

· 论 著 ·

## 热疗对 SMMC-7721 肝癌细胞形态、增殖、凋亡的影响\*

席子明<sup>#</sup>, 张 军, 马远方<sup>△</sup>

(河南大学细胞与分子免疫实验室, 开封 475001)

**摘要:**目的 探讨热疗对 SMMC-7721 肝癌细胞的影响。方法 将 SMMC-7721 肝癌细胞置恒温循环水浴锅中(42.5±0.5)℃ 孵育 1h, 然后放入 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中继续培养, 分别于热处理后 0、6、12、24h 采用倒置显微镜(LM×400)观察细胞形态变化, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖, 予 Annexin V/PI 染色后用流式细胞仪检测细胞凋亡, 予 366EC 和 FITC-羊抗鼠 IgG 处理细胞后用流式细胞仪检测细胞 DR5 表达, 用 Fluo-3/AM 负载细胞检测胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的变化。结果 热疗可导致肿瘤细胞形态改变, 表现为细胞变小, 变圆, 脱落, 出现空泡; 热疗可抑制细胞增殖, 细胞热疗后 0、6、12、24h 细胞抑制率分别为 22.18%、26.76%、31.30%、36.62%。热疗后 0h 细胞凋亡率为 15.00%, 其中早期凋亡率为 2.00%, 晚期凋亡率为 13.00%; 热疗后 6h 细胞凋亡率为 65.45%, 其中早期凋亡率为 43.23%, 晚期凋亡率为 22.22%; 热疗后 12h 细胞凋亡率为 12.32%, 其中早期凋亡率为 4.60%, 晚期凋亡率为 7.72%; 热疗后 24h 细胞凋亡率为 22.58%, 其中早期凋亡率为 7.15%, 晚期凋亡率为 15.43%。热疗后 0、4、8、12、24h 细胞内钙离子浓度分别为 18.13、7.87、13.01、37.23μmol/L, 对照组为 14.28μmol/L。热疗后 0、6、12、24h 细胞膜 DR5 表达率分别为 79.74%、83.22%、91.28%、92.52%, 对照组为 83.02%。结论 热疗导致肿瘤细胞凋亡的因素是复杂的, DR5 表达增加和细胞内 Ca<sup>2+</sup> 增加是原因之一; 热疗可增加肿瘤细胞 DR5 的表达, 提示热疗加化疗或其他治疗可能会增加疗效。

**关键词:**热疗; SMMC-7721 肝癌细胞; 细胞形态; 细胞增殖; 凋亡; DR5; Ca<sup>2+</sup>

**中图分类号:**R735.7; R730.23

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2010)03-0280-03

## The effect of hyperthermia on liver cancer SMMC-7721 cell morphology, proliferation, apoptosis\*

XI Zi-ming<sup>#</sup>, ZHANG Jun, MA Yuan-fang<sup>△</sup>

(Cellule and Molucule Immunity Lab, Henan University, Kaifeng 475001, China)

**Abstract: Objective** To determine the effect of thermotherapy on human hepatocellular carcinoma cell lines SMMC-7721. **Methods** SMMC-7721 cells were cultured in the water-bath (42.5±0.5)℃ for 1h, then put in 37℃, 5%CO<sub>2</sub> incubator for 0, 6, 12, 24h, the morphology was observed by microscope. cytotoxicity was examined by MTT assay. Apoptosis and DR5 expression of SMMC7721 were detected by flow cytometry. the Ca<sup>2+</sup> density change was examined by Fluo-3/AM. **Results** The thermotherapy might cause the tumour cell shape change, displayed changes that the cell was small, changed the circle, fell off, presented the vacuole; The thermotherapy may suppress cell multiply, after thermotherapy on cells for 1, 0, 6, 12, 24h, cell suppression rate respectively was 22.18%, 26.76%, 24.30%, 36.62%. After thermotherapy on cells, apoptosis rate was 15% for 0h, early apoptosis rate was 2%, later apoptosis rate was 13%; after thermotherapy on cells for 6h, apoptosis rate was 65.45%, early apoptosis rate was 43.23%, later apoptosis rate was 22.22%; after thermotherapy for 2h, apoptosis rate was 12.32%, early apoptosis rate was 4.6%, later apoptosis rate was 7.72%; after the thermotherapy for 24h, apoptosis rate was 22.58%, early apoptosis rate was 7.15%, later apoptosis rate was 15.43%. after thermotherapy for 0, 4, 8, 12h, the calciumion density respectively wa 18.13, 13.44, 7.87, 13.01, 37.23μmmol/L, the control was 14.28μmmol/L. After thermotherapy for 0, 6, 12, 24h, the cell membrane DR5 expression of SMMV7721 respectively was 79.74%, 83.22%, 91.28%, 92.52%. the control was 83.02%. **Conclusion** The reason that thermotherapy causes tumor cells apoptosis was complex, the DR5 expression is increased and the concentration of Ca<sup>2+</sup> is increased. The DR5 expression of SMMC7721 is increased by thermotherapy, the thermotherapy may increase therapy effects on tumor patients.

**Key words:** hyperthermia; SMMC-7721; hepatoma cells; cell morphology; cell proliferation; apoptosis; DR5; Ca<sup>2+</sup>

肿瘤热疗(hyperthermia)是继手术、放疗、化疗之后一种全新的治疗肿瘤的“绿色疗法”<sup>[1]</sup>, 是肿瘤治疗的有效手段之一, 但是其作用机制长期不甚明了<sup>[2]</sup>, 近年来随着热疗设备的不断革新和技术的不断进步, 热疗重新成为研究的热点。

热疗于 1985 年获美国食品及药物管理认证, 与手术、化疗、放疗、生物免疫治疗一起成为肿瘤综合治疗的有效手段<sup>[3]</sup>。热疗对于细胞的杀伤作用呈剂量依赖性, 随热负荷的增加而增加。体外研究表明, 热疗对细胞杀伤作用通常分两个阶段, 生

存曲线呈肩峰状, 在一定的临界温度以下, 呈线性杀伤或生长抑制, 温度超过临界温度后呈指数性杀伤<sup>[4]</sup>。临界温度随细胞种类以及基因特征而有一定的差异, 大多数细胞的临界温度通常为 42.5~43℃<sup>[5]</sup>, 少数细胞可达 44℃<sup>[6]</sup>, 41.8~42.0℃目前被广泛接受为全身热疗的治疗温度, 全身治疗的恒温期治疗时间为 1h<sup>[7]</sup>。热作用既可以诱发细胞凋亡, 又可以对细胞产生直接致死效应, 在临界温度以下热疗诱导细胞凋亡为热作用的主要机制, 而临界温度以上则主要引起细胞坏死<sup>[8]</sup>。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571697); 河南省高校杰出科研创新人才工程项目(0321001800)。 # 河南大学在读博士生, 河南大学医院主任医师。 △ 通讯作者, E-mail: mayf@henu.edu.cn。

热作用于肿瘤细胞后凋亡基因表达的研究多集中于 P53、HSP-70、c-Myc 等,热疗虽然开展多年,而热疗后 DR5 表达的变化研究却少见报道。作者对热疗作用于肝癌细胞株 SMMC-7721 后细胞形态、细胞增殖、凋亡、DR5 表达和胞内  $Ca^{2+}$  变化的影响进行初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** SMMC-7721 人肝癌细胞株来自中国科学院。RPMI-1640 系 Gibco 公司产品,内含 2mmol/L L-谷氨酰胺,25mmol/L HEPES。配备完全培养基还需 1mmol/L 丙酮酸,1mmol/L 丁酮二酸,2g/L 碳酸氢钠,均为 Sigma 公司产品。胰蛋白酶为 Sigma 产品,以 PBS 配置为 0.25% 浓度备用。DR5 结合性抗体 366EC,由本实验室制备。FITC-羊抗鼠 IgG 为 Jackson Immuno Research 公司产品。Annexin V/PI 试剂盒购自 BD 公司。FLUO-3/Am 为 Alexis 公司产品。四甲基偶氮唑盐(MTT)系 Sigma 公司产品。二甲基亚砜(DMSO)系上海凌峰公司产品。流式细胞仪(FACS Calibur)为 BD 公司产品(Cell Quest 分析软件)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** SMMC-7721 肝癌细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中培养,培养条件为 37℃、5%  $CO_2$  饱和湿度。取对数生长期的细胞,按不同实验要求进行。

**1.2.2 细胞热处理** 将细胞瓶瓶盖拧紧,外用胶带封紧,置恒温循环水浴锅中(42.5±0.5)℃ 孵育 1h,然后放入 37℃、5%  $CO_2$  的培养箱中继续培养,分别于 0、6、12、24h 进行细胞形态、细胞增殖、凋亡、DR5 和胞内  $Ca^{2+}$  浓度研究。

**1.2.3 细胞形态观察** 按实验分组及各时间点于倒置显微镜下观察细胞形态变化并拍照(LM×400)。

**1.2.4 MTT 法检测细胞增殖** 取对数生长期的 SMMC-7721 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释至一定浓度接种于 96 孔培养板,每孔设 3 个复孔,每孔 200 $\mu$ L,细胞数为  $5 \times 10^3$  个/孔,置于 37℃、5%  $CO_2$  饱和湿度培养箱中培养 24h 后按实验要求进行热处理,热处理后每孔加入 MTT20 $\mu$ L,再继续培养 4h,吸取培养上清液,加入 200 $\mu$ L DMSO,在微型振荡器上避光震荡 10min,将培养板置于酶标仪上,以 620nm 为参考波长,490nm 为实验波长,计算各平行孔的平均值,减去空白对照孔平均值。细胞增殖抑制率(%)=(对照组 OD 值-实验组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

**1.2.5 细胞凋亡检测** 细胞培养至 70%~80% 融片时,按实验设计对细胞进行热处理,用 0.25% 胰酶消化细胞,将细胞移至离心管中,离心半径 12.2cm,1 000r/min 离心 5min,弃上清液,加 PBS4mL 悬细胞,1 000r/min 离心 5min,弃上清液,将细胞调整为  $1 \times 10^6$  /mL,取 100 $\mu$ L 细胞悬液至流式管中,用 PBS 洗 2 次,结合液洗 1 次,加 Annexin V/PI 各 5 $\mu$ L,避光孵育 15min,加结合液 200 $\mu$ L,用流式细胞仪检测。

**1.2.6 钙离子检测** 按实验要求处理和收集细胞,细胞数为  $1 \times 10^7$  /mL,Fluo-3/AM 负载细胞,终浓度为 10 $\mu$ mol/L,37℃ 孵育 45min,离心半径 12.2cm,1 000r/min 离心 5min,弃上清液,用 PBS 洗 3 次,PBS200 $\mu$ L 制成细胞悬液,用流式细胞仪分析。

**1.2.7 DR5 检测** 细胞培养至 70%~80% 融片时,按实验设计对细胞进行热处理,用 0.25% 胰酶消化细胞,将细胞移至离心管中,离心半径 12.2cm,1 000r/min 离心 5min,弃上清液,用 PBS 洗 1 次,调整细胞数为  $1 \times 10^5$  /mL,加入 366EC(1:100),冰浴 1h,并在摇床上摇,预冷后用 PBS 洗 3 次,加入

FITC-羊抗鼠 IgG(1:100),冰浴,避光,再摇 45min,预冷后用 PBS 洗 2 次,将细胞移至流式管中,用流式细胞仪分析。

## 2 结果

**2.1 热疗后细胞形态变化** 肝癌 SMMC-7721 细胞在 37℃、5%  $CO_2$  标准 1640 全培养基培养的状态显示细胞呈扁平、多角、连接成片,细胞大,胞核大,核质比增大,核仁大,数目多(LM×400)。在(42±0.5)℃ 恒温循环水浴箱中热疗 1h 后细胞体积缩小,形状变化呈圆形、梭形,细胞核固缩,胞浆空泡化少许,有细胞脱落。热疗后继续培养 6、12、24h 后细胞变圆、变小明显,有细胞脱落,胞浆空泡化明显。24h 后胞浆空泡化更加明显(插页 I 彩图 6)。

**2.2 热疗对细胞增殖的影响** 热疗后 0、6、12、24h 细胞抑制率分别为 22.18%、26.76%、31.30%、36.62%(插页 II 彩图 7)。

**2.3 热疗对细胞凋亡的影响(Annexin V/PI 双染)** 热疗后 0h 细胞凋亡率为 15.00%,其中早期凋亡率为 2.00%,晚期凋亡率为 13.00%;热疗后 6h 细胞凋亡率为 65.45%,其中早期凋亡率为 43.23%,晚期凋亡率为 22.22%;热疗后 12h,细胞凋亡率为 12.32%,其中早期凋亡率为 4.60%,晚期凋亡率为 7.72%;热疗后 24h 细胞凋亡率为 22.58%,其中早期凋亡率为 7.15%,晚期凋亡率为 15.43%(插页 II 彩图 8)。

**2.4 热疗后钙离子浓度变化** 热疗后 0、4、8、12、24h 细胞内钙离子浓度分别为 18.13、13.44、7.87、13.01、37.23 $\mu$ mol/L,对照组为 14.28 $\mu$ mol/L(插页 II 彩图 9)。

**2.5 热疗后 DR5 表达** 热疗后 0、6、12、24h 细胞 DR5 表达率分别为 79.74%、83.22%、91.28%、92.52%。对照组为 83.02%(插页 II 彩图 10)。

## 3 讨论

全世界每年约有 700 万人死于癌症,是人类死亡的第 2 位原因。目前,恶性肿瘤的治疗主要依靠手术、放射、化学、生物治疗等。热疗是通过加热使肿瘤组织的温度达到 40~44℃,引起肿瘤细胞分化受阻和死亡的一种治疗<sup>[9]</sup>。

肝细胞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,早期发现困难,病程短,进展迅速,治疗上以手术切除为主,但多数患者确诊时已丧失手术时机。非手术治疗以肝动脉栓塞化疗为首选,经皮肝穿体内冷冻、射频、无水乙醇和抗癌药物注射治疗有一定效果,针对肝癌常选用的化疗药物顺铂、阿霉素等疗效及预后均较差,有待于寻找具有较好疗效的新的药物或方法(方案)<sup>[10]</sup>。

热疗对肿瘤细胞的杀伤作用取决于温度及时间。热疗可促进药物进入肿瘤细胞,可促进药物诱发肿瘤细胞凋亡,易在肿瘤组织中心部位达到较高的温度,中心部位酸性环境下热疗更易诱发肿瘤细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

死亡受体 DR5 是 1997 年 Pan 等在克隆出 DR4 的全长基因后,发现在某些细胞表面上存在着另外一种分子,其与 DR4 具有高度同源性,遂命名为死亡受体 DR5。它是由 411 个氨基酸组成,1~55 氨基酸是信号肽,84~179 氨基酸残基含有 2 个富含半胱氨酸的重复功能区的链状结合区,184~206 氨基酸为跨膜区,胞内区含死亡结构域,与 DR4 的同源性为 58%,与 TNFR1 死亡受体结构的同源性达 64%。有研究表明 DR5 受体的独特性就在于其高水平地广泛表达于许多肿瘤组织中,如肝癌、肺癌、乳腺癌、睾丸癌、卵巢癌、胰腺癌、直肠癌、宫颈癌、子宫癌、甲状腺癌、咽喉癌、前列腺癌等;而不表达或较少表达于正常的组织细胞中,这也成为了其不同于 DR4 的优越之处,因为 DR4 不仅不能普遍地高表达于这些肿瘤细胞,且在较多

的正常组织中也有表达,如脾脏、外周血白细胞、小肠、胸腺、活化 T 细胞等。

Ca<sup>2+</sup> 作为胞内重要的第 2 信使,是生存与死亡信号,几乎所有生理活动都受到 Ca<sup>2+</sup> 的调控,如心脏跳动、激素分泌、大脑中信息传递和储存等。Ca<sup>2+</sup> 在生命的开始就触发受精过程,控制细胞发育和分化成为特定类型的细胞,然后调节细胞的各种生理活动,最后参与细胞凋亡过程。

一般细胞外 Ca<sup>2+</sup> 浓度在 0.1~10mmol/L,胞质内 Ca<sup>2+</sup> 浓度约为 0.1μmol/L,正是这种浓度差成为 Ca<sup>2+</sup> 发挥生理作用的基础。胞质内游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度是调节各种反应的关键,胞内存在各种复杂的钙调控机制以保持其平衡。有研究发现 ATP 可刺激细胞,使细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度发生短暂性升高<sup>[12-13]</sup>,细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的动员可调节细胞的多种生物功能,包括肌肉收缩、神经传导、细胞分泌等短期反应及细胞分化和增殖等长期反应。Ca<sup>2+</sup> 对细胞功能的调节起信使作用,负责将激动剂的刺激信号传给细胞内各种酶反应系统和功能性蛋白<sup>[14-15]</sup>。

Ca<sup>2+</sup> 浓度过高对细胞有害,甚至会致死。因此有学者认为许多外界因素引起细胞坏死的共同机制是细胞内 Ca<sup>2+</sup> 稳态失控。许多损伤因素(如缺氧、毒素、氧化性应激、缺血再灌注、败血症、电离辐射、肠炎等)都可引起细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高,从而引起细胞凋亡。

1980 年 Wyllie 就已证实 DNA 在核小体间断裂是内源性核酸内切酶被激活的结果。1989 年 Jone 等确认 DNA 在核小体间断裂,分裂为特异性片段是细胞凋亡的标志。20 世纪 80 年代 Catmann 等利用荧光成像技术首次证实了胞质 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高是神经细胞凋亡的启动因素。另外钙超载还可引起线粒体内氧化磷酸化过程障碍,线粒体膜电位降低,组织 ATP 含量下降及胞质内磷脂酶、蛋白酶等激活,可导致并促进细胞的不可逆性损伤<sup>[16]</sup>。

本实验证明了热疗可增加肿瘤细胞表面 DR5 的表达。热疗引起肿瘤细胞凋亡的因素是复杂的,DR5 表达增加和细胞内钙离子增加是原因之一。胞质 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高可能是热疗导致肿瘤细胞晚期凋亡的主要原因。

(志谢:本文承蒙中国军事医学科学院基础医学研究所研究员、中国工程院院士、博士生导师沈倍奋老师指导。)

#### 参考文献:

- [1] 荆文华,丁亚媛. 肿瘤热疗的临床应用研究进展[J]. 护理研究,2007,22(7):1799.
- [2] 彭远飞,郑民华. 肿瘤热疗的细胞分子作用机制及应用进展[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(12):1319.
- [3] 蒋东,郑世营,陈锁成. 全身热疗与肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 医学综述,2008,14(1):50.

- [4] Hildebrandt B, Wust P, Ahlers D, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2002,43:33.
- [5] Hildebrandt B, Wust P, Ahlers D, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2002,43:33.
- [6] Lim CU, Zhang Y, Fox MH. Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells[J]. Int J Hyperthermia,2006,22:77.
- [7] Westermann AM, Grosen EA, Katschinski DM, et al. A pilot study of whole body hyperthermia and carboplatin in platinuin resistant ovarian cancer[J]. Eur J Cancer,2001,37(9):1111.
- [8] O'Neill KL, Fairbairn DW, Smith MJ, et al. Critical parameters influencing hyperthermia induced apoptosis in human lymphoid cell lines[J]. Apoptosis,1998,3:369.
- [9] 孔忆寒,王婷,张涛,等. 微波热疗联合介入化疗治疗肝癌的效果[J]. 医药论坛杂志,2006,27(13):1.
- [10] 刘宝瑞,刘文超. 现代肿瘤化疗手册[M]. 西安:世界图书出版公司,2000:107.
- [11] 刘宝瑞,钱晓平. 肿瘤热化疗的基础与临床研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册,2004,31(1):34.
- [12] Shimohama S, Fujimoto S, Matsushima H, et al. Alteration of phospholipase C-delta protein level and specific activity in Alzheimer's disease[J]. J Neurochem,1995,64(6):2629.
- [13] Kazilek CJ, Merkle CJ, Chandler DE. Hyperosmotic inhibition of calcium signals and exocytosis in rabbit neutrophils[J]. Am J Cell Physiol,1988,254(Pt 1):C709.
- [14] Smeland E, Bremnes RM, Fuskevag OM, et al. The effect of calcium channel blockers and calcium on methotrexate accumulation hepatocytes[J]. Anticancer Res,1995,15(4):1221.
- [15] Moore TM, Chetham PM, Kelly JJ, et al. Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and camp[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,1998,275(2 Pt 1):L203.
- [16] Mailland M, waelchli R, Ruat M, et al. Stimulation of cell proliferation by calcium and a calcimimetic compound[J]. Endocrinology,1997,138(9):3601.

(收稿日期:2009-07-18 修回日期:2009-08-09)

(上接第 279 页)

- 3 版. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,2002:537.
- [9] 林力,文浩,杨加林,等. 单纯根治性放疗与放疗联合化疗治疗鼻咽癌的远期疗效分析[J]. 中国肿瘤临床与康复,2000,7(4):49.

- [10] 马骏,麦海强,莫浩元,等. 鼻咽癌放射治疗失败原因分析[J]. 癌症,2000,19(11):1016.
- [11] 陈斌,殷善开. 鼻咽癌的病因和流行病学状况[J]. 中国全科医学,2002,5(4):262.

(收稿日期:2009-08-28 修回日期:2009-09-11)