

· 基础研究 ·

高压氧对鼻咽癌细胞增殖与死亡的影响及其机制研究

王素娥 彭争荣 刘娟 钟卫红 肖平田

【摘要】目的 研究高压氧(HBO)对人鼻咽癌细胞增殖与死亡的影响及其机制。**方法** 将实验培养的人鼻咽癌 CNE2Z 细胞分为对照组、HBO 1 组(0.20 MPa)和 HBO 2 组(0.25 MPa)。采用甲基噻唑基四唑(MTT)法分析细胞增殖抑制率,碘化丙啶(PI)染色观察细胞死亡情况,并采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 的含量,硫代巴比妥法测定 MDA 的含量。**结果** HBO 1 组和 HBO 2 组的细胞增殖抑制率、死亡率均较对照组增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);HBO 2 组的细胞增殖抑制率、死亡率较 HBO 1 组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);3 组 SOD 的含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);3 组 MDA 含量比较差异有统计学意义($P < 0.01$),HBO 1 组和 HBO 2 组人鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MDA 含量均较对照组增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);HBO 2 组的 MDA 含量较 HBO 1 组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HBO 处理增加实验培养的人鼻咽癌 CNE2Z 细胞增殖抑制率、死亡率,提高鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MDA 含量,从而提示 HBO 处理可能是通过增加鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MDA 含量而抑制鼻咽癌细胞的增殖,促进鼻咽癌细胞的死亡。

【关键词】 鼻咽癌细胞; 高压氧; 增殖抑制率; 死亡率; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

The effect of hyperbaric oxygen on the proliferation and death of nasopharyngeal carcinoma cells and its mechanisms WANG Su-e*, PENG Zheng-rong, LIU Juan, ZHONG Wei-hong, XIAO Ping-tian. * Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: PENG Zheng-rong, Email: pengzr138@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on the proliferation and death of human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells and the mechanisms underlying any effect. **Methods** Cultured CNE2Z line nasopharyngeal carcinoma cells were divided into 3 groups randomly. Group A was a control group; Group B received HBO at 0.20 MPa; Group C received HBO at 0.25 MPa. The inhibition ratio of proliferation (IROP) in all groups was detected with an MTT reduction assay, and the mortality rate (MR) was detected by PI staining. Levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were also measured. **Results** The IROP and MR in the B and C groups increased significantly compared with group A, and there was also a statistically significant difference between groups B and C. There was no significant difference in SOD levels among the groups, but there was a statistically significant difference in the MDA levels, with MDA in groups B and C higher than in group A. There was also a significant difference between the B and C groups. **Conclusions** HBO can increase IROP and MR in human NPC CNE2Z line cells, and elevate their MDA content. This suggests that HBO might inhibit the proliferation of NPC cells and promote their necrosis by increasing MDA levels.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Nasopharyngeal carcinoma; Inhibition ratio of proliferation; Mortality rate; Superoxide dismutase; Malondialdehyde

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种常见的恶性肿瘤,主要为低分化鳞状细胞癌,其中晚期患者的5年生存率仅50%左右^[1]。实验和临床资料证实,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)能提高肿瘤细胞

氧合、纠正肿瘤细胞缺氧^[2]、增强肿瘤细胞对射线的敏感性^[3]、增加肿瘤的局部控制率和患者的5年生存率^[4],然而国内外有关 HBO 对鼻咽癌细胞增殖与死亡的影响及其机制的研究尚不多^[5]。本研究拟从细胞水平观察 HBO 处理后人鼻咽癌细胞系 CNE2Z 细胞增殖抑制率和死亡率及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化,探讨 HBO 对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖与死亡的影响及其机制。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.02.006

作者单位:410008 长沙,中南大学湘雅医院中西医结合研究所,国家中医药管理局中医肝脏象重点研究室(王素娥),高压氧科(彭争荣、刘娟、钟卫红、肖平田)

通信作者:彭争荣,Email: pengzr138@yahoo.com.cn

材料与方法

一、实验材料及仪器

人鼻咽癌 CNE-2 细胞株(由湘雅医学院肿瘤研究所提供);甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)溶液(USA, Sigma);二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO)(上海西宝生物技术有限公司);CO₂ 培养箱(Japan, ESPEC);SOD 检测试剂(南京建成);MDA 检测试剂(南京建成);0.25% 胰酶(USA, Sigma);倒置显微镜(USA, Micro Star AO)、荧光显微镜(Japan, Olympus);低温离心机(珠海黑马);TGL-16G 台式离心机(上海安亭);721 nm 分光光度计(上海光谱);酶标仪(USA, Bio-Rad model 1450);超净工作台(上海明星电子设备厂);婴幼儿氧气加压舱(武汉船舶设计研究所, YLCO.5/1A)。

二、主要试剂配置

1. RPMI(Roswell Park Memorial Institute)-1640 培养基:将一包 RPMI-1640 干粉(Gibco Co.)溶于三蒸水中,加适量 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2,定容 1L,正压过滤除菌后分装,置于 -20℃ 保存。用于 CNE2Z 细胞培养时,加入小牛血清至浓度为 15%。

2. 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)溶液:NaCl 8 g, KCl 0.2 g, NaHPO₄ · 12H₂O 1.54 g, KH₂PO₄ 0.2 g,溶解后调 pH 至 7.0,定容 1 L,分装后高压灭菌,4℃ 保存。

3. MTT 溶液:MTT 5 g/L,0.01 mol/L PBS 配制,用 0.22 μm 微孔过滤器过滤除菌,放入 4℃ 冰箱内避光保存。

三、方法

1. 细胞培养:人鼻咽癌 CNE-2 细胞株置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养,培养液为 RPMI-1640,含 10% 小牛血清。待培养瓶中液体颜色变黄时更换培养液,当细胞长满瓶底时,用 0.5% 胰酶加 0.2% 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)于室温下消化传代。

2. 实验分组:本实验分为对照组、HBO 1 组和 HBO 2 组。对照组细胞不做处理,HBO 1 组细胞采用 0.20 MPa(ATA)HBO 处理 90 min,HBO 2 组细胞用 0.25 MPa(ATA)HBO 处理 90 min。

3. HBO 处理方法:将 HBO 1 组和 HBO 2 组 CNE2Z 人鼻咽癌细胞置于 YLCO/1A 型婴儿氧舱内,先以 10 L/min 的氧流量进行门缝洗舱 5 min,提高舱内氧浓度至 55% 以上,然后以 5~8 L/min 氧流量均匀变速加压,加压时间为 15 min,使舱内压力达到 0.20 MPa(HBO 1 组)和 0.25 MPa(HBO 2 组)时开始稳压,稳压时氧浓度达到 85% 以上,稳压时同时打开

加、减压阀,以 3~5 L/min 的氧流量持续小流量洗舱,稳压吸氧 60 min 后,均匀变速减压,减压时间为 15 min,总治疗时间为 90 min,共 2 次(2 次治疗的间隔时间 >4 h)。

4. MTT 法分析细胞增殖抑制情况:取指数生长期人鼻咽癌 CNE-2 细胞,胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液,计数后用梯度稀释至约 12 000 个/ml,96 孔培养板每孔加 200 μl 细胞悬液,每组 6 孔,种 4 块板,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养至贴壁。分别经 3 组中方法处理后,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h,加入 5 g/L MTT 溶液 20 μl,继续培养 4 h,翻转法弃去培养液,加入 200 μl DMSO,置 37℃ 培养箱中 10 min,酶标仪检测 492~630 nm 波长吸光值(A 值)。以空白孔调零。按 $IC = [(1 - \text{实验组 A 值均数} / \text{对照组 A 值均数}) \times 100\%]$ 公式计算细胞增殖抑制率(IC)。

5. 碘化丙啶观察细胞死亡情况:取指数生长期人鼻咽癌 CNE-2 细胞,接种于 6 孔培养板,种 6 孔,细胞贴壁后,分别经 3 组中方法处理,48 h 后 PBS 洗 2 次,加入 50 mg/L 碘化丙啶,用荧光显微镜观察。活细胞因细胞膜保持完整而拒染,凋亡细胞低染,坏死细胞高染。随机计数 500 个细胞,染红色荧光者为阳性,未染色者为阴性,计算细胞死亡率(细胞死亡率 = 阳性细胞数/细胞总数)。

6. 人鼻咽癌 CNE2Z 细胞 SOD、MDA 检测:取指数生长期人鼻咽癌 CNE-2 细胞,分别经 3 组中方法处理,48 h 后取样本液 0.1~0.2 ml 注入冰盒内 EP 管中,用低温离心机以 3000 转/分离心 10 min,上清液密封保存于 -70℃ 低温保存箱内保存。严格按试剂盒说明采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 的含量、硫代巴比妥法测定 MDA 的含量。

四、统计学分析

所有数据均用 SPSS 11.0 版统计软件处理。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,α = 0.05 为检验标准。2 组间比较采用成组设计均数 *t* 检验,对多组计量资料进行单因素方差分析,方差齐者采用 LSD 检验进行均数间多重比较,而方差不齐者采用 Tamhane's T2 法进行分析。

结 果

一、MTT 法分析细胞增殖抑制情况

HBO 2 组鼻咽癌 CNE2Z 细胞增殖抑制率较 HBO 1 组增加,2 组比较,差异有统计学意义($t = -2.347, P < 0.05$)。见表 1。

二、PI 染色观察细胞死亡情况

3 组鼻咽癌 CNE2Z 细胞死亡率比较差异有统计学意义($F = 67.805, P < 0.01$),HBO 2 组细胞死亡率

较 HBO 1 组增加,差异有统计学意义($t = -2.804$, $P < 0.05$);而 HBO 1 组细胞死亡率大于对照组,差异亦有统计学意义($t = -8.330$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组鼻咽癌 CNE2Z 细胞增殖抑制率与死亡率的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组 别	细胞增殖抑制率	细胞死亡率
对照组	—	1.43 ± 0.51
HBO 1 组	7.74 ± 4.28^a	4.00 ± 0.56^{bc}
HBO 2 组	13.58 ± 4.35	4.88 ± 0.53^c

注:与 HBO 2 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与对照组比较,^c $P < 0.05$

三、SOD、MDA 含量改变情况

3 组 SOD 的含量比较差异无统计学意义($F = 2.764$, $P > 0.05$);3 组 MDA 含量比较差异有统计学意义($F = 32.403$, $P < 0.01$),HBO 1 组和 HBO 2 组人鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MDA 含量均较对照组增加,差异有统计学意义($t = 6.495$, $P < 0.01$; $t = 7.071$, $P < 0.01$);HBO 2 组的 MDA 含量较 HBO 1 组增加,差异有统计学意义($t = 2.703$, $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组鼻咽癌 CNE2Z 细胞 SOD、MDA 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	SOD(U/ml)	MDA (nmol/ml)
对照组	83.29 ± 18.49	3.80 ± 0.78^a
HBO 1 组	99.29 ± 18.28	6.45 ± 0.62^b
HBO 2 组	75.14 ± 17.51	7.94 ± 1.20

注:与 HBO 1 组和 HBO 2 组比较,^a $P < 0.01$;与 HBO 2 组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

鼻咽癌多发生在我国南方,由于鼻咽部特殊的解剖结构,单纯手术难以根治。鼻咽癌多数为低分化鳞癌,对射线具有较高的敏感性,故目前国内外主要采用放射治疗。但患者的 5 年生存率较低,仅为患病人群的 50% 左右^[1],局部复发和远处转移率高。近几年来,HBO 治疗已经广泛地应用于临床,对某些恶性肿瘤的放疗增敏及其相关症状与疾病的治疗(如放射性脑病、放射性膀胱炎、放疗后综合征等)均取得了较好的疗效^[6],但 HBO 对鼻咽癌细胞增殖与死亡的影响国内外研究尚不多^[5]。本研究拟从细胞水平探讨 HBO 对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖与死亡的影响及其机制。

细胞的失控性生长是肿瘤最基本的生物学特征之一,因此抑制肿瘤细胞的生长、促进细胞死亡是治疗肿瘤的基本途径之一,也是抗癌治疗的基本要求。本研究采用了 MTT 比色法观察 HBO 对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖的抑制作用,采用 PI 染色观察 CNE-2 细胞的死亡

情况。结果显示,HBO 对 HBO 1 组和 HBO 2 组鼻咽癌细胞增殖有不同程度的抑制作用;对鼻咽癌细胞的死亡都有促进作用,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。这说明 HBO 能抑制鼻咽癌 CNE-2 细胞的增殖^[7],并促进鼻咽癌 CNE-2 细胞的死亡。这与 McDonald 等^[8]研究结果一致,他们对 40 只以 9,10-二甲基-1,2 苯并蒽制成颊囊癌模型的金色叙利亚地鼠进行观察,20 只地鼠进行 30 次 $2.8 \text{ ATA} \times 60 \text{ min}$ HBO 治疗,20 只作为对照。结果显示 HBO 治疗组动物肿瘤体积明显小于对照组。

自由基是含有不配对电子的原子、原子团或分子的总称。在生理情况下,机体内不断产生自由基,同时也不断地分解清除,使其维持在一个正常的生理水平。某些病理情况可造成自由基产生和清除功能失去平衡,氧自由基过多将导致细胞损伤、衰老或肿瘤发生等^[9]。SOD 是清除氧自由基最重要的酶之一,它的活性反映了机体清除氧自由基的能力^[10]。氧自由基可引起脂质过氧化反应损伤细胞膜,进而导致细胞死亡,其终产物 MDA 的含量亦间接反映了机体细胞被自由基损伤的程度。研究发现,几乎所有癌细胞的 SOD 和过氧化氢酶的活性都明显低于正常细胞^[11]。而这几种酶是细胞清除氧自由基的主要酶,所以癌细胞清除氧自由基的能力低下,对氧自由基十分敏感。也就是说,氧自由基对癌细胞有选择性杀伤力。而 HBO 能有效提高肿瘤组织的氧分压,改善肿瘤氧合状况,促进机体内氧自由基增多^[12]。本实验研究结果也显示,3 组 SOD 的含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$);而 3 组 MDA 含量比较差异有显著统计学意义($P < 0.01$),HBO 1 组和 HBO 2 组人鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MDA 含量均较对照组明显增加($P < 0.01$)。这说明 HBO 处理下人鼻咽癌细胞内的氧化与抗氧化平衡更进一步失调,抗氧化物质含量和活性下降,自由基生成增多,脂质过氧化作用增强,从而可造成肿瘤细胞的死亡。这与 Lian 等^[13]的研究结果相同。

从本实验结果还可知,HBO 2 组鼻咽癌细胞的增殖抑制率、死亡率更高,与 HBO 1 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),而 HBO 2 组的 MDA 含量较 HBO 1 组增加,2 组比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。这说明了 HBO 对鼻咽癌细胞增殖抑制率、死亡率的影响和 HBO 增加人鼻咽癌细胞 MDA 含量都与 HBO 处理的压力有一定关系,并且这种随 HBO 压力提高鼻咽癌细胞 MDA 含量增加,HBO 对鼻咽癌细胞增殖抑制率、死亡率也增加,是否也提示了 HBO 抑制鼻咽癌细胞的增殖和促进鼻咽癌细胞的死亡是通过 HBO 增加鼻咽癌细胞 MDA 含量来实现的,这有待更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Zeng Q, Guo X, Li NW, et al. Clinical characteristics and prognosis of aged nasopharyngeal carcinoma patients: a report of 313 cases. *Ai Zheng*, 2008, 27: 289-294.
- [2] Schönmeier BH, Wong AK, Reid VJ, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on squamous cell cancer growth and tumor hypoxia. *Ann Plast Surg*, 2008, 60: 81-88.
- [3] Kunugita N, Kohshi K, Kinoshita Y, et al. Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models. *Cancer Lett*, 2001, 164: 149-154.
- [4] Kohshi K, Yamamoto H, Nakahara A, et al. Fractionated stereotactic radiotherapy using gamma unit after hyperbaric oxygenation on recurrent high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 2007, 82: 297-303.
- [5] Sun TB, Chen RL, Hsu YH. The effect of hyperbaric oxygen on human oral cancer cell. *Undersea Hyperb Med*, 2004, 31: 251-260.
- [6] Stuhr LE, Iversen VV, Straume O, et al. Hyperbaric oxygen alone or combined with 5-FU attenuates growth of DMBA-induced rat mammary tumors. *Cancer Lett*, 2004, 210: 35-40.
- [7] Feldmeier J, Carl U, Hartmann K, et al. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy? *Undersea Hyperb Med*, 2003, 30: 1-18.
- [8] McDonald K, Bradfield J, Kinsella J, et al. Effect of hyperbaric oxygenation on existing oral mucosal carcinoma. *Laryngoscope*, 1996, 106: 957-959.
- [9] Chen ML, Li J, Xiao WR, et al. Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2006, 31: 635-639.
- [10] Gadjeva V, Dimov A, Georgieva N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma. *J Clin Pharm Ther*, 2008, 33: 179-185.
- [11] Sanchez M, Torres JV, Tormos C, et al. Impairment of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in advanced epithelial ovarian carcinoma of a Spanish community. *Cancer Lett*, 2006, 233: 28-35.
- [12] Daruwalla J, Christophi C. Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review. *World J Surg*, 2006, 30: 2112-2131.
- [13] Lian QL, Hang RC, Yan HF, et al. Effects of hyperbaric oxygen on S-180 sarcoma in mice. *Undersea Hyperb Med*, 1995, 22: 153-160.

(修回日期:2009-06-15)

(本文编辑:松 明)

· 消息 ·

2010 康复论坛暨 WHO 康复培训班 20 周年庆典 将于 4 月在武汉举行

方心让教授在上世纪 80 年代提出的“十年千人”中国康复医学人才培养项目,从启动至今已经 20 周年。该项目与 WHO 联合在武汉同济医学院和安徽医科大学开办培训班,先后共培训学员 430 余人,目前大多工作在全国各地康复医学的重要岗位上,有的业已登上国际舞台,为康复医学事业发展起着重要作用。

为了纪念“十年千人”项目实施 20 周年,拟于 2010 年 4 月 17-20 日在武汉同济医院举办“2010 康复论坛暨 WHO 康复培训班 20 周年庆典”,一方面对当年的教学工作进行阶段性评估与总结,另一方面通过学员工作、学术交流,展示 20 年来康复医疗、教学、培训、科研成果,促进今后中国康复事业的进一步发展。

这次活动的主题是“发展我国康复医学:机遇与挑战”,会议将议题包括:临床康复路径、医疗与社区关系、医改对康复的影响、学科建设、循证康复与康复特色技术等,将邀请国内外专家讲座,安排多种形式的交流、座谈和联欢,提供多层面的信息和交流平台。

我们诚邀请各位老师和学员重返母校参加大会,筹委会将以热诚的心来款待每一位参加者,将竭尽所能为大家举办一个既充实而又极具启发性的盛会。

会议时间:2010 年 4 月 17-20 日

会议地点:武汉同济医院

筹委会地址:湖北武汉汉口解放大道 1095 号同济医院康复科资源中心,邮编 430030

电话:(027)83663347 传真:(027) 83648310

电邮:rehabcc@163.com 联系人:许涛

会议网站:<http://www.rehabcc.net/>

WHO 康复培训与研究合作中心(武汉)

WHO 复康协作中心(香港)