文章编号:1000-5404(2009)15-1475-04

论著

线粒体凋亡途径在 H_2O_2 诱导耐阿霉素人乳腺癌细胞凋亡中的作用

张雪梅[1],杨秀蓉[1],吴 华[2],张振蔚[2],鲜于志群[2] ([1]广州军区武汉总医院核医学科,武汉 430070;[2]华中科技大学附属同济医院核医学科,武汉 430030)

摘 要:目的 探索耐阿霉素的乳腺癌细胞株 MCF-7/Adr 凋亡的可能途径。**方法** 采用耐药株 MCF-7/Adr 和野生株 MCF-7/wt 2 种细胞株进行对比,以噻唑蓝分析(MTT)法探索 H_2O_2 导致其线粒体功能下降的浓度,观察细胞形态学和线粒体超微结构的改变。应用 DNA 凝胶电泳、Annexin Ⅴ和 PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡发生,Rh123 共聚焦显微镜检测线粒体膜电位和 P-gp 功能,Western blot 检测细胞色素 C(Cyto C)的释放状况。**结果** 4 mmol/L H_2O_2 引起 MCF-7/Adr 线粒体整体功能不可逆的进行性下降,线粒体空化,嵴肿胀。MCF-7/Adr 凋亡率(96.52%)显著高于 MCF-7/wt(18.57%,$P<0.01$)。凋亡 DNA 电泳仅见 800、1 600 bp 2 个分子片段。MCF-7/Adr 线粒体数量较 MCF-7/wt 减少,MCF-7/Adr 膜电位下降。4 mmol/L H_2O_2 处理使 MCF-7/Adr 线粒体 Cyto C 释放至细胞质,MCF-7/wt 仅少量 Cyto C 释放。**结论** P-gp 阳性细胞因其线粒体的结构和功能改变的特点,较其野生株细胞更易经线粒体途径凋亡。提示以线粒体为靶点的药物有助于克服与 P-gp 表达有关的多药耐药。

关键词:肿瘤;多药耐药;凋亡;H_2O_2;线粒体;细胞色素 C

中图法分类号:R329.28;R73-354;R737.9 **文献标识码**:A

The apoptotic pathway of breast cancer multidrug resistant cells

ZHANG Xue-mei[1], YANG Xiu-rong[1], WU Hua[2], ZHANG Zhen-wei[2], XIANYU Zhi-qun[2] ([1]Department of Nuclear Medicine, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070; [2]Department of Nuclear Medicine, Tongji Hospital Subordinated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the possible apoptotic pathway in breast cancer daunorubicin-resistant subline, MCF-7/Adr cell line. Methods Drug-resistance cell line MCF-7/Adr expressing functional P-gp and its wild type MCF-7/wt cell line were used for comparison. The concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2) that may lead to loss of mitochondrial function was determined using MTT assay. The cell morphology and the mitochondrial ultrasructure were observed by invert and transmission electron microscopy, respectively. The apoptosis of the two cell lines was determined with DNA gel electrophoresis and Annexin V and PI double-stained flow cytometry. Mitochondrial membrane potential (MMP) and the function of P-gp were assessed with rhodamine 123 (Rh123) staining intensity by confocal microscopy. The release of cytochrome C from mitochondria was observed by Western blotting. Results The mitochondrial function of MCF-7/Adr was irreversibly damaged at the concentration of 4 mmol/L H_2O_2. The mitochondria were vacuolated and their cristae were swollen. The percentage of MCF-7/Adr cell apoptosis was significantly higher than that of MCF-7/wt, 96.52% and 18.57%, respectively ($P<0.01$). Only 800 and 1 600 Da DNA fragmentation was seen. The number of mitochondria and membrane potential of MCF-7/Adr mitochondria decreased as compared with those of MCF-7/wt. H_2O_2 at the concentration of 4 mmol/L induced release of cytochrome C from MCF-7/Adr mitochondria to cytoplasma, but little was detected in MCF-7/wt. Conclusion MCF-7/Adr cells expressing functional P-gp are more sensitive to H_2O_2-mediated mitochondrial apoptosis. It may attribute to the changes of mitochondrial structure and function in MCF-7/Adr cells. These may suggest that some way which may modify mitochondrial characteristics may be benificial to overcome the multidrug resistance related to P-gp.

Key words: tumor; multidrug resistance; apoptosis; hydrogen peroxide; mitochondria; cytochrome C

作者简介:张雪梅,女,湖北省武汉市人,博士,副主任医师,主要从事肿瘤核医学方面的研究,发表论著5篇。电话:(027)68878668,E-mail: plumzhang108@hotmail.com

收稿日期:2008-09-17;**修回日期**:2008-10-27

肿瘤的多药耐药(multidrug resistance,MDR)使其对化疗药物诱导的凋亡产生抵抗,影响化疗效果。因此,导致 MDR 主要因素之一的 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)与凋亡调控的关系受到人们的关注。细胞凋亡的发生机制主要有死亡受体通路、线粒体通路等。对于 MDR 肿瘤细胞,究竟从何途径容易发生凋亡目前所知甚少。本研究采用 P-gp 阳性的人乳腺癌耐阿霉素细胞株 MCF-7/Adr 和野生株 MCF-7/wt[1],观察 H_2O_2 作用下 MDR 细胞凋亡的发生特点,从分子水平揭示活性氧所致 MDR 细胞凋亡的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

人乳腺癌耐药细胞株 MCF-7/Adr 和野生株 MCF-7/wt,购自中山医科大学肿瘤研究所,细胞在 10% 胎牛血清的 DMEM(Gibco 公司)培养液中呈单层贴壁生长,37℃、5% CO_2 条件下培养。H_2O_2 由上海桃浦化学试剂厂提供,无支原体胎牛血清购自三利生物工程公司,含膜联蛋白荧光素(Annexin V Fluos,晶美公司),碘化丙碇(PharMingen),罗丹明 123(Sigma 公司),PVDF 膜(Milipore),鼠抗人 Cyto C 抗体(IMGENEX 公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中山生物技术有限公司),化学发光检测试剂盒(Santacruz 公司)。美国 BectonDickinson 公司 FACSort 流式细胞仪。

1.2 细胞处理及分组

参照文献[2],经不同浓度梯度测试,确定耐药细胞株 MCF-7/Adr 和野生株 MCF-7/wt 分别以 6、4、2、1、0.8、0.4、0.2 mmol/L 的 H_2O_2 处理 4 h 后进行实验。

1.3 MTT 法测定

以 5 000/孔接种细胞,37 ℃、5% CO_2 培养,待细胞接近融合时进行实验。以不同浓度 H_2O_2 处理,每组样品设 8 个平行孔,用 MTT 法检测。在 570nm 波长处测定各孔光密度值[$D(570)$],取均值。

1.4 细胞染色体 DNA 断裂的测定

按照姜泊[3]方法提取未经或经不同浓度 H_2O_2 处理的 DNA,取 10 μg DNA 样品点样于 1.5% 琼脂糖凝胶(含 1 mg/ml EB)的样品孔中,室温、5.0 V/cm 及 0.5×TBE 中电泳 3 h,紫外光灯下观察、照相。

1.5 Annexin V和碘化丙碇双标记流式细胞术检测

将收获的新鲜细胞 800 r/min 离心 5 min,去除培养基,悬浮于 100 μl Annexin V 和碘化丙碇的双标记液中,室温孵育 20 min 后,上 FACSort 流式细胞仪检测。用 Cellquest 软件获取数据,ModFit 软件进行数据分析。

1.6 电镜观察

取对数生长期、生长状态良好的细胞,经固定、脱水、Epon812 树脂包埋、超薄切片、双铅染色。透射电镜下观察细胞线粒体超微结构的改变。

1.7 线粒体膜电位的变化

细胞以不同浓度 H_2O_2 处理后,加入 1 μmol/L 罗丹明 123,使其终浓度为 10 μg/ml。激光扫描共聚焦显微镜(Leica)扫描,确定统一的参数后,对各组细胞随机选取 3 个视野进行扫描并分析结果。

1.8 Western 印迹法检测细胞色素 C(Cyto C)

分别提取细胞质、线粒体蛋白质,定量后行 SDS-PAGE 凝胶电泳,用电转印仪将蛋白质转印到 PVDF 膜,转印后的膜依次加入 1∶1 000 稀释的一抗、1∶1 000 稀释的二抗孵育,化学发光法显色曝光。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两个样本均数比较应用 t 检验,多个样本均数比较应用方差分析,百分比的比较用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察细胞形态变化

用 H_2O_2 处理细胞后,100、200 μmol/L 组未见明显形态学改变,400 μmol/L 组出现胞体皱缩变小,有颗粒感,随着 H_2O_2 浓度的增加其变化更加显著,以 MCF-7/Adr 变化明显。在 4 mmol/L 组,MCF-7/Adr 细胞逐渐变圆,脱离瓶壁,漂浮到培养液中,细胞核浓缩更明显;MCF-7/wt 细胞仍呈皱缩改变。予 6 mmol/L H_2O_2 时 MCF-7/wt 亦出现肿胀变圆。

2.2 不同浓度 H_2O_2 处理对 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 细胞株活性线粒体整体功能的影响

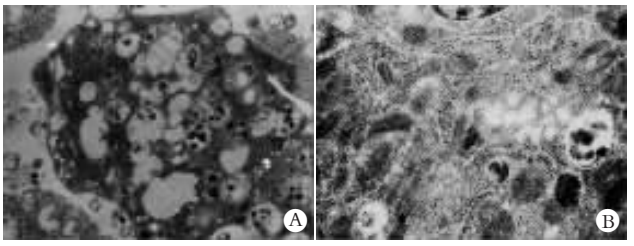
在 0~0.4 mmol/L H_2O_2 作用时,MCF-7/Adr、MCF-7/wt 细胞株活性相差不显著。0.8~1 mmol/L H_2O_2 作用后,MCF-7/Adr 的 MTT 值明显高于 MCF-7/wt($P<0.05$,$P<0.01$),MCF-7/Adr 线粒体代偿能力较强,对低浓度 H_2O_2 耐受好于 MCF-7/wt。之后,随着 H_2O_2 浓度逐渐加大,2 种细胞株的活性均受到抑制,4 mmol/L H_2O_2 引起 MCF-7/Adr 线粒体整体功能不可逆的进行性下降($P<0.01$)。其他浓度 H_2O_2 对 2 种细胞的影响无统计学差异($P>0.05$),对线粒体整体功能的影响也不大(表 1)。

表 1 不同浓度 H_2O_2 处理 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 细胞株 MTT 吸光度值的变化[$n=8$,$D(570)$,$\bar{x} \pm s$]

组别	MCF-7/Adr	MCF-7/wt	t	P
对照组	2.026±0.345	2.189±0.223	1.239	0.244
0.2 mmol/L	1.939±0.192	2.055±0.285	0.017	0.142
0.4 mmol/L	2.127±0.264	2.042±0.242	−0.800	0.441
0.8 mmol/L	2.007±0.283	1.622±0.382	−2.738	0.017
1 mmol/L	1.811±0.263	1.337±0.249	−4.696	0.000
2 mmol/L	1.419±0.334	1.170±0.232	−1.878	0.085
4 mmol/L	0.020±0.015	0.864±0.191	13.543	0.000

2.3 线粒体超微结构的改变

MCF-7/Adr 的线粒体数量少于野生株 MCF-7/wt,但其嵴较 MCF-7/wt 粗大。4 mmol/L H_2O_2 可引起 MCF-7/Adr 的线粒体极度肿胀,空化明显(图 1A),膜性结构消失,可见典型的细胞核染色质凝聚、胞体皱缩、胞膜完整,凋亡小体形成。2 mmol/L H_2O_2 对 MCF-7/wt 线粒体无明显影响,4 mmol/L H_2O_2 作用时部分线粒体嵴肿胀,至 6 mmol/L 时嵴肿胀明显,部分线粒体空化(图 1B)。

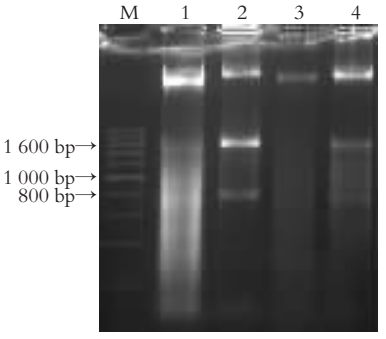


A: MCF-7/Adr(×10 000);B: MCF-7/wt(×20 000)

图 1　4 mmol/L H_2O_2 作用 4 h 后 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 电镜超微结构观察

2.4　DNA 凝胶电泳结果

凝胶电泳出现 800、1 600 bp 2 个分子片段的 DNA 条带,未见典型的凋亡梯状条带(图 2)。



M:DNA 标准;1,3: 正常 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 细胞;2,4:凋亡 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 细胞

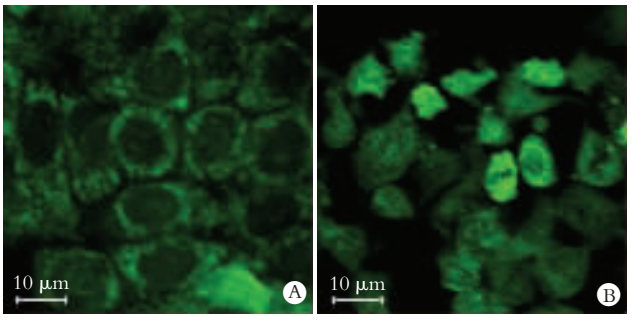
图 2　H_2O_2 诱导 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 细胞发生凋亡的凝胶电泳图

2.5　Annexin Ⅴ和 PI 双标记法细胞凋亡检测结果

采用 H_2O_2 诱导细胞凋亡,凋亡率呈剂量依赖性,MCF-7/Adr 凋亡较 MCF-7/wt 耐受 H_2O_2 浓度低,发生凋亡早。0.5、1 mmol/L H_2O_2 处理细胞时,2 种细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。予 2、4 mmol/L 时,MCF-7/Adr 凋亡率明显较 MCF-7/wt 高($P<0.05$)。尤其在 4 mmol/L 时,细胞凋亡率分别为 96.52% 和 18.57%($P<0.01$)。至 6 mmol/L 时,MCF-7/wt 凋亡数仍不及 MCF-7/Adr 细胞。

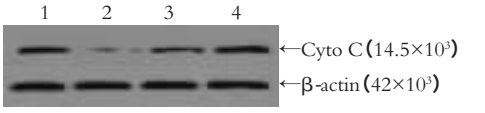
2.6　线粒体膜电位的改变

MCF-7/Adr 线粒体膜电位(89.17 ± 6.21)明显低于 MCF-7/wt(134.05 ± 19.98)($P<0.05$)。4mmol/L H_2O_2 处理后,MCF-7/wt 和 MCF-7/Adr 线粒体膜电位分别下降为(37.30 ± 8.46)和(36.99 ± 19.85)($P<0.05$)。激光扫描共聚焦显微镜见 MCF-7/wt 线粒体分布在核周,数量多,呈团块状;MCF-7/Adr 线粒体分布与 MCF-7/wt 基本一致,但数量明显稀少(图 3)。



A: MCF-7/wt;B:MCF-7/Adr

图 3　H_2O_2 处理后 4 h MCF-7/wt、MCF-7/Adr 细胞线粒体膜电位的变化



1:MCF-7/Adr 细胞质;2:MCF-7/Adr 线粒体;3:MCF-7/wt 细胞质;4:MCF-7/wt 线粒体

图 4　Western blot 检测 H_2O_2 对 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 线粒体释放 Cyto C 的影响

2.7　细胞质、线粒体 Cyto C 的变化

Cyto C 在正常肿瘤细胞中主要分布于线粒体,在细胞质中未检测到。4 mmol/L H_2O_2 处理 MCF-7/Adr、MCF-7/wt 后,可见 MCF-7/Adr 细胞质中 Cyto C 的含量明显增多,而线粒体中 Cyto C 则明显减少。MCF-7/wt 的 Cyto C 主要位于线粒体中,细胞质中有少量分布(图 4)。

3　讨论

MDR 导致肿瘤对化疗药物诱导凋亡的抵抗。本研究却显示耐药株 MCF-7/Adr 较野生株 MCF-7/wt 对 H_2O_2 诱导的凋亡更敏感,表明 MCF-7/Adr 更容易经线粒体途径凋亡。

调节细胞凋亡主要有 2 条通路:1 条是通过细胞表面的死亡受体,如 TNFR1 和 Fas/CD95/APO-1 介导的;另 1 条是通过线粒体信号系统导致细胞凋亡级联的发生,如 Bcl-2 家族介导的。后者涉及线粒体膜电位的改变,Cyto C 释放入细胞质以及 Caspase-9 的活化等。P-gp 通过抑制 Caspase 8 和 Caspase 3 的激活而抑制 Caspase 依赖性凋亡[4]。未见耐药细胞的线粒体凋亡途径研究报道。

细胞凋亡的线粒体途径通过 Bcl-2 家族蛋白调节。Bcl-2 可以调节线粒体凋亡通道 MAC 结构,具有显著调节线粒体释放 Cyto C、AIF 的作用[5,6]。由于 MCF-7/Adr 的 Bcl-2 蛋白较 MCF-7/wt 下调 10 倍,Bcl-2 mRNA 下调 2 倍[7],因此 MCF-7/Adr 细胞 Bcl-2 蛋白稳定线粒体膜、清除 ROS 的作用减弱,推测其易经线粒体途径凋亡[8]。

本研究采用了 H_2O_2 作为线粒体凋亡的诱导剂,是基于肿瘤化疗药物作用于凋亡的关键因素 H^+-ATP 合成酶,导致活性氧产生,活性氧对线粒体进一步氧化修饰,导致线粒体膜上通透性增加孔道迅速开放,进而引发线粒体膜上蛋白质,如 Cyto C、凋亡诱导因子(AIF)、Smac/Diablo 和核酸内切酶等凋亡分子泄漏,

引发凋亡过程[9,10]。

研究表明,H_2O_2诱导凋亡时,凋亡率呈剂量依赖性,MCF-7/Adr 细胞凋亡较 MCF-7/wt 细胞耐受 H_2O_2 浓度低,发生凋亡早。

MTT 测定是基于线粒体内含有琥珀酸脱氢酶,后者可将 MTT 从黄色转化为蓝色,它广泛用作细胞呼吸和活力的指标,反映线粒体的整体功能[2]。在 0.8、1 mmol/L H_2O_2作用时,MCF-7/Adr 的高代谢特征,表现出很好的氧化应激代偿能力,超出这一范围,其线粒体马上崩溃。从另一个方面说明 MCF-7/Adr 细胞更易经线粒体途径凋亡。

本研究还观察到,凋亡细胞 DNA 降解的条带仅局限于 800、1600 bp 2 个分子片段,未见典型的梯状条带。可能因为采用高浓度的 H_2O_2作用于细胞线粒体,线粒体释放了 AIF,在细胞核引起染色体凝聚和 DNA 大片段断裂导致细胞凋亡。从 DNA 电泳中,也看到 H_2O_2引起少量 MCF-7/wt 细胞凋亡,降解的 DNA 片段仅占总 DNA 的一小部分,进一步说明 MCF-7/Adr 细胞更容易被 H_2O_2损伤。

亲脂性阳离子荧光染料如 Rho 123 进入线粒体,积聚于线粒体内膜,细胞线粒体凋亡时 PTP 开放,线粒体膜电位消失,激光共聚焦显微镜检测膜电位的荧光强度下降[11]。在 MDR 细胞中,Rho123 同时又是 P-gp 作用的底物,它的多寡也反映了 P-gp 的功能。由于 P-gp 的表达,线粒体数量减少,膜电位下降,所以表现为 Rho123 聚集减少[12],本研究所见与文献报道一致。

线粒体不但是细胞凋亡的触发中心、细胞死亡的直接通路,而且线粒体与肿瘤多药耐药之间存在密切关系。线粒体维持 MDR 药物外排泵作用的能量供给,是耐药细胞的药物储存部位,保护细胞核及其他药物作用部位免受药物损伤。正常细胞依赖线粒体合成 ATP,癌细胞即使在有氧情况下,也较依赖糖酵解。P-gp 阳性的细胞线粒体呼吸转运链活性较其野生株增高,提示 P-gp 阳性的细胞 ATP 需求增加主要靠线粒体供给,因此 MCF-7/Adr 的线粒体呼吸更活跃,线粒体 DNA 更丰富[13]。本研究表明,在形态学上,耐药细胞 MCF-7/Adr 细胞的线粒体数量减少,体积增大,嵴粗大,膜电位降低,结构、功能的变化、能量代谢更为活跃,具有生物学特性差异的结构基础,与文献[7]报道一致。由于 MCF-7/Adr 的特点,使其更易受 H_2O_2的攻击,在 MCF-7/wt 线粒体结构尚完整时,就出现了线粒体嵴肿胀、空泡化。P-gp 阳性细胞高代谢的挑战,破坏了线粒体膜功能的完整性,使耐药细胞对由线粒体介导的凋亡刺激更敏感。

总之,P-gp 既是对某些凋亡刺激的抵抗因素,也是对刺激线粒体凋亡敏感的危险因素[14]。针对线粒体为有效靶点人新型抗癌药“mitocans”已经出现[15]。P-gp 的存在使Ⅰ型细胞(经典凋亡途径)向Ⅱ型细胞(线粒体相关的凋亡级联酶反应)转化。这启发我们逆转 P-gp 介导的肿瘤多药耐药性时,可将耐药肿瘤线粒体作为药物攻击的靶点,为临床治疗多药耐药的肿瘤提供了新的途径和思路。

参考文献:

[1] Mimnaugh E G, Fairchild C R, Fruehauf J P, *et al*. Biochemical and pharmacological characterization of MCF-7 drug-sensitive and AdrR multidrug-resistant human breast tumor xenografts in athymic nude mice [J]. Biochem Pharmacol, 1991, 42(2): 391 – 402.

[2] 蔡 黔, 周 红, 肖光夏, 等. 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体膜电位及细胞凋亡的影响[J]. 西北国防医学杂志, 2004, 25(4): 241 – 244.

[3] 姜 泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 第 2 版. 北京: 人民军医出版社, 1996: 128 – 143.

[4] Cullen K V, Davey R A, Davey M W. Drug resistance does not correlate with resistance to Fas-mediated apoptosis[J]. Leuk Res, 2001, 25(1): 69 – 75.

[5] Dejean L M, Martinez-Caballero S, Guo L, *et al*. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(5): 2424 – 2432.

[6] Hildeman D A, Mitchell T, Aronow B, *et al*. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(25): 15035 – 15040.

[7] Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria[J]. J Cell Physiol, 2003, 195(2): 158 – 167.

[8] 曹国春, 梁 军, 侯亚义. 薏苡仁油诱导乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞的凋亡及机理研究[J]. 实用临床医药杂志, 2007, 11(2): 1 – 3, 11.

[9] 方 敏, 王晓东. 细胞凋亡的线粒体通路[J]. 北京大学学报: 医学版, 2002, 34(1): 1 – 10.

[10] Jeong S Y, Seol D W. The role of mitochondria in apoptosis[J]. BMB Rep, 2008, 41(1): 11 – 22.

[11] Villa A M, Doglia S M. Mitochondria in tumor cells studied by laser scanning confocal microscopy[J]. J Biomed Opt, 2004, 9(2): 385 – 394.

[12] Stavrovskaya A A, Stromskaya T P. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells[J]. Biochemistry (Mosc), 2008, 73(5): 592 – 604.

[13] Li Y C, Fung K P, Kwok T T, *et al*. Mitochondria-targeting drug oligomycin blocked P-glycoprotein activity and triggered apoptosis in doxorubicin-resistant HepG2 cells[J]. Chemotherapy, 2004, 50(2): 55 – 62.

[14] Matarrese P, Testa U, Cauda R, *et al*. Expression of P-170 glycoprotein sensitizes lymphoblastoid CEM cells to mitochondria-mediated apoptosis[J]. Biochem J, 2001, 355(Pt 3): 587 – 595.

[15] Neuzil J, Wang X F, Dong L F, *et al*. Molecular mechanism of ‘mitocan’-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins[J]. FEBS Lett, 2006, 580(22): 5125 – 5129.

(编辑 张 维)