

纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 凋亡的影响*

马淑云¹,高尚风²,吴胜军¹,张少华¹,陈蕊¹,王莉³,徐锐³

(1. 西安医学院第一附属医院妇科,西安 710077;2. 西安交通大学医学院第一附属医院妇产科,西安 710061;
3. 西安医学院第一附属医院科研科,西安 710077)

[摘要] **目的** 探讨纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 的凋亡作用。**方法** 0.6 μmol/L 浓度的纳米雄黄作用于 COC1 细胞,于不同时间收集的细胞。倒置显微镜下观察细胞形态,流式细胞仪检测细胞凋亡率,RT-PCR 检测细胞中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 的 mRNA 的表达水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达水平。**结果** 0.6 μmol/L 浓度的纳米雄黄作用于 COC1 细胞 48 h 后出现显著的凋亡形态改变;纳米雄黄显著的促进细胞凋亡,并随着纳米雄黄处理 COC1 细胞时间的延长凋亡率显著性增加($P < 0.05$);随着纳米雄黄处理时间的延长 COC1 细胞中的 Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$),Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。**结论** 纳米雄黄对 COC1 细胞有显著的促凋亡作用,其作用机制可能与升高 Bax 和 Caspase-3 的表达和降低 Bcl-2 的表达有关。

[关键词] 纳米雄黄;COC1 细胞;Bax;Bcl-2;Caspase-3

[中图分类号] R711.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)29-4041-03

Apoptosis induced by nanoparticles in ovarian cancer COC1*

Ma Shuyun¹, Gao Shangfeng², Wu Shengjun¹, Zhang Shaohua¹, Chen Rui¹, Wang Li³, Xu Rui³

(1. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi 710077, China;
2. Department of Gynecology and Obstetrics, the First Hospital of Medicine School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China; 3. Research Service Office, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an, Shaanxi 710077, China)

[Abstract] **Objective** To explore the apoptosis induced by nanoparticles in ovarian cancer COC1. **Methods** 0.6 μmol/L concentration treated cells COC1, cells were collected at different times. Cell morphology was observed under an inverted microscope, rate of apoptosis were detected by flow cytometry. RT-PCR to detect the mRNA expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in the COC1 cells. Western blot to detect the protein expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3. **Results** Significant apoptotic morphological changes nanoparticles 0.6 μmol/L concentration appear to COC1 cells after 48 h; nanoparticles significantly promoted apoptosis and prolonged treatment with nanoparticles COC1 cell apoptosis rate significantly increased time ($P < 0.05$); with the extension of nanoparticles COC1 cell treatments in the Bax and mRNA and protein expression levels of Caspase-3 was significantly increased ($P < 0.05$), mRNA and protein expression levels of Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Nanoparticles on COC1 cells have significant pro-apoptotic effect. The mechanism of action may be related to increased expression of Bax and Caspase-3, decreased expression of Bcl-2.

[Key words] nanorealgar; COC1 cell; Bax; Bcl-2; Caspase-3

目前,因卵巢癌而死亡的女性排在所有女性恶性肿瘤的首位。近年来临床医生对卵巢癌的治疗主要是采用以铂类化疗药物为基础的化疗,但随着卵巢恶性肿瘤细胞对铂类化疗药物出现不同程度的耐药性,使以铂类化疗药物为基础的化疗效果十分不理想^[1]。雄黄是我国中医药常用的一种含有砷的化合物,有学者研究表明雄黄对白血病有显著的疗效^[2-3]。采用纳米技术处理得到的纳米雄黄相对于雄黄具有溶解性高、毒性降低的特点。然而,关于雄黄抑制卵巢癌恶性肿瘤细胞增殖和促进其凋亡的作用机制尚不清楚。有研究表明 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 在组织细胞的增殖和凋亡的过程中起着非常重要的作用^[4-5]。因此,本文观察纳米雄黄作用卵巢癌细胞 COC1 后,观察 COC1 的凋亡作用和 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 表达水平的变化,以探究雄黄抑制卵巢癌恶性肿瘤细胞增殖和促进其凋亡

的作用机制,为寻找到有效治疗卵巢癌的新药物提供更充足的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人黏液性卵巢恶性肿瘤细胞株 COC1 由西安交通大学第一附属医院中心实验室友情提供,COCl 细胞采用半铁壁悬浮培养。

1.2 主要试剂及仪器 PRMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物材料工程有限公司),Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 抗体(美国 Biowalde 公司),二抗(美国 Rockland 公司),雄黄(西安交通大学第一附属医院血液科友情提供)。精细研磨机(山东龙脉科技公司),光子相关纳米激光粒度分析仪(济南微纳颗粒仪器公司),垂直电泳槽(瑞典 Hofer Amersham Biosciences 公司),酶标仪(Bio-TEK 公司),流式细

胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组及培养 实验共分为平行对照组和纳米雄黄组。平行对照组常规培养,无药物干预;纳米雄黄组常规培养,用纳米雄黄浓度为 $0.6 \mu\text{mol/l}$ 小牛血清培养基培养 24、48、72 h 后收 COC1 卵巢恶性肿瘤细胞。

1.3.2 纳米雄黄的制备 将西安交通大学第一附属医院血液科提供的雄黄采用精细研磨机进行研磨,研磨之后采用光子相关纳米激光粒度分析仪测定研磨后的雄黄颗粒的粒径分布和尺寸的大小。以研磨后的雄黄颗粒平均粒径小于或等于 72.79 nm 作为研磨合格的标准。将研磨处理好的纳米雄黄用不含有小牛血清的培养基进行搅拌溶解,经原子吸收分光光度计检测浓度为 $62.4 \mu\text{mol/L}$,作为储备纳米雄黄液。在使用的过程中用含有 10% 浓度的小牛血清的培养基稀释配制。

1.3.3 COC1 细胞培养和纳米雄黄处理 对 COC1 卵巢恶性肿瘤细胞采用半贴壁悬浮培养,将 COC1 细胞在含有 10% 浓度小牛血清的培养基中培养,用含有 10% 体积浓度的小牛血清的培养基对纳米雄黄储备液进行稀释以配制工作液,配制的纳米雄黄的工作液浓度为 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 。当 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 浓度的纳米雄黄与 COC1 卵巢恶性肿瘤细胞作用 24、48 和 72 h 后收集 COC1 卵巢恶性肿瘤细胞。

1.3.4 COC1 细胞凋亡及细胞周期分析 使用 FITC-Annexin V-PI 双染流式细胞术对 COC1 细胞凋亡进行检测,主要步骤为:收集两株生长周期处于对数期的 COC1 细胞,将 COC1 的细胞浓度稀释为 1×10^6 个/瓶于 50 mL 的培养瓶中,加入适量的纳米雄黄溶液,配制成 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 浓度的工作液。分别培养 24、48、72 h,收集 COC1 细胞。用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次后,参照 ITC-Annexin V-PI 双染试剂盒上的说明,加入相应的试剂,低温避光 30 min,加入结合液之后在流式细胞仪中检测 COC1 细胞的凋亡。

1.3.5 COC1 细胞中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达水平的检测 使用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 COC1 细胞中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平。主要步骤为:收集经过 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 浓度纳米雄黄工作液处理了 24、48、72 h 后 COC1 细胞,使用裂解强度中等的 RIPA 裂解液对收集的 COC1 细胞进行裂解以提取 COC1 细胞的总蛋白,使用 BCA 对提取的总蛋白进行蛋白定量,加入适量的上样缓冲液,取每孔 $60 \sim 80 \mu\text{g}$ 蛋白在 10% 的分离胶中对总蛋白进行电泳分离,将电泳分离后的 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白转移至醋酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,在 1:1 000 的 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 抗体和 1:400 的 β -actin 抗体中 4°C 条件下孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,在 1:3 000 的二抗中孵育 1 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min,在目的蛋白出涂布 ECL 发光试剂,在暗室中曝光,用 Autogel 图像分析软件对曝光的条带进行分析,比较目的蛋白和 β -actin 的灰度值。实验重复 3 次。

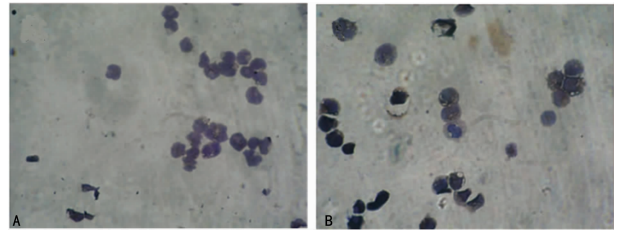
1.3.6 COC1 细胞中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达水平的检测 收集不同时间的 COC1 细胞,以 400 r/min 离心 10 min,收集离心后的细胞,按照 RNA 提取试剂的操作说明提取每个时间点的细胞中的 RNA,检测提取的 RNA 水平和纯度;参照 RT-PCR 操作说明检测各时间点 COC1 细胞中的 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量

资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 LSD 法对计量资料进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 凋亡细胞形态的影响 卵巢癌细胞 COC1 经过 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 浓度的纳米雄黄处理 24 h 后,细胞开始出现凋亡形态学的改变。但此时的细胞是圆形,细胞的体积没有出现显著缩小,胞核和胞质的边界还未完全分清,多数的 COC1 细胞仅能观察到深色的细胞核;处理 48 h 后 COC1 细胞凋亡阳性的细胞数开始增加,细胞形态呈现为非圆形,体积开始显著的缩小,胞质和胞核的边界分清。而在相同的细胞培养时间内,未被纳米雄黄处理的 COC1 细胞仍然呈现为半贴壁生长,COC1 细胞的体积大,观察不到明显的细胞核形态,细胞核呈现为均匀性的淡染,没有特异性的染色,见图 1。



A: 纳米雄黄干预培养 48 h; B: 纳米雄黄未干预培养 48 h。

图 1 纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 凋亡的细胞形态的影响

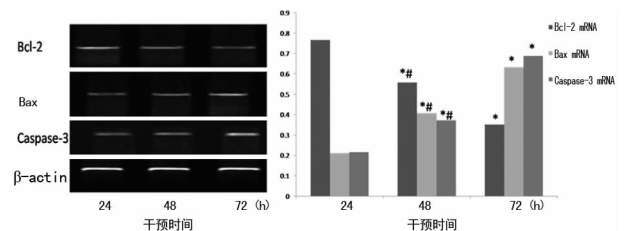
2.2 两组卵巢癌细胞 COC1 凋亡率比较 纳米雄黄组干预 24、48、72 h 的凋亡率显著高于平行对照组干预相同时间的凋亡率($P < 0.05$);纳米雄黄组中干预 72 和 48 h 的凋亡率显著高于干预 24 h 的凋亡率($P < 0.05$);纳米雄黄组中干预 72 h 的凋亡率显著高于干预 48 h 的凋亡率($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组卵巢癌细胞 COC1 凋亡率比较 (%)

组别	干预 24 h	干预 48 h	干预 72 h
平行对照组	1.34 ± 0.21	2.45 ± 0.34	5.66 ± 0.48
纳米雄黄组	$9.36 \pm 0.55^*$	$17.46 \pm 1.02^{* \#}$	$22.89 \pm 0.98^{* \# \Delta}$

*: $P < 0.05$,与平行对照组比较;#: $P < 0.05$,与干预 24 h 比较; Δ : $P < 0.05$,与干预 48 h 比较。

2.3 纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响 纳米雄黄组 COC1 细胞中的 Bax mRNA 和 Caspase-3 mRNA 表达随着干预时间的延长而显著增加($P < 0.05$);COC1 细胞中的 Bcl-2 mRNA 表达随着干预时间的延长而显著降低($P < 0.05$),见图 2。

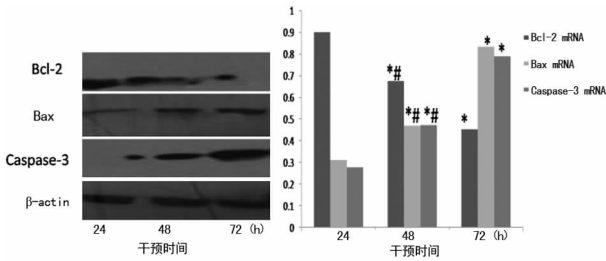


*: $P < 0.05$,与干预 24 h 比较;#: $P < 0.05$,与干预 48 h 比较。

图 2 纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响

2.4 纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3

蛋白表达的影响 纳米雄黄组 COC1 细胞中的 Bax 蛋白和 Caspase-3 蛋白表达随着干预时间的延长而显著增加 ($P < 0.05$); COC1 细胞中的 Bcl-2 蛋白表达随着干预时间的延长而显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3。



*: $P < 0.05$, 与干预 24 h 比较; #: $P < 0.05$, 与干预 48 h 比较。

图 3 纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 中 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响

3 讨 论

卵巢恶性肿瘤是严重威胁女性生命安全的一种恶性肿瘤, 目前已是女性三大恶性肿瘤之一。目前, 对卵巢癌的治疗主要是以铂类化疗药物为基础的化疗治疗, 这种治疗方法在早期时可以收到显著的临床效果, 但随着卵巢恶性肿瘤细胞对这些化疗药物的耐受性增加, 敏感性降低, 在后期治疗过程中临床效果显著降低, 达不到理想的治疗效果。硫化物类的化疗药物含有砷元素, 在临床上除了具有解毒杀虫、燥湿祛痰、截疟等作用外, 还具有治疗慢性粒细胞性白血病等抗肿瘤的作用^[6]。目前大多数的研究发现, 雄黄主要对血液系统的恶性肿瘤具有抗肿瘤的作用^[7]。雄黄抗肿瘤的主要作用机制主要有以下几点: (1)抑制恶性肿瘤细胞的增殖; (2)促进恶性肿瘤细胞的凋亡; (3)抑制实体肿瘤中的血管新生^[8-9]。

本研究发现, 纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 具有显著的促凋亡作用, COC1 细胞在 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的纳米雄黄的作用下细胞形态会发生显著的凋亡变化, 并且随着纳米雄黄处理时间的延长, 细胞凋亡形态的变化更严重。在本研究中的流式细胞仪检测凋亡结果表明 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 纳米雄黄对 COC1 细胞的凋亡具有促进的作用, 并且随着纳米雄黄处理 COC1 细胞时间的延长, COC1 细胞的凋亡率会显著增高, 这些结果表明纳米雄黄对卵巢癌细胞 COC1 具有促进凋亡的作用。黄娇娥等^[10]研究发现, 雄黄对人的肝癌细胞 Bel-7402 具有促进凋亡的作用。本研究结果和其研究结果表明, 纳米雄黄除了对血液系统的恶性肿瘤细胞具有抗肿瘤的作用之外, 对包括卵巢癌在内的实体瘤也具有显著的抗肿瘤的作用, 可以探索雄黄治疗包括卵巢癌在内的实体瘤的治疗。

随着对抗肿瘤药物机制研究的深入, 医学界发现多数的抗肿瘤药物主要是通过调节促凋亡蛋白和抑凋亡蛋白水平的变化来实现抗肿瘤的作用^[11-12]。Bcl-2 是机体中重要的抑制凋亡的基因, 通过编码相应的蛋白来抑制细胞色素 C 从细胞中线粒体内释放达到抗凋亡的作用^[13]。Bax 是机体中重要的促凋亡基因, 通过编码相应的蛋白达到促进恶性细胞凋亡的作用^[14]。但 Bcl-2 编码的凋亡抑制蛋白增多会与 Bax 结合抑制恶性细胞的凋亡。当 Bcl-2/Bax 比值发生变化时会调节凋亡蛋白 Caspase-3 的表达, 进而决定促进肿瘤细胞凋亡或抑制肿瘤细胞凋亡^[15]。本研究 RT-PCR 和 Western blot 检测结

果表明, 随着 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的纳米雄黄处理卵巢癌细胞 COC1 时间的延长, Caspase-3 和 Bax 的 mRNA 和蛋白表达量显著增加, 而凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白的表达量显著降低。该结果表明纳米雄黄促进卵巢癌细胞 COC1 凋亡的作用机制是通过将 Bcl-2/Bax 比值偏向 Bax, 进而促进促凋亡因子 Caspase-3 的表达量增加, 最终达到促进 COC1 细胞凋亡的作用。

参考文献

- [1] Itamochi H. Targeted therapies in epithelial ovarian cancer: Molecular mechanisms of action [J]. World J Biol Chem, 2010, 1(7): 209-220.
- [2] 张春敏, 孟双荣, 齐元富. 雄黄抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 山东中医杂志, 2010, 29(8): 579-581.
- [3] 王永胜, 周思彤, 魏虎来. 纳米雄黄对药物敏感性白血病细胞的凋亡诱导作用 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(13): 2202-2205.
- [4] 浦利军, 杨勤. 雷帕霉素对大鼠糖尿病性白内障晶状体上皮细胞凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 表达的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 38(9): 10-13.
- [5] 高华, 朱长明, 王涛, 等. PI3K 和 MAPK 抑制剂对胃肠道间质瘤细胞系 GIST-T1 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 38(9): 20-22, 26.
- [6] 叶世龙, 刘爱芹. 安宫牛黄丸的实验药理学研究 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 40(9): 1954-1957.
- [7] Van De Sluis B, Mao X, Zhai Y, et al. COMMD1 disrupts HIF-1 α /beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion [J]. J Clin Invest, 2010, 120(6): 2119-2130.
- [8] 石利利, 朱化超, 张梅, 等. 雄黄诱导人弥漫性大 B 淋巴瘤 SU-DHL-4 细胞凋亡及其机制的初步研究 [J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(3): 729-734.
- [9] 罗雅琴, 徐瑞荣. 雄黄治疗白血病机制研究进展 [J]. 吉林中医药, 2011, 31(7): 703-706.
- [10] 黄娇娥, 戴支凯. 雄黄抗人肝癌 BEL-7402 细胞作用 [J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(8): 936-939.
- [11] 陈津, 张如松. 细胞凋亡机制概述 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 40(4): 886-889.
- [12] 高枫, 符兆英. 天然产物诱导肿瘤细胞凋亡作用机制的研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18(7): 557-560.
- [13] 张艳波, 王军, 王勇, 等. 小檗碱对大鼠脑缺血再灌注损伤组织 Bcl-2、Bax 表达及凋亡活性影响 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25(2): 126-129.
- [14] 刘慧萍, 尤昭玲, 雷磊, 等. 补肾活血方对免疫性卵巢早衰小鼠卵泡凋亡调控基因 (Bcl-2/Bax) 蛋白的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 39(5): 1036-1038.
- [15] 刘郁东, 郑启新, 吴宏斌, 等. 雷帕霉素对不同肿瘤细胞 Bax/Bcl-2 和活性 caspase-3 表达的影响 [J]. 肿瘤, 2013, 33(2): 138-143, 163.

(收稿日期: 2016-02-22 修回日期: 2016-04-09)