·基础研究·

热疗联合化疗对 Raji 细胞的体外抑制及 Bcl-2 表达的作用

魏红梅[1] 郭坤元[1,3] 陈银海[2] 梅家转[1] 常 红[1] 宋朝阳[1] 邓 兰[1]

摘要 目的: 观察热疗联合阿霉素对人 B 细胞淋巴瘤细胞系 Raji 的体外增殖的抑制作用、凋亡及 Bcl-2 表达的影响。**方法:**MTT 法确定阿霉素的工作浓度,以该浓度进行化疗或与热疗的联合,选择温度 40℃、41℃及 42℃,体外作用于 Raji 细胞。作用前及 48h 采用台盼蓝拒染法检测肿瘤细胞的存活率;MTT 法检测肿瘤细胞增殖的抑制作用;流式细胞仪检测肿瘤细胞的凋亡及 Bcl-2 表达。观察热疗联合阿霉素的抗肿瘤效果。**结果:**作用 48h IC50 的药物浓度作为实验的工作浓度。单纯 40℃、41℃及 42℃热疗 60min 对 Raji 细胞系有抑制作用($P<0.01$),热化疗组对 Raji 细胞有明显的抑制作用($P<0.01$),均随着温度的增高而增强。流式细胞仪检测细胞凋亡及 Bcl-2 的表达,热疗组、化疗组及热化疗组的细胞凋亡率均较对照组显著升高,各组之间差异均有非常显著性意义($P<0.01$);Bcl-2 蛋白的表达则下降,各组之间差异也有非常显著性意义($P<0.01$)。**结论:**热疗联合阿霉素能增强对 Raji 细胞的体外抑制作用;提高肿瘤细胞的凋亡率,下调 Bcl-2 蛋白的表达。

关键词 热疗;阿霉素; Raji;凋亡;Bcl-2

中图分类号:R493,R73 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2007)-04-0319-04

The inhibitive effect and Bcl-2 expression of lymphoma cell line Raji with adriamycin and hyperthermia in vitro/WEI Hongmei, GUO Kunyuan, CHEN Yinhai, et al.//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(4):319—322

Abstract Objective: To observe the inhibitive effect,apoptosis and Bcl-2 expression of Raji cells with adriamycin and hyperthermia. **Method:** The working concentration of adriamycin against Raji was determined by MTT assay that has been developed for quantitative evaluation of the proliferation of cells. Hyperthermia and chemotherapy were used singly or concurrently and the cell survival rates were obtained at 48h.The inhibitive effect was evaluated by MTT.The apoptosis rates and Bcl-2 expression of Raji were determined by flow cytometric analyses. **Result:** The concentration of adriamycin in the experiment was defined as its 48h IC50. The hyperthermia of 40℃,41℃ and 42℃ for 60min showed obvious inhibition to Raji cells ($P<0.01$).Adriamycin chemotherapy combined with hyperthermia showed obvious inhibitive effect to Raji ($P<0.01$). According to flow cytometric analyses,the treatment of hyperthermia and adriamycin used alone or concurrently could significantly increase the apoptosis rates and down-regulate expression of Bcl-2 of Raji cells($P<0.01$). **Conclusion:** Adriamycin chemotherapy combined with 60min of hyperthermia showed obvious inhibitive effect to Raji. This effect could increase the apoptosis rates and down-regulate expression of Bcl-2.

Author's address Dept. of Hematology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University,Guangzhou, 510280

Key words hyperthermia; adriamycin; Raji; apoptosis; Bcl-2

淋巴瘤是造血系统的恶性肿瘤, 尤其是对复发难治性淋巴瘤,目前缺乏有效的治疗方法。化疗是淋巴瘤综合治疗的重要组成部分, 如何提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 提高化疗的总体效率是治疗中亟待解决的问题。

本研究使用人源的淋巴瘤细胞系 Raji, 观察了阿霉素(adriamycin,ADM)与热疗联合对淋巴瘤细胞系体外生长的影响, 为临床热化疗联合应用治疗恶性淋巴瘤提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系:人淋巴瘤细胞系 Raji 购自湖南大学湘雅医学院细胞中心,并由我科实验室传代保存。置于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 全培养液中于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂:RPMI 1640 培养基是 GIBCO 公司

1 南方医科大学珠江医院血液科,广州市,510280

2 南方医科大学珠江医院康复科

3 通讯作者:郭坤元(南方医科大学珠江医院血液科,广州市,510280)

作者简介: 魏红梅,女,副主任医师,在读博士

收稿日期: 2006-10-19

产品;新生胎牛血清为杭州四季青生物公司生产;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自宝泰克公司;阿霉素购自深圳万乐药业有限公司。

1.1.3 主要仪器: ELX800全自动酶标仪、倒置显微镜、电热恒温水浴箱。

1.2 方法

1.2.1 试验分组:试验设对照组(单纯培养)、化疗组、热疗组和热化疗组, 热疗和热化疗各分别设40℃、41℃及42℃ 3个温度,共设8组。

1.2.2 热疗方法: 电热恒温水浴箱中加热60min,温度变化±0.2℃。

1.2.3 工作浓度确定: 阿霉素设1、2、4、8、16μg/ml 5个浓度组,每组设3个复孔,以MTT法测定细胞增殖抑制率,以48h IC50的药物浓度作为试验的工作浓度。IC50的数值按IC50计算软件获得。

1.2.4 台盼蓝拒染法检测细胞存活率: 分别取处理的各组细胞悬液,稀释,使每组细胞数相同,分别吸出0.9ml均匀细胞液加0.1ml 0.4%的台盼蓝染色,在3min内于倒置显微镜下计数,细胞变蓝者为死细胞,每瓶细胞计数3次,取平均值。

细胞存活率=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数)×100%。

1.2.5 MTT法测定细胞增殖: 取对数生长的肿瘤细胞, 用完全培养液配成单细胞悬液, 接种到96孔板中,每孔200μl(10^3),分别给予热疗、化疗或热化疗处理,于37℃、5%CO_2培养箱中继续培养48h,每孔加入MTT20μl ,再继续培养4h,离心(2000r/min,5min),吸去培养液,每孔加入150μl DMSO,在微型震荡器上震荡5min, 然后将培养板置于全自动酶标仪上,选490nm为测定波长,测定各孔的吸光度OD,计算各复孔吸光度的平均值减去空白对照孔平均值, 作为试验组或对照组的吸光度,计算细胞增殖抑制率。实验重复3次。

细胞增殖抑制率=(对照组OD均值-实验组OD均值)/对照组OD均值×100%。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡: 取对数生长的Raji细胞配成单细胞悬液接种于50ml的培养瓶中,每瓶细胞数为2×10^5,分别按前分组进行处理后放回培养箱37℃继续培养,48h时收集细胞, 以冷磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤细胞两遍后, 去上清后加入300μl DNA染液,于室温避光保存30min。每管加入400μl缓冲液混合后上流式细胞仪检测细胞凋亡, 试验重复3次。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞Bcl-2表达: 取对数生长的Raji细胞配成单细胞悬液接种于50ml的培养瓶中,每瓶细胞数为2×10^5,选取40℃,42℃为试验温度, 分别按前分组进行处理后放回培养箱37℃继续培养, 48h时收集细胞,用PBS洗涤2次,离心,去上清,加入100μl破膜剂及5μl的FITC标记细胞内抗体 (Bcl-2/FITC) 和相应的阴性对照 (Mouse IgG1/FITC),于4℃冰箱内孵育20min,PBS洗1次,离心去上清,立即上机检测。试验重复3次。

1.3 统计学分析

采用SPSS11.0软件进行统计学分析,结果采用均数±标准差及单向方差分析。

2 结果

2.1 阿霉素工作浓度的确定

MTT实验测得不同浓度的阿霉素作用Raji细胞48h的抑制作用(见表1)。阿霉素对Raji的IC50为6.06μg/ml,并以此浓度进行各项试验。

2.2 细胞的存活率

试验前细胞存活率100%。化疗组、热疗组及热化疗组的细胞存活率较对照组细胞存活率低, 差异有非常显著性意义 ($P<0.01$);3种温度的热化疗组的细胞存活率均较热疗组和化疗组显著降低 ($P<0.01$)(表2)。

表1 不同浓度阿霉素作用Raji 48h的抑制率 ($\bar{x}\pm s$,n=3)

ADM(μg/ml)	Raji48h的抑制率(%)
1	20.8±2.5
2	30.6±4.5
4	41.2±3.6
8	52.0±3.9
16	70.1±3.8

表2 ADM联合热疗对Raji细胞的存活率分析(%) ($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别	40℃	41℃	42℃
对照组	100 ±0	100 ±0	100 ±0
化疗组	70.9±4.8①	70.9±4.8①	70.9±4.8①
热疗组	83.0±3.8①	78.8±3.8①	72.4±4.5①
热化疗组	57.2±2.5①②③	46.9±3.7①②③	38.9±3.9①②③

与对照组相比:①$P<0.01$;与化疗组相比:②$P<0.01$;与热疗组相比:③$P<0.01$

2.3 细胞的抑制率

单纯40℃、41℃及42℃热疗60min对Raji细胞系有抑制作用,抑制作用随这三种温度增高而增强;三种温度的热化疗组的细胞抑制率均较热疗组和化疗组显著降低 ($P<0.05$);42℃与41℃、42℃与40℃的热化疗组之间的抑制率差异均有显著性意义 ($P<0.05$);41℃与40℃的热化疗之间抑制率差异无显著性意义($P>0.05$)(表3)。

2.4 流式细胞仪检测凋亡

在40℃、41℃及42℃下,48h Raji细胞的凋亡情况发现,化疗组、热疗组及热化疗组细胞凋亡率较对照组明显升高($P<0.01$)。热化疗组的细胞凋亡率较热

疗组及化疗组的凋亡率均明显升高($P<0.01$)。上述结果均随温度的增加而增强。详见表 4。

2.5 流式细胞仪检测 Bcl-2 的表达

40℃、42℃温度下作用 48h Raji 细胞 Bcl-2 的表达率,化疗组、热疗组及热化疗组 Raji 细胞 Bcl-2 表达率与对照组相比均有显著差异($P<0.01$),并随温度的增加而下降($P<0.01$)(表 5)。

表 3 ADM 联合热疗对 Raji 细胞的抑制率分析(%)($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别	40℃	41℃	42℃
对照组	–	–	–
化疗组	43.0±3.4	43.0±3.4	43.0±3.4
热疗组	25.6±5.4	31.3±4.6	33.0±4.7
热化疗组	53.8±2.0①②	61.8±3.6①③	70.8±4.4①③

与热疗组:①$P<0.01$;与化疗组相比:②$P<0.05$, ③$P<0.01$;

表 4 ADM 联合热疗对 Raji 细胞凋亡率的分析(%)($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别	40℃	41℃	42℃
对照组	1.4±0.8	1.4±0.8	1.4±0.8
化疗组	14.2±1.3①	14.2±1.3①	14.2±1.3①
热疗组	9.4±0.3①	11.8±0.8①	14.3±1.5①
热化疗组	20.3±1.1①②③	30.8±2.5①②③	40.2±2.3①②③

与对照组相比:①$P<0.01$;与化疗组相比:②$P<0.01$;与热疗组相比:③$P<0.01$

表 5 ADM 联合热疗对 Raji 细胞 Bcl-2 表达的分析(%) ($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别	40℃	42℃
对照组	99.1±0.8	99.1±0.8
化疗组	63.0±3.6①	63.0±3.6①
热疗组	80.0±2.0①	62.0±3.5①
热化疗组	56.7±3.1①④	32.0±2.0③④

与对照组相比:①$P<0.01$;与化疗组相比:②$P<0.05$,③$P<0.01$;与热疗组相比:④$P<0.01$

3 讨论

热疗联合化疗对实体瘤的报道较多[1—2]。丁向东等[3]报道采用全身热疗治疗 1 例慢性粒细胞白血病-急粒变患者(随访 6 个月完全缓解),魏红梅等[4]全身热疗治疗恶性血液病 15 例,无 1 例患者出现出血及 DIC 的风险,初步显示其有效性和安全性。

3.1 Bcl-2 蛋白与凋亡

B 细胞淋巴瘤/白血病 2 (B cell lymphoma/leukemia 2 , Bcl-2) 基因是一种抑制细胞凋亡的基因,在多种肿瘤中表达,尤其是在淋巴瘤、白血病等恶性血液病中。目前 bcl-2 对细胞凋亡的抑制机制尚不清楚[5]。关于高温诱发细胞凋亡的发生机制,一方面高温可直接影响细胞结构,另一方面与某些基因异常表达有关。已有证据表明凋亡抑制基因表达增强或(和)凋亡活化基因受抑是白血病发生的机制之一。bcl-2 基因是从滤泡性淋巴细胞瘤中分离出来的一种癌基因,该基因的编码产物是 bcl-2 蛋白,它不像其他致癌基因那样加速细胞分裂、增殖,而是促进细胞生存,延长细胞寿命[6]。Bcl-2 蛋白异常高表达使细胞获得病态的生存优势,它是化疗耐药形成的内在生物学基础[7],温热可下调 Bcl-2 蛋白的表达[8]。

3.2 ADM 对热疗的影响

阿霉素是肿瘤细胞周期非特异性药物,主要作用机制是在 DNA 复制过程中诱导 TOPOII 抑制剂-DNA 断裂复合物的形成,引起细胞死亡或停滞于 S 期、G2 期[9]。由于阿霉素使大量细胞处于 S 期,S 期对热最敏感[10],因此热联合化疗对肿瘤细胞的杀伤作用增强。阿霉素对热疗具有增敏作用,有研究表明,加热前后细胞内阿霉素浓度有一定变化[11]。张洪新等[12]试验结果亦显示:加热后,肿瘤细胞内阿霉素荧光强度均较加热前显著提高,说明加热是通过增加肿瘤细胞内阿霉素浓度来提高其对化疗敏感性的。

3.3 加热对细胞的影响

高热对细胞具有杀伤作用,高热可改变生物膜的流动性,导致细胞质破坏;高热能抑制细胞 DNA、RNA 及蛋白质的合成与修复;高热可以改变细胞膜的通透性,提高胞质中的药物浓度。但温热必须达到一定温度对细胞才有杀伤作用,乏氧的肿瘤细胞比正常组织细胞对热更敏感。加温可不同程度地增强淋巴细胞的活性,提高机体的免疫功能[13]。本实验中看出单热 42℃ 60min 细胞毒性较强,因此在体内尤其是临床应用时既要注意温度过高对正常细胞的损伤,又要注意温度不能过低以致影响疗效。

本实验表明,阿霉素与热疗联合可以抑制 Raji 细胞的增殖,并促进其凋亡,下调 Bcl-2 蛋白表达水平,上述结果与杨阳等[14]、向世强等[5]及 He J 等[8]的报道是一致的。

4 结论

阿霉素与热疗联合对 Raji 细胞系有明显的抑制作用,为恶性淋巴瘤治疗提供了另一条途径及理论基础,但尚需更多的体外实验,选择更多的细胞系,为临床应用提供充分的依据。

参考文献

[1] Richel O, Zum Vorde Sive Vording PJ, Rietbroek R, et al. Phase II study of carboplatin and whole body hyperthermia (WBH) in recurrent and metastatic cervical cancer[J].Gynecol Oncol,2004,95(3):680—685.

[2] Ismail-Zade RS, Zhavrid EA, Potapnev MP. Whole body hyperthermia in adjuvant therapy of children with renal cell carcinoma[J]. Pediatr Blood Cancer, 2005,44(7):679—681.

[3] 丁向东,赵鑫,刘萍.全身热疗治疗慢性粒细胞白血病-急粒变 1

例[J].临床血液学杂志,2005,18(4):242.

[4] 魏红梅,郭坤元,尚振川,等.全身热疗系统治疗恶性血液病 15 例:加温、测温和控温技术的安全、顺应及有效性观察[J].中国临床康复,2006,10(8):38—40.

[5] 向世强,刘仁刚,周洁萍,等.高温诱导 Hela 细胞凋亡的相关机理的研究[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(4):427—430.

[6] Kutschka I, Kofidis T, Chen IY,et al.Adenoviral human Bcl-2 transgene expression attenuates early donor cell death after cardiomyoblast transplantation into ischemic rat hearts [J]. Circulation, 2006,14(1):1174—1180.

[7] 赵晓庆,李根山,郭稳捷,等.Bcl-2 和 Bax 蛋白在急性白血病细胞中的表达及临床意义[J].中国当代儿科杂志,1999,1(4):193—195.

[8] He J,Xu H,Yang Y,et al.Neuroprotective effects of olanzapine on methamphetamine-induced neurotoxicity are associated with an inhibition of hyperthermia and prevention of Bcl-2 decrease in rats[J].Brain Res,2004,1018(2):186—192.

[9] Tewey KM , Rowe TC, Yang L, et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II[J]. Science, 1984,226(4673): 466—468.

[10] Valdagni R. International consensus meeting on hyperthermia: Final report[J]. Int J Hyperthermia, 1990, 6(5): 839—877.

[11] Nishikawa K, Asaumi J, Kawasaki S, et al. Influence of cepharanthin and hyperthermia on the intracellular accumulatin of adriamycin and Fluo3, an indicator of Ca^{2+}[J]. Anticancer Res, 1998, 18(3A): 1649—1654.

[12] 张洪新, 刘燕,王执民,等.加热对人肝癌细胞 7721/Adm 耐药株阿霉素的增敏作用[J].基础医学与临床,2001,21(5):432—434.

[13] 杨维珍,尉继伟.热疗对荷 VX_2 瘤动物细胞因子影响的实验研究[J].中华普通外科杂志, 2005,20(9):591—593.

[14] 杨阳, 刘宝瑞, 钱晓萍. 羟基喜树碱联合热疗抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 体外增殖作用的研究 [J]. 实用临床医药杂志, 2005,9(5):9—13.

(上接 309 页)

进行注释,发现 117 条基因被找到注释,分属 8 个类别。其中,涉及细胞组分的基因有 41 条,分别与线粒体结构(5 条基因)、类细胞器(14 条基因)、细胞内质网(14 条基因)和膜结构(8 条基因)有关;涉及生物过程的有 76 条,分别与能量代谢(44 条基因)、糖代谢(19 条基因)、代谢负调控(7 条基因)和细胞物质运输(6 条基因)有关。

4 结论

系统规律的太极拳运动使与能量代谢, 尤其是三羧酸循环相关酶基因表达上调, 而使肌肉蛋白合成相关基因和神经鞘脂类相关基因表达下调。提示太极拳运动有助于保护神经细胞的完整性, 对抗衰老有积极作用,同时可加速体内脂类物质有氧代谢,对减肥或控制体重有较好影响。但也证明了太极拳运动对维持骨骼肌蛋白质合成没有积极作用。因此,老年人在参加太极拳运动的同时, 也应该适当增加力量训练项目,以弥补太极拳对肌力维持、肌肉弹性发展的不利。

参考文献

[1] Wong AM, Lin YC, Chou SW,et al. Coordination exercise and postural stability in elderly people: Effect of Tai Chi Chuan[J]. Arch Phys Med Rehabil,2001,82: 608—612.

[2] Naftali K, Friedman N. Practical approaches to analyzing results of microarray experiments [J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2002,27:125—132.

[3] Murray CM, Hutchinson R, Bantick JR, et al. Monocarboxylate transporter MCT1 is a target for immunosuppression [J]. Nat Chem Biol,2005, 7:371—376.

[4] 胡松年. 基因表达序列标签(EST)数据分析手册[M]. 第 1 版. 浙江大学出版社, 2005.138—143.

[5] Chen YW, Hubal MJ, Eric PH, et al. Molecular responses of human muscle to eccentric exercise [J]. J Appl Physiol,2003 , 95: 2485—2494.

[6] Derek Z, Elvira F, Janko D, et al. cDNA microarray analysis reveals novel candidate genes expressed in human peripheral blood following exhaustive exercise [J]. Physiol Genomics,2005, 23: 287—294.

[7] James A. Timmons,Carl Johan Sundberg. Oligonucleotide microarray expression profiling: Human skeletal muscle phenotype and aerobic exercise training[J]. IUBMB Life, 2006,58: 15—24.

[8] Coggan AR, Spina RJ, King DS, et al. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women[J]. J Appl Physiol,1992,72:1780—1786.

[9] Shlomit RA, Sholomo HI. Shahar, et al. Effects of aerobic training on gene expression in skeletal muscle of elderly men [J]. Med Sci Sports Exerc,2005, 37:1680—1696.

[10] Timmons JA, Jansson E, FischerH, , et al. Modulation of extracellular matrix genes reflects the magnitude of physiological adaptation to aerobic exercise training in humans [J]. BMC Biol, 2005, 3: 19.

[11] Wisloff U, Najjar SM, Ellingsen O,et al. Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity [J]. Science,2005,307:418—420.