文章编号:1000-5404(2013)22-2435-04

论著

索拉非尼诱导肝癌 HepG2 细胞自噬的机制及意义

秦利燕[1,2],王 滨[3],倪振洪[3],连继勤[3],宋方洲[1,2],袁成福[1,2],刘革力[1,2] (400016 重庆,重庆医科大学:基础医学部生物化学与分子生物学教研室[1],分子医学与肿瘤研究中心[2];400038 重庆,第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室[3])

[摘要] **目的** 探讨索拉非尼诱导肝癌 HepG2 细胞自噬的机制及意义。**方法** 用 GFP-LC3 质粒转染 HepG2 细胞后观察索拉非尼对自噬小体形成的影响;免疫共沉淀法检测索拉非尼对 Mcl-1 与 Beclin1 之间相互作用的影响;使用 siRNA 沉默自噬相关基因 Atg5 或用氯喹(CQ)抑制自噬后观察索拉非尼抗肝癌细胞的效应;Western blot 检测自噬与凋亡相关蛋白 Atg5、Beclin1、LC3、Mcl-1 与 PARP 表达的变化。**结果** 索拉非尼处理 HepG2 细胞后 LC3-Ⅱ蛋白表达量呈剂量依赖性增强,索拉非尼处理后转染 GFP-LC3 的 HepG2 细胞中出现明显的自噬小体样点状荧光,Western blot 结果显示索拉非尼处理后 HepG2 细胞中 Mcl-1 表达下调,Beclin1 无明显变化,Co-IP 证实在 HepG2 细胞中 Mcl-1 和 Beclin1 间存在蛋白相互作用,索拉非尼能减弱 Mcl-1 和 Beclin1 的结合。抑制自噬后能明显增强索拉非尼的杀细胞效应。**结论** 索拉非尼可能通过下调 Mcl-1 来诱导肝癌 HepG2 细胞自噬,抑制自噬后可显著增强索拉非尼的杀细胞效应。

[关键词] 索拉非尼;自噬;Mcl-1;凋亡
[中图法分类号] R735.7;R966;R979.19 [文献标志码] A

Mechanism and significance of sorafenib-induced autophagy in HepG2 cells

Qin Liyan[1,2], Wang Bin[3], Ni Zhenhong[3], Lian Jiqin[3], Song Fangzhou[1,2], Yuan Chengfu[1,2], Liu Geli[1,2] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2]Center of Molecular Medicine and Tumor, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the mechanism and significance of sorafenib-induced autophagy in HepG2 cell line. Methods HepG2 cells were transfected with GFP-LC3 plasmid to observe the effect of sorafenib on autophagosome formation. The interaction of Mcl-1 and Beclin1 was tested by co-immunoprecipitation (Co-IP). The anti-tumor effect of sorafenib was detected after autophagy inhibition with chloroquine (CQ) or knock down of autophagy-related gene Atg5 by siRNA. Changes of autophagic and apoptotic proteins Atg5, Beclin1, LC3, Mcl-1 and PARP were detected by Western blotting. Results In HepG2 cells, sorafenib upregulated LC3-Ⅱ protein expression in a dose-dependent manner. HepG2 cells transfected with GFP-LC3 plasmid showed autophogosome-like dot fluorescence when treated with sorafenib. Mcl-1 protein level was downregulated while Beclin1 remained unchanged when treated with sorafenib, as shown by Western blotting. The interaction between MCL-1 and Beclin1 were observed and could be reduced by sorafenib treatment, as shown by Co-IP. The anti-tumor effect of sorafenib was enhanced when autophagy was inhibited. Conclusion Sorafenib may induce autophagy by down-regulating Mcl-1 expression. The anti-tumor effect of sorafenib is enhanced when autophagy is inhibited.

[**Key words**] sorafenib; autophagy; Mcl-1; apoptosis

Supported by the National Nature Science Foundation of China (30800410). Corresponding author: Song Fangzhou, E-mail: fzsongcq@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床上最常见的恶性肿瘤之一,据最新统计全世界每年新发肝癌患者约60万,在各种恶性肿瘤病死率中居第3位,且大多数患者确诊时已为中晚期,失去了手术治疗

[基金项目] 国家自然科学基金(30800410)
[通信作者] 宋方洲,E-mail:fzsongcq@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130914.1456.006.html(2013-09-14)

的时机,只能选择非手术治疗[1-2]。药物治疗尤其是分子靶向药物治疗在肝癌治疗中的作用越来越受到重视。索拉非尼作为第1个被FDA批准治疗肝癌的分子靶向治疗药物,是一种多靶点、多激酶抑制剂,能显著改善晚期肝癌病人的生存期[3-6]。

自噬是细胞内一个高度保守的代谢过程,在饥饿、缺氧和化疗等应激条件下,细胞能形成一个双层膜结构的自噬小体,包裹受损、衰老的细胞器和大分子蛋白等,然后与溶酶体融合,在溶酶体酸性水解酶的作用下生成可供细胞重新利用的氨基酸、脂肪酸等小分子物质。研究表明自噬与肿瘤的发生、发展及治疗密切相关,各种因素诱导产生的自噬所发挥的作用不尽相同[7]。已有研究报道索拉非尼能诱导肝癌细胞发生自噬[8],可能是造成索拉非尼治疗抵抗的一个重要因素,但索拉非尼诱导自噬的相关机制还有待于深入研究。本研究以肝癌HepG2为模型,旨在初步探讨索拉非尼诱导肝癌细胞发生自噬的一种可能机制,从而为克服临床上索拉非尼的治疗抵抗问题提供新的思路和一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

人肝癌细胞株HepG2由第三军医大学基础部生物化学及分子生物学教研室保存并赠送。胎牛血清、DMEM培养基和0.25%胰酶购自美国HyClone公司;siRNA序列由上海吉玛生物公司合成;Lipofectamine^{2000} Transfection Reagent为美国Invitrogen公司产品;索拉非尼、氯喹、二甲基亚砜和LC3抗体购自美国Sigma公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒和细胞裂解液购自江苏碧云天生物技术公司;PARP、β-actin抗体购自美国Cell Signaling公司;Mcl-1、Beclin1、Atg5抗体购自美国Santa Cruz公司;PVDF膜购自美国Bio-Rad公司;蛋白Marker购自北京中杉公司。

1.2 细胞培养与转染方法

HepG2细胞培养于10%胎牛血清的DMEM培养液中,于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养。细胞融合度达到90%以上后用0.25%胰酶消化传代。取对数生长期细胞进行各项实验。取对数生长期的HepG2细胞以每孔按5×10^5个左右接种于6孔板,培养18 h后,细胞融合度达80%~90%,按Lipofectamine^{2000} Transfection Reagent的说明书操作,转染GFP-LC3质粒,24 h后处理组用10 μmol/L索拉非尼处理,48 h后用倒置荧光显微镜观察对照组和处理组自噬小体的形成情况。

1.3 免疫共沉淀实验(Co-IP)

收获10 cm细胞培养皿中培养的HepG2细胞,加入600 μL细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解30 min。4 ℃,13 000 r/min离心15 min后测定蛋白浓度,取适量蛋白作为Input组,变性后冻存;剩余蛋白分成2份,分别加入对应的一抗(Mcl-1)和对照IgG,4 ℃孵育1 h后加入Protein A-Agarose,4 ℃摇晃孵育过夜。用裂解液清洗beads,2 500 r/min离心2 min,共清洗4次后加入Loading Buffer煮沸变性后用于Western blot分析。

1.4 RNA干扰(RNAi)实验

Atg5的siRNA序列正义链:5′-GCAACUCUGGAUGGGAUUG-3′,反义链:5′-CAAUCCCAUCCAGAGUUGC-3′;阴性对照的siRNA序列正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,反义链:5′-ACGUGACACGUUC-GGAGAATT-3′。siRNA的转染按照Lipofectamine^{2000} Transfection Reagent的说明书进行,密度达到80%左右开始转染。细胞常规培养6 h后换液,24 h后处理组用10 μmol/L索拉非尼处理,48 h后用Western blot方法检测基因沉默效果及LC3、PARP表达变化。

1.5 Western blot检测

将处理后的HepG2细胞用PBS洗涤2次,用细胞裂解液冰上裂解20 min后4 ℃,13 000 r/min离心10 min,收集上清,BCA法测量蛋白浓度。将定量后的蛋白以每孔50 μg上样,在12%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,然后采用半干转的方法将蛋白转移至PVDF膜。将膜用含5%脱脂奶粉的PBST常温封闭1 h,再用1∶1 000稀释的第一抗体室温孵育2 h,经PBST洗3次后用1∶10 000稀释的第二抗体室温孵育1 h,PBST洗膜后用化学发光底物法于暗室显影曝光。

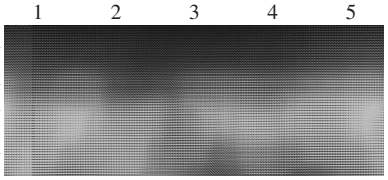
1.6 Hoechst 33258染色检测细胞凋亡

处理细胞后,吸尽培养液用PBS洗2遍,加入0.5 mL固定液,固定10 min后弃固定液再用PBS洗2遍后加入0.5 mL的Hoechst染色液染色5 min后于荧光显微镜下观察,荧光染料Hoechst 33258能少许进入正常细胞膜,使其染上低蓝色,而凋亡细胞的膜通透性增强,因此进入凋亡细胞中的Hoechst 33258比正常细胞多,荧光强度比正常细胞中要高,细胞核呈致密浓染颜色发白。细胞核呈正常的蓝色,而凋亡细胞的细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染。

2 结果

2.1 索拉非尼诱导HepG2细胞发生自噬

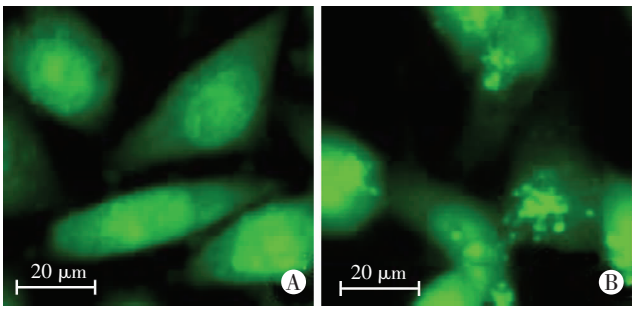
从图1可见,不同浓度的索拉非尼处理可导致HepG2细胞中Ⅱ型LC3蛋白水平逐渐增加,说明自噬水平呈剂量依赖性升高。Atg5是自噬发生过程中的关键分子,Western blot分析发现索拉非尼作用后Atg5蛋白水平明显升高(图1),说明索拉非尼在HepG2细胞中诱导的自噬可能与Atg5相关。



1:对照组;2:2.5 μmol/L索拉非尼组;3:5 μmol/L索拉非尼组;4:10 μmol/L索拉非尼组;5:20 μmol/L索拉非尼组

图1 Western blot检测索拉非尼对HepG2细胞中自噬相关蛋白Atg5、LC3表达的影响

从图 2 可见,10 μmol/L 索拉非尼处理经 GFP-LC3 转染的 HepG2 细胞 24 h 后出现明显的自噬小体样点状荧光,进一步说明索拉非尼可诱导 HepG2 细胞发生自噬。

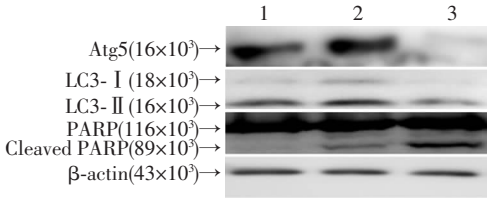


A:对照组;B: 10 μmol/L 索拉非尼组

图 2 索拉非尼处理后 HepG2 细胞中 GFP-LC3 荧光蛋白变化情况

2.2 抑制自噬可明显增强索拉非尼诱导的细胞凋亡

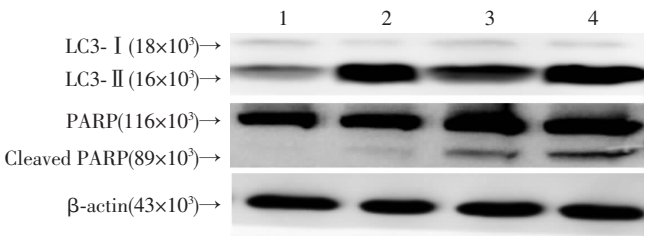
Atg5 是自噬发生过程中的关键基因,在索拉非尼处理的 HepG2 细胞中表达量明显升高(图 1)。转染 Atg5 siRNA 的 HepG2 细胞中,Atg5 与 LC3-Ⅱ水平明显下调,同时诱导细胞凋亡的关键分子 PARP 活性显著增强(图 3),说明下调 Atg5 抑制自噬后增强索拉非尼诱导的细胞凋亡。



1: 对照组;2:10 μmol/L 索拉非尼组;3:转染 Atg5-SiRNA + 10 μmol/L 索拉非尼组

图 3 下调 ATG5 增强索拉非尼诱导的 PARP 活性

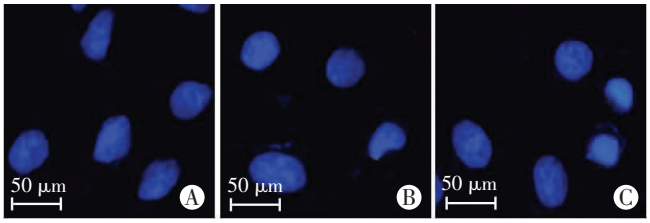
氯喹(CQ)由于能够抑制自噬小体和溶酶体的融合而阻断自噬进程,从而被作为自噬抑制剂使用。从图 4 可见,10 μmol/L CQ 和 10 μmol/L 索拉非尼联合用药以后,LC3-Ⅱ蛋白水平增强,不能通过溶酶体途径进一步降解。而细胞凋亡的标志蛋白 PARP 被剪切后活性增强,说明在 HepG2 细胞中自噬抑制剂氯喹增强了索拉非尼的杀细胞效应。



1: 对照组;2: 10 μmol/L CQ 组;3: 10 μmol/L 索拉非尼组;4: 10 μmol/L CQ + 10 μmol/L 索拉非尼组

图 4 氯喹抑制自噬后明显增强索拉非尼诱导的 PARP 剪切

10 μmol/L CQ 和 10 μmol/L 索拉非尼联合用药后,细胞核更加致密浓染且颜色发白,凋亡增强(图 5)。

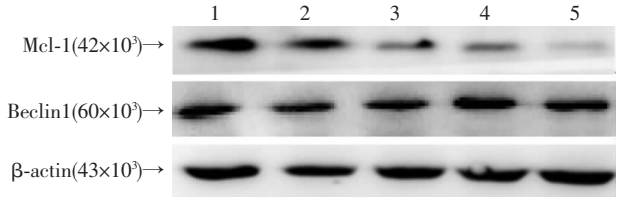


A: 对照组; B: 10 μmol/L 索拉非尼组; C: 10 μmol/L CQ + 10 μmol/L 索拉非尼组

图 5 荧光显微镜观察索拉非尼和氯喹联用后 HepG2 细胞中细胞核颜色变化

2.3 索拉非尼可下调细胞中 Mcl-1 蛋白水平而使 Beclin1 解离

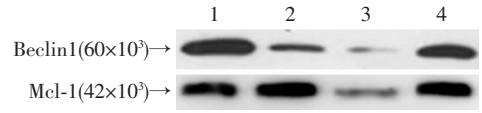
如图 3 显示,索拉非尼处理后 HepG2 细胞中 Mcl-1 蛋白水平呈剂量依耐性的降低。Beclin1 作为首个发现介导哺乳动物自噬的基因,在自噬启动过程中发挥关键作用。Western blot 分析发现索拉非尼作用后 Beclin1 蛋白水平无明显变化(图 6)。



1:对照组;2:2.5 μmol/L 索拉非尼组;3:5 μmol/L 索拉非尼组;4:10 μmol/L索拉非尼组;5:20 μmol/L 索拉非尼组

图 6 索拉非尼下调 HepG2 细胞中 Mcl-1 的表达

Co-IP 实验进一步发现,在 HepG2 细胞中 Mcl-1 和 Beclin1 存在于同一复合物中(图 7),两者之间可能存在相互作用,10 μmol/L的索拉非尼处理后 Beclin1 与 Mcl-1 的相互作用明显减弱,因此可能通过降低 Mcl-1 使 Beclin1 从该复合物中解离而启动自噬过程。



1:对照组;2:Mcl,Co-IP,10 μmol/L 索拉非尼组;3:Co-IP, IgG 阴性对照组;4:Input 阳性对照组

图 7 索拉非尼减弱 Mcl-1 与 Beclin1 的结合

3 讨论

自噬作为一种普遍存在的应激代谢过程,其与肿瘤的关系成为了近年来的研究热点。目前已有研究报道放疗、大部分的化疗药物及许多分子靶向药物在治疗肿瘤的过程中均能诱导肿瘤细胞发生自噬。适当的自噬对促进肿瘤细胞在应激压力下的存活具有积极的意义,但过度的自噬则会导致细胞死亡[9]。有临床研

究发现,在肿瘤细胞生长过程中通过代谢应激诱导细胞自噬以满足能量需求,但是如果这种不利的代谢应激持续以致超过细胞存活的平衡点时,将发生自噬性细胞死亡[10-11]。同时国内外越来越多的实验证明,自噬地放疗、化疗和细胞毒性药物治疗中大多起保护肿瘤细胞作用,从而成为药物耐受的主要原因之一。例如已有研究发现,在抗 Her-2 的单克隆抗体曲妥珠单抗治疗 HER2 阳性细胞中增强的自噬明显增加了细胞的药物耐受性,在 CML 细胞中通过 RNAi 技术或药物抑制自噬加强了甲磺酸伊马替尼诱导的细胞死亡,自噬的抑制也加强了顺铂、5-FU 在食管癌和结肠癌中的治疗效应等[12-13]。

索拉非尼是治疗肝癌的第 1 个分子靶向药物[14]。本研究发现,索拉非尼能诱导肝癌 HepG2 细胞发生自噬,并且这种自噬作用是有利于 HepG2 细胞存活的,可能是肝癌细胞对索拉非尼产生治疗抵抗的一种重要机制,抑制自噬的发生能显著增强索拉非尼的杀细胞效应。

Mcl-1 是 Bcl-2 抗凋亡蛋白家族的重要成员,能通过同源结构域 3(BH3)与自噬关键蛋白 Beclin1 相互作用,从而抑制自噬的发生[15-16],而已被证实含有 BH3 结构域。本研究通过免疫共沉淀实验也证实 Mcl-1与 Beclin1 存在于同一复合物中,因此索拉非尼通过下调 Mcl-1 而使 Beclin1 从该复合物中解离可能代表了索拉非尼诱导细胞自噬的新机制。本研究结果也证实,索拉非尼诱导的细胞自噬机制还依赖于另一个自噬关键基因 Atg5,下调 Atg5 可抑制索拉非尼的自噬诱导作用。

为进一步研究索拉非尼诱导的细胞自噬对 HepG2 细胞存活的影响,本研究分别使用自噬抑制剂 CQ 或 Atg5 siRNA 抑制自噬后观察索拉非尼的作用效果,结果提示抑制自噬可显著增强索拉非尼诱导的细胞凋亡,增强索拉非尼的杀细胞效应。

综上所述,索拉非尼可能通过下调 Mcl-1 来诱导肝癌 HepG2 细胞自噬,自噬对肝癌细胞起保护作用,可能最终导致肝癌细胞对索拉非尼耐药,而抑制自噬则可显著增强索拉非尼的杀肿瘤细胞效应。本研究对增强索拉非尼的临床治疗效果具有一定的实验参考价值。

参考文献:

[1] 秦叔逵, 龚新雷, 索拉非尼治疗原发性肝癌的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2008, 13(12): 1057-1068.

[2] Llovet J M, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008[J]. J Hepatol, 2008, 48(Suppl 1): S20-S37.

[3] Inaba H, Rubnitz J E, Coustan-Smith E, *et al*. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with clofarabine and cytarabine in pediatric relapsed/refractory leukemia[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(24): 3293-3300.

[4] Abou-Alfa G K, Schwartz L, Ricci S, *et al*. Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(26): 4293-4300.

[5] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, *et al*. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 378-390.

[6] Ben-Mousa A. Sorafenib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma[J]. Saudi J Gastroenterol, 2008, 14(1): 40-42.

[7] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, *et al*. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075.

[8] Shimizu S, Takehara T, Hikita H, *et al*. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafeni b in hepatocellula rcarcinoma[J]. Int J Cancer, 2012, 131(3) Sorafenib: 548-557.

[9] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer,2007, 7(12): 961-967.

[10] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease[J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.

[11] Janku F, McConkey D J, Hong D S, *et al*. Autophagy as a target for anticancer therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(9): 528-539.

[12] Valabrega G, Capellero S, Cavalloni G, *et al*. HER2-positive breast cancer cells resistant to trastuzumab and lapatinib lose reliance upon HER2 and are sensitive to the multitargeted kinase inhibitor sorafenib[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 130(1): 29-40.

[13] Chen S, Rehman S K, Zhang W, *et al*. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1806(2): 220-229.

[14] Villanueva A, Llovet J M. Second-line therapies in hepatocellular carcinoma: emergence of resistance to sorafenib[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(7): 1824-1826.

[15] Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 47-59.

[16] Funderburk S F, Wang Q J, Yue Z. The Beclin 1-PS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond[J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(6): 355-362.

(**收稿**:2013-05-20;**修回**:2013-07-23)

(编辑 郭建秀)