

肿瘤坏死因子 α 诱导人乳腺癌 MCF7/hGFP-Bax稳定表达 细胞凋亡对 Bax转移定位的影响

侯 琦*

(中国医学科学院、中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

摘要: 建立人乳腺癌 MCF7细胞 hGFP-Bax稳定表达细胞系, 观察肿瘤坏死因子 α (TNF α) 诱导的细胞凋亡对 Bax自细胞浆转移定位至线粒体的影响。荧光显微镜观察凋亡细胞 Bax从细胞浆至线粒体的转移和对细胞核染色体断裂的影响, 并观察和测定 TNF α 诱导细胞凋亡的量效和时效关系。以免疫荧光法观察 GFP-Bax从细胞浆转移至线粒体和定位以及细胞色素 c (Cyt-c) 从线粒体的释出, MTT法测定 TNF α 的细胞毒作用, TMRE测定观察对细胞线粒体功能的影响。结果显示 TNF α 诱导的 MCF7/hGFP-Bax细胞凋亡与 Bax自细胞浆转移定位于线粒体密切相关。

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; 细胞凋亡; Bax

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2007)12 - 1254 - 05

Effect of Bax translocation on TNF α induced apoptosis of human breast cancer MCF7 cells stably expressed hGFP-Bax

HOU Qí

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Established human breast cancer MCF7 cell line stably expressed GFP-Bax, which was used to investigate Bax translocation from cytosol into mitochondria induced by TNF α . Bax translocation from cytosol into mitochondria and DNA fragmentation were investigated under fluorescence microscope. The viability of cells treated with TNF α was measured by MTT method. Immunofluorescence method was used to investigate Bax translocation to mitochondria and Cyt-c release from mitochondria. The Dose-effect and time-course relationship were also observed and calculated by the percentage of GFP-Bax punctate cells. The TMRE assay was used to investigate the function of mitochondria. The results showed that Bax translocation from cytosol into mitochondria was associated with apoptosis induced by TNF α in hGFP-Bax-tagged MCF7 stable cell line.

Key words: TNF α ; apoptosis; Bax

肿瘤坏死因子 α (TNF α) 可诱导多种细胞凋亡, 通过与细胞膜受体结合的经典途径, 启动并激活细胞内一系列相关调控机制, 如活化 caspase-8 并使 Bid 裂解成为 tBid, 引起 Bax 从细胞浆转至线粒体和细胞色素 c (Cyt-c) 释出线粒体外, 从而激活一系列级联反应, 引起细胞凋亡^[1,2]。Bax (Bcl-2 associated x protein) 是 Bcl-2 家族最早发现的成员之一, 属凋

亡诱导蛋白。细胞内 Bax 表达水平过高可引起细胞的损伤和死亡, 而同一家族的 Bcl-2 和 Bcl-X_L 等则有抑制细胞凋亡作用。Dr. Hsu 等^[3,4] 于 1997 年首次报道了 Bax 从细胞浆转至线粒体的变化在细胞凋亡中的作用。转染野生型细胞并瞬时表达 GFP-Bax 常作为研究 Bax 的方法, 虽然在荧光显微镜下可以观察到典型的 GFP-Bax 荧光点 (punctate), 但是随着时间延长, 愈来愈多的细胞出现圆化、漂浮、碎裂和死亡, 故不利于作长时间和大量的观察或研究。

收稿日期: 2007-05-28.

* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63165192, Fax: 86 - 10 - 63017757,

E-mail: houq@imm.ac.cn

为了便于观察 Bax在细胞凋亡中从细胞浆转移至线粒体的变化,本研究以 hGFP-Bax标记人乳腺癌 MCF7 细胞并建立稳定表达 hGFP-Bax 细胞株 (MCF7/GFP-Bax),以诱导剂 TNF α 处理细胞,观察 GFP-Bax从细胞浆转移至线粒体的变化。本研究旨在为大批量初步筛选与细胞凋亡有关的化合物或药物以及研究其作用机制,建立一种直观、动态、简捷和有效的方法。

材料与方 法

细胞 人乳腺癌 MCF7 细胞 (ATCC, USA)。

药品与仪器 酶联免疫分析仪 (PerkinElmer Victor3 1420 multilabel counter, USA); 荧光显微镜 (Olympus, Tokyo, Japan)。G418、Fugene 6 和 Opti-DMEM 无血清培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (FCS)、L-谷氨酰胺与含 0.25% 胰酶的 Trypsin-EDTA (Gibco); TNF α 和 Saponin (Sigma); 甲基噻唑蓝 (MTT) Kit (Roche)。免疫荧光 SlowFadeKit (Molecular Probe), TMRE kit (Cell Technology), Cy3 标记的或未标记的羊抗鼠 IgG, 以及 Western blotting 检测试剂盒 (Amersham); 热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, Hsp60) 抗体 (Santa Cruze); Cyt c 抗体 (Pamlingen); Bax、Bcl-2、Bcl-X_L 单克隆抗体和 hGFP-Bax 表达质粒均为本实验室制备和构建;其他试剂与材料均购自 Sigma 或 Fisher Scientific (USA)。

MCF7/GFP-Bax 稳定表达细胞系的建立与细胞培养 将 MCF7 细胞接种于含 10% 胎牛血清、2% 谷氨酰胺的 DMEM 培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。接种细胞至 10 cm 培养皿,置培养箱中培养过夜。以 hGFP-Bax 质粒 DNA 6 μ g、Fugene 6 (3 μ L) 与 Opti-DMEM 混合后,室温放置 15 min 后加到培养皿中转染细胞,1 d 后换成含 G418 (0.4 mg \cdot mL⁻¹) 的 DMEM 培养液,培养 3 d 后换成含 G418 (0.2 mg \cdot mL⁻¹) 的培养液继续培养细胞 5 ~ 7 d, Trypsin-EDTA 消化 5 min,离心并洗涤后接种于 96 孔细胞培养板 (Corning),培养 1 ~ 2 周至克隆形成,荧光显微镜下观察并挑选出 GFP 阳性单克隆细胞,将细胞培养扩增后冻存于液氮备用^[5]。

凋亡细胞形态学观察 将 MCF7/GFP-Bax 细胞 (细胞数 3×10^4 孔) 铺于 6 孔细胞培养板 (Sastard),过夜,以不同浓度的 TNF α 处理细胞,培养结束后在细胞培养液中加入 Hoechst 33258 染料染色 10 min,荧光显微镜下观察细胞线粒体内荧光

点 (GFP-Bax punctate)、细胞核染色体断裂及形态变化。

免疫荧光法检测细胞 GFP-Bax 转移定位和细胞色素 c 释放^[6] 将处理过的细胞培养板以 1 \times PBS 洗 3 遍,以 6% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 遍,0.02% Saponin 穿孔 10 min,以含 5% FCS 的 Saponin 封闭 30 min 后,加入 Hsp60 或 Cyt c 单抗 2 h,洗 3 遍加 Cy3 标记的二抗 1 h,洗 3 遍后按试剂盒说明书加入 SlowFade 试剂,荧光显微镜下观察细胞凋亡 (以上操作均在室温条件下进行,自二抗以后步骤须避光)。

细胞生长抑制 将 MCF7/GFP-Bax 细胞 (细胞数 2 000, 100 μ L) 接种于 96 孔细胞培养板,培养过夜后加入 TNF α (终质量浓度为 0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10 及 20 ng \cdot mL⁻¹),设空白对照,每组 3 个复孔。继续培养 24 h,在培养结束前 4 h 加入 MTT 10 μ L 孔,继续培养 4 h 后加入溶解液 100 μ L 孔,孵箱过夜,以酶联免疫分析仪在 570 nm 检测其 A 值,计算细胞生长抑制百分率^[7]。

TNF α 对 MCF7/GFP-Bax 作用的量效和时效关系观察 将 MCF7/GFP-Bax 细胞铺于 6 孔细胞培养板并以 TNF α 处理细胞,观察 TNF α (0.1 ~ 20 ng \cdot mL⁻¹) 对细胞的影响,并观察不同时间点细胞凋亡的变化。在荧光显微镜下动态观察并计数有荧光点的细胞数,计算有荧光点的细胞占全部计数细胞的百分数及凋亡细胞的百分率^[8]。

通过荧光检测 TMRE 含量观察线粒体膜电位功能 在 96 孔细胞培养板 TNF α 处理过的细胞培养液中,按试剂盒说明书加入 TMRE,放置培养箱 1 h 后吸出含 TMRE 的培养液,加入 DMEM 100 μ L 孔,10 min 后以酶联免疫分析仪测定 TMRE 荧光值^[9]。

统计学分析 结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's *t* 检验比较组间显著性差异。

结 果

1 MCF7/GFP-Bax 稳定表达细胞的形态学观察和 TNF α 对细胞的作用

荧光显微镜下观察到 MCF7/GFP-Bax 细胞的 GFP-Bax 过量表达,因其主要存在于细胞浆内,故整个细胞呈现均匀的绿色荧光,细胞形态完整、清晰。以 TNF α 处理细胞后,可观察到细胞内有典型的环状荧光点,即凋亡细胞,且随着时间的延长和剂量的增高,凋亡细胞数也增加。以特异的线粒体 Marker

Hsp60 抗体标记并定位,观察到荧光点位于线粒体内,呈现特有的 GFP-Bax 转位于线粒体后形成环状荧光点的特征。

Cyt-c 正常情况下存在于细胞的线粒体内,以免疫荧光法标记 Cyt-c 抗体,形态清晰完整。凋亡细胞的 Cyt-c 从线粒体内释放到线粒体外,故镜下

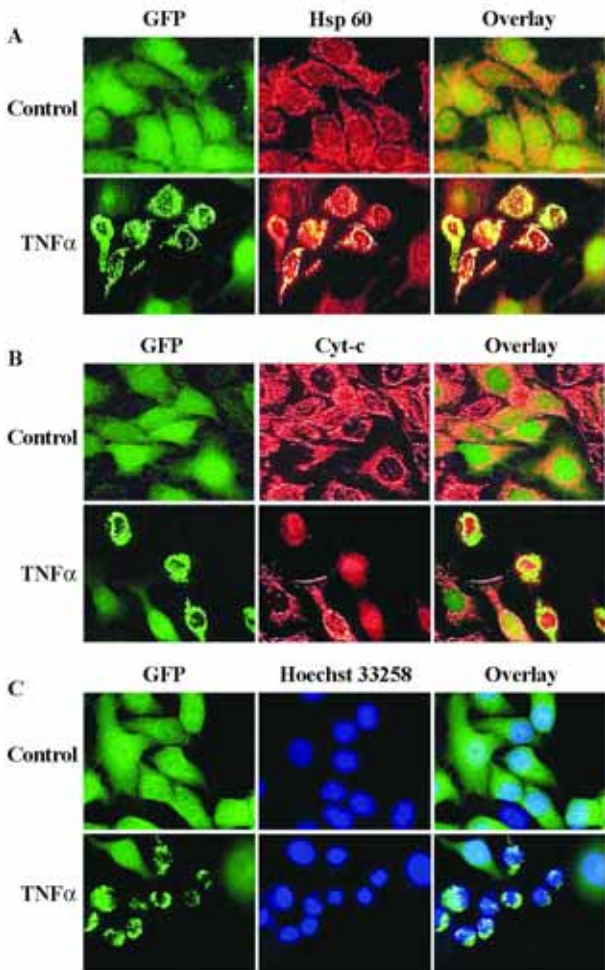


Figure 1 Development of a MCF7 cell line stably expressing hGFP-tagged Bax. A: Visualization of MCF7 cells stably expressing by fluorescence microscopy. Untreated cells displayed a cytosolic Bax labeling, many of the treated cells by TNFα (10 ng• mL⁻¹) for 18 h were displayed a punctate Bax-labeling pattem. GFP-Bax stable cells were stained with m itochondria specific marker Hsp60 antibody to label m itochondria. Overlay images show GFP-Bax location by Hsp60 fluorescence. B: The treated cells GFP-Bax punctate location matched Cyt-c releasing. C: Cells were stained with Hoechst 33258. The apoptotic cells induced by TNFα were floating, rounded-up and showed DNA fragmentation. Overlay images show GFP-Bax matching nuclear cleavage

观察轮廓模糊。以特异的细胞核染料 Hoechst 33258 染色,对照组细胞核呈均匀蓝色;经 TNFα 处理的细胞中,线粒体内有 GFP-Bax 荧光点的细胞呈现相应细胞核染色体断裂,细胞变圆且漂浮,碎裂(图 1)。

2 TNFα 对 MCF7/GFP-Bax 稳定表达细胞的细胞毒作用

TNFα 对细胞生长有明显的抑制作用并导致细胞的死亡,即细胞毒作用,随着 TNFα 浓度的增加而增大(图 2)。以 TNFα 处理 MCF7/GFP-Bax 细胞 24 h,用 MTT 方法检测细胞毒性,将测定数值进行统计,其 IC₅₀ 约为 8.4 ng• mL⁻¹。

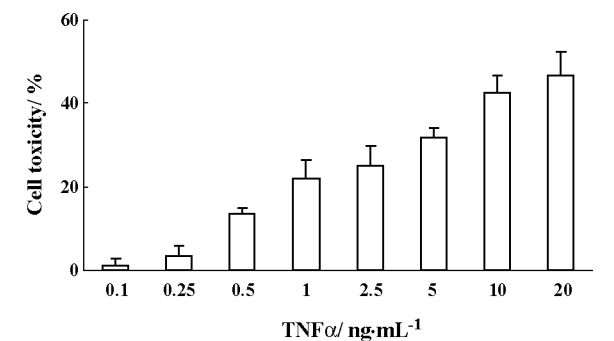


Figure 2 Viability assay induced by TNFα in GFP-Bax stably expressed MCF7 cells. Cells were planted onto 96 well plates at the density of 2 000 cell per well in 100 μL overnight, then added MTT (5 mg• mL⁻¹) 10 μL per well and incubated for further 4 h then added soluble buffer 100 μL per well, overnight at 37 °C, 5% CO₂, the plates were analyzed by using a micro plate reader. Results in each panel represent the $\bar{x} \pm s$ (bars) of at least four experiments carried out in triplicate

3 TNFα 对 MCF7/GFP-Bax 稳定表达细胞作用的量效和时效关系

TNFα 对细胞凋亡的诱导和促进作用表现为 TNFα 作用数小时即出现荧光点,随着时间的延长,荧光点亮度增加并且显示荧光点的细胞数增多,表明随着 TNFα 浓度增高细胞凋亡数量明显增加,在高剂量组凋亡细胞可达 90% 以上, TNFα 诱导的细胞凋亡具有量效依赖关系并亦呈时效依赖关系(图 3)。IC₅₀ 约为 4.5 ng• mL⁻¹。

4 TNFα 对细胞线粒体 TMRE 含量的影响

TMRE 是一种显红色荧光的标记物,在正常细胞可被线粒体特异性地摄取和聚集,故在荧光显微

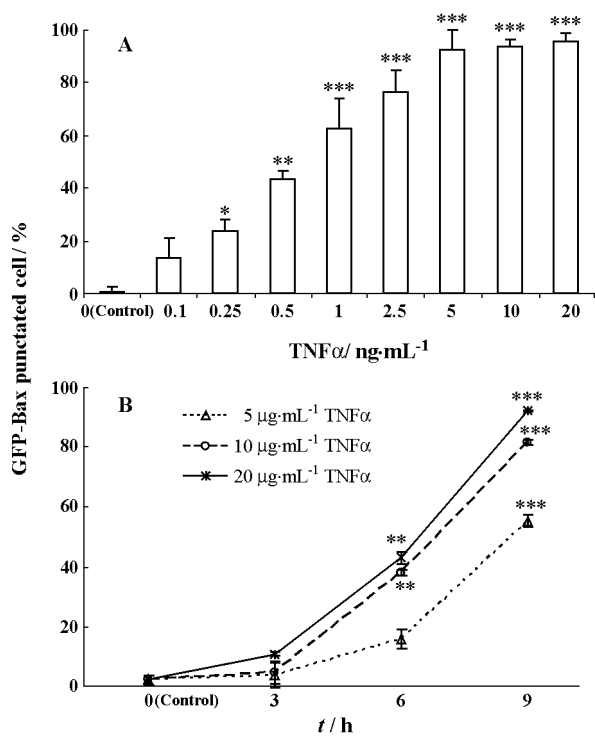


Figure 3 Dose-effect and time-course relationship assay in TNF α induced apoptosis. The cells were planted in 96 well plates then treated with various concentrations of TNF α . A: Dose-effect relationship investigation; B: Time-course relationship investigation. The punctate cells were counted at different time points. Percentages of GFP-Bax punctate cells were calculated and showed the dose-effect and time-course manner. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

镜下观察到细胞形态清晰完整。在诱导剂作用下可以引起线粒体膜电位下降,膜孔隙增大,线粒体膜不再完整, TMRE可被释放至细胞培养液中,若以一定波长测定培养液荧光值,则可分析线粒体膜电位的改变和功能。以 TNF α (10 ng·mL⁻¹, 20 h)处理细胞,检测到实验孔细胞培养液中荧光值明显增高,表明 TNF α 诱导的细胞凋亡影响线粒体功能和膜结构,其 IC₅₀是 4.9 ng·mL⁻¹,图 4。

讨论

Bax对细胞凋亡的诱导作用及其对疾病的发生发展与转归和治疗的影响,近年来有很多研究进展和报道。体内多种因素引起的病症或疾病如感染、炎症、肿瘤、心脑血管缺血出血性疾病以及自身免

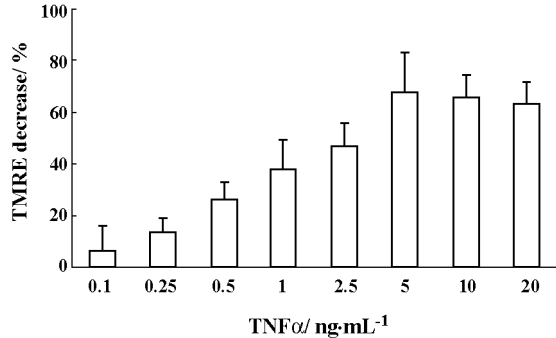


Figure 4 GFP-Bax-stable MCF7 cells were treated with the stated concentrations of TNF α for 20 h. Both the treated and untreated cells were then stained with TMRE and analyzed by using a fluorescence plate reader (excitation and emission wavelengths, 530 and 590 nm, respectively)

疫性疾病以及 AIDS等,均发现与机体细胞凋亡的调节失衡有关。Bax作为 Bcl-2家族中主要的致凋亡调节蛋白质,主要存在于细胞浆中,在由生理或/和病理条件下发生的细胞凋亡过程中,从细胞浆转移至线粒体并在线粒体内以同源二聚体或多聚体形式积聚,也可以与 Bcl-2或 Bcl-X_L结合成异源二聚体。在 TNF α 经典的受体依赖的信号转导途径介导的细胞凋亡中,Bax接受上游信号传导 (Bid),与之结合后从细胞浆转至线粒体内膜间隙形成二聚体或多聚体。在刺激剂作用下决定细胞归宿的先决条件是 Bcl-2/Bax比率,比率增大细胞可存活,反之则趋向死亡。伴随线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$)的降低,线粒体膜间隙增大,线粒体内的细胞色素 c释放到线粒体外,依次激活下游信号转导通路相关分子,如 caspases-3/7及 caspase-9活化与裂解,启动一系列级联反应和应答而使细胞凋亡^[10-12]。

本文首次以 hGFP-Bax标记人乳腺癌 MCF7细胞,建立了 MCF7/GFP-Bax稳定表达细胞株,观察了 TNF α 诱导的凋亡细胞中 Bax的变化和作用,发现在 MCF7/GFP-Bax稳定表达细胞中, TNF α 诱导的细胞凋亡可引起 Bid和 caspases活化与裂解(结果未列出),与 GFP-Bax从细胞浆转位到线粒体密切相关,且呈剂量和时间依赖关系。因此,通过用荧光显微镜直接观察细胞浆与线粒体的 GFP-Bax转移定位变化诱发的细胞凋亡,可作为大批量筛选具有细胞凋亡调节作用的化合物以及研究其作用机制的一种直观、动态、简捷和有效的方法。

本研究为与细胞凋亡调节有关的化合物的筛选和探讨其在调节细胞凋亡中的作用机制提供了实验依据和一个实用且简捷的模型。有关 TNF α 诱导的 MCF7/GFP-Bax 细胞凋亡对信号转导通路中 Bid、caspases 作用和对 Bcl-2/Bcl-X_L 的影响, 以及 Staurosporine(STS) 经非受体依赖途径诱导 MCF7/GFP-Bax 细胞凋亡对 Bax 影响的研究另文报道。

致谢: 对 Dr. Yi-Te Hsu(MUSC, USA) 给予本研究的指导和帮助, 在此深表谢意。

References

- [1] Depraetere V, Golstein P. Fas and other cell death signaling [J]. Sem in Immunol, 1997; 93 - 107.
- [2] Schneider P, Tschoop J. Apoptosis induced by death receptors [J]. Pham Acta Helv, 2000, 74: 281 - 286.
- [3] Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X (L) during apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 3668 - 3672.
- [4] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. Cell, 1993, 74: 609 - 619.
- [5] Menendez JA, del Mar Barbacid M, Montero S, et al. Effects of gamma-linolenic acid and oleic acid on paclitaxel cytotoxicity in human breast cancer cells [J]. Eur J Cancer, 2001, 37: 402 - 413.
- [6] Smaili SS, Hsu YT, Sanders KM, et al. Bax translocation to mitochondria subsequent to a rapid loss of mitochondrial membrane potential [J]. Cell Death Differ, 2001, 8: 909 - 920.
- [7] Hou Q, Cymbalyuk E, Hsu SC, et al. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: role in cytochrome c release and Bax regulation [J]. Apoptosis, 2003, 8: 617 - 629.
- [8] Hou Q, Hsu YT. Bax translocation from cytosol to mitochondria in cardiac cells during apoptosis: development of a GFP-Bax-stable H9c2 cell line for apoptosis analysis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289: H477 - H487.
- [9] Eskes R, Antonsson B, Osen-Sand A, et al. Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions [J]. J Cell Biol, 1998, 143: 217 - 224.
- [10] Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis [J]. J Cell Biol, 139: 1281 - 1292.
- [11] Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death [J]. Sem in Cancer Biol, 1993, 4: 327 - 332.
- [12] Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane [J]. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18: 685 - 689.

• 消息 •

Waters 公司在全球范围内, 通过传递实用、可持续发展的创新技术为人体保健、环境管理、食品安全和水质分析领域建立了商业优势。该公司拥有整合的分离科学、实验室信息管理、质谱和热分析技术。Waters 的技术突破和实验室解决方案为用户的成功提供了保证平台。2007 年, Frost & Sullivan 公司赞赏 Waters 公司为科学和商业创造新机遇所作的贡献, 肯定了公司在液相色谱领域取得成功和领先的地位, 表彰了 Waters 技术在经营业绩和科学进步所获得的成果。认可公司将分析科学提升到一个新水平的能力, 特别是指实验室信息学软件系列和信息管理平台。

详情请联系: xie_ying_feng@waters.com 网址: www.waters.com www.waterschina.com