

网络出版时间: 2019-6-10 17:48 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190606.1643.011.html>

低氘水对肺癌细胞 Caspase-3 表达的影响

焦敏 李敏 万凯华 杨劲 李岩

摘要 目的 研究低氘水(DDW)对肺癌细胞 A549 的凋亡作用,并探讨 DDW 诱导肺癌细胞凋亡作用及其机制。方法

用含不同氘浓度的培养基培养肺癌细胞 A549,分为实验组和对照组,实验组为 50、75、100 ppm 低氘水组,正常培养基为对照组。CCK-8 法检测 DDW 对肺癌细胞 A549 的细胞抑制率,流式细胞仪检测 DDW 对肺癌细胞 A549 凋亡作用,实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 法检测细胞凋亡相关基因半胱天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 的表达水平,Western blot 法检测 Caspase-3 蛋白的表达。结果 CCK-8 实验结果显示,随着培养基中氘浓度的降低,A549 细胞增殖得到明显的抑制,其中 50 ppm 的 DDW 抑制效果最明显;流式细胞仪实验结果显示不同氘浓度的 DDW 能明显诱导肺癌细胞 A549 凋亡;RT-PCR 和 Western blot 结果显示 DDW 能诱导肺癌细胞 A549 中 Caspase-3 表达明显增加。结论 DDW 对肺癌细胞 A549 具有辅助体外增殖抑制作用,其机制可能与诱导细胞凋亡,增加 Caspase-3 的蛋白表达有关。

关键词 低氘水;肺癌细胞 A549;凋亡;Caspase-3

中图分类号 R 331

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)07-1057-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.011

通常把氘体积分数低于 0.015% (150 ppm) 的水称为低氘水(deuterium depleted water, DDW)^[1]。自然界中的生物,其氘含量并不是个定值,范围约从 120~160 ppm,自然界中的 DDW 主要存在于冰川中,喜马拉雅冰川水氘含量约为 130 ppm。自然界的水中氘的含量约为 150 ppm^[2]。1990 年匈牙利国立研究所报道 DDW 能诱导宠物猫和狗自发性恶性肿瘤完全或部分消退^[3],并注册申请其为动物临床抗肿瘤药物。俄罗斯医学科学院癌症研究所与医学生物问题研究所进行的动物实验研究^[4-5]表明,长期饮用 DDW 可在一定程度上延长动物的寿命。Tyrysov et al^[6] 研究结果也得出,饮用氘含量低的水能显著减小小鼠肺癌细胞移植瘤体积并延长宫颈癌移植小鼠的寿命。

细胞凋亡是一个复杂的级联式基因表达过程,而半胱天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine protease protein, Caspase-3) 蛋白是细胞凋亡过程中的核心调控蛋白^[7],其表达水平的高低与细胞凋亡密切相关,该文通过实验研究 DDW 对肺癌细胞 A549 体外增殖抑制作用,观察处理后细胞的抑制率、细胞凋亡变

2019-04-16 接收

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(编号:81460570)

作者单位:新疆医科大学药学院,乌鲁木齐 830011

作者简介:焦敏,女,硕士研究生;

李岩,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: 77835228@qq.com

miR-9-5p in this cells were determined by using real-time PCR. Cell viability was assayed using a CCK8 assay. Migration and invasion were assayed by using Transwell cell migration and invasion assay. Bioinformatics is used to predict the target genes of miR-9-5p. The wild type (WT) and mutant type (Mut) luciferase reporter plasmids of target gene 3'-UTR were constructed. The predicted results were verified by luciferase assay and real-time PCR.

Results The expression of miR-9-5p in normal prostate epithelial cells RWPE-1 was significantly higher than that in prostate cancer cells PC3 and DU145. The expression level of miR-9-5p in PC3/miR-9-5p cells was significantly higher than that in PC3 cells ($P < 0.01$) and control cells (PC3/miR-NC) ($P < 0.01$). Cell viability assay showed that compared with PC3 group ($P < 0.05$) and PC3/miR-NC group ($P < 0.01$), the cell viability of PC3/miR-9-5p group decreased significantly at 72 h and 96 h. Overexpression of miR-9-5p was significantly inhibit cell migration and invasion of PC3 cells ($P < 0.01$). Bioinformatics prediction indicates that miR-9-5p can target 3'-UTR of CXCR4. Luciferase assay and real-time PCR show that miR-9-5p could target the 3'-UTR of CXCR4 and inhibit the expression of CXCR4 mRNA. **Conclusion** We have identified that miR-9-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells, and the mechanism may be achieved by targeting the 3'-UTR of CXCR4.

Key words prostate cancer; miR-9-5p; proliferation; migration; invasion

化、检测凋亡蛋白 Caspase-3 的表达水平,为今后 DDW 保健用品的开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 DDW(体积分数为 0.005%) 购自新疆阿克特冰泉科技有限公司;胎牛血清、RPMI 1640 培养基粉末购自美国 Gibco 公司;肺癌细胞 A549 购自中科院上海细胞库;CCK-8 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;抗体 Caspase-3 购自美国 Cell Signaling Technology;ECL 显色试剂购自美国 Thermo 公司。

1.2 细胞培养 肺癌细胞 A549 培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液、5% CO₂、37 °C 条件下培养。DDW 实验组 50、75、100 ppm,对照组为正常 RPMI 1640 培养液培养的细胞。

1.3 CCK-8 法检测肿瘤细胞的增殖活性 用 CCK-8 试剂盒对细胞增殖进行测定肺癌细胞接种 96 孔培养板中 24 h 培养后,弃去原来培养基,加入由 DDW 配制的培养基,设 3 个复孔,分别培养 12、24、48、72 h 后,每孔分别加入 10 μl CCK-8 溶液继续培养 3 h,在酶标仪上进行选择 490 nm 波长检测,测定各孔的光密度(optical density, OD) 值。结果取 3 次实验平均值。计算 DDW 对细胞的抑制率,抑制率(%) = (1 - 实验组 OD/对照组 OD) × 100%。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡 将肺癌细胞 A549 接种于 6 孔板,每孔接种细胞 1 × 10⁴/ml。37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后加入不同浓度的 DDW (实验分为对照组和实验组,实验组加入不同浓度的 DDW 50、75、100 ppm 配制的培养基。对照组为正常 RPMI 1640 配制的培养基。继续培养 72 h 后,弃去培养基,用 PBS 清洗 3 次,将细胞重悬于 1 × 结合缓冲液中使细胞浓度为 1 × 10⁶/ml。吸取 100 μl 细胞悬液于 5 ml 培养管中,加入 5 μl PE + 5 μl 7-AAD 后涡旋细胞,在室温黑暗处孵育 15 min。每孔加入 400 μl 1 × 结合缓冲液吹打收集的细胞后过 200 目尼龙筛,1 h 内测定荧光强度。实验重复 3 次。

1.5 RT-PCR 检测 Caspase-3 基因表达

1.5.1 总 RNA 提取 将肺癌细胞接种于 6 孔板,每孔接种细胞 1 × 10⁴/ml。37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后加入不同浓度的 DDW (实验分为对照组和实验组,实验组加入不同浓度的 DDW 50、75、100 ppm 配制的培养基。对照组为正常 RPMI 1640 培养液培养的细胞。继续培养 72 h 后,弃去培养基,加 PBS 清洗 3 次。每个孔各加入 1 ml TRIzol 静置 30 min

后用枪头混匀吹打,吸至无 RNase 酶的 EP 管中,加入氯仿 0.2 ml 轻微震荡 15 s 后,静置 5 min 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液。加入 0.5 ml 异丙醇,轻轻混匀后静置 10 min 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液,加入 1 ml 75% 乙醇(应现配现用)洗涤沉淀 4 °C、7 500 r/min 离心 5 min,弃上清液。室温干燥 15 min 后,加入 20 μl 无 RNase 酶的无菌水,立即测定 RNA 浓度。

1.5.2 逆转录 用 Thermo 逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA,严格按照说明书进行操作,整个过程均在冰上进行。配制逆转录反应液,立即放入 PCR 仪中进行逆转录,反应结束得到总 cDNA 后,立即进行实时定量荧光 PCR(RT-PCR) 或 -20 °C 保存。

1.5.3 RT-PCR 严格按说明书配制 RT-PCR 反应液,反应体系为 20 μl,操作过程均在冰上进行。用荧光定量试剂盒进行 RT-PCR 检测。PCR 条件: 95 °C、10 min 40 个循环: 95 °C、15 s 60 °C、60 s 4 °C ∞。β-actin 作为内参, Caspase-3 上游序列: 5'-TT-GAGACAGACAGTGGTGTGATGATG-3',下游序列: 5'-ATAATAACCAGGTGCTGTGGAGTATGC-3',样品目的基因的相对表达率(relative quantitation, RQ) 采用 ΔΔCt 方法计算, RQ = 2^{-ΔΔCt} (表示实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数), ΔΔCt = -(Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参})_{对照组}。

1.6 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白的水平 收集不同浓度 DDW 处理 72 h 后的细胞,提取细胞总蛋白,经 BCA 法定量蛋白,按抗体分子质量要求配置分离胶和浓缩胶,每孔 10 μl 蛋白样品上样,电泳电压 80 V,电泳 20 min 后改为 100 V,电泳 2 h,转膜电压为 100 V,电泳 2 h 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 10 min × 3 次,孵 Caspase-3 一抗(1 : 1 000) 4 °C 过夜, TBST 洗膜 10 min × 3 次,辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 5 000) 室温避光孵育 2 h, ECL 显色拍照,以 β-actin 为内参蛋白,目的蛋白相对含量用目的蛋白/内参的灰度值表示。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 21.0 进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验、方差分析 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DDW 对肺癌细胞增殖活性的影响 用不同浓度的 DDW 培养肺癌细胞 A549,含 50、75、100 ppm DDW 的培养基培养 12 h 对肺癌细胞的抑制率

表1 不同浓度 DDW 对肺癌细胞 A549 增殖抑制的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	OD 值			
	12 h	24 h	48 h	72 h
50 ppm	0.462 ± 0.02 **	0.4598 ± 0.06 **	0.49 ± 0.06 **	0.491 ± 0.058 **
75 ppm	0.47 ± 0.047 **	0.485 ± 0.02 **	0.528 ± 0.034 **	0.538 ± 0.068 **
100 ppm	0.503 ± 0.05 *	0.495 ± 0.011 *	0.5275 ± 0.082 **	0.566 ± 0.024 **
对照	0.517 ± 0.05	0.532 ± 0.053	0.581 ± 0.07	0.609 ± 0.091

与对照组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

为 10.59%、9.03%、3.97%; 24 h 的抑制率为 13.62%、8.9%、7.8%; 48 h 的抑制率为 15.74%、9.19%、9.31%; 72 h 的抑制率为 19.42%、11.71%、7.05%。各实验组与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$) ,见表 1。

2.2 DDW 对肺癌细胞凋亡作用的影响 不同浓度的 DDW 培养肺癌细胞 A549 后,晚期凋亡和总凋亡显著增加。含 50、75、100 ppm DDW 的培养基培养 72 h 对肺癌细胞的总凋亡率分别为(22.8 ± 0.95)%、(16.9 ± 0.49)%、(11.3 ± 0.32)% ,显著高于对照组(1.1 ± 0.2)% ($P < 0.05$)。见图 1。

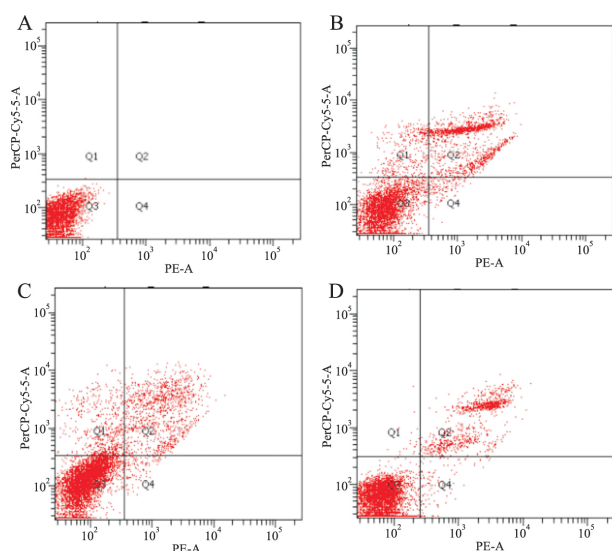


图1 流式细胞术检测 DDW 对肺癌细胞 A549 凋亡的影响

A: 对照组; B: 50 ppm DDW; C: 75 ppm DDW; D: 100 ppm DDW

2.3 DDW 对肺癌细胞中 Caspase-3 基因表达的影响 用 50、75、100 ppm DDW 的培养基培养肺癌细胞(A549) 72 h 后 Caspase-3 mRNA 的相对表达量分别为(1.256 ± 0.067)、(1.114 ± 0.037)、(1.058 ± 0.022)。与正常培养基相比, Caspase-3 mRNA 的相对表达量明显升高($P < 0.01$) ,见图 2。

2.4 DDW 对肺癌细胞中 Caspase-3 蛋白表达的影响 用 50、75、100 ppm DDW 的培养基培养肺癌细胞

(A549) 72 h 后, Western blot 法检测发现 DDW 能够明显上调 A549 细胞中 Caspase-3 蛋白的表达。与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3。

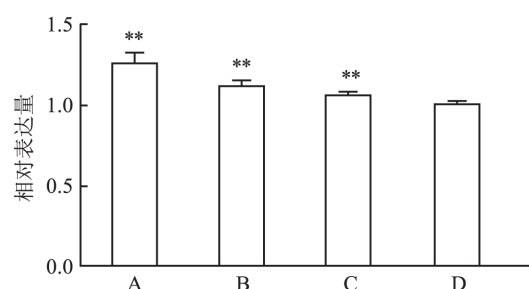


图2 DDW 对 Caspase-3 mRNA 表达的影响

A: 50 ppm; B: 75 ppm; C: 100 ppm; D: 对照组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

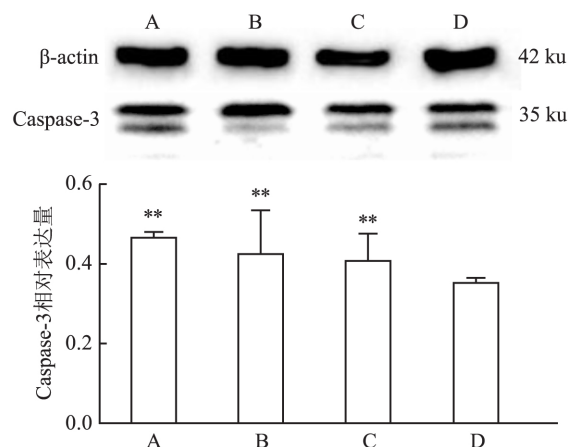


图3 Western blot 法检测 Caspase-3 蛋白表达水平

A: 50 ppm; B: 75 ppm; C: 100 ppm; D: 对照组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

凋亡是细胞生命体自行结束的方式, 凋亡细胞最后可被吞噬细胞或邻近细胞吞噬, 不会引起炎症反应。因此, 诱导肿瘤细胞凋亡对抗肿瘤有着重要的意义, 细胞凋亡的发生是细胞色素 C 从线粒体释

放,继而激活 Caspase,最终导致凋亡^[7]。其中 Caspase-3 被认为是凋亡反应的执行者,在细胞凋亡过程中起一个中心作用,它通过降解细胞内相应位置使细胞凋亡。在分子水平上 Caspase-3 的表达和活性的增加将导致细胞凋亡^[8-10]。本实验通过流式细胞术检测 DDW 主要影响早期凋亡、RT-PCR 和 Western blot 验证 Caspase-3 在 DDW 处理后的肺癌细胞有强的表达,对照组细胞呈弱或阴性的表达。结果显示 DDW 能显著抑制肺癌的增殖,上调 Caspase-3 活性,其中 50 ppm DDW 作用较显著,提示 DDW 促凋亡作用与激活 Caspase 依赖的凋亡途径有关,揭示 DDW 辅助抗癌作用机制与凋亡蛋白 Caspase-3 有关。

参考文献

- [1] Pijima M, Yoshida T, Kato T, et al. Visualization of lateral water transport pathways in soybean by a time of flight-secondary ion mass spectrometry cryo-system[J]. *J Exp Bot* 2011 62(6): 2179-88.
- [2] 张 力, 张瀚彬, 陈 森, 等. 低氘水抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖和侵袭能力的研究[J]. *中国医药导报* 2014 11(9): 20-5.
- [3] Somlyai G, Molnar M, Laskay G, et al. Biological significance of naturally occurring deuterium: the antitumor effect of deuterium depletion[J]. *Orv Hetil* 2010 151(36): 1455-60.
- [4] Czajka D M, Finkel A J, Fischer C S, et al. Physiological effects of deuterium on dogs[J]. *Am J Physiol* 1961 201(201): 357-62.
- [5] Friedman I, Smitgi. Deuterium content of snow cores from Sierra Nevada area[J]. *Science* 1970 169(3944): 467-70.
- [6] Tyrtsov V S, Siniak IuE, Antoshina E E, et al. The effect of preliminary administration of water with reduced deuterium content on the growth of transplantable tumors in mice[J]. *Vopr Onkol* 2006, 52(1): 59-62.
- [7] Jameel N M, Thirunavukarasu C, Wu T, et al. p38-MAPK-and caspase-3-mediated superoxide induced apoptosis of rat hepatic stellate cells: reversal by retinoic acid[J]. *Cell Physiol* 2009 218(1): 157-66.
- [8] Matapurkar A, Lazebnik Y. Requirement of cytochrome c for apoptosis in human cells[J]. *Cell Death Differ* 2006 13(12): 2062-7.
- [9] Wu Z, Sun H, Li J, et al. A polysaccharide from *Sanguisorba radix* induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia HL-60 cells[J]. *Int J Biol Macromol* 2014 70(12): 615-20.
- [10] Liu J, Yao Y, Ding H, et al. Oxymatrine triggers apoptosis by regulating Bcl-2 family proteins and activating caspase-3/caspase-9 pathway in human leukemia HL-60 cells[J]. *Tumour Biol* 2014, 35(6): 5409-15.

Effect of deuterium depleted water on the expression of Caspase - 3 in lung cancer cells

Jiao Min, Li Min, Wan Kaihua, et al

(School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011)

Abstract Objective To study the apoptosis of A549 by deuterium depleted water, and to explore the mechanism and mechanism of low phlegm-induced apoptosis of A549. **Methods** Lung cancer cells A549 were cultured in medium containing different concentrations of tritium, which were divided into experimental group and control group. The experimental groups were 50 ppm, 75 ppm, and 100 ppm deuterium depleted water. The normal medium was the control group. CCK-8 method was used to detect the cell inhibition rate of lung cancer cell line A549 by deuterium depleted water. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of lung cancer cell line A549. The expression level of apoptosis related gene Caspase-3 was detected by RT-PCR. Caspase-3 protein expression was detected by Western blot. **Results** CCK-8 experimental results showed that with the decrease in the concentration of radon in the culture medium A459 cell proliferation was significantly inhibited, of which 50 ppm deuterium depleted water group displayed the most obvious inhibitory effect; Flow cytometry showed different deuterium depleted water could significantly induce the apoptosis of lung cancer cell A549; RT-PCR and Western blot results showed that low hydrazine water could significantly increase the expression of Caspase-3 in lung cancer cell A549. **Conclusion** Deuterium depleted water can inhibit the proliferation of lung cancer cell line A549 *in vitro*, and its mechanism may be related to induction of apoptosis and increase of Caspase-3 protein expression.

Key words deuterium depleted water; lung cancer cells A549; apoptosis; Caspase-3