DOI:10.16016/j.1000-5404.201503144

论著

光敏剂MPPa介导光动力诱导人乳腺癌细胞MCF-7的内质网应激途径凋亡

朱 江[1],陈 青[2],田 思[2],贾功伟[1],白定群[2],虞乐华[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院康复医学科[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院康复医学科[2])

[摘要] **目的** 探讨光敏剂MPPa(pyropheophorbide-a methyl ester)介导的光动力作用于人乳腺癌细胞MCF-7,诱导内质网应激途径凋亡的机制。**方法** 给予不同浓度光敏剂MPPa(0、0.5、1、2、4 μmol/L),以及不同能量光照(0、0.9、1.8、2.7、3.6 J/cm^2)处理MCF-7细胞,用CCK-8法检测细胞活力。确定2 μmol/L MPPa及1.8 J/cm^{2}光能量为实验剂量。激光共聚焦显微镜观察光敏剂MPPa(2 μmol/L)内质网亚细胞器定位。将MCF-7细胞进行完全随机化分组,分为MPPa-PDT组(给予2 μmol/L MPPa及1.8 J/cm^{2}光能量)、空白对照组、单纯MPPa组(2 μmol/L MPPa)和单纯光照组(1.8 J/cm^{2}光能量)。应用Annexin V-FITC/PI双染流式细胞仪检测细胞的凋亡率。Flou-3/MA流式细胞仪检测细胞内Ca^{2+}浓度变化。Western blot检测内质网应激标志蛋白BIP和内质网应激途径相关凋亡蛋白caspase-12、CHOP的表达。**结果** MPPa介导光动力对MCF-7细胞有显著杀伤作用,抑制其生长,且抑制作用呈明显的剂量效应关系($P<0.05$);MPPa可富集在内质网上;MPPa-PDT组凋亡率显著高于各对照组($P<0.05$);MPPa-PDT组细胞内Ca^{2+}荧光强度较对照组增高($P<0.05$);Western blot检测发现BIP、caspase-12、CHOP蛋白在MPPa-PDT组中各时间点表达升高,而在各对照组中表达较低。**结论** MPPa介导的光动力可诱导MCF-7细胞发生内质网应激途径凋亡。

[关键词] 内质网应激;凋亡;光动力治疗;MPPa
[中图法分类号] R454.2; R73-36; R737.9 [文献标志码] A

Pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress pathway

Zhu Jiang[1], Chen Qing[2], Tian Si[2], Jia Gongwei[1], Bai Dingqun[2], Yu Lehua[1]([1]Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of endoplasmic reticulum stress pathway in pyropheophorbide-a methyl ester (MPPa)-mediated photodynamic therapy (PDT) in inducement of breast cancer cells apoptosis. **Methods** The MCF-7 cells were randomly divided into the MPPa-PDT group and 3 control groups (the blank control group, the MPPa alone group, and the light alone group). The cells were co-cultured with MPPa at different concentrations (0, 0.5, 1, 2 and 4 μmol/L) and exposed to the light of different energy intensities (0, 0.9, 1.8, 2.7 and 3.6 J/cm^2). CCK-8 assay was used to measure the viability of MCF-7 cells. Confocal laser scanning with ER-tracker GREEN Probe uploading was used to observed the subcellular location of MPPa (2 μmol/L). When the cells were treated with 2 μmol/L MPPa and exposed to 1.8 J/cm^2 light, flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double-staining was used to assess the cell apoptosis. Flow cytometry with Flou-3/AM was used to measure the concentrations of free calcium ion in

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81101692);重庆市自然科学基金(CSTC 2011BB5136)
[通信作者] 白定群, E-mail:baidingqun@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150715.1033.011.html(2015-07-15)

the cells. Western blotting was used to detect the protein levels of endoplasmic reticulum stress marker BIP, and its related apoptotic proteins, CHOP and caspase-12. **Results** Cell proliferation of MCF-7 cells was significantly inhibited by MPPa-PDT in an energy-dependent manner ($P<0.05$). MPPa was enriched in the endoplasmic reticulum. Flow cytometry showed the apoptotic rate and the Ca^{2+} level were obviously higher in the MPPa-PDT treated cells than the control cells ($P<0.05$). Western blot analysis indicated that the expression levels of BIP, CHOP and caspase-12 were increased in the MPPa-PDT group at all time points, whereas those in the control groups were low. **Conclusion** MPPa-PDT induces apoptosis in the MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress pathway.

[**Key words**] endoplasmic reticulum stress; apoptosis; photodynamic therapy; pyropheophorbide-a methyl ester

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81101692) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011BB5136). Corresponding author: Bai Dingqun, E-mail: baidingqun@163.com.

光动力疗法(photodynamic therapy,PDT)是一种新型辅助治疗方法,即细胞摄取光敏剂后,在特定波长的光照射下,产生活性氧物质,使细胞死亡或者导致细胞周围血管严重破坏及产生相关免疫反应,从而到达治疗目的[1-3]。MPPa(pyropheophorbide-a methyl ester)是一种在叶绿素降解产物的衍生物中提炼出来的新型光敏剂,对多数肿瘤细胞有效,具有广阔的临床应用前景[4]。光动力疗法对细胞具有杀伤作用,即引起细胞死亡,其中细胞凋亡是细胞死亡的最常见形式[5]。目前公认的凋亡通路为线粒体途径(内源性凋亡途径)和死亡受体途径(外源性凋亡途径)。近年研究表明高剂量及长时间内质网应激能诱导凋亡,最终导致细胞死亡[6],说明内质网应激途径可参与细胞的凋亡。本课题组前期已进行了光敏剂为芦荟大黄素介导的光动力对乳腺癌细胞的影响并引起线粒体途径凋亡的相关研究[3]。本实验拟从内质网应激途径这一角度探讨新型光敏剂MPPa介导光动力是否诱导人乳腺癌细胞MCF-7的凋亡,以期为MPPa-PDT更好地应用于临床治疗乳腺癌提供新的理论支持。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞

光敏剂MPPa(美国Sigma-Aldrich公司),用二甲基亚砜(DMSO)溶解过滤除菌,最终以10 mmol/L避光储存于-40 ℃的冰箱中备用;LED光源由本课题组自行研制(波长630 nm、连续输出方式、光功率密度30 mW/cm^2);DMEM高糖培养基胎牛血清、胰蛋白酶(美国Cyclone公司);CCK-8(日本同仁公司);Annexin V-FITC/PI双染检测试剂盒及Ca^{2+}荧光探针Flou-3/AM(美国凯基生物技术有限公司);内质网绿色标记探针(ER-tracker green ETG,Invitrogen公司);内质网应激蛋白BIP及内质网凋亡相关蛋白caspase-12、CHOP抗体(美国CST公司);GAPDH抗体和相应的含辣根过氧化物酶HPR标记的二抗(美国Santa Cruz公司)。人乳腺癌细胞MCF-7(上海复旦大学细胞库)。

1.2 细胞培养与分组

MCF-7细胞在含有1%青链双抗及10%胎牛血清的DMEM高糖培养基中传代培养。将MCF-7细胞随机分成MPPa-PDT组(光敏剂MPPa+光照)、空白对照组(无光敏剂MPPa、无光照)、单纯MPPa组和单纯光照组。给予0、0.5、1、2、4 μmol/L的光敏剂MPPa及0、0.9、1.8、2.7、3.6 J/cm^{2}光能量光照处理。MPPa-PDT组及单纯MPPa组待细胞贴壁后加入MPPa,单纯光照组和空白对照组加入等量无MPPa培养基,放置于37 ℃、5% CO_2孵箱中孵育,24 h后换成10%血清的新鲜培养基;MPPa-PDT组及单纯光照组给以不同剂量的光照射。

1.3 CCK-8法检测MPPa介导的光动力对MCF-7细胞增殖的影响

取对数生长期MCF-7细胞按5 000/孔接种于96孔板,待细胞贴壁后按1.2随机进行实验分组,并增加阴性对照组(只含培养基无细胞),加入0、0.5、1、2、4 μmol/L光敏剂MPPa,在孵箱中孵育24 h后给予光照(0、0.9、1.8、2.7、3.6 J/cm^2),照射时间为0、30、60、90、120 s。各组细胞经处理后继续避光培养24 h后加入CCK-8溶液10 μL于37 ℃、5% CO_2孵箱中孵育50 min。应用酶标仪在450 nm波长下检测各孔的光密度[D(450)]值,重复3次,并按公式计算其细胞活性。

细胞活性=[实验组平均D(450)值-阴性对照组D(450)值]/[空白对照组平均D(450)值-阴性对照组D(450)值]

1.4 激光共聚焦显微镜观察 MPPa 亚定位

取对数生长期 MCF-7 细胞 1 000/孔接种于培养小皿中,细胞贴壁后 MPPa(2 μmol/L)给药,避光培养 24 h。培养结束后,用 1 μmol/L 内质网标记探针 200 μL,37 ℃孵育 20 min 后再用新鲜培养基洗细胞 3 次。加入 200 μL PBS 在激光共聚焦显微镜下观察。

1.5 膜联蛋白 Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测细胞凋亡率

将对数生长期的 MCF-7 细胞,按 100 000/孔接种于 6 孔培养板中,贴壁后予以 2 μmol/L 的 MPPa 和 1.8 J/cm^{2}光照处理 24 h,离心消化收集所有悬浮及贴壁细胞,采用 Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 流式细胞仪检测细胞内游离 Ca^{2+} 浓度

将对数生长期的 MCF-7 细胞,按 100 000/孔接种于 6 孔培养板中,同 1.5 中光动力处理 24 h 后加入终浓度为 2 μmol/L 的 Flou-3/AM 孵育 1 h,新鲜培养基洗涤换液后置于孵箱中孵育 30 min,离心消化,反复用 PBS 洗涤,离心收集细胞悬液,流式细胞仪检测细胞内游离 Ca^{+} 浓度。

1.7 Western blot 检测 BIP 及 casease-12、CHOP 的表达

收集 4 组细胞,倒掉培养基并用预冷的 PBS 洗涤,加入细胞裂解液在冰上裂解,提取各组细胞蛋白。取等质量上述蛋白裂解液进行 SDS-PAGE 电泳,采用湿转法转移至 PDVF 膜上,25 ℃摇床上封闭 2 h,加入一抗(1∶1 000)4 ℃过夜摇床孵育,再加入含有辣根过氧化物酶 HPR 标记的二抗(1∶3 000)25 ℃摇床孵育 2 h,ECL 化学发光法显色,采用 Quantity One 软件分析,用 GAPDH 蛋白进行校正。

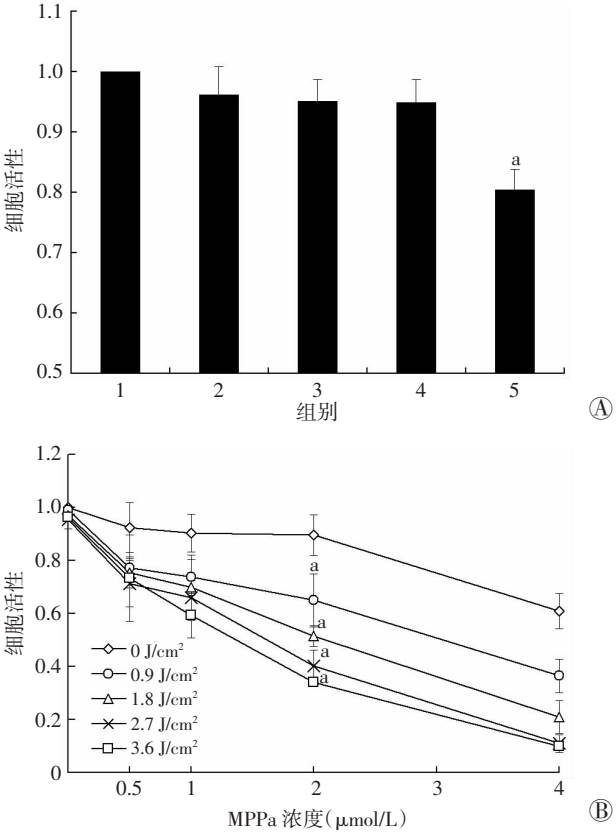
1.8 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,多组数据间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 MPPa 光动力对 MCF-7 细胞存活率的影响

MCF-7 细胞在不同浓度 MPPa 介导不同能量密度的红光作用下,活性改变见图 1。MPPa 对 MCF-7 细胞活性有一定的影响,低浓度(≤2 μmol/L)MPPa 不影响细胞活性,但高浓度 MPPa(4 μmol/L)会对细胞活性(0.618 1 ± 0.066 7)产生较大影响(图 1A)。因此,在后续的实验中使用 2 μmol/L MPPa。如图 1B 所示,单纯光照处理对 MCF-7 细胞活性无明显改变($P > 0.05$);2 μmol/L MPPa 处理时,各能量密度组间生存率相差显著,且随着能量密度的增加,存活率降低明显($P < 0.05$)。在光能量密度为1.8 J/cm^2 时细胞活性为 0.515 6 ± 0.039 2。因此,在后续的实验中使用的光能量密度是 1.8 J/cm^2。表明 MPPa 介导的光动力可以明显抑制细胞生长,影响其活性。



a:$P < 0.05$,与空白对照组比较

A:不同浓度的 MPPa 对 MCF-7 细胞活性的影响

1~5:分别 0、0.5、1、2、4 μmol/L MPPa 组;B:MPPa 复合不同能量密度的红光照射 24 h 后对 MCF-7 细胞活性的影响

图 1 不同浓度的 MPPa 与不同能量密度的红光照射对 MCF-7 细胞活性的影响

2.2 MPPa 可作用于乳腺癌细胞内质网亚细胞器

2 μmol/L MPPa 作用 MCF-7 细胞 24 h 后,可见光敏剂定位于内质网上(图 2)。

2.3 MPPa 光动力对 MCF-7 细胞凋亡的影响

2 μmol/L MPPa 介导 1.8 J/cm^2 的光动力作用 MCF-7 细胞 24 h 后,Annexin V-FITC/PI 染色,流式细胞仪检测细胞凋亡率的结果见图 3。MPPa-PDT 组(27.77 ± 2.59)的凋亡率明显高于空白对照组(3.46 ± 1.15)、单纯 MPPa 组(5.395 ± 1.85)和单纯光照组(5.62 ± 1.55,$P < 0.05$),3 个对照组间凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明 MPPa 介导的光动力疗

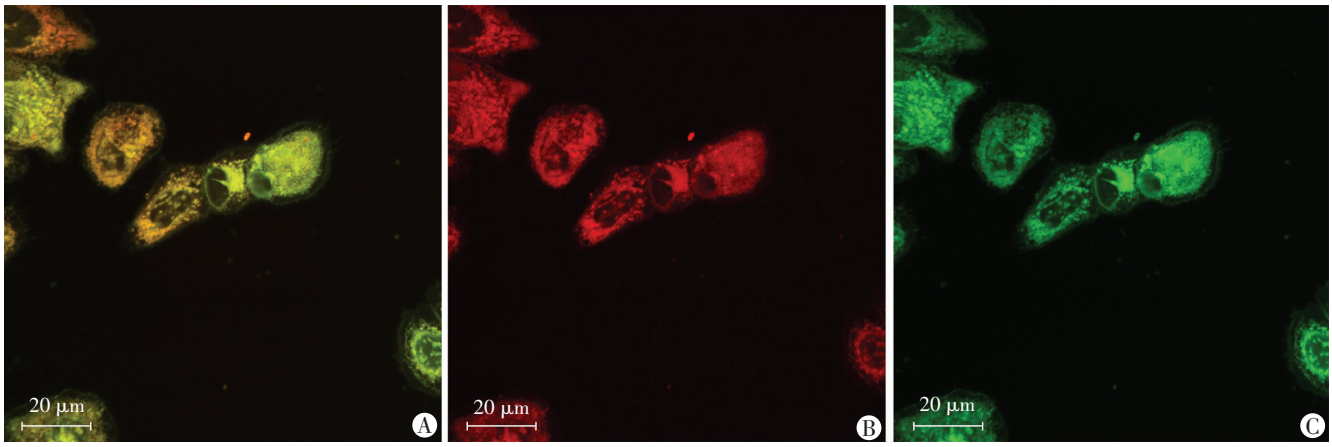
法可诱导MCF-7细胞的凋亡。

2.4 MPPa光动力对MCF-7细胞内Ca^{2+}浓度的影响

2 μmol/L MPPa介导1.8 J/cm^{2}的光动力作用MCF-7细胞24 h后，Flou-3/AM染色结合流式定量结果见图4：MPPa-PDT组细胞内游离Ca^{2+}相对荧光强度（312.047±8.576）高于空白对照组（107.637±10.599）、单纯MPPa组（104.527±8.293）和单纯光照组（98.533±1.557，$P<0.05$），3个对照组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。表明MPPa介导的光动力疗法可影响细胞内Ca^{2+}浓度的变化。

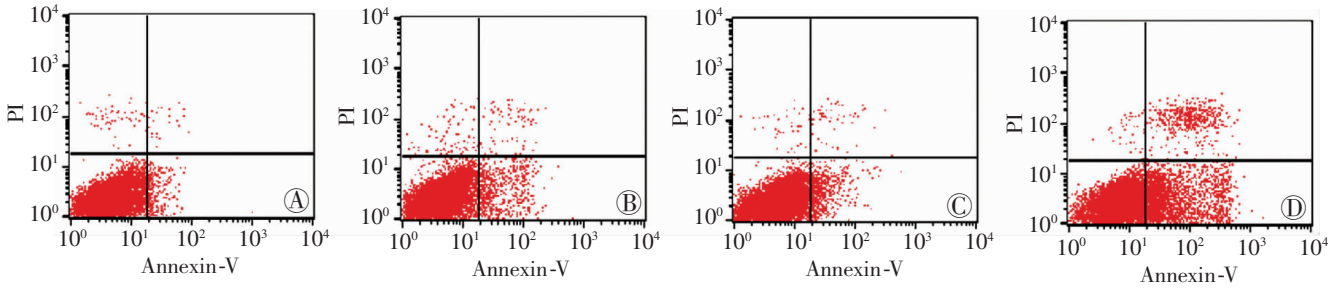
2.5 MPPa光动力对MCF-7细胞中BIP、casease-12、CHOP表达的影响

2 μmol/L MPPa介导1.8 J/cm^{2}的光动力作用MCF-7细胞12、24 h后，Western blot检测结果见图5。MPPa-PDT作用12 h组和24 h组，BIP、caspase-12、CHOP蛋白表达较对照组明显升高（$P<0.05$），而空白对照组、单纯MPPa组、单纯光照组表达均较低，3组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。表明MPPa介导的光动力可以诱导乳腺癌细胞发生内质网应激以及内质网应激途径凋亡。



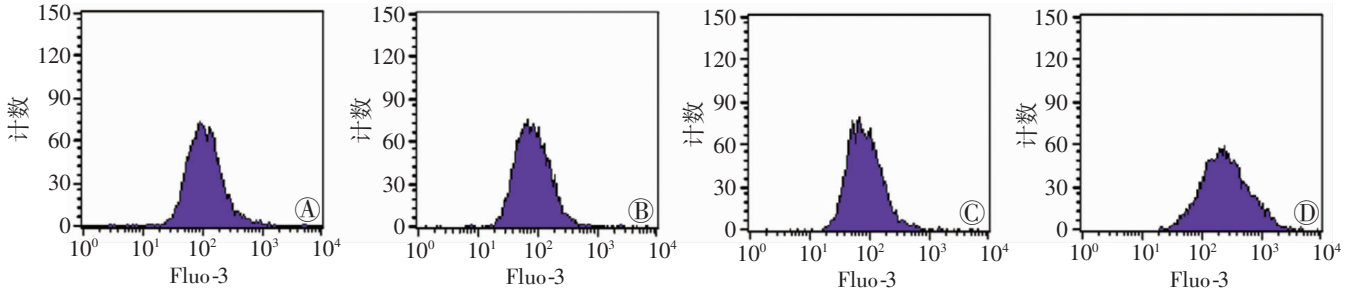
A：MCF-7细胞中显示绿色荧光的内质网；B：MCF-7细胞中自发红色荧光的MPPa；C：内质网与MPPa重叠荧光

图2 激光共聚焦显微镜观察2 μmol/L MPPa孵育24 h后在MCF-7细胞内质网细胞器亚定位



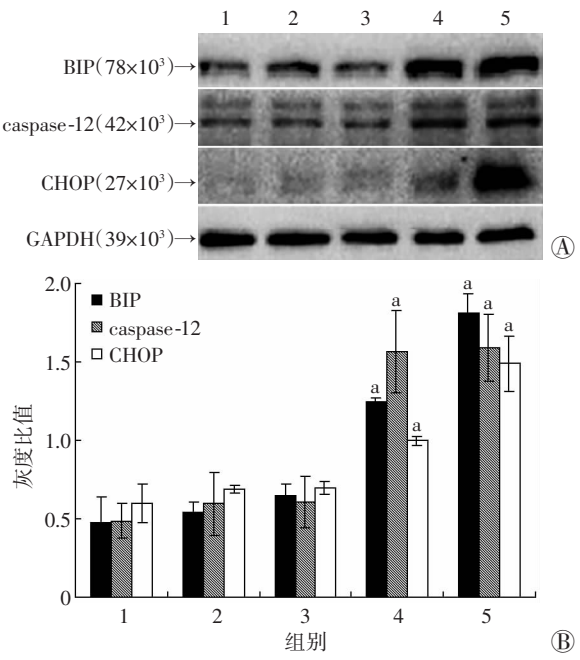
A：空白对照组；B：单纯MPPa组；C：单纯光照组；D：MPPa-PDT组

图3 流式细胞仪检测各组MCF-7细胞的凋亡率



A：空白对照组；B：单纯MPPa组；C：单纯光照组；D：MPPa-PDT组

图4 流式细胞仪检测各组MCF-7细胞内Ca^{2+}浓度变化



1:空白对照组;2:单纯 MPPa 组;3:单纯光照组;4:MPPa-PDT 后 12 h 组;5:MPPa-PDT 后 24 h 组

A:Western blot 检测; B:半定量分析 a:$P<0.05$,与空白对照组比较

图 5 Western blot 检测各组 MCF-7 细胞 BIP、caspase-12、CHOP 蛋白的表达

3 讨论

研究报道 MPPa 对食道癌细胞、人鼻咽癌细胞发挥显著作用[7]。乳腺癌作为危及女性健康的高发病率恶性肿瘤,急需在传统的药物及手术治疗方式外寻找突破[3]。本实验以人乳腺癌细胞 MCF-7 为对象,新型光敏剂 MPPa 介导光动力为处理因素,探讨 MPPa-PDT 对 MCF-7 细胞活性的影响。结果显示:MPPa 介导的光动力治疗对 MCF-7 细胞有明显杀伤作用,2 μmol/L MPPa 时,随着能量密度的增加,其存活率越低;并且 MPPa 介导的光动力治疗能显著引起 MCF-7 细胞凋亡。提示 MCF-7 细胞凋亡是 MPPa 光动力诱导乳腺癌细胞死亡的机制之一。

内质网是在真核细胞蛋白质分子合成、折叠修饰,以及脂质合成中起着重要作用的细胞器[8-10],作为细胞内最大的钙库,随时影响 Ca^{2+} 的储存。内质网同时是感受应激的敏感细胞器,其受到不同生理或病理条件刺激后,引起细胞内一系列序贯反应,称之为非折叠蛋白反应(unfolded protein reaction,UPR)。哺乳动物中包括 3 个跨膜内质网应激感受蛋白:PERK、ATF6 和 IRE-1,在内质网应激途径中起着重要作用。当应激发生时,GRP78/BIP 将与应激蛋白受体 PERK、ATF6 和 IRE-1 解离并激活感受蛋白。因此,把 GRP78/BIP 表达量的变化定为内质网应激的标志[11]。本实验结果显示:自发红色荧光的 MPPa 可以和显现带绿色荧光探针的内质网重合,说明光敏剂 MPPa 可以集聚于内质网上,作用于内质网,可能与内质网上含有低密度脂蛋白受体有关,当光敏剂与其结合后可增加光敏剂的亲脂性,利于在肿瘤细胞中的集聚[12],在光照作用下,内质网功能改变,发生后续反应;MPPa 光动力作用于 MCF-7 细胞,胞内游离 Ca^{2+} 水平升高,BIP 蛋白的表达明显增多,提示 MPPa-PDT 可诱导内质网应激的激活。

UPR 在正常应激范围内激活可通过清除过多的未折叠蛋白来维持内质网的正常功能,但在过强的刺激以及病理条件下(如高胆固醇症、肥胖、糖尿病、缺氧等),内质网功能无法修复,将会导致持续性的内质网应激,长期反复的内质网应激最终可激活凋亡因子 CHOP[13]。CHOP 是内质网应激途径介导细胞凋亡的关键特异蛋白分子。在非应激状态下,细胞中 CHOP 表达水平十分低下,但在内质网应激过程中,应激蛋白受体 IRE-1、PERK 和 ATF6 通过和 GRP78/BIP 解离并激活,向下调控 CHOP,使其表达增加[14],当 CHOP 激活后可活化 caspase-3,发生半胱天冬酶的细胞凋亡级联反应,最终导致细胞凋亡。而作为半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶家族成员之一的 caspase-12[15] 同样是内质网应激途径中重要的凋亡调节因子。可由 IRE1 途径、m-钙蛋白酶途径及 caspase-7 途径激活,激活后切割并激活 caspase-9 和 caspase-3 等效应分子参与细胞凋亡,但此过程独立于细胞凋亡的线粒体途径和死亡受体途径。本实验结果显示,MPPa-PDT 组 CHOP、caspase-12 蛋白表达上调,表明 MPPa 介导光动力作用于乳腺癌细胞可激活内质网应激途径凋亡。

综上所述,本研究进一步揭示,MPPa-PDT 可明显抑制 MCF-7 细胞的生长,并且其作用机制可能与激活内质网应激途径中的凋亡信号 CHOP、caspase-12 相关。研究[6]证明内质网应激途径同时可激活自噬,并且和凋亡具有密切关系,MPPa-PDT 是否可通过内质网应激途径引起自噬,以及如何影响凋亡,我们将进行深入研究。

参考文献：

[1] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal G B, *et al*. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer[J]. Cancers (Basel), 2011, 3(2): 2516 – 2539.

[2] Li J H, Chen Z Q, Huang Z, *et al*. *In vitro* study of low intensity ultrasound combined with different doses of PDT: Effects on C6 glioma cells[J]. Oncol Lett, 2013, 5(2): 702 – 706.

[3] 陈青，李开庭，田思，等. 芦荟大黄素复合光动力处理对人乳腺癌细胞抑制增殖和促进凋亡的体外观测[J]. 第三军医大学学报，2014，36(21)：2162 – 2166.

[4] 许川山，Albert Wing Nang Leung，杨青. MPPa光动力作用对鼻咽癌细胞生长抑制的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(14)：1457 – 1460.

[5] Kessel D. Death pathways associated with photodynamic therapy[J]. Med Laser Appl, 2006, 21(4): 219 – 224.

[6] Liu W T, Huang C Y, Lu I C, *et al*. Inhibition of glioma growth by minocycline is mediated through endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and autophagic cell death[J]. Neuro Oncol, 2013, 15(9): 1127 – 1141.

[7] Qumseya B J, David W, Wolfsen H C. Photodynamic Therapy for Barrett's Esophagus and Esophageal Carcinoma[J]. Clin Endosc, 2013, 46(1): 30 – 37.

[8] Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, *et al*. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer[J]. Front Oncol, 2015, 5: 11.

[9] Gorlach A, Klappa P, Kietzmann T. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(9/10): 1391 – 1418.

[10] Dufey E, Sepulveda D, Rojas-Rivera D, *et al*. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(7): C582 – C594.

[11] Weng W C, Lee W T, Hsu W M, *et al*. Role of glucose-regulated Protein 78 in embryonic development and neurological disorders[J]. J Formos Med Assoc, 2011, 110(7): 428 – 437.

[12] Jori G, Reddi E. The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers[J]. Int J Biochem, 1993, 25(10): 1369 – 1375.

[13] Chistiakov D A, Sobenin I A, Orekhov A N, *et al*. Role of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis and diabetic macrovascular complications[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 610140.

[14] Mihailidou C, Papavassiliou A G, Kiaris H. A crosstalk between p21 and UPR-induced transcription factor C/EBP homologous protein (CHOP) linked to type 2 diabetes[J]. Biochimie, 2014, 99: 19 – 27.

[15] Liu L Q, Fan Z Q, Tang Y F, *et al*. The resveratrol attenuates ethanol-induced hepatocyte apoptosis *via* inhibiting ER-related caspase-12 activation and PDE activity *in vitro*[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2014, 38(3): 683 – 693.

（收稿：2015-03-21；修回：2015-04-19）

（编辑　汪勤俭）