

二氯化钴诱导 A549 细胞凋亡及机制的研究

陈 健 仇 容 毕艳丽 徐麟皓 沈香娣

摘 要 **目的** 探讨二氯化钴(CoCl_2)诱导人非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的作用机制。**方法** 应用不同浓度 CoCl_2 作用 A549 细胞不同时间,建立化学性缺氧诱导细胞凋亡的实验模型;应用 MTT 法检测细胞生长抑制率;应用 AO/EB 荧光染色法检测细胞凋亡情况;应用 Western blotting 法检测总 Akt(total - Akt)、磷酸化 Akt(p - Akt)和 survivin 蛋白表达情况。**结果** 300、400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 24、36、48h 后 A549 细胞的生长受到不同程度的抑制,并呈现比较明显的剂量和时间依赖关系;通过荧光显微镜下能观察到细胞呈新月形、核质体绿色、染色质浓缩,呈现凋亡显著特征,200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 24、48h 后的细胞凋亡率显著高于对照组($P < 0.01$);Western blotting 检测结果显示 300、400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 48h 后细胞内 p - Akt、survivin 蛋白表达量较对照组显著减少($P < 0.01$),300 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 36、48h 较对照组能显著下调 p - Akt、survivin 蛋白表达量($P < 0.01$),而总 Akt 蛋白表达量均无显著变化。**结论** CoCl_2 可能是通过抑制 p - Akt 和 survivin 的蛋白表达,从而诱导 A549 细胞凋亡。

关键词 肺癌细胞 缺氧 凋亡 p - Akt Survivin

Mechanism of Apoptosis in A549 Cells Induced by CoCl_2 . Chen Jian, Qiu Rong, Bi Yanli, et al. Zhejiang Medical College, Zhejiang 310053, China

Abstract Objective To explore the mechanism of apoptosis in A549 cell line of non - small lung cancer induced by CoCl_2 . **Methods** The hypoxia model was set up by using different concentration of cobalt chloride (CoCl_2) to affect A549 cell line at different times. The growth inhibition was detected by MTT assay and the morphological transformation of cell was observed by fluorescent microscope. The change expression of Akt, p - Akt and survivin were quantified by Western blotting. **Results** The growth inhibition rate of A549 was significantly increased in the groups that were treated by CoCl_2 (300, 400 $\mu\text{mol/L}$) in 24, 36, 48h respectively ($P < 0.01$). From the results of morphology, after treatment of 24, 48h with CoCl_2 (200, 300, 400 $\mu\text{mol/L}$), we demonstrated that A549 cell line was characterized by apoptosis of crescent - shaped cells, the green nuclear plastid and nuclear fragmentation in this groups and the growth inhibition rate of A549 was significantly increased in the group that was treated by CoCl_2 (300, 400 $\mu\text{mol/L}$) in 48h when compared with the control group ($P < 0.01$). After exposing to CoCl_2 (300 $\mu\text{mol/L}$) in 36, 48h, the expression of survivin and p - Akt protein in A549 cell line were apparently downregulated ($P < 0.01$), however, the expression of Akt had no markable change. **Conclusion** CoCl_2 induces apoptosis of A549 cell line through suppressing the expression of p - Akt and survivin protein.

Key words Lung cancer; Hypoxia; Apoptosis; P - Akt; Survivin

缺氧是实体肿瘤的主要生长特性之一,与肿瘤的凋亡抑制、放疗耐受、血管生成和侵袭转移等关系密切^[1]。也有研究表明缺氧可以通过抑制线粒体呼吸链、降低线粒体膜电位,增加活性氧的生成以及通过 JNK/SAPK 等信号途径诱导凋亡^[2]。本实验从缺氧对人非小细胞肺癌 A549 体外毒性试验,并对细胞传导通路的相关分子进行研究,探讨缺氧诱导肺癌细胞凋亡的分子机制。

材料与方法

1. 细胞来源和培养:人非小细胞肺癌 A549 细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司。细胞置于 37℃、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱培养,培养液为含有 10% 小牛血清的 RPMI1640,每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

2. 药物和试剂:二氯化钴(CoCl_2)购自美国 Sigma 公司;RPMI1640 培养液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司;小牛血清购自杭州四季青生物制品公司;MTT、DMSO 均为美国 MBI 公司产品;荧光染色试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;一抗(survivin、Akt 和 p - Akt 抗体购自美国 CST 公司; β - actin 购自美国 Santa Cruz 公司),二抗(survivin、Akt、p - Akt 和 β - actin 均购自美国 Pierce 公司)。

3. MTT 法检测细胞生长抑制率:用培养液稀释配成不同

基金项目:浙江省卫生厅立项资助项目(2008A033)

作者单位:310053 杭州,浙江医学高等专科学校(陈健、仇容、徐麟皓、沈香娣);310002 杭州海勤疗养院(毕艳丽)

通讯作者:仇容,电子信箱:wopu1998@hotmail.com

浓度 CoCl_2 (100、200、300、400 $\mu\text{mol/L}$)。以约 2.0×10^4 个/孔细胞接种于 96 孔培养板中,待细胞贴壁后弃去旧培养液,分别加入不同浓度 CoCl_2 ,每个浓度每个时间点均设 6 个平行孔,并设细胞对照组,细胞对照组加入无血清培养液,培养 24、36 和 48h。采用 MTT 法检测,弃去培养液,加入 5g/L 的 MTT 溶液 20 微升/孔,继续培养 4h,然后吸弃上清液,加 150 微升/孔 DMSO,振荡 10min 后用酶标仪测每孔 $A_{490\text{nm}}$ 值,计算细胞生长抑制率(IR)。细胞生长抑制率 = $[1 - (A_{\text{药物处理组}}/A_{\text{细胞对照组}})] \times 100\%$ 。实验重复 3 次,取平均值。

4. AO/EB 荧光染色法检测细胞凋亡:以约 1.0×10^6 个/孔细胞接种于 6 孔培养板中,待贴壁后弃去旧培养液,分别加入不同浓度的 CoCl_2 (200、300、400 $\mu\text{mol/L}$),并设细胞对照组,培养 24、48h,用 PBS 洗涤并配成 5.0×10^5 个/ml 细胞悬液,将 25 μl 细胞悬液和染色反应液混合,吸取 10 μl 混合液置于一载玻片,并用盖玻片盖上,在荧光显微镜 510nm 激发波长下观察细胞。计数 500 个细胞,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率 = $[(\text{凋亡早期细胞} + \text{凋亡晚期细胞})/\text{细胞总数}] \times 100\%$ 。实验重复 3 次,取平均值。

5. Western blotting 检测蛋白表达:实验组分别用不同浓度

(200、300、400 $\mu\text{mol/L}$) CoCl_2 培养 24h 及 300 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 24、36、48h,并设细胞对照组,收集各组细胞。PBS 洗涤 2 次,加入蛋白裂解液,置冰上 30 ~ 60min。12000r/min 离心 15min,取上清液,采用 BCA 法进行总蛋白定量,然后上样,电泳,转膜,封闭,加一抗,4℃ 孵育过夜,TBS-T 洗膜 3 次,二抗孵育 2h,洗膜 3 次,加入 ECL,暗盒中曝光后进行显影和定影。应用凝胶扫描仪对胶片进行光密度扫描,并以 β -actin 校正做相对量分析,数值以两者积分光密度的比值表示。实验重复 3 次,取平均值。

6. 统计学方法:结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。同一处理因素多组之间采用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学显著性差异。

结 果

1. 细胞增殖的检测结果:300、400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 24、36、48h 后 A549 细胞的生长受到不同程度的抑制,与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$),并呈比较明显的剂量和时间依赖关系,400 $\mu\text{mol/L}$ 48h 后细胞抑制率可达 79.03% (表 1)。

表 1 不同浓度 CoCl_2 作用不同时间对细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	24h A_{490} 值	IR(%)	36h A_{490} 值	IR(%)	48h A_{490} 值	IR(%)
1(对照组)	0.62 $\pm$ 0.03	—	0.60 $\pm$ 0.03	—	0.62 $\pm$ 0.06	—
2(100 $\mu\text{mol/L}$)	0.73 $\pm$ 0.07	-17.74	0.76 $\pm$ 0.05	-26.67	0.56 $\pm$ 0.05	9.68
3(200 $\mu\text{mol/L}$)	0.61 $\pm$ 0.04	1.61	0.55 $\pm$ 0.09	8.33	0.42 $\pm$ 0.02 *	32.26
4(300 $\mu\text{mol/L}$)	0.38 $\pm$ 0.01 **	38.71	0.38 $\pm$ 0.01 *	36.67	0.32 $\pm$ 0.06 **	48.39
5(400 $\mu\text{mol/L}$)	0.31 $\pm$ 0.02 **	50.00	0.22 $\pm$ 0.06 **	63.33	0.13 $\pm$ 0.05 **	79.03

与对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

2. 凋亡细胞的检测结果:通过荧光显微镜下观察到凋亡早期细胞形状不规则,如呈新月形,核质体呈绿色;凋亡晚期细胞大小不一,可见胞质芽状突起,核质体呈橙色,染色质浓缩,见图 1。200、300、400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 24、48h 后的细胞凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.01$) (表 2)。

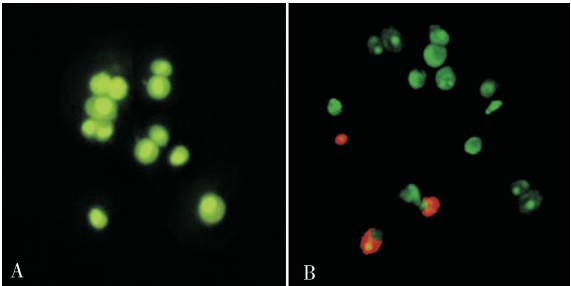


图 1 CoCl_2 作用后的 A549 细胞形态

A. 正常细胞:细胞呈圆形,核质体均匀染成绿色,大小形状一致;
B. 凋亡早期细胞:细胞形状不规则,如呈新月形,核质体呈绿色;
凋亡晚期细胞:细胞大小不一,可见胞质芽状突起,核质体呈橙色,染色质浓缩

表 2 不同浓度 CoCl_2 作用不同时间对细胞凋亡的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	组别 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞凋亡率(%) (24h)	细胞凋亡率(%) (48h)
对照组	—	2.23 $\pm$ 0.41	2.55 $\pm$ 0.48
CoCl_2 组	200	9.34 $\pm$ 0.87 *	12.13 $\pm$ 1.61 **
	300	12.93 $\pm$ 1.50 **	21.25 $\pm$ 3.52 **
	400	19.17 $\pm$ 2.93 **	26.09 $\pm$ 1.80 **

与对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

3. total-Akt、p-Akt 及 survivin 蛋白表达的检测结果:300、400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 48h 后 p-Akt、survivin 蛋白表达量较对照组显著减少 ($P < 0.01$), 300 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用 36、48h 较对照组能显著下调 p-Akt、survivin 蛋白表达量 ($P < 0.01$), 而 total-Akt 蛋白表达量均无显著变化。结果见图 2、图 3,表 3、表 4。

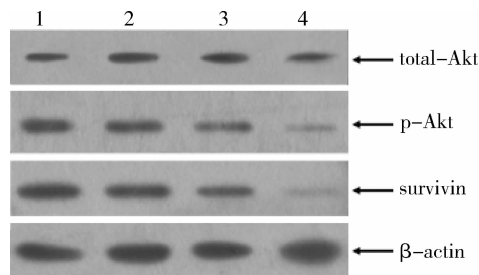


图2 不同浓度 CoCl_2 作用 48h 后 total - Akt、p - Akt 及 survivin 蛋白表达

1. 对照; 2. 200 $\mu\text{mol/L}$; 3. 300 $\mu\text{mol/L}$; 4. 400 $\mu\text{mol/L}$

表3 不同浓度 CoCl_2 作用 48h 后 total - Akt、p - Akt 及 survivin 蛋白表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别		total - Akt	p - Akt	survivin
($\mu\text{mol/L}$)				
对照组	-	0.20 ± 0.01	0.39 ± 0.03	0.46 ± 0.03
CoCl_2 组	200	0.22 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.40 ± 0.02
	300	0.20 ± 0.03	$0.28 \pm 0.01^*$	$0.30 \pm 0.03^{**}$
	400	0.19 ± 0.02	$0.14 \pm 0.03^{**}$	$0.11 \pm 0.03^{**}$

与对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

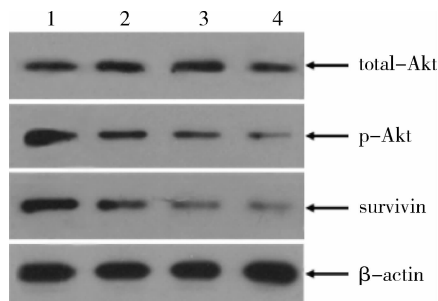


图3 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用不同时间后 total - Akt、p - Akt 及 survivin 蛋白表达

1. 对照; 2. 24h; 3. 36h; 4. 48h

表4 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 作用不同时间后 total - Akt、p - Akt 及 survivin 蛋白表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组		Total - Akt	p - Akt	survivin
对照组	-	0.21 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.03
CoCl_2 组	24h	0.22 ± 0.05	$0.26 \pm 0.02^*$	0.34 ± 0.03
	36h	0.20 ± 0.02	$0.20 \pm 0.03^{**}$	$0.22 \pm 0.02^{**}$
	48h	0.17 ± 0.04	$0.15 \pm 0.02^{**}$	$0.15 \pm 0.02^{**}$

与对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

讨 论

正常氧供给条件下,钴通过细胞内离子置换使亚铁螯合酶失活,抑制细胞氧化反应,从而达到常氧下模拟细胞缺氧的目的。我们采用 CoCl_2 处理 A549 细胞,模拟体外细胞化学性缺氧进行实验。应用 MTT 法和细胞形态学检测证实 CoCl_2 对 A549 细胞具有明

显的毒性作用,且呈剂量 - 时间依赖性地增加细胞生长抑制率并诱导其凋亡,400 $\mu\text{mol/L}$ 作用 48h 细胞生长抑制率高达 79%,细胞凋亡率高达 26%。

AKT 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它处在多条信号通路的重要交叉点,在细胞的存活和介导肿瘤的发生中有重要作用,并且已经成为肿瘤治疗的新靶点之一^[3]。p - Akt 是 AKT 的功能活化状态,在大部分肿瘤中高表达,其活化过程可分为 PI_3K 依赖和非 PI_3K 依赖两种。磷脂酰肌醇 - 3 激酶 (PI_3K) 是细胞内磷脂的关键调节剂, Akt 处在 $\text{PI}_3\text{K}/\text{Akt}$ 信号通路的中心环节,是 PI_3K 下游的直接靶蛋白, Akt 催化结构域的 Thr308 及 Ser473 位点的磷酸化而被激活,成为 p - Akt^[4], 只有 p - AKT 才具有生物学特性。本实验 Western blotting 法检测了 CoCl_2 处理前后的 Akt、p - Akt 蛋白表达变化,结果显示 p - Akt 蛋白表达量比对照组下降,统计学有显著性差异,且呈剂量 - 时间依赖性,而总 AKT 蛋白改变无显著性差异,说明 p - Akt 是细胞内早反应事件,证实该信号通路被化学性缺氧阻断。p - Akt 抑制细胞凋亡与其能够磷酸化激活下游一系列分子如 Bcl - 2 家族、Foxo 家族、IAPs 家族、半胱氨酸蛋白酶 (caspase) - 3、caspase - 9、Bad、NF - κB 等成员有关,保护细胞不发生凋亡^[5-8]。

经典的凋亡通路有死亡受体通路和线粒体通路,最后都激活天冬氨酸特异性 caspase 家族导致凋亡的发生,而凋亡抑制蛋白 (IAPs) 家族起抑制凋亡的作用^[9]。survivin 是 IAPs 家族的一个新成员,是目前发现最强的凋亡抑制因子。研究证实,它在肺癌组织中表达高达 90%,并且是非小细胞肺癌最显著的预后影响因子之一^[10]。survivin 的高表达可抑制 Fas、Bax、caspase 以及抗肿瘤药物等多种因素所诱导的细胞凋亡。本实验检测结果显示, CoCl_2 处理后的 survivin 蛋白表达水平显著下降,并呈剂量 - 时间依赖性,促进细胞凋亡的发生。而且本研究也探讨了 p - Akt 和 survivin 的关系,结果表明 p - Akt 和 survivin 表达呈正相关,提示在 A549 细胞中 survivin 的高表达可能与 Akt 的活化有关。Fornaro 等在前列腺癌细胞及 $\text{CD}34^+$ 的脐血细胞中也证实了存在 Akt/survivin 通路。

基于以上实验结果可证实, CoCl_2 诱导 A549 细胞凋亡与阻断 Akt 信号转导通路,下调 survivin 表达发病机制占有重要地位,但细胞凋亡过程是多系统、多因素参与的复杂过程,是否还有其他机制的参与,具体的机制尚有待进一步实验研究证实。

参考文献

- 1 Hoeckel M, Schlenger K, Hoeckel S, *et al.* Hypoxia cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive[J]. *Cancer Res*, 2001, 59(18):4525-4528
- 2 Kunz M, Ibrahim S, Koczan D, *et al.* Activation of c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is critical for hypoxia-induced apoptosis of human malignant melanoma[J]. *Cell Growth Differ*, 2001, 12(3):137-145
- 3 Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma[J]. *APMIS*, 2007, 115(10):1161-1176
- 4 Viniegra J, Martfnez N, Modirassari P, *et al.* Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM[J]. *Biol Chem*, 2005, 280:4029-4036
- 5 Fayard E, Gill J, Paolino M, *et al.* Deletion of PKB alpha/Akt1 affects thymic development[J]. *PLoS One*, 2007, 2(10):992
- 6 Matter M, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and

- alpha(v)beta3 integrins that elevates Bcl-2 transcription[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(30):27757-27763
- 7 王东海, 王建祥. PI3K/Akt 信号通路异常与白血病[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2006, 29(1):12-24
- 8 苗丽君, 王静. AKT 与肿瘤的研究进展[J]. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 2004, 24(5):406-409
- 9 Gu K, Ke A. Transforming growth factor beta can be a parameter of aggressiveness of pT1 colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(8):1193
- 10 Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, *et al.* Prognostic implications of cellcycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11):3974-3986

(收稿:2011-06-30)

(修回:2011-07-07)

FOLFOX 方案化疗对胃癌术后患者外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞细胞增殖及功能的影响

蒋 平 唐湘莲 韩绍伟

摘 要 **目的** 探讨 FOLFOX 方案化疗对胃癌术后患者外周血 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞(Treg 细胞)比例及功能的影响。**方法** 选择 43 例胃癌术后化疗患者,于化疗前 1 天、化疗结束后第 5 天采集外周血。采用流式细胞法检测外周血 Treg 细胞的比例;RT-PCR 法检测外周血 Treg 细胞 FoxP-3 mRNA 表达水平;将分选的 Treg 细胞和 CD4⁺CD25⁻T 细胞按单纯 Treg 细胞组、1:1 混合细胞组、单纯 CD4⁺CD25⁻T 细胞组培养,³H-TdR 掺入法检测 Treg 细胞体外抑制 CD4⁺CD25⁻T 细胞增殖的能力。**结果** 43 例胃癌患者化疗前 1 天外周血 Treg 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例为 17.63%±6.31%,化疗后降至 13.79%±4.82%(*P*<0.01);化疗后 FoxP-3 表达水平较化疗前显著下降(*P*<0.01);化疗后 Treg 细胞对 CD4⁺CD25⁻T 细胞的增殖抑制率由化疗前的 54.64%±5.15%下降至 24.63%±2.34%(*P*<0.01)。**结论** FOLFOX 化疗方案可减少胃癌患者外周血 Treg 细胞数量,下调其表面标志物 FoxP3 基因的表达水平,减弱 Treg 细胞的免疫抑制功能,有利于诱生抗肿瘤免疫效应。

关键词 胃癌 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 化疗

Influence of FOLFOX Chemotherapy on the Percentage and Function of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell in Peripheral Blood of Gastric Cancer Patients after Operation. Jiang Ping, Tang Xianglian, Han Shaowei. Wenzhou Medical College Affiliated Second Hospital, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To observe the influence of FOLFOX chemotherapy on the percentage and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell(Treg) in peripheral blood(PB) of gastric cancer patients after operation. **Methods** The prevalence of Treg in PB one day before chemotherapy and five days after chemotherapy was examined by flow cytometry method in 43 cases patients suffering gastric cancer. RT-PCR techniques were used to detect the expression of FoxP3 mRNA in these Treg cells. To determine regulatory properties, Treg(freshly isolated) and CD4⁺CD25⁻T cell from tumor patients were cocuhured in a ratio of 1:1. Proliferation was measured by ³H-TdR assay. **Results** The percentage of cells in the PB of 32 patients before chemotherapy was 17.63%±6.31% in CD4⁺T cells, and the percent-

基金项目:温州市科技局科研科技合作资助项目(2008S0411)

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院普外科(蒋平、韩绍伟);中南大学湘雅二医院普外科(唐湘莲)

通讯作者:蒋平,电子信箱:jiangstjst@163.com