

消癌平诱导人肺腺癌(ASTC-a-1)细胞内 caspase-3 活化的荧光光谱分析

陈同生¹, 王小平², 王治平³, 王龙祥¹, 王会营¹, 邢 达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, 广东 广州 510631
2. 暨南大学附属第一医院麻醉科, 广东 广州 510632
3. 广州中医药大学科技产业园有限公司, 广东 广州 510445

摘要 采用 CCK-8 技术检测发现传统中药消癌平(XAP)对人肺腺癌(ASTC-a-1)细胞的增殖活性具有显著的抑制作用。利用共聚焦扫描荧光显微成像、荧光共振能量转移(FRET)及其受体光漂白技术证实了基于 FRET 技术构建的 SCAT3 质粒在 ASTC-a-1 细胞中的稳定表达。将消癌平加入细胞培养液中培育细胞,并在不同的时间检测活细胞内 SCAT3 的荧光发射光谱,从而监测细胞中 caspase-3 的活化状态。实验结果表明:(1)消癌平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,消癌平对细胞的抑制作用具有剂量依赖性。(2)消癌平处理细胞 72 h 后,细胞内大量的 SCAT3 被切割,表明细胞内 caspase-3 的活化水平明显升高。(3)将含消癌平的细胞培养液与细胞共同培养 24 h,然后采用没有消癌平的细胞培养液培养细胞 48 和 72 h 后,细胞内 SCAT3 的光谱没有明显改变,表明消癌平作用细胞 24 h 内没有显著激活细胞内的 caspase-3。

关键词 消癌平; 荧光光谱; caspase-3; 荧光共振能量转移(FRET); 激光共聚焦荧光显微镜
中图分类号: Q631 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)06-1327-05

引言

消癌平(XAP)注射液是由通关藤(*Marsdenia tenacissima*)根部提取的灭菌水溶液,为国内新一代纯中药抗癌药物,高效低毒,具有独特的药理作用机制,既能够增强机体的免疫能力,又能够杀灭多种肿瘤细胞,具有显著的抑制肿瘤之功效^[1-6],并能明显延长癌症患者的生存期,同时还具有消炎、平喘、利尿等治疗作用。

Caspases 家族在细胞凋亡的信号通路中具有重要的作用,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,诱导凋亡小体来执行凋亡功能。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^[7,8]。

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、细胞凋亡和增殖的分子调控机制的重要技术^[9-17]。荧光光谱技术也被广泛应用于肿瘤特征、中药成分

以及中药作用机理的分析^[18-20]。在分子水平研究中抑制肿瘤细胞增殖活性的作用机理具有重要的意义。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应 caspase-3 动态活性的 FRET 质粒^[8]。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 和 526 nm 左右具有明显的两个峰值^[8]。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 526 nm 峰值下降。

本文首先采用 CCK-8 方法检测消癌平对人肺腺癌(ASTC-a-1)细胞有显著的抑制作用。然后利用共聚焦荧光扫描显微成像、FRET 受体光漂白技术和发射光谱证实 SCAT3 在 ASTC-a-1 细胞中的稳定表达。最后在消癌平处理细胞的不同时间通过检测活细胞中 SCAT3 的荧光发射光谱监测细

收稿日期: 2007-01-18, 修订日期: 2007-04-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670507; 60378043; 30470494)和中国博士后科学基金项目(2005037169)资助

作者简介: 陈同生, 1964 年生, 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教授

* 通讯联系人 e-mail: chentsh@scau.edu.cn

胞中 caspase-3 的活化状态。

1 实验部分

1.1 试剂

消癌平注射液(通化神源药业有限公司, 国药准字 Z20025869), 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($50 \text{ units} \cdot \text{mL}^{-1}$), 链霉素($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), NaHCO_3 , HEPEs, Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)。Lipofectin reagent(Invitrogen life technologies Inc.), G418(华美生物公司)。质粒 SCAT3 由 Miura 教授提供^[3]。

1.2 细胞培养

人类肺腺癌细胞(ASC-a-1)生长在含 10% 新生牛血清, $50 \text{ units} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的青霉素和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的链霉素的 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 μL 培养液, 接种后放入培养箱(37°C , 5% CO_2)继续培养。

1.3 CCK-8 检测

将接种 100 μL 细胞悬液(每孔 3 000 个细胞)于 96 孔板内, 预先置于 37°C , 5% CO_2 饱和湿度培养箱内培养 24 h; 处理组按照 10, 20, 30, 40, 50 μg 的剂量分为 5 组, 将消癌平加入 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 μL 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(OD_{450} 值), 并计算消癌平对细胞的抑制率。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

如同本研究小组前期的研究一样^[5, 6], 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^[5, 6]。

1.5 发射光谱检测与分析

将稳定转染表达了 SCAT3 的 ASC-a-1 细胞接种到 96 孔板中培养 24 h, 然后更换培养液后每孔加入 50 μg 的消癌平, 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上检测。激发光谱为(420 ± 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, 双通道的荧光探测通道分别是采用带通 470~500 nm 通道检测 CFP 发射荧光, 长通 530 nm 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 CO_2 培养箱, 在整个测量过程中始终保持相同的环境(37°C 恒温, 5% CO_2)。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 mean \pm SD。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 消癌平抑制细胞活性的检测

处理组按照 10, 20, 30, 40, 50 μg 的剂量分为 5 组, 将消癌平加入 96 孔板中, 在培养箱内培养 48 h, 然后更换培养液, 并且每个孔内加入 10 μL 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(OD_{450} 值), 并计算不同剂量消癌平对细胞的抑制率。

测量结果如图 1 所示, 对照组的 OD_{450} 值为 1.62 ± 0.08 , 对应 10, 20, 30, 40, 50 μg 剂量消癌平处理细胞组的 OD_{450} 值分别为: 1.12 ± 0.10 , 1.00 ± 0.18 , 0.93 ± 0.10 , 0.57 ± 0.02 , 0.56 ± 0.02 ($n = 5$), 相应的细胞活性抑制率为: 30.85%, 38.01%, 42.34%, 64.78% 和 65.52%。与对照组相比, 消癌平处理组的 $* p < 0.001$, 表明消癌平对细胞增殖活性具有明显的抑制作用。由以上结果可以发现: 与 10, 20, 30 μg 剂量组相比, 40 μg 剂量和 50 μg 剂量组对细胞增殖活性的抑制作用更加明显, 但是 40 μg 剂量组和 50 μg 剂量组之间对细胞的抑制作用并没有明显差异。

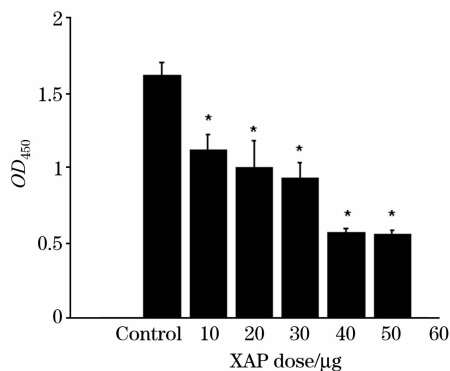


Fig. 1 Inhibition of XAP on the cell viability $* p < 0.001$

2.2 SCAT3 在 ASC-a-1 细胞中的稳定表达

图 2 给出了单个稳定表达 SCAT3 质粒的细胞在两个荧光通道的共聚焦荧光图像以及细胞的透射图。这个细胞是一个正在进行分裂的细胞, 有明显的双细胞核结构。SCAT3 在细胞中均匀分布, 没有特异性的聚集部位。

将稳定表达 SCAT3 的细胞富集之后接种到 96 孔板, 加入 100 μL 的细胞培养液在细胞培养箱中培养 24 h 后, 利用光谱仪在活细胞中测量 SCAT3 的发射光谱, 如图 3 所示, 该结果与文献[8]的结果一致, 在 476 和 526 nm 处有明显的两个峰值, 表明 SCAT3 在细胞中正常表达。

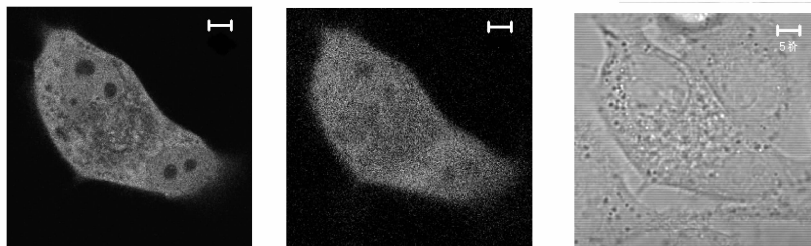


Fig. 2 Fluorescence images of cell expressing stably with SCAT3 in Venus and CFP channels. Bar: 5 μm

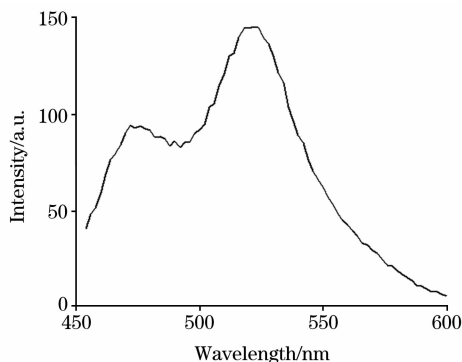


Fig. 3 Fluorescence emission spectra of SCAT3 inside living cells

为了进一步证实 SCAT3 质粒在细胞中表达及其 FRET 效应, 采用高强度的 514 nm 激光光漂白 SCAT3 的受体 Venus, CFP 荧光通道的荧光强度上升, 如图 4 所示(光漂白区域为图 2 中的方框区域), 表明 Venus 被光漂白后, 由供体 CFP 向受体 Venus 转移的能量减少, 导致 CFP 通道的荧光强度增加。而一旦撤销光漂白激光, 激发区域中 Venus 通道荧光迅速上升, 而 CFP 通道随之下降, 这是由于光漂白区域以外具有正常 FRET 效应的 SCAT3 蛋白扩散进入激发区域的结果。

以上结果表明 FRET 质粒 SCAT3 在细胞中正常表达。

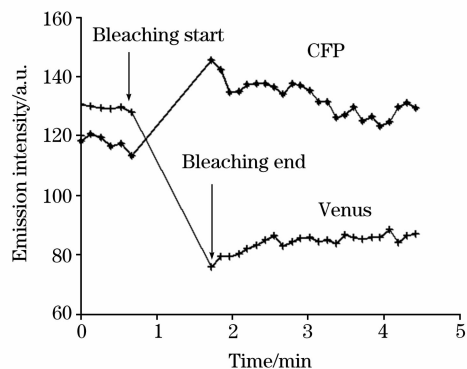


Fig. 4 Photobleaching the acceptor Venus of the SCAT3. Photobleaching area is the square area in Fig. 2

2.3 消癌平诱导细胞内 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。在 96 孔板中加入 50 μg 的消癌平, 然后分别在 24, 72 和 96 h 时检测活细胞中 SCAT3 的荧光发射光谱。由图 5 可见, 消癌平作用于细胞 24 h 时, SCAT3 的荧光发射光谱没有明显的改变, 表明细胞内的 caspase-3 活化水平没有显著提高; 消癌平作用于细胞 72 h 后, SCAT3 荧光发射光谱 526 nm 峰值明显下降, 而 476 nm 峰值显著上升, 表明消癌平诱导了细胞内 caspase-3 的活化; 消癌平作用于细胞 96 h 后, SCAT3 荧光发射光谱 526 nm 峰值消失, 显微镜下观察超过 90% 的细胞悬浮, 表明细胞已经死亡。

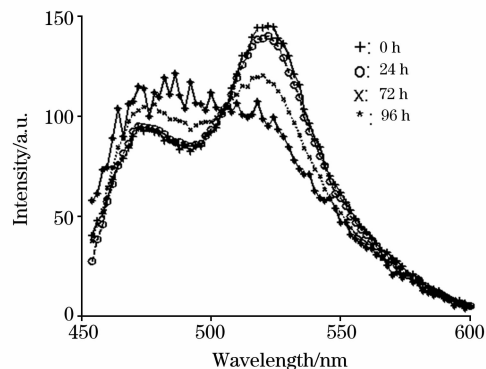


Fig. 5 Fluorescence Emission Spectra of SCAT3 inside living cells cultured with XAP for 0, 24, 72 and 96 h, respectively

为了进一步观察消癌平对细胞活性的影响, 研究了消癌平与细胞共同培育 24 h 后在不同时间段细胞中 SCAT3 的荧光发射光谱。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 后更换培养液并加入 50 μg 的消癌平在细胞培养箱中培养 24 h, 然后取走所有培养液, 采用 PBS 清洗 3 次后加入细胞培养液, 放入细胞培养箱中培养。然后分别在 0, 48 和 72 h 检测活细胞内 SCAT3 的荧光发射光谱, 如图 6 所示。三种情况下细胞内 SCAT3 的荧光发射光谱几乎一致, 表明 24 h 之内消癌平没有诱导细胞内 caspase-3 的活化, 而且利用显微镜观察三种情况下细胞形状以及贴壁状态都没有明显改变。

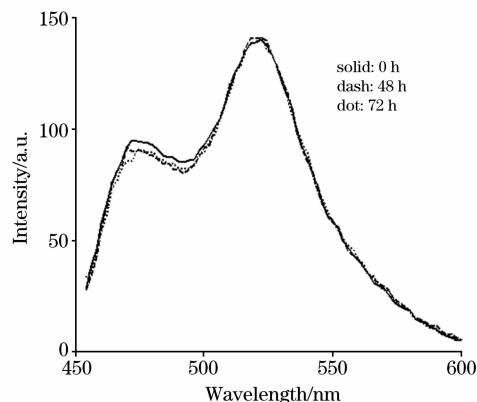


Fig. 6 Fluorescence emission spectra of SCAT3 inside living cells cultured with XAP for 24 hours and then 0, 48 and 72 hours after in DMEM, respectively

3 结 论

本文通过将基于 GFPs 以及 FRET 技术构建的 SCAT3 质粒稳定转染表达 ASTC-a-1 细胞, 然后在消癌平作用于细胞的不同时间段检测活细胞内 SCAT3 的荧光发射光谱, 从而监测细胞内 caspase-3 的活化水平, 并同时显微镜下观察细胞的形态。实验结果表明: (1) 消癌平可以有效抑制 ASTC-a-1 细胞的增殖生长, 并诱导细胞的死亡; (2) 消癌平作用于细胞 72 h 时诱导了细胞内 caspase-3 的显著活化, 但是细胞帖壁状态良好; (3) 当消癌平作用于细胞超过 96 h, 细胞内的 SCAT3 几乎完全被切割, 而且超过 90% 的细胞悬浮, 表明细胞内 caspase-3 水平很高。

参 考 文 献

- [1] LI Mao-quan, SHEN Jian-hua, XU Bin, et al(李茂全, 沈建华, 胥 彬, 等). J. Interventional Radiology(介入放射性杂志), 2001, 10(4): 228.
- [2] SUN Yu, SHEN Jian-hua, ZHU Mei-hua, et al(孙 珏, 沈建华, 朱美华, 等). Acta University Traditions Medicalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai(上海中医药大学学报), 2000, 14(2): 41.
- [3] YANG Min, WU Jing, LI Yong-qiang, et al(杨 岷, 吴 静, 李永强, 等). Traditional Chinese Medicinal Research(中医研究), 2000, 13(1): 39.
- [4] XING Wang-xing, CHENG Rong-zhen, LIN Pei-ying, et al(邢旺兴, 程荣珍, 林培英, 等). Acad. Sec. Mil. Med. Univ.(第二军医大学学报), 2003, 24(12): 1338.
- [5] HUANG Zhen-qian, TAN Huo, WANG Chun-yan, et al(黄振倩, 谭 获, 王春燕, 等). Chinese Clinical Oncology(临床肿瘤学杂志), 2007, 12(2): 97.
- [6] PEI Yi, WEI Shu-qing, YANG Yong-ming, et al(裴 毅, 魏淑青, 杨永明, 等). Cancer Research and Clinic(肿瘤研究与临床), 2006, 18(7): 469.
- [7] Nika N D, Stanley J K. Cell, 2004, 116: 205.
- [8] Takemoto K, Nagai T, Miyawaki A, et al. Journal Cell Biology, 2003, 160(2): 235.
- [9] Onuki R, Nagasaki A, Kawasaki H, et al. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2002, 99: 14716.
- [10] GAO Xue-juan, CHEN Tong-sheng, XING Da, et al. Journal of Cellular Physiology, 2006, 206(2): 441.
- [11] WANG Fang, CHEN Tong-sheng, XING Da, et al. Laser in Surgery and Medicine, 2005, 36: 2.
- [12] LIN Dan-ying, SUN Yun-xu, MA Wan-yun, et al(林丹樱, 孙云旭, 马马云, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 917.
- [13] WANG Jin, WANG Jing, SUN Yi-hong, et al(王 进, 王 晶, 孙依红, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(2): 279.
- [14] WANG Wei, FANG Qi, LIU Zhi-qiang, et al(王 伟, 方 奇, 刘志强, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2005, 63(14): 1323.
- [15] Zhang C, Wang C, Deng M, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, 290(5): 1411.
- [16] Alessandra P, Sylvia D, Marco N, et al. Structure, 2003, 11(9): 1087.
- [17] Alessandra P, Sylvia D, Marco N, et al. Micron, 2004, 35(1-2): 63.
- [18] LI Bu-hong, XIE Shu-sen(李步洪, 谢树森). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(7): 1083.
- [19] CHEN Li-hua, YIN Hong, YANG Zhao-xia, et al(陈莉华, 尹 红, 杨朝霞, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1640.
- [20] XU Chun-yan, HUANG Ming-zhi, XUE Chuan-xin(徐春艳, 黄明智, 薛传薪). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(11): 1772.

Fluorescence Emission Analysis of Caspase-3 Activation Induced by Xiao-Ai-Ping (XAP) inside Living Human Lung Adenocarcinoma Cells

CHEN Tong-sheng¹, WANG Xiao-ping², WANG Zhi-ping³, WANG Long-xiang¹, WANG Hui-ying¹, XING Da¹

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 Ji'nan University, Guangzhou 510632, China

3. Science and Technology Park Ltd., Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510445, China

Abstract The CCK-8 was used to measure the inhibition effect of Xiao-Ai-Ping (XAP), a traditional medicine, on the human lung adenocarcinoma (ASTC-a-1) cells viability. The ASTC-a-1 cells expressing stably with SCAT3, a fluorescence resonance energy transfer (FRET) plasmid based on the green fluorescent protein mutants (GFPs), was verified using confocal fluorescence scanning microscopy imaging, fluorescence emission spectra and FRET acceptor photobleaching techniques. The caspase-3 activation can be monitored by the fluorescence emission spectra of SCAT3 inside living cells. The cells expressing stably with SCAT3 were cultured with XAP for 96 hours, and the fluorescence emission spectra of the SCAT3 inside living cells were measured at the time of 0, 24, 72, and 96 hours, respectively. Experimental results showed that: (1) XAP inhibited obviously the proliferation of ASTC-a-1 cells and induced the cell death. The inhibition of XAP on the cells was dose-dependent; (2) the SCAT3 inside living cells was cleaved completely 72 hours after the XAP treatment, implying that a great deal of pro-caspase-3 was activated by XAP; (3) 24 hours after XAP treatment, the emission spectra of SCAT3 inside living cells cultured in DMEM without XAP for 48 and 72 hours did not change greatly, implying that XAP did not activate obviously caspase-3 within 24 hours.

Keywords Xiao-ai-ping (XAP); Fluorescence spectra; Caspase-3; Fluorescence resonance energy transfer (FRET); Laser confocal fluorescence microscope

(Received Jan. 18, 2007; accepted Apr. 19, 2007)