



42°C 热疗抑制 U251 细胞增殖并诱导凋亡*

吴聪英¹⁾ 周 翠¹⁾ 张 捷^{2)**}

(1) 北京中医药大学东直门医院, 北京 101121; (2) 北京大学第一医院, 北京 100034)

摘要 **目的** 艾灸是一种经典的中医治疗手段, 集合了物理疗法(热疗)和化学疗法, 目前已经证明对多种癌症有抑制作用, 但是具体的细胞生物学机制尚不明确。本研究旨在研究热疗对星形胶质细胞癌细胞系 U251 的作用, 来揭示艾灸通过热疗对癌细胞的作用。**方法** 通过显微缩时摄影技术, 记录了 42°C 热疗处理 U251 细胞系 108 h 中细胞形态的变化, 并用细胞计数法检测了热疗 3 d 时全细胞数、活细胞数及活细胞比例的变化, 来评价热疗对细胞增殖和死亡的影响。通过检测细胞凋亡标志物 Annexin V 和 Caspase-3, 来评价热疗对细胞凋亡的作用。**结果** 热疗明显抑制细胞的增殖, 细胞死亡明显增加。热疗处理后的 U251 细胞较对照组存在明显的核固缩, 标志物 Annexin V 和 PI 明显升高, PI 阳性细胞呈 Annexin V 阳性, 提示热疗导致的细胞死亡以细胞凋亡为主, PI 阳性的细胞为凋亡终末期, 细胞膜通透性增加所致。同时大部分收缩变圆的细胞中, Caspase-3 和 Annexin V 呈共同阳性, 提示热疗可能通过 Caspase 途径介导细胞凋亡。**结论** 本研究明确了热疗可以抑制星形胶质细胞癌 U251 细胞系的细胞增殖并诱导 Caspase 途径相关的凋亡。

关键词 热疗, 细胞凋亡, 星形胶质细胞瘤**中图分类号** R11, Q2**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0458

艾灸是传统中医的常用治疗方法。其借灸火的热力给人体以温热性刺激, 通过经络腧穴的作用, 以达到温通经络、调和气血、扶正祛邪及防病保健的方法。《灵枢经·官针》篇指出:“针所不为, 灸之所宜”。随着医学的进步与科研技术的发展, 艾灸对癌症的治疗作用也逐渐被揭示, 如改善血液循环、调节内分泌、抗炎、调节免疫功能和机体代谢、减轻化疗毒副反应, 以及减少癌症并发症等^[1]。所以有学者认为, 艾灸的治疗根本在于“扶正以抑瘤”。艾灸通过作用于人体气血经络, 扶助人体正气, 改善全身整体功能, 从而达到祛病抑瘤的目的^[2]。但也有实验证明, 艾灸对癌细胞有直接的抑制和杀伤作用^[3], 只是具体机制尚未得到阐明。

艾灸是一种综合性的疗法, 其中首要的作用是热疗。在肿瘤学中, 热疗是目前国际上认可的一种抑制癌症的物理治疗方法(高于 37°C, 一般为 40~43°C)。作为放疗和化疗的辅助手段, 热疗已经被用于多种癌症的治疗, 例如头颈癌、乳腺癌、宫颈癌、肉瘤和黑素瘤^[3]。在癌症治疗中使用热疗是

很有吸引力的, 因为作为一种物理疗法, 热疗的副作用比化疗和放疗少得多, 而且它可以与这些疗法结合使用。然而, 由于热疗临床抑癌效果的机制尚未得到明确, 应用受到了限制^[4]。

本研究通过运用长时间的显微缩时摄影技术、细胞计数以及凋亡标志物成像等细胞生物学技术研究 42°C 热疗对星形胶质细胞癌 U251 细胞系的作用, 从而明确热疗对癌细胞增殖和凋亡的影响, 以期从一个角度揭示艾灸治疗癌症的具体机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和热疗处理

U251 星形胶质细胞癌细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司(CL-0237, STR 鉴定正确)。本研究的 U251 细胞在适宜的细胞培养液中培养。细胞培养液的成分为: 体积占比 89% DMEM 培养

* 国家自然科学基金(81901155)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-83573238, E-mail: zhangjie2013bjmu@163.com

收稿日期: 2022-09-23, 接受日期: 2022-10-16

基 (Thermo Fisher Scientific), 体积占比 10% 胎牛血清 (Gibco) 和体积占比 1% 青霉素链霉素抗生素混合溶液 (Gibco)。正常的培养条件为在细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific) 中以 5% CO₂ 和 37°C 以及 95% 以上湿度进行培养。热疗的培养条件为在细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific) 中以 5% CO₂ 和 42°C 以及 95% 以上湿度进行培养。

1.2 显微缩时摄影

长时间的显微缩时摄影是应用 Olympus CKX41 倒置荧光显微镜对细胞形态进行记录, 用 INU 二氧化碳培养小室 (TOKAI HIT) 对细胞培养的温度、湿度和 CO₂ 浓度进行控制。本研究的观测热疗对 U251 细胞的培养条件为: 5% CO₂ 和 42°C 以及 95% 以上湿度。

1.3 细胞计数和统计方法

将 U251 细胞传代于 24 孔板, 对照组和热疗组分别在 37°C 和 42°C 培养 3 d (72 h) 后, 轻柔吸尽培养液, 每孔加入 1 ml 细胞消化液 (0.25% 胰酶-EDTA, Gibco), 37°C 消化 10 min。吹打混匀后, 取 10 μl 与等体积的 0.4% 台盼蓝染色液 (瑞沃德) 进行混匀染色, 然后取 10 μl 加入 DS-50 细胞计数板 (瑞沃德), 在 C100 自动细胞计数仪 (瑞沃德) 下计数, 记录全细胞数、活细胞数和死细胞数。用非配对 *t* 检验进行统计学分析。

1.4 核固缩观测

将 U251 细胞传代于激光共聚焦培养皿 (Nest), 对照组和热疗组分别在 37°C 和 42°C 培养 2 d (48 h) 后, 加入 1 ml 4% 多聚甲醛细胞固定液 (雷根) 固定细胞, 室温固定 10 min。然后加入用 PBS 溶液配制的 2 mg/L Hoechst33342 (Invitrogen H3570) 细胞核染色液, 染色 5 min。在 Olympus 激光共聚焦显微镜 (FLUOVIEW FV10i) 下观测。

1.5 细胞凋亡检测

将 U251 细胞传代于激光共聚焦培养皿 (Nest), 对照组和热疗组分别在 37°C 和 42°C 培养 2 d (48 h) 后, 应用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (C1062S, 碧云天) 经染色。每孔的玻璃小室内加入 210 μl 染色液 (195 μl Annexin V-FITC 结合液+5 μl Annexin V-FITC 染色液+10 μl 碘化丙啶 (PI) 染色液), 室温避光孵育 20 min。在 Olympus 激光共聚焦显微镜 (FLUOVIEW FV10i) 下观测。

1.6 活细胞Caspase-3活性检测

将 U251 细胞传代于激光共聚焦培养皿

(Nest), 对照组和热疗组分别在 37°C 和 42°C 培养 2 d (48 h) 后, 应用活细胞 Caspase-3 活性与 Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒 (C1077S, 碧云天)。每孔的玻璃小室内加入 200 μl 染色液 (194 μl Annexin V-mCherry 结合液+5 μl Annexin V-mCherry 染色液+1 μl GreenNuc™ Caspase-3 染色液), 室温避光孵育 20 min。在 Olympus 激光共聚焦显微镜 (FLUOVIEW FV10i) 下观测。

2 实验结果

2.1 热疗对U251细胞影响的动态观察

为了细致观测热疗对 U251 细胞的影响, 进行长达 108 h 的动态观察 (图 1, 视频 S1)。结果发现, 在第 1 天 (24 h) 内, 仍有一部分细胞进行了分裂增殖, 说明在热疗初期并不能完全抑制细胞的增殖, 在这一段时间内大部分变圆的细胞是因为细胞分裂。然而在 1 d 后, 就很少见到细胞分裂, 变圆的细胞开始慢慢增多。随着时间推移, 细胞变圆的现象更加明显, 而变圆的细胞往往最后会死亡, 而这种现象在 48 h (第 2 天), 变得比较明显, 后续将此事件节点作为检测细胞凋亡的时间点。而在 72 h (第 3 天), 底层贴壁细胞变少变大, 上层变圆和死亡的细胞明显增多, 后续将此时间节点作为细胞计数的时间点。

2.2 42°C热疗引起星形胶质细胞瘤U251细胞的凋亡

2.2.1 42°C热疗引起星形胶质细胞瘤U251细胞的核固缩

通过动态观察发现, 在 42°C 热疗处理 2 d (48 h) 后, 细胞变圆和细胞死亡的现象变得比较明显, 首先观测热疗对 U251 细胞胞核的影响。与对照组相比, 有一部分 42°C 热疗的星形胶质细胞瘤 U251 细胞 (往往是变圆的细胞) 的细胞核缩小、形态畸变、凝聚, 即核固缩, 提示其可能发生了凋亡 (图 2)。

2.2.2 42°C热疗引起星形胶质细胞瘤U251细胞的凋亡

因为观察到热疗可以引起 U251 细胞核的核聚缩, 用凋亡的标记物 Annexin V 来验证热疗是否引起了细胞凋亡。42°C 热疗处理 U251 细胞 2 d (48 h) 后, 与对照组相比发现, 凋亡的标志物 Annexin V 和细胞死亡的标志物 PI 阳性的细胞明显增多。与此同时还发现, 有一部分 Annexin V 阳性的细胞也同时是 PI 阳性, 而且 PI 阳性的细胞则往

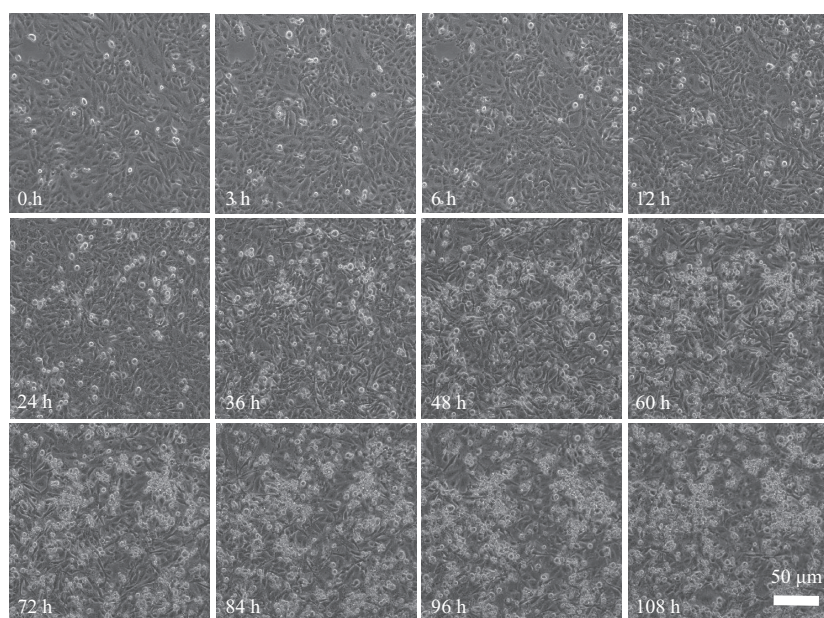


Fig. 1 Hyperthermia affected the morphology of astroglioma U251 cells during 108 h

Morphology of glioma U251 cells treated with hyperthermia at 42°C for 108 h was performed with Olympus CKX41 inverted fluorescence microscope with INU CO₂ culture chamber (TOKAI HIT).

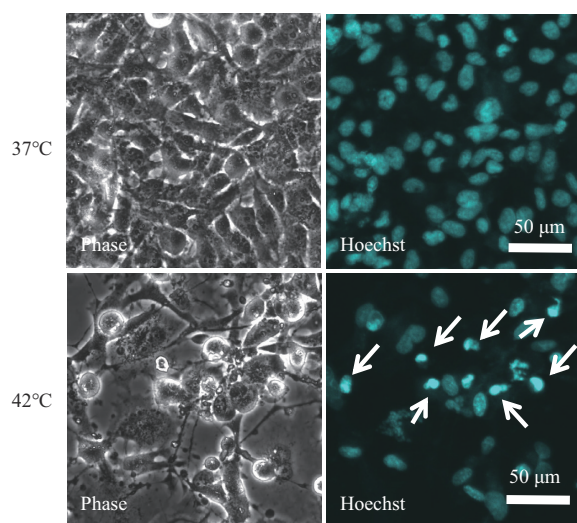


Fig. 2 Hyperthermia affected the nuclear pyknosis of astroglioma U251 cells

Fluorescence images showed Hoechst33342 staining (blue) in U251 cells.

往是 Annexin V 阳性的, 提示这些 PI 阳性的细胞为凋亡后期失去细胞膜完整性的细胞 (图3)。此实

验证了 42°C 热疗可以导致 U251 细胞的死亡, 且细胞死亡以凋亡为主。

2.2.3 热疗通过Caspase途径介导星形胶质细胞瘤U251细胞凋亡

在确定热疗可以引起 U251 细胞凋亡后, 进一步明确凋亡的类型。在 42°C 热疗处理 U251 细胞 2 d (48 h) 后, 较对照组相比发现, 收缩变圆的细胞往往显示 Caspase-3 和 Annexin V 双阳性 (图4), 提示热疗引起的细胞凋亡是 Caspase-3 相关的细胞凋亡。

2.3 42°C热疗抑制星形胶质细胞瘤U251细胞的增殖

通过动态观察发现, 在 42°C 热疗 1 d 后, U251 细胞基本上处于不再增殖且不断凋亡的状态。在热疗 3 d 后进行细胞计数, 评价热疗对 U251 细胞增殖的影响。发现无论是对于全细胞数还是活细胞数, 42°C 热疗组均明显低于正常温度 (37°C) 的对照组, 且活细胞占比也明显下降 (图5), 这说明 42°C 热疗抑制了星形胶质细胞瘤 U251 细胞的增殖。

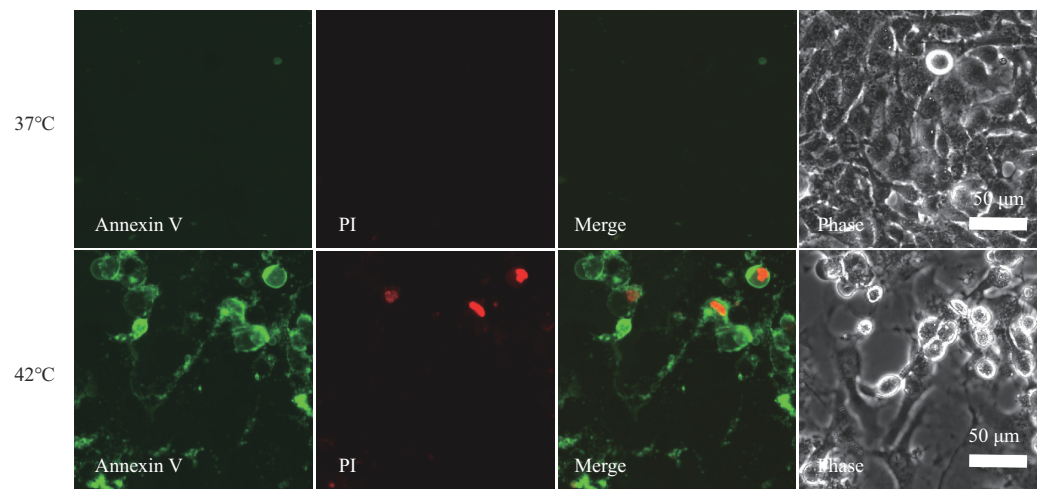


Fig. 3 Hyperthermia induced the apoptosis of astroglioma U251 cells
Fluorescence images showed Annexin V staining (green) and PI staining (red) in U251 cells.

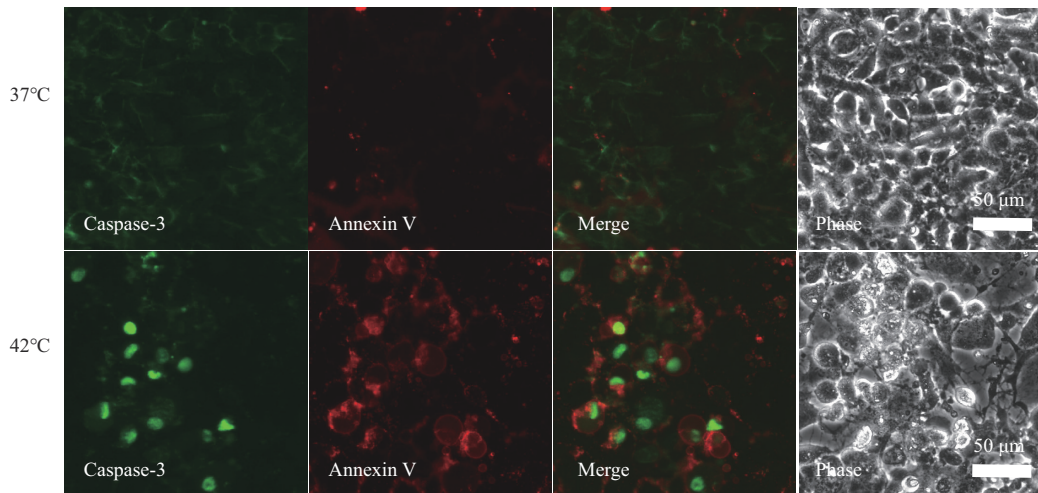


Fig. 4 Hyperthermia might mediate apoptosis of glioma U251 cells *via* Caspase-3 pathway
Fluorescence images showed Annexin V staining (red) and Caspase-3 staining (green) in U251 cells.

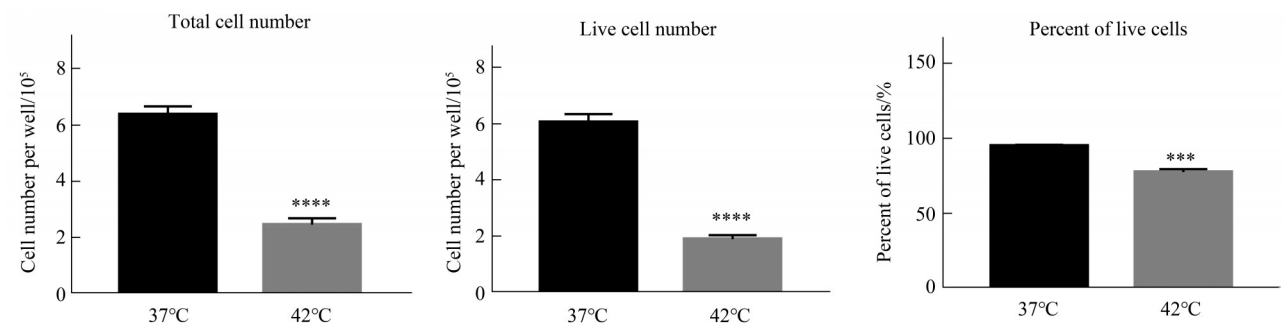


Fig. 5 Hyperthermia inhibited the proliferation of glioma U251 cells
Cell count of U251 cell numbers in different groups, the data were shown as *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

3 讨 论

现在癌症的发病率越来越高,已成为人类最常见的死亡原因之一。2020年全世界有大约1 930万癌症病例,估计到2040年这一数字可能增加到2 840万^[5]。国家癌症中心最新发布的《2022年全国癌症报告》显示,中国2016年恶性肿瘤新发病例约406.4万人,死亡约241.4万人。平均每天超过1万人被确诊为癌症。与历史数据相比,癌症负担呈持续上升态势。目前,中国恶性肿瘤发病、死亡数持续上升,每年恶性肿瘤所致的医疗花费超过2 200亿^[6]。现有癌症的治疗方法效果有限,手术治疗及放疗、化疗仍是当今肿瘤治疗的主流方法。但放疗、化疗产生的胃肠道反应、免疫力低下等副作用严重影响肿瘤的治疗及效果。近年来,艾灸疗法作为中国传统中医的重要组成部分,艾灸对肿瘤患者的细胞免疫、体液免疫及放、化疗后不良反应的改善都有显著疗效,在缓解肿瘤患者的癌痛、胃肠道反应、机体免疫力低下和癌因性疲乏等方面都有显著疗效^[7]。

艾灸的第一个特点是热。在18世纪,人们注意到发烧患者的肿瘤会缩小。从那时起,热疗作为一种潜在的癌症治疗方法被广泛研究^[8]。在20世纪70年代,体外和体内研究表明,肿瘤细胞不能像健康细胞一样耐受升高的温度^[9]。国内外的多项研究表明,热疗的抑癌机制可能是多方面的,包括但不限于帮助克服耐药性^[10]、增加放疗敏感性^[11]、调节血流^[12]和诱导细胞凋亡^[13]。尽管许多研究表明,热疗在癌症治疗中具有积极作用,但这种方法仍存在争议,其主要问题是缺乏热疗的精确肿瘤学定义并难以标准化^[14]。而本研究在42℃下用显微缩时摄影技术长时间观测热疗对U251细胞的作用,为建立标准化的热疗抑癌范式提供了实验证据。

热疗可以部分解释艾灸的抑癌机制,然而这可能不是艾灸抑制癌症的唯一原因。有学者认为,艾灸效应的原理并不仅仅是温热效应,而是由辐射、药化、创伤及综合等效应的综合作用结果^[1]。也有学者认为,艾灸的作用机理是由艾条燃烧时所产生的物理和化学因子作用于腧穴,将刺激信号传入中枢,经过整合作用后传出信号,调控机体神经、内分泌、免疫网络系统、循环系统等,从而调整机体的内环境,以达到防病治病的功效^[15]。国内的学者研究发现,艾灸能一定程度抑制胃瘤大鼠的

瘤体增长,上调胃部瘤体内HSP70 mRNA的表达,促进HSP70的生成及细胞外释放,且艾灸相对于红外线的作用更明显^[3],艾灸的第二个特点是艾草燃烧产生很多挥发油性的物质。这些物质的分子质量和亲脂性可以让它们比较容易地进入人体细胞中发挥作用。桉叶油素(1,8-cineole, Eucalyptol)是艾烟的主要成分^[16]。本课题组的另外一项研究证实了1,8-cineole可以调节U251细胞内的多条癌症相关通路从而起到抑制细胞增殖的作用。以上研究均说明艾灸的抑癌作用是一个综合作用,而不仅仅是热疗作用。

癌症目前来说是威胁人类健康的第一大疾病,且缺乏有效且安全的治疗手段。现阶段西医治疗癌症的放化疗方法并不能有效控制癌症的发展和提高病人的生存质量。中医有着悠久的历史,在中国历经了几千年的验证和积累,形成了一整套有效的医药运用方法。艾灸是一种经典的中医治疗手段,集合了物理疗法和化学疗法,对多种癌症有抑制作用。本研究从热疗的角度揭示艾灸抑制癌症细胞增殖的细胞机制,为临床艾灸治疗癌症提供理论基础,具有一定的理论意义和应用价值。

4 结 论

通过以上结果看到热疗明显抑制细胞的增殖,细胞死亡明显增加。热疗处理后的U251细胞较对照组存在明显的核固缩,标志物Annexin V和PI明显升高,PI阳性细胞均呈Annexin V阳性,说明热疗导致的细胞死亡以细胞凋亡为主;大部分收缩变圆的细胞Caspase-3和Annexin V呈共同阳性,说明热疗可能通过Caspase途径介导细胞凋亡。从而得出本研究结论:热疗可以抑制星形胶质细胞癌细胞系U251细胞的增殖并诱导Caspase途径相关的凋亡。

附件 见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>或<http://www.cnki.net>):

PIBB_20220458_Video S1.mp4

参 考 文 献

- [1] 原佩玉,郝重耀,张天生. 艾灸效应的原理及功能的临床研究现状. 中国医药导报, 2019, 16(12): 31-34
Yuan P Y, Hao Z Y, Zhang T H. China Medical Herald, 2019, 16(12): 31-34
- [2] 叶兴耀. 艾灸治疗癌症临床浅析//世界中医药学会联合艾灸保健推广委员会. 第三届国际灸法大会论文集. 北京: 世界中

- 医药学会联合艾灸保健推广委员会, 2015: 49-55
- Ye X Y. Clinical analysis of moxibustion treatment of cancer// World Association of Traditional Chinese Medicine and Moxibustion Health Promotion Committee. Proceedings of the Third International Moxibustion Method Congress. Beijing: World Association of Traditional Chinese Medicine and Moxibustion Health Promotion Committee, 2015: 49-55
- [3] Tan J, Lin Y P, Yi S X, *et al.* Effect of moxibustion on HSP70 mRNA and protein expression in gastric tumor-bearing rats. *J Acupunct Tuina Sci*, 2019, **17**(6): 395-401
- [4] Lee S Y, Fiorentini G, Szasz A M, *et al.* Quo vadis oncological hyperthermia (2020)? *Front Oncol*, 2020, **10**: 1690
- [5] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, **71**(3): 209-249
- [6] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析. *中华肿瘤杂志*, 2019, **41**(1): 19-28
- Zheng R S, Sun K X, Zhang S L, *et al.* *Chin J Cancer*, 2019, **41**(1): 19-28
- [7] 王婉婷, 王荃. 艾灸在肿瘤治疗中的应用研究进展. *广西中医药大学学报*, 2018, **21**(4): 76-78
- Wang W T, Wang J. *Journal of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine*, 2018, **21**(4): 76-78
- [8] Cheng Y, Weng S, Yu L, *et al.* The role of hyperthermia in the multidisciplinary treatment of malignant tumors. *Integr Cancer Ther*, 2019, **18**: 1534735419876345
- [9] Storm F K, Harrison W H, Elliott R S, *et al.* Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res*, 1979, **39**(6 Pt 2): 2245-2251
- [10] van der Heijden A G, Dewhirst M W. Effects of hyperthermia in neutralising mechanisms of drug resistance in non-muscle-invasive bladder cancer. *Int J Hyperthermia*, 2016, **32**(4): 434-445
- [11] Li Q, Hang L, Jiang W, *et al.* Pre- and post-irradiation mild hyperthermia enabled by NIR-II for sensitizing radiotherapy. *Biomaterials*, 2020, **257**: 120235
- [12] Lee S Y, Kim J H, Han Y H, *et al.* The effect of modulated electro-hyperthermia on temperature and blood flow in human cervical carcinoma. *Int J Hyperthermia*, 2018, **34**(7): 953-960
- [13] Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*, 2015, **20**(11): 1411-1419
- [14] Włodarczyk A, Gorgoń S, Radoń A, *et al.* Magnetite nanoparticles in magnetic hyperthermia and cancer therapies: challenges and perspectives. *Nanomaterials (Basel)*, 2022, **12**(11): 1807
- [15] 郭丽红, 郝蓬亮, 马文珠. 艾灸辅助治疗肿瘤临床研究进展. *山西中医*, 2014, **30**(8): 54-56
- Guo L H, Hao P L, Ma W Z. *Shanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2014, **30**(8): 54-56
- [16] Yang J, Zheng X, Jin R, *et al.* Effect of moxa smoke produced during combustion of Aiye (*Folium Artemisiae Argyi*) on behavioral changes in mice inhaling the smoke. *J Tradit Chin Med*, 2016, **36**(6): 805-811

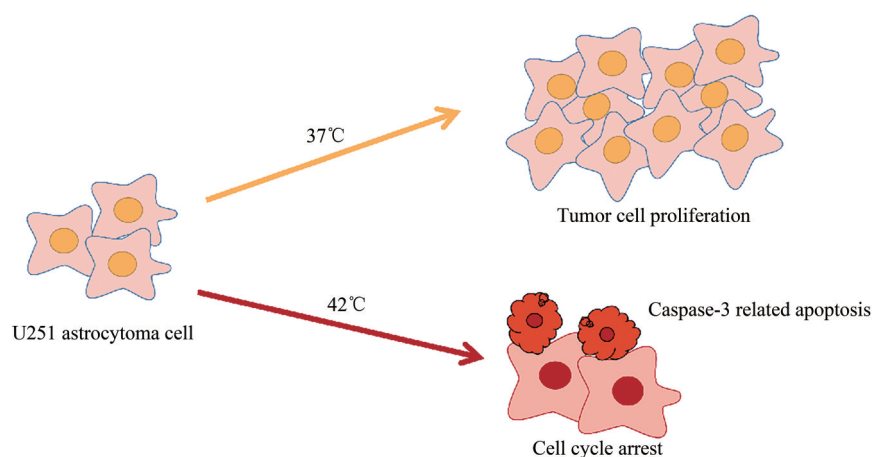
Hyperthermia at 42°C Inhibited The Proliferation and Induced Apoptosis of U251 Cells*

WU Cong-Ying¹⁾, ZHOU Cui¹⁾, ZHANG Jie^{2)**}

(¹⁾Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 101121, China;

(²⁾Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Moxibustion is a classic traditional Chinese medicine treatment that combines physical therapy (hyperthermia) and chemical therapy. It has been shown to have an inhibitory effect on a variety of cancers, but the cellular biological mechanism is still unclear. This study aims to study the effect of hyperthermia on astrocytic cancer cell line U251, and to reveal the effect of moxibustion on cancer cells through hyperthermia. **Methods** The morphological changes of U251 cells treated with hyperthermia at 42°C for 108 h were recorded by microphotography. The changes of total cell number, live cell number and live cell proportion were detected by cell counting after 3 d of hyperthermia to evaluate the effects of hyperthermia on cell proliferation and death. The effect of hyperthermia on cell apoptosis was evaluated by detecting Annexin V and Caspase-3. **Results** Hyperthermia significantly inhibited cell proliferation and increased cell death. Compared with the control group, the U251 cells treated with hyperthermia had obvious nuclear pyknosis, and Annexin V and PI markers were significantly increased, indicating that the cell death caused by hyperthermia was mainly caused by Caspase related apoptosis. **Conclusion** This study demonstrated that hyperthermia can inhibit cell proliferation and induce Caspase related apoptosis in astrocytic cell line U251.

Key words hyperthermia, apoptosis, astrocytoma

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0458

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81901155).

** Corresponding author.

Tel: 86-10-83573238, E-mail: zhangjie2013bjmu@163.com

Received: September 23, 2022 Accepted: October 16, 2022