

深低温反复冻融杀伤人眼脉络膜黑色素瘤 OCM-1 细胞的机制

刘 斌, 李永平, 张 波, 张文忻, 彭 展

(眼科学国家重点实验室//中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘 要: 【目的】研究 -70℃ 反复冻融体外杀伤人眼脉络膜黑色素瘤细胞系 OCM-1 的机制。【方法】OCM-1 细胞反复冻融后,用噻唑蓝比色法及克隆形成实验检测细胞的杀伤情况和细胞生长活力,免疫组织化学方法检测细胞 P16 表达的变化,电镜及共聚焦显微镜观察冻融后细胞凋亡和坏死的形态学改变,并测定细胞的凋亡比率,流式细胞仪检测冻融前后细胞 CD40 表达比率及细胞膜电位的变化。【结果】噻唑蓝比色法检测及克隆形成实验显示,冻融可以直接杀伤 OCM-1 细胞,且残存的细胞生长能力也明显受抑制。免疫细胞化学染色见对照组的细胞呈 P16 阳性,而冻融后的细胞均呈阴性,冻融后培养的细胞部分呈阳性。电镜下观察到冰晶的结构特征及细胞的坏死和凋亡等变化。激光共聚焦显微镜观察发现凋亡细胞随着冻融次数的增加而增多。流式细胞仪测定显示冻融后细胞膜电位下降,冻融前后 CD40 阳性细胞比率差异明显,且呈一定的量效关系。【结论】冻融不仅可以明显杀伤 OCM-1 瘤细胞,还能抑制残存瘤细胞生长。反复冻融能诱导大量的肿瘤细胞发生凋亡,此为杀伤肿瘤及诱导肿瘤退变的直接原因,其机制与线粒体膜电位及 P16 表达下调有关。冻融后瘤细胞坏死因子 CD40 表达增强,可能是增强机体的免疫应答,介导机体免疫杀伤瘤细胞的机理。

关键词:反复冻融; 脉络膜黑色素瘤; 细胞凋亡; CD40; 线粒体膜电位

中图分类号: R77

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0631-05

Mechanism of Repeating -70℃ Freeze Thawing on Human Choroidal Melanoma OCM-1 Cell Line

LIU Bin, LI Yong-ping, ZHANG Bo, ZHANG Wen-xin, PENG zhan

(State Key Laboratory of Ophthalmology//Zhongshan Ophthalmology Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the mechanism of repeating -70℃ freeze thawing on human choroidal melanoma cell line OCM-1. 【Methods】 OCM-1 cells were frozen by repeating -70℃ freeze thawing for various frequency, then the death rate of cells were examined by MTT assay. The cell viability was measured by clone assay. The morphological changes of the cells were observed using electron microscope and the P16 immunocytochemistry staining was performed. The cell apoptosis rate of the OCM-1 cells was examined by laser-scanning confocal microscopy (LSCM). The cell CD40 positive rates and mitochondrial membrane potential (MMP) were observed by flow cytometry (FCM). 【Results】 Growth of OCM-1 cells was inhibited by repeating -70℃ freeze thawing. And that showed freeze frequency dependent effects ($P < 0.01$). Different morphology of cells after -70℃ freeze thawing could be seen by electron microscopy. The classic morphologic characteristics of ice crystal and apoptosis were shown. The P16 immunocytochemistry staining showed positive reaction in the control group and negative reaction in the group of repeating -70℃ freeze thawing, then the positive reaction appearance in the cultured cells. Different cell apoptosis rates of the OCM-1 cells were showed by LSCM. Flow cytometry showed a positive correlation between the cell CD40 positive rates and lethal effect, but showed a inverse correlation the inverse correlation between the MMP and the cell apoptosis rate. 【Conclusion】 Freeze thawing can kill OCM-1 cells and also inhibits the growth of survivals.

收稿日期: 2007-03-20

基金项目: 国家自然科学基金 (39870801, 30672276); 广东省社会发展攻关项目 (2003A3020302)

作者简介: 刘 斌 (1980-), 男, 硕士生; 李永平, 教授, 通讯作者, 本中心病理室主任, E-mail: yongpingli1961@yahoo.com.cn

Repeating -70 freeze thawing induces a good deal of tumor cells to apoptosis, which is the immediate cause of tumor regression. The mechanism of this effect is that repeating -70 freeze thawing decreases the level of MMP and the expressed of P16. Freeze thawing induces the expressed of CD40, which may enhance immune response to kill tumor cells.

Key words: repeat freeze thawing; choroidal melanoma; apoptosis; morphology; CD40; mitochondrial membrane potential

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):631-635]

近年来,现代冷冻治疗技术因其治疗范围广、安全有效及微创等特点,在恶性肿瘤治疗中显示了令人鼓舞的应用价值^[1,2],已经成功地用于前列腺癌、气管内肿瘤、肝癌等治疗^[3-5]。冷冻在一些恶性肿瘤的早中期治疗效果明显,并能有效治愈恶性肿瘤^[6]。即便肿瘤发展到晚期甚至转移,当药物等常规治疗的手段效果非常有限时,冷冻治疗也能显示良好的效果^[7]。临床治疗上,无限制的延长冷冻治疗的时间并不现实,时间越长对正常组织造成的损害也越严重,因此,冷冻治疗肿瘤采用的方法是快速冷冻、缓慢复温、反复多次冻融^[8]。虽然冷冻治疗在临床上已广泛应用,但是反复多次冻融杀伤肿瘤细胞的机制并不十分清楚,研究其机制有助于我们在攻克肿瘤的治疗上取得进展。本实验针对冻融杀伤肿瘤细胞的机制进行研究,结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM/F12(1:1)培养基,胎牛血清(fetal calf serum FCS)均购自 Gibco 公司。小鼠抗人 P16, CD40 单克隆抗体分别购于福州迈新公司和 Chemicon 公司。荧光染料 Rhodamine 123 为 Sigma 公司产品。FITC 羊抗鼠 IgG 荧光二抗、Hoechst 33342 染色剂均购自 Dako 公司。仪器:美国 ThermoForma 生产 -86 超低温冰箱,型号:725。日本日立公司 H-600 型透射电镜。激光共聚焦荧光显微镜为德国 Zeiss, LSM 510 Meta 型。美国 BD 公司 FACSAria 型流式细胞仪和 BD FACSiVa software 数据分析软件。

1.2 实验分组

调节细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 取 1 mL 置入 EP 管, PBS 洗涤, 离心弃上清, 置入超低温冰箱, 调节温度为 -70℃, 每次冻融时间均为 0.5 min, 共分为 1、2、3、5 次共 4 组。细胞从冰箱中取出后均放于

37℃ 水浴恒温器中, 复温 2 min, 再行下一次冻融。

1.3 噻唑蓝比色法检测

将细胞按上述冻融方法分别处理后, 调节细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 取 80 μL 加入 96 孔板中, 加入培养液至 180 μL , 再加入 (3, 24, 5 dimethyliazol 22, 5 diphenyl tetrazolium bromide) MTT 液 20 μL , 每一处理条件设 6 个重复孔, 并设阴性对照组及空白对照组。继续培养 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 200 μL , 充分混匀, 在酶联免疫检测仪上测定每孔的吸光度 (A 值), 波长为 492 nm。计算细胞杀伤比率。

1.4 克隆(集落)形成实验

分别取对照组, 冻融 1、2、3、5 次组的细胞, 用台盼蓝染色方法记数 500 个活力好的细胞接种于 100 mm 培养皿中, 并使细胞分散均匀, 每组均用 3 个培养皿, 置 37℃、5%CO₂ 培养箱静止培养 14 d 后, 甲醇固定, 苏木素染色。记数细胞数 >50 为一个克隆, 计算克隆形成率。

1.5 免疫细胞化学染色

细胞经冻融处理后, 收集细胞, PBS 洗涤, 吹散, 用微量加样枪滴片, 风干, 甲醇固定。3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶 10 min, 加血清并水浴 10 min, 加入一抗 P16 后, 依次加入二抗, S-P/HRP 复合物, 上述步骤均以 PBS 缓冲液稍洗 3 次, DAB 显色, Mayer 苏木素复染细胞核, 常规脱水、透明、封片。显微镜下观察。

1.6 透射电镜观察

细胞冻融处理后, 收集细胞(细胞数量 1×10^7 个/mL)。加入 PBS, 1 000 r/min 离心 10 min ($r=12$ cm), 弃上清。放入预冷的 2% 多聚甲醛 2 戊二醛前固定液 (pH 值为 7.3) 中, 4℃ 固定 2 h, 再次离心后弃上清。制作电镜切片, 在透射电镜下观察及拍照。

1.7 激光共聚焦显微镜观察

细胞经冻融处理后, 收集细胞, PBS 洗涤, 吹散, 用微量加样枪滴片, 风干, 甲醇固定。水洗 3 min, 用 Hoechst 33342 染色 5 min, 晾干, 甘油封

片。共聚焦显微镜下观察。

1.8 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的改变

细胞冻融处理后,收集细胞(细胞数量 1×10^6)。洗涤2次,加入荧光染料 Rhodamine 123 至终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$, 于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中负载细胞 30 min 后,再次洗涤2次,在流式细胞仪下,待荧光强度稳定后,每隔 30 s 计数 10 000 个细胞,连续 5 次。荧光强度高代表细胞线粒体膜电位大小。

1.9 流式细胞仪测定 CD40 比率

细胞按上述方法冷冻后,收集细胞(细胞数量 1×10^6),每管加入 $100 \mu\text{L}$ 含 15% 多聚甲醛的 PBS, 4°C 固定 15 min,离心,弃固定液。加入含 10% FCS 的 PBS 4°C 封闭 2 h,洗涤3次后,每管加入 5

$\mu\text{g/mL}$ 的 CD40 单抗各 $100 \mu\text{L}$, 4°C 孵育 1 h,再次洗涤3次,于每孔中加入 $1:1000$ 稀释的 FITC 羊抗鼠 IgG 作为荧光二抗, 4°C 作用 0.5 h 后取出,充分洗涤3次后,并设空白对照管,使用流式细胞仪检测,并分析数据。

1.10 统计学分析方法

实验的数据均使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 12.0 软件对数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 细胞的杀伤比率

随着冻融次数增多,杀伤比率明显增加(表1)。

表1 OCM-1 细胞反复-70 $^\circ\text{C}$ 冻融后的改变

Table 1 Changes of OCM-1 cells after repeating -70 $^\circ\text{C}$ freeze thawing

($\bar{x} \pm s$)

Groups	Death rate(%)	Cloning rate(%)	Apoptosis rate(%)	MMP level	CD40 rate(%)
Control	0	27.3 ± 1.5	2.1 ± 1.1	128.3 ± 1.4	2.6 ± 0.3
0.5 x1	11.0 ± 3.5	21.6 ± 2.1	12.4 ± 2.4	87.0 ± 3.8	7.1 ± 0.3
0.5 x2	31.1 ± 2.2	15.8 ± 2.1	29.1 ± 3.2	57.2 ± 3.3	19.8 ± 0.2
0.5 x3	44.7 ± 3.1	8.7 ± 1.5	51.6 ± 3.7	38.3 ± 3.4	34.4 ± 0.2
0.5 x5	81.9 ± 2.3	4.0 ± 1.0	6.0 ± 2.9		46.2 ± 0.3
F	180.1	93.4	157.9	653.5	15560.0
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

0.5 x1: Freeze thawing 0.5 min 1 time, and so on

2.2 克隆形成实验结果

对照组细胞克隆形成较为均匀,克隆率为 $27.3\% \pm 1.5\%$ 。冻融后,细胞的贴壁能力及生长能力明显减弱。克隆形成较小,数目较少,并随着冻融次数的增加克隆形成的量进一步下降(表1)。

2.3 免疫细胞化学染色结果

对照组细胞 P16 阳性(图 1A),而冷冻后的细胞均呈阴性(图 1B),冷冻后培养的细胞部分呈阳性(图 1C)。

2.4 电镜观察结果

对照组结构完整,细胞为不规则圆形或多角形,胞浆丰富,胞质均匀,胞质内有丰富的线粒体、粗面内质网、核糖体、高尔基器、溶酶体和微丝;核膜清晰,核大,核仁明显,能见到核分裂。冻融后的细胞内发现梭形,边界清晰,低密度的裂隙,为早期冰晶的超微结构(图 2A)。镜下见大量不同时期的凋亡细胞及典型的凋亡小体(图 2B)。坏死的细胞密度降低,细胞膜破裂,消失,细胞成分外溢,染色质、胞质均溶解;有的细胞仅余核仁和完整的核

膜,其他细胞成分均消失。

2.5 共聚焦显微镜观察细胞形态变化

对照组细胞 Hoechst 33342 染色见细胞核蓝色,规则圆形,大小均一(图 3A)。冻融处理的细胞,镜下可见凋亡细胞的细胞核固缩而被 Hoechst 33342 染成亮蓝白色。不同冻融次数出现的凋亡细胞比率差异明显(表1)。0.5 x3 组出现凋亡细胞为最多(图 3B)。坏死的细胞,细胞膜消失,细胞内容物逸出,核内容物脱出呈带尾的丝状或礼花状(图 3C)。凋亡细胞随着冻融次数的增加而增多,达到一定程度后随着坏死细胞的增加反而减少。

2.6 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位的改变

冻融作用后,OCM-1 细胞线粒体的膜电位下降,增加冻融次数,下降程度更加明显(表1)。

2.7 流式细胞仪测定细胞 CD40 的阳性比率

对照组的 OCM-1 细胞也有 $2.6\% \pm 0.3\%$ 的细胞表达 CD40,随冻融次数增加,CD40 表达率上升(表1)。

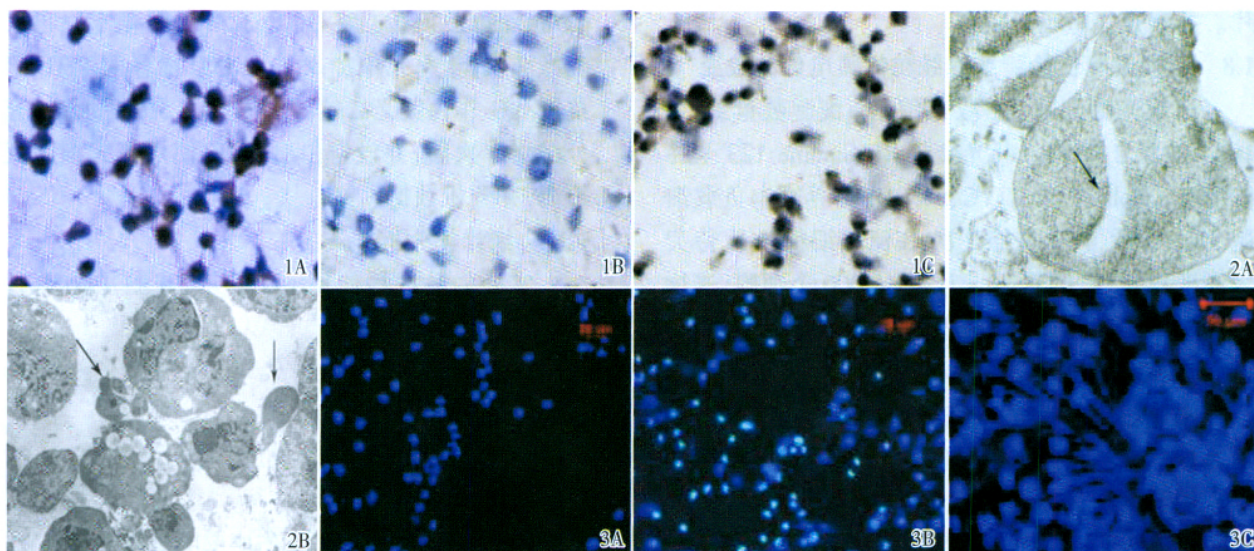


图 1 P16 免疫细胞化学染色 图 2 透射电镜观察 图 3 OCM-1 冻融后的激光共聚焦荧光显微镜观察

Fig.1 The P16 immunocytochemical stain

A: The P16 immunohistochemistry staining showed positive reaction in the control group; B: The P16 immunohistochemistry staining negative reaction in the group of freeze thawing; C: The P16 immunohistochemistry staining showed the positive reaction in the cells with cultured after freeze thawing ($\times 200$);

Fig.2 Transmission electron microscope of the OCM-1 cells after repeating $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ freeze thawing

A: The classic morphologic characteristics of ice crystal (\uparrow) could be seen ($\times 17\ 000$); B: Cells after freeze thawing appeared chromosomal concentrated, and the concentrated chromatin distributed around caryotheca. Then, chromatin split to cytotyctes with distinct boundary, and the apoptotic body (\uparrow) emerged at last ($\times 3\ 500$);

Fig.3 Laser-scanning confocal microscopy

A: The Hoechst 33342 staining in control group showed blue nucleolus, uniformitarian size, regular round, $\times 100$; B: The apoptosis cells were dyed white by Hoechst 33342 because of karyopyknosis, $\times 100$; C: The necrotic cells could also be observed, cellular membrane disappeared, cell content emitted, intranuclear content prolapsed like silkiness, $\times 400$

3 讨论

3.1 冷冻治疗后, 细胞内冰晶形成杀伤肿瘤

Gage 等^[9]认为细胞内冰晶形成和冰晶的机械损伤是最重要的机制: 细胞外液凝固结晶使细胞处于相对的高渗状态, 致使细胞脱水和皱缩, 而细胞外间隙形成的高渗状态使得冰晶容易通过细胞膜的微孔进入细胞, 促使细胞内冰晶的形成, 细胞膜的完整性被破坏。最后细胞内高度浓缩的电解质破坏细胞使之坏死、溶解。但是, 此前的研究并没有发现冰晶的超微结构特征。本研究在电镜下发现早期冰晶形成的结构特征, 直接证明了冻融通过形成细胞内冰晶杀伤肿瘤细胞, 细胞外冰晶形成可以使细胞脱水、皱缩; 而细胞内冰晶的形成则使细胞坏死、死亡。

3.2 反复冻融诱发 OCM-1 细胞发生凋亡及其机制

我们在临床上通过对视网膜母细胞瘤的冷冻

治疗, 发现冷冻灶没有明显的炎症反应, 但是肿瘤最后呈退变型疤痕愈合。这说明冰晶损伤只是早期急性杀伤反应, 冷冻应该还通过其他更加重要的机理杀伤肿瘤。Baust 等^[9]提出诱导大量肿瘤细胞的凋亡是冷冻杀伤肿瘤的另一个重要机制, 可能与细胞膜磷脂外翻, 激活半胱天冬酶, DNA 非随机性断裂等作用有关。ZARO 等^[10]认为 P16 是细胞周期调节蛋白之一, 其作用是和细胞周期素 D 竞争性结合 CDK4/6, 阻止细胞从 G1 期至 S 期的进程, 从而对细胞有丝分裂进行负反馈调节。在肿瘤细胞中由于基因的突变或缺失, 往往导致 P16 表达的增加。在研究细胞凋亡机制的实验中发现, 线粒体膜电位下降, 可使细胞的通透性增加, 释放细胞色素 C, 前体半胱天冬酶分裂, 引起细胞骨架蛋白降解、核膜破裂、DNA 降解等一系列损伤改变^[11, 12]。当这种损伤改变超过细胞自身的修复能力时, 细胞将死亡(凋亡及坏死)。本实验发现, 冻融后在共聚焦显微镜下能见到核固缩而被 Hoechst 33342 染成典

型呈亮蓝白色的凋亡细胞,电镜下也可见到较多的凋亡细胞;凋亡细胞的比率随着冻次数的增加而增高,证实了反复冻融可以诱发大量的肿瘤细胞凋亡,我们认为多次冻融诱导肿瘤细胞发生凋亡,为杀伤肿瘤及诱导肿瘤退变更为重要的机理。对照组的细胞 P16 免疫组织化学染色呈阳性,冻融后的细胞则呈阴性反应;流式细胞仪检测发现瘤细胞线粒体膜电位下降,且变化的幅度与凋亡细胞比率的变化幅度相符,这些均提示冻融对肿瘤细胞的杀伤还存在着后续作用,细胞的增殖能力被明显抑制,无限恶性增殖的趋势暂时停滞,为抑制残存细胞的增殖生长的机制之一。而线粒体膜电位的下降, P16 表达的下调是冻融诱发细胞凋亡的关键环节。

3.3 冷冻治疗可能能够活化 CD40 配体,介导机体免疫杀伤

有研究^[13]发现冻融后可激发机体的细胞免疫应答对肿瘤细胞产生杀伤作用。也有文献报道冻融后肿瘤细胞可以释放抗原从而致敏树突细胞(dendritic cell, DC)激活免疫应答^[14]。但是,冻融通过何种机制激发机体免疫应答还不确切。为了进一步研究冷冻治疗后增强免疫应答的机制,我们作了细胞 CD40 表达的流式细胞仪检测。CD40 分子是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族的成员之一,可以表达于不同分化阶段的 B 淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞等细胞上,它通过与活化 T 细胞上 CD40 配体相互作用,不仅可以作用于 B 细胞和调节机体体液免疫应答,而且可以增加 T 细胞、树突状细胞、巨噬细胞等细胞的免疫功能,诱导细胞因子的产生,从而影响机体细胞免疫反应^[15]。CD40 分子激发后的树突状细胞可以不需 CD4⁺细胞的辅助,直接活化 CD8⁺细胞毒性 T 细胞(CTL)^[16,17]。实验中发现随着冻融次数的增加,瘤细胞 CD40 的表达增强,并呈一定的量效关系,提示冻融通过上调细胞 CD40 的表达,活化 CD40 配体,可能是增强机体的免疫应答,介导机体免疫杀伤肿瘤细胞的机理。

参考文献:

- [1] MORIN J, TRAORE A, DIONNE G, et al. Magnetic resonance-guided percutaneous cryosurgery of breast carcinoma: technique and early clinical results [J]. *Can J Surg*, 2004,47(5):347- 351.
- [2] HARVEY C. Cryosurgery for prostate cancer [J]. *J Perioper Pract*, 2006,16(3):132- 133, 135- 137.
- [3] MAIWAND M O. The role of cryosurgery in palliation of tracheo- bronchial carcinoma [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999,15(6):764- 768.
- [4] VESTAL J C. Critical review of the efficacy and safety of cryotherapy of the prostate [J]. *Curr Urol Rep*, 2005, 6 (3):190- 193.
- [5] KERKAR S, CARLIN A M, SOHN R L, et al. Long-term follow up and prognostic factors for cryotherapy of malignant liver tumors [J]. *Surgery*, 2004, 136(4):770- 779.
- [6] POWELL T, WHELAN C, SCHWARTZ B F. Laparoscopic renal cryotherapy: biology, techniques and outcomes [J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2005, 57(2):109- 118.
- [7] YAN T D, PADANG R, XIA H, et al. Management of involved or close resection margins in 120 patients with colorectal liver metastases: edge cryotherapy can achieve long- term survival [J]. *Am J Surg*, 2006, 191(6):735- 742.
- [8] BAUST J G, GAGE A A. The molecular basis of cryosurgery [J]. *BJU Int*, 2005, 95(9):1187- 1191.
- [9] GAGE A A, BAUST J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery [J]. *Cryobiology*, 1998, 37(3):171- 186.
- [10] ZARO J L, SHEN W C. Cytosolic delivery of a p16-peptide oligoarginine conjugate for inhibiting proliferation of MCF7 cells [J]. *J Control Release*, 2005, 108(2- 3):409- 417.
- [11] ZAMZAMI N, HIRSCH T, DALLAPORTA B, et al. Mitochondria implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 1997, 29(2): 185- 193.
- [12] 陈静,唐二虎,潘渊明,等. 姜黄素对 MPP-+诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用及其与 iNOS 的关系 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(4): 424- 427.
- [13] BREITBART E W. Cryosurgery in the treatment of cutaneous malignant melanoma [J]. *Clin Dermatol*, 1990, 8(1):96- 100.
- [14] 唐松,李永平,应方微,等. 视网膜母细胞瘤抗原致敏的树突状细胞疫苗抗 SO- RB50 细胞系的实验研究 [J]. *中华眼科杂志*, 2004,40(4): 229- 233.
- [15] VAN KOOTEN C, BANCHEREAU J. CD40- CD40 ligand [J]. *J Leukoc Bid*, 2000, 67(1):2- 17.
- [16] MACKAY F, BROWNING J L. Turning off follicular dendritic cells [J]. *Nature*, 1998, 395(6697):26- 27.
- [17] RIDGE J P, DI ROSA F, MATZINGER P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T- killer cell [J]. *Nature*, 1998, 393(2): 474- 478.