

高温对 HepA 瘤株细胞周期的影响

刘仁刚 张炼 周洁萍 余达经 刘云华 骆清铭

【摘要】 目的 探讨高温对肿瘤细胞周期的影响。**方法** 将肝癌腹水型瘤株 HepA 细胞分为 37℃、40℃、42℃ 和 44℃ 四个温度组。每一组分别在 1 h、2 h、4 h 和 8 h 四个时间点取材,经 PI 染色在流式细胞仪上检测四种温度条件下,四个时间段时 HepA 细胞在各细胞周期中的细胞数。**结果** 37℃ 时,细胞处于活跃的增殖状态,绝大部分细胞处于 S 及 G2/M 期。40℃ 时,细胞增殖更趋活跃,G1 期细胞减少。42℃ 时,细胞增殖受到明显抑制,G1 期细胞增加,G2/M 期细胞减少。44℃ 时,1~2 h,细胞增殖受到进一步的抑制,G1 期细胞明显增加,G2/M 期细胞进一步减少;4~8 h,高温对细胞增殖的影响反而减弱,与 1~2 h 时相比,G1 期细胞明显减少,G2/M 期的细胞有了明显的增加,甚至多于 42℃ 时。**结论** 温和性高温(42~44℃)对 HepA 细胞的增殖活动有明显的抑制作用,使 HepA 细胞主要滞留于 G1 期。

【关键词】 高温; 肿瘤; 细胞周期

The effects of hyperthermia on the cell cycle of HepA cells LIU Rengang*, ZHANG Lian, ZHOU Jieping, YU Dajing, LIU Yunhua, LUO Qingming. * Department of Anatomy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To study the effects of hyperthermia on the cell cycle of tumor cells. **Methods** The HepA cells were divided into four groups, and placed respectively in 37℃, 40℃, 42℃ and 44℃. Each group was heated for 1, 2, 4 and 8 hours, and tested by the flow cytometer. **Results** At 37℃, the cells proliferated actively and most cells were in S phase and G2/M phase. At 40℃, the cells proliferated more actively and the number of cells in G1 phase was decreased. At 42℃, the proliferation of the cells was inhibited. The number of cells in G1 phase was increased and that in G2/M phase decreased. At 44℃ for 1-2 hours, the inhibition effect of hyperthermia on cell proliferation was enhanced. The number of cells in G1 phase was increased and that in G2/M phase decreased further. At 44℃ for 4-8 hours, the inhibition effect of hyperthermia on cell proliferation was weakened. The number of cells in G1 phase were decreased and that in G2/M phase increased markedly than at 44℃ for 1-2 hours. **Conclusion** The moderate hyperthermia(42-44℃) has a remarkable inhibition effect on proliferation of HepA cells and keeps them arrested in the G1 phase.

【Key words】 Hyperthermia; Tumor; Cell cycle

高温治疗肿瘤早有人为之。早期的热疗主要是利用高温引起蛋白质变性的物理性质杀伤肿瘤。该温度在杀伤肿瘤细胞的同时也杀伤正常组织细胞,大量的细胞坏死会引起强烈的炎症反应。这种炎症反应可能是引起病人恶液质的原因之一^[1]。因此长期以来,高温治疗肿瘤一直处于停滞不前的状态。后来发现,温和性高温(42℃左右)可以引起肿瘤细胞凋亡^[2,3],使得高温治疗肿瘤再次受到研究者的重视。在研究高温引发肿瘤细胞凋亡的过程中,我们发现高温也影响细胞周期^[4]。为了探讨高温对肿瘤细胞周期的影响,我们利用流式细胞仪对细胞周期进行分析,研究了 HepA 细胞在不同温度条件下细胞周期的进程。

材料与方法

一、肿瘤细胞株及分组

1. 肿瘤细胞株的接种:将肝癌腹水型瘤株 HepA 细胞(本校药学院提供)接种于昆明小鼠腹腔。

2. 肿瘤细胞的纯化:1 周后以无菌注射器抽取约 2 ml 癌性腹水。用 1640 培养基稀释后置培养皿中,37℃ 孵育 20 min,取未贴壁的细胞悬液置另一培养皿。如此反复贴壁 3 次,清除巨噬细胞和成纤维细胞以获得纯化的 HepA 细胞。经台盼蓝染色检查,成活率在 95% 以上者方可用于实验。

3. 分组:纯化的 HepA 细胞加 1640 完全培养基稀释至 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ 个/ml,以每皿 2 ml 分装入 48 只培养皿中。将 48 皿 HepA 细胞分为 37℃、40℃、42℃ 和 44℃ 四组,每组 12 皿。

二、加温处理

超级恒温器(上海实验仪器厂)4 个,预先将水温

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(No. 59836240)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院解剖学系(刘仁刚、周洁萍、余达经、刘云华);附属同济医院小儿科(张炼);生命科学院(骆清铭)

分别调至 37℃、40℃、42℃ 和 44℃ 并稳定 4 h 以上, 然后进行实验。将各组盛有 HepA 细胞的培养皿置于相应温度的恒温器内。10 min 后开始计时, 分别在 1 h、2 h、4 h 和 8 h, 各组均从其水浴箱中取出 3 皿。取出的培养皿置二氧化碳培养箱, 在 37℃、5% CO₂ 的条件下继续培养 12 h。

三、流式细胞仪检测细胞周期

经过以上处理的 HepA 细胞, 以 70% 的乙醇固定, 经过 PI 染色, 应用 FACSscan 型流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson 公司)进行细胞周期的检测。每皿检测 5 000 个细胞, 以细胞指数表示各期所含的细胞数。细胞指数 = (各期所含的细胞数/5 000) × 100。

四、统计学分析

应用 SPSS 统计软件, 以方差分析进行统计分析, $P < 0.05$ 定为差异有显著性意义, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

结 果

一、各温度下, HepA 细胞在不同时间的细胞周期变化

37℃ 时, 即在生理温度条件下培养的 HepA 细胞在各时间点的平均指数经方差分析无明显的组间差异 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 37℃ 时 HepA 细胞在细胞周期各期中的指数 ($\bar{x} \pm s$)

时间	G1	S	G2/M
1h	16.89 ± 3.70	41.09 ± 3.14	42.02 ± 1.04
2h	17.93 ± 5.00	41.15 ± 11.37	40.91 ± 6.71
4h	17.36 ± 2.94	43.80 ± 6.78	38.84 ± 9.21
8h	22.75 ± 4.42	33.40 ± 14.5	43.85 ± 11.01

40℃ 时 HepA 细胞指数在各时间点间无明显的组间差异 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 40℃ 时 HepA 细胞在细胞周期各期中的指数 ($\bar{x} \pm s$)

时间	G1	S	G2/M
1h	16.83 ± 1.87	42.47 ± 2.35	40.70 ± 4.18
2h	15.29 ± 4.27	45.56 ± 2.41	39.15 ± 1.89
4h	17.62 ± 0.49	36.25 ± 5.60	46.12 ± 5.19
8h	15.75 ± 2.11	45.37 ± 11.94	38.89 ± 14.04

42℃ 时 HepA 细胞指数在各时间点间也无明显的组间差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 42℃ 时 HepA 细胞在细胞周期各期中的指数 ($\bar{x} \pm s$)

时间	G1	S	G2/M
1h	27.93 ± 3.27	44.80 ± 7.20	27.27 ± 10.46
2h	26.15 ± 3.46	49.86 ± 0.51	23.99 ± 2.95
4h	25.97 ± 2.95	48.80 ± 1.79	25.24 ± 1.40
8h	29.03 ± 2.82	49.31 ± 1.37	21.66 ± 3.07

44℃ 时 HepA 细胞指数在各时间点间存在明显的组间差异, 主要表现在 1 h 与 2 h、4 h 及 8 h 之间, 见表 4。

表 4 44℃ 时 HepA 细胞在细胞周期各期中的指数 ($\bar{x} \pm s$)

时间	G1	S	G2/M
1h	34.58 ± 3.17	51.94 ± 2.08	13.48 ± 1.22
2h	33.19 ± 6.72	47.06 ± 4.75	19.76 ± 2.19*
4h	20.93 ± 0.56**	47.11 ± 2.55	31.96 ± 2.16**
8h	23.16 ± 0.51**	49.03 ± 1.90	27.80 ± 2.28**

注: 与 1h 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

G1 期, 各时间点的组间差异显著 ($P = 0.013$), 1 h 和 2 h 之间无明显差异 ($P > 0.05$); 而 4 h 和 8 h 的细胞数比 1h 有极明显的减少, 其 P 值分别为 0.0019 和 0.0036。S 期, 各时间点间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。G2/M 期, 各时间点的组间差异有极显著性意义 ($P = 0.00069$), 1 h 和 2 h 之间差异有显著性意义 ($P = 0.012$), 4 h 和 8 h 的细胞数比 1 h 有极显著意义的增加, P 值分别为 0.00023 和 0.00072。

二、不同温度下, HepA 细胞的细胞周期变化

经不同温度处理, HepA 细胞的细胞周期受到明显的影响, G1 期和 G2/M 期细胞数随着温度的升高, 发生明显规律性的变化; S 期细胞数无明显改变(见表 5)。

表 5 不同温度下 HepA 细胞在细胞周期中的平均指数 ($\bar{x} \pm s$)

温 度	G1	S	G2/M
37℃	18.73 ± 2.35	39.86 ± 3.89	41.41 ± 1.82
40℃	16.37 ± 0.91	42.41 ± 3.76	41.22 ± 2.92
42℃	27.27 ± 1.27#	48.19 ± 1.99	24.54 ± 2.03#
44℃			
1 ~ 2h	33.89 ± 0.70#	49.50 ± 2.44	16.62 ± 3.14#
4 ~ 8h	22.05 ± 1.12**	48.07 ± 0.96	29.88 ± 2.08*#

注: # 与 37℃ 相比 $P < 0.01$; 与 44℃、1 ~ 2 h 相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

37℃ 时, 约 20% 的细胞处于 G1 期, 约 40% 的细胞处于 S 期, 约 40% 的细胞处于 G2/M 期。40℃ 时, G1 期细胞略有减少, S 期细胞略有增加, 但没有显著性差异 ($P > 0.05$)。42℃ 时, 与 37℃ 时相比: G1 期提高了 8.54 个指数, 细胞增加了 46% ($P = 0.00073$); S 期提高了 8.33 个指数, 细胞增加了 21% ($P > 0.05$); G2/M 期下降了 16.87 个指数, 细胞减少了 41% ($P = 0.000019$)。44℃、1 ~ 2 h 时, 与 37℃ 时相比: G1 期提高了 15.16 个指数, 细胞增加了 81% ($P = 0.00094$); S 期提高了 9.64 个指数, 细胞增加了 24% ($P > 0.05$); G2/M 期下降了 24.79 个指数, 细胞减少了 60% ($P = 0.00028$)。44℃、4 ~ 8 h 时, 其细胞指数与 1 ~ 2 h 相比发生了逆转, 有向 37℃ 时回归的趋势。其细胞数与 1 ~ 2 h 时相比: G1 期减少了 35% ($P = 0.006$), G2/M 期增加了 80% ($P = 0.0359$); 与 37℃ 时相比: G1 期仅增加了 18% ($P > 0.05$), G2/M 期减少了 28% ($P = 0.00234$)。

以上结果表明:随着温度的升高,其对 HepA 细胞的细胞周期的影响,也随之发生改变。正常温度(37℃)时,细胞处于活跃的增殖状态。当温度从 37℃ 增至 40℃ 时,细胞的增殖似乎更趋活跃。当温度在 40℃ 至 44℃ 作用 1~2 h 时,细胞的增殖活动受到明显的影响,G1 期的细胞随着温度的升高而明显增多;而 G2/M 期的细胞随着温度的升高而显著减少。当温度增至 44℃、作用 4~8 h 时,其对细胞增殖的影响似乎明显减弱,G1 期细胞有了明显的减少,而 G2/M 期的细胞有了明显的增加;S 期变化不大(见图 1)。

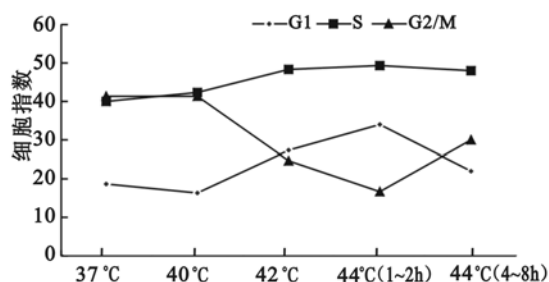


图 1 不同温度下 HepA 细胞在各期的细胞指数曲线图

讨 论

由亲代细胞复制为子代细胞的过程称细胞周期。细胞周期分为 G1 期、S 期、G2 期和 M 期。DNA 复制发生在 S 期,染色体分离发生在 M 期。HepA 细胞是小鼠肝癌腹水型瘤株,细胞处于活跃的增殖状态。

本研究表明 37℃ 时,83% 以上的细胞处于 DNA 复制和细胞分裂阶段。随着温度的升高和作用时间的延长,细胞周期的进程受到明显的影响。由于温度的不同和作用时间的不同其影响也不尽相同。40℃ 时,细胞周期未受到明显影响,细胞的增殖活动似乎更趋活跃。42℃ 时,细胞周期的进程受到明显的影响,G1 期的细胞明显增加,G2/M 期的细胞明显减少。44℃ 作用 1~2 h,G1 期的细胞增加更多,G2/M 期的细胞减得更少。44℃ 作用 4~8 h,其结果发生了逆转,G1 期的细胞比 1~2 h 时明显减少,G2/M 期的细胞比 1~2 h 时的增多有极显著性意义。

结果提示,高温对肿瘤细胞周期的影响,随着温度的升高而发生改变。当温度由 37℃ 升至 40℃ 时,该温度段对细胞内的某些酶类可能有促进其活性的作用,使代谢加强,增强了细胞的增殖活性。当温度升高到 42℃ 时,对温度敏感的某些调节细胞周期的调控因子可能受到影响,使细胞周期进程明显受阻,使肿瘤细胞滞留于某一特定的阶段。当温度升至 44℃ 以上时,对肿瘤细胞的杀伤

作用可能是非特异性的,均等地损伤处于各期的细胞,表现为细胞周期中各期细胞指数向 37℃ 时回归。细胞周期各期之间的转换,即细胞周期的进程,是受到控制的。细胞周期的调控因素,一部分来自于细胞外生长因子和激素的作用,一部分位于细胞内。细胞内的周期因子依赖性激酶(cyclin dependent kinase,CDK)控制着细胞周期各期之间的顺序转换,其活性由周期因子(cyclin)激活^[5]。各期的 CDK 和周期因子各有不同。细胞周期中有两个主要的调控点,一个位于 G1→S 转折点,控制细胞从静止状态(G1 期)进入 DNA 合成期(S 期);另一调控点位于 G2→M 转折点,是决定细胞一分为二的控制点。

如图 1 所示,当温度在 40~44℃ 并作用 1~2 h 时,G1 期的细胞指数与温度呈正相关,G2/M 期的细胞指数与温度呈负相关,S 期的细胞指数无甚相关。表明温和性高温使大量的细胞滞留于静止状态(G1 期),而分裂期(G2/M 期)的细胞大量减少。Nishita^[6] 和 Yokoyama^[7] 在研究高温引发肿瘤细胞凋亡的过程中也观察到类似的现象。温和性高温可能影响了细胞周期的第一个调控点即由 G1 期向 S 期转换的 CDK 和周期因子或与其相关的因子的活性,致使 HepA 细胞滞留于 G1 期。其有关机制和温和性高温对其他肿瘤细胞周期的影响,我们正在进一步研究。

参 考 文 献

- 1 杨明明,李娟. 细胞凋亡与癌症的治疗问题(综述). 国外医学老年医学分册, 1998, 19: 271-273.
- 2 Yonezawa M, Otsui T, Matsui N, et al. Hyperthermia induces apoptosis in malignant fibrous histiocytoma cell in vitro. Int J Cancer, 1996, 66: 347-356.
- 3 Sakaguchi Y, Stephens LC, Makino M, et al. Apoptosis in tumors and normal tissues induced by whole body hyperthermia and in rats. Cancer Res, 1995, 55: 5459-5467.
- 4 Yu DJ, Liu RG, Zhou JP, et al. The effect of hyperthermia on DNA in mouse HepA cells - an analysis with computer and observation with EM. J Tongji Med Univ, 2000, 20: 268-272.
- 5 Nigg EA. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of eukaryotic cell cycle. BioEssays, 1995, 17: 471-480.
- 6 Nishita M, Inoue S, Tsuda M, et al. Nuclear translocation and increased expression of Bax and disturbance in cell cycle progression without prominent apoptosis induced by hyperthermia. Exp Cell Res, 1998, 244: 357-366.
- 7 Yokoyama Y, Saito M, Saito T, et al. Synergistic antiproliferative effect of delta 12-prostaglandin J2 (delta 12-PGJ2) and hyperthermia on human esophageal cancer cell lines. Hum Cell, 2000, 13: 23-33.

(收稿日期:2001-10-09)

(本文编辑:郭铁成)