

金纳米链及抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链共轭物近红外热疗可启动细胞凋亡通路*☆

丛林海, 彭淑昆, 何晓光, 杨一兵

Gold nanochain and anti-epidermal growth factor receptor/Au near-infrared hyperthermia can start apoptosis pathway

Cong Lin-hai, Peng Shu-kun, He Xiao-guang, Yang Yi-bing

Abstract

BACKGROUND: Gold nanoparticles have a killing effect on tumor cells under the near-infrared laser irradiation.

OBJECTIVE: To evaluate the killing effect of gold nanochain and anti-epidermal growth factor receptor (EGFR)/Au conjugates in near-infrared hyperthermia on human laryngeal cancer Hep-2 cells and to explore relevant apoptosis pathway.

METHODS: Human laryngeal squamous carcinoma Hep-2 cells were extracted and intervened in gold nanochain or anti-EGFR/Au solution. Then, the Hep-2 cells were exposed to the near-infrared laser irradiation of 8 W/cm² (808 nm) for 6 minutes. The cells cultured alone in 1640 culture medium or only exposed to near-infrared laser were as controls.

RESULTS AND CONCLUSION: Under transmission electron microscope, the Hep-2 cells cultured in the gold nanochain solution after hyperthermia were significantly damaged, and the cells in the anti-EGFR/Au solution after hyperthermia were damaged worst. The Western blot detection exhibited that the expressions of heat-shock protein 70 and pro-apoptotic protein Bax were significantly increased, while the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was obviously decreased exposed to gold nanochain and anti-EGFR/Au near-infrared hyperthermia. These suggest that gold nanochain and anti-EGFR/Au near-infrared hyperthermia can kill human laryngeal cancer Hep-2 cells via apo-ptosis pathway activation.

Cong LH, Peng SK, He XG, Yang YB. Gold nanochain and anti-epidermal growth factor receptor/Au near-infrared hyperthermia can start apoptosis pathway. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(16): 2875-2878.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 金纳米颗粒在近红外激光照射下对肿瘤细胞具有杀伤效应。

目的: 评价金纳米链及抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链共轭物近红外热疗对人喉癌 Hep-2 细胞的热杀伤作用并探讨其凋亡通路。

方法: 取生长良好的人喉鳞癌 Hep-2 细胞, 分别应用金纳米链或抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链共轭物溶液进行干预, 在此基础上应用 8 W/cm² 近红外激光(808 nm)照射 6 min, 以单独应用 1640 培养液培养及单独给予近红外激光照射的细胞作对照。

结果与结论: 透射电镜观察发现, 金纳米链热疗后 Hep-2 细胞有明显的损伤, 抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链热疗后细胞的损伤程度最重。Western blot 检测显示, 金纳米链热疗和抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链热疗后细胞热休克蛋白 70 和促凋亡蛋白 Bax 表达明显增高, 而抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显降低。说明金纳米链及抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链共轭物近红外热疗可通过启动细胞凋亡通路杀伤人喉癌 Hep-2 细胞。

关键词: 金纳米链; 抗表皮生长因子受体抗体; Hep-2 细胞; 热疗; 凋亡; 生物材料; 纳米技术

缩略语注释: EGFR: epidermal growth factor receptor, 表皮生长因子受体; Hsp70: heat shock protein 70, 热休克蛋白 70
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.16.006

丛林海, 彭淑昆, 何晓光, 杨一兵. 金纳米链及抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链共轭物近红外热疗可启动细胞凋亡通路 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(16):2875-2878. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of
Otorhinolaryngology,
First Affiliated
Hospital of Kunming
Medical University,
Kunming 650031,
Yunnan Province,
China

Cong Lin-hai☆,
Doctor, Attending
physician,
Department of
Otorhinolaryngology,
First Affiliated
Hospital of Kunming
Medical University,
Kunming 650031,
Yunnan Province,
China
Conglinhai2008@
126.com

Peng Shu-kun,
Technician in charge,
Department of
Otorhinolaryngology,
First Affiliated
Hospital of Kunming
Medical University,
Kunming 650031,
Yunnan Province,
China

Cong Lin-hai and
Peng Shu-kun
contributed equally to
this study.

Corresponding
author: He
Xiao-guang, Doctor,
Professor,
Department of
Otorhinolaryngology,
First Affiliated
Hospital of Kunming
Medical University,
Kunming 650031,
Yunnan Province,
China
hexg1018@
yahoo.com.cn

Supported by: the
National Natural
Science Foundation
of China,
No.81160324/H1625*

Received: 2012-01-09
Accepted: 2012-02-08

0 引言

金纳米近红外热疗比化疗和放疗不良反应少, 是一种新的肿瘤热疗技术, 是近年来公认的“绿色疗法”, 在生物医学领域有着广泛的应用前景。其原理是金纳米在近红外区有强烈的光吸收, 经近红外激光照射后, 金纳米能将吸收的光能转化成热能, 使局域范围内的温度升高^[1-2]。而肿瘤细胞的热耐受差, 瘤体散热慢, 从而被杀伤而达到治疗目的^[3]。

实验利用金纳米颗粒易修饰, 可以和抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抗体结合而贴附于高表达EGFR的鳞癌和腺癌细胞膜表面^[4-5], 通过不同功率的近红外激光照射, 观察金纳米近红外热疗对人喉癌Hep-2细胞的治疗作用, 并进一步证明其热杀伤的凋亡通路。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

昆明医学院第一附属医院耳鼻喉科, 云南省昆明市 650031

丛林海☆, 男, 1972年生, 黑龙江伊春市人, 汉族, 2011年昆明医学院毕业, 博士, 主治医师, 主要从事头颈肿瘤基础及临床研究。conglinhai2008@126.com

并列第一作者: 彭淑昆, 女, 云南省昆明市人, 汉族, 1986年昆明医学院毕业, 主管技师。

通讯作者: 何晓光, 博士, 教授, 昆明医学院第一附属医院耳鼻喉科, 云南省昆明市 650031 hexg1018@yahoo.com.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)16-02875-04

收稿日期: 2012-01-09
修回日期: 2012-02-08
(20111129005/WLM·T)

时间及地点: 于2010-06/12在昆明医学院药理重点实验室完成。

材料:

细胞: 人喉鳞癌Hep-2细胞购于中国科学院上海细胞库。

主要试剂和仪器:

试剂和仪器	来源
anti-EGFR/Au 共轭物	昆明贵金属研究所
抗 EGFR 抗体、Bax 抗体、热休克蛋白 70(heat shock protein 70, Hsp70)抗体、Bcl-2 抗体	美国 Sigma 公司
JEM-1010 型透射电子显微镜	日本 JEOL 公司
808-nm 光纤耦合激光器	北京凯普林光电科技有限公司
凝胶成像仪 ImageMaster	美国 Pharmacia 公司

实验方法:

实验分组: 将人喉鳞癌Hep-2细胞随机分为4组, 每组设3个复孔。①空白对照组: 只加1640完全培养液, 不进行近红外激光照射。②单纯照射组: 加1640完全培养液, 并进行近红外激光照射。③金纳米链热疗组: 加1640完全培养液和金纳米链溶液, 进行近红外激光照射。④anti-EGFR/Au热疗组: 加1640完全培养液和anti-EGFR/Au共轭物溶液, 进行近红外激光照射。近红外激光照射为近红外激光(808 nm) 8 W/cm²照射6 min。

电镜观察近红外热疗后Hep-2细胞的凋亡: 取生长状态良好的Hep-2细胞, 消化离心后用1640完全培养基制成单细胞悬液, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 接种于6孔板内。细胞贴壁生长24 h后, 按上述实验分组进行干预, 培养液为2.5 mL/孔1640完全培养液或1.8 mL/孔1640培养液+0.7 mL/孔的金纳米链溶液或1.8 mL/孔的1640培养液+0.7 mL/孔的anti-EGFR/Au共轭物溶液, 继续培养8 h。近红外激光照射后, 继续培养24 h。各组孔内加入胰蛋白酶消化后轻柔吹打成单细胞悬液, 1 500 r/min离心5 min后弃上清, 小心收集沉淀的细胞块加入体积分数2.5%戊二醛4℃固定; 低速离心弃去固定液后再用体积分数1%锇酸固定, 梯度丙酮脱水, 环氧树脂包埋, 常规超薄切片, 醋酸双氧铀及枸橼酸铅染色, 透射电镜下观察细胞对纳米金粒子的摄取吞噬及近红外热疗后的凋亡情况。

Western blot检测近红外热疗后Hep-2细胞凋亡相关蛋白的表达: 取对数生长期的Hep-2细胞, 2.5 g/L的胰酶消化成单细胞悬液并调整细胞浓度至 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 2 mL/孔接种于12孔培养板, 置37℃、体积分数5%CO₂的培养箱中培养, 24 h后弃去原液, PBS冲洗3遍。按上述实验分组进行干预, 培养液为2.0 mL/孔1640完全培养液或1.5 mL/孔1640培养液+0.5 mL/孔的金纳米链溶液或1.5 mL/孔的1640培养液+0.5 mL/孔的anti-EGFR/Au共轭物溶液, 继续培养8 h。近红外激光照射后, 继续培养24 h。冰浴裂解细胞, 将细胞碎片和裂解液移Ep管中, 于4℃下1 200 r/min离心10 min。小心吸出上清液, 与5×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶蛋白上样缓冲液按4:1比例混匀后, 煮沸10 min, 使蛋白充分变性。行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 封闭液室温封闭2 h。加入抗Bcl-2, Bax, Hsp70一抗, 稀释比例均为1:1 000, β-actin一抗稀释比例为1:3 000, 4℃过夜。在稀释比例为1:4 000的二抗中室温孵育90 min, 加入辣根过氧化物酶偶联的化学发光底物, 于暗室用胶片显影。

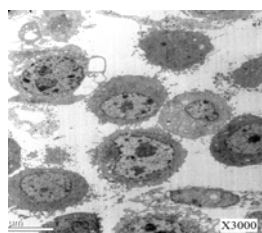
主要观察指标: 各组Hep-2细胞的形态、生长情况及Bcl-2、Bax及Hsp70的表达。

2 结果

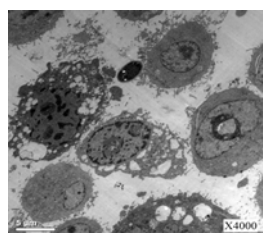
2.1 近红外热疗后Hep-2细胞的凋亡情况 透射电镜下观察发现单纯照射组有少量的凋亡细胞, 金纳米链热疗组和anti-EGFR/Au热疗组可见大量的细胞凋亡, 而后者更加严重, 见图1。

2.2 金纳米链近红外热疗后Hep-2细胞凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax的表达 Western blot结果显示, 经近红外热疗之后, 金纳米链热疗组和anti-EGFR/Au热疗组Bax蛋白表达明显增高, 而Bcl-2蛋白表达明显降低, 而单纯热疗组与空白对照组间及金纳米链热疗组与anti-EGFR/Au热疗组间差异不明显, 见图2。

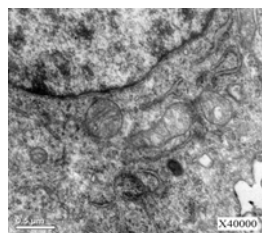
2.3 金纳米链近红外热疗后Hep-2细胞Hsp70蛋白的表达 Western blot结果显示, 经近红外热疗之后, 金纳米链热疗组和anti-EGFR/Au热疗组Hsp70蛋白表达明显增高, 以anti-EGFR/Au热疗组增高更明显, 单纯热疗组Hsp70蛋白的表达也比空白对照组增多, 见图3。



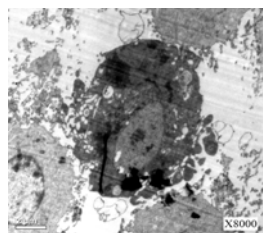
a: Control group ($\times 3\ 000$): The nuclear membranes and entoblasts could be seen clearly, and the growth of Hep-2 cells was good



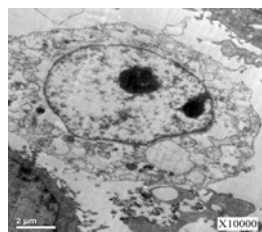
b: Near infrared group ($\times 4\ 000$): Some apoptotic Hep-2 cells were found



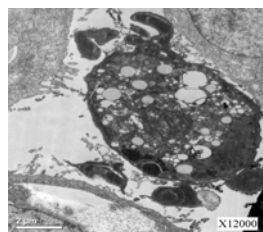
c: Nanochain group ($\times 40\ 000$): The Hep-2 cells were swollen obviously and mitochondria extended



d: Nanochain group ($\times 8\ 000$): Chromatin gathered to edge, cytoplasm was inspissated and separated, apoptotic body could be seen



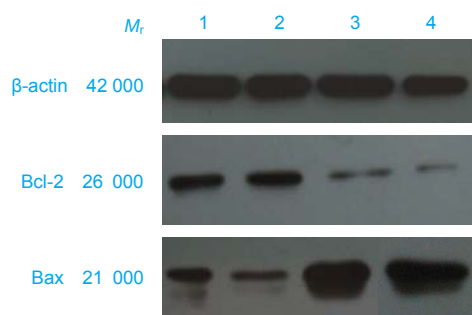
e: Anti-epidermal growth factor receptor/Au group ($\times 10\ 000$): The microvilli of cells disappeared, cell organ could not be distinguished, chromatin concentrated, and there were a lot of vacuoles in the cells



f: Anti-epidermal growth factor receptor/Au group ($\times 12\ 000$): Nucleus concentrated, cytoplasm was inspissated and separated, and apoptotic body could be seen

Figure 1 The ultrastructure of Hep-2 cells after near-infrared hyperthermia in each group under transmission electron microscope

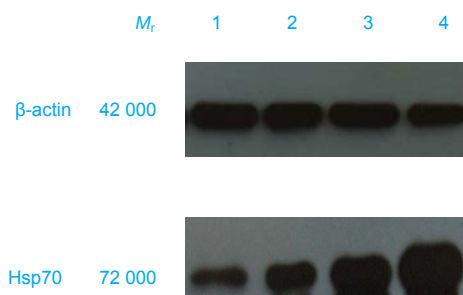
图1 近红外热疗后不同组 Hep-2 细胞的超微结构 (透射电镜观察)



1: control group; 2: near infrared group; 3: nanochain group; 4: anti-epidermal growth factor receptor/Au group

Figure 2 The expression of Bcl-2 and Bax proteins in Hep-2 cells after gold nanochain near-infrared hyperthermia (Western blot method)

图2 金纳米链近红外热疗后 Hep-2 细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达 (Western blot 检测)



1: control group; 2: near infrared group; 3: nanochain group; 4: anti-epidermal growth factor receptor/Au group

Figure 3 The expression of heat shock protein 70 (Hsp70) in Hep-2 cells after gold nanochain near-infrared hyperthermia (Western blot method)

图3 金纳米链近红外热疗后 Hep-2 细胞热休克蛋白 70 的表达 (Western blot 检测)

3 讨论

已有研究表明高温可以改变细胞膜的流动性、破坏与DNA合成有关的酶等;同时能引起生物大分子的变化,使胞内 Ca^{2+} 、活性氧浓度升高,并能影响细胞膜信息、物质、能量传递等。近年来,有研究表明高温能诱导细胞凋亡的发生^[6]。最近也有文献报道,纳米金热疗可引起细胞凋亡,使线粒体的膜通透性改变^[7]。

Rong等^[8]报道Dunn骨肉瘤细胞在 $43.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h后即可产生凋亡,6 h凋亡细胞最多。Nikfarjam等^[9]对肝脏肿瘤细胞加热研究发现,其细胞凋亡可持续96 h,并在24 h达到高峰。有研究发现热诱导的细胞死亡有两种方式:慢死亡和快死亡^[10]。慢死亡是指细胞受热后,在死亡之前能维持几天生理活动,这与染色体畸变、有丝分裂异常以及多核细胞形成等有关。而快死亡是指细胞在受热后几天内发生的死亡,细胞有变小、变圆并且脱离其培养表面等特征。快死亡的机制与热诱导的细胞凋亡有关。

Bcl-2蛋白能阻止发育中的神经和淋巴组织细胞的凋亡。体外转染研究表明,被剥夺了白细胞介素3, 4或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子的造血干细胞因Bcl-2蛋白的表达而免于凋亡;Bcl-2蛋白还能阻止由多种因素诱导的细胞凋亡,在体外模型中,不同的刺激物,如辐射、高温、糖皮质激素和多种化疗药物对细胞凋亡的诱导作用都可被Bcl-2抑制,且Bcl-2的抑制作用和其表达水平相关;另外,内源性Bcl-2表达也对调节体内细胞的生存起作用^[11]。

实验结果显示,单纯热疗组与空白对照组Bcl-2、Bax未见明显变化,而金纳米链热疗组和anti-EGFR/Au热疗组Bax蛋白表达明显增高,Bcl-2蛋白表达明显降低。Bax/Bcl-2的比值明显增加,提示近红外热疗可通过

诱导Bax高表达, Bcl-2低表达, 从而促进细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用。总之, 高温作为一种外来刺激信号, 通过上调促凋亡蛋白Bax表达和/或下调抑凋亡蛋白Bcl-2表达促进细胞凋亡。

Hsp可参与细胞凋亡的调节, 既有抗凋亡作用, 也有促凋亡作用。研究表明Hsp可对凋亡形成的各个阶段发挥阻断作用, Hsp70在热疗过程中表达量明显上调, 在细胞凋亡的各个阶段发挥着抗凋亡的作用^[12]。同时也会影响Bax、Bcl-2的表达, 使杀灭肿瘤细胞的作用增强, 又发挥着促使细胞凋亡的作用。

实验结果显示, 红外热疗后Hsp70蛋白的表达均增强, 说明热疗能促使Hsp70蛋白表达, 而因为有金纳米链及anti-EGFR/Au的存在, 在近红外激光照射下产生更多的热量, 从而促使Hsp70蛋白呈更高表达, 且因为EGFR的靶向作用而显示出梯度的变化。

在细胞凋亡中, 线粒体起着中心调控作用, 在某种意义上, 线粒体可以决定细胞的生存或死亡^[13-14]。细胞凋亡过程中, 许多重要事件的发生都与线粒体密切相关, 线粒体膜上具有调控凋亡的Bcl-2 家族蛋白, 该蛋白的结合状态将调节线粒体膜电位的变化, 通过激活Caspase通路导致细胞凋亡。且线粒体的此种促凋亡作用受Bcl-2 和Caspases的调节。热作用如何激活线粒体尚不明确, 可能与Bax/Bcl-2途径有关^[15]。实验中电镜观察发现, 金纳米链进入细胞后许多集中于线粒体内, 也许正是线粒体摄入大量的纳米粒子并接受近红外光照射, 产生热量从而破坏线粒体导致细胞凋亡。

综上所述, 纳米金红外热疗促使细胞凋亡可能是通过线粒体途径进行的。细胞热疗后, Bax与线粒体膜结合, 使线粒体的膜通透性转变为不可逆的过度开放, 导致线粒体的跨膜电位变化, 细胞色素C释放到胞浆, 启动Caspase的级联反应, 激活下游的Caspase-3和Caspase-7, 并完成对相应底物的切割, 引起细胞凋亡。

4 参考文献

- [1] Paull R, Wolfe J, Hebert P, et al. Investing in nanotechnology. *Nat Biotechnol*. 2003;21:1144-1147.
- [2] Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, Quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev*. 2004;104(1):293-346.
- [3] Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near infrared region by using goldnanorods. *J Am Chem Soc*. 2006;128(6):2115-2120.

- [4] Lowery AR, Gobin AM, Day ES, et al. Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(2):149-154.
- [5] Milanezi F, Carvalho S, Schmitt FC. EGFR/HER-2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(4):417-434.
- [6] Force T, Hyman G, Hajjar R, et al. Noncyclooxygenase metabolites of arachidonic acid amplify the vasopressin-induced Ca²⁺ signal in glomerular mesangial cells by releasing Ca²⁺ from intracellular stores. *J Biol Chem*. 1991;266(7):4295-4302.
- [7] Tong L, Cheng JX. Gold nanorod-mediated photothermalolysis induces apoptosis of macrophages via damage of mitochondria. *Nanomedicine (Lond)*. 2009;4(3):265-276.
- [8] Rong Y, Mack P. Apoptosis induced by hyperthermia in Dunn osteosarcoma cell line in vitro. *Int J Hyperthermia*. 2000;16(1):19-27.
- [9] Nikfarjam M, Muralidharan V, Malcontenti-Wilson C, et al. The apoptotic response of liver and colorectal liver metastases to focal hyperthermic injury. *Anticancer Res*. 2005;25(2B):1413-1419.
- [10] Tronov VA, Konstantinov EM, Kramarenko II. Hyperthermia induced signal for apoptosis and Pathways of its transduction in the cell. *Tsitologiya*. 2002;44(11):1079-1088.
- [11] Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993;75(2):241-251.
- [12] Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, et al. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J*. 2000;19(16):4310-4322.
- [13] Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003;112(4):481-490.
- [14] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004;305(5684):626-629.
- [15] Liang H, Zhan HJ, Wang BG, et al. Change in expression of apoptosis genes after hyperthermia, chemotherapy and radiotherapy in human colon cancer transplanted into nude mice. *World J Gastroenterol*. 2007;13(32):4365-4371.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金项目(81160324/H1625), 课题名称: EGFR-mAb 功能化修饰金纳米棒光热诱导 Hep-2 细胞调亡分子机制研究。

作者贡献: 实验设计为丛林海、何晓光, 实验实施及资料搜集为丛林海、彭淑昆, 实验评估为何晓光, 丛林海成文, 何晓光、杨一兵审校, 丛林海、何晓光对文章负责。彭淑昆与丛林海对实验的贡献相同, 故并列为第一作者。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

本文创新性: 检索万方、CNKI、PubMed 数据库, 检索时间 2001-01/2011-06, 检索关键词设定为: “金纳米链、热疗、喉癌、调亡”或“goldnanochain, thermotherapy, Hep-2 cells, anti-EGFR, laryngeal cancer, apoptosis”, 检索结果表明, 国内外尚未见有利用金纳米粒子或抗表皮生长因子受体抗体/金纳米链共轭物近红外热疗杀伤人喉癌细胞的研究。实验证实了金纳米链近红外热疗对人喉癌 Hep-2 细胞的热杀伤及靶向杀伤作用, 为进一步探讨喉癌热疗这一新的治疗方法的临床应用奠定了基础。