

文章编号:1005-6947(2007)11-1081-04

· 基础研究 ·

细胞色素 C 在氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡中的作用

杨建青

(广西柳州市人民医院 外科, 广西 柳州 545001)

摘要:目的 检测细胞色素 C 在氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡过程中的作用,分析细胞色素 C 在线粒体和胞浆中的分布及其与 caspase-9 活化的关系。方法 用 1×10^{-2} mol/L 的 5-FU 处理 HepG2 细胞,分别作用 2,4,8,16,24 h,用荧光检测试剂盒检测 HepG2 细胞凋亡过程中细胞色素 C 分布变化;Western-blot 检测 caspase-9 的活化和细胞色素 C 在胞浆及线粒体中的分布。结果 氟尿嘧啶处理肝癌细胞 4 h 后, caspase-9 活性开始升高,于 16 h 后达到高峰,与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。Western-blot 分析发现 caspase-9 被蛋白酶水解切断后形成 10 kD 片段;细胞色素 C 在胞浆中的分布从 4 h 后逐渐增加,16 h 最明显,而其在线粒体中的分布却正相反;细胞色素 C 的分布改变和 caspase-9 的活化基本同步。结论 在氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡过程中 caspase-9 被活化,并伴有细胞色素 C 自线粒体中释放到胞浆,提示细胞色素 C 可能在 Caspase-9 的活化和肝癌细胞凋亡中起重要作用。

[中国普通外科杂志,2007,16(11):1081-1084]

关键词: 肝肿瘤/病理学; 氟尿嘧啶/治疗应用; 凋亡; Caspase-9; 细胞色素 C

中图分类号:R 735.7

文献标识码:A

The role of cytochrome C in the apoptosis of hepatoma cell induced by flurouracil

YANG Jian-qing

(Department of General Surgery, People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou, Guangxi 545001, China)

Abstract: Objective To investigate the role of cytochrome C in the apoptosis of hepatoma cell induced by flurouracil, and to analyze the distribution of cytochrome C in cytosol and the relationship between the cytochrome C distribution and Caspase-9 activation. **Methods** The human hepatoma HepG2 cells were treated with flurouracil at 1×10^{-2} mol/L and 2,4,8,16,24h respectively. The change of cytochrome C in HepG2 apoptosis was detected by using Fluorescent Assay Kit; and proteolytic cleavage of caspase-9 and distribution of cytochrome C in cytosol or in mitochondria was analyzed by Western blot. **Results** Four hours after cells exposure to flurouracil, the caspase-9 activity in HepG2 cells increased gradually and reached the peak at 16h, compared with the control groups, the difference was significant ($P < 0.01$). In Western blot analysis, caspase-9 was found to be cleaved into 10 kD fragment, and distribution of cytochrome C in cytosol became more and more obvious from 4h on and reached a peak at 16h, but the distribution of cytochrome C in mitochondria was opposite. The distribution change of cytochrome C and activity alteration of Caspase-9 were synchronous. **Conclusions** Caspase-9 was activated in the apoptosis of HepG2 cells induced by flurouracil, accompanied by release of cytochrome C from mitochondria to cytosol. This data implies that cytochrome C plays an important role in the activation of Caspase-9 and apoptosis of hepatoma cell induced by flurouracil.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(11):1081-1084]

Key words: Liver Neoplasms/pathol; Fluorouracil/ther use; Apoptosis; Caspase-9; Cytochrome C

CLC number: R 735.7

Document code: A

收稿日期:2007-09-14; 修订日期:2007-10-29。

作者简介:杨建青,男,江西人,广西医科大学第五附属医院、柳州市人民医院副主任医师,主要从事肝癌基因治疗、肝移植方面的研究。

通讯作者:杨建青 E-mail:hawk1218@sina.com

研究发现化疗药物主要是通过损伤肿瘤细胞启动其内在的死亡程序即凋亡,并非导致死亡。凋亡是细胞发生不可修复损伤后按指令自我执行的一种主动的、程序性死亡方式,受细胞内外信号转导调控。迄今发现细胞凋亡主要经过两条死亡通路^[1],一条是外源性通路,即由死亡受体及配体系统激发的凋亡信号下传至启动性 caspase-8,然后激活效应性 caspase 蛋白酶而引发细胞凋亡;另一通路称为内源性通路,细胞损伤后线粒体功能障碍,膜通透性改变,凋亡蛋白包括细胞色素 C (cytochrome C, cyto C), Apaf-1 及 Smac/DIABLO 等从线粒体释放到胞浆, caspase-9 与之形成凋亡体 (apoptosome) 并被激活,随之引起 caspase 瀑布式活化和细胞死亡^[2-3]。笔者^[4-6]在以往研究中已证实氟尿嘧啶可诱导肝癌细胞凋亡,并有凋亡相关基因参与调控,但内源性通路对诱导肝癌细胞凋亡的作用尚不明确。本研究旨在了解氟尿嘧啶是否亦经内源性通路诱导肝癌细胞凋亡,以进一步阐明化疗的确切分子机制,为寻找新的药物治疗肿瘤靶点提供实验和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人肝癌 HepG2 细胞株(中南大学细胞中心提供),氟尿嘧啶(上海旭东海普药业有限公司)产品,兔抗 caspase-9、细胞色素 C 抗体和 HRP 标记的羊抗兔抗体(Boster 公司),核糖核酸酶 A、碘化丙啶(Sigma 公司),细胞色素 C 荧光检测试剂盒(Clontech 公司),caspase-9 抑制剂 Z-LEHD-FMK(R & D, USA),DMEM 培养基(GIBCO 公司),荧光分光光度计(HITACHI 公司),FACS Star 流式细胞仪(美国)。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 细胞培养及处理 HepG2 用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养基培养。并在培养基中加入 2mmol/L 谷氨酰胺,100kU/L-1 链霉素和 100kU/L 青霉素,细胞培养条件 37℃,50mL/L 二氧化碳浓度。待细胞进入对数生长期后加入 1×10^{-2} mol/L 氟尿嘧啶,分别作用 2, 4, 8, 16, 24 h, 每组标本数为 6。

1.2.2 细胞线粒体及胞浆的分离 收集 106 细胞,加入含 250℃ mM 蔗糖的细胞裂解液,用匀浆器进一步裂解细胞,匀浆液于 4℃ 下 750g 离心 10min,取上清,再在 4℃ 下 10 000℃ g 离心 15min,

所得沉淀部分即为线粒体;上清继续于 4℃ 下 10 000 g 离心 1 h,所得上清即为胞浆。所有操作均在冰上进行。

1.2.3 Caspase-9 活性检测 按试剂盒说明进行:收集 106 细胞,每份样本加入 50μL 细胞裂解液,冰上孵育 10 min,离心(10 000g, 4℃, 5 min),取上清(其中 5μL 用 Bradford 法作蛋白定量,读取 595 nm 吸光值),再加入 50μL 反应缓冲液和 5μL Caspase 底物 LEHD-pNA(亮氨酸-谷氨酸-组氨酸-天冬氨酸-p-硝基苯胺),37℃ 孵育 1.5 h,读取 405 nm 吸光值。Caspase 活性 = OD405 nm / OD595 nm。

1.2.4 Western-blot 检测 Caspase-9 活化 细胞先经冷 PBS 冲洗 3 遍,用加样缓冲液裂解细胞,100℃ 水浴 10 min 后,离心(10 000r/min × 10 min),收集上清,采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量,制备好的蛋白样品置 -80℃ 冰箱保存备用。以 20μg 蛋白/泳道上样,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜。室温封闭 3 h,加兔抗 caspase-9 抗体,室温下孵育 2 h,再加 HRP 标记的羊抗兔抗体,室温下孵育 1 h,采用 DAB 显色试剂盒进行显色约 2~5 min,待蛋白条带显色清晰时,终止反应,拍摄照片,记录实验结果。

1.2.5 Western-blot 检测细胞色素 C 的释放 细胞先经冷 PBS 冲洗 3 遍,用加样缓冲液裂解细胞,100℃ 水浴 10 min 后,离心(10 000 r/min × 10 min),收集上清,采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量,制备好的蛋白样品置 -80℃ 冰箱保存备用。以 20μg 蛋白/泳道上样,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至硝酸纤维素膜。室温封闭 3 h,加兔抗细胞色素 C 或 Smac/DIABLO 抗体,室温下孵育 2 h,再加 HRP 标记的羊抗兔抗体,室温下孵育 1 h,采用 DAB 显色试剂盒进行显色约 2~5 min,待蛋白条带显色清晰时,终止反应,拍摄照片,记录实验结果。

1.2.6 间接免疫荧光细胞化学技术检测细胞色素 C 在细胞内的分布 细胞接种在放置玻片的平皿中,待细胞贴在玻片上生长后加药处理,分别在 2, 4 h 和 8 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞,0.1% Triton X-100 在细胞膜上打孔,加入兔抗细胞色素 C 或 Smac/DIABLO 的抗体孵育 3 h,生物素标记的羊抗兔二抗孵育 1 h, Cy3(红色荧光)标记的链亲和素孵育 0.5 h,水溶性封片剂封片后在荧光显微镜 495nm 波长下观察细胞色素 C 在细胞内的分布。

1.2.7 细胞凋亡百分率的检测 离心收集 106 细胞,用 70% 乙醇固定,细胞核 DNA 荧光素(碘化丙锭)4℃ 避光染色 30 min,用流式细胞仪分析。测定前以鸡血红细胞作为标准品调整仪器的 CV 值在 3% 以内,测量数据和图形送入 HP-Consort300 计算机,应用相应的程序软件进行资料处理,计算出细胞凋亡百分率。

1.3 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用

Student' t 检验, $P < 0.05$ 时认为差异有显著性,使用 SPSS10.0 统计软件进行数据处理。

2 结果

2.1 caspase-9 活性变化

氟尿嘧啶处理肝癌细胞 4 h 后, caspase-9 活性开始升高,细胞凋亡增加,并随着时间延长而越明显,至 16 h 达到峰值,但直至 24 h 仍显著高于对照组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (表 1-2)。

表 1 氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡过程中 caspase-9 的活性变化($\bar{x} \pm s$) ($n = 6$)

组别	2h	4h	8h	16h	24h
空白对照组	126.4 ± 5.4	131.2 ± 5.7	128.5 ± 3.6	130.6 ± 5.2	133.5 ± 3.8
实验组	158.5 ± 5.6	265.3 ± 5.9 ¹⁾	342.8 ± 6.5 ²⁾	436.7 ± 7.5 ²⁾	313.9 ± 6.9 ¹⁾

注:与空白对照组比较,1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

表 2 氟尿嘧啶诱导的肝癌细胞凋亡($\bar{x} \pm s$) ($n = 6$)

组别	2h	4h	8h	16h	24h
空白对照组	4.55 ± 0.54	4.62 ± 0.21	4.56 ± 0.72	4.96 ± 0.85	4.46 ± 0.73
实验组	8.34 ± 0.53	9.91 ± 0.59 ¹⁾	11.15 ± 0.91 ²⁾	15.68 ± 1.00 ²⁾	13.52 ± 0.86 ¹⁾

注:与空白对照组比较,1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

2.2 Western-blot

经 Western-blot 分析发现,在氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡过程中, pro-caspase-9 被蛋白酶水解切断,形成了 10kD 片段,药物作用 4 h 后开始出

现,16 h 最明显(图 1)。同时也见细胞色素 C 4 h 后在胞浆中有分布,并有时间依赖性,16 h 最明显(图 2)。pro-caspase-9 的活化与细胞色素 C 的释放基本同步。

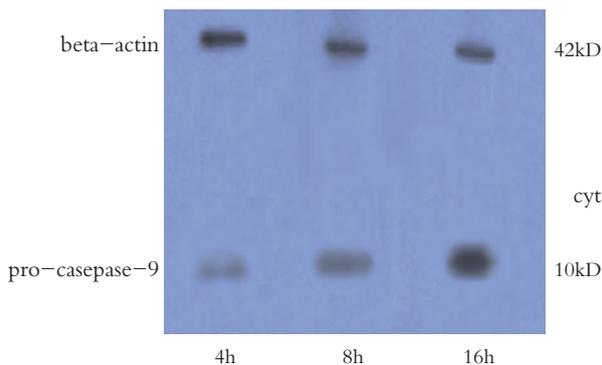


图 1 pro-caspase-9 被蛋白酶水解切断,形成了 10kD 片段

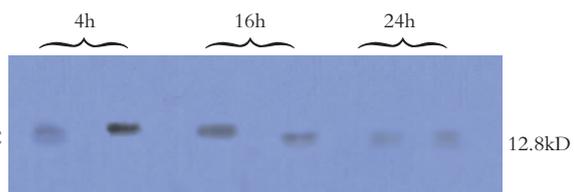


图 2 细胞色素在线粒体和胞浆中的分布,每组右侧条带为线粒体,左侧为胞浆

2.3 间接免疫荧光细胞化学技术检测细胞色素 C 在细胞内的分布

间接免疫荧光法检查发现,未受药物处理的肝癌细胞中细胞色素 C 蛋白荧光的分布呈粗点

状或细块状,提示细胞色素 C 蛋白局限于线粒体(图 3)。药物处理细胞 2 h 后,线粒体细胞色素 C 蛋白荧光呈弥散细点状,均匀分布于胞浆,表示蛋白从线粒体释放到胞浆(图 4)。

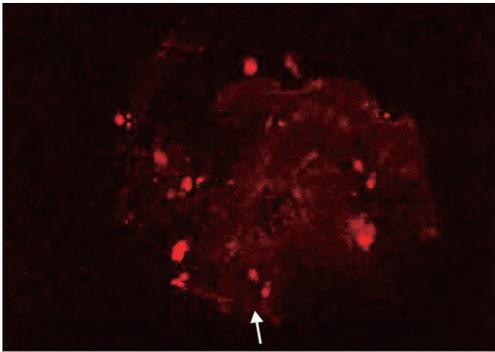


图3 细胞色素 C 蛋白分布呈粗点状或细块状(箭头所指)($\times 400$)

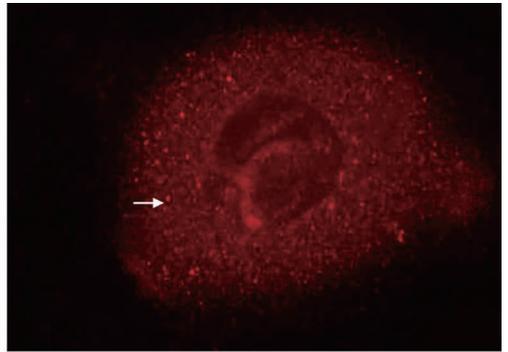


图4 细胞色素 C 蛋白呈弥散性点状分布(箭头所指)($\times 400$)

3 讨论

内源性凋亡通路在细胞损伤所激发的细胞凋亡中的地位日益受到重视,“内部应急”如癌蛋白、直接 DNA 损伤、缺氧和存活因子撤除能激活内源性通路^[7]。一系列致凋亡蛋白包括细胞色素 C (cytochrome C, cyto C)、AIF (Apoptosis inducing factor) 及 Smac/DIABLO 等从线粒体转移到胞浆引发 caspase 瀑布式活化,启动凋亡^[8-9]。

细胞色素 C 由核基因编码,先在胞浆中合成不含血红素的孤细胞色素 C (Apocytochrome C),然后移入线粒体中,并与血红素基因结合形成全细胞色素 C (Holocytochrome C)。全细胞色素 C 为可溶性蛋白,正常时位于线粒体膜间腔,为呼吸链电子转运体。全细胞色素 C 释放到胞浆后,在有 dATP/ATP 存在时,可与凋亡活化因子 Apaf-1 (Apoptosis activating factor) 组合成轮状凋亡体 (Apotosome)。1 个凋亡体和 7 个 caspase-9 前体借助相互间的 CARD 结构域而结合,由于局部高浓度,使 caspase-9 前体发生自身蛋白酶水解裂解而活化^[10]。细胞未发生凋亡时,由于线粒体外膜完整,细胞色素 C 被禁闭于线粒体当中,荧光相对集中于线粒体中,因而呈点状或细块状。细胞一旦凋亡,线粒体功能就开始出现功能紊乱,细胞色素 C 释放到胞浆,就会造成荧光呈弥散状分布^[11]。本实验研究证实,氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡过程中,在凋亡早期就有细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆。间接免疫荧光法检查发现仅药物处理 2 h 后代表细胞色素 C 的荧光在细胞中的分布即发生明显变化,由点状或细块状分布变弥散状分布。本研究的 Western-blot 的结果也支持上述结果,药物处理 4 h 后可见线粒体中的细胞色素 C 量也开始减少,而胞浆中的量开始增多。而且这种动态变化方式与药物诱导凋亡的过程在时间上基本同步。提示,在氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡的早期就发生了线粒体功能紊乱,有细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆。

Caspase-9 是内源性凋亡通路的最上游蛋白

酶,处在 caspase 瀑布式活化的尖端。因此,它的活化对于整个内源性凋亡通路的激活尤为重要。caspase-9 与其它 caspase 家族成员很相似,以无活性的酶原形式存在于胞浆中。caspase-9 作为细胞凋亡内源性通路的启动性 caspase,其活化需与细胞色素 C 和 Apaf-1 形成的凋亡体结合,通过蛋白酶水解裂解成大 (35 kD)、小 (10 kD) 亚单位,才能产生有催化活性的异源四聚体,即成熟的 caspase-9^[9-10],才可以催化效应性 caspase-3 或-6 的蛋白酶水解裂解,引发 caspase 瀑布式活化,导致细胞迅速瓦解死亡。本实验发现,Pro-caspase-9 的活化与细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆基本同步,提示细胞色素 C 可能在 caspase-9 的活化和肝癌细胞凋亡中可能有着重要作用。

参考文献:

- [1] Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease [J]. *Am J Med*, 2000, 108 (7): 567 - 574.
- [2] Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, *et al.* Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase-9 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (25): 14250 - 14255.
- [3] Acehan D, Jiang X, Morgan DG, *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, pro-caspase-9 binding, and activation [J]. *Mol Cell*, 2002, 9 (2): 423 - 432.
- [4] 杨建青, 杨连粤, 祝和成. 丝裂霉素诱导人肝癌细胞凋亡 [J]. *世界华人消化杂志*, 2001, 9 (3): 14 - 18.
- [5] 易彤波, 杨连粤. Caspase-8 在 5 氟尿嘧啶诱导肝癌细胞凋亡中的作用 [J]. *中华普通外科杂志*, 2002, 17 (3): 171 - 172.
- [6] 杨建青, 黄柏英, 吕新生. Caspase-9 在氟尿嘧啶诱导的肝癌细胞凋亡中的作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12 (3): 173 - 175.
- [7] Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256 (1): 42 - 49.
- [8] Vousden KH. P53: death star [J]. *Cell*, 2000, 103 (5): 691 - 694.
- [9] Antonsson B, Martinous JC. The Bcl-2 protein family [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256 (1): 50 - 57.
- [10] Acehan D, Jiang X, Morgan DG, *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, pro-caspase-9 binding, and activation [J]. *Molecular Cell*, 2002, 9 (2): 423 - 432.
- [11] Mosser DD, Caron AW, Bourget L, *et al.* The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20 (19): 7146 - 7159.