

线粒体移植增强人神经胶质瘤 U87 细胞的辐射敏感性

杨世锋^{1), 2)}, 孙超^{2), 3)}, 李昭君⁴⁾, 王玉佩^{2), 3)}, 张红^{1), 2), 3)}*

(¹⁾ 兰州大学药学院, 兰州 730000; (²⁾ 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;

(³⁾ 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049; (⁴⁾ 兰州大学药学院药理学研究所, 兰州 730000)

摘要 线粒体移植(mitochondrial transplantation)是从患者正常组织分离线粒体然后注入线粒体损伤或缺失的部位,使损伤细胞获得救治、器官功能得以恢复的全新干预技术。本研究重点探讨线粒体移植对人神经胶质瘤细胞(U87)辐射敏感性的影响。提取人星形胶质细胞(human astrocytes, HA)的线粒体,用荧光探针 Mito-Tracker Red 进行标记后再与 U87 细胞共培养,激光共聚焦显微镜观察发现, Mito-Tracker Red 的红色荧光大量出现在 U87 细胞内;随后对进入细胞内的游离线粒体荧光强度进行定量分析,游离线粒体和 U87 细胞共培养 12 h 时,单细胞内荧光强度由本底值 0.08 上升至 1.83,表明游离线粒体可以通过共培养方式进入 U87 细胞内。随后给予 U87 细胞 X 射线辐照, Western 印迹结果显示,联合组与单独辐照组相比, Cyto-C 和 Bax 的表达量分别由 179.5% 和 198.5% 升高至 251.72% 和 256.10%, Bcl-2 的表达量由 57.17% 降低至 22.23%;使用 Annexin V/PI 双染法检测到联合组 U87 细胞凋亡量相比单独辐照组的 3.1% 和 23.5% 上升至 19.2% 和 43.8%; RT-CES 检测结果表明, 96 h 内联合组 U87 细胞生长曲线被抑制;联合组克隆形成率相对单独辐照组的 53% 下降至 29.3%。鬼笔环肽染色发现,线粒体移植组细胞表面丝状伪足相比对照组明显减少。本研究提示,线粒体移植能够促进辐射诱导的肿瘤细胞凋亡,对 U87 细胞具有辐射增敏作用,其作用机制与重新激活线粒体凋亡通路、降低肿瘤恶性程度有关。

关键词 线粒体移植; 人神经胶质瘤细胞(U87); 辐射敏感性; 线粒体凋亡通路

中图分类号 Q25 Q28

Mitochondrial Transplantation Enhances Radiosensitivity of Human Glioma U87 Cells

YANG Shi-Feng^{1), 2)}, SUN Chao^{2), 3)}, LI Zhao-Jun⁴⁾, WANG Yu-Pei^{2), 3)}, ZHANG Hong^{1), 2), 3)}*

(¹⁾ School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; (²⁾ Institute of Modern Physics, Chinese

Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China; (³⁾ College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

(⁴⁾ Pharmaceutics Institute, School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract Mitochondrial transplantation, is a novel therapeutic intervention by isolating the mitochondria from the normal parts of the patient and then injecting into the areas in which mitochondria are deficient, allowing the injured cells and organs return to normal function. This study focused on the effects of mitochondrial transplantation on radiosensitivity of human glioma (U87) cells. Isolated mitochondria from human astrocytes (HA) cells were extracted and labeled with Mito-Tracker Red and then co-cultured

收稿日期: 2018-05-30; 修回日期: 2018-09-30; 接受日期: 2018-10-17

国家自然科学基金面上项目(No. 11775280, No. U1432248); “西部之光”人才培养引进计划“西部青年学者”项目(No. Y866020XB0)和甘肃省自然科学基金项目(No. 18JR3RA391)资助

* 通讯作者 Tel: 86-931-4969344; E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

Received: May 30, 2018; Revised: September 30, 2018; Accepted: October 17, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 11775280, No. U1432248), the CAS “Light of West China” Program (No. Y866020XB0) and Natural Science Foundation of Gansu Province(No. 18JR3RA391)

* Corresponding author Tel: 86-931-4969344; E-mail: zhangh@impcas.ac.cn

with U87 cells. The red fluorescence of Mito-Tracker Red was observed in the U87 cells by laser confocal microscopy. Quantitative analysis showed that the intracellular fluorescence intensity of free mitochondria and U87 cells increased from 0.08 to 1.83 after co-culture for 12 h, indicating that isolated mitochondria could enter U87 cells by co-culture. U87 cells were then exposed to X-rays. Western blot results showed that the expression levels of Cyto-C and Bax were increased from 179.5% and 198.5% to 251.72% and 256.10%. The expression of Bcl-2 was decreased from 57.17% to 22.23% in the combined group compared with the single irradiation group. The apoptosis of U87 cells in the combined group was detected by Annexin V/PI double staining, which increased to 19.2% and 43.8% as compared with 3.1% and 23.5% of the irradiated group alone. The results of RT-CES showed that the growth curve of U87 cells was inhibited in 96 h. The colony-forming ratio of combined group decreased from 53% to 29.3% when compared with that of irradiated group. In addition, after staining with phalloidin, the number of filopodia in the mitochondrial transplantation group was obviously reduced. Overall, these findings suggested that mitochondrial transplantation could enhance the radiosensitivity of U87 cells, which may be related to the activation of mitochondrial apoptotic pathway after X-ray radiation and the reduction of malignancy of the tumor cells.

Key words mitochondrial transplantation; human glioma (U87) cells; radiosensitivity; mitochondrial apoptotic pathway

线粒体 (mitochondria) 是真核细胞能量合成的重要细胞器,不但为细胞提供能量,而且还参与诸如细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等生理病理过程,并拥有调控细胞生长和细胞周期的能力^[1],而线粒体功能障碍也与许多人类的疾病有关^[2]。最新研究表明,癌症是一种代谢相关疾病^[3]。肿瘤细胞的能量供给方式由氧化磷酸化转换为糖酵解,而其能量代谢的转换与线粒体结构异常和功能障碍有关。肿瘤细胞的线粒体功能障碍包括:有氧糖酵解增加、线粒体凋亡通路抑制和对放疗敏感性降低^[4]。线粒体移植 (mitochondrial transplantation) 是从患者正常组织分离线粒体,然后注入线粒体损伤或缺失的部位,使损伤细胞获得救治、器官功能得以恢复的全新干预技术^[5-7],其正作为一种新兴治疗方案在一些疾病干预的基础研究中崭露头角。本研究重点探讨人星形胶质细胞 (human astrocytes, HA) 的线粒体,通过共培养方式进入人神经胶质瘤 (U87) 细胞,从而重新激活肿瘤细胞内因线粒体缺陷所阻断的线粒体凋亡通路,改善肿瘤的恶性表型、提高辐照后肿瘤细胞致死率,发挥线粒体移植的辐射增敏作用,旨在为神经胶质瘤放射治疗方案的优化及“线粒体生物制剂”在临床的开发和应用提供可靠的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

U87 细胞购自上海吉凯基因公司,HA 细胞购自美国 ScienCell 公司,DMEM 培养基、胰蛋白酶和 PBS

购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自北京 TransGene 公司,AM 培养基、多聚赖氨酸购自美国 ScienCell 公司,线粒体提取试剂购自碧云天公司,Cytochrome C 单克隆抗体、Bax 单克隆抗体和 Bcl-2 单克隆抗体购自美国 CST 公司, β 肌动蛋白购自北京博奥森公司,山羊抗兔二抗购自 Gene Tex 公司,Mito-Tracker Red 购自 Thermofisher 公司,FITC 偶联 Annexin-V 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司,F-actin Staining 试剂盒购自 Abcam 公司。主要实验仪器有:美国 Thermo Scientific 公司 8000DH CO₂ 培养箱、ZEISS 公司 DE20 倒置相差显微镜、ZEISS 公司 LSM700 激光共聚焦显微镜、Faxition 公司 43885DX 射线仪、Amnis 公司 Flow Cytometer 流式细胞分析仪、ACEA Biosciences 公司 RT-CES 实时细胞分析系统、Alpha Innotech 公司凝胶成像系统、Bio-Rad 公司 Mini-PROTEAN 蛋白电泳设备、BEKMAN COULTER 公司 Z1 Dual 细胞分析计数仪、Eppendorf 公司 5810R 离心机、瑞士 Tecan 公司 M200 多功能酶标仪。

1.2 细胞培养

U87 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下进行常规培养,2~3 d 传代;HA 细胞用 AM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下进行培养,7~10 d 传代,传代前用多聚赖氨酸包被培养瓶。所有实验均在细胞对数生长期进行。对照组细胞不进行任何处理;线粒体移植组为游离线粒体单独处理;辐照组为 4 Gy X 射线单独辐照;联合组为 U87 细胞与游离线粒体共培养 12 h 后给予 4 Gy X 射线辐照。X 射线源距

离样品表面约为 0.3 m, 能量为 50 keV, 照射剂量率为 0.45 Gy/min。

1.3 线粒体提取及移植

将 HA 细胞消化后, 600 g, 4℃ 离心 5 min, 弃上清。每 2×10^7 个细胞中加入线粒体分离试剂 1 mL, 吹匀, 冰上静置 10 ~ 15 min。将细胞悬液转移至匀浆器中, 手动匀浆 10 ~ 30 次, 用胎盘蓝染色液鉴定匀浆效果。600 g, 4℃ 离心 10 min, 取上清。11 000 g, 4℃ 离心 10 min, 沉淀即为细胞的线粒体。用 DMEM 培养基将线粒体吹匀, 在辐照 6 ~ 12 h 前加入 U87 细胞培养皿共培养。

1.4 线粒体鉴定

活性线粒体经 Mito-Tracker Red 染色后可发红色荧光, 活性较低或失去活性的线粒体则荧光较弱或无荧光。检测时, 在培养皿内加入线粒体 Mito-Tracker Red 荧光染色剂工作液 200 μ L 并混匀, 在培养箱内孵育 30 min, PBS 洗涤 2 次, 在荧光显微镜下观察荧光强度。

1.5 线粒体移植追踪观察

将灭菌的盖玻片放入 6 孔培养板中, 用多聚赖氨酸包被 2 h 后接种 U87 细胞。待细胞贴壁后, 提取 HA 细胞线粒体并用 Mito-Tracker Red 标记, 加入提前 1 d 接种好 U87 细胞的 6 孔板。分别在 6 h 和 12 h, 吸去培养基, PBS 快洗 2 次。用 4 % 多聚甲醛固定 15 min, 再用含 0.1 % Triton X-100 的 PBS 孵育样品 10 min, 再用 1 % BSA 封闭 30 min。在孔中加入 GFAP 一抗 (1:1 200), 4℃ 孵育过夜收集一抗, PBS 洗涤 3 次, 用二抗室温避光孵育 1 h。用 1 滴封片介质封片, 取出盖玻片, 轻轻扣在载玻片上, 用指甲油密封, 用激光共聚焦显微镜观察。

1.6 线粒体荧光定量

收集 U87 细胞, 接种于 96 孔板, 每孔细胞 1×10^4 个。待细胞贴壁后, 提取 HA 细胞线粒体, 并用 Mito-Tracker Red 标记, 加入 96 孔板与 U87 细胞共培养。分别在 0 h、6 h、12 h 时吸去培养基, PBS 快洗 2 次。在酶标仪上检测, 然后给予 4 Gy X 射线照射, 照射 6 h、12 h、18 h 和 24 h, 即线粒体加入 U87 细胞 18 h、24 h、30 h 和 36 h 时吸去培养基, PBS 快洗 2 次, 在酶标仪上检测。检测波长为 $E_x = 581$ nm, $E_m = 644$ nm。

1.7 蛋白质印迹分析

细胞处理 24 h, 收集细胞, 用 4℃ 预冷的 PBS 洗 2 次。用蛋白质裂解液裂解细胞, 提取总蛋白质, 整个过程在冰上进行。用 BCA 法测定样品含

量并调节样品浓度。取 20 μ g 蛋白质样品进行 SDS-PAGE, 转膜完成后, 用 5 % BSA 封闭 2 h, 加入一抗, 4℃ 摇床孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。加入二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, ECL 显色。结果经成像系统扫描条带, 目的条带的灰度值以 β -肌动蛋白灰度值作为参照, 以对照组灰度值作为 100 %, 分析各实验组蛋白质的相对表达量。

1.8 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡

细胞处理 24 h, 收集细胞, 用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤 1 次。调整待测细胞浓度至 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL, 取 1 mL 细胞悬液, 800 r/min, 4℃ 离心 4 min, 收集细胞。将细胞重悬于 150 μ L 缓冲液中, 向细胞悬液中加入 2 μ L Annexin V 和 1 μ L PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 上机检测。

1.9 RT-CES 实时分析监测系统监测细胞指数

对细胞进行线粒体移植和辐照处理后, 消化细胞并计数。用 RT-CES 实时分析监测系统, 分析板内每孔接种 2 000 个细胞。在培养箱内静置 20 min, 并轻轻拍打分析板边缘使孔内细胞分布均匀, 再连接至细胞分析仪并运行程序开始监测, 2 h 扫描 1 次, 监测 96 h。所有数据和统计值均由系统自动采集、计算和生成。

1.10 克隆形成实验

对细胞进行线粒体移植和辐照处理后, 将细胞消化并悬浮于培养基中备用。用细胞计数仪给细胞计数, 并接种于提前加入培养基的 60 mm 培养皿。每个培养皿接种 500 个细胞, 每组设 3 个平行样本。放入培养箱内培养 15 d, 弃掉培养基, 用 PBS 洗 2 次, 加适量用甲醇稀释过的结晶紫染色 30 min, 用蒸馏水洗净、晾干, 在倒置显微镜下观察, 统计大于 50 个细胞的克隆斑的个数, 计算克隆存活率。

$$\text{克隆存活率}(\%) = \frac{\text{克隆斑个数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

$$\text{克隆形成率}(\%) = \frac{\text{各处理组存活率}}{\text{对照组存活率}} \times 100\%$$

1.11 细胞伪足分布

采用鬼笔环肽染色法。将灭菌的盖玻片放入 6 孔培养板中, 接种对数生长期的 U87 细胞。待细胞贴壁后, 提取 HA 细胞线粒体, 与 U87 细胞共培养 12 h。吸去培养基, 用 4 % 多聚甲醛固定 30 min, 含 0.1 % Triton X-100 的 PBS 孵育样品 5 min, 再加入鬼笔环肽 (1:1 000) 避光孵育 30 min。用 1 滴封片介质封片, 取出盖玻片, 轻轻扣在载玻片上, 用指甲

油密封,用激光共聚焦显微镜观察。

1.12 统计学方法

所有实验重复 3 次,所得数据采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,计量之间的比较采用独立样本 *t* 检验。*P* 值小于 0.05 被认为差异有显著的统计学意义。

2 结果

2.1 提取的线粒体具有活性

为检验提取线粒体方法的可靠性,本文采用透射电镜和荧光显微镜对游离线粒体进行观察。如图 Fig. 1 所示,透射电镜拍摄的游离线粒体,其内部结构完整清晰,证明本研究采用的提取方法在提取线粒体后可充分保持结构的完整性。Mito-Tracker Red 可以对具有活性的线粒体进行染色,该染料的累积取决于线粒体膜电位。Fig. 1C、D 分别为 200 倍和 400 倍荧光显微镜下的 Mito-Tracker Red 染色的游离线粒体,其粒径在 0.5 ~ 1 μm 左右,背景清晰,荧光较强,说明线粒体膜电位较高,表示提取后的线粒体依然能够保持活性。

2.2 线粒体移植后可进入 U87 细胞

为证明游离线粒体能够通过共培养的方式进入 U87 细胞,本文采用激光共聚焦显微镜观察经 Mito-Tracker Red 染色的游离线粒体在共培养 6 h 和 12 h 后进入 U87 细胞的情况。如图 Fig. 2 所示,GFAP 标记的 U87 细胞在激光共聚焦显微镜下发出绿色荧光,Mito-Tracker Red 标记的游离线粒体发出红色荧光。共培养 6 h 时,可以在 U87 细胞内看到游离线粒体进入,12 h 后 U87 细胞内线粒体数量明显增多,说明外源线粒体可通过共培养方式进入宿主细胞并保持活性。

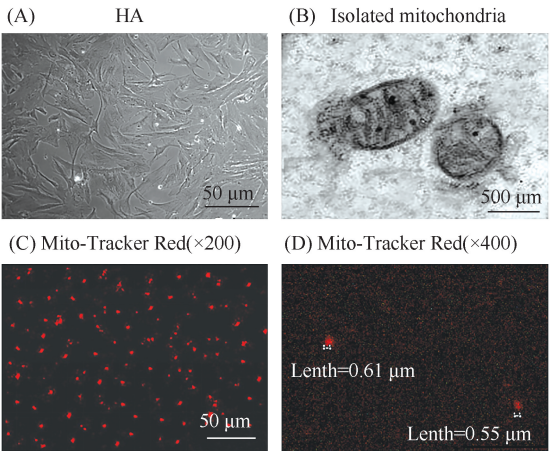


Fig. 1 The detection of mitochondrial activity (A) HA cells were photographed under the inverted phase contrast microscope. (B) Transmission electron microscopy (TEM) of extracellular mitochondria in astrocyte-derived conditioned medium (ACM). (C) Isolated mitochondria were stained with Mito-Tracker Red and observed under a fluorescence microscope. (D) Isolated mitochondria were stained with Mito-Tracker Red and observed under a fluorescence microscope

2.3 X 射线照射引起线粒体荧光强度降低

为探究不同时间内进入 U87 细胞的线粒体的相对数量,本研究利用 Mito-Tracker Red 对不同时间内进入 U87 细胞的线粒体进行了荧光定量, Fig. 3 是不同时间段内测得的荧光强度和所接种细胞量的比值。在游离线粒体与 U87 细胞共培养 6 h 时,单细胞平均荧光强度由 0 h 的 0.08 上升至 1.18,12 h 后上升至 1.83,说明在此时间段内有大量游离线粒体进入 U87 细胞。12 h 后给予 U87 细胞 4 Gy X 射线照射,照射 6 h 后荧光强度降低至 1.50,12 h 后降低至 1.14,18 h 后降低至 0.93,24 h 后降低至 0.73。说明 X 射线照射后,导致线粒体损伤,细胞内功能性线粒体的数量大幅下降。

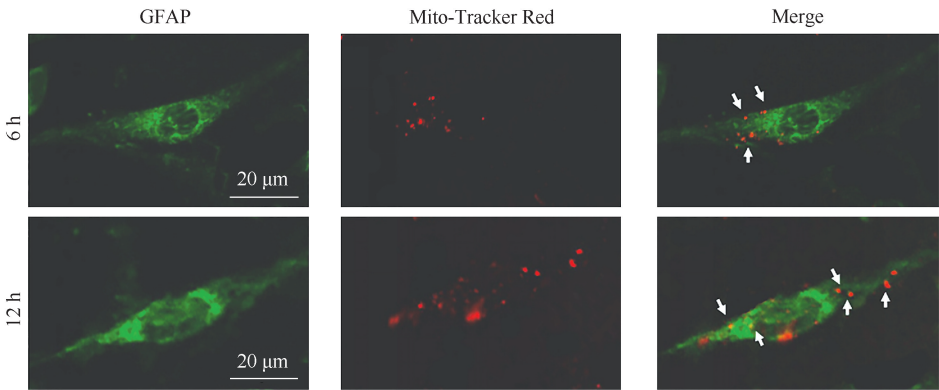


Fig. 2 Transplantation of isolated mitochondria in U87 cells Isolated mitochondria of HA cells were extracted and co-cultured with U87 cells for 6 hours or 12 hours. Mitochondria HA cells were labeled with Mito-Tracker Red, and U87 cells were labeled with GFAP. The arrows indicate the mitochondria marked with Mito-Tracker Red

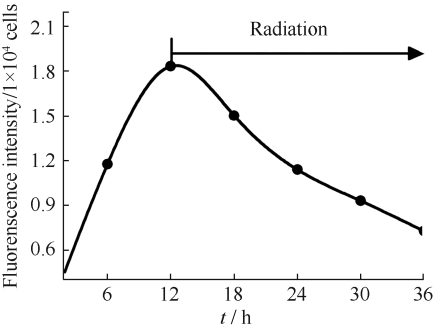


Fig. 3 Fluorescence quantification of exogenous mitochondria in U87 cells Isolated mitochondria of HA cells were extracted and co-cultured with U87 cells for 0, 6, 12, 18, 24, 30 and 36 hours respectively. U87 cells were exposed to X-rays after 12 hours co-cultured with isolated mitochondria. Mitochondria of HA cells were labeled with Mito-Tracker Red. Detection wavelength: Ex = 581 nm, Em = 644 nm

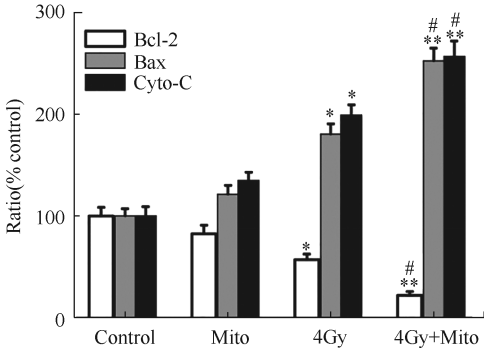
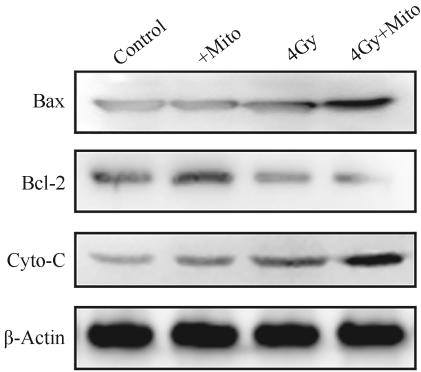


Fig. 4 Analysis of apoptotic related proteins by Western blotting (A) U87 cells were exposed to X-rays after 12 hours co-cultured with isolated mitochondria for 24 hours. Cell lysates were prepared. The proteins in lysates were separated by 10% SDS-PAGE. After transferring onto the membrane, the blots were probed with anti-Cyto-C, anti-Bax, and anti-Bcl-2. β -Actin was used as loading control. (B) The amount of protein was quantified by the integrated density of each band. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control group; # $P < 0.05$ versus 4 Gy irradiation alone

2.5 线粒体移植促进 X 射线诱导的 U87 细胞凋亡

为进一步研究线粒体移植对 X 射线诱导 U87 细胞凋亡的影响,本研究在 X 射线辐照 24 h 时,采用 AnnexinV/PI 双染法对 U87 细胞凋亡情况进行检测。如 Fig. 5 所示,4 Gy X 射线辐照后,细胞早期凋亡率和晚期凋亡率相比对照组,分别上升至 3.1% 和 23.5%,而联合组上升至 19.2% 和 43.8%,与单独辐照组相比,凋亡率有明显升高。进一步证明线粒体移植能够增强 U87 细胞对 X 射线的敏感性,在辐照后促进 U87 细胞凋亡。

2.6 线粒体移植增强 X 射线照射对细胞增殖的抑制作用

为在更长时间段内评价线粒体移植对 U87 细胞辐射敏感性的影响,采用 RT-CES 系统对辐射后 96 h 内细胞增殖曲线进行绘制。结果如 Fig. 6,照射

2.4 线粒体移植增强 X 射线辐射后的 U87 细胞内凋亡通路的活化

为研究线粒体移植对 X 射线激活 U87 细胞凋亡通路的影响,本文利用 Western 印迹对辐照 24 h 时细胞中的 Cyto-C、Bax 和 Bcl-2 进行检测。结果如 Fig. 4,以对照组的蛋白质表达量为 100%,其他各组与之比较。结果显示,4 Gy X 射线辐照引起细胞中 Bax 和 Cyto-C 蛋白质含量分别升高至 179.5% 和 198.5%,Bcl-2 蛋白含量降低至 57.17%;而当线粒体移植 12 h 时再给予 U87 细胞辐照,细胞中 Bax 和 Cyto-C 蛋白含量分别升高至 251.72% 和 256.10%,Bcl-2 蛋白含量降低至 22.23%。说明线粒体移植能够加剧 X 射线辐照后的 U87 细胞线粒体的损伤,活化线粒体凋亡通路,促进 U87 细胞凋亡。

42 h 后,对照组存活细胞数量较多且生长速度较快,而辐照组和联合组的增殖均进入平台期。但相比辐照组,联合组存活细胞数量减少,生长曲线明显被抑制,说明线粒体移植能够增强 X 射线辐照对 U87 细胞的增殖抑制作用。

2.7 线粒体移植降低细胞克隆形成数量

为了更进一步证明线粒体在辐照诱导细胞死亡中的作用,本研究对辐照 15 d 后 U87 细胞的克隆形成情况进行检测。结果如 Fig. 7,以对照组克隆形成率为 100%,辐照组的克隆形成率为 53%,联合组克隆斑的数量明显减少,细胞克隆形成率为 29.3%。表明 X 射线可通过激活外源线粒体的线粒体凋亡通路,增强 U87 细胞的放射敏感性。

2.8 线粒体移植后 U87 细胞恶性程度明显下降

丝状伪足在肿瘤细胞表面的分布量与肿瘤

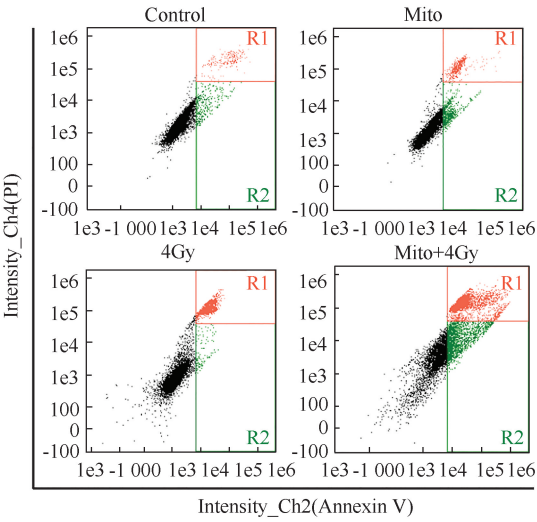


Fig. 5 Mitochondrial transplantation with X-ray radiation increased the apoptosis rate of U87 cells Cell apoptosis was detected using flow cytometry analysis. Apoptosis was analyzed by co-staining with Annexin V /PI. The visual images of each cell in control were used to set the threshold gating to determine the percentage of viable cells, early/late apoptotic cells and necrotic cells. The cell apoptosis percentages show early (Annexin V + and PI -) and late (Annexin V + and PI +) apoptotic cells

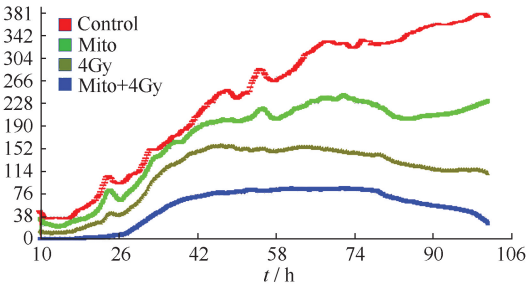


Fig. 6 Mitochondrial transplantation with X-ray radiation inhibited the proliferation of U87 cells Cells were exposed to X-rays after 12 hours co-cultured with isolated mitochondria. Cell index values were determined every 2 hours automatically by the RT-CES system for up to 96 hours

细胞的恶性程度有关。为探究线粒体移植对 U87 细胞恶性程度的影响,本研究将对照组和线粒体移植组的 U87 细胞用鬼笔环肽染色,并在激光共聚焦显微镜下观察细胞表面的伪足分布。如 Fig. 8 所示,对照组细胞表面有大量丝状伪足分布,而线粒体移植组细胞表面仅形成极少量丝状伪足。这提示,线粒体移植后 U87 细胞恶性程度明显下降,可能成为其放射敏感性增强的原因之一。

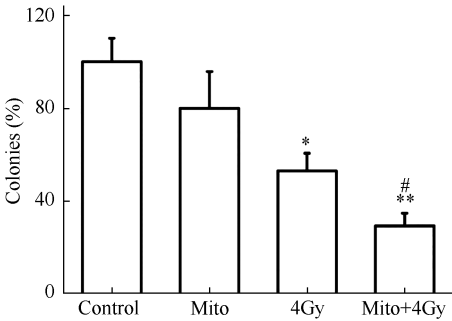


Fig. 7 Mitochondrial transplantation with X-ray radiation decreased the colony-forming ratio of U87 cells U87 cells were exposed to X-rays after 12 hours co-cultured with isolated mitochondria and allowed to grow for 15 days. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus control group; # $P < 0.05$ versus 4 Gy irradiation alone

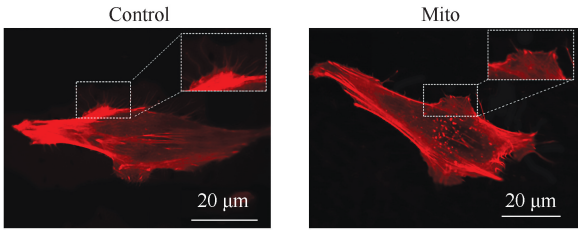


Fig. 8 The distribution of filopodia in U87 cells after mitochondrial transplantation The distribution of filopodia in U87 cells was captured by confocal laser scanning microscope with cytoskeleton stained with phalloidin

3 讨论

线粒体起源的经典假说内共生理论认为,线粒体的祖先是一种革兰氏阴性菌,具备三羧酸循环所需的酶和电子传递链系统。当其转移进入原始真核细胞后,即与真核细胞形成互惠共生的关系:真核细胞利用这种细菌获得充分的能量,这种细菌则从宿主细胞中获得更适宜的生存环境^[8]。近年来,内共生学说得到越来越多学者的关注和支持。如果这个假说成立,那么线粒体至今是否仍然保持跨细胞转移的能力? 本研究发现,游离纯化的线粒体可以通过简单共培养的方式进入到 U87 细胞内。为探究不同时间内线粒体进入 U87 细胞的相对数量,本文通过 Mito-Tracker Red 对线粒体进行不同时间内的荧光定量。结果发现,在线粒体与 U87 细胞共培养 12 h 时,U87 细胞内的功能性线粒体数量大幅增多。虽然线粒体转移的具体途径以及深入机制尚未阐明,但是,为线粒体起源内共生学说以及线粒体移植在线粒体缺陷性疾病中的应用提供了一定的数据支持。

线粒体内存在大量细胞致死因素,如:活性氧、钙离子、Cyto-C 等^[9]。X 射线辐照后,细胞内持续应激状态可以激活 Bcl-2 家族的凋亡前体蛋白质 Bad 和 Bax,使线粒体外膜通透性增高并释放出促凋亡关键蛋白质 Cyto-C。Cyto-C 释放到细胞质中与蛋白酶激活因子 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1) 结合,形成 Cyto-C/Apaf-1 复合体,促进胱天蛋白酶 9 前体的活化,进而激活胱天蛋白酶 3 前体,导致细胞凋亡^[10]。而早在 20 世纪二三十年代,Warburg 已经发现,多数恶性肿瘤细胞能量代谢方式发生转变,采用不依赖于线粒体的有氧糖酵解方式提供能量,其主要原因为肿瘤细胞内线粒体缺陷造成能量代谢方式重编程,这就是著名的“Warburg 效应”^[11,12]。研究人员也在多种肿瘤细胞和组织,如:肝癌 AS-30D 细胞、人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、人神经胶质瘤 U87 细胞以及人肝癌、乳腺癌组织中检测到 mtDNA 拷贝数减少、D-loop 区域突变、mtDNA 4977 bp 缺失以及线粒体皱缩、数量减少^[13-16]。线粒体的缺陷状态常常伴随有肿瘤细胞辐射抗性的出现,这与辐射后无法正常启动线粒体凋亡通路有密切关系^[17]。因此,将外源正常线粒体移植入肿瘤细胞,进而加剧射线诱导的肿瘤细胞凋亡可能成为一个新的肿瘤治疗方案。

本研究在 U87 细胞与游离线粒体共培养后给予 X 射线辐照,发现相比单独辐照组,联合组 Cyto-C、Bax 表达量明显升高、Bcl-2 表达量明显下降,细胞凋亡量增多,增值曲线被抑制,充分证明外源线粒体能够增强 U87 细胞对 X 射线的敏感性,使其在辐照后激活线粒体凋亡通路,从而大量凋亡。除此之外,线粒体移植组的肿瘤细胞生长速度相比对照组,也有很明显的降低。可能的原因是,正常线粒体进入肿瘤细胞后,对肿瘤细胞代谢表型进行转换,使肿瘤细胞的糖酵解途径被抑制,腺苷三磷酸 (ATP) 产生速度减缓,使其能量供给速度不能达到恶性增殖速度,从而抑制肿瘤细胞的增殖扩散。克隆形成率是评价细胞辐射敏感性的“金指标”,本研究发现,与辐照组相比,联合组 U87 细胞克隆形成能力明显降低,再次证明了外源线粒体对 U87 细胞具有辐射增敏作用。

丝状伪足在肿瘤细胞侵袭起始阶段起主要作用。它的主要功能包括运动、黏附、摄取营养和支持以及吞噬,其内部富含动力型肌动蛋白^[18]。通常,丝状伪足在肿瘤细胞表面的分布量与肿瘤细胞的恶性程度成正相关^[19]。本研究利用鬼笔环肽可以与

肌动蛋白微丝特异性结合的特性,标记 U87 细胞的丝状伪足。染色结果显示,对照组可见大量伪足,而线粒体移植组只有极少量伪足形成。细胞表面伪足数量的差异可反映出线粒体移植后,U87 细胞恶性程度有明显下降。这也是可能导致 U87 细胞放射敏感性增强的原因之一。

本研究发现,线粒体移植对神经胶质瘤 U87 细胞具有辐射增敏作用,其作用机制与 X 射线辐照激活线粒体凋亡通路、降低肿瘤细胞恶性程度有关。另外,有文献证明,游离的线粒体不能进入正常的细胞,只能选择性地进入线粒体功能缺失的恶性肿瘤细胞^[20]。这一特点说明,该手段可以在提升肿瘤细胞辐射敏感性的同时,不会增强辐照对周边正常组织的毒副作用。这是一种具有潜在应用价值的精准放射增敏方案。除此之外,这种利用患者自身物质治疗自身疾病的方法,还具有特异性高、个体化强和无免疫排斥等优势。然而,宿主细胞接受外源线粒体的条件、游离线粒体进入宿主细胞的方式和外源线粒体在新的细胞微环境中,是否能够长期存活等问题都还有待进一步阐明^[21],这也是我们未来工作的研究重点。

参考文献 (References)

[1] Durhuus JA, Desler C, Rasmussen LJ. Mitochondria in health and disease - 3rd annual conference of society for mitochondrial research and medicine[J]. Mitochondrion, 2015, **20**: 7-12

[2] 刘涓涓, 王志舒, 谭晓荣. 线粒体自噬与人类疾病[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Liu HH, Wang ZS, Tan XR. Mitophagy in human disease[J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2015, **31**(5): 466-472

[3] Mendonça FM, de Sousa FR, Barbosa AL, et al. Metabolic syndrome and risk of cancer: which link? [J]. Metabolism. 2015, **64**(2): 182-189

[4] Kocher AA, Schuster MD, Bonaros N, et al. Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines[J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, **40**(4): 455-464

[5] Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, **304**(7): H966-H982

[6] Cowan DB, Yao R, Akurathi V, et al. Intracoronary delivery of mitochondria to the ischemic heart for cardioprotection[J]. PLoS One, 2016, **11**(8): e0160889

[7] Kaza AK, Wamala I, Friehs I, et al. Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2017, **153**(4): 934-943

[8] Malina C, Larsson C, Nielsen J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology[J]. FEMS Yeast Res, 2018, **18**(5). doi:10.1093/fems/foy040

[9] Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease [J]. Cardiovasc Res, 2010, **88**(1): 16-29

[10] Chawla-Sarkar M, Leaman DW, Borden EC. Preferential

induction of apoptosis by interferon (IFN) - β compared with IFN- α 2; correlation with TRAIL /Apo2L induction in melanoma cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2001, **7**(6): 1821-1831

[11] Warburg O. Tests on surviving carcinoma cultures [J]. Biochemische Zeitschrift, 1923, **142**: 317-333

[12] Ferreira LM. Cancer metabolism: The Warburg effect today[J]. Exp Mol Pathol, 2010, **89**(3): 372-380

[13] Yu M, Shi Y, Wei X, *et al.* Depletion of mitochondrial DNA by ethidium bromide treatment inhibits the proliferation and tumorigenesis of T47D human breast cancer cells[J]. Toxicol Lett, 2007, **170**(1): 83-93

[14] Kukat A, Kukat C, Brocher J, *et al.* Generation of rho0 cells utilizing a mitochondrially targeted restriction endonuclease and comparative analyses [J]. Nucleic Acids Res, 2008, **36**(7): e44

[15] Cavalli LR, Varella-Garcia M, Liang BC. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA[J]. Cell Growth Differ, 1997, **8**(11): 1189-1198

[16] Davermann D, Martinez M, McKoy J, *et al.* Impaired mitochondrial function protects against free radical-mediated cell death[J]. Free Radic Biol Med, 2002, **33**(9): 1209-1220

[17] Sun C, Wang Z, Liu Y, *et al.* Carbon ion beams induce hepatoma cell death by NADPH oxidase-mediated mitochondrial damage[J]. J Cell Physiol, 2014, **229**(1): 100-107

[18] Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, **9**(6): 446-454

[19] Popow-Woźniak A, Mazur AJ, Mannherz HG, *et al.* Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells[J]. Histochem Cell Biol, 2012, **138**(5): 725-736

[20] Elliott RL, Jiang XP, Head JF. Mitochondria organelle transplantation; introduction of normal epithelial mitochondria into human cancer cells inhibits proliferation and increases drug sensitivity [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, **136**(2): 347-354

[21] 杨世锋, 孙超, 王玉佩, 等. 线粒体移植在治疗线粒体缺陷疾病中的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展(Yang SF, Sun C, Wang YP, *et al.* Advances of mitochondrial transplantation therapy for the mitochondrial deficiency diseases [J]. Prog Biochem Biophys), 2018, **45**(3): 297-304