

细胞自噬在三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡中的作用研究^{*}

李 洋, 谷仕艳, 张遵真[△]

四川大学华西公共卫生学院 环境卫生与职业医学系(成都 610041)

【摘要】 目的 研究细胞自噬在三氧化二砷(ATO)诱导的肝癌细胞死亡中的作用,观察调控细胞自噬对ATO诱导的细胞凋亡有何影响。**方法** 以人肝癌 HepG₂ 细胞为研究对象,在ATO作用于HepG₂细胞的基础上,加入自噬激动剂[雷帕霉素(Rap)]和自噬抑制剂[三甲基腺嘌呤(3-MA)]进行调控。以MTT法检测细胞生存率,透射电镜观察自噬体结构,免疫印迹法分析自噬相关蛋白LC-3和Beclin1的表达;流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 5~20 μmol/L ATO与10 mmol/L 3-MA联用时HepG₂细胞存活率比同剂量ATO单独作用时降低($P<0.05$),凋亡率增加($P<0.05$),细胞内呈现典型凋亡反应特征,自噬蛋白LC3和Beclin1表达低于ATO单独作用组($P<0.05$)。相反,5~20 μmol/L ATO与0.25 μmol/L Rap联用时,HepG₂细胞的存活率比ATO单独作用时显著增加($P<0.05$),凋亡率降低($P<0.05$),细胞内出现大量自噬体结构,自噬蛋白LC3和Beclin1的表达较ATO单独作用组有增加趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 特异性自噬抑制剂能显著增强ATO杀伤肝癌细胞的敏感性,其机制与增强肝癌细胞凋亡有关。

【关键词】 肝细胞癌 三氧化二砷 自噬 凋亡

Effect of Cell Autophagy on the Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells Induced by Arsenic Trioxide LI Yang, GU Shi-yan, ZHANG Zun-zhen[△]. Department of Environmental Health and Occupational Medicine, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: zhangzunzhen@163.com

【Abstract】 Objective To determine the effect of autophagy on the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells induced by arsenic trioxide (ATO). **Methods** Hepatocellular carcinoma HepG₂ cells were exposed to ATO. The cell viability was detected by MTT after adjustments for autophagy agonist (Rap) and autophagy inhibitor (3-MA). The autophagosome was observed under electronic microscope. The autophagy related proteins (LC3 and Beclin1) were detected by immunofluorescence. The cell apoptosis was measured by flow cytometry. **Results** With 5-20 μmol/L of ATO, HepG₂ cells exposed to 3-MA had significantly lower viability ($P<0.05$) and higher early apoptosis ($P<0.05$) than those without exposure to 3-MA. Exposure to 3-MA was also associated with lower expressions of LC3 and Beclin1, with HepG₂ cells showing typical apoptotic characteristics. By contrast, with 5-20 μmol/L of ATO, the cells exposed to Rap showed significantly higher viability ($P<0.05$) and lower early apoptosis ($P<0.05$) than those without exposure to Rap. A large number of autophagosome appeared in the cells exposed to Rap. Exposure to Rap was associated with increased expressions of LC3 and Beclin1, but with no statistical significance ($P>0.05$). **Conclusion** Targeted autophagy inhibition can significantly increase the sensitivity of HepG₂ to ATO. The underlining mechanism is associated with enhanced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma Arsenic trioxide Autophagy Apoptosis

细胞自噬是广泛存在于真核细胞内的一种生理现象^[1]。有研究表明,癌症、神经退行性疾病、免疫失调、糖尿病等疾病的发生发展都与自噬过程的异常密切相关^[2]。自噬可被肿瘤细胞激活,但绝大多数肿瘤细胞的自噬能力低于正常细胞^[3],提示自噬在肿瘤的发生、发展及治疗过程中具有重要作用。三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)是治疗急性早幼粒细胞白血病的一线临床用药^[4],多项研究显示

ATO对多种实体瘤也具有一定疗效^[5-6],已被我国食品药品监督管理局批准用于肝癌的治疗。我们的前期研究证实,ATO可有效诱导肝癌细胞凋亡^[7],但ATO可否诱导肝癌细胞自噬以及自噬在ATO杀伤肝癌细胞中的作用尚不清楚。本研究选用人肝癌 HepG₂ 细胞作为研究对象,以ATO诱导肝癌细胞死亡,探讨自噬在肝癌细胞死亡中的作用,以期为提高肝癌化疗敏感性提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株与细胞培养

^{*} 国家自然科学基金面上项目(No. 81372945)和四川省卫计委科研课题(No. 150109)资助

[△] 通信作者, E-mail: zhangzunzhen@163.com

人肝癌细胞株 HepG₂ 购于武汉大学中国典型培养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。HepG₂ 细胞贴壁培养于 DMEM 高糖培养基(含 10% 小牛血清, 100 μg/L 链霉素, 100 U/mL 青霉素), 在 37 °C、体积分数为 5% CO₂、饱和湿度下常规培养, 每 2~3 d 传代一次。

1.2 主要试剂与仪器

ATO 注射液由黑龙江哈尔滨医大药业有限公司生产(批号: 20110102); 噻唑蓝(MTT)购于瑞士 Fluka Chemical 公司; 自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)购自大连美仑生物技术有限公司; 自噬诱导剂雷帕霉素(rapamycin, Rap)购自美国 Sigma 公司; BCA 蛋白定量试剂盒(康为世纪公司); 凋亡检测试剂盒(美国 BD 生物科技有限公司); DMEM 细胞培养液(Gibco); 酶联免疫检测仪(Thermo Scientific Multiskan GO); DMLB2 型荧光显微镜(德国 Leica); Chemi Doc XRS 凝胶成像系统[美国伯乐(Bio-Rad)]; 透射电镜(日本 Hitachi H7650); 切片机(德国 Leica EMUC6); FC-500 流式细胞仪(Beckman Coulter)。

1.3 MTT 法检测自噬对 ATO 作用下 HepG₂ 细胞存活率的影响

取生长状态良好、处于对数生长期的 HepG₂ 细胞, 以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 每孔加入 200 μL 终浓度分别为 0(对照组)、2、5、10、20、50、100、200 μmol/L 的 ATO 培养液, 另设两组细胞在加入以上浓度 ATO 的基础上分别加入终浓度为 0.25 μmol/L 的自噬激动剂 Rap 和终浓度为 10 mmol/L 的自噬抑制剂 3-MA, 每个剂量组均设 8 个平行孔, 作用 24 h 后弃去培养液, 每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液, 继续在 37 °C 避光孵育 4 h, 弃去含 MTT 的培养液, 每孔加入 100 μL 二甲亚砜(DMSO), 并设 DMSO 为调零孔。摇床震荡 10 min 后, 酶标仪 490 nm 波长下读取各孔吸光度值(A_{490}), 并计算细胞存活率(细胞存活率 = 处理组 A_{490} ÷ 对照组 A_{490} × 100%)。实验重复 3 次。

1.4 透射电镜检测细胞自噬体结构

将处于对数生长期的 HepG₂ 细胞经对照组, 5 μmol/L ATO 及 5 μmol/L ATO + 0.25 μmol/L Rap, 5 μmol/L ATO + 10 mmol/L 3-MA 作用 24 h 后, 离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次后, 经 2.5% 戊二醛 4 °C 固定 1 h, 1% 锇酸固定 2 h, 丙酮梯度脱水处理 3 次, 10 min/次, 共经琼脂包埋, 甲苯胺蓝染色、定位, 制成 70 nm 超薄切片, 后经铅、铀双染色后,

在透射电子显微镜下观察自噬体形态。

1.5 免疫印迹实验检测 LC3、Beclin-1 蛋白水平

收集经过对照组, 5 μmol/L ATO 及 5 μmol/L ATO + 0.25 μmol/L Rap、5 μmol/L ATO + 10 mmol/L 3-MA 染毒处理 24 h 的 HepG₂ 细胞, 用预冷 PBS 洗涤 2 次后测量蛋白浓度。每孔上样 50 μg, 经 120 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转至 PVDF 膜。将 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 2 h, 转入一抗稀释液中孵育, 室温振荡 2 h, 使抗体与膜充分结合, 4 °C 过夜。取出 PVDF 膜, 洗膜缓冲液 5 min/次, 洗涤 3 次, 于二抗稀释液中室温孵育 1 h, 洗膜 3 次后用化学发光底物法于 Chemi Doc XRS 凝胶成像系统下曝光成像。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 HepG₂ 细胞用 0.25% EDTA 胰蛋白酶消化后, 吹打制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^6 mL⁻¹, 1 mL/孔接种于 6 孔细胞培养板。细胞贴壁后, ATO 单独处理组: ATO 终浓度为 5、10 和 20 μmol/L; ATO 联合自噬激动剂 Rap 处理组: ATO 终浓度分别为 5、10 和 20 μmol/L, Rap 终浓度为 0.25 μmol/L; ATO 联合自噬抑制剂 3-MA 处理组: ATO 终浓度分别为 5、10 和 20 μmol/L, 3-MA 终浓度为 10 mmol/L; 同时设置只含 DMEM 培养基处理的空白对照组。培养 24 h 后, 用不含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 4 °C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 1 500 r/min 离心 4 min, 去上清后向细胞沉淀中加入流式细胞术检测试剂盒中的结合液 100 μL 使细胞重悬, 再向细胞悬液中加入 5 μL Annexin V-FITC 染液和 5 μL PI 染液, 轻轻混匀后室温避光孵育 30 min, 待上机检测前再加入 400 μL 结合液, 混匀后采用流式细胞仪检测细胞凋亡。WinMDI 软件分析计算凋亡率, 实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据经方差齐性检验和正态性检验符合要求后, 两组间的比较采用 Student's *t* 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 调控自噬对 ATO 所致细胞存活率的影响

由图 1 可知, 在 5~200 μmol/L 浓度范围内, 随着 ATO 浓度的升高, HepG₂ 细胞的存活率明显下

降;当 5~200 $\mu\text{mol/L}$ ATO 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$ Rap 共同作用时,细胞存活率高于 ATO 单独作用组 ($P<0.05$);而当 ATO 和 10 mmol/L 3-MA 共同作用时,在 ATO 浓度为 5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的情况下,细胞存活率较 ATO 单独作用时降低 ($P<0.05$)。以上结果提示 ATO 对 HepG₂ 细胞的毒性作用随 ATO 浓度的升高而增强,且联合 10 mmol/L 3-MA 能增强 ATO 对 HepG₂ 细胞的杀伤作用。相反,Rap 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 联合 ATO 对 HepG₂ 细胞的生长没有抑制作用。

2.2 透射电镜观察细胞超微结构

由图 2 可知,ATO 单独作用可引起 HepG₂ 细胞自噬(图 2A),放大后清晰可见双层膜内包裹有缺陷或衰老的细胞器大分子(图 2B)。与 ATO 单独作用组相比,ATO 和 Rap 联合作用时(图 2C、2D)自噬体双层膜结构包裹的破损细胞器、大分子蛋白质明显增多,自噬体形态更加明显。而 ATO 与 3-MA

联合作用时细胞内未发现明显自噬体结构,细胞膜完整,胞浆内出现大量空泡样结构,线粒体肿胀明显,放大图中双箭头所指为肿胀的线粒体,提示细胞正在发生凋亡反应(图 2E、2F)。

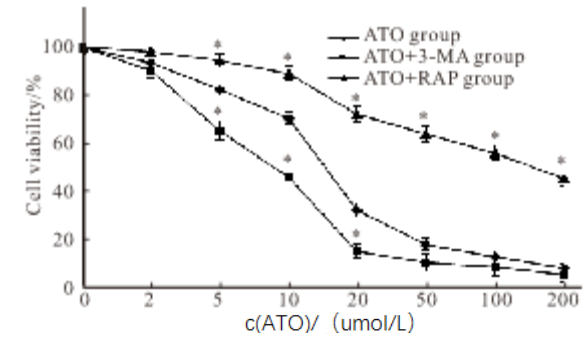


图 1 调控自噬对 ATO 作用下 HepG₂ 细胞存活率的影响
Fig 1 Effect of autophagy on the cell viability of ATO-treated HepG₂ cells
* $P<0.05$, vs. ATO group the same concentration

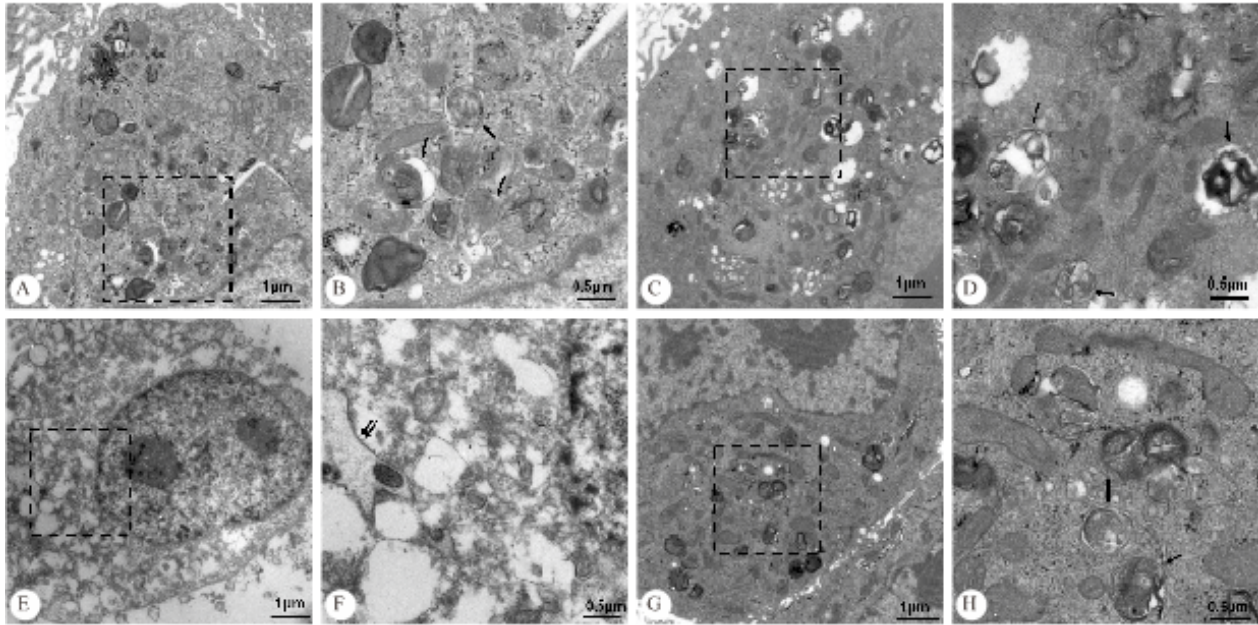


图 2 透射电镜下观察各组 HepG₂ 细胞超微结构图
Fig 2 Electron microscopy pictures of HepG₂ cells treated by ATO in combination with 3-MA or Rap
A, B: 5 $\mu\text{mol/L}$ ATO group; C, D: 5 $\mu\text{mol/L}$ ATO+0.25 $\mu\text{mol/L}$ Rap group; E, F: 5 $\mu\text{mol/L}$ ATO+10 mmol/L 3-MA group; G, H: Control group. Autophagic vesicles were denoted by single arrows. Mitochondria was denoted by double arrows

2.3 免疫印迹检测 LC3 I / II、Beclin1 蛋白水平

由图 3A 可见,与 ATO 组相比,ATO+Rap 组细胞内 LC-3 转换有增多趋势,但变化不明显;而 ATO+3-MA 组细胞内 LC-3 转换明显低于 ATO 组,提示 3-MA 显著抑制了细胞自噬形成过程。此外,Beclin1 蛋白表达的下降进一步佐证了自噬抑制

剂 3-MA 可有效减少 HepG₂ 细胞自噬相关蛋白的表达(图 3B)。

2.4 ATO 联合自噬激动剂/抑制剂对 HepG₂ 细胞凋亡的影响

结果见图 4。随着 ATO 浓度增加,ATO 联合 3-MA 组的细胞凋亡率较 ATO 单独应用组提高

($P<0.05$),其中 20 $\mu\text{mol/L}$ ATO 联合 3-MA 组细胞早期凋亡率高达 $(80.79\pm1.75)\%$,提示抑制自噬可有效增加 ATO 诱导 HepG₂ 细胞凋亡。相反,剂 Rap 和 ATO 联用较 ATO 单独使用时,HepG₂ 细胞凋亡率降低($P<0.05$),其中 20 $\mu\text{mol/L}$ ATO 联合 Rap 组的肝癌细胞早期凋亡率仅为 $(25.87\pm1.62)\%$ 。

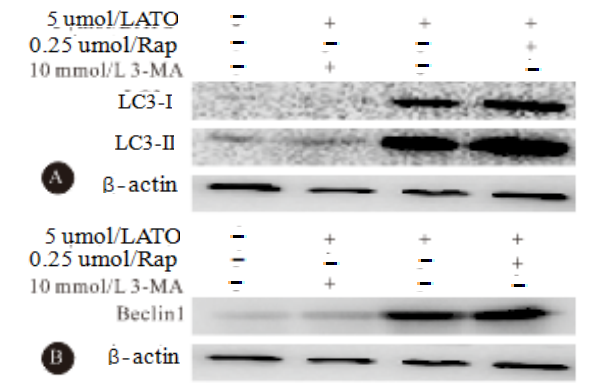


图 3 ATO 联合自噬激动剂/抑制剂对 HepG₂ 细胞全蛋白中 LC3-I / II (A) 和 Beclin1 (B) 表达的影响

Fig 3 Effects of autophagy agonist/inhibitor on ATO-induced LC3-I / II (A) and Beclin1 (B) expressions

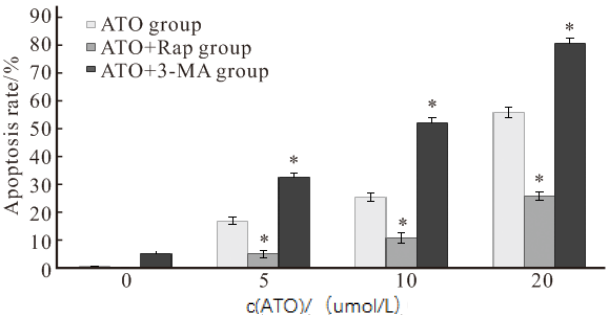


图 4 自噬对 ATO 作用下 HepG₂ 细胞早期凋亡率的影响

Fig 4 Effects of autophagy on early apoptosis of ATO-treated HepG₂ cells

* $P<0.05$, vs. ATO group at the same concentration

3 讨论

细胞凋亡和细胞自噬是细胞死亡的两种主要形式,越来越多的研究表明,细胞自噬也是一种重要的程序性细胞死亡方式,是维持真核细胞稳态和代谢平衡的重要机制^[1]。自噬既发生在一些生理过程,也存在于某些病理状况,人们对于自噬在肿瘤发生、发展过程中的作用进行了很多探讨,但对自噬过程是促进肿瘤细胞生长还是抑制其增殖目前仍有争议。有学者认为生理状态下的细胞自噬可以清除细

胞内引起 DNA 损伤的物质,如活性氧、错误折叠的蛋白等,从而维持细胞基因组的完整性和稳定性,进而抑制肿瘤发生^[2];然而,肿瘤形成后,肿瘤细胞能够通过自噬清除老旧细胞器,降解错误折叠蛋白从而获取更多能量,反而促进了肿瘤细胞的存活和生长^[8]。

细胞凋亡和细胞自噬在形态学上有较大区别,其发生发展也存在相互关联^[9-10],但具体机制尚未明确。一方面,有研究^[11]发现,在体外培养的交感神经元细胞中,自噬可以激活经典的 Caspase 信号通路引发细胞凋亡;还有研究^[12]发现,当细胞自噬过度激活时,细胞内 Caspase 蛋白酶抑制物被大量消耗从而诱发细胞凋亡。这些研究提示自噬可能是细胞凋亡的前提,发生于凋亡之前并可促进凋亡活性。另一方面,自噬能通过清除损伤的线粒体从而拮抗凋亡信号的传导^[13];或是由于过度抑制自噬,会导致代谢严重障碍和底物合成不足,同样可能促使细胞凋亡^[12];另有研究发现在慢性粒细胞性白血病(CML)细胞中通过 RNAi 技术或药物抑制自噬加强了抗肿瘤药物甲硫酸伊马替尼诱导的细胞死亡;抑制自噬还可以增强顺铂、5-氟尿嘧啶等抗肿瘤药物在食管癌和结肠癌中的治疗效应^[14],这些研究结果明确提示抑制自噬可以增加细胞凋亡。

那么,自噬在 ATO 诱导的肝癌 HepG₂ 细胞死亡过程中究竟扮演什么角色?大量研究显示,ATO 主要通过诱导细胞凋亡达到肿瘤治疗目的^[15-16],因此,本研究通过自噬抑制剂和激动剂调控自噬观察自噬在 ATO 诱导肝癌 HepG₂ 细胞凋亡过程中的作用。结果显示,3-MA 可增强 5~20 $\mu\text{mol/L}$ ATO 对 HepG₂ 细胞的杀伤作用,其中当 ATO 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,HepG₂ 细胞存活率小于 50%。在后续的电镜检测自噬体和免疫印迹实验中,我们给予 HepG₂ 细胞 5 $\mu\text{mol/L}$ ATO 处理,意在说明有效杀伤浓度范围内较低浓度 ATO 作用于 HepG₂ 细胞时,细胞便发生自噬反应,提示自噬可能是作为一种细胞防御机制被诱导发生,此时诱导的自噬只是细胞对外界环境变化的一种适应性反应,细胞启动自噬可增强细胞内物质的循环,清除受损、变性的细胞器以及隔离有害物质,减少损害效应,达到延迟细胞凋亡的作用^[17]。LC3 蛋白和 Beclin1 蛋白均属于自噬相关蛋白,是细胞自噬检测的蛋白分子标志物,其中 LC3 有 LC3-I (相对分子质量 18×10^3) 和 LC3-II (16×10^3) 两种类型。当细胞发生自噬时,存在于胞浆中的 LC3-I 降解转化成表达于自噬体

膜上的 LC3-II, 该转化被视为自噬发生的动态过程^[3]。在本研究中, 自噬被 3-MA 抑制后, LC3 和 Beclin1 蛋白的表达较单独 ATO 组均有显著降低, 说明自噬过程被明显抑制, 此时, 电镜下可见细胞质出现空泡样结构, 线粒体明显肿胀变大, 细胞核内出现致密碎片样变化, 这些均是凋亡产生的重要形态学特征, 提示抑制自噬可促进 HepG₂ 细胞发生凋亡, 其后的流式细胞术实验结果进一步证明: 抑制自噬有效增强了 ATO 对 HepG₂ 细胞产生的早期凋亡效应, 且呈现一定的剂量依赖关系。

综上所述, 细胞自噬和细胞凋亡作为引起细胞死亡的两种主要方式, 并非独立存在, 本研究结果明确揭示, 抑制自噬可以有效增加 ATO 对于肝癌细胞的杀伤作用, 其机制与抑制自噬增加凋亡有关, 这一结果为提高 ATO 在肝癌细胞中的化疗增敏效应提供了新思路。

参 考 文 献

- [1] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, LEVINE B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 2010, 140(3): 313-326.
- [2] KLIONSKY DJ, SALTIEL AR. Autophagy works out. *Cell Metab*, 2012, 15(3): 273-274.
- [3] PAN Y, GAO Y, CHEN L, *et al.* Targeting autophagy augments *in vitro* and *in vivo* antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(10): 3248-3258.
- [4] CHEN GQ, SHI XG, TANG W, *et al.* Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*, 1997, 89(9): 3345-3353.
- [5] 刘 欢, 那仁满都拉. 三氧化二砷治疗癌症机制研究进展. *中国现代应用药学*, 2013, 30(3): 338-342.
- [6] LIN LM, LI BX, XIAO JB, *et al.* Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells *in vitro*. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(36): 5633-5637.
- [7] LUO Q, LI Y, LAI Y, *et al.* The role of NF-kappaB in PARP-inhibitor-mediated sensitization and detoxification of arsenic trioxide in hepatocellular carcinoma cells. *J Toxicol Sci*, 2015, 40(3): 349-363.
- [8] WHITE E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(6): 401-410.
- [9] EDINGER AL, THOMPSON CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(6): 663-669.
- [10] RUBINSTEIN AD, KIMCHI A. Life in the balance——a mechanistic view of the crosstalk between autophagy and apoptosis. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 22): 5259-5268.
- [11] XUE L, FLETCHER GC, TOLKOVSKY AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci*, 1999, 14(3): 180-198.
- [12] MARINO G, NISO-SANTANO M, BAEHRECKE EH, *et al.* Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(2): 81-94.
- [13] BAUVY C, GANE P, ARICO S, *et al.* Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp Cell Res*, 2001, 268(2): 139-149.
- [14] CHEN S, REHMAN S K, ZHANG W, *et al.* Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1806(2): 220-229.
- [15] 白建刚, 李汉生. 三氧化二砷抗肿瘤研究进展. *中国药事*, 2008, 22(12): 1105-1108.
- [16] 李 楠, 罗旭飞, 李 娜, 等. 三氧化二砷通过抑制新生血管形成发挥抗小鼠恶性黑色素瘤作用. *中药药理与临床*, 2015(1): 114-117.
- [17] 付 校, 潘永成, 王建军, 等. 自噬在长春瑞滨诱导的肺癌细胞 A549 死亡中的作用. *中国肺癌杂志*, 2008, 11(3): 345-348.

(2016-09-14 收稿, 2016-12-09 修回)

编辑 汤 洁