

P-糖蛋白线粒体转位与线粒体 DNA 缺失肿瘤细胞多药耐药产生的关系

凌贤龙* 何玉琦 周源文 蕾

(第三军医大学新桥医院消化科, 重庆 400037)

摘要 线粒体DNA缺失细胞(ρ^0 细胞)拮抗化疗药物诱导的凋亡,但其确切机制尚不明确。本研究探讨P-gp线粒体转位与人肝癌细胞(SK-Hep1) mtDNA 缺失细胞(ρ^0 SK-Hep1)多药耐药产生的关系。以SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1和转线粒体细胞SK-Hep1Cyb为研究对象, CCK-8方法检测细胞对药物敏感性; Annexin V/PI 双染法及 DAPI 染色法检测细胞凋亡; Western blot 检测 P-gp 表达; 激光共聚焦显微镜结合免疫荧光检测 P-gp 细胞内分布。结果显示, SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞对多柔比星(DOX)的 IC_{50} 分别为 $0.62 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ 、 $4.93 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ 和 $0.57 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ 。SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡率分别为 $11.25\% \pm 1.36\%$ 、 $4.75\% \pm 0.98\%$ 和 $14.50\% \pm 1.57\%$, ρ^0 SK-Hep1 对细胞凋亡有明显抗性。Western blot 检测发现 ρ^0 细胞内 P-gp、Bax、Bcl-2 表达增加, Bcl-2/Bax 比值增加。免疫荧光共定位显示, ρ^0 细胞线粒体内 P-gp 表达增加。结果表明, ρ^0 细胞对化疗药物诱导的凋亡有明显抵抗, 这种现象可能与 ρ^0 细胞 P-gp、Bax、Bcl-2 表达增加有关。 ρ^0 细胞 P-gp 线粒体转位可发挥外排泵作用将药物排出线粒体, 改变化疗药物的亚细胞分布, 减少细胞内药物浓度, 使细胞产生多药耐药。

关键词 P-糖蛋白; 多药耐药; 线粒体 DNA; 肿瘤

肿瘤细胞多药耐药(multidrug resistance, MDR)是造成肿瘤化疗失败的重要原因。MDR 的发生主要涉及肿瘤细胞外膜上两类经典的转运蛋白^[1]: 一类是 ATP 结合盒(ATP binding cassette, ABC)转运蛋白超家族, 具有能量依赖的跨膜药物外输泵功能, 可以将细胞内底物包括多种抗肿瘤药物泵出肿瘤细胞, 如 P-gp/ABCB1、MRP1/ABCC1 和 BCRP/ABCG2 等; 另一类溶质运载蛋白家族(solute carrier transporter superfamily)可调控细胞内抗肿瘤药物的吸收。两类转运蛋白的过度表达可介导肿瘤细胞耐药。

线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)缺失可诱导肿瘤细胞多药耐药表型的产生, 然而其机制仍不清楚。mtDNA 缺失细胞对顺铂和光动力疗法有明显的抵抗作用, 甚至暂时缺失mtDNA的细胞对化疗药物也有抵抗作用, 由mtDNA减少引起的线粒体应激可使细胞产生明显的凋亡抵抗^[2]。含有突变型 mtDNA 的细胞较含有非突变型 mtDNA 的细胞抗凋亡能力明显增加^[3]。我们以往研究也发现 mtDNA 缺失与突变能诱导肿瘤细胞多药耐药表型的产生, 由mtDNA减少引起的线粒体应激可使细胞产生明显的凋亡抵抗^[4,5]。

本研究以人肝癌细胞 SK-Hep1、mtDNA 缺失细

胞 ρ^0 SK-Hep1 以及转线粒体胞质体细胞 SK-Hep1Cyb 为模型, 通过比较 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)线粒体内分布的差异, 探讨 P-gp 线粒体转位在 mtDNA 缺失细胞多药耐药产生中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料及细胞培养

1.1.1 细胞株 人肝癌 SK-Hep1 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.2 主要试剂 DMEM 高糖培养基和胎牛血清购自 Gibco-BRL 公司; 丙酮酸钠、MTT 购自 Sigma 公司; 尿嘧啶、DMSO 购自 Amresco 公司; 多柔比星(doxorubicin, DOX)和长春新碱(vincristine, VCR)购自深圳万乐药业有限公司; 顺铂(Cisplatin, CDDP)购自云南生物谷灯盏花药业有限公司; 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)购自上海旭东海普药业有限公司;

收稿日期: 2010-08-17 接受日期: 2010-11-15

国家自然科学基金(No.30470865)和新桥医院 1520 基金资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68774204, E-mail: lingxlong@yahoo.com.cn

鼠抗人 Bcl-2、Bax、 β -actin 单克隆抗体和兔抗人 P-gp 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; CCK-8 试剂盒 (DOJINDO, 日本); MitoTracker Red (Molecular Probes Inc, Eugene, OR); Annexin V FITC/PI 试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司); 激光共聚焦显微镜 (Leica Tcs SP2, 德国); FACS Calibur 流式细胞仪 (BD 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SK-Hep1 细胞在 DMEM 培养基, 含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素, 5% CO₂, 37°C 条件下培养。线粒体 DNA 缺失 SK-Hep1 细胞 (ρ^0 SK-Hep1)、SK-Hep1Cyb 细胞由本实验室诱导、保存^[4,7], 在高糖 DMEM 培养基中, 含 100 μ g/L 丙酮酸, 50 μ g/L 尿嘧啶, 15% 胎牛血清, 5% CO₂, 37°C 条件下培养。SK-Hep1Cyb 系 ρ^0 SK-Hep1 转线粒体细胞, 将血小板与 ρ^0 SK-Hep1 细胞融合后获得, 在 DMEM 高糖培养基含 10% 胎牛血清, 37°C 恒温, 5% CO₂, 95% 空气孵箱内培养。

1.2.2 CCK-8 检测细胞对顺铂敏感性 按 CCK-8 试剂盒说明操作。酶联免疫检测仪测定 (测定波长 450 nm, 参比波长 650 nm) 吸光度值 (A)。相对抑制率 (%) = (1 - 加药孔 A 值 / 对照孔 A 值) \times 100%, SPSS 13.0 计算 50% 细胞生长抑制时的药物浓度 (IC₅₀), 耐药指数 (RI) = 耐药细胞 IC₅₀ / 亲本细胞 IC₅₀。

1.2.3 AnnexinV/PI 双染法、DAPI 染色法检测细胞凋亡 采用 FITC-AnnexinV/PI 双荧光标记、流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡的变化。将细胞按 1×10^5 个 /ml 接种于 6 孔板, 各组设 3 复孔, 均加入 5 μ g/ml 多柔比星, 作用 24 h 后收集细胞, 调整细胞浓度至 1×10^5 /ml, 1 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加 Annexin V 5 μ l, 缓冲液 195 μ l, PI 20 μ l, 避光放置 20 min, 流式细胞仪收集 5×10^4 个细胞。激发光波长为 488 nm, FITC 受激发后发绿色荧光, PI 发红色荧光。Cellquest 软件分析结果。10 mm \times 10 mm 玻片经泡酸、清洗后, 放入 75% 乙醇中浸泡, 接种细胞时用酒精灯将玻片烤干, 放入 24 孔板中 (Corning/Costa)。将对数生长期的 SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞经胰蛋白酶消化后制成 1×10^4 /ml 的单细胞悬液, 将细胞接种到 24 孔板内 10 mm \times 10 mm 玻片上, 待细胞长至适宜密度时, 用含不同浓度的多柔比星 (0 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml) 处理细胞, 48 h 后 PBS 洗涤 2~3 次, 加入 95% 乙醇固定细胞 20 min。PBS 洗涤培养皿 2~3 次, 血清固定 30 min, Triton X-100 处理 20 min,

PBS 洗涤 2~3 次, DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 孵育 5 min, PBS 洗涤 2~3 次, 激光共聚焦显微镜观察细胞并照相。

1.2.4 Western 杂交 应用组织细胞裂解液分别裂解 SK-Hep1 细胞、 ρ^0 SK-Hep1 细胞和 SK-Hep1Cyb 细胞得到总蛋白。以牛血清蛋白 (BSA) 为标准品, 考马斯亮蓝法进行蛋白质定量。根据测得的总蛋白浓度, 每例标本取总蛋白 20 μ g, 10% SDS-PAGE 分离, 半干法转印于 PVDF (Roche 公司) 膜上。脱脂奶粉封闭。1 : 1 000 稀释 Bcl-2 与 Bax 一抗, 1 : 500 稀释 P-gp 一抗, 与经封闭液处理的 PVDF 膜 4°C 孵育过夜。1 : 10 000 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 加 ECI 发光剂, 在 5 min 内显影定影, 胶片洗涤干燥后, 记录结果。Quantity One 图像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司) 进行条带吸光度分析, 以目的蛋白与内参 β -肌动蛋白条带灰度的比值作为蛋白表达的相对含量。相同的细胞重复 3 次求其均值代表该细胞蛋白的表达水平。

1.2.5 免疫荧光分析 10 mm \times 10 mm 玻片经泡酸、清洗后, 放入 75% 乙醇中浸泡, 接种细胞时用酒精灯将玻片烤干, 放入 24 孔板中 (Corning/Costa)。将对数生长期的 SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞经胰蛋白酶消化后制成 1×10^4 /ml 的单细胞悬液, 将细胞接种到 24 孔板内 10 mm \times 10 mm 玻片上, 待细胞长至适宜密度时, 吸去培养基, 加入新鲜配制的含有 200 nmol/L Mitotracker Red 线粒体探针的培养基 37°C 孵育 30 min, PBS 洗涤 2~3 次, 加入 95% 乙醇固定细胞 20 min。PBS 洗涤培养皿 2~3 次, 血清固定 30 min, Triton X-100 处理 20 min, PBS 洗涤 2~3 次, 加入 1 : 100 稀释的抗 P-gp 一抗 4°C 避光孵育 18~24 h, PBS 洗涤 2~3 次, FITC 结合的二抗避光孵育 30 min, PBS 洗涤 2~3 次, DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) 孵育 5 min, PBS 洗涤 2~3 次, 激光共聚焦显微镜观察细胞并照相。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件, 分别行 *t* 检验和 χ^2 检验。P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 化疗药物对培养细胞的细胞毒作用

SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞对 DOX 的 IC₅₀ 分别为 0.62 \pm 0.02 μ g/ml、4.93 \pm 0.17 μ g/ml、0.57 \pm 0.02 μ g/ml, ρ^0 SK-Hep1 的 RI 是 SK-Hep1 的 7.95 倍, 中度耐药 (表 1)。

表 1 IC₅₀ 和抵抗指数(n=5)
Table 1 IC₅₀ and resistance index (n=5)

药物 Drugs	IC ₅₀ (μg/ml)			抵抗指数 Resistance index	
	SK-Hep1	ρ ⁰ SK-Hep1	SK-Hep1Cyb	ρ ⁰ SK-Hep1	SK-Hep1Cyb
DOX	0.62±0.02	4.93±0.17	0.57±0.02	7.95*	0.92
CDDP	5.04±0.06	16.34±0.29	2.02±0.12	3.24*	0.40
VCR	0.77±0.03	0.87±0.03	0.63±0.02	1.13	0.82
5-FU	12.49±0.27	19.33±0.21	10.27±0.34	1.55	0.82

Compared with SK-Hep1, *P<0.05.

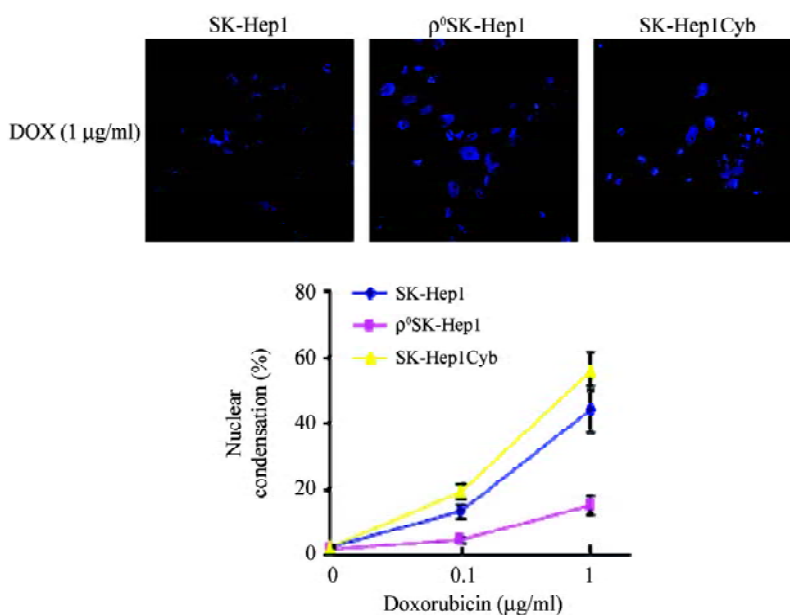


图 1 多柔比星对培养细胞的细胞毒性

Fig.1 Cytotoxicity of doxorubicin on the cultured cells

2.2 细胞凋亡检测

SK-Hep1、ρ⁰SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡率分别为 11.25%±1.36%、4.75%±0.98% 和 14.50%±1.57%。ρ⁰SK-Hep1 对细胞凋亡有明显抗性, 与另外两种细胞相比有显著差异, P<0.05。不同浓度的 DOX(0 μg/ml, 0.1 μg/ml, 1 μg/ml)处理细胞 48 h 后 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡明显增加, DAPI 染色细胞核染色质凝聚、核碎裂, 出现凋亡小体。而 ρ⁰SK-Hep1 细胞对 DOX 诱导的凋亡有明显的抗性 (图 1)。

2.3 ρ⁰SK-Hep1 细胞 P-gp、Bcl-2/Bax 蛋白表达

Western 印迹 P-gp、β-actin、Bcl-2 和 Bax 蛋白分子量大小分别为 170 kDa、43 kDa、28 kDa 和 23 kDa, Quantity One 图像分析系统分析后, 三种细胞 Bcl-2 与 Bax 条带灰度的比值(Bcl-2/Bax)分别是: SK-

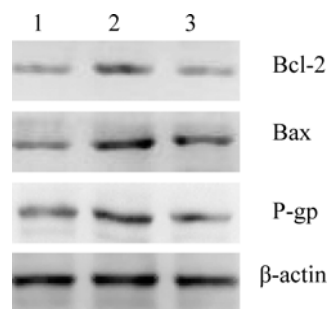


图 2 Bcl-2、Bax 和 P-gp 的表达

Fig.2 Bcl-2、Bax and P-gp expressions

1: SK-Hep1; 2: ρ⁰SK-Hep1; 3: SK-Hep1Cyb.

Hep1 细胞 0.53±0.06、ρ⁰SK-Hep1 细胞 0.61±0.03、SK-Hep1Cyb 细胞 0.43±0.05。ρ⁰SK-Hep1 细胞 P-gp 表达明显增强(P<0.01), 而 SK-Hep1Cyb 细胞与 SK-

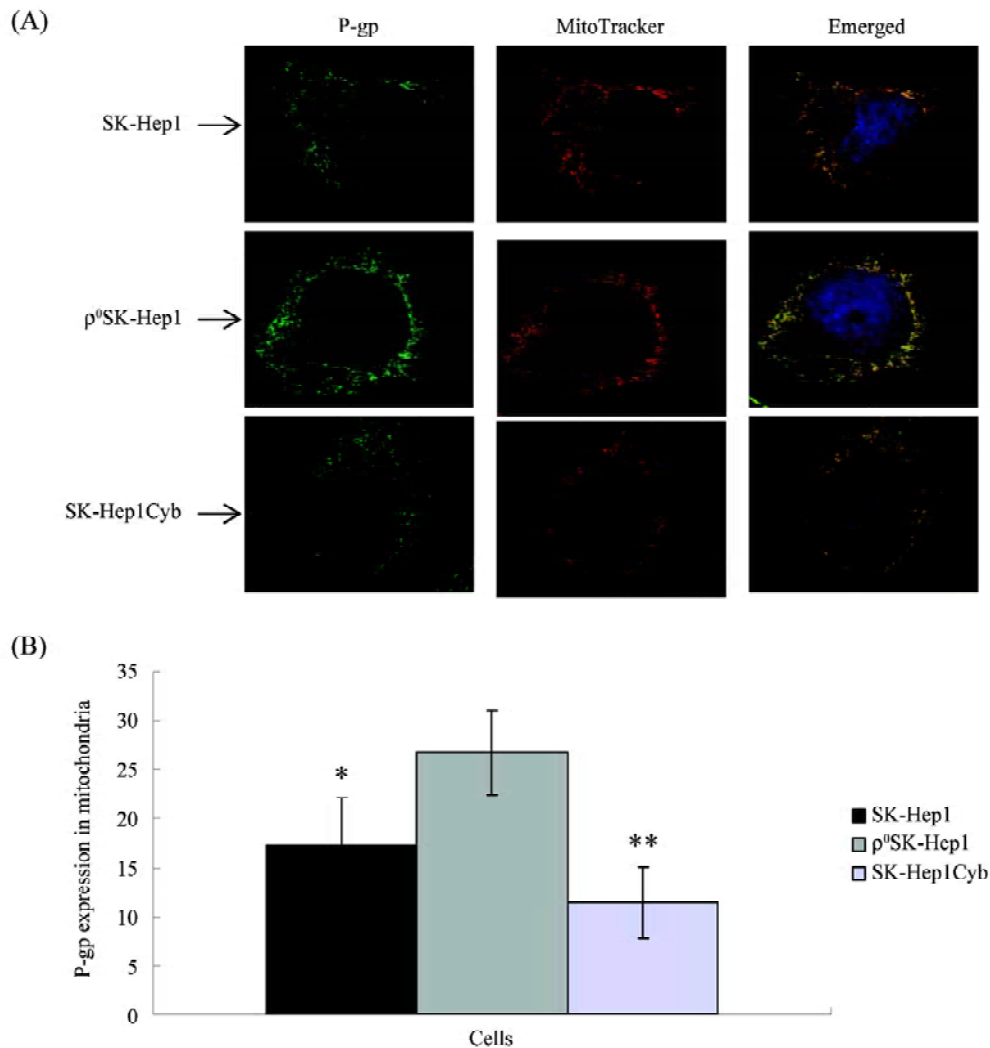


图3 激光共聚焦显微镜检测 P-gp 线粒体定位

Fig.3 P-gp localization in mitochondria assayed by immunofluorescence combined with laser scanning confocal microscopy
* $P < 0.05$, vs SK-Hep1. ** $P < 0.01$, vs SK-Hep1Cyb.

Hep1 细胞间差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 ρ⁰SK-Hep1 细胞 P-gp 线粒体转位增加

免疫荧光分析显示, SK-Hep1 细胞内 P-gp(绿色荧光)弥散分布, 而 ρ⁰SK-Hep1 细胞 P-gp 荧光强度明显增加; 转入线粒体后, SK-Hep1Cyb 细胞 P-gp 荧光强度减低。将 P-gp(绿色荧光)、MitoTracker Red(红色荧光)、DAPI(蓝色荧光)三色荧光染色后图像重建显示, ρ⁰SK-Hep1 细胞 P-gp 线粒体转位增加(图3)。

3 讨论

mtDNA 缺失可诱导肿瘤细胞多药耐药表型的产生, 由 mtDNA 减少引起的线粒体应激可使细胞产生明显的凋亡抵抗^[8,9]。mtDNA 缺失诱导肿瘤细胞多

药耐药表型产生的原因仍不清楚。

有研究证实 mtDNA 缺失能诱导肿瘤细胞 MDR1 mRNA 稳定性增加从而引起 P-糖蛋白表达增加, 使细胞内抗肿瘤药物蓄积减少和细胞对抗肿瘤药物敏感性下降, 细胞产生耐药表型。P-糖蛋白是 170 kDa 跨膜蛋白, 属于 ATP 结合盒式转运蛋白家族成员, 可作为能量依赖性外排泵发挥功能, 可减少细胞内毒性复合物浓度, 因此可使细胞对分子结构和靶点专一性不同的药物如紫杉醇、长春新碱、多柔比星等产生耐药性。细胞受凋亡信号刺激可产生两种凋亡通路: 内源性通路(线粒体)和外源性通路(受体、跨膜), 线粒体通路启动因子是 caspase-9, 外源性通路启动因子是 caspase-8 和 caspase-10, 两种通路共享效应因子

caspase-3。P-gp 可抑制 caspase-9、-3, 抑制内源性通路, 而对外源性通路 caspase-8 无影响。P-gp 除药物转运功能外, 在调节 caspase 依赖性凋亡途径中也起着特殊作用, P-gp 可保护人类肿瘤细胞免受多种 caspase 介导的凋亡的影响, 能影响不同刺激诱导的凋亡关键步骤 caspase-3 的激活, P-gp 通过抑制 caspase-3 而抑制线粒体凋亡途径, 但不影响 caspase-8 依赖性受体凋亡途径。当 P-gp 过表达细胞暴露于凋亡信号时无细胞色素 C 从线粒体释放, 细胞产生凋亡抵抗。

本研究发现, SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞对 DOX 的 IC_{50} 分别为 $0.62 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$ 、 $4.93 \pm 0.17 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.57 \pm 0.02 \mu\text{g/ml}$, ρ^0 SK-Hep1 的 RI 是 SK-Hep1 的 7.95 倍, 中度耐药。SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡率分别为 $11.25\% \pm 1.36\%$ 、 $4.75\% \pm 0.98\%$ 和 $14.50\% \pm 1.57\%$ 。 ρ^0 SK-Hep1 对细胞凋亡有明显抗性, 与另外两种细胞相比有显著差异。不同浓度的 DOX ($0 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$) 处理细胞 48 h 后 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞凋亡明显增加, DAPI 染色细胞核染色质凝聚、核碎裂, 出现凋亡小体。而 ρ^0 SK-Hep1 细胞对 DOX 诱导的凋亡有明显的抗性。线粒体 DNA 缺失细胞 P-gp 蛋白表达明显增加, 经激光共聚焦检测发现线粒体 DNA 缺失细胞可见明显的 P-gp 蛋白定位。P-gp 通常被认为定位于细胞膜, 通过降低细胞内药物总浓度介导耐药。近年来的研究发现在细胞核、高尔基体和线粒体也有功能活性的 P-gp 表达^[10,11]。因此 ρ^0 细胞的 P-gp 表达不仅仅对一些药物有外排作用, 也与药物在细胞内的再分布有关。有研究显示, ρ^0 细胞 P-gp 在 mRNA 和蛋白水平高表达, 且功能活性较高^[12], 人肝癌药物敏感性细胞 P5 线粒体内没有 P-gp 表达, 而经 P5 诱导产生的耐药性细胞 P1(0.5) 线粒体内则有功能活性的 P-gp 表达^[10]。P-gp 定位于多药耐药细胞线粒体膜与定位于细胞膜一样发挥同样的药物外排作用。结合以上我们认为, ρ^0 SK-Hep1 细胞耐药性的产生可能与细胞线粒体通路抗凋亡机制有关系。然而, 定位于细胞线粒体的 P-gp 是否有功能活性, 能否在线粒体发挥药物外排作用, 及其在调节 caspase 依赖性凋亡途径中所起的特殊作用还有待于进一步研究。

Bcl-2 家族蛋白通过调节线粒体外膜完整性而在细胞凋亡中起关键作用。Bcl-2、Bcl-XL 阻止凋亡蛋白释放并保护线粒体外膜完整性, 而促凋亡 Bcl-2 家族成员 Bax、Bak 诱导外膜通透性增加, 使促凋亡因子从线粒体释放^[13]。Bcl-2 蛋白与细胞增殖和凋亡

关系密切, 可启动细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 使细胞获得耐药性^[14]。本研究对 SK-Hep1、 ρ^0 SK-Hep1 和 SK-Hep1Cyb 细胞内 Bcl-2 蛋白表达进行检测显示, ρ^0 SK-Hep1 细胞 Bcl-2 蛋白表达明显增强, Bcl-2 与 Bax 蛋白量的比率增加, 而转入正常线粒体 DNA 后, SK-Hep1Cyb 细胞 Bcl-2 蛋白表达下降, Bcl-2 与 Bax 蛋白量的比率下降, 这也许是 ρ^0 SK-Hep1 细胞具有耐药性的部分机制所在。

参考文献(References)

- 1 Daood M, Tsai C, Ahdab-Barmada M, Watchko JF. ABC transporter (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) expression in the developing human CNS. *Neuropediatrics* 2008; 39(4): 211-8.
- 2 Singh KK, Russell J, sigala B, Zhang Y, Williams J, Keshav KF. Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents. *Oncogene* 1999; 18(48): 6641-6.
- 3 Shidara Y, Yamagata K, Kanamori T, Nakano K, Kwong JQ, Manfredi G, *et al.* Positive contribution of pathogenic mutations in the mitochondrial genome to the promotion of cancer by prevention from apoptosis. *Cancer Res* 2005; 65(5): 1655-63.
- 4 李歆强, 凌贤龙, 周源, 何玉琦, 李诗伟, 晏斌. 诱导细胞 mtDNA 缺失以及再转入线粒体后对肿瘤细胞凋亡的影响. *第三军医大学学报* 2009; 31(22): 2225-7.
- 5 何玉琦, 凌贤龙, 于金秋, 李诗伟, 周源, 李歆强, 等. 线粒体 DNA 损伤与人肝癌细胞多药耐药关系的研究. *肿瘤* 2009; 29(9): 828-32.
- 6 张国桥, 凌贤龙, 陈正堂. 人线粒体 DNA 缺失肝癌细胞株建立. *细胞生物学杂志* 2007; 29(1): 127-30.
- 7 何玉琦, 凌贤龙. 线粒体 DNA 缺失 SK-Hep1 细胞转线粒体模型的建立及生物学特性分析. *细胞生物学杂志* 2009; 31(1): 107-12.
- 8 Ferraresi R, Troiano L, Pinti M, Roat E, Lugli E, Quaglino D, *et al.* Resistance of mtDNA-depleted cells to apoptosis. *Cytometry A* 2008; 73(6): 528-37.
- 9 Lee W, Choi HI, Kim MJ, Park SY. Depletion of mitochondrial DNA up-regulates the expression of MDR1 gene via an increase in mRNA stability. *Exp Mol Med* 2008; 40(1): 109-17.
- 10 Solazzo M, Fantappiè O, Lasagna N, Sassoli C, Nosi D, Mazzanti R. P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines. *Exp Cell Res* 2006; 312(20): 4070-8.
- 11 Lo YL, Ho CT, Tsai FL. Inhibit multidrug resistance and induce apoptosis by using glycocholic acid and epirubicin. *Eur J Pharm Sci* 2008; 35(1-2): 52-67.
- 12 Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther* 2000; 85(3): 217-29.
- 13 Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Güner D. Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 2003; 39: 73-88.
- 14 Hellwinkel OJ, Muller J, Pollmann A, Kabisch H. Osteosarcoma cell lines display variable individual reactions on wild type p53 and Rb tumor-suppressor transgenes. *J Gen Med* 2005; 7(4): 407-19.

P-glycoprotein Mitochondrial Translocation on Multidrug Resistance in the Mitochondrial DNA-depleted Cells

Xian-Long Ling*, Yu-Qi He, Yuan Zhou, Lei Wen

(Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Cells that express the multidrug resistance (MDR) phenotype are resistant to the mitochondrial related apoptosis induced by several anticancer drugs. Why the mitochondrial DNA depleted cells showed MDR phenotype is still unknown. This study focused on P-glycoprotein (P-gp) mitochondrial translocation on multidrug resistance in the mitochondrial DNA-depleted cells. SK-Hep1, ρ^0 SK-Hep1 and the transmitochondria cells SK-Hep1Cyb were used. Sensitivity of the cells to chemotherapeutic drugs was assessed by CCK-8 assays. Apoptosis ratio of the cells were measured by Annexin V/PI double staining. Expression of P-gp was detected by Western blot, and distribution of P-gp within the cells was assayed by immunofluorescence combined with laser scanning confocal microscopy. Results showed, the IC_{50} of SK-Hep1, ρ^0 SK-Hep1 and SK-Hep1Cyb to Doxorubicin were 0.62 ± 0.02 $\mu\text{g/ml}$, 4.93 ± 0.17 $\mu\text{g/ml}$ and 0.57 ± 0.02 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and the apoptosis ratio of SK-Hep1, ρ^0 SK-Hep1 and SK-Hep1Cyb were $11.25\% \pm 1.36\%$, $4.75\% \pm 0.98\%$ and $14.50\% \pm 1.57\%$, respectively. The ρ^0 SK-Hep1 exhibited resistance to apoptosis induced by the chemotherapeutic drugs. P-gp, Bax and Bcl-2 were overexpressed and Bcl-2/Bax increased. ρ^0 cells showed resistance to apoptosis induced by chemotherapeutic drugs, and this might be related to increased Bax/Bcl-2, and increased P-gp translocation to mitochondria in the ρ^0 cells. Therefore, P-gp could be involved in the protection of apoptosis due to antiproliferative drugs.

Key words P-glycoprotein; multidrug resistance; mitochondrial DNA; tumor

Received: August 17, 2010 Accepted: November 15, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30470865) and 1520 Foundation of Xinqiao Hospital

*Corresponding author. Tel: 86-23-68774204, E-mail: lingxlong@yahoo.com.cn