

调控线粒体通透转运孔道对人肝癌耐药细胞 SK-Hep1/CDDP 多药耐药的影响

周源 凌贤龙* 李诗伟 晏斌 文蕾

(第三军医大学新桥医院消化科, 重庆 400037)

摘要 采用大剂量冲击、间歇诱导法获得人肝癌顺铂(cisplatin, CDDP)多药耐药细胞系 SK-Hep1/CDDP。利用线粒体通透转运孔道(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放剂苍术苷(atractyloside, ATR)和抑制剂环孢素 A (cyclosporin, CsA)分别干预 SK-Hep1 和 SK-Hep1/CDDP 细胞;免疫印迹法检测多药耐药基因 Mdr-1 和 Bax 表达水平;采用 Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡率;采用荧光探针 JC-1 检测线粒体膜电位 $\Delta\Psi_m$ 的变化。探讨调控线粒体 mPTP 对人肝癌耐药细胞 SK-Hep1/CDDP 多药耐药的影响。结果提示, ATR 可促进 mPTP 开放, 加速 $\Delta\Psi_m$ 下降, 同时降低 Bax 活性, 增加 SK-Hep1/CDDP 细胞凋亡; CsA 抑制 mPTP 开放, 可减轻并延迟线粒体膜电位下降, 使多药耐药细胞 SK-Hep1/CDDP 对 CDDP 诱导凋亡的耐受能力提高, 同时增加 Bax 活性。但 mPTP 活性的变化对细胞 Mdr-1 蛋白表达水平无影响。mPTP 的激活可能成为增加肿瘤细胞对化疗药物敏感性及逆转肿瘤细胞多药耐药的新方法。

关键词 肝癌; 线粒体通透性转运孔道; 多药耐药; 线粒体膜电位

肿瘤细胞多药耐药^[1] (multidrug resistance, MDR) 是临床肿瘤化疗的主要障碍。原发性肝癌是世界上第五大常见肿瘤, 在癌症相关死亡原因中排名第三^[2], 其恶性程度高、预后不佳。而肝癌细胞常对化疗药物产生原发性 MDR。细胞凋亡是化疗药物杀伤肿瘤细胞的共同通路。线粒体在细胞凋亡过程中起关键作用, 一方面调控线粒体通透转运孔道(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)功能可以保护正常细胞, 防止凋亡启动; 另一方面, 通过干扰线粒体功能, 可促进一系列凋亡蛋白的释放, 诱导肿瘤细胞发生凋亡^[3]。本研究以人肝癌细胞系 SK-Hep1 和建立的 SK-Hep1/CDDP 耐药型为模型, 通过调控 mPTP 功能状态, 探讨 mPTP 结构与功能的变化在肿瘤 MDR 过程中可能的作用, 期望为 MDR 逆转提供新的干预手段。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 SK-Hep1 细胞系(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); DMEM 高糖培养基、胎牛血清(Gibco 公司); 细胞活性计数试剂盒 CCK-8 (日本同仁化学研究所); 顺铂(cisplatin, CDDP, Sigma 公司)、苍术苷(atractyloside, ATR,

Sigma 公司)、环孢素 A (cyclosporin, CsA, 瑞士诺华公司); 线粒体跨膜电位检测试剂盒(JC-1) (碧云天生物技术研究所); Annexin V FITC/PI 试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司); 鼠抗人 Bax、 β -肌动蛋白、鼠抗人 Mdr-1 (JSB-1)单克隆抗体(Santa Cruz 公司); 辣根过氧化物酶标记二抗(北京中杉金桥公司)。

1.2 耐药细胞 SK-Hep1/CDDP 的建立

采用大剂量 CDDP 间歇诱导的方法建株。以含 5 mg/L CDDP 培养液冲击对数生长期的 SK-Hep1 细胞, 作用 24 h 后弃含药培养液, PBS 洗 3 遍, 加入新鲜培养液继续培养, 1~2 天换液洗去死亡细胞, 待其恢复对数生长后再次使用 5 mg/L 的 CDDP 冲击, 如此反复作用 6 次, 历时 6 月得到 SK-Hep1/CDDP 耐药细胞系, 并将其维持培养在含 0.01 $\mu\text{g/ml}$ CDDP 完全培养液中, 实验前 3 周更换为不含 CDDP 的完全培养基。

1.3 细胞培养和实验分组

SK-Hep1/CDDP 及 SK-Hep1 细胞在 DMEM 高糖培养基, 含 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素、100 g/L 链霉素、5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养。实验分组:

收稿日期: 2009-11-09 接受日期: 2010-03-15

第三军医大学新桥医院 1520 人才培养工程专项基金资助

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

① SK-Hep1 组; ② CsA 干预 SK-Hep1 细胞组: 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 干预细胞; ③ ATR 干预 SK-Hep1 细胞组: 20 $\mu\text{mol/L}$ ATR 干预细胞; ④ SK-Hep1/CDDP 组; ⑤ CsA 干预 SK-Hep1/CDDP 细胞组: 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 干预细胞; ⑥ ATR 干预 SK-Hep1/CDDP 细胞组: 20 $\mu\text{mol/L}$ ATR 干预细胞。干预时间: 30 min。

1.4 CCK-8 检测细胞对 CDDP 敏感性

按 CCK-8 试剂盒说明操作, 采用 WST-8 法检测不同浓度 CDDP 对上述 6 组人肝癌细胞的细胞毒作用, 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(%) = $(1 - \text{加药孔 } A \text{ 值} / \text{对照孔 } A \text{ 值}) \times 100\%$, SPSS 13.0 计算 50% 细胞生长抑制时的药物浓度 (IC_{50}), 耐药指数 (Resistance index, RI) = 耐药细胞 IC_{50} / 亲本细胞 IC_{50} 。

1.5 台盼蓝拒染试验

不同方式处理的人肝癌细胞传入 6 孔板, 加入 10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP 处理 24 h, 0.25% 胰蛋白酶消化后取细胞悬液滴加 0.4% 的台盼蓝染色 5 min。在显微镜下随机取 1 个视野计数。镜下观察, 死细胞淡蓝色, 活细胞拒染, 按下列式计算出活细胞百分率: 活细胞率 (%) = 活细胞数 / (活细胞数 + 死细胞数) $\times 100\%$ 。取 3 次均值。

1.6 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡

采用 FITC-Annexin V/PI 双荧光标记、流式细胞术检测细胞凋亡的变化。将细胞按 1×10^5 个 / ml 接种于 6 孔板, 按上述不同处理设组, 各组设 3 复孔, 均加入 10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP, 作用 12 h 后收集细胞, 调整细胞浓度至 1×10^5 个 / ml, 1 500 r/min, 离心 5 min, 弃上清液, 加 5 μl annexin V、195 μl 缓冲液、20 μl PI, 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。以 SK-Hep1 和 SK-Hep1/CDDP 组为空白对照。

1.7 JC-1 染色检测细胞线粒体膜电位 $\Delta\Psi\text{m}$

按线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 说明操作, 收集 5×10^6 个细胞, 重悬于 1 ml 细胞培养液中, 加入 JC-1 染色工作液 1 ml, 充分混匀, 避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min 后, 用 JC-1 染色缓冲液洗涤除去游离的多余染料, 室温下离心 (1 000 r/min) 3 min, 弃上清液, 加 500 μl JC-1 染色工作液, 轻摇试管使细胞重悬, 置于激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司) 下观察。JC-1 单体 (绿色荧光) 激发波长 488 nm, 发射波长 505~530 nm。当 $\Delta\Psi\text{m}$ 较低时, JC-1 主要以单体形式存在, 呈绿色荧光; 当 $\Delta\Psi\text{m}$ 较高时, 形成聚合物, 发出红色荧光。

镜下随机选取 10 个视野, 计算平均荧光密度 (IPP 软件), 以红色荧光 / 绿色荧光光密度比值表示 $\Delta\Psi\text{m}$ 高低。

1.8 免疫印迹法检测 Mdr-1 和 Bax 蛋白表达量

免疫印迹法检测细胞内 Mdr-1 和 Bax 蛋白表达量。应用蛋白裂解液裂解各分组细胞, 取上清液, BCA 法测量样品中总蛋白浓度。煮沸变性后, 根据测得的总蛋白浓度, 每例标本取总蛋白 20 μg , 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 半干法转印于 PVDF (Roche 公司) 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗 (Mdr-1 和 Bax 稀释度分别为 1 : 500 和 1 : 1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 温育过夜。TBST (TBS 中加入 0.05% Tween-20) 洗膜后, 加入 1 : 10 000 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h, TBST 洗膜后, 加 ECI 发光剂, 在 5 min 内显影定影, 记录结果。Gel-Pro 凝胶分析软件分析 (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 次取其均值代表该细胞蛋白的表达水平。

1.9 统计学处理

数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件, 各组数据间差异采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 t 检验进行统计。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CDDP 对不同方式处理的人肝癌细胞细胞毒性作用

CCK-8 检测结果表明 (表 1): SK-Hep1/CDDP 细胞 / SK-Hep1 细胞的 RI 为 13.76, 可以认为 SK-Hep1/CDDP 耐药株建立成功。SK-Hep1 和 SK-Hep1/CDDP 两组细胞分别给予 mPTP 激动剂 ATR 干预后发现其对 CDDP 的 IC_{50} 和 RI 均降低, 而给予 mPTP 抑制剂 CsA 后两组细胞的 IC_{50} 和 RI 增加, 增加耐药细胞对 CDDP 的耐药性。进一步用台盼蓝拒染分析活细胞

Table 1 Cytotoxicity to hepatoma cells induced by cisplatin ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Groups	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	RI	Survival rate (%)
SK-Hep1	5.13 \pm 0.09	-	25.8 \pm 11.3
SK-Hep1+CsA	6.25 \pm 0.03 ^a	1.22	43.5 \pm 10.3 ^a
SK-Hep1+ATR	2.53 \pm 0.08 ^a	0.49	13.6 \pm 4.7 ^a
SK-Hep1/CDDP	70.61 \pm 1.06	13.76	82.8 \pm 8.2
SK-Hep1/CDDP+CsA	84.22 \pm 1.03 ^b	16.42	93.8 \pm 2.7 ^b
SK-Hep1/CDDP+ATR	30.27 \pm 0.67 ^b	5.9	41.8 \pm 6.9 ^b

a: $P < 0.05$ vs SK-Hep1 cells; b: $P < 0.05$ vs SK-Hep1/CDDP cells.

的百分率,其结果与CCK-8方法检测结果基本一致。

2.2 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡率

SK-Hep1 与 SK-Hep1/CDDP 细胞自然凋亡率分别为 $2\% \pm 0.11\%$ 和 $0.67\% \pm 0.08\%$ 。10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP 作用 12 h 后,两组细胞凋亡率均增加,SK-Hep1 细胞凋亡率($6.95\% \pm 0.29\%$)明显较 SK-Hep1/CDDP 高($2.17\% \pm 0.11\%$, $P < 0.01$); CDDP 诱导细胞凋亡的同时加入 1 $\mu\text{mol/L}$ CsA 30 min 干预后,SK-Hep1 和 SK-Hep1/CDDP 细胞凋亡率分别为 $5.11\% \pm 0.18\%$ ($P < 0.05$ vs SK-Hep1+10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP)和 $0.86\% \pm 0.14\%$ ($P < 0.05$ vs SK-Hep1/CDDP+10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP),说明抑制 mPTP 开放能降低多药耐药细胞对顺铂诱导凋亡的敏感性;而加入 mPTP 激动剂 20 $\mu\text{mol/L}$ ATR 干预后,两组细胞凋亡率均增加,分别为 $24.61\% \pm 1.03\%$ ($P < 0.05$ vs SK-Hep1+10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP)和 $6.18\% \pm 1.13\%$ ($P < 0.05$ vs SK-Hep1/CDDP+10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP),说明促进 mPTP 开放能相对增强 CDDP 诱导凋亡的能力,使耐药细胞在 CDDP 作用下凋亡增加(图 1)。

2.3 Mdr-1 和 Bax 的表达变化

用免疫印迹法检测 SK-Hep1 与 SK-Hep1/CDDP 细胞内 Mdr-1 和 Bax 表达量的变化(图 2),经 Gel-Pro 凝胶分析软件分析样品与内参 β -肌动蛋白灰度比值,结果显示(表 2),SK-Hep1/CDDP 细胞(1.36 ± 0.04)较 SK-Hep1 细胞(0.58 ± 0.02) Mdr-1 表达明显增加($P < 0.01$);加入 mPTP 激动剂或抑制剂后 Mdr-1 表达无明显变化。SK-Hep1/CDDP 细胞(0.59 ± 0.02)较 SK-Hep1 细胞(3.53 ± 0.12) Bax 蛋白表达明显下降($P < 0.01$);加入 CsA 干预后,SK-Hep1 细胞与 SK-Hep1/CDDP 细胞 Bax 蛋白表达均有所降低,分别为 1.47 ± 0.03 ($P < 0.01$)和 0.39 ± 0.03 ($P < 0.05$);加入 ATR 干预后,SK-Hep1 细胞与 SK-Hep1/CDDP 细胞 Bax 蛋白表达均增加,分别为 4.12 ± 0.03 ($P < 0.01$)和 0.91 ± 0.03 ($P < 0.01$)。

2.4 流式细胞仪检测线粒体膜电位

SK-Hep1 细胞和 SK-Hep1/CDDP 细胞在加入 10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP 作用 12 h 后, $\Delta\Psi\text{m}$ 均有所下降, $P < 0.05$ (图 3)。两组细胞预先加入 1 $\mu\text{mol/L}$ mPTP 抑制剂 CsA 干预 30 min 后,加入 10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP 作用,发现 mPTP 抑制剂可减轻 $\Delta\Psi\text{m}$ 的降低程度;加入 20 $\mu\text{mol/L}$ mPTP 开放剂 ATR 干预 30 min 后,可促进 $\Delta\Psi\text{m}$ 降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

MDR 是目前临床肿瘤化疗的主要障碍,使用 MDR 逆转剂与抗癌药物联合化疗是克服临床肿瘤

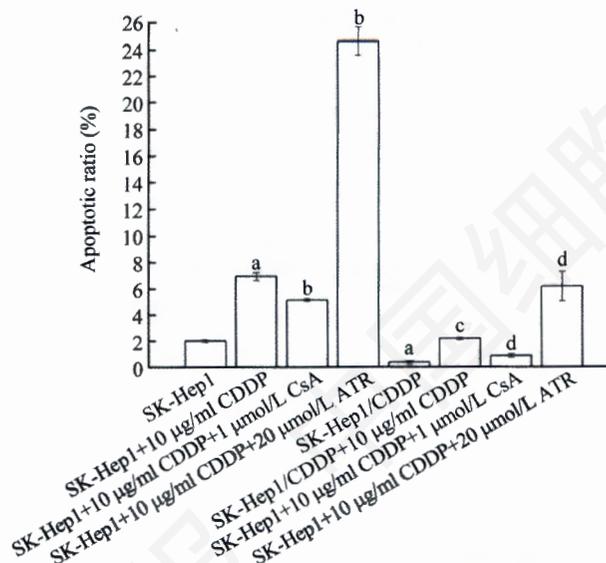


Fig.1 Apoptosis detected by annexin V assay

a: $P < 0.01$ vs SK-Hep1 cells; b: $P < 0.05$ vs SK-Hep1+10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP cells; c: $P < 0.05$ vs SK-Hep1/CDDP cells; d: $P < 0.05$ vs SK-Hep1/CDDP+10 $\mu\text{g/ml}$ CDDP cells.

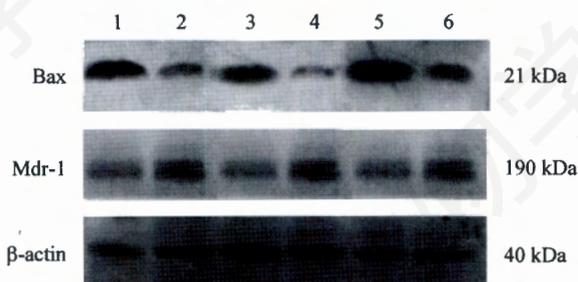


Fig.2 Western blotting for Mdr-1 and Bax

1: SK-Hep1; 2: SK-Hep1/CDDP; 3: SK-Hep1+CsA; 4: SK-Hep1/CDDP+CsA; 5: SK-Hep1+ATR; 6: SK-Hep1/CDDP+ATR.

Table 2 Expressions of Mdr-1 and Bax ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Mdr-1	Bax
SK-Hep1	0.58 ± 0.02	3.53 ± 0.12
SK-Hep1+CsA	0.56 ± 0.01^a	1.47 ± 0.03^c
SK-Hep1+ATR	0.54 ± 0.01^a	4.12 ± 0.03^c
SK-Hep1/CDDP	1.32 ± 0.04^c	0.59 ± 0.02^c
SK-Hep1/CDDP+CsA	1.33 ± 0.02^b	0.39 ± 0.03^d
SK-Hep1/CDDP+ATR	1.35 ± 0.03^b	0.91 ± 0.03^d

a: $P > 0.05$ vs SK-Hep1 cells; b: $P > 0.05$ vs SK-Hep1/CDDP cells; c: $P < 0.01$ vs SK-Hep1; d: $P < 0.05$ vs SK-Hep1/CDDP.

MDR 的重要方法。肿瘤 MDR 的发生机制比较复杂,目前研究认为其主要涉及肿瘤细胞外膜上两类经典的转运蛋白^[4]。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外,包括 P-gp/ABCB1、MRP1/

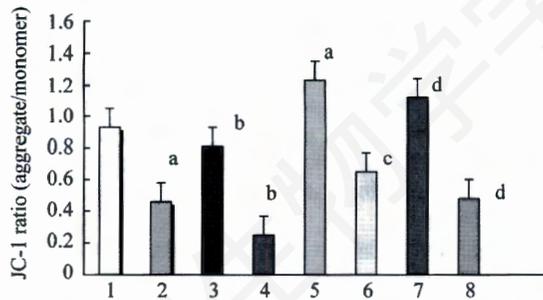


Fig.3 Mitochondrial membrane potential influenced by modulation of mPTP, quantification of mitochondrial membrane potential expressed as a ratio of JC-1 aggregate to monomer fluorescence in different treatments ($n=10$ images)

1: SK-Hep1; 2: SK-Hep1+10 µg/ml CDDP; 3: SK-Hep1+10 µg/ml CDDP+CsA; 4: SK-Hep1+10 µg/ml CDDP+ATR; 5: SK-Hep1/CDDP; 6: SK-Hep1/CDDP+10 µg/ml CDDP; 7: SK-Hep1/CDDP+10 µg/ml CDDP+CsA; 8: SK-Hep1/CDDP+10 µg/ml CDDP+ATR. a: $P<0.05$ vs SK-Hep1 cells; b: $P<0.05$ vs SK-Hep1 +10 µg/ml CDDP cells; c: $P<0.05$ vs SK-Hep1/ CDDP cells; d: $P<0.05$ vs SK-Hep1/CDDP+10 µg/ml CDDP cells.

ABCC1 和 BCRP/ABCG2^[5]等; 另一类溶质运载蛋白家族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。Kojima 等^[6]发现过度表达 Mdr-1 (P-gp、ABCB1)的肿瘤细胞可抑制线粒体内细胞色素 *c* 释放到胞质内, 抑制 caspase 依赖的细胞凋亡^[7]。同样, ATP 结合盒转运蛋白家族中的 BCRP/ABCG2^[8]的过度表达也能增强细胞抗凋亡能力。由此可见, 细胞凋亡与细胞多药耐药性之间存在不同程度的内在联系, 而肿瘤细胞凋亡逃逸或拮抗凋亡是其对化疗药物产生耐药性的关键因素之一。然而细胞凋亡过程中许多重要事件的发生都与线粒体密切相关, 我们以往研究也发现 mtDNA 缺失与突变能诱导肿瘤细胞 MDR 表型的产生^[9,10], 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。

目前线粒体介导的凋亡受到越来越多的重视, 其中 mPTP 在线粒体介导的凋亡中有重要作用。mPTP 是位于线粒体内、外膜之间的多蛋白复合体, 主要由三个部分组成: 位于外膜的电压依赖性阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC)、位于内膜的腺嘌呤核苷酸转运酶 (adenine nucleotide translocase, ANT) 以及基质的亲环蛋白 D (cyclophilin D, CyP-D)^[11]。另外还包括一些附加蛋白, 如外膜上的 Bcl-2 家族成员、苯二氮卓受体、线粒体肌酸激酶、己糖激酶等。最近有研究表明, 线粒体磷酸运载体也可能参与了 mPTP 的组成^[12]。正常生理条件下, mPTP 处于

关闭状态, 线粒体内膜通透性小。应激状态下, mPTP 开放, 允许相对分子质量小于 1 500 Da 的分子通过, 导致线粒体基质渗透压升高、基质肿胀、线粒体外膜损伤, 促进 mPTP 的开放。这样, 一方面使得细胞色素 *c* 和其他致凋亡蛋白从膜间隙中释放出来, 促进凋亡的进一步发展; 另一方面, 使线粒体基质渗透压进一步升高, 基质肿胀加重, 细胞骨架蛋白受压, 直接导致细胞凋亡。同时, 线粒体膜电位的破坏也加速线粒体能量耗竭。当 mPTP 开放后, 若不足以削弱整个细胞产生 ATP, 则引起细胞凋亡^[13]; 但如果线粒体破坏到一定程度, 细胞能量严重耗竭, 则发生细胞坏死。可以说, mPTP 是细胞凋亡的线粒体途径的枢纽。

mPTP 功能的影响因素很多, 包括线粒体膜电位的变化、氧化应激、激动剂与拮抗剂的相互作用, 以及线粒体内多种蛋白(包括 Bcl-2 家族蛋白)进行调控等等^[14]。免疫抑制剂 CsA 通过和 CyP-D 结合抑制 mPTP 开放^[15], 阻止线粒体内容物释放, 延缓细胞凋亡; 开放剂 ATR 却能通过降低基质 ADP 与 ANT 的亲合力, 诱导 ANT 的胞质构象(c-state), 使 mPTP 开放^[5]。目前已有研究者试图寻找某些药物可以通过 mPTP 改变肿瘤细胞的生长活性甚至诱导肿瘤细胞凋亡从而达到治疗肿瘤的目的。近来研究发现, 植物中茉莉酸类物质可以促进 mPTP 开放^[16], 这对发生转化的肿瘤细胞有凋亡诱导作用。另一些药物如氯尼达明、亚砷酸盐、CD437、PK1195 等实验性药物, 可直接作用于 mPTP 而达到治疗肿瘤的目的^[17]。

在本研究中, 我们以人肝癌细胞系 SK-Hep1 为研究对象, 通过大剂量 CDDP 冲击诱导所获得的 SK-Hep1/CDDP 耐药株(RI 为 13.76)的 Mdr-1 活性明显增加, 而凋亡蛋白 Bax 活性降低, 细胞凋亡率明显下降, 对抗化疗药物诱导凋亡的能力也有所提高。给予 mPTP 激活剂 ATR 干预后, SK-Hep1 和 SK-Hep1/CDDP 细胞对 CDDP 的 IC_{50} 、RI 和细胞存活率均降低, 细胞凋亡率增加, 细胞内 $\Delta\Psi_m$ 下降。Mdr-1 表达未受影响, 但 Bax 蛋白表达却有所增加。给予 mPTP 抑制剂 CsA 分别干预 SK-Hep1 和 SK-Hep1/CDDP 细胞后, 其对 CDDP 的 IC_{50} 、RI 和细胞存活率有所增加, 细胞凋亡率降低(相对于 SK-Hep1 细胞), Mdr-1 蛋白表达未受影响, Bax 蛋白降低表达。

提示通过促进 mPTP 开放或许可以减弱肿瘤的抗药性, 增加细胞凋亡。但调控 mPTP 并不影响耐药细胞 Mdr-1 的活性, 却能调节 Bax 活性, 从而影响耐药细胞对化疗药物的敏感性。因此, 我们认为, 调

控 mPTP 可以影响 SK-Hep1/CDDP 细胞的凋亡。促进 mPTP 开放, 凋亡蛋白 Bax 活性增强, 可增强化疗药物诱导肿瘤耐药细胞凋亡作用, 诱导耐药细胞凋亡, 为肿瘤治疗和多药耐药逆转提供新的线索。

参考文献(References)

- Pérez-Tomás R. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem* 2006; 13(16): 1859-76.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2557-76.
- Grimm S, Brdiczka D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 2007; 12(5): 841-55.
- Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy—a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009; 48(3): 239-44.
- Daoud 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.
- Kojima H, Endo K, Moriyama H, Tanaka Y, Alnemri ES, Slapak CA, *et al.* Abrogation of mitochondrial cytochrome *c* release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem* 1998; 273(27): 16647-50.
- Mantovani I, Cappellini A, Tazzari PL, Papa V, Cocco L, Martelli AM. Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells. *J Cell Physiol* 2006; 207(3): 836-44.
- Evseenko DA, Murthi P, Paxton JW, Reid G, Emerald BS, Mohankumar KM, *et al.* The ABC transporter BCRP/ABCG2 is a placental survival factor, and its expression is reduced in idiopathic human fetal growth restriction. *FASEB J* 2007; 21(13): 3592-605.
- 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.
- 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.
- Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20(1-4): 1-22.
- Leung AW, Halestrap AP. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777(7-8): 946-52.
- Bernardi P, Krauskopf A, Basso E, Petronilli V, Blachly-Dyson E, Di Lisa F, *et al.* The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. *FEBS J* 2006; 273(10): 2077-99.
- Lemasters JJ. Modulation of mitochondrial membrane permeability in pathogenesis, autophagy and control of metabolism. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22(1): S31-7.
- Halestrap AP. Mitochondrial calcium in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787(11): 1289-90.
- Goldin N, Heyfets A, Reischer D, Flescher E. Mitochondria-mediated ATP depletion by anti-cancer agents of the jasmonate family. *J Bioenerg Biomembr*. 2007; 39(1): 51-7.
- Brenner C, Grimm S. The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene* 2006; 25(34): 4744-56.

Multidrug Resistance in Hepatoma Cell Line SK-Hep1/CDDP by Modulation of the Mitochondrial Permeability Transition Pore

Yuan Zhou, Xian-Long Ling *, Shi-Wei Li, Bin Yan, Lei Wen

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

Abstract SK-Hep1/CDDP cell line was induced by pulse treatment with a high concentration of cisplatin (CDDP) *in vitro*. SK-Hep1 and SK-Hep1/CDDP were treated by mitochondrial permeability transition pore (mPTP) reactivator atractyloside (ATR) and mPTP inhibitor cyclosporin (CsA) respectively. Expressions of Mdr-1 and Bax were detected by Western blotting. Apoptosis of the cells was assessed with FITC-Annexin V. Mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were monitored with fluorescence dye Jc-1. The results showed that mPTP agonist ATR promoted the opening of the mPTP, accelerated the loss of $\Delta\Psi_m$, enhanced apoptosis induced by CDDP, and also increased Bax activity, Whereas mPTP blocker CsA blocked the mPTP, delayed the loss of $\Delta\Psi_m$, inhibited apoptosis induced by CDDP, and also inhibited Bax activity. Meanwhile there was no influence on mdr-1 expression. The results suggested that activation of mPTP might be efficient in clinic trials for cancer treatment and reversal of multidrug resistance.

Key words hepatoma; mitochondrial permeability transition pore (mPTP); multidrug resistance; mitochondrial inner membrane potential ($\Delta\Psi_m$)

Received: November 9, 2009 Accepted: March 15, 2010

This work was supported by Xinqiao Hospital 1520 Special Foundation of Third Military Medical University

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