

新闻中心

- ▶ 1-告示
- ▶ 2-高压氧
- ▶ 3-药物
- ▶ 4-养生保健
- ▶ 5-工程设备
- ▶ 6-管理与质控
- ▶ 7-问题解答
- ▶ 8-生命探索及其它
- ▶ 9-In English

相关链接

新闻

高压氧对鼻咽癌细胞生长与氧自由基的影响

双击自动滚屏

发布时间: 2008-10-15 14:54:12 阅读: 83次

高压氧对鼻咽癌细胞生长与氧自由基的影响

中南大学湘雅医院高压氧科 彭争荣

[摘要] 目的: 通过观察高压氧处理后人鼻咽癌细胞系CNE-2细胞生长抑制率和死亡率及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量的变化,以初步探讨高压氧处理对鼻咽癌细胞生长的影响及其影响机理。方法: 将实验培养的人鼻咽癌CNE-2细胞分为A组(对照组)、B组(高压氧0.15MPa)、C组(高压氧0.20MPa)、D组(高压氧0.25MPa)和E组(高压氧0.30MPa)。采用MTT法分析细胞生长抑制率,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: 高压氧处理各组的细胞死亡率、MDA含量均较A组明显增加,比较差异均有统计学意义($P<0.05$); 各组鼻咽癌CNE-2细胞生长抑制率、死亡率和MDA含量比较差异有统计学意义($P<0.05$),且均随高压氧处理压力升高而增加。结论: 高压氧处理增加实验培养的人鼻咽癌CNE-2细胞生长抑制率、死亡率,可能与高压氧处理增加鼻咽癌CNE-2细胞内氧自由基有关。

[关键词] 鼻咽癌; 高压氧; 生长抑制率; 死亡率; 氧自由基

The effect of hyperbaric oxygen on the growth and oxygen free radical of nasopharyngeal carcinoma cells

[ABSTRACT] Objective: To investigate the effect and the possible influential mechanisms of hyperbaric oxygen(HBO) on the growth and death in human nasopharyngeal carcinoma(NPC) cell line CNE-2 by viewing the inhibition ratio of growth and mortality rate and the content of superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) of nasopharyngeal carcinoma cells through HBO disposal. Method: Nasopharyngeal carcinoma(NPC) cell line CNE-2 were divided into 5 groups randomly, Group A: control group; Group B: hyperbaric oxygen(0.15MPa); Group C: hyperbaric oxygen(0.20MPa); Group D: hyperbaric oxygen(0.25MPa); Group E: hyperbaric oxygen(0.30MPa). The inhibition ratio of growth in CNE2Z cells of all groups were detected by MTT reduction assay and the mortality rate were detected by PI staining; as well as the content of SOD and MDA were detected. Result: The mortality rate and content of MDA of every hyperbaric oxygen groups were dramatically increased comparing with A group($P<0.05$); There were statistical difference in the content of MDA, inhibition ratio of growth and mortality rate in all groups($P<0.05$), furthermore, all to increased along with the heightening the pressure of hyperbaric oxygen. Conclusion: HBO disposal could increased the inhibition ratio of growth and mortality rate of human NPC cell line CNE-2, It is possible relevant with increaseing the oxygen free radical in human nasopharyngeal carcinoma cells through HBO disposal.

[KEYWORDS] nasopharyngeal carcinoma(NPC); hyperbaric oxygen(HBO); inhibition ratio of growth; mortality rate; oxygen free radical

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种常见恶性肿瘤,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]。大量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5年生存率^[4]。然而高压氧对鼻咽癌细胞生长的影响及其机理国内外研究尚不多^[5],所以本研究拟从细胞水平进行观察高压氧处理后人鼻咽癌细胞系CNE-2细胞生长抑制率和死亡率及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量的变化,探讨高压氧对鼻咽癌CNE-2细胞生长与死亡的影响及其影响机理。

1 材料与方法

1.1 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)、四唑盐(MTT)溶液与碘化丙啶荧光染色液(USA, Sigma)、DMSO(二甲基亚砷,上海西宝生物技术有限公司)、CO₂培养箱(Japan, ESPEC)、SOD和MDA检测试剂(南京建成)、0.25%胰酶(USA, Sigma)、倒置显微镜(USA, Micro Star A0)、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)、721nm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)。

1.1.2 主要试剂配制 ①RMPZ-1640培养基:将一包RMPZ-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CNE-2细胞培养时,加入小牛血清至浓度为15%。②PBS溶液:NaCl 8g, KCl 0.2g, NaHPO₄·12H₂O 1.54g, KH₂PO₄ 0.2g,溶解后调PH至7.0,定容1L,分装后高压灭菌,4℃保存。③四唑盐(MTT)溶液:MTT5g/L, 0.01mol/L PBS配制,用0.22μm微孔过滤器过滤除菌,放入4℃冰箱内避光保存。

1.2 方法

1.2.1 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RMPZ-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%EDTA于室温下消化传代。

1.2.2 试验分组

本实验分为A、B、C、D和E五组。A组(对照组):细胞不做处理。B组:细胞采用0.15MPa(ATA)高压氧处理90min; C组:细胞用0.20MPa(ATA)高压氧处理90min; D组:细胞采用0.25MPa(ATA)高压氧处理90min; E组:细胞采用0.30MPa(ATA)高压氧处理90min。

1.2.3 高压氧处理方法

将B、C、D和E组人鼻咽癌CNE-2细胞置于YLCO/1A型婴儿氧舱内,先以10L/min的氧流量进行门缝洗舱5min,将舱内氧浓度提高至55%以上,然后以5~8L/min氧流量均匀变速加压,加压时间为15min,使舱内压力分别达到0.15MPa、0.20MPa、0.25MPa和0.30MPa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3~5L/min的氧流量持续小流量洗舱,稳压吸氧60min后,均匀变速减压,减压时间为15min,总处理时间为90min,共2次(2次治疗的间隔时间>4h)。A组细胞也置于YLCO/1A型婴儿氧舱内90min×2次,但不加压,仅常压下吸空气。

1.2.4 MTT法分析细胞生长抑制情况

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12000个/ml,96孔培养板每孔加200μl细胞悬液,每组6孔,种5块板,置于37℃, 5%CO₂培养箱培养至贴壁。分别经各组处理后,置于37℃, 5%CO₂培养箱培养24hr,加入20μl 5g/l MTT溶液,继续培养4hr,翻转法弃去培养液,加入200μl DMSO,置37℃培养箱中10min,酶标仪检测492nm-630nm波长吸光值(A值)。以空白孔调零。按(生长抑制率=(1-实验组A值均数/A组A值均数)×100%)公式计算细胞生长抑制率。

1.2.5 PI染色观察细胞死亡情况

取指数生长期人鼻咽癌CNE-2细胞,接种于24孔培养板,每组6孔,种5块板,细胞贴壁后,分别经各组处理后48hrPBS洗两次,加入50mg/l碘化丙啶4℃下孵育20min,最后用甲醇和醋酸混合液(3:1)固定,用荧光显微镜观察并摄影。PI可与细胞核DNA(或RNA)结合,活细胞因细胞膜保持完整,PI不能透过,从而不能使之染色,但当细胞在处于坏死或晚期凋亡时细胞膜被破坏时,这时可被PI标记呈红色,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。

1.2.6 人鼻咽癌CNE2Z细胞SOD检测

采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活力。取指数生长期人鼻咽癌CNE-2细胞,接种于24孔培养板,每组6孔,种5块板,细胞贴壁后,分别经各组处理后48hr收集细胞,经离心收集后加入200μl的0.9%生理盐水,低温超声破碎。确定最佳样本液量后将样品与试剂盒中的试剂按次序加入充分混匀,空白管加相应量的蒸馏水,37℃恒温水浴40min。室温放置10min,于波长550nm蒸馏水调零后进行比色。记录吸光度的变化,然后计算SOD值。酶活力计算:(对照管吸光度-样品反应液的吸光度)×反应液体积/(对照管吸光度×50%×加入反应液中的酶液体积×蛋白质含量)。酶单位表示:在本实验条件下,抑制率达50%所对应的提取液SOD含量即为一个SOD单位(U)。

1.2.7 人鼻咽癌CNE2Z细胞MDA检测

采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法。细胞处理同前,取上清样本液0.2ml, 0.05mol/l HCl 2ml, 0.67%TBA 2ml

混匀，于沸水浴中加热30min，流水冷却，加甲醇/正丁醇2.7ml，振荡45s，3000 r/min离心10 min，取上层液测定。标准管取标准液0.2ml 同样操作。以甲醇/正丁醇作空白调零，535nm波长处测吸收度(OD值)。样品MDA含量(nmol)=[(测定管OD值-测定空白管OD值)/标准管OD值-标准空白管OD值]×100%。

2 统计学处理

所有数据均用统计软件SPSS11.0处理。计量资料采用均数±标准差表示， $\alpha=0.05$ 为检验标准。两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。

3 结果

3.1 MTT法分析细胞生长抑制情况(表1)

B、C、D和E四组鼻咽癌CNE-2细胞生长抑制率比较差异有统计学意义($F=16.436, P<0.01$)，两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)，且四组细胞生长抑制率随高压氧处理压力增加而增加。

表1 各组鼻咽癌CNE-2细胞生长抑制率与死亡率的比较

组别	细胞生长抑制率(%)	细胞死亡率(%)
A组	——	1.43±0.51
B组	2.98±2.93	2.61±0.94
C组	7.74±4.28	4.00±0.56
D组	13.58±4.35	4.88±0.53
E组	20.89±6.43	5.80±0.79

3.2 PI染色观察细胞死亡情况(表1,图1)

B、C、D和E四组的细胞死亡率均较A组增加($P<0.05$)，比较差异均有统计学意义($P<0.01$)，A、B、C、D和E五组鼻咽癌CNE-2细胞死亡率比较差异有统计学意义($F=38.847, P<0.01$)，两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。且五组鼻咽癌CNE-2细胞死亡率随高压氧处理压力升高而增加。

3.3 人鼻咽癌CNE2Z细胞SOD、MDA含量改变情况(表2)

A、B、C、D和E五组SOD的含量比较差异有统计学意义($F=3.176, P<0.05$)，两两比较仅B与E、C与D和C与E差异有统计学意义($P<0.05$)，C组SOD含量最高，E组最低；A、B、C、D和E五组MDA含量比较差异有统计学意义($F=35.101, P<0.01$)，两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$)，且五组MDA含量随高压氧处理压力增加而增加。

表2 各组鼻咽癌CNE-2细胞SOD、MDA含量的比较

组别	SOD	MDA
A组	83.29±18.49	3.80±0.78
B组	88.62±15.52	5.17±1.19
C组	99.29±18.28	6.45±0.62
D组	75.14±17.51	7.94±1.20
E组	65.20±19.14	10.43±1.32

4 讨论

近几年来，高压氧治疗已经广泛地应用于临床，对某些恶性肿瘤的放疗增敏^[6]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^[7]。但高压氧对鼻咽癌细胞生长的影响国内外研究尚不多^[5]，所以我们特设计了本实验研究，拟从细胞水平进行探讨高压氧对鼻咽癌CNE-2细胞生长的影响及其影响机理。

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比色法观察高压氧对鼻咽癌CNE-2细胞生长的抑制作用，采用PI染色法观察高压氧对鼻咽癌CNE-2细胞的死亡情况。本试验表1结果显示高压氧各组都对鼻咽癌细胞生长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显著统计学意义($P<0.01$)。这说明高压氧能抑制鼻咽癌CNE-2细胞的生长^[8]，促进鼻咽癌CNE-2细胞的死亡。这与McDonald K^[9]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2.8ATA×60min高压氧治疗，20只做为对照。结果显示进行高压氧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上。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^[10]。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^[11]。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氧自由基损伤的程度^[12]。大量研究发现，几乎所有癌细胞的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性都明显低于正常细胞^[13]。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。而高压

氧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^[14]。本研究表2的结果也显示,实验各组的SOD含量比较差异虽有统计学意义,但随高压氧处理的压力增加SOD的含量反而下降;而MDA含量比较实验各组差异都有显著统计学意义(P<0.05),高压氧四组较对照组明显增加(P<0.01),且随高压氧处理压力增加而明显增加。这说明高压氧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,抗氧化物质含量活性下降,氧自由基生成增多,脂质过氧化作用增强,从而可造成肿瘤细胞生长抑制和死亡。这与Lian Q^[15]的研究结果相同,高压氧组老鼠的肉瘤组织内氧自由基和丙二醛含量明显比对照组高,同时肉瘤组织坏死发生率和老鼠生存率也高于对照组,从而得出结论,高压氧能加速S-180肉瘤细胞的坏死。

5 结语

高压氧处理可使人鼻咽癌CNE-2细胞生长抑制率、死亡率升高,同时高压氧处理也使人鼻咽癌CNE-2细胞MDA含量增加,都是随高压氧处理压力增加而明显增加,这可能暗示了高压氧是通过增加鼻咽癌细胞内氧自由基来实现增加鼻咽癌细胞生长抑制率、死亡率。

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[J]. *Ai Zheng*. 2008 Mar; 27(3): 289-94. PMID: 18334119 [PubMed - in process]
- [2] Schönmeier BH, Wong AK, Reid VJ, et al. The effect of hyperbaric oxygen treatment on squamous cell cancer growth and tumor hypoxia[J]. *Ann Plast Surg*. 2008 Jan; 60(1): 81-8. PMID: 18281803 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [3] Kunugita N, Kohshi K, Kinoshita Y et al. Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models[J]. *Cancer Lett*. 2001 Mar 26; 164(2): 149-54. PMID: 11179829 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [4] Kohshi K, Yamamoto H, Nakahara A, et al. Fractionated stereotactic radiotherapy using gamma unit after hyperbaric oxygenation on recurrent high-grade gliomas[J]. *J Neurooncol*. 2007 May; 82(3): 297-303. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17120158 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [5] Sun TB, Chen RL, Hsu YH, The effect of hyperbaric oxygen on human oral cancer cell [J]. *Undersea Hyperb Med*, 2004 Summer; 31(2): 251-60. PMID: 15485088 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [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[J]. *Cancer Lett*, 2004 Jul 8; 210(1): 35-40. PMID: 15172118 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [7] Narozny W, Sicko Z, Przewozny T et al. Hyperbaric oxygen therapy as a method of treatment of laryngeal and pharyngeal radionecrosis[J]. *Otolaryngol Pol*, 2001; 55(1): 57-60. Polish. PMID: 11355479 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [8] Feldmeier, Carl U, Hartmann K, et al. Hyperbaric oxygen: does it promote growth or recurrence of malignancy[J]? *Undersea Hyperb Med*, 2003 Spring; 30(1): 1-18. Review. PMID: 12841604 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [9] McDonald K, Bradfield J, Kinsella J, et al. Effect of hyperbaric oxygenation on existing oral mucosal carcinoma[J]. *Laryngoscope*, 1996 Aug; 106(8): 957-9. PMID: 8699908 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [10] Chen ML, Li J, Xiao WR, et al. Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2006 Oct; 31(5): 635-9. PMID: 17062920 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [11] Gadjeva V, Dimov A, Georgieva N. Influence of therapy on the antioxidant status in patients with melanoma[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2008 Apr; 33(2): 179-85. PMID: 18315784 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [12] Nair U, Bartsch H, Nair J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007 Oct 15; 43(8): 1109-20. Epub 2007 Jul 20. Review. PMID: 17854706 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [13] 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[J]. *Cancer Lett*, 2006 Feb 20; 233(1): 28-35. PMID: 15899547 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [14] Daruwalla J, Christophi C. Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review[J]. *World J Surg*, 2006 Dec; 30(12): 2112-31. Review. PMID: 17102915 [PubMed - indexed for MEDLINE]

[15]Lian Q, Hang R, Yan HF et al: Effects of hyperbaric oxygen on S-180 sarcoma in mice[J]. Undersea Hyperb Med, 1995 Jun; 22(2): 153-60. PMID: 7633277 [PubMed - indexed for MEDLINE]

版权所有：高压氧医学网 地址：湖南长沙市湘雅路中南大学湘雅医院内
Copyright 2006-2008 www.med-hbo.com, All Rights Reserved
网站建设：湖南E酷网络服务中心 网站备案：湘ICP备07500061号