

# 细胞间隧道纳米管介导的线粒体转运诱导急性单核细胞白血病细胞抵抗凋亡的研究

徐前飞<sup>1</sup>, 刘亚蒙<sup>1</sup>, 周震<sup>2</sup>, 田志祥<sup>1</sup>, 王丽红<sup>1</sup>, 胡艳<sup>1</sup>, 李静<sup>1</sup>, 刘晓颖<sup>3</sup>, 葛健<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察人类急性单核细胞白血病(AML-M5)细胞系 THP-1 与骨髓间充质干细胞(BM-MSCs)之间隧道纳米管(TNTs)结构的形成;探讨 TNTs 中线粒体转运对 THP-1 细胞凋亡的影响及线粒体在 TNTs 中转运的分子机制。方法 使用特异性荧光染料分别对线粒体、细胞骨架蛋白 F-Actin 和细胞核进行荧光标记,共聚焦显微镜观察 BM-MSCs 与 THP-1 细胞间 TNTs 的形成及 TNTs 中线粒体的传递。BM-MSCs 与 THP-1 细胞共培养 5 d 后运用流式细胞术检测 THP-1 细胞凋亡;共培养体系分为 4 组:直接共培养(SC 组)、Transwell 透膜共培养(TC 组)、直接共培养体系中加入细胞松弛素(TNTs 抑制剂) Latrunculin B(LC 组)、无 BM-MSCs 而仅有培养液(MC 组);Western blot 检测细胞器转运相关马达蛋白(KIF5B)表达水平。结果 BM-MSCs 与 THP-1 细胞间可观察到 TNTs 形成,BM-MSCs 中线粒体通过 TNTs 单向传递到 THP-1 细胞,并未观察到线粒体逆向传递。Annexin V-FITC/PI 检测 THP-1 细胞凋亡结果显示,SC 组跟 LC 组凋亡率较 MC 组明显减低( $P < 0.01$ ),LC 组高于 SC 组( $P < 0.01$ ),TC 组较 SC 组和 LC 组明显升高( $P < 0.01$ ),TC 组与 MC 组凋亡率无明显差异( $P > 0.05$ )。BM-MSCs 中 KIF5B 表达水平明显高于 THP-1 细胞( $P < 0.001$ ),Rotenone 处理 BM-MSCs 后显著抑制 KIF5B 的表达( $P < 0.01$ )。结论 BM-MSCs 线粒体通过 TNTs 向 THP-1 细胞单向传递,THP-1 细胞摄取 BM-MSCs 线粒体后可能诱导凋亡抵抗;细胞间线粒体转运可能与马达蛋白 KIF5B 相关。

**关键词** 急性单核细胞白血病;人骨髓间充质干细胞;THP-1 细胞;凋亡

2019-05-16 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81200371);高等学校博士学科点专项科研基金联合资助课题(编号:20123420120011);安徽省自然科学基金(编号:1208085QH154、1708085MH224);安徽省教育厅高校优秀拔尖人才培养资助项目(编号:gxycZD2017029)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第一附属医院血液内科,合肥 230022

<sup>2</sup>青岛大学附属医院健康管理中心,青岛 266000

<sup>3</sup>安徽医科大学生命科学院生物学教研室,合肥 230032

作者简介:徐前飞,男,硕士研究生;

葛健,男,主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:gejian@ahmu.edu.cn;

刘晓颖,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:liuxiao-ying@ahmu.edu.cn

中图分类号 R 733.713

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)09-1377-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.009

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)的特点是白血病细胞浸润骨髓、异常增殖和分化受阻。有 50%~75% 的患者对诱导化疗敏感而达到缓解,但大多数会复发,只有 30%~40% 的患者能实现长期生存<sup>[1]</sup>,白血病细胞不能完全被药物杀灭可能与高水平的药物外排泵、有效的 DNA 修复以及环境介导耐药等有关<sup>[2]</sup>。肿瘤微环境中细胞间生物信息交换存在多种方式,主要通过缝隙连接、整合素蛋白、四硫蛋白、钙粘素、细胞因子、胞外囊泡等介导<sup>[3-4]</sup>。最近研究<sup>[5]</sup>发现一种新的细胞间相互作用方式—隧道纳米管(tunneling nanotubes, TNTs)或者叫膜纳米管,这些长管状结构主要由肌动蛋白和微管、微丝组成,直径在 50~1 500 nm,长度可以跨越几十到数百微米,将不同细胞的质膜和胞质连接在一起,从而实现将不同细胞成分从一个细胞转运到另一个细胞,完成生物信息的直接交换。进一步研究发现细胞间 TNTs 能够传递包括细胞器、病原体、膜结合蛋白等<sup>[6-9]</sup>多种物质。该研究通过模拟骨髓微环境,建立体外共培养体系鉴定骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BM-MSCs)与急性单核细胞白血病细胞系 THP-1 细胞间 TNTs 结构,观察 TNTs 中线粒体的转运及其对 THP-1 细胞凋亡的影响,并探索细胞间线粒体转运的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 骨髓均来自安徽医科大学第一附属医院血液内科,征得患者同意,所有实验者均签署知情同意书,骨髓结果明确诊断非白血病及其他血液系统恶性疾病。THP-1 细胞购自上海中国科学院细胞库。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 纤连蛋白(北京索莱宝公司);MitoTracker Red CMXRos(美国 Invitrogen 公

司); Transwell 小室 3  $\mu\text{m}$ (美国 Corning 公司); Latrunculin B(美国 APEX BIO 公司); 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); Annexin V-FITC/PI 试剂盒(上海贝博公司); 共聚焦显微镜 LEICA. APA\_DMI6000\_DIC(德国徕卡公司); DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、FBS、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); Ficoll 细胞分离液(天津 TBD 公司); Actin-Tracker Green、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司); CD45-APC 抗体(美国 Biolegend 公司); 山羊抗兔生物素二抗(北京中杉金桥有限公司); KIF5B 单克隆抗体(美国 Abcam 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素链霉素的 RPMI-1640 培养基于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中培养。

**1.2.2 BM-MSCs 的分离、培养** 肝素化骨髓取 50 U/ml 肝素抗凝的骨髓 5 ml, 加入等体积 PBS 细胞吹打混匀, 室温 1 500 r/min 离心 10 min, 去掉脂肪层, 用 PBS 重悬细胞, 缓慢注入等体积的 1.073 g/ml Percoll 分离液, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取中间的单个核细胞层, PBS 清洗 2 次, 重悬于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 将细胞按  $1 \times 10^6$ /ml 接种于培养瓶中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养, 24 h 后首次换液, 以后 2~3 d 换液 1 次。待原代细胞增殖至铺满瓶底时, 在 0.25% 胰蛋白酶消化以后以  $1 \times 10^4$ / $\text{cm}^2$  接种在培养瓶中, 实验中所用的间充质干细胞均为第 3~5 代。

**1.2.3 细胞爬片的制备** 取干净的盖玻片清洗干净, 浸泡在硫酸重铬酸钾溶液 48 h 后取出, 自来水冲洗干净, 双蒸水冲洗 3 次, 高压灭菌备用。准备浓度为 10  $\mu\text{g}$ /ml 纤维连接蛋白浸泡的盖玻片, 于超净台中晾干后置于 6 孔板中; 线粒体特异性探针 Mito-Tracker Red CMXRos 用无血清培养基稀释至 250 nmol/L, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 BM-MSCs (THP-1) 30 min, PBS 洗 3 次, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM (1640) 培养 24 h, BM-MSCs 配制成  $5 \times 10^4$ /ml 细胞悬液接种到有盖玻片的孔中, 待贴壁后吸去培养基, 用 5% FBS 的 1640 将处于对数生长期的 THP-1 细胞浓度调至  $1 \times 10^6$ /ml 加入到接种了 BM-MSCs 的孔中, 共培养 24 h。

**1.2.4 细胞爬片的染色与荧光成像** 将细胞爬片从培养皿中取出, 用 PBS 溶液洗涤 3 次, 滴加 4% 甲醛溶液于细胞爬片上, 剂量为覆盖爬片为准, 室温固定细胞 10 min, PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加

稀释度为 1 : 100 的 Actin Tracker Green (Ex 496 nm, Em 516 nm) 溶液于爬片上, 每片 200  $\mu\text{l}$ , 室温避光孵育 40 min, PBS 溶液洗涤同上; 滴加 200  $\mu\text{l}$  DA-PI (Ex 405 nm, Em 420 nm) 于爬片上对细胞核复染, 室温避光约 2 min, 封片剂 DAKO 封片; MitoTracker Red CMXRos (Ex 579 nm, Em 599 nm), 于共聚焦显微镜下观察荧光信号分布并采集图像。

**1.2.5 THP-1 细胞凋亡的 Annexin V/PI 荧光标记法检测** 将 P3-P5 代 BM-MSCs 以  $5 \times 10^4$ /孔接种于 24 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 弃去培养液, 取对数生长期的 THP-1 细胞, 用 10% FBS 的 1640 重悬, 以细胞密度为  $1 \times 10^6$  接种于相应的孔中, 共培养体系包括 BM-MSCs 与 THP-1 细胞直接共培养 (SC 组)、间隔 Transwell 透膜 (物理阻断 TNTs) 共培养 (TC 组)、直接共培养体系中加入细胞松弛素 Latrunculin B (TNTs 抑制剂) 1.25  $\mu\text{mol}$ /L (LC 组)、无 BM-MSCs 而仅有培养液 (MC 组) 四组, 共培养 5 d。SC、LC 组用 0.25% 胰蛋白酶 (不含 EDTA) 消化、收集细胞, 离心弃上清液, PBS 清洗两次, 用 95  $\mu\text{l}$  PBS 重悬, 加入 CD45-APC 抗体 5  $\mu\text{l}$ , 避光孵 20 min, 离心弃上清液, 再用 400  $\mu\text{l}$  Annexin V 结合液悬浮细胞, 先后加入 Annexin V-FITC 5  $\mu\text{l}$ 、Propidium Iodide 10  $\mu\text{l}$ , 分别避光孵育 15 min、5 min, 进行流式细胞仪检测。采用 Flowjo 7.6 软件分析。

**1.2.6 Western blot 检测蛋白的表达** 用 100 nmol/L Rotenone (线粒体特异性抑制剂) 处理 BM-MSCs 24 h 或 48 h; 各组细胞加入蛋白酶抑制剂和裂解液的混合物, 在冰上裂解 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min, 用 BCA 法检测蛋白浓度。制备 SDS-PAGE 凝胶, 80 V (浓缩胶) /120 V (分离胶) 电压对蛋白质进行分离, 在 100 V 恒压条件下转移 1.5 h。PVDF 膜用 TBST 冲洗并浸入 5% 脱脂牛奶中封闭, 震荡 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 一抗 (1 : 5 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 二抗 (1 : 2 500) 室温孵育 1 h, ECL 化学发光显像。

**1.3 统计学处理** 运用 SPSS 16.0 软件对结果进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用两独立样本均数的  $t$  检验, 多组间比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 鉴定 BM-MSCs 和 THP-1 细胞之间 TNTs** 共聚焦显微镜下观察到 BM-MSCs 与 THP-1 细胞间有长管状结构形成, 用荧光染料 Actin-Tracker Green 特异

性染色,显微镜下发现这些长管状结构表达细胞骨架蛋白 F-actin,提示这些管状结构即为 TNTs,见图 1。

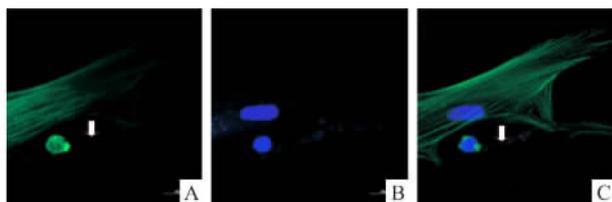


图 1 共聚焦显微镜下 BM-MSCs 与 THP-1 细胞间形成 TNTs  $\times 400$

A: F-actin; B: 细胞核; C: 叠加效果; 白色箭头指的是细胞间 TNTs 结构

**2.2 观察 BM-MSCs 和 THP-1 细胞间线粒体通过 TNTs 转运** 用 Mitotracker Red CMXRos 特异性标记线粒体,实验分为两组: BMSCs (MitoTracker) + THP-1、BMSCs + THP-1 (MitoTracker),在标准条件下共培养 24 h 后制片,并用共聚焦显微镜观察。在显微镜下观察到被荧光标记的 BM-MSCs 线粒体通过 TNTs 转运到 THP-1 细胞中,见图 2A;并未观察到 THP-1 细胞线粒体通过 TNTs 向 BM-MSCs 转运,见图 2B;说明线粒体是从 BM-MSCs 向 THP-1 细胞单向转运的。

### 2.3 流式细胞术检测各组 THP-1 细胞凋亡率

THP-1 细胞与 BM-MSCs 共培养 5 d 后各组凋亡率比较,SC 组、LC 组、TC 组及 MC 组凋亡率分别为  $(7.45 \pm 2.62) \%$ 、 $(24.03 \pm 2.3\%) \%$ 、 $(58.34 \pm 5.73) \%$ 、 $(61.37 \pm 2.78) \%$ ,SC 组及 LC 组凋亡率较 MC 组明显减低 ( $P < 0.01$ ),且 LC 组较 SC 组凋亡率增高 ( $P < 0.01$ ),提示直接共培养后 THP-1 细胞凋亡率减低;与 SC 组比较,加入 TNTs 抑制剂 Latrunculin B (破坏部分 TNTs 结构,阻碍线粒体传递)后 THP-1 细胞凋亡率有所增高,提示直接共培养后 THP-1 细胞凋亡率下降可能与 TNTs 形成有关;TC 组凋亡率较 SC 组及 LC 组明显增高 ( $P < 0.01$ ),TC 组与 MC 组凋亡率无差异 ( $P > 0.05$ );Transwell 透膜物理阻断 TNTs 后(TC 组) THP-1 细胞凋亡率增高,而与 THP-1 细胞单独培养凋亡率无明显差异,进一步提示 THP-1 细胞凋亡率下降可能是由 TNTs 介导,而 TNTs 中线粒体的转运可能是其重要的组成部分。各组间差异有统计学意义 ( $F = 69.97, P < 0.01$ ),见图 3。

**2.4 Western blot 检测 KIF5B 的表达水平** BM-MSCs 经鱼藤酮 (Rotenone) 分别处理 24、48 h 后,与对照组比较,KIF5B 蛋白表达量显著降低 ( $P < 0.01$ ),且 BM-MSCs 中 KIF5B 表达水平明显高于 THP-1 细胞 ( $P < 0.001$ ),见图 4。

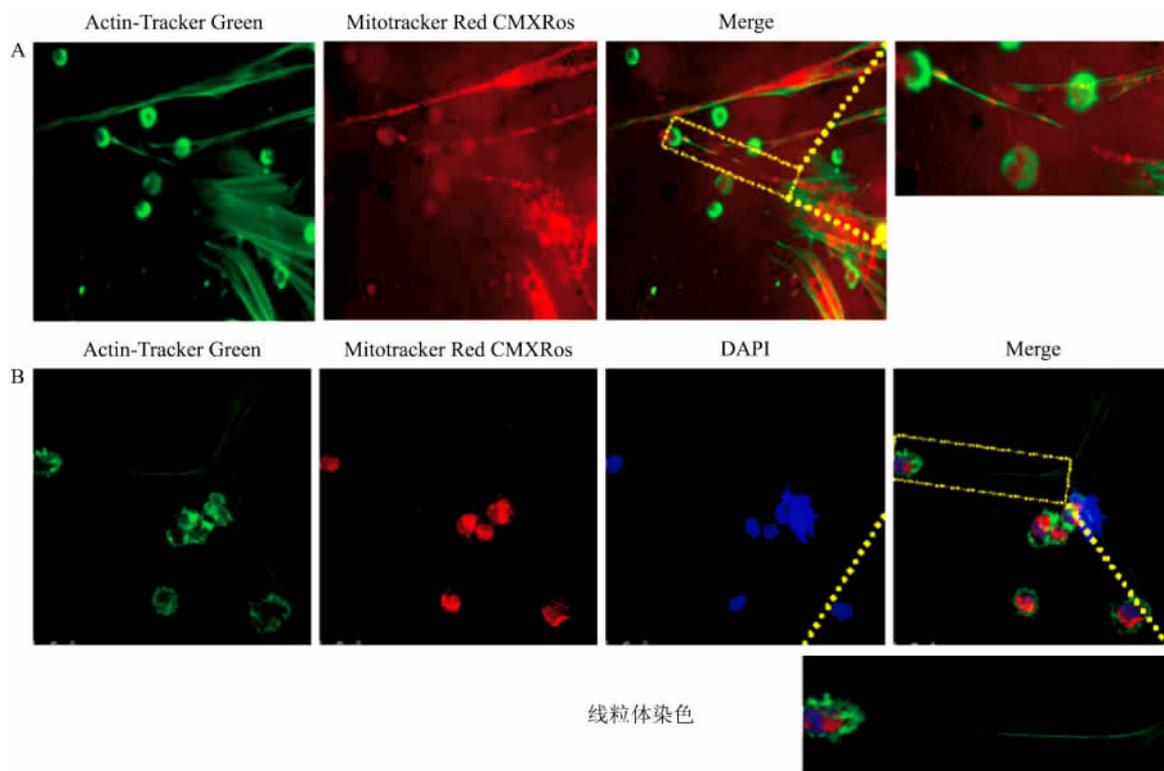


图 2 共聚焦显微镜下各组细胞间 TNTs 中线粒体的转运  $\times 400$

A: BMSCs (MitoTracker) + THP-1; B: BMSCs + THP-1 (MitoTracker); Actin-Tracker Green: 细胞骨架 F-actin; Mitotracker Red CMXRos: 线粒体; DAPI: 细胞核; Merge: 叠加效果及局部放大后图片; 白色箭头指的是沿 TNTs 转运的线粒体

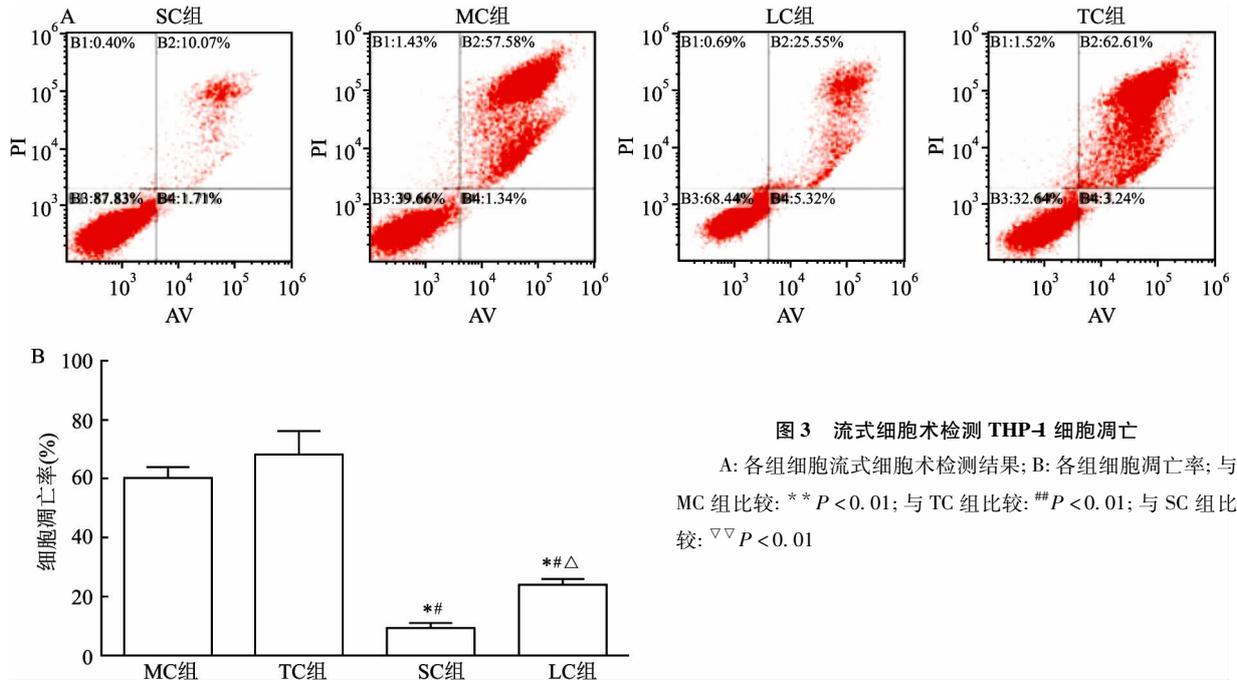


图3 流式细胞术检测 THP-1 细胞凋亡

A: 各组细胞流式细胞术检测结果; B: 各组细胞凋亡率; 与 MC 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TC 组比较: #  $P < 0.01$ ; 与 SC 组比较:  $\nabla \nabla P < 0.01$

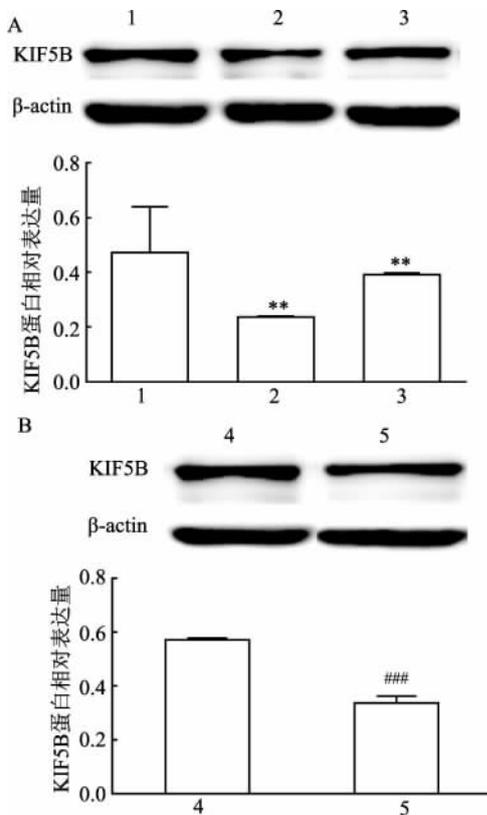


图4 Western blot 法检测 KIF5B 蛋白表达情况

A: KIF5B (BM-MSCs); 1: Control 组; 2: Rotenone 处理 24 h 组; 3: Rotenone 处理 48 h 组; 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; B: KIF5B (BM-MSCs-THP-1); 4: BM-MSCs 组; 5: THP-1 组; 与 BM-MSCs 组比较: ###  $P < 0.001$

### 3 讨论

通过模拟骨髓微环境建立共培养体系,本研究

表明 BM-MSCs 与 THP-1 细胞间能够远距离形成 TNTs。以往研究<sup>[10]</sup>认为 F-actin 的表达是 TNTs 的特异性标志,本研究通过 Actin-Tracker Green 特异性标记 F-actin,共聚焦显微镜下观察到 BM-MSCs 与 THP-1 细胞间 TNTs 中存在 F-actin。有研究<sup>[11]</sup>证实亲脂性染料 DiO、DiI 可以通过 TNTs 双向传递。线粒体是调节细胞能量水平、代谢和凋亡的重要细胞器,可影响细胞增殖和分化。近年来,研究<sup>[12]</sup>证明线粒体产生的 ATP 和线粒体局部代谢途径在 AML 的进展中起着重要作用。本研究使用荧光标记追踪线粒体的方法证明线粒体可以通过 TNTs 转运,并且发现线粒体只能由 BM-MSCs 向 THP-1 细胞单向转运,而没有观察到线粒体从 THP-1 细胞延着 TNTs 向 BM-MSCs 转运。线粒体只能单向传递的机制尚不明确,Brickley et al<sup>[13]</sup>研究认为神经元内线粒体转运可能与 Miro1、Miro2、TRAK1、KHC 等蛋白相关; Babenko et al<sup>[14]</sup>研究表明 Miro1 可以促进线粒体从 MSCs 向神经细胞转运。Ahmad et al<sup>[15]</sup>研究发现 Rotenone 是一种特异性线粒体抑制剂,可以有效抑制 BM-MSCs 线粒体向内皮细胞传递。本研究用 Rotenone 诱导 BM-MSCs,检测 Rotenone 诱导前、后 BM-MSCs 马达蛋白 KIF5B 的表达水平,发现 Rotenone 处理后 KIF5B 表达显著下降。并发现 KIF5B 在 BM-MSCs 中表达明显高于 THP-1 细胞,这符合浓度梯度动力学模型<sup>[15]</sup>,这提示 KIF5B 可能参与细胞间线粒体转运。

本实验同时研究了共培养系统中线粒体单向传

递对 THP-1 细胞凋亡的影响, Transwell 透膜组 THP-1 细胞凋亡率较直接共培养组明显增高, 而与 THP-1 单独培养组凋亡率无明显差异; Transwell 透膜通过物理阻断细胞间 TNTs, 切断线粒体传递, 而不影响细胞因子及胞外囊泡的作用, 这提示直接共培养组 THP-1 细胞凋亡下降可能主要受细胞间 TNTs 中线粒体转运影响; 加入 TNTs 抑制剂 Latrunculin B 可以破坏一部分 TNTs 结构, 阻碍部分线粒体传递, 这可能与加入 Latrunculin B 组 THP-1 细胞凋亡率较直接共培养组增高有关。

### 参考文献

- [1] Löwenberg B, Downing J R, Burnett A. Acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(14): 1051 - 62.
- [2] Meads M B, Hazlehurst L A, Dalton W S. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2519 - 26.
- [3] Andreu Z, Yanez-Mo M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 442.
- [4] Greco S J, Rameshwar P. Analysis of the transfer of circulating microRNA between cells mediated by gapjunction [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1024: 87 - 96.
- [5] Austefjord M W, Gerdes H H, Wang X. Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure [J]. *Commun Integr Biol*, 2014, 7(1): e27934.
- [6] Sowinski S, Jolly C, Beringhausen O, et al. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(2): 211 - 9.
- [7] Wang X, Gerdes H H. Transfer of mitochondria *via* tunneling nanotubes rescues apoptotic PC12 cells [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(7): 1181 - 91.
- [8] Pasquier J, Galas L, Boulange-Lecomte C, et al. Different modalities of intercellular membrane exchanges mediate cell-to-cell p-glycoprotein transfers in MCF-7 breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(10): 7374 - 87.
- [9] de Rooij B, Polak R, Stalpers F, et al. Tunneling nanotubes facilitate autophagosome transfer in the leukemic niche [J]. *Leukemia*, 2017, 31(7): 1651 - 4.
- [10] Chauveau A, Aucher A, Eissmann P, et al. Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(12): 5545 - 50.
- [11] Polak R, de Rooij B, Pieters R, et al. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells use tunneling nanotubes to orchestrate their microenvironment [J]. *Blood*, 2015, 126(21): 2404 - 14.
- [12] Basak N P, Banerjee S. Mitochondrial dependency in progression of acute myeloid leukemia [J]. *Mitochondrion*, 2015, 21: 41 - 8.
- [13] Brickley K, Stephenson F A. Trafficking kinesin protein (TRAK) - mediated transport of mitochondria in axons of hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 18079 - 92.
- [14] Babenko V A, Silachev D N, Popkov V A, et al. Miro1 enhances mitochondria transfer from multipotent mesenchymal stem cells (MMSC) to neural cells and improves the efficacy of cell recovery [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): E687.
- [15] Ahmad T, Mukherjee S, Pattnaik B, et al. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy [J]. *EMBO J*, 2014, 33(9): 994 - 1010.

## Intercellular tunneling nanotube-mediated mitochondrial transport induces apoptosis resistance in acute monocytic leukemia cells

Xu Qianfei<sup>1</sup>, Liu Yameng<sup>1</sup>, Zhou Zhen<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Health Management Center, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000)

**Abstract Objective** To observe the formation of tunneling nanotubes (TNTs) between human acute monocytic leukemia (AML-M5) cell line THP-1 and bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs); and investigate the effect of mitochondrial transport on apoptosis of THP-1 cells in TNTs, then to explore its molecular mechanism.

**Methods** Specific fluorescent dyes were used to label mitochondria, cytoskeleton protein F-Actin and nucleus respectively. The formation of TNTs between BM-MSCs and THP-1 cells and the transmission of mitochondria in TNTs were observed by confocal microscope. After 5 days of co-culture of BM-MSCs and THP-1 cells, apoptosis of THP-1 cells was detected by flow cytometry. The co-culture system was divided into four groups: Direct co-culture (SC), Transwell transmembrane co-culture (TC), direct co-culture system with cytochalasin (TNTs inhibitor) Latrunculin B (LC), no BM-MSCs but only culture medium (MC); The expression of organelle transporter associated motor protein (KIF5B) was detected by Western blot. **Results** TNTs formation was observed between BM-MSCs and THP-1 cells, mitochondria in BM-MSCs cells were unidirectionally transmitted to THP-1 cells *via* TNTs, but no

# Caspase-1 及其相关炎症因子 在二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌形成过程中的变化及意义

杨 琪, 卓少元

**摘要** 目的 探讨半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(Caspase-1)及其相关炎症因子白细胞介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )、IL-18、核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)在二乙基亚硝胺(DEN)诱导大鼠肝癌形成过程中的变化及意义。方法 制备DEN诱导的大鼠肝炎-肝硬化-肝癌模型,并分别于造模第0、6、13、20周取材,光镜下观察大鼠肝脏病理变化,采用生物化学法检测大鼠血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)和 $\alpha$ -L-岩藻糖苷酶(AFU)及肝癌组织中的Caspase-1活性,酶联免疫吸附实验(ELISA法)检测血清炎症因子IL- $1\beta$ 、IL-18、NF- $\kappa$ B含量的变化。结果 模型组大鼠在造模后第20周均形成肝癌。在DEN诱导肝癌形成过程中,大鼠肝脏指数逐渐升高,胸腺指数则逐渐降低,且大鼠肝脏形态及病理切片均发生相应的改变;血清ALT、AST、GGT、AFU、IL- $1\beta$ 、IL-18和NF- $\kappa$ B含量以及肝癌组织中Caspase-1活性均随着造模进程逐渐升高,且在造模第20周(肝癌期)达到最高。结论 利用DEN成功制备大鼠肝炎-肝硬化-肝癌模型。其中Caspase-1及其相关炎症因子IL- $1\beta$ 、IL-18、NF- $\kappa$ B可作为DEN诱癌过程中肝细胞损伤的标志因子,在肝癌发生发展过程中发挥重要作用。

**关键词** 肝癌; Caspase-1; 白细胞介素 $1\beta$ ; 白细胞介素18; 核因子 $\kappa$ B

**中图分类号** R 735.7

2019-04-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81660775、81860824)

作者单位: 广西中医药大学基础医学院, 南宁 530200

作者简介: 杨 琪, 女, 硕士研究生;

卓少元, 男, 副教授, 医学博士, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sherwin\_zhuo@126.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)09-1382-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.010

肝癌是目前临床常见难治的恶性肿瘤,其国内发病率与死亡率分别位居恶性肿瘤第四位和第二位<sup>[1]</sup>。肝癌发病机制非常复杂,但促进肿瘤的炎症是目前公认的肿瘤十大特征之一<sup>[2]</sup>,慢性肝脏炎症在肝癌的发生发展及转移过程中具有至关重要的推动作用<sup>[3-4]</sup>。Caspase-1是第一个在哺乳动物中被发现的半胱氨酸-天冬氨酸特异性蛋白酶(cysteine containing aspartate specific protease, Caspase),其在多种炎症反应中具有核心调控作用<sup>[5]</sup>。该研究采用腹腔注射二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)的方式来诱导大鼠肝炎-肝硬化-肝癌模型,旨在探讨Caspase-1及其相关炎症因子白细胞介素 $1\beta$ (interleukin- $1\beta$ , IL- $1\beta$ )、IL-18、核因子 $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)在DEN诱导大鼠肝癌形成过程中的变化及意义。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 雄性SD大鼠42只,SPF级,体质量(140 $\pm$ 20)g,购于广西医科大学实验动物中心,生产许可证号SCXK桂2014-0002,使用许可证号SYXK桂2014-0003。

**1.2 实验试剂** DEN购自美国Sigma公司,货号N0756-10ML;谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(glutamic-oxalacetic transami-

mitochondrial reverse transmission was observed. Annexin V-FITC/PI cell apoptosis assay results showed that the apoptosis rate of THP-1 cells in SC, LC groups were significantly lower compared with MC group ( $P < 0.01$ ), The apoptosis rate of group LC was higher than that of group SC ( $P < 0.01$ ), and that of group TC was significantly higher than that of group SC and group LC ( $P < 0.01$ ), there was no significant difference in apoptosis rate between group TC and group MC ( $P > 0.05$ ). The expression level of KIF5B in BM-MSCs was higher than that in THP-1 cells ( $P < 0.001$ ). Rotenone significantly inhibited the expression of KIF5B in BM-MSCs ( $P < 0.01$ ). **Conclusion**

Mitochondria of BM-MSCs are unidirectionally transmitted to THP-1 cells via TNTs, which may induces apoptosis resistance in THP-1 cells; intercellular mitochondrial transport may be associated with motor protein KIF5B.

**Key words** acute monocytic leukemia; human bone marrow mesenchymal stem cells; THP-1 cells; apoptosis