

· 基础研究 ·

热疗对人胃癌细胞 MKN28 的细胞周期及节律基因 Bmal1 影响的实验研究

魏柏 熊枝繁 侯炜

【摘要】目的 研究加热对胃癌 MKN28 细胞周期变化是否与节律基因 Bmal1 表达相关,为胃癌择时热疗提供理论依据。**方法** 体外复苏和培养胃癌细胞 MKN28;对照组 37 ℃ 下培养,实验组 43 ℃ 分别加热 0.5 h、1.0 h 和 1.5 h,用显微镜观察细胞形态变化,采用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测细胞增殖抑制率;采用流式细胞术检测细胞周期分布的变化;采用实时定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 Bmal1 基因表达变化。**结果** 加热后细胞形态发生显著变化,MTT 实验提示 37 ℃ 加热对细胞生长无明显抑制,细胞 43 ℃ 热疗 0.5 h、1.0 h 和 1.5 h 后细胞抑制率分别为 $(21.76 \pm 4.36)\%$ 、 $(25.30 \pm 4.36)\%$ 和 $(27.62 \pm 3.78)\%$,处理后细胞的增殖均受到抑制且抑制趋势具有时间依赖性;流式细胞术显示 43 ℃ 加热 1 h 后 G0/G1 最短而 G2/M 最长,同时实时定量 RT-PCR 结果显示 Bmal1 mRNA 表达最低,细胞周期 G0/G1 变化规律和 Bmal1 mRNA 变化规律一致。**结论** 热疗可改变胃癌细胞周期及钟基因 Bmal1 表达,提示择时热疗的可行性。

【关键词】 热疗; 胃癌 MKN28 细胞; 节律基因 Bmal1; 细胞周期

Influence of hyperthermia on cell cycle and rhythm gene Bmal1 expression in gastric cancer MKN28 cells

WEI Bai*, XIONG Zhi-fan, HOU Wei. * Department of Gastroenterology, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430071, China

Corresponding author: XIONG Zhi-fan, Email: trowell249@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the cell cycle blocked by hyperthermia and the expression of rhythm gene Bmal1 in gastric cancer MKN28 cells so as to provide the academic evidence in hyperthermia therapy for gastric cancer. **Methods** The MKN28 cells were resuscitated and cultured in vitro. In control group MKN28 cells were cultivated at 37 ℃. In experimental groups MKN28 cells were heated at 43 ℃ for different durations. The cell morphology was observed by microscopy. Methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay was adopted to evaluate the inhibitory effect of the cell line. The flow-cytometry was adopted to observe the influence on the cell cycle. The Bmal1 mRNA expression was investigated by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The remarkable changes of cell morphology were observed by microscopy after exposure to heating. According to the data of MTT assay, 37 ℃ heating could not inhibit the proliferation of MKN28. The inhibitive rates of cell growth after 0.5 h, 1 h, 1.5 h at 43 ℃ was $(21.76 \pm 5.46)\%$, $(25.30 \pm 4.36)\%$ and $(27.62 \pm 3.78)\%$, respectively. Results from flow-cytometry showed that G0/G1 phase cells in 1h at 43 ℃ were remarkably less than those in the control group. However G2/M cells were significantly more than those in the control group. The mRNA expression of Bmal1 was the lowest when heating 1h at 43 ℃ as compared to the control group. **Conclusions** Hyperthermia could induced the cell cycle changes and the expression of Bmal1 in gastric cancer MKN28 cells.

【Key words】 Hyperthermia; Gastric cancer MKN28 cell; Rhythm gene Bmal1; Cell cycle

目前热疗被认为是继手术、放疗、化疗、生物疗法之后的第 5 种治疗肿瘤的方法,细胞培养、动物模型、临床应用等研究证明,热疗是一种有效的肿瘤治疗方

法^[14]。时间生物学研究发现,根据肿瘤节律特征进行治疗可以提高疗效并降低治疗措施自身的毒副作用,但有关热疗和节律基因间相关性的研究却鲜有报道。本研究对胃癌细胞 MKN28 细胞进行水浴加热持续不同时间,观察热疗作用于胃癌细胞系后细胞形态、增殖凋亡、细胞周期变化,旨在通过观察热疗对 Bmal1 (brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like-1, Bmal1) 的调节作用,为临床择时热疗提供理论依据。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.01.007

作者单位:430071 武汉,华中科技大学同济医学院附属梨园医院消化内科(魏柏、熊枝繁);武汉大学医学病毒学研究所/病毒学国家重点实验室(侯炜)

通信作者:熊枝繁,Email:trowell249@sina.com

材料与方法

一、细胞培养

将细胞接种于 100 ml 培养瓶中,在含 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, DMEM) 的培养液中常规培养,取对数生长期的细胞进行加热处理。

二、加热实验

取对数生长期的细胞,用 0.25% 的胰酶消化,磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 洗 3 次,配成单细胞悬液调整浓度为 $1 \times 10^5/L$,接种 6 孔板,每组设 3 个复孔。对照组 37 °C 常规培养,不给予加热处理。实验组细胞置于恒温水浴箱 43 °C 分别持续加热 0.5 h、1.0 h、1.5 h,将热处理后的细胞换新鲜的 10% 培养基并放回培养箱 37 °C 继续培养 24 h 后收集细胞。

三、细胞形态观察

处理后的细胞置于倒置显微镜下观察细胞的生长情况及形态变化。

四、四甲基偶氮唑盐比色法测定细胞抑制率

取热处理后培养 24 h 的细胞,胰酶常规消化后接种 96 孔板,100 μl /孔,再将每孔加入噻唑蓝溶液 20 μl ,在避光条件下培养 4 h,每孔加入二甲基亚砷溶液 150 μl ,振荡后 10 min,用酶联免疫检测仪测定每孔的光密度值,波长为 570 nm。根据各组测得的吸光度值计算生长抑制率,公式如下:细胞生长抑制率 = $(1 - \text{试验组平均吸光度值} / \text{对照组平均吸光度值}) \times 100\%$ 。

五、实时定量 RT-PCR 检测

引物由上海生工合成, Bmal1 (NM-001178) 上游引物序列为 5'-GTACCAACATGCAACGCAATG-3'; 下游引物序列为 5'-TGTGTATGGATTGCTGGCACC-3'; β -actin (NM-001101) 上游引物序列为 5'-GTCCACCGCAAATGCTTCTA-3'; 下游引物序列为 5'-TGCTGTCACCTTCACCGTTC-3'。第一步提取上述细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA; 第二步做定量 PCR, 95 °C 10 min; 接着 95 °C, 15 s; 62 °C, 60 s, 重复 40 个循环; 同时以 β -actin 作为内参, 定量 PCR 的结果采用比较法测定目的基因的相对表达, 即目的基因量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 为热疗组 Bmal1 基因 mRNA 表达拷贝数与对照组相比的倍数。 $\Delta\Delta C_t = (\text{热疗组目的基因 } C_t \text{ 值} - \text{热疗组 } \beta\text{-actin 的 } C_t \text{ 值}) - (\text{对照组 } C_t \text{ 值} - \text{对照组 } \beta\text{-actin } C_t \text{ 值})$ 。

六、流式细胞仪测定细胞周期

收集前述热处理后继续培养的细胞, PBS 洗涤后用 70% 乙醇固定过夜, 再用 4 °C PBS 洗涤, 加入 RNA 酶 (100 $\mu g/ml$) 处理 30 min, 最后用 50 $\mu g/ml$ PI (Pro-

pidium Iodide, 碘化丙啶) 避光染色 30 min 后上流式细胞仪检测细胞周期变化。

七、统计学分析

所测数据采用 SPSS 11.0 版统计软件对其均数进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞形态学变化的观察

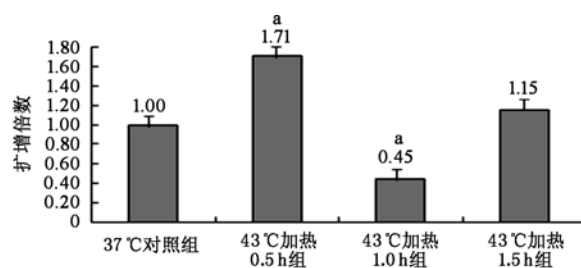
倒置显微镜下观察细胞, 未处理的 MKN28 细胞贴壁生长, 呈长梭形或多角形, 排列均匀, 细胞形态完整, 细胞核大, 核仁明显; 热处理后 MKN28 43 °C 热疗 1.5 h 细胞胞体变圆变小, 折光性增强, 分裂相的细胞数目减少, 仅有少数细胞贴壁, 可见部分细胞肿胀, 胞膜破坏, 连续性中断。

二、加热对胃癌细胞 MKN28 细胞生长的影响

四甲基偶氮唑盐比色法结果显示, 与 37 °C 组细胞相比, 细胞 43 °C 热疗 0.5 h、1.0 h 和 1.5 h 后细胞抑制率分别为 $(21.76 \pm 5.46)\%$ 、 $(25.30 \pm 4.36)\%$ 和 $(27.62 \pm 3.78)\%$, 提示 43 °C 细胞的增殖均受到抑制, 而且随着加热时间的延长其抑制细胞生长的作用也逐渐增强, 呈现一定时间依赖性。

三、加热对节律基因 Bmal1 表达的影响

实时定量 RT-PCR 检测结果如定量直方图所示 (图 1), 可见胃癌细胞 MKN28 各组中 Bmal1 确有表达; 同时提示对照组 37 °C 和 43 °C 热疗 1.0 h 及 0.5 h 组 Bmal1 表达有差异, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 其中以 1 h 达最低 (为对照组的 0.45 倍), 0.5 h 达最高 (为对照组的 1.71 倍)。上述结果提示热疗确实可导致钟基因变化, 为下一步热剂量选择提供了依据。



注: 与对照组比较, $^a P < 0.05$

图 1 加热不同时间 Bmal1 mRNA 表达量

四、加热对胃癌细胞生长周期的影响

体外培养的胃癌细胞至对数生长期, 将培养瓶密封浸没于恒温水浴槽内以 43 °C 0.5 h、1.0 h、1.5 h 热疗, 热疗后换液并放回 37 °C 细胞培养箱进行复温孵育, 于复温 24 h 收集细胞, 行流式细胞仪检测细胞周期变化。从图 2 可见热疗各组细胞周期 G0/G1 较 37 °C 对照组 (76.2%) 缩短, 且随热疗时间先缩短后延长, 其中 G0/

G1 期在 1 h 达最短(62.7%),1.5 h 达最长(72.8%),G2/M 期在 1 h 达最长(18.1%),1.5 h 达最短(12.3%),且与 37 °C 对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。此结果提示细胞热疗后 Bmal1 表达有改变,细胞周期变化和 Bmal1 表达变化趋势一致。

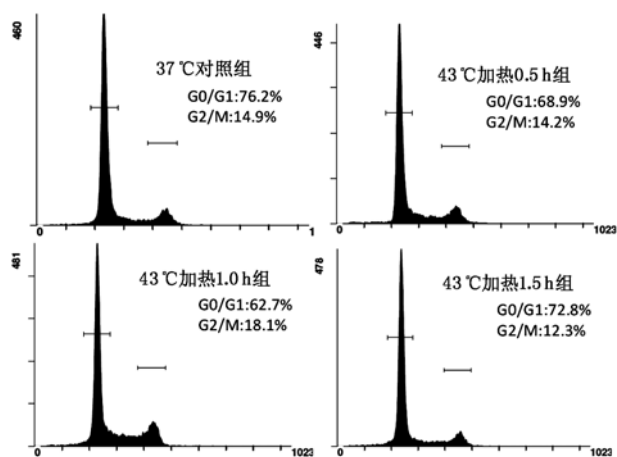


图 2 不同条件热处理后细胞周期变化

讨 论

热疗是一种有效的肿瘤辅助治疗方法^[5]。研究表明,热作用既可诱发细胞凋亡,又可对细胞产生直接致死效应^[6],同时加热也影响细胞周期的正负调节因子,使细胞周期发生改变,可见抗肿瘤的效应是由温度的高低和加热时间的长短决定的^[7-8]。为排除假阳性可能,本实验采用同一批培养的 MKN28,保证细胞培养条件及细胞活力状态一致,使实验结果可靠并具有可比性。本实验通过体外实验,比较传统热疗温度对体外培养胃癌细胞生长、细胞周期及节律基因 Bmal1 表达的影响。

既往研究证实,在临界温度以下诱导细胞凋亡为热作用的主要机制,而临界温度以上则主要引起细胞坏死^[9],43 °C 被认为是细胞凋亡的临界温度,也是临床应用最多的热疗温度。本研究显示,43 °C 与 37 °C 相比,胃癌细胞 MKN28 细胞株对传统热疗温度 43 °C 敏感性较好,细胞增殖抑制率上升,细胞增殖抑制率随加热时间的延长而增高,且差异具有统计学意义。这将为胃癌热疗方案的选择提供理论依据。

细胞周期是由 G0、G1、S、G2 和 M 期组成的复杂的过程,其进程受到各种细胞周期调节因子的调控,任何环节的变化会导致细胞周期分布异常。热处理肿瘤细胞后,细胞立即发生应激反应,细胞应激反应过程中的首发事件是细胞周期阻滞,也就是说热疗可引起细胞周期再分布^[10]。本研究结果显示,G0/G1 期在 1 h 达最短,1.5 h 达最长,G2/M 期在 1 h 达最长,1.5 h 达

最短,可见胃癌细胞热处理后细胞周期的再分布,提示 43 °C 加热 1 h 造成胃癌细胞 G1 缩短,大量细胞进入对热疗敏感的 S 期,同时 G2/M 期细胞堆积,提示 43 °C 加热 1 h 胃癌细胞对热刺激最敏感且细胞损伤严重;而加热 1.5 h 造成胃癌细胞在 G1 期阻滞,不能进入 S 期,且细胞损伤减轻,考虑和热耐受相关。上述结果和既往文献报道的肺癌细胞、宫颈癌细胞等有所不同。不同热剂量增加肿瘤细胞热敏感性还是热耐受性目前尚不明了,我们推测造成胃癌细胞周期分布异常的机制可能与热刺激改变细胞内某些基因及其产物的转录和翻译不同等相关。

昼夜生物节律是广泛存在的生命现象,这种节律发生的物质基础就是昼夜节律生物钟,构成生物钟的基因主要有 Clock, Bmal1, Per1, Per2 等。近年来钟基因和肿瘤的相关性引起许多学者们的重视。Bmal1 处于钟基因体系的上游,是反映生物钟基因节律的一个重要指标,其表达产物是正反馈环路的调节因子之一,参与细胞周期的调控,最终使得器官组织和细胞水平的生命活动高度有序协同。感染或自身免疫性疾病可通过肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 调整钟基因表达变化^[11],但高温对 Bmal1 的影响鲜见报道,故我们选择胃癌细胞经过不同时间水浴热疗后,观察 Bmal1 表达水平的变化。本研究在体外培养的胃癌细胞株 MKN28 中检测出节律基因 Bmal1 的表达,首次证实了节律基因 Bmal1 在胃癌细胞 MKN28 中的表达,并发现以 43 °C 加热 1 h 后 Bmal1 mRNA 达最低,0.5 h 最高,即加热可改变 Bmal1 表达。这一结果提示 MKN28 中 Bmal1 是非缺陷的,热疗可以诱导胃癌细胞中节律基因 Bmal1 的振荡。值得注意的是,同一时间流式细胞仪检测 MKN28 热处理后细胞周期改变和实时定量 PCR 法测定 Bmal1 mRNA 表达趋势一致,提示 43 °C 加热 1 h 减弱了钟基因节律正反馈环路中 Bmal1 的表达,减慢细胞生长,同时改变细胞周期的分布,增加了对热疗敏感的 S 期细胞数。这些数据提示 Bmal1 可能是胃癌细胞 MKN28 增殖抑制及细胞周期分布变化的可能机制之一;同时由于肿瘤细胞呈动态变化,热疗不能被简单视为一种物理干预措施^[12],可利用 Bmal1 作为细胞周期判断依据来选择热疗时机,找出热疗疗效最高而对机体损伤最低的时间规律。

总之本实验从细胞增殖,细胞周期分布变化及节律基因 Bmal1 表达方面研究了热疗对胃癌细胞 MKN28 的影响,发现 43 °C 热疗对 MKN28 有明显的抑制作用,可引起细胞周期分布变化,改变胃癌细胞 MKN28 Bmal1 的表达,提示节律基因 Bmal1 有可能参与加热导致的细胞周期变化,为择时热疗奠定理论基础。然而这一发现仅仅是我们研究的起点,节律基因

如何相互作用以及其信号传导机制,时间生物学如何更好和热疗结合起来等都有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Rampersaud EN, Vujaskovic Z, Inman BA. Hyperthermia as a treatment for bladder cancer. *Oncology*, 2010, 24:1149-1155.
- [2] Moros EG, Penagaricano J, Novak P, et al. Present and future technology for simultaneous superficial thermoradiotherapy of breast cancer. *Int J Hyperthermia*, 2010, 26:699-709.
- [3] Zagar TM, Oleson JR, Vujaskovic Z, et al. Hyperthermia for locally advanced breast cancer. *Int J Hyperthermia*, 2010, 26:618-624.
- [4] Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002, 43:33-56.
- [5] van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol*, 2002, 13:1173-1184.
- [6] Morrissey JJ, Higashikubo R, Goswami PC, et al. Mild hyperthermia as a potential mechanism to locally enhance cell growth kinetics. *J Drug Target*, 2009, 17:719-723.
- [7] Zhou J, Wang X, Du L, et al. Effect of hyperthermia on the apoptosis and proliferation of CaSki cells. *Mol Med Reprot*, 2011, 4:187-191.
- [8] Hayashi S, Sakurai H, Hayashi A, et al. Inhibition of NF-kappa B by combination therapy with parthenolide and hyperthermia and kinetics of apoptosis induction and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells. *Int J Mol Med*, 2010, 25:81-87.
- [9] Aravindan N, Shanmugasundaram K, Natarajan M. Hyperthermia induced NFkappaB mediated apoptosis in normal human monocytes. *Mol Cell Biochem*, 2009, 327:29-37.
- [10] 张宇辉. 肿瘤热疗与免疫相关因子. *国际病理科学与临床杂志*, 2009, 5:392-297.
- [11] Cavadin G, Petzalka S, Kohler P, et al. TNF-alpha suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104:12843-12848.
- [12] Furusawa Y, Tabuchi Y, Takasaki I, et al. Gene networks involved in apoptosis induced by hyperthermia in human lymphoma U937 cells. *Cell Biol Int*, 2009, 33:1253-1262.

(修回日期:2011-10-27)

(本文编辑:松 明)

· 外刊文献题录 ·

虚拟现实 (virtual reality rehabilitation) 康复最新文献题录 (二)

- Brien M, Sveistrup H. An intensive virtual reality program improves functional balance and mobility of adolescents with cerebral palsy. *Pediatr Phys Ther*, 2011, 23:258-266.
- Regrain E, Boyer F, Chays A. Rehabilitation of balance disorders for elderly. *Rev Prat*, 2011, 61:836-837.
- Darter BJ, Wilken JM. Gait training with virtual reality-based real-time feedback: improving gait performance following transfemoral amputation. *Phys Ther*, 2011, 91:1385-1394.
- Ingram JN, Wolpert DM. Naturalistic approaches to sensorimotor control. *Prog Brain Res*, 2011, 191:3-29.
- Wang CY, Hwang WJ, Fang JJ, et al. Comparison of virtual reality versus physical reality on movement characteristics of persons with Parkinson's disease: effects of moving targets. *Arch Phys Med Rehabil*, 2011, 92:1238-1245.
- Subramanian SK, Levin MF. Viewing medium affects arm motor performance in 3D virtual environments. *J Neuroeng Rehabil*, 2011, 8:36.
- Pusch A, Martin O, Coquillart S. A lightweight augmented virtuality system for providing a faithful and spatially manipulable visual hand representation. *Stud Health Technol Inform*, 2011, 167:170-175.
- Magdalon EC, Michaelsen SM, Quevedo AA, et al. Comparison of grasping movements made by healthy subjects in a 3-dimensional immersive virtual versus physical environment. *Acta Psychol*, 2011, 138:126-34.
- Koenig A, Omlin X, Zimmerli L, et al. Psychological state estimation from physiological recordings during robot-assisted gait rehabilitation. *J Rehabil Res Dev*, 2011, 48:367-385.
- Scott SH, Dukelow SP. Potential of robots as next-generation technology for clinical assessment of neurological disorders and upper-limb therapy. *J Rehabil Res Dev*, 2011, 48:335-353.
- Packman A, Meredith G. Technology and the evolution of clinical methods for stuttering. *J Fluency Disord*, 2011, 36:75-85.
- Pichierri G, Wolf P, Murer K, et al. Cognitive and cognitive-motor interventions affecting physical functioning: a systematic review. *BMC Geriatr*, 2011, 11:29.
- Ferrigno G, Baroni G, Casolo F, et al. Medical robotics. *IEEE Pulse*, 2011, 2:55-61.
- Melamed BG, Castro C. Observations and insights about strengthening our soldiers SOS. *J Clin Psychol Med Settings*, 2011, 18:210-223.
- Gil-Gómez JA, Lloréns R, Alcañiz M, et al. Effectiveness of a Wii balance board-based system (eBaViR) for balance rehabilitation: a pilot randomized clinical trial in patients with acquired brain injury. *J Neuroeng Rehabil*, 2011, 8:30.
- Laver K, George S, Ratcliffe J, et al. Virtual reality stroke rehabilitation—hype or hope? *Aust Occup Ther J*, 2011, 58:215-219.