

利用荧光共振能量转移技术在活细胞内研究顺铂诱导的凋亡信号通路*

刘 镭** 张英杰 汪献旺

(华南师范大学生物光子学研究院激光生命科学研究所, 激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631)

摘要 为在活细胞内探讨顺铂诱导的凋亡通路, 实验样品经顺铂处理后, 应用基于荧光共振能量转移(FRET)原理设计的荧光探针 pFRET-Bid 和 pSCAT-3 来检测 Bid 切割和 Caspase-3 活化的动态变化, 同时, 利用荧光成像在亚细胞水平对 Bid 转位线粒体的动力学特征进行了实时分析. 结果表明: 在顺铂诱导的细胞凋亡过程中, Bid 切割发生在药物刺激后 4~5 h, 历时(120±20) min. Bid 切割活化后即从胞浆内转位到线粒体, 历时(90±15) min. 在凋亡后期, 可以明显检测到 Caspase-3 的激活. 研究表明, 应用 FRET 及荧光成像技术, 可以在活细胞内实时、直观、可视地研究顺铂诱导的细胞凋亡过程, 从而客观地反映了 Bid、Caspase-3 等蛋白质分子在该凋亡信号通路中的动态行为及时空传递特性.

关键词 荧光共振能量转移, 顺铂, 细胞凋亡, Bid, Caspase-3

学科分类号 R735.7, Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00067

荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 是指能量从一种受激发的荧光基团以非辐射的方式转移到另一荧光基团的物理现象^[1~3]. FRET 的有效响应距离一般在 1~10 nm. 基于其原理及特点, FRET 技术成为对生物大分子之间相互作用检测的一种有效方法^[4~9]. 近几年, 我们应用该技术对细胞凋亡、细胞增殖、肿瘤治疗过程中各蛋白质分子间的相互作用及分子信号转导进行了重点研究, 并取得了一定进展^[7~17].

顺氯氨铂, 简称顺铂, 是多种恶性肿瘤的一线化疗药物, 其抗癌谱广, 属细胞周期非特异性药物^[18~20]. 研究表明, 顺铂通过与 DNA 分子形成链内或链间交叉联接或阻止 RNA 分子再复制等途径发挥抗肿瘤作用, 同时它还能影响蛋白质翻译、细胞周期、细胞凋亡等胞内活动^[19~21]. 目前, 关于其药理作用及导致肿瘤耐药性的具体分子机制尚不完全清楚. 研究施药后细胞内各蛋白质分子的动态行为将有助于深入认识顺铂抗肿瘤的药理机制, 为临床治疗提供可靠的理论参考.

细胞凋亡是一种普遍的生理现象. 研究表明, Bid 是关键的促凋亡因子, 能够触发线粒体凋亡途径. Bid 的激活依赖于特定的蛋白酶将全长的 Bid

切割形成 tBid, tBid 转位到线粒体诱导线粒体的外膜破裂^[21~25]. Caspase 家族蛋白在调节凋亡时也起着关键作用^[26,27]. 一般认为, Caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡发生的关键酶^[10, 11, 28], 一旦被激活, 凋亡常难以避免. 因此, Caspase-3 被作为细胞凋亡的标志.

本研究工作中, 为了在活细胞内进一步探讨顺铂诱导凋亡的分子机制, 我们应用基于 FRET 原理设计的荧光探针 pFRET-Bid 和 pSCAT-3 分别检测 Bid 切割和 Caspase-3 活化的动态变化. 同时, 利用荧光成像在亚细胞水平对 Bid 转位线粒体的动力学特征进行了实时分析. 因而, 我们在无损伤、活细胞生理条件下实时、直观、可视地研究了顺铂诱导的细胞凋亡过程, 获得了 Bid、Caspase-3 等蛋白质分子在该凋亡信号通路中的动态行为特性, 进一步深化对顺铂抗肿瘤作用机制的认识.

* 教育部“长江学者与创新团队计划”创新团队项目(IRT0829), 国家自然科学基金(30870676, 30870658)和广东省自然科学基金(7117865)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 020-85211436, E-mail: liulei@scau.edu.cn

收稿日期: 2009-02-04, 接受日期: 2009-05-25

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及试剂. 人类肺腺癌细胞系 (ASTC-a-1) 由暨南大学医学院提供. 小牛血清和培养基 DMEM 购于英国 GIBCO 公司; CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 购自日本同仁化学研究所; 荧光染料 Hoechst33258 和顺铂购自美国 Sigma 公司; 转染试剂 Lipofectamine 购于美国 Invitrogen 公司; Bid 和 Caspase-3 的一抗购于美国 Cell Signalling 公司; 荧光二抗 IRDye™ 800 购于美国 Rockland Immunochemicals 公司; 蛋白酶抑制剂 Cocktail Set I 购于美国 Calbiochem 公司.

1.1.2 主要仪器. 激光共聚焦扫描显微镜 (LSM510/ConfoCor2, Zeiss, Germany), 红外荧光扫描成像系统 (LI-COR Odyssey, Inc., Lincoln, NE), 酶联免疫检测仪 (DG5032, 中国南京华东电子集团医疗装备有限责任公司), 微型 CO₂ 细胞培养箱 (Tempcontrol 37-2 digital, Zeiss, Germany).

1.2 方法

1.2.1 质粒及其构建. 质粒 pFRET-Bid(pYFP-Bid-CFP) 是在全长 Bid 的 N 端和 C 端分别融合了 YFP 和 CFP. 质粒 pBid-CFP 是在全长 Bid 的 C 端融合了 CFP 构建而成. 这两种质粒均由日本东京大学 Kazunari Taira 教授惠赠. 质粒 pSCAT3 由 Caspase-3 的切割底物 DEVD, CFP 和 Venus(YFP 突变体 YFP-S175G) 融合构建而成, 该质粒由日本 RIKEN 脑科学研究所 Masayuki Miura 教授惠赠. 质粒 pDsRed-Mit 是将 cytochrome c 氧化酶的基因通过限制性内切酶酶切位点 *Bam*H I 和 *Nhe* I 插到质粒载体 pDsRed-N1 的 N 端, 构建成可以在哺乳动物细胞中表达的新质粒. 该质粒由日本东京大学 Yukiko Gotoh 教授惠赠.

1.2.2 细胞培养及转染. 细胞培养液为 DMEM, 添加 10% 小牛血清 (FCS), 100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素. 人肺癌细胞用胰蛋白酶消化, 转至细胞培养皿, 培养 24 h 左右, 使细胞汇合 50%~70%, 使用 Lipofectin 试剂转染. 所有实验样品均通过顺铂 (终浓度 20 μ mol/L) 处理来诱导细胞凋亡.

1.2.3 激光共聚焦扫描显微镜成像检测. 实验样品的荧光成像均在 Zeiss 公司 LSM 510 型激光共聚焦扫描显微镜上完成, 采用 Plan-Neofluar 40 $\times$ /1.3 NA

油镜对细胞进行激光共聚焦成像. 为检测转染 pSCAT-3 和 pFRET-Bid 在活细胞的 FRET 效应, 实验中采用 458 nm 的氩离子激光作为激发光源, NPT515 nm 的分束器分束, 选用带通 470~500 nm 的滤光片记录 CFP 通道的荧光图像, 长通 530 nm 的滤光片记录 YFP 通道的荧光图像. DsRed 选用 488 nm 的氩离子激光作为激发光源, 吸收滤色镜选用 BP600-650.

1.2.4 细胞活性分析. 本实验采用 CCK-8 来测定顺铂的细胞毒性. 将 ASTC-a-1 细胞培养在 96 孔板中, 细胞密度为 5×10^3 个 /ml. 在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 及饱和湿度条件下, 培养 24 h, 移去旧培养液, 除空白对照组, 分别加入含 20 μ mol/L 顺铂的新鲜培养液. 设置 8 h, 12 h, 16 h, 20 h, 24 h 的处理组, 处理完后用 CCK-8 进行细胞活性分析. 检测前每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 于培养箱中孵育 2 h 后, 在 DG5032 型酶联免疫检测仪上测定吸光度, 读取 450 nm 时的吸光度值 (A_{450}), A_{450} 的数值与细胞存活率成正比.

1.2.5 Hoechst33258 染色. 将 ASTC-a-1 细胞培养于一次性培养皿中, 分别设置对照组和实验组, 24 h 后, 实验组中加入 20 μ mol/L 顺铂处理, 20 h 后, 加入终浓度为 10 mg/L 的 Hoechst33258 染色 10 min, 用 PBS 清洗 2 遍, 在荧光显微镜下观察细胞核型. 实验激发光源为汞灯, 用数码相机拍摄得到实验结果.

1.2.6 蛋白质免疫印迹. 分别收集对照组和 20 μ mol/L 顺铂处理 20 h 后的细胞, 用预冷的 PBS 洗 2 次, 加入裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 150 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100, 100 mg/L PMSF 和 1 $\times$ 蛋白酶抑制剂 Cocktail Set I) 于冰上振荡裂解细胞, 30 min 后, 13 000 r/min 于 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 取上清液. 采用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 加入上样缓冲液于 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min, 以 12% SDS-PAGE 分离蛋白质后转移至 PVDF 膜, 膜用含 5% 的脱脂牛奶封闭 45 min, 加一抗 (分别为兔源 Caspase-3 抗体 1:1 000, 兔源 Bid 抗体 1:1 000) 于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 然后用 TBST 液 (0.02 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.01% Tween-20, pH 7.6) 洗膜 3 $\times$ 10 min. 以荧光二抗 IRDye™ 800 (1:5 000) 室温下闭光孵育 2 h 后再洗膜, 洗涤条件同上. 最后将膜置于 LI-COR Odyssey 红外荧光扫描成像系统上检测成像.

1.2.7 数据分析. 记录的图像和数据均用 Zeiss Rel3.2 图像处理软件(Zeiss, Germany)对图像上所选定的区域进行荧光强度定量分析. 所有实验均进行了 $n \geq 3$ 次重复, 同时重复对多个细胞的实验数据进行了分析.

2 结 果

2.1 顺铂诱导 ASTC-a-1 细胞凋亡

为了检测顺铂处理后不同时间点的细胞活性, 采用 CCK-8 进行了检测顺铂处理后不同时间点的细胞活性, 采用 CCK-8 进行分析. 不同处理组的 A_{450} 值如图 1a 所示. 与对照组相比, 经顺铂处理 12 h, 细胞活性有明显下降, 处理 16 h 后, 细胞活性非常低, 表明细胞存活率低. 随后, 在顺铂诱导 16 h 后用 Hoechst 染色检测细胞核的形态, 结果显示(图 1b), 空白对照组细胞的核呈圆形, 顺铂处理组细胞的核已经明显固缩、凝聚, 有的还出现断裂. Hoechst 染色结果表明, 经顺铂诱导 16 h 后细胞明显发生凋亡.

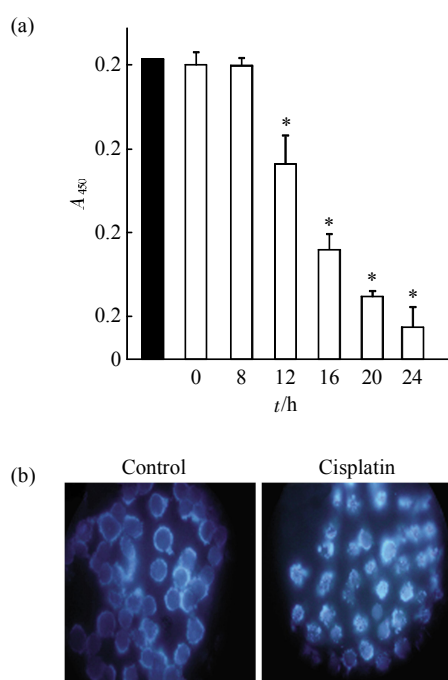


Fig. 1 Cisplatin-induced apoptosis in ASTC-a-1 cells

(a) The viability of ASTC-a-1 cells after cisplatin treatment, was assessed by the CCK-8 assays at different time points. Data represent the $\bar{x} \pm s$ of four independent experiments, $*P < 0.05$ v.s. Control group.

■: Control; □: Cisplatin. (b) Nuclear condensation of apoptotic cells. 16 h after cisplatin treatment (right panel), ASTC-a-1 cells were stained with Hoechst 33258, visualized under a Nikon fluorescent microscope (60 $\times$).

2.2 荧光探针 pFRET-Bid 的特性

我们应用基于 FRET 原理设计的荧光探针 pFRET-Bid, 在活细胞内检测顺铂诱导的细胞凋亡过程中 Bid 蛋白切割的动态变化. 根据 FRET 原理, 在 Bid 被切割之前, CFP 和 YFP 相距很近, 当激发 CFP 时, 能量可以从 CFP 共振转移给 YFP, 从而可以探测到 YFP 的荧光, 当 Bid 被切割时, CFP 和 YFP 被分离, 荧光共振能量转移就会降低或者消失, 探测到的 YFP 荧光强度也相应地降低或者消失(图 2a). 将荧光探针 pFRET-Bid 转染进 ASTC-a-1 细胞, 融合蛋白成功表达后如图 2b 所示. 在证明该探针能成功转染并表达后, 应用受体漂白实验进一步验证该探针的可靠性和敏感性. 用 514 nm 氩离子激光选择性对受体荧光蛋白 YFP 反复扫描进行漂白(图 2b, YFP), 受体漂白后的定量分析反映了 YFP、CFP 在漂白前后的荧光强度变化(图 2c). 由实验结果(图 2b, c)可以看到, 在漂白区域内, YFP 的荧光强度明显地下降, 在漂白后瞬间, 由于供体蛋白的能量不能有效共振转移给受体蛋白, 供体荧光蛋白 CFP 的荧光强度则陡然增强. 因此, 受体漂白实验结果(图 2b, c)证实: 在活细胞内, 荧光探 pFRET-Bid 的 FRET 效应明显, 应用该探针研究 Bid 切割的动态变化十分可信.

2.3 实时检测顺铂诱导细胞凋亡过程中 Bid 切割的动态变化

在 ASTC-a-1 细胞中转染 YFP-Bid-CFP 质粒, 表达 36 h 后对细胞进行不同的处理, YFP 及 CFP 随时间变化的典型序列图像如图 3a, 3b 所示. 实验结果显示, 对照组实验中, 在记录的时间内, YFP 和 CFP 的荧光强度没有任何变化(图 3a). 在经过顺铂处理后, 可以看到 CFP 的荧光强度明显增强, 而 YFP 的荧光强度明显变弱, YFP/CFP 的强度也相应减弱(图 3b), 该实验现象表明 Bid 已经被切割. 图 3c 中, 基于 FRET 原理, 通过定量分析对照组和顺铂处理组 YFP 和 CFP 荧光强度的比率随时间的变化, 证实 Bid 已经被切割. 同时可以看到, Bid 的切割发生在药物刺激后 4~5 h, 历时约 2 h. 蛋白质免疫印迹的结果证实 Bid 被切割(图 3d). 在顺铂诱导的细胞凋亡过程中, 通过利用 FRET 技术在活细胞内对 Bid 的动态行为进行检测, 证明 Bid 在该凋亡过程中被切割, 且整个过程进行缓慢, 历时较长.

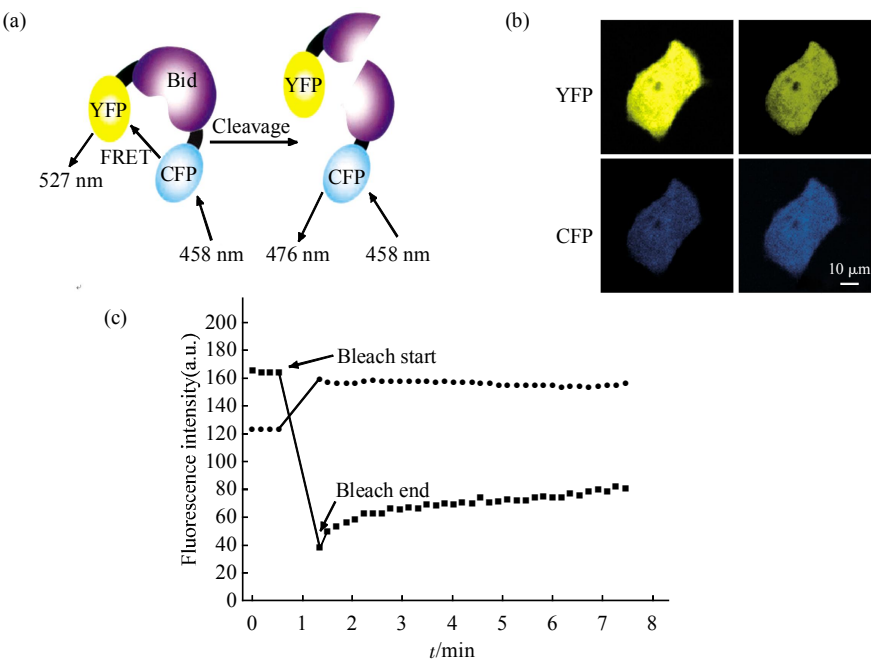


Fig. 2 Characterization of Bid FRET probe in living ASTC-a-1 cells

(a) In our FRET system, excitation of CFP at 458 nm should result in emission at 476 nm if no YFP is in close proximity. In the YFP-Bid-CFP, energy should be transferred from excited CFP to YFP, with resulting emission at 527 nm. When the fusion protein is cleaved by Calpain, energy can no longer be transferred from excited CFP to YFP. (b, c) Acceptor bleaching confirms FRET between CFP and YFP. (b) YFP was bleached in a single cell by repeated scanning of the cell area at high laser power at 514 nm. The experiment was repeated twice. (c) Quantitative analysis of CFP and YFP fluorescence following the bleaching of YFP. ■—■: YFP; ●—●: CFP.

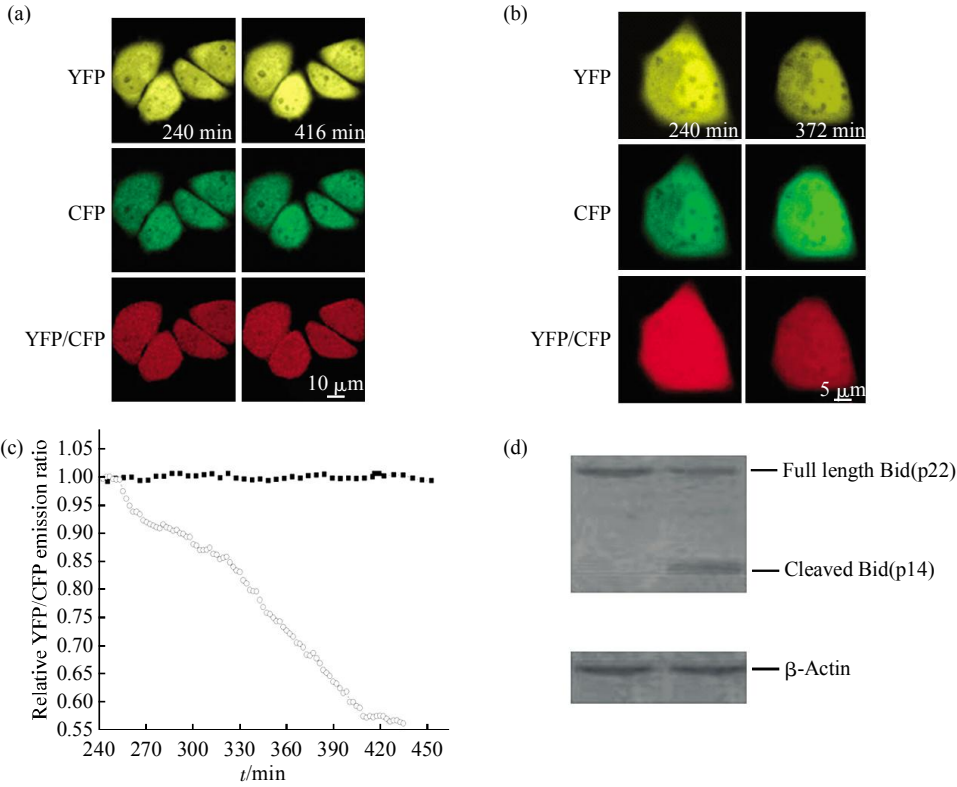


Fig. 3 Real-time monitoring of Bid cleavage in single living cell

ASTC-a-1 cells were transfected with YFP-Bid-CFP. (a) Typical fluorescence images of CFP and YFP emissions of the control cells. (b) Typical fluorescence images of CFP and YFP emissions of the cells after cisplatin treatment. The panels of CFP, YFP and YFP/CFP are shown separately. (c) Dynamics of YFP/CFP ratio after cisplatin treatment. The YFP/CFP ratios at the first time point are normalized to 1. Results represent one of four replicates. ■—■: Control; ○—○: Cisplatin. (d) Analysis of Bid cleavage by Western blotting.

2.4 顺铂诱导 Bid 转位线粒体

为了检测 Bid 切割活化后的动态行为, 实验中将质粒 Bid-CFP 转染进 ASTC-a-1 细胞, 通过对 CFP 的荧光成像追踪 Bid 在胞内的运动. 同时用 DsRed-Mit 标记线粒体形态, 根据 CFP 和 DsRed 的荧光重叠情况来判别 Bid 是否转位到线粒体. 结果显示, 在对照组, 凋亡未发生, Bid 主要分布在胞浆内, 线粒体呈细长的线状或树枝状, 散布在细

胞质内, 可以明显看出 Bid 没有聚集在线粒体上(图 4a). 而凋亡发生后, 可以明显看到, 线粒体分布在细胞核周围, Bid 明显定位, CFP 和 DsRed 荧光成像的重叠显示 Bid 定位在线粒体上, 证明顺铂诱导了 Bid 从胞浆转位到了线粒体(图 4b). 通过定量分析线粒体富集区域 CFP 的荧光强度随时间变化的关系(图 4c), 也证实在此过程中, Bid 逐步转位到了线粒体, 而且历时约 1.5 h.

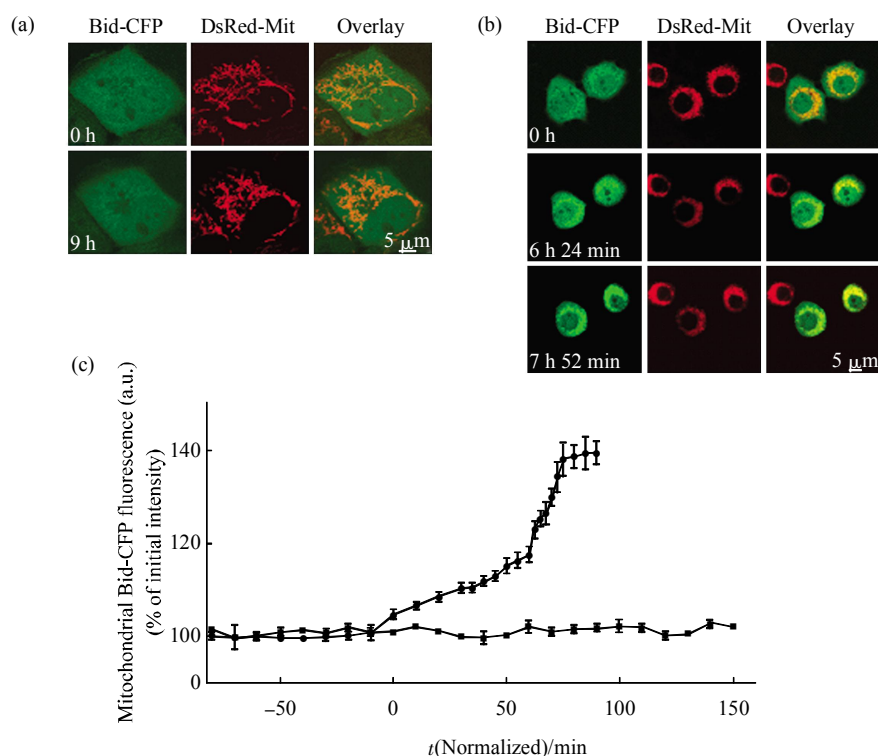


Fig. 4 Dynamics of Bid translocation to mitochondria during cisplatin-induced apoptosis

Bid-CFP localization at mitochondria was determined based on the overlap of Bid-CFP and DsRed-Mit fluorescence images. (a) Control cells without Bid translocation over time. (b) Time-lapse images of Bid-CFP redistribution after treatment with cisplatin. Similar results were obtained from 3 independent experiments. (c) Time courses of Bid translocation to mitochondria after cisplatin treatment. Each curve represents an average of 12~15 cells obtained from 3 independent experiments. Bid-CFP fluorescence intensity in each curve at the first time point is normalized to 100 and the time of the onset of Bid-CFP redistribution is set to zero. ■—■: Control; ●—●: Cisplatin. Data represent the $\bar{x} \pm s$.

2.5 顺铂诱导 Caspase-3 激活的动态检测

荧光探针 pSCAT3 设计原理与 pFRET-Bid 相同. 当 Caspase-3 激活后, 底物 DEVD 被切割, CFP 和 Venus 分离, CFP 的荧光强度上升, Venus 的荧光强度下降, Venus/CFP 荧光强度比值相应下降. 分析 Venus/CFP 荧光强度比值的下降可以直接反映细胞内 Caspase-3 的激活. 在 ASTC-a-1 细胞中转染 pSCAT-3 质粒, 表达 36 h 后对细胞进行不同的处理, YFP 及 CFP 随时间变化的典型序列图像如图 5a, 5b 所示. 实验结果显示, 对照组实

验中, 在记录的时间内, YFP 和 CFP 的荧光强度没有明显变化(图 5a). 在经过顺铂处理后, 可以看到, CFP 的荧光强度增强, 而 YFP 的荧光强度明显变弱, YFP/CFP 的强度也相应减弱(图 5b), 该实验现象表明 Caspase-3 已经激活. 图 5c 中, 基于 FRET 原理, 通过定量分析对照组和顺铂处理组 YFP 和 CFP 荧光强度的比率随时间的动态变化, 证实 Caspase-3 已经活化, 且其激活发生在药物刺激 14 h 后, 30 min 内即可彻底活化. 蛋白质免疫印迹的结果证实 Caspase-3 被切割活化(图 5d).

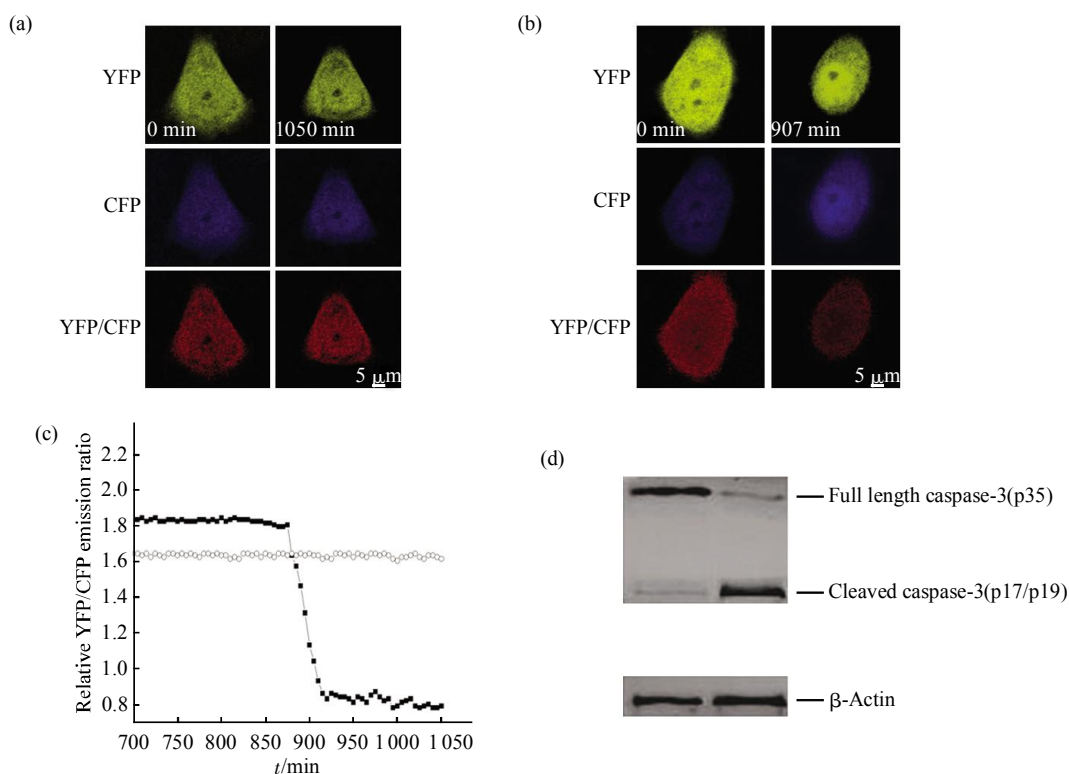


Fig. 5 Real-time monitoring of Caspase-3 activation in single living cell

ASTC-a-1 cells were transfected with pSCAT-3. (a) Typical fluorescence images of CFP and YFP emissions of the control cells. (b) Typical fluorescence images of CFP and YFP emissions of the cells after cisplatin treatment. The panels of CFP, YFP and YFP/CFP are shown separately. (c) Dynamics of YFP/CFP ratio after Cisplatin treatment. Results represent one of three replicates. $\circ-\circ$: Control; $\blacksquare-\blacksquare$: Cisplatin. (d) Analysis of caspase-3 activation by Western blotting.

3 讨 论

顺铂是目前临床治疗恶性肿瘤的常用化疗药物, 抗癌谱广^[18~20], 但长期使用也会导致肿瘤产生耐药性, 达不到理想治疗效果. 研究探讨施药后细胞内各蛋白质分子的动态行为有助于深入认识顺铂的药理作用及耐药机制, 为临床治疗提供理论参考.

本研究工作中, 我们应用 FRET 技术在活细胞内研究探讨了顺铂诱导凋亡的分子机制. 实验中, 我们用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂来诱导 ASTC-a-1 细胞凋亡(图 1), 基于 FRET 原理设计的荧光探针 pFRET-Bid(图 2)和 pSCAT-3 被分别用于检测 Bid 切割和 Caspase-3 活化的动态变化. 同时, 我们还利用荧光成像在亚细胞水平对 Bid 转位线粒体的动力学特征进行了实时分析. 研究结果表明: 顺铂诱导了 Bid 的切割(图 3), Bid 被切割活化后从胞浆内转位到线粒体(图 4), 在凋亡后期, 可以明显检测到 Caspase-3 的激活(图 5).

众多研究表明, Bid 是促凋亡的重要因子, 在触发线粒体凋亡途径中起着关键作用. 在静息状态下, Bid 没有活化, 以单体形式分布在胞浆中, 经凋亡刺激因子诱导后, Bid 依赖于特定的蛋白酶将其切割形成 tBid, 随后 tBid 转位到线粒体外膜诱发后续凋亡事件. 在顺铂诱导的凋亡过程中, 我们采用 FRET 技术在活细胞内实时检测到 Bid 的切割, 分析其动力学特性, 发现该过程进程缓慢, 历时约 2 h(图 3). 同时实时研究了凋亡前后 Bid 的时空变化, 其动力学特性表明: Bid 被切割活化后就开始向线粒体转位, 且进程缓慢, 历时 (90 ± 15) min(图 4).

Caspases 是一组具有相似氨基酸顺序、二级结构的半胱氨酸蛋白酶, 它除参与细胞因子成熟、细胞生长和分化外, 还与细胞凋亡密切相关^[26, 27]. Caspases 级联反应在凋亡通路中处于重要地位, 尤其 Caspase-3 的活化是关键环节, 是凋亡的最终执行者. 正常情况下, Caspase-3 以无活性的酶原形式存在于哺乳动物多种组织和细胞内, 活化后可特

异性识别并切割底物的氨基酸序列(DEVD),使胞内许多重要进程发生功能障碍,并破坏细胞结构成分,从而导致凋亡不可逆地发生,因而它是诱发细胞凋亡蛋白酶级联反应的“核心”蛋白酶^[10, 11, 28].

本文结合荧光融合蛋白 SCAT3,利用 FRET 技术,在活细胞生理条件下实时、可视地研究了顺铂诱导的 Caspase-3 活化的动态变化过程.实验结果显示,在凋亡后期, Caspase-3 明显被激活,且 30 min 内彻底活化(图 5).

总之,我们的研究应用 FRET 及荧光成像技术,在活细胞内实时、直观、可视地研究了顺铂诱导的细胞凋亡通路,获得了 Bid、Caspase-3 等蛋白质分子在该凋亡信号通路中的动态行为及时空传递特性,有助于深化对顺铂抗肿瘤作用机制的认识,为临床治疗提供新的理论参考依据.

致谢 感谢日本东京大学 Kazunari Taira 教授惠赠质粒 pFRET-Bid 和 pBid-CFP;感谢日本 RIKEN 脑科学研究所 Masayuki Miura 教授惠赠质粒 pSCAT3;感谢日本东京大学 Yukiko Gotoh 教授惠赠质粒 pDsRed-Mit.

参 考 文 献

- Fields S, Song O K. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 1989, **340**(6230): 245~246
- Sekar R B, Periasamy A. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J Cell Biol*, 2003, **160**(5): 629~633
- Peter J, Wouters F S, Reynolds A R, *et al.* Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane. *Science*, 2000, **290**(5496): 1567~1570
- Kiwamu T, Nagai T, Miyawaki A, *et al.* Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J Cell Biol*, 2003, **160**(2): 235~243
- 储 军, 施 华, 杨 杰, 等. 分子与细胞事件的光学可视化——解读 2008 年诺贝尔化学奖. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(10): 1104~1111
Chu J, Shi H, Yang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(10): 1104~1111
- 陆锦玲, 储 军, 杨 杰, 等. 利用受体漂白荧光共振能量转移技术研究 β -分泌酶在活细胞内的二聚化. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(3): 268~273
Lu J L, Chu J, Yang J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(3): 268~273
- Pei Y H, Xing D, Gao X J, *et al.* Real-time monitoring full length bid interacting with Bax during TNF- α -induced apoptosis. *Apoptosis*, 2007, **12**(9): 1681~1690
- Zhang L, Xing D, Zhu D B, *et al.* Low-power laser irradiation inhibiting A β (25-35)-induced PC12 cell apoptosis via PKC activation. *Cell Physiol Biochem*, 2008, **22**(1~4): 215~222
- 王进军, 陈小川, 邢 达. FRET 技术及其在蛋白质-蛋白质分子相互作用研究中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(6): 980~983
Wang J J, Chen X C, Xing D. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(6): 980~983
- Wang F, Chen T S, Xing D, *et al.* Measuring dynamics of caspase-3 activity in living cells using FRET technique during apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2005, **36**(1): 2~7
- Wu Y X, Xing D, Luo S M, *et al.* Detection of caspase-3 activation in single cells by fluorescence resonance energy transfer during photodynamic therapy induced apoptosis. *Cancer Lett*, 2006, **235**(2): 239~247
- Gao X J, Chen T S, Xing D, *et al.* Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *J Cell Physiol*, 2006, **206**(2): 441~448
- Wu Y X, Xing D, Chen W. Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by photofrin-PDT. *Cell Cycle*, 2006, **5**(7): 729~734
- Wu Y Y, Xing D, Liu L, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer analysis of Bid activation in living cells during ultraviolet-induced apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2007, **39**(1): 37~45
- 陈妙娟, 邢 达, 陈同生. 利用 FRET 技术再活细胞内研究红景天甙对 A β_{25-35} 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用. *生物物理学报*, 2006, **22**(6): 415~423
Chen M J, Xing D, Chen T S. *Acta Biophys Sin*, 2006, **22**(6): 415~423
- 陈同生, 王小平, 孙 磊, 等. Caspase-3 参与调控蟾酥诱导人肺腺癌(ATC-a-1)细胞的凋亡. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(1): 85~90
Chen T S, Wang X P, Sun L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(1): 85~90
- Zhang J T, Xing D, Gao X J. Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J Cell Physiol*, 2008, **217**(2): 518~528
- Eastman A. The Mechanism of Action of Cisplatin: from Adducts to Apoptosis. Switzerland: Wiley-VCH, 1999. 111~134
- Siddik Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003, **22**(47): 7265~7279
- Yoshimura N, Kudoh S, Mukohara T, *et al.* Phase I / II study of cisplatin combined with weekly paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2004, **90**(6): 1184~1189
- Liu L, Xing D, Chen W R, *et al.* Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis. *Int J Cancer*, 2008, **122**(10): 2210~2222
- Wu Y Y, Xing D, Chen W R, *et al.* Bid is not required for Bax translocation during UV-induced apoptosis. *Cell Signal*, 2007, **19**(12): 2468~2478

- 23 Luo X, Budihardjo I, Zou H, *et al.* Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 1998, **94**(4): 481~490
- 24 Huang D C S, Strasser A. BH3-only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 2000, **103**(6): 839~842
- 25 Korsmeyer S J, Wei M C, Saito M, *et al.* Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, 2000, **7**(12): 1166~1173
- 26 Wang J, Lenardo M. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Science*, 2000, **113**(5): 753~757
- 27 Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell*, 2002, **9**(3): 459~570
- 28 Lakhani S A, Masud A, Kuida K, *et al.* Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 2006, **311**(5762): 847~851

Using FRET Technique to Investigate The Apoptotic Mechanism Induced by Cisplatin in Living Cells*

LIU Lei**, ZHANG Ying-Jie, WANG Xian-Wang

(MOE Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract Cisplatin, an efficient anticancer agent, can trigger multiple apoptotic pathways in cancer cell. However, the signal transduction pathways in response to cisplatin-based chemotherapy are complicated, and the mechanism is not fully understood. Using fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique, the molecular mechanism of cisplatin-induced apoptosis in living human lung adenocarcinoma cells (ASTC-a-1) were investigated. After cisplatin treatment, the recombinant pFRET-Bid and pSCAT-3 probes were used to determine the kinetics of Bid cleavage and Caspase-3 activation, respectively. The fluorescence probes Bid-CFP and DsRed-Mit were also used to detect the spatial and temporal changes of Bid in real-time in sub-cell level. The results showed that a cleavage of the Bid-FRET probe occurring at about 4~5 h after treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin. Cleavage of the Bid-FRET probe coincided with a translocation of tBid from the cytosolic to the mitochondria, and the translocation lasted about 1.5 h. At the anaphase of cell apoptosis, Caspase-3 was activated obviously as detected by FRET and Western blotting techniques. Using real-time single-cell analysis, it was observed the kinetics of Bid and Caspase-3 activation for the first time in living cells during cisplatin-induced apoptosis.

Key words FRET, cisplatin, apoptosis, Bid, Caspase-3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00067

*This research is supported by grants from The Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0829), The National Natural Science Foundation of China (30870676, 30870658) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province (7117865).

**Corresponding author.

Tel: 86-20-85211436, E-mail: liulei@senu.edu.cn

Received: February 4, 2009 Accepted: May 25, 2009