

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00374

· 论 著 ·

鱼藤素对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 线粒体通透性转换孔的作用

杜 佳, 邓华瑜*, 姜 蓉, 陈 黎

重庆医科大学病理生理学教研室, 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究鱼藤素对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 线粒体通透性转换孔的作用。**方法** MTT 法检测鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制作用; Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率; 罗丹明 123 单染法观察线粒体膜电位变化; 蛋白免疫印迹法检测细胞质中 Cyt c 的表达; 分光光度法检测 caspase-3 蛋白活性; Fluo-3/AM 荧光指示剂检测细胞内钙离子浓度变化; RT-PCR 和蛋白免疫印迹法检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 及其蛋白表达。**结果** 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞增殖具有明显的抑制作用, 呈时效和量效依赖关系 ($P < 0.05$); 鱼藤素处理细胞后, 细胞线粒体膜电位降低, 细胞质内 Cyt c 蛋白表达水平升高, caspase-3 活性明显提高, 与未处理组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。流式细胞术检测显示细胞凋亡率和细胞内钙离子浓度随鱼藤素浓度的增加而增多; RT-PCR 和蛋白印迹检测结果发现鱼藤素能使 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达减少, 而 Bax 表达增加。**结论** 鱼藤素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖抑制、诱导凋亡作用可能与细胞内钙超载, Bcl-2 和 Bax 表达改变影响线粒体通透性转换孔开放, 诱导线粒体膜电位降低及 Cyt c 释放有关。

[关键词] 鱼藤素; 乳腺肿瘤; Bcl-2; Bax; 钙离子**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0374-06

Effect of deguelin on mitochondrial permeability transition pore of human breast cancer cell line MDA-MB-231

DU Jia, DENG Hua-yu*, JIANG Rong, CHEN Li

Department of Pathophysiology, Laboratory for Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of deguelin on mitochondrial permeability transition pore of human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** The inhibitory effect of deguelin on cell proliferation was determined by MTT assay; cell apoptosis rate was analyzed by flow cytometry with Annexin V FITC/PI double staining; MDA-MB-231 cells were stained by Rhodamine123 to detect the changes of mitochondrial transmembrane potential by FCM; alteration of protein of Cyt c outside of mitochondria was detected by Western blotting analysis; caspase-3 activity was assessed by colorimetric assay; and MDA-MB-231 cells were stained by Fluo-3/AM to detect changes of intracellular Ca^{2+} concentration by FCM. The expression of Bcl-2 and Bax was examined by RT-PCR and Western blotting analysis. **Results** Deguelin significantly inhibited the growth of MDA-MB-231 cells in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.05$). After treatment with deguelin, mitochondrial transmembrane potential was decreased, the expression of Cyt c outside of mitochondria was increased, and caspase-3 activity was significantly increased compared with negative control group ($P < 0.01$). FCM analysis showed that the apoptotic rate of MDA-MB-231 cells and intracellular Ca^{2+} concentration increased gradually with the increase of deguelin concentration. RT-PCR and Western blotting analysis showed that the expression of Bcl-2 mRNA and protein was down-regulated and that of Bax was up-regulated after deguelin treatment. **Conclusion** Deguelin can inhibit proliferation and induce apoptosis of MDA-MB-231 cells, and the induction of apoptosis might be related to increased intracellular Ca^{2+} concentration and changes of mitochondrial permeability transition pore induced by altered Bcl-2, Bax expression.

[Key words] deguelin; breast neoplasms; Bcl-2; Bax; calcium iron

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(4): 374-379]

在线粒体凋亡途径中, 线粒体通透性转换 (mitochondrial permeability transition, MPT) 改变是决定凋亡起始的关键环节。MPT 改变与线粒体通透

性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放有关。目前研究表明, MPTP 的开放直接引起细胞凋亡发生。在致凋亡因子的刺激

[收稿日期] 2009-08-03 **[接受日期]** 2010-01-06**[作者简介]** 杜 佳, 硕士生. E-mail: xiaodu7890@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485082, E-mail: cqdenghy@yahoo.com.cn

下, MPTP 开放, 导致线粒体跨膜电位下降或消失、线粒体膜间隙中凋亡相关蛋白(如 Cyt c、AIF 等)释放入胞质, 发生细胞凋亡^[1]。

鱼藤素是从豆科家族绢毛萌豆(*Mundulea sericea*)中提取的一种黄酮类化合物, 具有抗病毒、抗肿瘤作用^[2-3]。鱼藤素可通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡, 对多种进展期肿瘤发挥治疗作用^[4-7]。诱导凋亡是鱼藤素抗肿瘤作用的重要机制。鱼藤素对肿瘤细胞的诱导凋亡效应可能与其对 MPTP 开放调控作用启动了线粒体凋亡途径有关, Hail 等^[8]报道鱼藤素可通过促进 MPT、降低线粒体膜电位方式诱导皮肤癌细胞凋亡。

本研究采用鱼藤素体外诱导乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡, 观察细胞线粒体膜电位变化, 胞质中 Cyt c、caspase-3 活性变化, 细胞内 Ca^{2+} 浓度, 以及细胞内 Bcl-2、Bax mRNA 及蛋白表达情况, 探讨鱼藤素对 MPTP 的作用, 进一步了解鱼藤素诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 鱼藤素: ALEXIS 公司, 纯度 95.6%, 用二甲亚砜(DMSO)溶解配成 10 mmol/L 的储存液, 等量分装, -20℃ 保存, 临用前用 RPMI 1640 稀释成各种浓度, 将 DMSO 浓度控制在 0.1% 以下。RPMI 1640 干粉培养基, Gibco 公司。新生牛血清: 杭州四季青公司。MTT 和罗丹明 123, Sigma 公司。Caspase-3 活性检测试剂盒: 碧云天生物技术研究所。钙离子荧光指示剂 Fluo-3/AM: Biotium 公司。Annexin V-FITC/PI 试剂盒: 深圳晶美生物有限公司。细胞线粒体分离试剂盒: 碧云天生物技术研究所。小鼠抗人 Cyt c、Bax、Bcl-2、 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 均购自美国 Santa Cruz 公司。RT-PCR 试剂盒: 日本东洋纺生物有限公司。PCR 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。流式细胞仪: 美国 FACSCAN Becton Dickison; 酶标仪: 美国 Bio-Rad 公司 Model 1550 型; PAGE 凝胶电泳仪、垂直电泳槽、PCR 扩增仪、电泳凝胶图像分析系统均购自 Bio-Rad 公司。

1.2 细胞培养 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株由本室保存。将 MDA-MB-231 细胞接种于含 10% 新生牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 置 37℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养。当细胞长满培养瓶瓶底 80% 左右, 用 0.1% 的胰酶溶液消化传代。

1.3 MTT 法测定细胞增殖 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞, 调整细胞密度为 5×10^7 /L。接种于

96 孔培养板, 每孔接种细胞悬液 200 μ l。设未加药细胞组、鱼藤素实验组(终浓度为 400、800、1 200 nmol/L; 细胞接种 24 h 后加药), 每组设 5 个平行孔。置 37℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养。分别培养 24、48 和 72 h 后弃上清, 每孔加入无血清 RPMI 1640 培养液 200 μ l 及 MTT(5 g/L)20 μ l 继续培养 4 h, 取出后 $1\ 000 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 每孔加 200 μ l DMSO 振荡 10 min, 用酶标仪测定波长 570 nm 的光密度(D_{570})值。实验重复 3 次, 取平均值。计算细胞生长抑制率, 计算公式: 细胞生长抑制率(%) = $(1 - \text{加药组平均 } D_{570} / \text{未加药组平均 } D_{570}) \times 100\%$ 。根据抑制率, 求取中效浓度, 确定后续实验鱼藤素采用浓度。

1.4 Annexin V/PI 双标法流式细胞术检测细胞凋亡 常规培养 MDA-MB-231 细胞, 接种 24 h 后, 用终浓度为 0、800、1 200 nmol/L 鱼藤素处理 48 h 后收集细胞, 以 0 nmol/L 鱼藤素为对照。PBS 洗涤 2 次, 将细胞悬浮于 500 μ l 结合缓冲液中, 加入 10 μ l Annexin V-FITC 混匀, 4℃ 静置 20 min, 加入 5 μ l PI 室温避光 15 min。应用流式细胞仪检测早期凋亡细胞(Annexin V-FITC 阳性而 PI 阴性)百分率。

1.5 罗丹明 123 单染法检测鱼藤素对细胞线粒体膜电位的影响 细胞处理同 1.4 项。收集细胞, 经 PBS 离心洗涤 2 次, 加 100 μ l PBS 重悬细胞, 再加入 4 μ mol/L 罗丹明 123(一种能被线粒体摄取的阳离子亲脂染料, 细胞内罗丹明 123 的摄取量与线粒体跨膜电位变化呈正相关), 使其终浓度为 2 μ mol/L, 37℃ 避光孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次。流式细胞仪检测细胞荧光强度, 检测条件: 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm。

1.6 流式细胞仪检测细胞内钙离子浓度 Fluo-3/AM 是第 3 代钙离子荧光指示剂, 其不能与游离钙离子结合, 但能穿过细胞膜进入细胞内。Fluo-3/AM 进入细胞后可被细胞内非特异性酯酶水解成 Fluo-3, 后者与细胞内游离钙离子结合发出荧光, 荧光强度和细胞内游离钙离子的含量成正比。Fluo-3/AM 用 DMSO 配成 1 mmol/L 储存液, 等量分装, -20℃ 避光保存, 临用前用 PBS 稀释成工作浓度。

细胞处理同 1.4 项。用 0.1% 胰酶(不含 EDTA)消化收集细胞。应用 Fluo-3/AM(其负载浓度为 1 μ mol/L, 37℃ 避光孵育 1 h)、参照文献方法^[9]测定和计算 $IECa^{2+}$ ($IECa^{2+} = \text{受 Fluo-3/AM 作用后细胞荧光强度平均道数} / \text{无 Fluo-3/AM 作用细胞荧光强度平均道数} \times 1\ 000$)。

1.7 蛋白质免疫印迹法检测细胞内 Bcl-2、Bax 及细

胞质中 Cyt c 蛋白表达

1.7.1 细胞内 Bcl-2、Bax 蛋白表达检测 常规培养 MDA-MB-231 细胞,接种 24 h 后实验组加入 800 nmol/L 鱼藤素,对照组加入相等体积的培养基。48 h 后分别收集各组细胞约 5×10^6 个,用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白。Bradford 法测定蛋白含量。15% SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h 后以特异性抗体 (1:200 Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体,1:200 Bax 鼠抗人单克隆抗体) 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入 1:2 000 羊抗鼠 IgG/HRP 37°C 孵育 2 h, ECL 显色。用 Bio-Rad 图像分析系统照相, Quantity One 4.4.0 软件分析,以相应蛋白条带的灰度值/ β -actin 蛋白条带的灰度值表示相对蛋白含量。实验重复 3 次。

1.7.2 细胞质中 Cyt c 蛋白的提取及检测 细胞处理同 1.7.1。按细胞线粒体分离试剂盒说明分离细胞质和线粒体。收集细胞, PBS 洗涤, 离心收集细胞沉淀, 重悬于线粒体分离试剂中, 匀浆处理, $600 \times g$, 4°C 离心 10 min, 取上清液 $12\ 000 \times g$, 4°C 离心 10 min, 沉淀即为细胞线粒体部分, 取上清液, 进一步离心 ($12\ 000 \times g$, 4°C, 10 min) 留取上清液, 即为去除线粒体的细胞质蛋白, 应用此细胞质蛋白提取液, 进行蛋白质免疫印迹检测 Cyt c 蛋白。Cyt c 鼠抗人单克隆抗体稀释比例为 1:500, 检测方法同 1.7.1 项。

1.8 RT-PCR 检测鱼藤素对 Bcl-2 和 Bax 基因表达的调控

1.8.1 总 RNA 提取 细胞培养、实验分组和药物浓度同 1.7.1 项。用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA, 所提 RNA 溶于 20 μ l 去 RNA 酶水中。核酸定量仪测定 RNA 浓度和纯度, D_{260}/D_{280} 比值在 1.8 2.0 之间, 计算 RNA 含量, 并行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 观察 RNA 完整性。

1.8.2 RT-PCR 反应 按照反转录试剂盒说明书取 1 μ g 总 RNA 行 20 μ l 体系的反转录反应, 反转录为 cDNA 后继续行 PCR 反应以获得目的片段。Bcl-2 上游引物: 5'-GAG GAT TGT GGC CTT CTT TG-3', 下游引物: 5'-ACA GTT CCA CCA AGG CAT CC-3', 扩增产物 170 bp; Bax 上游引物: 5'-TTT GCT TCA GGG TTT CAT CC-3', 下游引物: 5'-CAG TTG AAG TTG CCG TCA GA-3', 扩增产物 216 bp; β -actin 上游引物: 5'-GTC AAG AAA GGG TGT AAC GCA AC-3', 下游引物: 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3', 扩增产物 356 bp。Bcl-2 反应条件: 94°C 预变性 3 min, 94°C 30 s、58°C 30 s、72°C 1 min 30 个循环, 72°C 充分延伸 5

min; Bax 反应条件: 94°C 预变性 3 min, 94°C 30 s、62°C 30 s、72°C 1 min 30 个循环, 72°C 充分延伸 5 min。取扩增产物 5 μ l 行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 用 Bio-Rad 图像分析系统照相, Quantity One 软件分析各扩增条带产物的含量, 以目的条带的灰度值/ β -actin 蛋白条带的灰度值表示。

1.9 分光光度法检测 caspase-3 蛋白活性 细胞培养、实验分组和药物浓度同 1.7.1 项。加药后各组细胞分别培养 24、48、72 h。待药物作用达到规定时间点时, 收集实验组和对照组细胞, 按照 100 μ l/ 2×10^6 细胞比例加入裂解液, 冰浴裂解 15 min。4°C、16 000 $\times g$ 离心 15 min; 取上清液, Bradford 法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度为 3 mg/ml。96 孔培养板设立空白组和实验检测组, 空白组孔加入检测缓冲液 90 μ l, 实验检测组孔加入 80 μ l 检测缓冲液及 10 μ l 待测样品, 适当混匀后, 每孔加入 10 μ l Ac-DEVD-pNA (caspase-3 底物), 于 37°C 避光孵育 4 h。用酶标仪测定波长 405 nm 的光密度 (D_{405}) 值反映 caspase-3 蛋白活性。

1.10 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 12.0 统计软件进行处理, 采用两独立样本均数的 t 检验、多样本均数比较的方差分析和多重比较的 SNK- q 检验进行比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 MTT 结果显示, 鱼藤素作用各实验组细胞生长受到抑制, 随药物浓度增加, 作用时间延长, 抑制率亦增大, 呈时效、量效依赖关系。不同浓度和不同时间之间的抑制率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 1)。计算中效浓度: 直线回归方程 $Y = 0.03X + 16.89$, 鱼藤素作用 48 h、细胞抑制率 50% 的药物浓度 (IC_{50}) 为 1 308.58 nmol/L。后续相关实验选用的药物浓度为 800、1 200 nmol/L。

表 1 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞的生长抑制作用

Table 1 Inhibition of MDA-MB-231 cells growth by deguelin ($n = 15, \bar{x} \pm s, \%$)

Deguelin cB/(nmol · L ⁻¹)	Time after treatment with deguelin t/h		
	24	48	72
400	4.33 ± 1.64	26.23 ± 2.16	49.89 ± 1.32
800	9.63 ± 0.80	38.73 ± 2.34	57.86 ± 1.82
1 200	15.24 ± 2.10	46.48 ± 1.46	69.43 ± 2.31

Analysis of variance. $F = 149.26, P < 0.01$ among different treatment time groups; $F = 15.60, P < 0.05$ among different concentration groups

2.2 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响 Annexin V-PI 双标法检测显示:随着鱼藤素浓度增加,细胞发生早期凋亡,且凋亡率呈递增趋势。与对照组比较,实验组凋亡率明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响 800、1 200 nmol/L 鱼藤素处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,用 FCM 检测细胞内荧光强度的变化,发现经鱼藤素处理过的 MDA-MB-231 细胞中弱荧光部分细胞所占百分比逐渐增多,分别为 $(43.06 \pm 2.14)\%$ 、 $(93.15 \pm 4.52)\%$,与对照组 $[(32.52 \pm 0.89)\%]$ 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。表明鱼藤素处理后,MDA-MB-231 细胞的线粒体膜电位强度受到影响而下降,导致进入细胞内的荧光染料减少,荧光变弱(图 1)。

2.4 细胞内钙离子浓度的变化 鱼藤素处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞内钙离子浓度增加,随着药物浓度增加,细胞内钙离子浓度呈递增趋势($P < 0.01$,表 2)。

表 2 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞早期凋亡和细胞内钙离子浓度的影响

Tab 2 Effect of deguelin on early apoptosis and intracellular Ca^{2+} concentration of MDA-MB-231 cells

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Deguelin $c_B/(nmol \cdot L^{-1})$	Early apoptosis rate(%)	IECa ²⁺
0(Control)	3.59 ± 0.3	$3\ 365.85 \pm 55.8$
800	$15.5 \pm 1.1^{**}$	$4\ 828.64 \pm 52.97^{**}$
1 200	$34.33 \pm 1.44^{**\Delta\Delta}$	$6\ 442.92 \pm 76.18^{**\Delta\Delta}$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 800 nmol/L deguelin group

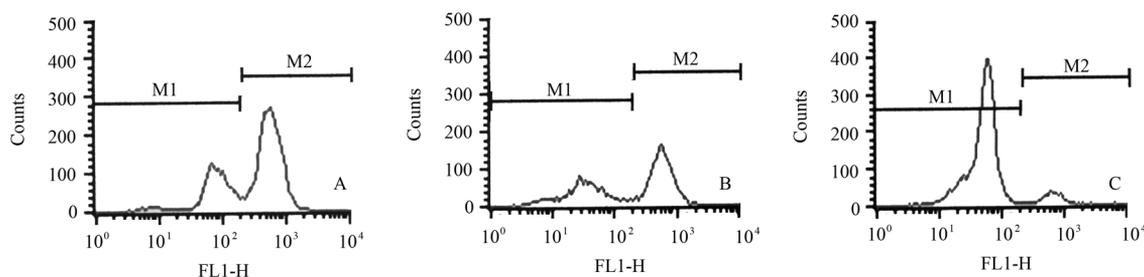


图 1 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞线粒体膜电位的影响

Fig 1 Changes in mitochondrial membrane potential of MDA-MB-231 cells induced by deguelin

A: Control group; B: 800 nmol/L deguelin group; C: 1 200 nmol/L deguelin group

2.5 鱼藤素对 Cyt c、Bcl-2、Bax 表达的影响 蛋白印迹检测显示,800 nmol/L 鱼藤素处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞质内 Cyt c 蛋白和细胞内 Bax 蛋白表达增加,细胞内 Bcl-2 蛋白表达降低,与对照

组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$,图 2)。RT-PCR 检测显示,细胞内 Bcl-2 和 Bax 在 mRNA 水平上的表达与蛋白水平一致(图 3)。

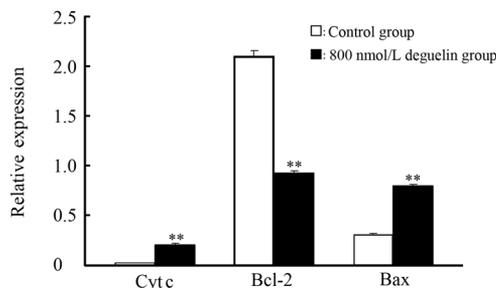
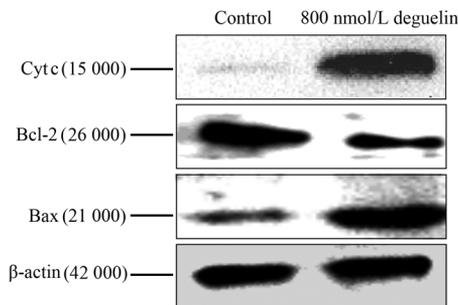


图 2 鱼藤素对 Cyt c、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

Fig 2 Expression of Cyt c, Bcl-2 and Bax protein in MDA-MB-231 cells

** $P < 0.01$ vs control group; $n=3, \bar{x} \pm s$

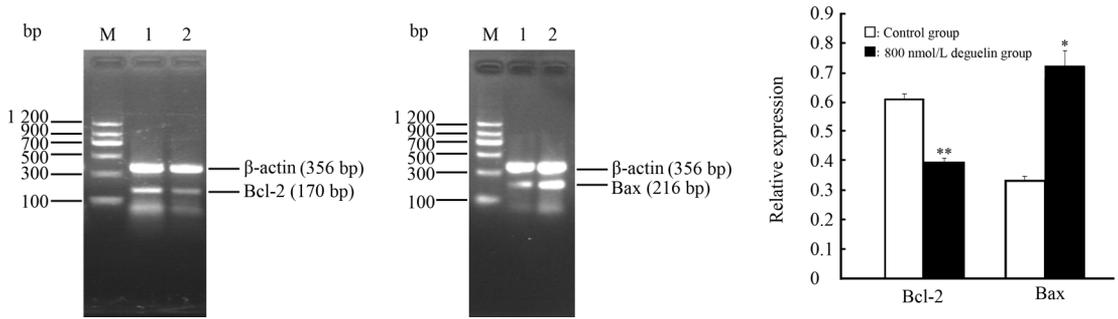


图3 MDA-MB-231细胞内 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的表达

Fig 3 Expression of Bcl-2 mRNA and Bax mRNA in MDA-MB-231 cells

M: DNA marker; 1: Control group; 2: 800 nmol/L deguelin group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.6 鱼藤素对 caspase-3 蛋白活性的影响 800 nmol/L 鱼藤素处理 24 h 后, caspase-3 活性增加, 48 h 达高峰, 后逐渐下降, 但各时间点与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。

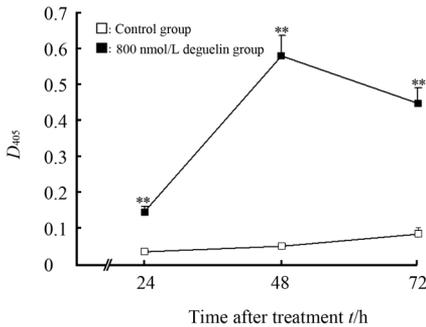


图4 鱼藤素对 caspase-3 蛋白活性的影响

Fig 4 Effect of deguelin on caspase-3 activity in MDA-MB-231 cells

** $P < 0.01$ vs control group. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

在细胞凋亡信号转导途径中, 线粒体凋亡途径是近年来研究的热点。线粒体在细胞凋亡过程中起着中心控制作用, 凋亡的线粒体事件中最重要的就是线粒体结构和功能的改变导致一系列凋亡相关蛋白从线粒体释放到细胞质^[10]。线粒体内膜通透性增加是凋亡信号转导的早期事件, 线粒体内膜跨膜电位 ($\Delta\psi_m$) 是反映线粒体内膜通透性的最佳指标之一, MPTP 在维持线粒体膜通透性方面具有重要作用。各种死亡信号诱导 MPTP 开放, 引起线粒体跨膜电位下降, 导致促凋亡物质释放, 继而激活 caspase, 引发细胞凋亡^[11-12]。MPTP 被称为细胞生死开关, 是由线粒体内膜的腺苷转移酶 (adenine nucleotide translocator, ANT)、外膜的电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)、基质亲环素 D (cyclophilin D, CYPD)、外室

的肌酸激酶、胞质中己糖激酶和外周苯二氮受体 (periphery benzodiazepine receptor, PBR) 在线粒体内外膜交接处构成的一种孔道复合物^[13]。MPTP 开放可使离子在线粒体内膜两侧达到平衡, 导致 $\Delta\psi_m$ 降低; 另一方面, 水分子进入基质, 导致基质膨胀, 外膜表面积远远小于内膜, 易于破裂, 释放出膜间促凋亡蛋白, 最终引起细胞凋亡。MPTP 具有感受器的功能, ATP、ADP、高浓度 Ca^{2+} 、氧化应激、Bcl-2 蛋白家族均对 MPTP 有重要的调控作用。Fulda 和 Kroemer^[14] 报道特异性 MPTP 抑制剂 Bongkreic acid (ANT 的拮抗性配基) 或环孢素 (cyclophilin D 的配基) 能阻止多种模型的凋亡, 相反, atractyloside (ANT 的激动剂) 导致的 MPTP 开放诱导线粒体基质肿胀和细胞凋亡。

Ca^{2+} 是细胞代谢活动中重要的第二信使, 参与了凋亡早期和凋亡执行阶段的信号转导机制, 尤其是在凋亡的早期阶段。 Ca^{2+} 是 MPTP 重要的激活物, VDAC 表面存在 Ca^{2+} 结合位点, 当线粒体内游离 Ca^{2+} 浓度 $> 10 \mu\text{mol/L}$ 时, Ca^{2+} 可与 MPTP 上的金属位点结合, 激发 MPTP 开放。Carboni 等^[15] 提出了钙离子依赖性的 MPTP 调节模式, 认为 MPTP 有低导性和高导性两种不同开放模式, 前者是一种可逆的正常调节过程, 后者为不可逆的细胞死亡信号。两种方式均受线粒体 Ca^{2+} 浓度的升高直接或间接调控。当线粒体 Ca^{2+} 超载, 激发的 MPTP 开放使线粒体膜电位下降, 最终诱导细胞凋亡。本研究发现, 鱼藤素对 MDA-MB-231 细胞具有增殖抑制作用; 800、1 200 nmol/L 鱼藤素处理 MDA-MB-231 细胞 48 h, 能以剂量依赖方式诱导细胞凋亡, 细胞内 Ca^{2+} 浓度与细胞早期凋亡率呈一致递增趋势, 提示鱼藤素可通过细胞内 Ca^{2+} 浓度增加激发 MPTP 开放, 诱导细胞凋亡。但鱼藤素是影响细胞外钙的内流, 还是调整细胞内钙库的释放, 尚需进一步研究。

细胞凋亡是一个多基因参与的网络式精细调控

过程。Bcl-2 家族是目前研究最深入的凋亡调控基因,广泛分布在线粒体外膜、核膜和内质网上,可分为 Bcl-2、Bcl-x_L 等抗凋亡蛋白和 Bax、Bak 等促凋亡蛋白。Bcl-2 是一种线粒体膜蛋白质,有抑制凋亡和提高细胞存活力的作用;Bax 是 Bcl-2 家族成员,在线粒体凋亡调节途径中起促进凋亡的作用。在依赖线粒体的凋亡途径中,Bcl-2 家族蛋白主要功能是调节线粒体的膜通透性。研究认为 Bax 可能与 MPTP 的组成部分 VDAC 邻近,能使 VDAC 结构发生改变失去电压依赖性和对离子通透性的选择,从而导致 Cyt c 释放^[16];另外,Bax 可直接与 ANT 结合,提高苍术苷诱导 MPTP 开放的敏感性^[17]。而 Bcl-2、Bcl-x_L 等可通过与 Bax 竞争性结合,或直接阻止 Bax 与 ANT、VDAC 的结合发挥抗凋亡作用。Bcl-2 与 Bax 的比值是决定细胞接受致病信号刺激后成活与否的关键因素。当 Bcl-2/Bax 比值下降,诱导细胞凋亡。本研究通过蛋白质免疫印迹和 RT-PCR 检测发现,800 nmol/L 鱼藤素处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达水平均降低,Bax 表达升高,Bcl-2/Bax 比值下降;说明在基因、蛋白水平,鱼藤素诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡的机制与 Bcl-2 和 Bax 表达改变有关,鱼藤素可能通过调控 Bcl-2 和 Bax 表达水平诱导 MPTP 开放,促进细胞凋亡。

由此提示,在鱼藤素诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的机制中,诱导 MPTP 开放,改变线粒体通透性转换孔具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Liu J, He H, Zhang Z, Jiang S, Akahoshi T, Yang J, et al. Mitochondria play a role in the development of non-apoptotic programmed cell death of neutrophils induced by ONO-AE-248 [J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4: 447-453.
- [2] Kinghorn A D, Su B N, Jang D S, Chang L C, Lee D, Gu J Q, et al. Natural inhibitors of carcinogenesis [J]. *Planta Med*, 2004, 70: 691-705.
- [3] Takatsuki A, Nakatani N, Morimoto M, Tamura G, Matsui M, Arima K, et al. Antiviral and antitumor antibiotics. X X. Effects of rotenone, deguelin, and related compounds on animal and plant viruses [J]. *Appl Microbiol*, 1969, 18: 660-667.
- [4] Oh S H, Woo J K, Yazici Y D, Myers J N, Kim W Y, Jin Q, et al. Structural basis for depletion of heat shock protein 90 client proteins by deguelin [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99: 949-961.
- [5] Dell'Eva R, Ambrosini C, Minghelli S, Noonan D M, Albini A, Ferrari N. The Akt inhibitor deguelin, is an angiopreventive agent also acting on the NF-kappaB pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28: 404-413.
- [6] Li R, Chen Y, Shu W X, Chen Z, Ke W J. Involvement of SRC-3 in deguelin-induced apoptosis in Jurkat cells [J]. *Int J Hematol*, 2009, 89: 628-635.
- [7] Chen Y, Wu Q, Cui G, Chen Y Q, Li R. Deguelin blocks cells survival signal pathways and induces apoptosis of HL-60 cells *in vitro* [J]. *Int J Hematol*, 2009, 89: 618-623.
- [8] Hail N Jr, Lotan R. Apoptosis induction by the natural product cancer chemopreventive agent deguelin is mediated through the inhibition of mitochondrial bioenergetics [J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 437-447.
- [9] 尹格平, 郝天羽, 袁玮, 陈铭, 杨树君, 陈诵芬. 妊高征患者外周血红细胞内钙含量测定及其临床价值 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2001, 9: 20-23.
- [10] Heath-Engel H M, Shore G C. Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling and apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(5-6): 549-560.
- [11] Sharov V G, Todor A, Khanal S, Imai M, Sabbah H N. Cyclosporine A attenuates mitochondrial permeability transition and improves mitochondrial respiratory function in cardiomyocytes isolated from dogs with heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42: 150-158.
- [12] Mullauer F B, Kessler J H, Medema J P. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion [J]. *Apoptosis*, 2009, 14: 191-202.
- [13] Juhaszova M, Wang S, Zorov D B, Nuss H B, Gleichmann M, Mattson M P, et al. The identity and regulation of the mitochondrial permeability transition pore: where the known meets the unknown [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1123: 197-212.
- [14] Fulda S, Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers [J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14(17-18): 885-890.
- [15] Carboni G L, Gao B, Nishizaki M, Xu K, Minna J D, Roth J A, et al. CACNA2D2-mediated apoptosis in NSCLC cells is associated with alterations of the intracellular calcium signaling and disruption of mitochondria membrane integrity [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 615-626.
- [16] Kumarswamy R, Chandna S. Putative partners in Bax mediated cytochrome-c release: ANT, CypD, VDAC or none of them [J]? *Mitochondrion*, 2009, 9: 1-8.
- [17] Shimizu S, Tsujimoto Y. Proapoptotic BH3-only Bcl-2 family members induce cytochrome c release, but not mitochondrial membrane potential loss, and do not directly modulate voltage-dependent anion channel activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 577-582.

[本文编辑] 孙岩