DOI:10.16016/j.1000-5404.201506001

盐酸吡柔比星通过上调 ATG4B 增强 HeLa 细胞保护性自噬

吴亚冉[1],倪振洪[1],闫小晶[1],郑英如[2],何凤田[1],连继勤[1] (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[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨盐酸吡柔比星增强宫颈癌 HeLa 细胞自噬水平的可能机制。**方法** 采用 CCK-8 检测盐酸吡柔比星单独或联用自噬抑制剂氯喹对 HeLa 细胞增殖的影响;台盼蓝染色实验检测盐酸吡柔比星单独或联用自噬抑制剂氯喹对 HeLa 细胞死亡的影响;GFP-LC3 质粒转染 HeLa 细胞后观察盐酸吡柔比星对自噬小体形成的影响;Western blot 检测细胞中自噬标志分子Ⅱ型微管相关蛋白轻链 3(microtuble-associated protein light chain 3-Ⅱ, LC3-Ⅱ)、自噬相关分子自噬相关蛋白 4B(autophapy related 4B,ATG4B)的表达情况。CCK-8 实验及台盼蓝染色实验观察在有或者无自噬抑制剂氯喹作用下以及 shRNA 下调 HeLa 细胞中的 ATG4B 后盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞的杀伤效应的影响。**结果** 盐酸吡柔比星能剂量依赖地抑制 HeLa 细胞的增殖并促进其死亡($P<0.05$);盐酸吡柔比星处理能显著增加 HeLa 细胞中自噬小体的数量,并显著上调自噬标志分子 LC3-II、自噬关键酶 ATG4B 的表达;自噬抑制剂氯喹可显著增强盐酸吡柔比星的杀细胞效应($P<0.05$),shRNA 干扰 ATG4B 可抑制盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞中自噬的增强作用($P<0.05$),并增强盐酸吡柔比星的杀细胞效应($P<0.05$)。**结论** 盐酸吡柔比星通过上调 ATG4B 而增强的自噬对 HeLa 细胞起保护作用。

[关键词] 盐酸吡柔比星;自噬;自噬相关蛋白 4B;宫颈癌

[中图法分类号] R737.33;R966;R979.1 [文献标志码] A

Pirarubicin induces cytoprotective autophagy in HeLa cells through up-regulating autophapy related 4B

Wu Yaran[1], Ni Zhenhong[1], Yan Xiaojing[1], Zheng Yingru[2], He Fengtian[1], Lian Jiqin[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the mechanism and significance of pirarubicin in enhancing the autophagy of HeLa cells. Methods Trypan blue exclusion assay and CCK-8 assay were used to detect cell mortality and proliferation in HeLa cells treated with different doses of pirarubicin alone or combined with chloroquine (autophagy inhibitor). The effect of pirarubicin on autophagosome formation in HeLa cells transfected with GFP-LC3 plasmid was observed with fluorescence microscopy. Western blotting was used to determine the protein levels of autophagy markers microtuble-associated protein light chain 3-Ⅱ (LC3-Ⅱ), and autophapy related 4B (ATG4B). After ATG4B was down-regulated with shRNA in HeLa cells, the effect of pirarubicin on killing HeLa cells in the presence of chloroquine was observed. Results Pirarubicin inhibited cell proliferation and induced cell death in a dose-dependent manner in HeLa cells ($P<0.05$). Pirarubicin induced the formation of LC3-GFP puncta in HeLa cells, and increased the expression of LC3Ⅱ and ATG4B markedly. Chloroquine enhanced pirarubicin-triggered cell death in HeLa cells ($P<0.05$). Knockdown of ATG4B *via* shRNA suppressed pirarubicin-induced autophagy and increased pirarubicin-induced

[基金项目] 国家自然科学基金(81472436);重庆市自然科学基金(CSTC2014jcyjA10110)

[通信作者] 连继勤,E-mail: lianjiqin@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151127.0853.010.html(2015-11-27)

cell death in HeLa cells. **Conclusion** Pirarubicin induces cytoprotective autophagy in HeLa cells through up-regulating ATG4B.

[**Key words**] pirarubicin; autophagy; autophapy related 4B; uterine cervical neoplasm

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81472436) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2014jcyjA10110).
Corresponding author: Lian Jiqin, E-mail: lianjiqin@sina.com

宫颈癌是妇科中最常见的恶性肿瘤,作为威胁女性生命的第二大恶性疾病[1],近年来有年轻化发展的趋势。目前结合化疗与放疗的综合治疗是治疗晚期宫颈癌的常用方法,其中治疗抵抗是影响疗效的关键因素。

盐酸吡柔比星(pirarubicin,THP)是一类蒽环类抗肿瘤药物。因盐酸吡柔比星具有抗肿瘤活性强,副作用低等优点,在临床有良好的应用前景[2]。前期研究表明,盐酸吡柔比星对妇科肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等具有较好的疗效[3-4]。但研究表明,部分宫颈癌患者对吡柔比星的化疗极不敏感,治疗抵抗是影响盐酸吡柔比星有效杀伤癌细胞的重要因素[5],相关机制值得深入探讨。

细胞自噬是真核生物中进化保守的对细胞内物质进行回收利用的重要过程,细胞内一些损坏的蛋白或细胞器可通过自噬过程进行降解并得以循环利用。近年来研究显示,自噬在肿瘤治疗过程中有不可忽视的作用,肿瘤细胞通过增强自身自噬水平回收利用治疗中受损的蛋白及细胞器等,降低肿瘤对化疗药物的敏感性,从而起到保护肿瘤细胞的效果[6-7]。研究表明,在膀胱癌细胞中,盐酸吡柔比星诱导癌细胞发生自噬而导致化疗抵抗[8],但盐酸吡柔比星在宫颈癌 HeLa 细胞中能否增强细胞自噬以及自噬在治疗中的作用尚不清楚。

本研究探讨盐酸吡柔比星对宫颈癌 HeLa 细胞的杀伤效应、对自噬的诱导作用及可能机制与意义,旨在为增强盐酸吡柔比星对宫颈癌的临床治疗效果提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞由基础部生物化学与分子生物学教研室保存。胎牛血清和高糖 DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司;氯喹购自美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂盒购自日本 Dojindo Laboraories;细胞裂解液 RIPA、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白酶抑制剂 PMSF 及 Tublin 抗体均购自江苏碧云天生物技术公司;ATG4B 抗体购自美国 Affinity 公司,LC3 抗体购自美国 Sigma 公司,山羊抗兔及山羊抗小鼠 HRP 标记二抗购自北京中杉金桥公司。检测 mRNA 表达水平用引物由上海英骏生物技术有限公司广州合成部合成,TRIzol 裂解液购自北京康为世纪生物科技有限公司,反转录试剂盒 M-MLV 及 SYBR 购自宝生物工程(大连)有限公司,转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司,靶向 ATG4B 的小干扰 RNA 购自上海吉玛公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HeLa 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。

1.2.2 CCK-8 实验

1.2.2.1 剂量依赖实验 以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,设置对照组和实验组(5 个浓度梯度),每组设置 3 个复孔,于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜后处理细胞。处理方式如下:实验组加入盐酸吡柔比星,浓度分别为 50、100、200、400 及 800 ng/mL,对照组加入等体积 PBS,处理 24 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 ℃避光孵育 10 min 后使用全波长酶标仪于 456 nm 处测量每孔的光密度值[$D(456)$]。

1.2.2.2 盐酸吡柔比星联合氯喹实验 以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中,设置对照组、盐酸吡柔比星组(100 ng/mL)、盐酸吡柔比星(100 ng/mL)与氯喹联用组(40 μmol/L),每组设置 3 个复孔,于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜后,按照上述方式处理 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 ℃避光孵育 10 min 后使用全波长酶标仪于 456 nm 处测量每孔的光密度值。

1.2.2.3 盐酸吡柔比星联合 ATG4B shRNA 实验 HeLa 细胞接种于 96 孔板,设置对照组、盐酸吡柔比星组、盐酸吡柔比星与 ATG4B 干扰联用组,每组设置 3 个复孔待细胞密度汇合至 50% 时,转染靶向 ATG4B 的 shRNA(转染用量按照吉玛公司推荐用量)24 h 后,加入盐酸吡柔比星 100 ng/mL,24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃避光孵育 10 min 后使用全波长酶标仪于 456 nm 处测量每孔的光密度值。

细胞存活率 =(加药孔光密度值 - 空白孔光密度值)/(对照组光密度值 - 空白孔光密度值)×100%

1.2.3 台盼蓝染色实验　经处理后的细胞按 9∶1体积比加入 0.4% 的台盼蓝染液,混匀后染色 3 min。用血细胞计数板在显微镜下分别计数活细胞与死细胞个数,死细胞在镜下成蓝色,而活细胞由于细胞膜通透性完整台盼蓝不能进入细胞中而不能被染成蓝色。

细胞死亡率 = 死细胞数/(活细胞数 + 死细胞数) × 100%

1.2.4　细胞中自噬小体的观察　6 孔板中 HeLa 细胞汇合至 80% 时,转染质粒 GFP-LC3,转染 24 h 后,加入浓度分别为 0、100、200 ng/mL 的盐酸吡柔比星,处理 24 h 后,于荧光显微镜下采集图像。

1.2.5　Western blot 分析　HeLa 细胞经处理 24 h 后(处理方法同 CCK-8)吸弃培养基,PBS 漂洗细胞表面两次,吸净 PBS,每孔加入 80μL 含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液,用细胞刮收集裂解液于 1.5 mL EP 管中,置于冰上裂解 20 min。4 ℃,12 000 r/min,离心 10 min,收集上清于新 EP 管中,并使用 BCA 法进行蛋白定量及标准化。将定量后蛋白样品以每孔 40 μg 上样,在 12% 丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离,电泳结束后采用半干转方法将凝胶中蛋白转移至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 1 h,其后用兔多克抗体 LC3(1∶1 000 稀释)、ATG4B(1∶1 000 稀释)及鼠多克隆抗体 Tublin(1∶5 000 稀释)4℃孵育过夜,次日用 PBST 洗膜 3 次、每次 10 min 后,分别用山羊抗兔二抗(1∶10 000 稀释)、山羊抗小鼠二抗(1∶10 000 稀释)室温孵育 1 h,PBST 洗膜后用化学发光底物法置于化学发光仪中显影曝光。

1.2.6　RNA 提取及 Real-time PCR 检测　HeLa 细胞经盐酸吡柔比星处理 24 h 后吸弃培养基,每孔加入 1 mL TRIzol 裂解液裂解细胞。经氯仿抽提、异丙醇沉淀、75% 乙醇漂洗后提取总 RNA,用 DEPC 水溶解沉淀。采用 TaKaRa 反转录试剂盒 M-MLV 反转录为 cDNA,作为模板用于 Real-time PCR 检测 ATG4B mRNA 表达水平变化。Real-time PCR 用试剂盒采用 TaKARa 公司生产的 SYBR,数据分析采用 ΔΔCt 法分析后作图。

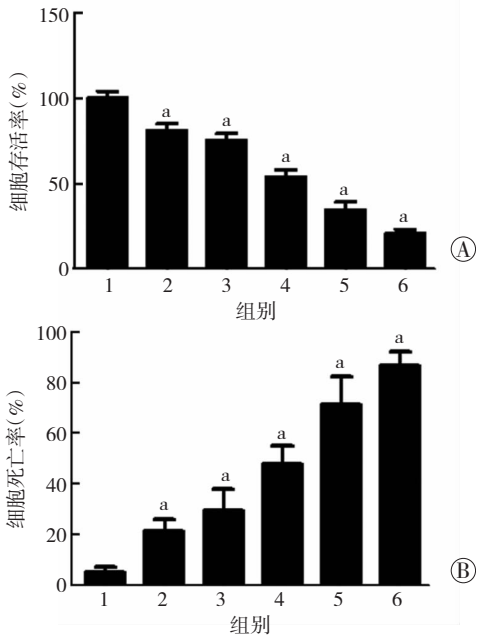
1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间 t 检验。

2　结果

2.1　盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞的增殖抑制和存活促进具有剂量依赖效应

为明确盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞的杀伤作用,本实验采用不同浓度的盐酸吡柔比星作用 HeLa 细胞 24 h 后,用 CCK-8 检测与台盼蓝排斥实验检测盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞增殖和存活的影响。结果见图 1,与对照组相比,盐酸吡柔比星能够剂量依赖性地抑制 HeLa 细胞的增殖并促进 HeLa 细胞的死亡($P<0.05$)。

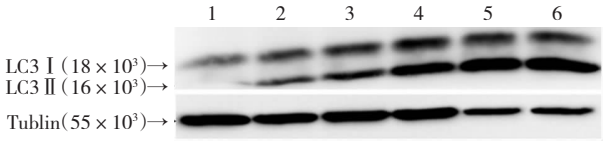


1:对照组;2 ~ 6:50、100、200、400、800 ng/mL 盐酸吡柔比星处理组　A:CCK-8 测定盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞增殖的抑制作用;B:台盼蓝染色法测定盐酸吡柔比星促进 HeLa 细胞死亡的效应　a:$P<0.05$,与第 1 组比较

图 1　不同浓度盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞增殖和存活的影响

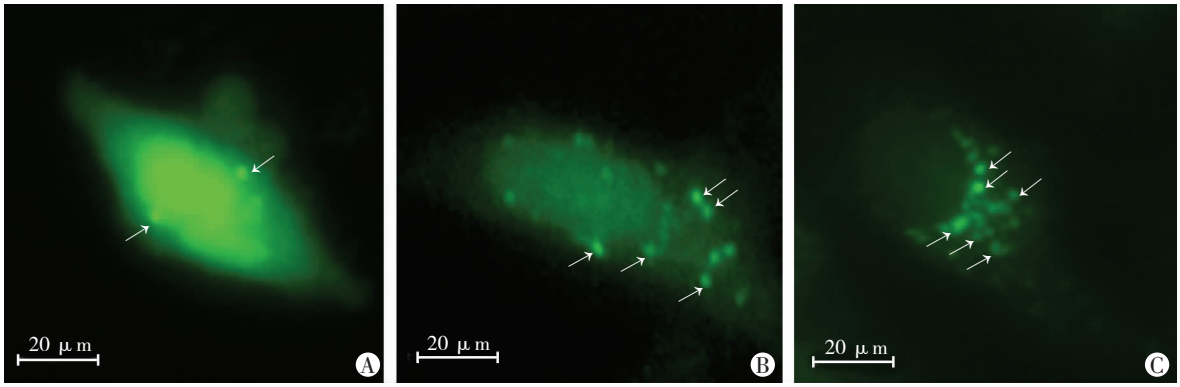
2.2　盐酸吡柔比星处理增强 HeLa 细胞的自噬水平

为证明盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞中自噬水平的影响,分别用不同浓度的盐酸吡柔比星处理 HeLa 细胞 24 h 后,Western blot 检测发现自噬标志性蛋白Ⅱ型微管相关蛋白轻链 3(microtuble-associated protein light chain 3-Ⅱ, LC3-Ⅱ)表达显著上调(图 2),且盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞中自噬水平的上调作用具有一定的剂量依赖效应。在此基础上,用 100 ng/mL 和 200 ng/mL 的盐酸吡柔比星处理转染 GFP-LC3 的 HeLa 细胞 24 h 后,荧光显微镜观察发现细胞中自噬小体数量明显增加(图 3),进一步证明盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞中自噬的增强作用。



1:对照组;2 ~ 6:50、100、200、400、800 ng/mL 盐酸吡柔比星处理组

图 2　Western blot 检测盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞自噬水平的增强作用

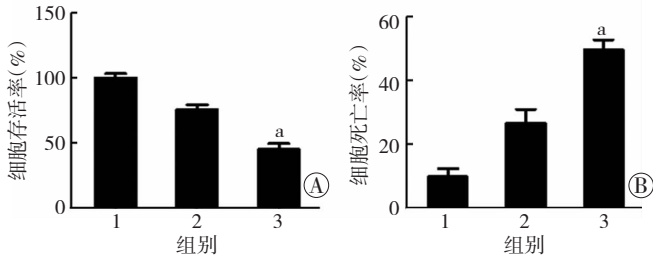


A:对照组;B、C:100、200 ng/mL 吡柔比星组

图3 盐酸吡柔比星处理后 HeLa 细胞中 GFP-LC3 荧光蛋白变化情况

2.3 抑制自噬增强盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞的杀伤效应

为证明自噬在盐酸吡柔比星杀伤 HeLa 细胞中的作用,本实验使用自噬抑制剂氯喹(chloroquine,CQ)阻断自噬后,采用 CCK-8 实验及台盼蓝染色实验观察盐酸吡柔比星对细胞存活率及死亡率的影响。结果见图4,与盐酸吡柔比星单独使用相比,自噬抑制剂 CQ 和盐酸吡柔比星联用能显著增强盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞的抗增殖效应($P<0.05$,图4A),并明显促进盐酸吡柔比星的杀细胞效应($P<0.05$,图4B)。



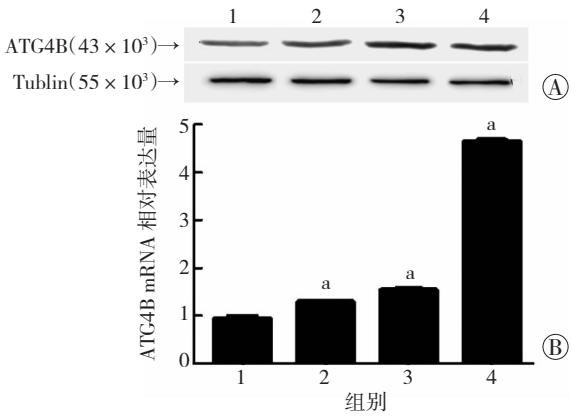
1:对照组;2:100 ng/mL 盐酸吡柔比星处理组;3:100 ng/mL 盐酸吡柔比星 +40 μmol/L CQ 处理组 a:$P<0.05$,与 100 ng/mL 盐酸吡柔比星处理组比较;A:CCK-8 法测定盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞增殖的抑制作用;B:台盼蓝染色法测定盐酸吡柔比星促进 HeLa 细胞死亡的效应

a:$P<0.05$,与第2组比较

图4 自噬抑制剂 CQ 对盐酸吡柔比星抗肿瘤效应的影响

2.4 盐酸吡柔比星增强 HeLa 细胞中自噬关键酶 ATG4B 的表达

为进一步探讨盐酸吡柔比星增强 HeLa 细胞中自噬水平的相关机制,本研究分别采用 Real-time PCR 及 Western blot 检测了盐酸吡柔比星处理前后 HeLa 细胞中自噬相关蛋白 4B(autophapy related 4B,ATG4B)的表达变化。结果表明,与对照组相比,盐酸吡柔比星可以剂量依赖性增强 HeLa 细胞中 ATG4B 的表达水平,体现为 ATG4B 的 mRNA 水平($P<0.05$,图5A)及蛋白水平(图5B)在盐酸吡柔比星处理后均呈剂量依赖性上调。

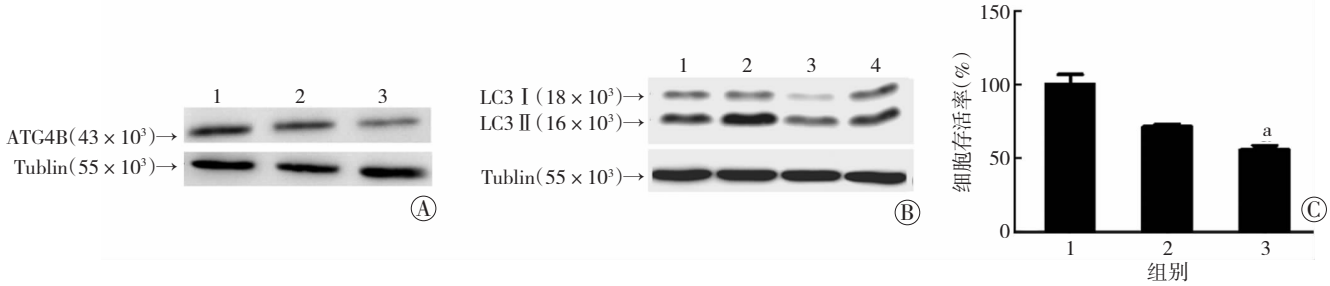


1:对照组;2~4:50、100、200 ng/mL 盐酸吡柔比星处理组;a:$P<0.05$,与第1组比较 A:Western blot 检测盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞中 ATG4B 蛋白水平的影响;B:Real-time PCR 检测盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞中 ATG4B mRNA 水平的影响

图5 不同浓度盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞 ATG4B mRNA 及蛋白表达水平的影响

2.5 下调 ATG4B 抑制盐酸吡柔比星诱导的保护性自噬并增强其杀细胞效应

为进一步证明 ATG4B 表达上调在盐酸吡柔比星增强 HeLa 细胞自噬及杀细胞效应中的作用,本研究使用 shRNA 下调 HeLa 细胞中的 ATG4B 后再用盐酸吡柔比星处理 HeLa 细胞。结果表明,与 shNC 组相比,所使用的靶向 ATG4B 的 shRNA 可有效抑制 HeLa 细胞中 ATG4B 的表达(图6A);与 shNC、THP 联用相比,shATG4B、THP 联用可显著抑制盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞自噬的增强作用(图6B),并且显著增强盐酸吡柔比星对 HeLa 细胞的杀伤效果($P<0.05$,图6C)。



A：Western blot 检测 ATG4B 干扰效果　1:pGPU6-shNC 组;2:pGPU6-shATG4B-1205 组;3:pGPU6-shATG4B-2589 组;B：Western blot 检测干扰 ATG4B 对盐酸吡柔比星诱导 HeLa 细胞自噬水平的影响　1:pGPU6-shNC + THP 0 ng/mL 处理组;2:pGPU6-shNC + THP100 ng/mL 处理组；3:pGPU6-shATG4B-2589 + THP 0 ng/mL 处理组;4:pGPU6-shATG4B-2589 + THP 100 ng/mL 处理组；C：CCK-8 检测 ATG4B 下调对盐酸吡柔比星杀伤 HeLa 细胞的影响　1:pGPU6-shNC + THP 0 ng/mL 处理组;2:pGPU6-shNC + THP100 ng/mL 处理组；3:pGPU6-shATG4B-2589 + THP 100 ng/mL 处理组　a：$P<0.05$,与第 2 组比较

图 6　下调 ATG4B 抑制盐酸吡柔比星诱导的保护性自噬并增强其杀细胞效应

3　讨论

盐酸吡柔比星为 1979 年半合成的蒽环类抗肿瘤药物,由多柔比星在 4′位添加 1 个四氢吡喃改造而成,在体内代谢和排泄较多柔比星快,在治疗过程中引起的心脏毒性、脱发率等副作用显著低于多柔比星[9]。对膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等多种实体肿瘤具有良好的治疗效果。前期临床试验表明,90% 宫颈癌患者对顺铂与丝裂霉素 C、5 氟尿嘧啶联用敏感,而顺铂与吡柔比星联用可达到同样效果[10];在 HPV18 感染的宫颈癌患者治疗过程中,吡柔比星与环磷酰胺联用 1 个月后,患者外阴未见子宫出血及渗透性肿瘤[11],表明吡柔比星对宫颈癌患者具有良好的治疗效果。但 Kato 等[5]在吡柔比星对妇科癌症的Ⅱ期临床实验中发现,宫颈癌患者对盐酸吡柔比星的敏感率较低,仅占 13.3%,而本研究的实验结果也进一步验证了这一点,即药物剂量为 100 ng/mL 时,细胞杀伤效果不足 25%;药物剂量为 200 ng/mL 时,细胞杀伤效果仍不足 50%,使用剂量为 800 ng/mL 时细胞杀伤率达到 80%,但这一剂量远超过吡柔比星的临床使用剂量(60 mg,血药浓度约 170 ng/mL),将引起严重的药物副作用[5]。类似的结果也在宫颈癌的其他细胞系 C33A、SiHa 中得到验证。因此,增加宫颈癌细胞对低剂量吡柔比星的敏感性是比较符合临床实际的治疗策略。

细胞自噬是真核细胞特有的高度保守的代谢过程,参与细胞内容物的降解和再循环。细胞通过形成双层膜包裹的自噬小体将胞内受损的蛋白质、细胞器等借助溶酶体途径进行降解,从而为处在压力状态下的细胞提供能量供应[12],起到促进细胞存活的作用。因此,细胞自噬已成为化疗过程中肿瘤细胞逃逸的重要机制[13],前期研究表明:紫杉醇可以增强子宫内膜癌细胞的自噬水平,而通过使用自噬抑制剂氯喹或干扰自噬相关分子 Beclin1 可以增加癌细胞对紫杉醇的敏感性,从而增强紫杉醇的杀细胞效果[14];多柔比星在诱导淋巴瘤 Raji 细胞凋亡过程中可增强其自噬水平,采用自噬抑制剂 3-MA 或 NH_4Cl 抑制自噬后可显著增强多柔比星的杀细胞效果[15],而在急性髓细胞性白血病细胞 HL-60 中,多柔比星激活了包括自噬在内的溶酶体降解途径,导致了 HL-60 细胞对多柔比星的不敏感[16];在乳腺癌 MCF-7 细胞中,表柔比星也诱导了一个保护性细胞自噬反应[17];Kong 等[18]研究表明,细胞自噬在卵巢癌对吡柔比星治疗抵抗过程中起到重要作用。上述研究都表明了,无论在治疗敏感的白血病细胞还是在治疗较不敏感的乳腺癌、卵巢癌细胞中,吡柔比星及其前体药物均诱导了保护性细胞自噬反应,同时我们的实验结果也证实,在宫颈癌 C33A、SiHa 细胞中盐酸吡柔比星也可以诱导保护性细胞自噬反应(未发表),提示自噬是引起肿瘤细胞对吡柔比星抵抗的普遍机制,而联用自噬抑制剂是增敏吡柔比星有效措施。本研究中所采用的自噬抑制剂氯喹(CQ)通过抑制自噬小体与溶酶体的融合[19],一方面可以抑制自噬小体内容物的降解,使处在压力状态下的细胞减少能量来源[20-21],另一方面清除受损的线粒体,减少 ROS 的积累从而起到保护细胞的作用[22-23]。本实验证实了盐酸吡柔比星在杀伤宫颈癌 HeLa 细胞同时,还明显增强了 HeLa 细胞的自噬水平,在低浓度下(100 ng/mL)联用自噬抑制剂 CQ 抑制自噬后,细胞存

活率从76%降低至44%,可以明显增强盐酸吡柔比星对宫颈癌HeLa细胞的杀伤效应。

在哺乳动物自噬发生过程中,LC3对自噬小体的形成起到重要作用:细胞中游离的LC3分子经剪切后露出半胱氨酸残基,经泛素化作用后锚定于自噬小泡双层膜,待双层膜延长并完全包裹内容物后,处于自噬小体外膜的LC3又被重新剪切回收,在这一过程中对LC3起剪切作用的分子为半胱氨酸蛋白酶ATG4B(又称自噬蛋白酶-1,autophagin-1)[24]。有研究表明,ATG4B上调可提高细胞内自噬水平,如:ATG4B可被转录因子C/EBPβ转录激活,从而提高小鼠成纤维细胞3T3中的自噬水平,促进脂质生成[25]。化合物BBP通过上调ATG4B提高乳腺癌MCF-7细胞的自噬水平[26]。作为在自噬过程中调节自噬小体形成并维持其数量的关键分子ATG4B,也有报道表明其在肿瘤细胞化疗抵抗过程中发挥了重要的作用:Rothe等[27]研究表明,在慢性粒细胞白血病细胞中ATG4B呈高表达状态,而干扰ATG4B可减弱细胞的自噬水平,增强其对伊马替尼的敏感性;在骨肉瘤细胞中,ATG4B抑制剂NSC185058可抑制细胞自噬,促进细胞死亡[28];Tran等[29]研究表明过表达ATG4B可促进前列腺癌PC-3细胞及C4-2细胞对多柔比星的抵抗效果。上述研究提示,自噬发生过程的关键蛋白ATG4B可能在盐酸吡柔比星诱导的宫颈癌HeLa细胞保护性自噬过程中起到重要作用。本研究通过荧光定量PCR及免疫印迹实验证实,盐酸吡柔比星可剂量依赖性上调ATG4B的表达水平,而干扰ATG4B后,盐酸吡柔比星诱导的自噬水平明显减弱,从而说明ATG4B的表达上调是盐酸吡柔比星诱导细胞自噬反应的重要机制。

综上所述,盐酸吡柔比星可剂量依赖性地抑制宫颈癌HeLa细胞增殖,促进细胞死亡。在此过程中,盐酸吡柔比星通过上调自噬相关分子ATG4B增强HeLa细胞中的自噬水平,而抑制自噬后,细胞死亡率增加。本研究为盐酸吡柔比星更好地应用于宫颈癌的治疗提供了理论与实验依据。

参考文献:

[1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917. DOI:10.1002/ijc.25516

[2] Chauvergne J, Fumoleau P, Cappelaere P, *et al*. Phase II study of pirarubicin (THP) in patients with cervical, endometrial and ovarian cancer: study of the Clinical Screening Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC)[J]. Eur J Cancer, 1993, 29A(3): 350-354.

[3] 李席如, 王建东, 张艳君, 等. 多西他赛联合表柔比星/比柔比星新辅助治疗乳腺癌临床分析[J]. 中华医学杂志, 2009, 89(2): 87-90.

[4] Untch M, Sevin B U, Perras J P, *et al*. Chemosensitivity to the new anthracycline pirarubicin and other chemotherapeutic agents in primary and recurrent ovarian tumors *in vitro*[J]. Gynecol Oncol, 1992, 47(2): 172-178.

[5] Kato T, Nishimura H, Umezu J, *et al*. Phase II study of 4′-O-tetrahydropyranyl-adriamycin (THP-ADM) in patients with gynecological cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 1985, 12(10): 1962-1967.

[6] Guo X L, Li D, Hu F, *et al*. Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2012, 320(2): 171-179. DOI:10.1016/j.canlet.2012.03.002

[7] Xu Y, Yu H, Qin H, *et al*. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells[J]. Cancer Lett, 2012, 314(2): 232-243. DOI:10.1016/j.canlet.2011.09.034

[8] Li K, Chen X, Liu C, *et al*. Pirarubicin induces an autophagic cytoprotective response through suppression of the mammalian target of rapamycin signaling pathway in human bladder cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460(2): 380-385. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.03.042

[9] Tsukagoshi S. Pirarubicin (THP-adriamycin)[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 1988, 15(9): 2819-2827.

[10] Kaku S, Takahashi K, Murakami Y, *et al*. Neoadjuvant intraarterial chemotherapy for stage IIB-IIIB cervical cancer in Japanese women[J]. Exp Ther Med, 2010, 1(4): 651-655.

[11] Guo Y, Song L, Liu H. Cervical clear cell adenocarcinoma infected with human papillomavirus type 18 in an adolescent[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2014, 27(1): e1-e3. DOI:10.1016/j.jpag.2013.04.007

[12] Yang Z, Klionsky D J. Eaten alive: a history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822.

[13] Yen C Y, Chiang W F, Liu S Y, *et al*. Long-term stimulation of areca nut components results in increased chemoresistance through elevated autophagic activity[J]. J Oral Pathol Med, 2014, 43(2): 91-96. DOI:10.1111/jop.12102

[14] Liu S, Li X. Autophagy inhibition enhances sensitivity of endometrial carcinoma cells to paclitaxel[J]. Int J Oncol, 2015, 46(6): 2399-2408. DOI:10.3892/ijo.2015.2937

[15] 范佳君, 曾贤, 李玉彬, 等. 细胞自噬在多柔比星诱导淋巴瘤细胞凋亡中的作用[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(6):595-598. DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00595

[16] Fernandes A, Azevedo M M, Pereira O, *et al*. Proteolytic systems and AMP-activated protein kinase are critical targets of acute myeloid leukemia therapeutic approaches[J]. Oncotarget, 2015, 6(31): 31428-31440. DOI:10.18632/oncotarget.2947

[17] Sun W L, Chen J, Wang Y P, *et al*. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development[J]. Autophagy, 2011, 7(9): 1035-1044.

[18] Kong D, Ma S, Liang B, *et al*. The different regulatory effects of p53 status on multidrug resistance are determined by autophagy in ovarian cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2012, 66(4): 271-278. DOI:10.1016/j.biopha.2011.12.002

[19] Cheng P, Ni Z, Dai X, *et al*. The novel BH-3 mimetic apogossypolone induces Beclin-1- and ROS-mediated autophagy in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Cell Death Dis, 2013, 4:e489.

[20] Jiang X, Overholtzer M, Thompson C B. Autophagy in cellular metabolism and cancer[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1): 47-54. DOI:10.1172/JCI73942

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

[22] Dewaele M, Maes H, Agostinis P. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy[J]. Autophagy, 2010, 6(7): 838-854.

[23] Ni Z, Wang B, Dai X, *et al*. HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 *via* activation of the ROS-JNK-autophagy pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 70: 194-203. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.012

[24] Till A, Subramani S. A balancing act for autophagin[J]. J Clin Invest, 2010, 120(7): 2273-2276. DOI:10.1172/JCI43238

[25] Guo L, Huang J X, Liu Y, *et al*. Transactivation of Atg4b by C/EBPβ promotes autophagy to facilitate adipogenesis[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(16): 3180-3190. DOI:10.1128/MCB.00193-13

[26] Li Y, Luo Q, Yuan L, *et al*. JNK-dependent Atg4 upregulation mediates asperphenamate derivative BBP-induced autophagy in MCF-7 cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 263(1): 21-31. DOI:10.1016/j.taap.2012.05.018

[27] Rothe K, Lin H, Lin K B, *et al*. The core autophagy protein ATG4B is a potential biomarker and therapeutic target in CML stem/progenitor cells[J]. Blood, 2014, 123(23): 3622-3634. DOI:10.1182/blood-2013-07-516807

[28] Akin D, Wang S K, Habibzadegah-Tari P, *et al*. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors[J]. Autophagy, 2014, 10(11): 2021-2035.

[29] Tran E, Chow A, Goda T, *et al*. Context-dependent role of ATG4B as target for autophagy inhibition in prostate cancer therapy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 441(4): 726-731. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.10.117

(**收稿**:2015-06-01;**修回**:2015-09-21)

(编辑 郭建秀)