

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.11.003

文章编号: 1005-8982 (2020) 11-0011-05

热疗联合顺铂对喉癌 Hep-2 细胞的影响研究 *

赵运华, 陈宝刚, 郭有新, 李健, 马志红, 唐艳丽, 胡志红

(承德市中心医院 耳鼻喉科, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 探讨热疗联合顺铂对喉癌 Hep-2 细胞的影响, 了解热疗与顺铂的治疗方法是否有交互作用。**方法** 将传代的 Hep-2 细胞分为对照组、热疗组、顺铂组及热疗联合顺铂组。对照组置于 37℃ 培养箱, 热疗组置于 43℃ 培养箱, 顺铂组置于 37℃ 培养箱并加入顺铂, 热疗联合顺铂组置于 43℃ 培养箱并加入顺铂。采用 MTT 法、Wound-healing 划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测热疗联合顺铂对 Hep-2 细胞的增殖、迁移和侵袭力影响。**结果** 4 组细胞在波长 490 nm 处光密度 (OD) 值分别为 (1.24 ± 0.13) 、 (0.99 ± 0.11) 、 (0.75 ± 0.07) 及 (0.31 ± 0.07) , 析因分析显示, 不同温度热疗在波长 490 nm 处的 OD 值有差异 ($P < 0.05$), 不同浓度顺铂在波长 490 nm 处的 OD 值有差异 ($P < 0.05$), 热疗与顺铂对在波长 490 nm 处的 OD 值存在交互作用 ($P < 0.05$)。4 组细胞未愈合区百分比分别为 $(31.83 \pm 1.62)\%$ 、 $(40.47 \pm 1.52)\%$ 、 $(53.13 \pm 2.61)\%$ 及 $(79.83 \pm 0.95)\%$, 析因分析显示, 不同温度热疗对未愈合区百分比有差异 ($P < 0.05$), 不同浓度顺铂对未愈合区百分比有差异 ($P < 0.05$), 热疗与顺铂对未愈合区百分比的影响存在交互作用 ($P < 0.05$)。4 组细胞穿过 Transwell 小室膜的细胞数目分别为 (27.8 ± 1.64) 、 (21.8 ± 1.48) 、 (11.2 ± 1.48) 及 (1.8 ± 0.84) 个, 析因分析显示, 不同温度热疗的穿膜细胞数有差异 ($P < 0.05$), 不同浓度顺铂的穿膜细胞数有差异 ($P < 0.05$), 热疗与顺铂对穿膜细胞数的影响存在交互作用 ($P < 0.05$)。**结论** 热疗能够增强喉癌 Hep-2 细胞对顺铂的敏感性, 热疗与顺铂联合有协同抗肿瘤作用。

关键词: 喉癌; 热疗; 顺铂; 增殖; 侵袭力

中图分类号: R739.6

文献标识码: A

Research of hyperthermia enhancing the sensitivity of laryngeal carcinoma Hep-2 cells to cisplatin*

Yun-hua Zhao, Bao-gang Chen, You-xin Guo, Jian Li, Zhi-hong Ma, Yan-li Tang, Zhi-hong Hu
(Department of Otolaryngology, Chengde Central Hospital, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of proliferation and invasion on hyperthermia combined with cisplatin in human laryngeal carcinoma Hep-2 cells and whether the two treatments have an interaction. **Methods** The Hep-2 cells were randomly divided into 4 groups: control group (37℃), hyperthermia group (43℃), cisplatin group and hyperthermia combined with cisplatin group. The effects of hyperthermia combined with cisplatin on proliferation, migration and invasion of Hep-2 cells were determined by MTT assay, Wound-healing assay and transwell invasion assay. **Results** Four groups of cells were administrated with MTT. The OD value at 490 nm were (1.24 ± 0.13) , (0.99 ± 0.11) , (0.75 ± 0.07) and (0.31 ± 0.07) respectively. Factorial analysis showed that OD values at different temperatures were statistically significant ($P < 0.05$). OD values at different concentrations of cisplatin were statistically significant ($P < 0.05$). There was an interaction between hyperthermia and cisplatin on OD value at 490 nm ($P < 0.05$). The percentage of 'unhealed area' in the four groups were $(31.83 \pm 1.62)\%$, $(40.47 \pm 1.52)\%$, $(53.13 \pm 2.61)\%$ and $(79.83 \pm 0.95)\%$ respectively. Factorial analysis showed that the difference of the influence of different temperature of hyperthermia on the percentage of 'unhealed area' was statistically significant ($P < 0.05$). The influence

收稿日期: 2019-12-01

* 基金项目: 河北省承德市科学技术研究与发展计划项目 (No: 201801A006)

of different concentrations of cisplatin on the percentage of 'unhealed area' was statistically significant ($P < 0.05$). There was an interaction between the influence of hyperthermia and cisplatin on the percentage of 'unhealed area' ($P < 0.05$). The number of invasion cells in the four groups were (27.80 ± 1.64) , (21.80 ± 1.48) , (11.20 ± 1.48) and (1.80 ± 0.84) respectively. Factorial analysis showed that the influence of different temperature of hyperthermia on the number of invasion cells was statistically significant ($P < 0.05$). The influence of different concentrations of cisplatin on the number of invasion cells was statistically significant ($P < 0.05$). There was an interaction between the effects of hyperthermia and cisplatin on the number of invasion cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Hyperthermia can enhance the sensitivity of Hep-2 cells to cisplatin. Hyperthermia combined with cisplatin has synergistic anti-tumor effects.

Keywords: laryngeal neoplasms; malignant hyperthermia; cisplatin; proliferation; neoplasm invasiveness

喉癌是头颈部常见的恶性肿瘤,近年全球喉癌的发病率明显升高^[1-2]。喉癌主要采取以手术为主的综合治疗^[2],尽管目前的治疗手段有所改善,但是预后仍较差^[3-4]。目前欧美国家非手术保喉治疗已成为中晚期喉癌患者根治性治疗的一种方式,而非辅助性治疗^[5]。单纯的化疗是治疗中晚期喉癌的重要方法之一。顺铂作为喉癌化疗的一线用药,在肿瘤治疗中有着重要作用,但耐药的出现限制其应用,因此寻找能够增敏顺铂的治疗方法有重要临床意义。近年热疗与化疗联合抗癌成为研究热点。研究显示热疗联合化疗在卵巢癌、食管癌、胃癌等的治疗中已广泛开展并获得较好的临床效果^[6-8],且热疗相对安全、无毒。本研究拟在体外培养条件下观察热疗联合顺铂对喉癌 Hep-2 细胞增殖、迁移和侵袭力的影响,旨在为喉癌的治疗提供新思路、新方法,为热疗联合化疗治疗喉癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

喉癌 Hep-2 细胞由天津医科大学第二医院提供, RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco Invitrogen 公司,胎牛血清购自天津血液学研究所,胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司,顺铂购自山东齐鲁制药有限公司,MTT 购自武汉华美生物技术有限公司,Transwell 侵袭实验用细胞外基质胶 (ECM) 购自美国 Sigma 公司,孔径为 $8 \mu\text{m}$ 的 Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 喉癌 Hep-2 细胞的培养及其对顺铂的敏感性检测 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37°C 、5% 二氧化碳 CO_2 中常规培养、传代喉癌 Hep-2 细胞。收集处于对数生长期的细胞,实验分 6 组:①阴性对照组 (培养基不加顺铂);② 0.004 mg/L 组 (顺

铂浓度 0.004 mg/L);③ 0.040 mg/L 组 (顺铂浓度 0.040 mg/L);④ 0.400 mg/L 组 (顺铂浓度 0.400 mg/L);⑤ 4.000 mg/L 组 (顺铂浓度 4.000 mg/L);⑥ 40.000 mg/L 组 (顺铂浓度 40.000 mg/L)。以 2×10^5 个/ml 密度接种于 96 孔板,每孔加入 100 μl 细胞悬液,每组设 6 个复孔。 $5\% \text{CO}_2$ 、 37°C 、饱和湿度条件下孵育 24 h 后,阴性对照组继续培养 24 h;②~⑥组换为含对应浓度顺铂的培养基,继续培养 24 h。吸弃各孔内培养基,每孔加入不含血清的 RPMI 1640 培养基 100 μl ,MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 μl ,继续培养 4 h。小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μl 二甲基亚砜 (DMSO),低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪在波长 490 nm 处测量各孔的光密度 (optical density, OD) 值,计算顺铂对喉癌 Hep-2 细胞的 IC50。

1.2.2 MTT 法检测 Hep-2 细胞的增殖 收集处于对数生长期的细胞,分为 4 组:①对照组 (置于 37°C 培养箱);②热疗组 (置于 43°C 培养箱);③顺铂组 (置于 37°C 培养箱并加入顺铂,顺铂的浓度为 4.000 mg/L);④热疗联合顺铂组 (43°C 培养箱并加入顺铂,顺铂的浓度为 4.000 mg/L)。以 2×10^5 个/ml 密度接种于 96 孔板,每孔加入 100 μl 细胞悬液,每组设 6 个复孔。 37°C 、5% CO_2 饱和湿度条件下孵育 24 h 后,对照组于 37°C 继续培养 24 h;热疗组于 43°C 作用 2 h 后重新置于 37°C 继续培养 22 h;顺铂组于 37°C 并加入顺铂 (顺铂浓度为 4.000 mg/L) 继续培养 24 h;热疗联合顺铂组于 43°C 并加入顺铂 (顺铂浓度为 4.000 mg/L),2 h 后重新置于 37°C 继续培养 22 h。MTT 法同上。用酶标仪在波长 490 nm 处测量各孔的 OD 值。按照 2×2 析因实验设计,2 个因素分别为热疗和顺铂,热疗有 2 个水平,分别为 37 和 43°C ;顺铂有 2 个水平,分别为顺铂浓度 0.000 mg/L 和顺铂浓度 4.000 mg/L。

1.2.3 Wound-healing 划痕实验检测 Hep-2 细胞的迁移 Hep-2 细胞按上述分组接种到 6 孔板,每孔的培养体积为 3 ml,细胞数大约为 5×10^5 个/ml, 37°C 、5% CO_2 饱和湿度条件下孵育 12 h。用 200 μl 移液器在已经铺满的单层细胞上划痕,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次,洗掉漂浮的细胞。对照组、热疗组用 3 ml 无血清 RPMI 1640 培养基培养,顺铂组、热疗联合顺铂组用 3 ml 无血清含 4.000 mg/L 顺铂的 RPMI 1640 培养基培养,在 0 和 24 h 拍照,实验重复 3 次。

1.2.4 Transwell 侵袭实验检测 Hep-2 细胞的侵袭力 分组同 1.2.2,收集处于对数生长期的细胞,随机分为 4 组,以 2×10^5 个/ml 的密度接种于 30 mm^2 平皿, 37°C 、5% CO_2 饱和湿度条件下孵育 24 h 后,对照组于 37°C 继续培养 24 h;热疗组于 43°C 作用 2 h 后重新置于 37°C 继续培养 22 h;顺铂组于 37°C 并加入顺铂 (顺铂浓度为 4.000 mg/L) 继续培养 24 h;热疗联合顺铂组于 43°C 并加入顺铂 (浓度为 4.000 mg/L), 2 h 后重新置于 37°C 继续培养 22 h。采用 Transwell 侵袭实验法^[9],将人工细胞外基质胶 (ECM) 按 1 : 4 比例用无血清的培养基稀释后,每室 100 μl 均匀铺于小室膜上,将小室置于 24 孔板中,上室加入 70 μl 无血清培养基, 37°C 静置 30 min,使基质胶水化后吸去剩余培养液。将 4 组细胞消化并计数,调整密度至 2×10^5 个/ml,取细胞悬液 200 μl 加入上室。下室加入 600 μl 含 30% 血清的培养基。24 h 后取出小室, PBS 清洗 2 遍,棉签擦去 ECM 和上室内的细胞,甲醇固定 15 min,苏木精染色,显微镜下观察,随机选择 5 个视野计数,取每组的平均值为 Hep-2 细胞的穿膜细胞数。

1.3 统计学方法

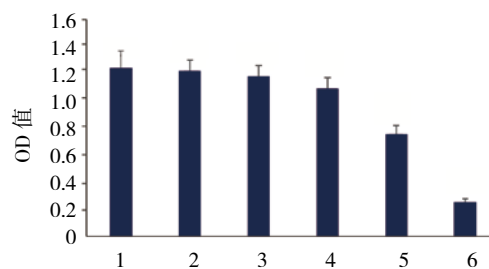
数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,比较用单因素方差分析或析因设计方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hep-2 细胞对顺铂的敏感性

6 组细胞进行 MTT 处理,测波长 490 nm 处 OD 值分别为 (1.24 ± 0.13)、(1.22 ± 0.08)、(1.18 ± 0.08)、(1.09 ± 0.08)、(0.75 ± 0.07) 及 (0.25 ± 0.03),经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 130.925$, $P = 0.000$); 40.000 mg/L 组 OD 值低于其他组 ($P < 0.05$); 4.000 mg/L 组 OD 值均低于 0.400 mg/L 组、0.040 mg/L 组、0.004 mg/L 组和

阴性对照组 ($P < 0.05$); 0.400 mg/L 组 OD 值低于 0.004 mg/L 组和阴性对照组 ($P < 0.05$),与 0.040 mg/L 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 0.040 mg/L 组、0.004 mg/L 组和阴性对照组 OD 值比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1)。顺铂对喉癌 Hep-2 细胞的 IC₅₀ 为 19.555 mg/L。



1: 阴性对照组; 2: 0.004 mg/L 组; 3: 0.040 mg/L 组; 4: 0.400 mg/L 组; 5: 4.000 mg/L 组; 6: 40.000 mg/L 组。

图 1 Hep-2 细胞对顺铂的敏感性 ($\bar{x} \pm s$)

2.2 热疗联合顺铂对 Hep-2 细胞增殖的影响

4 组细胞进行 MTT 处理,测波长 490 nm 处 OD 值分别为 (1.24 ± 0.13)、(0.99 ± 0.11)、(0.75 ± 0.07) 及 (0.31 ± 0.07),析因分析显示,不同温度热疗在波长 490 nm 处的 OD 值有差异 ($F = 73.665$, $P = 0.000$),不同浓度顺铂在波长 490 nm 处的 OD 值有差异 ($F = 213.005$, $P = 0.000$),热疗与顺铂对在波长 490 nm 处的 OD 值存在交互作用 ($F = 5.071$, $P = 0.036$)。见图 2 和表 1。

2.3 热疗联合顺铂对 Hep-2 细胞迁移的影响

4 组细胞未愈合区百分比分别为 (31.83 ± 1.62)%、(40.47 ± 1.52)%、(53.13 ± 2.61)% 及 (79.83 ± 0.95)%,析因分析显示,不同温度热疗的未愈合区百分比有差异 ($F = 296.934$, $P = 0.000$),不同浓度顺铂的未愈合区百分比有差异 ($F = 875.370$, $P = 0.000$),热疗与顺铂对未愈合区百分比的影响存在交互作用 ($F = 77.633$, $P = 0.000$)。见表 1 和图 3、4。

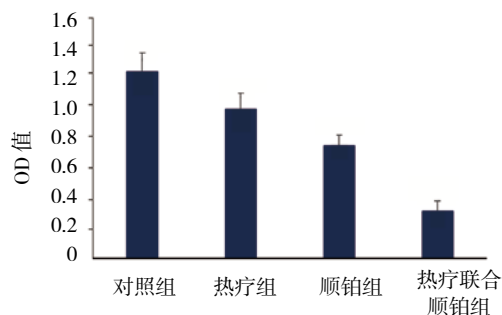


图 2 各组 Hep-2 细胞的 OD 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

表 1 各组 Hep-2 细胞的增殖、迁移和侵袭力 ($\bar{x} \pm s$)

组别	因素 A	因素 B	OD 值	未愈合区百分比 /%	穿膜细胞数 / 个
对照组	热疗 (37℃)	顺铂 (0 mg/L)	1.24 ± 0.13	31.83 ± 1.62	27.8 ± 1.64
热疗组	热疗 (43℃)	顺铂 (0 mg/L)	0.99 ± 0.11	40.47 ± 1.52	21.8 ± 1.48
顺铂组	热疗 (37℃)	顺铂 (4 mg/L)	0.75 ± 0.07	53.13 ± 2.61	11.2 ± 1.48
热疗联合顺铂组	热疗 (43℃)	顺铂 (4 mg/L)	0.31 ± 0.07	79.83 ± 0.95	1.8 ± 0.84

2.4 热疗联合顺铂对喉癌 Hep-2 细胞侵袭力的影响

4 组细胞穿过 Transwell 小室膜的细胞数目分别为 (27.8 ± 1.64)、(21.8 ± 1.48)、(11.2 ± 1.48) 及 (1.8 ± 0.84) 个, 析因分析显示, 不同温度热疗的穿膜细胞数

有差异 ($F=152.026, P=0.000$), 不同浓度顺铂的穿膜细胞数有差异 ($F=858.692, P=0.000$), 热疗与顺铂对穿膜细胞数的影响存在交互作用 ($F=7.410, P=0.015$)。见表 1 和图 5、6。

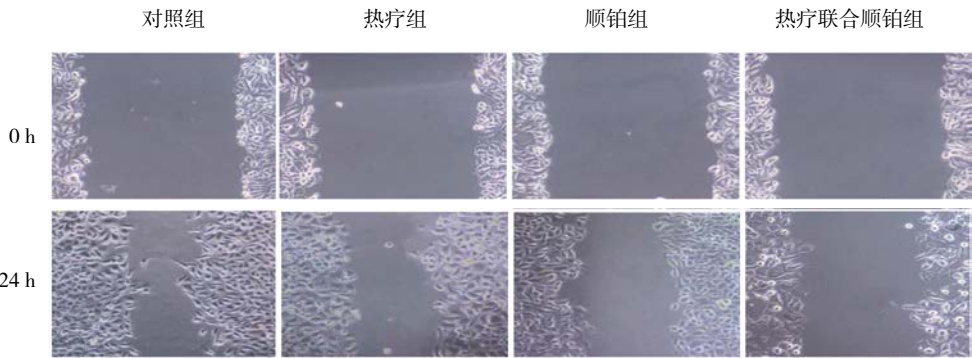


图 3 各组 Hep-2 细胞的迁移 ($\times 100$)

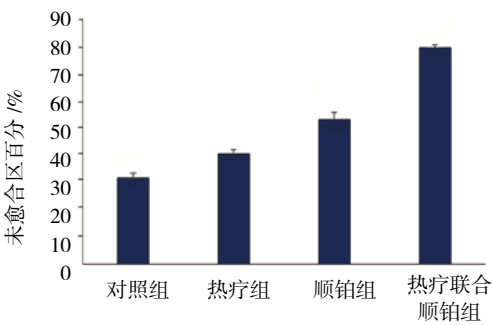


图 4 各组 Hep-2 细胞未愈合区百分比比较 ($\bar{x} \pm s$)

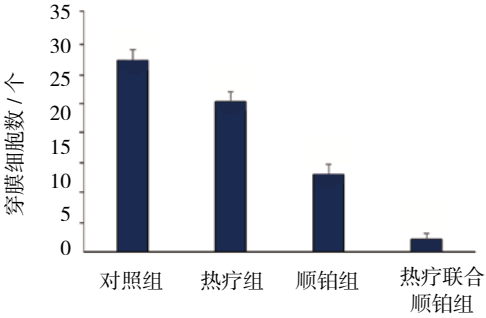


图 5 各组 Hep-2 细胞穿膜细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

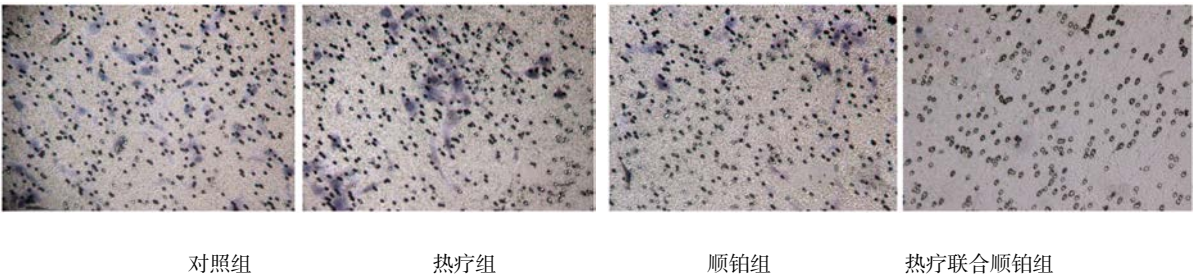


图 6 各组 Hep-2 细胞的侵袭力 (苏木精染色 $\times 200$)

3 讨论

我国喉癌发病率约为 26/10 万,占全身恶性肿瘤的 0.6%,病死率约为 15/10 万,占全身肿瘤的 0.5%^[10]。喉癌容易局部复发和/或远处转移,导致预后不良和治疗失败^[10]。顺铂是一种细胞周期非特异性细胞毒性药物,DNA 为其主要靶点,通过破坏肿瘤细胞 DNA 的正常结构,阻止 DNA 的复制,诱导肿瘤细胞的凋亡^[11]。早期对顺铂敏感的肿瘤在长期临床应用中逐渐产生耐药,限制其应用。而高温热疗是利用物理疗法,使组织加热,达到杀灭癌细胞的温度,以治疗恶性肿瘤。被认为是继手术、放疗、化疗、生物免疫疗法之后的第 5 种肿瘤治疗方法。临床应用无毒、安全,也称为绿色治疗^[12]。

本研究采用 MTT 比色法研究热疗联合顺铂对喉癌 Hep-2 细胞增殖的影响。MTT 可以被活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶还原成水不溶性的甲瓖结晶,并沉积在细胞中。结晶溶于 DMSO,经酶标仪检测后的 OD 值可间接反映活细胞数。本实验 4 组 Hep-2 细胞进行 MTT 处理,结果显示:热疗与顺铂均可以抑制 Hep-2 细胞增殖,热疗与顺铂联合对 Hep-2 细胞增殖的抑制有交互作用,表明热疗与顺铂联合有协同抗肿瘤作用。由此推测,热疗联合化疗的作用机制有可能是:①热疗通过杀伤处于 S 期肿瘤细胞的方式抑制肿瘤增殖。②热疗改变肿瘤细胞膜的结构,有利于化疗药物进入肿瘤细胞,进而增加肿瘤细胞内的药物浓度^[13],从而增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。

肿瘤细胞的侵袭是肿瘤发生转移的重要步骤,是恶性肿瘤最本质特征之一,抑制肿瘤的侵袭力可控制或降低肿瘤转移的发生。细胞外基质的降解是恶性肿瘤转移的关键步骤。本研究结果显示,热疗与顺铂均可以降低 Hep-2 细胞迁移和侵袭能力,热疗与顺铂联合对 Hep-2 细胞迁移及侵袭的抑制有交互作用,表明热疗与顺铂联合有协同抗肿瘤侵袭作用。有研究显示,热化疗可能通过抑制肿瘤细胞外基质降解,抑制肿瘤源性血管内皮细胞增生和细胞外基质重塑,从而抑制肿瘤细胞的扩散转移^[14]。笔者推测其机制可能为:热疗联合顺铂抑制肿瘤细胞,产生某些能够影响细胞外基质形成物质的能力,或者对具有降解细胞外基质功能的蛋白产生抑制作用,从而抑制肿瘤细胞的侵袭力。但具体的机制仍待进一步研究来证实。

综上所述,热疗与顺铂 2 种治疗方案联合应用有协同作用,热疗可以提高顺铂对 Hep-2 细胞的敏感性。热疗联合顺铂抑制喉癌 Hep-2 细胞的增殖,降低 Hep-2 细胞的迁移及侵袭力,从而为喉癌的临床治疗提供理论基础,但具体机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] JIN J, LIN F, LIAO S, et al. Effects of SNPs (CYP1B1*2 G355T, CYP1B1*3 C4326G, and CYP2E1*5 G-1293C), smoking, and drinking on susceptibility to laryngeal cancer among Han Chinese[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e106580.
- [2] 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志编辑委员会头颈外科组,李晓明. 喉癌外科手术及综合治疗专家共识[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2014, 49(8): 620-626.
- [3] 席盼盼,张淑香. 木黄酮对人喉癌细胞 Hep-2 诱导凋亡及抑制增殖的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015(7): 638-641.
- [4] 张卫平,王莹. 喉癌组织中 HIF-1 α 的表达及临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016(23): 1892-1895.
- [5] 颜芳,张欣欣,马林,等. 非手术综合治疗保留中晚期喉癌患者喉器官的效果分析[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2016, 51(5): 372-377.
- [6] 李征,米登海,杨克虎,等. 化疗联合热疗治疗食管癌的 Meta 分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(1): 7-9.
- [7] 黄相艳,李秀芳,孟泳圳. 深部热疗联合化疗治疗复发性卵巢癌的近期疗效观察[J]. 医学与哲学(B), 2017, 38(4): 34-36.
- [8] 朱利楠,樊青霞,宗红,等. 热疗联合化疗在晚期胃癌中的临床应用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2013, 35(4): 326-329.
- [9] 刘霞,余维,余丹,等. 腺病毒介导的 siRNA 沉默 PNUMS 基因对喉癌 Hep-2 细胞增殖、侵袭的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2018, 38(2): 161-166.
- [10] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. Ca Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [11] 于锋,黄鑫,艾毛毛,等. siRNA 干扰 β -catenin 基因表达后喉癌 Hep-2 细胞对顺铂化疗敏感性的研究[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2015(13): 1143-1147.
- [12] 标准·方案·指南——《中国肿瘤热疗临床应用指南(2017.V1.1)》(浅部热疗)[J]. 中国全科医学, 2018(7): 763.
- [13] 朱利楠,樊青霞,宗红,等. 热疗联合化疗在晚期胃癌中的临床应用[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2013, 35(4): 326-329.
- [14] GUO Y, MA J, WU L, et al. Hyperthermia-induced NDRG2 upregulation inhibits the invasion of human hepatocellular carcinoma via suppressing ERK1/2 signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61079.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 赵运华,陈宝刚,郭有新,等. 热疗联合顺铂对喉癌 Hep-2 细胞的影响研究[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(11): 11-15.