

基础研究

人凋亡诱导因子 C-末端截短体 AIF Δ 1-480 的表达对 MCF-7 细胞的影响

王丽娟, 肖华卫, 白 娥, 周 霞, 李 萌, 金桂花, 朱 青

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤中心肿瘤科, 陕西 西安 710061

摘要:目的 观察人凋亡诱导因子(AIF)C-末端截短体 AIF Δ 1-480 重组基因表达对 MCF-7 细胞生物学行为的影响。方法 利用脂质体将重组质粒 PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480 瞬时转染乳腺癌 MCF-7 细胞,通过 Western blot、流式细胞术、MTT、集落形成试验、线粒体膜电位测定等方法,检测目的基因在细胞中的表达及其对转染细胞凋亡相关分子 cytC 表达的变化及细胞增殖、凋亡等的影响。结果 重组质粒 PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480 转染肿瘤细胞后 AIF 蛋白表达明显增加;重组质粒能明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖;上调细胞色素 C 的表达;减低线粒体膜电位,正常细胞、空载体组和重组质粒的线粒体膜电位($\Delta\psi$)分别为 4.69 ± 1.07 、 3.86 ± 1.52 和 1.51 ± 0.79 mV,重组质粒组与对照组相比,线粒体膜电位明显下降($P<0.05$);并诱导细胞凋亡,正常细胞组、脂质体组、PcDNA3.0 组、重组质粒组细胞凋亡率分别为: $(9.2\pm 5.1)\%$ 、 $(15.4\pm 4.5)\%$ 、 $(20.5\pm 3.9)\%$ 、 $(32.2\pm 6.0)\%$,重组质粒组与对照组相比,细胞凋亡明显增加($P<0.05$)。结论 人 AIF C-末端截短体可通过诱导 cytC 从线粒体中释放促进 MCF-7 细胞凋亡。关键词: AIF Δ 1-480; MCF-7 细胞; 增殖; 凋亡; 细胞色素 C

Effect of the C-terminal truncated human apoptosis-inducing factor Δ 1-480 on biological behaviors of MCF-7 cells

WANG Lijuan, XIAO Huawei, BAI E, ZHOU Xia, LI Meng, JIN Guihua, ZHU Qing

Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University College of Medicine, Xi'an 710061, China

Abstract: Objective To observe the expression of the C-terminal truncated human apoptosis-inducing factor (AIF) and its biological effect on MCF-7 cells. **Methods** PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480 was transfected into human breast carcinoma MCF-7 cells with lipofectamins. The expression of the truncated AIF gene was detected by Western blotting, and its effects on the biological behaviors of MCF-7 cells and on the expression of cytochrome c (cytC) were evaluated using flow cytometry, MTT assay, colony-forming assay, and mitochondrial membrane potential measurement. **Results** PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480 enhanced AIF expression in MCF-7 cells, obviously inhibited the cell proliferation, and significantly reduced the mitochondrial membrane potentials ($P<0.05$). Transfection of the cells with PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480 promoted the expression of cytC and resulted in significantly increased apoptosis of MCF-7 cells ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of C-terminal truncated human AIF gene can induce apoptosis of human MCF-7 cells by promoting cytC release from mitochondria.

Key words: C-terminal truncated human apoptosis-inducing factor Δ 1-480; MCF-7 cells; proliferation; apoptosis; cytochrome c

细胞凋亡是细胞受到生理或病理刺激后发生的自发性死亡的过程,处于细胞凋亡调控中心的线粒体在细胞凋亡中扮演关键角色^[1-2]。凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是1996年发现的一种具有凋亡活性的黄素蛋白,定位于线粒体的膜间隙^[3]。细胞受到凋亡刺激时,AIF分子从线粒体释放到胞质,然后在易位到核,与染色体DNA结合,使染色体核周边凝集和DNA断裂,直接介导细胞核发生凋亡^[4-6]。AIF促凋亡作用不受广谱caspases抑制剂z-VAD.fmk的抑制,也不

受Bcl-2过量表达的影响,代表着独立于caspases信号通路之外的另一条凋亡途径^[7]。

基于AIF在细胞凋亡中的独特功能,探索其用于基因治疗的可能性,根据人截短型AIF仍具有促凋亡效应的研究^[8-9],为使AIF分子在生物体内更易表达、内化及杀伤,本课题将研究进一步截短AIF后所构建的重组质粒PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480在MCF-7细胞的促凋亡活性及其机制,为其应用于临床奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

E.coli 菌种 DH5 α 、及 PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480 重组质粒为第四军医大学免疫学教研室惠赠,人乳腺癌细胞系 MCF-7 由西安交通大学中心实验室保存。Annexin-V/PI 双染凋亡试剂盒购自深圳晶美生物公司,

收稿日期:2013-06-11

基金项目:国家自然科学基金(81072117)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81072117).

作者简介:王丽娟,在读博士研究生,E-mail: 6945216juan@163.com

通信作者:朱 青,副教授,副主任医师,医学博士,硕士研究生导师,E-mail: newzhuqing1972@yahoo.com

兔抗人AIF单克隆抗体、兔抗人cytC单克隆抗体、兔抗人 β -actin单克隆抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。LipofectAmine™2000购自inventrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 待MCF-7细胞达密度达到80%左右时进行转染。细胞先用无血清RPMI 1640洗2次,加0.8 ml无血清RPMI 1640。将2 μ g质粒DNA和4 μ l LipofectAmine™2000分别加于100 μ l无血清RPMI 1640中,轻轻震荡5 min,混匀,制成转染液。室温静置20 min后,将转染液加入细胞中,轻轻混合,置37 $^{\circ}$ C孵育6 h。弃去转染液,加100 ml/L胎牛血清的RPMI 1640继续培养。

1.2.2 MTT法测定转染细胞的生长曲线 将MCF-7细胞以 10^3 /孔的量接种于96孔板中,分设空白对照组、脂质体组、空载体组、重组质粒组,每组5个复孔,于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养。分别于不同时间点(转染后1~5 d)每孔加入20 μ l MTT(5mg/ml),37 $^{\circ}$ C继续孵育4 h,弃MTT液,加150 μ l DMSO混匀,酶联免疫检测仪测定各孔490 nm波长吸光值,绘制生长曲线。

1.2.3 克隆形成实验 将100~200个细胞接种于直径60 mm平皿内并轻轻混匀,在37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度条件下培养2~3周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,弃去培养液,1 $\times$ PBS洗2遍,加5 ml甲醇固定15 min。0.1%结晶紫染色30 min,流水缓慢冲洗后晾干。用克隆计数仪自动计数,计数含50个以上细胞的细胞群为一个克隆,计算克隆形成率。克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数 $\times$ 100%。

1.2.4 细胞凋亡检测 用胰酶消化转染48 h后细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 $5\times 10^5\sim 1\times 10^6$ /ml,离心,PBS洗涤3次;将细胞重悬于500 μ l结合缓冲液,加入10 μ l AnnexinV-FITC和5 μ l PI,轻轻混匀,避光室温反应15~20 min后流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞周期检测 取不同处理组干预48 h后细胞,弃培养液,胰酶适度消化后收集 1×10^6 转染和未转染的细胞,1 $\times$ PBS洗3遍;加70%预冷乙醇4 $^{\circ}$ C固定过夜;1000 r/min $\times$ 5 min离心收集细胞,PBS洗2次;0.4 ml PBS重悬细胞,加入RNase-A 150 μ l和PI 150 μ l,室温避光染色30 min后流式细胞仪检测。

1.2.6 线粒体膜电位的测定 收集不同处理组细胞,PBS洗涤2次,收集不低于 1×10^6 的细胞;用500 μ l 1 $\times$ Incubation Buffer加1 μ l JC-1涡旋混匀配成JC-1工作液将细胞均匀悬浮,于37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中孵育20 min,室温离心收集,1 $\times$ Incubation Buffer洗涤2次,500 μ l 1 $\times$ Incubation Buffer重悬细胞,流式细胞仪分析。

1.2.7 Western blot 方法检测细胞AIF、cytC凋亡相关蛋白的表达 提取不同处理组干预48 h后MCF-7细胞

总蛋白,行SDS-PAGE电泳,转膜,用TBST配置的5%脱脂牛奶37 $^{\circ}$ C封闭2 h。一抗兔抗人AIF单克隆抗体(1:500)及兔抗人cytC单克隆抗体(1:500)4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗,山羊抗兔抗体(1:2000)室温2 h,ECL法检测。

1.2.8 统计学分析 SPSS13.0软件统计分析,结果以均数 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒抑制MCF-7细胞增殖

MTT法检测不同处理组细胞的生长能力。结果表明:重组质粒组与正常细胞组、脂质体组、空载体组相比,细胞的生长明显受到抑制($P<0.05$,图1)。克隆形成实验检测不同处理组细胞的克隆形成能力,显示正常细胞组、脂质体组和空载体组之间均无显著差别($P>0.05$),重组质粒组与对照组相比,能显著抑制细胞的克隆形成能力($P<0.05$,图2)。

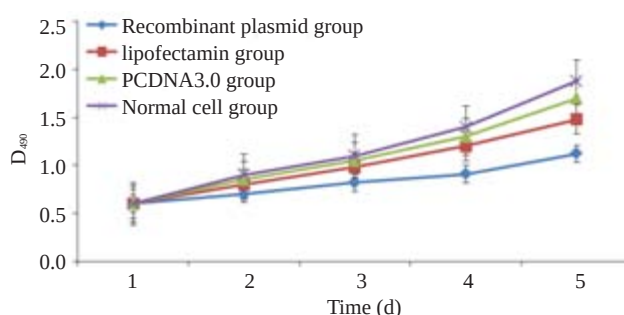


图1 MTT法检测不同处理组细胞的生长能力

Fig.1 MTT assay for assessing cell proliferation ability in different groups.

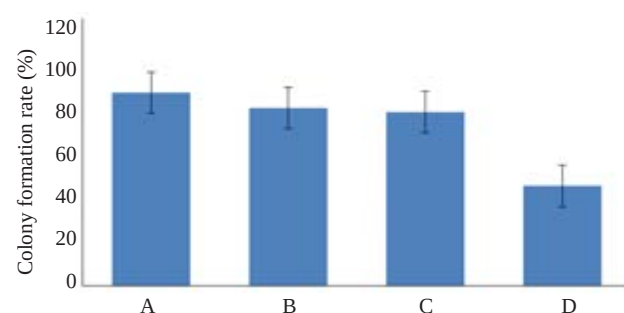


图2 集落形成实验检测各处理组细胞增殖能力

Fig.2 Colony forming assay of the cells in different groups. A: Normal cell group; B: Lipofectamins group; C: PCDNA3.0 group; D: Recombinant plasmid group.

2.2 重组质粒对MCF-7细胞凋亡的影响

用流式细胞仪分析各组细胞凋亡情况(图3)。正常细胞组、脂质体组、PcDNA3.0组、重组质粒组中存活细胞率分别为:(89.8 $\pm$ 15.5)%、(83.8 $\pm$ 8.4)%、(78.4 $\pm$ 7.9)%、(62.1 $\pm$ 11.2)%,细胞凋亡率分别为:(9.2 $\pm$ 5.1)%、

(15.4 ± 4.5)%、(20.5 ± 3.9)%、(32.2 ± 6.0)%。转染重组质粒组与正常细胞组、脂质体组、空载体组相比具有显著

的促凋亡作用($P < 0.01$),因此,重组质粒 PcDNA3.0-FDT-AIF Δ 1-480 对肿瘤细胞有一定的促凋亡作用。

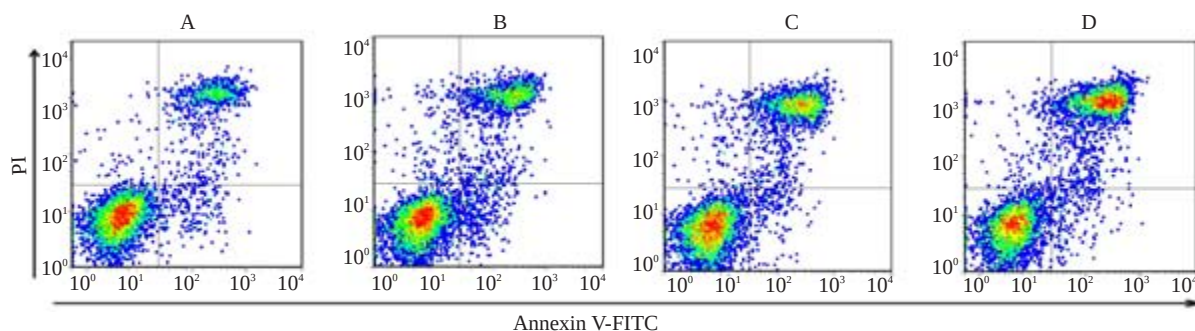


图3 重组质粒对MCF-7细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of the recombinant plasmid on MCF-7 cell apoptosis. A: Normal cell group; B: Lipofectamine group; C: PcDNA3.0 group; D: Recombinant plasmid group.

2.3 重组质粒对MCF-7细胞周期的影响

流式细胞仪检测各组细胞周期,结果表明:实验各组细胞周期各期的差别都不明显($P > 0.05$,图4)。因此,转染重组质粒的细胞增殖受到抑制,并非由细胞周期的阻滞引起,极有可能是细胞凋亡增加的原因所致。

2.4 重组质粒对线粒体膜电位的影响

流式细胞术检测线粒体的膜电位变化(图5),结果表明,正常细胞、空载体组和重组质粒的线粒体膜电位($\Delta\psi$)分别为 4.69 ± 1.07 , 3.86 ± 1.52 , 1.51 ± 0.79 mV。重组质粒组与对照组相比,线粒体膜电位显著下降($P < 0.05$)。据此,构建的重组质粒转染肿瘤细胞后可导致线粒体膜电位明显的下降,而线粒体膜电位的下降时细

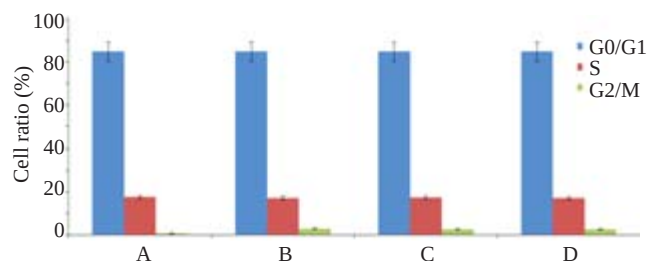


图4 不同处理方法对细胞周期影响的比较

Fig.4 Effect of recombinant plasmid on MCF-7 cell cycle. A: Normal cell group; B: Lipofectamine group; C: PcDNA3.0 group; D: Recombinant plasmid group.

胞早期凋亡不可逆的,因此,重组质粒转染肿瘤细胞后可诱导细胞凋亡。

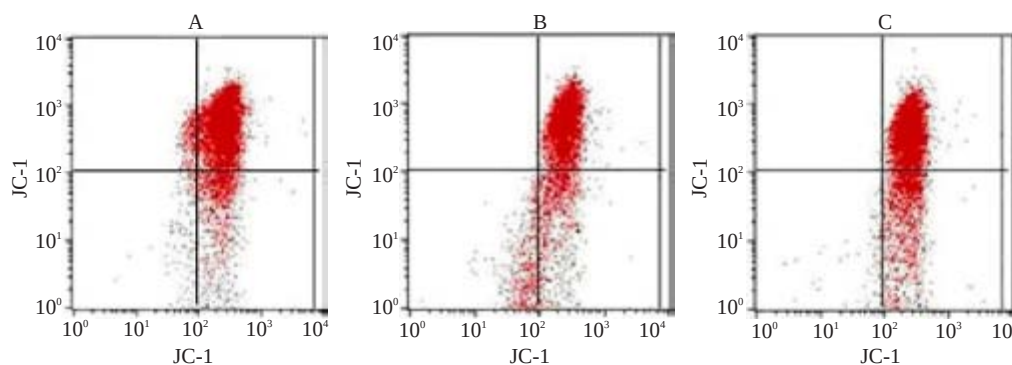


图5 重组质粒对线粒体膜电位的影响

Fig.5 Effect of the recombinant plasmid on MCF-7 cell mitochondrial membrane potential. A: Normal cell group; B: PcDNA3.0 group; C: Recombinant plasmid group.

2.5 重组质粒对AIF、cytC蛋白表达的影响

结果显示(图6),与对照组相比,转染重组质粒组AIF、cytC蛋白的表达水平明显增加。而空载体与正常细胞组相比,AIF、cytC蛋白的表达差别不明显。

3 讨论

AIF是1999年克隆的第一个能够诱导Caspase非

依赖性细胞凋亡的因子^[3],存在于细胞线粒体内膜;当有凋亡信号刺激时,成熟的AIF分子从线粒体释放到细胞浆,通过其核定位信号转位到细胞核中,直接引起染色体凝集和DNA断裂,导致细胞凋亡。成熟的AIF由3个部分构成:有1个FAD结构域,1个NADH结合结构域和1个C-末端结构域,由于AIF是一种双功能蛋白分子,其N端线粒体定位信号及FAD结合结构对促进细

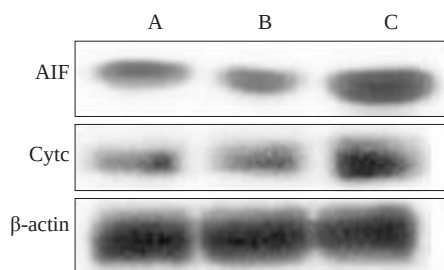


图6 Western blot检测AIF、cytC蛋白的表达
Fig.6 Expression of AIF and CytC protein by Western blotting. A: Normal cell group; B: PcDNA3.0 group; C: Recombinant plasmid group.

胞凋亡无明显作用^[4-6]。而在构建肿瘤杀伤分子表达质粒时,若分子过长,将会影响该分子在分泌、特异性识别及内化的效率,从而影响肿瘤的杀伤效率;以往,杨安钢课题组^[8-9]在实验中已证实:用截短型AIF分子AIFΔ1-120、AIFΔ1-260等真核表达载体转染细胞,仍可以引起转染细胞发生凋亡。因此,为有利于AIF分子在生物体内表达、内化及杀伤,能够更好地发挥其肿瘤杀伤的高效性。本课题组利用进一步截短的AIF分子所构建的PcDNA3.0-FDT-AIFΔ1-480表达质粒,通过多种试验方法检测其是否能够有效的促进乳腺癌肿瘤细胞凋亡,并初步探讨了AIFΔ1-480诱导乳腺癌细胞凋亡的分子机制,为AIF分子作为肿瘤治疗的杀伤分子奠定理论与研究基础。

目前,细胞凋亡的分子机制可概括为三条信号传导途径:死亡受体途径(外源性)、内质网途径、线粒体相关途径(内源性)。其中线粒体相关途径为线粒体基质的三羧酸循环酶系通过底物脱氢氧化生成NADH。很多种线粒体内的凋亡分子通过各种信号形式从线粒体中释放到细胞质,导致线粒体膜的通透性的改变^[10]。其中细胞色素(cytC)是最有代表性促凋亡分子的之一,可通过凋亡体的形成来激活caspase。一个凋亡的刺激例如DNA的损伤,可导致p53的增加,p53可能通过Bax来破坏线粒体外膜的通透性,最终导致细胞质中cytC水平的上升。在线粒体内膜也有AIF和endonuclease G,这两种可以以caspase非依赖的形式促进细胞核DNA裂解^[11-12]。本研究检测了截短体AIFΔ1-480对MCF-7细胞中cytC及线粒体膜电位的影响,发现AIFΔ1-480可降低线粒体膜电位,上调cytC的水平,从而证明了截短体AIFΔ1-480通过改变线粒体膜的通透性,上调cytC的表达激活下游凋亡通路诱导MCF-7细胞凋亡。

本实验利用我们前期总结AIF基因及其截短体对肿瘤细胞的促凋亡作用,来探讨重组质粒PcDNA3.0-FDT-AIFΔ1-480诱导乳腺癌MCF-7细胞凋亡,并从cytC的蛋白表达及细胞线粒体膜电位的变化来探讨其诱导凋亡的分子机制,实验结果证明:PcDNA3.0-FDT-AIFΔ1-480重组质粒能抑制乳腺癌MCF-7细胞的

增殖,诱导其凋亡,并且转染MCF-7细胞后,可以明显降低线粒体膜电位并上调cytC的表达,线粒体膜电位的降低是细胞早期凋亡的不可逆变化,使很多凋亡分子从线粒体中释放,因此,我们推测PcDNA3.0-FDT-AIFΔ1-480诱导凋亡的机制可能是通过诱导cytC从线粒体中释放的途径来实现的。对PcDNA3.0-FDT-AIFΔ1-480重组质粒肿瘤细胞杀伤功能的研究有利于进一步揭示AIF基因截短体的促凋亡作用及可能的机制,为AIF分子的截断体AIFΔ1-480作为肿瘤治疗的杀伤分子奠定了理论与研究基础,具有重要的临床应用价值。

参考文献:

- [1] Seo KS, Kim H, Hong TH, et al. Apiculan acetate induces cell death via AIF translocation and disrupts the microtubule network by down-regulating tubulin in HM7 human colon cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 434(3): 634-40.
- [2] 李兴,潘卫,邱峰,等.双向电泳分析肝癌细胞线粒体的差异表达蛋白[J].癌症,2005,24(11):1327-31.
- [3] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. Nature, 1999, 397(6718): 441-6.
- [4] Mendivil-Perez M, Jimenez-Del-Rio M, Velez-Pardo C. Glucose starvation induces apoptosis in a model of acute T leukemia dependent on caspase-3 and apoptosis-inducing factor: a therapeutic strategy [J]. Nutr Cancer, 2013, 65(1): 99-109.
- [5] Loeffler M, Daugas E, Susin SA, et al. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor [J]. FASEB J, 2001, 15(3): 758-67.
- [6] Lee JH, Oh EK, Cho HD, et al. Crude saponins from Platycodon grandiflorum induce apoptotic cell death in RC-58T/hSA4 prostate cancer cells through the activation of caspase cascades and apoptosis-inducing factor [J]. Oncol Rep, 2013, 29(4): 1421-8.
- [7] Pasupuleti N, Leon L, Carraway KL 3rd, et al. 5-Benzylglycyl-amiloride kills proliferating and nonproliferating malignant glioma cells through caspase-independent necroptosis mediated by apoptosis-inducing factor [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 344(3): 600-15.
- [8] 于翠娟,孟艳玲,桂俊豪,等.重组人凋亡诱导因子基因的构建、表达及其对HeLa细胞的促凋亡作用[J].生物化学与生物物理进展,2002,29(6):915-21.
- [9] 于翠娟,孟艳玲,杨安钢,等.人截短型凋亡诱导因子基因的表达及对HeLa细胞的促凋亡活性[J].细胞与分子免疫学杂志,2003,19(1):10-3.
- [10] Lee YM, Ting CM, Cheng YK, et al. Mechanisms of 2-methoxyestradiol-induced apoptosis and G2/M cell-cycle arrest of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Cancer Lett, 2008, 268(2): 295-307.
- [11] Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF) [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(1): 95-100.
- [12] Favreau DJ, Meessen-Pinard M, Desforges M, et al. Human coronavirus-induced neuronal programmed cell death is cyclophilin dependent and potentially caspase dispensable [J]. J Virol, 2012, 86(1): 81-93.

(编辑:吴锦雅)