

• 实验研究 Experimental research •

医用臭氧对宫颈癌细胞增殖和迁移抑制作用的初步研究

李锦程, 唐水英, 曾涛, 何晓峰

【摘要】 目的 探讨医用臭氧是否通过核因子(NF)- κ B 信号通路调控上皮-间质细胞转化(EMT)相关蛋白表达抑制宫颈癌细胞增殖和迁移。**方法** 选用人宫颈癌 Hela 细胞, 分别设空白组、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)处理组、NAC 和臭氧共处理组、臭氧组。细胞在臭氧处理前以 60 mmol/mL NAC 溶液预处理 20 min, 随后将细胞悬液与等体积半最大效应浓度(EC50)臭氧混合 15 min。细胞计数试剂盒(CCK)-8 和细胞集落实验检测细胞增殖抑制。二氯二乙酸酯(DCFH-DA)探针通过流式细胞术检测活性氧(ROS)水平。划痕实验和 Transwell 实验检测臭氧处理后 Hela 细胞迁移能力。蛋白质印迹法检测 NF- κ B 和 EMT 相关蛋白表达水平。**结果** 臭氧处理后 Hela 细胞增殖能力下降, 臭氧 EC50 为 10 mg/mL, 同时其迁移能力也下降。臭氧处理后, Hela 细胞 NF- κ B 和 κ B 抑制性蛋白激酶(IKK) α 表达及其磷酸化水平均降低, 同时 EMT 相关波形蛋白(vimentin)和 β -连环蛋白(β -catenin)表达水平降低, 而 NAC 预处理可逆转臭氧的作用。**结论** 医用臭氧可能通过抑制 NF- κ B 信号通路下调 vimentin、 β -catenin 抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖和迁移, ROS 在其中发挥重要作用, 表明医用臭氧有望成为宫颈癌新的辅助治疗手段。

【关键词】 医用臭氧; 宫颈癌; NF- κ B 信号通路; 细胞增殖; 细胞迁移

中图分类号: R737.3 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2021)-11-1140-06

The inhibition effect of medical ozone on the proliferation and migration of cervical cancer cells: a preliminary study LI Jincheng, TANG Shuiying, ZENG Tao, HE Xiaofeng. Department of Vascular and Interventional Radiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510515, China

Corresponding author: HE Xiaofeng, E-mail: ozonetherapy@126.com

【Abstract】 Objective To investigate whether medical ozone inhibits the proliferation and migration of cervical cancer Hela cells by regulating epithelial-mesenchymal cell transformation-related(EMT-related) protein expressions through NF- κ B signaling pathway. **Methods** Hela cells of human cervical cancer were used in this study. Blank group, N-acetyl-L-cysteine(NAC) treatment group, NAC and ozone combination treatment group and ozone treatment group were set up respectively. Before ozone treatment, the cells were pre-treated with 60 mmol/ml NAC solution for 20 min, then the cell suspension was mixed with equal volume of EC50 ozone for 15 min. CCK-8 kit and colony forming test were used to detect the cell proliferation inhibition. The level of reactive oxygen species(ROS) was detected by flow cytometry with a DCFH-DA probe. The migration ability of ozone-treated Hela cells was checked by scratch test and Transwell test. The expression levels of NF- κ B and EMT-related proteins were detected by Western blot. **Results** After ozone treatment, the proliferation ability of Hela cells was decreased, the EC50 ozone was 10 mg/mL, besides, the migration ability of Hela cells was also decreased. The NF- κ B and κ B inhibitory protein kinase- α (IKK- α) expression and its phosphorylation level were decreased, in the same time the EMT-related vimentin and β -catenin expression levels were also decreased, and NAC pre-treatment could counter the effect of ozone. **Conclusion** Medical ozone can inhibit the

DOI: 10.3969/j.issn.1008-794X.2021.11.013

作者单位: 510515 广州 南方医科大学南方医院血管及介入科(李锦程、唐水英、何晓峰);南方医科大学第一临床医学院检验系、广东医科大学附属医院医学检验科(曾涛)

通信作者: 何晓峰 E-mail: ozonetherapy@126.com

proliferation and migration of cervical cancer Hela cells by down-regulating vimentin and β -catenin through inhibiting the NF- κ B signaling pathway, in which ROS plays an important role, indicating that medical ozone may become a new adjuvant therapy for cervical cancer. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 1140-1145)

【Key words】 medical ozone; cervical cancer; NF- κ B signaling pathway; cell proliferation; cell migration

子宫颈癌严重影响女性健康,目前治疗手段包括手术和放化疗,存在易复发和 5 年生存率较低问题,需要寻求新的治疗手段^[1]。臭氧应用于治疗感染、肿瘤辅助治疗以及介入手术已取得良好疗效^[2-3]。有研究报道臭氧疗法在兔 VX2 肿瘤模型中取得一定疗效^[4-5]。臭氧通过诱导可控性氧化应激刺激人体适应性抗氧化反应,但不会导致抗氧化剂显著增加。在适当浓度下,大多数肿瘤细胞内源性抗氧化机制通常受到削弱^[6]。有研究推测臭氧抗癌作用涉及活性氧(reactive oxygen species,ROS)产生,ROS 积累可抑制核因子(NF)- κ B 激活,而 NF- κ B 在细胞增殖中起着关键作用^[7-8]。同时有研究表明,NF- κ B 信号通路可能是臭氧作用的主要机制之一,包括刺激内源性抗氧化系统上调、激活免疫功能和抑制炎症过程^[9]。目前臭氧已尝试应用于介入治疗输卵管炎症及输卵管梗阻^[10-11]。本研究探讨医用臭氧对宫颈癌生长和迁移是否有抑制作用,分析 ROS 积累、NF- κ B 信号通路与细胞迁移间的关系,为臭氧介入治疗宫颈癌提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人宫颈癌 Hela 细胞(中国科学院细胞库), Dulbecco 极限必需培养基(DMEM)(高糖)、胰酶、胎牛血清(美国 Gibco 公司),细胞计数试剂盒(CCK)-8(广州贵灵生物科技有限公司),N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、ROS 检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司),NF- κ B、上皮-间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)相关蛋白抗体(美国 CST 公司),结晶紫染色液(广州杰特伟生物科技有限公司),医用臭氧发生器(淄博前沿医疗器械公司)。

1.2 细胞培养与处理

Hela 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 中。研究分别设空白组、NAC 处理组、NAC 和臭氧共处理组、臭氧组,其中臭氧浓度为半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect,EC50),由 CCK-8 检测结果所求得。将细胞消化计数成 100 W/mL 细胞悬液,取 5 mL 装入 20 mL 注射器中,空白组细胞不做任何处理,NAC 处理组细胞加入 5% 体积

60 mmol/mL NAC 溶液预处理 20 min,NAC 和臭氧共处理组是在 NAC 预处理基础上加入等体积臭氧气体颠倒混匀 15 min,臭氧组不加 NAC,臭氧处理如上。

1.3 CCK-8 检测细胞活力

分别用 0、5、10、20、30 mg/mL 臭氧处理细胞后,将 2×10^3 细胞分别种植于 96 孔板,培养至 24 h、36 h、48 h 等 3 个检测时间点弃去旧培养基,每孔加入 100 μ L CCK-8 工作液,于孵箱孵育 2 h 后用酶标仪在 450 nm 波长条件下检测吸光度。根据前一步实验得到 EC50 值和培养时间,由上述分组再进行检测。

1.4 细胞集落实验

4 组细胞处理完后,按照 500/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中,随后置于孵箱培育,持续培养 2 周。培养完毕弃去旧培养基,甲醇固定后用结晶紫染色液进行染色摄影并计数。

1.5 ROS 水平检测

4 组细胞处理完后按 100 W/皿密度接种于中皿中,培养 24 h 后用二氯二乙酸酯(DCFH-DA)探针进行装载,流式细胞仪检测 ROS 水平。

1.6 划痕实验

在 60 mm 培养皿背面用马克笔划 3 条直线,每皿加入 200 W 细胞,待其长满。将培养基加入注射器中,按其预设 4 组:空白组(不做处理)、NAC 处理组(加入培养体系 8%体积 NAC 溶液预处理 20 min)、NAC 和臭氧共同处理组(NAC 预处理基础上加入等体积臭氧颠倒混匀 15 min)、臭氧组(仅加入等体积臭氧气体充分混合 15 min)。将上述处理过的培养基加入长满细胞的皿中培养 15 min,用枪头沿着画的直线垂直方向进行划痕,弃去培养基并洗涤 2 次,加入无血清培养基进行培养。于 0 h、12 h、24 h 等 3 个观察时间点进行摄影记录,随后进行划痕愈合面积统计和分析。

1.7 Transwell 实验

4 组细胞处理后,加入到小室的上室,细胞密度为 5×10^4 ,体积为 200 μ L,培养基中不含血清。下室添加 600 μ L 含 30%胎牛血清培养基。孵育 24 h 后用湿棉签去除上室细胞。甲醇固定移行细胞后,结晶紫溶液染色摄影并计数。

1.8 蛋白质印迹法检测 NF- κ B 和 EMT 相关蛋白

4 组细胞处理并培养 24 h 后进行裂解收集,紫光分光光度计测定蛋白浓度。每组添加 100 μ g 蛋白量上样,12%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,200 mA 恒流用聚偏二氟乙烯(PVDF)膜进行转膜,10%牛血清白蛋白(BSA)进行封闭,1:1 000 一抗浓度 4℃ 孵育过夜,次日用 Tris 缓冲 0.9%NaCl 溶液(TBST)洗膜 3 次,1:5 000 二抗浓度室温孵育 1 h 后,再次 TBST 洗膜 3 次,电化学发光(ECL)显影。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参对照。

1.9 统计学分析

每次实验均重复 3 次。采用 GraphPad Prism 7.0 版软件进行统计学分析,数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 臭氧处理抑制 Hela 细胞增殖

CCK-8 法检测 Hela 细胞增殖情况见图 1①,臭氧浓度 5、10、20、30 mg/mL 对 Hela 细胞增殖均有明显的抑制作用,具时间和浓度依赖性,求得 24 h 时 EC₅₀ 为 10 mg/mL,后续实验均以 10 mg/mL 浓度培养 24 h 方案;NAC 抵消臭氧诱导的 Hela 细胞增殖抑制作用(图 1②)。细胞集落实验表明,臭氧处理可

明显减少 Hela 细胞集落数,同样 NAC 可对抗一定的臭氧作用(图 1③)。

2.2 臭氧引起 Hela 细胞内 ROS 升高

臭氧处理后,Hela 细胞内 ROS 水平显著升高,而 NAC 预处理后 ROS 水平与空白组和 NAC 处理组差异无统计学意义,见图 2。

2.3 臭氧抑制 Hela 细胞迁移

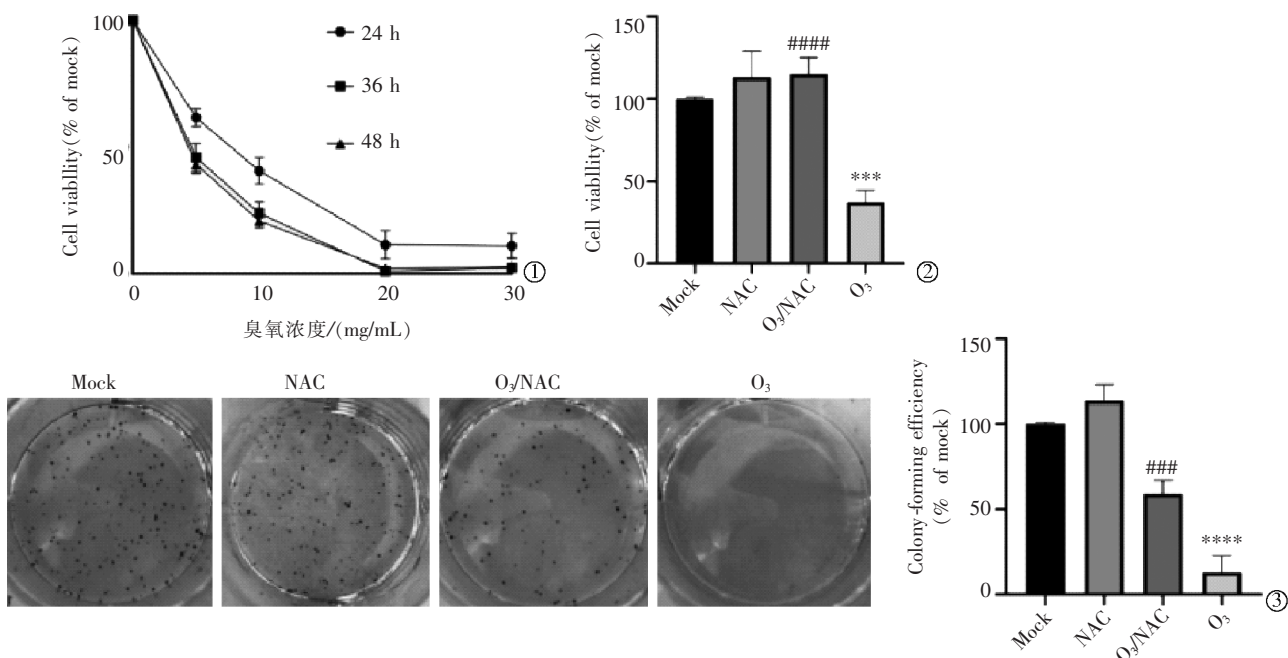
划痕实验分析显示,臭氧处理后 Hela 细胞的伤口愈合能力(代表迁移能力)均受到抑制,且在 12 h、24 h 时点差异均有统计学意义(图 3①②);Transwell 实验结果显示,臭氧抑制 Hela 细胞迁移能力与划痕实验一致(图 3③④)。

2.4 臭氧抑制 Hela 细胞 NF- κ B 信号通路表达

臭氧处理结果显示,Hela 细胞 NF- κ B 和 κ B 抑制性蛋白激酶(IKK) α 表达及其磷酸化水平均降低,同时 EMT 相关波形蛋白(vimentin)和 β -连环蛋白(catenin)表达水平降低,见图 4。此外,NAC 预处理细胞可在一定程度防止臭氧诱导 NF- κ B 信号通路蛋白和 EMT 相关蛋白 vimentin 和 β -catenin 表达降低。

3 讨论

臭氧对部分癌细胞有抑制增殖效果的机制尚不明确。本研究显示臭氧对宫颈癌 Hela 细胞氧化应激发生了作用,导致 ROS 在细胞内聚集,使细胞内



与空白组和 NAC 处理组比较,*** $P < 0.001$;与臭氧组比较,**** $P < 0.0001$

①CCK-8 检测不同浓度臭氧(0、5、10、20、30 mg/mL)处理 Hela 细胞 24 h、36 h、48 h 后细胞增殖;②CCK-8 检测示细胞经 60 mM NAC 预处理 20 min,EC₅₀ 浓度臭氧 24 h 的活性;③Hela 细胞集落形成

图 1 臭氧处理对 Hela 细胞增殖的影响

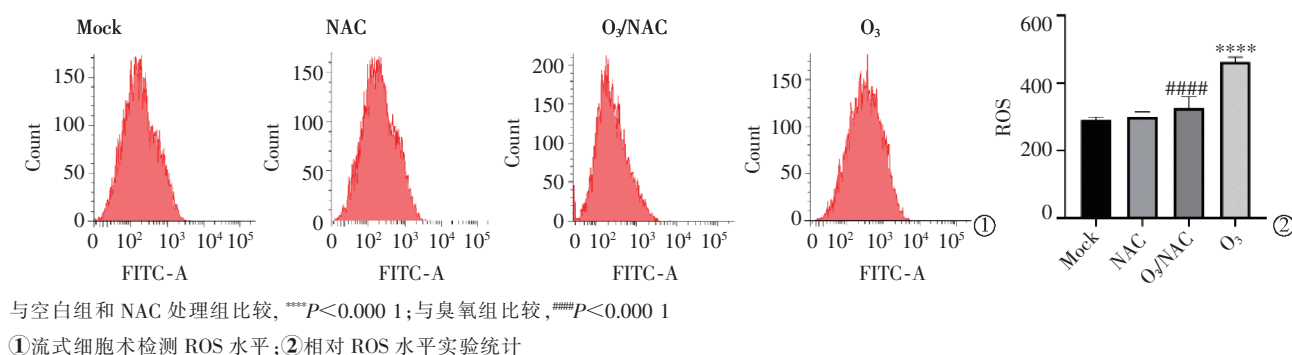
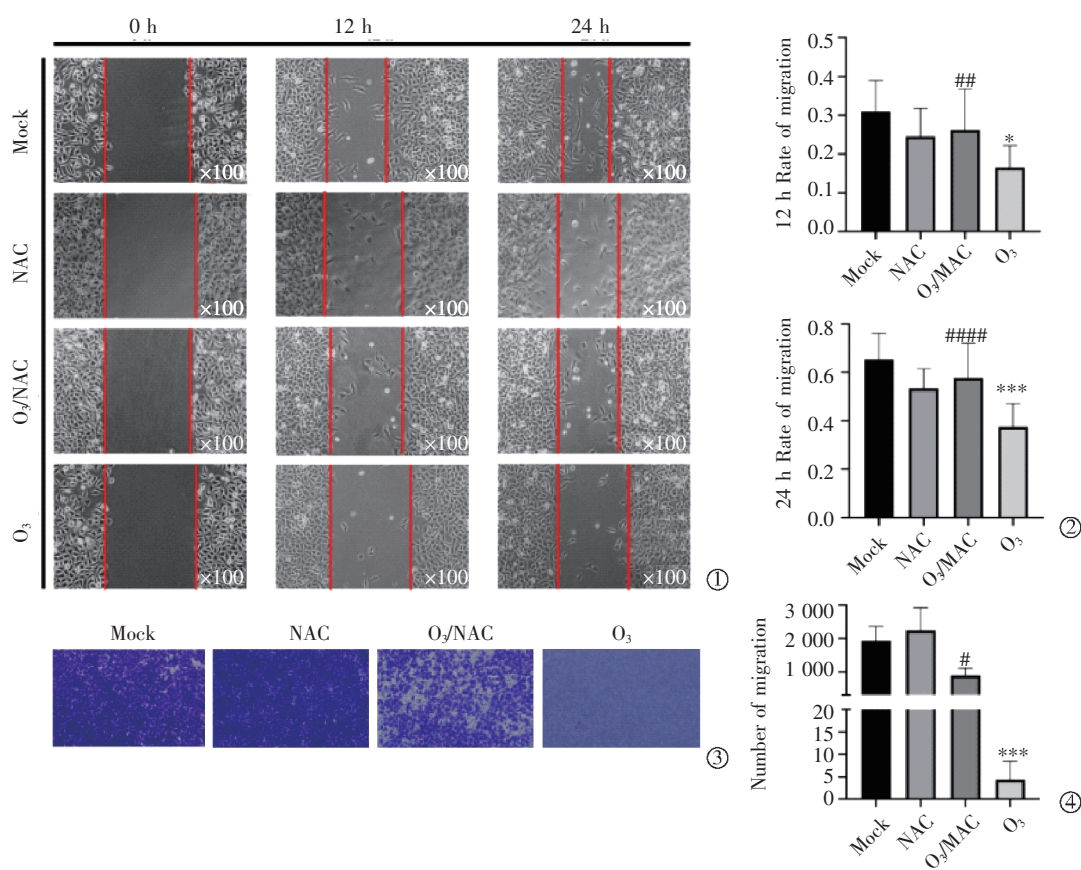


图 2 臭氧处理对 HeLa 细胞内 ROS 的影响



与空白组和 NAC 处理组比较, *** $P < 0.001$; 与臭氧组比较, **** $P < 0.0001$; 与臭氧组比较, * $P < 0.05$

①划痕实验分析细胞迁移; ②伤口愈合实验统计; ③Transwell 实验评估细胞迁移; ④Transwell 实验统计

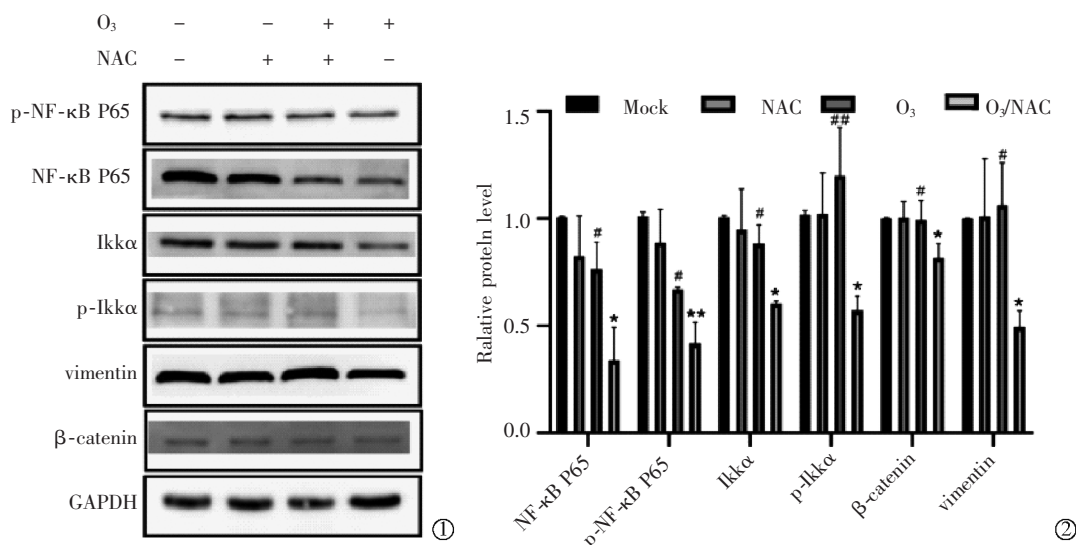
图 3 臭氧处理对 HeLa 细胞迁移的影响

NF- κ B 信号通路和 EMT 相关蛋白发生改变, 表现为增殖和迁移受到抑制。

臭氧是臭氧发生器利用医用纯氧电离产生的臭氧-氧气混合气体^[12]。臭氧在介入治疗领域已取得广泛应用, 如治疗缺血性疾病、炎症疾病和癌症^[10,13-14]。有研究报道臭氧可对膀胱癌^[15]、腺癌^[16]和胶质母细胞瘤^[17]有间接作用, 能抑制其进展。本实验发现臭氧处理后, HeLa 细胞内 ROS 有明显增加。ROS 是氧活性形式, 其过量产生可导致大分子氧化, 引起 DNA 突变和细胞死亡^[18]; ROS 积累会抑制 NF- κ B

表达^[7]。研究结果显示 NF- κ B 信号通路在多种肿瘤如宫颈癌、肝癌、胃癌、胰腺癌等进展中发挥重要作用^[19]; NF- κ B 激活与肿瘤细胞生存、增殖、血管生成、扩张和转移相关^[20]; 臭氧可能是潜在的 NF- κ B 抑制剂^[21]。因此, 臭氧通过增加 ROS 产生增加氧化应激抑制 NF- κ B 表达, 可能是一种潜在的治疗策略。

EMT 是各种癌症进展期一至关重要的事件, 与肿瘤侵袭和转移密切相关。研究证实多种实体肿瘤在发生侵袭和转移的同时, 常伴有肿瘤细胞 EMT^[22]。Vimentin 是 EMT 中重要因子, 属间质源性,



与空白组和 NAC 处理组比较, * $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 与臭氧组比较, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$

①臭氧处理加或不加 NAC 预处理后 NF-κB 信号通路蛋白免疫分析; ②蛋白相对灰度实验统计

图 4 臭氧对 HeLa 细胞 NF-κB 信号通路和 EMT 相关蛋白的影响

在正常细胞中表达量低或不表达,而在许多上皮肿瘤中高表达,是间质细胞迁徙的重要调节者,在肝癌、胃癌等恶性肿瘤中均能直接促进肿瘤侵袭、转移,其表达量与肿瘤预后呈负相关^[23-24]。β-catenin 是一种多功能可溶性蛋白,介导体内许多生物过程,包括细胞增殖、黏附、分化等,在正常组织和良性上皮肿瘤中维持低水平,而在恶性肿瘤中表达阳性率可达 50%以上,其表达量与肿瘤细胞侵袭转移能力呈正相关^[25-26]。本研究显示臭氧处理后 vimentin 和 β-catenin 表达降低,提示臭氧影响细胞增殖迁移可能与影响 EMT 相关蛋白有关。

综上,医用臭氧可能通过抑制 NF-κB 信号通路下调 vimentin、β-catenin 抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖和迁移,ROS 在其中发挥重要作用,表明医用臭氧有望成为宫颈癌新的辅助治疗手段。

[参考文献]

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.
- Buric J, Berjano P, Damilano M. Severe spinal surgery infection and local ozone therapy as complementary treatment: a case report[J]. Int J Spine Surg, 2019, 13: 371-376.
- Hao K, Tang S, Xie H, et al. Application of ozone therapy in interventional medicine[J]. J Intervent Med, 2019, 2: 8-11.
- 张学彬,花迎雪,仇晓霞,等. 肝动脉臭氧化碘油栓塞治疗兔 VX2 肝癌的初步研究[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21:760-764.

- 韩世龙,朱晓黎,张 猛,等. 经皮注射医用臭氧治疗兔 VX2 移植瘤的实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22:223-227.
- Clavo B, Rodriguez-Esparragon F, Rodriguez-Abreu D, et al. Modulation of oxidative stress by ozone therapy in the prevention and treatment of chemotherapy-induced toxicity: review and prospects[J]. Antioxidants(Basel), 2019, 8: 588.
- Clavo B, Santana-Rodriguez N, Llonet P, et al. Ozone therapy as adjuvant for cancer treatment: is further research warranted? [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 2018: 7931849.
- Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive Oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation [J]. Cell Physiol Biochem, 2001, 11: 173-186.
- Scassellati C, Ciani M, Galoforo AC, et al. Molecular mechanisms in cognitive frailty: potential therapeutic targets for oxygen-ozone treatment[J]. Mech Ageing Dev, 2020, 186: 111210.
- 申 刚,谭小云,陈德基,等. 介入再通联合臭氧治疗阻塞性输卵管炎的实验研究[J]. 介入放射学杂志, 2012, 21:405-409.
- 郭风先,魏乐群,贺 朝,等. 臭氧对经产妇输卵管梗阻再通术的疗效观察[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26:455-458.
- Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art[J]. Arch Med Res, 2006, 37: 425-435.
- Bocci V, Borrelli E, Travagli V, et al. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug[J]. Med Res Rev, 2009, 29: 646-682.
- Qing M, Yang CA, Xu J, et al. Effectiveness of ozonated saline in the treatment of VX2 tumors in rabbits[J]. J Intervent Medicine, 2018, 1: 143-149.
- Teke K, Ozkan TA, Cebeci OO, et al. Preventive effect of intravesical ozone supplementation on n-methyl-n-nitrosourea-induced non-muscle invasive bladder cancer in male rats[J]. Exp Anim, 2017, 66: 191-198.

- [16] Simonetti V, Quagliarello V, Franzini M, et al. Ozone exerts cytoprotective and anti-inflammatory effects in cardiomyocytes and skin fibroblasts after incubation with doxorubicin[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 2169103.
- [17] Megele R, Riemenschneider MJ, Dodoo-Schittko F, et al. Intratumoral treatment with oxygen-ozone in glioblastoma: a systematic literature search and results of a case series[J]. Oncol Lett, 2018, 16: 5813-5822.
- [18] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8: 579-591.
- [19] Zhang Y, Zhao Y, Ran Y, et al. Alantolactone exhibits selective antitumor effects in HELA human cervical cancer cells by inhibiting cell migration and invasion, G2/M cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and targeting Nf-kB signalling pathway[J]. J BUON, 2019, 24: 2310-2315.
- [20] Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, et al. Roles of NF-kB signaling in the regulation of miRNAs impacting on inflammation in cancer[J]. Biomedicines, 2018, 6: 40.
- [21] Wang J, Wu M, Lin X, et al. Low-concentration oxygen/ozone treatment attenuated radiculitis and mechanical allodynia via PDE2A-cAMP/cGMP-NF-kB/p65 signaling in chronic radiculitis rats[J]. Pain Res Manag, 2018, 2018:5192814.
- [22] Savagner P. Epithelial-mesenchymal transitions: from cell plasticity to concept elasticity[J]. Curr Top Dev Biol, 2015, 112: 273-300.
- [23] Hsu YM, Yf C, Chou CY, et al. KCl cotransporter -3 down-regulates E-cadherin/beta-catenin complex to promote epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Res, 2007, 67: 11064-11073.
- [24] 周霜霜, 张伯. C/EBP β 和 vimentin 在肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 医药前沿, 2019, 9:56-57.
- [25] 冯望德, 伍娇娇. 上皮间质转化与宫颈癌的研究进展[J]. 安徽医学, 2013, 34:1050-1053.
- [26] 章文华, 吴令英. 关于子宫颈癌综合治疗的商榷[J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25:206-208.

(收稿日期:2020-12-06)

(本文编辑:边 倩)

欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告
《Journal of Interventional Medicine》
网址: www.keaipublishing.com/JIM
邮箱: j_intervent_med.@163.com