

## Staurosporine 诱导人乳腺癌 MCF7/GFP-Bax 非受体依赖途径的细胞凋亡对 Bax 自胞浆至线粒体转移定位的影响

侯琦\*

(中国医学科学院、中国协和医学院 药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 以建立的人乳腺癌 MCF7 细胞 GFP-Bax 稳定表达细胞株(MCF7/GFP-PBax), 观察 staurosporine(STS) 诱导的非受体途径的细胞凋亡对 Bax 自胞浆转移定位于线粒体的影响。荧光显微镜观察凋亡细胞 Bax 从胞浆至线粒体转移和细胞核染色体断裂, 检测 STS 诱导细胞凋亡的量效和时效关系。免疫荧光法观察 GFP-Bax 从胞浆转移至线粒体与定位、细胞色素 c (cytochrome c, Cyt-c) 释放和 Annexin V 染色。MTT 法测定 STS 的细胞毒作用, TMRE 观测对细胞线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ ) 与功能的影响。Western blotting 方法分析 STS 诱导的细胞凋亡的信号转导途径和作用机制。结果 STS 可明显促进 Bax 从胞浆转移至线粒体与定位、细胞色素 c 释放, Western blotting 显示 JNK 特异抑制剂 SP600125 可抑制 STS 诱导的细胞 pJNK 表达, 表明 STS 作用机制与激活 JNK 信号通路相关。

**关键词:** staurosporine; 细胞凋亡; GFP-Bax; 线粒体

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)04-0378-05

## Effect of staurosporine induced apoptosis of MCF7/GFP-Bax stable cell line on Bax translocation from cytosol into mitochondria

HOU Qi\*

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

**Abstract:** To investigate Bax translocation from cytosol into mitochondria induced by staurosporine (STS) in GFP-Bax-tagged MCF7 stable cell line, the viability was measured by MTT method. Bax translocation from cytosol into mitochondria was investigated under the fluorescence microscope. The dose-effect and time-course relationships were also observed and the percentage of GFP-Bax punctuate cells were calculated. Immunofluorescence method was used to observe Bax translocation to mitochondria, Cyt-c release from mitochondria and Annexin V label. The TMRE assay was used to investigate membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and function of mitochondria. Western blotting was used to observe the mechanism of apoptosis induced by STS. The results showed that STS can induce Bax translocation from cytoplasm to mitochondria, Cyt-c release from mitochondria and Annexin V label. The Western blotting analysis presented the inhibitory effect on apoptosis induced by STS of SP600125 which is a specific JNK inhibitor. The study revealed the mechanism of STS induced apoptosis associated with JNK activated pathway.

**Key words:** staurosporine; apoptosis; GFP-Bax; mitochondria

目前关于细胞凋亡诱导的 Bax 转位于线粒体有两种主要方式, 外源性途径如 Fas 和 TNF $\alpha$  等配体通过与细胞表面的受体结合并进一步使 caspase 8

裂解活化, 从而使 Bid 裂解为 tBid, 与 Bax 结合后进入线粒体。内源性途径多种刺激因素如缺血/缺氧、UV、氧化剂, 抗肿瘤药等多种试剂或化合物诱发信号转导而以未知途径介导 Bax 转位于线粒体<sup>[1,2]</sup>。

已知蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 属于丝氨酸/苏氨酸家族, 与介导细胞的生长、分化和凋亡

收稿日期: 2007-10-08.

\* 通讯作者 Tel: 86-10-63165192, Fax: 86-10-63017757, E-mail: houqi@imm.ac.cn

的信号转导密切相关。Staurosporine (STS) 是一种特异的 PKC 抑制剂, 体外有明显的抑制细胞生长的作用, 其诱导的细胞凋亡系通过非受体介导途径, 但选择性差且作用机制尚未可知<sup>[3]</sup>。

Bax 是 Bcl-2 家族重要的凋亡调节蛋白, 细胞内 Bax 表达水平过高与引起细胞损伤和死亡相关<sup>[4]</sup>。本研究已经报道了 TNF $\alpha$  诱导的人乳腺癌 MCF7/GFP-Bax 细胞稳定表达细胞株细胞凋亡中对 Bax 作用<sup>[5]</sup>, 本研究观察了非受体介导的途径 STS 诱导的细胞凋亡在 MCF7/GFP-Bax 细胞对 Bax 转移定位的影响。

## 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 Victor 3 1420 multilabel counter, USA); 荧光显微镜 (Olympus, Tokyo, Japan); G418、Fugene 6、Opti-DMEM 无血清培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (FCS)、L-谷氨酰胺与 0.25% 胰酶 Trypsin-EDTA (Gibco)。Staurosporine、SP600125、Saponin、Hoechst 33258 (Sigma), 甲基噻唑蓝 (MTT) Kit (Roche)。免疫荧光 SlowFade Kit (Molecular Probe), TMRE kit (Cell Technology), Cy3 标记的或未标记羊抗鼠 Ig, ECL Western blotting 检测试剂盒 (Amersham), 热休克蛋白 (Heat shock protein, Hsp) 60 抗体 (Santa Cruz), Cyt-c 抗体 (Parmingen), Annexin V-Cy3<sup>TM</sup> Apoptosis Detection kit (Sigma), JNK 和 pJNK 抗体为 Cell Signaling (USA), Bax、Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 单克隆抗体和 hGFP-Bax 质粒均为 Dr. Yi-Te Hsu (Medical University of South Carolina, USA) 提供, 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**<sup>[6]</sup> MCF7/GFP-PBax 细胞以 10% 胎牛血清, 2% 谷氨酰胺的 DMEM, 置 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。将细胞接种于 10 cm 培养皿, 置孵箱中过夜。将 GFP-Bax 质粒转染细胞, 以 G418 0.2 mg · mL<sup>-1</sup> DMEM 培养液培养至克隆形成, 荧光显微镜下观察, 挑选出 GFP 阳性单克隆并将细胞培养扩增后冻存于液氮备用。

**凋亡细胞形态学观察** 将细胞铺于 6 孔细胞培养板, 培养过夜, 以不同浓度的 STS 处理细胞, 培养结束后在细胞培养液中加入 Hoechst 染料 10 min, 荧光显微镜下观察细胞线粒体内荧光点 (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 Cyt-c 释放**<sup>[7]</sup> 将处理过的细胞培养板以 1 × PBS 洗 3 次, 以 6% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 3 次, 0.02% Saponin 穿孔 10 min, 5% FCS 的 Saponin 封闭 30 min, Hsp60 或 Cyt-c 单抗作用 2 h, 洗 3 次后加 Cy3 标记的二抗 1 h, 洗 3 次后按 Kit 说明加 SlowFade 试剂, 荧光显微镜下观察细胞凋亡 (以上均在室温条件下操作, 自二抗以后操作须避光)。

**细胞毒测定**<sup>[8]</sup> 将 MCF7/GFP-Bax 细胞 (2 000 cells, 100  $\mu$ L) 接种于 96 孔细胞培养板, 培养过夜后加入 STS (终浓度为 100, 200, 400 和 800 nmol · L<sup>-1</sup>), 设空白对照, 3 个复孔。继续培养 24 h, 在培养结束前 4 h 每孔加入 MTT 10  $\mu$ L, 继续培养 4 h 后, 每孔加入二甲亚砜 100  $\mu$ L, 孵箱过夜, 以酶联免疫分析仪在 570 nm 测定其 OD 值, 计算细胞生长抑制百分比率。

**Annexin V 标记凋亡细胞**<sup>[9]</sup> 将 STS 处理过的细胞以 1 × PBS 洗 3 次按 Kit 使用说明加入 Annexin V-Cy3 100  $\mu$ L/孔, 室温闭光放置 10 min, 以 PBS 洗涤后, 荧光显微下观察凋亡细胞 Annexin V 标记。

**STS 对 MCF7/GFP-Bax 作用的量效和时效关系观察** 将铺于 6 孔细胞培养板并以 STS 处理细胞, 观察 STS 浓度为 50 ~ 400 nmol · L<sup>-1</sup> 对细胞的影响, 并观察不同时间点细胞凋亡的变化。于荧光显微镜下动态观察并记数有荧光点的细胞数, 计算百分率。

**荧光检测 TMRE 含量观察线粒体膜电位功能**<sup>[10]</sup> 在 96 孔细胞培养板 STS 处理过的细胞培养液中, 按 Kit 说明加入 TMRE, 置于培养箱 1 h 后吸出含 TMRE 培养液, 加 DMEM 100  $\mu$ L/孔, 10 min 后以酶联免疫分析仪在 410 nm 测定 TMRE 荧光值。

**Western blotting 检测 STS 细胞内作用机制** 将细胞预先给 SP600125 10  $\mu$ mol 处理 30 min 后, 加入 STS 200 nmol · L<sup>-1</sup> 作用 6 h 观察细胞凋亡。将 STS 处理过的细胞以 1 × PBS 洗涤, 加入细胞裂解液 200  $\mu$ L/孔, 将细胞刮下并于冰上放置 5 min 后, 收集并以 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 收集上清液, 经 Bio-Rad 法测定蛋白含量, 等量样品以 10% 凝胶 SDS-PAGE 分离蛋白质。电泳后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 封闭后加 JNK、pJNK、Bcl-2、Bcl-X<sub>L</sub> 和 ATPsynthase 抗体, 依此加二抗, ECL 显色, 扫描分析。

**统计学分析** 实验数据处理均采用 Students *t* 检验比较组间显著性差异。

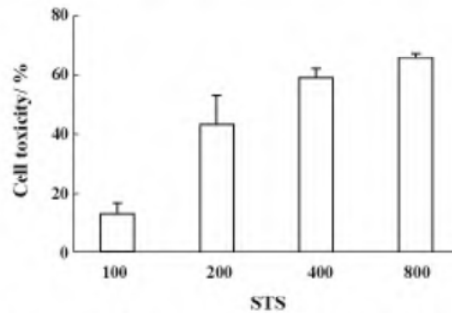
## 结果

### 1 STS 对 MCF7/GFP-Bax 作用的形态学观察

荧光显微镜下观察, 结果见图 1。在未处理的 MCF7/GFP-Bax 稳定表达细胞, 细胞形态完整, 细胞呈均匀的绿色。而 STS 处理过的细胞, 细胞内有典型的环状荧光点, 许多细胞碎裂形态不完整。以免疫荧光方法将特异性的线粒体 Marker Hsp60 抗体标记线粒体, 重叠后对比图片显示, GFP-Bax 从细胞浆中转移定位于线粒体(图 A), 伴随 GFP-Bax 转移 Cyt-c 释放到线粒体外(图 B)。以 Annexin V (Ann. V) 染色, 在凋亡细胞 Annexin V 标记显示阳性, 而正常细胞未见标记(图 C)。以 Hoechst 染色后可见蓝紫色的细胞核染色体聚集、断裂和分叶, 细胞皱缩、变圆、漂浮和碎裂(图 D)。以上结果均表明 STS 可明显诱导 MCF7/GFP-Bax 细胞凋亡, 与 GFP-Bax 从细胞浆中转移定位于线粒体、Cyt-c 释放到线粒体外、Annexin V 参与以及细胞核染色体聚集和碎裂有关。

### 2 STS 对 MCF7/GFP-Bax 细胞毒作用

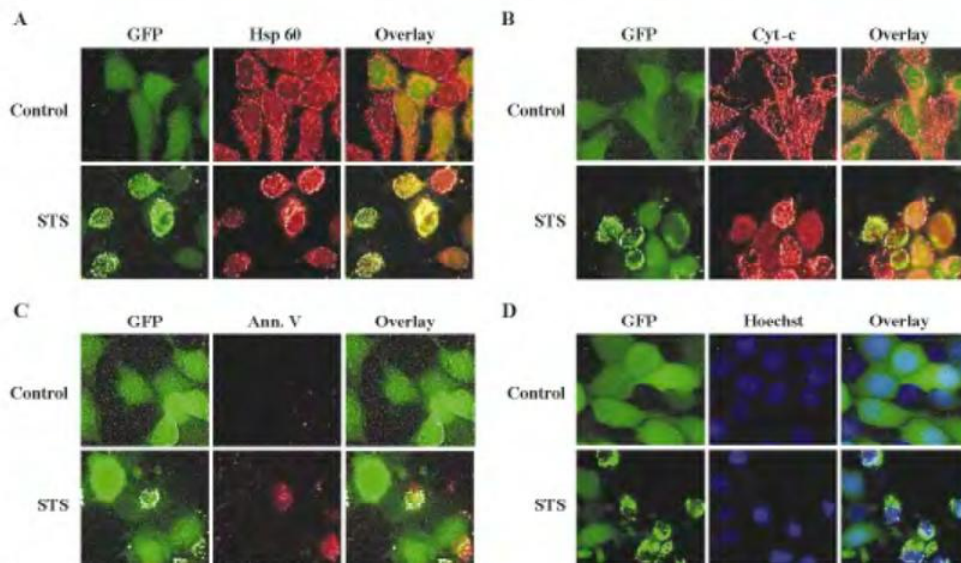
图 2 显示了 STS 的细胞毒作用。STS 有明显抑制细胞生长作用, 以不同浓度 STS 处理细胞 24 h, MTT 方法检测细胞毒性, 其诱导细胞死亡作用呈剂量依赖关系,  $EC_{50}$  是  $277 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



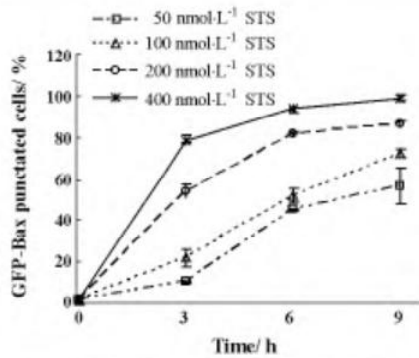
**Figure 2** Viability assay was induced by STS in GFP-Bax stable MCF7 cells. Cells were planted onto 96 well plates at the density of 2 000 cells per well in 100  $\mu\text{L}$  overnight, MTT ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) was added 10  $\mu\text{L}$  per well incubated for further 4 h, then soluble buffer was added 100  $\mu\text{L}$  per well, set overnight at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$ , then the plates were analyzed by using a micro plate reader (excitation and emission wavelengths, 570 and 630 nm, respectively). Results in each panel represent the means  $\pm$  standard deviation (bars) of at least four experiments carried out in triplicate

### 3 STS 对 MCF7/GFP-Bax 作用的量效和时效关系

STS 明显促进细胞凋亡, STS 对 GFP-Bax 从细胞浆中转移定位于线粒体其作用自 3 h 开始并出现典型的 GFP-Bax 荧光亮点, 呈量效依赖关系和时效依赖关系, 以 STS 处理细胞 6 h, 其  $EC_{50}$  约为  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 3)。



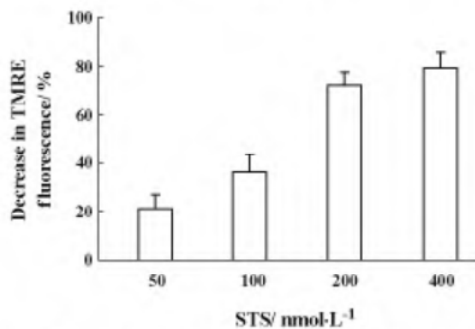
**Figure 1** Investigation of apoptosis induced by staurosporine (STS) in MCF7/GFP-Bax stable cells. Cells were treated with STS  $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 6 h. Cells treated were labeled by specific marker Hsp 60 and Cyt-c antibodies to investigate the GFP-Bax translocation into mitochondrial (A), Cyt-c release (B), Annexin V labeling (C) and nuclear condensation by Hoechst staining (D) directly observed under fluorescence microscopy



**Figure 3** Dose-effect and time-course relationship study in STS induced apoptosis. The cells were planted in 96 well plates then treated with different concentrations of STS. The punctate cells were counted at different times. Percentages of GFP-Bax punctate cells were calculated and showed in a dose-effect and time-course manners

#### 4 STS 对细胞线粒体 TMRE 的影响

TMRE 是一种红色荧光标记物, 可被正常细胞线粒体特异性摄取。若线粒体膜电位下降, 孔隙增大且不完整, TMRE 便被释放至细胞培养液中, 测定培养液荧光强度, 可分析线粒体膜性能。STS 诱导细胞凋亡, 检测其 OD 值(波长 410 nm)明显高于对照孔, 表明 STS 诱导的细胞凋亡可影响线粒体功能, 其  $EC_{50}$  是  $150 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 4)。

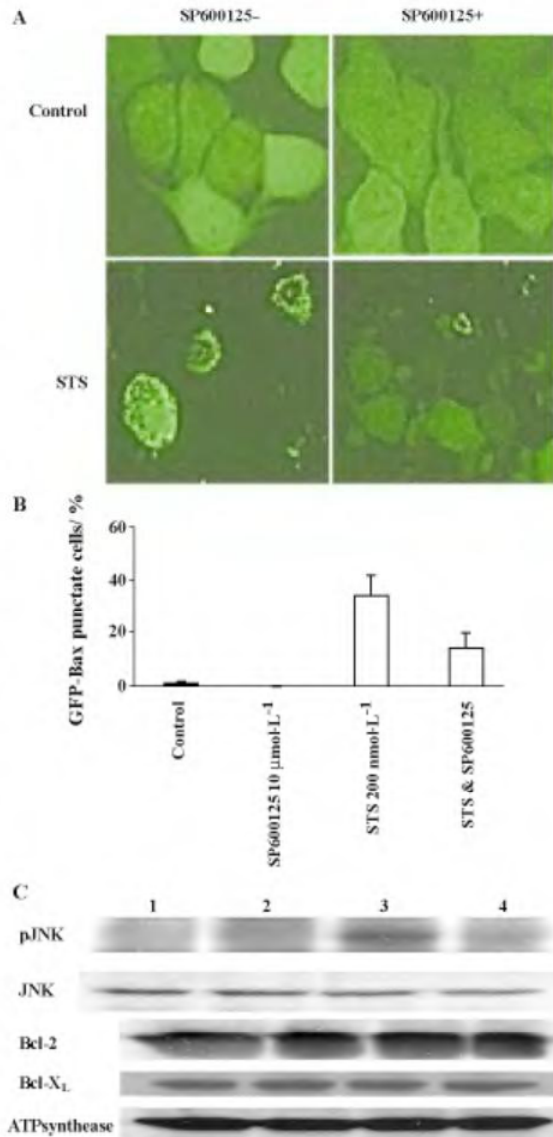


**Figure 4** Investigation of TMRE release from apoptotic cell induced by STS. MCF7/GFP-Bax stable cells were treated with STS from  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  to  $400 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 6 h. Then the cells were stained with TMRE and analyzed by using a fluorescence wavelengths plate reader (excitation and emission wavelengths, 530 nm and 590 nm, respectively)

#### 5 STS 诱导细胞凋亡机制

以 JNK 特异的抑制剂 SP600125 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预处理细胞 30 min, 然后给予 STS ( $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

作用 6 h 观察细胞凋亡。结果显示(图 5), A: 荧光显微镜下观察, 以 SP600125 预处理的细胞其凋亡



**Figure 5** STS induced apoptosis was reduced by JNK specific inhibitor SP600125. A: Investigation of apoptosis under fluorescence microscope induced by STS only or pre-treated with SP600125 at  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; B: Calculation of GFP-Bax punctate cells; C: Western blotting analysis to investigate STS induced apoptosis in MCF7/GFP-Bax stable cells. The lysates of treated cells with STS for 6 h were analysis by 10% SDS PAGE and immuoblotted with JNK, pJNK, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> and ATPase antibodies. Lane 1: Control and Lane 2: SP600125  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Lane 3: STS  $200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Lane 4: SP600125 plus STS



程度较 STS 组明显减低; B: 凋亡细胞计数显示 SP600125 可降低 STS 诱导的细胞凋亡; C: Western blotting 结果分析, STS 诱导的细胞 pJNK 表达水平显著增加, 而 SP600125 + STS 则显示明显抑制, 表明 STS 引起细胞凋亡与 JNK 信号转导通路有关, 但是对 Bcl-2 和 Bcl-X<sub>L</sub> 的表达则未见明显改变, ATPsynthase 为线粒体的组成性表达蛋白, 以检测基本组成蛋白的表达水平。结果表明 SP600125 对 STS 诱导的细胞凋亡有明显抑制作用。

## 讨论

程序性细胞死亡或凋亡是正常细胞分化、有毒物质致细胞损伤后清除中的重要步骤。在心脑血管疾病、肿瘤以及自身免疫疾病等, 组织内细胞凋亡调节存在失衡。近来研究指出, 许多引起凋亡的因素可引起 Bax 和仅有 BH3 (Bcl-2 homology 3) 结构域的 tBid 或 Bim 等从细胞浆至线粒体转移定位并有线粒体膜电位的改变和磷酸化, 从而发生细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

UV、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、放射性辐射、化学毒剂以及抗癌药等可激活应激诱导蛋白激酶 c-Jun N-terminal Kinase (JNK) 并启动与细胞死亡有关的一系列酶的活化如磷酸化等。STS 作为内源性的激动剂, 有很强的抑制细胞增殖和促细胞死亡作用, 其介导的细胞凋亡与抑制 PKC 蛋白激酶活性和增加 JNK 磷酸化使 pJNK 水平增高有关, 但是其作用机制尚不十分清楚<sup>[12]</sup>。

本实验室已经报道了在 MCF7/GFP-Bax 人乳腺癌稳定表达细胞株, TNF $\alpha$  激活的受体依赖途径的细胞凋亡与 Bid 裂解为 tBid 及其介导的 Bax 转位于线粒体作用相关, 为 caspases 依赖性作用。本研究表明, STS 在 MCF7/GFP-Bax 引起的细胞凋亡亦和 Bax 从细胞浆转移至线粒体相关且呈剂量和时间依赖关系, 为 caspases 非依赖性作用。研究还发现 STS 促进细胞凋亡作用与激活 JNK 活性并促进磷酸化有关, pJNK 水平的升高可被 JNK 特异抑制剂 SP600125 降低, 与镜下观察计数凋亡细胞所得结论一致。因此该研究可作为非受体依赖途径凋亡诱导模型, 与 TNF $\alpha$  介导的受体依赖途径模型相结合, 为筛选新的化合物或药物以及探讨其作用机制提供简

捷可行的实验模型和依据。

致谢: Dr. Yi-Te Hsu (Medical University of South Carolina, USA) 为本研究提供指导和帮助。

## References

- [1] Depraetere V, Golstein P. Fas and other cell death signaling pathways [J]. *Semin Immunol*, 1997, 9: 93-107.
- [2] Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors [J]. *Pharm Acta Helv*, 2000, 74: 281-286.
- [3] Swannie HC, Kaye SB. Protein kinase C inhibitors [J]. *Curr Oncol Rep*, 2002, 4: 37-46.
- [4] Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 1997, 139: 1289-1292.
- [5] Hou Q. Effect of Bax translocation on TNF $\alpha$  induced apoptosis of human breast cancer MCF7 cells stably expressed hGFP-Bax stable [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 1254-1258.
- [6] 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.
- [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] 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*, 2000, 37: 402-413.
- [9] Pigault C, Follenius-wund A, Achmutz M, et al. Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes [J]. *J Mol Biol*, 1994, 236: 199-208.
- [10] Smilli 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.
- [11] Kim B, Ryu S, Song B. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondria translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 21256-21265.
- [12] Caponigro F, French RC, Kaye SB. Protein kinase C: a worthwhile target for anticancer drugs? [J]. *Anticancer Drugs*, 1997, 8: 26-33.