

线粒体靶向抗氧化剂 MitoQ 的抗肿瘤效应

王华伟 王华南 康肖梦 张宇睿 杨福军 徐文清

(中国医学科学院 北京协和医学院放射医学研究所 天津分子核医学重点实验室 天津 300192)

摘要 采用噻唑蓝(MTT)法检测不同浓度 MitoQ 对肝癌 HepG2 细胞的毒性; 凋亡诱导实验研究不同浓度 MitoQ 对 HepG2 细胞凋亡率的影响; 裸鼠移植瘤模型研究 MitoQ 对肝癌 HepG2 荷瘤小鼠的抑瘤作用。结果表明, MitoQ 对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用随着浓度而增加; 给药组凋亡率显著高于对照组($p<0.01$); MitoQ 在 1、5、10 mg/kg 剂量给药 10 d 后对小鼠的肿瘤生长均有抑制作用, 与对照组相比, 10 mg/kg 剂量组肿瘤体积($p<0.01$)和肿瘤质量($p<0.05$)均有显著性差异。结果提示, MitoQ 在体内体外均具有抑制肝癌 HepG2 细胞生长的作用。

关键词 MitoQ, 抗肿瘤, HepG2 细胞, 细胞凋亡, 线粒体靶向

中图分类号 R96

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2016.rj.34.010201

Anti-tumor effects of mitochondria targeted antioxidant MitoQ

WANG Huawei WANG Huanan KANG Xiaomeng ZHANG Yurui YANG Fujun XU Wenqing

(Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Perking Union Medicine College &

Chinese Academy of Medical Sciences, Institute of Radiation Medicine, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT MTT was used to detect the cell toxicity of different concentrations of MitoQ on liver cancer HepG2 cells. Apoptosis-inducing assay was used to detect the apoptosis rate on liver cancer HepG2 cells after the treatment with varying MitoQ concentrations. Xenograft tumor model assay was used to investigate the anti-tumor effects of MitoQ on HepG2 hepatocarcinoma-bearing mice. The results showed that the inhibitory effects of MitoQ on HepG2 cells increased with MitoQ concentration, and compared with control group, the administration group apoptosis rate was significantly higher ($p<0.01$). In nude mice xenograft tumor model assay, the tumor growth was all inhibited after the treatment with 1 mg/kg, 5 mg/kg, and 10 mg/kg MitoQ concentration after 10 d. When the mice were treated with 10 mg/kg MitoQ, tumor volume ($p<0.01$) and tumor mass ($p<0.05$) were significantly different from those of the blank group ($p<0.01$). The results indicate that MitoQ has antitumor effect *in vivo* and *in vitro*.

KEYWORDS MitoQ, Anti-tumor, HepG2 cell, Cell apoptosis, Mitochondria targeted

CLC R96

基金资助: 天津市应用基础与前沿技术(14JCZDJC36400)、北京协和医学院青年基金(33320140124)和中国医学科学院放射医学研究所探索基金(1555)资助

第一作者: 王华伟, 男, 1988年9月出生, 2012年毕业于河南大学, 现为中国医学科学院放射医学研究所硕士研究生

通讯作者: 徐文清, 研究员, 硕士生导师, E-mail: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

收稿日期: 初稿 2015-09-11; 修回 2015-10-08

Supported by Tianjin Research Program of Application Foundation and Advanced Technology(14JCZDJC36400), Beijing Union Medical College Youth Fund(33320140124), and the Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences Research Fund(1555)

First author: WANG Huawei, male, was born in September 1988 and graduated from Henan University in 2012. Now he is a master candidate of the Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences

Corresponding author: XU Wenqing, professor, master tutor, E-mail: xuwenqing@irm-cams.ac.cn

Received 11 September 2015; accepted 08 October 2015

MitoQ 是由 Murphy 和 Smith 在 20 世纪 90 年代设计并合成的线粒体靶向抗氧化剂, 它由具有抗氧化作用的辅酶 Q 和具有靶向作用的三苯基膦组成, 两部分通过含 10 个碳原子的脂肪链链接(见图 1)^[1-2]。大量体内体外实验表明^[3-4], MitoQ 可以较容易地渗透通过细胞膜和线粒体膜, 根据能斯特方程, 在正常的生物状态下, 每 61.5 mV 的膜电势亲脂阳离子摄入进线粒体增加 10 倍, 所以与一般的辅酶 Q 相比, MitoQ 可以在线粒体中大量积累(是原来的 100~1 000 倍), 从而达到保护线粒体免受氧化应激损伤, 同时也可调控癌细胞的凋亡通道, 达到治疗肿瘤的目的。

有文献报道^[2-3, 5], MitoQ 被用于帕金森、局部缺血-再灌注、肌萎缩性脊髓侧索硬化症和线粒体疾病等疾病的治疗。然而, 对于 MitoQ 的抗肿瘤研究尚未见报道, 本研究将对其进行初步探索, 以期为深入研究提供依据。

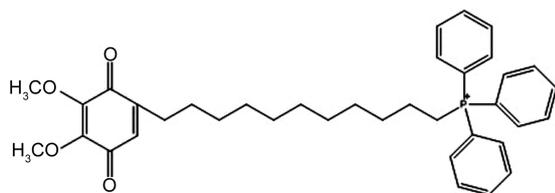


图 1 MitoQ 的化学结构
Fig.1 Chemical structure of MitoQ

1 材料与方法

1.1 材料

MitoQ 甲磺酸盐购自 Antipodean 制药公司(质量 β -环糊精: 质量 MitoQ 甲磺酸盐=4:1); 氯化钠注射液购自辰欣药业股份有限公司; PBS(Solarbio 公司); MTT(Solarbio 公司); HepG2 细胞本实验室保存, 凋亡试剂盒(eBioscience 公司); 双抗(Solarbio 公司); 血清(Gibco 公司); DMEM 基础培养基(Hyclone 公司); 胰酶(Gibco 公司); DMSO(Solarbio 公司); 赛多利斯电子天平(Sartorius BS124s); 流式细胞分析仪(美国 BD 公司); 多功能酶标仪(Tecan 公司); 台式低温高速离心机(Eppendorf 公司); 健康 SPF 级裸鼠, 由北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK(京)2012-0004。动物购回后置 SPF 级动物房笼饲养, 自由摄食和饮水, 温度 22~24 °C, 相对湿度 50%~60%, 压力差 \leq 10 Pa, 光照周期 12 h, 饲养设施合格证号: SYXK-(军)2014-0002。

1.2 细胞毒性实验

采用 MTT 法^[6]评价 MitoQ 对 HepG2 细胞的毒性。取对数生长期细胞, 用 0.25%的胰酶消化, 含 10%胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)培养基制成细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10^4 /mL, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞贴壁后, 换为含 0、5、6.25、10、12.5、20、25、40、50、100 μ g/mL MitoQ 的新鲜培养基, 设置 6 个复孔, 培养 24 h。终止培养前 4 h 每孔加入 10 μ L MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后弃去上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡混匀 10 min, 酶联免疫检测仪 490 nm 波长测定吸光度(A)值。

肿瘤细胞存活率(%)=实验组 A 值/对照组 A 值 \times 100%。

实验重复 3 次, 取平均值, 计算药物的 IC₅₀。

1.3 细胞凋亡诱导实验

取对数生长期的细胞, 用 0.25%胰酶消化, 含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基制成细胞悬液, 分为 5 个剂量组, 分别接种 4×10^5 个细胞于 60 mm 培养皿内, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 用 0、5、10、20、25 μ g/mL MitoQ 处理, 继续培养 24 h。2 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 洗两次, 收集 5×10^5 个细胞, 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后, 避光反应 10 min, 加入 5 μ L Propidium iodide, 混匀, 室温、避光反应 10 min, 0.5 h 后在流式细胞仪上观察、检测^[7-8]。

1.4 体内抗肿瘤研究

健康 SPF 级裸鼠 20 只, 取对数生长期的 HepG2 细胞, 用 0.25%胰酶消化, 以无血清培养基调整细胞浓度为 1×10^7 /mL, 取 0.2 mL 细胞悬液, 接种于正常小鼠左前肢腋窝皮下制备荷瘤模型^[9]。待肿瘤长到合适体积, 把裸鼠随机分成 4 组, 分别为生理盐水对照组、1 mg/kg 给药组、5 mg/kg 组、10 mg/kg 组, 每 2 d 腹腔给药一次, 每 2 d 称量裸鼠的体重并测量瘤块的体积。按下式计算肿瘤体积和抑瘤率:

$$\text{肿瘤体积} = \text{长度} \times \text{宽度}^2 / 2;$$

$$\text{抑瘤率}(\%) = (1 - \text{给药组肿瘤体积} / \text{模型对照组肿瘤体积}) \times 100\%^{[10]}。$$

1.5 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析, 多组数据比较采用单因素方差分析, 两组数据比较采用两独立样本 t 检验, $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞毒性实验

不同浓度的 MitoQ 处理肝癌 HepG2 细胞 24 h 后对存活率的影响见图 2。

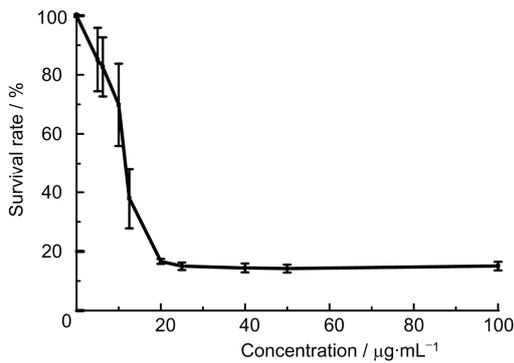


图 2 不同浓度的 MitoQ 处理对 HepG2 细胞的细胞毒性
Fig.2 Cell cytotoxicity in HepG2 cell treated with varying MitoQ concentration

由图 2 可知, 在 0~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 随着药物浓度的增加, MitoQ 对肿瘤细胞的生长抑制率逐渐增加; 在 25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内, 抑制率随浓度变化不大。说明 MitoQ 可以在较低的药物浓度条件下有效地抑制肝癌 HepG2 细胞的生长和增殖。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物浓度处理肝癌 HepG2 细胞 24 h 后对细胞的抑制率是 83.46%。这是由于相比于常规化疗药物, 线粒体靶向药可以更有效的浓集到作用靶点, 更好地发挥药物作用, 并且可以降低毒副作用。另外, 我们通过改良的寇式法计算得到 MitoQ 的 $\text{IC}_{50}=14.29 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 细胞凋亡实验

用不同浓度的 MitoQ 孵育 24 h 后, 用 Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide 染色, 0.5 h 后在流式细胞仪上检测。图 3 显示, 与对照组相比, 药物组能显著诱导 HepG2 细胞的凋亡, 用浓度为 0、5、10、20、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MitoQ 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 凋亡率分别为 3.3%、20.7%、22.6%、41.1%、59.0%, 其中早期凋亡率分别为 0.7%、4.3%、9.5%、10.4%、13.4%。结果表明, MitoQ 可以显著诱导 HepG2 细胞的凋亡, 并且 HepG2 细胞凋亡率与 MitoQ 的药物浓度具有量效依从关系。

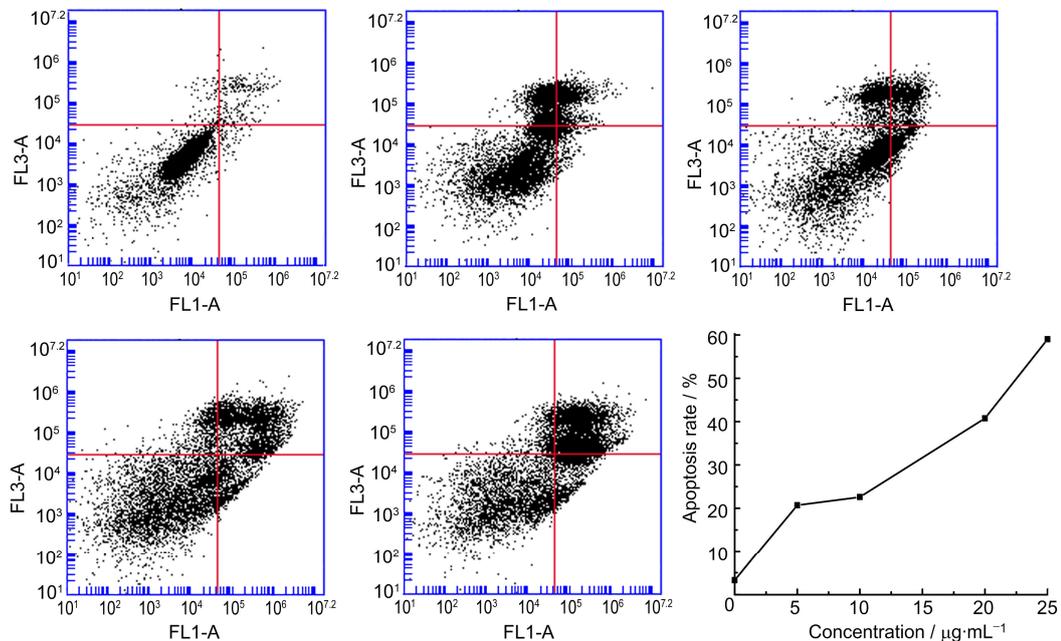


图 3 不同浓度的 MitoQ 处理后 HepG2 细胞的凋亡率
Fig.3 Apoptosis rate of HepG2 cells after the treatment with varying MitoQ concentration

2.3 体内抗肿瘤研究

图 4 和表 1 表明, MitoQ 在各剂量给药 10 d 后对小鼠的肿瘤生长均有一定的抑制作用, 并有量效依从关系。10 mg/kg 剂量组的抑制作用最强, 给药 10 d 后解剖裸鼠, 解剖前测量肿瘤体积, 解剖后称量瘤块质量, 与对照组相比, 10 mg/kg 组裸鼠肿瘤体积($p<0.01$)和肿瘤质量($p<0.05$)均有显著性差异。

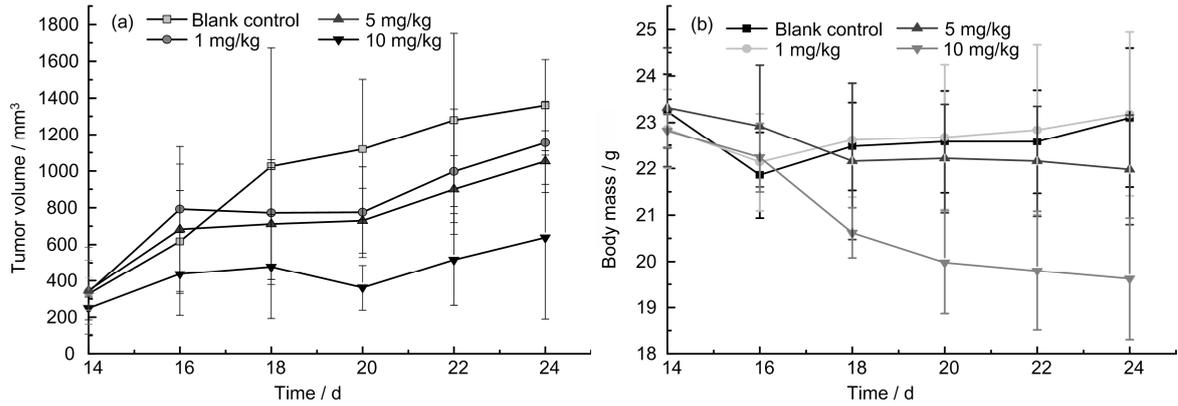


图 4 不同浓度 MitoQ 处理后荷瘤小鼠的肿瘤体积变化(a)和体重变化(b)
 Fig.4 Tumor volume changes (a) and body weight changes (b) of the tumor-bearing mice after the treatment with varying MitoQ concentration

表 1 不同浓度的 MitoQ 处理裸鼠 10 d 后肿瘤体积抑制率和瘤块质量
 Table 1 Tumor volume inhibitory rates and tumor weights in the xenografts in nude mice treated with varying MitoQ concentration after 10 d ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	肿瘤质量 Tumor mass / g	肿瘤体积抑制率 Tumor volume inhibitory rate / %
Control	1.6380±0.2870	-
1 mg/kg	1.5860±0.2905	0.1510±0.1670
5 mg/kg	1.5740±0.3683	0.2263±0.1241
10 mg/kg	0.9560±0.3770*	0.5310±0.3210

注: 与对照组比较, * $p<0.05$ 。
 Note: Compared with control group, * $p<0.05$.

3 讨论

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 传统的化疗药物治疗作用有限, 并且毒性较大, 所以靶向药逐渐成为发展的方向。相比于传统化疗药, 靶向药物具有毒副作用小、针对性强、能克服多药耐药性等优点。文献报道, 正常细胞线粒体和癌细胞线粒体在功能和结构上有较大的区别^[11], 例如, 肝癌细胞与肝脏正常细胞相比, 在大小、形状、细胞内线粒体数目上均有较大的区别。观察发现, 生长较快的肿

其中, 1、5 和 10 m/kg 剂量组对小鼠的抑瘤率分别是 15.10%、22.63%和 53.13%。体内抗肿瘤实验结果显示, MitoQ 对裸鼠肝癌 HepG2 细胞移植瘤具有显著的抑制作用, 与对照组相比, 有显著性差异。图 4b 显示, 给药组小鼠体重普遍在 19 g 以上, 并且小鼠存活率为 100%, 说明在给药剂量范围内 MitoQ 对小鼠的毒性较小。

瘤细胞比生长较慢的肿瘤细胞有更少和更小的线粒体, 良性肿瘤细胞含有更多的线粒体和更高水平的氧化酶。基于癌细胞和正常细胞线粒体功能和结构的差异性, 可以设计特定的药物分子, 使其与癌细胞线粒体作用, 诱导癌细胞凋亡。如具有特定生化性质的罗丹明 123 可以选择性地摄入到癌细胞线粒体, 干扰癌细胞的代谢, 并诱导癌细胞的凋亡^[12]。同时, 癌细胞线粒体结构和功能的改变, 使其对特定的药物分子作用更敏感, 导致其线粒体释放凋亡分子。因此, 线粒体被认为是抗肿瘤药物研发过程中一个比较有前途的药物靶点。

MitoQ 是发展较成熟的线粒体靶向药物, 已经广泛应用于各种疾病, 例如帕金森、线粒体疾病、糖尿病等, 但是对其抗肿瘤作用研究较少。经过前期的文献调研和理论基础, 我们认为 MitoQ 具有潜在的抗肿瘤作用。通过体内体外实验表明, MitoQ 具有一定的抗肿瘤作用。文献报道^[4], 小鼠静脉注射给药, 20 mg/kg 没有毒性, 27 mg/kg 有明显的药物毒性。经过我们预实验摸索, 设定 1、5、10 mg/kg 3 个药物剂量组研究 MitoQ 在体内的抗肿瘤效应。研究发现, MitoQ 在 1、5、10 m/kg 剂量给药 10 d

后, 对小鼠的肿瘤生长均有抑制作用, 其中 10 mg/kg 剂量组抑制作用最强。体外实验结果表明, 药物在 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对癌细胞的生长和增殖能力有较强的抑制作用。

线粒体是真核细胞的能量代谢中心, 遗传学和分子生物学研究表明, 线粒体在生理功能的内稳态包括电子传递、凋亡调节和钙稳态调节等方面发挥着重要的作用, 这些生理功能对身体来说至关重要, 因此这些功能障碍会引起许多疾病, 如糖尿病、癌症及遗传线粒体疾病分别是由能量转运系统的功能障碍、细胞凋亡调节的缺失以及线粒体 DNA (mtDNA) 的突变引起的^[13]。在正常细胞中, 线粒体在钙稳态/钙摄入、ATP 的产生、脂质的代谢中扮演着重要的角色, 同时, 线粒体内也包含大量的致命分子, 当这些分子从线粒体释放到胞质中, 会引起宿主细胞的死亡^[12], 如细胞色素c、Smac 蛋白、IAP 等。其中, 细胞色素c 是第一个被鉴定的线粒体细胞凋亡分子, 在正常细胞中细胞色素c 位于线粒体内、外膜之间; 当细胞被诱导凋亡时, 细胞色素c 从线粒体释放到细胞质, 在细胞质中与 Apaf-1 结合形成 Apaf-1/cytc 复合物。正常情况下, Apaf-1 与 ATP/dATP 的结合能力较弱, 一旦 Apaf-1 和细胞色素c 结合, Apaf-1 与 ATP/dATP 的结合能力至少提高 10 倍。Apaf-1/cytc 复合物与 ATP/dATP 的结合激发其多聚化从而形成凋亡体, 继而激活 Caspase9 和其下游的 Caspase3, 引起细胞凋亡^[14-15]。由于线粒体在能量代谢和细胞凋亡中扮演着重要的角色, 它被认为是抗肿瘤药发展的潜在靶点, 近年来被越来越多的研究者关注^[12]。近年来, 对于线粒体靶向药物抑制肿瘤细胞生长的机制研究越来越多, 其中 Cheng 等^[16]研究发现, 线粒体靶向药物可以介导肿瘤细胞的能量代谢, 降低肿瘤细胞内 ATP 的产生, 从而抑制肿瘤细胞增殖。Zhou 等^[17-18]研究表明, 线粒体靶向药物抑制肿瘤生长是通过调控线粒体凋亡通路。线粒体靶向药物使细胞色素c 从线粒体内、外膜之间释放到细胞质, 引起 Caspase9 和下游的 Caspase3 的激活, 从而导致癌细胞凋亡^[17-18]。同时, 细胞色素c 的释放, 使电子链的传递中断, ATP 的合成受阻, 线粒体不能维持正常的膜电位。MitoQ 抑制肿瘤细胞生长的机制还有待进一步研究。

参考文献

- 1 Duveau D Y, Arce P M, Schoenfeld R A, *et al.* Synthesis and characterization of mitoQ and idebenone analogues as mediators of oxygen consumption in mitochondria [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2010, **18**(17): 6429-6441. DOI:10.1016/j.bmc.2010.06.104.
- 2 Li Y, Fawcett J P, Zhang H, *et al.* Transport and metabolism of MitoQ10, a mitochondria-targeted antioxidant, in Caco-2 cell monolayers [J]. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2007, **59**(4): 503-511. DOI: 10.1211/jpp.59.4.0004.
- 3 Cocheme H M, Kelso G F, James A M, *et al.* Mitochondrial targeting of quinones: therapeutic implications [J]. *Mitochondrion*, 2007, **7**(Suppl): S94-S102. DOI: 10.1016/j.mito.2007.02.007.
- 4 Smith R A, Murphy M P. Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ [J]. *Annals of New York Academy of Sciences*, 2010, **1201**: 96-103. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05627.x.
- 5 Skulachev V P. Cationic antioxidants as a powerful tool against mitochondrial oxidative stress [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, **441**(2): 275-279.
- 6 邢晓萌, 王彦, 杜利清, 等. 白藜芦醇对肺癌 A549 细胞的放射增敏作用及其机制研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2014, **32**(06): 24-28. DOI: 10.11889/j.1000-3436.rj.2014.060203.
XING Xiaomeng, WANG Yan, DU Liqing, *et al.* Study on radiosensitization effect and mechanism of resveratrol on lung A549 cells [J]. *Radiation Research and Radiation Processing*, 2014, **32**(06): 24-28. DOI: 10.11889/j.1000-3436.rj.2014.060203.
- 7 WANG Xiaoxing, LI Yangbing, YAO Hongjuan, *et al.* The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells [J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(24): 5673-5687. DOI: 10.1016/j.biomateris.2011.04.029.
- 8 Chiu H W, Lin S W, Lin L C, *et al.* Synergistic antitumor effects of radiation and proteasome inhibitor treatment in pancreatic cancer through the induction of autophagy and the downregulation of TRAF6 [J]. *Cancer Letters*, 2015, **365**(2): 229-239. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.05.025.
- 9 Li N, Zhang C X, Wang X X, *et al.* Development of targeting lonidamine liposomes that circumvent drug-resistant cancer by acting on mitochondrial signaling pathways [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(13): 3366-3380.

- DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.055.
- 10 Jiang L, Li L, He X, *et al.* Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel loaded dual-functional liposomes with mitochondria targeting and pH-response [J]. *Biomaterials*, 2015, **52**: 126-139. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.004.
 - 11 Modica-Napolitano J S, Singh K K. Mitochondrial dysfunction in cancer [J]. *Mitochondrion*, 2004, **4**(5-6): 755-762. DOI: 10.1016/j.mito.2004.07.027.
 - 12 Wang F, Ogasawara M A, Huang P. Small mitochondria-targeting molecules as anti-cancer agents [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2010, **31**(1): 75-92. DOI: 10.1016/j.mam.2009.12.003.
 - 13 Chan D C. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development [J]. *Cell*, 2006, **125**(7): 1241-1252. DOI:10.1016/j.cell.2006.06.010.
 - 14 Zou H, Li Y, Liu X, *et al.* An APAF-1. cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**(17): 11549-11556.
 - 15 Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(40): 31199-31203. DOI: 10.1074/jbc.C000405200.
 - 16 Cheng G, Zielonka J, Mcallister D M, *et al.* Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death [J]. *BMC Cancer*, 2013, **13**: 285.
 - 17 Zhou J, Zhao W Y, Ma X, *et al.* The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(14): 3626-3638. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.078.
 - 18 方敏, 王晓东. 细胞凋亡的线粒体通路[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2002, **34**(1): 1-10.
FANG Min, WANG Xiaodong. The mitochondrial pathways of apoptosis [J]. *Journal of Peking University (Health Sciences)*, 2002, **34**(1): 1-10.