

· 基础研究 ·

高压氧联合细胞周期特异性药物 对结肠腺癌 Lovo 细胞的杀伤作用

张丽达 田小强 张伟 杨琳 汪爱国 黄平 钱霞

【摘要】目的 探讨高压氧(HBO)联合细胞周期特异性药物氟尿嘧啶对结肠腺癌 Lovo 细胞的杀伤作用。**方法** 0.20 MPa HBO 暴露后联合应用不同浓度氟尿嘧啶处理结肠腺癌 Lovo 细胞。流式细胞仪检测细胞周期,四甲基偶氮唑盐(MTT)法观察其对结肠腺癌细胞增殖的抑制作用。**结果** ①HBO 暴露后 Lovo 细胞 S 期细胞积聚较对照组明显增多($P < 0.01$),HBO 暴露后 24 h 组 Lovo 细胞 S 期积聚明显高于 HBO 暴露后 12 h 组和 48 h 组($P < 0.01$);②0.20 MPa HBO 暴露后 24 h 联合应用低浓度氟尿嘧啶($\leq 8 \mu\text{M}$)作用 Lovo 细胞 12 h 后,HBO 联合氟尿嘧啶组癌细胞增殖的抑制程度与氟尿嘧啶组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);药物作用 48 h 后,HBO 联合氟尿嘧啶组与氟尿嘧啶组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);③中浓度和高浓度(16,32 和 64 μM)的氟尿嘧啶作用于 Lovo 细胞 12 h,HBO 联合氟尿嘧啶组与氟尿嘧啶组之间差异无统计学意义($P > 0.05$);药物作用 48 h 后,HBO 联合氟尿嘧啶组与氟尿嘧啶组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 0.20 MPa HBO 暴露可提高细胞周期特异性药物氟尿嘧啶对 Lovo 细胞的杀伤作用,尤其增强低浓度氟尿嘧啶对结肠腺癌细胞的杀伤作用。

【关键词】 高压氧; 氟尿嘧啶; 细胞增殖; 结肠癌细胞

The effect of hyperbaric oxygen combined with drug treatment on the cell cycle of colon carcinoma Lovo cells
ZHANG Li-da*, TIAN Xiao-qiang, ZHANG Wei, YANG Lin, WANG Ai-guo, HUANG Ping, QIAN Xia. * Department of Hyperbaric Oxygen, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) combined with 5-fluorouracil (5-FU) chemotherapy on colon carcinoma Lovo cells. **Methods** Lovo cells were exposed to 0.20 MPa HBO combined with 5-FU at different concentrations. The cell cycle was monitored with flow cytometry, and cell proliferation was detected using a methylthiazol tetrazolium test (MTT). **Results** ①After exposure to HBO, phase accumulation of Lovo cells was significantly higher than in the control group, and the accumulation of Lovo cells exposed to HBO after 24 h was significantly higher than at 12 and 48 hours. ②There was difference between HBO (0.20 MPa, post 24 h) + 5-FU ($\leq 8 \mu\text{M}$) group and 5-FU ($\leq 8 \mu\text{M}$, 12 h) group on the inhibition of cells proliferation($P < 0.05$), and significant difference could be seen between the two groups after treatment for 48 h ($P < 0.01$); ③There was no significant difference between HBO + 5-FU group and 5-FU group treatment with the concentration (16,32, 64 μM) of 5-FU ($P > 0.05$) for 12 h; however, the difference could be seen after treatment for 48 h between the two groups($P < 0.05$). **Conclusion** The lethal effect on Lovo cells of 5-FU can be enhanced by exposure to 0.20 MPa HBO, especially with low concentrations of 5-FU.

【Key words】 Hyperbaric oxygenation; Fluorouracil; Cell proliferation; Colon carcinoma cells

化学治疗方法作为恶性肿瘤的主要治疗手段之一,在临床治疗的过程中往往疗效不尽人意,认为其可能与肿瘤细胞获得多药耐药性(multidrug resistance, MDR)、化疗的不良反应、肿瘤的异质性(heterogeneous)等因素有关^[1-3]。目前有研究认为,实体瘤部分细胞缺氧和肿瘤组织的异质性可能是导致肿瘤对放疗

和化疗产生耐受的主要原因之一,实体肿瘤的异质性可使同一瘤组织内具有不同增殖潜能的癌细胞亚群(subpopulation)存在,导致细胞周期特异性化疗药物作用的靶细胞减少。本课题组的前期研究结果显示,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)可诱导结肠腺癌细胞周期在 S 期聚集,提示 HBO 可提高细胞周期特异性药物作用的靶细胞数量,达到增强药物的抗癌效应^[4]。本研究探讨 0.20 MPa HBO 暴露后联合不同浓度的细胞周期特异性药物氟尿嘧啶对结肠腺癌细胞的杀伤作用,旨在为临床治疗肿瘤探寻一种新的策略和方法。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.011.005

基金项目:江苏省教育厅科研基金项目(HJ03-059);南京市社会发展科技项目(200401070-3)

作者单位:210009 南京,东南大学附属中大医院高压氧科(张丽达、黄平、钱霞);东南大学医学院(田小强、张伟、杨琳、汪爱国)

材料与方法

一、实验材料和细胞株

人结肠腺癌 Lovo 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所,无血清细胞冷冻-1640 培养基(美国 Gibco 公司);小牛血清(杭州四季青公司);氟尿嘧啶、四甲基偶氮唑盐(3-(2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 购自 Sigma 公司;高压氧舱 DWC150-300 型动物实验舱购自上海 701 所;Calibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司产)。

二、方法

(一) 细胞培养和细胞生长曲线测定

人结肠腺癌 Lovo 细胞,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,培养液为含 10% 小牛血清、1 × 10⁵ U 青霉素和 1 × 10⁵ U 链霉素的无血清细胞冷冻-1640 培养基。细胞用胰酶消化,6.0 × 10⁴ /ml,以备后续实验。

选择生长状态良好的 Lovo 细胞株,采用传代方法进行消化,制备成细胞浓度为 1.0 × 10⁴ /ml 单细胞悬液,分别接种在 21 ~ 30 个常用的 10 ml 培养瓶,每天取 3 瓶进行计数及均值,观察 7 ~ 10 d 至细胞总数明显减少为止,以培养时间为横轴,细胞的对数为纵轴,绘制细胞的对数生长曲线。

(二) HBO 暴露方法

实验开始前用紫外线消毒氧舱 20 min,纯氧洗舱 10 min。然后将培养瓶(盛于消毒盒中)放入加压舱,将瓶盖松开一部分以便于氧气进入,15 min 内缓慢升压至实验所需的 0.20 MPa 压力后稳压,HBO 暴露 60 min,减压 15 min。HBO 暴露过程中保持持续通风,纯氧流量 2 L/min,舱内平均纯氧浓度为 95%。HBO 暴露总时间 90 min。细胞出舱后置 CO₂ 培养箱继续培养 24 h,进入后续实验。

(三) 氟尿嘧啶药物配制

每次实验加药前取氟尿嘧啶注射液,用含 5% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将其稀释为浓度分别为 2、4、8、16、32 和 64 μM/L(按体积比为 1:5000、1:2500、1:1250、1:500、1:250、1:125、1:62.5 稀释),即用。

(四) 实验分组

实验时选取对数生长期的细胞,调整细胞数至 6 × 10⁴ /ml,按照实验要求分组。①对照组:对数生长期细胞置 CO₂ 培养箱,常压常氧环境;②氟尿嘧啶组:单给不同浓度氟尿嘧啶,常压常氧环境;③HBO 组:单给 0.20 MPa HBO 处理;④HBO 联合氟尿嘧啶组:0.20 MPa HBO 暴露后 24 h 给予不同浓度氟尿嘧啶。为减少误差,各组至少 3 个样本。0.20 MPa HBO 暴露后 24 h,氟尿嘧啶组和 HBO 联合氟尿嘧啶

组给予氟尿嘧啶浓度分别为 2、4、8、16、32 和 64 μM/L,共 6 个浓度梯度,观察药物作用 12、24 和 48 h 细胞增殖的抑制改变。

(五) 流式细胞仪检测细胞周期

0.20 MPa HBO 暴露后 12、24 和 48 h,各时间段的 Lovo 细胞均用 0.25% 胰酶消化,同时收集细胞数量 1.0 × 10⁶ /ml,800 ~ 1000 r/min(离心半径 r = 20 cm)离心 5 min,弃去培养液,磷酸盐缓冲液洗 3 次,离心去磷酸盐缓冲液,加入冰预冷的 70% 乙醇固定(4℃,1 h),用 Calibur 流式细胞仪检测各组细胞的 G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期的比例。实验重复 4 次。

(六) MTT 检测各组细胞增殖抑制率的改变

各组细胞给予 MTT 溶液,37℃ 作用 4 h 后,吸弃培养液后加入适量的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),振荡器振荡 10 min 充分溶解结晶,置 DG3022A 酶联免疫吸附仪酶标分析仪上测定波长 492 nm 下的吸光度(A),实验重复 3 次。根据文献^[5]按公式计算细胞增殖抑制率:

$$\text{细胞增殖抑制率} = \frac{\text{对照孔 } A_{492} - \text{实验孔 } A_{492}}{\text{MTT 溶液}} \times 100\%$$

三、统计学分析

采用 SPSS 17.0 版软件,所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、HBO 暴露后 Lovo 细胞形态学改变

对照组结肠腺癌 Lovo 细胞呈梭形贴壁细胞,细胞形态完整,核仁明显(图 1),贴壁生长良好。HBO 暴露后 1 h 细胞数量减少,梭形贴壁细胞变为椭圆形,细胞悬浮,细胞胞浆混浊,细胞胞体皱缩;0.20 MPa HBO 暴露后 12 h、24 h 细胞呈梭形向外伸展,单层铺开(图 2、3);0.20 MPa HBO 暴露后 48 h 细胞密集、重叠(图 4)。

二、HBO 暴露后不同时间对结肠腺癌细胞 Lovo 细胞周期的影响

0.20 MPa HBO 暴露后不同时间(12、24 和 48 h),经流式细胞仪检测 Lovo 细胞的细胞周期各时相比比例(G₀/G₁ 期、S 期、G₂/M 期),发现 HBO 暴露后 S 期细胞均明显升高,G₀/G₁ 期细胞减少,HBO 暴露后 24 h 组的细胞 S 期聚集明显高于 HBO 暴露后 12 h 组和 48 h 组(图 5),且具有统计学意义($P < 0.01$)。故最佳时间点选为高压氧暴露后 24 h,然后进行各组干预实验。

三、HBO 暴露后 24 h 联合氟尿嘧啶作用 12 h 对结肠腺癌细胞增殖抑制的影响

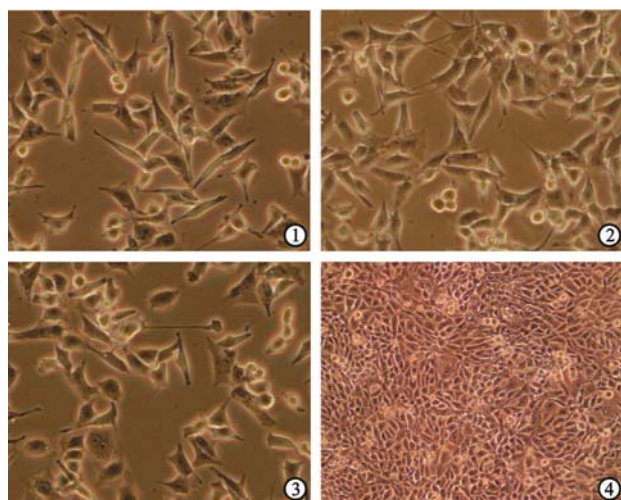
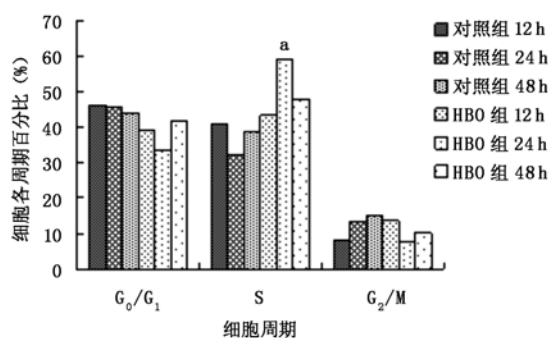


图1 对照组结肠腺癌 Lovo 细胞(HE 染色, $\times 400$)
图2 HBO 组暴露后 12 h 的 Lovo 细胞(HE 染色, $\times 400$)
图3 HBO 组暴露后 24 h 的 Lovo 细胞(HE 染色, $\times 400$)
图4 HBO 组暴露后 48 h 的 Lovo 细胞(HE 染色, $\times 200$)



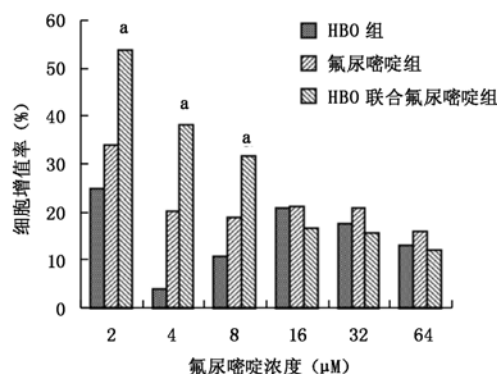
注:与 HBO 暴露后 12 h 组和 48 h 组比较, $^a P < 0.01$

图5 HBO 暴露后不同时间对结肠腺癌细胞 Lovo 细胞周期的影响示意图

药物作用 12 h, 氟尿嘧啶在 $\leq 8 \mu\text{M}$ (2、4 和 $8 \mu\text{M}$) 时, HBO 联合氟尿嘧啶组肿瘤细胞增殖的抑制率 (53.9%、37.9%、31.5%) 与氟尿嘧啶组 (33.8%、20.3%、18.9%) 比较 (图 6), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 中浓度和高浓度的氟尿嘧啶 (16、32 和 $64 \mu\text{M}$) 作用下, HBO 联合氟尿嘧啶组肿瘤细胞增殖的抑制率 (10.7%、7.8%、6.4%) 与氟尿嘧啶组 (12.3%、10.3%、7.9%) 比较 (图 6), 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

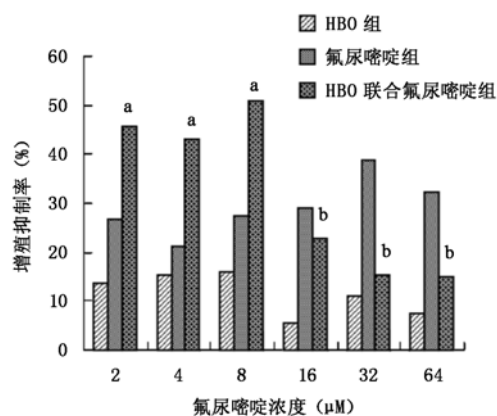
四、HBO 暴露后 24 h 联合氟尿嘧啶作用 48 h 对结肠腺癌细胞增殖抑制的影响

药物作用 48 h, 氟尿嘧啶在 $\leq 8 \mu\text{M}$ 时, HBO 联合氟尿嘧啶组肿瘤细胞增殖抑制率与氟尿嘧啶组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 中浓度和高浓度的氟尿嘧啶 (16、32 和 $64 \mu\text{M}$) 作用下, 氟尿嘧啶组的肿瘤细胞增殖抑制率与 HBO 联合氟尿嘧啶组比较 (图 7), 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注:与氟尿嘧啶组比较, $^a P < 0.05$

图6 HBO 暴露后 24 h 联合不同浓度氟尿嘧啶作用 12 h 对 Lovo 细胞增殖抑制率的影响示意图



注:与氟尿嘧啶组比较, $^a P < 0.01$; 与 HBO 联合氟尿嘧啶组比较, $^b P < 0.05$

图7 HBO 暴露后 48 h 联合不同浓度氟尿嘧啶作用 48 h 对 Lovo 细胞生长抑制率的影响示意图

讨 论

HBO 是一种迅速有效地改善组织细胞缺氧状态的手段,其可通过:①增加血液中的物理溶解氧量,提高血氧含量和血氧张力;②增加组织的氧含量和氧储备;③提高血氧弥散率和增加组织内氧有效弥散距离;④改善组织微循环,改善组织器官的有氧代谢,纠正缺氧状态。目前 HBO 治疗各种疾病已得到广泛的临床应用。有关 HBO 能否用于肿瘤的辅助治疗尚有争议。目前陆续有学者发现 HBO 不仅没有明显促进肿瘤组织增殖,甚至发现 HBO 可以通过促进细胞周期改变,增强肿瘤对放疗和化疗的敏感性,减轻或降低化疗药物的不良反应,改善癌症患者放疗、化疗后遗症^[6-7]。

HBO 能使处于静止期的肿瘤细胞重新进入细胞周期,这有利于提高细胞周期特异性药物的抗癌效能。Kalns 等^[8]报道 HBO 可使 LNCaP 癌细胞在 G_2/M 期积蓄,并可使缺氧区域的癌细胞分裂增殖加速,推测 HBO 具有导致肿瘤细胞周期同步化的作用。

Tompach^[9]的实验表明,HBO 对肿瘤细胞的积聚作用由于细胞的生长特性及对氧的敏感性不同而存在差异。本实验结果显示,0.20 MPa HBO 暴露后的 48 h 内,可能由于 Lovo 细胞对氧的敏感性及其代谢等方面的影响,在 24 h 时 Lovo 细胞周期 S 期积聚最为显著($P < 0.01$),表明 HBO 可促使肿瘤细胞进入 DNA 合成期,而这种细胞周期的积蓄对增加细胞周期特异性化疗作用提供了有利条件,与 Conconi 等^[10]报道一致。

有研究发现,在化疗的过程中联合 HBO 进行辅助治疗,会在很大程度上增加化疗药物的作用。Conconi 等^[10]报道,HBO 联合化疗药物(紫杉醇、顺铂和阿霉素)对前列腺癌(PC-3)细胞生长具有明显的抑制作用,HBO 联合阿霉素降低肿瘤细胞生长率达 145.8%、HBO 联合紫杉醇组达 327%,显示化疗药物联合 HBO 可提高化疗疗效;Beppu 等^[11]对小脑幕上神经胶质瘤细胞进行实验,结果显示 HBO 结合干扰素和尼莫西丁化疗不仅缩短化疗周期而且提高化疗药物疗效。HBO 可增强化疗药物氟尿嘧啶的作用^[12-14]。目前认为:① HBO 通过产生氧自由基使 DNA 肽链发生空间位置的改变,增加对抗癌药物的敏感性;② HBO 可以提高组织细胞氧分压,增加组织细胞氧含量,使处于严重低氧和缺氧状态的肿瘤细胞供氧得到改善,增加对化疗药物的敏感性;③ HBO 可使癌细胞膜的通透性增加,使抗癌药物渗透入癌细胞的量增多而增加抗癌药物的效果;④ HBO 可干扰肿瘤代谢,改善肿瘤局部血供,可使进入肿瘤组织内的药物浓度增加,在 HBO 暴露对肿瘤细胞中的电子传递系统有抑制作用,线粒体氧化酶活性减退,ATP 合成减少,肿瘤细胞生长受到抑制。本实验观察到在 HBO 暴露 24 h 后联合不同浓度的氟尿嘧啶作用于 Lovo 细胞,结果显示,当氟尿嘧啶浓度 $\leq 8 \mu\text{M}$,药物作用时间为 12 h 和 48 h,其杀伤肿瘤细胞的作用与同剂量氟尿嘧啶组相比有差异统计学意义($P < 0.05$),提示 HBO 可能通过促进 Lovo 细胞周期 S 期积聚,从而提高 Lovo 细胞对低浓度氟尿嘧啶的药物敏感性,达到增强其杀伤肿瘤细胞的效应。本研究结果提示,HBO 联合细胞周期特异性化疗药物可明显提高低浓度化疗药物杀伤肿瘤的疗效,减轻不良反应,值得进一步深入探究。

参 考 文 献

- [1] Hockel M, Schlenger K, Aral B, et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*, 1996, 56:4509-4515.
- [2] Ogiso Y, Tomida A, Lei S, et al. Proteasome inhibition circumvents solid tumor resistance to topoisomerase II-directed drugs. *Cancer Res*, 2000, 60:2429-2434.
- [3] Beavon IR. Regulation of E-cadherin; does hypoxia initiate the metastatic cascade. *Mol Pathol*, 1999, 52:179-188.
- [4] 张伟, 张丽达, 汪爱国, 等. 高压氧对结肠癌 LoVo 细胞周期的影响. *中华航海医学与高气压医学杂志*, 2006, 13:88-91.
- [5] Vock EH, Lutz WK, Ilinskaya O, et al. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity for the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with aldehydes and diepoxides. *Mutation Res*, 1999, 441:85-93.
- [6] 黄耿文, 杨连粤. 缺氧致肿瘤恶性转化的分子机制. *世界华人消化杂志*, 2001, 9:1300-1304.
- [7] Takiguchi N, Saito N, Nunomura M, et al. Use of 5-FU plus hyperbaric oxygen for treating malignant tumors; evaluation of antitumor effect and measurement of 5-FU in individual organs. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 47:11-14.
- [8] Kalns J, Krock L, Piepmeier E. The effect of hyperbaric oxygen on growth and chemosensitivity of metastatic prostate cancer. *Anticancer Res*, 1998, 18:363-367.
- [9] Tompach GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological response to hypoxia. *J Appl Physiol*, 2000, 88:1474-1480.
- [10] Conconi MT, Baiguera S, Guidolin D, et al. Effects of hyperbaric oxygen on proliferative and apoptotic activities and reactive oxygen species generation in mouse fibroblast 3T3/J2 cell line. *J Investig Med*, 2003, 51:227-232.
- [11] Beppu T, Feldmeier J, Carl U, et al. Hyperbaric oxygen; does it promote growth or recurrence of malignancy. *Undersea Hyperb Med*, 2003, 30:1-18.
- [12] Stuhr LE, Iversen VV, Straume O, et al. Hyperbaric oxygen alone or combined with 5-FU attenuates growth of MBA-induced rat mammary tumors. *Cancer Lett*, 2004, 210:35-40.
- [13] Kalns JE, Piepmeier EH. Exposure to hyperbaric oxygen induces cell cycle perturbation in prostate cancer cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35:98-101.
- [14] Kunugita N, Kohshi K, Kinoshita Y, et al. Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models. *Cancer Lett*, 2001, 164:149-154.

(修回日期:2011-08-26)

(本文编辑:汪 玲)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》