

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.01.006

· 基础研究 ·

## 线粒体融合蛋白-2 基因增强人乳腺癌 T47D 细胞对小白菊内酯的敏感性

邱梅清<sup>1</sup>, 佟仲生<sup>1</sup>, 贾勇圣<sup>1</sup>, 刘晓东<sup>1</sup>, 陈悦<sup>2</sup> (1. 天津医科大学 附属肿瘤医院 乳腺内科, 教育部乳腺癌防治重点实验室, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060; 2. 南开大学 药学院, 天津 300071)

**[摘要]** **目的:**探讨线粒体融合蛋白-2(mitofusin-2, *Mfn-2*)基因表达对人乳腺癌 T47D 细胞对小白菊内酯敏感性的影响。**方法:**Real-time PCR 检测不同乳腺癌细胞系(T47D、MDA-MB-231、MCF-7、MDA-MB-435 及 HCC38)中 *Mfn-2* mRNA 的表达。Lipofectamine™ 2000 体外转染 pEGFP 和 pEGFP-*Mfn-2* 质粒至人乳腺癌 T47D 细胞, real-time PCR 和 Western blotting 检测 T47D 细胞中 *Mfn-2* mRNA 和蛋白的表达, MTT 法检测 T47D 细胞的增殖, 流式细胞术检测 T47D 细胞凋亡率及线粒体膜电位。**结果:**与正常乳腺细胞相比, *Mfn-2* mRNA 在乳腺癌 HCC38 细胞系中高表达, 在 T47D 等其他细胞系中均低表达。pEGFP-*Mfn-2* 转染 48 h 后, T47D 细胞中 *Mfn-2* mRNA 和蛋白的表达均明显上调。与 pEGFP 转染组相比, pEGFP-*Mfn-2* 转染组 T47D 细胞在小白菊内酯(0.05 mol/L)作用下的存活率明显降低[(47.93 ± 2.21)% vs (56.93 ± 2.05)% ,  $P < 0.05$ ]。流式细胞术检测结果显示: 50 mmol/L 小白菊内酯作用下, pEGFP-*Mfn-2* 转染组与 pEGFP 转染组相比, T47D 细胞凋亡率升高[(71.2 ± 2.1)% vs (38.8 ± 2.6)% ,  $P < 0.05$ ], 而线粒体膜电位明显降低[(1.6 ± 0.1)% vs (5.0 ± 0.5)% ,  $P < 0.05$ ]。**结论:**pEGFP-*Mfn-2* 转染可增强 T47D 细胞对小白菊内酯的敏感性。

**[关键词]** 乳腺癌; T47D 细胞; 线粒体融合蛋白-2; 小白菊内酯; 敏感性

**[中图分类号]** R737.9; R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)01-0037-06

## Mitofusin-2 gene enhances sensitivity of human breast cancer T47D cells to parthenolide

Qiu Meiqing<sup>1</sup>, Tong Zhongsheng<sup>1</sup>, Jia Yongsheng<sup>1</sup>, Liu Xiaodong<sup>1</sup>, Chen Yue<sup>2</sup> (1. Department of Breast Oncology & Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy of Ministry of Education & Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Affiliated Tumor Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 2. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of mitofusin-2 (*Mfn-2*) gene expression on sensitivity of human breast cancer T47D cells to parthenolide. **Methods:** The expressions of *Mfn-2* mRNA in various breast cancer cell lines (T47D, MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-435 and HCC38) were detected by real-time PCR. Plasmids pEGFP and pEGFP-*Mfn-2* were transfected into human breast cancer T47D cells by Lipofectamine™ 2000 *in vitro*. The expression levels of *Mfn-2* mRNA and protein in T47D cells were detected by real-time PCR and Western blotting. MTT assay was used to detect the proliferation of T47D cells. The cell apoptotic rate and mitochondrial membrane potential of T47D cells were measured by flow cytometry. **Results:** Compared with that in normal breast cells, *Mfn-2* mRNA was highly expressed in breast cancer HCC38 cell line, and lowly expressed in the other cell lines, such as T47D etc. After pEGFP-*Mfn-2* transfection for 48 h, the expression levels of *Mfn-2* mRNA and protein were significantly up-regulated in T47D cells. Compared with the pEGFP transfection group, the pEGFP-*Mfn-2* transfection group showed a significant decrease in survival rate of T47D cells under the treatment of parthenolide (50 mmol/L) [(47.93 ± 2.21)% vs (56.93 ± 2.05)% ,  $P < 0.05$ ]. Flow cytometry results showed that the apoptotic rate of T47D cells under the treatment of 0.05 mol/L parthenolide was significantly in-

**[基金项目]** 天津市自然科学基金资助项目(No. 10JCYBJC11500)。Project supported by the Natural Science Foundation of Tianjin(No. 10JCYBJC1150)

**[作者简介]** 邱梅清(1989-),女,山东省枣庄市人,硕士生,主要从事肿瘤分子药理学方面的研究。E-mail: ashoeg@163.com

**[通信作者]** 佟仲生(Tong Zhongsheng, corresponding author), E-mail: tonghang@medmail.com.cn

**[网络出版]** http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130116.0826.003.html

creased in pEGFP-Mfn-2 transfection group compared with that in pEGFP transfection group ( $[71.2 \pm 2.1] \%$  vs  $[38.8 \pm 2.6] \%$ ,  $P < 0.05$ ). However, the mitochondrial membrane potential was significantly decreased in the pEGFP-Mfn-2 transfection group ( $[1.6 \pm 0.1] \%$  vs  $[5.0 \pm 0.5] \%$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** pEGFP-Mfn-2 transfection can enhance the sensitivity of T47D cells to parthenolide.

[ **Key words** ] breast cancer; T47D cell; mitofusin-2; parthenolide; sensitivity

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(1): 37-42 ]

小白菊内酯(parthenolide)是从菊科类植物中提取的倍半萜内酯。Liu 等<sup>[1-3]</sup>研究发现,小白菊内酯可抑制肺癌、肝癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞增殖,并可诱导细胞凋亡。研究<sup>[4-5]</sup>显示,小白菊内酯诱导肿瘤细胞凋亡的作用与抑制核因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)活化、促进活性氧簇形成,以及抑制线粒体功能有关,提示线粒体很可能是小白菊内酯作用的重要靶器官之一。线粒体融合蛋白-2(mitofusin-2, *Mfn-2*)基因是 Chen 等<sup>[6]</sup>利用 mRNA 差异显示技术发现的一个新基因,研究<sup>[7-8]</sup>证实其在维持线粒体融合、线粒体形态、新陈代谢等方面发挥重要作用。目前认为线粒体融合与抗肿瘤药物的敏感性密切相关,因此推测 *Mfn-2* 可能影响小白菊内酯抗肿瘤作用的发挥。另外,小白菊内酯对乳腺癌的作用尚未见报道。本研究拟探讨 *Mfn-2* 基因对小白菊内酯治疗乳腺癌疗效的影响及其相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

人乳腺癌细胞株 T47D、MDA-MB-231、MCF-7、HCC38、MDA-MB-435 及正常乳腺细胞系 MCF-10a 由本实验室保存。胎牛血清、改良型 RPMI 1640 培养基等购自美国 Gibco 公司,real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,TRIzol RNA 抽提试剂、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购自 Invitrogen 公司,*Mfn-2* 抗体、MTT 试剂盒购自美国 Sigma 公司,Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自 BD 公司,线粒体荧光探针 MitoTracker RED 购自上海杰美生物公司。重组真核表达质粒 pEGFP、pEGFP-Mfn-2 由中国科学院动物所陈侗教授惠赠,PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。小白菊内酯由南开大学药学院合成。

### 1.2 pEGFP-Mfn-2 质粒转染 T47D 细胞

取对数生长期 T47D 细胞  $6 \times 10^5$  个接种于 6 孔培养板,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱过夜,至汇合度 60%~70% 时,每孔分别加 pEGFP、pEGFP-Mfn-2 质粒 4  $\mu$ g 及 10  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000,无血清培养基培养 6 h 后更换完全培养基,转染 48 h 后收集 T47D 细胞,荧光显微镜检测荧光强度,并计算转染效率。

### 1.3 Real-time PCR 检测 T47D 细胞中 *Mfn-2* mRNA 的表达

消化收集转染 pEGFP 和 pEGFP-Mfn-2 质粒的 T47D 细胞,按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA。按 TaKaRa 试剂盒操作说明逆转录 cDNA,根据 GenBank 中 *Mfn-2* 的序列设计一对特异性引物:5'-CATGGGCATTCTTGTGTTG-3',5'-TGGAGCCAGTGTAGCTGATG-3'。按照 TaKaRa 公司 SYBR real-time PCR 试剂盒说明书扩增 *Mfn-2* 基因片段,反应条件:95 °C、30 s 预变性后,95 °C 5 s、60 °C 34 s、72 °C 30 s,共 40 个循环;72 °C 10 min,4 °C 保存。以  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  值表示 *Mfn-2* mRNA 的表达量。

### 1.4 Western blotting 检测 T47D 细胞中 *Mfn-2* 蛋白的表达

取 30 g 细胞裂解液与上样缓冲液混合,煮沸 10 min 后上样,行 SDS-PAGE;电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。*Mfn-2* 一抗稀释度为 1:500,室温孵育 2 h;二抗稀释度为 1:2000,室温孵育 2 h,用 ECL 化学发光试剂盒处理并暗室显影。以  $\beta$ -actin 为内参照。运用 Quantitative one 软件进行图像分析,以 *Mfn-2* 蛋白条带与  $\beta$ -actin 条带密度积分的比值表示其蛋白水平。

### 1.5 MTT 法检测转染 pEGFP-Mfn-2 质粒对 T47D 细胞增殖的影响

取对数生长期 T47D 细胞接种 6 孔板,按照上述方法分 pEGFP 转染组和 pEGFP-Mfn-2 质粒组。转染后 48 h,按  $5 \times 10^3$ /孔细胞数接种 96 孔板,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱过夜培养。加入小白菊内酯,工作浓度为 0、6.25、12.5、25、50、100 mmol/L。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 h,每孔加 5 mg/ml MTT 20  $\mu$ l,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h,弃培养基,每孔加 DMSO 150  $\mu$ l,充分振荡 10 min。在全自动酶标仪上检测 490 nm 波长处光密度值( $D$ 值),细胞增殖抑制率( $\%$ ) =  $(1 - D_{\text{实验组}}/D_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

### 1.6 Annexin-V/PI 双标法检测 T47D 细胞的凋亡

pEGFP、pEGFP-Mfn-2 组 T47D 细胞分别加终浓度为 50 mmol/L 的小白菊内酯,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>

培养箱孵育 48 h 后收集细胞,预冷 PBS 洗涤细胞,离心后再悬浮于 100  $\mu$ l 缓冲液中,加 5  $\mu$ l Annexin V 和 5  $\mu$ l PI,避光保存 15 min,加入 400  $\mu$ l 的缓冲液,流式细胞术检测 T47D 细胞凋亡率,Cell Quest 软件分析。每组实验重复 3 次。

### 1.7 线粒体荧光探针 MitoTracker RED 染色法检测 T47D 细胞线粒体膜电位

pEGFP、pEGFP-Mfn-2 组 T47D 细胞分别加入终浓度为 50 mmol/L 的小白菊内酯,置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 48 h 后收集细胞,预冷 PBS 洗涤细胞,加入终质量浓度为 10  $\mu$ g/ml 的线粒体探针 MitoTracker RED,避光孵育 30 min,PBS 洗 3 遍后进行流式细胞仪检测,激发波长分别为 579 nm 和 599 nm,流式细胞术检测线粒体膜电位。

### 1.8 统计学处理

实验数据采用 SPSS16.0 统计软件,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人乳腺癌细胞系中 Mfn-2 mRNA 的表达

Real-time PCR 结果(图 1)显示:与正常乳腺细胞 MCF-10a 相比,Mfn-2 mRNA 在人乳腺癌 T47D、MDA-MB-231、MCF-7 及 MDA-MB-435 细胞中呈低表达[(0.50  $\pm$  0.06)、(0.15  $\pm$  0.01)、(0.14  $\pm$  0.01)、(0.06  $\pm$  0.01) vs (1.0  $\pm$  0.05)],均  $P < 0.05$ 。与正常乳腺细胞 MCF-10a 相比,人乳腺癌 HCC38 细胞株高表达 Mfn-2 mRNA [(8.82  $\pm$  0.26) vs (1.0  $\pm$  0.05)], $P < 0.01$ 。由此可见,Mfn-2 在大部分乳腺癌细胞株中呈低表达,选择其中 Mfn-2 低表达的乳腺癌细胞株 T47D 作为研究对象。

### 2.2 pEGFP-Mfn-2 高效转染 T47D 细胞

pEGFP-Mfn-2 转染 T47D 细胞 48 h 后,倒置显微镜下观察 T47D 细胞的形态结构(图 2A),同时荧光显微镜下观察 T47D 细胞中 pEGFP 的表达(图 2B),结果显示,pEGFP-Mfn-2 可高效转染 T47D 细胞,转染效率为(78.0  $\pm$  6.8)%。

### 2.3 pEGFP-Mfn-2 转染上调 T47D 细胞中 Mfn-2 mRNA 的表达

Real-time PCR 检测结果显示,未转染对照组 T47D 细胞中 Mfn-2 mRNA 的表达为(0.48  $\pm$  0.07),转染 pEGFP 对照质粒组 T47D 细胞中 Mfn-2 mRNA 的表达为(0.50  $\pm$  0.06),pEGFP-Mfn-2 质粒转染组 T47D 细胞中 Mfn-2 mRNA 的表达为(946  $\pm$  41.72)。结果提示,转染 pEGFP-Mfn-2 可明显上调 T47D 细

胞中 Mfn-2 mRNA 的表达水平。

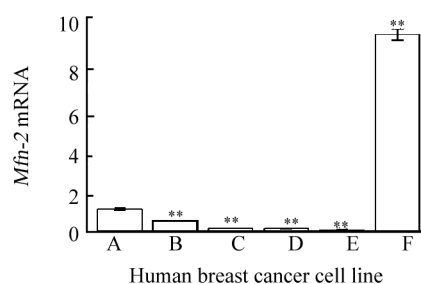


图 1 人乳腺癌细胞系 Mfn-2 mRNA 的表达

Fig.1 Expression of Mfn-2 mRNA in human breast cancer cell lines

A: Control (MCF-10a); B: T47D; C: MDA-MB-231;

D: MCF-7; E: MDA-MB-435; F: HCC38

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

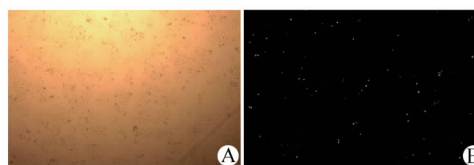


图 2 pEGFP-Mfn-2 高效转染 T47D 细胞( $\times 40$ )

Fig.2 pEGFP-Mfn-2 high efficiently transfected into T47D cells ( $\times 40$ )

A: Light microscope; B: Fluorescence microscope

### 2.4 pEGFP-Mfn-2 转染上调 T47D 细胞 Mfn-2 蛋白的表达

Western blotting 检测结果显示,与转染 pEGFP 相比,转染 pEGFP-Mfn-2 可明显提高 T47D 细胞中 Mfn-2 蛋白的表达(图 3),由此可见,pEGFP-Mfn-2 转染至 T47D 细胞可以提高 Mfn-2 蛋白的表达。

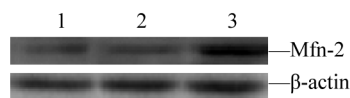


图 3 pEGFP-Mfn-2 转染后 T47D 细胞 Mfn-2 蛋白表达增加

Fig.3 Mfn-2 protein expression increased in T47D cells after pEGFP-Mfn-2 transfection

1: Untreated; 2: pEGFP; 3: pEGFP-Mfn-2

### 2.5 pEGFP-Mfn-2 转染增强小白菊内酯对 T47D 细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测结果(图 4)显示,小白菊内酯单独处理组,随着其工作浓度的不断增加,T47D 细胞生

存率明显下降( $r = 0.971, P = 0.006$ )。小白菊内酯组的  $IC_{50}$  为 72 mmol/L, 故选取 50 mmol/L 为后续实验给药浓度。pEGFP-Mfn-2 转染 48 h 后, 与 pEGFP 组相比, 在 50 mmol/L 小白菊内酯下, T47D 细胞的存活率显著降低[ $(47.93 \pm 2.21)\% vs (56.93 \pm 2.05)\%$ ,  $P < 0.05$ ]; 且随着小白菊内酯浓度的增加, pEGFP-Mfn-2 转染组 T47D 细胞的存活率明显下降, 呈现浓度依赖性( $r = 0.948, P = 0.004$ )。由此可见, 小白菊内酯单独处理可降低 T47D 细胞存活率, 并具有浓度依赖性; pEGFP-Mfn-2 转染后导致小白菊内酯对 T47D 细胞的增殖抑制作用更为明显。

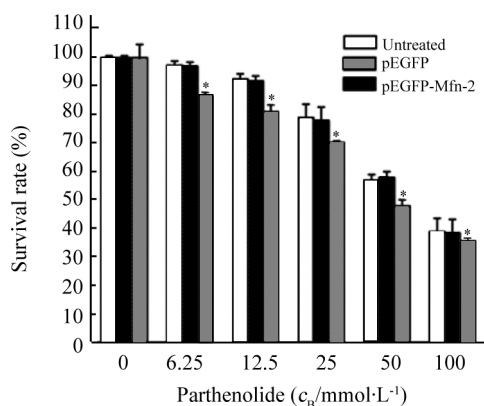


图 4 pEGFP-Mfn-2 转染增强小白菊内酯对 T47D 细胞增殖的抑制作用

Fig. 4 pEGFP-Mfn-2 transfection enhanced inhibition of parthenolide on T47D cells

\*  $P < 0.05 vs pEGFP$  group

### 2.6 pEGFP-Mfn-2 转染促进小白菊内酯对 T47D 细胞凋亡的诱导作用

流式细胞术检测结果(图 5)显示, 50 mmol/L 小白菊内酯处理下, pEGFP 转染组 T47D 细胞开始出现早期凋亡, pEGFP-Mfn-2 转染组细胞出现晚期凋亡和坏死, 并以晚期凋亡为主。pEGFP-Mfn-2 转染组与 pEGFP 转染组相比, 细胞凋亡率升高[ $(71.2 \pm 2.1)\% vs (38.8 \pm 2.6)\%$ ,  $P < 0.05$ ]。结果显示, 50 mmol/L 小白菊内酯可诱导乳腺癌 T47D 细胞凋亡, pEGFP-Mfn-2 转染使小白菊内酯对细胞的致凋亡作用更为明显。

### 2.7 pEGFP-Mfn-2 转染增强小白菊内酯对 T47D 细胞线粒体膜电位的降低作用

流式细胞术结果(图 6)显示: 50 mmol/L 小白菊内酯处理下, 与未处理组相比, pEGFP 组可明显降低 T47D 细胞线粒体膜电位[ $(5.0 \pm 0.5)\% vs (18.1 \pm 1.7)\%$ ,  $P < 0.05$ ]; 与 pEGFP 组比较,

pEGFP-Mfn-2 转染组 T47D 细胞线粒体膜电位降低更加显著[ $(1.6 \pm 0.1)\% vs (5.0 \pm 0.5)\%$ ,  $P < 0.05$ ]。提示 pEGFP-Mfn-2 转染可能通过降低线粒体膜电位增强 T47D 细胞对小白菊内酯的敏感性。

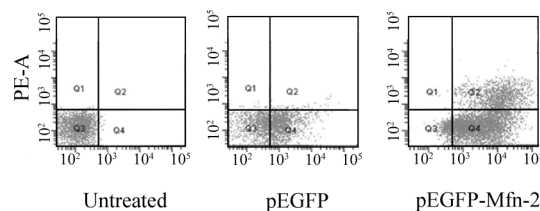


图 5 pEGFP-Mfn-2 转染增强小白菊内酯对 T47D 细胞的致凋亡作用

Fig. 5 pEGFP-Mfn-2 transfection enhanced the apoptotic effect of parthenolide on T47D cells

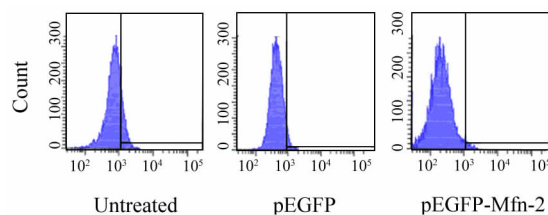


图 6 pEGFP-Mfn-2 转染增强小白菊内酯诱导的 T47D 细胞线粒体膜电位降低

Fig. 6 pEGFP-Mfn-2 transfection enhanced decrease of mitochondrial membrane potential in T47D cells induced by parthenolide

## 3 讨论

小白菊内酯可抑制肺癌、肝癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞的增殖, 并诱导其凋亡<sup>[6-8]</sup>。而对乳腺癌细胞小白菊内酯能否发挥抗肿瘤的活性, 目前尚未见报道。本研究结果显示, 小白菊内酯对乳腺癌 T47D 细胞的增殖有明显抑制作用, 而且可明显诱导 T47D 细胞的凋亡。研究<sup>[9-11]</sup>显示, 小白菊内酯抗肿瘤机制可能主要是通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活性, 从而显著地降低 Bcl-2 蛋白表达水平, 导致 Bcl-2/Bax 的比值下降, 致使线粒体功能紊乱, 最终促进细胞凋亡。本研究结果同样显示, 小白菊内酯可明显降低线粒体膜电位。这些结果提示, 小白菊内酯可能通过线粒体凋亡通路诱导细胞凋亡。

Mfn-2 是应用差异显示方法克隆得到的一种作用于线粒体外膜的增殖抑制基因, 对调节线粒体的融合、形态和功能有着重要的作用<sup>[3,12]</sup>。该基因定

位于人的染色体 1p36.22 位置上,此区域为许多肿瘤的突变高发区,肿瘤患者染色体的这一区带会出现缺失或易位<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,*Mfn-2* 在正常乳腺细胞中高表达,而在大部分乳腺癌细胞系中是低表达的,这一结果与中国学者<sup>[14]</sup>的研究结果基本一致;他们发现 *Mfn-2* 在正常乳腺组织及骨骼肌组织中较高表达,而在乳腺癌组织中低表达。

研究<sup>[15-16]</sup>显示,*Mfn-2* 是 *P53* 抑癌基因调控的靶基因,*Mfn-2* 可通过介导线粒体凋亡通路,上调 Bax 凋亡蛋白的表达。Wang 等<sup>[17]</sup>进行的 *Mfn-2* 对肝癌细胞系增殖的研究也证实了这一结果。同时 *Mfn-2* 蛋白在线粒体外膜和内质网都有丰富的表达,不仅调控着线粒体的形态和功能,而且调节着内质网的应激和内质网  $Ca^{2+}$  的释放<sup>[18-19]</sup>。这些可能与 *Mfn-2* 蛋白抑制癌细胞增殖和诱导凋亡密切相关,*Mfn-2* 自身可通过改变线粒体形态及膜电位,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。而过表达 *Mfn-2* 能否增加化疗药物的抗肿瘤活性,目前尚在初步研究阶段。

Xia 等<sup>[14,20]</sup>的研究表明,外源性 *Mfn-2* 可使细胞周期停滞在 S 期,从而增强肿瘤细胞对化疗药物放线菌酮的敏感性,提示 *Mfn-2* 可增加细胞对化疗药物的敏感性。研究还显示,外源性 *Mfn-2* 基因转染联合氟尿嘧啶可增强对肝癌细胞增殖的抑制作用,阻滞细胞周期于  $G_0/G_1$  期。本研究也得出相似的结果,*Mfn-2* 转染可增强小白菊内酯抑制 T47D 细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用,其机制可能与降低线粒体膜电位有关。

线粒体是细胞的动力工厂,参与细胞能量代谢、氧化代谢、酶活性的调节,同时线粒体是调控细胞内凋亡信号通路的重要细胞器,线粒体膜的通透性和跨膜电位的改变与凋亡密切相关。线粒体在进行电子呼吸链传递时,质子从线粒体内膜基质侧泵到内膜外,从而造成跨膜电位差。这种跨膜电位差与线粒体正常形态和功能的维持密切相关。目前研究<sup>[21-22]</sup>证实,线粒体膜电位的下降是细胞开始凋亡的重要标志,提示细胞通过线粒体介导的凋亡通路发生凋亡。本研究通过流式细胞术检测各组 T47D 细胞线粒体膜电位的变化,发现小白菊内酯处理均可明显降低线粒体膜电位,转染 pEGFP-*Mfn-2* 可进一步降低线粒体膜电位。本研究结果提示,小白菊内酯可能通过线粒体介导的凋亡通路诱导细胞凋亡,*Mfn-2* 可以明显降低线粒体膜电位,提示其将来可作为化疗增敏的靶点。

综上所述,小白菊内酯可明显抑制乳腺癌 T47D

细胞的增殖,*Mfn-2* 可显著增强小白菊内酯的抗肿瘤活性,其机制可能是通过线粒体介导的凋亡通路诱导细胞凋亡,该结果为小白菊内酯的抗肿瘤分子机制提供了新的线索,但仍需进一步深入研究。

## [参考文献]

- [1] Liu JW, Cai MX, Xin Y, et al. Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro* [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29(1): 108-114.
- [2] Park JH, Liu L, Kim IH, et al. Identification of the genes involved in enhanced fenretinide-induced apoptosis by parthenolide in human hepatoma cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2804-2814.
- [3] Shanmugam R, Kusumanchi P, Cheng L, et al. A water-soluble parthenolide analogue suppresses *in vivo* prostate cancer growth by targeting [J]. *Prostate*, 2010, 70(10):1074-1086.
- [4] Sohma I, Fujiwara Y, Sugita Y, et al. Parthenolide, an NF- $\kappa$ B inhibitor, suppresses tumor growth and enhances response to chemotherapy in gastric cancer [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2010, 8(1): 39-47.
- [5] Parada-turska J, Paduch R, Majdan M, et al. Antiproliferative activity of parthenolide against three human cancer cell lines and human umbilical vein endothelial cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59(2): 233-237.
- [6] Chen KH, Guo X, Ma D, et al. Dysregulation of HSC triggers vascular proliferative disorders [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(9): 872-883.
- [7] Huang P, Yu T, Yoon Y. Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein *Mfn2* causes mitochondrial dysfunction and cell death [J]. *Eur J Cell Biol*, 2007, 86(6): 289-302.
- [8] Zorzano A, Liesa M, Sebastian D, et al. Mitochondrial fusion proteins: Dual regulators of morphology and metabolism [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, 21(6): 566-574.
- [9] Zhang S, Ong CN, Shen HM. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2004, 211(2): 175-188.
- [10] Hayashi S, Koshihara K, Hatashita M, et al. Thermosensitization and induction of apoptosis or cell-cycle arrest via the MAPK cascade by parthenolide, an NF- $\kappa$ B inhibitor, in human prostate cancer androgen-independent cell lines [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 28(6): 1033-1042.
- [11] Yeo AT, Porco JA Jr, Gilmore TD. Bcl-XL, but not Bcl-2, can protect human B-lymphoma cell lines from parthenolide-induced apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2010, 318(1): 53-60.
- [12] Eura Y, Ishihara N, Oka T, et al. Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (*Mfn*) protein function [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(23): 4913-4925.
- [13] Hogarty MD, Maris JM, White PS, et al. Analysis of genomic imprinting at 1p35-36 in neuroblastoma [J]. *Med Pediatr Oncol*, 2001, 36(1): 52-55.
- [14] 夏耘, 吴亚群, 张林, 等. 线粒体融合素基因-2 对人乳腺癌

- MCF-7 细胞株增殖与化疗敏感性的影响 [ J ]. 2007, 26( 8 ): 815-819.
- [ 15 ] Wang W, Lu J, Zhu F, et al. Pro-apoptotic and anti-proliferative effects of mitofusin-2 via Bax signaling in hepatocellular carcinoma cells [ J ]. *Med Oncol*, 2011, 29( 1 ): 70-76.
- [ 16 ] Wang W, Cheng X, Lu J, et al. Mitofusin-2 is a novel direct target of p53 [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 400( 4 ): 587-592.
- [ 17 ] Wang W, Zhou D, Wei J, et al. Hepatitis B virus X protein inhibits p53-mediated upregulation of mitofusin-2 in hepatocellular carcinoma cells [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 421( 2 ): 355-360.
- [ 18 ] De Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria [ J ]. *Nature*, 2008, 456( 7222 ): 605-610.
- [ 19 ] Ngoh GA, Papanicolaou KN, Walsh K. Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress [ J ]. *J Biol Chem*, 2012, 287( 24 ): 20321-20332.
- [ 20 ] 夏耘, 吴亚群, 郑启昌, 等. 线粒体融合素基因-2 对乳腺癌细胞凋亡的影响 [ J ]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29( 9 ): 653-656.
- [ 21 ] Troiano L, Ferraresi R, Lugli E, et al. Multiparametric analysis of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis by polychromatic flow cytometry [ J ]. *Nat Protoc*, 2007, 2( 11 ): 2719-2727.
- [ 22 ] Dussmann H, Rehm M, Kogel D, et al. Outer mitochondrial membrane permeabilization during apoptosis triggers caspase-independent mitochondrial and caspase-dependent plasma membrane potential depolarization: A single-cell analysis [ J ]. *J Cell Sci*, 2003, 116( 3 ): 525-536.
- [ 收稿日期 ] 2012 - 10 - 25 [ 修回日期 ] 2012 - 12 - 20
- [ 本文编辑 ] 周玲琳

## · 科技动态 ·

## 树突状细胞中 A20 的表达参与机体免疫稳态的维持

树突状细胞(dendritic cell, DC)是机体内主要的抗原提呈细胞,可通过其相关受体,如 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)感知外界病原微生物的刺激,从而激活下游免疫反应。由于共栖菌及宿主自身表达的 TLR 配体亦可激活炎症反应信号通路,因此宿主细胞,如 DC 有可能在静息稳态接触此类活化性配体,基于此,论文作者推测在静息稳态下,细胞内亦有某些蛋白参与控制 DC 的活化及免疫稳态的维持。

A20 是一种经典的免疫负向调控蛋白,可通过去泛素化及 E3 泛素连接酶功能参与调控转录因子 NF- $\kappa$ B 的活化。A20 缺陷(A20<sup>-/-</sup>)小鼠自发产生严重的炎症疾病,并于围产期致死。此外,在人类中,单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism, SNP)分析发现,人 A20 基因与多种人类自身免疫病,如系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等的发生发展密切相关,提示 A20 参与了人类自身免疫稳态的维持,然而 A20 的负向调控功能主要是在免疫应激和感染的条件下研究的,其是否参与了静息状态下 DC 的活化及稳态的维持尚未明确。

论文作者构建了 CD11c 阳性细胞特异性敲除 A20 的缺陷小鼠,研究 DC 中表达的 A20 对静息状态下机体的调控作用。作者发现在 DC 特异性 A20<sup>-/-</sup>小鼠中,经典 DC(conventional DC, cDC)和浆细胞 DC(plasmacytoid DC, pDC)的比例均没有明显改变,说明 A20 对于 DC 的发育并非必需;但在静息状态下,缺陷小鼠中 DC 处于比野生型小鼠更为活化的状态,表现为高表达共刺激分子 CD80 和 CD40。体内实验表明,此敲除小鼠有明显的脾和淋巴结肿大,脾和淋巴结中单核细胞过度募集,且活化的 A20<sup>-/-</sup>DC 诱导更多的炎症反应,说明 DC 中表达的 A20 可以抑制 DC 的过度活化,并可控制 DC 产生的炎症细胞因子,如 IL-6 等,从而维持髓系细胞的稳态;另一方面,作者发现,DC 中表达的 A20 同样参与了 T 细胞稳态的维持,表现为 A20<sup>-/-</sup>DC 可以诱导 T 细胞的过度活化和增殖。作者进而对这些现象进行了机制探讨,发现 DC 中表达的 A20 可分别通过 MyD88 依赖或非依赖的途径调控炎症细胞因子(IL-6 等)或共刺激分子(CD80 等)的表达,从而分别调控 T 细胞的增殖和活化。DC 中 A20 表达缺失与自身免疫病,如炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)及伴随的骨性关节炎的发生密切相关;A20<sup>-/-</sup>小鼠在 5 个月时便会 100% 自发肠炎,且伴随有强直性关节炎和肌腱炎,这些症状与人 IBD 十分相似。

改论文的亮点在于丰富了 A20 在静息稳态中的负向调控作用,并将其与人类 IBD 和伴随的骨性关节炎联系起来,为此类疾病的临床治疗提供了有利线索。

[ 夏梦摘译, 刘书逊审阅. Hammer GE, Turer EE, Taylor KE, et al. *Nat Immunol*, 2011, 12( 12 ): 1184-1193. ]