

高压氧对人胶质瘤 172 细胞生存的影响

于秋红¹, 李冬果², 张琪³, 任梓齐¹, 嵇江淮², 刘亚玲¹, 王丛¹, 薛连璧¹

【摘要】 目的:观察高压氧(HBO)对人胶质瘤 172 细胞生存的影响。方法:常规培养的人胶质瘤 172 细胞随机分为对照组和 HBO 组,对照组每日实验舱中常压 0.1MPa 空气放置 90min,其余时间正常培养,HBO 组每日 HBO 暴露 1 次,将细胞置实验舱中,氧气加压,15min 升至 0.2MPa,稳压 1h,减压 15min,其余时间培养同对照组,HBO 暴露 10 次。第 11d 取材,观察 2 组细胞生长情况,流式细胞仪检测细胞凋亡比例、细胞生长周期,电镜观察细胞超微结构。结果:HBO 组细胞计数明显少于对照组($P=0.01$),HBO 组早期和晚期凋亡细胞比例均明显高于对照组(均 $P<0.01$)。2 组 G1 期和 S 期细胞比例比较差异均无统计学意义,HBO 组 G2 期细胞比例较对照组明显减少($P<0.01$)。电镜观察到 HBO 组肿瘤细胞较对照组突起短小、减少。结论:HBO 减慢了人胶质瘤 172 细胞生长,促进细胞凋亡,使更多的细胞阻滞在 S 期,使与肿瘤的转移、复发有关的突起变短、减少,显示了 HBO 对肿瘤细胞的抑制作用。

【关键词】 高压氧;胶质瘤;172 细胞;凋亡;超微结构

【中图分类号】 R493;R739.4 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2020.06.001

Effect of hyperbaric oxygen on survival of human glioma 172 cells Yu Qihong, Li Dongguo, Zhang Qi, et al. Department of Hyperbaric Oxygen, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China

【Abstract】 Objective: To observe the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on survival of human glioma 172 cells. **Methods:** Cultured human glioma 172 cells were randomly divided into control group and HBO group. The cells in control group were placed in chamber of 0.1 MPa for 90 min per day, and then cultured in 37°C 5% CO₂ incubator. The cells in HBO group were exposed to HBO with pressure increasing from 0.1 MPa to 0.2 MPa within 15 min, and maintaining at 0.2 MPa for 1 h, then decreasing to 0.1 MPa within 15 min per day, and then cultured in 37°C 5% CO₂ incubator. The cells were exposed to HBO 10 times. On the 11th day, cells of both groups were collected. Cell growth was observed under light microscopy, and apoptosis and cell growth cycle were detected by flow cytometry. The ultrastructure of cells was observed by electron microscopy. **Results:** The cell count of the HBO group was significantly less than that of the control group ($P=0.01$), and the proportion of early and late apoptotic cells in the HBO group was significantly higher than that in the control group (both $P<0.01$). There was no statistically significant difference in the proportion of G1 and S phase cells between the two groups. The proportion of G2 phase cells in the HBO group was significantly reduced as compared with the control group ($P<0.01$). The protrusions of 172 cells in HBO group were shorter and smaller than those of control group. **Conclusion:** HBO can delay the growth of human glioma 172 cells, and promote apoptosis of 172 cells, with more cells blocking in the S phase, together with the protrusions shorten and reduced which related to tumor metastasis and recurrence, implying HBO has an inhibitory effect on human glioma 172 cells.

【Key words】 hyperbaric oxygen; glioma; 172 cells; apoptosis; ultrastructure

基金项目:首都医科大学基础—临床科研合作基金(天坛专项)17JL(TTZX)10

收稿日期:2020-01-16

作者单位:1.首都医科大学附属北京天坛医院高压氧科,北京 100070; 2.首都医科大学生物医学工程学院,北京 100069;3.北京市神经外科研究所,首都医科大学附属北京天坛医院电镜室,北京 100070

作者简介:于秋红(1977-),女,副主任医师,主要从事高压氧神经病学及脑复苏方面的研究。

通信作者:薛连璧, xue40@vip.sina.com

脑胶质瘤是颅内最常见的恶性肿瘤,约占脑肿瘤的 50%左右,手术切除后复发率高,术后复发的主要原因为肿瘤残留^[1],而扩大切除范围则意味着脑功能的损伤,部分患者术后出现昏迷、偏瘫、失语等,给患者、家庭及社会带来沉重的负担。最大程度地切除肿瘤还是保留更多的脑功能经常是临床医生面临的难

题。在脑血管病^[2-3]、脑外伤等疾病的康复治疗阶段,医生会选择高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗,但在选择肿瘤切除术后患者的康复方案时,采用 HBO 治疗会格外谨慎。虽然有报道称 HBO 治疗结合放射性治疗和化学疗法会增强治疗效果^[4-5],减小肿瘤体积、减慢肿瘤生长速度,但单独 HBO 治疗作用于肿瘤细胞结果不一,有关 HBO 治疗恶性肿瘤的作用尚未形成定论^[6-7]。HBO 是否会促进肿瘤生长这一顾虑,在很大程度上妨碍了 HBO 的临床应用。本研究采用临床经常应用的 HBO 治疗方案处理人胶质瘤 172 细胞,观察 HBO 暴露对细胞生存的影响,以期能对临床安全用氧提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用细胞株:人脑胶质瘤 172 细胞由神经外科同事惠赠,购自中国科学院上海细胞库。按常规培养在含 10% 胎牛血清的改良 eagle 培养基(dul-becco's modified eagle medium, DMEM)中,于 37℃、5%CO₂ 条件下培养。根据细胞生长状况换液、传代。试剂:DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Hyclone 公司),多聚赖氨酸、四甲基偶氮唑蓝(Sigma 公司进口分装),二甲基亚砜(北京索莱宝科技有限公司)。设备及仪器:氧舱使用上海减压器厂生产的透明实验舱,流式细胞仪(美国 BD 公司 FACS Verse)、切片仪(Leica EM UC6 切片仪)、透射电子显微镜(HITACHI-7650)。

1.2 方法 取对数生长期的 172 胶质瘤细胞随机分为对照组和 HBO 组,对照组细胞每日在实验舱中置于常压 0.1MPa 空气中 90min,其余时间置于培养箱中,根据细胞生长情况换液、传代等,无特殊处理;HBO 组稳压压力为 0.2MP,每日 HBO 暴露 1 次,共暴露 10 次,暴露方案具体如下:将胶质瘤细胞置于实验舱中,氧气加压,15min 升压至 0.2MPa,稳压 1h,减压 15min,其余时间培养同对照组。

1.3 检测指标 HBO 暴露 10 次后继续培养 1d,第 11d 收集 2 组细胞,每组细胞观察如下指标:①细胞计数:选取处于对数生长期、生长状态佳且无明显悬浮状态的细胞,按传代步骤得到单细胞悬液,通过细胞计数板显微镜下计数胶质瘤细胞数目。②细胞凋亡比例:根据磷脂结合蛋白 Annexin V 和 7-氨基-放线菌素 D (7-amino-actinomycin D, 7-AAD)亲和部位及能力不同,用流式细胞仪(BD FACS Verse)检测荧光强度来检测细胞早期及晚期凋亡情况,此过程重复 3 次。③生长周期:根据不同脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)量结合的荧光染料量不同,用流式细胞仪检测荧光强度来反映细胞增殖状况,用 BD 公司

MODFIT 软件分析,此过程重复 3 次。④超微结构:透射电镜下观察细胞超微结构。

1.4 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,各组数据均进行正态性检验,如符合正态性分布用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞计数 2 组对数生长期的 172 胶质瘤细胞都贴壁生长,无明显悬浮死亡细胞,对照组细胞计数 $(4.19 \pm 0.09) \times 10^5$ 个, HBO 组计数 $(4.03 \pm 0.07) \times 10^5$ 个, HBO 组细胞计数明显少于对照组 ($t = 3.2$, $P = 0.01$)。

2.2 2 组凋亡细胞比例 本研究用 Annexin V 与 7-AAD 进行细胞染色, Annexin V 是一种磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,故早期凋亡细胞呈现 Annexin V 染色阳性(Annexin V⁺/7-AAD⁻),晚期凋亡细胞则染色呈现双阳性(Annexin V⁺/7-AAD⁺)。HBO 组早期和晚期凋亡细胞比例均明显高于对照组(均 $P < 0.01$),见表 1。

表 1 2 组凋亡细胞比例 $\%, \bar{x} \pm s$

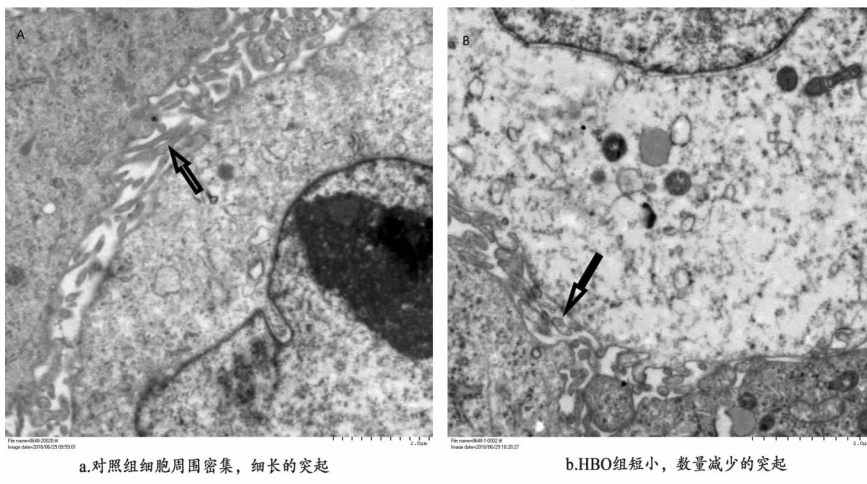
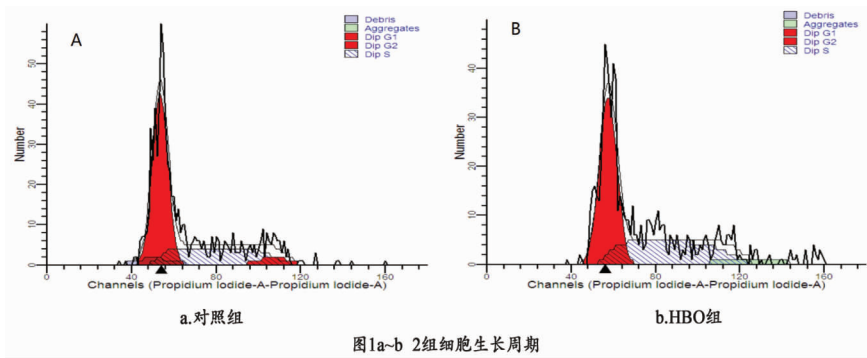
组别	早期凋亡细胞	晚期凋亡细胞
对照组	0.10±0.01	1.44±0.03
HBO 组	0.70±0.01	4.60±0.05
<i>t</i>	190.420	157.230
<i>P</i>	0.001	0.001

2.3 细胞生长周期 HBO 组 G1 期细胞比例为 $(57.26 \pm 3.56)\%$, 对照组为 $(59.48 \pm 5.32)\%$, 2 组比较差异无统计学意义 ($t = 0.780$, $P = 0.460$); HBO 组 S 期细胞比例为 $(40.91 \pm 5.37)\%$, 对照组为 $(35.23 \pm 5.31)\%$, 2 组比较差异无统计学意义 ($t = 1.680$, $P = 0.130$); HBO 组 G2 期细胞比例 $(1.2 \pm 0.26)\%$ 较对照组 $(5.41 \pm 0.86)\%$ 明显减少 ($t = 10.420$, $P < 0.01$)。此外, HBO 组肿瘤细胞出现凋亡和死亡细胞(绿色图例),其比例约占 6.8%,见图 1a~b。

2.4 细胞超微结构 对照组细胞周围突起密集、细长,而 HBO 组细胞突起较对照组减少,形状短小,见图 2a~b。

3 讨论

Nature 杂志曾发表了天主教鲁汶大学的研究结果^[8],研究分析了 3000 多例患者肿瘤样品,发现当氧气缺乏时,甲基基团过度的添加到 DNA 上。超甲基化这种表观遗传(不影响遗传密码,但强烈干扰基因功能)阻止肿瘤的抑制基因表达,因而能够让细胞产生异



常行为,导致肿瘤过度生长。而在小鼠体内,当肿瘤的血供应正常化时,可以阻止这些表观遗传变化。实验室人员也正在开展聚焦于血管正常化疗法的新研究。

常压下机体主要依靠血红蛋白输送氧气,治疗无疑受制于血管正常,而高压氧则是增加物理溶解氧,只要有液体存在的地方就能有氧气供应,无疑能很好的解决缺氧的问题。最近 Science 杂志发表了 Chakraborty 等^[9] 的研究,证实组蛋白脱甲基酶 KDM6A(histone demethylase, KDM6A)具有直接感受环境缺氧的能力,它的减少或缺失就像缺氧一样可以直接阻止组蛋白 H3 赖氨酸 27(Histone H3 lysine 27, H3K27)的去甲基化,与前文的缺氧导致超甲基化异曲同工。在缺氧细胞中补充 KDM6A 可以恢复 H3K27 的甲基化平衡。这表明氧可以直接影响染色体调整因子,控制细胞命运。基于此,本研究拟将胶质瘤 172 细胞作 HBO 处理,观察肿瘤细胞生长情况,电镜下观察肿瘤细胞微结构。与 Selvendiran 等^[10] 从卵巢癌得出的结论相似,本研究发现 HBO 暴露后胶质瘤 172 生长速度也减慢。兰川等^[11] 和赵秀文等^[12] 的研究亦提示 GL261 胶质瘤细胞 HBO 培养后细胞繁殖能力下降、细胞计数减少。这些都提示 HBO 并没有促进肿瘤细胞生长。此外,本研究提示 HBO 暴露后

胶质瘤 172 细胞更多的阻滞在 S 期,这与凋亡细胞染色结果的趋势是一致的, HBO 使 G2 期细胞减少,有将细胞阻滞在 S 期的趋势,并且促进细胞凋亡。这与兰川等^[11] 和赵秀文等^[12] 的研究结果发现 HBO 培养后胶质瘤细胞更多的阻滞在 G0~G1 期不同,考虑原因一是 HBO 暴露方式不同,本研究是常规培养,采用临床常用 HBO 剂量进行暴露,而兰川等^[11] 的研究则是将胶质瘤细胞一直在高压高氧环境中培养,造成二者 HBO 暴露剂量不同;另外研究采用的胶质瘤细胞系不同,不排除这也可能造成结果差异。

此外,值得注意的是,张伟等^[13] 观察到结肠癌 LoVo 细胞在应用 0.2 MPa 的 HBO 暴露且在暴露后 24h 时,细胞积聚在 S 期最明显,此时应用细胞周期特异性化疗药物氟尿嘧啶,可显著增强药物效果,且浓度越低显效越早,考虑可能是采用高浓度药物

早期即可达治疗效果,而低浓度药物本身不足以达到治疗效果,联合应用 HBO 后随时间延长才显示联合应用更优的效果。这些都提示我们临床中更应注意 HBO 的剂量和治疗时间窗,根据病理结果,选取合适的 HBO 剂量在不同的时期介入,可能会影响化疗药物的选择。进行个性化的精准治疗,可能有助于减小药物剂量,减轻毒副作用,使患者预后更佳。

正是实体肿瘤内部的缺氧微环境,在肿瘤的恶性进展中发挥着重要的作用^[8,14-15]。而 HBO 作为唾手可得纠正缺氧的物理治疗,理应得到更多的关注。除了增加脑血屏障开放、促进化疗药物进入肿瘤组织^[16],本研究再一次证实 HBO 本身对肿瘤细胞也产生了一定的抑制作用,促进细胞凋亡可能是机制之一。与脑梗死大鼠 HBO 治疗改善缺氧,使细胞存活而凋亡减少不同^[17-18],本研究提示 HBO 使得胶质瘤凋亡细胞增加,这与万文武等^[19] 的研究结果是相符的,考虑 HBO 使得凋亡细胞增加,从而坏死细胞相对减少,减轻能量消耗,阻断了肿瘤进一步缺氧。HBO 已逐渐成为治疗基础疾病过程及疾病本身的药物^[20]。

目前的研究认为肿瘤组织中存在肿瘤干细胞,具有强烈的增殖能力和自我更新能力^[21],并能分化成子代肿瘤细胞,保持肿瘤的不断生长,是肿瘤复发和转移的关键,而这种能力与细胞表面的突起有关,可能涉及

到多种微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, MicroRNA)的作用^[22]。本研究发现 HBO 暴露后,胶质瘤细胞表面突起短缩,数量减少,考虑肿瘤细胞增殖转移能力下降。这可能和 HBO 影响了细胞的 MicroRNA 有关,我们正在进行相关研究。

总之,细胞增殖、凋亡和 DNA 损伤等,是恶性肿瘤发生、发展以及决定癌细胞对放射或化疗药物敏感性的重要分子病理学基础。本研究显示:HBO 减慢了肿瘤细胞生长,促进细胞凋亡,使更多的细胞阻滞在 S 期,使与肿瘤的转移、复发有关的突起变短、减少,初步显示了 HBO 对肿瘤细胞的抑制作用。我们正在进一步的研究,以便对临床安全用氧提供更多的理论依据。

【参考文献】

- [1] Sanai N, Polley MY, McDermott MW, et al. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas [J]. *J Neurosurg*, 2011, 115(1):3-8.
- [2] 孙莉,肖恺,徐建奇,等. 自发性脑出血患者综合治疗加高压氧治疗疗效分析[J]. *中国康复*, 2016, 31(4): 246-248.
- [3] 熊虎,陈慧芳,徐伟健,等. 高压氧联合鼠神经生长因子治疗脑卒中后肢体功能障碍疗效观察[J]. *中国康复*, 2017, 32(2): 129-130.
- [4] Yahara K, Ohguri T, Uono H, et al. Radiotherapy using IMRT boosts after hyperbaric oxygen therapy with chemotherapy for glioblastoma[J]. *J Radiat Res*, 2017, 58(3):351-356.
- [5] Williams BB, Hou H, Coombs R, et al. EPR Oximetry for Investigation of Hyperbaric O₂ Pre-treatment for Tumor Radiosensitization[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 923: 367-374.
- [6] Chen JR, Xu HZ, Ding JB, et al. Radiotherapy after hyperbaric oxygenation in malignant gliomas [J]. *Curr Med Res Opin*, 2015, 31(11): 1977-1984.
- [7] Ding JB, Chen JR, Xu HZ, et al. Effect of Hyperbaric Oxygen on the Growth of Intracranial Glioma in Rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(23):3197-3203.
- [8] Thienpont B, Steinbacher J, Zhao H, et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity [J]. *Nature*, 2016, 537(7618):63-68.
- [9] Chakraborty AA, Laukka T, Myllykoski M, et al. Histone demethylase KDM6A directly senses oxygen to control chromatin and cell fate [J]. *Science*, 2019, 363(6432):1217-1222.
- [10] Selvendiran K, Kuppasamy ML, Ahmed S, et al. Oxygenation inhibits ovarian tumor growth by downregulating STAT3 and cyclin-D1 expressions [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(4): 386-390.
- [11] 兰川,李飞,陈图南,等. 高压氧对脑内种植 GL261 胶质瘤 C57 小鼠尼莫司汀化疗后生存期的影响[J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2012, 12(6):707-711.
- [12] 赵秀文,汪攀,兰川,等. 缺氧对 C57 小鼠脑胶质瘤模型肿瘤形成及生存期的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(7): 611-615.
- [13] 张伟,张丽达,汪爱国,等. 高压氧对结肠癌 LoVo 细胞周期的影响[J]. *中华航海医学与高压医学杂志*, 2006, 13(2): 88-91.
- [14] Stepien K, Ostrowski RP, Matyja E. Hyperbaric oxygen as an adjunctive therapy in treatment of malignancies, including brain tumours[J]. *Med Oncol*, 2016, 33(9): 101-101.
- [15] Moen I, Stuhr LE. Hyperbaric oxygen therapy and cancer-a review [J]. *Target Oncol*, 2012, 7(4):233-42.
- [16] 李咪咪,黄品芳,许昌声,等. 高压氧对顺铂在脑胶质瘤大鼠体内药代动力学的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2016, 38(12): 890-893.
- [17] 于秋红,郁军超,吉康祥,等. 大剂量高压氧对脑梗死大鼠细胞色素 C 及 caspase-3 的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2016, 22(5): 540-543.
- [18] 于秋红,刘亚玲,王丛,等. 高压氧对大脑中动脉阻塞大鼠细胞凋亡的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2019, 41(8): 561-564.
- [19] 万文武,汪攀,兰川,等. 高氧促进胶质瘤干细胞分化致化疗增敏的体外研究[J]. *中华神经外科杂志*, 2017, 33(3): 293-298.
- [20] R Choudhury. Hypoxia and Hyperbaric Oxygen Therapy: A Review [J]. *Int J Gen Med*, 2018, 11: 431-442.
- [21] 于春泳,杨辉. 神经干细胞与脑胶质瘤干细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(6):1163-1166.
- [22] Gasparello J, Lomazzi M, Papi C, et al. Efficient Delivery of MicroRNA and AntimiRNA Molecules Using an Argininocalix [4] arene Macrocycle [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 748-763.

本刊办刊方向:

立足现实 关注前沿 贴近读者 追求卓越