

线粒体腺苷酸转运体在宫颈癌组织中的表达变化及其与细胞凋亡的关系

金华¹, 马翔宇², 郭霞³, 阿依努尔·色依提¹, 刘艳¹, 程静新¹

1. 新疆医科大学附属肿瘤医院肿瘤妇科, 乌鲁木齐 830011
2. 中山大学药学院, 广州 510006
3. 新疆医科大学新疆地方病分子生物学重点实验室, 乌鲁木齐 830011

摘要 为探讨线粒体腺苷酸转运体(ANT)在宫颈癌组织中的表达变化及其与细胞凋亡的关系,收集维吾尔族妇女浸润性宫颈鳞癌患者的组织36例,正常或者慢性宫颈炎宫颈组织32例作为对照。分别运用荧光定量PCR(Q-PCR)、蛋白免疫印迹(western blot, WB)技术,检测线粒体腺苷酸转运体ANT1、ANT2、ANT3,以及Bax、Bcl-2、p53在不同宫颈组织中的mRNA和蛋白表达水平及其差异。运用TUNEL法测定不同宫颈组织中的细胞凋亡程度。Q-PCR和WB结果显示,与正常对照组相比,p53、Bax在宫颈癌患者宫颈组织中表达降低,而Bcl-2和ANT3表达升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。TUNEL结果显示,宫颈癌组的凋亡指数(AI)明显高于正常对照宫颈炎组,两组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。线粒体腺苷酸转运体ANT在宫颈癌组织中的异常表达导致线粒体功能紊乱,从而干扰细胞凋亡过程,这可能是宫颈癌发生与发展的一个重要机制。

关键词 线粒体腺苷酸转运体;宫颈癌;细胞凋亡;维吾尔族妇女

中图分类号 R737.33

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.16.002

Association of Cell Apoptosis with the Change of Expression of ANT in Tissue of Cervical Cancer

JIN Hua¹, MA Xiangyu², GUO Xia³, SEYITI Ayinuer¹, LIU Yan¹, CHENG Jingxin¹

1. Department of Gynecology, The Affiliated Tumor Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. College of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China
3. Xinjiang Key Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract To investigate the association of the cell apoptosis with the expression change of adenine nucleotide translocator (ANT) in the tissue of Uighur women with cervical cancer, we collected cervical tissue samples from Uygur women with cervical lesions (invasive cervical cancer (ICC): 36 cases and cervicitis: 32 cases). The mRNA and protein expression levels of ANT1, ANT2, ANT3, Bax, Bcl-2, and P53 in the tissues from the two groups were examined by real-time fluorescence quantitative PCR (Q-PCR) and western blot (WB). Apoptotic activity of cervical epithelium cells from the two groups was studied by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) method. The results of Q-PCR and WB show that compared with the cervicitis group, the expressions of p53 and Bax in the ICC group decreased while the expressions of Bcl-2 and ANT3 increased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The TUNEL results showed that the apoptosis index (AI) of the ICC group was obviously higher than that of the normal control cervicitis groups, the difference between the two groups was statistically significant ($P<0.05$). The abnormal expression of ANT in cervical cancer leads to mitochondrial dysfunction, thus interfering the apoptosis process, which may be an important mechanism of the occurrence and development of cervical cancer.

Keywords adenine nucleotide translocator; cervical cancer; cell apoptosis; Uighur women

收稿日期:2013-11-28;修回日期:2014-04-30

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2011211A039)

作者简介:金华,副主任医师,研究方向为妇科恶性肿瘤放化疗,电子信箱:jinhua5616@sina.com;程静新(通信作者),主任医师,研究方向为妇科恶性肿瘤诊疗,电子信箱:13899899061@17288.com

引用格式:金华,马翔宇,郭霞,等.线粒体腺苷酸转运体在宫颈癌组织中的表达变化及其与细胞凋亡的关系[J].科技导报,2014,32(16):20-23.

宫颈癌是一种妇科恶性肿瘤,新疆地区维吾尔族妇女宫颈癌发病率高(490/100000~526/100000),死亡率是新疆其他民族平均水平的3~4倍,在全国少数民族中居第1位^[1-3]。开展宫颈癌及癌前病变的基础和临床研究,阐释族群高发机制和早期诊断治疗是新疆高发肿瘤面临的重大挑战。

细胞凋亡的改变在宫颈癌发生发展中起重要作用,而线粒体功能紊乱是启动凋亡的关键因素之一^[4]。线粒体腺苷酸转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)在维持线粒体正常能量代谢中发挥着关键作用^[5]。目前ANT在心肌细胞代谢中的报道甚多,但是ANT的表达变化所介导的细胞凋亡过程异常与宫颈癌发生的关系尚未明确。本研究选取本地区宫颈癌高发人群维吾尔族妇女宫颈病变样本资源,针对ANT家族蛋白以及凋亡相关关键分子进行mRNA和蛋白表达水平筛查分析,以确定ANT表达与宫颈癌的发生及细胞凋亡之间的关系,揭示宫颈癌的发生与发展的生物学本质。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2012年10月至2013年6月在新疆医科大学附属肿瘤医院妇科收治的维吾尔族妇女浸润性宫颈癌(invasive cervical cancer, ICC)组织38例作为实验组,收集同期新疆维吾尔族妇女良性病变行子宫切除患者正常或者慢性宫颈炎宫颈组织32例作为对照,其年龄分布在27~58岁,中位年龄(48.32±7.65)岁。其中临床分期情况:Ia 7例, Ib 8例, IIa 5例, IIb 9例, IIIa 3例, IIIb 6例。肿瘤分化程度:高分化10例,中分化17例,低分化11例。淋巴结是否转移:盆腔淋巴结肿大9例,腹膜后淋巴结肿大5例,锁骨上淋巴结肿大1例。脉管瘤栓:脉管有癌栓的5例。38例无1例神经浸润。纳入病例时排除已接受过肿瘤手术切除或放疗的患者,同时排除患有子宫切除或骨盆放射治疗史、其他恶性肿瘤以及呼吸系统、心血管和代谢性疾病等其他严重疾病的患者。所有组织标本均经病理学确诊,并且与患者签署知情同意后收集。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol试剂(Invitrogen公司,美国);荧光定量PCR试剂盒、逆转录所需的dNTPs及逆转录酶、100 bp DNA Ladder Marker(北京康润生物公司);ABI Prism 7500荧光定量PCR仪(ABI公司,美国)。ANT3、Bax、Bcl-2、P53特异性单克隆抗体(Santa Cruz和Anbio公司,美国),酶标二抗(北京中杉金桥生物技术公司),光学显微镜(BA210, Motic公司,中国香港),原位细胞凋亡检测试剂盒(Roche公司,美国)。

1.3 荧光实时定量PCR检测

1) 引物设计合成。由美国国立生物技术信息中心(national center of biotechnology information, NCBI)基因库获知人ANT1、ANT2、ANT3、Bax、Bcl-2、p53和内参照GAPDH基因的序列,按照原则设计和扩增这6种基因的引物,引物由北京康

润生物公司合成。所设计引物的序列如下:ANT1(356 bp)F: 5' AATAAAAGCAGGGCAGGCTAGT3', R: 5' AGAGGCTGAGG GTTCTAGGAAT3'; ANT2(283 bp) F: 5' AAATCGGCCATTT-GCTTCGCT3', R: 5' TGGGAATACGGACCACGCAG3'; ANT3(235 bp) F: 5' CGACGCCCTCCATTCACTCTC3', R: 5' CACGATGCCCTGTACTGCTTG3'; Bcl-2(408 bp) F: 5' ACAACATCGCC CTGTGGATGAC3', R: 5' ATAGCTGATTGACGTTTTTGCC3'; Bax(477 bp) F: 5' GGCCACCAGCTCTGAGCAGA3', R: 5' GC CACGTGGGCGT CCCAAAGT3'; p53(277 bp) F: 5' GTGCTTTC CACGACGGTGAC3', R: 5' GGAGCAGCCTCTGGCATTCT3'。

2) RNA提取、cDNA合成和荧光定量PCR反应。采用Trizol法提取RNA后逆转录合成cDNA,按照荧光定量PCR试剂盒说明书进行操作。反应体系:扩增条件下,循环40次,荧光定量PCR仪扩增并采集数据,根据数据分别绘制2种样品的标准曲线。

1.4 蛋白免疫印迹

选择在Q-PCR结果中2组间差异有统计学意义的基因,对其蛋白的表达含量进行测定。取宫颈组织0.5 g,剪碎加入细胞裂解液,冰上匀浆裂解40 min, 12000 r/min离心5 min,收集上清液进行蛋白定量(BCA法)。取40 μg总蛋白进行12.5%变性SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移,丽春红S染色,封闭非特异性的结合位点, TBST洗膜,然后加入预测蛋白的一抗孵育1 h。TBST洗膜后加入结合有辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔的IgG二抗孵育1 h,化学发光、显影、定影, GAPDH蛋白作为内参照。

1.5 TUNEL染色

将宫颈组织置于10%福尔马林中固定24 h后,常规石蜡包埋切片,片厚4 μm。应用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TDT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)检测宫颈组织凋亡细胞,按照TUNEL试剂盒说明书操作。TUNEL染色阳性细胞为胞核中出现棕黄色颗粒,每个切片随机选取5个高倍视野(400×)观察计数,根据公式:凋亡指数(AI)=(凋亡细胞数/细胞总数)×100%计算,取其平均凋亡指数。

1.6 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行数据统计处理,资料分析采用Student's *t* test检验;所有数据间的统计学差异均以*P*值表示,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光定量PCR检测结果

设正常对照慢性宫颈炎组的表达数据为1,宫颈癌组与其比较,由图1可以直观地看出,与正常对照组相比,p53、Bax在宫颈癌患者宫颈组织中表达降低,而Bcl-2和ANT3表达升高,且差异有统计学意义(*P*<0.05)。ANT1和ANT2在两组之间的比较差异无统计学意义。

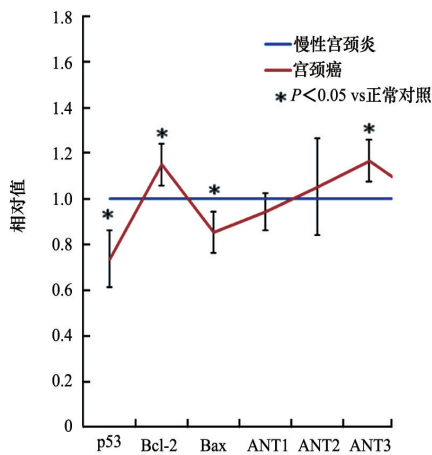
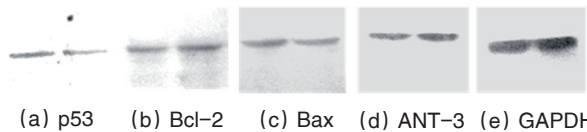


图1 宫颈癌与正常对照慢性宫颈炎患者宫颈组织中ANT1、ANT2、ANT3、Bax、Bcl-2、p53 mRNA水平表达比较
Fig. 1 Comparative analysis of the mRNA expressions of ANT1, ANT2, ANT3, Bax, Bcl-2, p53 in the cervical cancer and cervicitis groups

2.2 蛋白免疫印迹结果

以正常对照组慢性宫颈炎组的表达数据为1,宫颈癌组与其比较,由图2和图3可以直观的看出,与正常对照组相



注:左侧条带是慢性宫颈炎组,右侧条带是宫颈癌组
图2 宫颈癌与正常对照慢性宫颈炎患者宫颈组织中p53蛋白(a)、Bcl-2(b)、Bax(c)、ANT3(d)、GAPDH(e)WB检测结果

Fig. 2 WB result of p53 (a), Bcl-2(b), Bax(c), ANT3(d), GAPDH (e) in the cervical cancer and cervicitis groups

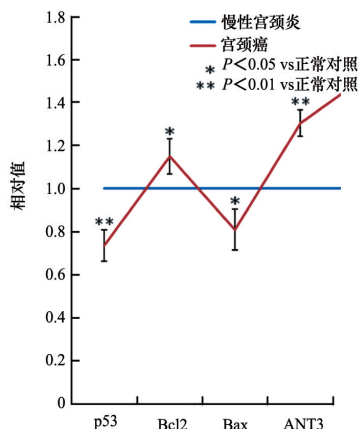


图3 宫颈癌与正常对照慢性宫颈炎患者宫颈组织中ANT3、Bax、Bcl-2、p53蛋白水平表达比较
Fig. 3 Comparative analysis of the protein expressions of ANT3, Bax, Bcl-2, p53 in the cervical cancer and cervicitis groups

比,p53、Bax在宫颈癌患者宫颈组织中表达降低,而Bcl-2和ANT3表达升高,且差异均有统计学意义($P < 0.05$),并且p53和ANT3在两组之间的比较有显著差异($P < 0.01$)。Bcl-2/Bax比值在宫颈癌组中明显高于正常值($P < 0.05$)(图4)。

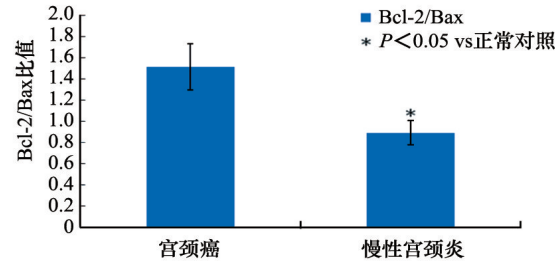


图4 Bcl-2/Bax比值在宫颈癌组与正常对照组间的比较
Fig. 4 Comparative analysis of Bcl-2/Bax ratio in the cervical cancer and cervicitis groups

2.3 TUNEL染色结果

通过对TUNEL反应阳性细胞的观察计数,计算每组的凋亡指数,结果显示正常对照慢性宫颈炎组的凋亡指数为(0.89±0.12)%,而宫颈癌组中AI升高至(1.51±0.22)%,两组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)(图5)。

从图5可以看出,正常宫颈上皮细胞核蓝染,凋亡细胞可见细胞核呈棕黄色,染色质凝聚、浓缩(TUNEL染色,400×)。

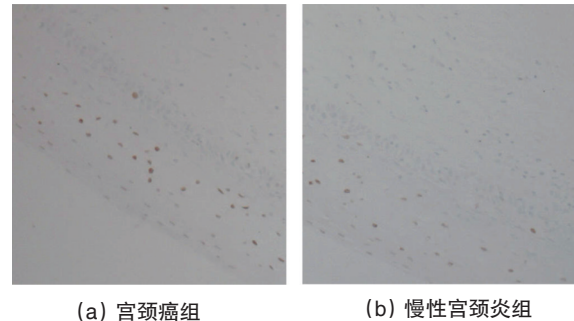


图5 TUNEL实验结果
Fig. 5 Result of TUNEL technique

3 讨论

研究表明,线粒体功能紊乱介导的细胞凋亡过程异常与肿瘤的形成和发展有密切的关系^[6]。近年来,针对细胞凋亡在肿瘤发生与进程中的作用进行了大量研究,但结论产生分歧,有时甚至截然相反。本研究运用TUNEL技术检测发现在宫颈癌组织中凋亡指数明显高于正常对照宫颈炎组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),这与Lipponen等^[7,8]的研究一致,发现在膀胱癌、乳腺癌患者中细胞凋亡指数高者预后差,且凋亡指数与增殖指标正相关,认为是肿瘤生长到一定程度,肿瘤细胞增殖和死亡维持相对平衡,凋亡作用淘汰某些癌变有困难的细胞,选择更具有侵袭力的细胞群,从而促进肿瘤的发展,导致肿瘤的转移。但是Brambilla等^[9]研究发现,较低的凋

亡指数预示生存期缩短,预后较差,认为凋亡作用作为机体抑制细胞过度生长的一种自稳机制而抑制肿瘤的发生和发展。因此认为,对不同的肿瘤,凋亡所起的作用可能不同;同一种肿瘤,在不同的阶段,凋亡所起的作用也可能不同,这提示还不能认为凋亡指数是反应细胞生物学行为的一个稳定而独立的指标。

线粒体启动细胞凋亡机制在于其内膜上一种通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)的形成^[10]。位于线粒体内膜上的腺苷酸转运体 ANT 是线粒体内膜的通透性转运(PT)的主要参与者。ANT 是核基因编码的蛋白,分子量约 34 kD。人体中,主要存在 ANT1、ANT2、ANT3、ANT4 4 个亚型^[11]。线粒体膜通透性转运孔(mPTP)是线粒体内外膜接触区的一个多蛋白复合物结构,主要由位于线粒体外膜的电压依赖式离子通道(VDAC)和位于线粒体内膜的 ANT 构成。PT 孔的开放可以导致线粒体渗透性转运,使线粒体肿胀,外膜破碎,线粒体内膜渗透性增加,膜电位瓦解,ATP 合成受到抑制,线粒体释放一些前凋亡因子,如:凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF),细胞色素 c (cytochrome c, Cyt-c)等,引起线粒体的凋亡^[12]。本研究发现,与宫颈炎组相比,ANT1、ANT2、ANT3 在宫颈癌组织中 mRNA 水平均是表达升高,而抑癌基因 p53 表达降低。在 mRNA 和蛋白质水平, p53 表达降低和 ANT3 表达升高(宫颈癌组)均具有统计学意义($P < 0.05$)。说明 ANT3 的表达升高与宫颈癌的发生具有相关性。目前有研究报道,ANT 家族蛋白参与肿瘤细胞代谢的重要关键分子,ANT1 和 ANT3 能够促进细胞凋亡,而 ANT2 和 ANT4 是对细胞凋亡具有抑制作用^[13],有学者认为 ANT 可能是抗肿瘤治疗的靶点^[14,15]。

此外,本研究又分别检测了 Bcl-2 和 Bax 这 2 种凋亡关键分子,发现与正常对照组比较,在 mRNA 和蛋白质水平, Bcl-2 在宫颈癌组织中的表达均明显升高,而 Bax 的表达均明显下降, Bcl-2/Bax 值显著升高($P < 0.05$)。与此同时,ANT 家族分子均表达升高,可见 ANT 的表达调控与 Bcl-2 和 Bax 密切相关。研究证实,PT 孔的结构还受到 Bcl-2 家族中 Bax 和 Bcl-2 的调控, Bcl-2 维持 ANT 的转运活性,而 Bax 抑制 ANT 的转运功能^[16]。而 Bcl-2 是细胞凋亡的抑制基因之一,其在多种肿瘤细胞内呈高表达,而促凋亡分子 Bax 呈低表达。由于细胞死亡的易感性受控于胞质内 Bcl-2 和 Bax 间的平衡, Bcl-2/Bax 比值增大使细胞凋亡过度抑制,导致肿瘤细胞以绝对的优势获得生长,并对凋亡信号不再敏感,这种“一边倒”的生长模式打破了正常细胞的凋亡机制,使得肿瘤细胞不断发展、恶化^[17]。

4 结论

阐释了 ANT 的异常表达在线粒体介导的细胞凋亡与宫颈癌的发生发展的关系,为揭示宫颈癌的发生发展机制及新疆维吾尔自治区宫颈癌的早期预警提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] 刘开江, 刘继文, 李晓荣, 等. 新疆维、汉妇女宫颈癌发病危险因素的流行病学研究[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(10): 1335-1338.
- [2] 拉莱·苏祖克, 彭玉华, 周康, 等. 新疆不同民族宫颈癌发病趋势分析[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(7): 569-571.
- [3] 张国庆, 刘开江, 赖小军, 等. 新医大附属肿瘤医院 1989—2002 年住院病人恶性肿瘤分布[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(4): 393-395.
- [4] Jourdain A, Martinou J C. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009, 41(10): 1884-1889.
- [5] Duarte F V, Gomes A P, Teodoro J S, et al. Dibenzofuran-induced mitochondrial dysfunction: Interaction with ANT carrier[J]. Toxicology in Vitro, 2013, 27(8): 2160-2168.
- [6] Cirri P, Chiarugi P. Tumors and their stroma: Mitochondria at the crossroad[J]. Cell Cycle, 2013, 12(2): 204-205.
- [7] Lipponen P, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis[J]. Journal of Pathology, 1994, 173(4): 333-339.
- [8] Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma V A. Apoptosis in breast cancer as related histopathological characteristics and prognosis[J]. European Journal of Cancer, 1994, 30A(14): 2068-2073.
- [9] Brambilla E, Negoescu A, Gazzeri S, et al. Apoptosis related factors p53, Bcl-2, and Bax in neuroendocrine lung tumors[J]. American Journal of Pathology, 1996, 149(6): 1941-1952.
- [10] Vysokikh M Y, Brdiczka D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis[J]. Acta biochimica Polonica, 2003, 50(2): 389-404.
- [11] Liu Y, Chen X J. Adenine nucleotide translocase, mitochondrial stress, and degenerative cell death[J]. Oxid Med Cell Longevity, 2013, 2013: ID146860.
- [12] Halestrap A P, Brenner C. The adenine nucleotide translocase: A central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death[J]. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10(16): 1507-1525.
- [13] Gallerne C, Touat Z, Chen Z X, et al. The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010, 42(5): 623-629.
- [14] Belzacq A S, Brenner C. The adenine nucleotide translocator: A new potential chemotherapeutic target[J]. Current Drug Targets, 2003, 4(7): 517-524.
- [15] Sharaf el dein O, Mayola E, Chopineau J, et al. The adenine nucleotide translocase 2, a mitochondrial target for anticancer biotherapy[J]. Current Drug Targets, 2011, 12(6): 894-901.
- [16] Belzacq A S, Vieira H L, Verrier F. Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity[J]. Cancer Research, 2003, 63: 541-546.
- [17] Chiu T L, Su C C. Curcumin inhibits proliferation and migration by increasing the Bax to Bcl-2 ratio and decreasing NF- κ Bp65 expression in breast cancer MDA-MB-231 cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2009, 23(4): 469-475.

(责任编辑 吴晓丽)