

生理性深层海水联合热疗治疗肝细胞癌的体外抑瘤研究*

代佑果¹,李为明²,唐辉蓉²,姚乾¹,崔进^{2△}

(1.昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院,昆明 650118;2.昆明医科大学第二附属医院,昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨生理性深层海水(PDSW)联合热疗对肝细胞癌的体外抑瘤作用。**方法** 将取自我国海南省海域的深层海水进行制备,制成 PDSW,检测所含有的部分元素。体外培养的正常肝细胞和人肝癌 QGY-7703 细胞被随机分为 PDSW 组和生理盐水组,PDSW 组加入 PDSW,生理盐水组给予等量生理盐水,24 h 后,每天分别接受 40 ℃ 热疗 6 h 和 43 ℃ 热疗 1 h,在热疗后的 24、48、72 h,用 MTT 法检测热疗结合 PDSW 对正常肝细胞及人肝癌 QGY-7703 细胞的抑制率。同时检测 PDSW 及生理盐水在 40 ℃ 6 h 连续 10 d 状态下对人肝癌 QGY-7703 细胞克隆形成率的影响。**结果** MTT 检测结果显示肿瘤抑制率在两组均呈时间和浓度依赖性。PDSW 组的肿瘤抑制率明显较生理盐水组高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PDSW 组对正常肝细胞的生长抑制率明显低于生理盐水组。此外,PDSW 组的肿瘤细胞克隆形成率较生理盐水组低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PDSW 能够提高正常肝细胞对热的耐受性。当联合热疗时,可明显抑制人肝癌 QGY-7703 细胞生长。

[关键词] 癌,肝细胞;生理性深层海水;热疗;耐受性**[中图分类号]** R282.77**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)07-0899-04**The anti-cancer effects of physiological deep-sea water combined with hyperthermia for hepatocellular carcinoma in vitro***Dai Youguo¹,Li Weiming²,Tang Huirong²,Yao Qian¹,Cui Jin^{2△}

(1. the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650118, China; 2. the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To explore the anti-cancer effects of physiological deep-sea water(PDSW) combined with hyperthermia for hepatocellular carcinoma in vitro. **Methods** Deep-sea water (DSW) from the south Chinese sea was processed, and made into PDSW, detection of some elements. In vitro, the cultured normal liver cells and human hepatoma QGY-7703 cells were randomly divided into PDSW group and normal saline(NS) group, the NS group received saline, the PDSW group received different concentrations of PDSW. Two groups were heated respectively to 6 h of 40 ℃ or 1 h of 43 ℃, 24, 48, 72 h after the administration of PDSW or saline, the normal liver cells and QGY-7703 cells proliferation capacity and toxicity were investigated by MTT assay. At the same time testing PDSW and NS in 40 ℃ 6 h for 10 d state of human liver QGY-7703 cell clone formation rate. **Results** The results of MTT assay showed that tumor inhibitory rate were time and concentration dependent in tow groups. Tumor inhibitory rate of PDSW group in different time was significantly higher than NS group ($P < 0.05$). On the other hand, the inhibitory of hepatocyte for PDSW group in different time were significantly lower than NS group. In addition, the clone formation rate of PDSW group was lower than those of NS group($P < 0.05$). **Conclusion** PDSW can improve the heat tolerance of normal liver cells. When combine with heat, it can obviously inhibit the growth of human liver cancer QGY-7703 cells.

[Key words] carcinoma, hepatocellular; deep-sea water; hyperthermia; tolerance

肿瘤热疗(hyperthermia)于 1985 年获美国食品及药物管理认证,与手术、化学药物治疗、放射治疗、生物免疫治疗一起成为肿瘤综合治疗的有效手段^[1]。研究表明,热疗对肝癌细胞具有抑制作用,可与化学药物治疗、放射治疗等联合加强肝癌的治疗效果^[2]。目前,有关“深层海水”在恶性肿瘤治疗中的报道较少。本试验拟通过生理性深层海水(PDSW)联合全身热疗治疗人肝癌 QGY-7703 细胞的体外抑瘤研究,探讨 PDSW 对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖抑制的作用,以及其联合全身热疗对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制作用,并初步探讨可能的机制。

1 材料与方**1.1 材料****1.1.1 深层海水** 取自海南省琼海市海域,海平面 200 m 以

下,避光运至昆明,室温避光储存。在 0.3 MPa 压力下,经 5.00 μm、1.00 μm 聚丙烯熔喷 PP 棉超微过滤后,用铜锌合金(KDF)除去海水中的重金属,反复冻融方法浓缩并去除海水中多余的盐分浓缩海水,0.01 μm PVC 合金超滤膜除细菌、部分病毒和微小杂质,活性炭吸附异味,电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)多次检测 PDSW 中部分元素的含量后,制备成 PDSW 备用。

1.1.2 细胞株 人肝癌 QGY-7703 细胞株由云南省肿瘤研究所提供。正常肝细胞由云南省肿瘤研究所提供。**1.1.3 主要试剂** RPMI1640 培养基为美国 Gibco 公司产品;新生小牛血清为美国 Costar 公司产品;十二烷基硫酸钠(SDS)、二甲基酰胺(DMF)和乙二胺四乙酸二钠(EDTA)为上海生工生物工程有限公司产品;MTT:美国 Amresco 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞抑制率检测(改良 MTT 比色法) 取对数生长期的肿瘤细胞株及正常肝细胞株经 0.25% 胰酶消化, 调细胞浓度为 2×10^5 个/mL 接种于 96 孔板, 培养 24 h。然后进行分组, 每组设 6 个平行孔, 其中空白对照组: 只加培养基; 对照组: 培养细胞, 不加药; 试验组: 海水终浓度梯度为 100% (即 PDSW)、50.00%、25.00%、12.50%、8.33%、6.25%; 阳性对照组: 盐水终浓度梯度为 0.90%、0.45%。上述各组再根据热疗温度不同设 37 °C、40 °C 及 43 °C 3 个组, 每组根据热疗时间(次数)再分为 24 h(热疗 1 次)、48 h(热疗 2 次)、72 h(热疗 3 次)3 个组。热疗: 其中一组每天把培养箱的温度提高到 40 °C, 持续 6 h 后, 再把培养箱的温度恢复到 37 °C; 另一组每天把培养箱的温度提高到 43 °C, 持续 1 h 后, 再把培养箱的温度恢复到 37 °C。37 °C 组按常规进行细胞培养法培养。终止热疗作用: 分别在热疗后的 24、48、72 h 每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20.00 μ L, 继续培养 4 h。各孔加入 20% SDS 50% DMF 裂解液溶解甲瓖结晶, 震荡后过夜。用酶标仪于 580 nm 测定光密度(OD)值, 以 OD 值表示细胞增殖情况。

1.2.2 癌细胞克隆形成率检测 每试验点设 3 复孔(24 孔板), 每孔接种 2×10^2 个人肝癌 QGY-7703 细胞, 24 h 后分别加入生理盐水(NS)或 PDSW。每 3 天换液。连续观察 7~10 d, 计数各孔克隆数(细胞数大于或等于 50 判定为克隆)。克隆形成率(%) = 克隆数目/接种细胞数 $\times 100\%$, 计算各孔克隆形成率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件包处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用的检验方法有 *t* 检验、方差分析和 LSD 检验, 趋势图用 SPSS 软件制作, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 加 PDSW 或 NS 进行 37 °C 常规培养对正常肝细胞增殖的抑制作用 37 °C 正常培养状态下, 加 PDSW 或 NS 对正常肝细胞均没有明显的抑制作用, 24、48、72 h 各时段两组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 1。

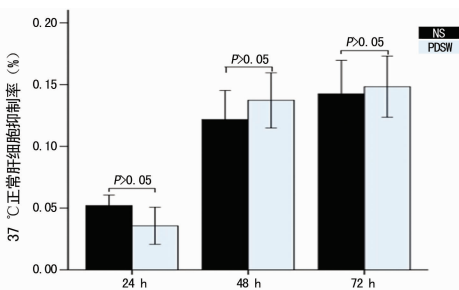


图 1 37 °C 常规培养时, 加 PDSW 或 NS 对正常肝细胞增殖的抑制率

2.2 加 PDSW 或 NS 分别进行 40 °C 6 h 或 43 °C 1 h 热疗对正常肝细胞增殖的平均抑制率 40 °C 6 h 或 43 °C 1 h 加 NS 或 PDSW 对正常肝细胞增殖的平均抑制率均呈时间依赖性(图 2), 即随着热疗时间延长, 抑制率也随着增加; 且加 NS 的抑制率较加 PDSW 者明显。

2.3 同一温度下, PDSW 组及 NS 组对正常肝细胞增殖的抑制率 在同一温度(40 °C 或 43 °C)下, 各时间点, PDSW 组对正常肝细胞增殖的抑制率均较 NS 组小($P < 0.05$)。就 PDSW 组来说, 40 °C 6 h 与 43 °C 1 h 比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 3。

2.4 同一时间、同一温度, 不同浓度海水对正常肝细胞增殖的抑制率 同一时间(24、48、72 h)、同一温度(40 °C 或 43 °C)热疗时, 各组随着海水浓度增加, 抑制率增强, 呈现出浓度依赖的特点, 即随着海水浓度增大, PDSW 加热疗对正常肝细胞增殖的抑制率增强。未被稀释的 PDSW(即海水原液: 硬度为 3 000 ppm 的深层海水)组的抑制率最强, 见图 4。

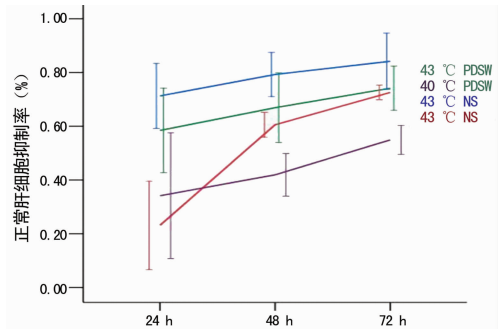


图 2 不同时间、不同温度, 加 PDSW 和 NS 对正常肝细胞增殖的抑制率

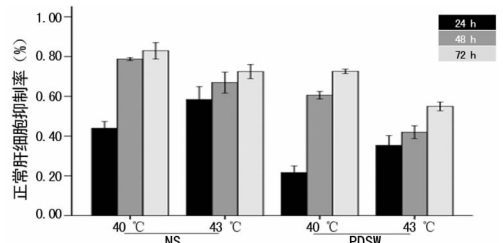


图 3 同一温度下, PDSW 组及 NS 组对正常肝细胞增殖的抑制率

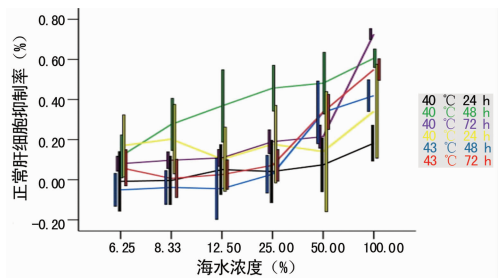


图 4 同一时间、同一温度, 不同浓度海水对正常肝细胞增殖的抑制率

2.5 同一时间、同一温度下, 加 NS 与 PDSW(海水原液)对正常肝细胞增殖的影响 同一时间(24、48、72 h)、同一温度(40 °C 或 43 °C)下, 在体外, PDSW 加热疗对正常肝细胞增殖的抑制率均低于 NS($P < 0.05$), 见图 5。

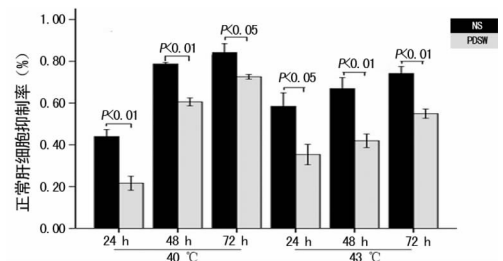


图 5 同一时间、同一温度下, 加 NS 与 PDSW 对正常肝细胞增殖的抑制率

2.6 加 PDSW 或 NS 进行 37 °C 常规培养对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制作用 在 37 °C 正常培养状态下, 加 PD-

SW 对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖有明显的抑制作用,24、48、72 h 各时段与 NS 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 6。

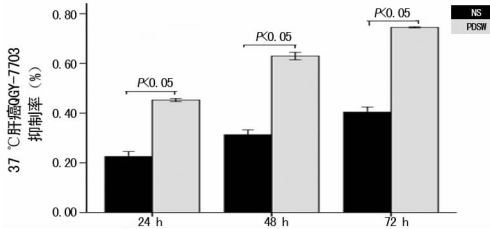


图 6 37 °C 常规培养时,加 PDSW 或 NS 对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率

2.7 加 PDSW 或 NS 分别进行 40 °C 6 h 或 43 °C 1 h 热疗对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的平均抑制率 40 °C 6 h 或 43 °C 1 h 加 NS 或 PDSW 对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的平均抑制率呈时间依赖性(图 7),即随着热疗时间延长,抑制率也随着增加;且 PDSW 组的抑制率较 NS 组明显。

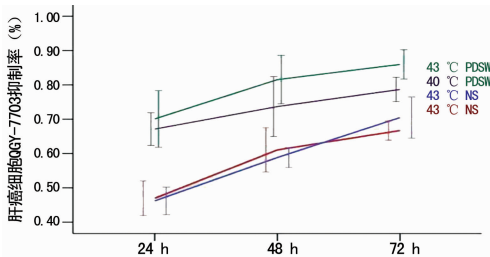


图 7 不同时间、不同温度,加 NS 和 PDSW 对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率

2.8 40 °C 6 h 与 43 °C 1 h 热疗比较,加 NS 组或 PDSW 组的各时段对体外培养的人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的影响 40 °C 6 h 与 43 °C 1 h 热疗比较,加 NS 组或 PDSW 组的各时段的抑制率比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 8。

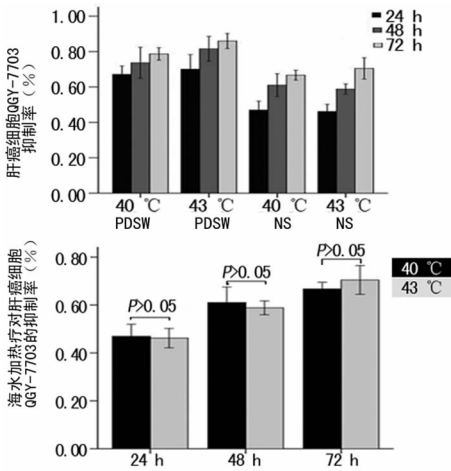


图 8 40 °C 6 h 与 43 °C 1 h 热疗比较,加 NS 组或 PDSW 组的各时段对体外培养的人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率

2.9 同一时间、同一温度,不同浓度的深层海水对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率 同一时间(24、48、72 h)、同一温度(40 °C 或 43 °C)热疗时,各组随着海水浓度增加,抑制率增强,呈现出浓度依赖的特点,即随着海水浓度增大,PDSW 加热疗对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率增强。PDSW(即海水原液)组的抑制率最强,见图 9。

2.10 同一时间、同一温度下,加 NS 与 PDSW(海水原液)对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的影响 同一时间(24、48、72 h)、同一温度(40 °C 或 43 °C)下,在体外,PDSW 加热疗对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率均高于 NS 加热疗 ($P < 0.05$),见图 10。

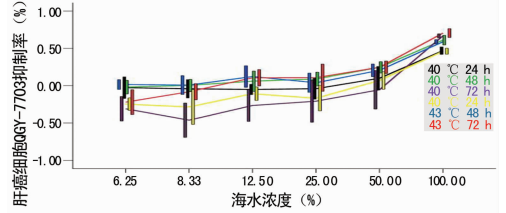


图 9 同一时间、同一温度,不同浓度海水对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率

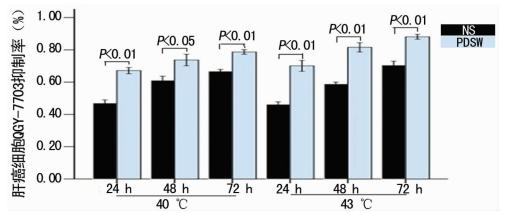


图 10 同一时间、同一温度下,加 NS 与 PDSW 对人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率

2.11 同一时间、同一温度,加 PDSW 对正常肝细胞和人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的影响 从总体上看,PDSW 加 40 °C 6 h 或 43 °C 1 h 热疗在 24、48、72 h 均可以对肝癌 QGY-7703 细胞起到较好的抑制作用,同时对正常肝细胞产生较小的影响,见图 11。

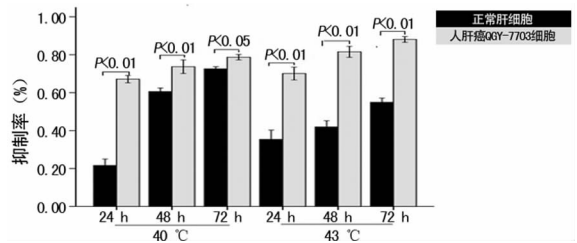
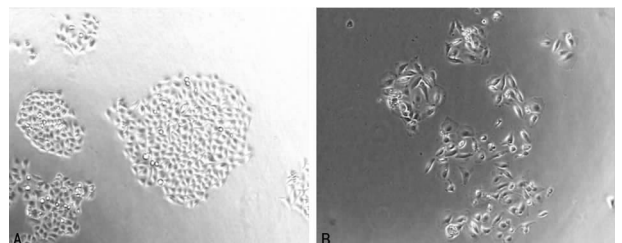


图 11 同一时间、同一温度,加海水对正常肝细胞和人肝癌 QGY-7703 细胞增殖的抑制率

2.12 PDSW 对人肝癌 QGY-7703 细胞克隆形成率的抑制作用 经过 10 d 培养,PDSW 组人肝癌 QGY-7703 细胞克隆形成较少(图 12A),而在 NS 克隆形成明显(图 12B)。进行统计分析发现,40 °C 6 h 热疗 10 d 后各组克隆形成率比较,PDSW 组的克隆率明显较 NS 组少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 1。



A: NS 组; B: PDSW 组。

图 12 加 NS 或 PDSW 40 °C 6 h 热疗 10 d 后,人肝癌 QGY-7703 细胞克隆形成情况

表 1 40 ℃ 6 h 热疗 10 d 后两组各培养孔
肿瘤细胞克隆形成率 (n=3)

组别	克隆形成率 (%)			均值($\bar{x} \pm s$)
	1 孔	2 孔	3 孔	
PDSW 组	6.5	3.0	4.5	4.67±1.01
NS 组	21.0	17.5	15.0	17.83±1.74

3 讨 论

原发性肝癌是我国比较常见的恶性肿瘤,其恶性程度较高,起病隐匿,早期多无明显症状,一旦发现,大多已属中晚期,目前缺乏有效的治疗药物。因而,为中晚期原发性肝癌患者寻找行之有效的治疗方法已成为医疗界最紧迫的任务之一。热疗可以抑制肿瘤血管形成及促进癌细胞凋亡^[3],正逐渐成为一种有希望的肝癌治疗手段。

体外实验研究发现,细胞的生存率会随着加热的温度和时间而变化,温度越高、作用时间越长,疗效将呈指数性递增^[4-5]。根据癌细胞对热的临界温度(或称为阈值)不同,热可以发挥两方面的作用,在阈值以下热诱导细胞凋亡为热作用的主要机制,而阈值以上则主要引起细胞坏死,细胞损伤程度呈指数性递增^[6-7]。细胞株的种类不同,阈值也不一样,差异颇大,一般认为大多数细胞株的临界温度介于 42.5~43.0 ℃。本试验发现,在同一组别(NS 组或 PDSW 组),40 ℃ 6 h 的热疗对人肝癌 QGY-7703 细胞的抑制率与 43 ℃ 1 h 比较差异有统计学意义($P < 0.05$),说明提高热疗的温度或延长作用时间,均可增加热疗的细胞毒作用,从而可为温和热疗[平台期生物体核心温度(39.8±0.2)℃,恒温期 6 h]治疗肿瘤奠定基础,在温和热疗作用下,随着治疗时间延长,可以达到高温热疗同样的效果。

内环境的维持靠各种微量元素的平衡,只有在稳定的内环境下,机体的功能才能正常发挥。海水是为人类提供“平衡微量元素”的最好资源^[7]。与表层海水比较,深层海水具有以下特点:低温、洁净性、富含平衡易吸收的微量元素、氧化还原水、pH 值呈弱碱性^[8]。饮用深层海水可纠正元素异常,恢复患者的钙(Ca)/镁(Mg)比例,以及铝(Lv)、汞(Hg)和铅(Pb)水平^[9]。长期饮用深层海水可促进机体的元素平衡,如其中的钠(Na)和钾(K)均衡有助于维持机体的酸碱平衡^[10];Ca 和 Mg 比例的适当对调节脂代谢及维持心血管系统的正常功能尤为重要^[11-12]。在本试验中发现,加入 PDSW,正常肝细胞对热的临界温度提高,耐热能力增强,而肝癌 QGY-7703 细胞的临界温度相反降低,耐热能力降低。推测由于癌细胞结构异常(如 Na⁺-K⁺ ATP 等异常),即使在给予平衡元素的基础上也难以纠正自身的元素失衡,造成对热耐受能力降低,相关机制需要进一步研究。

此外,深层海水具有直接抑制肿瘤侵袭或转移的作用, Kim 等^[13]的研究表明 PDSW 对乳腺癌的侵袭/转移具有抑制作用,由此认为 PDSW 通过预防肿瘤转移,有望改善癌症患者的生存。本研究发现在 37 ℃ 正常培养状态下,PDSW 对体外培养的人肝癌 QGY-7703 细胞的增殖能力具有明显的抑制作用,且这种抑制具有时间及浓度依赖的特点,其抑制机制推测可能与 Kim 等报道的结果类似,相关研究有待进一步深入。

总之,本研究结果表明 PDSW 能够提高正常肝细胞对热

的耐受性。在正常体温(37 ℃)状态下,PDSW 对体外培养的人肝癌 QGY-7703 细胞的增殖能力具有明显的抑制作用。当与热疗联合使用时,PDSW 能够改变癌细胞对热的临界温度,增加热疗的抗癌效果,相关机制需要更多研究支持。

参考文献

- [1] 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):50-53.
- [2] 席子明,张军,马远方. 热疗对 SMMC-7721 肝癌细胞形态、增殖、凋亡的影响[J]. 重庆医学,2010,39(3):280-282,385-386.
- [3] Gadaleta-Caldarola G, Infusino S, Galise IA, et al. Sorafenib and locoregional deep electro-hyperthermia in advanced hepatocellular carcinoma: A phase II study[J]. Oncol Lett,2014,8(4):1783-1787.
- [4] Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2002,43(1):33-56.
- [5] Kalamida D, Karagounis IV, Mitrakas AA, et al. Fever-range hyperthermia vs. hypothermia effect on cancer cell viability, proliferation and HSP90 expression[J]. PLoS One,2015,10(1):e0116021.
- [6] Neill KL, Fairbairn DW, Smith MJ, et al. Critical parameters influencing hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoid cell lines[J]. Apoptosis,1998,104(3):369-375.
- [7] 崔进. “深层海水”在医学领域中的研究[J]. 昆明医学院学报,2011,32(8):1-2,8.
- [8] Tsuchiya Y, Nakamura K, Sekikawa H, et al. Subacute effects of deep-sea water from the Japan Sea on blood examination values in mice[J]. Environ Health Prev Med, 2002,7(5):189-192.
- [9] Kimata H, Tai H, Nakagawa K, et al. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome(AEDS)[J]. Acta Medica (Hradec Kralove),2002,45(2):83-84.
- [10] Hataguchi Y, Tai H, Nakajima H, et al. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome[J]. Eur J Clin Nutr,2005,59(9):1093-1096.
- [11] Yoshioka S, Hamada A, Cui T, et al. Pharmacological activity of deep-sea water; examination of hyperlipemia prevention and medical treatment effect[J]. Biol Pharm Bull, 2004,27(11):1784-1787.
- [12] Chi CW. Dietary deep seawater and hepatic steatosis[J]. J Chin Med Assoc,2013,76(3):121-122.
- [13] Kim S, Chun SY, Lee DH, et al. Mineral-enriched deep-sea water inhibits the metastatic potential of human breast cancer cell lines[J]. Int J Oncol,2013,43(5):1691-1700.