

· 实验研究 ·

线粒体 DNA 缺失对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞药物敏感性的影响

孙玉兰 谷峰 张祖平 付丽

【摘要】 目的 探讨线粒体 DNA 缺失对人乳腺癌细胞药物敏感性的影响。**方法** 采用溴化乙锭(EB)处理获得人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的线粒体 DNA 缺失(ρ^0 MDA-MB-231)细胞,电镜下观察细胞形态改变,胶原凝胶包埋三维立体培养法(CD-DST)对比分析细胞的药物敏感性,免疫组织化学方法检测 P-糖蛋白(P-gp)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)的表达。**结果** 与 MDA-MB-231 细胞比较, ρ^0 MDA-MB-231 细胞线粒体数量增多,嵴消失呈空泡样改变,对化疗药物相对抵抗,P-gp、BCRP 的表达明显增加。**结论** 线粒体的损伤可能参与了乳腺癌细胞耐药表型的形成。

【关键词】 线粒体;线粒体 DNA;乳腺癌;多药耐药

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Effect of mitochondrial DNA deletion on the sensitivity of MDA-MB-231 cells to chemotherapeutic drugs

SUN Yu-lan, GU Feng, ZHANG Zu-ping, Fu Li. Department of Breast Pathological Research, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between mitochondrial DNA deletion and drug resistance in human breast cancer cells. **Methods** The ρ^0 -derivative of MDA-MB-231 was generated by treating the cultured cells with ethidium bromide. The morphologies were confirmed by transmission electron microscope (TEM). The sensitivities to chemotherapy were determined by Collagen Gel Droplet Embedded Culture-Drug Sensitivity Test (CD-DST). P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP) expression were detected by immunohistochemistry. All the differences were comparatively analyzed between MDA-MB-231 and ρ^0 MDA-MB-231 cells. **Results** Compared with MDA-MB-231 cells, ρ^0 MDA-MB-231 cells showed different characters, including more mitochondria and cristae vacuolation, less drug sensitivity, and markedly higher expression of P-gp and BCRP. **Conclusions** Mitochondrial DNA deletion may play a role in the formation of drug resistance phenotype of human breast cancer.

【Key words】 Mitochondria; Mitochondrial DNA; Breast neoplasms; Multidrug resistance

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一。化疗是乳腺癌术后综合治

基金项目:国家自然科学基金(30470667)

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理研究室 乳腺癌防治教育部重点实验室

通信作者:付丽, E-mail: fulijyb@hotmail.com

疗的重要手段之一。正确的个体性化疗和患者的预后息息相关,但耐药一直是困扰临床医师的难题。肿瘤细胞对一种化疗药物耐药的同时,对其他一些结构不同、作用机制不同的药物也存在耐药现象,称为多药耐药(multidrug resistance, MDR)。研究表明,线粒体功能不全是肿瘤细胞最重要的特征之一,线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 突变见于多种肿瘤,且可能与肿瘤 MDR 产生有关^[1-3]。本研究以人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象,探讨 mtDNA 缺失对化疗药物敏感性和多药耐药相关因子表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,在含 10% 胎牛血清(FCS)的 DMEM 培养基、37 °C、5 % CO₂、饱和湿度条件下培养。参照文献[4-5]报道的方法用溴化乙锭(EB)处理培养细胞,制备 mtDNA 缺失细胞(rho⁰ MDA-MB-231)。采用 PCR 方法结合 DNA 测序判定 mtDNA 缺失状态。rho⁰ MDA-MB-231 细胞培养条件:高糖 DMEM 培养基,含 15% FCS、50 μg/ml 尿嘧啶、110 μg/ml 丙酮酸钠,5 % CO₂、37°C 条件下进行培养。

1.2 细胞超微结构观察

各取对数生长期 1×10^7 个细胞,洗涤沉淀后用 2.5% 冰戊二醛固定,梯度乙醇脱水,树脂包埋,制成超薄切片,JEOL-2000EX 透射电镜下观察其超微结构。

1.3 胶原凝胶包埋三维立体培养(CD-DST)法检测药物敏感性

试剂盒 Primaster 为日本新田明胶公司生产,将试剂盒中的 A 液、B 液、C 液按 8:1:1 的比例混合,与对数生长期细胞悬液混匀,每滴 30 μl,以每孔 3 滴加入 6 孔培养板中,每滴细胞数约 0.5×10^5 ,每板设一孔为对照组。在 CO₂ 孵箱内凝胶化后加入对应的细胞培养液,24 h 后分别加入化疗药物(均为江苏恒瑞公司生产)顺铂(DDP),吉西他滨(GEM),紫杉醇(PTX),氟尿嘧啶(5-FU)或吡柔比星(THP),分别设置两种药物浓度处理(表 1),继续培养 24 h。中性红染色,10% 中性福尔马林固定,Scion Image 图像分析系统对胶滴进行扫描和分析,图像信号数值化,以对照组细胞的生存率为 100%,分别计算出各用药组细胞的生存率。

表 1 药物处理浓度表

药物	浓度 1/(μg · ml ⁻¹)	浓度 2/(μg · ml ⁻¹)
顺铂	0.2	2.0
吉西他滨	0.03	0.30
紫杉醇	1	10
氟尿嘧啶	1	10
吡柔比星	1	10

1.4 免疫组织化学检测

采用 LSAB 法免疫组织化学技术检测 P-糖蛋白(P-gp)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)在 MDA-MB-231 和 ρ^0 MDA-MB-231 细胞中的表达。一抗分别为浓缩型鼠抗人 P-gp 单克隆抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)和鼠抗人 BCRP 单克隆抗体(Signet 公司)。免抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。按试剂盒说明书操作,一抗工作浓度分别为 1:100 和 1:50, DAB 显色。细胞质/细胞膜着棕黄色颗粒为阳性细胞。随机计数 10 个高倍视野($\times 400$), 计算阳性细胞百分率。

1.5 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件进行 χ^2 检验和 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ρ^0 MDA-MB-231 细胞制备

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系在含 50 ng/ml EB 的 DMEM 培养基中培养 28 d 后, 用有限稀释法克隆到 ρ^0 MDA-MB-231 细胞, 经 PCR 扩增和 DNA 测序证明 mtDNA 缺失。

2.2 细胞超微结构

透射电镜观察, MDA-MB-231 细胞表面可见较粗大的突起和微绒毛, 线粒体呈球状, 体积较小, 数量适中, 嵴清晰(图 1)。而 ρ^0 MDA-MB-231 细胞线粒体数量增多, 部分体积增大, 嵴消失呈空泡样改变(图 2)。

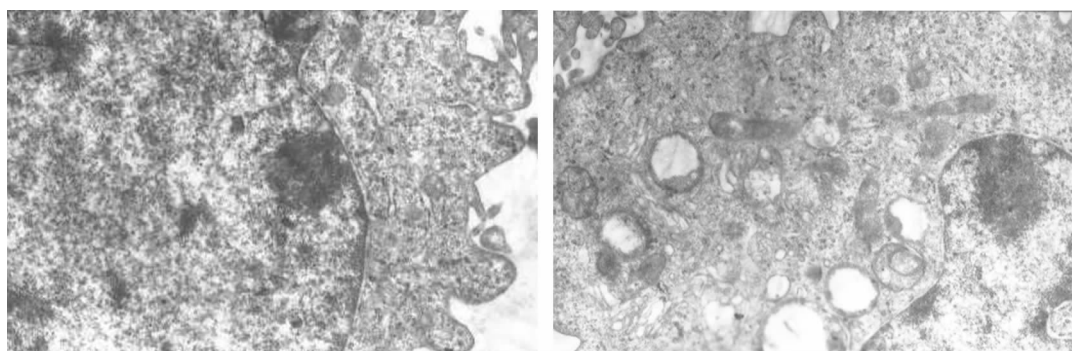


图 1 MDA-MB-231 细胞(电镜 $\times 10\,000$)

图 2 ρ^0 MDA-MB-231 细胞(电镜 $\times 10\,000$)

2.3 MDA-MB-231 细胞和 ρ^0 MDA-MB-231 细胞的药物敏感性

以未予药物处理的细胞为对照(100%)。用不同浓度的化疗药物处理细胞, 计算细胞的相对生存率。相同的药物处理条件下, ρ^0 MDA-MB-231 细胞相对生存率要高于 MDA-MB-231 细胞, 即对化疗药物相对抵抗, 但是在低浓度 DDP 和 5-FU 表现为 MDA-MB-231 细胞对药物相对抵抗(图 3)。

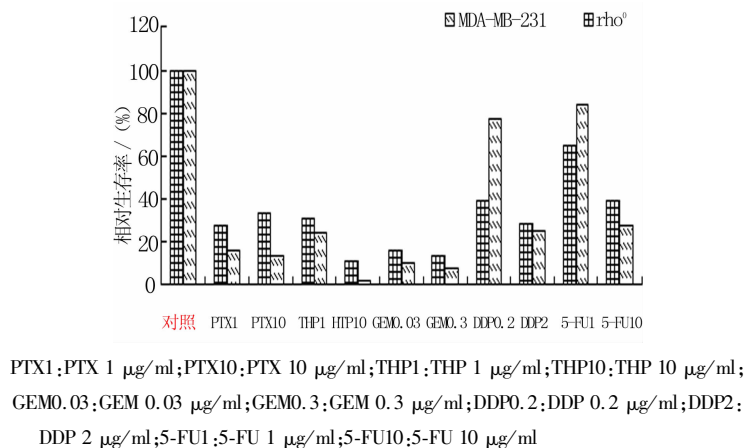


图 3 药物处理后细胞的相对生存率

2.4 P-gp、BCRP 在 MDA-MB-231 及 rho⁰ MDA-MB-231 细胞中的表达

随机计数 10 个高倍视野阳性细胞数,计算平均百分比。MDA-MB-231 细胞 P-gp、BCRP 免疫组织化学染色阳性细胞百分比分别为 18% 和 15%,而 rho⁰ MDA-MB-231 细胞为 35% 和 30%,两者相比差异有非常显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

线粒体是真核细胞内核外唯一遗传物质——mtDNA 的细胞器,是细胞内能量合成的主要场所,参与了细胞内诸多功能的实现,亦在细胞凋亡及细胞内其他生物学行为的信号传递过程中扮演重要角色^[6]。本研究用 DNA 分子螯合剂 EB 抑制 mtDNA 的复制和转录,成功获得人乳腺癌 rho⁰ MDA-MB-231 细胞,为研究线粒体损伤与肿瘤细胞耐药表型的关系奠定了基础。与过去的 MTT 药敏检测法不同,本研究采用了 CD-DST 药物敏感检测。其基本原理是胶原凝胶滴包埋培养基质上细胞的立体培养,按临床等值剂量概念设定药物的接触条件,最大限度地模拟了体内微环境,多用于肿瘤原代培养细胞的药敏检测,以指导临床用药^[7]。本研究将 CD-DST 法应用于肿瘤细胞系,具有可重复性好,操作简单的优点,图像信号的数字化分析进一步增加了实验数据的严谨性^[8]。

有研究表明,突变 mtDNA 存在复制优势,含有 mtDNA 突变或肿瘤源性特征 mtDNA 突变的细胞有着增生的优势,且 rho⁰ 细胞有着增生和形成肿瘤的能力。研究者在肾癌中发现从低侵袭到高侵袭的细胞生物学行为伴随着线粒体损伤程度的逐渐增加^[7,9]。而作为核外唯一遗传物质,mtDNA 编码参与氧化磷酸化的 13 种多肽产物的合成。其缺失应该是一个影响氧化磷酸化的事件,获得的增生优势可能影响对化疗药物的敏感性。本研究显示,较之于 MDA-MB-231 细胞,mtDNA 缺失的 rho⁰ MDA-MB-231 细胞在超微结构上表现为线粒体数目增多,体积增大和嵴的空泡样改变,生物学行为表现为对化疗药物敏感

性降低, P-gp、BCRP 的表达增加, 提示 mtDNA 缺失及线粒体损伤可能参与了乳腺癌耐药表型的形成。Calcabrini 等^[10]对结肠癌细胞株 LoVo 的研究也发现, 透射电镜下药物抵抗细胞株有显著的线粒体修饰。

MDR 是一个十分复杂的生物过程。近年对 MDR 的深入研究发现, 药物转运蛋白活性增强是 MDR 的一个重要原因。BCRP 与 P-gp 同属 ABC (ATP binding cassette) 超家族膜转运蛋白, 在功能上有很大的相似性, 即依赖 ATP 提供能量, 通过细胞膜将化疗药物泵出细胞外, 导致细胞内药物浓度降低从而产生耐药^[11-12]。研究发现化疗药物的毒性主要是通过细胞内的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 来实现的, 线粒体膜电位也与药物敏感性的差异有关^[10,13]。某些传统的化疗药物, 如阿霉素, 其作用机制是在酶复合物 I 作用下还原为半醌自由基, 在线粒体内与氧反应导致大量氧自由基的形成。这些自由基对生物大分子有高度反应性, 从而造成细胞死亡。Singh 等^[14]观察了缺乏 mtDNA 的肿瘤细胞系对不同抗癌药物的反应, 以明确线粒体及 mtDNA 在肿瘤治疗中的地位与意义。研究者应用 mtDNA 复制的抑制剂溴化乙锭处理 Hela 细胞, 获得相应的 mtDNA 缺失的细胞系, 将这两种细胞对照暴露于各种药物。结果显示, mtDNA 缺失的细胞对于阿霉素的耐药性是 Hela 细胞的 2 倍, 杀死 90% 细胞的剂量分别为 1.6 μmol (mtDNA 缺失的细胞) 和 0.75 μmol (Hela 细胞)。由于 mtDNA 缺失的细胞线粒体功能不全, 既无足够酶复合物 I 还原激活阿霉素, 又不能产生大量的氧自由基, 所以对阿霉素不甚敏感。两种细胞在细胞凋亡及药物摄取过程方面并无差异, 耐药性产生不是由于细胞凋亡变化、细胞周期反应或对阿霉素的摄入量, 而是阿霉素活化产生的氧自由基, 导致 Hela 细胞 mtDNA 突变所致。由此证明, mtDNA 在癌细胞对药物敏感性方面起重要作用。结合本研究结果, 推测 mtDNA 缺失可能通过影响氧化磷酸化过程、ROS 及线粒体膜电位参与到 MDR 过程中。值得一提的是, 虽然 mtDNA 有自我复制能力, 但产能过程中所需要的大多数蛋白仍然是由核 DNA 所编码, 线粒体基因组的复制和转录都受到细胞核的指导 and 调控, 亦即线粒体的遗传系统只有依靠核基因所合成的大量多肽类物质的协调作用才能发挥作用, 因此称线粒体为半自主性复制的细胞器^[15]。线粒体损伤可能与涉及信号转导、细胞构架、代谢、细胞增生和分化以及凋亡的核基因的异常表达有关。这些基因介导了线粒体与细胞核的对话^[16], 从而影响到了包括 MDR 在内的细胞的生物学行为。

比较有趣的是, 在低浓度的 DDP 和 5-FU 处理时, MDA-MB-231 细胞却表现为相对耐药。耐顺铂的细胞株中, 药物蓄积降低的机制仍不清楚, 可能包括吸收降低或主动排出, 或两者兼有。顺铂蓄积降低的部分原因是该药进入癌细胞时存在流入缺陷, 但是其进入细胞的确切机制尚不清楚。一般认为, 顺铂

是通过被动扩散进入细胞的,因为铂吸收的决定因素是铂化合物的浓度,而且顺铂的吸收不是饱和的。Gately 等^[17-18]也提出了一种顺铂蓄积模型,认为约 50% 的吸收率依靠被动扩散,其余 50% 则是通过尚未确定的门控通道促进扩散进行的。现已公认 5-FU 对肿瘤杀伤作用的强弱直接与抑制胸苷酸合成酶的程度有关,线粒体损伤及 mtDNA 缺失在肿瘤细胞对 5-FU 敏感性方面地位如何,目前尚不清楚。从另一个角度来分析,目前国内有学者开始研究化疗对激素受体状态是否有影响,以期对激素受体阴性的患者提供一个接受内分泌治疗的机会^[19]。而雌激素受体阴性的 MDA-MB-231 细胞 mtDNA 缺失后对化疗药物的相对不敏感现象,是否也蕴含了受体状态改变及内分泌治疗相对敏感的生物信息,作者将在后续的工作中进一步研究证实。

参考文献

- [1] Poetsch M, Petersmann A, Lignitz E, *et al.* Relationship between mitochondrial DNA instability, mitochondrial DNA large deletions, and nuclear microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinomas. *Diagn Mol Pathol*, 2004, 13: 26-32.
- [2] Grandjean F, Bremaud L, Robert J, *et al.* Alterations in the expression of cytochrome c oxidase subunits in doxorubicin-resistant leukemia K562 cells. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63: 823-831.
- [3] Pillay V, Martinus R D, Hill J S, *et al.* Upregulation of P-glycoprotein in rat hepatoma rho(o) cells: implications for drug-DNA interactions. 1998, 69: 463-469.
- [4] 戴纪刚, 闵家新, 张国强, 等. 线粒体 DNA 缺失细胞系的建立. 第三军医大学学报, 2005, 27: 570-571.
- [5] Diaz F, Bayona Bafaluy M P, Rana M, *et al.* Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 4626-4633.
- [6] Birch Machin M A. The role of mitochondria in ageing and carcinogenesis. *Clin Exp Dermatol*, 2006, 31: 548-552.
- [7] Simonnet H, Alazard N, Pfeiffer K, *et al.* Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 759-768.
- [8] Kobayashi H. Development of a new *in vitro* chemosensitivity test using collagen gel droplet embedded culture and image analysis for clinical usefulness. *Recent Results Cancer Res*, 2003, 161: 48-61.
- [9] Holmuhamedov E, Lewis L, Bienengraeber M, *et al.* Suppression of human tumor cell proliferation through mitochondrial targeting. *FASEB J*, 2002, 16: 1010-1016.
- [10] Calcabrini A, Arancia G, Marra M, *et al.* Enzymatic oxidation products of spermine induce greater cytotoxic effects on human multidrug-resistant colon carcinoma cells (LoVo) than on their wild-type counterparts. *Int J Cancer*, 2002, 99: 43-52.
- [11] Stouch T R, Gudmundsson O. Progress in understanding the structure-activity relationships of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54: 315-328.
- [12] Ahmed Belkacem A, Pozza A, Macalou S, *et al.* Inhibitors of cancer cell multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Anticancer Drugs*, 2006, 17: 239-243.
- [13] Harper M E, Antoniou A, Villalobos Menuet E, *et al.* Characterization of a novel metabolic strategy used by drug resistant tumor cells. *FAFEB J*, 2002, 16: 1550-1557.
- [14] Singh K K, Russell J, Sigala B, *et al.* Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. *Oncogene*, 1999, 18: 6641-6646.
- [15] Jaanman J W. The mitochondrial genome: transcription, translation and replication. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1410: 103-123.
- [16] Amuthan G, Biswas G, Zhang S Y, *et al.* Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor

progression and cell invasion. EMBO J, 2001, 20: 1910 – 1920.

- [17] Gately D P, Howell S B. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin; a review. Br J Cancer, 1993, 67: 1171 – 1176.
- [18] Liu J, Li C, Qu W, *et al.* Nitric oxide prodrugs and metallochemotherapeutics: JS-K and CB-3-100 enhance arsenic and cisplatin cytotoxicity by increasing cellular accumulation. Mol Cancer Ther, 2004, 3: 709 – 714.
- [19] 刘志洋, 张瑾. 新辅助化疗 TE 与 CEF 方案治疗乳腺癌的临床效果比较. 中华乳腺病杂志(电子版), 2008, 2: 18 – 23.

(收稿日期: 2008-05-12)

(本文编辑: 陈莉)

孙玉兰, 谷峰, 张祖平, 等. 线粒体 DNA 缺失对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞药物敏感性的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2008, 2(4): 429 – 435.