文章编号:1000-5404(2009)22-2225-03

论著

诱导细胞 mtDNA 缺失以及再转入线粒体后对肿瘤细胞凋亡的影响

李歆强,凌贤龙,周 源,何玉琦,李诗伟,晏 斌 (第三军医大学新桥医院消化内科,重庆 400037)

摘 要:目的 对比研究 mtDNA 缺失以及再转入线粒体后细胞凋亡的变化。**方法** 在成功构建 ρ^0SK-Hep1 细胞和转线粒体细胞 SK-Hep1Cyb 的基础上,采用 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡;流式细胞仪检测细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位($\Delta\Psi$m);Western blot 检测细胞 Bcl-2、Bax 表达水平;免疫荧光染色观测 Bcl-2 细胞内分布。**结果** SK-Hep1、ρ^0SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡率分别为(2.01±0.11)%、(0.37±0.08)%和(2.10±0.12)%。ρ^0SK-Hep1 对细胞凋亡有明显抗性($P<0.05$)。ρ^0SK-Hep1 细胞内 DCFDA 荧光强度较 SK-Hep1 细胞显著增强(35.5 与 15.9, $P<0.01$);转入线粒体后,SK-Hep1Cyb 细胞 DCFDA 荧光强度较 ρ^0SK-Hep1 细胞明显下降(17.4 与 35.5, $P<0.01$)。ρ^0SK-Hep1 细胞 MitoTracker Red 荧光强度较 SK-Hep1 细胞显著减低(55.0 与 65.9, $P<0.05$);转入线粒体后,SK-Hep1Cyb 细胞 MitoTracker Red 荧光强度与 SK-Hep1 细胞基本一致(67.4 与 65.9, $P>0.05$)。ρ^0SK-Hep1 细胞线粒体 Bcl-2、Bax 表达增多,Bcl-2/Bax 比值增加($P<0.01$)。SK-Hep1Cyb 细胞线粒体 Bcl-2/Bax 值下降。**结论** mtDNA 缺失肿瘤细胞对细胞凋亡有明显拮抗。Bcl-2 线粒体转位、线粒体 Bcl-2/Bax 值增加、ROS 产生增多可能参与细胞凋亡拮抗的形成。

关键词: 线粒体 DNA;胞质体;ROS;细胞凋亡;肿瘤
中图法分类号: R329.25;R394.3;R73-354 **文献标识码:** A

Apoptosis in mtDNA-depleted cells and its transmitochondrial cybrids

LI Xin-qiang, LING Xian-long, ZHOU Yuan, HE Yu-qi, LI Shi-wei, YAN Bin (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical College, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate cell apoptosis in mtDNA-depleted SK-Hep1 cells and the transmitochondrial cybrids on the basis of establishment of ρ^0SK-Hep1 (a mtDNA-depleted cell line derived from human hepatoma cell line SK-Hep1) and the transmitochondrial cybrids, SK-Hep1Cyb. **Methods** SK-Hep1 cells, ρ^0SK-Hep1 cells, and the transmitochondrial cybrids were cultured in high-glucose DMEM. Apoptosis was determined by Annexin V/PI assay. Flow cytometry (FCM) and laser scan confocal microscopy were used to detect reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$m) respectively. Western blot analysis was applied to detect Bcl-2 and Bax expressions in the above 3 groups of cells. Distribution of Bcl-2 in the 3 groups was assessed by immunofluorescence analysis. **Results** Apoptotic ratio of SK-Hep1, ρ^0SK-Hep1 and SK-Hep1Cyb cells were (2.01±0.11)%, (0.37±0.08)% and (2.10±0.12)%, respectively. ρ^0SK-Hep1 cells were more counteractive against apoptosis than the other 2 cells ($P<0.05$). Fluorescence intensity of ROS in ρ^0SK-Hep1 cells was significantly higher than that of the parent cells (35.5 *vs* 15.6, $P<0.01$), but the $\Delta\Psi$m was comparatively lower (55.0 *vs* 65.9, $P<0.05$), meanwhile the ratio of Bcl-2/Bax was elevated. After transmitochondria to ρ^0SK-Hep1 cells, the SK-Hep1Cyb cells had all the above reversed. **Conclusion** mtDNA-depleted cells are more counteractive against apoptosis, and it might be related to the elevated mitochondrial Bcl-2/Bax and ROS.

Key words: mitochondrial DNA; cybrid; reactive oxygen species; apoptosis; neoplasm

线粒体是真核细胞内特有的细胞器,参与了细胞内诸多功能的实现。线粒体功能不全是肿瘤细胞最重要的特征之一[1,2]。线粒体 DNA 突变(mitochondrial DNA,mtDNA)可能与多种肿瘤的发生、发展有关[3]。我们已经建立了人肝癌 mtDNA 缺失 ρ^0SK-Hep1 细胞以及转线粒体细胞 SK-Hep1Cyb[4,5]。ρ^0SK-Hep1 细胞

基金项目: 国家自然科学基金(30470865);新桥医院 1520 基金(2006)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470865) and the 1520 Talents Foundation of Xinqiao Hospital (2006)
作者简介: 李歆强,男,河北省磁县人,硕士研究生,主要从事肿瘤细胞多药耐药方面的研究。E-mail: lixinqiang496@sohu.com
通信作者: 凌贤龙,E-mail: lingxlong@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-09-25;**修回日期:** 2009-10-23

生长速度加快、侵袭能力增强,然导致其表型改变的机制尚不清楚。本研究通过分析 ρ^0SK-Hep1 细胞,SK-Hep1Cyb 细胞,SK-Hep1 细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)、线粒体膜电位($\Delta\Psi$m)以及 Bcl-2/Bax 细胞内分布的差异,对比研究 mtDNA 缺失以及再转入线粒体后细胞凋亡的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

主要材料:高糖培养基(DMEM)、胎牛血清(Gibco 公司)。5′-氧溴脱氧尿嘧啶(BrdU)、丙酮酸钠(Sigma 公司)。DCFDA、MitoTracker Red 荧光探针(Invitrogen 公司)。Annexin V FITC/PI 试剂盒、线粒体提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。鼠抗人 Bcl-2、Bax、β-actin 单抗(Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥公司)。Coulter Epics XL 流式细胞仪(Beckman 公司)、TCS-NT 激光扫描共聚焦显微镜(Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞系与细胞培养 人肝癌 SK-Hep1 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,在 DMEM 高糖培养基、含 10% 胎牛血清,37 ℃恒温,5% CO_2、95% 空气孵箱内培养。ρ^0SK-Hep1 细胞为 SK-Hep1 细胞经溴化乙锭诱导(EB,100 μg/L)获得[4],在含丙酮酸钠 100 mg/L、尿嘧啶 50 mg/L、含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,37 ℃恒温,5% CO_2、95% 空气孵箱内培养。SK-Hep1Cyb 系 ρ^0SK-Hep1 转线粒体细胞,将血小板与 ρ^0SK-Hep1 细胞融合后获得[5],在 DMEM 高糖培养基、含 10% 胎牛血清,37 ℃恒温,5% CO_2、95% 空气孵箱内培养。

1.2.2 细胞内 ROS 测定 细胞以 5×10^4/孔接种于 6 孔培养板中,常氧条件下培养 48 h。0.25% 胰蛋白酶消化为单细胞悬液后移入离心管,500 × *g* 离心 5 min。加入 1 ml PBS + 5 μl DCFDA 储存液,轻轻混匀,37 ℃孵育 30 min。弃去 loading 液体,加入预温至 37 ℃的 DMEM + 10% 胎牛血清,孵育 20 min。离心弃 DMEM + 10% 胎牛血清,以 PBS + 10% 胎牛血清洗 2 次。激光共聚焦显微镜、流式细胞仪检测细胞内 DCFDA 荧光探针平均荧光强度。

1.2.3 线粒体 $\Delta\Psi$m 细胞以 1×10^5/孔接种于 6 孔培养板中,常氧条件下培养 72 h。弃去培养基,加入 1 ml 37 ℃ PBS + 10% 胎牛血清,再加入 10 μl MitoTracker Red 储存液,37 ℃孵育 30 min。流式细胞仪检测细胞内荧光特异性探针 MitoTracker Red 平均荧光强度。

1.2.4 Annexin Ⅴ/PI 双染法检测细胞凋亡 调整细胞数至 1×10^5/ml,1 500 r/min,离心 5 min,弃上清,加 Annexin Ⅴ 5 μl,缓冲液 195 μl,PI 20 μl,避光放置 20 min,流式细胞仪检测细胞凋亡状态。激发光波长为 488 nm,FITC 受激发后发绿色荧光,PI 发红色荧光。Cellquest 软件分析结果。

1.2.5 线粒体分离 采用线粒体提取试剂盒分离培养细胞线粒体。收集 5×10^7 个培养细胞,匀浆,PBS 洗涤;加入 1.0 ml 冰预冷 Lysis Buffer 重悬细胞,将细胞悬液转移到小容量玻璃匀浆器内,0 ℃冰浴研磨 30 ~ 40 次;将细胞匀浆物转移到离心管,4 ℃,1 000 × *g* 离心 5 min;取上清,4 ℃,1 000 × *g* 离心 5 min;取上清,加入一新的离心管中,4 ℃,12 000 × *g* 离心 10 min。将上清转移到新离心管,线粒体沉淀在管底。在线粒体沉淀中加入 0.5 ml Wash Buffer 重悬线粒体沉淀,4 ℃,1 000 × *g* 离心 5 min;取上清,加入一新的离心管中,4 ℃,12 000 × *g* 离心 10 min。弃上清,高纯度的线粒体沉淀在管底。用 100 μl Store Buffer 或合适的反应缓冲液重悬线粒体沉淀,-70 ℃保存。

1.2.6 免疫荧光分析 培养细胞以 DMEM + 10% FBS 洗涤后,在含 100 nmol/L MitoTracker Red 的培养基中孵育 30 ~ 45 min。然后以 PBS 洗涤 2 次,再以 4% 福尔马林固定 30 min、100% 甲醇固定 10 min。后用 PBS 洗涤 3 次,再以 2% 马血清 + 0.5% Triton X-100 + 0.02% NaN_3 处理 20 min。细胞在含抗 Bax 和抗 Bcl-2 抗体的培养液中室温下孵育 90 min 后以 PBS 洗涤 3 次,再以 FITC 和 TRITC 结合二抗孵育 40 min,PBS 洗涤 3 次;随后在含 DAPI (4′, 6-diamidino-2-phenylindole) 的培养液中孵育 5 min;PBS 洗涤,激光共聚焦显微镜下观测。

1.2.7 Western 杂交 考马斯亮蓝法作蛋白定量。根据测得的总蛋白浓度,每例标本取总蛋白 20 μg,10% SDS-PAGE 电泳分离,半干法转印于 PVDF(Roche 公司)膜上。脱脂奶粉封闭。1∶1 000 稀释 Bcl-2、Bax 单抗,与经封闭液处理的 PVDF 膜 4 ℃孵育过夜。1∶10 000 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,加 ECI 发光剂,在 5 min 内显影定影,胶片洗涤干燥后记录结果。Quantity One 图像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)进行条带吸光度分析,以目的蛋白与内参 β-肌动蛋白条带灰度的比值作为蛋白表达的相对含量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件行单因素方差分析。

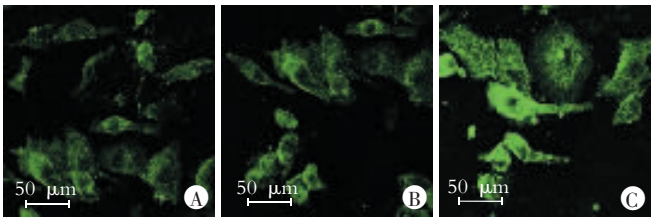
2 结果

2.1 SK-Hep1、ρ^0SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡检测

SK-Hep1、ρ^0SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡率分别为 (2.01 ± 0.11)%、(0.37 ± 0.08)% 和 (2.10 ± 0.12)%。ρ^0SK-Hep1 对细胞凋亡有明显抗性,与另外 2 种细胞相比有显著差异($P<0.05$)。

2.2 细胞内 ROS 测定

DCFDA 平均荧光强度 ρ^0SK-Hep1 细胞为 35.53, SK-Hep1 细胞为 15.94, SK-Hep1Cyb 细胞为 17.48。ρ^0SK-Hep1 细胞 DCFDA 平均荧光强度明显高于 SK-Hep1 细胞和 SK-Hep1Cyb 细胞,差异有显著性($P<0.01$)。见图 1。



A: SK-Hep1; B: SK-Hep1Cyb; C: ρ^0SK-Hep1

图 1 细胞内 ROS DCFDA 荧光染色观察

2.3　线粒体 ΔΨm 测定

流式细胞仪检测 MitoTracker Red 荧光密度,ρ^0SK-Hep1 细胞平均记数 55.04,而 SK-Hep1 细胞平均记数 65.48,SK-Hep1Cyb 细胞 64.39。ρ^0SK-Hep1 细胞线粒体 ΔΨm 明显降低($P<0.05$)。

2.4　Bcl-2/Bax-9 蛋白表达

经 Quantity One 图像分析系统分析样品与内参 β-actin 灰度比值,结果显示,ρ^0SK-Hep1 细胞 Bcl-2、Bax-9 蛋白表达明显增强($P<0.01$)且 Bcl-2/Bax 值增加[SK-Hep1、ρ^0SK-Hep1、SK-Hep1Cyb Bcl-2/Bax 值分别为(0.50 ± 0.08,0.67 ± 0.11,0.52 ± 0.09),$P<0.01$],而 SK-Hep1Cyb 细胞与 SK-Hep1 细胞间差异不显著($P>0.05$)。见图 2。

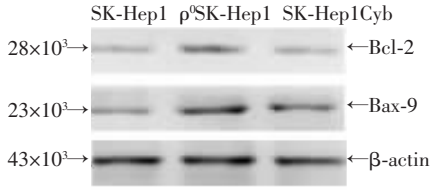


图 2　3 种细胞中线粒体内 Bcl-2、Bax 蛋白表达

2.5　ρ^0SK-Hep1 细胞 Bcl-2 线粒体转位免疫荧光观察

SK-Hep1 细胞内 Bcl-2（绿色荧光）弥散分布,而 ρ^0SK-Hep1 细胞 Bcl-2 荧光强度明显增加;转入线粒体后,SK-Hep1 细胞 Bcl-2 荧光强度减低。将 Bcl-2（绿色荧光）、MitoTracker Red(红色荧光)，DAPI(蓝色荧光）三色荧光染色后图像重建显示,ρ^0SK-Hep1 细胞 Bcl-2 线粒体转位增加。见图 3。

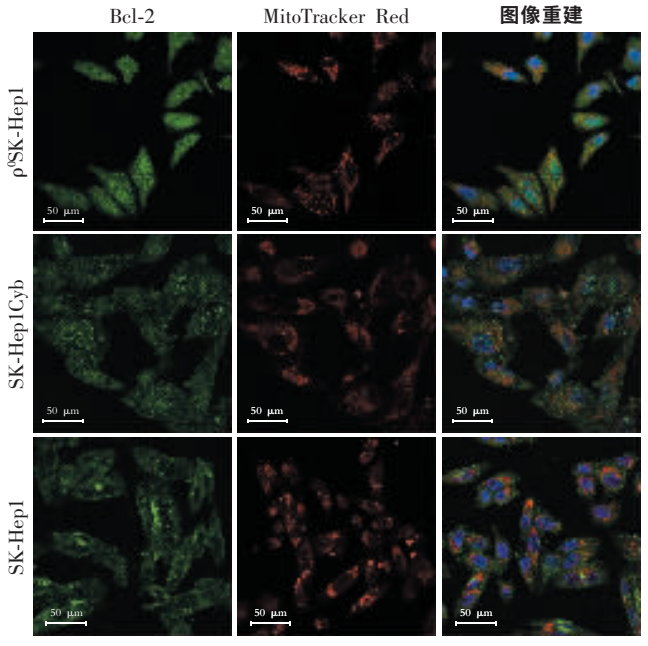


图 3　ρ^0SK-Hep1 细胞 Bcl-2 线粒体转位免疫荧光染色观察　（×400）

3　讨论

本研究显示,mtDNA 缺失细胞对细胞有明显抗性。线粒体 DNA 缺失细胞 ROS 增加,而线粒体膜电位降低[6]。恶性程度不同的肿瘤细胞其线粒体膜电位可能存在差异[1]。线粒体 ΔΨm 是线粒体电化学梯度的主要构成部分,反应线粒体内膜的结构情况,线粒体 ΔΨm 下降表明细胞内膜结构改变,通透性增加[7]。线粒体是细胞内 ROS 产生的主要场所。线粒体 DNA 缺失导致呼吸链电子传递缺陷致使 ROS 产生增加。另一方面,自由基增多也可能与肿瘤细胞去分化有关。

本研究还显示,ρ^0SK-Hep1 细胞 Bcl-2 向线粒体内转位增加,线粒体 Bcl-2/Bax 蛋白比值增加。转入正常线粒体后,SK-Hep1Cyb 细胞线粒体 Bcl-2/Bax 下降。Bcl-2/Bax 比率决定了细胞对凋亡刺激的反应[8],mtDNA 缺失细胞线粒体 Bcl-2/Bax 比值增加可能导致其对凋亡刺激的拮抗作用。Bcl-2、Bax 参与了线粒体通透性转换孔形成,Bcl-2 家族蛋白通过调节线粒体外膜完整性而在细胞凋亡过程中起作用。Bcl-2、Bcl-XL 阻止凋亡蛋白释放并保护线粒体外膜完整性,而 Bax、Bak 诱导线粒体外膜通透性增加,使促凋亡因子从线粒体释放[9]。Bcl-2/Bax 比值增加通过抑制线粒体通透性转换孔开放,进而抑制细胞凋亡。

参考文献:

[1] Modica-Napolitano J, Singh K K. Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer[J]. Expert Rev Mol Med, 2002, 4(9): 1-19.

[2] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. Science, 1999, 283(5407): 1482-1488.

[3] Fliss M S, Usadel H, Caballero O L, *et al*. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids[J]. Science, 2000, 287(5460): 2017-2019.

[4] 张国桥, 凌贤龙, 陈正堂. 人线粒体 DNA 缺失肝癌细胞株建立[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(1): 127-130.

[5] 何玉琦, 凌贤龙. 线粒体 DNA 缺失 SK-Hep1 细胞转线粒体模型的建立及生物学特性分析[J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(1): 107-112.

[6] 张国桥, 凌贤龙, 陈正堂. 线粒体 DNA 缺失肝癌细胞内活性氧、线粒体膜电位变化实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 711-713.

[7] Cortopassi G A, Wong A. Mitochondria in organismal aging and degeneration[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1410(2): 183-193.

[8] Korsmeyer S J, Shutter J R, Veis D J, *et al*. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death[J]. Semin Cancer Biol, 1993, 4(6): 327-332.

[9] Daniel P T, Schulze-Osthoff K, Belka C, *et al*. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins[J]. Essays Biochem, 2003, 39: 73-88.

（编辑　王　红）