

低温等离子体对骨肉瘤细胞 MG63 的作用及机制研究

王园, 胡勇, 徐生林, 阙玉康

摘要 目的 探讨低温等离子体对人骨肉瘤细胞株 MG63 的杀伤作用及其可能作用机制。方法 采用 MTT 法和克隆形成实验测定低温等离子体对人骨肉瘤细胞株 MG63 的增殖抑制作用, 显微镜下观察低温等离子体对 MG63 细胞形态的影响, 流式细胞术检测细胞凋亡, Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达变化。结果 显微镜观察结果显示低温等离子体可以诱导骨肉瘤 MG63 细胞发生皱缩, 在 MTT 和克隆形成实验中都显示出低温等离子体对骨肉瘤细胞 MG63 具有明显的增殖抑制效果并且呈剂量依赖性, 流式细胞分析显示低温等离子体是通过诱导细胞凋亡而引起细胞增殖抑制。Western blot 法显示低温等离子体可以诱导凋亡蛋白的表达, 并且呈剂量依赖性。结论 低温等离子体对 MG63 细胞株具有显著的杀伤作用, 可能与诱导细胞凋亡有关。

关键词 低温等离子体; 骨肉瘤; 细胞凋亡; 克隆形成实验
中图分类号 R 738.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)04-0562-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.04.015

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤之一, 最常发生在儿童和青少年长骨的干骺端, 大约 10% ~ 20% 的患者在初次就诊时就已经发生转移^[1-2]。骨肉瘤具有高度侵袭性并可以导致进行性骨质破坏, 目前, 骨肉瘤患者的主要临床治疗方法仍以手术为主, 辅以化疗或放疗^[2]。尽管骨肉瘤患者的治疗措施在过去几十年中有所改善, 但 5 年总体生存率仍然很低(约 60%)^[3], 因此, 迫切需要新的治疗方法来减少复发率, 提高患者生存率。低温等离子体是固体、液体和气体之后的第四种基本物质状态。等离子体是通过聚焦放电产生的部分电离气体^[4]。人们尝试着使用等离子体来取代或者联合传统的医疗手段来达到更好的治疗效果, 这样不仅可以避免手术或药物对人体造成的副作用, 而且更加快速高效, 不会对人体产生明显伤害。该研究在形态、增殖和凋亡等方面探讨低温等离子体对骨肉瘤细胞的作用及可能作用机制, 为等离子体医学在骨肉瘤治疗上的应用提供理论依据。

2019-12-03 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(编号: 1708085MH215); 安徽医科大学校基金(编号: 2015xkj088)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院骨病骨肿瘤外科, 合肥 230022

作者简介: 王园, 男, 硕士研究生;

胡勇, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hy_in163@163.com

I/R in the IPC group. In the MPC group, morphine was injected before I/R. The numbers of ventricular arrhythmias [premature ventricular contraction (PVCs) and ventricular tachycardia/ventricular fibrillation (VT/VF)] were recorded within 30 min of reinfusion by electrocardiogram monitoring. Cardiac specimens were stained with TTC. Left ventricle (LV), right ventricle (RV), infarct area (IS), ischemic risk area (AAR) volume were measured, and the IS/AAR ratio was calculated. Western blot assay was used for RVLM nucleus c-fos protein expression detection. ELISA assay and immunohistochemical staining assay were used for quantitative and qualitative detection the levels of β -EP expression in T2-5 spinal cord and left ventricular muscle, respectively. **Results** Compared with the Sham group, the IS volume, IS/AAR, the numbers of PVCs, VT/VF, and expression of c-Fos in RVLM and β -EP in spinal cord and myocardium were increased in IR group ($P < 0.01$). Compared with IR group, the IS volume, IS/AAR, the numbers of PVCs, VT/VF, and the levels of c-Fos expression were significantly decreased ($P < 0.01$), but the levels of β -EP expression in myocardium and spinal cord were significantly increased in IPC group and MPC group ($P < 0.01$). **Conclusion** Morphine preconditioning in RVLM can alleviate myocardial I/R injury in rats, which may be related to the decrease of c-Fos expression in RVLM nucleus after I/R. β -endorphin may be involved as a transmitter in the myocardial protective effect of morphine preconditioning in RVLM. **Key words** ischemic preconditioning; myocardial protection; morphine; ischemia-reperfusion injury; β -endorphin

1 材料与amp;方法

1.1 材料 MG63 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院; 胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天公司; 实验所用抗体均购自沈阳万类生物公司; 本研究使用的等离子体装置是一种依赖于空气的装置, 由中国科学院等离子体物理研究所设计和开发。

1.2 细胞培养 用含有 10% 胎牛血清、10 000 U/ml 青霉素、10 g/ml 链霉素的 DMEM 完全培养基培养人骨肉瘤细胞系 MG63; 细胞培养环境为 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱, 每 2~3 d 传代 1 次, 取对数期生长细胞用于实验。

1.3 低温等离子体处理 取指数生长的贴壁的骨肉瘤细胞 MG63, 用低温等离子体处理, 其工作电压为 10 kV, 因为其装置中存在两个 10 MΩ 电阻, 所以其工作电流为 5 mA, 其中装置与培养基液面之间等距离为 2 cm。低温等离子体处理细胞的时间分别为 0、2、4、8 min, 处理后将细胞置于 37 ℃ 培养箱孵育 2 h, 然后更换培养基并进行下一步实验。

1.4 方法

1.4.1 显微镜观察低温等离子体对 MG63 细胞结构的作用 低温等离子体处理骨肉瘤 MG63 细胞后, 胰酶消化, 使其呈细胞悬液。细胞计数调准浓度为 5×10^4 个/ml, 每孔 500 μl 接种 MG63 细胞株于 35 mm 板内。用低温等离子体处理相应时间后孵育 2 h, 更换培养基置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的环境培养 24 h 后, 用 Zeiss Axiovert 200M 倒置显微镜观察并摄像。

1.4.2 噻唑蓝 (MTT) 法 低温等离子体处理骨肉瘤 MG63 细胞后, 胰酶消化, 使其呈细胞悬液。细胞计数调准浓度为 5×10^4 个/ml, 每孔 500 μl 接种 MG63 细胞株于 35 mm 板内, 每组设 3 个复孔。用低温等离子体处理相应时间后孵育 2 h, 更换培养基置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的环境培养 24 h 后, 每孔加入 20 μl 5% MTT 溶液, 再次置于 37 ℃ 培养箱继续培养 4 h, 弃上清液, 每孔加入 200 μl DMSO, 在水平摇床上避光振荡 10 min, 使 MTT 还原物完全溶解, 用酶标仪在 560 nm 处测定各孔吸光度 (OD) 值。肿瘤细胞存活率 = 等离子体处理组 OD 值 / 未处理组 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.4.3 克隆形成实验 在低温等离子体处理 MG63 细胞 2 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化并吹打成单个

细胞悬液。然后将细胞悬液接种到含 10 ml 37 ℃ 预温培养液的 10 cm 皿中。并轻轻转动, 使细胞分散均匀。置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的环境下, 静置培养 2~3 周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次。加 1:3 醋酸/甲醇 5 ml, 固定 15 min。然后去固定液, 加适量 Giemsa 应用染色液染色 10~30 min, 用流水缓慢洗去染色液, 空气干燥, 计数克隆形成数 (A 值), 肿瘤克隆形成率 = 等离子体处理组 A 值 / 未处理组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.4.4 流式细胞仪检测 流式细胞仪检测转染低温等离子体对骨肉瘤 MG63 细胞凋亡的影响。各组膜联蛋白 V-异硫氰酸酯 (Annexin V-FITC) 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 双染, 同时设置未染色空白对照管、单染 Annexin V-FITC 管及单染 PI 管。并置于冰上, 避光条件下室温静置 10 min, 加入 400 μl \times Binding Buffer, 轻轻混匀, 并在 30 min 内进行检测。以未染色空白细胞为基准调零机器, 以 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管做为基准参照, 测定每个上样 EP 管的数据。采用 Flowjo-v 10 软件进行参数获取和资料分析, 计算凋亡细胞百分比。

1.4.5 Western blot 将细胞密度调整为 1×10^5 /ml 接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后进行低温等离子体处理相应时间后孵育 2 h。更换培养基后继续培养 24 h, 收集细胞。使用细胞裂解剂提取蛋白, 并用 BCA 进行蛋白定量, 将 40 μg 蛋白质在 10% SDS-PAGE 上电泳并转移至 PVDF 膜。用 TBST 缓冲液和 5% (M/V) 脱脂奶粉封闭, 将膜在 4 ℃ 下用 Caspase-3 (1:500)、cleaved Caspase-3 (1:1000) 一抗孵育过夜。洗涤后, 将印迹与辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:5000) 在室温下孵育 45 min。用 TBST 洗涤后, 使用 ECL + 化学发光试剂盒在暗室曝光。将胶片进行扫描, 用凝胶图像处理软件分析目标条带的光密度值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每一实验重复 3 次 ($n=3$), 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低温等离子体影响细胞形态 通过显微镜观察到低温等离子体处理骨肉瘤细胞改变了细胞形态, 与未处理组细胞相比, 低温等离子体处理时间在 4 min 时细胞的出现皱缩, 并有少量细胞开始漂浮

在细胞培养基中。当暴露时间达到 8 min 梭形细胞变圆并且萎缩,并且更多细胞悬浮在培养基中(图 1)。

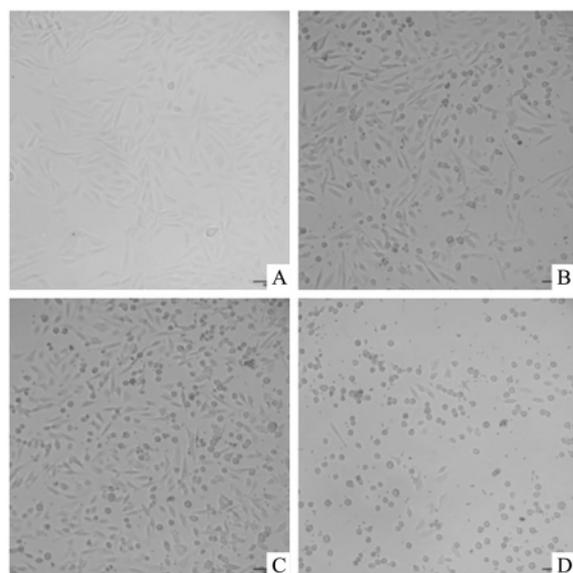


图 1 不同处理时间的 CAP 对骨肉瘤细胞 MG63 的形态的影响 ×40
不同的 CAP 处理时间: A. 0 min; B. 2 min; C. 4 min; D. 8 min

2.2 低温等离子体对细胞增殖能力影响 通过 MTT 法发现随着低温等离子体处理 MG63 的时间延长细胞的存活率下降,当处理时间达到 8 min 时细胞的存活率为 $(16.93 \pm 5.970)\%$,与未处理组间比较差异有统计学意义($t = 8.41, P < 0.05$)。通过克隆形成实验发现随着低温等离子体处理 MG63 的时间延长,细胞的克隆形成率下降,当处理时间达到 8 min 时细胞的克隆形成率 $(8.043 \pm 2.228)\%$,与未处理组间比较差异有统计学意义($t = 7.74, P < 0.05$) ,见图 2。

2.3 低温等离子体诱导细胞凋亡 通过流式细胞仪发现随着低温等离子体处理 MG63 的时间延长细胞的存活率下降,当处理时间达到 8 min 时细胞的凋亡率为 $(73.94 \pm 3.88)\%$,与未处理组间比较差异有统计学意义($F = 5.53, P < 0.05$) ,见图 3。通过 Western blot 法发现随着低温等离子体处理 MG63 的时间延长 Caspase-3 蛋白表达量减少,cleaved Caspase-3 蛋白表达量增加,且 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比率随着处理时间的延长而增加,当处理时间达到 8 min 时细胞的 cleaved Caspase-3/Caspase-3 比为 (1.33 ± 0.24) ,与未处理组比较,差异有统计学意义($F = 2.19, P < 0.05$) ,见图 4。

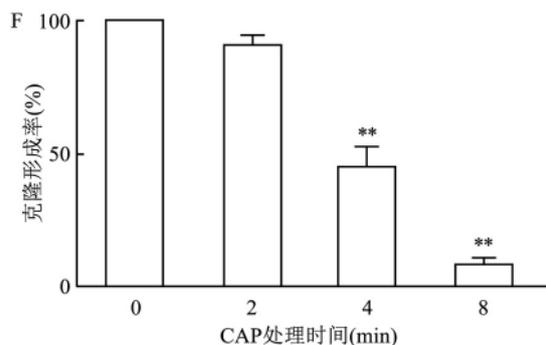
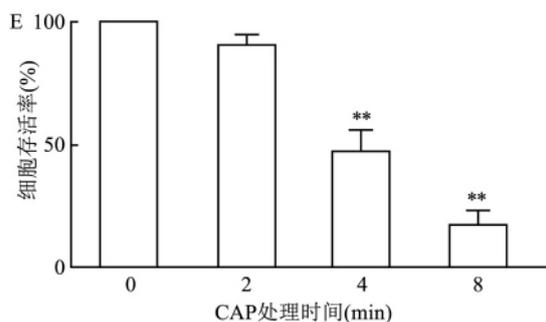
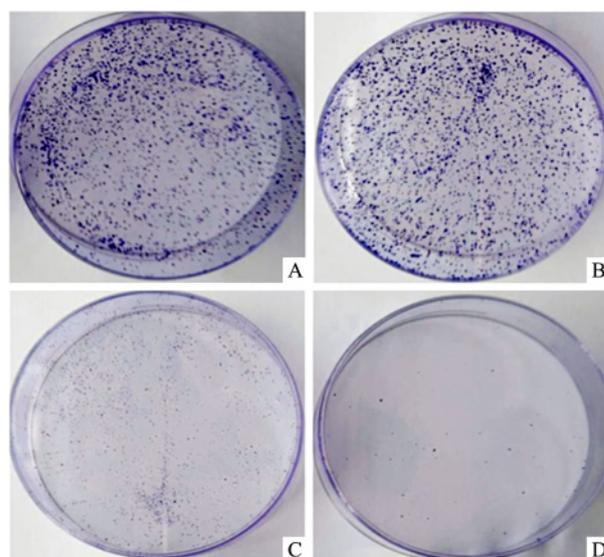


图 2 不同处理时间的 CAP 对骨肉瘤 MG63 细胞增殖的影响
不同的 CAP 处理时间处理骨肉瘤 MG63 细胞后克隆形成的照片; A: 0 min; B: 2 min; C: 4 min; D: 8 min; E. MTT 法检测骨肉瘤 MG63 细胞存活率的结果统计图; F. MTT 法检测骨肉瘤 MG63 细胞克隆形成率的结果统计图; 与未处理组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

等离子体包含各种物理和化学成分,包括电场、离子、光子、自由基和其他未知的活性物质^[5]。传统等离子体只能在高温下用于工业。温度超过 10 000 °C。低温等离子体温度范围为 20 ~ 50 °C,从而保持分子结构和细胞完整性^[6]。报告显示低温等离子体可用于伤口愈合^[7]和灭菌^[8]等。低温等

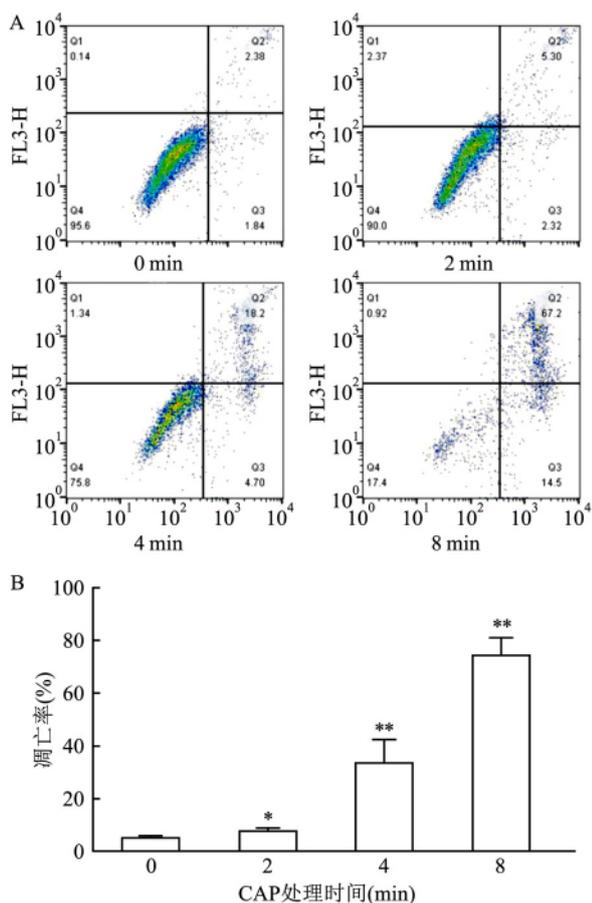


图3 CAP 诱导骨肉瘤细胞 MG63 凋亡

A: CAP 处理细胞后流式图; B: CAP 各个处理时间诱导细胞凋亡率的统计图; 与未处理组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

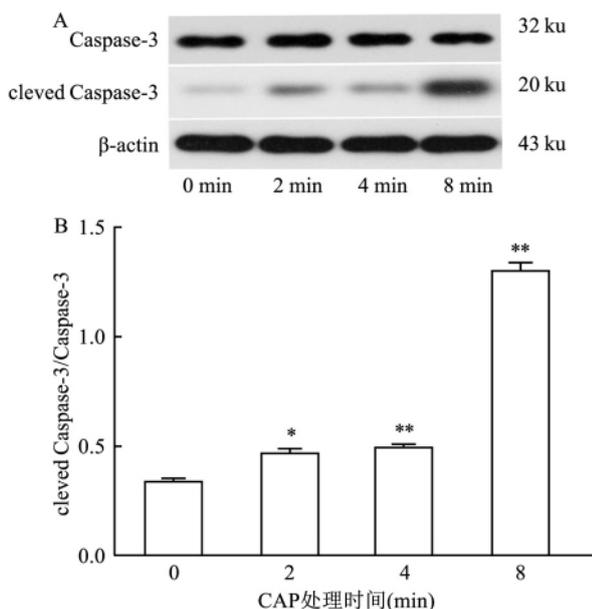


图4 CAP 促进骨肉瘤细胞 MG63 凋亡蛋白的表达

A: CAP 处理细胞后的 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达情况; B: CAP 各个处理时间后 cleaved Caspase-3/Caspase-3 表达量比值的统计图; 与未处理组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

离子体的抗癌能力已成为研究人员的热门话题,包括恢复化疗耐药癌细胞的敏感性^[9]。

近年来随着对骨肉瘤治疗水平的提高,保肢手术得到了极大的发展^[10]。但伴随而来肿瘤复发和远处转移也成为了困扰骨科医生的问题,仅仅靠最大程度上的切除和新辅助化疗并不能降低这一事件的发生几率^[11]。Takeuchi et al 对 461 例骨肉瘤患者进行了长期随访,结果显示 45 例复发患者 5 年存活率 30%, 10 年存活率只有 13%^[12]。因此期望通过低温等离子体对手术中肉眼不可见残留肿瘤细胞杀灭,达到控制肿瘤复发目的。已有研究表明^[13-16],低温等离子体在体内或体外实验中能够抑制多种肿瘤细胞的增殖。在此次研究中,首先通过 MTT 法检测低温等离子体对骨肉瘤细胞的具有明显的增殖抑制效果,结果表明骨肉瘤细胞经低温等离子体处理,细胞的生长受到了明显的抑制,细胞的抑制率最高可以达到 90% 以上,同时还发现等离子体对细胞的增殖的抑制呈明显的剂量依赖性。细胞克隆形成实验也验证了这一结果。

对于低温等离子体诱导癌细胞凋亡已有多例报道,如 Kim et al 研究不同强度等离子体对人结肠癌细胞 HCT-416、SW480 和 LoVo 的作用,发现该等离子体可以有效的诱导三种结肠癌细胞凋亡^[17]; Ahn et al 用低温等离子体成功诱导了人宫颈癌细胞 HeLa 的凋亡^[18]。本次研究证明了低温等离子体对骨肉瘤细胞活力具有显著的抑制效果。为了证明其抑制作用可以通过程序性细胞凋亡来实现低温等离子体激活的林格氏溶液诱导 MG63 细胞死亡,通过流式细胞仪观察 Annexin V/PI 对细胞的双染情况,本次研究的结果也显示等离子体处理所引起的凋亡早期和凋亡晚期的细胞量均多于无处理对照组,表明等离子体处理可以诱导骨肉瘤细胞凋亡,且这种凋亡作用同样也呈明显的剂量依赖性。为了进一步确定低温等离子体诱导细胞凋亡信号通路,在本次研究中,Western blot 结果表明凋亡蛋白 Caspase-3 和 cleaved Caspase-3 的表达同样呈剂量依赖性。

综上所述,低温等离子体对人骨肉瘤细胞具有很好的杀伤作用,为临床上治疗骨肉瘤细胞提供了新的思路和方法,低温等离子体对人骨肉瘤细胞的杀伤作用的机制可能是诱导细胞凋亡但具体的诱导凋亡的原因还有待进一步研究。

参考文献

[1] Geller D S, Gorlick R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, man-

- agement , and treatment strategies. [J]. *Clin Adv Hematol Oncol* , 2010 8(10) : 705 – 18.
- [2] Blattmann C , Oertel S , Schulz-Ertner D , et al. Non-randomized therapy trial to determine the safety and efficacy of heavy ion radiotherapy in patients with non-resectable osteosarcoma [J]. *Bmc Cancer* , 2010 10(1) : 1 – 7.
- [3] Anja L , Meyers P A , Ian L , et al. Osteosarcoma treatment – where do we stand? A state of the art review [J]. *Cancer Treatment Reviews* , 2014 40(4) : 523 – 32.
- [4] Yan D , Sherman J H , Keidar M. Cold atmospheric plasma , a novel promising anti-cancer treatment modality [J]. *Oncotarget* , 2017 8(9) : 15977 – 95.
- [5] Keidar M , Yan D , Beilis I I , et al. Plasmas for treating cancer: opportunities for adaptive and self-adaptive approaches [J]. *Trends in Biotechnology* , 2018 6(6) : 586 – 93.
- [6] Lee H J , Shon C H , Kim Y S , et al. Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma [J]. *New Journal of Physics* , 2009 11(11) : 115026.
- [7] Sander B , Anke S , Lydia B , et al. Redox stimulation of human THP-1 monocytes in response to cold physical plasma [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* , 2015 2016(4) : 1 – 11.
- [8] Iseki S , Ohta T , Aomatsu A , et al. Rapid inactivation of *Penicillium digitatum* spores using high-density nonequilibrium atmospheric pressure plasma. [J]. *Appl Phys Lett* , 2010 96(15) : 1310 – 9.
- [9] Julia K R , Veronika B , Andrea S F , et al. Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma [J]. *PLoS One* , 2013 8(5) : e64498.
- [10] Giulia O , Robert R S , Huh W W , et al. Sociooccupational and physical outcomes more than 20 years after the diagnosis of osteosarcoma in children and adolescents: limb salvage versus amputation [J]. *Cancer* , 2013 119(20) : 3727 – 36.
- [11] Mavrogenis A F , Abati C N , Romagnoli C , et al. Similar Survival but Better Function for Patients after Limb Salvage versus Amputation for Distal Tibia Osteosarcoma [J]. *Clin Orthop Relat Res* , 2012 470(6) : 1735 – 48.
- [12] Takeuchi A , Lewis V O , Satcher R L , et al. What are the factors that affect survival and relapse after local recurrence of osteosarcoma? [J]. *Clin Orthop Relat Res* , 2014 472(10) : 3188 – 95.
- [13] Yan D , Cui H , Wei Z , et al. The specific vulnerabilities of cancer cells to the cold atmospheric plasma-stimulated solutions [J]. *Scientific Reports* , 2017 7(1) : 4479 – 91.
- [14] Koensgen D , Besic I , Gumbel D , et al. Cold Atmospheric Plasma (CAP) and CAP-Stimulated Cell Culture Media Suppress Ovarian Cancer Cell Growth – A Putative Treatment Option in Ovarian Cancer Therapy [J]. *Anticancer Research* , 2017 37(12) : 6739.
- [15] Yan D , Talbot A , Nourmohammadi N , et al. Principles of using Cold Atmospheric Plasma Stimulated Media for Cancer Treatment [J]. *Sci Rep* , 2015 5(5) : 18339.
- [16] Chen Z , Li L , Cheng X , et al. Effects of cold atmospheric plasma generated in DI water on Cancer cells [J]. *Scientific Reports* , 2016 6(5) : 564 – 80.
- [17] Kim J , Choi J S , Hong Y J , et al. Evaluation of non-thermal plasma-induced anticancer effects on human colon cancer cells [J]. *Biomedical Optics Express* , 2017 8(5) : 2649 – 59.
- [18] Ahn H J , Kim K I , Kim G , et al. Atmospheric-pressure plasma jet induces apoptosis involving mitochondria via generation of free radicals [J]. *PLoS One* , 2011 6(11) : e28154.

Effect and mechanism of Cold atmospheric plasma on osteosarcoma cell line MG63

Wang Yuan , Hu Yong , Xu Shenglin , et al

(Dept of Bone Disease and Bone Tumor Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the killing effect of Cold atmospheric plasma on human osteosarcoma cell line MG63 and its possible mechanism. **Methods** The proliferation inhibition effect of Cold atmospheric plasma on MG63 cells was determined by MTT assay and colony formation assay. The effect of Cold atmospheric plasma on the morphology of MG63 cells was observed under a microscope. Apoptosis was detected by flow cytometry , and the changes in expression of apoptosis related proteins was detected by Western blot. **Results** Microscopic observation showed that Cold atmospheric plasma could induce the shrinkage of MG63 cells. In both MTT and colony formation experiments , Cold atmospheric plasma showed significant proliferation inhibition effect on MG63 cells in a dose-dependent manner. The cellular analysis showed that Cold atmospheric plasma caused inhibition of cell proliferation by inducing apoptosis. Western blot showed that Cold atmospheric plasma could induce the expression of apoptotic proteins in a dose-dependent manner. **Conclusion** Cold atmospheric plasma has a significant killing effect on MG63 cells , which may be related to the induction of apoptosis.

Key words cold atmospheric plasma; osteosarcoma; apoptosis; colony formation experiment