

文章编号:1005-6947(2008)07-0673-05

· 基础研究 ·

线粒体融合素基因-2对肝癌细胞凋亡的影响及其机制

王尧, 郑启昌, 胡文君, 胡青钢, 夏耘, 张景辉

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430020)

摘要:目的 探讨外源性线粒体融合素基因-2(mfn2)对肝癌细胞株 HepG2 凋亡的影响及其机制。方法 利用脂质体 2000 将质粒 mfn2 转染 HepG2 细胞。RT-PCR 检测转染后细胞 mfn2 mRNA 的表达水平;Western Blot 法检测 mfn2 蛋白的表达;MTT 检测 mfn2 对 HepG2 细胞增殖的影响;Annexin-V/PI 双标记法检测转染前后细胞凋亡的变化;RT-PCR 检测凋亡相关基因的表达;电镜观察超微结构的变化。结果 转染 mfn2 基因的 HepG2 细胞可以稳定表达 Mfn2 蛋白;MTT 实验提示转染 mfn2 基因后, HepG2 细胞增殖受到抑制;转染组与转染空质粒组和空白对照组相比前者可促进细胞凋亡($P < 0.05$);电镜示 mfn2 转染后 HepG2 细胞线粒体嵴断裂、消失、基质疏松;RT-PCR 结果示 Bcl-2 和 survivin 基因表达下调。结论 外源性 mfn2 基因可抑制 HepG2 细胞的增殖,诱导其凋亡。凋亡相关基因的表达下调可能是其诱导凋亡的机制。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 673-677]

关键词: 肝肿瘤;线粒体基因;细胞凋亡

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** A

Effect of mitofusin-2 gene on apoptosis of hepatic carcinoma cell strain and its possible mechanism

WANG Yao, ZHENG Qichang, HU Wenjun, HU Qinggang, XIA Yun, ZHANG Jinghui

(Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of mitofusin-2 gene (mfn2) on apoptosis of hepatocellular carcinoma cell strain HepG2 and its possible mechanism. **Methods** Plasmid pEGFPmfn2 was transfected into hepatocellular carcinoma cell strain HepG2 by Lipofectamine 2000 in vitro. The mRNA of Mfn2 expression was detected by RT-PCR and protein expression by Western-blot. The cell proliferation of HepG2 was measured by MTT assay and cell apoptosis was observed in Annexin-V/PI by flow cytometry. The ultramicrostructure of cell was observed by electron microscope. The expression of apoptosis related genes was observed by RT-PCR. **Results** Mitofusin-2 gene was expressed in transfected HepG2/mfn2 stably and it could obviously inhibit cell proliferation by MTT assay. Exogenous mfn2 gene significantly induced cell apoptosis and induced the break down, disappearance and groundsubstance rarefaction of chondrosome cristae. Expression of Bcl-2 and survivin genes were reduced in HepG2/mfn2. **Conclusions** Exogenous mfn2 could inhibit proliferation of HepG2 and induce its apoptosis. The downregulation of apoptosis related genes may be the mechanism for inducing apoptosis. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(7): 673-677]

Key words: Liver Neoplasms; Mitochondrial Gene; Cell Apoptosis

CLC number: R 735.7

Document code: A

收稿日期:2008-02-01; 修订日期:2008-05-28。

作者简介:王尧,男,华中科技大学同济医学院附属协和医院博士研究生,主要从事肝胆疾病基础和临床方面的研究。

通讯作者:郑启昌 E-mail:tongjimc@126.com

恶性肿瘤是一种多基因异常疾病,包括原癌基因的激活或抑癌基因的突变、失活或缺失等。基因治疗的临床应用为恶性肿瘤的治疗提供了良好的前景。线粒体融合素基因-2 (mitofusin-2 gene, mfn2) 是我国学者陈光惠在对血管平滑肌细胞的 cDNA 文库进行筛选时分离获得的一个新基因,它具有重要的调节血管平滑肌细胞的增殖作用^[1];在维持线粒体融合、线粒体形态、新陈代谢等方面也发挥了重要作用^[2]。mfn2 在细胞凋亡尤其是对肿瘤细胞凋亡的影响已引起关注,但现仍知之甚少。笔者在前期的实验中已经构建了该基因的真核表达载体及稳定表达该基因的肝癌细胞株,本研究拟通过体外转染 mfn2 基因至肝癌细胞 HepG2,探讨其对肝癌细胞凋亡的影响及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞株 HepG2 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心;重组真核表达质粒 pEGFPmfn2 由本实验室构建;mfn2 引物、内参照 β -actin 引物、Trizol RNA 抽提试剂、多聚酶链反应试剂盒、RPMI1640 培养基、新生牛血清等购自美国 Gibco 公司;lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;四甲基偶氮唑蓝盐 (MTT)、免疫印迹 (Western-blot) 化学发光试剂、硝酸纤维素膜、mfn2 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司;AnnexinV/FITC 凋亡检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司;FEI Tecnai G212 型透射电子显微镜 (荷兰) 由本校同济医学院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 (1) 基因转染组: HepG2 细胞在含 10% 新生牛血清的改良型 RPMI1640 培养基中培养、传代。取 5×10^5 个细胞/孔接种 6 孔培养板, 37°C , 5% CO_2 培养箱中过夜培养至 80% ~ 90% 汇合;每孔细胞中加入含 pEGFPmfn2 质粒 4 μg /孔及 lipofectamine 2000 10 μL /孔的无血清培养基, 4h 后更换含血清培养基。(2) 转染 pEGFP 组: 将 pEGFP-N2 空载体如上述方法转染 HepG2 细胞。(3) 空白对照组: 将正常培养的 HepG2 细胞做空白对照。

于转染后 48h 收集细胞, 流式细胞仪检测转染效率。

1.2.2 逆转录-多聚酶链式反应 (RT-PCR) 检测 mfn2 基因的表达 消化收集转染 mfn2 细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA。根据基因库 (GeneBank) 中 mfn2 序列设计一对特异性引物: 5'-ATGTCCCTGCTCTTCTCTC-3'; 5'-CTATCTGCTGG-

GCTGCAG-3'。PCR 反应条件: 94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 1.5 min, 72°C 延伸 7 min; 共 30 个循环。PCR 产物 25 μL 上样琼脂糖凝胶, 50V 电泳 30 ~ 45 min 后照相。

1.2.3 Western-blot 检测目的蛋白的表达 取 40 μg 细胞裂解液与上样缓冲液混合, 煮沸 10min 后上样, 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜, 甲醇固定, 在含 5% 脱脂奶粉的封闭液 4°C 过夜。一抗稀释度为 1:1 000, 室温孵育 2h; 二抗稀释度为 1:1 000, 室温孵育 2h 后用 ECL 化学发光试剂盒处理并暗室显影。以 β -actin 为内参照。图像运用 Quantitative one 软件进行分析, 用 mfn2 蛋白条带与 β -actin 条带的积分密度比值表示其蛋白水平。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖情况 取对数生长期的 HepG2 细胞, 按 1×10^3 个细胞/孔铺于 96 孔板中, 24 h 后分为 3 组, 即转染 pEGFPmfn2 组、转染 pEGFP 组和空白对照组, 每组 5 个平行孔。分别于转染 1, 2, 3, 4, 5 d 每孔加 5 g/L MTT 20 μL , 培养 4 h, 弃培养基, 每孔加 DMSO 150 μL , 充分振荡 10 min, 在全自动酶标仪上检测 490 nm 吸光度值 (A 值)。计算细胞增殖抑制率 (%) = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{空白对照组 A 值}) \times 100\%$ 。重复 3 次取平均值并绘制生长曲线。

1.2.5 Annexin V/PI 双标法检测细胞凋亡 于转染后 48 h, 分别取 1×10^6 个转染 pEGFPmfn2 组、转染 pEGFP 组和空白对照组细胞, 冰磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次; 离心后 200 μL 结合缓冲液重悬细胞, 加 5 μL FITC-AnnexinV 及 10 μL 碘化丙啶 (PI), 避光保存 15 min; 加 300 μL 结合缓冲液, 上流式细胞仪检测。结果用 Cellquest 软件分析。每组重复 3 次, 取均值。

1.2.6 透射电镜观察细胞形态学变化 细胞转染 48 h 后, 消化收集 2×10^6 个转染 pEGFPmfn2 组、转染 pEGFP 组和空白对照组细胞, 分别以 800 r/min 和 1 500 r/min 离心 10 min, 加 4°C 预冷的 2.5% 戊二醛固定; 按本院电镜室操作规程处理细胞, 用透射电子显微镜进行观察。

1.2.7 凋亡相关基因的表达 消化收集转染后 mfn2 细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 根据 GeneBank 中 Bcl-2 及 survivin 的序列设计特异性引物。Bcl-2 引物: 5'-GGAAATATGGCC-CACGCT-3', 5'-TCACTTGTGCCCCAGAT-3'。

Survivin 引物: 5'-ACCAAGGGTTAATTCTTCA-3', 5'-AGGACCACCGCATCTC-3'。

β -actin 引物: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 5'-CTCCTTAATGTACACGCACGATTTTC-3'。PCR 反应条件如前。

1.3 统计学处理

实验结果以($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据采用SPSS12.0统计软件进行处理。组间比较使用方差分析和 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率

流式细胞仪检测绿色荧光强度,空白对照组、转染 pEGFP 组、pEGFPmfn2 组分别依次为(0.6 ± 0.2)%, (49.7 ± 3.4)% 和 (51.0 ± 3.8)%。说明转染成功。

2.2 mfn2 基因的表达

转染 mfn2 基因组可见大小约 2 274 bp 的条带表达(图 1),符合目的基因片段大小;转染空质粒组和空白对照组中未见相应的条带。表明转染后细胞可以稳定表达 mfn2 基因。

2.3 mfn2 蛋白的表达

Western 印迹法检测转染 pEGFPmfn2 细胞和未转染细胞 Mfn2 蛋白表达水平,以 β -actin 为内参照。可见 mfn2 蛋白在转染基因组细胞中表达,与 β -actin 积分密度比值为 0.362,而在未转染组细胞中未见表达(图 2)。表明转染细胞可较稳定地表达 mfn2 蛋白。

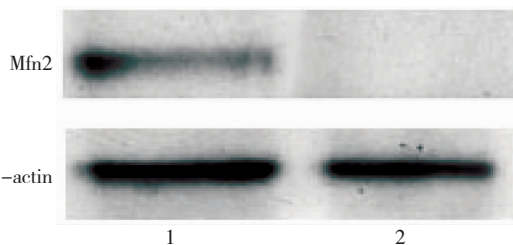


图 2 转染后 HepG2 细胞 mfn2 蛋白水平表达 1:mfn2 转染组细胞; 2:未转染组细胞

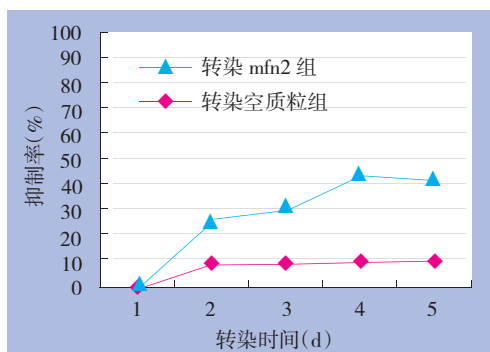


图 3 mfn2 基因对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

2.5 细胞凋亡情况

转染 48 h 后,空白对照组、转染空质粒组及 pEGFPmfn2 转染组细胞凋亡百分率分别为(1.58 ± 0.34)%, (2.16 ± 0.49)% 和 (16.87 ± 0.35)%。pEGFPmfn2 转染组细胞与转染空质粒组及空白对照组相比较,差异均有显著性($P < 0.05$);而转染空质粒 pEGFP 组细胞数与对照组比较差异无显著性。表明 mfn2 基因转染可诱导 HepG2 细胞凋亡(图 4)。

2.6 电镜所见

转染 pEGFPmfn2 组细胞 48 h,电镜下可见多量凋亡细胞,核固缩,染色质边集、细胞裂解及凋亡小体出现,并可见细胞内线粒体嵴断裂、消失,基质疏松,部分线粒体肿胀排列于核周围;其他两组未见明显凋亡细胞(图 5)。

2.7 凋亡相关基因的表达

转染基因组转染后 HepG2 细胞 Bcl-2, survivin 基因的表达水平进行分析(图 6)。结果示转染组的基因表达水平均降低,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。提示转染后细胞凋亡的相关基因下调,这可能是其促进凋亡的机制之一。

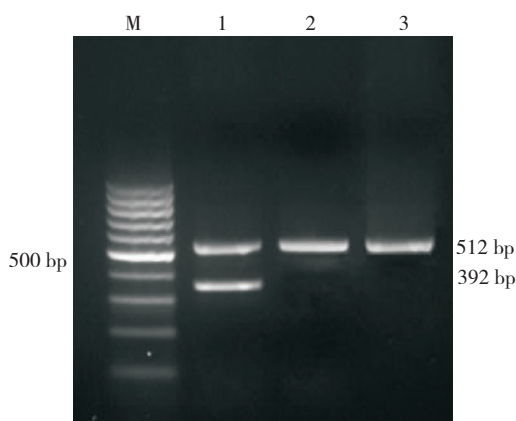


图 1 转染后 HepG2 细胞 mfn2 mRNA 表达水平 M:DNA marker; 1:pEGFPmfn2 转染细胞; 2:转染空质粒细胞; 3:空白对照组

2.4 细胞生长曲线

转染 HepG2 细胞 24 h 后,MTT 法检测结果显示。随着时间的延长,转染 pEGFPmfn2 组活细胞数明显低于转染空质粒 pEGFP 组与对照组,差异有显著性($P < 0.05$);而转染空质粒 pEGFP 组细胞数与对照组比较差异无显著性(图 3)。

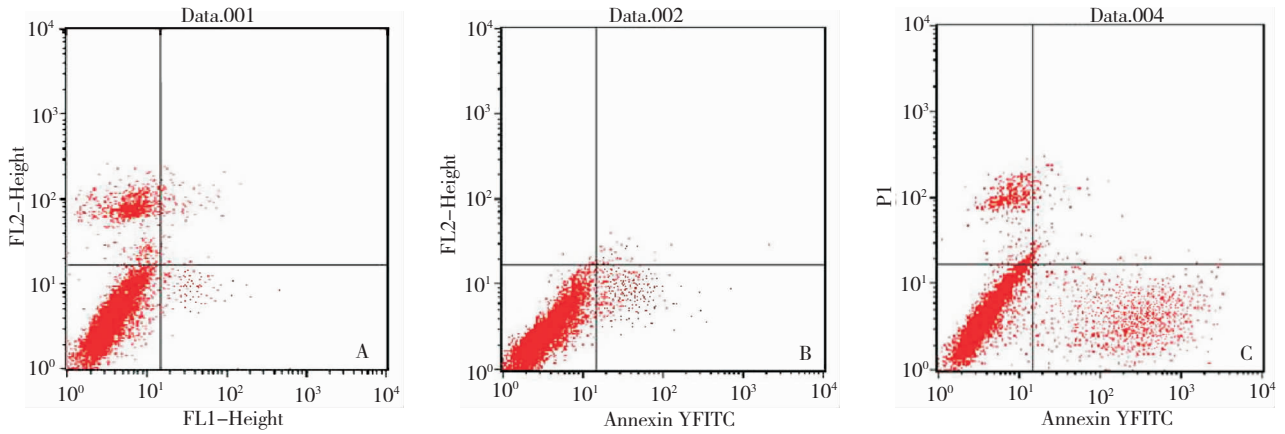


图4 转染 mfn2 后 HepG2 细胞凋亡 A:空白对照组; B:转染空质粒组; C:pEGFPmfn2 转染组

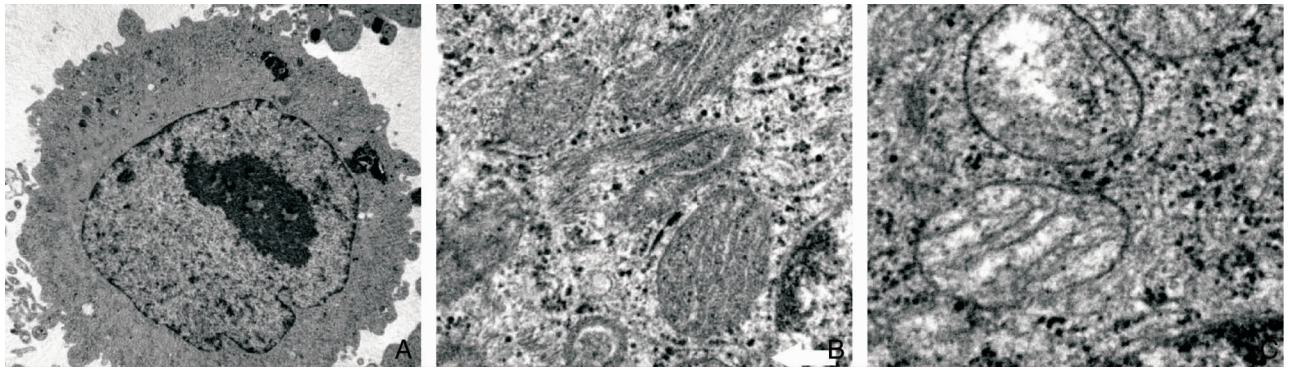


图5 转染后细胞及线粒体超微结构变化 A:正常细胞; B:正常细胞线粒体; C:凋亡细胞线粒体改变

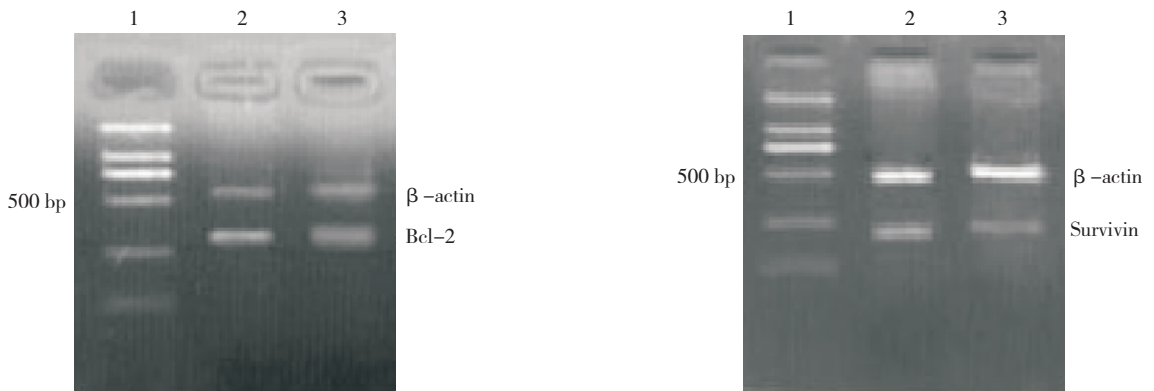


图6 转染后细胞凋亡相关基因 mRNA 表达水平 1:PCR marker; 2:对照组; 3:mfn2 转染组

3 讨论

细胞增殖和细胞凋亡在恶性肿瘤的发生、发展中发挥着重要作用。随着研究的深入,对其调控机制的研究已从细胞质膜转向线粒体。在哺乳动物细胞和酵母中,线粒体可以通过融合与分裂之间的平衡调节其自身的大小和形态^[3],从而维持线粒体发挥正常功能。线粒体融合蛋白(mitofusin, mfn)在哺乳动物有 mfn1 和 mfn2,后者

定位于线粒体外膜,对线粒体的融合、形态和功能起着重要的调节作用^[4-5]。研究发现,mfn2 与线粒体的能量代谢、膜电位、细胞呼吸等相关^[6],而且 mfn2 基因在线粒体的新陈代谢、调节细胞信号等方面也发挥重要作用^[2]。进一步研究表明,其可通过抑制 Ras-Raf-ERK-MAPK 途径,有效地阻遏血管平滑肌细胞周期和抑制细胞增殖,并可通过活化线粒体凋亡途径促进大鼠血管平滑肌凋亡^[7]。

mfn2 基因定位于人的 1 号染色体短臂 36.22 位置上;此区域为多种肿瘤的突变高发区,许多肿瘤患者染色体的这一区带会出现缺失或易位^[8-9]。*mfn2* 的同源基因 *rHSG* 在大鼠睾丸、肝脏、心肌、脑组织中呈高表达,在肾、骨骼肌中较高表达,在正常人的骨骼肌中呈高表达,乳腺、肝脏组织中较高表达,在肝癌组织中低表达^[10]。

笔者前期实验已构建了 *mfn2* 基因的真核表达质粒,并建立了稳定表达细胞株^[11]。为了探讨 *mfn2* 基因对肿瘤细胞的作用及其可能机制,本实验通过 MTT 法检测 *mfn2* 基因转染后人 HepG2 细胞的增殖情况,结果显示转染后细胞的增殖受到抑制,说明外源性 *mfn2* 基因具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。但具体机制尚不明。双标法对细胞凋亡的检测及对凋亡细胞超微结构的观察提示,外源性 *mfn2* 基因可诱导 HepG2 细胞凋亡,而且可观察到凋亡的 HepG2 细胞及细胞内多数线粒体的嵴完全断裂呈肿胀空泡样变,线粒体基质疏松,部分线粒体的外膜破裂,且肿胀的线粒体紧密地排列在核周围。说明转染 *mfn2* 基因后线粒体的形态结构发生了改变,可能与细胞的增殖抑制和凋亡有关。凋亡相关基因的检测提示, HepG2 细胞凋亡发生的机制可能与凋亡抑制基因 *Bcl-2* 和 *survivin* 表达的下调有关。*Bcl-2* 是细胞凋亡相关基因 *Bcl* 家族中的重要成员,编码一种膜结合蛋白,定位于线粒体膜、核膜、内质网上,主要通过阻滞线粒体释放细胞色素 C 等物质来发挥抑制细胞凋亡的作用^[12]。*survivin* 是凋亡抑制蛋白家族(IAP)中最小、作用最强的一员,*survivin* 基因阻断细胞凋亡的途径是通过直接作用于终末效应酶-半胱氨酸蛋白酶 *Caspase-3* 和 *Caspase-7*^[13-14]。近期研究表明,*Survivin* 可被认为是 *p53* 抑制基因,对 *p53* 依赖性凋亡发挥转录抑制作用^[15]。本实验可观察到 *Bcl-2* 和 *survivin* 基因的下调。笔者认为,*mfn2* 基因可能通过下调 *Bcl-2* 及 *survivin2* 基因,使线粒体释放细胞色素 C 等凋亡诱导因子增加,并可减弱对 *Caspase-3* 和 *Caspase-7* 活性的抑制,使其活化,从而发挥诱导细胞凋亡的作用。具体作用机制尚待研究证实^[16]。

综上所述,外源性 *mfn2* 基因转染 HepG2 细胞后可抑制细胞增殖,并可诱导细胞凋亡。其发挥作用的机制可能与线粒体改变、调节凋亡相关基因的表达有关。因此,*mfn2* 基因有可能系新的抑癌基因。就认识肿瘤的发生发展及治疗而言,对其进行深入研究可能有重要的潜在意义。

参考文献:

- [1] Chen KH, Guo X, Ma D, *et al.* Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6 (9): 872 - 873.
- [2] Bach D, Pich S, Soriano FX, *et al.* Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (19): 17190 - 17197.
- [3] Tondera D, Czaderna F, Paulick K, *et al.* The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (14): 3049 - 3059.
- [4] Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (5): 867 - 874.
- [5] Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117 (26): 6535 - 6346.
- [6] Honda S, Aihara T, Hontani M, *et al.* Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2 [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (14): 3153 - 3161.
- [7] 李俐, 王剑明, 陈光慧, 等. *mfn2* 基因对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的促进作用及其机制 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2007, 36 (1): 57 - 59.
- [8] Hofmann WK, Takeuchi S, Xie D, *et al.* Frequent loss of heterozygosity in the region of D1S450 at 1p36.2 in myelodysplastic syndromes [J]. *Leuk Res*, 2001, 25 (10): 855 - 858.
- [9] Hogarty MD, Maris JM, White PS, *et al.* Analysis of genomic imprinting at 1p35-36 in neuroblastoma [J]. *Med Pediatr Oncol*, 2001, 36 (1): 52 - 55.
- [10] Bach D, Pich S, Soriano FX, *et al.* Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (19): 17190 - 17197.
- [11] 王尧, 郑启昌, 胡青钢, 等. 稳定表达线粒体融合素基因 2 肝癌细胞株的建立和意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17 (1): 37 - 40.
- [12] Kobayashi M, Nakamura S, Shibata K, *et al.* Etodolac inhibits EBER expression and induces *Bcl-2*-regulated apoptosis in Burkitt's lymphoma cells [J]. *Eur J Haematol*, 2005, 75 (3): 212 - 220.
- [13] Shin S, Sung BJ, Cho YS, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40 (4): 1117 - 1123.
- [14] 李志红, 王志明, 穆拉德. 三氧化二砷与阿霉素对人肝癌细胞株 HepG2 中 *survivin* 表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (6): 441 - 447.
- [15] Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, *et al.* Transcriptional repression of the anti-apoptotic *survivin* gene by wild type *p53* [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 3247 - 3257.
- [16] 黄文广, 李杰, 王峰, 等. 维甲酸诱导肝癌细胞株凋亡及其与 *midkine* 基因表达关系的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (10): 783 - 785.