

线粒体在埃克替尼诱导涎腺腺样囊性癌细胞系 ACC-M 细胞凋亡中的作用

杨彩玲¹, 崔卫刚², 张应花², 路德荣³, 刘进忠⁴

摘要 目的 利用涎腺腺样囊性癌细胞系 ACC-M 细胞为模型,研究不同浓度埃克替尼(icotinib)对涎腺腺样囊性癌细胞系 ACC-M 细胞凋亡的影响以及线粒体在 icotinib 诱导 ACC-M 细胞凋亡中的作用。方法 icotinib 和 P53 抑制剂(PFT)分别处理 ACC-M 细胞,应用噻唑蓝比色法检测细胞活性,利用 Western blot 法检测 P53 和胞质内细胞色素 C(Cyt C)蛋白的表达变化,用 Caspase-3 凋亡相关蛋白活力检测 ACC-M 细胞的凋亡情况。结果 icotinib 可抑制 ACC-M 细胞的活性,增加胞质 Cyt C 蛋白的表达和 P53 在线粒体的转位并诱导 ACC-M 细胞凋亡。用 PFT 预处理后,icotinib 诱导 ACC-M 细胞的凋亡明显下降,线粒体蛋白 P53 的表达降低,胞质内 Cyt C 表达减少,Caspase-3 凋亡相关蛋白活力下降。结论 icotinib 可能通过诱导 P53 转位到线粒体进而促进 ACC-M 细胞凋亡。

关键词 埃克替尼;涎腺腺样囊性癌细胞;线粒体;凋亡

中图分类号 R 739.86

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)10-1379-04

埃克替尼(icotinib)是一种新近出现的、对肿瘤确有疗效的靶向表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂,有学者发现 icotinib 可抑制人表皮细胞癌、胃腺癌细胞的生长增殖^[1-2]。线粒体是细胞内能量产生的细胞器,许多因素如抗癌药物、生长因子抑制剂等可以导致线粒体损伤,诱导细胞凋亡^[3]。P53 是重要的促凋亡转录因子,研究^[4]表明 P53 蛋白能够从胞质转位到线粒体,从而激活内源性线粒体途径,促进凋亡。然而 icotinib 的抗肿瘤机制是否与线粒体有关尚未见报道。该研究以 ACC-M 细胞为模型,探讨线粒体在 icotinib 诱导的 ACC-M 细胞凋亡中的作用,为腺样囊性癌的治疗提供理论基础。

2014-07-13 接收

基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:14B320018)

作者单位:¹新乡医学院第一附属医院口腔科,新乡 453100

²新乡医学院人体解剖学教研室,新乡 453003

³新乡医学院第三附属医院消化内科,新乡 453003

⁴郑州大学口腔医学院口腔病理教研室,郑州 450052

作者简介:杨彩玲,女,副教授;

刘进忠,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:liujz@zzu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试剂及分组 icotinib 由浙江贝达药业有限公司惠赠;P53 抑制剂(Pifithrin- α , PFT)购自碧云天生物技术有限公司;MTT、Caspase-3 测定试剂盒购自美国 Sigma 公司;兔抗 P53 一抗和兔抗细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)一抗购自美国 Santa Cruz 公司;抗兔二抗购自美国 KPL 公司;COX4 购自美国 Protein-tech 公司;线粒体提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。随机分为 6 组,不同干预因素处理 24 h:①对照组;② icotinib 组(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$);③ PFT 组(终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$,预处理 1 h);④ PFT + icotinib 组(终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$,预处理 1 h,然后 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 icotinib 处理 24 h)。

1.2 细胞培养 将 ACC-M 细胞株置于 RPMI-1640 培养基(含 10% 小牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中进行培养。

1.3 细胞线粒体和细胞质蛋白提取 参照线粒体提取试剂盒的说明书进行。简述如下:收集细胞,加入预冷的提取液重悬细胞并匀浆离心(1 000 r/min 离心 5 min)。取上清液,置入一新的离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min。重新取上清液,置入一新的离心管,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min。离心后的上清液包含胞质成分,可从中提取胞质蛋白,用于胞质内 Cyt C 的检测。线粒体沉淀位于管底,加入 0.2 ml 提取液重悬并离心(12 000 r/min 离心 10 min),弃上清液;全细胞蛋白裂解缓冲液重悬沉淀,测蛋白浓度,保存备用,用于 P53 的检测。

1.4 Western blot 法检测 提取后的蛋白用 BCA 法测定蛋白浓度,配置 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶进行电泳,然后电转到 PVDF 膜,分别加入兔抗 P53 一抗和兔抗 Cyt C 一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 清洗 10 min $\times$ 3 次,加入抗兔二抗,室温孵育 2 h, ECL 发光、显影及定影。用 COX4 作为线粒体蛋白电泳的内参和 β -actin 作为胞质蛋白电泳的内参,成像分析仪扫描并保存,待测蛋白的表达水平用待测蛋白和内参灰度值的比值表示。

1.5 Caspase-3 凋亡相关蛋白活力检测 Caspase-3 凋亡相关蛋白的活力检测参照 Caspase-3 测定试剂盒说明书进行,简述如下:处理后的细胞用 500 μ l 裂解液冰上裂解并孵育 30 min,然后 16 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min。收集的上清液用底物 (acetyl -Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilide) 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min。405 nm 分光光度法测定 Caspase-3 凋亡相关蛋白的活力。分别测定 3 次,取平均值。结果以对照组的相对百分值表示。为检测 P53 是否参与了 icotinib 诱导的 ACC-M 细胞凋亡,用 PFT 50 μ mol/L 预处理 ACC-M 细胞 1 h,然后加入 icotinib 40 μ mol/L 24 h 后收集细胞,用 Caspase-3 凋亡相关蛋白活力检测细胞的凋亡情况。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析,处理组之间均数两两比较用 LSD 检验法。

2 结果

2.1 icotinib 对 Tca8113 细胞活性和细胞凋亡的影响 不同浓度的 icotinib 分别作用 ACC-M 细胞 24 h 后,利用 MTT 法观察 icotinib 对 ACC-M 细胞活性影响。结果显示:与对照组相比,不同浓度的 icotinib 组的 ACC-M 细胞的活性降低,差异有统计学意义 ($F = 17.438, P < 0.05$);加入 50 μ mol/L 的 PFT 预处理 ACC-M 细胞 1 h,然后用 40 μ mol/L 的 icotinib 处理 24 h 组的 ACC-M 细胞活性与单纯 icotinib 40 μ mol/L 处理组相比,细胞活性明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。结果显示:与对照组相比,不同浓度的 icotinib 组可诱导 ACC-M 细胞的 Caspase-3 凋亡相关蛋白活力表达明显增高,差异有统计学意义 ($F = 10.824, P < 0.05$)。与 40 μ mol/L 的 icotinib 组相比,PFT + icotinib 组的 ACC-M 细胞 Caspase-3 凋亡相关蛋白活力明显降低,表明 PFT 逆转了 icotinib 对 Caspase-3 凋亡相关蛋白的影响,见表 1。

2.2 icotinib 可诱导 P53 向线粒体转位及 Cyt C 向胞质的释放 Western blot 法结果显示,与对照组相比,icotinib 组的 P53 蛋白表达在线粒体蛋白成分中增多,差异有统计学意义 ($F = 12.311, P < 0.05$);与对照组相比,icotinib 组的 P53 蛋白表达在胞质蛋白成分中减少,差异有统计学意义 ($F = 4.65, P < 0.05$);与 40 μ mol/L 的 icotinib 组相比,PFT + icotinib 组的 P53 蛋白在线粒体表达明显降低,而 P53 蛋

表 1 icotinib 对 ACC-M 细胞活性及 Caspase-3 凋亡相关蛋白的影响 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞活性 (%)	Caspase-3 (%)
对照	100.00 $\pm$ 10.32	100.00 $\pm$ 16.56
icotinib (μ mol/L)		
10	63.80 $\pm$ 6.53 [*]	132.40 $\pm$ 11.57 [*]
20	61.80 $\pm$ 9.23 [*]	136.60 $\pm$ 13.87 [*]
40	62.60 $\pm$ 12.30 [*]	137.20 $\pm$ 9.07 [*]
PFT 50 μ mol/L	96.40 $\pm$ 9.37	100.40 $\pm$ 10.41
PFT + icotinib (50 μ mol/L + 40 μ mol/L)	99.60 $\pm$ 14.01 ^{Δ}	101.20 $\pm$ 12.13 ^{Δ}

与对照组比较:^{*} $P < 0.05$;与 icotinib 组 (40 μ mol/L) 比较: ^{Δ} $P < 0.05$

白在胞质表达增加,差异有统计学意义 ($F = 22.942, P < 0.05$);与对照组相比,不同浓度 icotinib 组的 Cyt C 蛋白表达在胞质增多而在线粒体减少;与 40 μ mol/L 的 icotinib 组相比,PFT + icotinib 组的 Cyt C 蛋白表达在胞质明显降低而在线粒体增加,差异有统计学意义 ($F = 6.481, P < 0.05$)。见图 1、2,表 2、3。

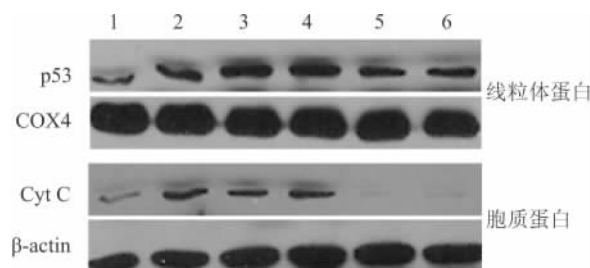


图 1 Western blot 法检测 icotinib 对 ACC-M 细胞线粒体 P53 和胞质 Cyt C 的影响

1:对照组;2:icotinib (10 μ mol/L) 组;3:icotinib (20 μ mol/L) 组;4:icotinib (40 μ mol/L) 组;5:PFT (50 μ mol/L) 组;6:PFT + icotinib 组

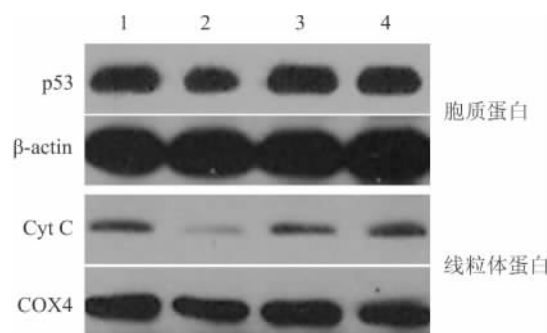


图 2 Western blot 法检测 icotinib 对 ACC-M 细胞胞质 P53 和线粒体 Cyt C 的影响

1:对照组;2:icotinib 组;3:PFT 组;4:PFT + icotinib 组

3 讨论

icotinib 是中国自主研发的靶向表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂,可抑制人表皮细胞癌等肿

表2 icotinib 对 ACC-M 细胞线粒体蛋白 P53 和胞质蛋白 Cyt C 的影响 ($n=5 \bar{x} \pm s$)

组别	线粒体蛋白 P53	胞质蛋白 Cyt C
对照	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.11
icotinib ($\mu\text{mol/L}$)		
10	1.36 $\pm$ 0.14*	1.42 $\pm$ 0.11*
20	1.38 $\pm$ 0.17*	1.37 $\pm$ 0.15*
40	1.48 $\pm$ 0.11*	1.52 $\pm$ 0.12*
PFT 50 $\mu\text{mol/L}$	0.99 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.13
PFT + icotinib (50 $\mu\text{mol/L}$ + 40 $\mu\text{mol/L}$)	1.03 $\pm$ 0.19 Δ	0.94 $\pm$ 0.14 Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 icotinib 组 (40 $\mu\text{mol/L}$) 比较: $\Delta P < 0.05$

表3 icotinib 对 ACC-M 细胞胞质蛋白 P53 和线粒体蛋白 Cyt C 的影响 ($n=5 \bar{x} \pm s$)

组别	胞质蛋白 P53	线粒体蛋白 Cyt C
对照	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.13
icotinib 40 $\mu\text{mol/L}$	0.75 $\pm$ 0.15*	0.73 $\pm$ 0.10*
PFT 50 $\mu\text{mol/L}$	0.99 $\pm$ 0.12	0.97 $\pm$ 0.11
PFT + icotinib (50 $\mu\text{mol/L}$ + 40 $\mu\text{mol/L}$)	1.02 $\pm$ 0.15 Δ	0.96 $\pm$ 0.09 Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 icotinib (40 $\mu\text{mol/L}$) 组比较: $\Delta P < 0.05$

瘤细胞的生长增殖^[5-6],但对 ACC-M 细胞的作用及机制是否与线粒体有关尚未见报道。本研究用 MTT 法检测不同浓度 icotinib 对 ACC-M 细胞的活性影响。结果显示: icotinib 在较低浓度时即可抑制 ACC-M 细胞的活性。线粒体凋亡通路是机体细胞凋亡的重要途径之一,各种凋亡刺激信号引起线粒体通透性增加,线粒体膜通透性转运孔道开放,从而使线粒体膜间隙的小分子蛋白质物质被释放出来,包括 Cyt C、Smac 等细胞凋亡诱导因子。P53 是重要的抑癌基因,调控着细胞周期及凋亡信号通路,与凋亡发生密切相关^[7-8]。为了证明 icotinib 能否诱导 P53 的线粒体转位,在 icotinib 作用 24 h 后收集细胞,提取线粒体蛋白进行 Western blot 法检测,结果显示,icotinib 作用后, P53 蛋白在线粒体表达增加,呈剂量效应关系。同时分析 Cyt C 的定位,提取胞质蛋白,检测胞质 Cyt C 的表达情况。结果显示 icotinib 导致胞质蛋白 Cyt C 的表达增加,表明 icotinib 引起了 Cyt C 从线粒体的释放。

Caspase 在细胞凋亡过程中发挥着重要的作用。许多凋亡刺激能诱导线粒体释放 Cyt C, 释放到胞质中的 Cyt C 与 APaf-1 结合从而激活 Caspase 家族^[9-10]。本研究结果显示,不同浓度的 icotinib 能诱导 ACC-M 细胞 Caspase-3 活力增加,表明细胞的凋亡增加。

为进一步分析 P53 的线粒体转位是否介导了线

粒体凋亡通路,本研究用 PFT 预处理细胞,加入 icotinib 作用 24 h 后提取胞质蛋白和线粒体蛋白, Western blot 法分析 PFT 对 icotinib 引起的 P53 和 Cyt C 释放的影响,结果显示 PFT 抑制了 icotinib 诱导的 P53 线粒体转位,同时也抑制了 icotinib 诱导的线粒体 Cyt C 的释放。本研究结果同时显示, icotinib 引起的 Caspases-3 活力的激活被 PFT 逆转。这些结果表明 icotinib 诱导 P53 转位到线粒体,转位到线粒体的 P53 引起了线粒体功能异常, Cyt C 释放增加,从而引起细胞凋亡。

综上所述, icotinib 能诱导 P53 激活并转位到线粒体,从而引起 Cyt C 从线粒体释放到胞质,以及 Caspases 的激活,线粒体凋亡通路参与了 icotinib 诱导的 ACC-M 细胞凋亡。

参考文献

- [1] Camidge D R. icotinib: kick-starting the Chinese anticancer drug industry[J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(10):913-4.
- [2] Gao Z, Chen W, Zhang X, et al. icotinib, a potent and specific EGFR tyrosine kinase inhibitor, inhibits growth of squamous cell carcinoma cell line A431 through negatively regulating AKT signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67(5):351-6.
- [3] Mercer A E, Copple I M, Maggs J L, et al. The role of heme and the mitochondrion in the chemical and molecular mechanisms of mammalian cell death induced by the artemisinin antimalarials[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(2):987-96.
- [4] Hu W, Ge Y, Ojcius D M, et al. p53 signalling controls cell cycle arrest and caspase-independent apoptosis in macrophages infected with pathogenic *Leptospira* species[J]. *Cell Microbiol*, 2013, 15(10):1642-59.
- [5] 穆晓东, 姜艳霞, 张 晔, 等. 盐酸埃克替尼诱导肺癌 HCC827 细胞周期阻滞及其机制研究[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(5):2016-9.
- [6] 杨彩玲, 韩新光, 于春亚. 盐酸埃克替尼对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞周期及 Cy-clinD1、P27 表达的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2011, 46(1):82-5.
- [7] 于立春, 盛玉文, 曲更庆, 等. p53 基因与 PTEN 基因共转染对膀胱癌 T24 细胞凋亡的影响[J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34(8):886-9.
- [8] 徐高峰, 白晓斌. 二氯乙酸通过抑制 HIF-1 α 、激活 P53 凋亡通路增强替莫唑胺的化疗作用[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2014, 35(1):51-5.
- [9] Kanno T, Nishizaki T. Sphingosine induces apoptosis in hippocampal neurons and astrocytes by activating caspase-3/-9 via a mitochondrial pathway linked to SDK/14-3-3 protein/Bax/cytochrome c[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(9):2329-37.
- [10] Bank A, Wang P, Du C, et al. SMAC mimetics sensitize nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis by promoting caspase-3-mediated cytochrome c release[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(1):276-84.

人通用转录因子 GTFIIF2 表达与定位

赵 健 耿慧武 乔 正 李春雨 李克娟 刘晓颖 范礼斌

摘要 目的 构建不同标签的人通用转录因子 IIF 多肽 2 (GTFIIF2) 表达载体, 观察其细胞内的表达和定位。方法 设计 GTFIIF2 的引物, 以全长 cDNA 序列为模板, 利用聚合酶链式反应技术扩增 GTFIIF2 全长序列, 构建 pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 和 pCDGFP-GTFIIF2 质粒, 利用 Western blot 法和免疫荧光法检测其在细胞表达与定位; 构建 GST-GTFIIF2 质粒, 转化到 BL21 菌株, 用 IPTG 诱导剂诱导融合蛋白表达, 用 SDS-PAGE 分析诱导表达情况。结果 免疫荧光法检测 GTFIIF2 蛋白集中分布在 COS7 细胞核中, 在细胞质没有分布; pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 和 pCDGFP-GTFIIF2 质粒

能够在 HEK293T 细胞中有效表达; GST-GTFIIF2 在 BL21 菌株中很好的诱导表达。结论 GTFIIF2 在 COS7 细胞、HEK293T 细胞和 BL21 感受态细胞中能有效表达, 为更好地了解 GTFIIF2 蛋白在细胞内的功能提供一定的研究基础。

关键词 GTFIIF2; 基因表达; 蛋白定位; BL21

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)10-1382-05

2014-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201368); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 11040606M170、11040606M164); 安徽省教育厅自然科学重点科研项目 (编号: KJ2010A187)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 赵 健, 男, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: xyz2848@sohu.com;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: fan_libin@hotmail.com

通用转录因子 IIF (GTFIIF) 参与基因转录的起始、启动子清除、延伸过程, 是由通用转录因子 IIF 多肽 2 (general transcription factor IIF subunit 2, GTFIIF2 或 RAP30) 和 GTFIIF1 两种亚基组成的四聚体分子^[1-3]。GTFIIF2 定位于人染色体其 13q14, 广泛表达于大部分的组织、器官中, 特别是肝、肾、肺。该基因 cDNA 全长 750 bp, 包含 8 个外显子 7 个内含子, 编码的 GTFIIF2 蛋白由 249 个氨基酸残基组成, 相对分子质量约为 28 380 ku 的蛋白质。其 N-末端与 GTFIIF1 相联系, GTFIIF1 与 GTFIIF2 两者形成的通用转录因子 GTFIIF 四聚体复合物。GTFIIF2 中间部分通过 RPB5 结合到 RNA 聚合酶 II, 对转录延

Effect of mitochondrion mediated apoptosis induced by icotinib in human salivary adenoid cystic carcinoma cell line ACC-M

Yang Cailing¹, Cui Weigang², Zhang Yinghua², et al

(¹Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100; ²Dept of Human Anatomy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003)

Abstract Objective To investigate the role of mitochondrion in the induction of the apoptosis in human salivary adenoid cystic carcinoma cells through icotinib and to observe the effect of different concentrations of icotinib on the apoptosis. **Methods** The ACC-M cells were exposed to icotinib and (or) the P53 inhibitor PFT. The cell viability of ACC-M was measured by MTT assay. Expression of P53 and Cyt C was determined by Western blot analysis. The apoptosis of ACC-M cells was measured by Caspase-3 apoptosis related protein activity. **Results** icotinib inhibited the viability in ACC-M. icotinib significantly increased the protein levels of P53 in mitochondrion and Cyt C in cytoplasm and induced apoptosis in ACC-M. However, pretreatment with P53 inhibitor (PFT), the inhibitory effect of icotinib on ACC-M cells was significantly reversed. The level of the Caspase-3 apoptosis related protein activity and the expression of P53 in mitochondrion and Cyt C in cytoplasm were also decreased significantly. **Conclusion** icotinib may induce apoptosis of ACC-M through the P53 mitochondrial translocation.

Key words icotinib; adenoid cystic carcinoma cell; mitochondrion; apoptosis