

# 热化疗中活性氧作用机制的研究\*

王昇志 毛祖彝

**摘要** 通过对正常 BALB/C 鼠及实验组荷瘤鼠外周血超氧化物歧化酶(SOD)及脂质过氧化物(LPO)的测定,观察发现:热化疗组荷瘤鼠 SOD 及 LPO 水平与正常鼠比较无显著性差异( $P>0.05$ ),而与单纯热疗或化疗及未作任何处理组(NT 组)比较有显著性差异( $P<0.01$ ),而热疗或化疗组与 NT 组比较无差异( $P>0.05$ )。本实验证实:热化疗对癌症有一定的治疗效果。热化疗可以提高癌细胞中的活性氧的量,活性氧通过本身的细胞毒作用及由其引起的脂质过氧化作用等,可使癌细胞首先被杀死。

**关键词** 超氧化物歧化酶 脂质过氧化物 癌 热化疗

利用超氧阴离子( $O_2^-$ )及它引发的其它活性氧来杀死癌细胞是放疗和许多化疗药物的特点<sup>[1,2]</sup>。近来的研究已经表明,热化疗具有很好的抗癌效应。但对热化疗中活性氧作用机制的研究,目前尚未见报道。本研究的目的,旨在通过动物实验,探讨热化疗中活性氧作用机制,为热化疗在临床的进一步推广、应用提供可靠的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**动物** BALB/C 纯系小白鼠 100 只(华西医科大学钩端螺旋体病研究室提供),8 周龄,雌雄各半,体重雄 22~24 g,雌 21~23 g。分笼标准饲料喂养,自由饮水,摄食。

**瘤株、瘤细胞** 为  $S_{180}$  腹水型,接种皮下后可长成实体型肿瘤(华西医科大学肿瘤研究所提供)。

**药物** 平阳霉素(天津河北制药厂生产)。

**加温装置** 恒温小型水浴箱(北京医疗器械厂生产)。水浴温度用精确水银玻璃温度计控制,精确度为 0.1℃

### 1.2 方法

**1.2.1 分组** 小白鼠分笼饲养 3.d 后,随机平均分为 5 组,每组 20 只,雌雄各半,同性别组间平均体重相差小于 1 g。5 组为:正常对照组(N 组),不治疗组(NT 组),平阳霉素治疗组(P 组),高温治疗组(H 组),高温联合平阳霉素治疗组(HP 组)。后 4 组为实验组,均由

一人操作,于小鼠右后足底皮下注入  $S_{180}$  细胞  $2 \times 10^7 / 0.1 \text{ ml}$ 。

**1.2.2 治疗** 接种瘤细胞 48 h 后,给 P 组和 HP 组小鼠腹腔注射平阳霉素 0.2 mg/只,HP 组给药后立即用恒温水浴( $42.5 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ )加温右后足荷瘤部位,时间 30 min。H 组给予同样加温处理。7 d 后,各治疗组重复上一次治疗。

第 2 次治疗后半月,所有动物全部去眼球放血处死。

**1.2.3 观察指标** 红细胞超氧化物歧化酶(SOD)水平,采用邻苯三酚自氧化法<sup>[3]</sup>,在美国 Beckman-42 型自动生化分析仪上测定空白管自氧化速率及样品管自氧化速率,算出 SOD 自氧化抑制率,代入标准曲线回归方程,求得 SOD  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 。用氯化高铁血红蛋白法测定同一样品血红蛋白(Hb)含量,酶活力以每克血红蛋白所含 SOD 微克数表示。

肝脏脂质过氧化物(LPO)含量,采用 TBA 法<sup>[3]</sup>,在美国 Beckman DU-T 紫外分光光度计上测定 OD 值,代入标准曲线回归方程,求得每毫克肝组织中丙二醛 n mol 数。

### 1.3 统计分析

SOD, LPO 的结果,按完全随机设计的多个样本均数间两两比较,行方差分析,再行多个样本均数间两两比较的 q 检验。

\* 本课题由国家教委博士点基金资助

作者单位:515041 汕头大学医学院一附院(王昇志),华西医科大学口腔医学院(毛祖彝)

## 2 结 果

### 2.1 各组 SOD 检测结果

各组 SOD 活性检测结果见表 1。各组 SOD 活性均数两两比较结果见表 2。

表 1 5 组小鼠 SOD 活性( $\mu\text{g SOD/gHb}$ )

分组	n	SOD 活性( $\bar{x}\pm s$ )
NT 组	20	659 $\pm$ 120
P 组	20	717 $\pm$ 74
H 组	20	739 $\pm$ 104
HP 组	20	980 $\pm$ 104
正常组	20	1051 $\pm$ 207

表 2 各组 SOD 活性均数两两比较的 q 检验

对比组	均数之差	组数	q 值	$P=0.05$	$P=0.01$	P 值
NT 与 P 组	58	2	2.05	2.83	3.76	>0.05
NT 与 H 组	80	3	2.83	3.40	4.28	>0.05
NT 与 HP 组	321	4	11.34	3.74	4.59	<0.01
NT 与正常组	392	5	13.85	3.98	4.82	<0.01
P 与 H 组	22	2	0.78	2.83	3.76	>0.05
P 与 HP 组	243	3	8.59	3.40	4.28	<0.01
P 与正常组	234	4	11.80	3.74	4.59	<0.01
H 与 HP 组	263	2	9.29	2.83	3.76	<0.01
H 与正常组	312	3	11.02	3.40	4.28	<0.01
HP 与正常组	71	2	2.51	2.83	3.76	>0.05

统计结果表明 NT 组、P 组、H 组 3 组之间及 HP 组与正常组之间 SOD 的活性无差异( $P>0.05$ ),而其余各组之间有显著性差异( $P<0.01$ )。

### 2.2 各组肝脂质过氧化物的量检测结果

LPO 测量结果见表 3,统计学处理同 SOD,样本均数间两两比较的 q 检验结果见表 4。

表 3 5 组小鼠肝脂质过氧化物的量( $\text{n mol/g}$  肝组织)

分组	n	肝脂质过氧化物的量( $\bar{x}\pm s$ )
NT 组	20	0.5341 $\pm$ 0.0450
P 组	20	0.5273 $\pm$ 0.0389
H 组	20	0.5176 $\pm$ 0.0959
HP 组	20	0.4473 $\pm$ 0.0425
正常组	20	0.4442 $\pm$ 0.0449

统计结果表明 NT 组与 P 组、H 组、P 组与 H 组之间及 HP 与正常组之间 LPO 的量无差异( $P>0.05$ ),

而其余各组之间均有显著性差异( $P<0.01$ )。

表 4 各组 LPO 均数两两比较的 q 检验

对比组	均数之差	组数	q 值	$P=0.05$	$P=0.01$	P 值
NT 与 P 组	0.0068	2	0.37	2.83	3.76	>0.05
NT 与 H 组	0.0165	3	0.91	3.40	4.28	>0.05
NT 与 HP 组	0.0868	4	4.77	3.74	4.59	<0.01
NT 与正常组	0.0899	5	4.94	3.98	4.82	<0.01
P 与 H 组	0.0097	2	0.53	2.83	3.76	>0.05
P 与 HP 组	0.0800	3	4.40	3.40	4.28	<0.01
P 与正常组	0.0831	4	4.57	3.74	4.59	<0.01
H 与 HP 组	0.0703	2	3.86	2.83	3.76	<0.01
H 与正常组	0.0734	3	4.32	3.40	4.28	<0.01
HP 与正常组	0.0031	2	0.17	2.83	3.76	>0.05

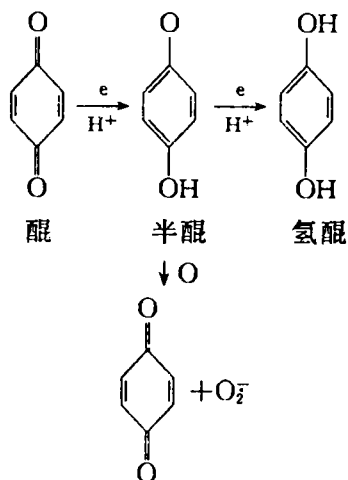
## 3 讨 论

热化疗作为恶性肿瘤综合治疗的一种手段,在提高癌症患者治愈率和生存率的同时,还可保存患者的组织器官,具有提高癌症患者生存质量之独特优点,近几年研究进展较快,且效果令人鼓舞<sup>[4,5]</sup>。众所周知,活性氧与癌有着非常密切的关系,过量的活性氧不论对正常细胞还是癌细胞都具有细胞毒作用,及其介导的脂质过氧化作用。作为重要的清除活性氧——超氧阴离子的 SOD 的缺失和降低是癌细胞和肿瘤宿主普遍具有的特征,因而可通过活性氧来抑制癌的生长。采用活性氧治癌的原理在于:利用癌细胞与正常细胞 SOD 活性的差别,通过超氧阴离子的细胞毒作用及其介导的脂质过氧化作用来杀伤癌细胞。所以国内外学者认为:提高癌细胞对活性氧的敏感性,增强癌细胞内的脂质过氧化作用,从而提高癌细胞的坏死率,是一个有意义的课题<sup>[1,2]</sup>。目前研究热化疗的抗癌效应,阐明热化疗中活性氧作用的机制,对热化疗在临床的进一步推广应用具有重要意义。

近几年,国外学者证实活性氧在热疗中的作用机制:通过热疗可以提高癌细胞中的活性

氧含量,从而提高其细胞毒作用,及其介导的脂质过氧化作用,提高了癌细胞内的氧化损伤。热疗中活性氧的作用机制是:热疗(Hyperthermia)使细胞内氧化/还原反应增强,导致细胞内活性氧的量提高,由于肿瘤细胞内缺乏或极少含有 Mn-SOD,因而通过活性氧的直接作用或由活性氧介导的脂质过氧化作用等,使肿瘤细胞首先被杀死。而正常细胞由于胞内 Mn-SOD 的量正常,因而可以清除细胞内因高温而产生的过量活性氧,从而使正常细胞得到保护,而不被杀死。部分细胞内 Mn-SOD 含量低的正常细胞也有被杀死的可能<sup>[6~9]</sup>。这就是为何热疗可选择性地杀伤肿瘤细胞,而对正常组织无损伤或损伤非常轻微的原因。

已知大量的抗癌药物的确能产生活性氧,通过超氧阴离子的细胞毒作用等杀伤癌细胞是化疗的重要机制之一。许多具有抗癌能力的抗生素类抗癌药物都含有醌式结构,它们可通过半醌自由基与氧反应生成 O<sub>2</sub><sup>-</sup>,如附图。



附图 抗生素类抗癌药产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 反应式

这一反应可看作一般醌类抗癌药物的共同抗肿瘤作用机理。抗生素类抗癌药物博来霉素,它不但以半醌自由基的形式产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup>,同时作为一种金属螯合物,能和亚铁离子形成 Bleomycin-Fe<sup>+</sup> 复合物,该复合物能为氧分子提供电子,可形成 O<sub>2</sub><sup>-</sup>、过氧化物和 ·OH,这些具有高度活性的活性氧,导致了肿瘤细胞最后的

死亡<sup>[10,11]</sup>。

已经证实热疗能提高癌细胞中活性氧的量,而许多抗癌药物均能产生活性氧,因而两者联合使癌细胞中活性氧的量大大提高,从而提高了癌细胞内活性氧的细胞毒作用,及其介导的脂质过氧化作用,和细胞内的氧化损伤,从而使热化疗的抗癌效应优于单一的热疗或化疗,所以热疗联合化疗有协同增敏作用。

国内外学者已经证实人和动物 50 余种癌细胞中 SOD 的量缺乏或降低,而荷瘤宿主外周血 SOD 量显著降低,而其脂质过氧化物的量显著增高。其原因在于:癌细胞可以源源不断地产生活性氧,而作为最重要的活性氧 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 具有高度弥散性,它极易穿过癌细胞膜,进入细胞外的机体内部,因此使荷瘤宿主体内的活性氧增多,从而使 SOD 消耗而水平降低,也导致脂质过氧化作用增强,脂质过氧化物的生成量增多<sup>[1,2]</sup>。

在本实验中,NT 组未经治疗,因瘤细胞内 SOD 减少或缺失,使瘤细胞内源源不断产生的具有高度弥散性的 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 进入荷瘤鼠机体内部,使其体内活性氧增多,因而使外周血 SOD 不断消耗而水平大大降低,同时也导致体内脂质过氧化作用增强,LPO 生成量增多,LPO 水平大大上升。在 H 或 P 组中,由于经单一热疗或化疗的作用,短小时内导致瘤细胞内活性氧的量有所增加,因而可杀死部分肿瘤细胞,死亡的肿瘤细胞便不能再产生具有高度弥散性的活性氧,使外周血 SOD 水平较 NT 组稍高,LPO 水平有所降低,但两组与 NT 组比较无显著性差异(P > 0.05)。在 HP 组由于热疗联合化疗的作用,短小时内瘤细胞内活性氧的浓度大大升高,导致大量肿瘤细胞快速立即死亡,大量死亡的肿瘤细胞便不能再产生具有高度弥散性的活性氧,因而致外周血 SOD 水平上升,LPO 水平下降,与正常组比较无显著性差异(P > 0.05),而与 NT, H, P 组比较有显著性差异(P < 0.01)。

本实验的结果表明:热化疗可以大大地提高癌细胞内的活性氧的量,通过活性氧的细胞毒作用及其介导的脂质过氧化作用,从而起到

了很好的抗癌效应。但是也不能把热化疗抗肿瘤的作用机理都归之为单一的由活性氧作用所致,还有很多其它因素,但丝毫不贬低活性氧在热化疗抗癌效应中所起的作用。通过本实验的研究得到了活性氧在热化疗中所起的作用,也丰富和深化了对热化疗的认识。

活性氧的研究属于新兴的亚分子生物学范畴,从亚分子生物学的角度深入探讨、研究活性氧与热化疗的关系,不仅在理论上有助于阐明热化疗抗癌作用的机理,而且在实践上有助于热化疗在临床的推广和应用。

(本实验得到华西医科大学肿瘤研究所王朝俊副教授的大力支持,在此表示感谢)

#### 4 参考文献

- 1 Oberley LW. Role of superoxide dismutase in cancer, A review. *Cancer Res*, 1979;39:1141
- 2 方允中,李文杰. 自由基与酶. 北京:科学出版社,1989:216~271
- 3 郑光静,易平. 生物化学实验手册. 华西医科大学口腔研究所中心实验室,1990:10
- 4 毛祖彝. 微波加热联合化疗治疗口腔颌面部恶性肿瘤的初步报告. *华西口腔医学杂志*,1988;6:137
- 5 王昇志. 含抗癌药物的热敏脂质体微球联合热疗的抗肿瘤作用. *国外医学口腔医学分册*,1992;19:133
- 6 Issels RD, Fink RM, Lengfelder E. Effects of hyperthermic conditions on the reactivity of oxygen radicals. *Free Radic Res Commun*, 1986;2:7
- 7 Burndon RH, Gill VM, Rice Evans E. Oxidate stress and heat shock protein induction in human cells. *Free Radic Res Commun*, 1987;3:129
- 8 Omar RA, Yano S, Kikkawa Y. Antioxident enzymes and survival of normal and simian virus 40-transformed mouse embryo cells after hyperthermia. *Cancer Res*, 1987;47:3473
- 9 Freeman ML. Does heat shock enhance oxidative stress? Studies with ferrous and ferrio iron. *Radiat Res*, 1990;124:288
- 10 Ishida R, Takahashi T. In creased DNA chair breakage by combined action of bleomycin and superoxiade radical. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975;66:432
- 11 李振. 恶性肿瘤的化学治疗与免疫治疗. 北京:人民卫生出版社,1990

(1994-10-28 收稿)

## The Mechanism Study of the Action of Reactive in the Hyperthermo-Chemotherapy

Wang Shengzhi

*The First Hospital Attached to Shantou University*

Mao Zuyi

*College of Stomatology, WCUMS*

### Abstract

The activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of lipid peroxide (LPO) were measured in normal and implantend S<sub>180</sub> BALB/C mice. The results showed that the activity of SOD and the level of LPO in the group of hyperthermo-chemotherapy was close to the normal group ( $P > 0.05$ ). Authors also found that there were statistical significance between the hyperthermo-chemotherapy group and hyperthermia group or chemotherapy group, or none of treatment group ( $P < 0.01$ ). On the other hand authors found that there were no statistical significance between hyperthermia group and chemotherapy group or none of treatment group. This experimental study indicated that hyperthermo-chemotherapy had good antitumor effects. Tumor cells will be killed first because the Mn-SOD in the tumor cells were lose or little, simultaneously the reactive oxygen increased in the tumor cell by hyperthermo-chemotherapy. Reactive oxygen has cytotoxic action and can mediate lipid peroxidation. Killed tumor cells can't produce O<sub>2</sub><sup>-</sup> which have highly diffusible. So the activity of SOD and the level of LPO of the mice were close to the normal group.