

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2019.06.002

· 基础研究 ·

线粒体动力相关蛋白 FIS1 调控舌鳞癌顺铂敏感性的机制研究

雷新元, 林欣羽, 欧展鹏, 阮毅, 李劲松

中山大学孙逸仙纪念医院口腔科, 广东 广州(510120)

【摘要】 目的 探讨线粒体动力相关蛋白(mitochondrial fission protein 1, FIS1)对于舌鳞癌细胞的凋亡以及顺铂耐药性的调控作用。方法 使用舌鳞癌细胞系 SCC9 和 CAL27, 检测顺铂处理后这两种细胞中 FIS1 的 mRNA 以及蛋白质水平, 采用小干扰 RNA (small interfere RNA, siRNA) 沉默经顺铂处理后的 SCC9 和 CAL27 细胞中的 FIS1, 或者利用质粒过表达 SCC9 和 CAL27 细胞中的 FIS1, 之后采用线粒体染色检测细胞中线粒体的分裂状态, TUNEL、流式细胞术、Caspase3/7 检测细胞的凋亡状态。结果 经顺铂处理后的舌鳞癌细胞中 FIS1 蛋白表达水平升高, 但 mRNA 水平未发生变化。沉默 FIS1 表达可减少顺铂处理后的舌鳞癌细胞中的线粒体分裂以及细胞凋亡, 而过表达 FIS1 则可以观察到相反效应。沉默或者过表达 FIS1 前后, SCC9 和 CAL27 细胞中分裂线粒体所占的百分比, 凋亡细胞的含量以及 Caspase3/7 的活性值差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 FIS1 参与调控舌鳞癌细胞顺铂化疗敏感性, 可作为提高口腔鳞癌顺铂化疗敏感性的新靶点。

【关键词】 线粒体动力学; 舌鳞状细胞癌; 顺铂敏感性; FIS1; 化疗; 凋亡; 小干扰 RNA

【中图分类号】 R739.8 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)06-0350-05

【引用著录格式】 雷新元, 林欣羽, 欧展鹏, 等. 线粒体动力相关蛋白 FIS1 调控舌鳞癌顺铂敏感性的机制研究[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(6): 350-354.

Mitochondrial fission protein 1 determines mitochondrial fission and cisplatin sensitivity in tongue squamous cell carcinoma LEI Xinyuan, LIN Xinyu, OU Zhanpeng, RUAN Yi, LI Jinsong. Department of Stomatology, Sun Yat-sen Memorial hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: RUAN Yi, Email: 13802929651@139.com, Tel: 0086-20-83112220; LI Jinsong, Email: lijinsong1967@163.com, Tel: 0086-20-83112220

【Abstract】 Objective To investigate the effect of mitochondrial fission protein 1 (FIS1) on apoptosis and cisplatin resistance in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) cells. **Methods** The squamous cell carcinoma cell lines SCC9 and CAL27 were used to detect the mRNA and protein levels of FIS1 after cisplatin treatment, the knockdown and overexpression of FIS1 of SCC9 and CAL27 with or without cisplatin treatment were accomplished through small interfering RNA (siRNA) and plasmid, respectively. The mitochondrial division state in cells was detected by mitochondrial staining, and the apoptosis state of cells was detected by TUNEL, flow cytometry and Caspase 3/7. **Results** FIS1 protein expression in tongue squamous carcinoma cells treated with cisplatin was increased, but the mRNA level did not change. Silencing of FIS1 expression reduced mitochondrial division and apoptosis in squamous cell carcinoma cells treated with cisplatin, whereas overexpression of FIS1 exhibited the opposite effects. The percentage of dividing mitochondria, the number of apoptotic cells and the activity of Caspase 3/7 in SCC9 and CAL27 cells were significantly different before and after modulation of FIS1 expression ($P < 0.05$). **Conclusion** FIS1 is involved in the regulation of cisplatin chemotherapy sensitivity in tongue squamous cell carcinoma and can be used as a new target for improving the sensitivity of cisplatin chemotherapy in oral squamous cell carcinoma.

【Key words】 Mitochondrial dynamics; Tongue squamous cell carcinoma; Cisplatin sensitivity; FIS1; Chemotherapy; Apoptosis; Small interfere RNA

【收稿日期】 2019-03-07; **【修回日期】** 2019-04-02

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81872194、81672676); 广东省自然科学基金项目(2017A030313501)

【作者简介】 雷新元, 硕士研究生在读, Email: leixinyuan1993@gmail.com

【通信作者】 阮毅, 副主任医师, 本科, Email: 13802929651@139.com, Tel: 0086-20-83112220

李劲松, 主任医师, 博士, Email: lijinsong1967@163.com, Tel: 0086-20-83112220

线粒体是持续进行分裂和融合的动态细胞器,其分裂和融合各自具有重要的生理功能。线粒体分裂会使线粒体内外膜间隙中的促凋亡蛋白释放,从而引发细胞的凋亡。近年来,越来越多的研究揭示了异常线粒体动力学对细胞凋亡的调控^[1]以及与多种疾病的相关性^[2]。然而,鲜有研究揭示线粒体分裂对于化疗敏感性的可能调控机制。顺铂是目前被广泛使用于多种实体恶性肿瘤中的一线化疗药物^[3],大约有80.6%的口腔鳞癌患者最初对铂类药物有着比较好的反应性,然而,有超过70%的患者最终出现了化疗耐药^[4],进一步探讨及明确导致顺铂化疗耐药的机制,为临床治疗提供可能的靶点则显得尤为必要。在哺乳动物细胞的线粒体中,存在多种蛋白调控其分裂。线粒体动力相关蛋白(mitochondrial fission protein 1, FIS1)作为其中一种重要的调控分子,在线粒体分裂以及介导细胞凋亡中发挥了重要作用。目前关于FIS1与化疗耐药相关性的研究甚少,本研究选择了FIS1作为一个突破点,探讨FIS1在调控舌鳞癌细胞线粒体分裂以及顺铂敏感性中的重要作用,以期为临床化疗提供新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 细胞及试剂

人舌鳞癌细胞系SCC9和CAL27均购买于美国ATCC细胞库。DMEM及DMEM-F12培养基(Gibco公司,美国);顺铂(Sigma-Aldrich公司,美国);FIS1 siRNA(GE Dharmacon公司,中国);胎牛血清、Lipofectamine TM RNAMAX(Invitrogen公司,美国);TUNEL试剂盒、Caspase3/7试剂盒(Promega公司,美国);FIS1抗体(Abcam公司,英国),山羊抗鼠IgG二抗(Proteintech公司,美国);ECL化学发光液、MitoTracker Red CMXRos、TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国);Annexin V和碘化丙啶(PI)(Sigma-Aldrich公司,美国);SYBR Green Real-time PCR Master Mix(Toyobo公司,日本);激光扫描共聚焦TCS SP5显微镜(Leica公司,德国);ImagerZ1显微镜(Zeiss公司,德国);LightCycler 480(Roche公司,瑞士)。

1.2 顺铂处理SCC9和CAL27细胞

顺铂粉剂配制成 10^{-6} M的终浓度。分别处理SCC9和CAL27细胞0、12、24、48 h,每隔24 h换液。

1.3 检测顺铂处理的SCC9和CAL27细胞FIS1的表达

1.3.1 qRT-PCR检测FIS1的mRNA TRIzol试剂

进行总RNA提取,使用SYBR Green Real-time PCR Master Mix和LightCycler 480仪器对FIS1以及 β -actin进行定量检测。FIS1引物序列:5'-GTCTC-TATCCTCTGTGGCCTTCA-3',3'-CCCCGTTTTATT-TACTCATCC-5'。 β -actin引物序列5'-AGCCTC-GCCTTTGCCGATCC-3',3'-ACATGCCGAGCCGTT-GTCG-5'。荧光定量PCR的反应条件设置为95℃ 1 min,95℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,一共40个循环, β -actin作为内参,其表达量设置为1。

1.3.2 Western Blotting检测FIS1蛋白的表达

向细胞中加入适量RIPA及蛋白酶抑制剂,提取舌鳞癌细胞中的蛋白,和Loading Buffer混合后100℃加热变性。在SDS-PAGE胶中上样并进行电泳分离,250 mA,60 min将蛋白转到PVDF膜上,脱脂奶粉封闭1 h,随后分别加入FIS1抗体(1:1 000)和 β -actin(1:500)抗体,4℃孵育过夜。第二天将PVDF膜用TBST溶液洗涤5 min×3次后,加入山羊抗鼠二抗(1:2 000),室温孵育1 h,使用化学发光法在曝光机中显像。

1.4 FIS1 siRNA沉默SCC9和CAL27细胞FIS1基因的表达

Lipofectamine辅助下分别对经 10^{-6} M顺铂处理后24小时的SCC9和CAL27细胞进行FIS1 siRNA和阴性对照的瞬时转染,于转染后24 h进行下游实验,顺铂浓度始终维持在 10^{-6} M。FIS1 siRNA序列:5'-AUUUCUUUCAAACUUCAGCA-3',3'-CUGAAGUUUGAAAAG AAAUUU-5';阴性对照FIS1-sc序列:5'-UGUAUUCGGAAAUUAACGCAA-3',3'-GCGUAAAUUCCGAAUACAGA-5'。实验分组:①空白对照组;②顺铂处理48 h组;③顺铂处理24 h后转染FIS1-sc的阴性对照组;④顺铂处理24 h后转染FIS1的siRNA组。

1.5 SCC9和CAL27细胞过表达FIS1基因

PCR扩增FIS1,引物序列为:5'-GTCTC-TATCCTCTGTGGCCTTCA-3',3'-CCCCGTTTTATT-TACTCATCC-5'。并使用pcDNA3.1作为载体构建pcDNA-FIS1质粒。Lipofectamine辅助下对未经顺铂处理的SCC9及CAL27细胞进行pcDNA-FIS1质粒以及空载质粒Vec的瞬时转染,于转染6~8 h之后换液,转染后24 h进行下游实验。实验分组:①空白对照组;②转染空载质粒组;③转染FIS1过表达质粒组;④顺铂处理24 h组。

1.6 线粒体染色

将未经处理的SCC9和CAL27细胞种在盖玻片

上并按照1.2、1.4、1.5的实验内容分别进行处理。然后使用0.1 μM MitoTracker Red CMXRos对细胞进行30分钟染色,染色全程严格避光,预热PBS洗片,5 min \times 3次,滴加抗荧光淬灭剂并封片^[5]。采用激光扫描共聚焦显微镜TCS SP5对细胞进行观察以及图像采集,并对线粒体形态进行评估及定量^[6]。

1.7 凋亡检测

使用TUNEL试剂盒对经过1.4、1.5的实验内容处理的SCC9和CAL27细胞涂片进行凋亡检测。1% Triton X-100通透液透膜处理,3% H_2O_2 封闭液封闭,加入Proteinase K工作液;冲洗,加入DNase I反应液,冲洗;加入TdT酶反应液,37 $^\circ\text{C}$ 避光60 min;冲洗,加入Streptavidin-HRP标记工作液,孵育后冲洗切片,加入DAB工作液显色,然后使用苏木精染液复染。用ImagerZ1显微镜观察切片,每张切片随机观察20个视野。同时采用Annexin V和碘化丙啶(PI)双染色后流式细胞术检测凋亡细胞。Caspase3/7活性使用Apo-ONE[®]Homogeneous Caspase3/7试剂盒进行检测。

1.8 Western Blotting 实验

使用前述方法提取进行了1.4、1.5的实验内容处理的SCC9及CAL27细胞的蛋白。蛋白提取物于8% SDS聚丙烯酰胺胶中进行电泳后,转移至PVDF膜上,与FIS1(1:1 000)或 β -actin(1:500)的一抗进行孵育并进一步与山羊抗鼠的二抗(1:2 000)进行孵育,利用化学发光法进行观察。

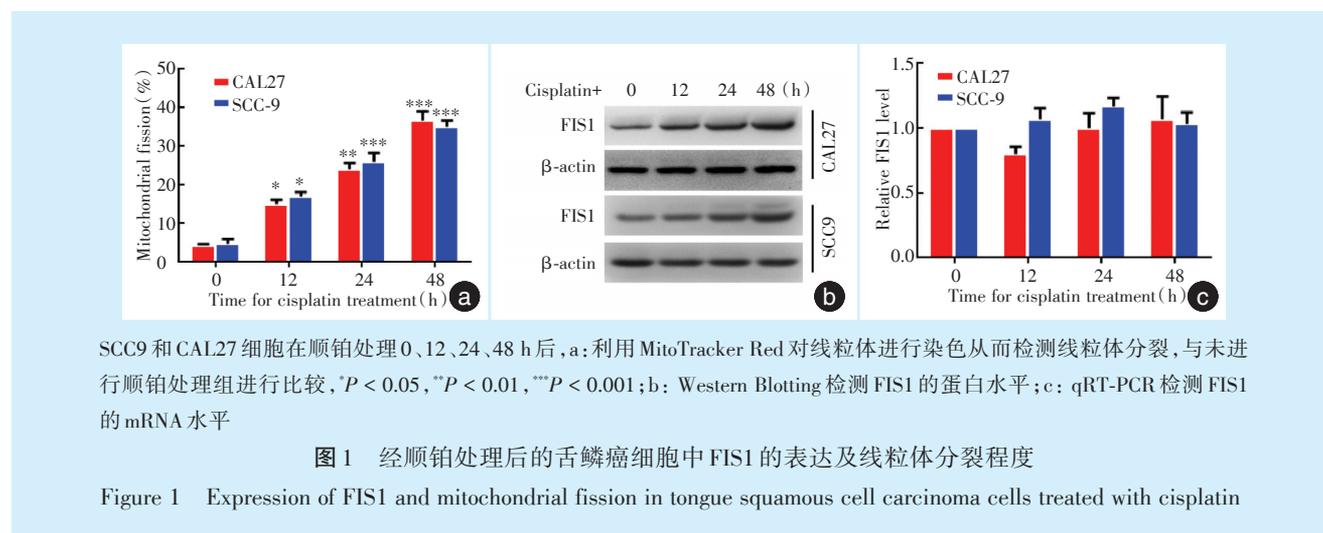
1.9 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据分析应用SPSS 19.0软件完成。两组间均数的比较采用 t 检验,若 $P < 0.05$,则被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 经顺铂处理后的舌鳞癌细胞中FIS1基因的表达及线粒体分裂程度

与未进行顺铂处理组相比,经顺铂处理后的SCC9和CAL27细胞中,线粒体分裂程度增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)(图1a);同时还观察到FIS1蛋白水平也随着顺铂处理时间的增加而增加(图1b),但mRNA水平间差异无统计学意义(图1c)。这提示影响顺铂处理后细胞中FIS1表达水平的调控过程可能发生在转录后。



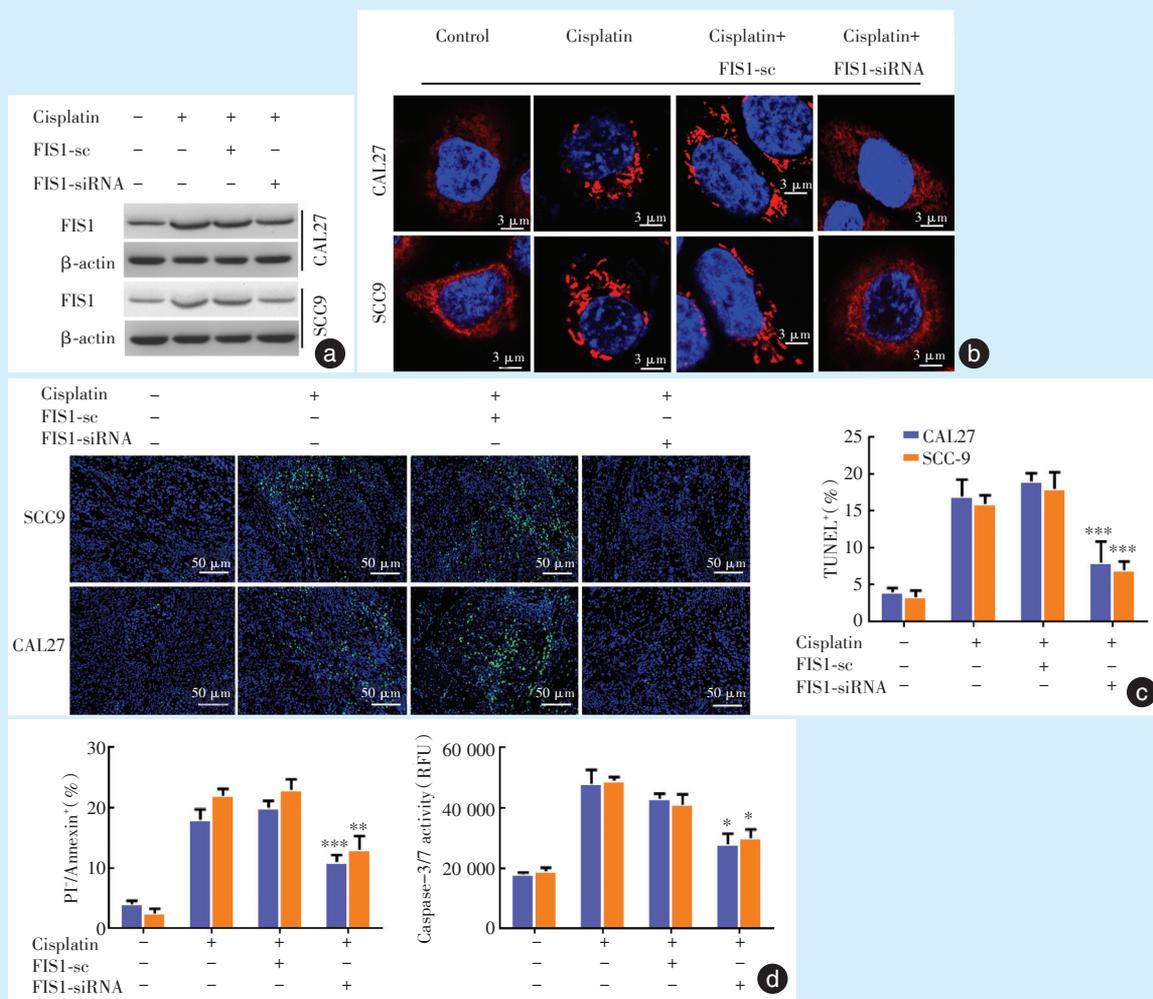
2.2 沉默舌鳞癌细胞中FIS1基因表达对线粒体分裂程度及细胞凋亡的影响

采用FIS1 siRNA转染经顺铂处理的SCC9和CAL27细胞,FIS1蛋白表达下调(图2a),抑制线粒体的过度分裂(图2b)。采用流式细胞术检测细胞早期凋亡,采用TUNEL实验检测细胞晚期凋亡,Caspase3/7检测细胞凋亡状态(图2c-d),均观察到,与FIS1-sc组相比,沉默FIS1表达可降低顺铂处理后细胞的凋亡程度,差异有统计学意义($P <$

0.05),说明FIS1表达水平降低与舌鳞癌细胞的顺铂耐药性密切相关。

2.3 过表达舌鳞癌细胞中FIS1表达对线粒体分裂程度及细胞凋亡的影响

采用质粒过表达FIS1则会进一步促进这两种细胞系中的线粒体分裂,同时,采用上述方法检测细胞凋亡状态后均观察到过表达FIS1进一步促进了细胞凋亡,差异有统计学意义($P < 0.05$),且其促进凋亡的效应与顺铂处理类似(图3)。



a: FIS1 表达水平使用 Western Blotting 检测; b: 利用 MitoTracker Red 对线粒体进行染色从而检测线粒体分裂, 比例尺为 3 μm; c、d: 利用 TUNEL、流式细胞术和 Caspase 3/7 活性检测试剂盒检测 SCC9 和 CAL27 的凋亡状态 (TUNEL: 绿色, DAPI: 蓝色, 比例尺为 50 μm); 与 FIS1-sc 组相比, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$

图 2 沉默 FIS1 可逆转顺铂引发的线粒体分裂及细胞凋亡

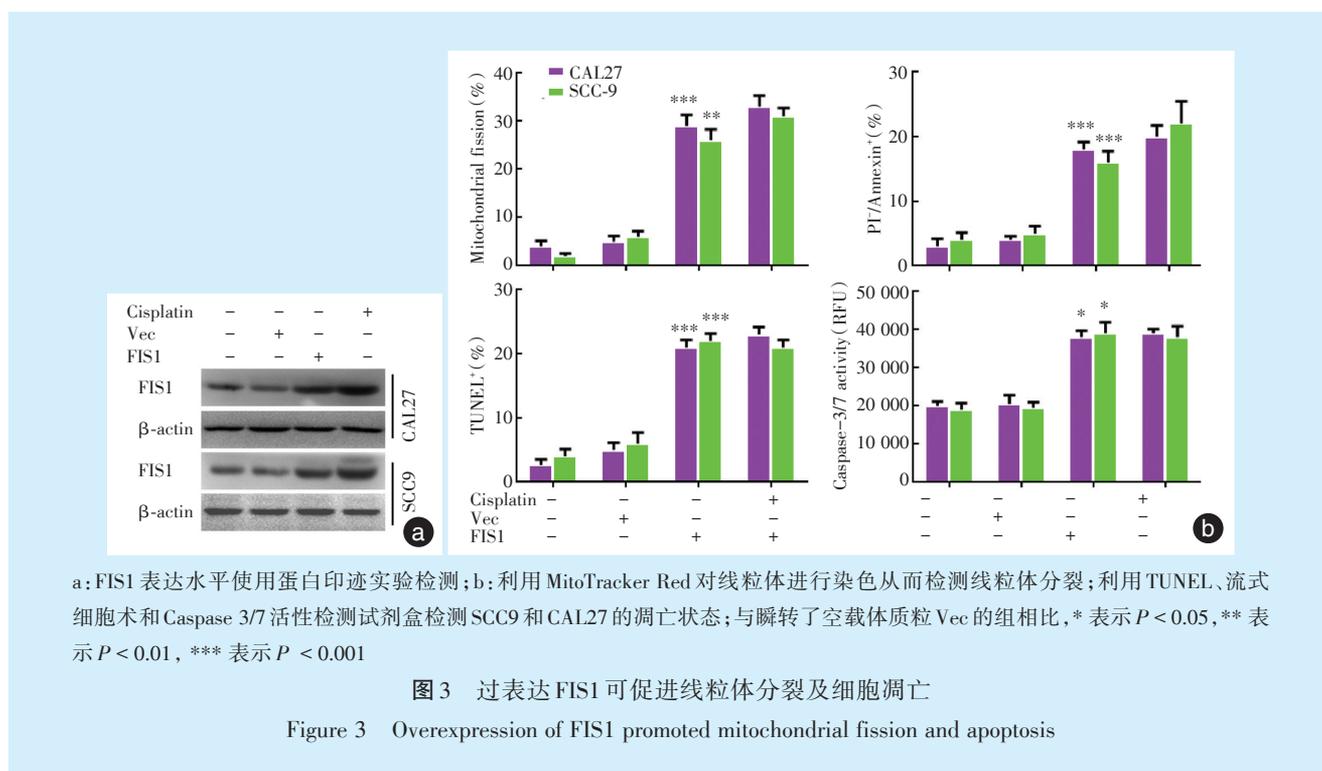
Figure 2 Silencing FIS1 reversed cisplatin-induced mitochondrial fission and apoptosis

3 讨论

顺铂是多种实体肿瘤的一线化疗药,然而,初始具有良好顺铂反应性的病人通常都会在后续治疗中逐渐出现顺铂耐药^[4],这也是临床上导致化疗失败的重要原因。过去三十年内,有大量的研究探讨了导致顺铂耐药的机制^[3]。但尽管如此,临床治疗中尚未出现克服这种耐药的方法。因此,从一个全新的角度去探讨由顺铂引发的细胞凋亡的具体机制是很有必要的。总体来说,顺铂可以通过损伤 DNA 的方式来引发内源性途径的凋亡,这一过程同时也被认为是线粒体依赖的。近年来有研究显示线粒体分裂也是凋亡的早期特征,可能与细胞凋亡以及顺铂敏感性有着更密切的关联^[7],

对其进行深入探讨具有重要的临床意义。

线粒体作为所有真核生物所共有的细胞器,一直以来都是生物医学研究所关注的重点。近年来,除了线粒体代谢作用相关的研究之外,作为动态细胞器的线粒体所独有的动力学也开始逐渐获得人们的关注^[8]。线粒体作为高度动态的细胞器,处在不断的分裂与融合之中,且其分裂与融合过程均具有重要的生理意义^[9]。研究表明线粒体动力学与细胞尤其是肿瘤细胞生物学行为具有相关性^[10],抑制线粒体分裂可以抑制肺癌、胃癌、乳腺癌以及结肠癌的生长^[11];而线粒体分裂增加则被认为与乳腺癌、甲状腺癌以及胶质瘤的远处转移有关^[12]。线粒体分裂过程由多种蛋白调控。线粒



体动力相关蛋白(dynamin-related protein 1, DRP1) 主要分布于细胞质中,具有 GTP 酶活性,在线粒体分裂发生时水解 GTP 获得能量,聚集成团后被招募至线粒体外膜,与相关配体相互作用,共同完成线粒体分裂过程^[13]。FIS1 定位于线粒体上,是 DRP1 的配体,也是线粒体分裂过程中重要的调控分子。本研究采用沉默以及过表达 FIS1 的方式调控 TSCC 线粒体分裂,发现 FIS1 可以通过调控 TSCC 细胞的线粒体分裂以及凋亡从而决定顺铂化疗的敏感性,揭示了线粒体分裂蛋白 FIS1 在调控细胞凋亡以及顺铂敏感性中的重要作用,为提高顺铂化疗敏感性提供新的靶点奠定了基础。

参考文献

[1] Soares CD, Morais TML, Mariano FV, et al. Expression of mitochondrial dynamics markers during melanoma progression: comparative study of head and neck cutaneous and mucosal melanomas[J]. J Oral Pathol Med. 2019. doi: 10.1111/jop.

[2] Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(10): 634-646.

[3] Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance[J]. Oncogene, 2012, 31(15): 1869-1883.

[4] Zhong LP, Zhang CP, Ren GX, et al. Randomized phase III trial of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil followed by surgery versus Up-Front surgery in locally advanced resectable oral squamous cell carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2013, 31

(6): 744-751.

[5] Wang JX, Jiao JQ, Li Q, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1 [J]. Nat Med, 2011, 17(1): 71-78.

[6] Tanaka A, Youle RJ. A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis[J]. Mol Cell, 2008, 29(4): 409-410.

[7] Srinivasan S, Guha M, Kashina A, et al. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics - the cancer connection[J]. Biochim Biophys Acta Bioenerg, 2017, 1858(8, SI): 602-614.

[8] Trotta AP, Chipuk JE. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(11): 1999-2017.

[9] Zorzano A, Isabel Hernandez-Alvarez M, Sebastian D, et al. Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(12): 1020-1031.

[10] Li J, Wang YL, Wang YP, et al. Pharmacological activation of AMPK prevents Drp1-mediated mitochondrial fission and alleviates endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 86: 62-74.

[11] Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, et al. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth[J]. Mol Cell. 2015, 57(3): 537-551.

[12] Wan YY, Zhang JF, Yang ZJ, et al. Involvement of Drp1 in hypoxia-induced migration of human glioblastoma U251 cells[J]. Oncol Rep, 2014, 32(2): 619-626.

[13] Friedman JR, Lackner LL, West M, et al. ER tubules mark sites of mitochondrial division[J]. Science, 2011, 334(6054): 358-362.

(编辑 罗燕鸿,曾曙光)