

· 基础研究 ·

高压氧对鼻咽癌细胞 MMP-9 和 VEGF 表达的影响

彭争荣¹ 王素娥¹ 刘娟¹ 肖平田¹

摘要 目的:通过观察高压氧处理后人鼻咽癌细胞系 CNE2Z 细胞 MMP-9 和 VEGF 的表达,探讨高压氧对鼻咽癌细胞浸润与转移的影响及其机制。**方法:**将实验用人鼻咽癌 CNE2Z 细胞分为对照组(A组)、乏氧组(B组)、乏氧加高压氧组(C组)、单纯高压氧组(D组)四组。各组分别处理后,采用细胞免疫化学染色法检测各组鼻咽癌细胞 MMP-9、VEGF 的表达水平,并在显微镜下观察各组 MMP-9、VEGF 的表达情况。**结果:**鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MMP-9、VEGF 表达的平均光密度值 A 组与 B 组比较差异有显著性意义($P<0.05$);C 组与 B 组比较差异有显著性意义($P<0.05$);D 组平均光密度值比 B 组明显降低,但 D 组与 B 组比较差异无显著性意义($P>0.05$);A、C 和 D 三组之间比较差异无显著性意义($P>0.05$)。**结论:**高压氧处理可使乏氧条件下人鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MMP-9、VEGF 高表达减少,而对正常条件下鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MMP-9、VEGF 的表达无影响,从而提示高压氧处理可能是通过改善乏氧状态而抑制鼻咽癌细胞的浸润与转移。

关键词 鼻咽癌; CNE2Z 细胞株; 高压氧; 基质金属蛋白酶-9; 血管内皮生长因子

中图分类号: R493, R459.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-11-0998-04

Effects of hyperbaric oxygen on the MMP-9 and VEGF expressions of nasopharyngeal carcinoma cells/ PENG Zhengrong, WANG Sue, LIU Juan, et al. //Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(11): 998—1001

Abstract Objective: To investigate the effect and the possible influential mechanisms of hyperbaric oxygen (HBO) on the infiltration and metastasis in human nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE2Z by observing MMP-9 and VEGF expressions of nasopharyngeal carcinoma cells after HBO treatment. **Method:** Nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells CNE2Z were divided into 4 groups randomly: Group A : control group; Group B: oxygen deficiency; Group C: oxygen deficiency plus hyperbaric oxygen; Group D: hyperbaric oxygen. The MMP-9 and VEGF expressions in CNE2Z cells of all groups were detected by SP immunocytochemical staining and the expressed images were observed under microscope. **Result:** Average optical density(OD) of MMP-9 and VEGF expressions were statistically significant different between group A and group B ($P<0.05$), and between group C and group B also. Average optical of group D were down-regulated compared with group B, but there was no statistically significant difference ($P>0.05$). No significant difference was found between group A, group C and group D on the average OD ($P>0.05$). **Conclusion:** HBO treatment could decrease the MMP-9 and VEGF high-expressions in human NPC cell line CNE2Z in anaerobic condition, and it did not affect the MMP-9 and VEGF expressions in CNE2Z cells in normal condition. It showed that HBO treatment could inhibit the infiltration and metastasis of NPC cells by improving the oxygen deficiency condition.

Author's address Dept. of Hyperbaric Oxygen, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410008

Key words nasopharyngeal carcinoma; CNE2Z cell line; hyperbaric oxygen; matrix metallo-proteinase 9; vascular endothelial growth factor

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种特殊的肿瘤,早期即发生侵袭及转移,其预后与癌细胞的增殖、转移潜能密切相关。近年来的研究表明,基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的过度表达与许多人类恶性肿瘤的侵袭及转移密切相关^[1-2]。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗已经广泛地应用于临床,对某些恶性肿瘤的放化疗增敏及其相关症状

与疾病的治疗^[3],如放射性脑病、放射性膀胱炎、放化疗后综合征等均取得了较好的疗效^[4]。但高压氧治疗与恶性肿瘤浸润、转移的研究较少。本实验通过观察高压氧处理后人鼻咽癌细胞系 CNE2Z 细胞 MMP-9、VEGF 的表达水平,以初步探讨高压氧处理对鼻咽癌细胞浸润与转移的影响及其机制。

1 中南大学湘雅医院高压氧科,长沙,410008

作者简介:彭争荣,男,主治医师

收稿日期:2007-03-05

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂与仪器: 人鼻咽癌细胞系 CNE2Z (湘雅医学院肿瘤研究所)、兔抗人基质金属蛋白酶-9 多克隆抗体 (Rabbit Anti-Human MMP-9) (ZSGB-BIO ZA-0336)、兔抗人血管内皮生长因子单克隆抗体 (Rabbit anti-VEGF) (ZSGB-BIO ZA-0509)、SP-9000 免疫组化染色试剂盒 (ZSGB-BIO)、ZLI-9031 浓缩型 DAB 显色试剂盒 (ZSGB-BIO)、0.25% 胰酶 (Sigma 公司)、CO₂ 培养箱 (Herqeous 公司)、超净工作台 (上海明星电子设备厂)、倒置显微镜 (上海光学仪器厂)、乏氧培养箱 (浙江冷冻机总厂)、LB2 型光学显微镜 (Leica 公司)、麦克奥迪图像采集与分析系统 (Motic 公司)、YLCO/1A 型婴儿氧舱 (武汉 701 所)。

1.1.2 主要试剂配置: ①RMPZ-1640 培养基: 将一包 RMPZ-1640 干粉 (Gibco, Co.) 溶于三蒸水中, 加适量 NaHCO₃ 调 pH 至 7.2, 定容 1L, 正压过滤除菌后分装, 置于 -20℃ 保存。用于 CNE2Z 细胞培养时, 加入小牛血清至浓度为 15%。②PBS 溶液: NaCl 8g, KCl 0.2g, NaHPO₄·12H₂O 1.54g, KH₂PO₄ 0.2g, 溶解后调 pH 至 7.0, 定容 1L, 分装后高压灭菌, 4℃ 保存。③底物混合液: 在 1.5ml 双蒸水 (pH 约 7.0) 中, 加入一滴 (约 50μl) 浓缩缓冲液, 混合均匀, 然后将浓缩 DAB 溶液和浓缩过氧化氢溶液各一滴加入其中, 再次混匀。避光保存, 30min 内使用。④甲醛-丙酮固定液: 甲醛与丙酮以 1:1 混合。⑤乏氧气体: 94%N₂, 1%O₂, 5%CO₂。

1.2 实验方法

1.2.1 鼻咽癌细胞培养: 采用 CNE2Z 人鼻咽癌细胞株, 加入 15% 小牛血清、RMPZ-1640 培养基, 37℃, 5%CO₂ 培养箱培养, 待细胞贴壁生长进入生长指数期后, 0.25% 胰酶消化, 更换培养液, 准备实验用。

1.2.2 实验分组: 将实验用 CNE2Z 人鼻咽癌细胞分为 4 组, ①对照组 (A 组): 在培养箱中培养 16h; ②乏氧组 (B 组): 在乏氧箱中培养 16h; ③乏氧加高压氧组 (C 组): 乏氧箱中培养 16h 后再进行高压氧 (2.0ATA, 80min, Bid×1d) 处理; ④单纯高压氧组 (D 组): 单纯进行高压氧 (2.0ATA, 80min, Bid×1d) 处理。

1.2.3 乏氧处理: 将 B 组和 C 组 CNE2Z 癌细胞置于乏氧培养箱中, 抽空培养箱中原有空气后充满乏氧气体 (94%N₂, 1%O₂, 5%CO₂), 然后保持乏氧气体浓度基本不变, 共 16h。

1.2.4 高压氧处理: 将 C 组乏氧处理后和 D 组 CNE2Z 人鼻咽癌细胞置于 YLCO/1A 型婴儿氧舱

内, 先以 10L/min 的氧流量进行门缝洗舱 5min, 提高舱内氧浓度至 55% 以上, 然后以 5—8L/min 氧流量均匀变速加压, 加压时间为 15min, 使舱内压力达到 0.10MPa 时开始稳压, 稳压时氧浓度达到 85% 以上, 稳压时同时打开加、减压阀, 以 3—5L/min 的氧流量持续小流量洗舱, 稳压吸氧 40min 后, 均匀变速减压, 减压时间为 20min, 总治疗时间为 80min^[5], 共 2 次 (2 次治疗的间隔时间 >4h)。

1.2.5 乏氧加高压氧处理: 将乏氧 (乏氧条件同前) 16h 后的 C 组 CNE2Z 癌细胞再立即置于 YLCO/1A 型婴儿氧舱内进行高压氧处理 (处理方法同前)。

1.2.6 免疫细胞化学染色: 取各组处理后 CNE2Z 细胞接种于内置盖玻片的 6 孔培养板中, 贴壁后冷 PBS 洗 3×5min, 预冷甲醛-丙酮固定液固定 10min, 3%H₂O₂ 去离子水孵育 10min, 冷 PBS 洗 3×5min, 滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育 15min, 倾去多余血清, 再滴加兔抗人一抗工作液, 4℃ 冰箱孵育过夜。然后滴加生物素化二抗工作液, 37℃ 孵育 15min, 再滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37℃ 孵育 15min, DAB 显色 10—15min (在显微镜下控制显色时间), 自来水充分冲洗后苏木素轻度复染, 自来水返蓝 15min, 逐级脱水, 晾干后甘油封片。

1.2.7 结果观察和判定: 光学显微镜下观察, 对图像进行拍摄, 可见 VEGF 阳性着色为棕黄色或棕褐色细颗粒, 主要表达定位于细胞膜和细胞质, MMP-9 阳性着色亦为棕黄色或棕褐色细颗粒, 主要表达定位于细胞浆和细胞膜。并按信号强弱程度分为 4 个等级: 着蛋黄色为弱阳性; 棕黄色为阳性; 棕褐色为强阳性; 无色为阴性。每组选用上、中、下、左、右、中 5 个区域, 计数 500 个细胞, 再通过麦克奥迪图像采集与分析系统获得每组平均光密度值, 然后进行比较判定。

1.3 统计学分析

所有数据均采用统计软件 SPSS11.0 及 Excel 7.0 分析统计软件处理。计量资料用均数±标准差表示, 两组间比较采用成组设计均数 *t* 检验, 多组间比较采用完全随机设计资料的方差分析。

2 结果

2.1 各组鼻咽癌细胞 MMP-9 和 VEGF 的阳性表达

见图 1—8 (见后置彩色插页 2)。各组 MMP-9 和 VEGF 在鼻咽癌细胞中阳性着色均较深, 表达率较高。A、C、D 组 MMP-9 和 VEGF 在鼻咽癌 CNE2Z 细胞中多为弱阳性或阳性表达, 呈蛋黄色或棕黄色颗粒分布于癌细胞胞浆和胞膜; B 组 MMP-9 和 VEGF

在鼻咽癌 CNE2Z 细胞中多为阳性或强阳性表达, 呈棕黄色或棕褐色颗粒分布于癌细胞胞膜和胞质中。

2.2 各组鼻咽癌细胞 MMP-9 和 VEGF 表达的平均光密度值比较

见表 1。MMP-9、VEGF 平均光密度值 A 组与 B 组比较差异有显著性意义 ($t=-2.496$; $t=-2.921$ $P<0.05$); B 组与 C 组比较差异有显著性意义 ($t=3.849$; $t=3.049$ $P<0.05$); D 组平均光密度值比 B 组明显降低, 但 D 组与 B 组比较差异无显著性意义 ($t=0.904$; $t=2.416$ $P>0.05$); A、C 和 D 三组之间比较差异无显著性意义 ($F=1.546$; $P>0.05$)。

表 1 各组鼻咽癌细胞 MMP-9 和 VEGF 表达的平均光密度值表 ($\bar{x}\pm s$)

	A 组 (对照组)	B 组 (乏氧组)	C 组 (乏氧加高压氧组)	D 组 (高压氧组)
MMP-9	0.19±0.029 ^①	0.23±0.035 ^②	0.16±0.032 ^⑤	0.19±0.038 ^④
VEGF	0.17±0.031 ^①	0.28±0.078 ^③	0.17±0.026 ^⑤	0.18±0.035 ^④

①与 B 组比较 $P<0.05$; ②与 C 组比较 $P<0.01$; ③与 C 组比较 $P<0.05$; ④与 B 组比较 $P>0.05$; ⑤A、C、D 三组比较 $P>0.05$

3 讨论

鼻咽癌为我国南方常见的头颈部肿瘤之一, 分化程度低, 恶性度较高, 具有较强的局部侵袭力及淋巴结转移力。放射治疗是首选的治疗方法, 转移是鼻咽癌治疗失败的主要原因之一, 鼻咽癌晚期(N2、N3)患者远处转移率高达 20%—40%。近几年来, 在鼻咽癌的研究中, 有大量实验研究报道 MMP-9、VEGF 与鼻咽癌的颈淋巴结转移及浸润密切正相关。Horikawa 等^[6]报道用免疫组化法检测鼻咽癌病理组织标本中的 MMP-9 蛋白显示, MMP-9 蛋白的水平虽然与 T 分期无关, 但与淋巴结转移明显相关, 淋巴结转移组 MMP-9 的平均评分为 41.5, 无淋巴结转移组为 6.0。王军等^[7]也报道 MMP-9 蛋白在鼻咽癌淋巴结转移组的阳性率(79.5%), 明显高于无淋巴结转移组(60.5%), 并且证实 MMP-9 在鼻咽癌组织中的高表达与临床分期、病理分期有关。Wakisaka 等^[8]报道运用免疫组化方法可以检测到鼻咽癌淋巴结转移组患者鼻咽组织中 VEGF 水平明显高于无淋巴结转移组, 并且 VEGF 水平与肿瘤组织的微血管密度呈正相关。从本实验 A 组光镜观察结果也证实 MMP-9 和 VEGF 在鼻咽癌细胞胞膜和胞浆中阳性表达率较高, 着色均较深。

低氧是肿瘤组织中的普遍存在的现象, 多种不同组织类型的实体瘤组织有严重的组织低氧, 甚至无氧。低氧可能是肿瘤微环境中促进肿瘤转移的一个重要因素, 其机制可能和肿瘤细胞基因不稳定性、肿瘤细胞侵袭能力增加、肿瘤血管生成能力增加和

选择性细胞凋亡能力降低有关^[9]。研究表明, 鼻咽癌原发瘤及颈部淋巴结转移瘤微环境中都有低氧的表现, 并且可能和肿瘤的分化以及肿瘤的体积增加有关^[10]。本实验中 B 组乏氧条件下鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MMP-9、VEGF 表达的平均光密度值均较 A 组明显增高, 说明了鼻咽癌 CNE2Z 细胞中 MMP-9、VEGF 在乏氧条件下表达较对照组明显增加, 表明缺氧可引起鼻咽癌组织的血管生成; 可造成细胞外基质的破坏, 从而促进鼻咽癌细胞的浸润与转移。

HBO 治疗已经广泛地应用于临床, 对某些恶性肿瘤的放化疗增敏及其相关症状与疾病的治疗^[3], 如放射性脑病、放射性膀胱炎、放化疗后综合征等均取得了较好的疗效^[4]。本实验旨在通过观察高压氧处理后人鼻咽癌细胞株 CNE2Z 细胞 MMP-9、VEGF 的表达, 以初步探讨高压氧处理对鼻咽癌细胞浸润与转移的影响及其影响机制。从实验中可知, C 组 MMP-9、VEGF 表达的平均光密度值比 B 组明显降低, 与对照组比较无明显差异, 表明高压氧处理能明显降低缺氧条件导致的鼻咽癌细胞高表达 MMP-9、VEGF, 说明了高压氧在一定程度上可抑制缺氧条件下鼻咽癌细胞的浸润与转移。但本实验中 D 组与 A 组 MMP-9、VEGF 表达的平均光密度值基本一致, A、C、D 三组比较差异无显著性意义。表明了单纯高压氧处理并不影响鼻咽癌 CNE2Z 细胞 MMP-9、VEGF 的表达, 说明了单纯高压氧处理对正常条件下的鼻咽癌细胞的转移与浸润不产生影响。结合上述情况, 在一定范围内暗示了临床高压氧治疗是安全的, 是不会增加恶性肿瘤的转移与浸润, 相反高压氧还能抑制缺氧条件下鼻咽癌细胞的浸润与转移。

参考文献

- [1] Maeta H, Ohgi S, Terada T, et al. Protein expression of matrix metalloproteinase 2 and 9 and tissue carcinomas [J]. Virchows Arch, 2001, 438: 121—128.
- [2] Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma [J]. Cancer, 2001, 61(18): 6952—6957.
- [3] Stühr LE, Iversen VV, Straume O, et al. Hyperbaric oxygen alone or combined with 5-FU attenuates growth of DMBA-induced rat mammary tumors [J]. Cancer Lett, 2004, 210(1): 35—40.
- [4] Narozny W, Sicko Z, Przewozny T, et al. Hyperbaric oxygen therapy as a method of treatment of laryngeal and pharyngeal radionecrosis [J]. Otolaryngol Pol, 2001, 55(1): 57—60.
- [5] 吴钟琪. 高压氧临床医学 [M]. 长沙: 中南大学出版社, 2003. 86—88.
- [6] Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen TS, et al. Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Cancer, 2000, 89(4): 715—723.
- [7] 王军, 崔德威, 姚俊, 等. MMP-9 及 TIMP-1 在鼻咽癌组织中的表达及意义 [J]. 肿瘤学杂志, 2003, 9(6): 337—339.
- [8] Wakisaka N, Wen QH, Yoshizaki T, et al. Association of vas-

cular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma [J]. Laryngoscope, 1999, 109(5): 810—814.

- [9] Rofstad EK. Microenvironment-induced cancer metastasis [J]. Int J Radiat Biol, 2000, 76(5): 589—605.

- [10] Yeh SH, Liu RS, Wu LC, et al. Fluorine-18 fluoromisonidazole tumour to muscle retention ratio for the detection of hypoxia in nasopharyngeal carcinoma [J]. Eur J Nucl Med, 1996, 23(10): 1378—1383.

·短篇论著·

超声波头穴刺激结合药物治疗痴呆的疗效观察

马兴常¹ 冯玉辉¹ 王泽静¹

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2001 年 3 月—2007 年 2 月住院的阿尔茨海默(Alzheimer)病和脑血管性痴呆患者 180 例,诊断标准为修订的长谷川智能量表 (1994 年长谷川和夫修订)(Hastgawa dementia scale, HDS-R)^[1],变性病与非变性病痴呆患者均包括在内。采用随机双盲法分为对照组和治疗组,两组患者均签署《知情同意书》,一般资料比较差异无显著性(见表 1)。

表 1 两组患者一般资料比较

组别	例数	性别		年龄(岁)
		男	女	
对照组	100	46	54	60.44±3.34
治疗组	80	45	35	61.14±3.46

1.2 治疗方法

对照组采用药物治疗,丹参 800mg 加入 5%葡萄糖 250ml 静点,胞二磷胆碱 750mg 加入 0.9%盐水 250ml 静点 14 天 1 个疗程。

治疗组在药物治疗的基础上采用 STV-600 型超声血管治疗仪(北京)进行头穴刺激。所用超声波波形为 1:2 脉冲波,频率为 800kHz,声头大小为 0.5—1cm,输出强度 0.3—1.25W/cm²,依据脉冲式超声治疗等级^[2]。选取头维、百会、风池、神阙、脑空、脑户、上星、人中穴,每组 4 个穴位,根据患者情况调整治疗强度,调换声头,一般皮肤、皮下与骨膜的痛感是超声临界强度的信号,在有疼痛出现时即减小剂量^[3],每组穴位刺激 20min/次,1 次/d,14 次 1 疗程,进行 1 个疗程治疗。

1.3 疗效评定

两组患者在治疗前和治疗结束后 1 周分别采用修订的长谷川智能量表(HDS-R)和痴呆日常生活活动量表(ADL)进行评分^[4]。痴呆日常生活活动量表 1969 年由 Lawton 和 Brody 制订,常用于评估日常功能状态,现广泛用于痴呆患者生活自理能力缺陷的评估。此量表包括评定躯体生活自理能力和评定工具性日常生活自理能力两方面内容。评分分 4 级:1 级:可由自己完成,无困难;2 级:完成有困难;3 级:需要帮助;4 级:能力丧失,根本无法完成。

1.4 统计学分析

应用 SPSS10.0 软件进行统计分析,计量资料间比较采用方差分析及 *t* 检验。

2 结果与讨论

结果见表 2。

表 2 两组患者治疗前后 HDS-R 和 ADL 评分比较

组别	例数	HDS-R			ADL		
		治疗前	治疗后	<i>P</i>	治疗前	治疗后	<i>P</i>
治疗组	80	7.31±3.52	10.66±3.45	<0.01	52.31±7.69	42.36±8.45	<0.01
对照组	100	7.18±3.38	8.46±3.89	<0.05	51.28±8.55	48.23±8.35	<0.05
<i>P</i>		>0.05	<0.01		>0.05	<0.01	

近年来,痴呆治疗研究开展广泛,应用针灸方法治疗老年性痴呆取得了一定疗效^[5]。本研究在药物治疗基础上加用超声波头部穴位刺激治疗,加强神经系统传递。人中穴:醒脑、开窍主穴,是醒神急救之要穴,现代生理研究证明刺激本穴能直接兴奋上行激活系统,解除脑细胞的抑制状态,并可特异性增加颈总动脉血流,纠正血流动力学紊乱,改善脑循环,提高认知能力。风池、脑空、脑户、头维、上星穴可以改善脑供血情况,提高记忆力。神阙为补益强壮穴。超声波的机械振动可以刺激脑的穴位,对脑组织细胞产生细微的按摩作用,此作用可改善脑细胞膜的通透性,有利于细胞膜内外物质交换,提高神经物质的传递,提高细胞膜的生物功能,从而促进脑神经细胞功能的恢复。超声波的机械振动和温热作用刺激穴位,有利于脑血管侧支循环的形成。超声波对血脂的代谢也颇具调节作用^[6],能降低胆固醇和甘油三酯,而血浆高密度脂蛋白的代谢也与阿尔茨海默病的关系非常密切^[7]。本研究表明,治疗组的 ADL 评分较对照组下降较大,治疗组的 HDS-R 评分较对照组提高较大,差异有显著性。

参考文献

- [1] 陈俊抛,林煜,徐斌,等.痴呆治疗学[M].第 1 版.北京:人民军医出版社,2002.72—77.
- [2] 周永昌,郭万学,王牧,等.超声医学[M].第 4 版.北京:科学技术出版社,1988.1726—1729.
- [3] 程海英,程东旗.针灸治疗老年性痴呆相关评价指标的研究进展[J].中国针灸,2006,26(8): 605.
- [4] 周万松,郭锐主编.超声治疗心脑血管疾病基础研究与临床实践[M].第 1 版.北京:科学技术出版社,2003. 8,116—119.
- [5] 陈大伟,陈彪,杨静芳,等.胆固醇酯蛋白转运蛋白基因多态性与阿尔茨海默病的关系[J].中华神经科杂志,2006,39(12): 814.
- [6] 陈俊抛,林煜,徐斌,等.痴呆治疗学[M].第 1 版.北京:人民军医出版社,2002. 75—77.

1 河北省唐山市丰润区第二人民医院神经内科,唐山市丰润区,063030

作者简介:马兴常,男,主治医师

收稿日期:2007-07-10