doi:10.11659/jjssx.01E016075

低浓度氧化铈纳米材料对肝癌细胞增殖能力的影响

程 姮,廖忠莉,陈虹燕,王 涛,郭 红 (第三军医大学新桥医院消化内科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 研究不同低浓度氧化铈纳米材料(CNPs)对肝癌细胞增殖能力的影响。**方法** 体外培养3株不同种类的肝癌细胞(Huh7、HepG2、7721),分别加入不同浓度(0.005、0.01、0.05、0.1、1 μg/mL)的CNPs。采用CCK8检测CNPs对肝癌细胞增殖能力的影响;qRT-PCR检测CNPs对肝癌细胞凋亡相关基因的影响;流式细胞术分析CNPs对肝癌细胞周期的影响;裸鼠体内成瘤实验证实低浓度CNPs对肝癌细胞成瘤的影响。**结果** CCK8实验显示低浓度CNPs对肝癌细胞的增殖有不同程度的促进作用,其中0.01 μg/mL CNPs促增殖作用最明显;qRT-PCR结果显示低浓度CNPs可以抑制肝癌细胞的凋亡;流式细胞术分析却并未发现CNPs对细胞周期的影响;体内成瘤实验证实低浓度CNPs可以增强肝癌细胞的成瘤能力。**结论** 低浓度CNPs可以显著提高肝癌细胞的增殖能力。

[关键词] 氧化铈纳米材料;肝癌细胞;增殖能力;流式细胞术
[中图分类号] R361+.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-01-15

Effect of low concentration of cerium oxide nanomaterials on hepatocellular carcinoma cell proliferation

CHENG Heng, LIAO Zhong-li, CHEN Hong-yan, WANG Tao, GUO Hong (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the impact of different low concentrations of cerium oxide for hepatocellular carcinoma cell proliferation. **Methods** Three different types of hepatoma cells (Huh7, HepG2, 7721) were cultured, and added different concentrations of cerium oxide (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 1 μg/mL), of which the cell proliferation was detected by CCK8. The apoptosis-related genes was detected by qRT-PCR technology. The cell cycle was analyzed by flow cytometry. And the effect of low concentration cerium oxide on hepatocellular carcinoma cells tumorigenicity was confirmed by the nude mice experiments. **Results** CCK8 experiment showed that low concentrations of cerium oxide could promote proliferation of hepatocellular carcinoma cell, especially in concentration of 0.01 μg/mL. The qRT-PCR showed that low concentration of cerium oxide could inhibit the apoptosis of hepatocellular carcinoma cell. The flow cytometry analysis had not found any effect of cerium oxide on cell cycle. The tumorigenicity experiments confirmed that low concentrations of cerium oxide could enhance the tumorigenic ability of hepatocellular carcinoma cell. **Conclusion** Low concentration of cerium oxide can significantly improve the proliferation of liver cancer cells.

Keywords: cerium oxide; hepatocellular carcinoma cell; proliferation; flow cytometry analysis

肝癌是第5大常见的肿瘤,位于癌症死亡病因的第3位[1-3]。目前,肝癌为仅次于肺癌的最主要恶性肿瘤,每年发病和死亡人数都在不断增加[4]。外科手术肝切除及肝脏移植属于根治性治疗,是当前肝癌患者获得长期存活的主要手段,但有一半以上的肝癌患者在首诊时便已确诊为晚期,失去了外科手术的最佳时机,治疗效果及预后极差。针对肝癌的新型抗癌技术的探索成为近年来肿瘤研究的热点[5-6]。

氧化铈纳米材料(cerium oxide nanoparticles,CNPs)结构为CeO_2(Ce^{4+})/Ce_2O_3(Ce^{3+}),形状为立方体晶体,直径为3~5 nm,具有较强的抗氧化作用。目前氧化铈纳米材料(CNPs)已被广泛应用于生物医学研究领域,包括皮肤的创伤修复、血管的生成、氧化应激以及放射和炎症的防护等[7-8]。最近的研究表明CNPs可以通过提高氧自由基(ROS)的水平而抑制肿瘤增殖[9-10]。但是之前的研究都是建立在高浓度氧化铈纳米材料(CNPs)(≥10 μg/mL)的基础上,该浓度并不适合于人体。而国内外关于低浓度的CNPs(≤1 μg/mL)是否对肿瘤细胞的增殖有影响的研究极少。本实验通过CCK8、RT-PCR等技术检测低浓度(≤1 μg/mL)的CNPs对肝癌细胞系增殖的影响,为进一步研究纳米材料(CNPs)作为肝癌治疗的重要手段提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞株Huh7、HepG2、7721购自美国ATCC细胞中心,冻存于本实验室。DMEN高糖培养基、胎牛血清、0.25%胰酶购自Hyclone公司。CCK8试剂盒

[基金项目] 国家自然科学基金(81301968)
[通信作者] 郭 红,E-mail:hguoxqyy@163.com

(cell counting kit-8)购自碧云天公司。Trizol、逆转录试剂盒、qRT-RNA 试剂盒购自 TakaRa 公司,总 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司。氧化铈纳米材料由第三军医大学生物工程系生物材料实验室提供。Bax、Bcl-2、GAPDH 引物由生工公司合成。6 ~ 7 周龄的 BALB/c 裸鼠购自新桥医院动物中心。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和 CNPs 浓度的配制 复苏保存于本实验室液氮罐的 Huh7、HepG2、7721 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 在 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱培养。取出质量浓度为 1 μg/μl 的 CNPs,用无血清 DMEM 配制为 0.005 μg/μl 的 CNPs,4 ℃冰箱保存。

1.2.2 CCK8 法检测细胞增殖 取对数生长期的 Huh7、HepG2、7721 细胞配制成 1×10^4/mL 单细胞悬浊液,每种细胞分成 6 组,加入配制好的 CNPs,使每种细胞的 CNPs 浓度分别为 0、0.005、0.01、0.05、0.1、1 μg/mL。将细胞重悬后接种于 96 孔板中,每组细胞设定 6 个复孔,每孔 100 μl 细胞悬浊液,用培养液作为空白对照,37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱培养。24 h 后取出 96 孔板,加入 CCK8 试剂 10 μl,继续孵育 2 h 后,用酶标仪检测 450 nm 处各孔的吸收度(OD 值),测 3 次,取平均值。

1.2.3 qRT-PCR 检测凋亡相关基因 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达 3 种细胞株经低浓度 CNPs 处理 24 h 后,Trizol 法提取细胞总 RNA,并用核酸浓度测量仪测浓度,按照说明书逆转录合成 cDNA,逆转录产物稀释 10 倍后,以 GAPDH 为内参进行荧光定量 PCR,Bax 上游引物:TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG,下游引物:TGTGTCCACGGCGGCAATCATC;Bcl-2 上游引物:ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT,下游引物:GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC。反应条件为:95 ℃,1 min;95 ℃,10 s;60 ℃,15 s;72 ℃,30 s,共扩增 40 个循环。最后结果用 $^{\Delta\Delta}$CT 法对结果进行分析。

1.2.4 流式细胞术检测 CNPs 对细胞周期的影响 将处于对数增长期的 Huh7、HepG2、7721 细胞接种于 6 孔板,加入配制好的 CNPs,24 h 后收集细胞,PBS 洗涤 3 遍,75% 乙醇 4 ℃冰箱保存,上机检测。

1.2.5 裸鼠皮下种植实验检测 CNPs 对肝癌细胞成瘤能力的影响 购买 12 只4 ~6周龄裸鼠,随机分为对照组和实验组并称体质量,每组 6 只裸鼠。将 1×10^6 HepG2 细胞重悬于 100 μl PBS 中,将细胞悬液皮下注射于 2 组裸鼠的右侧腹股沟。第 2 天开始隔日在实验组裸鼠腹腔注射剂量为0.01 mg/kg的 CNPs 悬浊液,对照组注射同样剂量的 PBS。30 d 后处死裸鼠,取下瘤体并称重。

1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 5 软件进行统计学分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本配对或非配对 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义,$P < 0.01$ 表示差异具有极显著性统计学意义。

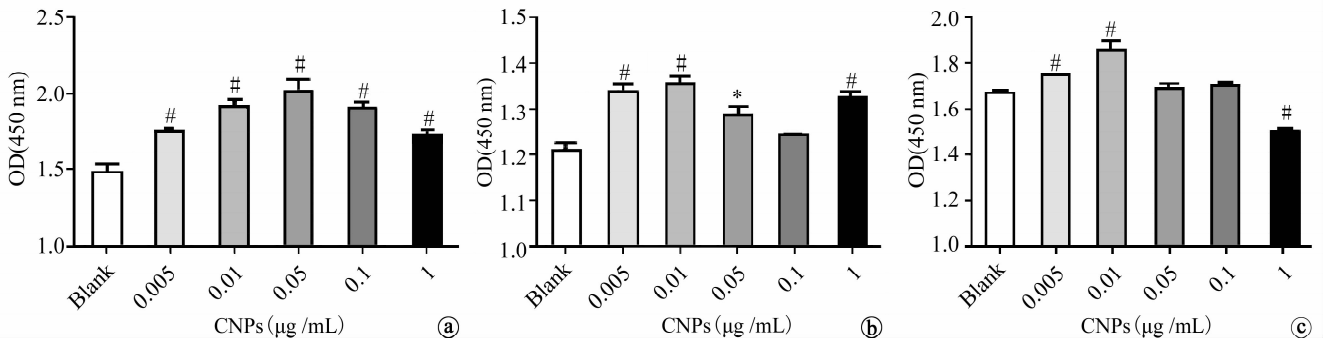
2 结果

2.1 低浓度 CNPs 对肝癌细胞增殖能力的影响

CCK8 检测不同浓度 CNPs 对 Huh7、HepG2、7721 肝癌细胞系增殖能力的影响,见图 1。可见,在肝癌细胞中低浓度的 CNPs 可以不同程度地促进细胞的增殖,其中0.01 μg/mL的浓度最明显($P < 0.01$),后续实验浓度将使用0.01 μg/mL。说明低浓度 CNPs 可以促进肝癌细胞的增殖,而且有浓度依赖性。

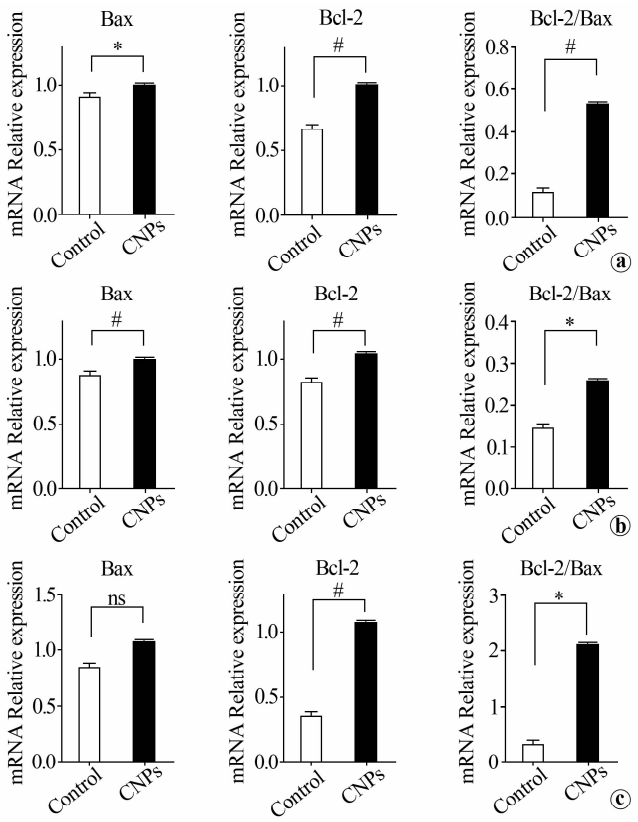
2.2 低浓度 CNPs 对肝癌细胞凋亡相关基因的影响

qRT-PCR 定量分析低浓度(0.01 μg/mL)CNPs 对肝癌细胞凋亡相关基因的影响。由图 2 可见在 HepG2 和 Huh7 细胞中凋亡基因 Bax 以及抗凋亡基因 Bcl-2 均有升高,但是 Bcl-2 升高更明显,7721 细胞只有 Bcl-2 显著升高。说明低浓度 CNPs 可以通过增强肝癌细胞的抗凋亡能力促进细胞的增殖。



a:HepG2 细胞;b:7721 细胞;c:Huh7 细胞;*:与空白对照组比较,$P < 0.05$;#:与空白对照组比较,$P < 0.01$

图 1 CCK8 检测 CNPs 对肝癌细胞系的增殖



a:HepG2 细胞;b:Huh7 细胞;c:7721 细胞;ns:差异无统计学意义;*:$P<0.05$;#:$P<0.01$

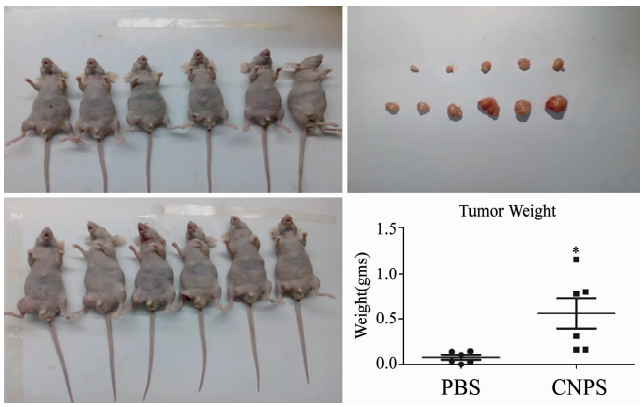
图 2 qRT-PCR 定量分析低浓度 CNPs 对肝癌细胞凋亡相关基因的影响

2.3 低浓度 CNPs 对肝癌细胞成瘤能力的影响

裸鼠皮下成瘤实验检测低浓度(0.01 mg/kg) CNPs 对肝癌细胞的成瘤能力的影响。由图 3 可见不管肿瘤的大小还是肿瘤的重量,实验组均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),说明低浓度的 CNPs 可以显著提高肝癌细胞的成瘤能力。

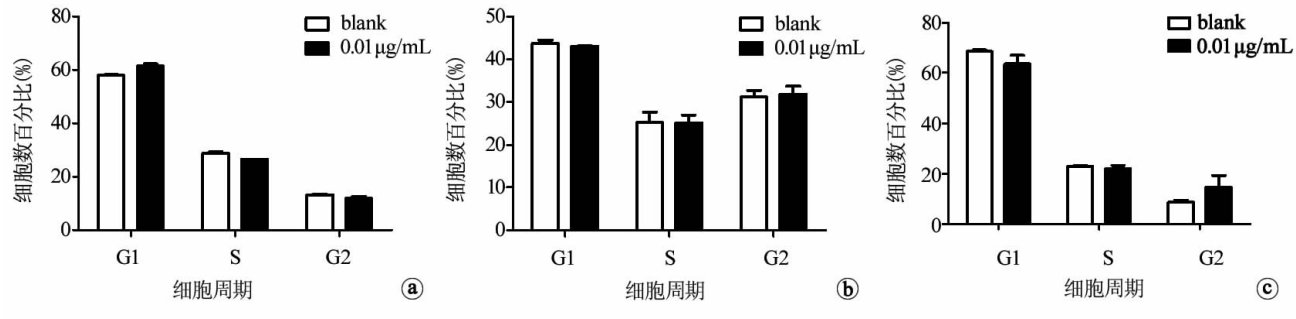
2.4 低浓度 CNPs 对肝癌细胞周期的影响

流式细胞术检测低浓度 CNPs 对肝癌细胞周期的影响。由图 4 可见低浓度的 CNPs 对 3 种肝癌细胞系的细胞周期并无影响。



*:与 PBS 比较,$P<0.05$

图 3 裸鼠皮下成瘤实验低浓度的 CNPs 对肝癌细胞成瘤的影响



a:HepG2 细胞;b:7721 细胞;c:Huh7 细胞

图 4 流式细胞术检测低浓度 CNPs 对肝癌细胞周期的影响

3 讨论

肿瘤作为一个全球性的问题,对人类的健康有着极大的威胁,传统放疗、化疗对患者又有着不可避免的副作用。而纳米医学的出现让肿瘤的治疗有了新的选择,特别是 CNPs 由于其特殊的氧化铈结构,已被广泛用于很多疾病包括肿瘤的治疗研究[11-12]。有研究显示,CNPs 不仅对肿瘤细胞有直接杀伤作用,而且可以抑制肿瘤细胞的侵袭以及增强肿瘤细胞对放疗、化疗的敏感性[13-14]。研究发现当质量浓度大于等于 10 μg/mL 时,CNPs 可以显著抑制肝癌细胞的增殖[15-16]。但是低于 10 μg/mL 的低浓度 CNPs 是否也会抑制肝癌细胞的增殖,并没有进一步研究。因此,本研究探讨低浓度 CNPs 对肝癌细胞增殖能力的影响,以完善 CNPs 对肝癌细胞杀伤作用的理论基础。

本研究采用 CCK8 检测了质量浓度分别为 0.005、0.01、0.05、0.1、1 μg/mL 的 CNPs 对肝癌细胞增殖的影响,发现低浓度的 CNPs 并未对肝细胞的增殖起到抑制作用,反而可以促进肿瘤细胞的

增殖,而且具有浓度依赖性,以0.01 μg/mL 促增殖能力为最强。进一步研究发现,低浓度的 CNPs 可以显著提高抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,从而抑制肝癌细胞的凋亡。本研究采用流式细胞术检测了低浓度的 CNPs 对肝癌细胞周期的影响,但是其细胞周期并没有发生明显变化。

为进一步证实我们的结果,我们用 HepG2 细胞对裸鼠进行了皮下成瘤实验。之前的研究者对裸鼠的处理浓度均大于等于 0.1 mg/kg,结果均显示其对肿瘤细胞的成瘤能力也有抑制作用[17-18]。本次实验我们将处理浓度降到 0.01 mg/kg,结果显示,低浓度的 CNPs 确实可以促进肝癌细胞的成瘤能力。

本研究第一次证实了 CNPs 对肝癌细胞具有促增殖的能力,为纳米材料在肝癌临床治疗的应用提供重要的理论依据。但是低浓度的 CNPs 是通过何种途径促进肝癌细胞增殖,其具体作用机制尚需要进一步研究。

[参考文献]

[1] He G,Dhar D,Nakagawa H,et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling[J]. Cell,2013,155(2):384 - 396. doi:10.1016/j. cell. 2013.09.031.

[2] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med,2011,365(12):1118 - 1127. doi:10.1056/NEJMra1001683.

[3] Liu J,Fan D. Hepatitis B in China[J]. Lancet,2007,369(9573):1582 - 1583.

[4] 陈建国,陈万青,张思维. 中国 2003-2007 年肝癌发病率与死亡率分析[J]. 中华流行病学杂志,2012,33(6):547 - 553. doi:10.3760/cma. j. issn. 0254 - 6450. 2012.06.001.

[5] 刘允怡,赖俊雄,刘晓欣. 手术切除在肝癌多学科综合治疗中的地位[J]. 中国实用外科杂志,2014,34(8):677 - 680. doi:10.7504/CJPS. ISSN1005 - 2208. 2014.08.01.

[6] 褚志强,吴向未,杨宏强,等. 原发性肝癌手术治疗的生存率分析及影响因素研究[J]. 实用医学杂志,2013,29(5):787 - 789. doi:10.3969/j. issn. 1006 - 5725. 2013.05.040.

[7] Hirst SM,Karakoti A,Singh S,et al. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice[J]. Environ Toxicol,2013,28(2):107 - 118. doi:10.1002/tox. 20704.

[8] Gao Y,Chen K,Ma J,et al. Cerium oxide nanoparticles in cancer[J]. Onco Targets Ther,2014,7(2):835 - 840. doi:10.2147/OTT. S62057.

[9] Xu X,Ho W,Zhang X,et al. Cancer nanomedicine:from targeted delivery to combination therapy[J]. Trends Mol Med,2015,21(4):223 - 232. doi:10.1016/j. molmed. 2015.01.001.

[10] Chauhan VP,Jain RK. Strategies for advancing cancer nanomedicine[J]. Nat Mater,2013,12(11):958 - 962. doi:10.1038/nmat3792.

[11] Wason MS,Zhao J. Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases[J]. Am J Transl Res,2013,5(2):126 - 131.

[12] Das S,Dowding JM,Klump KE,et al. Cerium oxide nanoparticles:applications and prospects in nanomedicine[J]. Nanomedicine,2013,8(9):1483 - 1508. doi:10.2217/nnm. 13.133.

[13] Eom HJ,Choi J. Oxidative stress of CeO_2 nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell,Beas-2B[J]. Toxicol Lett,2009,187(2):77 - 83. doi:10.1016/j. toxlet. 2009.01.028.

[14] Sack M,Alili L,Karaman E,et al. Combination of conventional chemotherapeutics with redox-active cerium oxide nanoparticles--a novel aspect in cancer therapy[J]. Mol Cancer Ther,2014,13(7):1740 - 1749. doi:10.1158/1535 - 7163. MCT - 13 - 0950.

[15] Cheng G,Guo W,Han L,et al. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways[J]. Toxicol In Vitro,2013,27(3):1082 - 1088. doi:10.1016/j. tiv. 2013.02.005.

[16] Liu Y,Jiao F,Qiu Y,et al. Immunostimulatory properties and enhanced TNF-α mediated cellular immunity for tumor therapy by C60(OH)20 nanoparticles[J]. Nanotechnology,2009,20(41):415102. doi:10.1088/0957 - 4484/20/41/415102.

[17] Giri S,Karakoti A,Graham RP,et al. Nanoceria:a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer[J]. PloS One,2013,8(1):e54578. doi:10.1371/journal. pone. 0054578.

[18] Hirst SM,Karakoti A,Singh S,et al. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice[J]. Environ Toxicol,2013,28(2):107 - 118. doi:10.1002/tox. 20704.

(编辑:杨 颖)