论著·基础医学

肿瘤细胞通过上调ATG4D表达增强自噬而抵抗失巢凋亡

马晓壮,张越婷,孙梁博,闫小晶,杨明珍,连继勤 陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系临床生物化学教研室,重庆

［**摘要**］ **目的** 失巢凋亡抵抗(anoikis resistance,AR)是转移性肿瘤细胞所具备的关键特征,而自噬水平增强则是引起AR的重要原因,自噬相关蛋白4D(autophagy related 4D,ATG4D)是调控细胞自噬的关键酶,本研究着重探讨肿瘤细胞是否通过上调ATG4D表达增强自噬而促进AR的作用及分子机制。**方法** 将肝癌HepG2细胞和胃癌AGS细胞分为AR组和对照组。AR组用超低黏附细胞培养板悬浮培养48 h,对照组用常规细胞培养板贴壁培养。Western blotting检测自噬标志蛋白Ⅱ型微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3 Ⅱ,LC3-Ⅱ)与p62表达变化并进行定量分析。使用30 μg/mL氯喹(chloroquine,CQ)处理对照组或AR组肿瘤细胞抑制细胞自噬,然后使用凋亡检测试剂盒结合流式细胞术分析细胞凋亡水平变化。qRT-PCR结合Western blotting检测ATG4D的mRNA与蛋白水平变化。在AR肿瘤细胞中通过脂质体法转染对照siRNA或*ATG4D* siRNA,Western blotting检测ATG4D蛋白含量及自噬标志物LC3-Ⅱ与p62表达变化,使用凋亡检测试剂盒结合流式细胞术分析细胞凋亡水平变化。构建包含*ATG4D*基因启动子的报告质粒,将报告质粒分别转入对照组及AR组肿瘤细胞,24 h后使用荧光素酶报告基因实验检测*ATG4D*基因启动子活性变化。使用放线菌素D(5 μg/mL)处理对照组或AR组肿瘤细胞,分别于处理后0、2、4、6、8 h收取细胞,通过qRT-PCR检测*ATG4D*的mRNA在不同时间点水平变化。使用环乙酰亚胺(50 μg/mL)处理对照组或AR组肿瘤细胞,分别于处理后0、2、4、6、8 h收取细胞,通过Western blotting检测ATG4D蛋白在不同时间点水平变化。**结果** 与对照组肿瘤细胞相比,AR组肿瘤细胞自噬水平显著增强,LC3-Ⅱ水平显著升高($P<0.01$),p62水平明显降低($P<0.01$)。使用CQ抑制自噬后,AR+CQ处理组肿瘤细胞的凋亡水平显著增加($P<0.01$)。qRT-PCR及Western blotting检测发现,AR组肿瘤细胞中*ATG4D* mRNA与ATG4D蛋白水平较对照组均显著增强($P<0.01$)。使用*ATG4D* siRNA能够明显抑制*ATG4D*的表达,并下调LC3-Ⅱ表达水平、增强p62表达水平、促进AR肿瘤细胞凋亡($P<0.01$)。与对照组肿瘤细胞相比,AR组肿瘤细胞中*ATG4D*基因启动子活性并无明显改变。经放线菌素D处理后,AR组肿瘤细胞在各处理时间点*ATG4D*的mRNA表达量均显著升高($P<0.001$),表明*ATG4D* mRNA的稳定性在AR肿瘤细胞中显著增强。经环乙酰亚胺处理后,AR组肿瘤细胞在各处理时间点ATG4D的蛋白表达量无显著变化,表明ATG4D蛋白的稳定性在AR肿瘤细胞中无明显变化。**结论** ATG4D表达上调引起的自噬水平增强促进肿瘤细胞的AR。

［**关键词**］ 自噬相关蛋白4D;自噬;肿瘤细胞;失巢凋亡抵抗
［**中图法分类号**］ R394.2;R73-37;R730.23 ［**文献标志码**］ A

Upregulation of ATG4D promotes anoikis resistance of tumor cells by autophagy enhancement

MA Xiaozhuang, ZHANG Yueting, SUN Liangbo, YAN Xiaojing, YANG Mingzhen, LIAN Jiqin Department of Clinical Biochemistry, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, China

［**Abstract**］ **Objective** Anoikis resistance (AR) is a critical characteristic of metastatic tumor cells,

［**基金项目**］ 国家自然科学基金面上项目(82273114);重庆市自然科学基金创新发展联合基金重点项目(CSTB2022NSCQ-LZX0018)
［**通信作者**］ 连继勤,E-mail:lianjiqin@sina.com

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:马晓壮,张越婷,孙梁博,等. 肿瘤细胞通过上调ATG4D表达增强自噬而抵抗失巢凋亡[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(13):1854-1862. DOI:10.16016/j.2097-0927.202602096.
Citation:MA X Z,ZHANG Y T,SUN L B,*et al*. Upregulation of ATG4D promotes anoikis resistance of tumor cells by autophagy enhancement[J]. J Army Med Univ,2026,48(13):1854-1862. DOI:10.16016/j.2097-0927.202602096.

and enhanced autophagy is an important contributor to AR. Autophagy-related 4D (ATG4D) is a key enzyme regulating autophagy. This study aims to investigate whether tumor cells promote AR by upregulating ATG4D expression to enhance autophagy and elucidate the underlying molecular mechanisms. **Methods** Hepatocellular carcinoma HepG2 cells and gastric cancer AGS cells were divided into an AR group and a control group. The AR group was cultured in ultra-low adhesion plates for 48 h, while the control group was cultured in conventional plates. Changes in the expression of autophagy markers LC3-Ⅱ and p62 were determined by Western blotting. Chloroquine (CQ, 30 μg/mL) was used to inhibit autophagy in control or AR tumor cells, followed by flow cytometry for apoptosis levels with an apoptosis detection kit. The expression of ATG4D at mRNA and protein levels were assessed by qRT-PCR and Western blotting, respectively. AR tumor cells were transfected with control siRNA or *ATG4D* siRNA using Lipofectamine. Subsequently, the protein expression levels of ATG4D, LC3-Ⅱ and p62 were detected by Western blotting, and apoptotic rates were analyzed with flow cytometry. A reporter plasmid containing the ATG4D promoter was constructed and transfected into control and AR tumor cells, respectively; after 24 h, luciferase reporter gene assay was employed to detect the changes in the activity of ATG4D promoter. To assess cell stability, the control or AR tumor cells were treated with actinomycin D (5 μg/mL) or cycloheximide (50 μg/mL), and then harvested at 0, 2, 4, 6, and 8 h after treatment. The mRNA and protein levels of *ATG4D* were determined by qRT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Compared with the control tumor cells, the AR tumor cells showed significantly enhanced autophagy, with significantly elevated LC3-Ⅱ levels ($P<0.01$) and markedly reduced p62 levels ($P<0.01$). Inhibition of autophagy using CQ significantly increased apoptosis in AR tumor cells ($P<0.01$). qRT-PCR and Western blotting revealed significantly elevated *ATG4D* mRNA and protein levels in AR tumor cells compared with the control cells ($P<0.01$). *ATG4D* siRNA transfection significantly inhibited *ATG4D* expression, downregulated LC3-Ⅱ, upregulated p62, and promoted apoptosis in AR tumor cells ($P<0.01$). *ATG4D* promoter activity did not differ significantly between AR and control tumor cells. However, after actinomycin D treatment, *ATG4D* mRNA expression was significantly higher in AR tumor cells at all time points ($P<0.001$), indicating enhanced mRNA stability. In contrast, cycloheximide treatment showed no significant change in ATG4D protein levels over time in AR tumor cells, suggesting unaltered protein stability. **Conclusion** Enhanced autophagy caused by *ATG4D* upregulation promotes AR in tumor cells.

[**Key words**] autophagy-related 4D; autophagy; tumor cells; anoikis resistance

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82273114), and the Key Project of Innovation and Development Joint Fund of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2022NSCQ-LZX0018). Corresponding author: LIAN Jiqin, E-mail: lianjiqin@sina.com

恶性转移是影响恶性肿瘤预后的主要原因。在转移过程中,肿瘤细胞脱离原位癌后首先必须在脉管系统中存活,然后才能侵袭进入异位器官的基质层并生长形成转移瘤[1]。正常状态下,细胞从原位组织脱落进入血流后,由于外界输入的存活信号中断常引起凋亡,即失巢凋亡(anoikis)[2]。但对失巢凋亡具有耐受能力的肿瘤细胞能够延长其在非黏附状态下的生存时间,从而有足够的时间迁移到继发部位,形成新的转移灶[3]。因此,失巢凋亡抵抗(anoikis resistance,AR)是转移性肿瘤细胞所具备的关键特征,AR的分子机制也是肿瘤转移过程中的关键基础前沿科学问题,针对这一问题进行深入研究对于预防或抑制肿瘤的转移、提高肿瘤的治疗效果具有重要意义。

自噬(autophagy)是细胞维持自我稳态的一种重要机制,它借助自噬体/溶酶体系统降解细胞内受损的细胞器与蛋白质等成分来保证细胞内环境稳定并通过回收利用降解产物促进细胞存活[4]。当细胞面临生存压力(如失巢、化疗药物等)时,细胞内自噬水平增加,从而增强细胞抗压能力,促进细胞存活,对细胞起保护作用[5]。研究表明,自噬水平增强是转移性肿瘤细胞AR的重要原因[6]。肿瘤细胞在失巢环境下通常面临多种生存压力,在这些压力刺激下,肿瘤细胞中的自噬水平显著升高,通过加强细胞分解代谢过程使营养物质得到最大效率的循环利用,促进细胞存活,而抑制自噬则可以促进肿瘤细胞的失巢凋亡[7]。但到目前为止,肿瘤细胞究竟通过何种机制来增强自身的自噬水平以抵抗失巢凋亡尚不明确。

自噬相关蛋白4D(autophagy related 4D,ATG4D)是半胱氨酸蛋白酶ATG4家族中的成员,其通过切割回收自噬小体外膜上的标志蛋白Ⅱ型微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3 Ⅱ,

MAP1LC3-Ⅱ/LC3-Ⅱ)而密切参与自噬,被认为是调控细胞自噬的关键酶[8]。ATG4D被激活后可将锚定在成熟自噬小体外膜上的LC3-Ⅱ切割回收,从而促进自噬体与溶酶体的融合,加速细胞自噬过程[9]。研究表明,ATG4D敲除的细胞中会蓄积大量的LC3-Ⅱ与自噬小体,表明ATG4D在促进自噬流的通畅性方面发挥重要作用[10]。已有研究发现,ATG4D在肝癌组织及细胞中表达升高,而沉默ATG4D则可以抑制肝癌细胞的增殖[11]。同时,ATG4D还密切参与了胶质瘤、子宫肌瘤、胃癌、结肠癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞的恶性生长[12-13]。因此,ATG4D有望成为多种肿瘤治疗的新靶标,但在肿瘤细胞的AR过程中ATG4D究竟发挥什么作用目前尚不清楚。本研究的目的在于探讨ATG4D/自噬信号通路在AR肿瘤细胞中的变化机制及意义。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

DMEM培养基(GIBCO),胎牛血清(HyClone),胰蛋白酶(Invitrogen),RNA提取试剂盒(BioFlux),自噬相关基因及GAPDH引物(生工生物工程),qRT-PCR试剂盒与逆转录试剂盒(TAKARA),青霉素/链霉素双抗、蛋白定量试剂盒及RIPA裂解液(碧云天),PMSF(Selleck),Lipofectamine 3000 Transfection Kit(Invitrogen),GAPDH、ATG4D、LC3、p62抗体(Proteintech),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(Bioworld),PVDF膜(Bio-Rad),凋亡检测试剂盒(BD),双荧光素酶报告基因检测试剂盒(GeneCopoeia)。

1.2 AR肿瘤细胞的培养

人肝癌细胞系HepG2与胃癌细胞系AGS由陆军军医大学临床生物化学教研室提供。对照组细胞使用含10%胎牛血清及双抗(青霉素100 U/mL+链霉素100 μg/mL)的DMEM培养基,在37 ℃、5%CO_2条件下采用标准培养皿贴壁培养。AR组肿瘤细胞使用相同的培养基与培养条件采用超低黏附培养皿悬浮培养48 h作为模型细胞。

1.3 *ATG4D*基因的沉默

细胞经消化后以2×10^5/孔的密度接种于6孔板,待融合度达70%~80%时,用对照siRNA或*ATG4D* siRNA转染。转染时将对应的siRNA与Lipo3000在Opti-MEM培养基中混合,室温孵育20 min,再将复合物加入细胞培养孔中,轻轻混匀后放入37 ℃培养箱。转染24 h,通过Western blotting检测蛋白表达水平变化。

1.4 自噬相关基因mRNA表达水平检测

收集对照组或AR组肿瘤细胞,PBS漂洗细胞后使用BioFlux总RNA提取试剂盒按说明书操作提取RNA。经紫外分光光度计检测,RNA样品OD_{260}/OD_{280}严格控制在1.8~2.1之间。后续逆转录及qPCR检测分别参照GeneCopoeia试剂盒与TAKARA试剂盒说明书执行。qRT-PCR扩增条件为95 ℃ 40 s预变性;95 ℃ 15 s,60℃ 50 s循环反应,共40个循环反应;4 ℃保存。

表1 相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Genes	Primer sequences (5′→3′)
DRAM1	Forward: TGCCTGCTGATGGACTTCCT
	Reverse: GGTGGTGGTGTTGATGTTGG
ATG4D	Forward: GACCTGCTGACCTTCATCGC
	Reverse: TCCAGCTTCTTGGTCTTGGC
ULK1	Forward: GAGCTGCTGATGGACTTCCT
	Reverse: GGTGGTGGTGTTGATGTTGG
ATG10	Forward: ATGAGCTCGAGTGTCCTGGA
	Reverse: CTCCCACTTACGACAAGAGT
ATG7	Forward: GCTGCTGATGGACTTCCTCA
	Reverse: GGTGGTGTTGATGTTGGTGG
ATG2B	Forward: CAGCTGCTGATGGACTTCCT
	Reverse: GGTGGTGGTGTTGATGTTGG
EI24	Forward: GACCTGCTGACCTTCATCGC
	Reverse: TCCAGCTTCTTGGTCTTGGC
ATG16L1	Forward: GAGCTGCTGATGGACTTCCT
	Reverse: GGTGGTGGTGTTGATGTTGG
ATG101	Forward: ATGAGCTCGAGTGTCCTGGA
	Reverse: CTCCCACTTACGACAAGAGT
ATG9A	Forward: CAGCTGCTGATGGACTTCCT
	Reverse: GGTGGTGGTGTTGATGTTGG

1.5 细胞自噬标志蛋白表达水平的测定

收集对照组或AR组肿瘤细胞。PBS漂洗细胞3次,加入含1 mmol/L RIPA裂解液,冰上作用5 min。裂解液移入EP管后,4 ℃ 14 000×*g*离心5 min收集上清。采用BCA法测定蛋白浓度(检测波长562 nm)。蛋白样品经变性处理后取20 μg进行SDS-PAGE电泳(上层胶:80 V 30 min;下层胶:120 V 60 min)。转膜采用恒压20 V 15 min,随后以5%脱脂奶粉封闭1.5 h。一抗孵育条件:兔抗人ATG4D抗体(1∶1 000)、兔抗人LC3抗体(1∶1 000)、兔抗人p62抗体(1∶1 000)与GAPDH抗体(1∶10 000)4 ℃过夜;PBST洗涤3次(10 min/次)。二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(1∶10 000),室温孵育1 h后经PBST洗膜3次,最终显影分析蛋白表达差异。

1.6　流式细胞术检测细胞凋亡

将对照组或AR组肿瘤细胞用30 μg/mL氯喹(Chloroquine,CQ)处理24 h,然后收集细胞进行凋亡水平分析。采用凋亡检测试剂盒进行检测:收集对照组或AR组肿瘤细胞,800×*g*离心5 min收集细胞,预冷PBS洗涤2次后重悬。每样本加入100 μL 1×结合缓冲液、2 μL FITC标记的Annexin V及2 μL碘化丙啶,混匀后室温避光孵育15 min,流式细胞仪检测凋亡率。

1.7　双荧光素酶报告基因实验检测*ATG4D*基因启动子活性

从HepG2细胞基因组中通过PCR方法扩增获得*ATG4D*基因启动子片段(上游引物序列:5′-TTGGATC-ACACCCTCATTC-3′;下游引物序列:5′-GACTAG-TGTGACCTCCGG-3′),将扩增片段克隆至报告质粒pGL-basic中,重组质粒经鉴定后分别转染至HepG2与AGS细胞中,贴壁或悬浮培养24 h后使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒分别检测各组报告基因活性,量化为萤火虫荧光素酶活性值与海肾荧光素酶活性值的比值,并分别与对照组比较计算差异倍数。

1.8　qRT-PCR检测*ATG4D* mRNA稳定性

将细胞贴壁或悬浮培养48 h,在培养基中添加放线菌素D,终浓度为5 μg/mL,分别于处理后0、2、4、6、8 h收取细胞,提取RNA后qRT-PCR检测*ATG4D*的mRNA在不同时间点水平变化。

1.9　Western blotting检测ATG4D蛋白稳定性

将细胞贴壁或悬浮培养48 h,在培养基中添加环乙酰亚胺,终浓度为50 μg/mL,然后于不同时间点(0、2、4、6、8 h)收集细胞,提取总蛋白后,通过Western blotting检测ATG4D蛋白水平变化,并经灰度扫描后进行定量分析。

1.10　统计学分析

所有数据均为3次独立实验得到,采用$\bar{x}\pm s$表示,通过GraphPad Prism 9.0统计软件进行单因素方差分析,P<0.05表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　AR肿瘤细胞中自噬水平显著升高

Western blotting结果显示(图1),与对照组相比,AR组肿瘤细胞中LC3-Ⅱ水平显著升高(P<0.05),p62水平明显降低(P<0.05),表明AR肿瘤细胞中自噬水平显著升高。

2.2　抑制自噬可以显著增强肿瘤细胞的失巢凋亡水平

为探究自噬对肿瘤细胞失巢凋亡水平的影响,将AR组细胞用自噬抑制剂氯喹处理后使用流式细胞术分析细胞凋亡率,结果显示,与AR组相比,AR+CQ处理组肿瘤细胞的凋亡水平显著增强(P<0.05,图2)。

2.3　ATG4D在AR肿瘤细胞中表达水平显著升高

为进一步分析肿瘤细胞AR过程中发挥关键作用的自噬相关基因,qRT-PCR检测mRNA表达水平,结果发现,与对照组相比,AR组肿瘤细胞*ATG4D*基因上调最明显(P<0.05,图3)。Western blotting检测蛋白水平,结果发现,与对照组相比,AR组肿瘤细胞ATG4D蛋白水平也明显上调(P<0.05,图4),表明ATG4D在AR肿瘤细胞中表达水平显著升高。

2.4　沉默*ATG4D*可以显著降低肿瘤细胞的自噬水平与AR能力

为进一步明确*ATG4D*表达水平升高在肿瘤细胞AR中的意义,用siRNA沉默AR肿瘤细胞中*ATG4D*,Western blotting结果发现,与对照siRNA相比,*ATG4D* siRNA能明显抑制肿瘤细胞LC3-Ⅱ表达而增强p62表达(P<0.05,图5A),表明沉默*ATG4D*显著降低AR细胞的自噬水平;流式细胞术结果发现,与对照siRNA相比,*ATG4D* siRNA能显著增强AR细胞的凋亡水平,即沉默*ATG4D*可抑制其AR能力(P<0.05,图5B)。

2.5　失巢环境不影响*ATG4D*基因启动子活性

由于*ATG4D*的mRNA和蛋白水平在AR肿瘤细胞

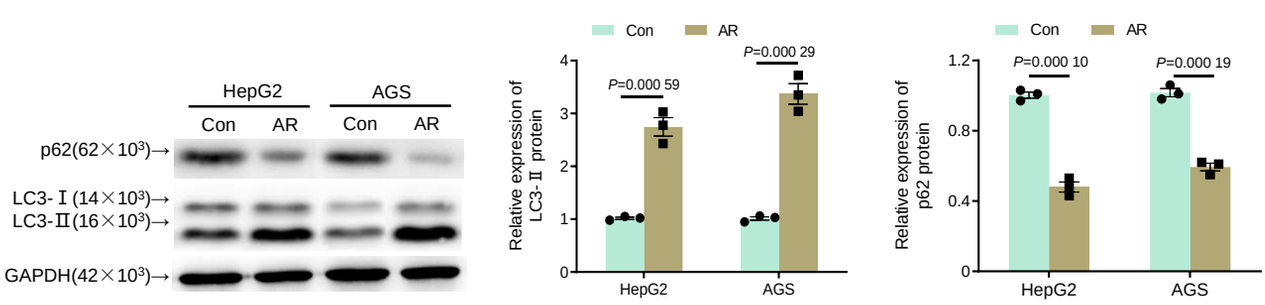


图1　对照组与AR组肿瘤细胞中p62、LC3表达水平

Figure 1　Expression levels of p62 and LC3 in control and anoikis resistance (AR) tumor cells

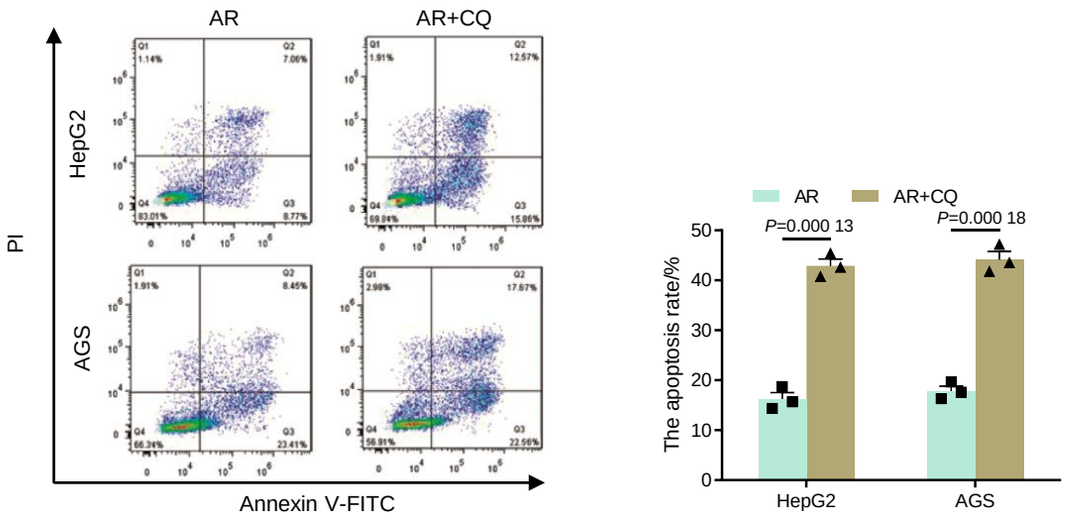
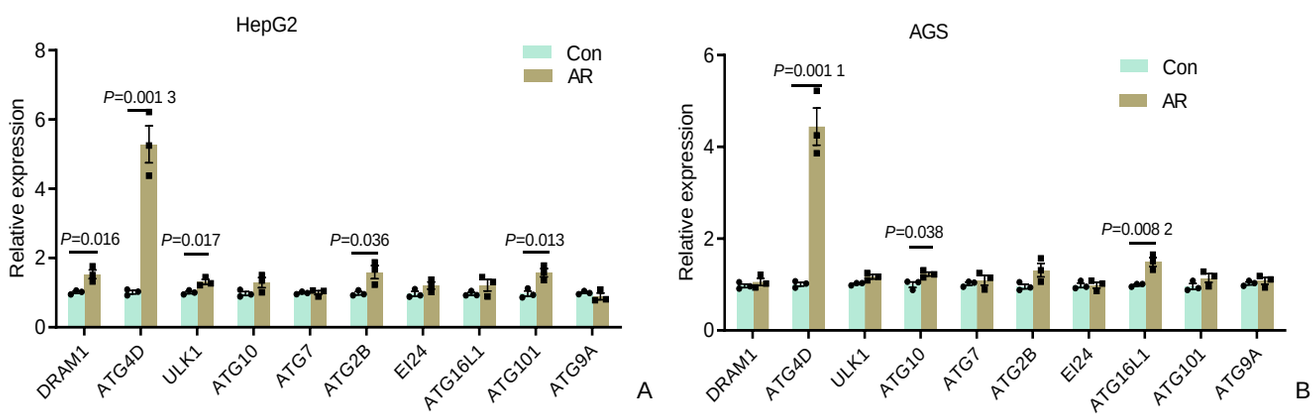


图2 抑制自噬显著增强AR肿瘤细胞的凋亡水平

Figure 2 Autophagy inhibition by chloroquine (CQ) significantly enhances apoptosis of AR tumor cells



A and B: mRNA levels of autophagy related genes in control and AR tumor cells of HepG2 (A) and AGS (B) by qRT-PCR

图3 *ATG4D* mRNA水平在AR肿瘤细胞中显著升高

Figure 3 The mRNA levels of *ATG4D* are significantly increased in AR tumor cells

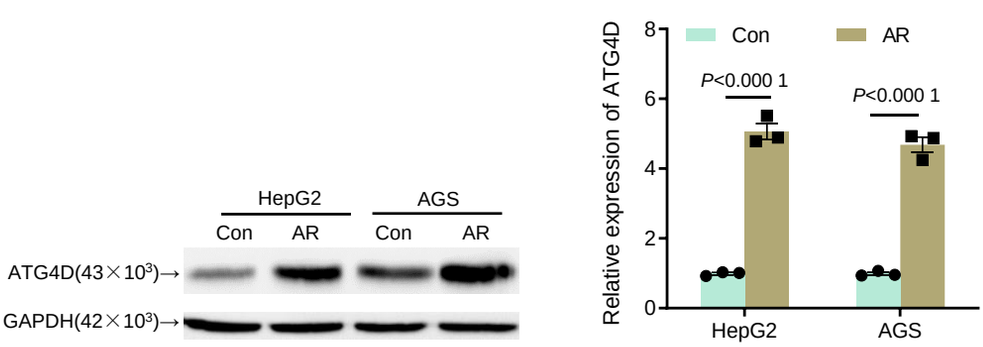
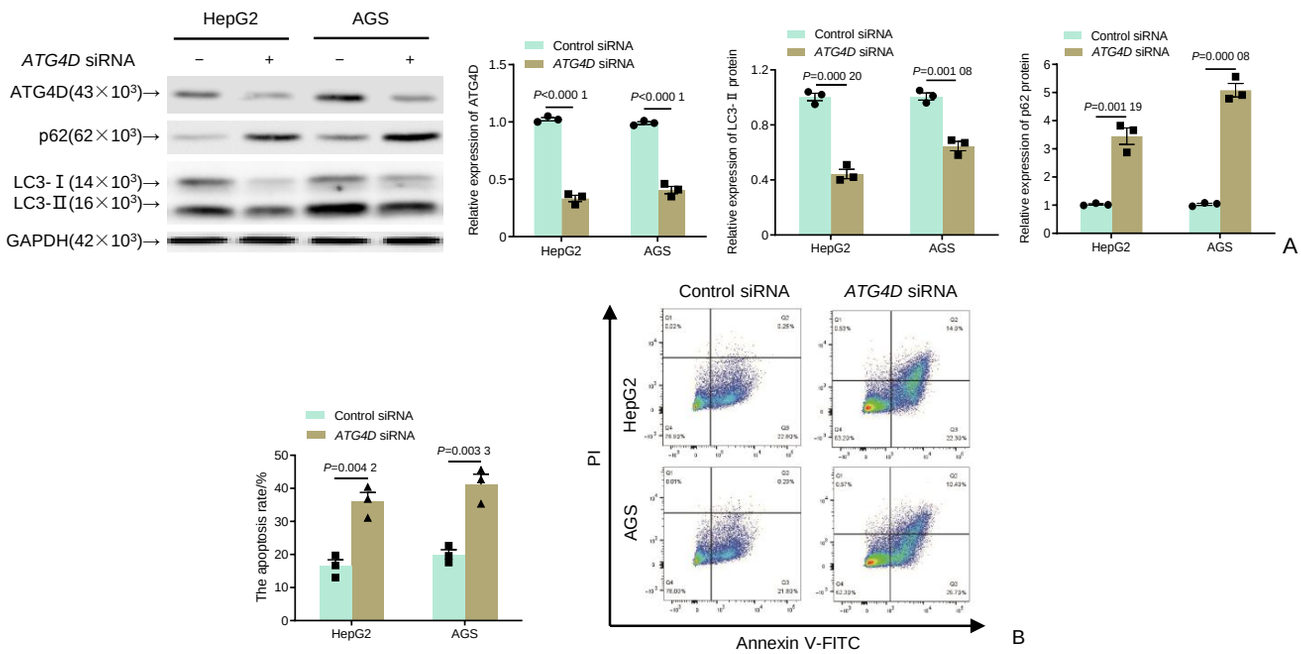


图4 ATG4D蛋白水平在AR肿瘤细胞中显著升高

Figure 4 The protein level of ATG4D is significantly increased in AR tumor cells



A: Representative Western blotting images of ATG4D, p62 and LC3 in AR tumor cells after transfection with control siRNA or *ATG4D* siRNA for 24 h; B: Apoptosis rate of AR tumor cells after transfection with control siRNA or *ATG4D* siRNA

图5 沉默ATG4D显著降低AR肿瘤细胞的自噬水平与AR能力

Figure 5 Silencing ATG4D significantly reduces autophagy and AR in AR tumor cells

中均显著上调,为进一步分析其表达上调的可能机制,通过报告基因实验检测发现,与对照组相比,AR组肿瘤细胞的*ATG4D*基因启动子活性并无显著变化(图6),说明*ATG4D*的mRNA和蛋白水平上调不是因转录水平增强所导致的。

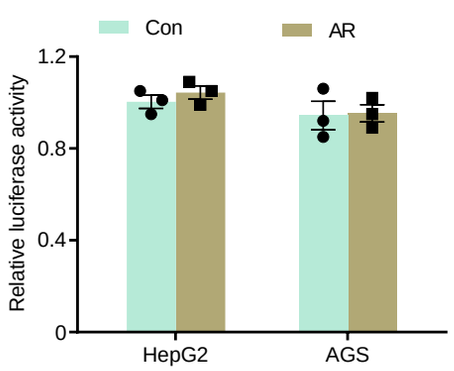


图6 失巢环境不影响*ATG4D*基因启动子活性

Figure 6 *ATG4D* promoter activity is not affected by anoikis environment

2.6 失巢环境增强了*ATG4D* mRNA的稳定性

为进一步分析*ATG4D*表达上调的机制,*ATG4D* mRNA稳定性检测发现,与对照组相比,AR组肿瘤细胞*ATG4D* mRNA的稳定性显著增强($P<0.05$,图7),这一结果提示,失巢环境下肿瘤细胞中*ATG4D* mRNA的稳定性增强是导致其表达增强,进而引起自噬水平增加及AR的重要因素。

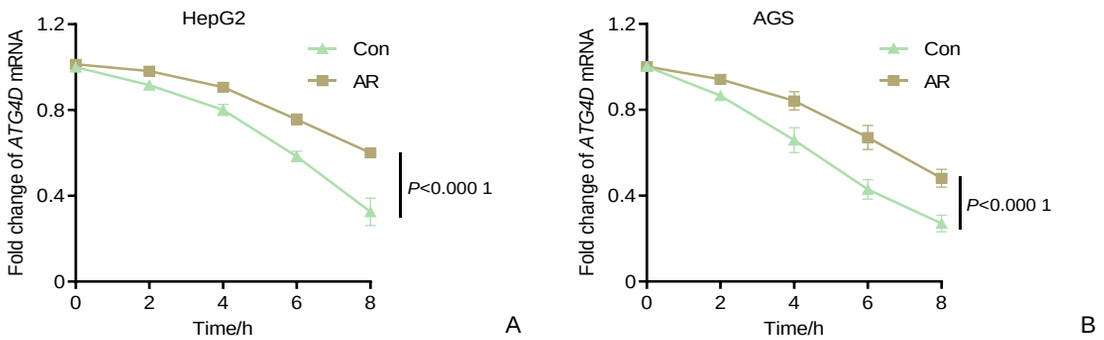
2.7 失巢环境不影响ATG4D蛋白的稳定性

为进一步分析蛋白质稳定性对*ATG4D*表达上调的影响,ATG4D蛋白稳定性检测发现,与对照组相比,AR组肿瘤细胞的ATG4D蛋白稳定性无显著变化(图8),这一结果提示,失巢环境下肿瘤细胞中ATG4D蛋白的表达上调主要是由其mRNA的稳定性增强所致,而与ATG4D蛋白的稳定性变化关系不大。

3 讨论

3.1 保护性自噬水平升高可能是导致肿瘤细胞AR的普遍机制

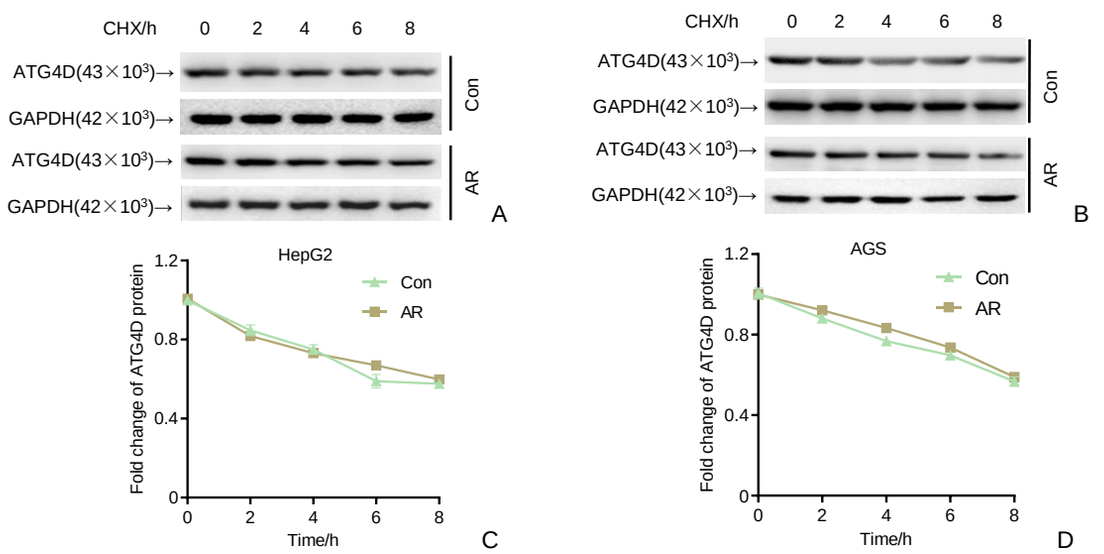
肿瘤细胞在转移过程中进入循环系统时必须在没有合适细胞外基质(extracellular matrix,ECM)黏附的情况下生存下来并不断增殖。在正常细胞中,缺乏合适ECM黏附的细胞就会发生凋亡,即失巢凋亡。肿瘤细胞可以通过多种方式来抵抗失巢凋亡,如细胞黏附因子的改变、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)、抗凋亡途径的结构性激活、氧化应激的调节以及能量代谢的调节(如自噬)[14]等。研究表



A and B: mRNA levels of *ATG4D* in control or AR tumor cells of HepG2 (A) and AGS (B) by qRT-PCR after treatment with actinomycin D (5 μg/mL) for 0, 2, 4, 6, and 8 h

图7 失巢环境增强*ATG4D* mRNA的稳定性

Figure 7 *ATG4D* mRNA stability is enhanced by anoikis environment



A and B: Protein levels of *ATG4D* in control or AR tumor cells of HepG2 (A) and AGS (B) by Western blotting after treatment with cycloheximide (CHX, 50 μg/mL) at indicated time points; C and D: Statistical analysis of ATG4D expression levels in A and B

图8 失巢环境不影响*ATG4D*蛋白的稳定性

Figure 8 Protein stability of ATG4D is not affected by anoikis environment

明,自噬是肿瘤细胞抵抗失巢凋亡的重要机制。如在胃癌细胞中,circSPECC1和生长分化因子15(growth differentiation factor 15,GDF15)可上调保护性细胞自噬水平而促进AR,而抑制这种信号而促进胃癌细胞凋亡并抑制转移[15-16];在前列腺癌中,CircCEMIP和ATF4/CEMIP/PKCalpha信号通路的激活也可增强保护性细胞自噬水平而促进AR[17-18]。一种新型劳衍生物MSDF则可通过降低ROS与保护性自噬而抑制肝癌细胞的转移[19]。本研究结果也表明,在AR的肝癌HepG2和胃癌AGS细胞中自噬水平显著升高,而抑制自噬则可以促进肿瘤细胞凋亡,提示保护性自噬水平升高可能是导致肿瘤细胞AR的普遍机制。

3.2 肿瘤细胞可能通过上调ATG4D以增强保护性自噬水平获得抗失巢凋亡能力

自噬过程受到多个自噬相关基因的严密调控,且多个自噬相关基因与肿瘤细胞AR密切相关。自噬关键调节分子mTORC1可通过介导双相机械反应而协调黏附依赖性细胞生长和失巢凋亡抗性[20]。肿瘤细胞依赖integrin-GSK3β-FTO-mTOR信号轴黏附生长,而AR肿瘤细胞则能抑制该信号轴而增强保护性自噬水平。在肝癌细胞中,表达下调的miR-30a导致其靶基因*BECN1*和*ATG5*表达上调而增强保护性自噬并引起AR[21]。细胞外酸性pH环境还可通过AMPK/mTOR途径促进HCC细胞的自噬而引起AR[7]。但到目前为

止,尚未有ATG4D调控肿瘤细胞AR的相关报道。在自噬小体的生成阶段,半胱氨酸蛋白酶ATG4D首先会对细胞质中游离的LC3前体(pro-LC3)进行识别与切割,由此生成LC3-I。随后,在ATG3、ATG7等分子介导的类泛素化修饰作用下,LC3-I会与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine,PE)发生共价结合,经酯化后转化为定位于膜结构上的LC3-Ⅱ。与此同时,ATG4D还具备逆向调控功能,它能够对LC3-Ⅱ进行切割使其去酯化,将多余的LC3-Ⅱ回收利用,进而推动膜融合过程,助力自噬小体的形成[22]。因此,ATG4D主要依靠对LC3酯化与去酯化过程的双向调控,来促进自噬小体生成,最终实现细胞自噬水平的提升。本研究发现,相较于常规贴壁培养的肿瘤细胞,处于失巢培养状态的肿瘤细胞中,*ATG4D*的表达量呈现显著上升趋势。进一步的功能验证显示,当利用技术手段沉默*ATG4D*表达后,肿瘤细胞的自噬过程受到明显抑制,同时失巢凋亡效应被显著增强。这一结果表明,肿瘤细胞可通过上调*ATG4D*的表达,强化保护性自噬作用,以此抵御失巢凋亡,进而为其转移进程提供助力。

3.3 肿瘤细胞可能通过增强*ATG4D* mRNA的稳定性上调*ATG4D*表达

引起基因表达上调的机制涉及表观遗传修饰、转录调控、转录后调控、翻译调控和翻译后调控等多个环节[23]。在深入探讨AR肿瘤细胞中*ATG4D*表达上调机制这一基本科学问题时,本研究发现,失巢环境并不能增强*ATG4D*基因的启动子活性,也不能增加ATG4D蛋白的稳定性,但却显著增强了*ATG4D* mRNA的稳定性。导致mRNA的稳定性增强的可能机制也有多种,如miRNA可促进特定mRNA降解,当该miRNA表达水平降低时则可增强对应mRNA的稳定性,肝癌细胞中就有miR-30a表达下调而导致其靶基因*BECN1*和*ATG5*表达上调的报道[21];mRNA的稳定性还受到其分子中m6A修饰水平的影响,如甲基转移酶FTO介导的mTOR mRNA分子中m6A修饰可降低其稳定性[20];此外,mRNA的稳定性也受到一些RNA结合蛋白及核酸酶的影响[24]。因此,ATG4D mRNA的稳定性既可能受到相关miRNA如miR-101水平的影响[25],也可能与其本身的m6A修饰水平有关,但究竟是哪一种机制导致AR肿瘤细胞中*ATG4D* mRNA稳定性增强尚需通过进一步研究确定。

综上所述,*ATG4D*表达升高所引起的保护性自噬水平增强可能是导致肿瘤细胞AR的重要机制,降低*ATG4D*的表达可增强肿瘤细胞的失巢凋亡,但在研究中也发现还存在多个自噬相关基因的表达水平受到失巢环境的影响,它们在AR肿瘤细胞中是否发挥及发挥多大作用尚不清楚,导致AR肿瘤细胞中*ATG4D* mRNA稳定性增强的机制是什么也尚需进一步探讨,如何有效地靶向抑制AR肿瘤细胞中*ATG4D*也是需要实际解决的问题。因此*ATG4D*有望成为一种潜在的靶向治疗分子,靶向这一分子可以抑制肿瘤细胞AR和转移,在肿瘤的生物治疗中具有重要意义。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] D'AMORE T, BRAVOCO D, DI PAOLA G, *et al*. Anoikis resistance in gastric cancer: a comprehensive review[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1): 528. DOI: 10.1038/s41419-025-07860-1.

[2] MEI J, JIANG X Y, TIAN H X, *et al*. Anoikis in cell fate, physiopathology, and therapeutic interventions [J]. MedComm, 2024, 5(10): e718. DOI: 10.1002/mco2.718.

[3] FRISCH S M, HU G Q. Anoikis resistance and cancer[J]. BMC Cancer, 2025, 25: 1764. DOI: 10.1186/s12885-025-15178-6.

[4] WANG H Y, FENG X R, HE H L, *et al*. Crosstalk between autophagy and other forms of programmed cell death[J]. Eur J Pharmacol, 2025, 995: 177414. DOI: 10.1016/j.ejphar.2025.177414.

[5] WANG H, SUN P, YUAN X J, *et al*. Autophagy in tumor immune escape and immunotherapy[J]. Mol Cancer, 2025, 24(1): 85. DOI: 10.1186/s12943-025-02277-y.

[6] FULLER A D, BORDNER T H, STAUB A J, *et al*. Autophagy reprogramming in cancer [J]. J Cell Physiol, 2025, 240(11): e70107. DOI: 10.1002/jcp.70107.

[7] WANG S Y, LV Y Y, ZHOU Y Y, *et al*. Acidic extracellular pH induces autophagy to promote anoikis resistance of hepatocellular carcinoma cells *via* downregulation of miR-3663-3p[J]. J Cancer, 2021, 12(12): 3418-3426. DOI: 10.7150/jca.51849.

[8] MCMANN E, GORSKI S M. Last but not least: emerging roles of the autophagy-related protein ATG4D[J]. Autophagy, 2024, 20(9): 1916-1927. DOI: 10.1080/15548627.2024.2369436.

[9] TAMARGO-GÓMEZ I, MARTÍNEZ-GARCÍA G G, SUÁREZ M F, *et al*. ATG4D role in mAtg8s delipidation and neuroprotection[J]. Autophagy, 2021, 17(6): 1558-1560. DOI: 10.1080/15548627.2021.1922979.

[10] LIU P F, YANG S W, YANG W H, *et al*. Autophagy protease ATG4D facilitates proliferation and malignancy of

osteosarcoma cells[J]. FASEB J, 2025, 39(17): e70990. DOI:10.1096/fj.202501321RR.

[11] ZHAO J Y, LI X Y, LIU T D, *et al*. Silencing of ATG4D suppressed proliferation and enhanced cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma through Akt/Caspase-3 pathway[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(11): 4153-4159. DOI:10.1007/s11010-021-04224-z.

[12] WANG M Y, JING J J, LI H, *et al*. The expression characteristics and prognostic roles of autophagy-related genes in gastric cancer[J]. PeerJ, 2021, 9: e10814. DOI: 10.7717/peerj.10814.

[13] NIE S, SHI Z, SHI M Y, *et al*. PPARγ/SOD2 protects against mitochondrial ROS-dependent apoptosis *via* inhibiting ATG4D-mediated mitophagy to promote pancreatic cancer proliferation[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 745554. DOI:10.3389/fcell.2021.745554.

[14] KHAN S U, FATIMA K, MALIK F. Understanding the cell survival mechanism of anoikis-resistant cancer cells during different steps of metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2022, 39(5): 715-726. DOI:10.1007/s10585-022-10172-9.

[15] WU Y R, CHEN Y, YAN X J, *et al*. Lopinavir enhances anoikis by remodeling autophagy in a circRNA-dependent manner[J]. Autophagy, 2024, 20(7): 1651-1672. DOI: 10.1080/15548627.2024.2325304.

[16] GAO X Y, ZHANG Z W, LI Q Y, *et al*. GDF15 enhances anoikis resistance and metastasis of gastric cancer through protective autophagy[J]. Cell Signal, 2024, 124: 111457. DOI:10.1016/j.cellsig.2024.111457.

[17] YU Y, SONG Y R, CHENG L L, *et al*. CircCEMIP promotes anoikis-resistance by enhancing protective autophagy in prostate cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022, 41(1): 188. DOI:10.1186/s13046-022-02381-7.

[18] YU Y, LIU B, LI X X, *et al*. ATF4/CEMIP/PKCα promotes anoikis resistance by enhancing protective autophagy in prostate cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(1): 46. DOI:10.1038/s41419-021-04494-x.

[19] URADE R, CHANG W T, KO C C, *et al*. A fluorene derivative inhibits human hepatocellular carcinoma cells by ROS-mediated apoptosis, anoikis and autophagy[J]. Life Sci, 2023, 329: 121835. DOI:10.1016/j.lfs.2023.121835.

[20] ZHANG C L, WANG Y, ZHEN Z F, *et al*. mTORC1 mediates biphasic mechano-response to orchestrate adhesion-dependent cell growth and anoikis resistance[J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(6): e2307206. DOI:10.1002/advs.202307206.

[21] FU X T, SHI Y H, ZHOU J, *et al*. MicroRNA-30a suppresses autophagy-mediated anoikis resistance and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2018, 412: 108-117. DOI:10.1016/j.canlet.2017.10.012.

[22] NUCERA F, DI STEFANO A, RICCIARDOLO F L M, *et al*. Role of ATG4 autophagy-related protein family in the lower airways of patients with stable COPD[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(15): 8182. DOI:10.3390/ijms25158182.

[23] VASUKUTTY A, BHATTARAI P Y, CHOI H S. Enhancer regulation in cancer: from epigenetics to m6A RNA modification[J]. Arch Pharmacal Res, 2025, 48(7): 706-735. DOI:10.1007/s12272-025-01561-1.

[24] JUNGFLEISCH J, GEBAUER F. RNA-binding proteins as therapeutic targets in cancer[J]. RNA Biol, 2025, 22(1): 1-8. DOI:10.1080/15476286.2025.2470511.

[25] CUI D, FENG Y, QIAN R L. Up-regulation of microRNA miR-101-3p enhances sensitivity to cisplatin *via* regulation of small interfering RNA (siRNA) anti-human AGT4D and autophagy in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC)[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8435-8446. DOI: 10.1080/21655979.2021.1982274.

(收稿:2026-02-27;修回:2026-05-12)

(编辑 张艺霖)