

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.003

致凋亡的声动力疗法诱导巨噬细胞线粒体钙升高的机制研究 *

高维伟¹ 盛思琪¹ 曹正宇² 谭凡成³ 田野^{2,3△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院心血管病研究所 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学附属第一医院心内科 黑龙江 哈尔滨 150001; 3 哈尔滨医科大学病理学与病理生理学教研室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:研究致凋亡的声动力疗法诱导巨噬细胞线粒体钙升高的机制。**方法:**应用佛波酯(PMA)诱导 THP-1 单核细胞分化为巨噬细胞进行实验研究。选用 5-氨基酮戊酸(ALA)作为声敏剂,进行声动力治疗(SDT)。应用流式细胞术证实 SDT 显著促进了细胞凋亡;应用 Rhod 2/AM 实时监测线粒体 Ca^{2+} 水平;通过蛋白质免疫印迹对全细胞蛋白中的 Bax、Cleaved-caspase3、电压依赖性阴离子通道 1(VDAC1)和三磷酸肌醇 III 型受体(IP3R-III)进行检测;应用 VDAC1 抗体进行免疫共沉淀,检测 VDAC1 和 IP3R-III 之间的相互作用;实时监测线粒体 Ca^{2+} 水平,检测 VDAC 抑制剂 DIDS 和 IP3Rs 抑制剂 2-ABP 对 SDT 效果的影响。**结果:**与对照组相比,仅 SDT 组出现了显著的细胞凋亡($P<0.001$)。与对照组相比,ALA 对线粒体 Ca^{2+} 水平无明显影响,超声诱导了线粒体 Ca^{2+} 水平的明显升高,SDT 诱导了线粒体 Ca^{2+} 水平快速且大幅度的升高,且去除超声后仍维持在较高水平。与对照组相比,超声对 Bax、Cleaved-caspase3、VDAC1 和 IP3R-III 的表达无明显影响,ALA 诱导了 VDAC1($P<0.01$)和 IP3R-III 表达量的增加($P<0.05$),SDT 诱导了 Bax($P<0.001$)、Cleaved-caspase3($P<0.001$)、VDAC1($P<0.01$)和 IP3R-III($P<0.05$)表达量的增加,VDAC1 和 IP3R-III 的增加幅度与 ALA 组接近;ALA 和 SDT 均诱导了 VDAC1 和 IP3R-III 之间相互作用的显著增强($P<0.05$)。DIDS 和 2-ABP 均明显抑制了 SDT 诱导的线粒体 Ca^{2+} 增加。**结论:**在致凋亡的 SDT 作用于 THP-1 巨噬细胞的过程中,ALA 诱导了线粒体外膜 Ca^{2+} 转运通道 VDAC1 和内质网重要 Ca^{2+} 转运通道 IP3R-III 的表达量增加与二者间相互作用的增强,在内质网和线粒体之间建立了大量的 Ca^{2+} 转运通道,超声的作用则在于触发这些 Ca^{2+} 转运通道的开放,进而引发线粒体钙的迅速增加。这是后续线粒体凋亡通路启动的重要机制之一。

关键词:SDT; 巨噬细胞; VDAC1; IP3R-III; Ca^{2+}

中图分类号:R-33;R331.36;Q244;Q68;Q582 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2019)07-1212-06

Mechanism Research on Mitochondrial Calcium Increase in Macrophage induced by Apoptotic Sonodynamic Therapy*

GAO Wei-wei¹, SHENG Si-qi¹, CAO Zheng-yu², TAN Fan-cheng³, TIAN Ye^{2,3△}

(1 Cardiovascular Institute, The 1st Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department of Cardiology, The 1st Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

3 Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism by which sonodynamic therapy (SDT) initiated the mitochondrial calcium increase in macrophages. **Methods:** THP-1 monocytes were differentiated into macrophages by adding PMA. For SDT, ALA was used as sonosensitizer. Flow cytometry was used to certify the SDT-induced apoptosis of macrophages. Real-time detection of mitochondrial Ca^{2+} indicated by Rhod 2/AM was applied. Whole cell lysates were aquired. Bax, Cleaved caspase3, voltage dependent anion channel 1 (VDAC1) and inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor III (IP3R-III) were separately detected by Western blot. Primary antibodies against VDAC1 were used for immunoprecipitation to analyze interactions between VDAC1 and IP3R-III. 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-ABP) were separately used to inhibit functions of VDAC1 and IP3R-III, real-time detection of mitochondrial Ca^{2+} was conducted again. **Results:** Compared with the control group, only SDT induced obvious increase of cell apoptosis ($P<0.001$). Compared with the control group, ALA showed no significant effect to mitochondrial Ca^{2+} level, ultrasound induced obvious increase of mitochondrial Ca^{2+} level, SDT led to rapid and sharp increase of mitochondrial Ca^{2+} level which sustained at high level even after ultrasound exposure like the ultrasound group. Compared with the control group, ultrasound showed no obvious effect to the proteins, ALA induced marked upregulation of VDAC1 ($P<0.01$) and IP3R-III ($P<0.05$), SDT led to significant upregulation of Bax ($P<0.001$), Cleaved-caspase3 ($P<0.001$), VDAC1 ($P<0.01$) as well as IP3R-III ($P<0.05$). Enhanced interactions between VDAC1 and IP3R-III were observed in ALA and SDT groups($P<0.05$). SDT-induced increase of mitochondrial Ca^{2+} level were markedly weakened by

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81371709)

作者简介:高维伟(1989-),硕士,研究实习员,主要研究方向:细胞凋亡的机制研究, E-mail: jcyxgww@163.com

△通讯作者:田野, E-mail: yetian@ems.hrbmu.edu.cn

(收稿日期:2018-08-07 接受日期:2018-08-31)

DIDS and 2-ABP. **Conclusions:** During the course of apoptotic SDT, ALA induced the upregulation of VDAC1 and IP3R-III, as well as the enhanced interactions between the proteins, thus building lots of channels for Ca^{2+} transition between endoplasmic reticulum and mitochondria. While the main function of ultrasound is to trigger the opening of these channels, thus leading to the rapid calcium increase in mitochondria. This may be an important mechanism of the following mitochondrial apoptosis pathway.

Key words: SDT; macrophage; VDAC1; IP3R-III; Ca^{2+}

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R331.36; Q244; Q68; Q582 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1212-06

前言

声动力疗法(Sonodynamic therapy, SDT)作为一种新型的治疗手段,能通过低频超声激活聚集在细胞内的声敏剂,靶向诱导细胞的凋亡^[1-3]。先前的研究已经证实,声敏剂 5-氨基酮戊酸(aminolevulinic acid, ALA)介导的 SDT 能靶向诱导体内的和体外的巨噬细胞经线粒体途径发生凋亡^[4-6],且线粒体外膜上表达丰富的 Ca^{2+} 转运通道电压依赖性阴离子通道 1(voltage dependent anion channel 1, VDAC1)在其中发挥了重要的作用^[4,7]。

由各种刺激所诱发的线粒体 Ca^{2+} 过度增加是细胞凋亡的重要诱因之一^[8,9]。细胞内的钙库内质网,通过“线粒体相关内质网膜”与线粒体之间密切相连,内质网膜上的三磷酸肌醇受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, IP3Rs)与 VDACs 蛋白之间通过近距离接触,进行 Ca^{2+} 输送^[10,11], Ca^{2+} 输送程度上的区别决定了细胞的存活与否^[12,13]。本研究使用人急性单核白血病细胞系(THP-1)诱导而成的巨噬细胞作为研究模型,应用 1 mM 的 ALA 联合 $0.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的超声进行声动力治疗,诱导细胞凋亡^[4,14]。着重探讨了致凋亡的 SDT 对线粒体 Ca^{2+} 水平的影响和作用机制,这将会为调控巨噬细胞的功能找到更多的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

THP-1 细胞系购买自美国 ATCC 公司。改良型 RPMI-1640 培养基和胎牛血清由 Hyclone 公司提供;100× 青霉素-链霉素溶液和 Hank's 平衡盐溶液购买自碧云天生物技术有限公司;PMA、ALA、DIDS 和 2-ABP 购买自 Sigma 公司;Rhod 2/AM 购买自 AAT Bioquest 公司;PBS 缓冲液由博士德公司提供;SDS-PAGE 凝胶试剂盒由北京索莱宝科技有限公司提供;凋亡检测试剂盒、脱脂奶粉和 IP3R-III 抗体购买自 BD 公司;VDAC1 抗体由武汉三鹰公司提供;Bax 抗体和 Cleaved-caspase3 抗体购买自 Cell signalling technology 公司;actin 抗体、HRP 兔二抗和 HRP 小鼠二抗购买自中杉金桥公司。

1.2 研究方法

1.2.1 THP-1 巨噬细胞的诱导 对数期生长的 THP-1 细胞,用改良型 RPMI-1640 培养基(含 10%胎牛血清、 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)调整细胞浓度为 $(3 \sim 5) \times 10^5$ 细胞/mL。向细胞悬液中加入 PMA 使其终浓度为 100 nM。将充分混匀的细胞悬液平铺于 35 mm 的细胞培养皿中,2 mL/孔。37℃, 5% CO_2 培养 48~72 h,使细胞分化为贴壁的巨噬细胞。

1.2.2 细胞基本分组及处理 ALA 组:将 ALA 粉末用 RPMI-1640 培养液溶解并稀释成 1 mM,1 mL/皿,37℃, 5% CO_2 孵育巨噬细胞 6 h;超声组:用等量的 RPMI-1640 培养液孵育

巨噬细胞 6 h 后,给予细胞 $0.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的超声波辐照,持续 5 min;SDT 组:用 1 mM 的 ALA 孵育细胞 6 h(同 ALA 组)后,给予 $0.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的超声波辐照,持续 5 min(同超声组)。各组细胞经处理后均放置在 37℃、5% CO_2 的细胞培养箱中继续培养。

1.2.3 超声波辐照 本研究使用的超声换能器、脉冲发生器和功率放大器均由哈尔滨工业大学组装。国产的超声换能器(直径 35 mm,共振频率 1 MHz,占空因数 10%,重复频率 100 Hz)置于 30 cm 除气水柱下方,细胞培养皿置于水柱顶端。水听器监测超声波强度为 $0.5 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$,细胞避免暴露于超声 5 min^[4,14]。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 超声波辐照过后 6 h,将贴壁的巨噬细胞用 4℃ 的 PBS 洗涤 2 次;用胰酶细胞消化液处理获得细胞悬液;用 4℃ 的 PBS 重悬洗涤细胞 3 次;每份细胞样品用 100 μL 的 1× Binding Buffer 重悬,加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 染液室温下避光孵育 10 min,再加入 5 μL 的 PI 染液避光孵育 5 min;每份细胞样品加入 400 μL 的 1× Binding Buffer 终止染色;用 200 目的滤网过滤各组细胞;上机检测。

1.2.5 实时监测线粒体 Ca^{2+} 水平 贴壁的巨噬细胞经 ALA 孵育 6 h 后,用胰酶细胞消化液处理获得细胞悬液;用 4℃ 的 PBS 重悬洗涤细胞 3 次;用 Hank's 平衡盐溶液重悬细胞,将细胞加入荧光分光光度计配套的石英杯内;应用荧光分光光度计记录细胞内的 Rhod 2/AM 荧光强度数值(激发波长 549 nm,发射波长 578 nm),1 min 后从石英杯的顶部经封闭的水柱给予超声波辐照,持续 5 min,超声结束后继续监测 4 min,获得 Rhod 2/AM 的时间-强度曲线。

1.2.6 全细胞蛋白的提取和免疫共沉淀 超声波辐照过后 5 h,去除细胞上清,用 4℃ 的 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次;向各皿中加入 60 μL Western 及 IP 细胞裂解液(含 1 mM PMSF)裂解一个培养皿的细胞并收集于 1.5 mL 的 EP 管中;冰上孵育 30 min,每隔 10 min 涡旋震荡 30 s;4℃、12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min;将上清收集于新的冷 EP 管中;应用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组样品的蛋白浓度;应用 Western 及 IP 细胞裂解液(含 1 mM PMSF)将各组蛋白样品调整至等浓度和等体积;从各组中分出 400 mg 蛋白样品,加入 VDAC1 抗体,在 4℃ 摇匀器中混匀过夜,各组剩余样品则加入 5× SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液并在 100℃ 金属浴中加热、-80℃ 冻存;向各组蛋白-抗体混合液中加入琼脂糖珠,将样品放入 4℃ 摇匀器中混匀 1.5 h;1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集各管琼脂糖珠,用 Western 及 IP 细胞裂解液(含 1 mM PMSF)洗涤 3 次;向各管加入 80 μL 裂解液和 20 μL 5× SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液并在 100℃ 金属浴中加热 5-10 min;1500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集各管上清。

1.2.7 蛋白质免疫印迹/Western Blot 向 SDS-PAGE 凝胶的浓缩胶孔中依次加入等质量的蛋白样品,设置浓缩胶电压 80

V, 分离胶电压 100 V; 设置 0.3 A 的电流进行电转移, 将蛋白转至 PVDF 膜上; 将带有蛋白样品的 PVDF 膜浸泡于 5% 的脱脂牛奶 (含 0.1% Tween20) 中, 室温封闭 1.5 h; 用 1× TBST 缓冲液 (含 0.05% Tween20) 将抗体稀释至适当的浓度, 根据蛋白分子量裁剪的 PVDF 膜分别浸没于相应的抗体稀释液中, 4℃ 摇床中孵育过夜; 用 1× TBST 缓冲液 (含 0.05% Tween20) 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/ 次; 室温下用二抗孵育 PVDF 膜 1.5 h; 用 1× TBST 缓冲液 (含 0.05% Tween20) 洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/ 次; 应用 Bio-Rad 扫描仪进行 ECL 显色。

1.3 数据统计与分析

本实验中的数据均以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。两组数据间的比较采

用 t 检验, 多组数据比较采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。应用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计学分析和作图。

2 结果

2.1 SDT 诱导 THP-1 巨噬细胞凋亡率增加

与对照组细胞相比, 经 1 mM ALA 孵育 6 h 的细胞凋亡率无明显提升 ($P > 0.05$), 经超声作用后的细胞凋亡率略有增加 ($P > 0.05$), 经 SDT 作用后的细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.001$)。结果见图 1A、1B。说明 SDT 诱导了显著的 THP-1 巨噬细胞凋亡。

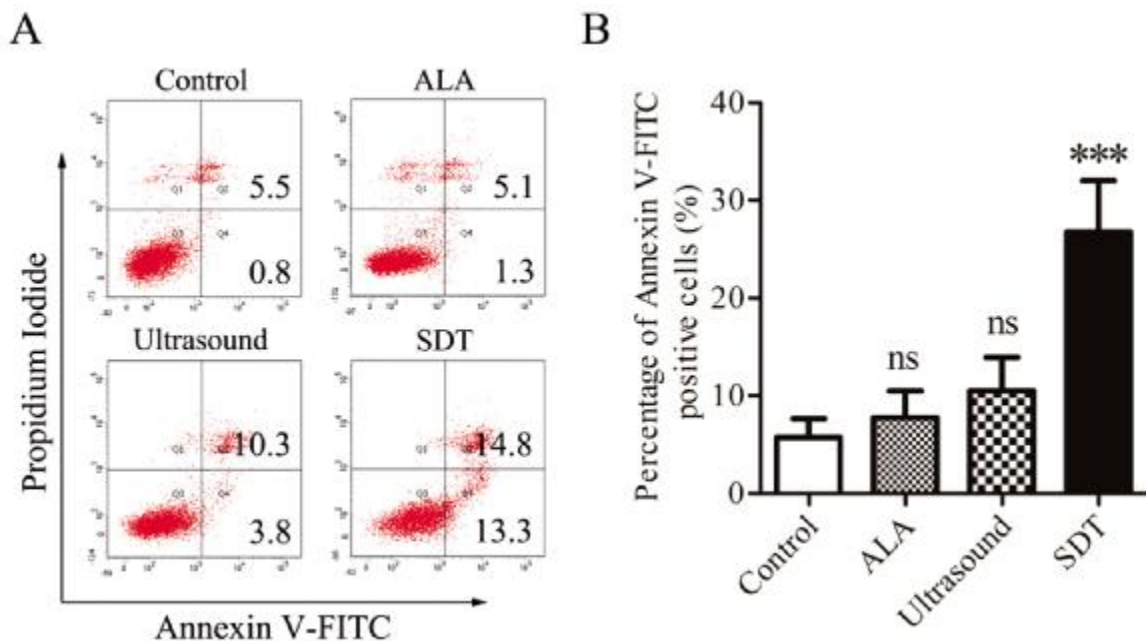


图 1 SDT 诱导 THP-1 巨噬细胞凋亡增加

Fig.1 SDT increased the apoptosis of THP-1 macrophages

注: A 流式细胞术检测细胞凋亡率结果, Q1 区域代表坏死细胞, Q2 区域代表晚期凋亡的细胞, Q3 区域代表存活细胞, Q4 区域代表早期凋亡细胞; B: 细胞凋亡率的统计图。*** $P < 0.001$ vs 对照组, ns $P > 0.05$ vs 对照组。

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. A Apoptosis rates detected by flow cytometry, Q1 area represents necrotic cells, Q2 area represents late apoptotic cells, Q3 area represents living cells, Q4 area represents early apoptotic cells; B Histogram of cell apoptosis rates. *** $P < 0.001$ vs control group, ns $P > 0.05$ vs control group.

2.2 SDT 诱导 THP-1 巨噬细胞线粒体 Ca^{2+} 升高

应用 Rhod 2/AM 标记线粒体内的 Ca^{2+} 。实时监测线粒体内的 Rhod 2/AM 荧光信号, 结果显示: 与对照组相比, ALA 对线粒体 Ca^{2+} 水平的影响较弱; 超声诱导了线粒体 Ca^{2+} 水平的缓慢升高, 去除超声后线粒体 Ca^{2+} 仍维持在较高水平; SDT 在超声开始后诱导了 Ca^{2+} 水平即刻且大幅度的升高, 去除超声后线粒体 Ca^{2+} 仍维持在较高水平, 结果见图 2。

2.3 ALA、超声和 SDT 对 Bax、Cleaved-caspase3、VDAC1 和 IP3R-III 的影响

应用 Western Blot 技术检测 ALA、超声和 SDT 对 Bax、Cleaved-caspase3、VDAC1 和 IP3R-III 蛋白表达量的影响。与对照组相比, ALA 组和超声组的 Bax 表达量略有升高 ($P > 0.05$), SDT 组的 Bax 表达量明显升高 ($P < 0.001$); 与对照组相比, ALA 组和超声组的 Cleaved caspase3 的表达量均略有升高 ($P > 0.05$), SDT 组的 Cleaved caspase3 表达量显著升高 ($P < 0.001$); 与对照组相比, 超声组 VDAC1 变化不显著 ($P > 0.05$), ALA 组和 SDT 组的 VDAC1 表达量均显著升高 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 超声组的 IP3R-III 变化不显著 ($P > 0.05$), ALA 组和 SDT 组的 IP3R-III 表达量均显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图 3A、3B。

001); 与对照组相比, 超声组 VDAC1 变化不显著 ($P > 0.05$), ALA 组和 SDT 组的 VDAC1 表达量均显著升高 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 超声组的 IP3R-III 变化不显著 ($P > 0.05$), ALA 组和 SDT 组的 IP3R-III 表达量均显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图 3A、3B。

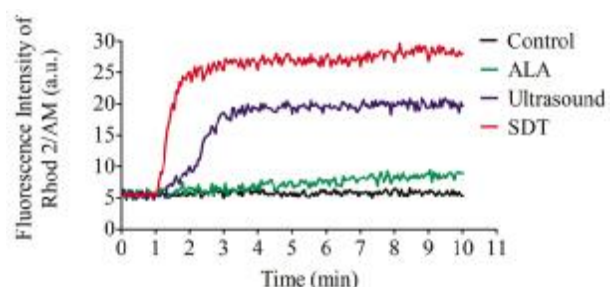


图 2 对线粒体 Ca^{2+} 进行实时监测的结果

Fig.2 Results of real-time detection of mitochondrial Ca^{2+}

应用 VDAC1 抗体进行免疫共沉淀反应,应用 Western blot 技术对样品中的 VDAC1 和 IP3R-III 进行检测。结果显示,与对照组相比,超声组未呈现出明显的蛋白间相互作用($P>0.05$),

ALA 组和 SDT 组 VDAC1 与 IP3R-III 之间的相互作用均显著增强($P<0.05$)。说明 SDT 诱导的 VDAC1 和 IP3R-III 的表达上调与相互作用增强主要由 ALA 导致。结果见图 3C、3D。

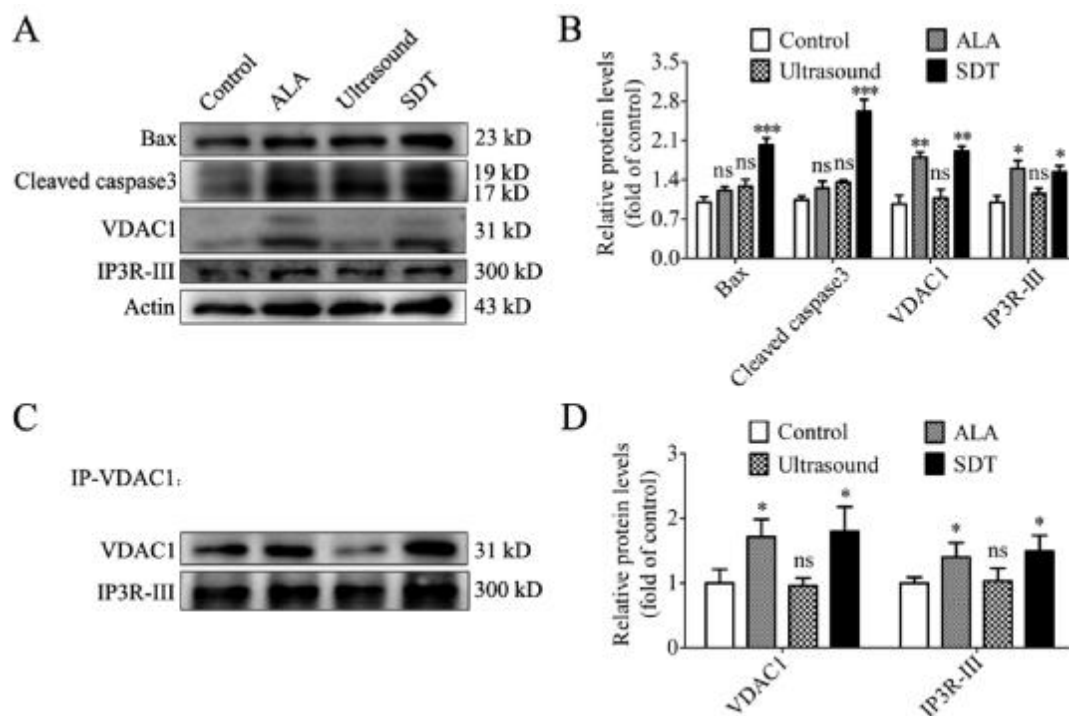


图3 Western blot 和免疫共沉淀的检测结果

Fig.3 Results of Western blot and immunoprecipitation

注:A Western blot 检测 ALA、超声和 SDT 对 Bax、Cleaved caspase3、VDAC1 和 IP3R-III 表达量的影响;B Western blot 结果的统计图;C 免疫共沉淀检测 ALA、超声和 SDT 对 VDAC1 与 IP3R-III 相互作用的影响;D 免疫共沉淀结果的统计图。与对照组比较,* $P<0.05$ vs 对照组,** $P<0.01$ vs 对照组,*** $P<0.001$ vs 对照组,ns $P>0.05$ vs 对照组。

Note: Data were expressed as $\bar{x} \pm SD$, $n=3$. A Effects of ALA, ultrasound and SDT on expression of Bax, Cleaved caspase3, VDAC1 and IP3R-III tested by Western blot; B Histogram of Western blot; C Effects of ALA, ultrasound and SDT on interactions between VDAC1 and IP3R-III tested by immunoprecipitation; D Histogram of immunoprecipitation. * $P<0.05$ vs control group, ** $P<0.01$ vs control group, *** $P<0.001$ vs control group, ns $P>0.05$ vs control group.

2.4 IP3Rs 抑制剂 2-ABP 和 VDAC 抑制剂 DIDS 抑制 SDT 诱导的线粒体 Ca^{2+} 升高

实时监测线粒体内的 Rhod 2/AM 荧光信号,结果显示:与对照组相比,DIDS 和 2-ABP 对线粒体 Ca^{2+} 水平无明显影响;经 DIDS 和 2-ABP 作用后,SDT 诱导的线粒体 Ca^{2+} 升高幅度显著减小(图 4)。说明 VDAC 和 IP3Rs 在 SDT 诱导线粒体 Ca^{2+} 的快速升高中发挥了重要的作用。

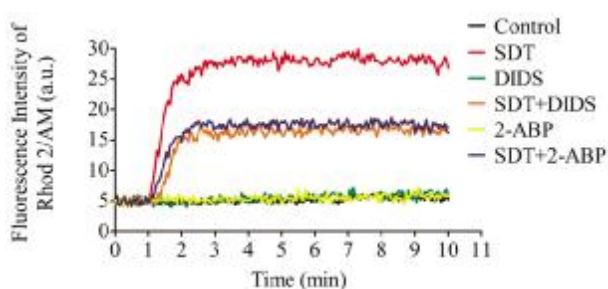


图4 DIDS 和 2-ABP 抑制 SDT 诱导的线粒体 Ca^{2+} 升高

Fig.4 Inhibition of SDT-induced mitochondrial Ca^{2+} increase by DIDS and 2-ABP

3 讨论

先前有关 SDT 的机理研究,多围绕活性氧(Reactive oxygen species, ROS)展开,认为 SDT 对靶细胞的杀伤作用主要通过生成大量的 ROS 实现^[15-17]。以 ALA 介导的 SDT 治疗巨噬细胞的研究已经证实,细胞主要经由线粒体 caspase 途径发生凋亡^[45],且在一定范围内逐渐增大超声强度,能导致细胞内 ROS 产量增加的幅度得到逐步的提升^[18]。基于大量文献提示了 Ca^{2+} 与 ROS 之间的相互促进作用^[19-22],且线粒体是 ALA 代谢产生的原卟啉 IX (PpIX)聚集并发挥声敏性作用的主要场所^[23,24],本研究试图阐明致凋亡的 SDT 对巨噬细胞线粒体 Ca^{2+} 水平的影响及可能的作用机制,为优化 SDT 的治疗条件和靶向调节巨噬细胞的功能找到更多的靶点。

针对 THP-1 巨噬细胞的研究显示,经 ALA 介导的 SDT 作用后,细胞内的 ROS 产量显著增加,同时伴随着细胞内 Ca^{2+} 水平的明显升高;而对 ROS 和 Ca^{2+} 二者之一的作用进行抑制,同时都会对另外一种因素产生抑制作用;且抑制作用的最终结果均体现为细胞凋亡的减少^[4]。这在全细胞的层面上肯定了 Ca^{2+}

和 ROS 相互促进作用以及这种作用对细胞凋亡的重大意义。而在细胞器层面上,进入线粒体基质的 Ca^{2+} 能有效促进线粒体内的氧化磷酸化反应,在促进 ATP 生成的同时伴随着 ROS 的产生,过度增加的线粒体 Ca^{2+} 则会造成 ROS 的过量生成,导致氧化应激的发生^[20,22]。线粒体在短时间内快速摄取的 Ca^{2+} 主要来自于内质网和细胞浆^[20],而内质网的 Ca^{2+} 浓度与细胞外接近并远高于细胞浆^[9]。健康细胞内的一部分线粒体即靠近内质网的 Ca^{2+} 释放位点分布,以维持线粒体代谢对 Ca^{2+} 的需要,因而内质网和线粒体的连接处具有相对较高的 Ca^{2+} 浓度。在此处,内质网膜上的 IP3Rs 和线粒体外膜上的 VDACs 通过 Grp75 蛋白相连接^[10],从 IP3Rs 处释放的 Ca^{2+} 在电化学梯度的驱动下,经由 VDACs 孔蛋白跨越线粒体外膜后,再经由线粒体内膜上的线粒体钙单向转运体(MCU)进入线粒体基质^[11]。从内质网到线粒体短暂的 Ca^{2+} 释放会促进线粒体 ATP 的产生,而持续的 Ca^{2+} 释放会最终导致线粒体通透性转运孔(mPTP)的开放,进而激活线粒体凋亡通路^[20]。

在本研究中,我们首先应用 SDT 诱导了显著的 THP-1 巨噬细胞凋亡(图 1A、1B),明确了 SDT 的致凋亡效应。之后在同等条件下开展了对线粒体 Ca^{2+} 的变化及其规律的研究。通过实时记录超声辐照前后 10 min 内线粒体 Ca^{2+} 水平的变化,发现 SDT 诱导了线粒体 Ca^{2+} 水平即刻且大幅度的升高,且这一变化由超声直接触发(图 2)。而先前的研究显示,ROS 的生成同样由超声触发^[4,18],这与本研究中 Ca^{2+} 的变化规律极为相似,说明 SDT 作用过程中的 ROS 与 Ca^{2+} 可能同步变化并相互影响。在健康细胞中,位于“线粒体相关内质网膜”处的多种蛋白,本身即具备产生 ROS 的能力,ROS 产生后近距离作用于 IP3R-III 和 VDAC1 等 Ca^{2+} 转运通道,能够促进从内质网到线粒体的 Ca^{2+} 输送^[21]。我们猜测,超声迅速强化了这类蛋白产生 ROS 的能力,从而更有效地活化了各种通道对 Ca^{2+} 的转运。不可忽略的是,ALA 对线粒体 Ca^{2+} 水平无明显影响,却导致了 SDT 组线粒体 Ca^{2+} 水平明显高于超声组,说明 ALA 可能强化了 Ca^{2+} 转运通道的作用。

先前的研究已经证实了 VDAC1 对线粒体凋亡途径的促进作用^[9],故本研究从蛋白水平上检测了 ALA、超声和 SDT 对 Bax、Cleaved caspase3、VDAC1 和 IP3Rs 中较为常见的 IP3R-III 的影响。结果显示,ALA 在不引起 Bax 表达增加和 Cleaved caspase3 激活的前提下,能够诱导 VDAC1 和 IP3R-III 表达的上调,且蛋白表达的升高幅度与 SDT 组接近(图 3A、3B)。进一步的研究显示,ALA 同样促进了 VDAC1 与 IP3R-III 相互作用的增强,且效果与 SDT 组接近(图 3C、3D)。说明 ALA 为超声触发线粒体 Ca^{2+} 升高建立了结构基础。ALA 被吸收进入巨噬细胞后,经细胞内代谢产生具有较强声敏性的原卟啉 IX (PpIX)蓄积于线粒体处^[22,23]。在长达 6 h 的作用过程中,线粒体内过量聚集的 PpIX,可能干扰了线粒体内的复杂的信号转导通路,进而改变了线粒体乃至全细胞内部分蛋白的表达水平。为进一步验证 VDACs 与 IP3Rs 对线粒体 Ca^{2+} 水平的影响,我们应用 DIDS 和 2-ABP 分别抑制了 VDACs 和 IP3Rs 的作用,并证实 SDT 诱导的线粒体 Ca^{2+} 增加受到了明显的抑制(图4)。说明 VDACs 和 IP3Rs 在 SDT 诱导的线粒体 Ca^{2+} 升高中发挥了重要的作用。

综上所述,ALA 长时间作用于巨噬细胞诱导了 VDAC1 和 IP3R-III 蛋白表达量的增加和二者间相互作用的增强,在内质网和线粒体之间建立了更多的 Ca^{2+} 转运通道,超声直接造成了通道的开启,导致了 Ca^{2+} 转运的发生。这提示我们,通过调整线粒体内的 Ca^{2+} 水平,能够改变细胞的存活状态。而对声敏性药物的种类和用量的调整,可能会同时诱导细胞内多种功能蛋白表达水平的改变。超声的短时间作用,主要触发了细胞内变化较为迅速的生化反应,诸如 ROS 产生和离子转运等等。对超声参数设置的改变,可能会对 ROS 的产生量和离子转运的幅度产生显著的影响,甚至改变细胞的命运。以往有关 SDT 的研究均偏重整体效应,试图通过适宜浓度的声敏剂联合适宜强度的超声诱导靶细胞发生特定的生物学变化。本研究在探讨致凋亡的 SDT 诱导线粒体 Ca^{2+} 水平变化机制的过程中,首次发现声敏剂 ALA 在不影响细胞存活的前提下,能够诱导细胞发生分子水平的变化,为超声进一步的发挥作用建立基础。本研究针对线粒体 Ca^{2+} 水平的变化展开,并未关注同一时间内细胞浆 Ca^{2+} 水平的变化。而对“线粒体相关内质网膜”中 Ca^{2+} 转运通道的研究也仅局限于 VDAC1 和 IP3R-III 两种较为常见的蛋白。在今后的研究中,我们将更为全面的探索 ALA 介导的 SDT 对 Ca^{2+} 转运的影响和机制,从而为优化 SDT 的作用效果找到更多的靶点。

参考文献(References)

- [1] Trendowski M. The promise of sonodynamic therapy [J]. Cancer metastasis reviews, 2014, 33(1): 143-160
- [2] Suehiro S, Ohnishi T, Yamashita D, et al. Enhancement of antitumor activity by using 5-ALA-mediated sonodynamic therapy to induce apoptosis in malignant gliomas: significance of high-intensity focused ultrasound on 5-ALA-SDT in a mouse glioma model[J]. J Neurosurg, 2018, 19: 1-13
- [3] Lv Y, Zheng J, Zhou Q, et al. Antiproliferative and Apoptosis-inducing Effect of exo-Protoporphyrin IX based Sonodynamic Therapy on Human Oral Squamous Cell Carcinoma[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40967
- [4] Chen H, Gao W, Yang Y, et al. Inhibition of VDAC1 prevents Ca^{2+} -mediated oxidative stress and apoptosis induced by 5-aminolevulinic acid mediated sonodynamic therapy in THP-1 macrophages [J]. Apoptosis, 2014, 19(12): 1712-1726
- [5] Li Z, Sun X, Guo S, et al. Rapid stabilisation of atherosclerotic plaque with 5-aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy[J]. Thromb haemost, 2015, 114(4): 793-803
- [6] Sun X, Guo S, Yao J, et al. Rapid inhibition of atherosclerotic plaque progression by sonodynamic therapy[J]. Cardiovasc Res, 2018
- [7] Shoshan-Barmatz V, De S. Mitochondrial VDAC, the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger, and the Ca^{2+} Uniporter in Ca^{2+} Dynamics and Signaling[J]. Adv Exp Med Biol. 2017, 981: 323-347
- [8] Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, et al. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8619-8627
- [9] Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012, 13(9): 566-578
- [10] Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca^{2+} channels[J]. J Cell Biol, 2006, 175(6): 901-911

- [11] Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses [J]. Science, 1998, 280(5370): 1763-1766
- [12] Pierro C, Cook S J, Foets T C F, et al. Oncogenic K Ras suppresses IP3 dependent Ca^{2+} release through remodelling of the isoform composition of IP (3)Rs and ER luminal Ca^{2+} levels in colorectal cancer cell lines[J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 7): 1607-1619
- [13] Hedgepeth S C, Garcia MI, Wagner LE 2nd, et al. The BRCA1 tumor suppressor binds to inositol 1,4,5 trisphosphate receptors to stimulate apoptotic calcium release [J]. Biol Chem, 2015, 290 (11): 7304-7313
- [14] Sun X, Guo S, Wang W, et al. Potential involvement of the 18 kDa translocator protein and reactive oxygen species in apoptosis of THP-1 macrophages induced by sonodynamic therapy [J]. PLoS One, 2018,13(5): e0196541
- [15] Zhu P, Chen Y, Shi J. Nanoenzyme-Augmented Cancer Sonodynamic Therapy by Catalytic Tumor Oxygenation[J]. ACS Nano, 2018, 12(4): 3780-3795
- [16] Qian J, Gao Q. Sonodynamic Therapy Mediated by Emodin Induces the Oxidation of Microtubules to Facilitate the Sonodynamic Effect [J]. Ultrasound Med Biol, 2018, 44(4): 853-860
- [17] You DG, Deepagan VG, Um W, et al. ROS-generating TiO_2 nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23200
- [18] Sun X, Xu H, Shen J, et al. Real-time detection of intracellular reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in THP-1 macrophages during ultrasonic irradiation for optimal sonodynamic therapy[J]. Ultrason Sonochem, 2015, 22: 7-14
- [19] Sandra T Cooper. Ca^{2+} and mitochondrial ROS: Both hero and villain in membrane repair[J]. Sci signal, 2017, 10(495)
- [20] Tian J, Gan Y, Pan C, et al. Nerol-induced apoptosis associated with the generation of ROS and Ca^{2+} overload in saprotrophic fungus *Aspergillus flavus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102 (15): 6659-6672
- [21] Huang RZ, Huang XC, Zhang B, et al. 16-O-caffeoyl-16-hydroxylhexadecanoic acid, a medicinal plant-derived phenylpropanoid, induces apoptosis in human hepatocarcinoma cells through ROS-dependent endoplasmic reticulum stress[J]. Phytomedicine, 2018, 41: 33-44
- [22] Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, et al. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009, 14: 1197-1218
- [23] Zhang J, Weng H, Ding W, Kang Z, et al. N-terminal engineering of glutamyl-tRNA reductase with positive charge arginine to increase 5-aminolevulinic acid biosynthesis [J]. Bioengineered, 2017, 8 (4): 424-427
- [24] Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside [J]. Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2008, 7(3): 283-289
- [25] Berridge M J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease[J]. Physiol Rev, 2016, 96(4): 1261-1296
- [26] Giorgi C, Baldassari F, Bononi A, et al. Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis[J]. Cell Calcium, 2012, 52(1): 36-43
- [27] Gutierrez T, Simmen T. Endoplasmic reticulum chaperones tweak the mitochondrial calcium rheostat to control metabolism and cell death [J]. Cell Calcium, 2018, 70: 64-75

(上接第 1205 页)

- [20] Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans[J]. Am J Physiol-Endoc M, 2007, 293(2): E444-E452
- [21] Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans [J]. Nat Med, 2013, 19(5): 631-634
- [22] Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. N Engl J Med, 2009, 360(15): 1509-1517
- [23] Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans[J]. Cell Metab, 2013, 17(5): 798-805