

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00541

## 氯化镧经 Caspase-3 途径诱导子宫颈癌细胞凋亡

郭菲<sup>1\*</sup>, 赵萍<sup>2</sup>, 缪丽芳<sup>3</sup>, 陆丹<sup>3</sup>, 俞玲芳<sup>3</sup>, 汪泱<sup>1\*</sup>

1. 南昌大学第一附属医院烧伤研究所, 南昌 330006

2. 江西省科学院人事处, 南昌 330029

3. 南昌大学研究生院医学部, 南昌 330006

**[摘要]** **目的** 探讨氯化镧体外诱导人子宫颈癌细胞凋亡的作用和分子机制, 为探索稀土化合物的药用价值提供理论依据。**方法** 采用形态学观察、四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法测定氯化镧对 HeLa 细胞的抑制率; 流式细胞术分析细胞周期和细胞凋亡率, 蛋白质印迹技术分析 Caspase-3 蛋白表达的改变, 并以分光光度法测定其活性。**结果** 形态学分析和 MTT 法显示氯化镧能够抑制 HeLa 细胞生长并诱导其凋亡( $P < 0.05$ ), 其作用呈明显的量效关系。细胞周期实验结果说明, 氯化镧可令细胞大多阻滞于 G<sub>1</sub> 期, 并呈一定的浓度依赖性; 氯化镧诱导细胞凋亡亦有剂量依赖性, 在 5 μmol/L 剂量下, 细胞开始凋亡, 随着药物浓度的增加, 凋亡率不断增高, 各浓度与对照组相比差异都具有统计学意义( $P < 0.01$ )。蛋白质印迹实验显示氯化镧亦可上调活化的 Caspase-3 蛋白表达水平及活性且呈浓度依赖性。**结论** 一定浓度的氯化镧可抑制人子宫颈癌 HeLa 细胞的增殖并通过激活 Caspase 途径诱导 HeLa 细胞凋亡。

**[关键词]** 镧; HeLa 细胞; 细胞凋亡; Caspase-3

**[中图分类号]** R 737.33

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0541-04

### Lanthanum chloride induces apoptosis in HeLa cells via Caspase-3 pathway

GUO Fei<sup>1\*</sup>, ZHAO Ping<sup>2</sup>, MIAO Li-fang<sup>3</sup>, LU Dan<sup>3</sup>, YU Ling-fang<sup>3</sup>, WANG Yang<sup>1\*</sup>

1. Burns Institute, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

2. Department of Human Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330006, Jiangxi, China

3. Department of Medicine, Postgraduate Department of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

**[Abstract]** **Objective** To explore apoptosis-inducing effect of lanthanum chloride in cervical cancer cells *in vitro* and the related mechanism, so as to provide a theoretical basis for medical use of rare earth complex. **Methods** The anti-tumor activity of lanthanum chloride against HeLa cells was examined by morphological observation and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. Distribution of cell cycle and cell apoptosis were analyzed using flow cytometry (FCM). The expression and activation of Caspase-3 were examined by Western blotting assay and spectrophotometry. **Results** Morphological observation and MTT assay showed that lanthanum chloride significantly induced apoptosis in HeLa cells and inhibited cell growth in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). FCM analysis showed that the cell ratio of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase increased and that of S phase decreased significantly with the increase of lanthanum chloride doses. Lanthanum treatment also induced cell apoptosis dose-dependently. The minimum dose of lanthanum chloride to trigger apoptosis was 5 μmol/L, and the apoptosis rate increased in a dose-dependent manner compared with the control group ( $P < 0.01$ ). Western blotting analysis showed that lanthanum chloride up-regulated Caspase-3 expression in a dose-dependent manner. **Conclusion** Lanthanum chloride can inhibit growth of human cervical cancer HeLa cells and induce cell apoptosis via Caspase pathway.

**[Key words]** lanthanum; HeLa cells; apoptosis; Caspase-3

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5): 541-544]

镧是一种化学性质十分活跃的稀土金属, 研究证实稀土具有抗菌、促进创面愈合、调节细胞免疫功能

等作用<sup>[1-5]</sup>。我们的前期研究工作证明稀土化合物氯化镧对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 引起

**[收稿日期]** 2011-02-23

**[接受日期]** 2011-04-02

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30960405), 江西省自然科学基金 (2007GZY1132). Supported by National Natural Science Foundation of China (30960405) and Natural Science Foundation of Jiangxi Province (2007GZY1132).

**[作者简介]** 郭菲, 博士, 副研究员。

\* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 0791-8692539, E-mail: guofei2005@126.com; Tel: 0791-8692527, E-mail: wanyg63cn@sina.com

的体内效应有明显的拮抗作用,且镧可抑制多种细胞内 NF- $\kappa$ B 通路内部信号分子的表达及活化<sup>[6]</sup>。而 NF- $\kappa$ B 是调控涉及癌症起始、进展、转移和化学抵抗的通用转录因子,该信号通路控制着细胞增殖、炎症反应、细胞转移、血管形成及抗凋亡等<sup>[7-9]</sup>。因此,本研究以子宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象,观察氯化镧对体外培养宫颈癌细胞生长的抑制和凋亡诱导作用并探索可能的分子机制,为临床宫颈癌的防治提供新思路,并为开发稀土的药用价值提供科学依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 HeLa 细胞株为南昌大学第一附属医院泌尿外科研究所保存,氯化镧(纯度 99.9%)、四甲基偶氮唑盐(MTT)液、4'-6 二脒基-2-苯基吡啶盐酸(DAPI)染液购自美国 Sigma 公司,RPMI 1640 培养液购自美国 HyClone 公司,新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司,细胞周期检测试剂盒及 Caspase-3 活性检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。兔抗 Cleaved Caspase-3 (Asp75)购自美国 Cell Signaling Technology 公司,ECL 化学发光试剂盒购自美国 Millipore 公司。

1.2 细胞培养和分组 HeLa 细胞培养于含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温密闭孵箱中常规培养。取对数生长期细胞,随机分为实验组和对照组;对照组培养液中不含氯化镧和血清;实验组分别以含有 5、50、100  $\mu$ mol/L 的氯化镧的无血清培养液孵育细胞。

1.3 细胞形态的观察 上述两组细胞在含 10% 新生小牛血清的 RPMI 1640 培养液中孵育 24 h 后,弃培养上清,分别更换为含氯化镧(0、5、50、100  $\mu$ mol/L)的培养液继续孵育 24 h,随即在倒置相差显微镜下观察各组细胞的生长密度和一般形态学变化。细胞核的形态变化的观察:以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞接种于预先放置盖玻片的 24 孔培养板中,每孔体积 1 ml。孵育 24 h 后,加入 0、5、10、100  $\mu$ mol/L 氯化镧,24 h 后取出黏附了细胞的盖玻片,固定,行 DAPI 染色并置于 Zeiss-700 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司产品)下观察 HeLa 细胞核的形态变化。

1.4 MTT 比色法检测细胞的增殖情况 取对数生长期的 HeLa 细胞,以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200  $\mu$ l。孵育 24 h 后,加入 0、5、50、100  $\mu$ mol/L 氯化镧作用 48 h,每个浓度设 3 个平行孔,同时设空白对照孔。随后加入 MTT 液(5 mg/ml)20  $\mu$ l,37 °C 继续孵育 4 h,终止培养。小心吸弃孔内培养上清液,加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷(DM-

SO),37 °C 振荡 10 min,使结晶物充分溶解。置酶标仪(芬兰 Thermo Multiskan Ascent 公司产品)于 490 nm 波长处测定各孔光密度(D)值,并计算细胞抑制率(%)=(1-D<sub>实验组</sub>/D<sub>对照组</sub>) $\times$ 100%。

1.5 细胞周期分析 参照试剂盒说明书操作。取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板内,每孔 2 ml,常规培养细胞 24 h 后,加入 0、5、50、100  $\mu$ mol/L 氯化镧作用 48 h,每个浓度设 3 个复孔;氯化镧作用 48 h 后,收集各孔细胞,PBS 漂洗 2 次。加入 70% 的冷乙醇,4 °C 冰箱固定过夜;弃乙醇,再以 PBS 漂洗;100 目筛网过滤;离心后加入 RNA 酶消化 30 min,再以 PI 工作液作用 0.5 ml 室温避光孵育细胞 30 min,上流式细胞仪(FACSCalibur,美国 BD 公司)检测,使用 ModFit 软件分析结果。

1.6 蛋白质印迹技术检测细胞中截短式 Caspase-3 的表达 取对数生长期细胞接种于 25 T 培养瓶内,常规培养细胞 24 h 后,加入 0、5、50、100  $\mu$ mol/L 氯化镧作用 48 h 后,分别提取上述各组细胞总蛋白 30  $\mu$ g 以 15% SDS-PAGE 分离后转移至硝酸纤维素膜上,在室温下,用含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲液(TBS)封闭 2 h,加入一抗(兔抗 Cleaved Caspase-3 多克隆抗体,1:200),4 °C 孵育过夜。洗涤后,加入相应的 HRP-标记的二抗(抗兔 IgG,1:4 000),室温孵育 1 h。洗涤后,用 ECL 化学发光试剂盒检测杂交信号。采用 ImageQuant 300 型凝胶成像分析系统(美国 Amersham 公司产品)分析结果。

1.7 Caspase-3 活性测定 采用分光光度法测定各组细胞裂解液中 Caspase 活性,按照 Caspase-3 活性检测试剂盒说明书操作,用酶标仪于 405 nm 处测定反应产物 D 值。通过计算 D<sub>实验组</sub>/D<sub>对照组</sub> 比值确定各组细胞 Caspase-3 活化程度。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用单因素方差分析。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 细胞形态学观察 倒置相差显微镜下可见对照组细胞贴壁生长密集,形态清晰,胞质饱满,相邻细胞生长融合成片(图 1A);实验组细胞随着氯化镧浓度的增高,细胞密度逐渐降低,细胞质内颗粒逐渐增多,颜色加深,细胞间隙增大,少量细胞变圆漂浮,脱落细胞也逐渐增多(图 1B~1D)。激光共聚焦显微镜下可见对照组细胞核饱满,核膜完整;实验组见染色质浓聚,边集,核体积变小,随着氯化镧浓度的升高核染色质逐步崩解,核膜破裂,核碎裂(图 2)。

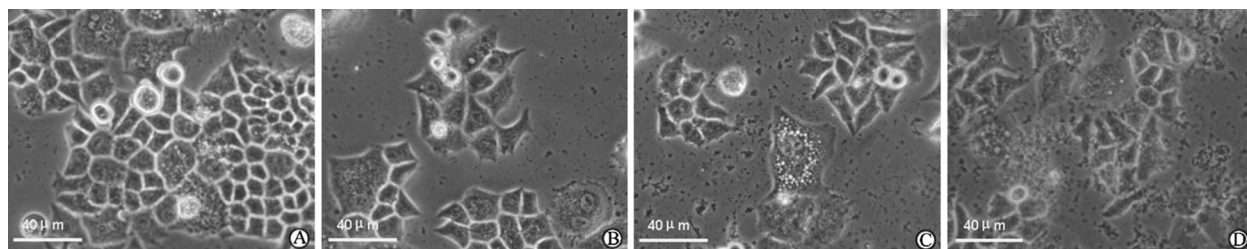


图 1 不同浓度氯化镧对 HeLa 细胞形态的影响

Fig 1 Effects of various dosages of lanthanum chloride on HeLa cell morphology

The morphologic changes of the HeLa cells were observed by inverted phase contrast microscope (scale bar=40 μm). A: Control group (the cells grew adherently, with clear morphology and plump cytoplasm, and the cells became integrated into neighboring cells); B: Experimental group(5 μmol/L of lanthanum chloride, the intercellular space widened, the cells were deep in color and granules were seen in cytoplasm); C: Experimental group(50 μmol/L of lanthanum chloride, the cells had more cytoplasmic granules and lowered cell density, with low refraction and obscure cell boundaries); D: Experimental group(100 μmol/L of lanthanum chloride, cell collapsed, cytoplasmic granules and obscure cell boundaries increased)

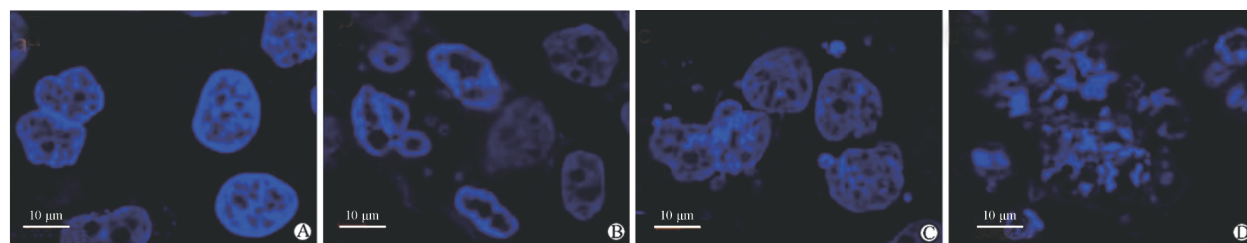


图 2 氯化镧对 HeLa 细胞核形态的影响

Fig 2 Effects of lanthanum chloride on nuclear morphology of HeLa cells

The nuclear morphology was observed by laser scanning confocal microscope (LSCM, DAPI staining, scale bar=10 μm ). A: Control group (plump nuclei and intact nuclear membrane were seen); B: Experimental group(5 μmol/L of lanthanum chloride, the nuclear chromatin was condensed and marginated, with the volume of nuclear decreased); C: Experimental group(50 μmol/L of lanthanum chloride, karyorrhexis was seen); D: Experimental group(100 μmol/L of lanthanum chloride, karyorrhexis was complete)

2.2 细胞增殖情况的变化 实验组细胞经不同浓度 (5、50 和 100 μmol/L) 的氯化镧作用后, 细胞生长的 *D* 值分别为  $1.26 \pm 0.10$ 、 $0.84 \pm 0.07$  和  $0.37 \pm 0.04$ , 5 μmol/L 组低于对照组 ( $1.68 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。可见随着氯化镧浓度的增加 *D* 值逐步降低; 其对应的细胞生长抑制率分别为 24%、51%、78%, 高于对照组 ( $0, P < 0.05$ ), 抑制效应呈剂量依赖关系。

2.3 细胞周期分析 结果如表 1 所示, 随着氯化镧浓度提高, *G*<sub>1</sub> 期细胞明显增多, 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), *S* 期细胞明显减少, 5、50、

100 μmol/L 浓度组与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。 *G*<sub>2</sub> 期细胞也明显减少, 各浓度组与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结果说明细胞大多阻滞于 *G*<sub>1</sub> 期, 并呈一定的浓度依赖性。氯化镧诱导细胞凋亡亦呈剂量依赖性, 在 5 μmol/L 剂量下, 细胞凋亡率为  $(9.03 \pm 2.13)\%$ , 随着药物浓度的增加, 凋亡率不断增高, 50 μmol/L 和 100 μmol/L 组的凋亡率分别为  $(11.83 \pm 3.32)\%$  和  $(19.88 \pm 3.18)\%$ , 3 个浓度与对照组相比差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 1 不同浓度的氯化镧处理对 HeLa 细胞周期的影响

Tab 1 Effects of various dosages of lanthanum chloride on cell cycle of HeLa cells

( $n=3, \bar{x} \pm s, \%$ )

Group	Lanthanum chloride <i>c</i> <sub>B</sub> /(μmol · L <sup>-1</sup> )	Cell cycle distribution		
		<i>G</i> <sub>0</sub> / <i>G</i> <sub>1</sub>	<i>S</i>	<i>G</i> <sub>2</sub> / <i>M</i>
Control	0	49.33±5.23	40.35±2.15	10.31±3.18
Experimental	5	64.96±6.02*	28.30±3.42*	6.71±1.05*
	50	68.45±5.98*	27.25±2.67*	5.30±1.97*
	100	69.82±6.39*	21.09±2.14**	6.37±1.96*

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

2.4 氯化镧对 Caspase-3 蛋白表达及活性的影响 蛋白质印迹实验结果如图 3 所示, 5 μmol/L 氯化镧

即可有效诱导活化型 Caspase-3 的表达, 随着氯化镧浓度的升高, 诱导作用呈浓度依赖效应。

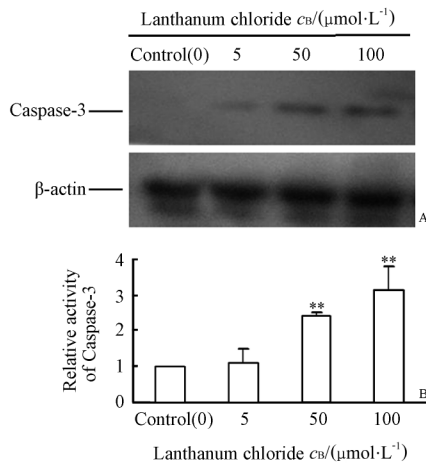


图3 氯化镧对 HeLa 细胞 Caspase-3 蛋白表达(A)及活性(B)的影响

Fig 3 Effects of lanthanum chloride on protein expression(A) and activity(B) of Caspase-3 in HeLa cells

\*\* P<0.01 vs control(0) group. n=3,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

研究显示稀土镧对肿瘤具有较高的亲和性,能够抑制小鼠腋下瘤株 S<sub>180</sub> 肉瘤和 Lewis 肺癌的生长,同时体外实验也表明稀土化合物能够抑制人白血病细胞 K562 和胃癌细胞 PAMV82 的生长,但对正常人羊膜细胞能够起促生长作用<sup>[10]</sup>。刘玉荣等<sup>[11]</sup>报道氯化镧抗小鼠原位移植肝癌的效应;Heffeter 等<sup>[12]</sup>的研究表明,低浓度稀土镧化合物 KP722 可通过诱导肿瘤细胞凋亡或细胞周期停滞而产生抗肿瘤作用。目前,稀土已成功地运用于烧伤、皮肤病、血栓病等患者的临床治疗,美国 FDA 已批准将碳酸镧用于肾功能衰竭患者,有效地降低患者血中磷酸盐水平,且没有明显的毒副作用<sup>[13]</sup>。最近不少研究表明柠檬酸镧可促进多种肿瘤细胞的凋亡,但其具体机制尚有待探讨<sup>[14-15]</sup>。

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用<sup>[16]</sup>,其中 Caspase-3 为关键的执行分子,它在凋亡信号转导的许多途径中发挥功能。Caspase-3 正常以酶原(32 000)的形式存在于胞质中,在凋亡的早期阶段它被激活,活化的 Caspase-3 由 2 个大亚基(17 000)和 2 个小亚基(12 000)组成,裂解相应的胞质胞核底物,最终导致细胞凋亡。本研究通过观察氯化镧处理后的 HeLa 细胞中相对分子质量为 17 000 的 Caspase-3 大亚基表达水平的改变,分析氯化镧诱导 HeLa 细胞凋亡的可能机制。本研究结果显示,氯化镧可上调 HeLa 细胞 Caspase-3 大亚基表达水平及活性,从而诱导细胞凋亡,且该效应呈剂量依赖性。

本研究发现,一定浓度的氯化镧可通过激活 Caspase 途径诱导 HeLa 细胞凋亡,并抑制人子宫颈

癌 HeLa 细胞的增殖,提示稀土镧在宫颈癌治疗领域可能有良好的应用前景。

### [参考文献]

- Manolov I, Raleva S, Genova P, Savov A, Froloshka L, Dundarova D, et al. Antihuman immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of rare earth metal complexes of 4-hydroxycoumarins in cell culture[J]. *Bioinorg Chem Appl*, 2006; 71938.
- Roland C R, Naziruddin B, Mohanakumar T, Flye M W. Gadolinium chloride inhibits Kupffer cell nitric oxide synthase (iNOS) induction[J]. *J Leukoc Biol*, 1996, 60: 487-492.
- Wang Y, Guo F, Hu F, Wang G, Li G. Lanthanum inhibited the binding of LPS with monocyte and CD14 expression upregulation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1: 392-394.
- Deveci M, Eski M, Sengezer M, Kisa U. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL-6 and TNF-alpha levels in burned rats[J]. *Burns*, 2000, 26: 41-45.
- 方勇, 陈玉林, 李富财, 韦多, 葛绳德. 烧伤早期切痂和创面硝酸银湿敷对大鼠存活率和淋巴细胞亚群变化的影响[J]. *第二军医大学学报*, 1995, 16: 535-537.
- Fang Y, Chen Y L, Li F C, Wei D, Ge S D. Effects of early burn excision and wet dressing of cerium nitrate on cell-mediated immunity after severe burn[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 1995, 16: 535-537.
- Wang Y, Guo F, Zhao P. Inhibitory effects of lanthanum on NF-κB activation induced by LPS in mice macrophage [J]. *J Rare Earths*, 2005, 23: 513-517.
- Pandey M, Sandur S, Sung B, Sethi G, Kunnumakkara A, Aggarwal B B. Butein, a tetrahydrochalcone, inhibits nuclear factor (NF)-κB and NF-κB regulated gene expression through direct inhibition of IκB kinase β on cysteine-179 residue [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 17340-17350.
- Takada Y, Khuri F R, Aggarwal B B. Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH 66336) abolishes NF-κB activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli leading to suppression of NF-κB-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 26287-26299.
- Youn H S, Lim H J, Choi Y J, Lee J Y, Lee M Y, Ryu J H. Selenium suppresses the activation of transcription factor NF-κB and IRF3 induced by TLR3 or TLR4 agonists [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8: 495-501.
- 纪云晶, 栗建林, 王宗惠. 轻稀土化合物抑癌作用及机制的研究 [J]. *职业与健康*, 2004, 20: 1-7.
- 刘玉荣, 陈东, 姜文华. 三氯化镧抗小鼠肝癌作用的整体药理学研究 [J]. *中国稀土学报*, 2008, 26: 405-410.
- Heffeter P, Jakupec M A, Korner W, Wild S, von Keyserlingk N G, Elbling L, et al. Anticancer activity of the lanthanum compound [tris(1, 10-phenanthroline) lanthanum (III)] trithiocyanate (KP722; FFC24) [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71: 426-440.
- Shigematsu T. Lanthanum carbonate effectively controls serum phosphate without affecting serum calcium levels in patients undergoing hemodialysis [J]. *Ther Apher Dial*, 2008, 12: 55-61.
- 苏湘鄂, 郑小娜. 柠檬酸镧对肝癌细胞 HepG2 抗失巢凋亡的影响 [J]. *深圳大学学报: 理工版*, 2010, 27: 236-240.
- 沈立明, 兰子尧, 刘琼, 倪嘉纛. 柠檬酸镧诱导肿瘤细胞凋亡的研究 [J]. *中国稀土学报*, 2009, 27: 441-446.
- Ghavami S, Hashemi M, Ande S R, Yeganeh B, Xiao W, Esbraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes [J]. *J Med Genet*, 2009, 46: 497-510.