DOI:10.16016/j.1000-5404.201412133

论著

MPPa-PDT 诱导人骨巨细胞瘤细胞自噬

黄 秋,涂平华,欧云生,刘 渤,陶 勇,尹 航 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院骨科)

[摘要] **目的** 探讨焦脱镁叶绿酸-a 甲酯介导的光动力疗法(MPPa-PDT)对人骨巨细胞瘤 SGC-0404 细胞自噬的影响,研究自噬与凋亡的关系。**方法** SGC-0404 细胞经 MPPa-PDT 处理后采用 Hochest33258 染色观察细胞凋亡,DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平,单丹磺酰戊二胺(MDC)染色和透射电镜观察细胞内自噬体的形成,Western blot 检测 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和 Beclin-1 蛋白的表达水平,流式细胞仪检测细胞凋亡率。**结果** MPPa-PDT 处理 SGC-0404 细胞以后,Hochest33258 染色可观察到细胞核固缩、核碎裂等典型凋亡形态学改变;DCFH-DA 染色结果显示 MPPa-PDT 组细胞内 ROS 水平分别是对照组、MPPa 药物组、LED 光照组的 21.07、18.68 倍和 19.66 倍($P<0.05$);MDC 染色及透射电镜下可见细胞内有典型自噬体形成;Western blot 检测结果则显示 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和 Beclin-1 蛋白的表达明显高于各对照组($P<0.05$);流式细胞仪检测发现经 3-MA 抑制自噬后 MPPa-PDT 所致的细胞凋亡率明显升高[(27.69±2.23)% *vs* (43.17±2.87)%,$P<0.05$]。**结论** MPPa-PDT 能诱导 SGC-0404 细胞发生凋亡与自噬;自噬在 MPPa-PDT 作用的早期可以延缓凋亡的发生,具有抗凋亡的保护作用。

[关键词] 焦脱镁叶绿酸-a 甲酯;光动力疗法;骨巨细胞瘤;自噬
[中图法分类号] R73-362; R730.23; R738.1 [文献标志码] A

MPPa-PDT induces autophagy in human bone giant cell tumor cell line SGC-0404

Huang Qiu, Tu Pinghua, Ou Yunsheng, Liu Bo, Tao Yong, Yin Hang (Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of pyropheophorbide-a methyl ester-mediated photodynamic therapy (MPPa-PDT) on the autophagy of human bone giant cell tumor cell line SGC-0404 and the relationship between autophagy and apoptosis. **Methods** After SGC-0404 cells were treated with MPPa-PDT, cell apoptosis was analyzed by Hochest33258 nuclear staining, and the level of reactive oxygen species (ROS) was detected by dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA) staining. Cell autophagy was observed by monodansylcadaverine (MDC) staining and electron microscopy. The expression of LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and Beclin-1 was assayed by Western blotting. Meanwhile, cell apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** After SGC-0404 cells were treated with MPPa-PDT, nuclear condensation, fragmentation and other typical apoptotic morphological changes were observed, and the level of ROS in the MPPa-PDT group was 21.07 times, 18.68 times, and 19.66 times higher than that in the control group, the MPPa group, and the LED group, respectively ($P<0.05$). MDC staining and electron microscopy results showed that MPPa-PDT resulted in formation of typical autophagosome. Western blotting indicated that LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and Beclin-1 expression in the MPPa-PDT group was higher than those in the other 3 groups ($P<0.05$). After autography was inhibited with 3-methyladenine, the cell apoptosis rate was remarkably increased (27.69±2.23 *vs* 43.17±2.87, $P<0.05$). **Conclusion** MPPa-PDT can induce cell apoptosis and autophagy in SGC-0404 cells. And

[基金项目] 重庆市教育委员会研究生科研创新项目(CYS14122);重庆市科学技术委员会科技攻关项目(CSTC2012gg-yyjs10018)
[通信作者] 欧云生,E-mail:ouyunsheng2001@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1410.016.html(2015-03-27)

at the early stage of MPPa-PDT treatment, autophagy can delay apoptosis, thus exerting protective effect against apoptosis.

[**Key words**] pyropheophorbide-a methyl ester; photodynamic therapy; giant cell tumor of bone; autophagy

Supported by the Innovative Project of Science Research for Postgraduate of Chongqing Municipal Education Committee (CYS14122) and the Tackling Project of Science and Technology of Chongqing Science and Technology Committee (CSTC2012gg-yyjs10018). Corresponding author: Ou Yunsheng, E-mail: ouyunsheng2001@163.com

骨巨细胞瘤(giant cell tumor,GCT)是我国较常见的原发性骨肿瘤之一,其发病率约占原发骨肿瘤的20%[1]。目前GCT的治疗主要是手术刮除加植骨,但是病损内刮除的复发率高达25%[2]。广泛切除虽能降低复发率,但却带来骨缺损修复与功能重建的问题。理想的治疗方案是彻底清除肿瘤的同时又保存正常的骨结构和关节功能。光动力疗法(photodynamic therapy,PDT)具有选择性好、创伤小、毒副反应少、可重复治疗、可协同手术提高疗效等优点,目前已用于鼻咽癌、肺癌、脑胶质瘤、骨肉瘤等多种恶性疾病的临床治疗[3]。因此手术刮除联合PDT以消灭残存的瘤细胞便成为一种可能的治疗策略。自噬是细胞内双层膜性小泡吞噬胞内待降解的蛋白和细胞器等成分形成自噬体,自噬体再与溶酶体融合,进而由溶酶体内的水解酶将内吞物降解的代谢过程[4]。研究表明PDT能够诱导口腔鳞状细胞癌、黑色素瘤、乳腺癌等多种肿瘤细胞发生自噬,并且自噬在肿瘤的PDT治疗当中可以起到促存活和促死亡的双重作用[5]。本研究探讨MPPa-PDT诱导SGC-0404细胞发生的自噬现象,分析自噬在MPPa-PDT处理过程中对SGC-0404细胞是否具有抗凋亡的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

人骨巨细胞瘤细胞SGC-0404购于第四军医大学,焦脱镁叶绿酸-a甲酯(MPPa)、单丹磺酰戊二胺(MDC)、DCFH-DA、β-actin、Beclin-1和微管相关蛋白1的轻链3(LC3)抗体、Hochest33258购于美国Sigma公司,DMEM细胞培养基购于美国HyClone公司,胎牛血清购于美国Gibco公司,胰蛋白酶、羊抗兔辣根过氧化物酶IgG购于上海碧云天生物技术有限公司,光动力治疗仪购于重庆京渝激光生物研究所。

1.2 细胞培养

人骨巨细胞瘤SGC-0404细胞在含50 μg/mL青霉素、50 μg/mL链霉素及10%胎牛血清的DMEM培养基(完全培养基)中,37 ℃、5% CO_2常规细胞培养、传代。

1.3 实验分组及处理

将对数生长期的SGC-0404细胞分成对照组、MPPa药物组、LED光照组和MPPa-PDT组。换液后MPPa-PDT组及MPPa药物组在避光条件下中加入终浓度为2 μmol/L的MPPa[6],对照组和LED光照组则加入等量DMEM培养基和等浓度的DMSO。于37 ℃、5% CO_2条件下避光孵育20 h后,各组去掉含MPPa或DMSO的培养液,PBS缓冲液冲洗3遍,加新的完全培养基;LED光照组和MPPa-PDT组使用波长630 nm、连续输出方式、光功率密度为40 mW/cm^2的集成LED特种光源照射120 s,使细胞接受的光能量密度达到4.8 J/cm^2,后继续避光条件下培养至检测。

1.4 Hochest33258染色观察细胞凋亡

取对数生长期的SGC-0404细胞,按5×10^4个/孔接种于24孔培养板,培养24 h待细胞贴壁后进行分组并给予相应处理。处理后3、6、12 h弃培养基,PBS缓冲液冲洗2遍,加入浓度为10 μg/mL的Hochest33258染料200 μL,37 ℃避光孵育5 min,PBS缓冲液冲洗3遍后,荧光显微镜下观察细胞凋亡情况并拍照(激发波长350 nm、发射波长460 nm)。

1.5 DCFH-DA荧光探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平

取对数生长期的SGC-0404细胞,按5×10^4个/孔接种于24孔培养板,培养24 h待细胞贴壁后进行分组并给予相应处理,处理后2 h各组加入浓度为10 μmol/L的DCFH-DA荧光探针200 μL,37 ℃避光孵育15 min,PBS缓冲液冲洗3遍后,荧光显微镜下观察并拍照(激发波长488 nm、发射波长520 nm)。采用Image Pro Plus 6.0软件进行图像分析。

1.6 MDC染色观察细胞内自噬体

取对数生长期的SGC-0404细胞行细胞爬片,爬片成功后进行分组并给予相应处理。处理后6 h,弃培养基,PBS缓冲液冲洗3遍,加入浓度为0.05 mmol/L的MDC染料200 μL,37 ℃避光孵育45 min,PBS缓冲液冲洗3遍,4%多聚甲醛固定15 min,荧光显微镜下观察并拍照(激发波长425 nm、发射波长525 nm)。

1.7 透射电镜观察细胞超微结构

取对数生长期SGC-0404细胞分组后给予相应处理,处理后6 h,收集各组细胞并离心,2.5%戊二醛和1%锇酸固定液依次固定后,梯度乙醇及丙酮进行脱

水,然后行包埋、固化、超薄切片机切片,最后经3%醋酸铀-枸橼酸铅染色后,透射电镜观察并拍照。

1.8 Western blot检测自噬相关蛋白LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和Beclin-1表达

取对数生长期SGC-0404细胞分组后给予相应处理,分别于3、6、12 h后收集各组细胞,常规方法提取细胞总蛋白,BCA测定蛋白浓度,调整各组浓度为5 μg/μL,煮沸变性后取等量上述蛋白样品行SDS凝胶电泳,经转膜、室温封闭后加入相应一抗4 ℃孵育过夜,复温30 min后洗膜,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育1 h,经TBST洗膜后,采用ECL化学发光法显影。采用Quantity One 4.6.2软件进行图像分析。

1.9 细胞凋亡检测

取对数生长期SGC-0404细胞,按1×10^5/孔接种于6孔培养板中,在MPPa-PDT处理细胞前用5 mmol/L 3-MA预处理细胞1 h,各组细胞经实验处理后37 ℃、5% CO_2避光培养3 h,收集各组细胞,制成单细胞悬液,PBS液洗2次,经Annexin V-PI双染,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.10 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-q法。

2 结果

2.1 MPPa-PDT对人骨巨细胞瘤SGC-0404细胞凋亡的诱导作用

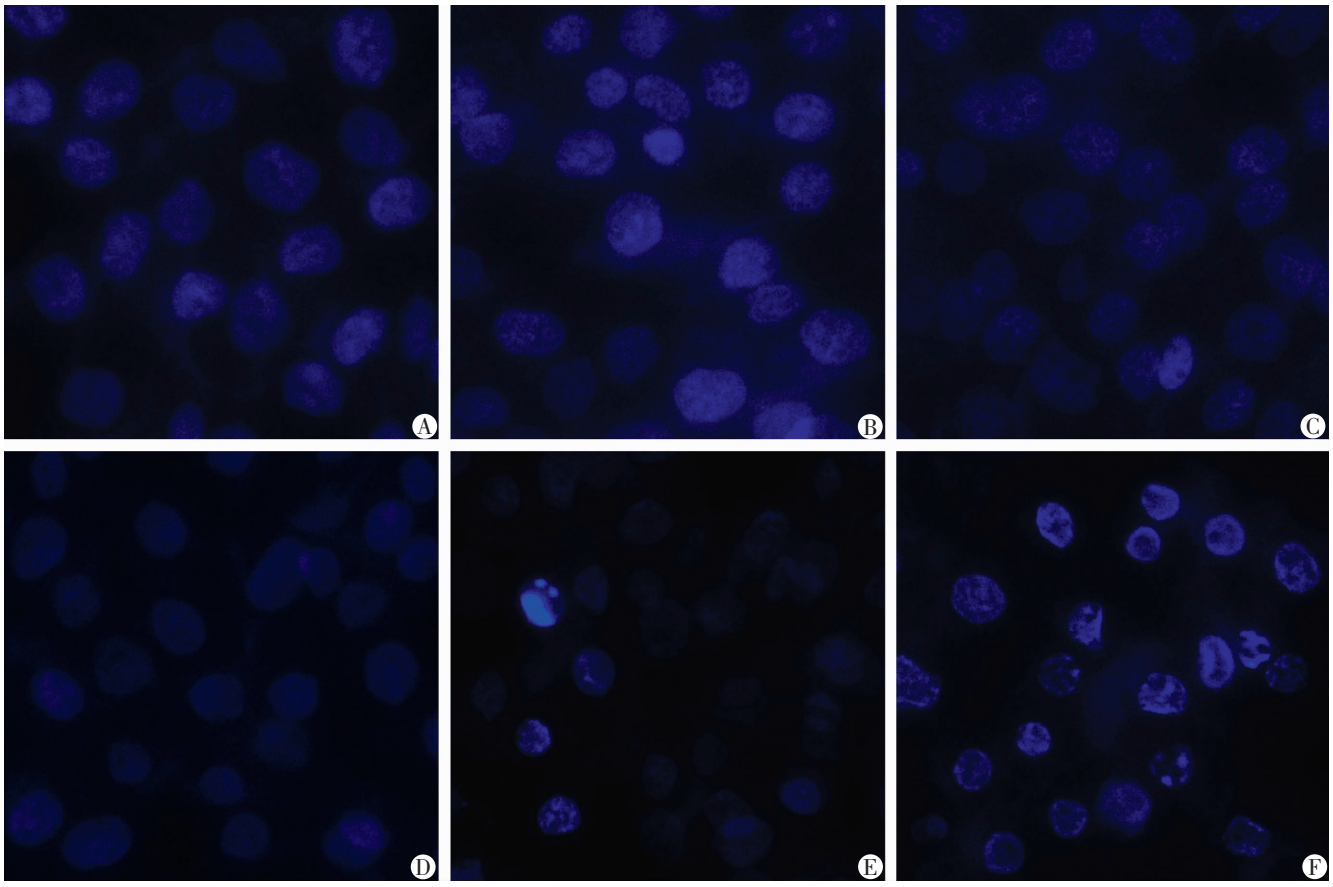
Hochest33258染色观察结果显示,MPPa-PDT作用后3、6、12 h SGC-0404细胞逐渐出现核染色质密度增高,呈高亮蓝色,以及核固缩、凝聚、碎裂等典型的细胞凋亡形态学改变,并且这类细胞的数量明显多于各对照组(图1)。

2.2 细胞内ROS水平变化

MPPa-PDT细胞平均荧光强度依次是对照组、MPPa药物组、LED光照组的21.07、18.68、19.66倍,差异有统计学意义($P<0.05$,图2)。

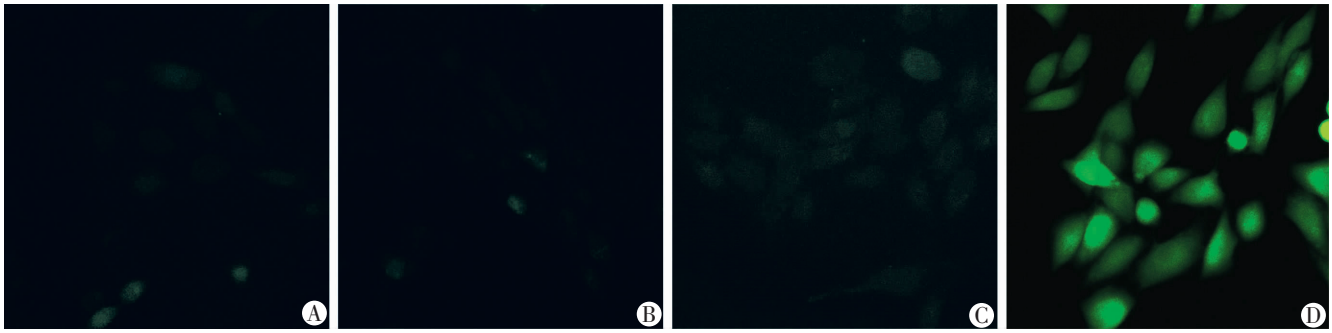
2.3 MDC染色观察自噬体

MPPa-PDT作用后,SGC-0404细胞胞质内的绿色荧光斑点数量明显高于对照组、MPPa药物组和LED光照组(图3)。



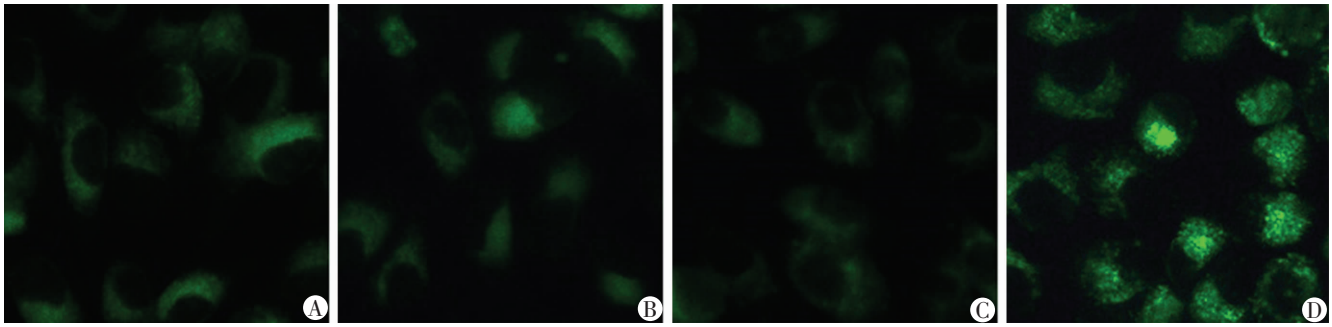
A:对照组;B:MPPa药物组;C:LED光照组;D:MPPa-PDT组3 h;E: MPPa-PDT组6 h;F:MPPa-PDT组12 h

图1 Hochest33258染色检测各组细胞凋亡 (荧光显微镜 ×200)



A:对照组;B:MPPa 药物组;C:LED 光照组;D:MPPa-PDT 组

图2 DCFH-DA 检测各组细胞 ROS 水平 （荧光显微镜 ×200）

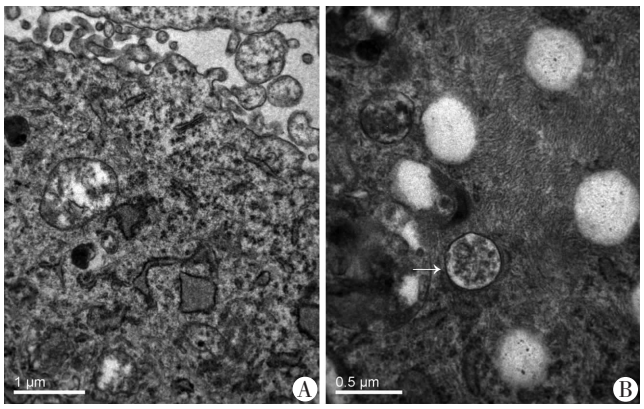


A:对照组;B:MPPa 药物组;C:LED 光照组;D:MPPa-PDT 组

图3 MDC 染色检测各组细胞自噬体 （荧光显微镜 ×200）

2.4 透射电镜下细胞的超微结构

MPPa-PDT 处理 SGC-0404 细胞后 6 h,透射电镜可见细胞胞质有大量包裹有胞质内成分的双层膜结构——自噬体(图4)。

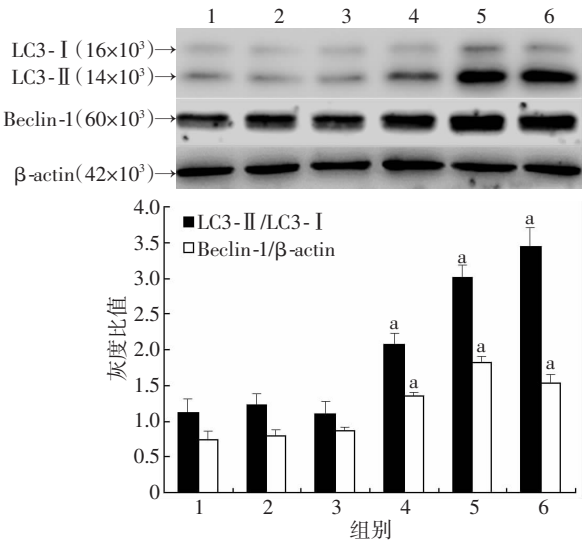


A:对照组;B:MPPa-PDT 组 ↑:示自噬体

图4 透射电镜下2组 SGC-0404 细胞超微结构

2.5 自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和 Beclin-1 的表达

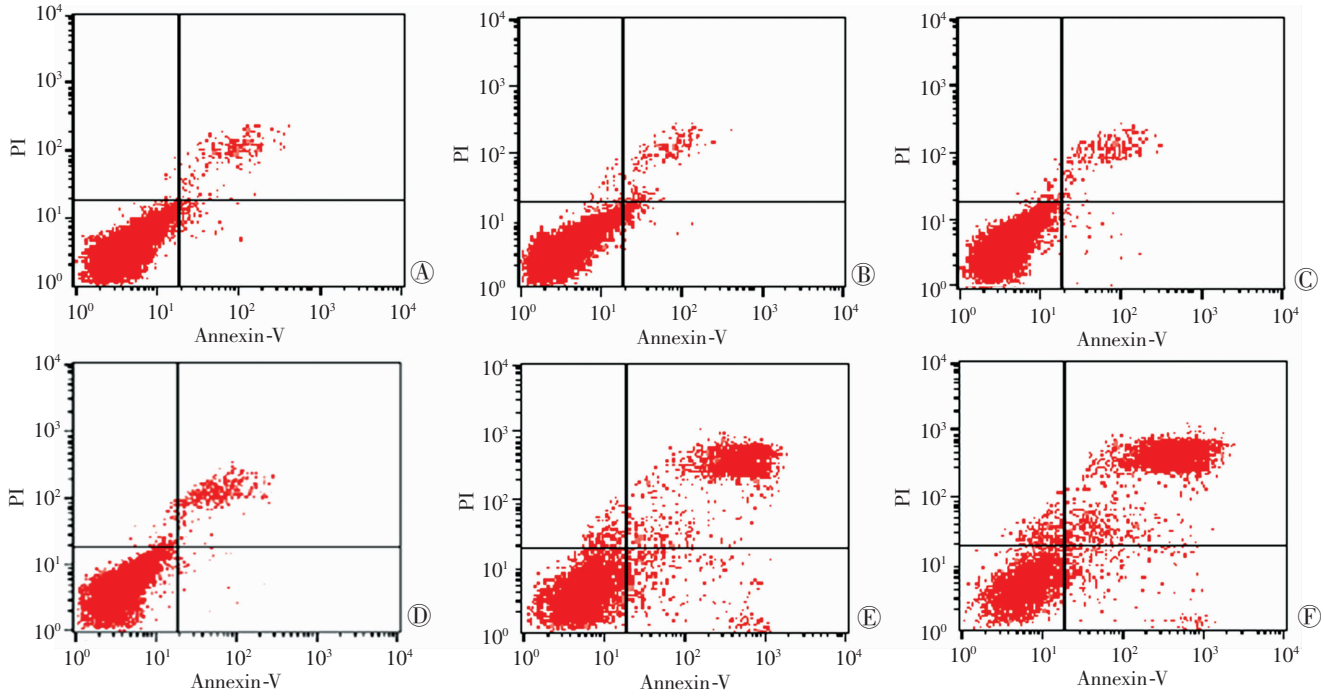
对照组、MPPa 药物组、LED 光照组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ的值差异无统计学意义($P>0.05$),而 MPPa-PDT 组在 PDT 处理后3、6、12 h,与各对照组比较,均有统计学差异($P<0.05$)。对照组、MPPa 药物组、LED 光照组 Beclin-1/β-actin 的值差异无统计学意义($P>0.05$),而 MPPa-PDT 组在 PDT 处理后3、6、12 h 与各对照组相比,均有统计学差异($P<0.05$,图5)。



1:对照组;2:MPPa 药物组;3:LED 光照组;4:MPPa-PDT 组3 h;5:MPPa-PDT 组6 h;6:MPPa-PDT 组12 h

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组、MPPa 药物组、LED 光照组比较

图5 Western blot 检测各组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ和 Beclin-1 蛋白的表达



A:对照组;B:MPPa 药物组;C:LED 光照组;D:3-MA 组;E:MPPa-PDT 组;F:3-MA + MPPa-PDT 组

图 6　流式细胞检测各组 SGC-0404 细胞的凋亡率

2.6　细胞凋亡的变化

对照组(3.64 ± 0.94)%、MPPa 药物组(4.28 ± 0.48)%、LED 光照组(3.08 ± 0.94)% 和 3-MA 组(4.49 ± 0.68)% 之间细胞凋亡率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),MPPa-PDT 组(27.69 ± 2.23)% 细胞凋亡率明显高于各对照组($P < 0.05$);采用 3-MA 抑制自噬水平后,细胞凋亡率(43.17 ± 2.87)% 较 MPPa-PDT 组显著上升($P < 0.05$,图 6)。

3　讨论

PDT 是采用特定波长的光激发富集在肿瘤细胞内的光敏剂,诱导其与周围环境中的氧发生光化学反应,生成大量的 ROS,并通过高水平的 ROS 造成细胞内脂质、蛋白、核酸等成分的氧化损伤,起到抗肿瘤的治疗目的[7-9]。MPPa 是一种叶绿素降解产物衍生物,其成分单一,性质稳定,光敏活性强,是一种有临床应用前景的新型光敏剂[10]。本研究主要探讨 MPPa-PDT 诱导 SGC-0404 细胞发生的自噬现象以及自噬在 MPPa-PDT 处理过程中对细胞是否具有抗凋亡的保护作用。

PDT 的细胞毒性作用有赖于高水平的 ROS 对细胞造成的氧化损伤[7-9]。本实验通过 DCFH-DA 染色的方法发现 MPPa-PDT 组细胞 ROS 水平明显升高,从而证实 MPPa-PDT 能有效产生 ROS。目前研究表明,诱导细胞凋亡是 PDT 发挥其抗肿瘤作用的主要机制[11]。我们采用 Hochest33258 细胞核荧光染色发现经 MPPa-PDT 处理后细胞逐渐出现典型的细胞凋亡形态学改变;同时流式细胞仪检测发现 MPPa-PDT 组细胞凋亡率明显高于各对照组。这些结果表明 MPPa-PDT 能诱导 SGC-0404 细胞凋亡。

近年研究发现,PDT 在诱导肿瘤细胞凋亡的同时也能诱导细胞自噬[12]。MDC 能够选择性地与自噬体结合,将其标记为 MDC 荧光阳性的点状结构[13]。本实验发现经 MPPa-PDT 处理后,细胞胞质内有大量 MDC 阳性的点状结构聚集,而各对照组则未见类似现象。电镜检测是目前研究自噬发生与否的金标准。我们通过电子显微镜发现 MPPa-PDT 组细胞胞质内存在大量包含胞质成分的自噬体。LC3 分为两型:LC3-Ⅰ和 LC3-Ⅱ,自噬发生时,LC3-Ⅰ向 LC3-Ⅱ转化,因此 LC3-Ⅱ被认为是自噬的标志性蛋白,LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ则反映细胞自噬活性高低[14]。本实验结果显示,SGC-0404 细胞经 MPPa-PDT 处理后 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ明显高于各对照组。以上结果表明,MPPa-PDT 在诱导 SGC-0404 细胞凋亡的同时也诱导细胞发生自噬。

目前自噬在肿瘤 PDT 治疗过程中的作用仍存争议:一方面,自噬可以通过清除受损的细胞器、促进营养成分再利用,而有利于细胞生存,具有抗凋亡的保护

性作用;另一方面,自噬是细胞死亡的机制之一,即自噬性细胞死亡(又称Ⅱ型程序性细胞死亡)[15]。本研究采用3-MA预处理细胞以抑制细胞自噬水平后再行MPPa-PDT处理,细胞凋亡率明显增加。以上结果表明在MPPa-PDT作用中,自噬可能通过清除部分ROS和受损的细胞器延缓凋亡的发生,从而对SGC-0404细胞起到抗凋亡的细胞保护作用。

自噬和凋亡调节通路的交汇点在Beclin-1与Bcl-2蛋白的相互作用:Bcl-2抑制Bax、Bak等促凋亡因子起到抗凋亡作用,同时也抑制自噬特异性因子Beclin-1,进而抑制Beclin-1介导的细胞自噬[16]。我们在前期的研究中已经发现MPPa-PDT处理后3、6、12 h SGC-0404细胞Bcl-2表达逐渐降低[6]。本研究结果显示MPPa-PDT处理后3、6、12 h细胞Beclin-1的表达均高于各对照组。这就提示在MPPa-PDT处理中,SGC-0404细胞可能通过Beclin-1和Bcl-2的相互作用调节凋亡与自噬水平来维持自身稳态。

综上所述,本实验证实凋亡与自噬共同参与了MPPa-PDT对SGC-0404细胞的抗肿瘤效应,并且自噬在MPPa-PDT作用的早期可以延缓凋亡的发生,具有抗凋亡的保护作用。但MPPa-PDT诱导SGC-0404细胞发生自噬的具体机制,以及如何调控自噬和凋亡来提高MPPa-PDT对骨巨细胞瘤的抗肿瘤效应,仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Chakarun C J, Forrester D M, Gottsegen C J, *et al*. Giant cell tumor of bone: review, mimics, andnew developments in treatment[J]. Radiographics, 2013, 33(1): 197-211.

[2] Klenke F M, Wenger D E, Inwards C Y, *et al*. Giant cell tumor of bone: risk factors for recurrence[J]. Clin Orthop Relat Res, 2011, 469(2): 591-599.

[3] 李黎波, 李文敏, 项蕾红, 等. 光动力疗法在中国的应用与临床研究[J]. 中国激光医学杂志, 2012, 21(5): 278-307.

[4] Rubinstein A D, Kimchi A. Life in the balance-a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 22): 5259-5268.

[5] 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.

[6] Li K T, Zhang J, Duan Q Q, *et al*. Apoptosis triggered by pyropheophorbide-α methyl ester-mediated photodynamic therapy in a giant cell tumor in bone[J]. Laser Physics, 2014, 24(6): 066002.

[7] Wang H, Liu Q, Zhang K, *et al*. Comparison between sonodynamic and photodynamic effect on MDA-MB-231 cells[J]. J Photochem Photobiol B, 2013, 127: 182-191.

[8] 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.

[9] Molina A, Bentez M, Berrios K, *et al*. Design of a Stimulus-responsive Human Serum Albumin-based Nanoparticle for Photodynamic Therapy (LB249)[J]. FASEB J, 2014, 28(1 Suppl): LB249.

[10] 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.

[11] Allison R R. Photodynamic therapy: oncologic horizons[J]. Future Oncol, 2014, 10(1): 123-124.

[12] Inguscio V, Panzarini E, Dini L. Autophagy contributes to the death/survival balance in cancer photodynamic therapy[J]. Cells, 2012, 1(3): 464-491.

[13] Lu J, Sun D, Gao S, *et al*. Cyclovirobuxine D induces autophagy-associated cell death *via* the Akt/mTOR pathway in MCF-7 human breast cancer cells[J]. J Pharmacol Sci, 2014, 125(1): 74-82.

[14] Karim M R, Kawanago H, Kadowaki M. A quick signal of starvation induced autophagy: transcription versus post-translational modification of LC3[J]. Anal Biochem, 2014, 465: 28-34.

[15] Kessel D. Subcellular targets for photodynamic therapy: implications for initiation of apoptosis and autophagy[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2012, 10(Suppl 2): S56-S59.

[16] Booth L A, Tavallai S, Hamed H A, *et al*. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. Cell Signal, 2014, 26(3): 549-555.

(**收稿**:2014-12-11;**修回**:2015-01-22)

(编辑 龙 亮)