

网络出版时间: 2021-6-11 15:54 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0928.007.html>

MitoQ 通过 NIX 介导的线粒体自噬对肺腺癌 A549 细胞迁移及凋亡的影响

刘鹏程¹ 张 晔² 陈晓宇² 赵大海¹

摘要 目的 探讨 Mitoquinone (MitoQ) 通过 NIX 介导的线粒体自噬对人肺腺癌 A549 细胞迁移及凋亡的影响。方法 不同浓度的 MitoQ 诱导 A549 细胞 12 h, 利用 CCK-8 检测细胞存活率, 细胞划痕实验检测细胞迁移能力, Western blot 检测 NIX、p62 及 Bax 等线粒体自噬及凋亡相关蛋白表达。结果 与对照组比较, 各 MitoQ 组细胞发生明显的增殖及细胞迁移抑制。并且随着凋亡的发生, 自噬促进相关蛋白 NIX 表达上调, 自噬抑制相关蛋白 p62 表达下调, 凋亡促进相关蛋白 Bax 表达上调, 并且伴随着 MitoQ 浓度的升高差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组相比, MitoQ 组细胞表现出迁移及增殖能力下降, 线粒体自噬及凋亡水平升高。结论 MitoQ 能抑制 A549 细胞的迁移及增殖, 促进 A549 细胞凋亡, 其机制可能与 MitoQ 调节线粒体自噬通路上的关键分子诱导 A549 细胞自噬有关, 该自噬的关键分子可能为 NIX 蛋白。

关键词 MitoQ; NIX; A549; 自噬; 凋亡

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)07-1037-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.007

肺癌的高发病率和低生存期仍然是目前的难题^[1-2]。寻找抑制癌细胞增殖、迁移, 促进癌细胞凋亡的新方法至关重要^[3]。MitoQ 是由具有抗氧化作用的辅酶 Q 和具有靶向作用的三苯基膦组成。与一般的辅酶 Q 相比, MitoQ 可以在线粒体中大量积累, 从而保护线粒体免受氧化应激损伤。研究^[4]表明, MitoQ 在多种疾病的治疗过程中发挥重要作用, 如帕金森病、缺血再灌注损伤等, 同时随着研究的深

入, 越来越多的证据^[5]表明 MitoQ 参与了肿瘤的发生发展及诱导肿瘤细胞凋亡。线粒体自噬包括 PINK1 (PTEN induced putative kinase 1) /Parkin、BNIP3L (protein 3-like protein) /Nix 和 FUNDC1 (FUN14 domain containing 1) 等多条途径, 研究^[6]表明在多种疾病中都存在线粒体自噬功能的失调。然而, 截止目前, MitoQ 作用癌细胞的机制仍不清晰, 因此, 寻找其中的分子机制对改善患者的预后具有重要意义, 该研究拟采用不同浓度的 MitoQ 体外作用 A549 细胞, 探讨 MitoQ 在肺腺癌细胞中所发挥的功能机制, 期望为肺癌的治疗提供思路。

1 材料与方法

1.1 细胞 人肺腺癌 A549 细胞购自广东吉尼欧生物技术有限公司。

1.2 主要试剂 MitoQ 购自美国 ABMole 公司, DMEM 高糖培养基、胎牛血清均购自美国 HyClone 公司, DAPI 溶液、RIPA 强裂解液均购自北京索莱宝科技有限公司, NIX 抗体购自英国 abcam 公司, p62 抗体、Bax 抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司, BCA 蛋白定量试剂盒、CCK-8 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司, ECL 超敏发光液购自美国 PIERCE 公司。

1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱购自日本 Sanyo 公司; 酶联免疫分析、电泳仪器均购自美国 Bio-Rad 公司; 倒置显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.4 细胞培养 A549 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 U/ml 的青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 37℃、5% CO₂ 下培养。当细胞生长到对数生长期时用 PBS 清洗细胞, 使用胰酶消化细胞 1 min, 以 1 000 r/min 离心 5 min 后收集细胞, 弃去上清液, 加入新鲜培养基重悬。将细胞分到新的培养皿中, 培养过夜。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力 用胰酶消化收集对数期细胞, 调整细胞密度, 96 孔板每孔加入 100 μl 细胞悬液, 使细胞密度为 4×10^3 /孔左右。同时设置无细胞的对照组, 放入 CO₂ 培养箱中培养, 待

2021-04-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81373421); 安徽省重点研究与开发计划项目(编号: 201904a07020064)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院呼吸与危重症医学科, 合肥 230601

² 安徽医科大学组织胚胎学教研室, 合肥 230032

作者简介: 刘鹏程, 男, 硕士研究生;

陈晓宇, 男, 博士, 教授, 责任作者, E-mail: cxyayd@163.com;

赵大海, 男, 博士, 副教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: zhaodahai@ahmu.edu.cn

细胞完全贴壁后加入不同浓度的 MitoQ (0、0.125、0.25、0.5、1、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 处理 12 h, 更换新鲜培养基后每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 培养箱中孵育 1 h 后使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。实验重复 3 次。细胞存活率 = $[(\text{实验孔} - \text{空白孔}) / (\text{对照孔} - \text{空白孔})] \times 100\%$ 。

1.6 细胞划痕实验测定 A549 细胞的迁移能力

将 A549 细胞接种于 6 孔板中培养 24 h, 待细胞铺满培养皿时, 沿中心轴方向, 用 200 μl 微量吸管在培养基表面划线, 用 PBS 清洗 3 次, 加入含有不同浓度 MitoQ (0、10 $\mu\text{mol/L}$) 的无血清 DMEM 培养基, 放入培养箱中培养 12 h, 于固定位置用显微镜拍照并计算细胞迁移率(伤口愈合百分比)。细胞迁移率 = $(0 \text{ h 划痕面积} - 12 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积} \times 100\%$ 。

1.7 Western blot 检测 NIX、p62、Bax 的表达 将 A549 细胞接种于 6 孔板中培养。加入含有不同浓度 MitoQ (0、0.5、1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 的培养基处理细胞 12 h 后。用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤细胞 3 次, 然后用细胞刮铲均匀收集培养皿中的细胞, 加入蛋白裂解液 RIPA 和蛋白酶抑制剂 PMSF 裂解细胞, 并使用 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机离心, 收集蛋白上清液分装, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质并转移到 PVDF 膜上。膜用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 与抗 Bax (1 : 500)、抗 p62 (1 : 500)、抗 NIX (1 : 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 室温下孵育辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (1 : 2 500) 1 h, 最后用 ECL 试剂曝光条带, ImageJ 测定目的条带和内参蛋白 GAPDH 灰度值, 实验重复 3 次。

1.8 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对计量资料均进行正态性检验及方差齐性检验, 采用独立样本 t 检验和单因素方差分析进行统计学计算, 其中在单因素方差分析中利用 LSD、SNK 等检验进行组间两两比较, 所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。检验水准 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MitoQ 抑制 A549 细胞增殖能力 不同浓度的 MitoQ 处理 A549 细胞 12 h 后, 采用 CCK-8 检测试剂盒测定 A549 细胞在相应药物浓度下的细胞活性。如图 1 所示, 与对照组比较, MitoQ 抑制了 A549 细胞的增殖。数据采用单因素方差分析, 细胞活力差异有统计学意义 ($F = 97.366$, $P < 0.001$)。

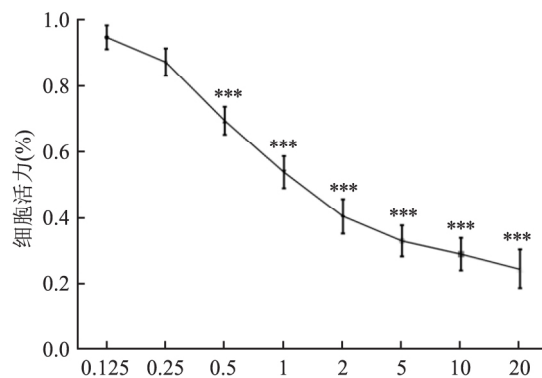


图 1 不同浓度 MitoQ 对 A549 细胞增殖的影响
与对照组比较: *** $P < 0.001$

2.2 MitoQ 抑制 A549 细胞迁移能力 如图 2、3 所示, 使用不同浓度的 MitoQ (0、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用 A549 细胞 12 h, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, MitoQ 组 (10 $\mu\text{mol/L}$) 显著抑制了 A549 细胞的迁移能力 ($P < 0.05$)。对照组细胞迁移能力为 $(41.4 \pm 5.8)\%$, MitoQ 组 (10 $\mu\text{mol/L}$) 细胞迁移能力降至 $(20.7 \pm 2.7)\%$ 。数据采用独立样本 t 检验 $t = -5.628$, $P = 0.005$ 。细胞迁移能力差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

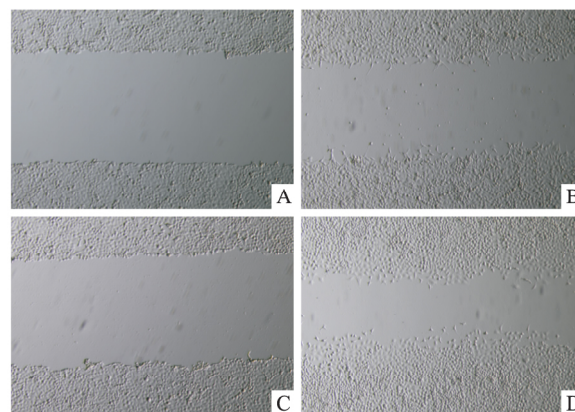


图 2 不同浓度 MitoQ 对 A549 细胞迁移能力的影响 $\times 200$
A: MitoQ 组 (10 $\mu\text{mol/L}$, 0 h); B: MitoQ 组 (10 $\mu\text{mol/L}$, 12 h);
C: 对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$, 0 h); D: 对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$, 12 h)

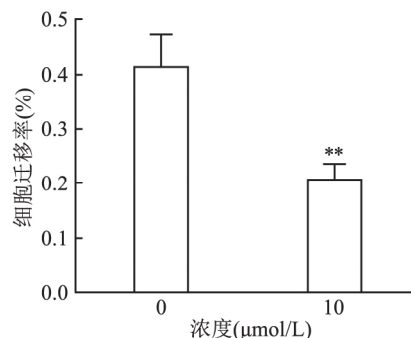


图 3 不同浓度 MitoQ 对 A549 细胞迁移能力的影响
与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: ** $P < 0.01$

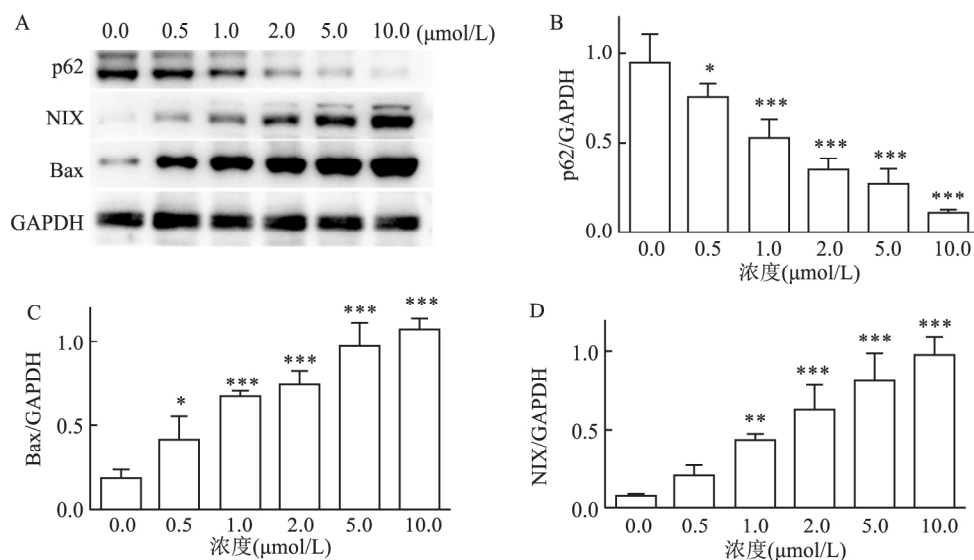


图4 不同浓度 MitoQ 对 A549 细胞自噬和凋亡相关蛋白表达的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 MitoQ 可以上调 A549 细胞自噬从而诱导 A549 的凋亡 如图 4 所示,该课题组研究了 MitoQ (0.0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理 A549 细胞 12 h 后 NIX、p62、Bax 等自噬及凋亡相关蛋白的变化,Western blot 结果显示,自噬相关蛋白 NIX 及凋亡相关蛋白 Bax 在 MitoQ 组中的表达呈剂量依赖性增加,自噬蛋白 p62 表达下降。MitoQ 以剂量依赖的方式上调细胞自噬诱导细胞凋亡。数据采用单因素方差分析,蛋白表达量差异有统计学意义,其中 NIX 蛋白组 $F = 31.098$, $P < 0.001$; Bax 蛋白组 $F = 38.923$, $P < 0.001$; p62 蛋白组 $F = 34.600$, $P < 0.001$ 。

3 讨论

根据世界卫生组织国际癌症研究署 (international agency for research on cancer, IARC) 2018 年发布的癌症报告^[1],肺癌的发病率和病死率均高居恶性肿瘤首位。因此,明确肺癌发生、发展的分子机制和途径,寻找能够抑制癌细胞增殖,减少其侵袭和转移并最终促进癌细胞凋亡的方法是治疗肺癌的重要突破口。作为一种特殊的自噬形式,线粒体自噬利用自噬溶酶体特异性的清除异常的线粒体,参与细胞的能量及物质代谢^[7]。线粒体在正常新陈代谢中产生大量活性氧。对于正常组织和细胞而言,线粒体 ROS 由于受到抗氧化体系的调控而处于较低水平。然而在肿瘤细胞中,由于线粒体的功能障碍,癌细胞比正常细胞具有更高的 ROS 水平,这在

很大程度上促进了癌症的发展^[8]。癌细胞的线粒体结构和功能发生改变使其对特定的分子更敏感,因此,针对线粒体的靶向药物是一类比较有应用潜力的抗癌药^[9]。

目前 MitoQ 诱导的线粒体自噬可以诱导超氧化物的产生进而导致细胞凋亡,并且在癌症的治疗上也具有明显的效果^[10-11]。课题组前期预实验的研究结果也表明 MitoQ 可以明显抑制 A549 细胞的生长,差异有统计学意义。然而,大型随机临床试验和一些生物学研究^[12]提出了相互矛盾的结果。自噬作为一把“双刃剑”,它既可以通过破坏细胞的营养和能量代谢来抑制肿瘤的发展,也可以通过赋予肿瘤细胞抵抗氧化应激的优势来促进肿瘤的进展,目前已有研究^[12]表明抗氧化剂本身会产生不良影响,如促进黑色素瘤的发生。通过大量使用抗氧化剂来地毯式的清除细胞内的 ROS 是有害的,因为它们不能在特定的生成部位特异性的清除 ROS。因此,线粒体靶向抗氧化剂 MitoQ 在抗癌方面可能具有一定的优势。

该研究利用不同浓度的 MitoQ 作用人肺腺癌细胞 12 h 后,在倒置显微镜中观察到 MitoQ 组较对照组细胞形态偏圆,细胞密度降低,提示肺癌细胞可能发生了凋亡,CCK-8 实验显示 MitoQ 可显著抑制 A549 细胞的增殖,通过无血清 DMEM 培养基在抑制 A549 细胞增殖的背景下进行了细胞划痕实验,结果显示其可显著抑制肺癌细胞的迁移,体外实验表明 MitoQ 具有良好的抗癌活性,随后通过 Western

blot 半定量检测自噬及凋亡蛋白的表达情况,结果显示自噬相关蛋白 NIX 表达上调,p62 表达下调,凋亡相关蛋白 Bax 表达上调,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。BNIP3L 位于线粒体外膜,不仅可以通过 Parkin-p62 通路调节 Parkin 中的位移,然后激活细胞自噬,而且还可作为自噬受体与 Atg8 家族蛋白直接结合,将自噬体的前体招募到线粒体上。Bax 是线粒体自噬过程中的一个重要分子,属于 Bcl-2 家族,同时也被认为是促凋亡蛋白^[13]。p62 蛋白能通过电压依赖性阴离子通道蛋白 1 (voltage-dependent anion channel 1 protein,VDAC1) 经 p62-LC3 进入自噬-溶酶体系统降解。自噬增强时 p62 蛋白被降解增多,自噬减弱时,p62 蛋白降解减少,在胞质中蓄积。同时 p62 蛋白还作为一个重要的 caspase-8 细胞凋亡的调节器。该研究表明,MitoQ 组 NIX、Bax 蛋白表达增强,提示相对于对照组,MitoQ 组细胞的自噬及自噬流增强,Bax 蛋白表达上调,caspase 家族活化,细胞凋亡增加。与此同时,目前主流科学界认为 Nix 介导的线粒体自噬机制主要包括以下几个方面,通过与 Parkin 相互作用介导线粒体自噬;Nix 作为自噬受体招募 Atg8 蛋白家族启动线粒体自噬;Nix 增加胞质中游离的 Beclin-1 诱导自噬^[14]。在肺癌中,NIX 蛋白介导的线粒体自噬增强的具体通路及线粒体自噬与凋亡间的具体联系仍不清晰,且鲜有文献报道。在后续研究中,该课题组将进一步在其他细胞系中体外验证实验结果,动物荷瘤实验也将同步展开,联合内质网应激、非编码 RNA 等进一步探讨 MitoQ 影响线粒体自噬及凋亡的具体分子通路^[15]。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394–424.
- [2] Marx A, Chan J K, Coindre J M, et al. The 2015 world health or-

- ganization classification of tumors of the thymus: continuity and changes [J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10 (10): 1383–95.
- [3] Saleh A I, Mohamed I, Mohamed A A, et al. *Elaeagnus angustifolia* plant extract inhibits angiogenesis and downgrades cell invasion of human oral cancer cells via erk1/erk2 inactivation [J]. *Nutr Cancer* 2018, 70 (2): 297–305.
- [4] Rossman M J, Santos-Parker J R, Steward C A C, et al. Chronic supplementation with a mitochondrial antioxidant (MitoQ) improves vascular function in healthy older adults [J]. *Hypertension*, 2018, 71 (6): 1056–63.
- [5] Payen V L, Zampieri L X, Porporato P E, et al. Pro- and antitumor effects of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38 (1–2): 189–203.
- [6] Springer M Z, Macleod K F. In Brief: mitophagy: mechanisms and role in human disease [J]. *J Pathol*, 2016, 240 (3): 253–5.
- [7] 卢长青, 贾合磊, 雷震, 等. 五味子乙素通过诱导线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤 [J]. *安徽医科大学学报* 2019, 54 (3): 418–22, 428.
- [8] Peng C A, Gaertner A A E, Henriquez S A, et al. Fluconazole induces ROS in *Cryptococcus neoformans* and contributes to DNA damage *in vitro* [J]. *PLoS One* 2018, 13 (12): e0208471.
- [9] Ferro F, Servais S, Besson P, et al. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, 98: 129–38.
- [10] Fulda S. Autophagy in cancer therapy [J]. *Front Oncol* 2017, 7: 128.
- [11] Li X, Zhou Y, Li Y, et al. Autophagy: a novel mechanism of chemoresistance in cancers [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119: 109415.
- [12] Le Gal K, Ibrahim M X, Wiel C, et al. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7 (308): 308re8.
- [13] Pedanou V E, Gobeil S, Tabariès S, et al. The histone H3K9 demethylase KDM3A promotes anoikis by transcriptionally activating pro-apoptotic genes BNIP3 and BNIP3L [J]. *Elife*, 2016, 5: e16844.
- [14] Zheng Y, Zhang X, Chen Z. Research progress on mechanism of Nix-mediated mitophagy [J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2017, 46 (1): 92–6.
- [15] Lin Y, Jiang M, Chen W, et al. Cancer and ER stress: mutual crosstalk between autophagy, oxidative stress and inflammatory response [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109249.

MitoQ may regulate the migration and apoptosis of lung adenocarcinoma A549 cells through NIX-mediated mitochondrial autophagy

Liu Pengcheng¹, Zhang Ye², Chen Xiaoyu², et al

(¹Respiratory and Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ²Dept of Histology and Embryology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of Mitoquinone (MitoQ) on the migration and apoptosis of human

lung adenocarcinoma A549 cells through NIX-mediated mitochondrial autophagy. **Methods** A549 cells were exposed to various concentrations of MitoQ for 12 hours, the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to detect cell viability. Cell migration was measured with scratch assay. Western blot analysis was used to detect the expression levels of the mitochondrial autophagy and apoptosis related proteins NIX, p62 and Bax. **Results** Compared with that in the control group, MitoQ groups showed significant inhibition of proliferation and migrate. Accompanied by the occurrence of apoptosis, the expression of autophagy-promoting related proteins (NIX) was up-regulated, the expression of autophagy-inhibiting related proteins (p62) was down-regulated, the expression of apoptosis-promoting related proteins (Bax) was up-regulated, and the difference increased with elevating MitoQ concentration ($P < 0.05$); compared to the control group, MitoQ groups exhibited a decreased capacity for cell migrate and proliferation, and an increased levels of mitochondrial autophagy and apoptosis. **Conclusion** MitoQ can inhibit A549 cells migration and proliferation, and promote A549 cells apoptosis. The mechanism may be related to the MitoQ regulating key molecules on the mitochondrial autophagy pathway and inducing autophagy in A549 cells, and the key molecule of mitochondrial autophagy may be the NIX protein.

Key words MitoQ; NIX; A549; autophagy; apoptosis

(上接第 1036 页)

Study on the mechanism of melatonin to delay the aging of kidney cells in diabetic rats

Chen Yongxin, Liu Wanning, Zhou Qing et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University, Key Laboratory of Gene Utilization for Severe Disease of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the effect of melatonin (MLT) on diabetic nephropathy (DN) rats, and to explore the mechanism of MLT delaying the progression of DN in rats. **Methods** Fifteen male SD rats were randomly divided into the normal group, model group and MLT group with 5 rats in each group. Rats in the model group and the MLT group were given 55 mg/kg of streptozotocin (STZ) by intraperitoneal injection in order to establish a DN rat model. After the model was successfully established, rats in the MLT group were given 10 mg/(kg · d) of MLT by intraperitoneal injection, and rats in the normal group and model group were given the equal volume of normal saline. Abdominal aortic blood and kidney tissue of rats were taken 16 weeks after they were given, blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCR) in serum were detected; masson staining was used to observe morphological changes of kidney tissue; β -galactosidase staining (β -gal) was used to detect changes in kidney cell aging; Western blot was used to detect the expression levels of autophagy markers (p62, LC3B), myosin light chain kinase (MLCK) and cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors (p16, p53, and p21). **Results** Compared with the normal group, the levels of BUN and SCR in serum in the model group increased, renal interstitial fibrosis was obvious, the autophagy level of kidney tissue decreased, and the expression levels of MLCK, p16, p53, and p21 increased. Compared with the model group, the levels of BUN and SCR in serum in the MLT group decreased, and the aging of the kidney tissue was delayed. After MLT was administered, the pathological damage was significantly reduced, and the autophagy level of kidney tissue was also improved. The expression levels of MLCK, p16, p53 and p21 decreased. **Conclusion** MLT can improve the progress of DN in DN rats by increasing autophagy and delaying aging.

Key words diabetic nephropathy; autophagy; melatonin; p16; p53; MLCK