

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.01.005

中频交变微电流联合紫杉醇抗 A549 细胞作用的研究*

梁 衡^{1,2} 于宏珠³ 毛 昀¹ 路晓光¹ 谢 青⁴ 唐劲天³ 李利亚^{1,2,Δ}

(1 北京中医药大学 北京 100029; 2 中日友好医院中西医结合肿瘤科 北京 100029;

3 清华大学工程物理系医学物理与工程研究所医疗新技术实验室 北京 100084;

4 贵州医科大学附属医院中医科 贵州 贵阳 550001)

摘要 目的:研究中频交变微电流联合紫杉醇注射液抗 A549 细胞的作用及机制。**方法:**对处于对数生长期的肺腺癌 A549 细胞施加电刺激、紫杉醇及电刺激联合紫杉醇三种不同处理,采用 MTT 法检测 A549 细胞存活率,并利用流式细胞仪测量分析各组细胞凋亡/死亡比例及细胞周期状态。**结果:**通过不同参数的中频交变微电流刺激 A549 细胞,得到的最低细胞存活率(参数 150 kHz、90 mA、30 min)为 $78.02 \pm 0.73\%$ ($P < 0.01$);联合紫杉醇注射液半抑制浓度(IC_{50})干预后,细胞存活率为 $32.87 \pm 0.94\%$ ($P < 0.01$);同时发现中频交变微电流联合紫杉醇注射液能促进 A549 细胞凋亡,阻滞细胞于 S 期、G2/M 期。**结论:**中频交变微电流可抑制 A549 细胞增殖、促进凋亡,但对细胞周期影响不明显;与紫杉醇注射液联合应用时具有协同增强抗肿瘤作用。

关键词: 中频交变微电流;紫杉醇注射液;A549 细胞;细胞周期;凋亡**中图分类号:** R-33; Q64; Q68; R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)01-24-06Effect of Alternating Micro-current at Intermediate Frequency(ACIF)
Combined with Paclitaxel on A549 Cells*LIANG Heng^{1,2}, YU Hong-zhu³, MAO Yun¹, LU Xiao-guang¹, XIE Qing⁴, TANG Jin-tian³, LI Li-ya^{1,2,Δ}

(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China; 2 Oncology Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029, China;

3 Institute of Medical Physics and Engineering Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing, 100084, China;

4 Traditional Chinese Medicine Department, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, 550001, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect and mechanism of Alternating Micro-current at Intermediate Frequency (ACIF) in combination with paclitaxel injection against A549 cells in vitro. **Methods:** The A549 cells was exposed to ACIF, paclitaxel and the combination of both in logarithmic phase. The cell growth rate was measured by MTT assay. Cell Apoptosis/death rate and cell cycle status were analyzed by flow cytometry. **Results:** A549 cells were exposed to different ACIF parameters. The lowest cell survival rate was $78.02 \pm 0.73\%$ (parameter 150 kHz, 90 mA, 30 min) ($P < 0.01$). After the intervention of paclitaxel (IC_{50}), the cell survival rate was $32.87 \pm 0.94\%$ ($P < 0.01$). It was found that the combination of ACIF and paclitaxel can promote apoptosis of A549 cells, and block cells in S and G2/M phases. **Conclusion:** ACIF can promote apoptosis of A549 cells, but has no obvious effect on cell cycle. When combined with paclitaxel injection, it has synergistic enhancement of anti-tumor effect.

Key words: Alternating Micro-current at Intermediate Frequency(ACIF); Paclitaxel injection; A549 cells; Cell cycle; Apoptosis**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; Q64; Q68; R734.2 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2020)01-24-06

前言

肺癌是近年全球发生率及死亡率位居首位的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)占 85%以上^[1]。目前 NSCLC 常规治疗方法的疗效不能令人十分满意,亟需寻找新的治疗技术提高 NSCLC 的治疗效果。

电流电场是肿瘤治疗的研究热点,代表方法有电化疗法^[2]、肿瘤治疗电场^[3,4]等。其中肿瘤治疗电场可引起细胞的免

疫原性死亡,被 FDA 批准应用于神经胶质母细胞瘤的治疗,并于 2016 年开始进行 NSCLC 脑转移的三期临床试验。本实验室自主研发中频交变微电流(alternating micro-current at intermediate frequency, ACIF)并研究其抗肿瘤效果,研究证实 ACIF 对人肝癌 Hep-2 细胞、BEL-7420 细胞、人胶质瘤 U251 细胞、乳腺癌 MCF-7 等多种肿瘤细胞具有不同程度的增殖抑制作用^[5-7],且具有机体损伤低、易操作、低毒等作用优点^[8]。同时 ACIF 可减少肿瘤细胞耐药、增加化疗药物细胞摄取率,

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81372412)

作者简介:梁衡(1992-),女,硕士研究生,主要研究方向:恶性肿瘤中西医结合治疗,E-mail: 244063334@qq.com

Δ 通讯作者:李利亚(1962-),女,主任医师,硕士生导师,主要研究方向:恶性肿瘤中西医结合治疗,

E-mail: liliya207@163.com,电话:13910051282

(收稿日期:2019-05-21 接受日期:2019-06-18)

具有化疗增敏作用^[9]。但目前还没有 ACIF 对 NSCLC 的相关研究。而紫杉醇是 NSCLC 的重要一线用药,可抑制肿瘤细胞分裂、诱导细胞凋亡^[11]。

本实验将初步探索中频交变微电流及其联合紫杉醇对 A549 细胞的作用、机制及用于 NSCLC 治疗的可行性。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药品与试剂

人肺癌 A549 细胞株,由北京协和细胞库提供;紫杉醇注射液(30 mg/5 mL)批号:国药准字 H10980069,购自北京协和药厂(国产);MTT,北京兰博利德生物技术有限公司;DMEM 培养基,美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS),美国 Hyclone 公司,细胞 DNA 含量(细胞周期)即时检测试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 仪器设备

中频交变微电流治疗仪,由清华大学医疗新技术实验室研发,参数范围:频率 0-500 kHz,电流 0-150 mA,正弦波。电极:铂金材质;L 形电极:铂金材质;多功能读数仪-酶标仪,美国 Thermo Scientific 公司;BD FACSCalibur 型流式细胞分析仪,美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 A549 细胞使用 DMEM 完全培养液(含 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素、链霉素),于 37℃、5%CO₂ 条件下进行常规培养,每 1-2 天更换新鲜培养基,当细胞贴壁生长至 80-90%左右时进行传代。实验时,将处于对数生长期的 A549 细胞用 PBS 冲洗 2 次,胰酶消化 2-3 min 后,加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化,吹打混匀,吸入离心管中离心,调整细胞数目至所需细胞浓度。

1.3.2 不同频率中频交变微电流对 A549 细胞增殖的影响 设置对照组:正常培养细胞;电刺激组:选取中频交变微电流参数为 70 mA、30 min,分别以 50 kHz、100 kHz、150 kHz、200 kHz、300 kHz、400 kHz 的电流频率刺激 A549 细胞,每个频率组设置 5 个复孔。将细胞浓度为 1×10^4 个/mL 的 A549 细胞悬液,按每孔 2 mL 接种于 24 孔板,在置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时后,分别予以不同电流频率的中频交变微电流刺激 A549 细胞,每 24 小时刺激 1 次,共刺激 3 次。电流刺激结束后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 100 μ L,避光孵育 4 h,弃去上清液,每孔加入 600 μ L DMSO 水平低速震荡 10 min,使结晶充分溶解后,使用酶标仪检测 490 nm 波长处每孔的 OD 值并计算各组细胞存活率。细胞存活率(%)=实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 $\times$ 100%。

1.3.3 不同电流强度的中频交变微电流对 A549 细胞增殖的影响 设置对照组:正常培养细胞;电刺激组:选取中频交变微电流参数为 150 kHz、30 min,分别以 50 mA、70 mA、90 mA、110 mA、130 mA、150 mA 的电流强度刺激 A549 细胞,每组设置 5 个复孔。将细胞浓度为 1×10^4 个/mL 的 A549 细胞悬液,按每孔 2 mL 接种于 24 孔板,在置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时后,分别予以不同电流强度的中频交变微电流刺激 A549 细胞,每 24 小时刺激 1 次,共刺激 3 次。电流

刺激结束后,MTT 法测定每孔的 OD 值并计算各组细胞存活率。(方法同 "1.3.2" 项)。

1.3.4 不同时间的中频交变微电流对 A549 细胞增殖的影响 设置对照组:正常培养细胞;电刺激组:选取中频交变微电流参数为 150 kHz、90 mA,分别以 15 min、30 min、45 min、60 min 的作用时间刺激 A549 细胞,每个时间组设置 5 个复孔。将细胞浓度为 1×10^4 个/mL 的 A549 细胞悬液,按每孔 2 mL 接种于 24 孔板,置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时后,分别予以不同作用时间的中频交变微电流刺激 A549 细胞,每 24 小时刺激 1 次,共刺激 3 次。电流刺激结束后,MTT 法测定每孔的 OD 值并计算各组细胞存活率。(方法同 "1.3.2" 项)。

1.3.5 不同浓度紫杉醇注射液抑制 A549 细胞增殖的研究 设置对照组:正常培养细胞;紫杉醇组:将含有紫杉醇注射液的药物培养基分别调整浓度为:0.01 nmol/L、0.1 nmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1000 nmol/L,每一浓度组设置 5 个复孔。将细胞浓度为 1×10^4 个/mL 的 A549 细胞悬液,按每孔 2 mL 接种于 24 孔板,置于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时后,换入上述浓度的紫杉醇药物培养基并避光培养,在培养 72 h 后,MTT 法测定每孔的 OD 值并计算各组细胞存活率。(方法同 "1.3.2" 项)。

1.3.6 中频交变微电流联合紫杉醇对 A549 细胞增殖的影响 设置对照组:正常培养细胞;电刺激组:选取中频交变微电流参数为 150 kHz、90 mA、30min;紫杉醇组:选取紫杉醇药物培养基的半抑制浓度为 10.05 nmol/L(IC₅₀);联合组:电刺激联合紫杉醇组。将细胞浓度为 1×10^4 个/mL 的 A549 细胞悬液,按每孔 2 mL 接种于 24 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时后,紫杉醇组及联合组分别给予 10.05 nmol/L 的紫杉醇注射液;同时电刺激组及联合组给予每隔 24 小时中频交变微电流刺激 1 次,共 3 次;各组细胞培养 72 h 后,测定各组的 OD 值并计算细胞存活率(方法同 "1.3.2" 项)。

1.3.7 流式细胞术检测 A549 细胞的凋亡 / 死亡及细胞周期 分组方法同 "2.6" 项。取对数生长期的 A549 细胞,将细胞浓度为 1×10^6 个/mL 的处于对数生长期的 A549 细胞,按每孔 2 mL 接种于 24 孔板中,每组设置 10 个复孔,置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时后,紫杉醇组及联合组分别给予 10.05 nmol/L 紫杉醇;同时电刺激组及联合组给予每隔 24 小时中频交变微电流刺激 1 次,共 3 次,各组细胞处理 72 h。

(1) 细胞凋亡 / 死亡 各组细胞在用不含 EDTA 的胰酶消化后搜集至离心管内,于 2000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 PBS 洗涤 2 次后于 2000 r/min 离心 5 min 小心收集细胞。加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞,予 5 μ L 的 Annexin V-FITC 混匀后,再加入 5 μ L 的 Propidium Iodide 混匀,室温避光反应 10 min 后,流式细胞仪检测细胞凋亡 / 死亡。

(2) 细胞周期 各组细胞用胰酶消化搜集到离心管,于 800 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用 PBS 洗涤 2 次后,于 2000 r/min 离心 5 min,小心搜集并调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,取 1 mL 的单细胞悬液离心,弃去上清液,在细胞中加入 500 μ L 体积分数为 70%的冷乙醇溶液,置于 4℃环境固定 2 h。于 2000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入 100 μ L RNaseA 后置于 37℃水浴 30 min,再加入 400 μ L PI 染色均匀,4℃避光

保存 30 min 后,流式细胞仪检测细胞周期。

1.4 处理数据

数据使用 SPSS20.0 处理,以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验进行统计学分析,其中 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有显著性差异。

2 结果

2.1 不同频率的中频交变微电流对 A549 细胞增殖的影响

实验选取的中频交变微电流参数为 70 mA、30 min, 分别以 50 kHz、100 kHz、150 kHz、200 kHz、300 kHz、400 kHz 的电流频率刺激 A549 细胞, 每 24 小时刺激 1 次, 共刺激 3 次, MTT 法检测细胞存活率。结果显示,除 50 kHz 小频率电流外,不同频率的中频交变微电流对 A549 细胞均具有抑制作用,其中 150 kHz 的中频交变微电流具有最优 A549 细胞增殖抑制作用(见表 1)。根据实验结果,我们选取 150kHz 作为后续电流频率参数。

表 1 不同频率电流作用 A549 细胞的存活率
Table 1 The survival rate of A549 cell in different ACIF frequency

Frequency	50 kHz	100 kHz	150 kHz	200 kHz	300 kHz	400 kHz
Survival rate	99.02± 1.32*	92.77± 2.83**	82.25± 0.54**	87.22± 2.03**	93.88± 1.70**	92.42± 0.80**

Note: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs control group.

2.2 不同电流强度的中频交变电流对 A549 细胞增殖的影响

实验选取中频交变微电流参数为 150 kHz、30 min, 分别以 50 mA、70 mA、90 mA、110 mA、130 mA、150 mA 的电流强度刺激 A549 细胞, 每 24 小时刺激 1 次, 共作用 3 次, MTT 法检测

细胞存活率。实验结果显示:不同电流强度对 A549 细胞均起到了较明显的抑制细胞增殖作用,其中 90 mA 对 A549 细胞的增殖抑制作用最强(见表 2)。故选取 90 mA 作为后续电流强度参数。

表 2 不同电流强度作用 A549 细胞的存活率
Table 2 The survival rate of A549 cell in different ACIF intensity

Intensity	50 mA	70 mA	90 mA	110 mA	130 mA	150 mA
Survival rate	95.38± 1.32*	83.01± 0.65**	78.34± 0.79**	85.41± 1.47**	92.73± 2.39**	94.78± 2.05*

Note: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs control group.

2.3 不同时间的中频交变电流对 A549 细胞增殖的影响

实验选取中频交变微电流参数为 150 kHz、90 mA, 分别以 15 min、30 min、45 min、60 min 的作用时间刺激 A549 细胞, 每 24 小时刺激 1 次, 共作用 3 次, MTT 法检测细胞存活率。实验结果提示:随着中频交变微电流的作用时间增长, A549 细胞增

殖率呈逐步下降趋势, 但长于 30 min 的作用时间其对应的细胞增殖率降低幅度在逐渐减缓, 故 30 min 的作用时长具有较明显且经济的 A549 细胞增殖抑制作用(见表 3)。故选用 30 min 作为后续电流时间参数。

表 3 不同时间电流作用 A549 细胞的存活率
Table 3 The survival rate of A549 cell in different ACIF time

Time	15 min	30 min	45 min	60 min
Survival rate	94.31± 2.01*	78.02± 0.73**	77.53 ± 1.26**	75.12± 1.17**

Note: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs control group.

2.4 不同浓度紫杉醇注射液抑制 A549 细胞增殖的研究

根据对 A549 细胞增殖率的检测可以看出,随着紫杉醇药物浓度的提高,紫杉醇在体外对 A549 细胞具有明显增殖抑制

作用(见表 4)。经过对实验结果的分析计算,紫杉醇注射液的 IC_{50} 浓度为 10.05 nmol/L。故选取 10.05 nmol/L 为后续实验的药物浓度参数。

表 4 不同浓度紫杉醇注射液作用 A549 细胞的存活率
Table 4 The survival rate of A549 cell in different concentration paclitaxel

Concentration	0.01 nmol/L	0.1 nmol/L	1 nmol/L	10 nmol/L	100 nmol/L	1000 nmol/L
Survival rate	97.46± 1.28*	79.67± 2.13**	63.88± 0.59**	50.47± 1.11**	28.65± 1.13**	7.89± 1.71**

Note: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs control group.

2.5 中频交变微电流联合紫杉醇对 A549 细胞增殖的影响

通过对电刺激组、紫杉醇组及联合组的相对细胞增殖率进行测定, 与对照组相比, 各组的细胞增殖率分别为 (78.02± 0.73)%、(50.34 ± 1.26)%、(32.87 ± 0.94)% ($P < 0.01$)。可见对

A549 细胞, 中频交变微电流联合紫杉醇共同作用比单纯电刺激或药物刺激具有更加明显增殖抑制作用。

2.6 中频交变微电流联合紫杉醇对 A549 细胞凋亡 / 死亡的影响

对不同实验组进行操作后,使用流式细胞仪采用 Annexin-V-FITC/PI 法检测 A549 细胞的凋亡率。流式细胞仪结果如下,图中的左下方象限内为正常 A549 细胞,左上方象限内为细胞碎片,右上方象限内为晚期凋亡及坏死的细胞,右下方象限内为早期凋亡细胞。总凋亡率为早期与晚期凋亡细胞总和。

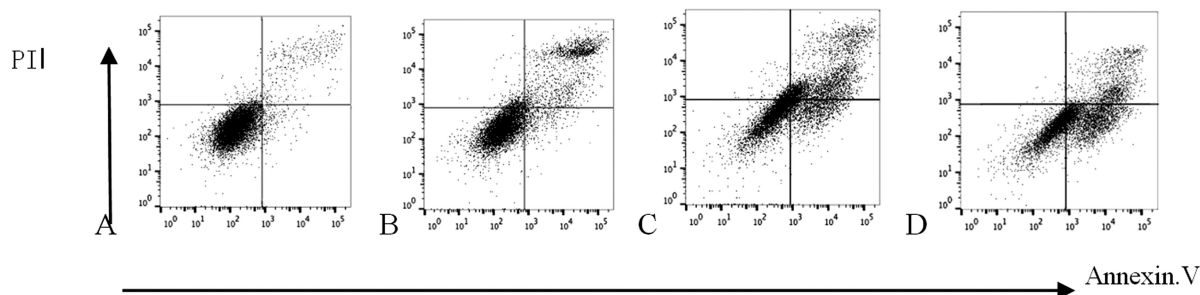


图 1 各组 A549 细胞的凋亡 / 死亡情况

Fig.1 Apoptosis/death of A549 cells in each group

Note: A: Control group. B: ACIF group. C: TAX group. D: Joint group

表 5 A549 细胞凋亡率检测

Table 5 The detection of A549 cells' apoptosis rate

Groups	The proportion of A549 cells(%)				
	Survival rate	Cell fragment	Late apoptotic rate	Early apoptotic rate	Apoptosis rate
Control	91.20± 0.87	0.50± 0.52	8.10± 1.31	1.20± 0.75	9.30± 1.27
ACIF	76.70± 0.73**	4.70± 0.27*	13.30± 0.98**	5.30± 1.03**	18.60± 0.92**
TAX	51.20± 1.32**	10.20± 2.12**	24.40± 1.01**	14.20± 0.85**	38.60± 1.42**
Jiont	34.40± 0.89**	2.30± 1.46*	18.50± 0.83**	44.80± 1.35**	63.30± 1.11**

Note: * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ vs control group.

2.7 中频交变微电流联合紫杉醇对 A549 细胞周期的影响

流式细胞仪结果显示,与对照组相比,电刺激组 G₀/G₁ 期细胞增加, S 期、G₂/M 期细胞减少,变化幅度较小,说明单纯中频交变微电流刺激对 A549 细胞具有轻度细胞周期影响作用,将细胞阻滞于 G₀/G₁ 期;紫杉醇处理组 G₂/M 期、S 期细胞明显增多, G₀/G₁ 期细胞明显减少,说明紫杉醇可以明显影响 A549 细胞周期,将其阻滞于 G₂/M 期、S 期;中频交变微电流联合紫杉醇组 G₂/M 期、S 期细胞明显增多, G₀/G₁ 期细胞百分比降至极低水平,但较紫杉醇组细胞,联合组的 G₂/M 期、S 期细胞比例增加幅度较小;故可说明,中频交变微电流联合紫杉醇对 A549 细胞周期具有明显的细胞周期阻滞作用,可将其阻滞于 G₂/M 期、S 期;但较单纯应用紫杉醇,联合治疗对细胞周期阻滞仅具有轻度促进作用。(见图 2)。

3 讨论

NSCLC 作为发生率及死亡率最高的恶性肿瘤,近年来关于它的靶向、免疫学等治疗新方式及联合传统治疗方法的研究备受关注。基于中频交变电场在抗肿瘤领域的应用,本实验室率先提出中频电场与交变电流结合的思想并研发出中频交变微电流治疗仪。前期研究表明,肿瘤细胞具有旺盛的有丝分裂能力,导致多数细胞的胞内电场分布不均,故在外加电场及电流的作用下,细胞内的带电粒子和极性分子可定向移动至细胞

对比实验结果可知,单纯电刺激及紫杉醇药物刺激均具有促进 A549 细胞凋亡的作用,对比对照组具有显著性差异;中频交变微电流联合紫杉醇共同作用后可见 A549 晚期凋亡细胞及坏死细胞明显增多,说明电刺激联合紫杉醇具有协同增敏、促进 A549 细胞凋亡的作用(见图 1、表 5)。

分裂沟内,破坏微管蛋白的聚合和解聚,干扰两级纺锤体的形成,此现象称为介电电泳现象^[12]。JQ Tong 等^[13]实验研究提示,中频交变微电流在不改变细胞生存环境温度及酸碱性的前提下,利用非热效应,可刺激细胞产生脂囊泡、电穿孔等现象,改变细胞膜的电位差及结构,影响膜蛋白功能及细胞内外离子平衡,引起细胞凋亡。紫杉醇注射液是以微管为作用靶点的抗肿瘤药物,通过调节 mTOR、ROS、AKT/MARK 等信号通路,诱导和促进微管蛋白聚合、抑制微管解聚,抑制纺锤体的形成,将肿瘤细胞阻滞于 G₂/M 期,从而抑制肿瘤细胞增殖并诱导凋亡^[14,15]。目前还没有关于中频交变电流及其联合紫杉醇对 A549 细胞作用的相关研究。因此,本实验为首次对中频交变微电流及其联合紫杉醇对肺腺癌 A549 细胞作用效果的探索。

本实验通过 MTT 法检测经不同频率、强度及时间的中频交变微电流处理后的 A549 细胞存活率后,发现不同参数的中频交变微电流对 A549 细胞具有不同程度的增殖抑制作用,最终选定的最优增殖抑制参数为 150 kHz、90 mA、30 min,此条件下 A549 细胞相对存活率可降低至 78.02± 0.73%($P<0.01$)。中频交变微电流联合紫杉醇(IC₅₀)作用后 A549 细胞相对存活率为 32.87± 0.94%($P<0.01$),结果提示,相较单纯电刺激或紫杉醇药物作用,中频交变微电流联合紫杉醇对 A549 细胞具有协同增效杀伤肿瘤细胞的作用。

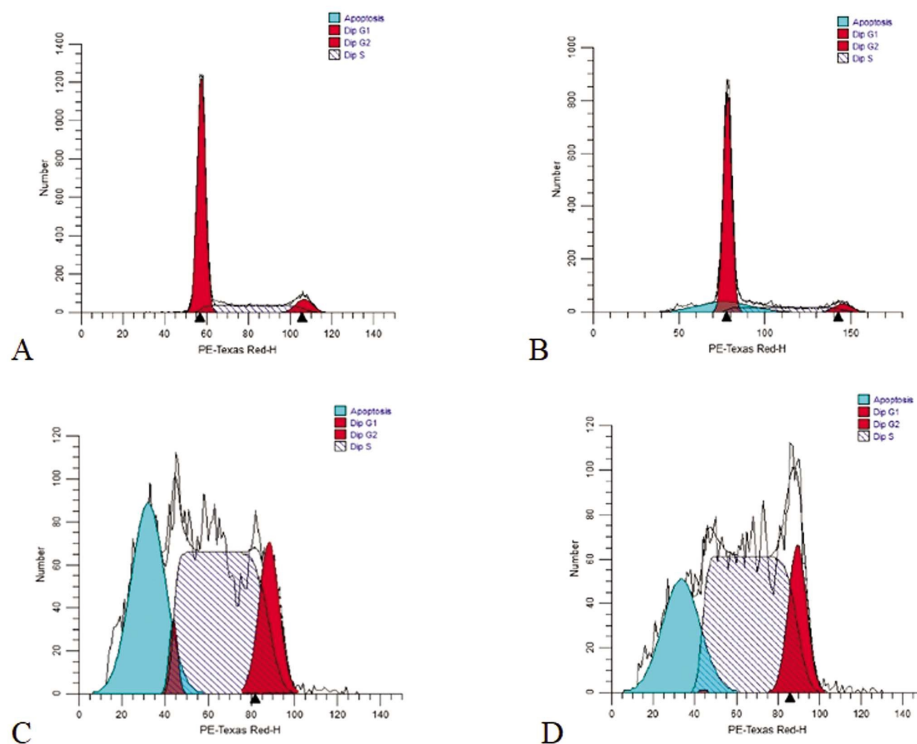


图2 不同治疗对 A549 细胞的细胞周期影响

Fig.2 The proportion of A549 cells in different treatment group

Note: A: Control group. B: ACIF group. C: TAX group. D: Joint group

表6 A549 细胞不同周期细胞所占比例

Table 6 The proportion of A549 cells in each phase of cell cycle

Groups	The proportion of A549 cells(%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	71.18± 1.89	21.04± 2.06	7.78± 2.31
ACIF	78.02± 2.15**	16.22± 1.32*	5.76± 1.84*
TAX	8.26± 1.29**	63.04± 0.92**	28.70± 1.53**
Joint	0.15± 1.30**	67.22± 2.40**	32.63± 1.24**

Note: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs control group.

恶性肿瘤细胞具有对抑制生长信号不敏感、规避细胞凋亡等生长特点,而细胞毒性药物主要是通过抑制肿瘤细胞的增殖和/或诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用,其中诱导肿瘤细胞凋亡是抗肿瘤治疗的关键点之一^[16]。实验证实紫杉醇可通过上调 miR-7 表达,减少抗凋亡分子 Bcl-2 及其相关 mRNA 表达水平,起到抑制肺腺癌 A549 细胞增殖及促进细胞凋亡的作用^[17]。在本实验的流式细胞仪检测细胞凋亡/死亡结果中,电刺激组的细胞凋亡率为 $18.60 \pm 0.92\%$,紫杉醇组的细胞凋亡率为 $38.57 \pm 1.42\%$,相比于对照组的细胞凋亡率均有明显增加,表明中频交变微电流及紫杉醇注射液均具有促进 A549 细胞凋亡的作用;而联合组的细胞凋亡率为 $63.33 \pm 1.11\%$,明显高于单纯电刺激或紫杉醇作用组,结果表明中频交变电流联合紫杉醇具有协同促进 A549 细胞凋亡的作用。

细胞经过 G₁/S 期、G₂/M 期完成一次有丝分裂得到子代细胞。该过程需要大量的细胞内外信号相互配合及物质合成供应,在该过程的 G₁/S、G₂/M 两个细胞周期检查点中,可通过人

为调控细胞内基因表达及物质合成,阻滞细胞进入下一阶段,该现象细胞周期阻滞^[18]。研究发现调控 p38MARK 与 MT-BT 表达可参与 NSCLC 细胞的 G₂/M 期阻滞^[19],而下调细胞周期正调控蛋白 Cyclin A-CDK2、Cyclin D1-CDK4、Cyclin E-CDK2 的相对表达,可抑制转录因子 E2F 释放,达到将细胞阻滞于 S 期的目的^[20]。本实验中的细胞周期检测结果显示,联合组的 G₀/G₁ 期细胞降至极低水平,仅为 $0.15 \pm 1.30\%$,而 S 期、G₂/M 期及凋亡细胞明显增多(分别为 $(67.22 \pm 2.40\%、32.63 \pm 1.24\%)$);但相比单纯紫杉醇作用细胞,联合组的 S 期、G₂/M 期细胞比例仅见轻度升高(紫杉醇组为 $63.04 \pm 0.92\%、28.70 \pm 1.53\%$)。因此可见中频交变微电流联合紫杉醇可将 A549 细胞阻滞于 S 期及 G₂/M 期。但对比单纯紫杉醇作用,紫杉醇联合中频交变微电流的联合作用对细胞周期阻滞的仅有轻度促进作用。笔者猜测中频交变微电流联合紫杉醇的细胞周期阻滞作用是否上调细胞内 p38MARK、MT-BT 基因表达,下调细胞周期正调控蛋白水平有关,同时细胞周期阻滞是否可使肿瘤细胞

位于细胞周期检查点时间延长,增加细胞肿瘤暴露于紫杉醇作用的时间,从而导致联合治疗具有更强的抑制肿瘤增殖及促进细胞凋亡的作用。

本研究表明中频交变微电流对 A549 细胞具有一定的抑制增殖、促进凋亡的作用;同时其联合紫杉醇注射液对 A549 细胞的增殖可表现出协同增效作用,其抗 A549 细胞机制与诱导细胞凋亡、促进细胞周期阻滞相关。中频交变微电流及联合药物的抗肿瘤作用研究为 NSCLC 的治疗新技术及药物增敏提供了的全新思考方向,为我国创新肿瘤物理治疗新技术开拓了新思路,但其分子作用机制及临床应用方式尚需进一步深入研究。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin. 2017, 67(1): 7-30
- [2] Goggins CA, Khachemoune A. The use of electrochemotherapy in combination with immunotherapy in the treatment of metastatic melanoma: a focused review [J]. Int J Dermatol 2018 Nov 26 [Epub ahead of print]
- [3] Pless M, Weinberg U. Tumor treating fields: concept, evidence and future[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2011, 20(8): 1099-106
- [4] Gera N, Yang A, Holtzman TS, et al. Tumor treating fields perturb the localization of septins and cause aberrant mitotic exit [J]. PLoS ONE, 2015, 10(5): e0125269
- [5] 马俊,王然,唐劲天,等. 中频交变电流抑制肿瘤细胞的体外增殖[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(11): 2032-203
- [6] 毛 昀,谢青,张北山,等. 中频交变微电流联合替莫唑胺对 U251 细胞的影响[J].现代肿瘤医学, 2018, 26(16): 2494-2498
- [7] 谢青,王晓文,汪悦,等. 中频交变电流联合紫杉醇抗乳腺癌 MCF-7 细胞作用的研究[J]. 中日友好医院学报, 2017, 31(01): 26-30+2
- [8] Davvies A, Weinberg U, Palti Y. Tumor treating fields: a new frontier in cancer therapy[J]. Ann New York Academy Sci, 2013: 86-95
- [9] Janigro D, Perju C, Fazio V, et al. Alternating current electrical stimulation enhanced chemotherapy: a novel strategy to bypass multidrug resistance in tumor cells[J]. BMC Cancer, 2006, 6: 72
- [10] 谢柳倩, 马俊, 王晓文, 等. 中频交变微电流影响人乳腺癌细胞耐药性的初步研究[J].现代肿瘤医学, 2015, 23(16): 2251-2255
- [11] Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells [J]. Mol Biol Cell, 2014, 25(18): 2677-2681
- [12] Moshe G, Rosa SS, Tali, et al. Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells [J]. Sci Rep, 2015, 5: 18046
- [13] Tong J Q, Liu R T, Zhao L Y, et al. Inhibiting Human Breast Cancer Cells (MCF-7) with Alternating Micro-current at Intermediate Frequency (ACIF) in Vitro and in Vivo [C]. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering. Beijing, China: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 1596-1599
- [14] Baotong Z, Ranran Z, Yuan H, et al. Micro RNA 100 sensitizes luminal A breast cancer cells to paclitaxel treatment in part by targeting mTOR[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 5702-5714
- [15] Xiaoli R, Bingbing Z, Hongjian C, et al. Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the AKT/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 8289-8299
- [16] Mark A. Feitelson, AA, Rob J, et al. Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets [J]. Semin Cancer Biol, 2015, 35(Suppl): S25-S54
- [17] 孙红亚, 李纪鹏, 邵静萍. 紫杉醇通过上调 miR-7 抑制非小细胞肺癌细胞的抗增殖作用并促进其凋亡的应用研究[J].中国药物与临床, 2019, 19(01): 8-10
- [18] Natalia BM, Gabriela CS, Juan CR, et al. Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies[J]. Curr Genomics, 2017, 18(2): 106-131
- [19] Li Y, Zhang X, Zhang J, et al. A small molecule MTBT prevents cancer cell growth by activating p38 MAPK [J]. Anti-cancer drugs, 2014, 25(4): 423-432
- [20] Vanessa O, Weili W, Brittney H, et al. Cyclin A/Cdk2 regulates Cdh1 and claspain during late S/G2 phase of the cell cycle [J]. Cell Cycle, 2014, 13(20): 3302-3311
- [24] Wang X F, Liu X J, Zhou Q M, et al. Ginsenoside rb1 reduces isoproterenol-induced cardiomyocytes apoptosis in vitro and in vivo [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 454389
- [25] 赵丹丹,白颖,吴瑞,等. 人参皂苷 Rb1 对肥胖小鼠骨骼肌胰岛素抵抗及 AMPK 信号通路的影响[J].世界中医药, 2019, 14(04): 852-858
- [26] Zheng X, Wang S, Zou X, et al. Ginsenoside Rb1 improves cardiac function and remodeling in heart failure [J]. Exp Anim, 2017, 66(3): 217-228
- [27] Ji L, Liu F, Jing Z, et al. MICU1 Alleviates Diabetic Cardiomyopathy Through Mitochondrial Ca^{2+} -Dependent Antioxidant Response [J]. Diabetes, 2017, 66(6): 1586-1600
- [28] Wu K M, Hsu Y M, Ying M C, et al. High-density lipoprotein ameliorates palmitic acid-induced lipotoxicity and oxidative dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells via ROS suppression [J]. Nutr Metab (Lond), 2019, 16: 36
- [29] Volpe C, Villar-Delfino P H, Dos A P, et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 119
- [30] Teshima Y, Takahashi N, Nishio S, et al. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase[J]. Circ J, 2014, 78(2): 300-306