

低氧对食管癌 ECa9706 细胞生长及顺铂敏感性的影响

杨联河¹, 赵雪艳¹, 牛春玲¹, 辛 凯², 陈玉龙¹

(1. 河南中医学院 基础医学院, 郑州 450046; 2. 河南中医学院 第三附属医院, 郑州 450008)

摘 要:着重探讨低氧对食管癌 ECa9706 细胞生长及顺铂敏感性的影响。ECa9706 细胞分别培养于顺铂干预的常氧和低氧(1% O₂)环境下,倒置显微镜观察细胞形态,MTT 法检测细胞活力,流式细胞法检测细胞凋亡和细胞周期。结果显示:与常氧环境下培养相比,低氧下细胞形态变长、变大,细胞自第 7 d 后生长缓慢。常氧下顺铂作用细胞 48 h 的 IC₅₀ 为(1.180 ± 0.056) μM,低氧下为(2.675 ± 0.063) μM。培养 48 h 后,常氧对照组及常氧高浓度顺铂组(1.18 μM)阻滞细胞周期于 G1 期,低氧下各组细胞周期阻滞于 S 期。低氧导致顺铂诱导的细胞凋亡率较常氧下降。表明:低氧环境影响了细胞的形态、增殖及细胞周期,低氧下细胞对顺铂的细胞毒作用敏感性降低。

中图分类号:Q279;R735.1

文献标志码:A

食管癌是常见的恶性肿瘤之一,中国发生食管癌居世界之首^[1]。化疗是临床治疗食管癌常用的方法,但食管癌临床化疗有效反应率只有 19%~40%,肿瘤耐药成为治疗食管癌的主要障碍^[2-3]。低氧现象普遍存在于血液供应不能满足快速生长需求的较大瘤体中^[4-5]。低氧影响肿瘤细胞多种生物行为,如生长、凋亡、自噬、迁移等,同时也是产生耐药的重要因素^[6]。顺铂是食管癌化疗常用药物之一。低氧可降低顺铂对肿瘤细胞的损伤^[7]及肿瘤细胞对顺铂的敏感性^[8]。为探讨食管癌顺铂耐药机制,本研究以食管癌细胞株 ECa9706 在低氧细胞工作站建立细胞低氧模型,观察低氧环境对 ECa9706 生长及顺铂敏感性的影响,以期对食管癌抗顺铂耐药研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 ECa9706 细胞培养与形态观察

食管癌 ECa9706 细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 的完全培养液培养。细胞分为常氧组(于 37 ℃, 5% CO₂, 饱和湿度的 CO₂ 培养箱中常规培养)和低氧组(于 37 ℃, 1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂, 饱和湿度的低氧细胞工作站中培养)。两组分别以不含顺铂的完全培养液培养细胞为对照组。倒置显微镜下进行观察细胞形态。

1.2 细胞生长曲线检测

取常规培养的对数生长期细胞,制成细胞悬液,按 5×10⁵/瓶接种于 25 cm² 细胞培养瓶中。常氧组和低氧组同时培养 10 d。每天同一时间分别消化 1 瓶细胞,计数。以时间为横坐标,细胞数为纵坐标,绘制生长曲线。

收稿日期:2015-02-30;修回日期:2015-08-01。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81373535);河南省科技攻关计划项目(142102310038);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A360025);河南中医学院博士基金项目(BSJJ2011-01)。

第 1 作者简介:杨联河(1968—),男,河南济源人,河南中医学院副教授,博士,研究方向:天然药物抗肿瘤机制,E-mail:13598420711@139.com。

通信作者:陈玉龙(1973—),河南平舆人,河南中医学院教授,博士,研究方向:肿瘤病机制与防治,E-mail:cyl72621@163.com。

1.3 MTT 法检测细胞毒作用

常氧组和低氧组同时进行. 以 5×10^3 /孔接种于 96 孔培养板, 每组 8 个复孔. 铺板, 过夜, 两组同时加入顺铂(终浓度: 4、2.5、2、1.25、1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 继续分别培养 48 h, 加入 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 20 μL , 继续分别培养 4 h. 加 150 μL DMSO, 酶标仪以 570 nm 测定吸光值(OD 值), 计算 IC_{50} 值^[9].

1.4 PI 染液法检测细胞周期

取常规培养的对数生长期细胞, 以 2×10^6 /瓶培养于 25 cm^2 细胞瓶中. 经不含血清培养基同步化培养 24 h. 两组按顺铂浓度平行分为低浓度组($\text{IC}_{15} = 0.35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中浓度组($\text{IC}_{30} = 0.70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、高浓度组($\text{IC}_{50} = 1.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)加药处理. 分别培养 48 h 后, PI 染色, 于流式细胞仪检测细胞周期.

1.5 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

分组和顺铂处理同 1.4. 分别培养 48 h 后, 收集细胞 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, PBS 洗 2 遍. 细胞重悬 500 mL BufferA 中, 加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 染液染色, 室温下孵育 15~20 min, 于流式细胞仪分析细胞凋亡.

1.6 统计方法

每次实验至少重复 3 次. 对符合正态分布的数值变量采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计描述. 在假设检验中, 取双侧 0.05 水准, 所有的统计检验均采用双侧检验, 以 $\alpha \leq 0.05$ 作为所检验的差异有统计学意义的标准. 两样本均数的比较采用 t 检验, 多样本均数的比较采用单因素方差分析. 以 SPSS 18.0 数据统计软件处理.

2 结 果

2.1 低氧对细胞形态的影响

常氧对照组细胞在显微镜下形态呈圆形, 细胞体积较小. 低氧对照组细胞呈长形, 较正常培养下细胞体积变大(见图 1).

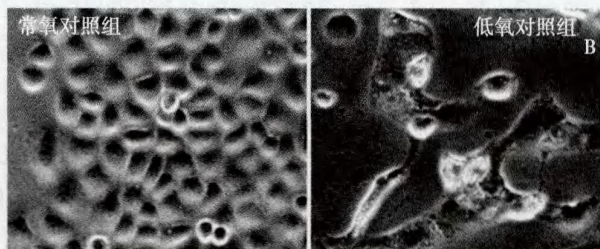


图1 常氧对照组和低氧对照组细胞形态(20 \times)

2.2 低氧对细胞生长的影响

常氧对照组和低氧对照组组间比较, 前 6 d 细胞数差异无显著性统计学意义. 7 d 后低氧对照组细胞数较常氧对照组减少, 组间比较有显著性统计学意义. 8~10 d, 低氧对照组细胞数组内比较, 差异无显著性统计学意义(见图 2).

2.3 低氧对顺铂细胞毒作用的影响

常氧组细胞的 IC_{50} 为 $(1.180 \pm 0.056) \mu\text{M}$, 低氧组细胞的 IC_{50} 为 $(2.675 \pm 0.063) \mu\text{M}$.

2.4 低氧对细胞周期的影响

低氧对照组与常氧对照组组间比较, S 期细胞数增多, 差异有显著性统计学意义($P < 0.05$), 表明, 低氧可诱导细胞周期显著阻滞于 S 期. 常氧低、中浓度组分别与常氧对照组组间比较, S 期细胞数增多, G_1 期细胞数减少, 差异有显著性统计学意义($P < 0.05$); 低氧低、中、高浓度组分别与低氧对照组组间比较, S 期增多, G_1 期减少, 差异有显著性统计学意义($P < 0.05$), 表明, 顺铂在常氧和低氧环境下皆可显著诱导细胞阻滞在 S 期(见表 1). 低氧高浓度组与常氧高浓度组组间比较, S 期差异有显著性统计学意义($P > 0.05$).

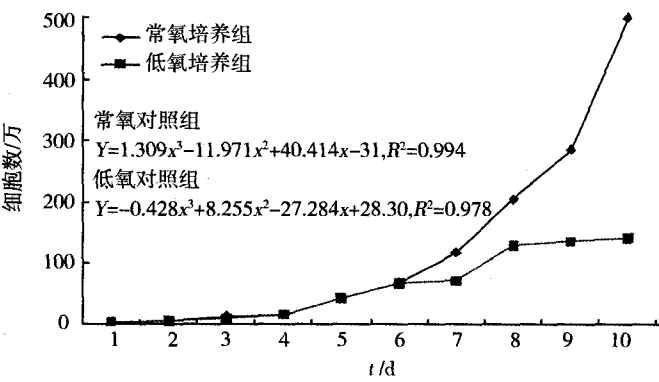


图 2 常氧对照组和低氧对照组细胞生长曲线

表 1 常氧组和低氧组不同浓度顺铂处理后细胞周期分布 (n=4, $\bar{x}\pm s$)

组别	G ₁	G ₂	S
常氧对照组	56.63%±2.71	16.77%±1.80	25.04%±3.21
常氧低浓度组	5.41%±2.08*△	34.07%±3.42*△▲	55.55%±19.62*
常氧中浓度组	9.94%±6.23*	17.37%±6.33	66.15%±15.10*
常氧高浓度组	42.33%±2.05*▲	5.70%±0.019*▲	37.59%±11.32
低氧对照组	45.33%±7.42■	9.06%±3.61■	43.74%±6.30■
低氧低浓度组	21.06%±3.70*■	14.16%±3.14■	61.53%±7.61*
低氧中浓度组	17.29%±4.94*■	10.97%±1.64	69.41%±9.45*
低氧高浓度组	19.45%±8.73*■	10.63%±2.61■	68.13%±9.52*■

注:*,与同组对照组比较 $P<0.05$;△:与同组高浓度组比较 $P<0.05$;▲:与同组中浓度组比较 $P<0.05$;■:和常氧组同剂量比较 $P<0.05$.

2.5 低氧对细胞凋亡的影响

常氧高、中、低浓度组与常氧对照组组间比较,细胞凋亡率升高,差异有显著性统计学意义($P<0.05$),且呈剂量依赖性;低氧高浓度组与低氧对照组组内比较,细胞凋亡率升高,差异有显著性统计学意义($P<0.05$).常氧组与低氧组在同浓度下组间比较,低氧高、中、低浓度组凋亡率低于常氧组,差异有显著性统计学意义($P<0.05$,见表 2,见图 3).

表 2 常氧组和低氧组不同浓度顺铂处理后细胞凋亡率 (n=4, $\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡率	组别	凋亡率
常氧对照组	6.96%±1.35	低氧对照组	7.93%±2.93
常氧低浓度组	21.39%±5.50*△▲	低氧低浓度组	9.81%±5.35■△
常氧中浓度组	40.19%±6.52*	低氧中浓度组	12.72%±6.53■
常氧高浓度组	73.73%±386*▲	低氧高浓度组	26.50%±2.26*▲■

注:*,与同组对照组比较 $P<0.05$;△:与同组高浓度组比较 $P<0.05$;▲:与同组中浓度组比较 $P<0.05$;■:和常氧组同剂量比较 $P<0.05$.

3 讨 论

建立低氧模型一般分为化学法和物理法.在培养基内加入连二亚硫酸钠、氯化钴等化学物质引起培养基低氧是建立低氧模型常用的化学方法,但由于添加的物质可能会改变培养基的化学成分,且添加剂本身对细胞有损伤作用,增加了实验的混杂因素^[10].物理法采用低氧细胞工作站可模拟出接近体内不同氧分压的生理低氧环境.在低氧细胞工作站中以常规培养基培养细胞,可避免化学法的缺憾.本文选择在低氧细胞工作站以物理法建立低氧细胞模型.

研究表明,低氧可以促进上皮细胞向间充质细胞转化^[11].低氧下 ECa9706 细胞体积变大,呈长梭形,形态接近于间质细胞,但是否具有相应生物标志物如 E-cadherin 减少尚有待于进一步研究.与常氧条件下比较,低氧下细胞周期阻滞于 S 期,且 ECa9706 细胞 6 d 后较常氧对照组生长显著缓慢,8 d 后趋于平台期,提

示,细胞周期阻滞可能是 ECa9706 细胞增殖抑制的原因。

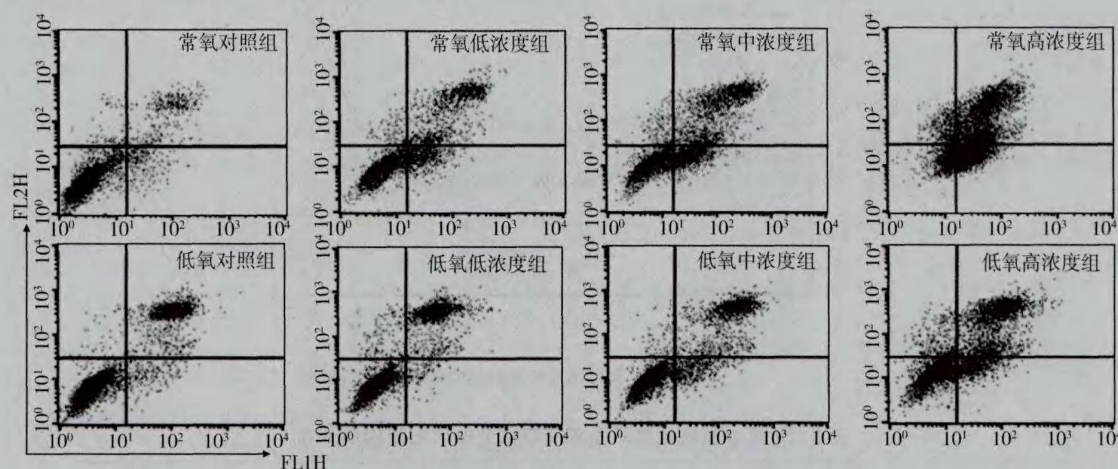


图3 Annexin V / PI双染法检测常氧组和低氧组不同浓度顺铂处理后细胞凋亡率

低氧可通过直接和间接作用导致肿瘤细胞耐药^[12-14]。从 IC_{50} 值可知,在 1% O_2 条件下,顺铂对 ECa9706 细胞毒作用较常氧下减弱,提示,低氧可引起 ECa9706 细胞顺铂耐药。本研究发现,低氧下顺铂诱导的细胞凋亡率较常氧下明显降低,提示,低氧导致 ECa9706 细胞对顺铂诱导的细胞凋亡的拮抗可能是其耐药的机制之一。

细胞周期阻滞是肿瘤细胞应对低氧环境的一种对策,因此,它既是化疗药物抑制肿瘤细胞活力的机制,又可能是低氧下肿瘤细胞耐药的原因。MTT 法是检测细胞活力的常规方法,MTT 法反映的信息依赖细胞的活化程度,可能是细胞死亡、线粒体代谢改变、增殖抑制,或这些效应的综合效应^[15]。常氧和低氧低、中浓度组顺铂皆可诱导细胞阻滞于 S 期,但两组之间并无显著性差异。常氧高浓度组阻滞细胞周期于 G_1 期,而低氧高浓度组仍阻滞细胞周期于 S 期,提示,低氧环境下 ECa9706 细胞可能通过细胞周期阻滞产生对顺铂的耐药,且呈剂量依赖性。

综上所述,ECa9706 细胞在低氧下形态和生长曲线发生变化,细胞周期阻滞于 S 期,并可能通过抑制细胞凋亡和诱导周期阻滞对顺铂产生耐药,其详细的机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 尤 静,朱广迎.食管癌化疗相关进展[J].中国癌症防治杂志,2014,6(4):327-330.
- [2] Ancona E, Ruol A, Santi S, et al. Only pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy improves significantly the long term survival of patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma: final report of a randomized, controlled trial of preoperative chemotherapy versus surgery alone[J]. Cancer, 2001, 91(11):2165-74.
- [3] Wilson W R, Hay M P. Targeting hypoxia in cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6):393-410.
- [4] Dewhirst M W, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8:425-437.
- [5] Giaccia A J, Schipani E. Role of carcinoma-associated fibroblasts and hypoxia in tumor progression[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 345:31-45.
- [6] Peter C, Enzinger M D, Robert J, et al. Esophageal Cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349:2241-52.
- [7] 孔晓霞,李梦楠,朱雯婷,等.低氧对顺铂损伤 A549 细胞的影响[J].中国老年学杂志,2011,31(9):3552-3554.
- [8] 郭宇玲,徐丽瑶,李丽芳,等.低氧微环境下自噬对顺铂处理的肺腺癌 A549 细胞增殖活性的影响[J].江西医药,2013,48(8):676-678.
- [9] Lianhe Yang, Wei Li, Zhiyong Tian, et al. Mono-naphthalimide spermidine conjugate induces cell proliferation inhibition and apoptosis in HeLa cells[J]. Toxicology in Vitro, 2011, 25:882-889.
- [10] 龚 敏,李树清.体外培养细胞缺氧模型及特点[J].临床合理用药,2011,4(1):157-158.
- [11] Du R, Xia L, Ning X. Hypoxia-induced Bmi1 promotes renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition and renal fibrosis via PI3K/Akt signal[J]. Mol Biol Cell, 2014, 25(17):2650-9.
- [12] Wohlkoenig C, Leithner K, Deutsch A, et al. Hypoxia-induced cisplatin resistance is reversible and growth rate independent in lung

- cancer cells[J]. Cancer Lett, 2011, 308: 134-143.
- [13] Wozniak A J, Glisson B S, Hande K R, et al. Inhibition of etoposide-induced DNA damage and cytotoxicity in L1210 cells by dehydrogenase inhibitors and other agents[J]. Cancer Res, 1984, 44(2): 626-632.
- [14] Xia S, Yu S, Yuan X. Effects of hypoxia on expression of P-gp and multidrug resistance protein in human lung adenocarcinoma A549 cell line[J]. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2005, 25(3): 279-281.
- [15] McGahon A J, Martin S J, Bissonnette RP, et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro[J]. Methods Cell Biol, 1995, 46: 153-185.

Effects of Hypoxia on the Growth and Cisplatin Sensitivity in ECa9706 Cells

YANG Lianhe¹, ZHAO Xueyan¹, NIU Chunling¹, XIN kai², CHEN Yulong¹

(1. School of Basic Medicine, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Third Affiliated Hospital, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: This study focused on the effects on cell growth and cisplatin sensitivity in esophageal cancer ECa9706 cells under hypoxia. ECa9706 cells were cultured under normoxia or hypoxia (1% O₂) treated by cisplatin respectively, and then, the cell morphology were observed by inverted microscope, cells activation was tested by MTT assays, apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry respectively. Our research revealed that ECa9706 cells cultured in hypoxia were longer, bigger than that of cells in normoxia, and grew slowly since the cells were treated by cisplatin at 7 day under hypoxia. The IC₅₀ value for ECa9706 cells under normoxia or hypoxia treated with cisplatin for 48 h were (1.180 ± 0.056) μM and (2.675 ± 0.063) μM respectively. Cells cycle was arrested at G1 phase both the cells were cultured under normoxia and treated by cisplatin at 1.18 μM under normoxia for 48 h respectively. The cells cycle were arrested in S phase under hypoxia during a 48 h period. The rate of apoptosis induced by cisplatin under hypoxia were decreased than that of cells in normoxia. It is concluded that hypoxia affects the morphology, proliferation and cell cycle, and decreases the effect of cisplatin on cells cytoactivity in ECa9706 cells cultured in hypoxia.

Keywords: normoxia; hypoxia; ECa9706; cisplatin; drug-sensitivity