

新城疫病毒 D90 株对乳腺癌 MCF-7 细胞作用的实验研究

张增岭¹, 蔡永东², 宋纯³, 胡昇序¹

(¹南京医科大学附属南京医院浦口分院, 南京市浦口区中心医院普外科, 江苏 南京 211800; ²南京医科大学附属南京医院普外科, 江苏 南京 210006; ³哈尔滨医科大学附属第一临床医学院乳甲外科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 国内外研究表明, 新城疫病毒在体内外对多种肿瘤具有明显抑制作用。本研究旨在探讨新城疫病毒 D90 株体外对乳腺癌 MCF-7 细胞的作用及可能机制。方法: CCK-8 法检测 MCF-7 细胞增殖抑制; 光学显微镜及 DAPI 染色观察 D90 株对 MCF-7 细胞形态学影响; 流式细胞术检测 MCF-7 细胞凋亡率; Western blot 检测 MCF-7 细胞凋亡相关蛋白的表达情况。结果: D90 株对 MCF-7 细胞具有显著抑制作用并呈浓度和时间依赖性; D90 株能够诱导 MCF-7 细胞凋亡并调节凋亡相关蛋白的表达, 包括上调 Bax 蛋白、下调 Bcl-2 蛋白, 并促进 Caspase-3 和 Caspase-9 的裂解活化。结论: D90 株能够调节凋亡相关蛋白的表达, 并促进 Caspase-3 和 Caspase-9 的裂解活化, 通过线粒体途径诱导 MCF-7 细胞凋亡并呈浓度和时间依赖性。

[关键词] 新城疫病毒; 乳腺癌; MCF-7 细胞; 凋亡; 凋亡蛋白

[中图分类号] Q255

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1066-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20140813

Anticancer effects of NDV-D90 on breast cancer cells MCF-7

Zhang Zengling¹, Cai Yongdong², Song Chun³, Hu Shengxiang¹

(¹Department of General Surgery, Nanjing PuKou Central Hospital, Branch Institute of Nanjing Hospital of NJMU, Nanjing 211800; ²Department of General Surgery, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006; ³Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

[Abstract] **Objective:** Studies showed that Newcastle disease virus (NDV) had significant inhibitory action on many tumors *in vitro* and *in vivo*. This experiment was designed to investigate the effects and possible mechanism of NDV-D90 strain on breast cancer MCF-7 cells *in vitro*. **Methods:** Growth inhibition of MCF-7 cells was detected by CCK-8 method. The morphological changes of MCF-7 cells caused by D90 strain were observed by optical microscope and DAPI staining. MCF-7 cell apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expression of apoptosis related proteins of MCF-7 cells was detected by Western blot. **Results:** NDV-D90 strains had inhibitory effect on MCF-7 cells in a concentration and time dependent manner; D90 strain induced apoptosis of MCF-7 cells and regulated the expression of apoptosis related proteins, including up-regulating Bax expression, down-regulating Bcl-2 protein, and promote the cleavage and activation of Caspase-3 and Caspase-9. **Conclusion:** D90 strain could regulate the expression of apoptosis related protein, promote the cleavage and activation of Caspase-3 and Caspase-9. It could induce apoptosis of MCF-7 cells through the mitochondrial pathway in a concentration and time dependent manner.

[Key words] Newcastle disease virus; breast cancer; MCF-7 cell; apoptosis; apoptosis proteins

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1066-1071]

20 世纪 50 年代, 新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)使晚期胃癌的转移受到抑制, 从而引起关注。研究发现, NDV 在肿瘤细胞中的复制效率是在正常细胞中的 10 000 倍, 并且仅特异性杀伤肿瘤细胞, 对正常细胞无毒副作用, 这使得它成为潜在的抗癌生物制剂^[1]。到目前为止国外学者通过试验已经筛选出或修饰了多株可以杀伤肿瘤细胞的 NDV

毒株, 其中最为广泛应用的 NDV 毒株有 73-T 毒株、MTH-68 溶癌毒株和 Mlster 非溶癌毒株, 并且随着人们对 NDV 的研究不断加深, 现已证明 NDV 在体内外对多种癌症均具有显著疗效^[2-5]。

然而, 目前国内用于研究的 NDV 需要从国外引进或其变种, 本实验所采用的 NDV-D90 株是由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所李曦老师新近分离培

育的,具有我国自主知识产权。本研究通过光学显微镜、免疫荧光染色、CCK-8 法、流式细胞仪及 Western blot 法,对 NDV-D90 作用于乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制及可能的作用机制进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

NDV-D90 株由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所保存;MCF-7 细胞由哈尔滨医科大学附属肿瘤医院提供;胎牛血清、双抗(上海赛默飞世尔科技有限公司);RPMI1640 培养液、胰酶(美国 Sigma 公司);CCK-8 细胞计数试剂盒(日本株式会社同仁化学研究所);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司);DAPI 染色液、Western 及 IP 细胞裂解液、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白分子量标准品、显影定影试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、SDS-PAGE 上样缓冲液(上海碧云天生物技术研究所);Caspase-3 抗体、Caspase-9 抗体、 β -actin 抗体、bcl-2 抗体、bax 抗体(美国 Santa Cruz 公司);山羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MCF-7 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养;以 0.25% 胰酶和 0.02% 的 EDTA 混合液消化传代。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 CCK-8 检测

取对数生长期 MCF-7 细胞系,加入 96 孔板中,每孔 5×10^3 个。待细胞贴壁呈单层后,弃去培养液,以含有不同浓度的 D90 株(原液、10 倍稀释、100 倍稀释、1 000 倍稀释)接种 MCF-7 细胞作为实验组,混合培养液(PBS:培养基=1:9)作为阴性对照组,每组接种 5 孔,分别于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中孵育 12、24、36、48 h。弃上清液,加入 CCK-8 溶液,置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱孵育 2 h。以空白对照作为调零孔,选择 450 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值。按照公式细胞抑制率(%)=(1-实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值)×100%,计算细胞抑制率。

1.2.3 细胞形态学观察

取对数生长期 MCF-7 细胞系,培养于 25 cm² 培养瓶中,待其贴壁生长至 90%左右时倒置显微镜下观察 MCF-7 细胞形态,拍照记录;10 倍稀释的

D90 株感染 MCF-7 细胞后,37℃ 5%CO₂ 培养箱中孵育,分别于 12、24、36、48 h 倒置显微镜下观察 MCF-7 细胞形态,拍照记录。

1.2.4 DAPI 荧光染色

取对数生长期 MCF-7 细胞系,接种于 24 孔培养板。待细胞贴壁后,弃上清液,PBS 冲洗 2 次,实验组加 10 倍稀释的 D90 株,混合培养液作为阴性对照组,分别于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中孵育 12、24、36、48 h 进行 DAPI 染色。

1.2.5 流式细胞仪

取对数生长期 MCF-7 细胞系,加入 6 孔培养板中,每孔 2×10^5 个。待细胞贴壁后,实验组加入 10 倍稀释 D90 株,对照组加入混合培养液,每组接种 3 孔,分别于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中孵育 12、24、36、48 h。消化、收集细胞。以 PBS 制成 1.0×10^6 个/ml 细胞悬液。取 100 μ l 上述单细胞悬液,加入 5 μ l Annexin V-FITC 染液和 5 μ l PI 染液,轻轻摇匀,室温避光孵育 15 min。FACS 检测:样品上机检测,收集至少 10 000 个细胞,以 CELL Quest 软件对结果进行计算分析。凋亡率=早期凋亡率(Annexin V-FITC 阳性、PI 阴性)+晚期凋亡率(Annexin V-FITC 阳性、PI 阳性)。

1.2.6 Western blot

取对数生长期 MCF-7 细胞系,加入 6 孔培养板中,每孔 2×10^5 个。待细胞贴壁后,实验组加入 10 倍稀释的 D90 株,对照组加入混合培养液,每组接种 3 孔,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 36 h。消化、收集细胞,提取总蛋白,用超微量紫外分光光度仪定量蛋白。取 60 μ g 总蛋白进行电泳后,蛋白转移至 0.22 μ m PVDF 膜。然后一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1.5 h。ECL 化学发光试剂发光,X 线片进行显影、定影、图像分析。以目的蛋白条带灰度值与 β -actin 蛋白条带灰度值的比值表示相对蛋白含量。

1.3 统计学方法

所有实验结果数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS13.0 统计软件对数据进行处理,两组均数比较采用 *t* 检验,多组比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD 法, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

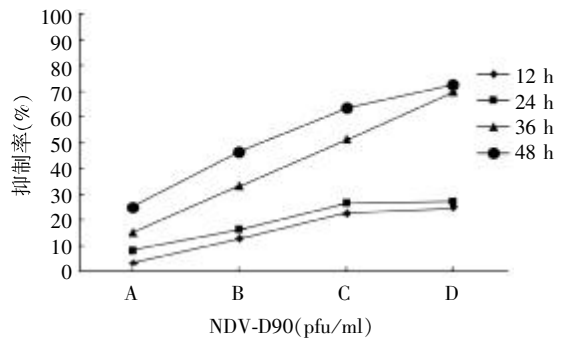
2.1 CCK-8 检测 MCF-7 生长抑制

NDV-D90 株原液、10 倍稀释、100 倍稀释、1 000 倍稀释组作用于 MCF-7 细胞后 12~48 h 吸光度值

见图1。分析提示:随着D90株浓度的增加,MCF-7细胞的增殖抑制率逐渐升高;随着D90株作用时间延长,MCF-7细胞的增殖抑制率逐渐上升。各实验组同其对照组相比, $P < 0.01$,具有统计学意义;不同时间段之间:12 h vs 24 h, $P > 0.05$;36 h vs 48 h, $P > 0.05$;其余时间段之间 $P < 0.01$,具有统计学意义。

2.2 倒置显微镜观察 MCF-7 细胞学形态

正常的 MCF-7 细胞,单层贴壁生长,扁平延展,呈不规则梭形,核膜、核仁轮廓明显,细胞间结构紧密、边界清晰,生长旺盛,折光性强(图 2A)。D90 株作用于 MCF-7 细胞 12 h 后,细胞开始变形、皱缩、贴壁不佳、细胞排列疏松,继而出现核固缩、染色质边集,培养基中可见较多细胞碎片;随着 D90 株作用时间延长,体积缩小、悬浮的 MCF-7 细胞逐渐增

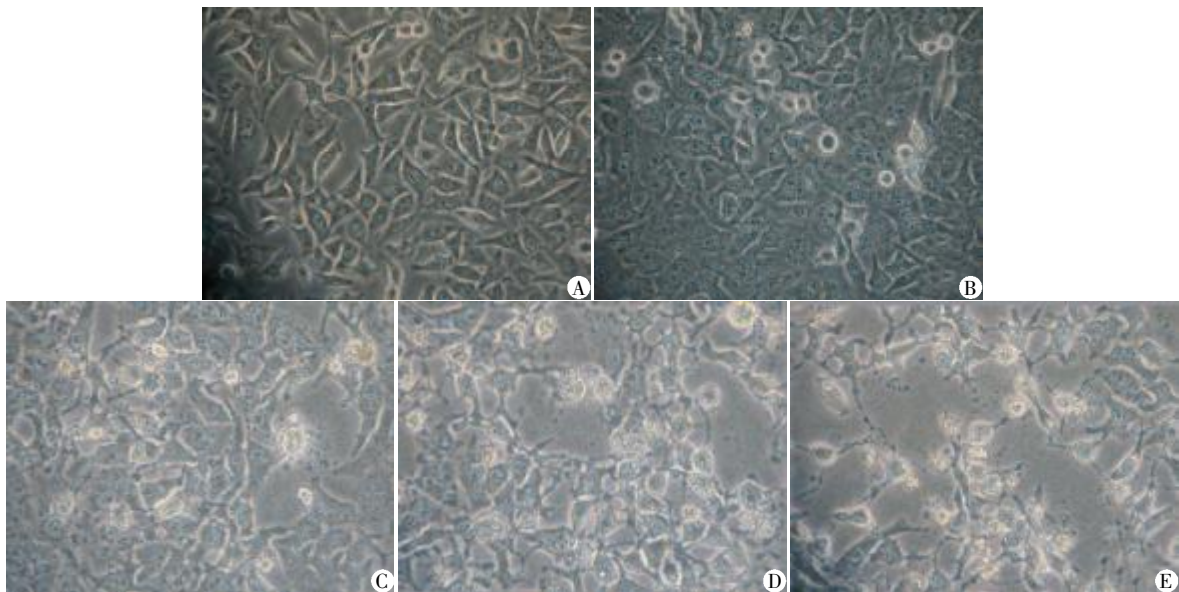


A:1 000 倍稀释;B:100 倍稀释;C:10 倍稀释;D:原液。

图1 NDV-D90 株对体外培养的人乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制曲线

Figure 1 NDV-D90 strains inhibit the growth of MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*

多,细胞体消失增多,残留不规则的细胞碎片也在增多(图 2B~E)。



A:对照组(未加 NDV-D90);B:NDV-D90 作用 12 h;C:NDV-D90 作用 24 h;D:NDV-D90 作用 36 h;E:NDV-D90 作用 48 h。

图2 NDV-D90 株作用于 MCF-7 细胞不同时间段的倒置显微镜下观察结果($\times 200$)

Figure 2 NDV-D90 strains act on the MCF-7 cells under inverted microscope in different time period($\times 200$)

2.3 DAPI 荧光染色

正常 MCF-7 细胞发出淡蓝色荧光,细胞核完整,呈椭圆形,核仁清晰可见,胞核内染色均匀一致(图 3A)。D90 株作用于 MCF-7 细胞 12 h 后出现典型的凋亡形态学改变,表现为细胞核染色质高度浓缩、边集,并可见明显的核碎裂和凋亡小体,随病毒作用时间的延长凋亡细胞增加(图 3B~E)。

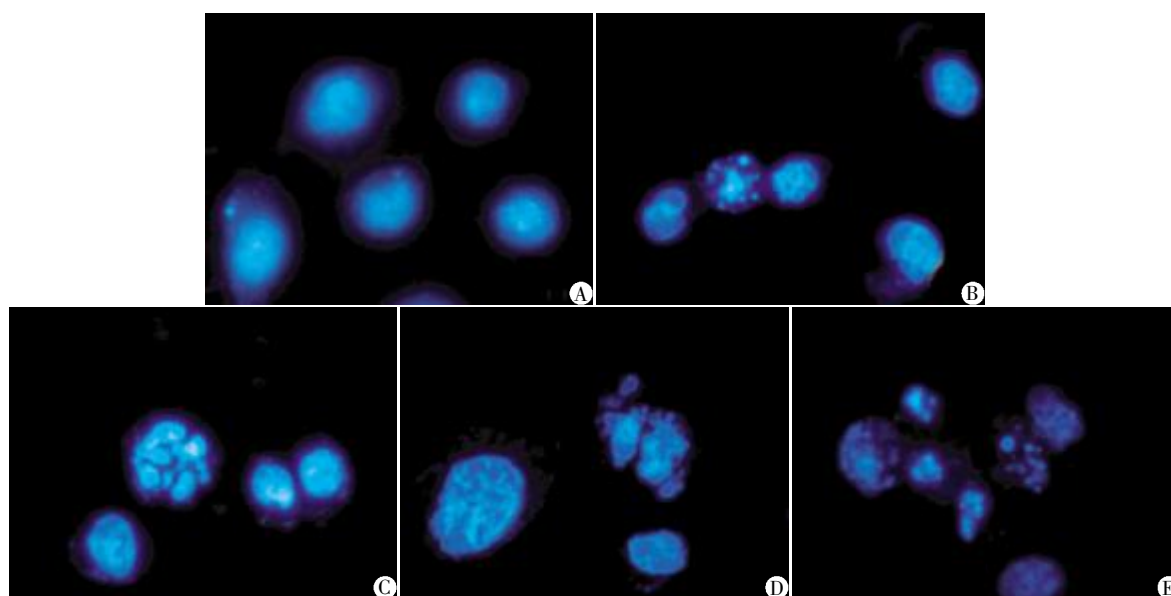
2.4 流式细胞仪检测 MCF-7 细胞凋亡

NDV-D90 株感染 MCF-7 细胞后,细胞凋亡情况见图 4。实验组 MCF-7 细胞的凋亡率分别是:12 h

(23.4 ± 2.0)%,24 h (67.5 ± 1.2)%,36 h (73.6 ± 2.6)%,48 h(81.8 ± 7.4)%;对照组 MCF-7 细胞的凋亡率分别是:12 h(7.8 ± 0.7)%,24 h(9.0 ± 1.2)%,36 h (10.2 ± 1.5)%,48 h(12.4 ± 1.4)%。随着作用时间的延长而增加,开始增加较快,然后逐渐变慢,拟合指数曲线 ($R^2 = 0.971, P < 0.05$),实验组与对照组相比,具有明显差异,说明 NDV-D90 株对 MCF-7 细胞具有明显的杀伤作用。

2.5 Western blot 检测凋亡蛋白表达

实验组抑凋亡基因 Bcl-2 蛋白和促凋亡基因



A:对照组(未加 NDV-D90);B:NDV-D90 作用 12 h;C:NDV-D90 作用 24 h;D:NDV-D90 作用 36 h;E:NDV-D90 作用 48 h。

图 3 NDV-D90 株作用于 MCF-7 细胞不同时间段的 DAPI 荧光显微镜下观察情况($\times 400$)

Figure 3 NDV-D90 strains act on the MCF-7 cells under DAPI fluorescence microscope in different time period($\times 400$)

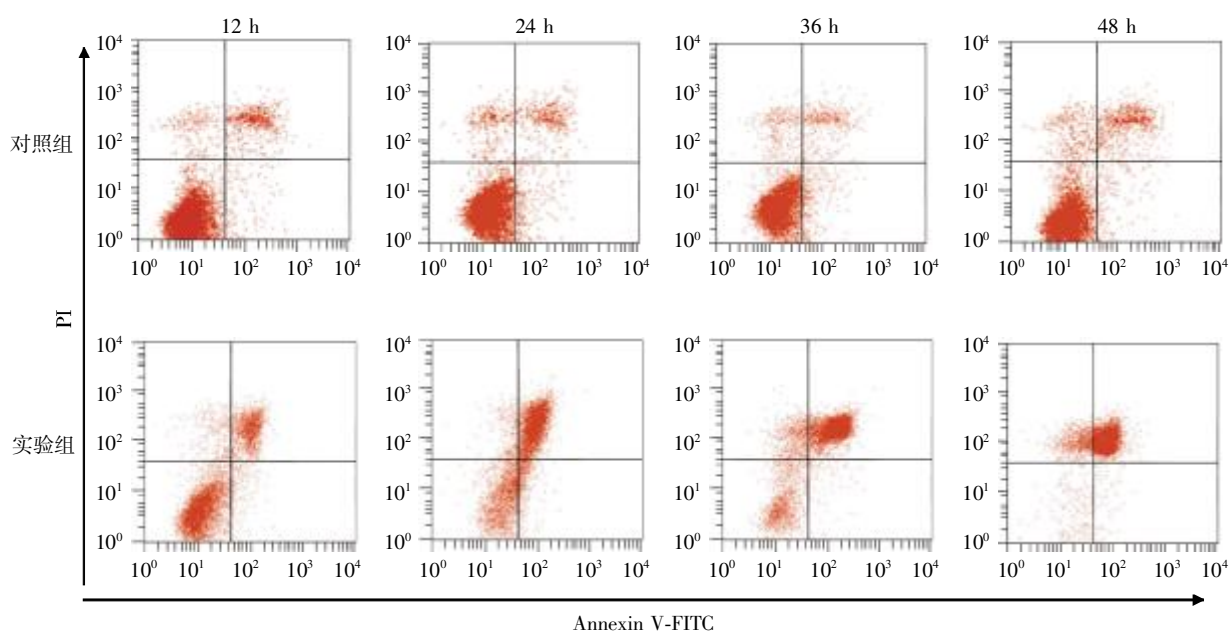


图 4 流式细胞仪检测 NDV-D90 株作用于 MCF-7 细胞不同时间段的凋亡状况

Figure 4 MCF-7 cell apoptosis in different time periods acted by NDV-D90 strains were measured by flow cytometry

Bax 蛋白的相对表达量分别为 0.196 ± 0.041 和 0.817 ± 0.288 , 与对照组 0.731 ± 0.238 和 0.236 ± 0.060 相比, Bcl-2 表达显著降低 ($t = 12.139, P < 0.05$), Bax 表达显著增高 ($t = 10.898, P < 0.05$); 和对照组相比, 实验组 Caspase-3 和 Caspase-9 均可见裂解的活性片段(图 5)。

3 讨论

“细胞凋亡”是由 Kerr 等于 1972 年提出的, 凋

亡具有特异的形态学特征: 细胞皱缩, 染色质浓缩且位于核膜的边缘, 细胞膜发泡现象, 细胞碎片形成特异性的凋亡小体出现。肿瘤的发生是由于细胞增殖与细胞凋亡失调而使细胞无限增殖所致。对于正常组织, 其细胞增殖和细胞死亡之间的生长曲线呈稳定状态。当某种因素打破这种平衡而导致细胞增殖超过细胞死亡时, 便会产生肿瘤^[6]。因此, 通过诱导肿瘤细胞凋亡来消除肿瘤成为一种有效的肿瘤治疗途径和战略以及寻找抗肿瘤药物的新靶点和评估抗

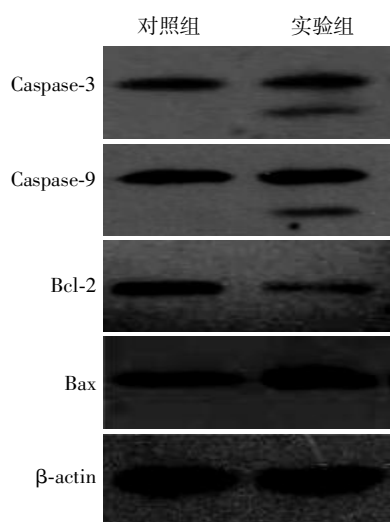


图5 Western blot 乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡相关蛋白的表达
Figure 5 Expression of apoptosis proteins in MCF-7 breast cancer cells

癌药物作用能力的重要指标^[7-9]。

本研究通过一系列体外细胞实验,探讨了具有抗肿瘤作用的生物制剂 NDV-D90 株对体外培养的乳腺癌 MCF-7 细胞株的抑制作用,通过倒置显微镜、DAPI 荧光染色,可以观察到 D90 株感染后的 MCF-7 细胞呈现出典型的细胞凋亡形态学特征并随着作用时间延长凋亡细胞不断增加;通过 CCK-8 比色法及流式细胞仪对 MCF-7 细胞凋亡的定量分析,说明 D90 株以诱导 MCF-7 细胞凋亡为主;从形态学和定量分析证实 ND90 株能够促进 MCF-7 细胞凋亡;D90 株能够诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡并呈时间及浓度依赖性。

目前,按照形态学标准细胞分解可分为 3 条途径,即凋亡、自噬和死亡^[10]。凋亡是由基因严格调控的程序性死亡,当细胞接受凋亡信号,通过一系列的信号传递,影响凋亡相关的正负调节基因表达,最终导致细胞凋亡^[11]。引起肿瘤细胞凋亡途径主要有 2 条:死亡受体(TNFR)诱发的外源性途径和线粒体-凋亡小体介导的内源性途径^[12-13]。其中线粒体-凋亡小体介导的内源性凋亡通路是抗癌药物诱导肿瘤细胞凋亡的一条核心通路。

线粒体是多种促细胞凋亡信号转到分子的靶点,同时也是细胞死亡通路的整合元件,在各种促细胞凋亡信号作用下,线粒体通透性转变孔(MPT pore, MPTP)不可逆过度开放,导致线粒体跨膜电位崩解,位于线粒体膜间隙细胞色素 C 等释放于细胞浆内,细胞色素 C 的释放是线粒体凋亡通路的主要步骤,在 ATP/dATP 存在的情况下,细胞色素 C 与

凋亡蛋白酶活化因子(apoptotic protease-activating factor, Apaf-1)形成多聚复合体,通过 Apaf-1 氨基末端的 Caspase 募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)募集胞质中的 Caspase-9 前体,启动蛋白水解过程并活化 Caspase-9,然后活化 Caspase-3、7,从而开始了 Caspase 瀑布样反应使凋亡达到顶峰^[14]。Bcl-2 家族蛋白是调节肿瘤细胞凋亡的最重要的因子^[15-16]。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白,位于线粒体膜上,而 Bax 是促凋亡蛋白^[17]。通过敲除一些 Bcl-2 家族基因小鼠的研究发现,在应对多种细胞毒性刺激时,一种或多种 Bcl-2 蛋白起着绝对重要作用,缺少 Bax 促凋亡分子的细胞不能够发生内源性细胞死亡^[17]。大多数环境下,一个细胞的命运是生存还是死亡,取决于 Bcl-2 家族中促凋亡和抗凋亡的比例^[18-19]。

在前期研究中发现 NDV-D90 株感染胎儿肝细胞后,细胞形态学观察未见异常改变,结果表明,NDV-D90 毒株对正常肝细胞未造成损伤^[20]。本实验通过 Western blot 检测 MCF-7 细胞内凋亡相关蛋白的表达,结果说明 D90 株可以降低 Bcl-2 表达,同时升高 Bax 表达,并促进 Caspase-3 和 Caspase-9 裂解活化,说明线粒体途径参与 D90 株诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡。因此推断,D90 株能调节 Bcl-2 和 Bax 表达,引起细胞色素 C 从线粒体释放,从而激活了下游的 Caspase-9,引起了效应 Caspase(Caspase-3 等)的活化最终导致 MCF-7 细胞的凋亡。

综上所述 NDV-D90 株对人正常细胞无毒副作用,能够调节凋亡相关蛋白的表达,包括上调 Bax 蛋白、下调 Bcl-2 蛋白,并促进 Caspase-3 和 Caspase-9 的裂解活化,通过线粒体途径诱导 MCF-7 细胞凋亡并呈浓度和时间依赖性,进一步深入对 NDV-D90 株研究探讨有望使其成为治疗恶性肿瘤的生物制剂。

[参考文献]

- [1] Reichard KW, Lorence RM, Cascino CJ, et al. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells[J]. Surg Res, 1992, 52(5): 448-453
- [2] Ravindra PV, Tiwari AK, Sharma B, et al. Newcastle disease virus as an oncolytic agent[J]. India Med Res, 2009, 130(5): 507-513
- [3] Ravindra PV, Tiwari AK, Ratta B, et al. Time course of Newcastle disease virus-induced apoptotic pathways[J]. Virus Res, 2009, 144(1): 350-354
- [4] Vigil A, Martinez O, García-Sastre A, et al. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector for cancer

- therapy[J]. *Mol Ther*,2008,16(11):1883-1890
- [5] Zamarin D,Vigil A,Fong Y,et al. Genetically engineered Newcastle disease virus for malignant melanoma therapy [J]. *Gene Ther*,2009,16(6):796-804
- [6] 杜 佳,张 辉,苏式兵. Micro RNA 调节肿瘤细胞凋亡及中药的影响[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*,2011,13(4):606-607
- [7] Mutoh M,Akasu T,Takahashi M,et al. Possible involvement of hyperlipidemia in increasing risk of colorectal tumor development in human familial adenomatous polyposis[J]. *Jpn J Clin Oncol*,2006,36(3):166-171
- [8] Qi L,Bellail AC,Rossi MR,et al. Heterogeneity of primary glioblastoma cells in the expression of caspase-8 and he response to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Apoptosis*,2011,16(11):1150-1164
- [9] Taniguchi F,Kaponis A,Izawa M,et al. Apoptosis and endometriosis[J]. *Front Biosci*,2011,1(3):648-662
- [10] Wu C,Zhang Y,Sun Z,et al. Molecular evolution of Cide family proteins;novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence [J]. *BMC Evol Biol*,2008,8:159
- [11] Hui KK,Kanungo AK,Elia AJ,et al. Caspase-3 deficiency reveals a physiologic role for Smac/DIABLO in regulating programmed cell death [J]. *Cell Death Differ*,2011,18(11):1780-1790
- [12] Dong SW,Cui YT,Zhong RR,et al. Decreased expression of retinoblastoma protein-interacting zinc-finger gene1 in human esophageal squamous cell cancer by DNA methylation[J]. *Clin Lab*,2012,58(1/2):41-51
- [13] Kim R. Recent advances in understanding the death pathways activated by anticancer therapy [J]. *Cancer*,2005,103(8):1551-1560
- [14] Broughton BR,Reutens DC,Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [J]. *Stroke*,2009,40(5):331-339
- [15] Topuridze ML,Kipiani VA,Pavliashvili NS,et al. Molecular mechanisms of apoptosis [J]. *Georgian Med News*,2007(150):38-45
- [16] 马家宝,朱 文,周清华. bag-1,bcl-2 和 bax 在非小细胞肺癌中的表达和意义及其与化疗多药耐药相关性的研究[J]. *中国肺癌杂志*,2009,12(10):1089-1094
- [17] Malla R,Gopinath S,Alapati K,et al. Downregulation of uPAR and cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the P13K/Akt pathway in gliomas [J]. *PLoS One*,2010,5(10):e13731
- [18] 张 力,龚明玉,李毅学,等. 放疗联合热疗诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡及其与 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达关系的研究[J]. *中国全科医学*,2011,14(2):627-630
- [19] Wu CY,Tang ZH,Jiang L,et al. PCSK9 siRNA inhibits HUVEC apoptosis induced by ox-LDL via Bcl/Bax-caspase9-caspase3 pathway [J]. *Mol Cell Biochem*,2012,359(1-2):347-58
- [20] 符 芳,刘春燕,宋 纯,等. 新城疫病毒 D90 毒株对肺癌 A549 细胞生物学特性的研究[J]. *中国预防兽医学报*,2008,30(3):179-182

[收稿日期] 2013-09-06

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖!