

doi:103969/j.issn.0490-6756.2015.02.032

CdTe 量子点对人乳腺癌细胞 MCF-7/ADM 的化学增敏作用及其机制研究

钟文英¹, 李晓明², 韩玉萍¹, 陈楠², 黄庆², 赵云¹

(1. 四川大学生命科学学院, 成都 610064; 2. 中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800)

摘要: 利用纳米材料 CdTe 量子点作为增敏剂, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞活力的实验表明 CdTe 量子点增强了阿霉素对于 MCF-7/ADM 的毒性, 而对非耐药的 MCF-7 无增敏作用. 然后利用免疫印迹法和免疫荧光染色法检测发现 CdTe 量子点提高了 MCF-7/ADM 细胞的自噬水平, 且这种自噬水平的上调与化学增敏效应是相关的, 以上结果提示 CdTe 量子点通过诱导 MCF-7/ADM 细胞发生自噬, 增强耐药性细胞对 DOX 毒性的敏感性.

关键词: 乳腺癌; 耐药性; 阿霉素; CdTe 量子点; 增敏; 自噬

中图分类号: G25 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2015)02-0397-06

Mechanistic analysis of CdTe quantum dots-enhanced chemosensitization of MCF-7/ADM cells

ZHONG Wen-Ying¹, LI Xiao-Ming², HAN Yu-Ping¹, CHEN Nan², HUANG Qing², ZHAO Yun¹

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. Laboratory of Physical Biology, Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract: CdTe quantum dots (QDs) were utilized as a sensitizer, Cell viability via MTT assay indicated that CdTe QDs enhanced the sensitivity to DOX for MCF-7/ADM cells but not for non-resistant MCF-7 cells. Further studies using immunoblotting and immunofluorescence microscopy revealed that CdTe QDs up-regulated autophagy in MCF-7/ADM cells, and increased level of autophagy are related to their ability of chemosensitization. These results suggest that autophagy is part of the mechanism for CdTe QDs-induced chemosensitization.

Key words: Breast cancer; Drug resistance; Doxorubicin; CdTe quantum dots; Sensitizing; Autophagy

1 引言

阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 又称多柔比星 (Adriamycin), 是一种强烈的广谱抗癌药物. DOX 能够进入细胞核, 插入到 DNA 双链分子中, 抑制拓扑异构酶 II 的活性, 破坏 DNA 的三级结构, 从而发挥药效^[1]. 阿霉素通常在临床上被用

来治疗包括乳腺癌在内的多种癌症, 初期使用一般都有很好的疗效, 但随着使用时间增长, 其药效逐渐减弱, 甚至无效^[2]. 造成这种情况的主要原因是癌细胞产生了多药耐药 (Multidrug Resistance, MDR), 即用一种化疗药物作用于肿瘤细胞后, 肿瘤细胞就会对包括这种药物在内的多种抗癌药物产生耐药性. MDR 的存在使得肿瘤细胞免

收稿日期: 2013-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(31100716, U1332119)

作者简介: 钟文英(1988-), 女, 四川广安人, 硕士, 主要研究领域为纳米材料及其生物效应. E-mail: zwytxw@163.com

通讯作者: 赵云. E-mail: zhaoyun@scu.edu.cn

受化疗药物的攻击,是肿瘤细胞的一种自我防御机制^[3]。为了克服这个问题,科学家们做了大量工作,目前针对肿瘤细胞耐药性的研究主要从MDR相关蛋白入手:例如P-gp蛋白是MDR-1所编码的P-糖蛋白,是一种能量依赖性的药物排出泵,当其表达增强时,会导致药物的流出增加,细胞内药物浓度下降,无法构成对肿瘤细胞的有效杀伤,产生P-gp介导的MDR。在治疗方面针对P-gp的对策包括:利用P-gp抑制剂环孢菌素A及其类似物抑制该蛋白的活性;或通过siRNA干扰MDR基因的表达等手段与化疗药物联用来应对肿瘤细胞的耐药性^[4]。

近年来,随着纳米技术的迅速发展,纳米材料在生物医药领域得到了日益广泛的应用,也为攻克许多现有的医学难题提供了全新的思路。由于纳米材料尺寸小、容易进入细胞,因此广泛应用于药物分子的高效载带研究,已有多种纳米材料被应用于药物载带和体内成像并取得了很好的疗效。除此之外,纳米材料引发的一系列生物学效应及其应用也是近期纳米生物医药研究的热点^[5-7]。近期的一项研究表明,富勒烯C₆₀纳米晶体能够诱导癌细胞发生自噬,而自噬水平的升高显著增强了DOX对癌细胞的杀伤性^[8]。自噬是细胞内结构通过溶酶体降解自身组分和外来物质的重要过程,对细胞生长、发育过程中稳态的维持至关重要,它的非正常激活与抑制肿瘤等多种疾病的发生、发展密切相关^[9-11]。此外,我们在近期的研究中发现CdTe量子点对于PC12细胞的自噬水平具有上调作用,并且通过自噬增强了细胞对于镉离子Cd²⁺毒性的敏感性^[12]。CdTe量子点作为新兴的纳米材料在生物成像和分子载带方面具有极大的应用前景,而关于量子点是否影响耐药癌细胞的化学敏感性方面的研究还未见报道。因此,本研究选取CdTe量子点为增敏剂,考察其是否能够增强耐药乳腺癌细胞MCF-7/ADM对于DOX毒性的敏感性,并探讨相关的细胞学机制,以期在纳米材料在耐药肿瘤细胞的复合化疗药物方面的应用提供理论基础。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 药物和细胞 阿霉素(Sigma)、CdTe量子点(实验室合成)、MCF-7和MCF-7/ADM(南京凯基生物科技发展有限公司)

2.1.2 试剂 RPMI-1640培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素、EBSS和Atto488荧光标记羊抗兔二抗购于Invitrogen公司;阿霉素、四氮甲唑蓝(MTT)、SDS、Hoechst33258购自Sigma公司;兔抗人LC3 II B抗体购自Novus公司;小鼠抗人 β -actin抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔IgG二抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠IgG二抗购自Abcam;荧光染色贴片试剂购自丹麦DAKO公司;30% Acr Bis(29:1)、过硫酸铵(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)购于美国伯乐公司;ECL plus显色液、PVDF膜和一次性过滤器(Millex[®] GP)购于美国密理博公司;一抗稀释液购于碧云天生物科技研究所。实验中配制溶液所用的溶剂为Milli-Q水,所用其他试剂均为分析纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司。

2.1.3 仪器 5%CO₂培养箱、超净工作台、离心机、蔡司正置荧光显微镜、BIORAD电泳仪、Syn-gene GBOX Chemi发光成像仪、BIORAD酶标分光仪。

2.2 方法

2.2.1 量子点合成 依照先前报道,用微波加热法在水相直接合成CdTe量子点。

2.2.2 细胞培养 MCF-7及MCF-7/ADM复苏于液氮罐,细胞悬浮于RPMI-1640完全培养基(10%热灭活的FBS,青霉素100 U/mL,链霉素100 U/mL)中,于37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养,间隔2~3 d 0.25%胰酶消化传代,收集对数生长期的细胞用于实验。

2.2.3 MTT法检测DOX对MCF-7及其耐药株MCF-7/ADM的IC₅₀ 以5×10⁵个/mL细胞浓度,将MCF-7及MCF-7/ADM分别接种于24孔板中,每孔0.8 mL细胞悬液(每组设3个复孔)。孵育过夜后将培养液吸除,重新加入含不同浓度的DOX的细胞培养液。其中对MCF-7细胞:DOX终浓度分别为0、10、20、100、200、400、600 ng/mL;对MCF-7/ADM细胞:DOX终浓度分别为0、0.3、0.6、3、6、30 μ g/mL。加药孵育48 h后,进行MTT检测。首先吸除培养基,并用0.01 M PBS洗一次;然后每孔加入5 mg/mL MTT 50 μ L,继续培养4 h;接下来每孔加入pH=2~3 10% SDS 1 mL孵育过夜以溶解蓝紫色甲嘧结晶;最后将每孔内液体混匀,分别吸取200 μ L到96孔板中,使用酶标仪(于492 nm波长下)测定吸光度值(A),通过各个吸光度与对应的药物浓度得到

的拟合方程计数出 IC_{50} .

2.2.4 CdTe 量子点对 MCF-7 及 MCF-7/ADM 毒性评估 5×10^4 个/mL 细胞浓度, 将 MCF-7 及 MCF-7/ADM 分别接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL 细胞悬液(每组 3 个复孔). 孵育过夜后将培养液吸除, 重新加入含 10、50、100 nM CdTe 量子点的细胞培养液, 作用 48 h 后测 MTT(如 2.2.3). 通过计算吸光度便可得到细胞存活率(以不加量子点只含正常培养基的对照组的细胞活性计为 100%), 计算公式为:

$$\text{细胞存活率} = (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$$

2.2.5 MTT 法检测 CdTe 联合 DOX 对 MCF-7 及 MCF-7/ADM 细胞活力的影响 5×10^4 个/mL 细胞浓度, 将 MCF-7 及 MCF-7/ADM 分别接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL 细胞悬液(每组设 3 个复孔). 孵育过夜后将培养液吸除, 加入含不同处理方式的培养液孵育 48 h; MCF-7 中分别加入 DOX 终浓度为 0、10、20、30、50 ng/mL(DOX 对照组)的培养液和 30 nM CdTe 联合 0、10、20、30、50 ng/mL DOX(致敏组)的培养液; MCF-7/ADM 中分别加入 DOX 终浓度为 0、5、10、15 $\mu\text{g/mL}$ (DOX 对照组)培养液和 30 nM CdTe 联合 0、5、10、15 $\mu\text{g/mL}$ DOX(致敏组)的培养液. 处理结束后, 对上述细胞进行 MTT 检测(如 2.2.3), 通过计算吸光度便可得到细胞存活率(以不加量子点正常培养的对照组的细胞活性计为 100%), 计算公式如 2.2.4

2.2.6 Western-Blot 法检测自噬相关蛋白 LC3I 和 LC3II 表达水平将两种细胞以 3×10^5 个/mL 细胞密度分别种于 6 孔板中, 过夜待细胞完全贴壁后进行实验. 对照组: 仅以含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液处理; 致敏组: CdTe 终浓度为 10、20、30、50 nM 作用细胞 24 h; 饥饿组(EBSS): 收集细胞前 3 h 加入饥饿液, 吸除培养基加入细胞裂解液 $80 \mu\text{L/孔}$, 快速收集裂解的细胞, 置于 95°C 水浴中煮 5~10 min. 保存样品进行 western blot 检测.

2.2.7 荧光显微观察自噬泡的形成 取对数生长期的 MCF-7/ADM 细胞, 用 RPMI-1640 完全培养基调至 4×10^4 个/mL, 接种于 RPMI-1640 完全培养基包被的圆玻片, 过夜生长后以不同方式进行处理. 阴性对照组: 仅以含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液处理; 实验组: 以含有不同浓度的

CdTe 量子点培养液作用细胞 24 h; 阳性对照组: 饥饿液(EBSS)处理 3 h. 各组细胞处理 24 h 后, 吸除培养液, 0.01 M PBS 洗涤三次, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 进行 LC3 自噬泡的免疫荧光染色样品的制备, 并进行显微荧光观察.

3 实验结果

3.1 DOX 对于两种乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MCF-7/ADM 的细胞毒性

非耐药的 MCF-7 细胞对于 DOX 的毒性很敏感, 且具有明显的浓度依赖性, 其 IC_{50} 约为 110 ng/mL(图 1). 与此相对, MCF-7/ADM 细胞对于 DOX 的毒性极度不敏感, 且没有表现出浓度依赖关系, 其 IC_{50} 大于 30 $\mu\text{g/mL}$ (图 2).

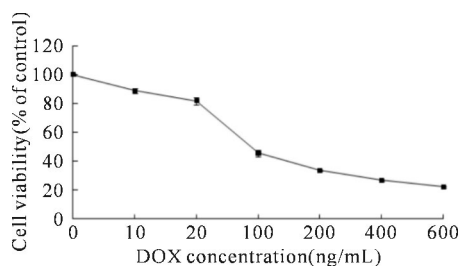


图 1 阿霉素对于 MCF-7 细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of doxorubicin on the viability of MCF-7 cells

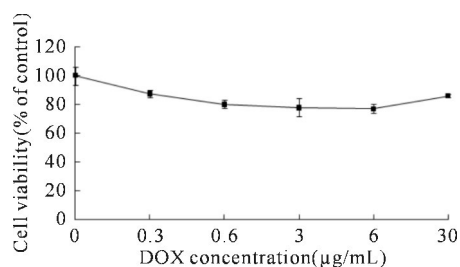


图 2 阿霉素对于 MCF-7/ADM 细胞活力的影响

Fig. 2 Effects of doxorubicin on the viability of MCF-7/ADM cells

3.2 CdTe 量子点对于 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞活力的影响

CdTe 量子点对于两种细胞的细胞活力均影响不大. 随着量子点浓度的升高, 细胞活力降低. 基于这一结果, 在接下来的实验中, 选择使用 30 nM 的量子点进行致敏实验.

3.3 CdTe 量子点增强了 MCF-7/ADM 细胞对于 DOX 毒性的敏感性

对于 MCF-7 细胞, 30nM 的 CdTe 量子点并不能够增加细胞对于 DOX 的敏感性, DOX 叠加 CdTe 量子点处理 MCF-7 细胞的毒性与单独的 DOX 处理并无显著性差别. 相反地, 对于 MCF-7/ADM 细胞, 叠加了 30nM 的 CdTe 量子点处理细胞后, DOX 的毒性显著增强, 尤其在较高浓度的 DOX 作用下, 增敏效果更为明显.

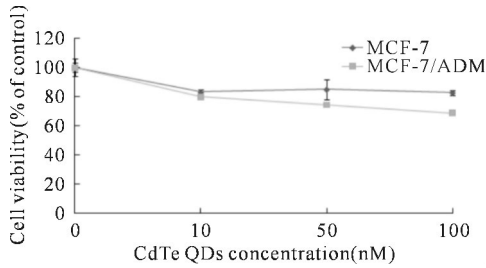


图 3 CdTe 量子点对于 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞活力的影响

Fig. 3 Effects of CdTe Quantum dots on the viability of MCF7 and MCF-7/ADM cells

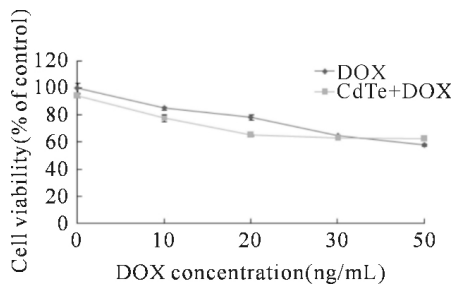


图 4 阿霉素叠加 CdTe 量子点后对于 MCF-7 细胞的毒性

Fig. 4 Effects of CdTe Quantum dots on the cytotoxicity of DOX in MCF-7 cells

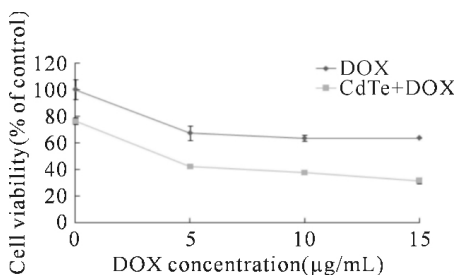


图 5 阿霉素叠加 CdTe 量子点后对于 MCF-7/ADM 细胞的毒性

Fig. 5 Effects of CdTe Quantum dots on the cytotoxicity of DOX in MCF-7/ADM cells

3.4 CdTe 量子点诱导 MCF-7/ADM 细胞发生自噬

Western blot 检测结果表明: 对于非耐药的 MCF-7 细胞, 作为阳性对照的饥饿处理明显增加了 LC3-I 到 LC3-II 的转换, 即诱导了自噬反应. 而 10-50nM 的 CdTe 量子点处理的 MCF-7 细胞中 LC3 I 和 LC3 II 的水平没有明显变化, 表明 CdTe 量子点不诱导 MCF-7 细胞发生自噬(图 6). 与此相反的是, 相同浓度的 CdTe 量子点处理 MCF-7/ADM 后, 出现了 LC3-I 到 LC3-II 的转换, 表明 CdTe 量子点诱导 MCF-7/ADM 发生自噬(图 7). 以上结果提示 CdTe 量子点化学增敏 MCF-7/ADM 的可能机制是: CdTe 量子点诱导 MCF-7/ADM 细胞发生自噬.

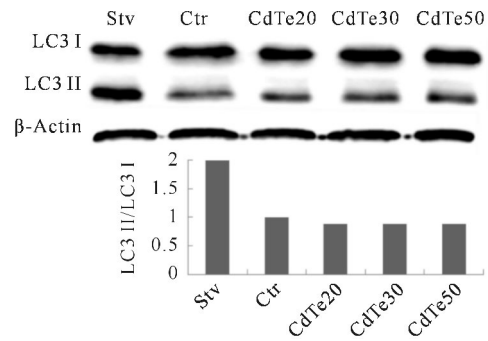


图 6 CdTe 量子点不能够诱导 MCF-7 细胞发生自噬
Fig. 6 CdTe quantum dots do not induce autophagy in MCF-7 cells

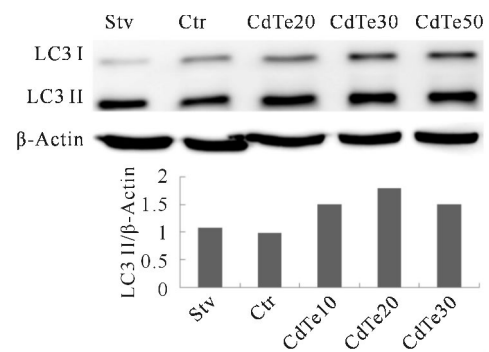


图 7 CdTe 量子点诱导 MCF-7/ADM 细胞发生自噬
Fig. 7 CdTe quantum dots induce autophagy in MCF-7/ADM cells

3.5 CdTe 量子点诱导 MCF-7/ADM 细胞中自噬体的增多

通过免疫荧光染色的方法对自噬体和 CdTe 量子点在细胞内的分布直接进行观察. 结果表明: 与对照组(图 8A)相比, 经过 CdTe 量子点处理后

的 MCF-7/ADM 细胞(图 8B)中, LC3 蛋白的表达量明显上调, 且在细胞质中形成了明显的点状聚

集(自噬泡), 同时细胞质中可见红色的 CdTe 量子点.

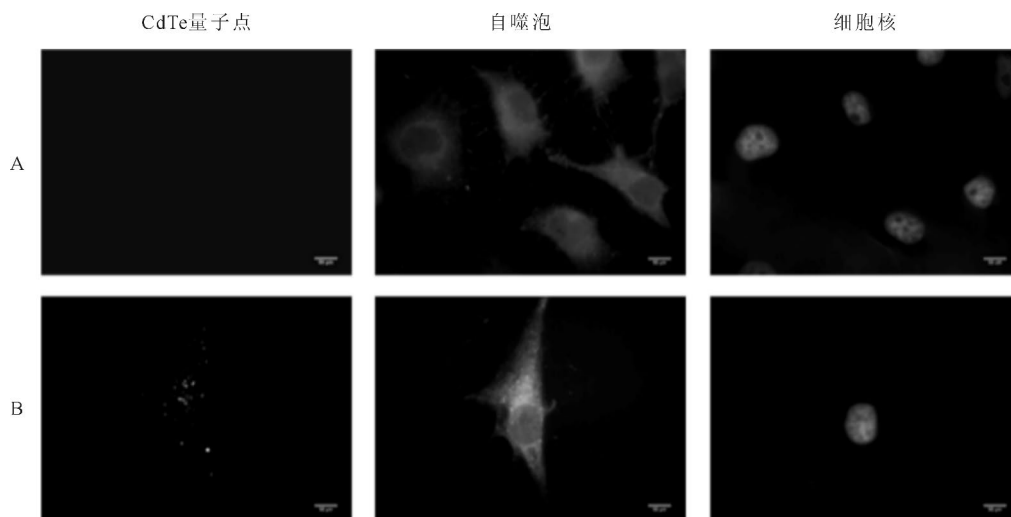


图 8 MCF-7/ADM 细胞中自噬泡的免疫荧光检测

Fig. 8 Immunofluorescence microscopy detection of autophagosome in MCF-7/ADM cells

4 讨 论

乳腺癌是发病率最高的女性恶性肿瘤, 且其发病率在全球范围内都呈上升趋势. 在临床上, 除了最直接的手术切除, 化疗也是重要的治疗手段, 阿霉素是治疗乳腺癌的一线药物, 但是癌细胞的多药耐药性(MDR)往往导致化疗的失败. 为了对抗耐药性, 常常不得不增大用药量, 而化疗药物往往具有一定的毒副作用, DOX 也不例外, 其毒副作用主要表现在对心脏和肾脏功能的损伤, 此外 DOX 还会导致患者血液中白细胞减少等^[13]. 因此, 逆转乳腺癌细胞的耐药性, 增强药效, 降低用药量和相应的毒副作用, 一直是困扰临床医生的关键性难题.

近来, 纳米材料的应用在生物医学领域, 尤其是肿瘤的诊断和治疗研究中成为热点. 其中, 纳米颗粒诱导的自噬效应成为了纳米毒理学和纳米医药研究中一个新的研究方向. 自噬是细胞降解自身物质的生物学过程, 具有重要的生理和病理学作用. 正常细胞能够通过自噬清除细胞内损伤、衰老的蛋白和细胞器, 维持内环境的稳态和生理功能^[14]. 此外, 自噬过程与病原体感染, 免疫系统应答, 神经系统疾病以及肿瘤发生等多个病理过程密切相关^[15]. 细胞的自噬效应往往具有双重作用. 例如, 在肿瘤的形成和发展过程中, 一方

面, 自噬可以清除细胞内功能异常的蛋白, 防止基因组的损伤从而抑制癌症发生; 另一方面, 癌细胞通过自噬作用提供能量, 在营养和氧气缺乏的微环境下得以存活和转移^[16]. 因此, 对于自噬机理的深入了解, 有助于人们通过精确调控自噬的水平来抵御和治疗疾病.

包括量子点在内的多种纳米颗粒已经被证明能够影响细胞的自噬水平, 进而对细胞的生理功能产生影响^[17, 18]. 本研究巧妙地选取 CdTe 量子点作为自噬增敏剂, 显著增强了 MCF-7/ADM 细胞对于 DOX 毒性的敏感性. 在此之前, 我们已经报道了 CdTe 量子点能够在 PC12 细胞中上调自噬水平且通过自噬增强了 PC12 细胞对于镉离子毒性的敏感性^[12]. 无独有偶, Wen 实验室的研究也表明富勒烯 C60 及其衍生物所引发的细胞自噬对于肿瘤细胞具有化学致敏的效果^[8]. 因此, 使用包括量子点在内的多种纳米材料与 DOX 等经典的抗癌药物相叠加, 通过改变细胞的自噬水平达到化学致敏的效果, 逆转肿瘤细胞的耐药性, 从而达到增强药效和降低用药量的目的, 不失为一种值得尝试的方案.

本研究的另一个发现是 CdTe 量子点引发的自噬和化学增敏效果是因细胞而异的. 通过自噬蛋白 LC3 的检测以及化学增敏实验 MTT 结果分析, 有趣的是, CdTe 量子点对于非耐药的乳腺

癌细胞 MCF-7 无化学增敏作用, 相应的, CdTe 量子点对于 MCF-7 细胞的自噬水平也没有影响。因此 CdTe 量子点对于两种乳腺癌细胞自噬水平的不同效应, 即量子点能够引发细胞自噬的具体机制尚待进一步地深入研究。

参考文献:

- [1] 刘晓, 邵方元, 陈宏远. 阿霉素抗肿瘤分子机制的研究进展 [J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(5): 373.
- [2] 黄俊辉, 张曦蓓, 肖佳, 等. 米非司酮逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/ADR 耐多柔比星机制的探讨 [J]. 实用肿瘤杂志, 2011, 26(6): 584.
- [3] 姜智, 陈宝安, 吴强, 等. 磁性纳米 Fe₃O₄ 对卵巢癌细胞耐药性的逆转作用及其与凋亡相关基因的关系 [J]. 癌症, 2009, 28(11): 1158.
- [4] 周瑞芳, 刘鹏熙. 中药逆转乳腺癌多药耐药研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(22): 1797.
- [5] Arivalagan K, Ravichandran S, Rangasamy K, *et al.* Nanomaterials and its potential applications [J]. Int J Chem Tech Res, 2011, 3(2): 534.
- [6] Barreto J A, O'Malley W, Kubeil M, *et al.* Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy [J]. Adv Mater, 2011, 23(12): H18.
- [7] Kumar C S S R, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery [J]. Adv Drug Deliv Rew, 2011, 63(9): 789.
- [8] Zhang Q, Yang W J, Man N, *et al.* Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C₆₀ nanocrystal [J]. Autophagy, 2009, 5(8): 1107.
- [9] Hippert M M, O'Toole P S, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? [J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9349.
- [10] Rosenfeldt M T, Ryan K M. The multiple roles of autophagy in cancer [J]. Carcinogenesis, 2011, 32(7): 955.
- [11] White E, DiPaola R S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(17): 5308.
- [12] Li X M, Chen N, Su Y Y, *et al.* Autophagy-Sensitized Cytotoxicity of Quantum Dots in PC12 Cells [J]. Adv Healthc Mater, 2013.
- [13] 胡会国, 邓意辉, 毕殿洲. 阿霉素脂质体的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2011, 20(5): 372.
- [14] Komatsu M, Ichimura Y. Selective autophagy regulates various cellular functions [J]. Genes Cells, 2010, 15(9): 923.
- [15] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069.
- [16] Kenific C M, Thorburn A, Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 241.
- [17] Kenzaoui B H, Bernasconi C C, Guney-Ayra S, *et al.* Induction of oxidative stress, lysosome activation and autophagy by nanoparticles in human brain-derived endothelial cells [J]. Biochem J, 2012, 441: 813.
- [18] Yu K N, Yoon T J, Minai-Tehrani A, *et al.* Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via reactive oxygen species generation [J]. Toxicol in Vitro, 2013, 27(4): 1187.