

三氧化二砷诱导乳腺癌细胞凋亡的早期事件——凋亡性容量下降

王莹¹, 王乐秋², 何志鹏¹, 李丽¹ (1.牡丹江医学院机能教研室, 黑龙江 牡丹江 157011; 2.牡丹江医学院附属红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

摘要: 目的 探讨凋亡性容量下降(apoptotic volume decrease, AVD)是否是三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的早期事件。方法 噻唑兰(MTT)法检测 As₂O₃ 对 MCF-7 细胞存活率的影响;流式细胞技术检测 As₂O₃ 能否引起 MCF-7 细胞凋亡;时滞显微摄影技术检测细胞容量;Caspase-3 试剂盒检测凋亡信号活性。结果 MTT 实验表明 As₂O₃ 使 MCF-7 细胞存活率下降并呈现剂量依赖的量效关系;流式细胞测定结果证实 As₂O₃ 对乳腺癌细胞的致凋亡作用;As₂O₃ 作用 MCF-7 细胞在 2 h 内细胞出现 AVD,但 Caspase-3 的活性无明显变化,直到作用 MCF-7 细胞 6 h 后 Caspase-3 活性显著升高。结论 AVD 是 As₂O₃ 诱导乳腺癌细胞凋亡的早期事件。

关键词: 三氧化二砷; 乳腺癌细胞; 凋亡性容量下降

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)03-0274-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.03.004

Apoptotic Volume Decrease is the Early Event in Arsenic Trioxide Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells

WANG Ying¹, WANG Leqiu², HE Zhipeng¹, LI Li¹ (1.Department of Medical Function Research, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China; 2.Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate whether the apoptotic volume decrease is the early event in arsenic trioxide induced apoptosis in breast cancer MCF-7 cells. **METHODS** The effect of As₂O₃ on cell viability was assayed by methylthiazolotetrazolium(MTT). Apoptosis was analyzed by flow cytometry. Lag-time microphotography was employed to detect cell volume. The apoptotic signaling activity of Caspase-3 was detected by caspase assay kit. **RESULTS** MTT result showed As₂O₃ reduced the viability of MCF-7 cells in a concentration-dependent manner. Flow cytometry assay confirmed apoptosis resulted in As₂O₃-treated MCF-7 cells. Apoptotic volume decrease was observed within 2 h in As₂O₃ treated MCF-7 cells, but the caspase-3 activity had no significant change. The caspase-3 activity increased significantly until As₂O₃ treated MCF-7 cells for 6 h. **CONCLUSION** Apoptotic volume decrease is the early event in arsenic trioxide induced apoptosis in breast cancer cells.

KEY WORDS: arsenic trioxide; MCF-7 cells; apoptotic volume decrease

凋亡性容量下降(apoptotic volume decrease, AVD)是指在等渗条件下发生的凋亡性细胞皱缩,以往认为凋亡时这种细胞容量下降可能是凋亡的“附属”现象,其产生是由于被激活的 Caspase-3 对细胞骨架系统如 F 肌动蛋白等的水解作用所致。但目前发现即使在某些不发生明显细胞核片断化的细胞也发现细胞容量下降,表明它可能是先于 Caspase-3 激活的上游事件。本研究采用人乳腺癌 MCF-7 细胞作为研究对象,探讨 AVD 是否是三氧化二砷诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的早期事件。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌 MCF-7 细胞株(上海麦莎生物科技

有限公司);亚砷酸注射液[哈尔滨伊达药业有限公司,规格:5 mg·(5 mL)⁻¹,批号:H19990191];DMEM 培养基、新生胎牛血清购自美国 Gibco 公司;噻唑兰(上海前尘生物科技有限公司,规格:250 mg,编号:40201ES72)。CaspACETM 检测系统(普洛麦格生物技术有限公司,规格:50 次,编号:G7351)。

1.2 细胞培养

MCF-7 细胞接种于含有 10%FBS 的低糖 DMEM 培养液的培养瓶中,置于 37 °C, 5%CO₂ 培养箱中培养。细胞贴壁生长,当细胞融合至 70%~80%时的对数生长期时,开始传代培养,2~3 d 传代 1 次。用于实验的细胞均处于对数生长期。

基金项目:牡丹江医学院科学技术研究项目(2011-07)

作者简介:王莹,女,博士,讲师 Tel: (0453)6984302 E-mail: 55265064@qq.com

1.3 MTT 比色法

将细胞按 10^4 个细胞·孔⁻¹ 接种于 96 孔培养板中培养 24 h, 按剂量分组加入不同浓度的 As_2O_3 , 对照组加等量的 PBS, 药物作用 24 h 后每孔加 MTT 15 μ L, 培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 震荡摇匀, 使孔内蓝紫色甲臞结晶充分溶解, 用酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan 公司)在 490 nm 处测其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内, 该吸收值与活细胞数成正比, 样本重复 3 次统计结果。

1.4 流式细胞术

将细胞按 10^5 个细胞·孔⁻¹ 接种于 6 孔培养板中培养 24 h, 按剂量分组加入不同浓度的 As_2O_3 , 对照组加等量的 PBS, 阴性对照组不加任何药品处理, 药物作用 24 h 后先用胰酶消化并制成单个细胞悬液, 再用 PBS 洗涤, 使待测细胞的浓度为 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个·mL⁻¹。取 1 mL 细胞, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C 离心 10 min, 弃上清。加入 1 mL 冷的 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮, $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C 离心 10 min 弃上清。重复上述清洗步骤 2 次。将细胞重悬于 200 μ L Binding Buffer 缓冲液中。加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI 染料, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min 或 4°C 反应 30 min, 加入 300 μ L Binding Buffer 缓冲液, 在 1 h 内流式细胞仪(美国 BD 公司)检测。样本重复 3 次统计结果。

1.5 细胞容量检测

MCF-7 接种在 35 mm 细胞培养皿中培养 24 h, 按剂量分组加入不同浓度的 As_2O_3 , 对照组加等量的 PBS, 加入 As_2O_3 后培养皿被放在普通光学显微镜(日本 OLYMPUS)下观察, 固定焦距, 采用时滞摄影技术, 每 5 min 采集 1 次细胞图像, 采集时间为 2 h。应用 Image-proplus 软件分析细胞图像, 计算细胞面积。细胞相对容量改变应用公式: 相对细胞容量 $(V/V_0) = (S/S_0)^{3/2}$, S 表示在某一时间点的细胞面积; S_0 表示在实验开始时的细胞面积; V 表示在某一时间点的细胞容量(体积); V_0 表示在实验开始时的细胞容量(体积), 细胞容量检测实验在室温下进行。每一张图片取 10 个细胞进行统计, 样本重复 3 次统计结果。

1.6 Caspase-3 活性检测

将细胞按 10^5 个细胞·孔⁻¹ 接种于 6 孔培养板中培养 24 h, 实验组加入 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} As_2O_3$, 对照

组加等量的 PBS, 分别收集 As_2O_3 处理后的细胞与对照组, 离心并轻轻吸弃上清液。细胞加入细胞裂解缓冲液, 充分裂解后高速离心取上清液。用 BCA 法测定总蛋白质含量。检测标本加入 20 μ L 细胞提取液, 37°C 孵育 30 min。然后加入 10 μ L Caspase-3 催化底物 Ac-YVAD-AMC, 37°C 孵育 60 min。荧光分光光度计在 360/460 nm 波长检测荧光强度, 计算 Caspase-3 活性, 样本重复 3 次统计结果。

1.7 统计学方法

本实验中计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用双侧 t 检验, $P < 0.05$ 为具有显著性差异, $P < 0.01$ 为具有极显著性差异。

2 结果

2.1 As_2O_3 对 MCF-7 细胞活力的影响

不同剂量 As_2O_3 (2, 4, 8, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别孵育 MCF-7 细胞 24 h, MTT 结果显示 As_2O_3 可以降低 MCF-7 细胞成活率, 作用具有明显的浓度依赖性。药物浓度在 2, 4, 8 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞的活力分别为对照组的 $(87.63 \pm 4.90)\%$, $(75.67 \pm 4.46)\%$, $(50.70 \pm 2.84)\%$ 和 $(42.41 \pm 2.66)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 < 0.01)。结果见图 1。

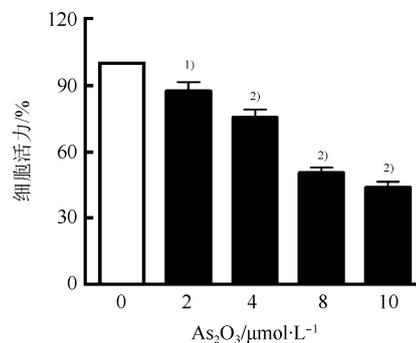


图 1 As_2O_3 降低了 MCF-7 细胞的活力

与 $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} As_2O_3$ 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 As_2O_3 reduced viability of MCF-7 Cells Compared with $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} As_2O_3$ group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

2.2 As_2O_3 诱导 MCF-7 细胞凋亡

流式细胞试验结果, As_2O_3 8, $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 分别孵育 MCF-7 细胞 24 h 之后, 凋亡细胞显著增加。 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} As_2O_3$ 处理细胞后, 正常和早期凋亡细胞分别为 $(52.13 \pm 6.14)\%$ 和 $(45.10 \pm 5.19)\%$, $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} As_2O_3$ 处理细胞后, 正常和早期凋亡细胞分别为 $(39.60 \pm 5.28)\%$ 和 $(57.43 \pm 5.13)\%$ 。结果见图 2。

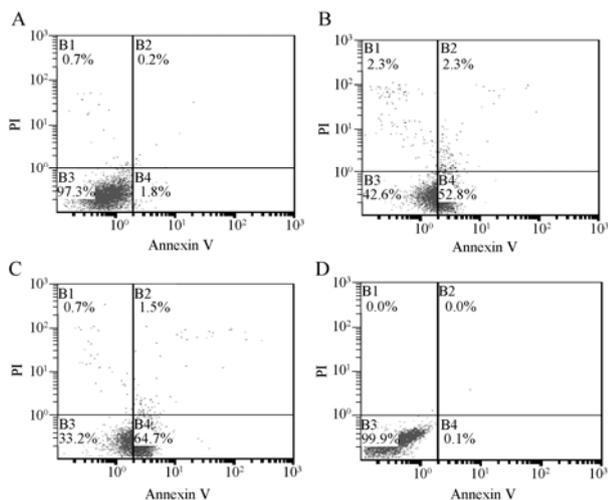


图2 As₂O₃ 诱导 MCF-7 细胞凋亡

A-对照组; B-As₂O₃ 8 μmol·L⁻¹; C-As₂O₃ 16 μmol·L⁻¹; D-阴性对照组

Fig. 2 Apoptosis induced by As₂O₃

A-control group; B-As₂O₃ 8 μmol·L⁻¹; C-As₂O₃ 16 μmol·L⁻¹; D-negative control

2.3 As₂O₃ 介导的 AVD

取对数生长期细胞传代培养, As₂O₃ 处理后的 MCF-7 细胞应用时滞摄影技术每隔 5 min 获取一次图像, 软件分析计算细胞容量, 观察 2 h 内细胞容量随时间变化过程。与对照组相比, 8 μmol·L⁻¹ 和 16 μmol·L⁻¹ As₂O₃ 均能使 MCF-7 细胞容量下降, 至 2 h 分别下降(23.24 ± 0.08)%和(39.02 ± 0.09)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图 3。

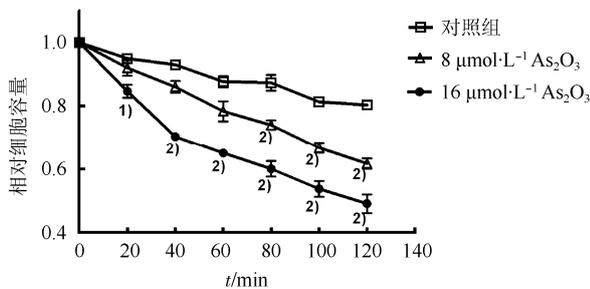


图3 As₂O₃ 诱导了 AVD

与对照组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Apoptotic volume decrease was induced by As₂O₃

Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

2.4 As₂O₃ 对 MCF-7 细胞 Caspase-3 活性的影响

为了进一步探讨 AVD 是否是凋亡的早期事件, 本实验检测了 Caspase-3 的活性。当细胞生长融合密度约 80% 给予 As₂O₃, 分别在 2 h 和 6 h 后提取细胞总蛋白测定 Caspase-3 活性。与对照组相比, 在加入 As₂O₃ 2 h 时 Caspase-3 活性无明显变化, 而加入 As₂O₃ 6 h 时 Caspase-3 的活性增强了

(55.67 ± 0.12)% ($P < 0.01$)。这表明 AVD 是凋亡的早期事件, AVD 发生过程不依赖 Caspase-3 的激活, 先于 Caspase-3 激活。结果见图 4。

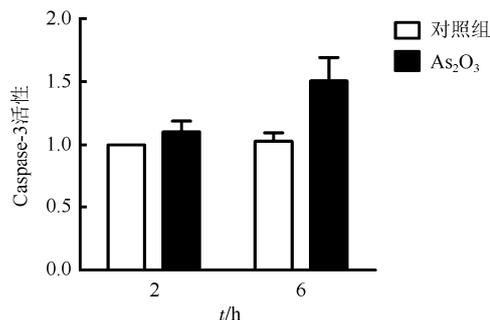


图4 As₂O₃ 对 MCF-7 细胞 Caspase-3 活性的影响

Fig. 4 Caspase-3 activation in As₂O₃ treatment group

3 讨论

As₂O₃ 是存在自然界中一种砷化物, 俗称砒霜、亚砷酸等, 为一种剧毒药, 又是一种作用广泛的药物, 已经使用了 2 400 多年^[1]。As₂O₃ 对治疗急性早幼粒细胞白血病具有很好的疗效。近年来, As₂O₃ 对乳腺癌的抑制作用得到了大量研究的证实^[2-7]。本实验进一步确定了 As₂O₃ 对乳腺癌细胞株 MCF-7 生长的抑制作用, 这种抑制作用呈现剂量的依赖关系, As₂O₃ 抑制 50% 的细胞活力所需要的药物浓度为 8.2 μmol·L⁻¹。

细胞凋亡是在一定的生理和病理条件下, 通过一定的信号传导途径激活的细胞“自杀”程序, 是在一系列基因调控下进行的程序化细胞死亡方式。这被认为是抗白血病等恶性肿瘤的一个重要机制^[8-9]。为了明确 As₂O₃ 这种抑制作用, 笔者进行了细胞凋亡的相关实验。流式细胞检测显示 Ca²⁺ 依赖性磷脂结合蛋白能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS) 特异性结合, 揭示了细胞大部分处于早期凋亡阶段。以上结果可以看出, As₂O₃ 是通过诱导 MCF-7 细胞凋亡而降低细胞活力的。

细胞皱缩或细胞容量下降是凋亡细胞重要的形态学特征, 最早的凋亡研究将其称为“皱缩性坏死”以标志是一种特殊类型的细胞死亡方式^[10]。由于这种凋亡性细胞皱缩在等渗条件下发生, Okada 等^[11]首次将这一过程命名为凋亡性容量下降(apoptotic volume decrease), 目前人们认识到 AVD 是细胞凋亡的关键事件, 在大多数细胞类型中能观察到凋亡细胞存在 AVD 过程, 但在 As₂O₃ 诱导的 MCF-7 细胞凋亡中还没有相关报道。本研

究结果显示,应用 As_2O_3 作用 MCF-7 细胞在 2 h 内细胞容量发生明显下降,但无明显的 Caspase-3 激活, As_2O_3 作用 MCF-7 细胞 6 h Caspase-3 活性显著升高,表明 AVD 是 Caspase-3 激活的上游事件,其发生先于 Caspase-3 被激活,因而是凋亡的早期事件。类似的现象在 U937、HeLa、NG108-15、PC12 细胞也被观察到,在这些细胞应用外源性或内源性凋亡诱导剂(TNF- α 、staurosporine)1 h 内 AVD 发生,而细胞色素 C 释放、Caspase-3 激活及 DNA 片断化发生在凋亡刺激 2~3 h 后^[11]。

对 AVD 过程的认识加深了人们对凋亡发生机制的理解。在 AVD 和细胞凋亡关系研究中,有人发现应用高渗细胞外液介导细胞皱缩时细胞出现凋亡现象^[12],以后又发现应用细胞外高钾培养液、钾通道阻滞剂抑制 AVD 发生时细胞凋亡也被抑制^[11]。这些研究充分证明 AVD 在细胞凋亡中具有重要的调节作用,

综上所述,本研究进一步证实了 As_2O_3 对乳腺癌细胞致凋亡的作用,并发现 AVD 是 As_2O_3 诱导乳腺癌细胞凋亡的早期事件。

REFERENCES

- [1] KLAASSEN C D. Heavy metals and heavy-metal antagonists//GILMAN'S E G. The Pharmacological Basis of Therapeutics [M]. New York: McGraw-Hill, 1996: 649-1672.
- [2] LIU W, GONG Y, LI H, et al. Arsenic trioxide-induced growth arrest of breast cancer MCF-7 cells involving FOXO3a and I κ B kinase β expression and localization [J]. Cancer

- Biother Radiopharm, 2012, 27(8): 504-512.
- [3] WANG Y, ZHANG Y, YANG L, et al. Arsenic trioxide induces the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells through activation of caspase-3 and inhibition of HERG channels [J]. Exp Ther Med, 2011, 2(3): 481-486.
- [4] WANG X, GAO P, LONG M, et al. Essential role of cell cycle regulatory genes p21 and p27 expression in inhibition of breast cancer cells by arsenic trioxide [J]. Med Oncol, 2011, 28(4): 1225-1254.
- [5] ZHOU J, YE J, ZHAO X, et al. JWA is required for arsenic trioxide induced apoptosis in HeLa and MCF-7 cells via reactive oxygen species and mitochondria linked signal pathway [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 230(1): 33-40.
- [6] LIU H, NAREN M D L. Mechanisms of arsenic trioxide used in cancers therapy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(3): 338-342.
- [7] YU L, KUANG Y M, YANG J R, et al. Preparation of arsenic trioxide nanoparticles the cytotoxicity against four tumor cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(7): 701-707.
- [8] CHOW S K, CHAN J Y, FUNG K P. Inhibition of cell proliferation and the action mechanisms of arsenic trioxide As_2O_3 on human breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2004, 93(1): 173-187.
- [9] YE J, LI A, LIU Q, et al. Inhibition of mitogen-activated protein kinase enhances apoptosis induced by arsenic trioxide in human breast cancer MCF-7 cells [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005, 32(12): 1042-1048.
- [10] KERR J F. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death [J]. J Pathol, 1971, 105(1): 13-20.
- [11] MAENO E, ISHIZAKI Y, KANASEKI T, et al. Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9487-9492.
- [12] BORTNER C D, CIDLOWSKI J A. Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes [J]. Am J Physiol, 1996, 271(3 Pt 1): C950-C961.

收稿日期: 2014-05-19

石杉碱甲保护人脑微血管内皮细胞损伤的体外实验研究

姜松国¹, 徐磊², 柴冬梅³, 朱辉武¹, 林铮^{2*} (1.浙江省江山市第四人民医院, 浙江 江山 324100; 2.浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310009; 3.浙江省江山市上余镇卫生院, 浙江 江山 324123)

摘要:目的 体外实验研究石杉碱甲对人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMEC)损伤的保护作用和机制。方法 在培养的 HBMEC 上,利用丙酮醛诱导细胞损伤,通过 MTT 检测细胞活力,LDH、SOD 活性试剂盒及 caspase-3 活性试剂盒检测细胞损伤情况,观察石杉碱甲的作用和机制。结果 石杉碱甲呈浓度依赖地保护 MGO 诱导的细胞损伤,在 10^{-5} mol·L⁻¹ 时呈最大保护作用。丙酮醛能诱导 HBMEC 的 SOD 活性下降,而石杉碱甲(10^{-6} , 10^{-5} mol·L⁻¹)能逆转这种作用。进一步研究发现石杉碱甲能抑制丙酮醛诱导的 caspase-3 活性上升。结论 石杉碱甲对丙酮醛诱导的 HBMEC 的损伤具有保护作用,这可能与抗自由基和抗凋亡作用有关。

关键词: 石杉碱甲; 脑微血管内皮细胞; 丙酮醛; 凋亡

基金项目: 浙江省自然科学基金(Y2100294); 浙江省卫生厅项目(2011KYA073, 2014KYA100); 浙江省中医药项目(2014ZA067)

作者简介: 姜松国,男,主治医师 Tel: (0570)4335650 E-mail: 871449439@qq.com *通信作者: 林铮,男,硕士,主任医师 Tel: (0571)87767233 E-mail: linzzr@126.com