

· 论 著 ·

热化疗诱导胶质瘤细胞凋亡的实验研究

方胜 袁先厚 裴永恩 戴学元 龚玲玲

【摘 要】 目的 研究热化疗对 C_6 细胞凋亡的影响,评价热化疗抑制细胞增殖的价值。方法 将不同浓度的丝裂霉素直接作用于体外培养的 C_6 胶质瘤细胞,接种后 20 h、48 h 置于 42.7℃ 恒温箱中加温 2 次,每次 30 min。观察丝裂霉素对 C_6 细胞的抑制率、生长曲线的影响及热疗、化疗、热化疗对 C_6 细胞凋亡的诱导作用。结果 丝裂霉素在 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 浓度时杀伤作用达高峰($P < 0.001$),再加大浓度并不增加杀伤作用($P > 0.05$);透射电镜、FCM、TUNEL 均观察到热疗、化疗、热化疗诱导细胞凋亡的作用($P < 0.001$);热化疗有协同作用($P < 0.001$)。结论 ① 热疗、化疗、热化疗均抑制 C_6 细胞增殖。② 热疗、化疗、热化疗诱导细胞凋亡为其抗癌机制之一。③ 热疗能提高化疗药物的细胞毒性作用。

【关键词】 丝裂霉素类; 胶质母细胞瘤; 高温,诱发; 凋亡

C_6 glioma cell apoptosis induced by hyperthermia combined with antineoplastic agents in vitro FANG Sheng*, YUAN Xianhou, PEI Yongen, DAI Xueyuan, GONG Lingling. * Department of Neurosurgery, Central Hospital of Huangshi, Huangshi 435000, China

【Abstract】 **Objective** To study whether hyperthermia, chemotherapy and thermochemotherapy can inhibit the growth and promote apoptosis of C_6 glioma cell. **Methods** Experiments were performed as follows; Mitomycin C (MMC) of different concentrations (0.5 ~ 2.5 $\mu\text{g/ml}$) were directly applied to C_6 glioma cell line cultivated in vitro. Then the effects of hyperthermia, chemotherapy, and thermochemotherapy on apoptosis of the C_6 glioma cells induced by the drug were observed and analyzed. **Results** The killing effect of MMC on C_6 glioma cells peaked at the concentration of 1.5 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0.001$). Transmission electron microscopy, FCM and TUNEL examination observed apoptosis of C_6 glioma cells in every group ($P < 0.001$), and remarkable synergistic effects between hyperthermia and the drug ($P < 0.001$). **Conclusion** Hyperthermia, chemotherapy and thermochemotherapy can all produce a growth inhibiting effect on C_6 glioma cell; Induction of apoptosis of C_6 glioma cells can be achieved by hyperthermia and chemotherapy; Hyperthermia in combination with MMC would provide a greater cytotoxic effect on C_6 glioma cells.

【Key words】 Mitomycins; Glioblastoma; Hyperthermia, induced; Apoptosis

脑胶质瘤采用当前的手术、放疗、化疗或免疫治疗方案都是非常难以彻底治愈的^[1]。诱导细胞凋亡已经成为肿瘤治疗的新思路^[2]。

化疗是目前治疗恶性肿瘤的重要手段之一,然而肿瘤细胞对化疗药物的耐药是化疗失败的主要原因^[3]。加热治疗可在细胞水平加强放疗及化疗效果,无蓄积毒作用。

因此,目前国内外一致认为脑胶质瘤必须采用综合治疗。我们利用细胞培养技术,通过对鼠胶质瘤细胞(C_6)进行热疗、化疗、热化疗,并与对照组进行比较,探讨:①热疗、化疗能否抑制细胞增殖;②热疗、化疗、热化疗能否促进细胞凋亡;③热疗能否增强化疗药物的细胞毒性,有无协同作用。

材料与方法

一、实验分组及细胞培养

实验分对照组、热疗组、化疗组、热化疗组。鼠胶质瘤 C_6 细胞用含葡萄糖(4.5 g/ml)的 DMEM (Dullbecco's Modification of Eagle's Medium) 培养液培养,其中补充 10% 新生小牛血清、青霉素(100 U/ml)及链霉素(100 mg/ml),生长在 37℃、5% 的 CO_2 培养箱中。

二、热疗、化疗、热化疗对 C_6 细胞的细胞毒性作用

采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法, C_6 细胞调整至 1.9×10^5 个/ml 的浓度接种于 96 孔培养板内,内含不同的药物浓度,即 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、1.0 $\mu\text{g/ml}$ 、1.5 $\mu\text{g/ml}$ 、2.0 $\mu\text{g/ml}$ 、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 丝裂霉素及对照组(0 $\mu\text{g/ml}$)、单纯热疗组(0 $\mu\text{g/ml}$)。每 6 孔为一组,每组浓度相同。接种培养后 20 h、48 h,热疗组和热化疗组均加热 30 min、42.7℃。第 2 次加热 3 h 后每孔加入新配制的 MTT 液,孵育 4 h 后加入二甲亚砜(DMSO) 100 μl ,用

基金项目:湖北省 2002 年重点指令性计划资助项目 (No. 2002p1508)

作者单位:435000 黄石市中心医院神经外科(方胜、裴永恩、戴学元);湖北医科大学附二院神经外科(袁先厚),病理科(龚玲玲)

酶标仪检测吸光密度值(OD 值)。抑制率(%)=(对照孔 OD 值-实验孔 OD 值)/对照孔 OD 值 $\times$ 100%。

三、热疗、化疗、热化疗对 C₆ 细胞生长曲线的影响

调整细胞浓度至 5×10^4 个/ml 置于 T-25 培养瓶中。培养及处理方法同二。化疗组和热化疗组药物浓度为 0.5、1.5、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。每天各组取 2 瓶细胞,以台盼蓝染色法计算活细胞数,以每毫升活细胞数为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制生长曲线。

四、热疗、化疗、热化疗诱导 C₆ 细胞凋亡的研究

1. 透射电镜观察细胞凋亡:细胞浓度 2×10^5 个/ml,接种于 T-25 培养瓶内,培养及处理方法同三。化疗组与热化疗组含丝裂霉素 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。接种培养 56 h 后,弃培养液,加入 3% 戊二醛前固定液过夜,PBS 漂洗 3 次,梯度乙醇脱水,样品用 Epon812 包埋剂包埋,做超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅染色,于 H-300 透射电镜下观察并摄影。

2. 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡^[4]:收集处于对数生长期的细胞,接种于 T-75 培养瓶内,培养及处理方法同三。化疗组、热化疗组丝裂霉素浓度为 0.5、1.5、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。培养 56 h 后处理细胞制成单细胞悬液,经 PBS 洗 2 次后,用 70% 的预冷乙醇 4℃ 固定过夜,再经 PBS 洗 2 次后,RNA 酶消化,PI 染色,采用 FACSsort 流式细胞仪对样品进行测定,每次计数细胞 6 000 个,分析软件为 CEIIQust,计算凋亡率。

3. TUNEL(TdT-mediated duTP nick labeling)细胞凋亡的原位检测(同四中第 2 步):经 PBS 洗 3 次后,制成单细胞悬液,置于美国产甩片机内,以 800 转/分的速度甩片,将单细胞群粘附于经多聚赖氨酸处理过的玻璃片上,制成细胞涂片备用。其染色步骤按说明书操作。其结果判定,光镜下调亡细胞核被染成棕黄色,AI=凋亡细胞数/1 000 $\times$ 100%。

五、统计学分析

用 SPSS 软件包进行 *t* 检验。

结 果

一、热疗、化疗、热化疗对 C₆ 细胞的毒性作用(表 1)

与对照组比较,热疗、化疗、热化疗组 OD 值呈显著性降低,抑制率呈显著性增加, $P < 0.001$ 。与单纯热疗、化疗组比较,热化疗组 OD 值呈显著性降低,抑制率呈显著性增加, $P < 0.001$ 。当药物浓度达 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 时,杀伤作用最强,以后随药物浓度增加,差异无显著, $P > 0.05$ 。

二、热疗、化疗、热化疗对 C₆ 细胞生长曲线的影响(图 1)

表 1 热疗、化疗、热化疗对 C₆ 细胞的毒性作用

组 别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	例数	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	0	18	0.605 $\pm$ 0.025	
热疗组	0	18	0.397 $\pm$ 0.029 [▲]	34.38 $\pm$ 0.031 [▲]
化疗组	0.5	18	0.491 $\pm$ 0.018 [▲]	18.84 $\pm$ 0.04 [▲]
	1.0	18	0.458 $\pm$ 0.023 [▲]	24.30 $\pm$ 0.025 [▲]
	1.5	18	0.409 $\pm$ 0.016 [▲]	32.40 $\pm$ 0.06 ^{▲△}
	2.0	18	0.414 $\pm$ 0.021 [▲]	31.57 $\pm$ 0.04 ^{▲△}
	2.5	18	0.428 $\pm$ 0.024 [▲]	29.26 $\pm$ 0.32 ^{▲△}
热化疗组	0.5	18	0.376 $\pm$ 0.024 [▲]	37.85 $\pm$ 0.04 ^{▲*}
	1.0	18	0.342 $\pm$ 0.022 [▲]	43.47 $\pm$ 0.065 ^{▲*}
	1.5	18	0.252 $\pm$ 0.032 ^{▲△}	58.35 $\pm$ 0.024 ^{▲*}
	2.0	18	0.304 $\pm$ 0.021 ^{▲△}	49.75 $\pm$ 0.04 ^{▲*}
	2.5	18	0.308 $\pm$ 0.025 ^{▲△}	49.09 $\pm$ 0.032 ^{▲*}

注:*单纯热疗、单纯化疗、热化疗组与空白对照组比较, $P < 0.001$;[▲]热化疗组与单纯热疗、单纯化疗组比较, $P < 0.001$;[△]单纯化疗、热化疗 1.5、2.0、2.5 $\mu\text{g/ml}$ 组间比较, $P > 0.05$ 。

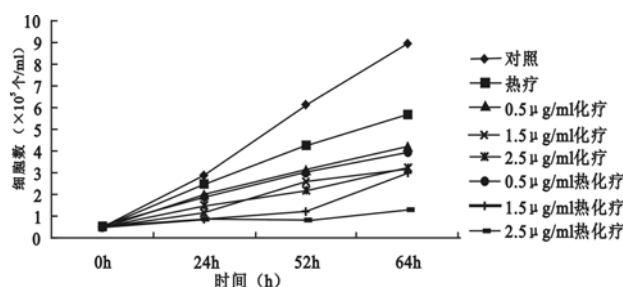


图 1 热疗、化疗、热化疗对 C₆ 生长曲线的影响

与对照组比较,热疗、化疗、热化疗组细胞数呈显著性降低,细胞数增加缓慢, $P < 0.001$;与单纯热疗、化疗组比较,热化疗组细胞数呈显著性降低,细胞数增加缓慢, $P < 0.001$ 。

三、热疗、化疗、热化疗对 C₆ 细胞凋亡的诱导

1. 透射电镜观察凋亡:对照组细胞大而圆,胞体光滑,绒毛多,一个或多个核仁,核质密度低。热疗、化疗或热化疗处理后,细胞变小,发生浓缩碎裂、边聚,细胞起泡,以出芽的方式向胞外释放凋亡小体。部分细胞见细胞质空泡化(图 2~4)。

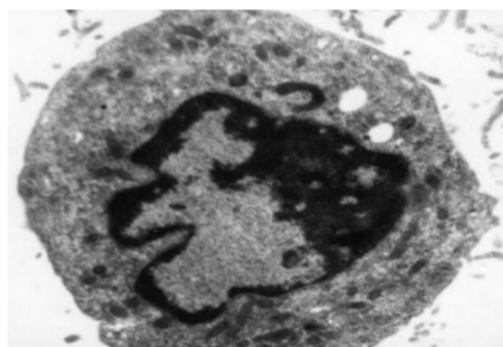


图 2 C₆ 细胞经药物化疗后,染色质浓缩、边聚($\times 10 000$)

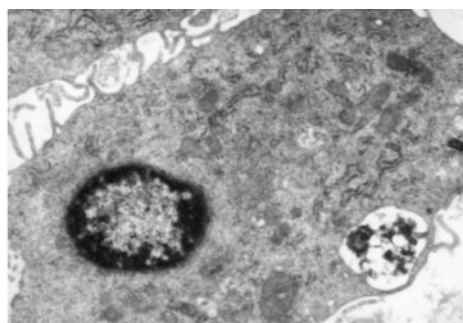


图3 C₆ 细胞经加热后,染色体浓缩、边聚,细胞起泡,以出芽的方式向胞外释放凋亡小体(×8 000)

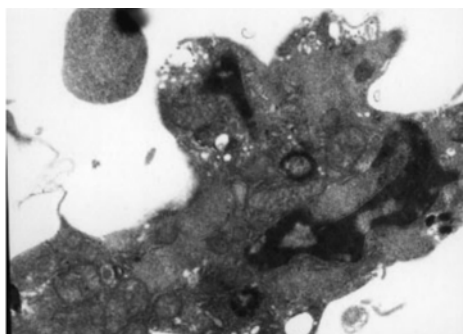


图4 C₆ 细胞经热化疗后,染色质浓缩、边聚、碎裂,细胞以出芽方式向胞外释放凋亡小体(×12 000)

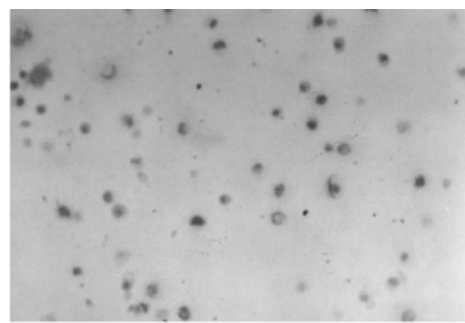


图5 C₆ 细胞经热疗后,TUNEL 法见核呈蚕豆状或新月状棕色团块之凋亡细胞,可见凋亡小体(×200)

讨 论

一、热疗、化疗、热化疗对细胞增殖的抑制作用

细胞形态是细胞功能状态最客观的反映。生长曲线是反映细胞群体增殖动力学简单而直观的指标之一,但死细胞常被计算在内。MTT 能被活细胞内线粒体琥珀酰脱氢酶消化而形成蓝色的甲胍。MTT 法就是通过比色法确定甲胍形成的量,判断活细胞数量和功能状态,通过计算处理因素对肿瘤细胞的抑制率反映对活细胞的影响,从而弥补生长曲线的不足^[5]。本研究结果表明热疗、化疗、热化疗对细胞增殖有直接抑制作用($P < 0.001$)。热疗与化疗有协同作用($P < 0.001$)。随丝裂霉素浓度增加而抑制作用增强($P < 0.001$),在其浓度达 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 时杀伤作用最强,以后随药物浓度增加,无明显增强, $P > 0.05$ 。其机制有待进一步研究。

二、热疗、化疗、热化疗对细胞凋亡的促进作用

细胞凋亡形态学是鉴定细胞凋亡最可靠的方法。细胞凋亡最显著而具特征性的生化特征是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖的内源性核酸内切酶的激活将核染色体从核小体间裂断,形成由大约 $180 \sim 200 \text{ bp}$ 或其多聚体组成的寡核苷酸片段。TUNEL 法能够先于坏死细胞与凋亡细胞 3-OH'端结合,反映细胞凋亡典型的生化和形态特征,进行凋亡细胞形态和计量观察^[6]。凋亡细胞的体积微小,光散射特征发生改变,用一些 DNA 结合荧光染料对其 DNA 进行染色,用流式细胞仪可以将凋亡细胞检测出来,细胞经乙醇固定后,用 PI 染色,在单参数流式细胞仪的直方图上,在 G₀/G₁ 期的左侧发现一亚二倍体峰。本研究透射电镜观察、TUNEL 法、FCM 结果均表明热疗、化疗能诱导细胞凋亡,且热化疗有协同作用。

三、热化疗诱导凋亡的机制

生物膜是加热治疗的靶,受热后生物膜的流动性和通透性均发生改变,导致细胞内离子浓度的变化。胞内 Ca^{2+} 上升,一方面可以活化磷脂酶 A₂ (PLA₂),另一方面可直接激活核酸内切酶,导致 DNA 片断化^[7]。

2. FCM 观察各组细胞凋亡:凋亡细胞内总 DNA 含量减少,经 PI 染色后,在 FCM 图上表现为亚 G₁ 峰。对照组 C₆ 细胞凋亡率 4.44%。各处理组与对照组相比,热疗、化疗、热化疗组细胞凋亡率均呈显著增加, $P < 0.001$;当药物浓度相同时,热化疗组较化疗组的细胞凋亡率显著性增加, $P < 0.001$ (表 2)。

表 2 热疗、化疗、热化疗对 C₆ 细胞凋亡率的影响

组 别	药物浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	例数		凋亡率(%, $\bar{x} \pm s$)	
		FCM	TUNEL	FCM	TUNEL
对照组	0	9	45	4.44 ± 0.84	0
热疗组	0	9	45	$12.59 \pm 0.96^{\Delta}$	$9.89 \pm 1.25^{\Delta}$
化疗组	0.5	9	45	$16.15 \pm 1.06^{\Delta}$	$10.25 \pm 1.23^{\Delta}$
	1.5	9	45	$38.58 \pm 1.25^{\Delta}$	$26.36 \pm 1.08^{\Delta}$
	2.5	9	45	$18.92 \pm 1.08^{\Delta}$	$18.05 \pm 2.05^{\Delta}$
热化疗组	0.5	9	45	$32.95 \pm 1.32^{\Delta\Delta}$	$24.25 \pm 1.85^{\Delta\Delta}$
	1.5	9	45	$44.11 \pm 1.28^{\Delta\Delta}$	$32.98 \pm 2.24^{\Delta\Delta}$
	2.5	9	45	$31.64 \pm 1.34^{\Delta\Delta}$	$21.25 \pm 2.25^{\Delta\Delta}$

注: Δ 单纯热疗组、单纯化疗组、热化疗组与空白对照组比较, P 值均 < 0.001 ; $\Delta\Delta$ 热化疗组与单纯热疗组、单纯化疗组比较, $P < 0.001$

3. TUNEL 法对各组细胞凋亡的原位检测:凋亡细胞核被染成棕黄色(图 5)。对照组 C₆ 细胞凋亡率 0。各处理组与对照组相比,热疗、化疗、热化疗组细胞凋亡率均显著增加, $P < 0.001$;当药物浓度相同时,热化疗组较化疗组的细胞凋亡率显著增加, $P < 0.001$ 。如表 2 所示。

Watanake 等利用体外实验证实丝裂霉素在有氧或缺氧状态都显示与热疗的协同作用^[8]。本研究结果也证实热化疗有协同作用机制,热疗能提高丝裂霉素的细胞毒性作用($P < 0.001$)。诱导细胞凋亡为其抗癌机制之一。

参 考 文 献

- 1 Rieger L, Weller M, Bornemann A, et al. Bcl-2 family protein expression in human malignant glioma: a clinical - pathological correlative study. J Neurol Sci, 1998, 155: 68-75.
- 2 Kokawa K, Shikone T, Otani T, et al. Transient increases of apoptosis and Bax expression occurring during radiotherapy in patients with invasive cervical carcinoma. Cancer, 1999, 86: 79-87.
- 3 Abe T, Mori T, Wakabayashi Y, et al. Expression of multidrug resistance protein gene in patients with glioma after chemotherapy. J Neurooncol, 1998, 40: 11-18.
- 4 Ormerod MG, Sun XM, Snowden RT, et al. Increased membrane permea-

bility of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. Cytometry, 1993, 14: 595.

- 5 冯建芳. 培养细胞增殖动力学的常用分析方法. 见: 章静波, 主编. 细胞生物学实用方法与技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社出版, 1995. 52-54.
- 6 Negoescu A, Lorimier P, Francoise LM, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. J Histochem Cytochem, 1996, 44: 959-968.
- 7 McConkey DJ, Hartzell P, Duddy SK, et al. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by Ca^{2+} mediated endonuclease activation. Science, 1988, 242: 256-259.
- 8 Watanake M, Tanaka R, Hondo H, et al. Effects of antineoplastic agents and hyperthermia on cytotoxicity toward chronically hypoxic glioma cells. Int J Hyperthermia, 1992, 8: 131-138.

(收稿日期: 2001-12-07)

(本文编辑: 郭正成)

· 短篇报道 ·

中药药汽浴在强直性脊椎炎治疗中的作用

李萍 段瑛春 曹铁梅 刘文华 高莞 张萍

选择 1995 年 12 月 ~ 1997 年 12 月住院的强直性脊椎炎 (AS) 患者, 所有病例均符合 1984 年修订版纽约标准^[1]。排除 ① 虽为 AS, 但有发热、关节红肿、急性虹膜炎、血沉 ≥ 30 mm/h 等活动期患者; ② AS 合并心衰、肺心病、Ⅱ期以上高血压、支气管哮喘、中度以上贫血 (Hb < 9 g) 及传染性疾病。患者随机分为观察组和对照组, 对照组 31 例给予常规的中西药治疗^[2]; 观察组 35 例, 在对照组治疗基础上应用中药药汽浴辅助治疗。2 组在性别、年龄、病程、病情等方面均有可比性。观察项目: 腰骶部疼痛程度、疼痛关节数、晨僵时间、Schober 试验、指 - 地距。以 2 个月为 1 疗程, 除计量指标外, 依疼痛的程度 (无、轻、中、重) 分别按 0、1、2、3 分计算, 并进行统计学分析。

中药药汽浴治疗方法: (1) 药浴处方: 豨莶草 30 g、葛根 20 g、透骨草 25 g、防风 25 g、艾叶 20 g、羌活 15 g、木瓜 20 g、伸筋草 20 g、当归 25 g、鸡血藤 15 g、红花 10 g、牛膝 10 g, 将以上各药加水浸泡 2 h 后, 煎煮 2 次, 制成 5000 ml 原液, 1 次用完。(2) 操作方法: 病人坐在蒸汽浴房 (北燕牌桑那浴房 IS-1128 型) 中, 按蒸汽键, 待蒸汽均匀喷出后熏蒸 15 min, 然后将中药原液反复均匀地喷淋在皮肤上, 以疼痛部位为主, 同时按摩病痛部位, 持续时间为 20 ~ 30 min, 隔日进行 1 次。(3) 注意事项: ① 密切观察患者, 如有不适终止治疗; ② 尽量延长药物停留时间以利吸收; ③ 严防感冒; ④ 疗后休息半小时, 多饮水, 保持电解质平衡。

疗效标准: 显效, 1 疗程前后观察项目总有效率 $> 70\%$; 有效, 1 疗程前后观察项目总有效率 $30\% \sim 70\%$; 无效, 1 疗程前后总有效率 $< 30\%$ 。经过治疗后, 观察组无效 4 例, 有效 15 例, 显效 16 例; 对照组无效 11 例, 有效 15 例, 显效 5 例。经过 Ridit

分析, $U = 2.942$, 两组总疗效比较差异有极显著性, $P < 0.01$ 。2 组观察项目疗效比较见表 1, 从中可见观察组治疗后改善程度优于对照组。

表 1 2 组观察项目疗效比较

观察项目	观察组 ($n=35$)	对照组 ($n=31$)	t 值	P 值
腰骶疼痛程度 (积分)	1.44 ± 0.53	0.57 ± 0.48	6.96	< 0.05
疼痛关节数 (个)	2.43 ± 1.48	1.02 ± 1.11	4.33	< 0.05
肌僵 (min)	46.53 ± 28.48	21.66 ± 19.89	4.06	< 0.05
Schober (cm)	0.57 ± 0.62	0.22 ± 0.25	3.07	< 0.05
指 - 地距 (cm)	9.46 ± 10.29	3.58 ± 5.66	2.92	< 0.05

讨论 本药浴处方活血以祛风, 温经而散寒, 将两者融于一方之中。本疗法独创之处在于药物可透皮直达病处。现代研究证明, 药汽浴治疗 AS 具有独特优势: ① 通过升温使血流加快, 促进血液循环和新陈代谢, 并降低神经末梢的兴奋及肌肉痉挛, 可收到镇痛效果; ② 使全身腠理疏松以发汗, 达到祛风散寒、调节机体免疫的功能; ③ 浸浴的水合作用有利于中药生物碱的吸收, 游离生物碱容易透过皮肤角质层直接作用于病变部位。该疗法驱邪不伤正, 是内证外治、由里透表、通经活络、发汗而不伤营卫的好方法。因而在改善 AS 的临床症状及体征方面明显优于对照组, 有利于该病的康复。

参 考 文 献

- 1 蒋明, 朱立平, 林孝义. 风湿病学. 北京: 科学出版社, 1995. 952-953.
- 2 曹铁梅, 韩宏妮, 段英春, 等. 中西医结合长疗程治疗强直性脊柱炎的临床观察. 中西医结合杂志, 2001, 8: 577-578.

(收稿日期: 2001-11-29)

(本文编辑: 熊芝兰)

作者单位: 130062 长春, 中国人民解放军第 208 医院中医科 (李萍、曹铁梅、刘文华、高莞、张萍), 理疗科 (段瑛春)