DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.034
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
1482 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)16-1482-02

氧自由基对体外胆管癌细胞增殖的作用

王立明[1],郑 灵[2],马宽生[3],何振平[3],李 昆[3] ([1]第三军医大学附属新桥医院普通外科,重庆 400037;[2]重庆北城和平医院,重庆 400020;[3]第三军医大学附属西南医院全军胆肝外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨氧自由基在胆管癌发生与发展中的作用。方法 通过细胞培养,采用紫外分光光度仪等测定体外培养胆管癌细胞QB内氧自由基中间产物丙二醛(Malonbialdehyde, MDA)含量,同时应用^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法观察氧自由基对QB增殖的影响。结果 高浓度氧自由基对胆管癌QB细胞增殖具有明显促进作用,抑制细胞内氧自由基水平可明显抑制QB细胞的增殖。结论 氧自由基水平能影响胆管癌细胞的增殖。

关键词:胆管癌;氧自由基;细胞增殖
中图法分类号:R329.28;R340.5;R735.8 文献标识码:A

Effect of oxygen free radical on the proliferation of cholangiocarcinoma cell *in vitro*

WANG Li-ming, ZHENG Ling, MA Kuan-sheng, HE Zheng-ping, LI Kun (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of oxygen free radical on the occurrence and development of cholangiocarcinoma. **Methods** The MDA content of oxygen free radical in cells of cultured cholangiocarcinoma QB was determined using ultraviolet visible light spectrometer after cell culture. The effects of oxygen free radical on proliferation of cholangiocarcinoma QB were observed by ^{3}H-TDR incorporation. **Results** High concentration of oxygen free radical had promoting effects on the proliferation of cholangiocarcinoma QB. **Conclusion** The results indicate that the level of oxygen free radical may influence the proliferation of cholangiocarcinoma cells.

Key words: cholangiocarcinoma; oxygen free radical; proliferation

利用体外培养的胆管癌细胞QB,检测不同浓度的氧自由基对QB细胞增殖的影响,试图为临床利用胆管癌细胞自身生物学特性来防治肿瘤提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 MDA试剂盒购自南京生物工程研究所;^{3}H-TDR购自北京原子能研究所;DMEM培养基及新生牛血清购自Serva公司;超氧化物歧化酶(Super oxide dismupase, SOD)及过氧化氢(H_2O_2)均为Sigma公司产品;注射用胰岛素、青霉素和链霉素为临床应用药品。

1.1.2 主要仪器 紫外分光光度仪(瑞典LKB公司);高速低温离心机(美国杜邦公司);倒置显微镜(重庆光学仪器厂XYJ-D型);超静工作台(苏州净化设备公司YT-875型);液体闪烁计数仪(瑞典LKB公司1217型);24孔细胞培养板(美国Costar公司产品)等。

作者简介:王立明(1965-),男,湖北省武汉市人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤发病机制方面的研究,发表论文18篇。电话:(023)68755114-74905

收稿日期:2002-06-20;修回日期:2002-09-30

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理 体外培养胆管癌细胞QB由西南医院肝胆医院建株。材料取自低分化肝门部胆管腺癌患者,男性,51岁。肝内转移灶。QB组织学上与源癌组织相似,具有较多的微绒毛、微管、微丝及细胞连接,细胞质和细胞膜存在角蛋白和桥粒蛋白等上皮来源特征,生长速度快,群体活力高,独立生存能力强,具有较强的致瘤性[1]。本实验所用为第25~30代细胞。将细胞悬液接种于盛有含10%小牛血清的DMEM培养基的培养瓶中,于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养,细胞贴壁生长良好。细胞每3 d传代1次,传代后接种于24孔细胞培养板,按实验要求时间加样0.1 ml/孔,待细胞生长汇合80%时,用0.25%胰蛋白酶消化后,立即检测或用DMEM培养液制成细胞悬液(10^6个/ml)置-4 ℃冰箱或液氮保存待用。

1.2.2 实验分组及治疗 NQB组:正常培养胆管癌QB细胞,未加其它治疗试剂,作为对照;SQB组:体外培养胆管癌QB细胞,传代当天按5 mmol/L的剂量加入SOD,3 d后取样检测;HQB组:体外培养胆管癌QB细胞,传代当天按5 mg/L的剂量加入H_2O_2,3 d后取样检测。

1.2.3 MDA含量测定 参照文献[2],按试剂盒说明书进行。

1.2.4 ^{3}H-TDR掺入实验 参照文献[3]进行。传代72 h对数生长期细胞,0.25%胰蛋白酶消化,用10%含小牛血清的培

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

养液制成细胞悬液, 接种于 24 孔板(5×10^4 细胞·(0.9 ml)$^{-1}$·孔$^{-1}$), 培养 24 h。当细胞贴壁生长后换为等量无血清培养液, 标记后各孔加入 0.1 ml 不同浓度的 SOD 和 H_2O_2, 对照组加入等量 DMEM。培养 70 h, 加^{3}H-TDR(7.4× 10 kBq/孔)再培养 2 h, 弃上清, 每孔加 0.25% 胰蛋白酶消化, 多头细胞抽滤器过滤于滤纸上, 干燥, 加入到放有闪烁液的计数管内过夜(12 h)激活, 放入液体闪烁计数仪内计数。

1.3　统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 Office 软件包中 EXCEL 程序对实验数据进行统计学处理, 采用 t 检验。

2　结果

由表 1 可以看出, 在体外培养的胆管癌细胞 QB 中, 存在着一定浓度的氧自由基, 加入 SOD 后其水平明显降低($P<0.05$), 而使用 H_2O_2 时氧自由基浓度明显增高($P<0.001$)。这种结果清楚地表明胆管癌细胞中存在着活跃的氧自由基, 其水平可受外源性氧自由基诱导剂和抑制剂的调节。

表 1　体外培养胆管癌细胞 QB MDA 含量($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Contents of MDA in cholangiocarcinoma cell QB *in vitro* ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	MDA(nmol/ml)
NQB	10	4.74±0.09
SQB	10	2.45±0.21 *
HQB	10	10.58±0.10 **

NQB: Control; SQB: Cholangiocarcinoma cells+ SOD; HQB: Cholangiocarcinoma cells+ H_2O_2; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* NQB

从表 2 可见, 加入 SOD 减少 QB 细胞内氧自由基的生成量后(SOD 组), 胆管癌细胞的增殖明显受到抑制($P<0.01$); 当使用 H_2O_2 刺激细胞内氧自由基的生成时(HQB 组), 可非常显著地促进胆管癌细胞的增殖($P<0.001$)。由此表明胆管癌 QB 细胞内氧自由基水平与肿瘤细胞的增殖关系密切。

表 2　氧自由基对胆管癌细胞 QB 增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of oxygen free radical on proliferation of cholangiocarcinoma QB($\bar{x}\pm s$)

Group	n	^{3}H-TdR(Bq/well)
NQB	10	108.52±8.89
SQB	10	41.32±4.59 **
HQB	10	325.18±6.41 ***

NQB: Control; SQB: Cholangiocarcinoma cells + SOD; HQB: Cholangiocarcinoma cells+ H_2O_2; **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ *vs* NQB

3　讨论

20 世纪 90 年代以后, 随着自由基生物化学和自由基生物学的发展, 氧自由基与恶性肿瘤的关系日益明朗[4]。氧自由基是细胞内正常生化途径如氧化还原与电子转移途径的中间产物, 在传统观念中, 其一直被认为是一种毒性物质, 与多种病理过程有关[5], 因受研究方法和手段的局限, 氧自自基在肿瘤发病学中的作用一直未被人们认识。最近有人[6]在原癌基因 *ras* 致癌的成纤维细胞中发现, 癌细胞中的氧自由基水平明显增高, 这些氧自由基是 *ras* 生长信号传导途径的重要环节, 可刺激细胞分裂、增殖。这一新发现除了进一步证实自由基是一种对组织造成损伤的有害毒素的传统理论外, 同时还揭示了氧自由基参与正常组织增殖及癌变过程。本研究结果提示, 胆管癌细胞内也存在较高浓度的氧自由基, 亦表明其与胆管癌发病学的关系密切。

本研究观察了氧自由基对体外培养胆管癌细胞 QB 增殖的影响, 发现氧自由基能明显刺激胆管癌细胞增殖, 外源性 SOD 可抑制胆管癌细胞增殖, 与过去报道超氧化物具有致癌潜力并能促进肿瘤增长相一致[7]。有关氧自由基刺激肿瘤细胞生长的机制早年已有报道[8]。人们认为氧自由基造成 DNA 氧化损伤是其主要原因, 这些 DNA 损伤很可能改变机体内原癌基因与抑癌基因的活性状况, 最终引发细胞失控增殖及癌症发生; 其次, 氧自由基尚可造成蛋白质损伤[9], 这类损伤往往是复杂且不可逆的, 常导致蛋白质不能折叠, 使氨基酸氧化、脱羧、脱氨与大规模的结构损伤, 这些损伤的蛋白质可在体内积聚起来并造成更大范围的损伤。

参考文献:

[1] 王曙光. 肝外胆管癌细胞系的建立[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(2): 67—68.

[2] 李家林. 紫外分光光度法测定血浆过氧化脂质[J]. 中国循环杂志, 1989, 4(1): 57—58.

[3] McCord J M. The evolution of free radicals and oxidative stress[J]. Am J Med, 2000, 108(8): 652—659.

[4] Wang G, Godinger D, Aronovitch J, *et al*. Opposing effects of nitroxide free radicals in *Escherichia coli* mutants deficient in DNA repair[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1305(1—2): 71—78.

[5] Durusoy M, Diril N, Bozcuk A N. Age-relativity of catalase in different genotypes of drosophila melanogaster[J]. Exp Gerontol, 1995, 30(1): 77—86.

[6] Irani K, Xia Y, Jay L, *et al*. Mitogenic signaling mediated by oxidants in ras-transformed fibroblasts[J]. Science, 1997, 275(2): 1649—1652.

[7] Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, *et al*. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice[J]. Endocrinology, 2003, 144(3): 1098—1107.

[8] Ionescu G, Merk M, Bradford R. Simple chemiluminescence assays for free radicals in venous blood and serum samples: results in atopic, psoriasis, MCS and cancer patients[J]. Forsch Komplementarmed, 1999, 6(6): 294—300.

[9] Ozawa T. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and disease[J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1271(1): 177—189.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net