

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01113

• 短篇论著 •

不同 CO₂ 分压对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响

Effect of different CO₂ pressures on proliferation and apoptosis of MCF-7 cells

陈琪枫,王 强*,蔡清萍,阮灿平

第二军医大学长征医院普通外科,上海 200003

[摘要] 目的:观察不同 CO₂ 分压对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响,探讨临床腔镜技术的安全性。方法:体外建立人工气腔,MCF-7 细胞在 0、7、15 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)CO₂ 分压下暴露 1 h,处理后 0、24、48、72 h 测定细胞增殖率,FCM(流式细胞术)测定 MCF-7 细胞凋亡率和 Fas、Fas-L 表达。采用 0 mmHg 的 N₂(1 h)作为缺氧对照组;正常培养细胞作为正常对照组。结果:与正常对照组相比,0 mmHg CO₂ 可促进 MCF-7 细胞增殖($P<0.05$),7、15 mmHg CO₂ 抑制细胞增殖($P<0.05$);7、15 mmHg CO₂ 组细胞凋亡率明显增高($P<0.05$);15 mmHg CO₂ 组 MCF-7 细胞 Fas 表达明显增高($P<0.05$);7 mmHg CO₂ 组 Fas 表达在处理 0 h 时增高($P<0.05$);7、15 mmHg CO₂ 组在处理 24、48 h Fas-L 表达显著增高($P<0.05$)。结论:CO₂ 分压对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响较复杂,临床常用的 7~15 mmHg CO₂ 分压能增加肿瘤细胞 Fas/Fas-L 表达,抑制增殖,促进凋亡。

[关键词] 乳腺肿瘤;CO₂ 气腔;MCF-7 细胞株;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R 737.9 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2008)09-1113-03

随着腔镜在外科领域的广泛应用,其安全性问题也日益受到临床医生的重视,成为相关研究的热点。不少研究^[1-2]认为,气腹介质 CO₂ 的压力及作用时间与恶性肿瘤细胞生长、转移及增殖、凋亡相关。基于脂肪抽吸建立 CO₂ 腋窝气腔室的腹腔镜技术是近来国内外较为流行的术式,在其操作过程中需持续充入 CO₂ 气体,但其对乳腺癌细胞的影响并不清楚,缺乏相关安全性的研究。我们的前期研究^[3]发现,随着时间的延长,7 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)CO₂ 分压会促进乳腺癌 MCF-7 细胞黏附力增强,但短时间(1 h)内影响不大,因此有必要探讨合适的 CO₂ 分压,以进一步提高腹腔镜手术的安全性。因此,本研究观察不同 CO₂ 气腔分压对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7(中国科学院细胞生物所),常规培养于体积分数为 5%CO₂、37℃、95%湿度恒温孵箱。DMEM 培养基含 10%胎牛血清、0.01 mg/ml 胰岛素。每 2 d 更换 1 次培养液,每周传代 1~2 次。

1.2 实验分组及处理 CO₂ 气腔组:自制透明密封塑料箱,约 6 L 容积,带有 2 个通气孔。每次实验前用紫外线消毒 40 min。CO₂ 气腹机连接至通气孔,99.5%医用 CO₂ 持续充入,排尽空气后置入含 MCF-7 细胞的 6 孔培养板,细胞预先培养 24 h 使其贴壁生长。调整气腹机气压参数,维持压力在 0、7、

15 mmHg 下 37℃ 恒温箱培养 1 h。此后继续在 37℃ 细胞孵箱进行培养,分别在处理后 0、24、48、72 h 取细胞送检。缺氧对照组:0 mmHg N₂ 组(用 N₂ 代替 CO₂);正常对照组:细胞一直培养在 37℃ 恒温培养箱,不作任何处理。

1.3 MCF-7 细胞增殖率的测定 细胞接种于 96 孔培养板,密度约为 2×10⁴/ml,每组加样 3 个复孔及空白培养液孔,终容积为 100 μl。经 CO₂ 气腔处理后 0 h,向各组培养板加入 CCK-8,10 μl/孔,37℃ 细胞孵育箱 2 h,即用 Spectrafluor Plus 光度仪测定 450 nm 光密度值,以加 CCK-8 无细胞的培养液空白调零。24、48 和 72 h 时重复以上操作。实验重复测定 3 次,最后数据取均值并绘制各组光密度值分布图。

1.4 FCM 流式术测定细胞凋亡率 细胞经 0.25%胰蛋白酶-0.03%EDTA 消化成单细胞悬液,约 1×10⁵/管;PBS 液洗涤 2 次,加 5 μl FITC-Annexin V 和 5 μl 的 PI(碘化丙啶染液,50 μg/ml);混合均匀,室温避光 20 min;加 300 μl PBS 液后上流式细胞仪(BD,美国)测定细胞凋亡率。FITC-Annexin V 和 PI 液由第二军医大学长海医院流式室提供。同一条件下实验重复测定 3 次。

1.5 FCM 流式术测定细胞表面 Fas 和 Fas-L 蛋白表达 细胞经 0.25%胰蛋白酶-0.03% EDTA 消化成单细胞悬液;1 ml PBS 液洗涤 2 次,加 PE-Fas-L 和 FITC-Fas 单抗各 5 μl;混合均匀,室温避光 30 min;1 ml PBS 洗涤后加 300 μl PBS 液 FCM 测定;PE-Fas-L 和 FITC-Fas 购自 BioLegend 公司。每次实验均设立同型抗体阴性对照管。同一条件下实验重

[收稿日期] 2008-02-01 [接受日期] 2008-06-03
[基金项目] 第二军医大学长征医院“三重三优”学科人才建设基金。Supported by Key Superior Program of Changzheng Hospital.
[作者简介] 陈琪枫,博士,主治医师。E-mail:chenqifeng76@163.com
* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-63610109-73301, E-mail:wang2929@hotmail.com

复 3 次测定。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行重复测量方差分析和多元方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCF-7 细胞增殖率的测定结果 0 mmHg 组在处理 48、72 h 时光密度值显著大于正常对照组和其他各处理组 ($P<0.05$);7 和 15 mmHg 组在处理 24、48 和 72 h 时光密度值显著小于正常对照组 ($P<0.05$);正常对照组和缺氧对照组在各时间点差异均不显著(图 1)。

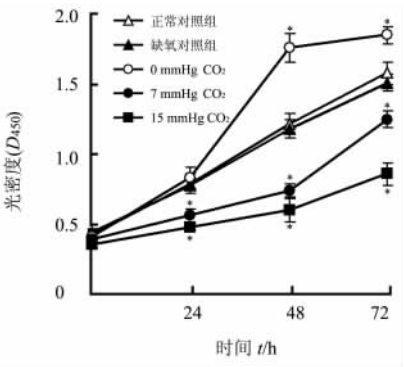


图 1 各组 MCF-7 细胞增殖率的比较
* $P<0.05$ 与正常对照组相比, $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 MCF-7 细胞凋亡率的测定结果 7 mmHg 组在处理 24、48 h 时凋亡率显著高于正常对照组 ($P<0.05$),15 mmHg 组在处理 24、48 和 72 h 时凋亡率均显著高于正常对照组 ($P<0.05$)。正常对照组、缺氧对照组、0 mmHg 组凋亡率无统计学差异(图 2)。

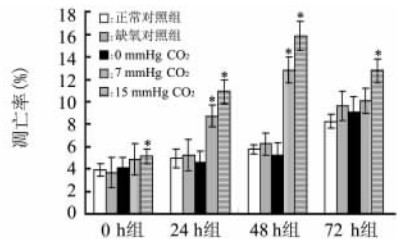


图 2 各组 MCF-7 细胞凋亡率的比较
* $P<0.05$ 与正常对照组相比, $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 MCF-7 细胞表面 Fas 和 Fas-L 蛋白表达结果 Fas 在 MCF-7 细胞表达较低;7 mmHg 组在处理 0 h 时表达高于正常对照组 ($P<0.05$);15 mmHg 组在处理 0、24 和 48 h 时表达均高于正常对照组 ($P<0.05$);而正常对照组、缺氧对照组及 0 mmHg 处理组之间无统计学差异(图 3A)。0、7、15 mmHg 组在处理 24、48 h 时 Fas-L 的表达均显著高于正常对照组 ($P<0.05$);各时间点下正常对照组和缺氧对照组无统计学差异(图 3B)。

3 讨论

细胞的一些生理功能,如生长、分泌细胞因子等都需要

合适的 pH 值以适应一系列酶的活性。Lagadic-Gossman 等^[4]研究认为 CO₂ 气体通过改变细胞内外 pH 值对细胞生长、增殖、凋亡产生影响。本研究结果发现,0 mmHg CO₂ 气体能促进肿瘤细胞的生长,但随着气腔压的增加,肿瘤细胞的生长反而受到了抑制。FCM 检测结果显示,7、15 mmHg CO₂ 处理后均使乳腺癌细胞凋亡增加。这可能是由于 0 mmHg CO₂ 使细胞培养液的 pH 值适合细胞生长,而随着压力的增加更低的 pH 反而抑制了细胞生长、促进了凋亡。Hiraga 等^[5]研究认为缺氧可导致包括乳腺癌在内的多种肿瘤细胞表达缺氧诱导因子(HIF-1),从而导致肿瘤生物学行为的改变;且在不同的环境和条件下其对肿瘤细胞的凋亡具有双向调节作用^[6]。考虑到 CO₂ 气腔会导致细胞内外缺氧,因此本实验设定了缺氧对照组。研究结果表明缺氧对照组和正常对照组的凋亡率无统计学差异,这可能与实验中缺氧时间较短有关。

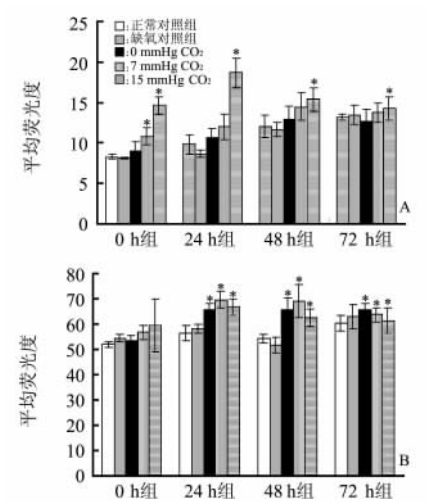


图 3 各组 MCF-7 细胞 Fas(A)、Fas-L(B)蛋白表达的比较
* $P<0.05$ 与正常对照组相比, $n=3, \bar{x} \pm s$

Fas/Fas-L 表达调控的紊乱在乳腺癌细胞凋亡和逃避机体免疫攻击中起着举足轻重的作用。国外研究^[7-8]发现乳腺癌 MCF-7 细胞 Fas 表达减少,IFN- γ 可上调 MCF-7 细胞 Fas 的表达,使其对淋巴细胞表达的 Fas-L 敏感,从而介导凋亡。临床上的一些放射、化学药物及细胞因子等治疗均主要通过诱导乳腺癌细胞表达 Fas,诱导凋亡而发挥作用^[9]。Longley 等^[10]应用 5-氟尿嘧啶和雷替曲塞处理 MCF-7 细胞后,Fas 的表达增高了 10 倍以上。而 Müllauer 等^[11]发现在多种乳腺癌中 Fas 的表达减弱,而 Fas-L 表达明显上调,认为 Fas-L 上调可引起肿瘤周围浸润的淋巴免疫细胞凋亡,可能导致肿瘤细胞的免疫豁免。本研究结果表明,MCF-7 细胞本身表达的 Fas 量和表达 Fas 的细胞数均较低,与正常对照组相比,CO₂ 气腔能使 MCF-7 细胞 Fas 的表达增高,与国外其他研究结果类似^[12];本研究中 7~15 mmHg 分压 CO₂ 气腔作用下,MCF-7 细胞 Fas-L 表达也相对增高,并呈现出与 Fas 表达相似的变化趋势,说明 CO₂ 气腔同时调节了 Fas 和 Fas-L 的表达。研究结果也表明,两者的表达与细胞培养时间亦有相关

性,随着时间的延长表达会有所下降。

综上所述,CO₂ 气腔对乳腺癌细胞的影响是多方面、复杂的;临床常用的 7~15 mmHg CO₂ 气腔压能增加乳腺癌细胞 Fas/Fas-L 的表达,抑制乳腺癌细胞增殖,促进其凋亡。但由于本实验在体外进行,与实际操作环境仍有较大差异,相关结论仍有待进一步的动物实验证实。

[参 考 文 献]

[1] Tan B J. Is carbon dioxide insufflation safe for laparoscopic surgery? A model to assess the effects of carbon dioxide on transitional-cell carcinoma growth, apoptosis, and necrosis[J]. J Endourol, 2006, 20: 965-969.

[2] 蒋宇林,冷金花,郎景和. 体外模拟二氧化碳气腹环境对卵巢癌细胞凋亡的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39: 634-635.

[3] 陈琪枫,王 强,蔡清萍,阮灿平,李 杨. 体外模拟 CO₂ 气腔对 MCF-7 细胞黏附分子 CD44v6 表达及黏附力的影响[J]. 外科理论与实践, 2007, 12: 376-378.

[4] Lagadic-Gossmann D, Huc L, Lecureur V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles[J]. Cell Death Differ, 2004, 11: 953-961.

[5] Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, Yoneda T. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67: 4157-4163.

[6] Garayoa M, Martínez A, Lee S, Pío R, An W G, Neckers L, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation; a possible promotion mechanism of carcinogen-

esis[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14: 848- 862.

[7] Reimer T, Herrnring C, Koczan D, Richter D, Gerber B, Kabelitz D, et al. FasL: Fas ratio—a prognostic factor in breast carcinomas[J]. Cancer Res, 2000, 60: 822-828.

[8] Wang H J, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Inhibition of insulin-like growth factor 1 receptor signaling enhanced silibinin-induced activation of death receptor and mitochondrial apoptotic pathways in human breast cancer MCF-7 cells[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 107: 260-269.

[9] Kuo P L, Hsu Y L, Sung S C, Ni W C, Lin T C, Lin C C. Induction of apoptosis in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by pterocarnin A from the bark of Pterocarya stenoptera *via* the Fas-mediated pathway [J]. Anticancer Drugs, 2007, 18: 555-562.

[10] Longley D B, Allen W L, McDermott U, Wilson T R, Latif T, Boyer J, et al. The roles of thymidylate synthase and p53 in regulating Fas-mediated apoptosis in response to antimetabolites[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 3562-3571.

[11] Müllauer L, Mosberger I, Grusch M, Rudas M, Chott A. Fas ligand is expressed in normal breast epithelial cells and is frequently up-regulated in breast cancer[J]. J Pathol, 2000, 190: 20-30.

[12] Danforth D N, Zhu Y. Conversion of Fas-resistant to Fas-sensitive MCF-7 breast cancer cells by the synergistic interaction of interferon-gamma and all-trans retinoic acid[J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 94: 81-91.

[本文编辑] 贾泽军