepsilon_2} \quad , \quad d \leq x \leq \infty \quad (1b)$$

其中， ϕ 為電位，各 α 值為各離子之區域變數，該離子存在時 $\alpha=1$ ，反之 $\alpha=0$ 。 d 為薄膜厚度， ρ_{el} 和 ρ_{fix} 為自由電荷密度與膜內固定電荷密度， ε_1 和 ε_2 分別為薄膜內外的介電常數。假設溶液中的離子呈 Boltzmann 分佈，則 ρ_{el} 可表示為

$$\begin{aligned} \rho_{el} = F[& \alpha_a a C_a^0 \exp\left(\frac{-aF\phi}{RT}\right) + \alpha_c c C_c^0 \exp\left(\frac{-cF\phi}{RT}\right) + \alpha_{H^+} C_{H^+}^0 \exp\left(\frac{-F\phi}{RT}\right) \\ & - \alpha_b b C_b^0 \exp\left(\frac{bF\phi}{RT}\right) - \alpha_{OH^-} C_{OH^-}^0 \exp\left(\frac{F\phi}{RT}\right) + \alpha_{buffer} \text{buffer term}] \end{aligned} \quad (2)$$

其中， a 、 c 和 b 分別為一、二價陽離子價數和一價陰離子價數， C_a^0 、 C_c^0 、 C_b^0 、 $C_{H^+}^0$ 、 $C_{OH^-}^0$ 分別為在體溶液中，一、二價陽離子濃度、一價陰離子濃度、氫離子濃度、和氫氧根離子濃度， F 、 R 、 T 分別為法拉第常數、氣體常數、絕對溫度。

假設薄膜內存在均勻分佈之酸鹼官能

基， H_2A 與 BH^+ ，且二價陽離子 M^{2+} 會和解離後帶負電的官能基發生鍵結反應。若 N_{ma} 及 N_{mb} 分別代表於薄膜內酸鹼官能基的密度，經整理後可得 ρ_{fix} 的表示式為

$$\begin{aligned} \rho_{fix} = & \frac{FN_{mb}}{1 + K_{b1}/C_{H^+}} \\ & + FN_{ma} \left(\frac{K_{a1}K_{m1}C_{H^+}C_{M^{2+}} - K_{a1}C_{H^+} - 2K_{a1}K_{a2}}{C_{H^+}^2 + K_{a1}C_{H^+} + K_{a1}K_{a2} + K_{a1}K_{m1}C_{H^+}C_{M^{2+}} + K_{a1}K_{a2}K_{m2}C_{M^{2+}}} \right) \end{aligned} \quad (3)$$

其中， $K_{a1} = C_{H^+}C_{HA^-}/C_{H_2A}$ 與 $K_{a2} = C_{H^+}C_{A^{2-}}/C_{HA^-}$ 為酸一次、二次解離常數， $K_{b1} = C_{H^+}C_B/C_{BH^+}$ 為鹼一次解離常數， $K_{m1} = C_{HAM^+}/C_{HA^-}C_{M^{2+}}$ 與 $K_{m2} = C_{MA}/C_{A^{2-}}C_{M^{2+}}$ 為二價陽離子一次、二次鍵結常數。

接著考慮系統中的流體為不可壓縮之牛頓流體，使用 Navier-Stokes 方程式描述為

$$\eta_1 \frac{d^2u}{dx^2} - fu + \rho_{el}(x)E = 0 \quad , \quad 0 \leq x \leq d \quad (4a)$$

$$\eta_2 \frac{d^2u}{dx^2} + \rho_{el}(x)E = 0 \quad , \quad d \leq x \leq \infty \quad (4b)$$

其中， η_1 與 η_2 為薄膜內外液體的黏度， E 為所施加平行於平板表面的電場強度， f 為薄膜內的摩擦係數。最後利用有限元素數值方法，將適當的電位與流速邊界條件分別帶入主控方程式(1)與(4)，即可求得生物細胞的電泳遷移率 $\mu = -U_0/E$ 。

2. 實驗方法

本研究利用電泳裝置(Malvern Zeta-sizer 3000)量測 HepG2 肝細胞電泳遷移率的數值。操縱變因包括：溶液的 pH 值、離子強度及二價陽離子的種類。實驗步驟如下：

- (1) 配製含有 2.5 mM NaCl、2.0 mM CaCl_2 、280 mM glucose、10 mM buffer $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (pH 7 to 9) 或 Na-acetate (pH 4 to 6) 的 basic solution，同時使用稀釋過後的 HCl (pH $\approx$ 0.5) 調整溶液至不同的 pH 值。其中使用 glucose 的目的為使溶液的滲透壓維持恆定。
- (2) 實驗所使用的儀器為 Malvern Zeta-sizer 3000，首先熱機 10 min 並事先鍵入溶液的資料，包括介電常數、黏度及溫度。
- (3) 於培養液中取出適量的 HepG2 細胞，並加入預先配製的 basic solution，調整細胞的個數濃度約為 30 萬個/10 cc 左右，靜置 5 min 後即可開始測量。
- (4) 使用針筒吸取適量於步驟 3 中所配製好

之溶液，直接注入儀器的電泳槽中，注射過程必須避免產生氣泡，之後即可測量溶液的電泳遷移率及 zeta 電位。

- (5) 每次實驗後必須注入去離子水清洗電泳槽，才可繼續其他實驗。
- (6) 改變溶液中的二價陽離子(Ca^{2+})濃度，分別為 0.05、0.5、1.0、2.0、5.0 mM，並調整 glucose 的濃度使溶液滲透壓維持恆定。實驗中，固定 basic solution 的 pH 值約 7.2 左右，重複步驟 3-4。
- (7) 改變二價陽離子的種類(Mg^{2+} 、Hexamethonium)，重複上述實驗，測量在不同混合電解質溶液中細胞電泳遷移率的變化情形。

四、結果與討論

模擬結果顯示，離子體積所產生的效應可以分為兩部分：(1) 因為電解質離子考慮體積時進入薄膜內的數量相較於忽略體積時減少，使得遮蔽效應變小，而 $|\mu|$ 變大；(2) 考慮解離官能基體積時其數量相較於忽略體積時減少，使得帶電量減少，而 $|\mu|$ 變小。如圖 1 所示，當解離官能基體積還小時， $|\mu|$ 受到上述第一部分之影響較劇，因此 $|\mu|$ 較忽略離子體積效應時來的大；當解離官能基體積漸漸增大，上述第二部分之影響變大，因此 $|\mu|$ 較忽略離子體積效應時來的小；整體來看，當解離官能基體積漸漸增大時， $|\mu|$ 會持續變小。圖 3 則呈現一價陽離子體積對 μ 的影響，當一價陽離子體積愈大，能進入薄膜內的一價陽離子數量減少，使得遮蔽效應變小，造成 $|\mu|$ 愈大；相反地，當一價陰離子體積愈大時， $|\mu|$ 愈小。

利用擬合方法來獲得 HepG2 肝癌細胞表面性質的步驟為：使用實驗中含有機二價陽離子時其與薄膜內官能基之鍵結常數為 0 來當做數據擬合的開端，先找出無鍵結時其他參數之大小，包含薄膜厚度 d 、酸鹼官能基密度 N_{ma} 、 N_{mb} 和解離常數 K_{a1} 、 K_{b1} ，再利用實驗數據找出 Ca^{2+} 與 Mg^{2+} 之鍵結常數。擬合的實例(Ca^{2+})如圖 4 與 5 所示。

利用上述擬合方法，表 1 列出所有相關 HepG2 肝癌細胞表面性質的參數值。由此表的結果可以發現，忽略離子體積會低估薄膜內官能基密度以及二價陽離子鍵結常數，但不影響酸鹼官能基的解離常數。

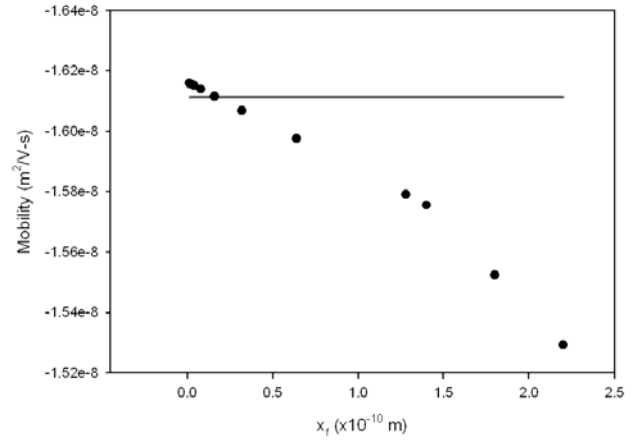


Figure 2. Variation of mobility as a function of fixed charge size for the case when pH=10. Discrete symbols, ionic sizes considered, curve, ionic sizes neglected. Parameters used are, $T=298$ K, $\epsilon_1=\epsilon_2=78.5 \times 8.854 \times 10^{-12}$ C/V-m, $\eta_1=\eta_2=8.91 \times 10^{-4}$ Ns/m², $f=1 \times 10^{10}$ Ns/m⁴, $E=800$ V/m, $d=60$ Å, $N_{ma}=6.2$ mM, $N_{mb}=8.7$ mM, $K_{a1}=2.51$ mM, $K_{a2}=0$, $K_{b1}=2.5 \times 10^{-2}$ mM, $K_{m1}=0$, and $K_{m2}=0$.

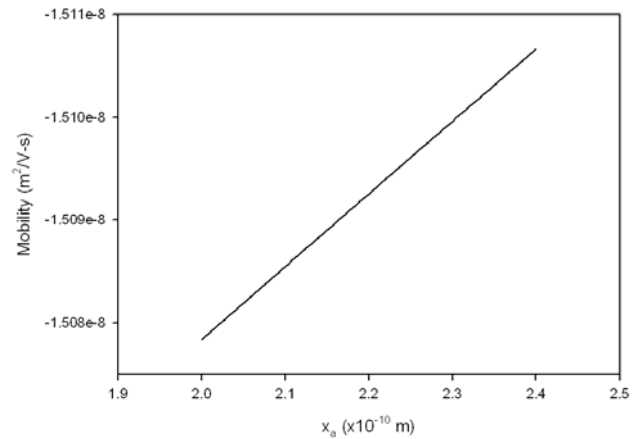


Figure 3. Variation of mobility as a function of scaled effective radius of monovalence cations x_a . Parameters are the same as in Fig. 2.

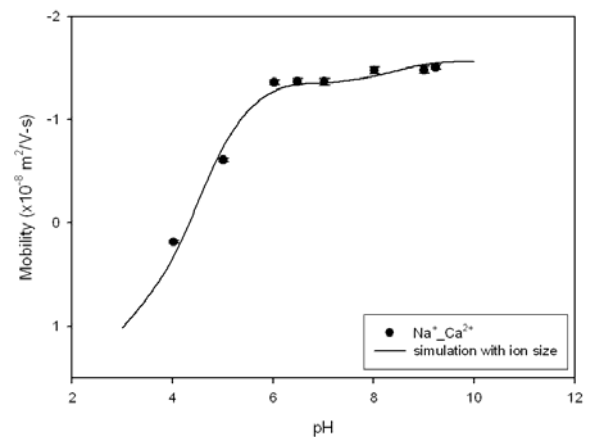


Figure 4. Variation of the mobility of HepG2 cells as a function of pH for the case when cell suspension contains 2.5 mM NaCl, 2 mM Ca^{2+} , and 280 mM glucose. pH is

buffered by either 10 mM $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (pH 7 to 9) or Na-acetate (pH 4 to 6). Discrete symbols, experimental data, the width of error bar represents two standard deviations. Solid curve, simulated result, ionic sizes considered with $K_{mi}=2.5\times10^{-2} \text{ mM}^{-1}$ and other parameters the same as in Fig. 2..

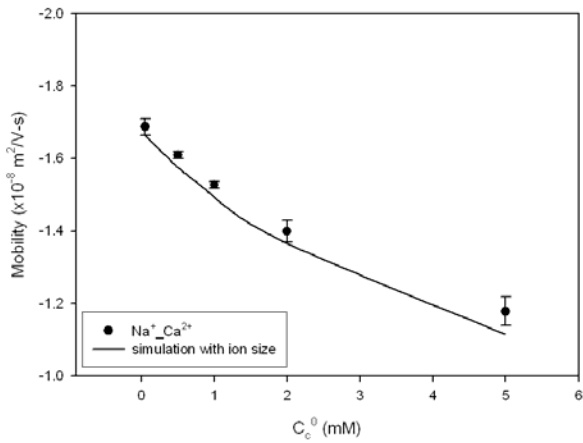


Figure 5. Variation of the mobility of HepG2 cells as a function of the concentration of Ca^{2+} . pH is buffered at about 7.2 by 10 mM $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$. Discrete symbols, experimental data, the width of error bar represents two standard deviations. Solid curve, simulated result, ionic sizes considered with $K_{mi}=2.5\times10^{-2} \text{ mM}^{-1}$ and other parameters the same as in Fig. 2.

Table 1. Summary of the results of fitting parameters.

	Ignoring volume of ions			Considering volume of ions		
	hexamethonium	Ca^{2+}	Mg^{2+}	hexamethonium	Ca^{2+}	Mg^{2+}
d (Å)	60	60	60	60	60	60
N_{ma} (mol/m ³)	6.2	6.2	6.2	6.6	6.6	6.6
N_{mb} (mol/m ³)	8.7	8.7	8.7	9.4	9.4	9.4
K_{bl} (mol/m ³)	2.5e-2	2.5e-2	2.5e-2	2.5e-2	2.5e-2	2.5e-2
K_{ml} (m ³ /mol)	0	2e-2	9.5e-3	0	2.5e-2	1.8e-2

五、参考文献

- [1] D. C. Prieve, and E. Ruckenstein, *J. Theor. Biol.* 56 (1976) 205-228.
- [2] T. W. Healy, D. Chan, and L. R. White, *Pure Appl. Chem.* 52 (1980) 1207-1219.
- [3] S. Kawahata, E.V. Ohshima, N. Muramatsu, and T. Kondo, *J. Colloid Interface Sci.* 138 (1990) 182-282.
- [4] K. Morita, N. Muramatsu, H. Ohshima, and T. Kondo, *J. Colloid Interface Sci.* 147 (1991) 457-461.
- [5] K. Makino, M. Ikekita, T. Kondo, S. Tanuma, and H. Ohshima, *Colloid Polym. Sci.* 272 (1994) 487-492.
- [6] K. Makino, F. Fukai, T. Kawaguchi, and H. Ohshima, *Colloids Surfaces B* 5 (1995) 221-226.

- [7] S. Levine, M. Levine, K. A. Sharp, and D. E. Brooks, *Biophys. J.* 42 (1983) 127-135.
- [8] H. Ohshima and T. Kondo, *J. Colloid Interface Sci.* 116 (1987) 305-311.
- [9] S. Tseng, S. H. Lin, and J. P. Hsu, *Colloids Surfaces B* 13 (1999) 277-286.
- [10] J. P. Valleau and G. M. Torrie, *J. Chem. Phys.* 76 (1982) 4623-4630.