

细胞自噬在褪黑素诱导的肝癌细胞株 HepG2 死亡中的作用

范文洁, 贾振亚, 曹 静, 徐 玥, 范璐璐, 孙国平

摘要 目的 研究褪黑素(MT)对人肝癌 HepG2 细胞自噬功能的影响,并初步探讨自噬在 MT 诱导细胞死亡中的作用。方法 体外培养肝癌细胞株 HepG2,用不同浓度的 MT (10^{-7} 、 10^{-5} 、 10^{-3} mol/L)作用于 HepG2 细胞,Western blot 法检测 HepG2 细胞自噬相关蛋白 LC3(LC3-I/LC3-II)的表达,并用单丹磺酰尸胺(MDC)染色在激光共聚焦显微镜下观察 HepG2 细胞内自噬体形成情况;在给予 MT 的同时使用 3-甲基腺嘌呤(3-MA)或氯喹(CQ)对细胞自噬进行抑制,利用 MTT 和 Western blot 法分别测定 HepG2 细胞的细胞活力和 LC3 蛋白的表达变化。结果 MT 作用后可诱导 HepG2 细胞内自噬小体形成,自噬相关蛋白 LC3-II 表达增多且呈剂量依赖关系。MT 作用后,HepG2 细胞生长受到抑制,加入 3-MA 或 CQ 抑制自噬后,细胞生长受抑制现象更加显著。MT + 3-MA 组 LC3-II/ β -actin 比值较 MT 单药组明显减小,MT + CQ 组则比值增大。结论 MT 可激活肝癌细胞 HepG2 保护性自噬反应,通过 3-MA 或 CQ 阻断 MT 诱导的自噬通路可显著增强 MT 对 HepG2 细胞的生长抑制作用,提示自噬可能是肝癌细胞 HepG2 逃避 MT 肿瘤杀伤作用的一种有效机制。

关键词 肝癌;自噬;褪黑素;细胞增殖

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)08-1053-04

褪黑素(melatonin, MT)是一种主要由松果腺合成并分泌的吲哚类化合物,具有调节生理节奏、抗氧化、抗炎、免疫调节等多种功能^[1]。研究^[2]表明 MT 还具有抗肿瘤和化学预防作用,动物实验及临床试验^[3]均表明,MT 能有效抑制肝癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌等多种肿瘤增殖。自噬是细胞面对饥饿等环境压力下的一种生存机制,目前对于 MT 与自噬的关系尚不明确。多数研究^[4-5]表明 MT 可抑制自噬通路且这种作用常与其抗氧化活性直接相关;但 Liu et al^[6]则发现在小鼠肝癌 H22 细胞中,MT 可通过减少 mTOR 和 Akt 信号蛋白表达从而诱发自噬过

程。但是在人类肝癌细胞中,MT 是否在细胞自噬诱导的肿瘤抑制机制或细胞保护机制中发挥作用尚不明确。因此,该研究旨在明确 MT 在肝癌治疗中能否诱导自噬产生,并对自噬在 MT 杀伤肿瘤细胞中的作用进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HepG2 肝癌细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞库,培养于含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养,隔天换液,融合度达 80% 时传代。

1.1.2 主要试剂 MT、LC3 兔抗多克隆抗体、3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)、氯喹(chloroquine, CQ)、单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)染料均购自美国 Sigma 公司; β -actin 鼠抗多克隆抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 法检测细胞自噬相关蛋白 LC3 的表达 取对数生长期的 HepG2 细胞,用 0.1% 胰蛋白酶消化以每孔 2.5×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板中,培养 24 h 待细胞贴壁后进行药物干预。选用不同浓度梯度的 MT 溶液(10^{-7} 、 10^{-5} 、 10^{-3} mol/L,生理浓度约 10^{-9} mol/L)作用于 HepG2 细胞,以只加培养液的 HepG2 细胞为对照组。24 h 后收集细胞,冷 PBS 洗 2 次,每孔加蛋白裂解液 150 μ l,冰上裂解 30 min,然后 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,BCA 法定量,取 20 μ g 蛋白进行 Western blot 实验;12.5% SDS-PAGE 电泳,转膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,4 °C 一抗孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,最后加入电化学发光试剂(美国 Pierce 公司),采用 ImageQuant™ LAS-4000 型发光成像系统显像。

1.2.2 MDC 染色法观察自噬体的形成 细胞发生自噬形成的自噬体为酸性,故弱碱性的荧光染料 MDC 被细胞吸收后可选择性的浓聚于自噬体,可用于显示自噬体的形成及自噬体的数量^[7]。将预先消毒的盖玻片(24 mm \times 24 mm)放置于培养皿内,

2014-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81071986,81272739)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介:范文洁,女,硕士研究生;

孙国平,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:sunguoping@ahmu.edu.cn

接种对数生长期的 HepG2 细胞于盖玻片上制成细胞爬片,待细胞贴壁后进行药物干预。实验分为空白组、雷帕霉素 (1 μg/ml) 组 (阳性对照)、MT 组 (10⁻⁵ mol/L) 24 h 后用 0.05 mmol/L MDC 于 37 °C 避光孵育 30 min 后,取出爬片置于载玻片上,立即在激光共聚焦显微镜下进行观察。

1.2.3 MTT 法检测自噬抑制剂对 MT 抗肿瘤作用的影响 调整细胞密度为 2.5 × 10⁴/ml,接种于 96 孔板,每孔 200 μl,待细胞贴壁后分别加入自噬抑制剂 3-MA (2 mmol/L) 和 CQ (5 μg/ml) 预处理细胞 1 h,然后加入不同质量浓度的 MT (0、10⁻⁷、10⁻⁵、10⁻³ mol/L) 共同培养 24 h 后,进行 MTT 法检测。实验分为 MT 单药组、MT + 3-MA 联合用药组、MT + CQ 联合用药组,以只加培养液的孔为空白组。每组设 3 个复孔,加药后培养 24 h,每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μl,37 °C 继续孵育 4 h 后吸出各孔培养液,每孔加入 DMSO 150 μl,用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔吸光度 (optical density, OD) 值,并计算细胞存活率。存活率 (%) = (OD_{实验组} - OD_{空白组}) / (OD_{对照组} - OD_{空白组}) × 100%。

1.2.4 自噬抑制剂对 LC-3 蛋白表达的影响 HepG2 细胞贴壁生长后,加入药物处理,实验分为: MT (0、10⁻⁵ mol/L) 单药组、MT (0、10⁻⁵ mol/L) + 3-MA (2 mmol/L) 联合用药组,MT (0、10⁻⁵ mol/L) + CQ (5 μg/ml) 联合用药组,作用 24 h 后收集细胞至 1.5 ml 离心管中,行 Western blot 检测,检测方法同 1.2.1。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 MT 对 HepG2 细胞自噬功能的影响

2.1.1 自噬相关蛋白 LC3 的表达水平 Western blot 检测显示,与对照组比较,经不同浓度 MT (10⁻⁷、10⁻⁵、10⁻³ mol/L) 处理 24 h 后,HepG2 细胞 LC3-II 蛋白表达量均明显增高,LC3-II /β-actin 吸光度比值随 MT 浓度增加呈现出递增趋势 (*F* = 80.336 *P* < 0.05),见图 1,提示 MT 可诱导 HepG2 细胞自噬体形成,并呈现出剂量依赖关系。

2.1.2 MDC 荧光染色检测自噬水平改变 激光共聚焦显微镜下观察结果显示,与对照组比较,经 MT (10⁻⁵ mol/L) 处理后有大量绿色荧光小点即自噬小体散在分布于细胞膜附近,且数量明显多于对照组,

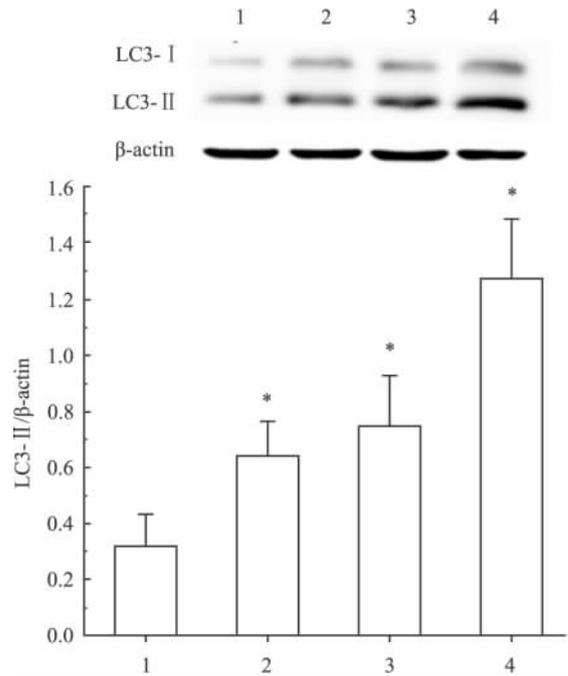


图1 Western blot 检测不同浓度 MT 对 HepG2 细胞中自噬相关蛋白 LC3 (LC3-I 和 LC3-II) 表达的影响 1:空白组;2:MT 10⁻⁷ mol/L 组;3:MT 10⁻⁵ mol/L 组;4:MT 10⁻³ mol/L 组;与空白组比较:* *P* < 0.05

与雷帕霉素处理结果相似,见图 2。形态学上出现自噬体的增多是证实自噬发生的最基本的条件,因此上述结果提示,MT 确实可以诱导 HepG2 细胞自噬的产生。

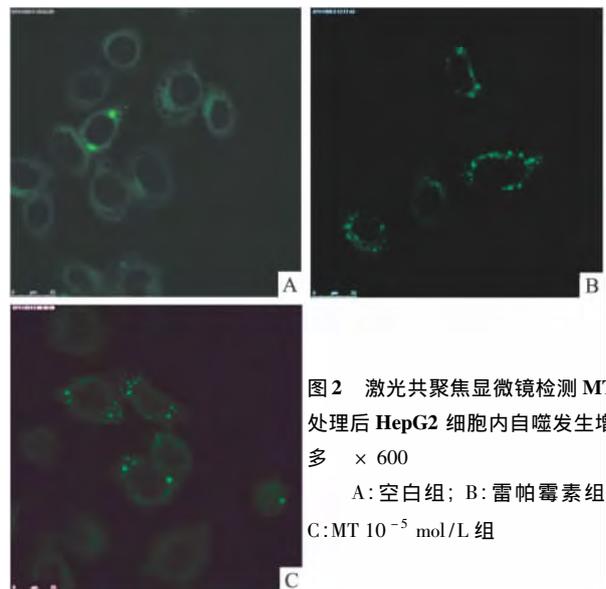


图2 激光共聚焦显微镜检测 MT 处理后 HepG2 细胞内自噬发生增多 × 600 A:空白组;B:雷帕霉素组;C:MT 10⁻⁵ mol/L 组

2.2 抑制细胞自噬能增强 MT 对 HepG2 细胞的生长抑制 MTT 检测结果显示,与对照组相比,MT (10⁻⁷、10⁻⁵ 和 10⁻³ mol/L) 单药处理 HepG2 细胞 24 h 后的细胞活力均被抑制 (*F* = 49.271, *P* <

0.05), 加入自噬抑制剂 3-MA (2 mmol/L 预处理 1 h) 或 CQ (5 μ g/ml 预处理 1 h) 后, 联合用药组的细胞存活率均较 MT 单药组明显下降 ($F = 39.682$, $F = 68.794$, $P < 0.05$), 见图 3。

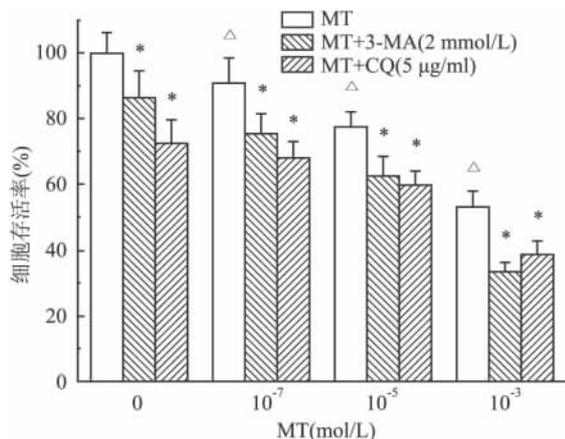


图3 自噬抑制剂 3-MA 或 CQ 与 MT 联合作用对 HepG2 细胞存活率的影响
与空白组比较: $\Delta P < 0.05$; 与 MT 组比较: * $P < 0.05$

2.3 抑制自噬后自噬相关蛋白 LC3 的表达水平检测 10^{-5} mol/L MT 治疗组 HepG2 细胞 LC3-II 表达量高于对照组, 而 2 mmol/L 3-MA 和 10^{-5} mol/L MT 联合干预后 HepG2 细胞 LC3-II 表达量低于 MT 单药组, 而经过 10^{-5} mol/L MT 和 5 μ g/ml CQ 联合干预后 LC3-II 表达量高于 MT 单药组, 见图 4。以上结果提示 3-MA 可抑制 HepG2 细胞自噬体的形成, CQ 则可在溶酶体水平阻断 HepG2 细胞自噬体的降解, 这也从另一个方面显示 MT 作用下 HepG2 细胞自噬体增多的现象的确是自噬机制被激活的结果, 而非自噬降解通路被抑制所造成的假象。

3 讨论

自噬是广泛存在于真核细胞中的一种生命现象, 是一种高度保守的细胞行为, 与细胞的生长、增殖及肿瘤的发生过程关系密切。研究^[8]表明自噬在肿瘤中具有双重作用, 既可以作为一种防御机制来抵御环境变化对细胞造成的损伤, 同时亦可作为一种 II 型细胞死亡程序诱导细胞主动性死亡, 因此不同条件下自噬在肿瘤中的作用主要取决于细胞状态以及所处的具体环境。

LC3 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8 基因的同源物, 现已作为自噬的特异性标志蛋白^[9], 自噬发生时 LC3 由胞质型 (即 LC3-I) 转位到自噬体膜 (LC3-II) 增加, 因此 LC3-I 向 LC3-II 的转变代表

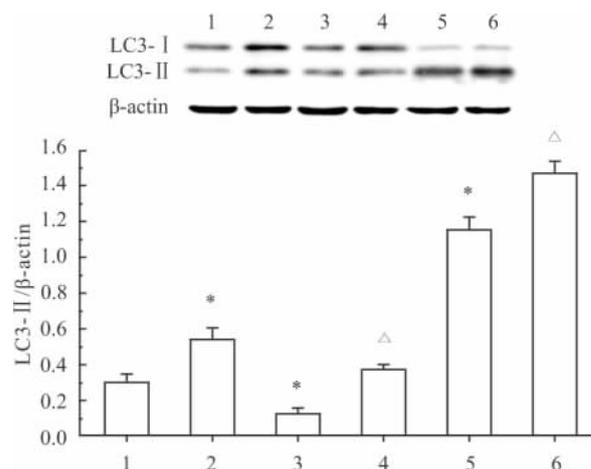


图4 抑制自噬后自噬相关蛋白 LC3 (LC3-I/LC3-II) 的表达水平
1: 空白组; 2: MT (10^{-5} mol/L) 组; 3: 3-MA (2 mmol/L) 组; 4: MT (10^{-5} mol/L) + 3-MA (2 mmol/L) 组; 5: CQ (5 μ g/ml) 组; 6: MT (10^{-5} mol/L) + CQ (5 μ g/ml) 组; 与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 MT (10^{-5} mol/L) 组比较: $\Delta P < 0.05$

了自噬的诱导, 但 LC3-I 相对不稳定, 易受环境及实验条件等多种因素的影响, 且对抗体的亲和力要低于 LC3-II, 因此多数研究将 LC3-II 作为自噬检测指标^[10-11]。本研究采用 Western blot 检测显示, 经 MT 处理后, HepG2 细胞的 LC3-II/ β -actin 的比值明显增高, 且呈剂量依赖关系, 表明 MT 可诱导 HepG2 细胞自噬发生。

3-MA 是一种核苷派生物, 能促进溶酶体碱化, 导致自噬体不能与溶酶体融合而抑制自噬小体的形成^[12]。CQ 则作为一种溶酶体抑制剂, 可在自噬性降解通路的下游——溶酶体水平来抑制自噬^[13]。本研究显示将二者分别加入 HepG2 细胞均可抑制 MT 引起的自噬反应, 且可使 MT 刺激后的 HepG2 细胞存活率较 MT 单独作用明显下降, 提示抑制自噬可能会提高肝癌细胞 HepG2 对 MT 的敏感性。由此推测抗癌药物治疗过程中诱导产生的自噬体可能是肝癌细胞逃避化疗药物环境从而逃避死亡的一种有效机制; 在化疗过程中加用自噬抑制剂以抑制自噬反应可降低肿瘤细胞对受损细胞器的清除能力, 从而增加肿瘤细胞死亡率, 增强化疗疗效。但关于自噬在 MT 杀伤肝癌细胞中所起的具体作用及分子机制尚有待进一步研究阐明。

参考文献

- [1] Reiter R J, Paredes S D, Manchester L C, et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin [J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2009, 44(4): 175-200.
- [2] Lenoir V, de Jonage-Canonica M B, Perrin M H, et al. Preventive

- and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat [J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(4): R470-6.
- [3] Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, et al. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1) [J]. *J Pineal Res* 2010 49(3):248-55.
- [4] Nopparat C, Porter J E, Ebadi M, et al. The mechanism for the neuroprotective effect of melatonin against methamphetamine-induced autophagy [J]. *J Pineal Res* 2010 49(4):382-9.
- [5] Koh P O. Melatonin prevents ischemic brain injury through activation of the mTOR/p70S6 kinase signaling pathway [J]. *Neurosci Lett* 2008 444(1):74-8.
- [6] Liu C, Jia Z, Zhang X, et al. Involvement of melatonin in autophagy-mediated mouse hepatoma H22 cell survival [J]. *Int Immunopharmacol* 2012 12(2):394-401.
- [7] Biederbick A, Kern H F, Elsässer H P. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific *in vivo* marker for autophagic vacuoles [J]. *Eur J Cell Biol* 1995 66(1):3-14.
- [8] Yu Y X, Gu Z L, Qin Z H, et al. The role of autophagy in pharmacological actions of anticancer drugs [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, 22(2):137-41.
- [9] Slobodkin M R, Elazar Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy [J]. *Essays Biochem* 2013, 55:51-64.
- [10] Rubinsztein D C, Cuervo A M, Ravikumar B, et al. In search of an "autophagometer" [J]. *Autophagy*, 2009, 5(5):585-9.
- [11] Klionsky D J, Abdalla F C, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2):151-75.
- [12] Wu Y, Wang X, Guo H, et al. Synthesis and screening of 3-MA derivatives for autophagy inhibitors [J]. *Autophagy* 2013 9(4):595-603.
- [13] Egger M E, Huang J S, Yin W. Inhibition of autophagy with chloroquine is effective in melanoma [J]. *J Surg Res* 2013, 184(1):274-81.

The role of autophagy in human hepatocarcinoma cell line HepG2 induced by melatonin

Fan Wenjie, Jia Zhenya, Cao Jing, et al

(Dept of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the change in function of autophagy in hepatocarcinoma cell line HepG2 induced by melatonin (MT), and to explore the role of autophagy in MT-induced cell death. **Methods** Hepatocarcinoma cancer cell line HepG2 was treated with different concentrations of MT (10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} mol/L). The expression of autophagy-related protein LC3 (LC3-I/LC3-II) during MT-induced cell death was analysed by Western blot assay, autophagosomes and autolysosomes in HepG2 cells were detected by Monodansylcadaverin (MDC) staining under laser scanning confocal microscope (LSCM). The viability of HepG2 cells was examined by MTT assay after treated either with different concentrations of MT alone or in combination with the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) or chloroquine (CQ). The expression of LC3 in MT-treated HepG2 cells was analysed by Western blot assay before and after 3-MA or CQ treatment. **Results** Western blot assay demonstrated that MT could dose-dependently increase LC3-II expression, and the formation of autophagosomes in HepG2 cells after MT treatment could be observed under LSCM. Compared with the control group, MT treatment significantly inhibited cell growth which was further enhanced by combined use of autolysosome inhibitor 3-MA or CQ, the ratio of LC3-II/ β -actin was decreased markedly after 3-MA treatment, while after CQ treatment, the ratio of LC3-II/ β -actin was increased markedly. **Conclusion** MT can enhance the function of autophagy in HepG2 cells and induce an increased formation of autophagosomes. The autolysosome inhibitor 3-MA or CQ can significantly enhance the effect of MT-induced proliferative inhibition in HepG2 cells by blocking MT-induced autophagy pathway, indicating autophagy is likely to be a mechanism for HepG2 cells to avoid MT-induced cell death.

Key words liver neoplasms; autophagy; melatonin; cell proliferation