

## 论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1688-04

### 纳米细菌促进乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡

刘胜男<sup>1</sup>,张德纯<sup>1</sup>,张名均<sup>1</sup>,郭亚楠<sup>1</sup>,杨晓容<sup>1</sup>,许 舸<sup>2</sup> (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学院病原生物学教研室,分子医学与肿瘤研究中心<sup>1</sup>,生命科学院电镜组<sup>2</sup>)

**[摘要]** **目的** 观察纳米细菌(nanobacteria, NB)与纳米羟基磷灰石颗粒(nano hydroxyapatite, nHAP)对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的影响。**方法** 实验分为 NB 组、nHAP 组和正常对照组,其中 NB 组和 nHAP 组悬液的浓度均为 2 麦氏浊度(M),正常对照组仅加培养基,与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞共同培养 24、48、72 h,通过 CCK-8 检测其对细胞的毒性作用;培养 12、24、48、72 h,取上清,经全自动生化分析仪测定 LDH 活性;作用 72 h,经流式细胞仪(flow cytometry, FCM)测定其凋亡率,透射电镜观察其超微结构的变化情况。**结果** CCK-8 显示,NB 组 24、48、72 h 对细胞的抑制作用均强于 nHAP 组和正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );NB 组 LDH 含量在 24、48、72 h 时均高于正常对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );24、48、72 h 均高于 nHA 组,但仅 24、48 h 有统计学差异( $P < 0.05$ )。nHAP 组 LDH 活性仅在 72 h 与正常对照组比较有统计学差异( $P < 0.01$ );72 h 后 NB 组细胞凋亡率高于 nHAP 组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );透射电镜下观察,NB 组可以看到胞质空泡样变,核固缩以及明显的凋亡小体,nHAP 组未见明显异常。**结论** NB 可以抑制乳腺癌细胞的生长,促进其发生凋亡,其导致细胞凋亡的成分不仅仅是 NB 羟基磷灰石的外壳,也可能与 NB 的其他组分或代谢产物有关。

**[关键词]** 纳米细菌;纳米羟基磷灰石;凋亡;乳腺癌

**[中图分类号]** R318.08;R73-354;R737.9

**[文献标志码]** A

### Nanobacteria promotes apoptosis in breast cancer cell line MDA-MB-231

Liu Shengnan<sup>1</sup>, Zhang Dechun<sup>1</sup>, Zhang Mingjun<sup>1</sup>, Guo Yanan<sup>1</sup>, Yang Xiaorong<sup>1</sup>, Xu Ke<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Center of Molecular Medicine and Tumor Research, Department of Pathogenic Biology, College of Basic Medical Sciences, <sup>2</sup>Electron Microscopy Group, College of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of nanobacteria (NB) and nano hydroxyapatite (nHAP) on breast cancer cells. **Methods** Breast cancer MDA-MB-231 cells were treated by 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nHAP with a turbidity of 2 M and NB at a same turbidity for 12, 24 and 48 h, respectively. The MDA-MB-231 cells receiving no treatment served as normal control. CCK-8 assay was used to determine the toxic effect of NB and nHAP on the cells. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant was measured after the treatment for 12, 24, 48 and 72h, respectively. In 72 h after the treatment, flow cytometry (FCM) was used to measure the apoptotic rates, and transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe the ultrastructure of the cells. **Results** CCK-8 assay revealed that NB showed significantly stronger inhibition on the proliferation of MDA-MB-231 cells than nHAP treated and normal control cells after 24, 48 and 72 hours' treatment ( $P < 0.01$ ). NB also resulted in significantly higher LDH activity than normal control after 24, 48 and 72 hours' treatment ( $P < 0.05$ ). The activity level was still higher in NB treated cells than in nHAP treated ones, but there were statistical differences only in 24 and 48 hour's treatment ( $P < 0.05$ ). Significant difference was also found in the LDH levels between nHAP treatment cells and control cells in 72 h ( $P < 0.01$ ). In 72 h after treatment, the apoptotic rates of the breast cancer cells were obviously higher in NB treated group than in nHAP treated group ( $P < 0.01$ ). TEM displayed that the MDA-MB-231 cells in NB group had cytoplasmic cavities, karyopyknosis and obvious apoptotic bodies. But no such change was found in the cells in the nHAP group. **Conclusion** NB inhibits the growth and promotes the apoptosis in breast cancer cells. It is due to not only hydroxyl apatite shell components, but also other components or metabolic products of NB.

**[Key words]** nanobacteria; nano hydroxyapatite; apoptosis; breast cancer

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31000075). Corresponding author: Zhang Dechun, E-mail: zhangdechun46@163.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31000075)

**[通信作者]** 张德纯, E-mail: zhangdechun46@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1542.004.html> (2013-04-10)

纳米细菌(nanobacteria, NB),又称纳米钙化颗粒,可以自主复制产生一层羟基磷灰石的矿化外壳,菌体大小在80~500 nm<sup>[1]</sup>。羟基磷灰石(hydroxyapatite, HAP)是临床常用的骨科材料,与正常细胞具有很好的兼容性。纳米羟基磷灰石(nano hydroxyapatite, nHAP)在大于80 nm,浓度在31.5~500 μg/mL时可以抑制肿瘤细胞的生长,在一定程度上诱导凋亡的发生<sup>[2-5]</sup>。目前关于NB对肿瘤细胞生物学效应的研究尚少见文献报道,同时NB的致病物质尚不清楚。本研究基于NB和nHAP在形态大小和组成成分上的相似性,观察NB与nHAP对乳腺癌MDA-MB-231细胞的影响,并探讨其钙化可能存在的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

RPMI1640粉剂购自HyClone公司,标准胎牛血清(FBS)购自TBD公司,纳米羟基磷灰石粉剂(nHAP)购自上海宝曼生物科技有限公司(经扫描电镜扫描大小为300 nm),0.1%和0.25%的胰酶,CCK-8试剂盒购自七海生物,Annexin V/PI试剂盒购自碧云天,PBS购自Boster。Millipore公司的0.22 μm滤器,CO<sub>2</sub>培养箱,倒置显微镜,流式细胞仪,HI-TACHI-7000透射电子显微镜,DL-ZD2浊度计,日立7180全自动生化分析仪。

### 1.2 细胞株

MDA-MB-231细胞株由本中心保存。

### 1.3 实验方法

1.3.1 NB细菌悬液与nHAP悬液的配置 用双蒸水配置1 mg/mL的nHAP悬液原液,磁力振荡混匀3 h,高压消毒备用。实验前按培养基配方与已过0.22 μm滤器的1640培养基、FBS混合,配成最终浓度为100 μg/mL的nHAP悬液,浊度计测定为2麦氏浊度(M)。钙化胎盘中分离所得,经形态学鉴定的大小在300 nm左右的NB,超声振荡10 min,用含10% FBS的1640配置2M的NB悬液。

1.3.2 CCK-8测定NB和nHAP对MDA-MB-231细胞的抑制作用 取培养72 h生长状态良好的MDA-MB-231细胞,配成悬液,以 $2 \times 10^4$ /mL的密度接种于96孔板,每孔100 μL,贴壁24 h,分别加入配好的NB和nHAP悬液,作用24、48、72 h后,加CCK-8,共培养4 h,450 nm处测定光密度值。设置空白对照3组:NB空白对照组:100 μL 10% FBS的1640培养基+NB悬液10 μL;nHAP空白对照组:100 μL 10% FBS的1640培养基+nHAP悬液10 μL;培养基空白对照组:110 μL 10% FBS的1640培养基;实验组3组:NB组:接种好的细胞+NB悬液10 μL;nHAP组:接种好的细胞+nHAP悬液10 μL;正常对照组:接种好的细胞+10% FBS的1640培养基10 μL。每组设3个复孔,用各实验组与相应空白组光密度值之差间接代表NB和nHAP对MDA-MB-231细胞的抑制作用。

1.3.3 NB和nHAP对细胞损伤指标LDH的测定 取生长状态良好的MDA-MB-231细胞,配成 $2 \times 10^4$ /mL的悬液,1 mL/孔,接种于4个24孔板,培养24 h后换新鲜培养基或2 M的NB悬

液或100 μg/mL的nHAP悬液1 mL,分别在培养12、24、48、72 h时吸取上层培养基400 μL,在日立7180全自动生化分析仪上测定LDH活性。设3个组别:正常对照组,NB组,nHAP组,每组设置6个复孔。

1.3.4 细胞凋亡率的测定 取生长状态良好的MDA-MB-231细胞,配成 $5 \times 10^4$ /mL的悬液,2 mL/孔接种于6孔板,培养24 h后,更换培养基,正常对照组:10% FBS的1640培养基;NB组:NB悬液;nHAP组:nHAP悬液各2 mL,每组设置3个复孔。作用72 h后,0.25%胰酶消化下细胞,PBS洗涤(1 000 r/min, 2 min)2次,流式Annexin V/PI双染色法测定细胞凋亡率。

1.3.5 透射电镜观察细胞结构变化 取生长状态良好的MDA-MB-231细胞,配成 $5 \times 10^4$ /mL的悬液,5 mL/瓶接种于100 mL细胞培养瓶中,24 h后换液,换液步骤同1.3.4。取作用72 h后的细胞,0.1%胰酶消化,放入10 mL离心管,800 r/min离心5 min,保留1.5 mL上清,轻轻吹散细胞后转入1.5 mL离心管,1 200 r/min,离心10 min,弃上清,缓慢加入4%戊二醛作前固定,1%锇酸后固定,酒精、丙酮梯度脱水,环氧树脂包埋后制备超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅染色,透射电镜观察。

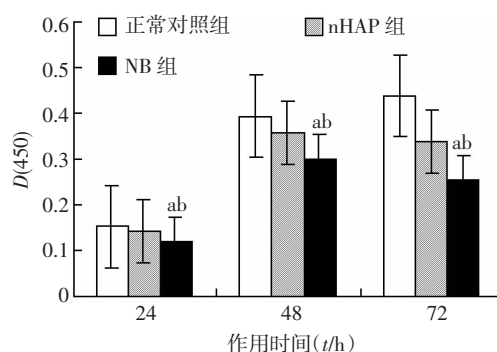
### 1.4 统计学处理

数据采用SPSS 17.0进行单因素方差分析,采用GraphPad Prism 5进行双因素方差分析并绘图,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NB及nHAP对细胞活性的抑制作用

2 M的NB和nHAP作用于MDA-MB-231细胞后,均可抑制细胞的活性,且NB对细胞的抑制作用强于nHAP,与正常对照组比较均有统计学差异( $P < 0.01$ ),两者之间各时间段比较也均有统计学差异( $P < 0.01$ ),且随作用时间的增强,两者对细胞的抑制作用增强,差异也增大。见图1。



a:  $P < 0.01$ ,与正常对照组比较;b:  $P < 0.01$ ,与nHAP组比较

图1 NB与nHAP对MDA-MB-231细胞的抑制作用

### 2.2 对细胞的损伤作用

NB组作用12、24、48、72 h时,上清中LDH活性均高于正常对照组和nHAP组,但在12 h时,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),与正常对照组相比,24 h( $P < 0.05$ )、48 h( $P < 0.01$ )、72 h( $P < 0.01$ )均有统计学差异,与nHAP组相比仅在24 h( $P < 0.05$ )、48 h( $P < 0.01$ )时差异有统计学意义。nHAP组与正常对照组比较仅在72 h有统计学差异( $P < 0.01$ ),见表1。

表1 NB与nHA对细胞LDH活力的影响 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
正常对照组	14.2 ± 2.2	10.2 ± 1.2	15.3 ± 2.2	21.3 ± 2.2
nHAP组	15.0 ± 2.8	10.5 ± 2.3	14.8 ± 4.3	28.4 ± 1.7 <sup>c</sup>
NB组	15.2 ± 2.3	15.0 ± 2.7 <sup>ab</sup>	22.8 ± 2.7 <sup>cd</sup>	31.5 ± 2.2 <sup>c</sup>

a:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , 与nHAP组比较

### 2.3 细胞凋亡结果

作用72 h测凋亡,正常对照组的细胞凋亡率为(3.0 ± 0.5)%,nHA组的细胞凋亡率为(5.1 ± 0.9)%,NB组的细胞凋亡率为(13.8 ± 2.0)%。nHAP组细胞凋亡率高于正常对照组,但差异无统计学意义( $P = 0.082$ )。NB组细胞凋亡率高于正常对照组和nHAP组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图2。

### 2.4 透射电镜观察结果

透射电镜下,NB组表现为:细胞外有大量NB;细胞可吞噬NB,吞噬的NB可溶解(图3A);线粒体略有肿胀,可见细胞膜和细胞器相对完整的核固缩及明显的凋亡小体形成(图3B)。nHA组:细胞外颗粒较少,细胞内可见吞噬的nHA,细胞器未见明显异常(图3C、D)。

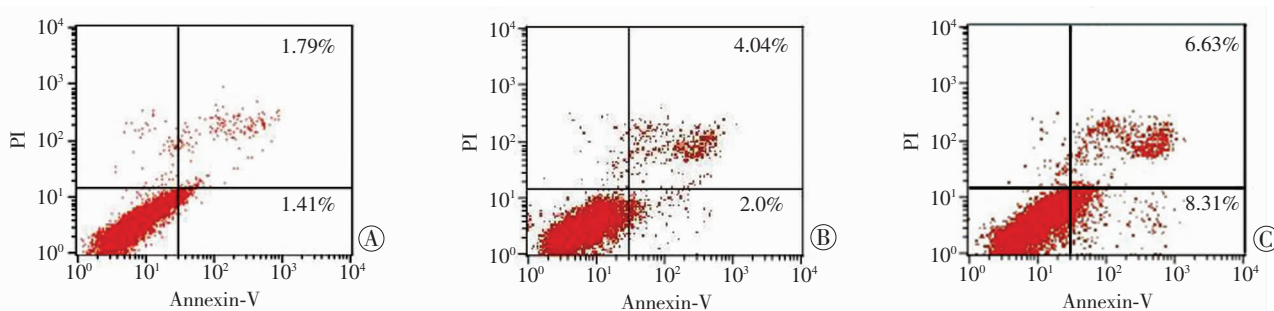
## 3 讨论

NB目前已经成功从肾结石、膀胱结石等泌尿系统

结石、胆道系统结石、动脉粥样硬化斑块以及胎盘钙化组织和乳腺癌钙化组织等多种异常钙化性疾病中分离获得<sup>[1,6-9]</sup>,其导致钙化和结石形成的机制和其致病成分尚未明确,同时对于其是否具有生命活性也存在质疑,但其矿化外壳成分HAP是得到公认的;同时nHAP可以抑制肿瘤细胞生长,促进凋亡也已得到证实<sup>[2-5]</sup>。

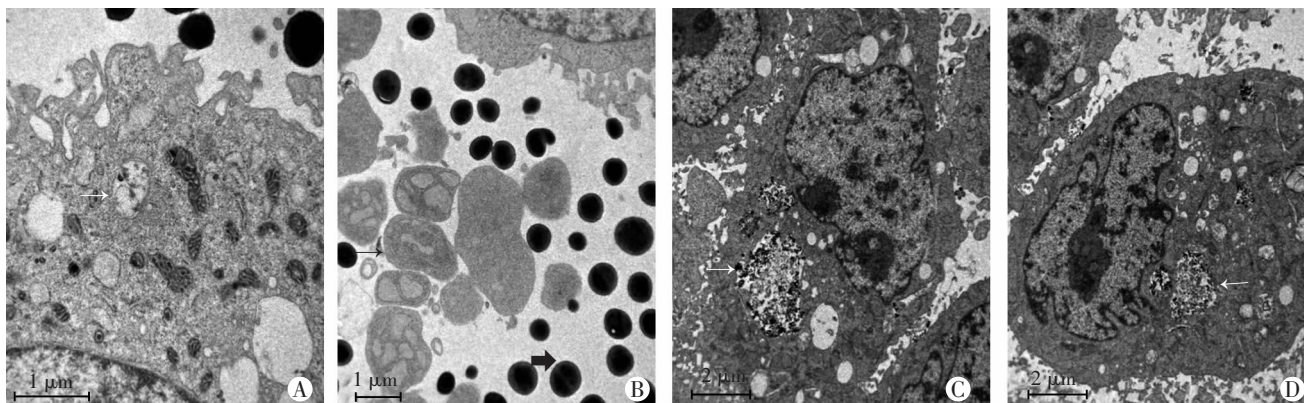
本研究基于NB矿化外壳成分是HAP这一共性出发,通过相同大小和起始浓度的NB和nHAP对肿瘤细胞的影响进行对比研究,一方面可以明确其致病物质是否是HAP,为进一步研究钙化机制,抗肿瘤治疗奠定基础,另一方面可以从侧面证实NB具有生物活性。

从CCK-8的结果可以发现:随作用时间的延长nHAP和NB均可抑制肿瘤细胞的生长,NB的抑制作用明显强于nHAP,且随作用时间的延长,强度增加,说明300 nm左右的nHAP有一定的抗肿瘤作用,同时也说明NB致病成分不仅仅是HAP外壳,可能与NB的其他组分及NB的自我复制有关。细胞损伤指标LDH活性以及细胞凋亡率、透射电镜下观察结果也与CCK-8结果吻合。



A: 正常对照组; B: nHAP组; C: NB组

图2 流式细胞术检测NB、nHAP作用MDA-MB-231细胞72 h后各组细胞的凋亡率



A: NB组, ↑示细胞吞入NB, 吞入胞质NB的有溶解迹象, 线粒体略有肿胀; B: NB组, ↑示凋亡小体, ⇓示分裂中的NB; C: nHAP组, ↑示细胞吞入nHA并有溶解变小趋势, 细胞器未见明显异常; D: nHAP组, ↑示吞入细胞的nHA大小不一趋势更加明显

图3 NB、nHAP作用MDA-MB-231细胞72 h后透射电镜观察细胞变化

综上所述,NB可以抑制乳腺癌细胞的生长,造成其一定程度的损伤,并促进其凋亡,其导致肿瘤细胞凋亡的成分不仅仅是HAP外壳,也可能包括NB的其他组分或代谢产物。Sharif等<sup>[10]</sup>研究发现细胞凋亡越明显,软骨钙化越快,也说明了凋亡和钙化的形成有一定的关系。因此可以推测:NB导致钙化可能与其诱导细胞凋亡有关,大量凋亡的细胞超出机体的清除速率,在体内堆积,网络NB及其他有形成分形成矿化的核心,导致钙化的产生,但其具体机制尚待进一步研究。

### 参考文献:

[1] Guo Y, Zhang D, Lu H, et al. Association between calcifying nanoparticles and placental calcification[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 1679-1686.  
[2] 唐胜利,刘志苏,钱群,等.羟基磷灰石纳米粒子诱导人肝癌BEL-7402细胞凋亡的机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(4): 660-662.  
[3] 李海丰,俞光荣,王德平.纳米羟基磷灰石对骨肉瘤U2-OS细胞生长的影响[J]. *同济大学学报:医学版*, 2005, 26(1): 35-37.

[4] 王江,师钟丽,黄鑫,等.不同形貌羟基磷灰石纳米颗粒的可控合成及其对骨肉瘤细胞生长的影响[J]. *浙江大学学报:理学版*, 2011, 38(3): 333-336.  
[5] 陈晓娟,李小平,唐忠志,等.羟基磷灰石纳米粒子对人胃癌细胞增殖及侵袭的影响[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(19): 3181-3183.  
[6] 唐中华,吴唯,吕新生,等.乳腺癌组织中纳米细菌样颗粒的电镜观察[J]. *医学临床研究*, 2002, 19(3): 214-215.  
[7] Lu H, Guo Y N, Liu S N, et al. Nanobacteria may be linked to calcification in placenta[J]. *Ultrastruct Pathol*, 2012, 36(3): 160-165.  
[8] Ciftcioglu N, McKay D S. Pathological calcification and replicating calcifying-nanoparticles: general approach and correlation[J]. *Pediatr Res*, 2010, 67(5): 490-499.  
[9] Kutikhin A G, Brusina E B, Yuzhalin A E. The role of calcifying nanoparticles in biology and medicine[J]. *Int J Nanomedicine*, 2010, 7: 339-350.  
[10] Sharif M, Whitehouse A, Sharman P, et al. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2): 507-515.

(收稿:2013-01-08;修回:2013-03-20)

(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2013)16-1691-01

## 个案与短篇

### 新生儿先天性皮肤缺损1例治疗体会

胡琦,何念海,邓睿 (400038 重庆,第三军医大学西南医院儿科)

[关键词] 新生儿;先天性;皮肤缺损

[中图分类号] R726.2;R758.5 [文献标志码] B

新生儿先天性皮肤缺损为临床罕见疾病,自1767年首次由Cordon报道距今已有200多年,全世界共报道先天性皮肤缺损约500例,发病率为十万分之一<sup>[1]</sup>,国内外相关文献多为病例报道。本科新生儿室于2012年11月22日收治1例患儿,经综合治疗及精心护理,治疗22d临床治愈出院,现将对其治疗体会报告如下。

#### 1 临床资料

##### 1.1 一般情况

患儿,男性,出生后58min,因双侧足部皮肤缺损入院。患儿系第1胎第1产,为体外受精-人工胚胎植入,母亲患有妊娠糖尿病,妊娠合并甲状腺功能亢进,间断予“丙基硫氧嘧啶”口服治疗,患儿为胎龄37<sup>+6</sup>周剖宫产,出生体质量3595g,出生后Apgar评分1.5、10min均为10分,羊水呈乳糜样,脐带绕颈1周,胎盘未见异常,生后即发现患儿双足踝关节附近皮肤缺损,露出鲜红色肉芽组织,反应尚可,哭声洪亮,无发热,无少哭少动,即转入我科治疗。患儿父亲幼时有类似症状(疤痕后脱

皮表现)。体格检查:体温37.1℃,呼吸41/min,心率145/min,氧饱和度95%,血压70/40mmHg,足月儿外貌,呼吸平稳,反应尚可,刺激后哭声洪亮,右足内侧踝部可见1.3cm×1.5cm不规则皮肤缺损,左侧脚踝部分别见8cm×2cm、2cm×1.5cm不规则皮肤缺损,露出鲜红色肉芽组织,有脓性渗出液(图1)。临床诊断:新生儿先天性皮肤缺损。

##### 1.2 治疗情况

入院后查血常规:WBC 20.33×10<sup>9</sup>/L,淋巴细胞百分率19.2%,中性粒细胞百分率69.8%,降钙素原0.05ng/dL,CRP 0.6mg/dL,TORCH均阴性,梅毒抗体阴性,创面渗液细菌培养及真菌培养阴性。入院后予氟氯西林抗感染,每次30mg/kg,静滴,12h1次,碘伏消毒创面,无菌纱布覆盖,并保持创面干燥,第2天患儿创面出现较多蜂窝状脓性分泌物,即予调整治疗,加强抗感染,予氟氯西林联合头孢他啶抗感染,并改变换药方式:①首先碘伏消毒创面,清除坏死组织,并予氧气吹干创面;②生理盐水冲洗创面,再予氧气吹干创面;③创面上涂上粒细胞巨噬细胞刺激因子凝胶,创面周围外涂莫匹罗星软膏;④盖上无菌凡士林纱布;⑤覆盖无菌纱布包扎固定。调整治疗后2d,患儿创面脓性分泌物消失,此后创面长出新生皮肤组织,并生长良好,无感染迹象,前10d为每日换药1次,此后为每2d换药1次,治疗18d后患儿皮损完全结痂,治疗21d结痂基本脱落,皮肤生长良好,未见明显疤痕、挛缩及功能障碍(图2)。

(下转1697页)

[通信作者] 何念海,E-mail:henianhai@vip.sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130227.1337.004.html>(2013-02-27)