

Caspase-3 在硫化砷诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡中的作用

尹伶, 濮德敏*, 程艳香, 刘嵘, 李天

(华中科技大学附属同济医院妇产科, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 探讨硫化砷 (As_4S_4) 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的分子机制。方法 以不同剂量 (7.5、15、30、60 mg/L) 的 As_4S_4 12、24、36、48、60 h 处理 HeLa 细胞, 用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定细胞增殖抑制率; 采用流式细胞术测定细胞凋亡情况; Western blot 法检测不同剂量 As_4S_4 处理 HeLa 细胞后凋亡相关蛋白 bcl-2、caspase-3 表达的变化; 并以流式细胞术检测半胱氨酸酶 3 (caspase-3) 酶活性的变化。结果 不同剂量 As_4S_4 处理的 HeLa 细胞, 细胞增殖受到抑制, 作用呈明显的时效和量效关系。24 h 时 IC_{50} 为 30 mg/L, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 流式细胞术显示不同浓度 As_4S_4 作用 HeLa 细胞 24 h 后, 出现明显的凋亡峰, 其凋亡率分别为 (8.13 ± 1.13)%、(29.58 ± 2.51)%、(46.24 ± 3.92)%、(62.36 ± 4.42)%, 对照组没有出现凋亡峰, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 经 As_4S_4 处理后凋亡相关蛋白 bcl-2 表达下降, caspase-3 表达增加; 随着 As_4S_4 剂量的增加, 表达活性 caspase-3 的细胞百分率逐渐增加, 分别为 (2.67 ± 0.22)%、(9.53 ± 0.15)%、(21.28 ± 0.43)%、(39.63 ± 0.80)%、(63.40 ± 0.69)% ($P < 0.01$)。结论 As_4S_4 体外对 HeLa 细胞具有增殖抑制和促进凋亡作用, 其作用机制可能通过下调 bcl-2 蛋白表达, 活化 caspase-3 的活性来起作用。

关键词: 硫化砷 (As_4S_4); 细胞凋亡蛋白酶 (caspase-3); Bcl-2 蛋白; 细胞凋亡; HeLa 细胞

中图分类号: R994.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)06-0324-04

Role of caspase-3 played in As_4S_4 induced apoptosis of HeLa cell line

YIN Ling, PU De-min*, CHENG Yan-xiang, LIU Rong, LI Tian

(Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract Objective To investigate the possible role of caspase-3 and bcl-2 played in As_4S_4 induced apoptosis of cervical tumor HeLa cell line. **Method** HeLa cells were cultured with various concentrations (7.5, 15, 30 and 60 mg/L) of As_4S_4 for 12, 24, 36, 48 and 60 h respectively, then measuring the situation of cell growth apoptosis with MTT and flow cytometry analysis. The expressions of bcl-2 and caspase-3 protein were detected by Western blot, caspase-3 activity was evaluated with flow cytometry. **Result** The results showed that As_4S_4 might time and dose dependently depress the proliferation of cervical tumor HeLa cell line significantly, the IC_{50} for 24 h was 30 mg/L. Flow cytometry revealed after 24 h co-culture the apoptotic rates of HeLa cells were (8.13 ± 1.13)%, (29.58 ± 2.51)%, (46.24 ± 3.92)% and (62.36 ± 4.42)%, respectively ($P < 0.01$), under different concentrations of As_4S_4 (7.5, 15, 30, 60 mg/L), while the apoptotic peak did not appear in control group ($P < 0.01$). The expression of bcl-2 protein was also down-regulated; while caspase-3 protein was up-regulated with the increase of dose, (2.67 ± 0.22)%, (9.53 ± 0.15)%, (21.28 ± 0.43)%, (39.63 ± 0.80)% and (63.40 ± 0.69)%, respectively ($P < 0.01$). **Conclusion** As_4S_4 has the effect of depressing proliferation and enhancing apoptosis on HeLa cell *in vitro*, its mechanism may related to down-regulating the expression of bcl-2 protein and activating the activity of caspase-3.

Key words: As_4S_4 ; Caspase-3; Bcl-2; Apoptosis; HeLa cell

雄黄主要成分为硫化砷 (As_4S_4), 在我国传统医学中有着悠久的历史。近来国内学者发现雄黄具有抗肿瘤作用, 尤其对恶性血液病的治疗效果显著^[1~3], 已成为抗肿瘤研究热点。但其对实体肿瘤的作用研究甚少, 对妇科肿瘤的作用未见报道。本实验采用高纯度的硫化砷 (As_4S_4), 在既往实验的基础上观察对体外培养宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的作用, 并探讨其诱导细胞凋亡的可能机制, 为 As_4S_4 抗实体肿瘤的作用提

供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

药物: 高纯度硫化砷 (经鉴定为 96%) 由西安交通大学血液病研究中心提纯并惠赠。培养基 RPMI 1640 购自 Sigma 公司, 鼠抗人 bcl-2、caspase-3 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), RNase A、1 kb DNA ladder、碘化丙啶 (PI) 和 caspase-3 活性检测试剂盒购自晶美公司 (深圳)。

1.2 细胞培养

人宫颈癌 HeLa 细胞株购自上海科学院细胞中心。

收稿日期: 2006-09-18; 修回日期: 2006-10-24

作者简介: 尹伶 (1965-), 女, 副教授, 博士研究生, 研究方向: 妇科疾病, 工作单位: 武汉科技大学临床学院。

* 通讯作者, 博士生导师, 教授。

在含有 10% 的胎牛血清、青霉素 100 U/ml 及链霉素 100 U/ml 的 RPMI1640 培养基中 37℃、5%CO₂ 条件下培养箱中贴壁培养, 每 48 h 换液传代一次, 取生长良好、细胞活性大于 98% 的细胞进行实验。

1.3 MTT 检测

以每孔 1×10⁵ 个 HeLa 细胞接种于 96 孔培养板, 分为空白组 (调 0)、As₄S₄ 实验组 (7.5、15、30、60 mg/L, 参考其他文献并进行多次预实验所得浓度) 和对照组 (不加药物的细胞), 分别培养 12、24、36、48、60 h 后加入 MTT 液, 再培养 4 h, 吸弃孔中的培养上清, 每孔加入 150 μl DMSO, 混匀 10 min, 在酶联免疫检测分析仪 570 nm 处测定各孔吸光度值 (A), 抑制率 (%) = (1 - 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) × 100%。重复 3 次取平均值。

1.4 细胞周期及凋亡测定

将终剂量为 7.5、15、30、60 mg/L As₄S₄ 与 HeLa 细胞作用 24 h 后, 0.25% 胰酶消化, 收集制成 1×10⁵ 个细胞的单细胞悬液, 收集六孔板内细胞制备单细胞悬液。磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 70% 冰乙醇固定。检测时以 PBS 洗 2 次, 加入 200 μl RNaseA (1 g/L), 37℃ 水浴 30 min, 再加 PI 染色液避光反应 30 min, 上机检测, Multicycle 软件分析亚二倍体峰。

1.5 细胞蛋白质样品制备及蛋白定量

HeLa 细胞 bcl-2 和 caspase-3 蛋白质表达: 以 1×10⁶ 个 HeLa 细胞接种于 100 ml 培养瓶, 细胞贴壁后换液, 加入不同剂量 As₄S₄, 使其终剂量分别为 7.5、15、30、60 mg/L。设不进行药物干预的细胞为对照组。经处理后的细胞立即弃去培养液, 洗涤, 离心。加预冷的细胞裂解液 (0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris HCl, pH=7.6, 0.001 mol/L EDTA, 100 μg/ml PMSF, 2 μg/ml Leupeptin) 0.1 ml, 裂解 30 min, 然后以 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清备用。以上所有操作均在 4℃ 下进行。测定蛋白, 并调各组蛋白浓度一致。

1.6 Western blot 分析 bcl-2 和 caspase-3 内参照 β-actin 表达水平

按文献[4]报道的 Western blot 方法检测, 蛋白提取物经定量后, 取 25 μg 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳。转膜到醋酸纤维素膜上, 丽春红染色观察转膜情况。转膜成功后, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h。分别加一抗 bcl-2、caspase-3 抗体 (内参照 β-actin 抗体) 在 4℃ 条件下过夜孵育; 充分用 PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min。再用二抗 (1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔, 羊抗鼠 IgG) 震荡孵育 2 h。洗去未结合的二抗, 滴加 ECL 化学发光试剂, X 线片曝光显影。扫

描 X 光片, 计算机软件处理, 软件进行扫描定量, 每个浓度组重复 3 次, 取均值代表测定结果。

1.7 Caspase-3 活性检测

采用 Active Caspase-3 Apoptosis Kit 检测 caspase-3 活化情况。取不同剂量 As₄S₄ 处理的 HeLa 细胞六孔板内培养 24 h 后, 收集细胞制备单细胞悬液, 1.5 ml PBS 清洗后加破膜剂 A 100 μl, 避光孵育 15 min 后, 以 2 ml PBS 清洗, 1 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 μl B 液 + caspase-3-PE 抗体或同型对照抗体, 置 4℃ 反应 20 min, 再以 2 ml PBS 清洗, 离心弃上清, 再以 1 ml PBS 重悬, 并上机分析。用标准荧光微球校准光路和流路, 以 FS 和 SS 设门, 用阴性对照确定阴性范围, 依次上机检测, 每个样本检测 10⁵ 个细胞。

1.8 统计分析

采用 SPSS11.5 统计软件包进行 *t* 检验分析。

2 结果

2.1 As₄S₄ 对 HeLa 细胞增殖的影响

As₄S₄ 以时间剂量依赖性方式抑制 HeLa 细胞增殖, 作用 12、24、36、48、60 h 后, 细胞抑制率见表 1。各组差异有统计学意义 (*P* < 0.01), 24 h IC₅₀ 为 30 mg/L, 48 h IC₅₀ 为 15 mg/L。

表 1 As₄S₄ 不同作用时间、剂量对 HeLa 细胞增殖的影响

剂量 (mg/L)	不同作用时间 HeLa 细胞抑制率 (%)				
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
7.5	23.58±4.65	30.92±3.79	35.57±4.21	40.18±4.25	46.31±1.90
15.0	28.71±5.64	37.58±5.81	46.58±3.92	51.77±1.28	54.22±2.25
30.0	40.28±0.67	47.99±4.53	54.82±4.47	61.61±1.81	64.01±4.00
60.0	47.27±0.93	58.29±3.83	65.57±3.73	71.88±4.05	79.75±6.14

2.2 As₄S₄ 对 HeLa 细胞周期的影响

FCM 显示, 不同剂量 As₄S₄ 作用 24 h 后, 呈剂量依赖性改变细胞周期分布, 一方面使 G₀/G₁ 期细胞比例呈逐渐增高趋势; 另一方面使 S 期和 G₂/M 期细胞比例呈逐渐下降趋势, 见表 2。

表 2 As₄S₄ 对 HeLa 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

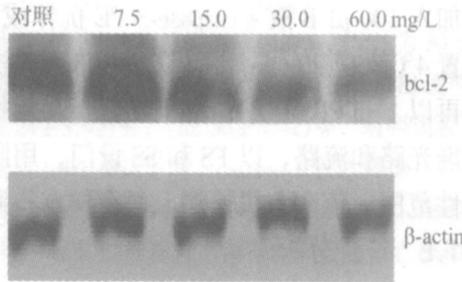
As ₄ S ₄ 剂量 (mg/L)	细胞周期百分数 (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	52.56±2.11	27.12±1.02	20.04±0.23
7.5	55.14±1.63	23.37±1.23	18.12±1.32
15.0	62.19±0.88	17.10±2.73	15.16±2.12
30.0	70.17±1.14	15.98±1.18	12.23±1.17
60.0	77.11±1.12	12.62±1.15	10.14±2.10

2.3 流式细胞仪分析细胞凋亡

在 DNA 图谱 G₀/G₁ 期前出现一个代表凋亡细胞的亚 G₁ 峰, 对亚 G₁ 峰进行定量分析表明, 4 种不同

剂量的 As₄S₄ (7.5、15、30、60 mg/L) 作用于 HeLa 细胞 24 h 后, 均显示亚 G₁ 峰, As₄S₄ 呈剂量依赖性非线性方式诱导其凋亡。其凋亡率分别为 (8.13 ± 1.13)%, (29.58 ± 2.51)%, (46.24 ± 3.92)%, (62.36 ± 4.42)%, 对照组没有出现凋亡峰, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 As₄S₄ 对 HeLa 细胞 bcl-2, caspase-3 蛋白表达的影响



HeLa 细胞经不同剂量 As₄S₄ 处理 24 h 后, Western blot 显示, 随着 As₄S₄ 浓度增加, bcl-2 蛋白表达下降, 其 OD 值分别为 11.020.64 ± 121.40, 10.249.11 ± 113.31, 7.471.58 ± 87.26, 6.135.76 ± 77.69, 4.832.14 ± 67.33, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); caspase-3 蛋白表达上调, 其 OD 值分别为 64.14 ± 8.15, 103.32 ± 8.20, 135.31 ± 6.35, 196.23 ± 5.11, 212.43 ± 5.43, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 1。

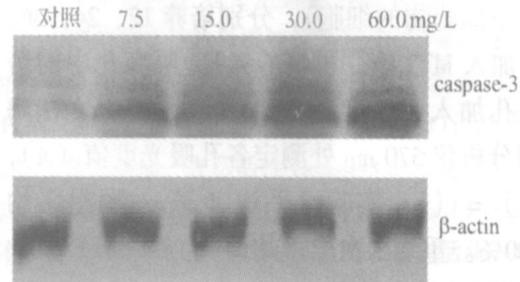


图 1 不同剂量 As₄S₄ 处理 HeLa 细胞 24 h bcl-2, caspase-3 蛋白表达变化

2.5 As₄S₄ 对 HeLa 细胞 caspase-3 活性的影响

随着 As₄S₄ 浓度的增高, caspase-3 明显活化, 并且以高浓度为明显。As₄S₄ 处理 HeLa 细胞 24 h 后, 表达活化 caspase-3 的细胞百分率分别为 (2.67 ± 0.22)%, (9.53 ± 0.15)%, (21.28 ± 0.43)%, (39.63 ± 0.80)%, (63.40 ± 0.69)%, 呈明显的剂量依赖性关系 ($P < 0.01$)。

3 讨论

雄黄具有祛风、杀虫及解毒作用。近年又发现其能诱导急性早幼粒细胞白血病细胞的凋亡, 临床治疗疗效显著^[5,6], 使其治疗范围逐渐从少数白血病向其他白血病及实体肿瘤扩展, 已经成为继维甲酸开发与研究后的又一热点, 有可能成为中药抗肿瘤治疗新药。宫颈癌是威胁妇女生命的第二大恶性肿瘤, 其发生发展与肿瘤细胞的恶性增殖和肿瘤细胞的凋亡减少有关, 随着对细胞凋亡研究的深入和发展, 人们逐渐认识到诱导细胞凋亡是治疗肿瘤性疾病的一种有效的方法和手段。

有研究报道雄黄对人类白血病细胞、肝癌细胞有抑制增殖和诱导凋亡的作用^[7], 其诱导肿瘤细胞凋亡机制与下调凋亡相关基因有关。

本实验结果显示 As₄S₄ 以时间-剂量依赖性方式抑制 HeLa 细胞增殖。应用流式细胞术检测结果, As₄S₄ 处理后在 DNA 图谱 G₀/G₁ 期前出现一个代表凋亡细胞的亚 G₁ 峰, 对亚 G₁ 峰进行定量分析了解细胞凋亡率, 结果显示 As₄S₄ 呈剂量依赖性诱导细胞发生凋亡, 其凋亡诱导作用随药物浓度升高而增强, 这表明

As₄S₄ 对宫颈癌 HeLa 细胞有诱导凋亡作用。但其诱导 HeLa 细胞凋亡的分子机制不清楚。

bcl-2 家族是最重要的凋亡调节因子之一, 其中 bcl-2 是主要的抗凋亡和促凋亡成员, 它通过调节线粒体的功能来调节凋亡^[8]。bcl-2 蛋白分布于线粒体的外膜胞浆表面、内质网和核膜, 它可稳定线粒体膜并通过蛋白相关转换孔维持膜的通透性, 线粒体内膜很少有死亡启动因子, 诸如细胞色素 C (cytochrome C) 和半胱氨酸酶 (caspase) 等。Caspase 是一组半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶, 而 caspase 家族成员中研究最多、功能相对较明确的为 caspase-3, 它广泛分布于各种类型的细胞中, 在细胞内以无活性的前体 (酶原) 形式存在, 被激活后在细胞凋亡中发挥关键作用, caspase-3 为凋亡的效应分子, 是凋亡途径下游进行底物酶解的关键蛋白酶, 被称为凋亡的“执行者”。本实验中发现, 不同浓度的 As₄S₄ 诱导 HeLa 细胞凋亡的同时, HeLa 细胞的 caspase-3 的蛋白表达增加, 而 bcl-2 蛋白表达水平呈剂量依赖性下降, 使 As₄S₄ 作用后的 HeLa 细胞呈程序性死亡^[9,10]。有研究结果证实 bcl-2 在线粒体膜上形成蛋白孔道使细胞线粒体跨膜电位下降, 释放细胞色素 C 激活 caspase 蛋白酶级联反应^[11]。本实验结果显示, As₄S₄ 处理 HeLa 细胞后其 caspase-3 酶活性升高, 因此我们推测 As₄S₄ 可能通过调节 bcl-2 蛋白的表达而间接激活 caspase-3, 从而诱导宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡。

总之, 本实验结果表明 As₄S₄ 能够诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡, 这种效应可能与 bcl-2 蛋白表达下降,

caspase-3 蛋白表达增加,从而活化 caspase-3 有关。其确切的机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] 陈思宇, 李信民, 刘陕西. 含砷类中药在恶性血液病治疗中的研究概况 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25 (8): 454.
 [2] Wang ZY. Arsenic compound sasantic cancer agents [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 48 (Suppl1): S72-76.
 [3] Chen Z, Chen GQ, Shen ZX, et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: In vitro and in vivo studies [J]. Semin Hematol, 2001, 38 (1): 26-36.
 [4] Kami j T, Sato T, Nagatomi Y, et al. Induction of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitors in prostate cancer cell lines [J]. Int J urol, 2001, 8 (7): 35-39.
 [5] 黄世林, 郭爱霞, 向阳, 等. 复方青黛片为主治疗急性早幼粒细胞白血病的研究 [J]. 中华血液学杂志, 1995 16 (1): 26-28.

[6] 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病 [J]. 中华血液学杂志, 1996 17 (2): 58-60.
 [7] 张晨, 黄世林. 雄黄抗白血病细胞多药耐药及其凋亡诱导关系的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5 (12): 40-43.
 [8] Reed JC. Double identity for proteins of the bcl-2 family [J]. Nature, 1997, 38 (7): 773-776.
 [9] Ramachandran C, You W. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin [J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 54 (3): 269-277.
 [10] Anto RJ, Mukhopadhyay A, Denning K, et al. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase 8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of bcl-2 and bcl-x1 [J]. Carcinogenesis, 2002, 23 (1): 143-150.
 [11] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2 release of cytochrome c from mitochondria blocked [J]. Science, 1997, 275: 1129-1132.

氟对铝电解作业工人健康的影响

靳宝宁

(水电四局西宁中心医院, 青海 西宁 810007)

为了解铝电解生产中氟污染状况及氟对铝电解工人的健康影响, 我院于 2003 年 5 月对某铝厂电解车间作业工人进行了健康体检及现场职业卫生学调查, 报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

接触组为某公司铝电解车间男性作业工人 122 名, 年龄 27~50 岁, 平均 38.2 岁, 工龄 5.3~18.6 年, 平均 12.3 年, 对照组为不接触氟的男性工人 115 名, 年龄 23~52 岁, 平均 37.2 岁, 工龄 5.4~25.3 年, 平均 10.7 年。每天工作 8 h。

1.2 调查分析

1.2.1 电解铝车间空气氟化物测定 按照 GB16228-1996 《作业场所空气中氟化物卫生标准》, 使用 Fc-4 型粉尘采样器, 对作业场所进行监测。

1.2.2 铝电解作业工人的体检 对两组人员进行了内科、血常规、肝功、乙肝五项、B 超、心电图检查。对接氟工人测定尿氟, 工龄 5 年以上的工人拍摄 X 线骨盆、胫腓骨及尺桡骨正侧位片, 数据统计使用 PEM3.0 for windows 软件包进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 车间空气中氟化物浓度

在铝厂电解车间设氟监测点 20 个, 采样 20 份, 氟化物浓度 0.09~0.18 mg/m³, 平均 0.13 mg/m³, 按 GBZ2-2002 《工作场所所有害因素职业接触限值》规定, 车间空气中时间加权平均浓度为 2 mg/m³。

2.2 两组临床症状

由表 1 可见, 接触组的主要症状是神经衰弱样症状 (如头痛、头晕、失眠、多梦、记忆力减退, 并具有 3 项以上者) 以及胸闷、咳嗽、关节痛、四肢疼痛和麻木, 两组症状的发

尘毒防治。

生率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 两组临床症状比较

组别	受检人数	神经衰弱样症状	胸闷	咳嗽	四肢疼痛	关节痛	四肢麻木
接触组	122	59.78*	73.49*	53.12*	38.18*	48.26*	32.07*
对照组	115	6.20	10.11	11.20	3.15	3.00	5.11

与对照组比较 * $P < 0.01$

2.3 X 线骨片及尿氟检测结果

2.3.1 接触组 103 例氟观察对象中常见的改变有胫骨后膜反应 (占 20.61%)、骨盆双闭孔膜反应 (13.34%)、桡骨皮质增厚 (1.13%)、桡骨嵴边缘不光滑 (2.11%)。X 线骨片骨周改变者 5~10 年工龄者占 10.15%, 10 年以上工龄者占 89.85%。

2.3.2 尿氟测定采用选择性电极法, 尿氟增高 8 例 (121.8~153.3 $\mu\text{mol/L}$), 平均 131.3 $\mu\text{mol/L}$ (正常参考值 113.7 $\mu\text{mol/L}$)。

2.4 心电图及其他异常检出结果

由表 2 可见, 接触组心电图异常与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。肝功检查 ALT $> 40 \text{ U/L}$, AST $> 28 \text{ U/L}$, HBsAg 阳性者, 接触组 6 例, 对照组 9 例, 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。高血压以及 B 超、尿常规异常检出率两组比较差异亦无统计学意义。

表 2 铝作业工人和对照组心电图异常率比较 例 (%)

组别	心率异常	心律不齐	传导异常	T 波改变	其他
接触组	29(23.77)*	23(18.85)*	19(14.75)*	17(13.94)*	14(11.48)*
对照组	15(13.04)	11(9.57)	3(2.61)	2(1.73)	9(7.83)

与对照组比较 * $P < 0.05$

3 小结

工业性氟病是由于工作中长期接触过量氟化物, 以骨骼改变为主的全身性疾病, 诊断主要依据长骨和骨盆的 X 线片及尿氟水平。根据工业性氟病诊断标准 (GBZ5-2002), 本次调查接触组 103 例诊断为氟观察对象, 尚未发现工业性氟骨病。本次铝电解车间现场监测空气中氟浓度低于国家卫生标准, 尚有待于动态调查。