

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01324

抑制线粒体呼吸链复合物 I 活性对结肠癌细胞 Caco2 迁移侵袭能力的影响

王卫星[△], 袁 扬[△], 刘敬禹, 江 旭, 杨继金*

第二军医大学长海医院介入放射科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨抑制线粒体呼吸链复合物 I 活性对结肠癌细胞 Caco2 迁移侵袭能力的影响及其可能的机制。

方法 体外培养的 Caco2 给予线粒体呼吸链复合物 I 活性抑制物鱼藤酮处理(1 μmol/L), 采用比色法检测线粒体呼吸链复合物 I 的活性; 通过 Transwell 小室实验检测 Caco2 细胞迁移、侵袭能力; 通过流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS)水平。

结果 1 μmol/L 鱼藤酮干预 Caco2 细胞 48 h 后, 胞内线粒体呼吸链复合物 I 活性低于未干预组($P < 0.01$); Transwell 实验结果显示, 1 μmol/L 鱼藤酮干预组细胞的迁移率(30.4 ± 1.4)%、侵袭率(20.3 ± 1.0)%均高于未干预组 Caco2 细胞的迁移率(22.6 ± 1.4)%和侵袭率(15.2 ± 1.3)%, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); 鱼藤酮干预组 Caco2 细胞内 ROS 水平(5.68 ± 0.44)%高于未干预组(3.46 ± 0.30)%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。 **结论** 抑制线粒体呼吸链复合物 I 活性可能通过增加胞内 ROS 水平的方式增强结肠癌细胞的迁移侵袭能力。

[关键词] 线粒体; 呼吸链复合物 I; 结肠肿瘤; 肿瘤转移; 细胞迁移; 细胞侵袭; 活性氧

[中图分类号] R 735.35 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)12-1324-05

Effect of inhibiting mitochondrial respiratory chain complex I on migration and invasion capacity of colon cancer cell line Caco2

WANG Wei-xing[△], YUAN Yang[△], LIU Jing-yu, JIANG Xu, YANG Ji-jin*

Department of Interventional Radiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of inhibiting mitochondrial respiratory chain complex I on the migration and invasion capacity of colon cancer cell line Caco2, and to explore the possible molecular mechanism. **Methods** Human colon cancer cell line Caco2 was treated with 1 μmol/L rotenone *in vitro*. Then the relative activity of mitochondrial respiratory chain complex I was examined by chromatometry, the capacity of cell migration and invasion was determined by transwell assay, and the reactive oxygen species (ROS) level in cells was determined using flow cytometry. **Results** The activity of mitochondrial respiratory chain complex I of Caco2 cells treated with 1 μmol/L rotenone was significantly lower than that of the untreated cells ($P < 0.01$). In addition, Transwell assay showed that the cell migration rate and invasive rate in Caco2 cells treated with rotenone were significantly higher than those in untreated Caco2 cells after 48 h (migrant rate [30.4 ± 1.4]% vs [22.6 ± 1.4]%, invasive rate [20.3 ± 1.0]% vs [15.2 ± 1.3]%, $P < 0.01$). Furthermore, the ROS level in the rotenone treated cells was significantly higher than that in untreated cells ([5.68 ± 0.44]% vs [3.46 ± 0.30]%, $P < 0.01$). **Conclusion** Our data suggest that inhibiting the activity of mitochondrial respiratory chain complex I may promote cell migration and invasion by increasing ROS production in colon cancer cells.

[Key words] mitochondria; respiratory chain complex I; colon neoplasms; neoplasm metastasis; cell migration; cell invasion; reactive oxygen species

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(12):1324-1328]

[收稿日期] 2015-01-28 **[接受日期]** 2015-06-02

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81000932), 上海市自然科学基金(11ZR1447700). Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (81000932) and Natural Science Foundation of Shanghai (11ZR1447700).

[作者简介] 王卫星, 博士, 副主任医师. E-mail: wxwang1969@163.com; 袁 扬, 硕士, 助理研究员. E-mail: iamyuanyang@163.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-31162170, E-mail: jijinyang@sina.com

结肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一^[1-2]。近年来,随着人民生活水平的提高和饮食结构的变化,结肠癌的发病率呈逐年上升趋势。尽管随着手术以及化疗等技术的日臻完善,结肠癌患者的生存期得到了有效的延长,但长期疗效仍不理想。造成结肠癌患者长期生存率低下的主要原因为肿瘤的复发和转移^[1-2]。

线粒体是真核生物细胞中重要的细胞器,被认为是调节细胞功能的多信号通路综合平台,其对真核生物的生存、发育、衰老和疾病的发生等具有重要的调控作用^[3-4]。线粒体呼吸链位于线粒体内膜上,由 5 个复合物组成,复合物 I 是线粒体呼吸链上的第一个同时也是最大的一个呼吸复合物^[5]。线粒体呼吸链通过一系列的氧化还原过程最终形成三磷酸腺苷(ATP),为细胞提供能量。以往研究结果显示,线粒体呼吸链功能异常可导致多种线粒体疾病如线粒体肌病、共济失调并发色素性视网膜炎等,严重威胁身体健康^[6-7]。但目前,有关线粒体呼吸链功能异常对肿瘤细胞生物学活性的研究较少。本研究采用线粒体呼吸链复合物 I 的特异性抑制剂鱼藤酮干预体外培养的结肠癌细胞株 Caco2,继而通过细胞学实验检测抑制线粒体呼吸链复合物 I 活性对 Caco2 细胞迁移、侵袭能力的影响,从而探讨线粒体呼吸链复合物 I 在结肠癌转移发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 结肠癌细胞株 Caco2 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)购自 Invitrogen 公司,Transwell 小室购自 BD 公司,鱼藤酮及 Matrigel 购自 Sigma 公司,线粒体呼吸链复合物 I 活性及胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平检测试剂盒购自 GENMED 公司。

1.2 细胞培养 Caco2 细胞使用 DMEM(含 10% FBS)培养基于 5% CO₂、37℃ 条件下培养。培养至对数生长期后在培养基中添加鱼藤酮至终浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 μmol/L。48 h 后检测细胞内线粒体呼吸链复合物 I 活性。

1.3 线粒体呼吸链复合物 I 活性检测 线粒体呼吸链复合物 I 活性检测按照试剂盒说明书操作:取 1×10⁷ 细胞,加入 1 mL 细胞裂解液,充分混匀裂解细胞,4℃,15 000×g 离心 10 min,取上清,4℃ 保存待用;设定分光光度计测量波长为 340 nm,并置零;

取 500 μL 缓冲液,加入 500 μL 反应液及 500 μL 阴性液混合,测量值作为背景值;500 μL 细胞裂解液,加入 500 μL 缓冲液及 500 μL 反应液混合均匀,测量值作为数据值;特异性呼吸链复合物 I 活性=数据值-背景值。

1.4 细胞迁移能力检测 Transwell 小室放入预先每孔加有 600 μL 培养基(含 10% FBS 的 24 孔板内,随后在 Transwell 的内室加入 100 μL Caco2 细胞悬液(含 0.1% FBS 的培养基,1×10³/孔),37℃ 培养 24 h 后取出 Transwell 小室。用棉签擦去黏附于膜上室面的细胞后将膜置于 70% 乙醇常温固定 30 min,0.1% 结晶紫常温染色 10 min,清水漂净,显微镜下计数显色细胞,计算迁移细胞占总细胞的百分比。

1.5 细胞侵袭能力检测 Matrigel(5 μg/mL)稀释液包被 Transwell 小室底部膜的上室面,无菌条件下 4℃ 干燥。随后把 Transwell 小室倒置,在 Transwell 小室的膜的下室面预涂纤连蛋白(10 μg/mL),37℃ 静置 2 h。PBS 漂洗一遍后,放入预先每孔加有 600 μL 培养基(含 10% FBS)的 24 孔板内,随后在 Transwell 的内室加入 100 μL Caco2 细胞悬液(含 0.1% FBS 的培养基,1×10³/孔),37℃ 培养 24 h 后取出 Transwell 小室。用棉签擦去黏附于膜上室面的细胞后将膜置于 70% 乙醇中常温固定 30 min,0.1% 结晶紫常温染色 10 min,清水漂净,显微镜下计数显色细胞,计算侵袭细胞占总细胞的百分比。

1.6 胞内 ROS 水平检测 取 1×10⁷ 细胞,500×g 离心弃上清;用清理液洗涤细胞 1 次;加入 2 mL 含有染色液和稀释液的染色工作液,轻柔混匀,放进 37℃ 恒温水槽避光孵育 20 min;500×g 离心 5 min,弃上清后加入预冷的 500 μL 保存液,轻柔混匀细胞颗粒群,行细胞流式术分析荧光细胞比例。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析(ANOVA),检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Caco2 细胞线粒体呼吸链复合物 I 活性 结果显示 1.0、1.5、2.0 μmol/L 处理组线粒体呼吸链复合物 I 活性均低于 0 μmol/L 处理组($P < 0.01$),而 1.0、1.5、2.0 μmol/L 处理组间呼吸链复合物 I 的活性差异无统计学意义(图 1)。因此,本研究选择 1.0 μmol/L 鱼藤酮处理细胞。

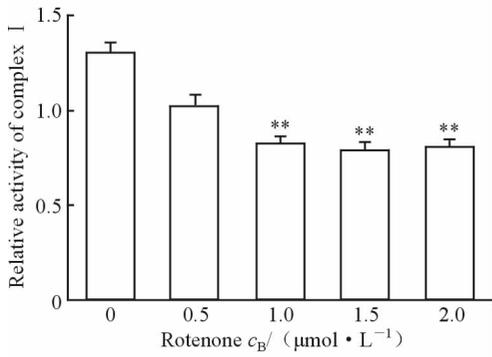


图1 鱼藤酮对 Caco2 细胞线粒体呼吸链复合物 I 活性的影响
 Fig 1 Activity of mitochondrial respiratory chain complex I in Caco2 cells treated with or without rotenone

** $P < 0.01$ vs control ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

2.2 Caco2 细胞迁移能力 通过 Transwell 小室实验对细胞的体外迁移能力进行检测,结果显示,经鱼藤酮处理的 Caco2 细胞迁移率为 $(30.4 \pm 1.4)\%$,高于未处理 Caco2 细胞的迁移率 $(22.6 \pm 1.4)\%$,差异

有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。提示鱼藤酮抑制线粒体呼吸链复合物 I 活性后增强了 Caco2 细胞的迁移能力。

2.3 Caco2 细胞侵袭能力 通过 Matrigel 包被的 Transwell 小室实验对细胞的侵袭能力进行检测,结果显示经鱼藤酮干预处理的 Caco2 细胞及未干预的 Caco2 细胞的侵袭率分别为 $(20.3 \pm 1.0)\%$ 和 $(15.2 \pm 1.3)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。提示鱼藤酮抑制线粒体呼吸链复合物 I 活性后增强了 Caco2 细胞的侵袭能力。

2.4 Caco2 细胞 ROS 水平 $1 \mu\text{mol/L}$ 鱼藤酮干预组细胞的 ROS 水平为 $(5.68 \pm 0.44)\%$,高于未干预组 $(3.46 \pm 0.30)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。提示鱼藤酮抑制 Caco2 细胞内线粒体呼吸链复合物 I 活性后可致使胞内 ROS 水平上升,从而增强细胞的迁移侵袭能力。

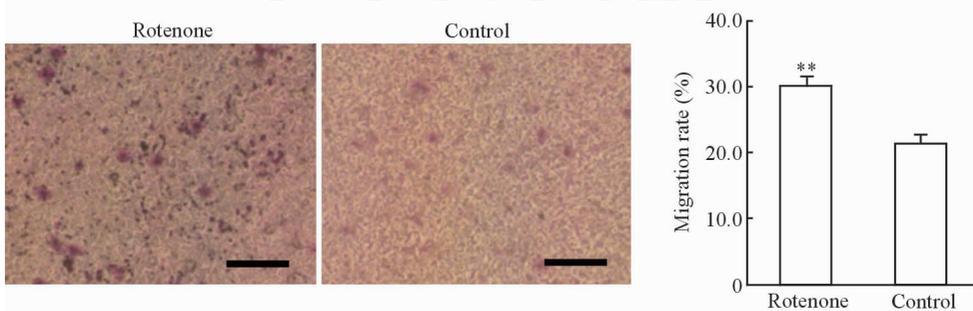


图2 鱼藤酮($1.0 \mu\text{mol/L}$)抑制细胞线粒体呼吸链复合物 I 活性对 Caco2 细胞迁移能力的影响
 Fig 2 Migration capability of Caco2 cells treated with or without rotenone ($1.0 \mu\text{mol/L}$)

Bar = $100 \mu\text{m}$; ** $P < 0.01$ vs control. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

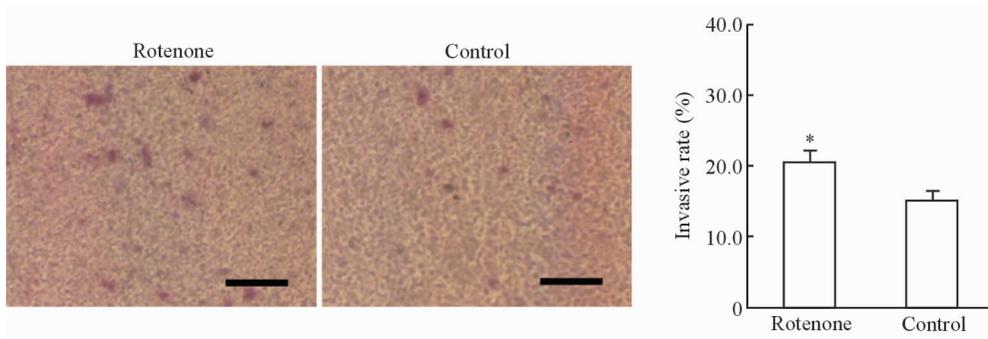


图3 鱼藤酮($1.0 \mu\text{mol/L}$)抑制细胞线粒体呼吸链复合物 I 活性对 Caco2 细胞侵袭能力的影响
 Fig 3 Invasive capability of Caco2 cells treated with or without rotenone ($1.0 \mu\text{mol/L}$)

Bar = $100 \mu\text{m}$; * $P < 0.05$ vs control. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

肿瘤转移是一个多步骤、多环节的过程,其分子机制涉及癌基因、抑癌基因、转移相关基因、生长因

子及其受体、黏附分子及细胞外基质、肿瘤血管、机体免疫等多个环节^[8]。探索肿瘤转移发生机制并开展相应靶向治疗一直是肿瘤研究领域的热点。

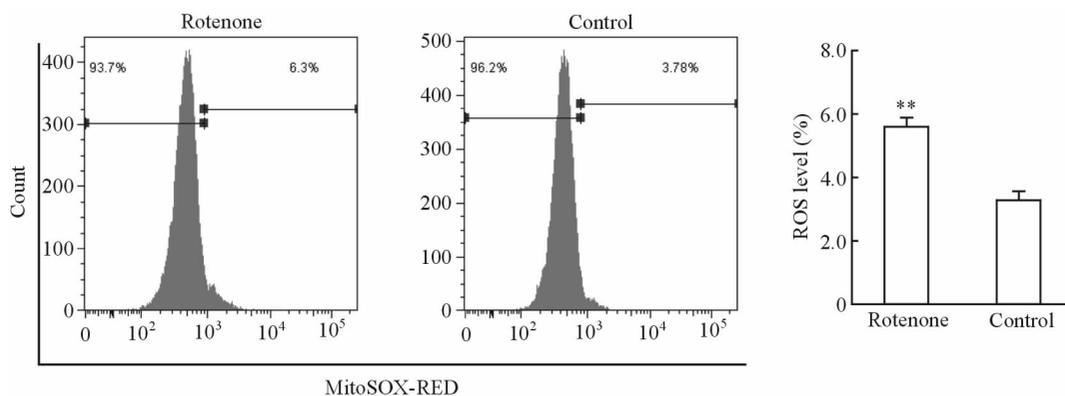


图 4 鱼藤酮(1 $\mu\text{mol/L}$)干预对 Caco2 细胞胞内 ROS 水平的影响

Fig 4 The reactive oxygen species (ROS) level in Caco2 cells treated with of without rotenone (1.0 $\mu\text{mol/L}$)

** $P < 0.01$ vs control. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

线粒体是真核生物细胞中重要的细胞器,随着研究的不断深入,人们对线粒体功能的认识已由最初单纯的“细胞能量工厂”拓展为调节细胞功能的多信号通路综合平台^[3-4]。研究表明,线粒体在合成 ATP 为细胞提供能量的同时,可调节细胞的氧化还原电势和信号转导,进而调控细胞氧化应激、凋亡、基因表达等多种生理反应^[9]。因此线粒体功能对调控真核生物的生存、发育、衰老和疾病的发生等生理过程具有重要的作用^[10-12]。近年来,有研究结果显示在肺癌、肝癌和肾癌等数种肿瘤细胞中检测到线粒体功能障碍^[13-15],因此线粒体功能在肿瘤病因学方面的研究逐渐得到重视。

线粒体呼吸链复合物(也称为线粒体呼吸链酶、线粒体呼吸链复合酶)位于线粒体内膜上,其功能为通过一系列的氧化还原过程最终形成 ATP,为机体组织提供能量。线粒体呼吸链复合物由 5 个复合物组成,线粒体呼吸链复合物 I (也称 CoQ 还原酶、NADH 脱氢酶)在 ATP 的生成过程中发挥关键作用^[5-7]。以往研究显示,线粒体呼吸链复合物 I 功能缺陷导致的 ATP 合成障碍可引起多脏器的损伤^[5-7],但对于线粒体呼吸链复合物 I 在肿瘤发生发展中的作用报道较少。Ishikawa 等^[16]通过细胞杂合技术研究发现,将低转移性的小鼠纤维肉瘤细胞株的线粒体替换为高转移性肿瘤细胞株的线粒体构建的杂合细胞具有与高转移性细胞株一致的高转移能力;反之,将高转移性肿瘤细胞株的线粒体替换为低转移性肿瘤细胞株的线粒体后,杂合细胞不具有高转移能力。进一步的研究显示,高转移性肿瘤细胞中编码线粒体呼吸链复合物 I 亚基的基因突变导

致线粒体呼吸链复合物 I 活性下降可能是导致肿瘤细胞转移活性增强的原因^[16-17]。本研究中,我们通过用线粒体呼吸链复合物 I 的特异性抑制剂鱼藤酮抑制结肠癌细胞 Caco2 线粒体呼吸链复合物 I 活性后,Caco2 的体外迁移及侵袭能力出现明显上升,提示线粒体呼吸链复合物 I 的活性下降可能在结肠癌转移发生过程中发挥重要作用。

ROS 与肿瘤发生发展密切相关^[18]。ROS 的增加可引起羟基游离产物羟基脱氧鸟苷的大量贮积,促进 DNA 突变进而引起细胞氧化磷酸化功能异常。有研究显示,电离辐射所致 DNA 损伤与 ROS 的产生有关,此外多种化学物质在其自发氧化过程中产生的大量 ROS 是其致癌的主要原因^[17]。在细胞内,ROS 是调节电子传递的副产品,而线粒体呼吸链是产生 ROS 的主要来源,其中线粒体呼吸链复合物 I 是调控胞内 ROS 产生的最主要部位^[19]。本研究中,我们通过鱼藤酮特异性抑制 Caco2 的线粒体呼吸链复合物 I 活性后,细胞内 ROS 水平明显上升,由此推测线粒体呼吸链复合物 I 功能下降可能引发了 ROS 在胞内的过量积聚,进而导致了结肠癌细胞转移能力显著增强。

综上,本研究从细胞生物学角度探讨了线粒体呼吸链复合物 I 对结肠癌细胞 Caco2 迁移侵袭能力的影响,结果显示抑制线粒体呼吸链复合物 I 具有增强结肠癌细胞迁移侵袭能力的作用。在以后的研究中,将进一步探索线粒体呼吸链复合物 I 相关基因的变异与线粒体呼吸链复合物 I 活性的相关性并探讨其在结肠癌转移中的作用,以更好地揭示线粒体调控结肠癌转移的机制,从而为结肠癌转移诊断、

预防及治疗提供新的思路和理论基础。

[参考文献]

[1] 刘荫华, 姚宏伟. 结直肠癌外科手术的原则与进展 [J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12: 401-404.

[2] 付金金, 林英豪, 肖冰. 大肠癌的综合治疗 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2013, 18: 115-118.

[3] Scheffler I E. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives [J]. Mitochondrion, 2001, 1: 3-31.

[4] McBride H M, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse [J]. Curr Biol, 2006, 16: R551-R560.

[5] Swalwell H, Kirby D M, Blakely E L, Mitchell A, Salemi R, Sugiana C, et al. Respiratory chain complex I deficiency caused by mitochondrial DNA mutations [J]. Eur J Hum Genet, 2011, 19: 769-775.

[6] Schapira A H V. Mitochondrial diseases [J]. Lancet, 2012, 379: 1825-1834.

[7] Bratic A, Larsson N G. The role of mitochondria in aging [J]. J Clin Invest, 2013, 123: 951-957.

[8] Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic [J]. Nat Med, 2013, 19: 1450-1464.

[9] Murphy M P. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. Biochem J, 2009, 417: 1-13.

[10] James D I, Martinou J C. Mitochondrial dynamics and apoptosis: a painful separation [J]. Dev Cell, 2008, 15: 341-343.

[11] Jeong S Y, Seol D W. The role of mitochondria in

apoptosis [J]. BMB Rep, 2008, 41: 11-22.

[12] Grandemange S, Herzig S, Martinou J C. Mitochondrial dynamics and cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19: 50-56.

[13] Johannsen D L, Ravussin E. The role of mitochondria in health and disease [J]. Curr Opin Pharmacol, 2009, 9: 780-786.

[14] Gaude E, Frezza C. Defects in mitochondrial metabolism and cancer [J]. Cancer Metab, 2014, 2: 10.

[15] Sotgia F, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn U E, Flomenberg N, Birbe R C, Witkiewicz A K, et al. Mitochondrial metabolism in cancer metastasis: visualizing tumor cell mitochondria and the “reverse Warburg effect” in positive lymph node tissue [J]. Cell Cycle, 2012, 11: 1445-1454.

[16] Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, et al. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis [J]. Science, 2008, 320: 661-664.

[17] Tan A S, Baty J W, Berridge M V. The role of mitochondrial electron transport in tumorigenesis and metastasis [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840: 1454-1463.

[18] Parri M, Chiarugi P. Redox molecular machines involved in tumor progression [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19: 1828-1845.

[19] Sena L A, Chandel N S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species [J]. Mol Cell, 2012, 48: 158-167.

[本文编辑] 魏学丽