

Caspase-3 参与调控蟾酥诱导 人肺腺癌 (ASTC-a-1) 细胞的凋亡*

陈同生^{1)**} 王小平²⁾ 孙 磊¹⁾ 王会营¹⁾ 王龙祥¹⁾

¹⁾华南师范大学激光生命科学研究所, 暨激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631;

²⁾暨南大学附属第一医院麻醉科, 广州 510632)

摘要 采用基因质粒转染技术、荧光发射谱检测分析以及荧光共振能量转移(FRET)受体光漂白技术, 首次在活细胞中实时检测中药蟾酥 (Chan-Su, CS 或 bufonis venenum) 诱导人肺腺癌 (ASTC-a-1) 细胞凋亡过程中 caspase-3 的活化特性. 采用 CCK-8(Cell Counting Kit-8)技术检测发现, 蟾酥对细胞的活性具有显著的抑制作用; 蟾酥处理稳定表达 FRET 质粒 SCAT3 的人肺腺癌细胞后, 在不同的时间检测活细胞中 SCAT3 的荧光光谱; 利用共聚焦扫描荧光显微成像技术检测蟾酥处理后细胞的形态, 从而进一步证实蟾酥诱导细胞凋亡. 实验结果表明: a. 蟾酥可以有效抑制人肺腺癌 (ASTC-a-1) 细胞的增殖活性并诱导细胞的死亡. 蟾酥对细胞的抑制作用具有剂量依赖性; b. 蟾酥处理细胞 6 h 后能检测到明显的细胞凋亡小体, 连续作用 24 h 后细胞全部皱缩, 并有部分细胞破碎; c. 蟾酥作用细胞 2 h 就能明显切割细胞内的 SCAT3, 细胞内 SCAT3 的切割程度随着蟾酥作用时间的延长而增加, 24 h 内细胞内的 SCAT3 完全被切割. 受体光漂白实验也证实了该结论, 表明 caspase-3 参与调控了蟾酥诱导的细胞凋亡过程.

关键词 蟾酥, 荧光光谱, caspase-3, 荧光共振能量转移(FRET), 激光共聚焦荧光显微成像

学科分类号 Q631

Caspases家族在细胞凋亡的信号通路中起着关键的作用, 它通过下游效应因子切断细胞间的信号传递, 重组细胞骨架, 关闭DNA复制和修复, 破坏DNA和细胞结构, 诱导凋亡复合体来执行凋亡功能^[1]. 其中caspase-3是在细胞凋亡过程中起着中央而关键的功能, 一旦caspase-3被激活, 细胞凋亡就不可避免^[1].

基于荧光的各种技术已经成为在活体细胞中实时检测细胞信号转导、细胞凋亡和增殖分子调控机制的重要技术^[1~5]. SCAT3是基于绿色荧光蛋白(green fluorescent proteins, GFPs)和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)技术构建的一个能够在单个活细胞中实时反映caspase-3动态活性的FRET质粒^[1]. SCAT3的供体是青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP), 受体是黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein, YFP)的突变体 Venus, 二者之间连接的是一段包含caspase-3切割底物DEVD的序列. SCAT3的发射光谱在476 nm和526 nm左右具有明显的2个峰值^[1]. 当细胞内caspase-3被激活时, 就会切割DEVD, 因

此SCAT3的FRET效应就会消失, 从而导致SCAT3发射光谱476 nm峰值上升, 而525 nm峰值下降.

尽管由于用途大、药效好, 中药蟾酥 (Chan-Su, CS)日益成为治疗晚期癌症最合适的临床推广药物之一^[6], 但是蟾酥抑制肿瘤细胞的分子机制仍然不清楚. 尽管国内外对于蟾酥诱导肿瘤细胞凋亡机制有比较深入的研究^[7~13]. 但是关于中药蟾酥抑制肿瘤细胞活性的研究仅仅限于一些实验现象的描述^[6, 14], 而对中药蟾酥诱导肿瘤细胞凋亡分子机制的研究很少.

本文利用荧光发射谱技术、FRET技术以及共聚焦荧光显微成像技术, 在活细胞中检测蟾酥诱导人肺腺癌(ASTC-a-1)细胞凋亡过程中细胞稳定表达质粒SCAT3的荧光发射光谱及其FRET效应的状态, 从而确定caspase-3参与调控蟾酥诱导细胞凋亡的

* 国家自然科学基金(30670507, 60378043, 30470494)和广东省自然科学基金(015012)资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 020-85211436-8202, 13434292240

E-mail: chentsh@sclu.edu.cn

收稿日期: 2007-06-05, 接受日期: 2007-07-02

过程.

1 材料和方法

1.1 材料

蟾酥注射液(江苏安格药业有限公司, 国药准字Z32020694), DMEM培养基(Life Technologies, Inc), 新生牛血清(杭州四季青生物公司), 胰蛋白酶(华美生物工程公司), 青霉素(50 U/ml), 链霉素(50 mg/L), NaHCO₃, HEPEs, Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). Lipofectin reagent(购自Invitrogen Life Technologies Inc.), G418(购自华美生物公司). 质粒SCAT3由Miura教授提供^[1].

1.2 细胞培养

人类肺腺癌细胞(ASTC-a-1)生长在含10%新生牛血清, 50 U/ml青霉素和50 mg/L链霉素的DMEM培养液中, 待生长到70%~85%汇合后用胰蛋白酶消化传代, 以 1×10^4 个细胞/孔间隔接种于细胞培养皿中, 每皿500 μ l培养液, 接种后放入培养箱(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)继续培养.

1.3 CCK-8检测

将100 μ l细胞悬液(3 000个/孔)接种于96孔板内, 预先置于37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂饱和湿度培养箱内培养24 h. 然后更换新鲜培养液, 并将样品分为对照组以及蟾酥剂量分别为20, 40, 60, 80, 100 μ l的实验组, 每组5个孔, 将蟾酥加入96孔板中, 在培养箱内培养48 h. 更换96孔板中的培养液, 并且每个孔内加入10 μ l的CCK-8试剂, 在培养箱内培养2 h. 利用酶标仪(infinite M200, Tecan, Austria)在450 nm波长处测定吸光度(A_{450} 值), 并计算蟾酥对细胞活性的抑制率. 抑制率 = (对照组 A_{450} - 处理组 A_{450}) / 对照组 $A_{450} \times 100\%$.

1.4 稳定表达SCAT3质粒细胞系的筛选

正如本研究小组前期的研究一样^[4, 5], 采用G418对转染pSCAT-3的细胞进行稳定表达细胞系的筛选, 具体步骤参见文献[4, 5].

1.5 发射光谱检测与分析

将稳定转染表达了SCAT3的ASTC-a-1细胞接种到96孔板, 并分为对照组和处理组, 处理组则分为3个剂量组: 20 μ l, 60 μ l和100 μ l剂量组. 细胞培养24 h后更换培养液, 然后按照不同的剂量分别向96孔板中加入不同剂量的蟾酥, 并分别在不同的时间检测活细胞内SCAT3的荧光发射光谱. 同时需要检测没有转染SCAT3细胞的对应发射光谱作为背

景. 活细胞内SCAT3的发射光谱在自动微孔检测仪(infinite M200, Tecan, Austria)上检测. 激发光谱为(420 \pm 20) nm, 发射光谱在454~600 nm范围扫描, 扫描光谱步长为2 nm. 每一个点连续测量25次.

1.6 激光共聚焦荧光成像以及FRET受体光漂白

使用Zeiss的激光共聚焦扫描荧光显微镜(LSM510, Zeiss, Germany)对细胞进行多通道荧光成像和FRET受体光漂白. FRET检测时, 使用氩离子激光器的458 nm激光作为CFP激发光源, 采用带通BP470-500 nm通道选择性探测CFP的荧光, 选择长通LP530nm通道检测Venus发射荧光. 使用的显微镜物镜是Zeiss Plan-Neofluar 100 \times /NA1.45的油镜. 采用氩离子激光器的514 nm激光选择性地光漂白SCAT3的受体Venus. 显微镜移动平台上安装有一个微型CO₂培养箱, 在整个测量过程中始终保持相同的环境: 37 $^{\circ}$ C恒温, 5% CO₂. 使用Zeiss Rel3.2图像处理软件处理实验结果.

1.7 数据分析

每个实验都有5个相同的重复样品, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$. 采用SPSS12 (SPSS, Chicago)分析软件的双样品 t -test进行分析. * $P \leq 0.05$ 时认为有明显的差异.

2 结果与讨论

2.1 蟾酥抑制细胞活性的检测

将实验组按照20, 40, 60, 80, 100 μ g的剂量分为5组, 将蟾酥加入96孔板中, 在培养箱内培养48 h后更换100 μ l培养液, 并且每个孔内加入10 μ l的CCK-8试剂, 在培养箱内培养2 h后利用酶标仪在450 nm波长处测定吸光度(A_{450} 值).

测量结果如图1所示, 对照组的 A_{450} 值为 1.61 ± 0.09 , 对应20, 40, 60, 80, 100 μ l剂量蟾酥处理细胞组的 A_{450} 值分别为: (1.71 ± 0.03), ($0.81 \pm$

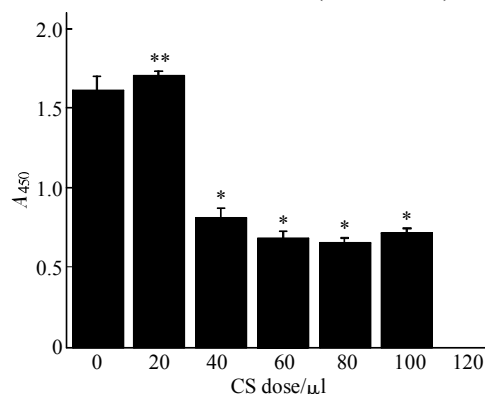


Fig. 1 Inhibition of CS on the cell viability

* $P < 0.01$, ** $P > 0.05$.

0.06), (0.69 ± 0.03), (0.65 ± 0.03), (0.72 ± 0.02) ($n=5$), 相应的细胞活性抑制率为: 0%, 50%, 57%, 59%和55%. 与对照组相比, 40~100 μl 蟾酥处理组的细胞活性抑制率都超过了50%, 而且 $*P<0.01$, 表明该剂量范围的蟾酥对细胞增殖活性具有明显的抑制作用, 而20 μl 剂量处理组的细胞活性抑制率为0, $**P>0.05$, 表明该剂量的蟾酥对细胞活性没有明显的作用.

2.2 蟾酥诱导细胞凋亡的形态特征光学检测

将蟾酥与细胞培养液按照2:3的比例共培养细胞24 h后, 细胞形态表现出明显的死亡特征(图2), 几乎所有细胞明显皱褶甚至破裂.

稳定转染表达SCAT3细胞的共聚焦荧光显微荧光图像表明: 未经蟾酥处理的细胞形态呈菱形或椭圆形(图3a和b); 经过蟾酥处理24 h后细胞荧光图像表现出如下特征: a. 超过90%的细胞出现明显的凋

亡小体(图3c); b. 细胞皱褶和破碎(图2b); c. 细胞核内荧光强度增加, 而细胞质中荧光强度下降或消失, 表明SACT3向细胞核聚集. 我们还发现蟾酥处理4 h细胞就变圆, 而处理6 h后部分细胞就出现凋亡小体(图3d白色箭头).

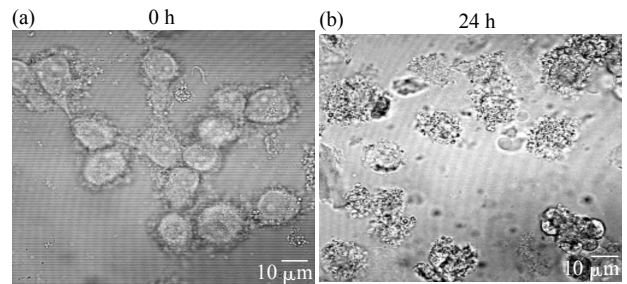


Fig. 2 The morphology of ASTC-a-1 cells examined and photographed by phase microscope (100 ×)

(a) Control. (b) After exposure to the CS for 24 h, the cell damage apparently appeared after treatment with CS.

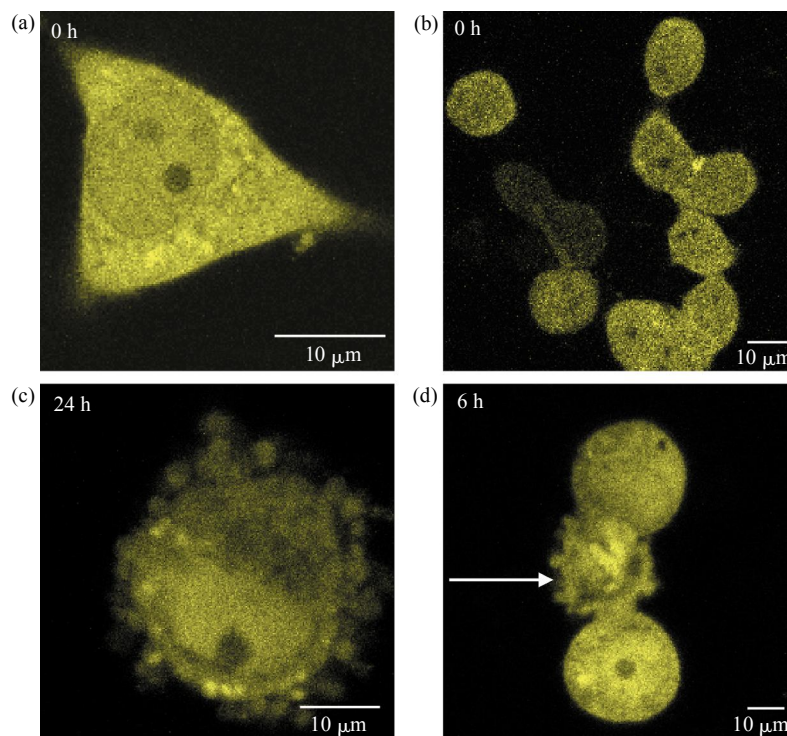


Fig. 3 Fluorescence images of cells expressed stably with SCAT3

(a) and (b) Control. (c) 24 h after CS treatment. (d) 6 h after CS treatment.

2.3 蟾酥诱导细胞内caspase-3活化的光谱分析

分别将没有转染SCAT3的细胞以及稳定转染表达了SCAT3的细胞富集之后接种到96孔板, 并加入100 μl 的细胞培养液, 在细胞培养箱中培养24 h后更换培养液, 并测量细胞中SCAT3的荧光发射光谱, 同时测量没有转染SCAT3细胞的相应光

谱作为背景, 光谱数据分析时减去背景. 96孔板上的实验样品组分为3组: 分别向第1, 第2和第3组加入20 μl , 60 μl 和100 μl 的蟾酥, 然后分别在蟾酥作用细胞0 h (对照组, control), 2, 24和48 h后检测活细胞中SCAT3的荧光发射光谱.

图4给出了3种剂量蟾酥处理细胞后不同时间

的SCAT3荧光发射光谱. 20 μl 剂量处理组的SCAT3荧光光谱在2 h内没有明显变化(没有给出数据), 处理24 h后526 nm谱峰下降, 476 nm谱峰上升, 表明细胞的部分SCAT3被切割, 说明细胞内有部分前体caspase-3被活化, 但是该剂量处理 48 h后SCAT3的荧光发射谱没有明显变化(图4a), 表明该剂量的蟾酥不能显著性活化细胞内的caspase-3; 60 μl 剂量组的SCAT3荧光光谱在处理2 h就有非

常明显的变化(图4b), 即526 nm峰下降, 476 nm峰上升, 24 h后更加明显, 而48 h后 526 nm峰消失(图4b), 表明细胞内的SCAT3完全被切割, 说明细胞内的caspase-3被蟾酥活化; 100 μl 剂量组在蟾酥处理24 h后SCAT3的荧光谱526 nm谱峰就消失了(图4c). 以上结果表明蟾酥剂量依赖性诱导细胞caspase-3的活化.

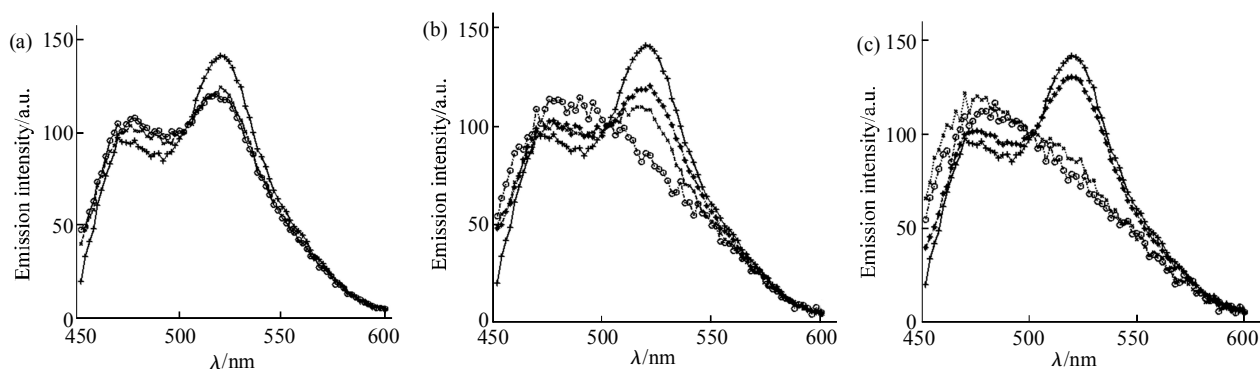


Fig. 4 Dynamical fluorescence emission spectra of SCAT3 inside living cells induced by CS

The cells were expressed stably with SCAT3. (a) The cells were treated by 20 μl of CS. (b) The cells were treated by 60 μl of CS; (c) The cells were treated by 100 μl of CS. --- : Control. $\times\text{---}\times$: 24 h. $\circ\text{---}\circ$: 48 h. $\ast\text{---}\ast$: 2 h.

2.4 蟾酥诱导细胞凋亡后SCAT3的受体光漂白分析

为了进一步验证蟾酥是否能够活化细胞内的caspase-3, 采用最强的514 nm激光光漂白细胞内稳定表达的 SCAT3 受体 Venus, 然后采用BP470~500 nm通道和LP530 nm通道同时探测CFP和Venus的荧光强度动态变化. 在蟾酥处理前, 光漂白受体Venus时, 随着Venus荧光强度的下降, CFP的荧光强度显著上升(图5a), 表明SCAT3在细胞内的表达以及其FRET效应正常. 由于自有扩散

的缘故, Venus的荧光在撤去光漂白激光后开始上升, 而CFP的荧光强度有所下降(图5a). 当按照蟾酥与细胞培养液之比为2:3处理细胞24 h后, 光漂白Venus时CFP通道的荧光强度几乎没有下降, 而且撤去光漂白激光后, Venus的荧光强度上升, 但是Venus通道的荧光强度依然没有明显变化(图5b), 表明细胞内的绝大部分SCAT3被切割, 说明蟾酥诱导活化了细胞内的caspase-3.

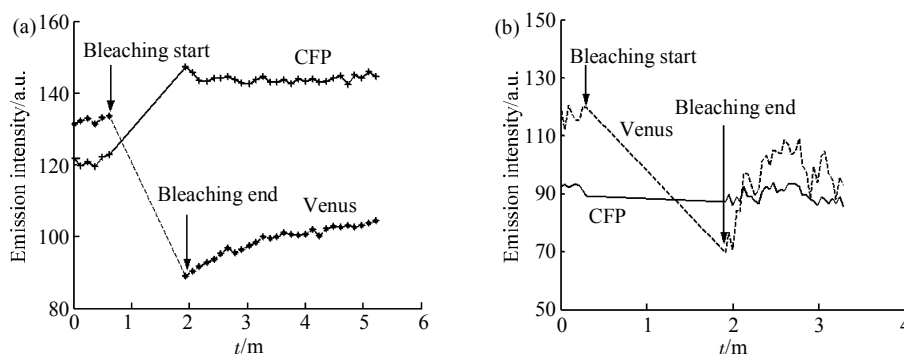


Fig. 5 Photobleaching of Venus, the acceptor of SCAT3 inside living cells

(a) Control. (b) 24 h after CS treatment.

3 讨 论

中药蟾酥是已经广泛应用于晚期癌症治疗的临床药物. 本文利用荧光检测技术首次在人肺腺癌细胞中实时研究了蟾酥对细胞凋亡起关键作用的 caspase-3 活化的影响. 研究表明: 蟾酥剂量依赖性地抑制细胞活性, 小剂量蟾酥对细胞活性以及 caspase-3 活化没有明显的影响, 而大剂量的蟾酥可以诱导细胞凋亡, 蟾酥作用 6 h 后就可以观察到细胞凋亡小体, 而且在作用 24 h 后导致超过 90% 细胞死亡.

蟾酥对肿瘤细胞的作用机理可能是与蟾酥的剂量有关. CCK-8 实验结果表明, 20 μl 处理细胞 48 h 后细胞活性并没有下降(图1), SCAT3 光谱的实验结果也表明, 该剂量的蟾酥作用细胞 48 h 后细胞内 caspase-3 的活化水平并没有增加(图3a). 而当蟾酥剂量超过 40 μl 时, 其能明显抑制细胞活性(图1), 并诱导细胞内 caspase-3 的活化(图4b和c), 从而导致细胞凋亡(图2b), SCAT3 受体光漂白实验结果也证实了以上结果(图5b).

在蟾酥诱导细胞凋亡后对 SCAT3 受体光漂白实验中发现, Venus 的荧光强度在光漂白结束后迅速上升(图5a), 上升的速率明显高于对照组(图5b), 该现象也表明, 细胞内的 SCAT3 被切割以及细胞内的 caspase-3 被活化. 活化的 caspase-3 将 SCAT3 切割为两部分, 各个部分的大小和质量大约只有 SCAT3 的一半, 因而它们的扩散速率必然高于 SCAT3, 从而导致 Venus 通道的荧光迅速上升.

本文的研究表明, 凋亡是中药蟾酥抑制肿瘤细胞活性的主要形式之一, 而且 caspase-3 参与调控了蟾酥诱导人肺腺癌细胞的凋亡过程, 调控的过程具有剂量和时间依赖性. 但是蟾酥诱导细胞凋亡的上游调控机理还有待于进一步的研究.

参 考 文 献

- 1 Yeh J Y, Huang W J, Kan S F, *et al.* Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. *Prostate*, 2003, **54** (2): 112~124
- 2 Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, *et al.* Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol*, 2003, **160** (2): 235~43
- 3 WU Y X, Xing D, Luo S M, *et al.* Detection of caspase-3 activation in single cells by fluorescence resonance energy transfer during photodynamic therapy induced apoptosis. *Cancer Letters*, 2006, **235** (2): 239~247
- 4 Gai X J, Chen T S, Xing D, *et al.* Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *J Cell Physiol*, 2006, **206** (2): 441~448
- 5 Wu Y X, Xing D, Chen W R. Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by photofrin-PDT. *Cell Cycle*, 2006, **5** (7): 729~734
- 6 高瑞霖, 绍义祥. 蟾酥的临床应用. *中国临床康复*, 2006, **10** (35): 142~144
Gao R, Shao Y X. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 2006, **10** (35): 142~144
- 7 Jing Y, Watabe M, Hashimoto S, *et al.* Cell cycle arrest and protein kinase modulating effect of bufalin on human leukemia ML-1 cells. *Anticancer Res*, 1994, **14** (3A): 1193~1198
- 8 Kurosawa M, Tani Y, Nishimura S, *et al.* Distinct PKC isozymes regulate bufalin-induced differentiation and apoptosis in human monocytoc cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, **280**(3): 459~464
- 9 Watabe M, Ito K, Masuda Y, *et al.* Activation of AP-1 is required for bufalin-induced apoptosis in human leukemia U937 cells. *Oncogene*, 1998, **16** (6): 779~787
- 10 Masuda Y, Kawazoe N, Nakajo S, *et al.* Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells. *Leuk Res*, 1995, **19** (8): 549~556
- 11 Kawazoe N, Watabe M, Masuda Y, *et al.* Tiam1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene*, 1999, **18** (15): 2413~2421
- 12 徐瑞成, 陈小义, 陈莉, 等. 蟾蜍灵诱导白血病 HL-60 细胞分化及相关基因表达. *中草药*, 2002, **33** (2): 151~153
Xu R C, Chen X Y, Chen L, *et al.* *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2002, **33** (2): 151~153
- 13 田昕, 罗颖, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵诱导 HL-60 细胞凋亡过程中对 Bcl-2、Survivin/Smac/DIABLO 表达的影响. *中华血液学杂志*, 2006, **27** (1): 21~24
Tian X, Luo Y, Liu Y P, *et al.* *Chin J Hematol*, 2006, **27** (1): 21~24
- 14 石雪蓉, 王虹. 蟾酥胶囊诱导人肝癌细胞凋亡的研究. *四川解剖学杂志*, 2005, **13** (3): 9~12
Shi X R, Wang H. *SiChuan Journal of Anatomy*, 2005, **13** (3): 9~12

Caspase-3 is Involved in The Chan-Su (CS) -induced Human Lung Adenocarcinoma (ASTC-a-1) Cell Apoptosis*

CHEN Tong-Sheng^{1)**}, WANG Xiao-Ping²⁾, SUN Lei¹⁾, WANG Hui-Ying¹⁾, WANG Long-Xiang¹⁾

¹⁾MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

²⁾Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Chan-Su(CS, or bufonis venenum), a traditional Chinese medicine, has many biological functions. It is mainly composed of bufotenidines, bufogenins, and etc. CS has been documented to possess functions against inflammation and cancer, and is widely employed as a therapeutic drug for many kinds of cancers in China. However, it is difficult to judge antitumor effect of agents derived from CS because of the following reasons: agents derived from CS are mixture, they are lack of observations of multiple centres, preparation process is lack of quality control standards and agents have many toxic or side effects at high dose. Apoptosis is a very important cellular event that plays a key role in pathogeny and therapy of many diseases. The mechanisms of the initiation and regulation of apoptosis are complex and diverse. Caspase family is closely connected with many apoptotic processes, while its member, caspase-3, being an important executive apoptotic molecule. To explore the inhibitory effect and mechanism of CS on human lung adenocarcinoma (ASTC-a-1), gene plasmid transfection, fluorescence emission spectra and fluorescence resonance energy transfer (FRET) were used to study the caspase-3 activation during the CS-induced human lung adenocarcinoma (ASTC-a-1) cell apoptosis. CCK-8 was used to assay the inhibition of CS on the cells viability. The dynamical emission spectra of SCAT3 were performed inside living cells expressed stably with SCAT3 after CS treatment. The cell morphology was examined and photographed by phase microscope and confocal fluorescence scanning microscope. Experimental results showed that (1) CS inhibited dose-dependently the cells viability; (2) apoptotic body was observed in some cells 6 h after CS treatment, and most of cells were in shrinkage 24 h after CS treatment; (3) The SCAT3 inside living cells were cleaved by caspase-3 2 h after CS treatment, and most of the SCAT3 was cleaved 24 h after CS treatment, and the acceptor photobleaching experiments of SCAT3 also verified these results, implying that CS activated caspase-3 which induced cell apoptosis. Therefore, caspase-3 is involved in the CS-induced cell apoptosis.

Key words Chan-Su (CS), emission spectra, caspase-3, fluorescence resonance energy transfer (FRET), confocal fluorescence scanning microscope

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30670507 60378043, 30470494) and Natural Science Foundation of Guangdong Province (015012).

**Corresponding author. Tel: 86-20-85211436-8202, 13434292240, E-mail: chentsh@sclu.edu.cn

Received: June 5, 2007 Accepted: July 2, 2007