

交变磁场作用下磁性 Fe_3O_4 纳米粒子诱导肝癌细胞凋亡机制

邢娟¹, 李金莲², 李向民¹, 刘俊杰³

1. 滨州医学院实验教学管理中心医学物理学实验室, 山东 烟台 264003; 2. 滨州医学院实验教学管理中心机能学实验室, 山东 烟台 264003; 3. 滨州医学院基础学院物理学教研室, 山东 烟台 264003

【摘要】目的: 观察磁性四氧化三铁纳米粒子(Fe_3O_4)在交变磁场(EMF)作用下对肝癌细胞凋亡相关因子的影响。**方法:** 培养大鼠肝癌 CBRH-7919 细胞, 分为正常对照组、交变磁场照射组、100 $\mu\text{g/mL}$ Fe_3O_4 纳米粒子组、交变磁场+100 $\mu\text{g/mL}$ 纳米 Fe_3O_4 组。酶生化法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量; Western Blot 检测 Bax、Bcl-2 表达及细胞色素 C 从线粒体至胞浆的释放; 荧光酶标仪测定 Caspase-3 活性。**结果:** 交变磁场协同磁性 Fe_3O_4 纳米粒子作用于 CBRH-7919 细胞能使 Bax 表达上调, 而凋亡抑制基因 Bcl-2 表达下调, 促进细胞色素 C 从线粒体释放至胞浆, 增加 Caspase-3 活性。交变磁场、磁性 Fe_3O_4 纳米粒子单独作用组对结果无影响。**结论:** 在交变磁场作用下, Fe_3O_4 纳米粒子诱导 CBRH-7919 细胞凋亡的机制与 Bax 表达增加、Bcl-2 表达减少、细胞色素 C 的释放及 Caspase-3 活性增加有关。

【关键词】 四氧化三铁; 纳米粒子; 交变磁场; 肝癌细胞; 凋亡

【DOI 编码】 doi:10.3969/j.issn.1005-202X.2015.02.024

【中图分类号】 Q64; R329.27; R735.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-202X(2015)02-0255-04

Mechanism Research of Hepatoma Cells Apoptosis Induced by Magnetic Fe_3O_4 Nanoparticles under the Effect of the Alternating Magnetic Field

XING Juan¹, LI Jin-lian², LI Xiang-min¹, LIU Jun-jie³

1. The Medical Physics Laboratory of Experimental Teaching Management Center, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; 2. The Functional Laboratory of Experimental Teaching Management Center, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China; 3. Department of Physics, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: Objective To observe the influence of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles on the apoptosis-related factors in hepatoma carcinoma cells under the effect of alternating magnetic field. Methods The hepatoma carcinoma cells CBRH-7919 of rats were cultivated and divided into the normal control group, the alternating magnetic field exposure group, 100 $\mu\text{g/mL}$ nano Fe_3O_4 group, and the alternating magnetic field + 100 $\mu\text{g/mL}$ nano Fe_3O_4 group. Superoxide dismutase(SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content were measured by biochemical methods; the expression of Bax and Bcl-2 and the release of cytochrome C from mitochondria to the cytoplasm were investigated by western blotting. Caspase-3 activity was detected by fluorescence microplate reader. Results The synergistic effect of alternating magnetic field and magnetic Fe_3O_4 nanoparticles on CBRH-7919 cells can make Bax expression up-regulated and Bcl-2 expression down-regulated. Meanwhile, it can promote the release of cytochrome C from mitochondria to the cytoplasm and increase the caspase-3 activeness. The alternating magnetic field or magnetic Fe_3O_4 nanoparticles had no extra effect on the results alone. Conclusion Under the effect of alternating magnetic field, the mechanism of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles inducing apoptosis in CBRH-7919 cells is connected with the increase of Bax expression, the reduction of Bcl-2 expression, the release of cytochrome C and the increase of caspase-3 activeness.

Key words: Fe_3O_4 ; nanoparticles; alternating magnetic field; hepatoma carcinoma cells; apoptosis

【收稿日期】 2014-11-10

【基金项目】 滨州医学院科技计划项目(BY2010KJ084)

【作者简介】 邢娟(1974-), 女, 汉族, 山东威海人, 高级实验师, 硕士, 从事医学物理学实验技术及方法的探索和研究。Tel: 0535-6913204; E-mail: xingjuan8@163.com。

前言

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 也是我国发病率最高的肿瘤之一, 占世界肝癌发生总数的 43%, 我国每年约 13 万例患者死于此病, 大约占全球肝癌死亡病例的 40%^[1], 目前在我国消化系统恶性肿

瘤中列第3位,仅次于胃癌和食管癌,在世界范围的癌症死亡中也已跃居第3位。它临床进展快、生存期短,传统临床治疗的中远期疗效均不理想。尽管手术切除仍是目前最为彻底的治疗手段,但由于绝大多数肝癌患者就诊时已经是晚期,因此手术切除率仅为20%~30%^[2],即使有可能长期存活和治愈,也仅占肝癌患者的10%,根治切除复发率仍高达40%~60%^[3]。因此,研究和探索治疗肝癌的新方法和途径,有着很大的现实意义。

磁性药物靶向治疗是靶向治疗的一种,它借助磁场使具有磁响应的药物聚集,将药物尽可能有选择地运送到靶部位,提高靶部位的药物浓度,减少药物对全身正常组织的毒副作用^[4]。磁性纳米材料定向治疗的方法治疗肝细胞癌是利用磁性纳米材料的超顺磁性在外加定磁场照射下定位磁场指向位置^[5-6],也可通过选择生物相容性好和低毒副作用的磁性纳米颗粒载体携带药物、单克隆抗体、多肽、激素、基因等物质在外加磁场的作用下,到达靶部位而杀灭肿瘤细胞^[7]。目前,很多实验研究表明,磁性纳米粒子协同外加磁场,特别是外加交变磁场,对不同细胞系的肝癌细胞的增殖、凋亡等生物学效应的影响有统计学意义。

前期研究发现,在交变磁场作用下,大鼠肝癌 CBRH-7919 细胞对 Fe_3O_4 纳米粒子的吞噬量增加,细胞存活率降低,凋亡率增加,但其诱导细胞凋亡的机制尚未阐明。本研究观察在交变磁场作用下, Fe_3O_4 纳米粒子诱导 CBRH-7919 细胞凋亡的相关机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂

大鼠肝癌细胞株 CBRH-7919 购自中国科学院上海细胞库。磁性纳米 Fe_3O_4 粒子由中科院固体物理研究所惠赠,为直径 200 nm 的纳米团,加入 PBS 中超声震荡 30 min,纳米团可震荡成为粒径分布均匀、分散性好的纳米粒子,平均粒径约为 30 nm,获得混悬液,高压灭菌后用培养液稀释待用。交变磁场发生装置为改装后的亥姆霍兹实验仪,频率范围为 20 Hz~200 Hz,线圈中心点的最大磁感应强度约 70 mT^[8]。RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清均购自 Hyclone 公司;超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒、丙二醛(MDA)含量检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Bax、Bcl-2、细胞色素 C 抗体购自 Santa Cruz 公司; β -actin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;胞质和线粒体蛋白质提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;Apo-ONE™ Homogeneous Caspase-3 试剂盒为 Promega 公司产品。

1.2 方法

(1)细胞培养及处理

CBRH-7919 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37℃、含 5% CO_2 的细胞培养箱中进行常规培养。实验时将细胞接种于培养皿中,

分为正常对照组、交变磁场照射组、100 $\mu\text{g/mL}$ 纳米 Fe_3O_4 组、交变磁场 +100 $\mu\text{g/mL}$ 纳米 Fe_3O_4 组。100 $\mu\text{g/mL}$ Fe_3O_4 纳米粒子与细胞共孵育 48 h,交变磁场照射组在共孵育期间接受 20 Hz~200 Hz 交变磁场照射,照射方法参见文献^[8],每间隔 4 h 照射 1 次。

(2)SOD 活性及 MDA 含量测定

各组细胞按上述方法处理结束后弃去培养基, PBS 洗 2 遍,加入 1% Triton X-100 500 μL ,反复吹打,收集。12 000 r/min 离心取上清,按试剂盒说明书进行测定。考马斯亮蓝法测定蛋白含量。

(3)Western Blot

收集各组细胞,用预冷 PBS 冲洗 3 次,加入适量 RIPA 细胞裂解液置于冰上裂解 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清,即为细胞总蛋白。胞质及线粒体蛋白的提取按照试剂盒说明书进行操作。测定各组蛋白质浓度,每孔上样约 30 μg 蛋白,行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜上,加入封闭液室温封闭 1 h,然后分别加入 Bax、Bcl-2、细胞色素 C、 β -actin 抗体,4℃过夜;TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记 IgG 二抗,室温孵育 1 h;TBST 洗涤 3 次,等量 ECL 反应液 A、B 混合后加至膜上,X 片显影。凝胶分析软件 Quantity One 测灰度值。

(4)Caspase-3 活性检测

检测方法按试剂盒说明书进行。简述如下:将细胞接种于 96 孔板,各组经不同处理后,预冷 PBS 洗 2 次,每孔加入 Caspase-3 反应液 100 μL ,震荡混匀,室温避光反应 3 h,多功能酶标仪 (TECAN Infinite, Austria) 检测各孔荧光强度,激发波长 492 nm,发射波长 516 nm,单位以 Relative Fluorescence Units (RFU) 表示。

(5)统计分析

数据用均数±标准差表示,SPSS17.0 软件进行分析处理,采用单因素方差分析,两组间比较采用 Student's t 检验, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 交变磁场作用下 Fe_3O_4 纳米粒子对 CBRH-7919 细胞 SOD 活性、MDA 含量的影响

SOD 及 MDA 检测结果如表 1 所示,与正常组比较,交变磁场协同 Fe_3O_4 纳米粒子组细胞 SOD 活性明显降低,MDA 含量增高,差异均有显著性($P<0.01$),说明在交变磁场作用下 Fe_3O_4 纳米粒子能够导致 CBRH-7919 细胞的氧化损伤。单独交变磁场照射组及单独 Fe_3O_4 纳米粒子孵育组对 SOD 活性、MDA 含量均无明显影响。

2.2 交变磁场作用下 Fe_3O_4 纳米粒子对 CBRH-7919 细胞 CytC 释放的影响

Western Blot 分别检测各组细胞胞质及线粒体内细胞色素 C 蛋白水平。图 1 结果显示,与正常对照组相比,交变磁场组、 Fe_3O_4 纳米粒子组细胞色素 C 释放

表 1 交变磁场作用下 Fe₃O₄ 纳米粒子对 CBRH-7919 细胞 SOD 活性、MDA 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.1 The Influence of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles on the SOD Activity and MDA Content in CBRH-7919 Cells under the Action of Alternating Magnetic Field(Mean \pm SD, n=6).

Group	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
Control	24.33 \pm 7.64	1.28 \pm 0.12
EMF	26.58 \pm 6.31	1.03 \pm 0.37
100 μ g/mL NanoFe ₃ O ₄	23.84 \pm 4.82	1.58 \pm 0.34
100 μ g/mL NanoFe ₃ O ₄ + EMF	17.26 \pm 3.50 **	4.39 \pm 0.83 **

**P<0.01 vs Control.

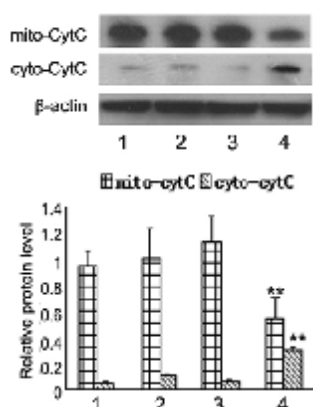


图 1 交变磁场作用下 Fe₃O₄ 纳米粒子对 CBRH-7919 细胞 CytC 释放的影响

Fig.1 The Influence of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles on the Cytochrome C Release in CBRH-7919 Cells under the Action of Alternating Magnetic Field

1: control; 2: EMF; 3: 100 μ g/mL NanoFe₃O₄; 4: 100 μ g/mL NanoFe₃O₄ + EMF. **P<0.01 vs control.

无明显改变,交变磁场协同 Fe₃O₄ 纳米粒子组线粒体细胞色素 C 表达减少,胞质中细胞色素 C 表达增加,说明细胞色素 C 的释放明显增加(P<0.01)。

2.3 交变磁场作用下 Fe₃O₄ 纳米粒子对 CBRH-7919 细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响

结果如图 2 所示,与正常对照组相比,交变磁场、Fe₃O₄ 纳米粒子单独作用对 Bax、Bcl-2 表达无明显影响,交变磁场与 Fe₃O₄ 纳米粒子协同作用能使 Bax 表达增加,Bcl-2 表达减少,差异显著(P<0.01)。

2.4 交变磁场作用下 Fe₃O₄ 纳米粒子对 CBRH-7919 细胞 Caspase-3 活性的影响

Caspase-3 活性检测结果见表 2。交变磁场协同 Fe₃O₄ 纳米粒子作用后,Caspase-3 活性明显增强,与对照组相比差异显著(P<0.01)。

表 2 交变磁场作用下 Fe₃O₄ 纳米粒子对 CBRH-7919 细胞 caspase-3 活性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab.2 The Influence of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles on the Caspase-3 Activity in CBRH-7919 Cells under the Action of Alternating Magnetic Field(Mean \pm SD, n=6).

Group	Caspase-3 Activity(RFU)
Control	3348 \pm 523
EMF	3027 \pm 378
100 μ g/mL NanoFe ₃ O ₄	3964 \pm 416
100 μ g/mL NanoFe ₃ O ₄ + EMF	8752 \pm 792 **

** P<0.01vs Control.

3 讨论

已有研究证明,氧化铁是一种潜在的脂质过氧化诱导剂,可启动自由基的形成^[9]。SOD 是体内降解、清除 H₂O₂ 等自由基的主要抗氧化酶,SOD 活力可用来评价机体清除氧自由基的能力^[10]。MDA 是膜脂过氧化的最终分解产物,检测它的含量可以反映膜脂过氧化的程度^[11]。通常,SOD 和 MDA 同时检测能够更好的反映细胞的氧化损伤程度,因而本研究通过检测 SOD、MDA 来测定细胞的氧化损伤情况。结果显示,Fe₃O₄ 纳米粒子协同交变磁场作用下 SOD 活力明显降低,MDA 含量增高,提示交变磁场作用下 Fe₃O₄ 纳米粒子引起的氧化损伤可能是产生细胞毒性的主要

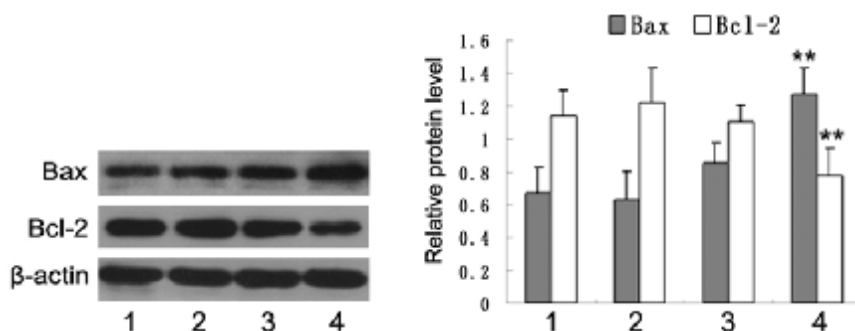


图 2 交变磁场作用下纳米 Fe₃O₄ 粒子对 CBRH-7919 细胞 Bax、Bcl-2 表达的影响

Fig.2 The Influence of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles on the Bax, Bcl-2 Expression in CBRH-7919 Cells Under the Action of Alternating Magnetic Field

1: control; 2: EMF; 3: 100 μ g/mL NanoFe₃O₄; 4: 100 μ g/mL NanoFe₃O₄ + EMF. **P<0.01 vs control.

原因之一。

细胞凋亡的线粒体通路是现阶段研究较为成熟的凋亡途径。细胞色素 C 是第一个被鉴定的线粒体的细胞凋亡分子。从线粒体释放到细胞浆中的细胞色素 C 是线粒体介导凋亡信号转导通路中最重要的事件^[12]。本实验结果发现,交变磁场协同纳米 Fe_3O_4 作用能够明显增加线粒体细胞色素 C 的释放,表明交变磁场协同 Fe_3O_4 纳米粒子通过影响线粒体依赖途径诱导细胞凋亡的产生。

细胞线粒体细胞色素 C 及其它凋亡分子的释放受 Bcl-2 蛋白家族的调控。Bcl-2 家族又可分为两个亚族——抗凋亡亚族和促凋亡亚族。Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最重要的抑制凋亡和促进凋亡蛋白。研究证实, Bcl-2、Bax 参与了肝癌的发生及进展^[13]。本实验检测了交变磁场及 Fe_3O_4 纳米粒子作用下 Bcl-2、Bax 的表达,结果显示,交变磁场作用下 Fe_3O_4 纳米粒子能够显著降低 Bcl-2 蛋白表达,增加 Bax 蛋白表达,Bcl-2/Bax 比例下降,说明交变磁场协同纳米 Fe_3O_4 对 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的调控参与了细胞凋亡的发生。

Caspase 家族与细胞凋亡的发生和调控密切相关,Caspase-3 是细胞凋亡过程中的主要效应因子,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志^[14]。线粒体释放细胞色素 C 到细胞浆后,启动 caspase-9 激活,继而激活 Caspase-3,从而导致细胞凋亡的发生。本研究又进一步检测了 Caspase-3 的活性,交变磁场作用下 Fe_3O_4 纳米粒子促进了 Caspase-3 的活化,表明交变磁场协同纳米 Fe_3O_4 具有增强 Caspase-3 活性,促进细胞凋亡的作用。

综上所述,交变磁场作用下 Fe_3O_4 纳米粒子可以通过影响线粒体依赖途径诱导 CBRH-7919 细胞凋亡的产生。此实验结果为 Fe_3O_4 纳米粒子在肝癌治疗中的应用开发提供了新的研究思路和实验室数据。

【参考文献】

- [1] 陈谦. 原发性肝癌介入治疗的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2006, 33 (11): 654-657.
- Chen Q. The progress of interventional procedure for primary hepatic carcinoma the progress of interventional procedure for primary hepatic carcinoma[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2006, 33 (11): 654-657.
- [2] 信涛, 赵玉莹, 徐玉涛, 等. 阿霉素白蛋白磁性纳米颗粒栓塞治疗大鼠原发性肝癌的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 2007, 34(24): 1422-1427.
- Xin T, Zhao YY, Xu YT, et al. Application of magnetic adriamycin nanoparticles in transcatheter arterial chemoembolization for

- treatment of hepatocellular carcinoma in rats[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2007, 34(24): 1422-1427.
- [3] 肖宝来, 王剑明, 郑建伟. 纳米磁性靶向药囊对人肝癌裸鼠移植瘤 bcl-2/bax 蛋白表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(20): 3041-3044.
- Xiao BL, Wang JM, Zheng JW. Effect of targeted magnetic nanoparticles containing 5-FU on expression of bcl-2/bax protein in transplanted liver cancer in nude mice[J]. China Journal of Modern Medicine, 2006, 16(20): 3041-3044.
- [4] 熊平, 郭萍, 向东, 等. 引导磁场下磁性药物靶向治疗的理论分析 [J]. 物理学报, 2006, 55(8): 4383-4387.
- Xiong P, Guo P, Xiang D, et al. Theoretical research of magnetic drug targeting guided by an outside magnetic field[J]. Chinese Journal of Physics, 2006, 55(8): 4383-4387.
- [5] Lutz JF, Zarafshani Z. Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide-alkyne “click” chemistry[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60: 958-970.
- [6] Petri-Fink A, Steitz B, Finka A, et al. Effect of cell membrane on polymer coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): colloidal stability, cytotoxicity, and cell internalization studies [J]. Eur Pharm Biopharm, 2008, 68: 129-137.
- [7] Ito A, Shimka M, Honda H, et al. Heat-inducible TNF- α gene therapy combined with hyperthermia using magnetic Nan particles as a novel tumor-targeted therapy[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8: 649-654.
- [8] 邢娟, 刘军锋, 李金莲, 等. 外加磁场作用下磁性 Fe_3O_4 纳米粒子对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(31): 6055-6059.
- Xing J, Liu JF, Li JL, et al. Effect of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles under external magnetic field on proliferation and apoptosis of hepatoma carcinoma cells[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(31): 6055-6059.
- [9] Guillaume G, Sbastien G, Pierre G, et al. Benzo (a) pyrene-coated onto Fe_2O_3 particles-induced lung tissue injury: role of free radicals [J]. Cancer Lett, 2001, 17(1): 7-15.
- [10] 和水祥, 舒昌杰. 自由基在病毒性肝炎中的作用及其防治[J]. 中国实用内科杂志, 1994, 14(11): 679.
- He SX, Shu CJ. The role of free radicals in pathological hepatitis and its prevention and control [J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 1994, 14 (11): 679.
- [11] Del R, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2005, 15(4): 316-328.
- [12] Arnould D, Peron P, Martinou JC, et al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli [J]. J Cell Biol, 2002, 159 (6): 923-929.
- [13] 张文吉. 凋亡相关基因 bcl-2 及 bax 在肝癌的表达及意义[J]. 山西中医学院学报, 2000, 1(1): 36-38.
- Zhang WJ. Expression of apoptosis-related gene bcl-2 and bax in liver cell carcinoma and its clinical significances[J]. Journal of Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, 2000, 1(1): 36-38.
- [14] Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99-104.