

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.08.006

# 人食管鳞癌 EC9706 细胞线粒体 DNA 与凋亡的关系

刘宗文, 张中冕, 杨家梅, 田薇薇

## Relationship between mtDNA and Apoptosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines of EC9706

LIU Zong-wen, ZHANG Zhong-mian, YANG Jia-mei, TIAN Wei-wei

Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, China

**Abstract: Objective** To establish the  $\rho^0$  cells of the human esophageal carcinoma cells EC9706 and investigate the relationship between mtDNA copies and apoptosis. **Methods** Cells deficient mtDNA ( $\rho^0$  cells) were acquired from ESCC cell lines EC9706 through continuous passage culture in the RP-MI1640 supplemented with 50 $\mu$ g/ml EB, 50 $\mu$ g/ml uridine and 100 $\mu$ g/ml pyruvate. MtDNA copies of the two cell lines were detected at different time using the real-time fluorescence quantitative PCR after treated by EB. PCR products were validated by agarose gel electrophoresis; Apoptosis of ESCC cell lines EC9706 were analyzed using TUNEL staining and flow cytometry at different time after treated by EB. **Results** The  $\rho^0$  cells of ESCC cell lines EC9706 were successfully established. The results identified by the real-time fluorescence quantitative PCR indicated that mtDNA copies decreased progressively with the increasing in times of cell division in the presence of EB and mtDNA was disappear until 12 days. Apoptosis analysis was performed during the culture of  $\rho^0$  cells of EC9706 after the cells were treated with EB on the 4th, 8th and 12th day. The results detected by flow cytometry indicated that apoptosis was increased gradually from the 4th day to 12th day. Apoptotic rates(%) were  $2.78 \pm 1.04$ ,  $11.68 \pm 1.85$  and  $26.62 \pm 1.06$  in the cells EC9706. The apoptosis deduced by TUNEL was increased gradually from the 4th day to 12th day. **Conclusion** Establishment of the  $\rho^0$  cells of ESCC cell lines EC9706 offers new tools for research on the relationship between mitochondrial DNA and esophageal carcinoma. Apoptotic rate of EC9706 cells was increased gradually with the decrease of mtDNA copies. The results suggest that mtDNA may participate in the inducement of apoptosis and mtDNA lesions induced selectively could lead to mtDNA copies obvious decrease and further induce cell apoptosis. This is wished to become a new target for biotherapy of esophageal carcinoma.

**Key words:** Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC); Mitochondrial DNA; Apoptosis

**摘要:目的** 建立人食管鳞癌 EC9706 细胞的无线粒体 DNA( $\rho^0$ )细胞,探讨食管癌线粒体 DNA 与凋亡的关系。**方法** 在细胞培养液中加入 EB 50 $\mu$ g/ml、尿嘧啶 50 $\mu$ g/ml、丙酮酸 100 $\mu$ g/ml,进行连续传代培养,获得完全缺失 mtDNA 的细胞( $\rho^0$ 细胞);运用实时荧光定量 PCR 技术,检测 EB 处理后不同时间的人食管鳞癌细胞 EC9706 mtDNA 的拷贝数,并采用琼脂糖凝胶电泳对 mtDNA 进行定性检测;采用 TUNEL 染色和流式细胞技术,检测 EB 处理后不同时间人食管鳞癌细胞 EC9706 的凋亡情况。**结果** 成功建立了人食管鳞癌细胞 EC9706 的  $\rho^0$  细胞,经实时荧光定量 PCR 鉴定,发现在 EB 存在下,随着细胞分裂,mtDNA 拷贝数进行性减少,直到 12 天,mtDNA 完全丢失;流式细胞术检测结果显示,EC9706 细胞 EB 处理后,第 4 天、8 天及 12 天细胞凋亡率(%)分别为( $2.78 \pm 1.04$ )、( $11.68 \pm 1.85$ )、( $26.62 \pm 1.06$ ),与对照组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );TUNEL 检测结果与上述一致,从第 4 天到第 12 天凋亡也逐渐增加。**结论** 成功建立了 EC9706  $\rho^0$  细胞。随着 EC9706 细胞 mtDNA 拷贝数量的逐渐减少,细胞凋亡率逐渐增加,表明 mtDNA 在诱导细胞凋亡中起着一定调控

作用,提示选择性地诱导食管癌细胞 mtDNA 损伤,使食管癌细胞 mtDNA 拷贝数量明显减少,进而诱导细胞凋亡,可望成为食管癌生物治疗的一个新靶点。

**关键词:**食管鳞癌;线粒体 DNA;凋亡

收稿日期:2009-7-17;修回日期:2009-10-28

作者单位:450014 郑州,郑州大学第二附属医院肿瘤科

作者简介:刘宗文(1966-),男,博士,副主任医师,主要从事消化道肿瘤的研究

中图分类号:R735.1 文献标识码:A

文章编号:1000-8578-(2010)08-0878-04

## 0 引言

线粒体作为一种重要的细胞器,参与能量产生、细胞凋亡、肿瘤的发生以及衰老等多种生理和病理过程<sup>[1]</sup>。细胞凋亡作为细胞死亡的一种特殊形式越来越受到人们的重视,尤其在肿瘤的发生及治疗中的作用,已成为当前研究的热点<sup>[2]</sup>。细胞发生凋亡受多种因素调控,其中线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 损伤可能是诸多调控因素之一<sup>[3]</sup>。mtDNA 与细胞凋亡之间的相关性已引起众多学者的关注<sup>[4]</sup>。为探讨食管癌线粒体 DNA 与凋亡的关系,本研究参考文献<sup>[5-6]</sup>,用溴化乙啶(EB)抑制人食管癌 EC9706 细胞 mtDNA 的复制,同时用荧光定量 PCR 鉴定,建立人食管癌 EC9706 细胞的无线粒体 DNA( $\rho^0$ )细胞,并采用 TUNEL 染色、流式细胞术检测细胞凋亡情况,为食管癌的线粒体靶向治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 人食管癌细胞系 EC9706 细胞株由中国医学科学院国家分子肿瘤重点实验室馈赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 高糖型 DMEM 培养液为 Gibco 公司产品;胎牛血清为 TBD 公司产品;溴化乙啶、尿嘧啶、丙酮酸及碘化丙啶(PI)为 Sigma 公司产品;mtDNA 引物由上海杰美基因医药科技有限公司合成;PCR 扩增试剂盒为上海生工生物工程技术服务有限公司产品;线粒体提取及 mtDNA 萃取试剂盒为上海杰美基因医药科技有限公司产品;原位细胞凋亡检测试剂盒为洛阳华美生物工程公司产品;流式细胞仪为德国 Partec PAS 公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的复苏及培养 从液氮中取出冻存细胞,迅速放入 37℃ 水浴 1~2 min 使之融化。吸取细胞悬液,加入适量培养液。1 000 r/min 离心 5min,弃上清液,加入培养液,重复离心 2 次。用含 10% 小牛血清的培养液适当稀释后,接种于培养瓶内,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,次日更换一次培养液。以后按常规进行培养。

1.2.2  $\rho^0$ 细胞的建立及培养 EC9706 细胞在高糖型 DMEM(葡萄糖为 4500mg/L)中生长,培养液中含有 10% FBS(已灭活)。EB 50 $\mu$ g/ml,尿嘧啶 50 $\mu$ g/ml,丙酮酸 100 $\mu$ g/ml,HEPE 25mmol/L,于

37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。2 天换液一次,3 天传代一次。

1.2.3 细胞生长曲线的绘制 将对照组和 EB 处理组细胞分别接种于 96 孔板,每 24h 消化每组 3 孔细胞,分别计数每孔细胞,计算平均值。从第 1 天开始连续测定 12 天,以培养时间为横坐标,细胞数为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.4 EC9706 细胞 mtDNA 的荧光定量 PCR 检测 用线粒体提取及 mtDNA 萃取试剂盒分别提取 EB 未处理和处理后第 4、8、12 天的 EC9706 细胞 mtDNA 并进行浓度和纯度的测定;采用荧光定量 PCR 分别检测以上各组细胞 mtDNA 拷贝数量,PCR 使用的引物为:上游引物(MT1) 5'-CAC-CCTAGCCATCATTCTAC-3',下游引物(MT2) 5'-GGGGTATGCTGTTCTGAATTC-3',扩增片段长度为 403 bp。扩增条件:95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 30 s,59℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环后,再 72℃ 继续延伸 5 min,置 4℃ 保存。反应结束后,计算样本中 mtDNA 的拷贝数,并采用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳对荧光定量 PCR 产物进行定性检测。

1.2.5 TUNEL 法染色 依照试剂盒说明分别在第 4、8、12 天对 EC9706 细胞的对照组和 EB 处理组进行 TUNEL 染色。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡情况 在第 4、8、12 天分别收集 EC9706 的未处理组和 EB 处理组细胞;调整细胞浓度为  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ /ml,取 1ml 细胞悬液,用 PBS 清洗,1 000 r/min,4℃ 离心 10 min,弃上清液,重复两次;然后用 Binding Buffer 重悬细胞,取 100  $\mu$ l 细胞悬液分别加入 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l 碘化丙啶(PI)双标记后,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,上流式细胞仪检测。以 Annexin V-FITC 单染管和 PI 单染管作为基准参照,测定每个上样管数据,利用 CellQuest 软件进行参数获取和资料分析,计算凋亡细胞百分比。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 软件处理,资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数的比较采用 *t* 检验及方差分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 EC9706 细胞生长曲线

分别对对照组和 EB 处理组进行细胞计数,绘制细胞生长曲线。结果显示,第 4 天及以后,EC9706 EB 处理组细胞生长缓慢且死亡细胞数量显著高于对照

组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

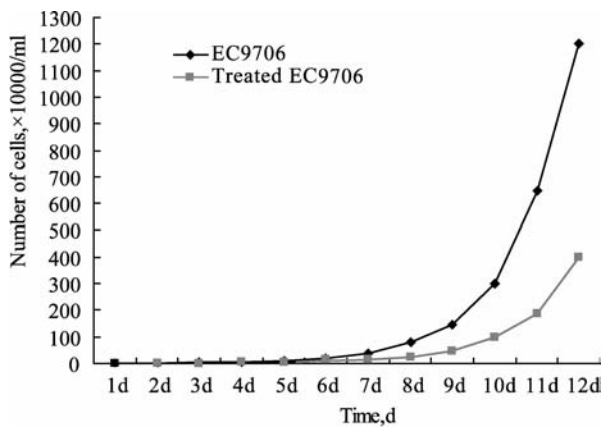
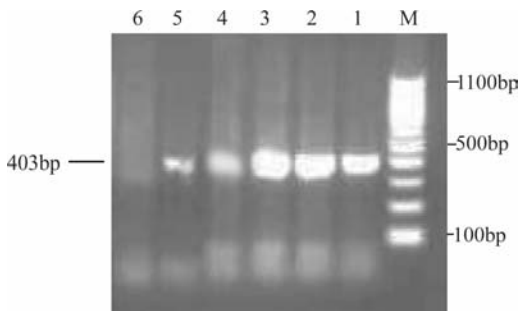


图 1 EC9706 细胞生长曲线

Figure 1 Growth curve of EC9706 cells

### 2.2 EC9706 细胞 mtDNA 拷贝数检测结果

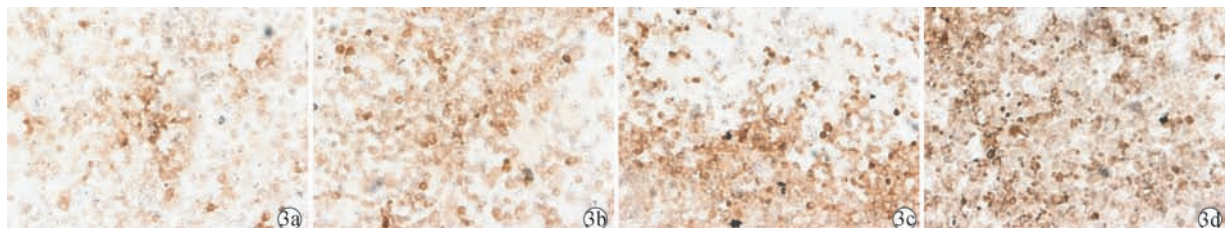
在 EC9706 细胞中加入 EB 50  $\mu\text{g/ml}$ ,通过荧光定量 PCR 检测,EB 处理第 4、8 天时,mtDNA 的 Ct 值分别为 33.56、35.25,对照组的 Ct 值为 23.85。mtDNA 拷贝数逐渐减少,到第 12 天,mtDNA 已完全丢失,荧光定量 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 2。



M:DNA marker; 1~3: The control group at 4th, 8th and 12th day respectively; 4~6: The EB-treated group at 4th, 8th and 12th day respectively

图 2 EC9706 细胞 mtDNA 分别在正常和 EB 处理后第 4、8、12d 检测结果

Figure 2 PCR products of mtDNA from normal cell line EC9706 and treated with EB at 4th, 8th and 12th day



3a: Normal cell line EC9706; 3b~3d: The EB-treated group at 4th, 8th and 12th day respectively

图 3 食管癌 EC9706 细胞株 TUNEL 染色( $\times 200$ )

Figure 3 ECSS EC9706 cell products of TUNEL stain( $\times 200$ )

### 2.3 食管癌 EC9706 细胞株 TUNEL 染色结果

TUNEL 染色结果显示,正常对照组和 EB 处理后第 4、8、12 天的 EC9706 细胞的凋亡阳性细胞数依次增加,见图 3。

### 2.4 流式细胞术检测结果

EC9706 细胞 EB 处理后第 4、8 及 12 天细胞凋亡率逐渐增高,与对照组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 EC9706 流式细胞术检测结果

Table 1 The results of EC9706 tested by flow cytometry

Group	4d	8d	12d	F	P
Control	0.71 ± 0.26	1.78 ± 0.85	7.38 ± 0.68	91.935	<0.05
EB treated	2.78 ± 1.04	11.68 ± 1.85	26.62 ± 1.06	232.782	<0.05
t	11.228	71.34	695.00		
P	<0.05	<0.05	<0.05		

### 3 讨论

mtDNA 是核外唯一的遗传物质,有关 mtDNA 在肿瘤发生发展中的作用日益受到关注<sup>[7]</sup>。目前的研究表明,mtDNA 的异常与人类多种肿瘤关系密切<sup>[8]</sup>。对 mtDNA 功能异常或缺陷发生的分子机制的研究可以进一步阐明这些疾病的病因、mtDNA 的表达调节、nDNA 与 mtDNA 相互作用的机制,并为治疗提供理论指导。为达到上述目的,有必要建立一个特殊的细胞模型,能将肿瘤细胞的线粒体从一个细胞环境移向另一个,或者引入新的基因进入线粒体,这就是无线粒体 DNA 的细胞系,即 rho( $\rho^0$ )细胞<sup>[9-10]</sup>。本实验结果发现在 EB 的存在下,随着细胞分裂,细胞株 mtDNA 拷贝数进行性减少,直到 12 天时 mtDNA 完全丢失。

目前各种方式的真核细胞核 DNA 转基因系统极大地促进了核基因表达及调控机制的研究<sup>[11]</sup>,但线粒体内缺乏类似的转基因模型,阻碍了对哺乳动物细胞线粒体基因组复制与表达的深入研究。转线粒体细胞系的研究部分弥补了这种缺陷。所谓转线粒体细胞系,是指全部的 mtDNA 被外源的 mtDNA

所替换而核基因组保持不变的细胞系<sup>[12]</sup>。而  $\rho^0$  细胞的构建是转线粒体细胞系建立的首要环节,本实验首次成功构建了人食管癌 EC9706 细胞的  $\rho^0$  细胞,为进一步研究线粒体与食管癌的关系奠定了基础。

细胞凋亡受基因调控,也与细胞识别和信号转导有关。由于 mtDNA 与体内能量代谢直接相关,若 mtDNA 损伤,可导致 ATP 合成减少,引发细胞衰老甚至死亡,因此 mtDNA 损伤是细胞发生凋亡或坏死的诸多调控因素之一。目前,食管癌 mtDNA 与细胞凋亡的关系国内外尚未见报道。本实验在 EC9706 细胞中加入 50 $\mu$ g/ml EB,通过荧光定量 PCR 鉴定,结果在 EB 处理第 4、8 天时,mtDNA 拷贝数逐渐减少,到第 12 天 mtDNA 完全丢失。在检测 mtDNA 拷贝数量的同时,进行了 TUNEL 染色,结果发现在第 4、8、12 天时,凋亡细胞进行性增加,与对照组相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),并且随着 mtDNA 拷贝数量的减少,细胞的凋亡率逐渐增加,两者之间存在负相关关系。Dali-Youcef N 等<sup>[13]</sup>也提出 mtDNA 的转录水平增高可以造成细胞凋亡降低可能与其致癌有关。这些结果均提示线粒体在细胞凋亡中起着中心调控作用。

肿瘤细胞对许多抗癌药物的耐受性是通过细胞凋亡的抵抗而获得的。线粒体被认为是细胞凋亡程序中的“gatekeeper”,因此,可以以线粒体为选择性作用靶点刺激细胞凋亡程序而达到抗肿瘤目的。Pelicano 等<sup>[14]</sup>用 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 和鱼藤酮(可以抑制细胞线粒体呼吸,增加自由基的产生)处理白血病细胞后,继续在高氧环境下培养时发现,白血病细胞的凋亡率明显提高。Uchida 等<sup>[15]</sup>用莫法罗汀处理乳腺癌细胞系 ZR-75-I 和 MCF-7,也发现了 mtDNA 编码 ND1 基因的下调表达,提示化疗药物可能通过抑制 mtDNA 的转录水平达到抑制癌细胞增殖的目的。本研究与上述诸多学者的结果具有某种一致性,抑制食管癌细胞 mtDNA 的复制可促进细胞凋亡从而达到抑制细胞增殖的目的,我们有可能通过特异性降低癌细胞的 mtDNA 来治疗肿瘤,这为食管癌的治疗提供了新的思路。

参考文献:

[1] Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondri-

al conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling [J]. Trends Pharmacol Sci, 2004, 25(5): 259-264.

[2] Zhang D, Mott JL, Farrar P, et al. Mitochondrial DNA mutations activate the mitochondrial apoptotic pathway and cause dilated cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(1): 147-157.

[3] 李超,伏圣博,刘华玲,等. 细胞凋亡研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 2007, 29(3): 45-53.

[4] Geromel V, Kadhom N, Cebalos-Picot I, et al. Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts Harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA [J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(11): 1221-1228.

[5] 戴纪刚, 闵家新, 张国强, 等. 线粒体 DNA 缺失细胞系的建立 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(6): 570-571.

[6] 张国桥, 凌贤龙, 陈正堂. 人线粒体 DNA 缺失肝癌细胞株建立 [J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(1): 127-130.

[7] Eaton JS, Lin ZP, Sartorelli AC, et al. Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis [J]. J Clin Invest, 2007, 117(9): 2723-2734.

[8] Penta JS, Johnson FM, Wschsman JT, et al. Mitochondrial DNA in human malignancy [J]. Mutat Res, 2001, 488(2): 119-133.

[9] Delsite R, Kachhap S, Anbazhagann R, et al. Nuclear geninvolved in mitochondrial-to-nucleus communication in breacancer cells [J]. Mol Cancer, 2002, 1(1): 6-18.

[10] Jannifer SC, Peng H. Mitochondrial defects in cancer [J]. Mol Cancer, 2002, 1(1): 9-28.

[11] Armand R, Channon JY, Kintner J, et al. The effects of ethidium bromide induced loss of mitochondrial DNA on mitochondrial phenotype and ultrastructure in a human leukemia T-cell line (MOLT-4 cells) [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 196(1): 68-79.

[12] Kirches E, Krause G, Kirches MW, et al. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples [J]. Int J Cancer, 2001, 93(4): 534-538.

[13] Dali-Youcef N, Matakis C, Coste A, et al. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(25): 10703-10708.

[14] Pelicano H, Xu RH, Du M, et al. Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism [J]. J Cell Biol, 2006, 175(6): 913-923.

[15] Uchida T, Inagaki N, Furuichi Y, et al. Down-regulation of mitochondrial gene expression by the anti-tumor arotinoid mofarotene (Ro 40-8757) [J]. Int J Cancer, 1994, 58(6): 891-897.

[编辑校对: 杨 卉]