

## · 实验研究 ·

# 七氟醚对骨肉瘤细胞增殖、侵袭、凋亡及化疗敏感性的影响

朱彦东 刘钰

**【摘要】** 目的 探讨七氟醚对骨肉瘤细胞增殖、侵袭、凋亡及化疗敏感性的影响。方法 选取骨肉瘤 MG63 细胞,随机分为四组:对照组、1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组,分别为不给予七氟醚、给予 1.7%、3.4%和 5.1%七氟醚处理。采用 MTT 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,Transwell 细胞侵袭实验检测细胞迁移;给予各组顺铂处理,检测各组细胞凋亡情况。结果 培养 24、36 和 72 h 的 1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚 OD 值明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ),培养 24、36 和 72 h 的 5.1%七氟醚组 OD 值明显低于 1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组 ( $P < 0.05$ )。四组细胞凋亡率、细胞迁移数差异无统计学意义。顺铂作用后,1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组细胞凋亡率明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ),5.1%七氟醚组细胞凋亡率明显低于 1.7%七氟醚组和 3.4%七氟醚组 ( $P < 0.05$ )。结论 七氟醚可抑制骨肉瘤 MG63 细胞增殖,对细胞迁移、凋亡无明显影响;七氟醚可降低骨肉瘤 MG63 细胞对顺铂的敏感性。

**【关键词】** 七氟醚;骨肉瘤;增殖;侵袭;凋亡;化疗敏感性

**Effects of sevoflurane on proliferation, invasion, apoptosis and chemosensitivity of osteosarcoma cells** ZHU Yandong, LIU Yu. Department of Anesthesiology, Shenzhen Hospital, Southern Medical University, Shenzhen 518101, China

Corresponding author: ZHU Yandong, Email: zhuyandong84@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate effects of sevoflurane on proliferation, invasion, apoptosis and chemosensitivity of osteosarcoma cells. **Methods** The osteosarcoma MG63 cells were randomly divided into control group, 1.7% sevoflurane group, 3.4% sevoflurane group and 5.1% sevoflurane group. The control group did not receive sevoflurane, and the rest were given with 1.7%, 3.4%, and 5.1% concentrations sevoflurane, respectively. Cell proliferation was detected by MTT, cell apoptosis was detected by flow cytometry and cell migration was detected by Transwell cell invasion test. Each group was treated with cisplatin, and the apoptosis of each group was detected. **Results** The OD values of 1.7% sevoflurane group, 3.4% sevoflurane group and 5.1% sevoflurane group at 24 h, 36 h and 72 h after cultured were significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ), of which OD values in 5.1% sevoflurane group at 24 h, 36 h and 72 h after cultured were significantly less than 1.7% sevoflurane group, 3.4% sevoflurane group ( $P < 0.05$ ). There were no significant difference in cell apoptosis rate, cell migration number of the four group. Under the effect of cisplatin, the apoptosis rate in 1.7% sevoflurane group, 3.4% sevoflurane group and 5.1% sevoflurane group were significantly lower than that of the control group ( $P < 0.05$ ), of which apoptosis cell rate in 5.1% sevoflurane group were significantly lower than that of the 1.7% sevoflurane group and 3.4% sevoflurane group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sevoflurane, inhibiting the proliferation of osteosarcoma MG63 cells, has no significant effect on cell migration and apoptosis and reduces the sensitivity of osteosarcoma MG63 cells to cisplatin.

**【Key words】** Sevoflurane; Osteosarcoma; Proliferation; Invasion; Apoptosis; Chemosensitivity

骨肉瘤是常见于 20 岁以下青少年或儿童的恶性骨肿瘤,约占所有骨肿瘤的 20%,特点是瘤细胞直接形成骨样组织<sup>[1]</sup>。骨肉瘤恶性程度较高,易于

复发和转移,早期发现和及时治疗可以很大程度上提高患者生存率。研究显示,经过正规治疗后,患者 5 年生存率能够达到 70%~80%<sup>[2]</sup>。骨肉瘤的治疗以化疗为主,随着化疗药物疗效的增加,毒副作用也随之增大,并且随着化疗药物的使用,肿瘤细胞对化疗药物敏感性下降,造成化疗疗效不佳<sup>[3]</sup>。七氟醚是一种新型的卤族吸入麻醉药,临床上广泛用于患儿全麻。有研究报道,七氟醚对如喉癌、胰

DOI: 10.12089/jca.2019.02.016

基金项目:广东省科技计划项目(技术开发及产业化类别)(411255342023)

作者单位:518101 南方医科大学深圳医院麻醉科(朱彦东);  
东阳市红十字会医院麻醉科(刘钰)

通信作者:朱彦东,Email: zhuyandong84@126.com

腺癌等多种恶性肿瘤细胞具有细胞毒性及抗增殖效应<sup>[4]</sup>,可能对化疗敏感性有影响。本研究探讨七氟醚对骨肉瘤细胞增殖、侵袭、凋亡及化疗敏感性的影响。

### 材料与方法

**实验材料** 骨肉瘤 MG63 细胞株(上海酶研生物科技有限公司);七氟醚(美国 Baxter 公司);胎牛血清、DMEM 培养基(赛默飞生物);七氟醚吸入式动物麻醉机(美国 Matrx 公司);细胞恒温培养箱(美国赛默飞世尔科技有限公司);流式细胞仪(贝克曼库尔特公司)。

**细胞培养与分组** MG63 细胞使用 5 ml 含 10% 胎牛血清的培养基培养,1:2 传代,每 2 天进行 1 次传代。将细胞随机分为四组:对照组、1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组。

**七氟醚细胞处理** 将四组 MG63 细胞制成单细胞悬浮液后,接种于 6 孔板中。37 ℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养 24 h 后,将细胞放置于密闭的有机玻璃箱中,七氟醚挥发罐接入进气口,气体分析仪接入出气口,调节七氟醚挥发罐的气体流量为 3 L/min,预充气 3 min 使气体(5%CO<sub>2</sub>、21%O<sub>2</sub>、74%N<sub>2</sub>)充满密闭容器。之后调节麻醉气体挥发罐的气体流量为 0.5 L/min,打开吸入气体挥发罐,维持 5 min 以上保持浓度稳定。之后关闭进气口和出气口,将密闭的有机玻璃箱在 37 ℃恒温箱中处理 3 h 后,置于培养箱中培养。24 h 后采用 MTT 法检测细胞增殖和流式细胞术检测细胞凋亡。

**MTT 法检测细胞增殖** 将 MG63 细胞制成单细胞悬浮液,调整细胞浓度为 1×10<sup>4</sup>/ml,将以上浓度的细胞接种于 96 孔板中,每孔 200 μl。设置对照组培养 24 h,使用不同浓度七氟醚处理 4 h,之后培养 24 h。加入 5 mg/ml 的 MTT,4 h 使用 DMSO 溶解紫色结晶,在 490 nm 波长下检测四组培养后 12、24、36 和 72 h 时的 OD 值。

**流式细胞术检测细胞凋亡** (1)顺铂作用前:取对数期的 MG63 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>/ml,每个培养皿中加入 1 ml 细胞悬液,培养 24 h 后使用不同浓度七氟醚处理 4 h 后置于 37℃下 CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h。制成单细胞悬液,加入 5 μl 的 Annexin V-FITC 轻轻混匀后再加入 10 μl 碘化丙锭,混匀并避光室温孵育 15 min,流式细胞仪检测各组凋亡率。(2)顺铂作用后:取对数期的 MG63 细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>/ml,每个培养皿中加入 1 ml 细胞悬液,培养 24 h 后加入顺铂,终浓度为 10 mg/L。后使用不同浓度七氟醚处理 4 h 后置于 37℃下 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 20 h。制成单细胞悬液,其余步骤同上。

**Transwell 细胞侵袭实验检测细胞侵袭能力** 取对数期的 MG63 细胞制成单细胞悬浮液,调整细胞浓度为 2×10<sup>5</sup>/ml,将以上浓度的细胞接种于 96 孔板中,每个孔板加入 500 μl 含 10% 血清的培养基,每个孔板含 100 μl 细胞悬液,培养 24 h;取出小室加入约 800 μl 甲醇的孔中,室温固定 30 min;取出小室,加入约 800 μl 的 Giemsa 染液的孔中,室温染色 15~30 min;清水浸泡后取出小室,吸取上室液体后,晾干、封片;显微镜下取 9 个随机视野计数,统计结果。

**统计分析** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

### 结 果

**细胞增殖情况** 培养 24、36 和 72 h,1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组的 OD 值明显低于对照组(*P*<0.05),5.1%七氟醚组的 OD 值明显低于 1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组(*P*<0.05)(表 1)。

**顺铂作用前细胞凋亡率** 对照组、1.7%七氟醚

表 1 四组细胞不同时间点 OD 值的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	皿数	培养 12 h	培养 24 h	培养 36 h	培养 72 h
对照组	6	0.302±0.102	0.578±0.098	0.652±0.105	0.782±0.112
1.7%七氟醚组	6	0.299±0.097	0.453±0.089 <sup>a</sup>	0.544±0.097 <sup>a</sup>	0.612±0.108 <sup>a</sup>
3.4%七氟醚组	6	0.300±0.101	0.400±0.090 <sup>ab</sup>	0.468±0.102 <sup>ab</sup>	0.527±0.097 <sup>ab</sup>
5.1%七氟醚组	6	0.304±0.100	0.357±0.088 <sup>abc</sup>	0.410±0.099 <sup>abc</sup>	0.467±0.101 <sup>abc</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与 1.7%七氟醚组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05;与 3.4%七氟醚组比较,<sup>c</sup>*P*<0.05

组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组细胞凋亡率分别为(6.8±1.2)%、(7.0±1.2)%、(6.9±1.1)%和(7.0±1.1)%,差异无统计学意义(图 1)。

**细胞侵袭能力** 对照组、1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组细胞迁移数分别为(400.3±78.3)个、(390.4±80.2)个、(392.2±90.5)个和(399.2±87.6)个,四组细胞迁移数差异无统计学意义(图 2)。

**细胞对顺铂的敏感性** 顺铂作用后,1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组细胞凋亡率分别为(57.29±9.43)%、(48.29±8.29)%、(37.10±9.11)%和(30.04±8.22)%,1.7%七氟醚组、3.4%七氟醚组和 5.1%七氟醚组明显低于对照组,5.1%七氟醚组明显低于 1.7%七氟醚组和 3.4%七氟醚组( $P<0.05$ )(图 1)。

### 讨 论

骨肉瘤是最多发的原发恶性骨肿瘤,特点是在成骨同时又发生骨质破坏,常见于 20 岁以下的青少年或儿童。骨肉瘤恶性程度极高,转移倾向较高,据报道,约 25%的患者在发生转移后才被确诊,造成该病死亡率居高不下<sup>[5]</sup>。临床数据显示,化疗可

以将骨肉瘤患者 5 年生存率从 20%提高到 65%~70%<sup>[6]</sup>。但是骨肉瘤易发生早期侵袭转移,因此对于骨肉瘤的整体化疗效果仍不理想。同时,由于顽固性的骨肉瘤患者对多种化疗药物表现不敏感,因此仍需要探索更好的治疗方案。骨肉瘤患者化疗中存在最常见的问题是多种耐药(multidrug resistance, MDR)<sup>[7]</sup>。化疗药物在体内的摄取和转运障碍都会影响肿瘤对化疗药物的敏感性。研究显示,肿瘤细胞的 MDR 是一个极其复杂并且不断变化的过程,涉及多种基因和因子的共同参与<sup>[8]</sup>。因此寻找高效、低毒的 MDR 逆转剂是目前临床研究的重点。近年来有研究报道,麻醉药物对肿瘤细胞的增殖具有重要的影响<sup>[9]</sup>。七氟醚是临床常用吸入麻醉药,多用于手术中麻醉维持,有可控性强、麻醉效能高等特点。研究显示,七氟醚对多种肿瘤细胞如喉癌、胰腺癌、乳腺癌等有细胞毒性和抗增殖效应<sup>[10-11]</sup>。Lemoine 等<sup>[12]</sup>研究报道,七氟醚可以通过下调抑制基因 Survivin,达到抑制肺癌细胞的增殖的效应。

本研究 MTT 实验结果显示,与对照组比较,骨肉瘤 MG63 细胞增值能力随着七氟醚浓度增高而逐渐减弱,说明七氟醚可抑制骨肉瘤 MG63 细胞的增

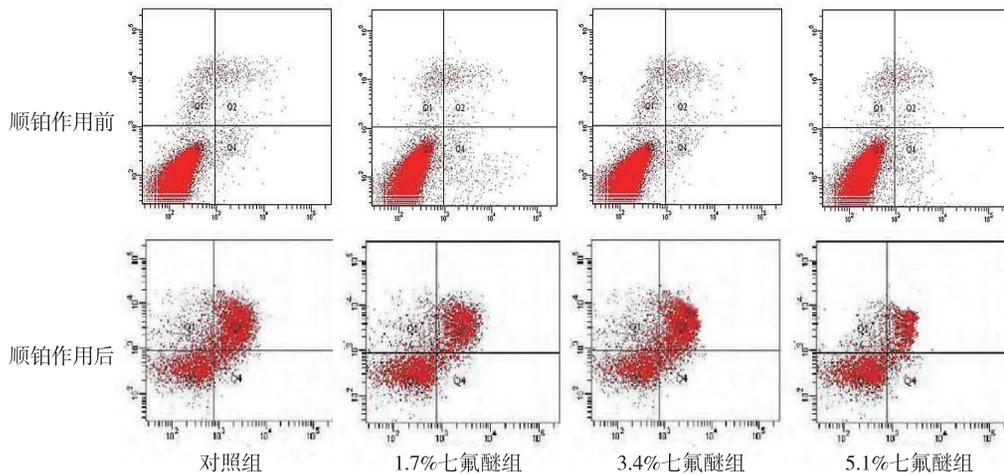


图 1 四组细胞顺铂作用前后流式检测图

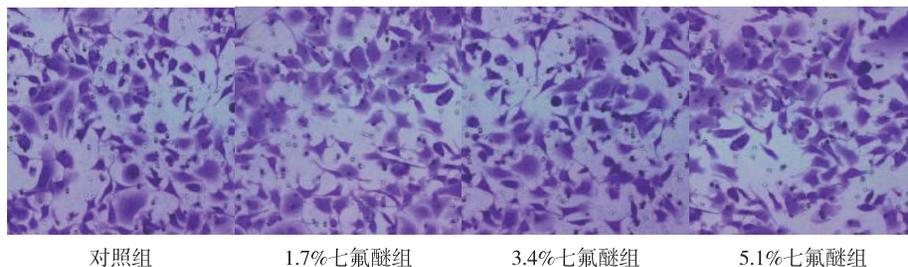


图 2 四组细胞 Transwell 侵袭检测图

殖,高浓度抑制作用更明显,本研究提示七氟醚在骨肉瘤中可能具有抑制肿瘤细胞的生长的作用。

既往研究表明,七氟醚能抑制乳腺癌、结肠癌以及肺癌细胞的增殖与侵袭<sup>[13]</sup>。本研究中,侵袭实验结果显示,四组细胞迁移数差异无统计学意义,表明七氟醚对骨肉瘤 MG63 细胞迁移无明显影响,与既往研究不相符。王国武等<sup>[14]</sup>研究显示,七氟醚对前列腺癌细胞毒性作用与其诱导细胞凋亡有关。本研究中四组细胞凋亡率差异无统计学意义,表明七氟醚对细胞凋亡无明显影响,七氟醚可抑制骨肉瘤 MG63 细胞细胞的增殖并不是由于其诱导的细胞凋亡,具体的机制仍需要进一步探究。

顺铂是一种细胞周期非特异性抗肿瘤药物,也是骨肉瘤基本化疗药物之一。顺铂在体内能与 DNA 结合,通过破坏 DNA 的功能抑制有丝分裂从而诱导细胞凋亡。Brozovic 等<sup>[15]</sup>研究发现,七氟醚可以拮抗顺铂对艾氏腹水肿瘤细胞的 DNA 毒性。为了探讨七氟醚对顺铂诱导 MG63 细胞凋亡的影响,各组 MG63 细胞对顺铂诱导的凋亡率显示,1.7%、3.4%和 5.1%七氟醚组细胞凋亡率明显低于对照组,其中 5.1%七氟醚组细胞凋亡率明显低于 1.7%七氟醚组和 3.4%七氟醚组,提示七氟醚对顺铂诱导的 MG63 细胞凋亡有拮抗作用,降低了 MG63 细胞对顺铂的化疗敏感性,且有一定的浓度依赖性,与 Brozovic 等<sup>[15]</sup>研究结果一致。

综上所述,七氟醚可抑制骨肉瘤 MG63 细胞增殖,对细胞迁移、凋亡无明显影响;七氟醚可降低骨肉瘤 MG63 细胞对顺铂的敏感性。

#### 参 考 文 献

- [1] 易生辉,秦刚,黄肖华,等.骨肉瘤的治疗进展.医学综述,2017,23(8):1529-1532.
- [2] 董迪,张威,宋菲,等.骨肉瘤患者行大剂量甲氨蝶呤化疗后 24 小时血药浓度分析及其临床意义.中国医院药学杂志,2016,36(13):1092-1095.
- [3] 符策岗,曾艳,赵红卫,等.骨肉瘤继发性化疗耐药的分子机制.广东医学,2016,37(1):140-142.
- [4] 邹海町,孙丽,陶蕾,等.七氟醚、异氟醚对骨肉瘤 MG63 细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响.现代生物医学进展,2015,15(23):4419-4423.
- [5] 郭梦瑶,王拥军,杨燕萍.现代医学治疗骨肉瘤现状分析及展望.实用医学杂志,2017,33(4):507-509.
- [6] 黄涛.新辅助化疗治疗骨肉瘤最新进展.临床军医杂志,2016,44(3):221-223.
- [7] Chen Z, Shi T, Zhang L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance; a review of the past decade. *Cancer Lett*, 2016, 370(1):153-164.
- [8] Pontali E, Sotgiu G, D'Ambrosio L, et al. Bedaquiline and multidrug-resistant tuberculosis; a systematic and critical analysis of the evidence. *Eur Respir J*, 2016, 47(2):394-402.
- [9] Tiberi S, D'Ambrosio L, DeLorenzo S, et al. Ertapenem in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: first clinical experience. *Eur Respir J*, 2016, 47(1):333-336.
- [10] Zhang H, Li L, Sun Y, et al. Sevoflurane prevents stroke-induced depressive and anxiety behaviors by promoting cannabinoid receptor subtype I-dependent interaction between  $\beta$ -Arrestin 2 and ERK1/2 in the rat hippocampus. *J Neurochem*, 2016, 137(4):618-629.
- [11] Ranft A, Golkowski D, Kiel T, et al. Neural correlates of sevoflurane-induced unconsciousness identified by simultaneous functional magnetic resonance imaging and electroencephalography. *Anesthesiology*, 2016, 125(5):861-872.
- [12] Lemoine S, Tritapepe L, Hanouz JL, et al. The mechanisms of cardio-protective effects of desflurane and sevoflurane at the time of reperfusion; anaesthetic post-conditioning potentially translatable to humans. *Br J Anaesth*, 2016, 116(4):456-475.
- [13] 杨波,杨磊,张兰.七氟醚下调 MMP-9 抑制骨肉瘤细胞的生长和转移.临床和实验医学杂志,2017,16(21):2110-2114.
- [14] 王国武,李超,胡啸玲.不同浓度七氟醚对人前列腺癌细胞增殖与侵袭能力的影响.天津医药,2016,44(2):159-161.
- [15] Brozovic G, Orsolich N, Knezevic F, et al. Evaluation of DNA damage in vivo induced by combined application of cisplatin and sevoflurane. *Eur J Anaesthesiol*, 2008, 25(8):642-647.

(收稿日期:2018-05-11)