

论著

文章编号:1000-5404(2012)04-0290-04

过氧化氢联合低频超声波诱导卵巢癌 A2780/DDP 细胞凋亡的研究

张勇¹, 常淑芳¹, 孙江川¹, 王志刚² (400010 重庆, 重庆医科大学: 附属第二医院妇产科¹, 超声影像研究所²)

[摘要] 目的 探讨过氧化氢联合超声波诱导人卵巢癌 A2780/DDP 细胞凋亡的效果。方法 体外培养人卵巢癌 A2780/DDP 细胞, MTT 法研究过氧化氢对卵巢癌 A2780/DDP 细胞生长抑制情况, 选择过氧化氢对 A2780/DDP 细胞作用的合适作用参数; 实验分为对照组, 0.5 W/cm²、30 s 超声组, 10 μmol/L 过氧化氢组, 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声组; 不同因素作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后, Hoechst33258 染色观察细胞形态变化; 流式细胞仪检测各处理因素作用 A2780/DDP 细胞的凋亡率; Western blot 检测各组细胞 caspases-9 蛋白表达量的改变。结果 对照组, 0.5 W/cm²、30 s 超声组和 10 μmol/L 过氧化氢组无明显凋亡改变, 而 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声组与对照组之间比较, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。结论 过氧化氢联合超声波能增强诱导人卵巢癌 A2780/DDP 细胞凋亡的作用。

[关键词] 过氧化氢; 超声学; 细胞凋亡; 肿瘤细胞, 培养的

[中图分类号] R73-36; R730.5; R737.31

[文献标志码] A

Combination of hydrogen peroxide and low-frequency ultrasound exposure induces apoptosis in human ovarian cancer A2780/DDP cells

Zhang Yong¹, Chang Shufang¹, Sun Jiangchuan¹, Wang Zhigang² (¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, ²Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of hydrogen peroxide combined with low-frequency ultrasound exposure on apoptosis in human ovarian cancer A2780/DDP cells. **Methods** The A2780/DDP cells were cultured under the exposure to 0.5 W/cm², 30 s ultrasound wave in present or absent of 10 μmol/L hydrogen peroxide for 24 h. The MTT assay was used to detect the proliferation in A2780/DDP cells after different treatments. The apoptosis was investigated by using flow cytometry analysis, and the cell morphology was observed by Hoechst staining. Western blotting was used to detect the protein levels of caspase-9. **Results** Exposure to 0.5 W/cm², 30 s ultrasound wave or treatment of 10 μmol/L hydrogen peroxide did not induce obvious apoptosis in A2780/DDP cells. However, combination treatment of 10 μmol/L hydrogen peroxide and 0.5 W/cm², 30 s ultrasound exposure induced apoptosis distinctly ($P < 0.05$). **Conclusion** Combination treatment of hydrogen peroxide and ultrasound exposure strongly enhances apoptosis in human ovarian cancer A2780/DDP cells.

[Key words] hydrogen peroxide; ultrasonics; apoptosis; tumor cells, cultured

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30801228), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5405) and the Science Research Project of Chongqing Public Health Bureau (07-2-098). Corresponding author: Chang Shufang, E-mail: shfch2005@163.com

卵巢癌是女性生殖器官常见的肿瘤之一, 发病率仅次于宫颈癌和子宫体癌而列居第3位。但因卵巢癌致死者, 却占各类妇科肿瘤的首位, 对妇女生命造成严重威胁^[1]。因此, 探讨新的治疗方法迫在眉睫。过氧化氢是细胞正常新陈代谢的产物, 但是当细胞发生癌变, 人体免疫系统开始攻击癌细胞时, 癌细胞中的过氧化氢浓度会逐渐超标, 进而抑制过氧还原酶, 破坏癌

细胞自身的组织, 促进其死亡^[2-4]。Kariya 等^[5]研究过氧化氢联合 X 射线诱导人类前列腺癌 PC-3 细胞凋亡时, 发现一系列活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS), 包括: 超氧阴离子 (O_2^-)、羟自由基 ($\cdot OH$)、过氧化氢 (H_2O_2) 等, 导致溶酶体破裂, 线粒体碎裂, 同时从线粒体中释放细胞色素 c 到细胞质, 与细胞信号转导之间存在内在关联, 刺激蛋白激酶级联反应促进细胞凋亡。同时大量文献报道过氧化氢通过细胞凋亡的膜受体通路、引起细胞色素 c 释放和 caspases 激活的生物化学途径诱导细胞凋亡^[6-8]。超声对辐照后存活

[基金项目] 国家自然科学基金 (30801228); 重庆市自然科学基金 (CSTC2008BB5405); 重庆市卫生局科研项目 (07-2-098)

[通信作者] 常淑芳, E-mail: shfch2005@163.com

细胞的生物学效应包括细胞结构和功能改变^[9-10],使用较低的超声频率时,超声吸收系数较小,产生的热量和温升均接近于可忽略的程度,其产生的效应主要与空化机制有关,包括微声流(microstreaming)导致的黏滞应力和超声瞬态空化产生的自由基^[11]。自由基是氧化反应中的重要成分,其在诱导细胞凋亡方面起重要作用。本研究通过研究过氧化氢联合超声波对人卵巢癌 A2780/DDP 细胞的作用,观察过氧化氢联合超声波能否增强其产生自由基的能力,以及对人卵巢癌 A2780/DDP 细胞凋亡的影响。旨在为临床治疗卵巢癌积累实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

A2780/DDP 细胞株由华中科技大学同济医学院附属协和医院王泽华教授惠赠;小牛血清购自杭州四季青生物有限公司;RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司;0.01 mol/L PBS 液购于武汉博士德生物工程有限公司;MTT、DMSO、胰酶均购自 Sigma 公司;Annexin V-FITC、PI 购自杭州隆基生物技术有限公司;Hoechst 33258 染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Western blot 及 IP 细胞裂解液均购自碧云天生物技术有限公司;浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;一抗兔抗人 caspase-9 购自北京博奥森生物技术有限公司;二抗山羊抗兔 IgG 为进口分装;ELX 800 型酶标定量测定仪为基因有限公司产品;TS-2000 A 脱色摇床仪为江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司;冰醋酸、甲醇购自重庆川东化工有限公司化学试剂厂;30% 过氧化氢购自成都市科龙化工试剂厂;1 MHz 射频超声基因转染仪为重庆医科大学超声工程研究所提供。

1.2 细胞培养

卵巢癌 A2780/DDP 细胞株复苏后,接种于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,在 5% CO₂、37 °C 条件下培养,24~36 h 换液维持,36~72 h 传代 1 次。取对数生长期细胞,进行各项实验。

1.3 MTT 实验观察各处理因素对 A2780/DDP 细胞生长影响

分别用浓度为 10、25、50 μmol/L 的过氧化氢作用 A2780/DDP 细胞 6、12、24 h,观察不同浓度过氧化氢作用 A2780/DDP 细胞不同时间对其生长影响,选择作用 A2780/DDP 细胞的合适参数。待细胞处于对数生长期时,0.25% 胰酶消化离心后,取 1 × 10⁵/ml 细胞分别加入 0.5 W/cm²、30 s 超声、合适浓度的过氧化氢、及两者联合处理后接种于 24 孔板内,并设空白对照组(不加任何干扰因素)。每孔总体积为 1 ml,每组平行设 5 个复孔。置于 CO₂ 培养箱内继续培养 24 h,于实验结束前 4 h 每孔加入新鲜配制的 MTT(5 mg/ml)100 μl,继续培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 0.75 ml。振荡 10 min 使其充分溶解后,用自动酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定光密度值,以空白调零计算细胞增殖抑制率 = [1 - 实验组 D(490)值/对照组 D(490)值] × 100%。

1.4 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡的形态学变化

把 A2780/DDP 细胞接种于 24 孔板内,按实验分组要求给予不同的处理因素作用 24 h,PBS 洗 2 次,加入新鲜配制的固定液(甲醇:冰乙酸 = 3:1)200 μl,4 °C 固定细胞 10 min,PBS 洗 2 次,每次 2~3 min,加入 5 mg/L Hoechst 33258 染色液作用 10 min,PBS 冲洗,荧光显微镜下观察、摄片并数每个视野凋亡细胞数目及计算凋亡率。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

各组细胞分别用 0.25% 胰酶消化,PBS 洗 2 遍、重悬,调整浓度为 1 × 10⁶/ml,按照 AV-PI 双染试剂盒说明书操作。上机,行流式细胞术定量检测。凋亡率 = [(早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数)/总细胞数] × 100%。

1.6 Western blot 检测凋亡蛋白的表达

细胞分组处理后,0.25% 胰酶消化,1 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 洗 2 次,加 WB 及 IP 细胞裂解液于冰上裂解 30 min,13 000 r/min 离心 4 min,收集上清液。经 BCA 法进行蛋白浓度测定后,每孔加 150 μg 等量样品,以 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质。电泳后将蛋白转印至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,一抗孵育过夜,再以辣根过氧化物酶标记的二抗封闭液孵育 1 h,DAB 显色,拍片记录。用 Quantity One 4.62 软件分析灰度值。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计学软件,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 MTT 法检测细胞生长抑制情况

细胞处于对数生长期时,用不同浓度过氧化氢处理 A2780/DDP 细胞不同时间,发现过氧化氢在一定浓度和时间范围内对 A2780/DDP 细胞生长抑制作用随着浓度增加和时间延长而增强(表 1)。其中 10 μmol/L 过氧化氢作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后,细胞存活率 > 80%,是合适的参数。用 0.5 W/cm²、30 s 超声,10 μmol/L 过氧化氢及 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声分别作用 A2780/DDP 细胞 24 h 产生不同程度抑制作用,其 *D*(490) 值分别为(0.56 ± 0.01)、(0.53 ± 0.01)、(0.42 ± 0.04),抑制率分别为 13.43%、18.16%、35.06%,对照组 *D*(490) 值为(0.65 ± 0.00)。联合组较其他组差异有显著性(*P* < 0.05),可见过氧化氢联合超声对抑制 A2780/DDP 细胞的生长具有明显的协同作用。

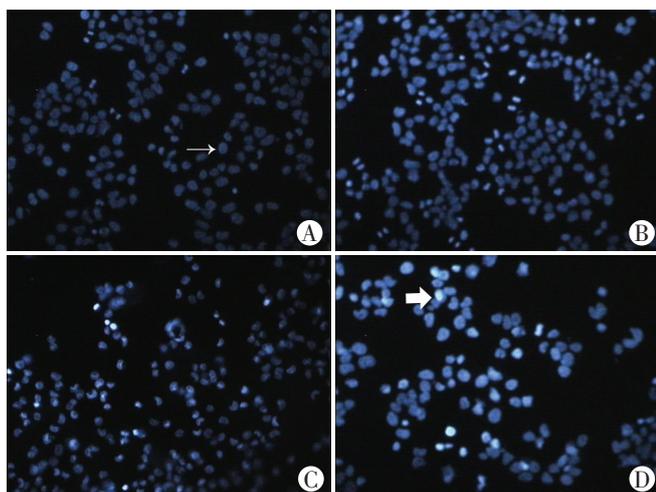
表 1 不同浓度过氧化氢和作用时间对卵巢癌细胞 A2780/DDP 的抑制率($\bar{x} \pm s$)

H ₂ O ₂ (μmol/L)	6 h		12 h		24 h	
	<i>D</i> (490)值	抑制率 (%)	<i>D</i> (490)值	抑制率 (%)	<i>D</i> (490)值	抑制率 (%)
0	0.501 ± 0.030	-	0.601 ± 0.024	-	0.649 ± 0.004	-
10	0.488 ± 0.006 ^a	2.54	0.542 ± 0.008 ^a	9.94	0.531 ± 0.011 ^a	18.16
25	0.480 ± 0.007 ^a	4.05	0.483 ± 0.003 ^a	19.67	0.480 ± 0.001 ^a	25.97
50	0.470 ± 0.007 ^a	6.07	0.401 ± 0.018 ^a	33.35	0.495 ± 0.122 ^a	50.31

a: *P* < 0.05,与 0 μmol/L(对照组)比较

2.2 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡的形态学变化

0.5 W/cm²、30 s 超声组、10 μmol/L 过氧化氢组、10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声组作用 A2780/DDP 细胞 24 h 凋亡率分别为 (8.33 ± 2.52)%、(11.00 ± 2.65)%、(29.67 ± 4.51)%，对照组凋亡率为 (6.33 ± 2.52)%，联合组中凋亡细胞所占比例明显大于其他组 ($P < 0.05$)，提示过氧化氢联合超声对诱导 A2780/DDP 细胞凋亡具有明显的协同作用。见图 1。



↑: 正常细胞, 其核表现为弥漫均匀的低强度荧光; ↑: 凋亡细胞, 其核呈浓染致密固缩状态或颗粒状荧光

A: 对照组; B: 0.5 W/cm²、30 s 超声组; C: 10 μmol/L 过氧化氢组; D: 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声组

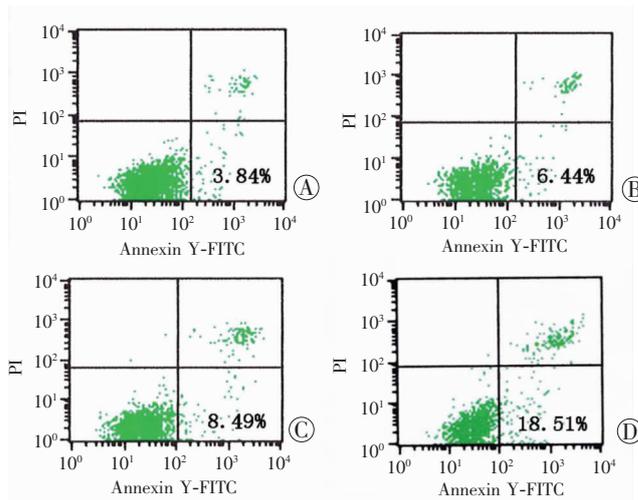
图 1 各因素作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后 Hoechst 33258 染色观察 (×200)

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

0.5 W/cm²、30s 超声, 10 μmol/L 过氧化氢, 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后凋亡率分别为 (6.17 ± 0.50)%、(8.42 ± 0.10)%、(19.53 ± 1.39)%，对照组凋亡率为 (3.44 ± 0.35)%，联合组较其他组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)，可见过氧化氢联合超声对诱导 A2780/DDP 细胞凋亡具有明显的协同作用。流式细胞仪检测结果见图 2。

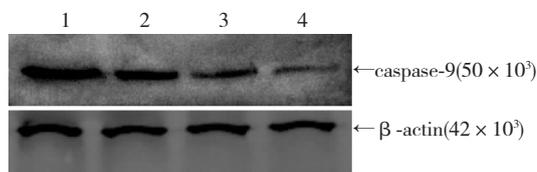
2.4 Western blot 检测 caspase-9 蛋白在各组细胞中的表达

0.5 W/cm²、30 s 超声和 10 μmol/L 过氧化氢分别作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后可见 caspase-9 蛋白表达, 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后 caspase-9 蛋白表达明显 (1.81 ± 0.06)，其相对表达量较 0.5 W/cm²、30 s 超声组 (0.66 ± 0.04) 和 10 μmol/L 过氧化氢组 (1.02 ± 0.03) 均高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，对照组 caspase-9 蛋白表达水平为 (0.53 ± 0.02)。见图 3。



A: 对照组; B: 0.5 W/cm²、30 s 超声组; C: 10 μmol/L 过氧化氢组; D: 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30 s 超声组

图 2 各因素作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后流式细胞仪检测凋亡率



1: 10 μmol/L 过氧化氢联合 0.5 W/cm²、30s 超声组; 2: 10 μmol/L 过氧化氢组; 3: 0.5 W/cm²、30 s 超声组; 4: 对照组

图 3 不同处理因素作用 A2780/DDP 细胞 24 h 后诱导 caspase-9 蛋白表达

3 讨论

细胞凋亡是一切生物正常胚胎发生过程和人类发育过程中细胞清除的正常途径。这一过程的紊乱将导致发育异常, 并给人类造成许多严重的疾病。许多证据表明, 肿瘤的发生与细胞凋亡的调节紊乱有密切关系^[12]。细胞凋亡参与了癌症的起始过程, 并对癌症的发生起负调控作用。癌前期细胞对细胞凋亡更为敏感, 更易被清除, 这是机体自我保护功能的表现。本课题通过增强自由基产生, 诱导癌细胞凋亡, 达到治疗肿瘤的目的。正常生物体内的自由基产生和清除是处在平衡状态的, 另一方面, 外界环境中存在着多种形式的自由基, 其性质活泼, 易与体内多种物质发生化学反应, 与内源性自由基一起影响着细胞的生长、分化及死亡过程, 在肿瘤的发生发展中起一定作用。过氧化氢与细胞生长状态之间存在剂量-反应关系^[13], 低浓度的过氧化氢可刺激细胞增殖, 一定浓度范围内引起细胞凋亡样改变, 而高浓度则可直接导致细胞坏死。目前国内外对过氧化氢作用细胞的浓度不一致, 本实验

参考相关文献[14],通过用0.22 μm 过滤器处理过氧化氢后,MTT 发现一定浓度内过氧化氢的作用提高约10倍,并且发现10 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢作用 A2780/DDP 细胞24 h后抑制率并不高,但是0.5 W/cm²、30 s 超声联合10 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢作用 A2780/DDP 细胞24 h后其抑制率达35%,具有明显的协同效果。大量文献证明过氧化氢诱导细胞凋亡的机制包括激活死亡受体信号通路和线粒体信号通路。由于死亡受体通路的激活是通过肿瘤坏死因子超家族的受体(如TNF受体和Fas等)与其相应的配体结合,然后活化caspase-8完成的;而线粒体信号通路的激活是通过线粒体释放细胞色素c等促凋亡蛋白,然后活化caspase-9完成的,两条通路均通过激活caspase-3导致细胞凋亡^[15-19]。因此,本实验通过Western blot检测caspase-9表达量变化说明过氧化氢联合超声波能增强诱导人卵巢癌A2780/DDP细胞凋亡的作用。流式细胞术和Hoechst 33258染色发现联合组的凋亡率分别提高10.02%、19.11%,说明超声联合过氧化氢诱导人卵巢癌A2780/DDP细胞有明显协同作用。

国内外学者一直在研究治疗癌症的新方法,一些学者相继研究了几种超声波与其他技术相结合的治疗方法,其中过氧化氢、超声波两者联合可能增加自由基的产生,增强诱导癌症细胞凋亡的能力,是一个全新的研究领域。由于超声基因治疗仪及过氧化氢的稳定行性较差,导致本实验还有很多不足之处,如超声基因治疗仪产生超声波的强度变化及过氧化氢易分解导致其实际作用浓度的变化等;其次,过氧化氢增强超声波诱导肿瘤细胞凋亡的机制还待进一步研究,特别是对ROS产生及其发挥作用的过程进行监测,过氧化氢联合超声波对其他癌症的作用及相关体内实验等都是我们下一步研究的方向。

参考文献:

[1] Jelovac D, Armstrong D K. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(3): 183-203.
[2] Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(4): 290-302.
[3] Brown R D, Burke G A, Brown G C. Dependence of leukemic cell proliferation and survival on H₂O₂ and L-arginine[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(8): 1211-1220.
[4] Yoshizaki K, Fujiki T, Tsunematsu T, et al. Pro-senescent effect of hy-

drogen peroxide on cancer cells and its possible application to tumor suppression[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73(2): 311-315.
[5] Kariya S, Sawada K, Kobayashi T, et al. Combination treatment of hydrogen peroxide and X-rays induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009, 75(2): 449-454.
[6] Willis S N, Adams J M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis[J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17(6): 617-625.
[7] Zhao M, Antunes F, Eaton J W, et al. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(18): 3778-3786.
[8] Yu Z, Wang R, Xu L, et al. β -Elemene piperazine derivatives induce apoptosis in human leukemia cells through downregulation of c-FLIP and generation of ROS[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15843.
[9] Honda H, Zhao Q L, Kondo T. Effects of dissolved gases and an echo contrast agent on apoptosis induced by ultrasound and its mechanism via the mitochondria-caspase pathway[J]. Ultrasound Med Biol, 2002, 28(5): 673-682.
[10] Vlad R M, Kolios M C, Czarnota G J. Ultrasound imaging of apoptosis: spectroscopic detection of DNA-damage effects at high and low frequencies[J]. Methods Mol Biol, 2011, 682: 165-187.
[11] Rosenfeld E. Non-thermal non-cavitational effects of ultrasound[J]. Ultrason Med, 2003, 24(1): 40-44.
[12] Hunter A M, LaCasse E C, Korneluk R G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets[J]. Apoptosis, 2007, 12(9): 1543-1568.
[13] 杨瑞华,海春旭,李瑞珍,等.过氧化氢与细胞生长状态的剂量反应关系研究[J].癌变·畸变·突变,1997,9(2):92-99.
[14] 姚运红,钟守军,熊晖.双氧水对鼻咽癌细胞生长特性的影响及其机制的初步研究[J].广东医学院学报,2006,24(2):113-115.
[15] Ikner A, Ashkenazi A. TWEAK induces apoptosis through a death-signaling complex comprising receptor-interacting protein 1 (RIP1), Fas-associated death domain (FADD), and caspase-8[J]. J Biol Chem, 2011, 286(24): 21546-21554.
[16] Krohn K, Maier J, Paschke R. Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors[J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007, 3(10): 713-720.
[17] 李建明,蔡黔,周红,等.过氧化氢对肠上皮细胞线粒体的损伤作用[J].第三军医大学学报,2002,24(2):142-145.
[18] Kim C H, Yoo Y M. Melatonin Induces Apoptotic Cell Death via p53 in LNCaP Cells[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2010, 14(6): 365-369.
[19] Gopalakrishnan K, Low G K, Ting A P, et al. Hydrogen peroxide induced genomic instability in nucleotide excision repair-deficient lymphoblastoid cells[J]. Genome Integr, 2010, 1(1): 16.

(收稿:2011-08-24;修回:2011-10-30)

(编辑 吴培红)