

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00933

饥饿诱导胶质瘤细胞自噬发生及 Beclin-1 表达的变化

赵建祥¹, 贺 华², 马建芳³, 卞留贯^{1*}, 孙青芳¹, 沈建康¹

1. 上海交通大学医学院瑞金医院神经外科, 上海 200025
2. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003
3. 上海交通大学医学院瑞金医院神经病学研究所, 上海 200025

[摘要] **目的** 探讨饥饿诱导大鼠胶质瘤细胞 C6 自噬的发生及自噬相关蛋白 Beclin-1 的变化。**方法** 在培养大鼠胶质瘤细胞 C6 至对数生长期后, 以无氨基酸培养液 EBSS(Earle's balanced salt)代替 DMEM 培养液培养细胞, 培养 1、3、6、12、18 h 后收集细胞, 采用蛋白质印迹分析和免疫荧光检测特异性标记自噬的微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC-3)以及自噬相关蛋白 Beclin-1, 采用透射电镜观察自噬体。**结果** 饥饿处理 1 h 后胶质瘤细胞 C6 中 LC-3 表达开始增加, 并随着饥饿时间延长而逐渐增加, 12 h 达到高峰后开始下降; 免疫荧光下可见点状自噬体; 透射电镜下观察到自噬体的形成。饥饿处理 1 h 后胶质瘤细胞 C6 中 Beclin-1 表达开始升高, 3 h 达到高峰后逐渐下降; 免疫荧光下观察到 Beclin-1 表达增高。**结论** 饥饿可以诱导胶质瘤细胞 C6 发生自噬, Beclin-1 与饥饿诱导的胶质瘤细胞 C6 的自噬相关, 为进一步研究 Beclin-1 在胶质瘤细胞自噬中的作用机制打下基础。

[关键词] 神经胶质瘤; 自噬; LC-3; Beclin-1

[中图分类号] R 730.264 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-0933-04

Starvation-induced autophagy in glioma and changes in Beclin-1 expression

ZHAO Jian-xiang¹, HE Hua², MA Jian-fang³, BIAN Liu-guan^{1*}, SUN Qing-fang¹, SHEN Jian-kang¹

1. Department of Neurosurgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China
2. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
3. Neurological Institute of Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective** To investigate the starvation-induced autophagy in rat C6 glioma cells and the changes of autophagy-related protein Beclin-1. **Methods** Rat C6 glioma cells of the logarithmic growth phase were cultured with amino acid-free EBSS medium instead of the DMEM medium. Cells were collected at 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, and 18 h after EBSS culture. Western blotting analysis and immunofluorescence were used to detect the specific markers of autophagic microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC-3) and autophagy-related protein Beclin-1, and transmission electron microscope was used to observe the autophagic body. **Results** LC-3 expression was found in C6 glioma cells 1 h after starvation; the expression increased with the prolongation of starvation, and reached a peak 12 h later and then began to decline. Autophagic bodies were observed under transmission electron microscopy, and autophagosomes were found in immunofluorescence. Beclin-1 expression began to increase in C6 glioma cells 1 h after starvation, reached a peak at 3 h and then decreased gradually. Increased expression of Beclin-1 was also observed by immunofluorescence. **Conclusion** Starvation can induce autophagy in C6 glioma cells, which is correlated with the expression of autophagy-related protein Beclin-1. This study lays a foundation for studying the autophagy mechanism in glioma cells.

[Key words] glioma; autophagy; LC-3; Beclin-1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):933-936]

自噬 (autophagy) 是胞质蛋白质和细胞器在膜包裹形成的自噬体中降解成氨基酸、核酸等小分子的生物学过程, 是细胞对所处环境变化的有效反应^[1]。在细胞营养缺乏时, 自噬发挥维持细胞能量

稳态的重要作用。然而自噬的过度激活可导致程序性细胞死亡, 称为 II 型程序性细胞死亡, 从而引起一系列疾病过程。自噬作用在机体的生理和病理过程中广泛存在, 与人类的多种疾病, 尤其是恶性肿瘤存

[收稿日期] 2010-04-01 **[接受日期]** 2010-05-07

[作者简介] 赵建祥, 硕士生, 住院医师. E-mail: 113657050@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-64370045-666091, E-mail: bian6612@yahoo.com.cn

在密切关系。胶质瘤是常见的神经系统肿瘤,约占神经系统原发性肿瘤的60%。自噬在胶质瘤细胞的侵袭性生长^[2]和胶质瘤细胞对各种治疗因素的反应中均起着重要作用^[3]。Beclin-1是参与哺乳动物细胞自噬体形成的关键调控蛋白^[4],但其在胶质瘤细胞自噬中的具体作用及其机制尚不清楚。本研究采用Earle's balanced salt (EBSS)代替培养液处理大鼠胶质瘤细胞C6,透射电镜下观察自噬体的形成,蛋白质印迹法及免疫荧光检测自噬的标记蛋白微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3,LC-3)和自噬相关蛋白Beclin-1表达的变化,以进一步研究胶质瘤自噬的作用机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株及主要试剂 大鼠胶质瘤细胞C6购自中国科学院上海生命科学院生化细胞研究所。C6细胞的培养液为DMEM,10%胎牛血清(FBS),1%青霉素,1%链霉素。所有培养液所需的材料及去血清培养液EBSS均购自Gibco公司。LC-3兔抗大鼠单克隆抗体、Beclin-1兔抗大鼠单克隆抗体、 β -actin小鼠单克隆抗体均购自Sigma公司,羊抗兔、羊抗小鼠辣根过氧化物酶IgG均购自Cell Signaling公司。

1.2 细胞培养及处理 C6细胞在含10%FBS、1%青霉素、1%链霉素的DMEM培养液中,37℃、5%CO₂条件下培养。培养至70%~80%细胞融合、对数生长期时,实验组细胞以去血清培养液EBSS洗3遍后,以无氨基酸培养液EBSS代替含10%FBS、1%青霉素、1%链霉素的DMEM培养液培养(饥饿处理),并在1、3、6、12、18h收获细胞;对照组细胞以含10%FBS、1%青霉素、1%链霉素的DMEM培养液培养,不加任何处理因素。

1.3 蛋白质印迹法检测LC-3和Beclin-1表达 收获细胞,4℃预冷的PBS洗2次,用细胞刮子刮下细胞,低温离心机12 000×g离心1min,弃上清液,取沉淀的细胞,加入适量的细胞裂解液,混匀后冰上孵育1h,低温离心机12 000×g离心30min,取上清液,弃沉淀。15%SDS-PAGE 100V电泳,100V、2h转膜,5%脱脂牛奶常温下封闭后,在4℃孵育一抗(兔抗大鼠Beclin-1、兔抗大鼠LC-3、小鼠抗大鼠 β -actin滴度均为1:1 000);5%脱脂牛奶常温下封闭二抗(羊抗兔辣根过氧化物酶IgG和羊抗小鼠辣根过氧化物酶IgG滴度均为1:5 000,5%脱脂牛奶配制),ECL显影。

1.4 免疫荧光观察LC-3和Beclin-1表达 C6细胞培养于24孔板内,孔内事先置入无菌盖玻片。取正常对照细胞和EBSS培养6h的细胞,PBS洗2

次,4%多聚甲醛固定,10%BSA(0.2%Triton X-100)封闭,加入一抗(LC-3和Beclin-1滴度均为1:1 000)常温下孵育2h,PBS清洗3次,加入荧光标记二抗Alexa488或594(购自Invitrogen公司,1:800)常温下孵育1h,甘油封片。用Olympus IX70荧光显微镜观察。

1.5 透射电镜观察自噬体 取以EBSS培养6h的C6细胞,弃去培养液,用不含任何添加成分的37℃的DMEM培养液清洗,收集至1.5ml离心管中,1 500×g离心5min。沉淀的细胞用2%戊二醛在4℃下固定2h左右。后用PBS清洗,再用锇酸在4℃下固定2h左右,梯度乙醇(30%~100%)脱水。然后在1:2松香树脂618/PO的混合液中浸润过夜,树脂包埋。超薄切片,乙酸双氧铀染色,枸橼酸铅复染,Philips CM120透射电镜下观察。

1.6 统计学处理 每项实验均重复3次,数据用SPSS 11.5软件进行分析,组间比较采用方差分析(ANOVA),检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 蛋白质印迹法显示饥饿处理C6后LC-3和Beclin-1表达增高 蛋白质印迹分析结果发现,与对照组比较,饥饿处理1h后即有LC-3 II增高,6h和12h时与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),12h达高峰后下降(图1);Beclin-1在饥饿处理1h后表达增高,3h达高峰(与对照组相比差异有统计学意义, $P < 0.05$),后逐渐下降(图2)。

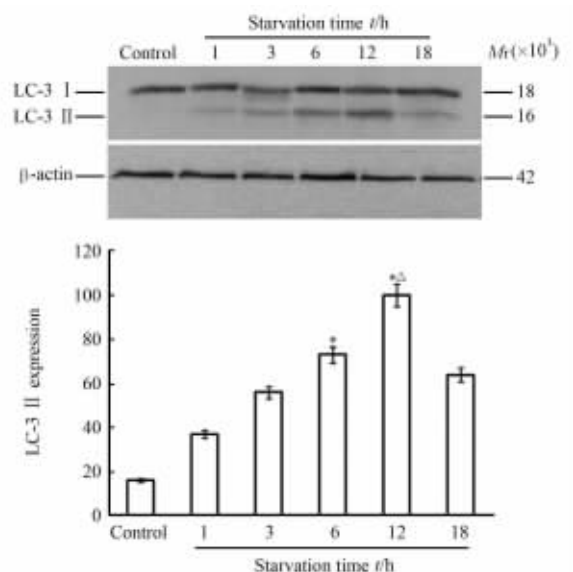


图1 饥饿处理后C6胶质瘤细胞LC-3表达的变化
Fig 1 Changes of LC-3 expression after treating C6 glioma cells with starvation

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 1 h after starvation. $n = 3, \bar{x} \pm s$

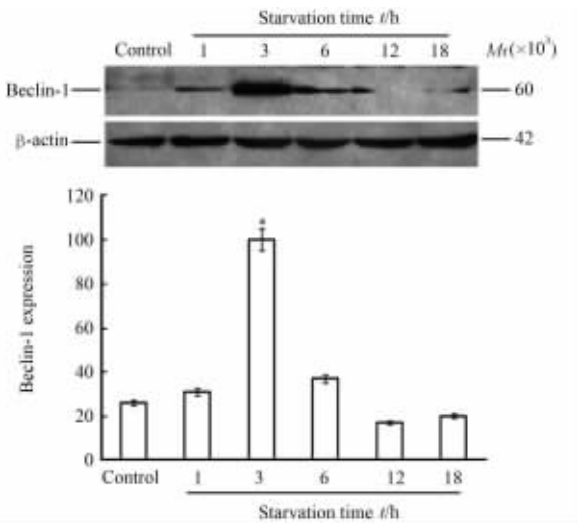


图 2 饥饿处理后 C6 胶质瘤细胞 Beclin-1 表达的变化

Fig 2 Changes of Beclin-1 expression after treating C6 glioma cells with starvation

* $P < 0.05$ vs control group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.2 免疫荧光显示自噬体形成和 Beclin-1 表达增高 荧光显微镜下可见, 饥饿处理 6 h 后的胶质瘤细胞 C6 内出现 LC-3 表达高亮点, 说明自噬体形成, 而对照组无此现象; 饥饿处理后 Beclin-1 的表达也明显增高(图 3)。

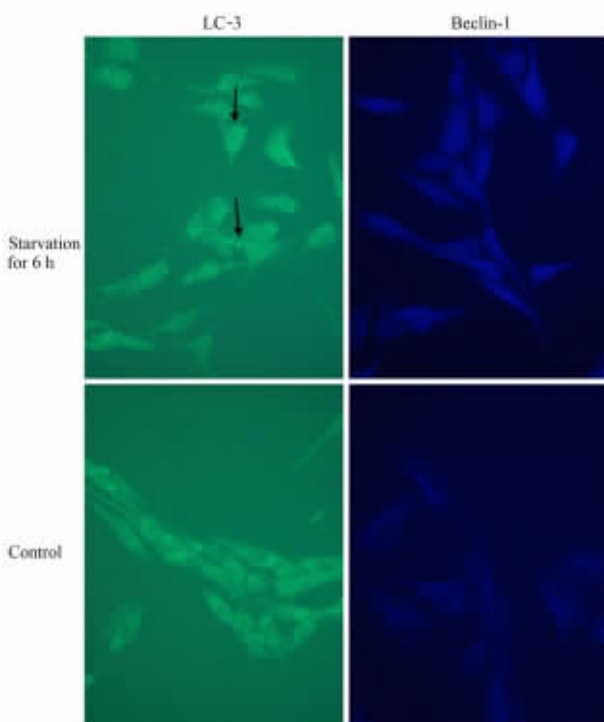


图 3 饥饿处理 C6 胶质瘤细胞后自噬体形成及 Beclin-1 的表达

Fig 3 Formation of autophagosome (black arrows) and Beclin-1 expression after treating C6 glioma cells with starvation

Original magnification: $\times 400$

2.3 透射电镜显示自噬体形成 透射电镜下可见, 饥饿处理 6 h 后的胶质瘤细胞 C6 内出现自噬体, 而对照组无此现象(图 4), 提示饥饿处理后 C6 细胞发生自噬。

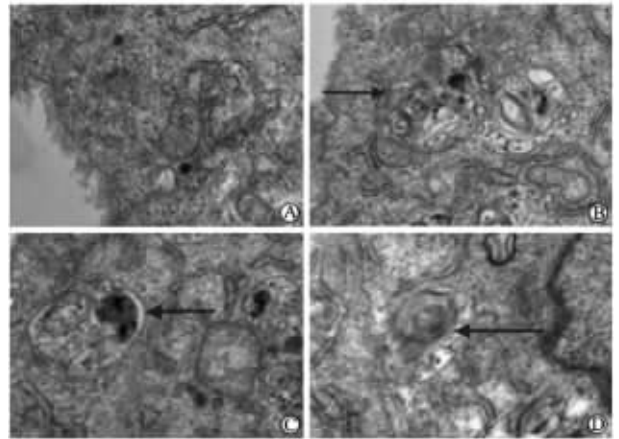


图 4 透射电镜下观察自噬体的形成

Fig 4 Autophagosomes were found under transmission electron microscope

A: Control group; B-D: The experimental group 6 h after starvation treatment. The arrows indicate autophagosomes containing organelles and proteins. Original magnification: $\times 7\ 000$

3 讨论

根据底物进入溶酶体内的途径不同可将自噬分为 3 种类型: 微自噬、巨自噬和分子伴侣介导的自噬。巨自噬即通常所指的自噬, 以自噬体的形成为特征。自噬体由来源于内质网的双层膜包裹胞质蛋白质和细胞器形成。巨自噬在细胞的自噬作用中占有最重要的地位, 本研究检测的是巨自噬^[5]。LC-3 是酵母菌自噬基因 Atg8 (autophagy-related gene 8) 在哺乳动物中的同源物, LC-3 被自噬基因 Atg4 的同源体 hATG4B 加工形成 LC-3 I, LC-3 I 的 PE 修饰形式 LC-3 II, 存在于自噬体形成各阶段的内外膜上, 在自噬溶酶体膜上也可见, LC-3 II 常作为自噬体膜标志性蛋白质, 用于检测细胞自噬的发生。

自噬在胶质瘤的浸润性生长和对化疗、放疗的抵抗中均有重要意义。Beclin-1 参与哺乳动物自噬体形成的调控。多种肿瘤存在 Beclin-1 等自噬基因的缺陷, 能够逃避自噬性死亡^[6]。自噬在胶质瘤的生长以及胶质瘤对化疗、放疗的抵抗中的作用机制尚未完全阐明, Beclin-1 在胶质瘤自噬中的作用机制也有待于进一步研究。

3.1 饥饿可以诱导大鼠胶质瘤细胞 C6 发生自噬 自噬可以通过促进蛋白质分解代谢, 使处于有害环境的胶质瘤细胞寿命延长而发挥促进胶质瘤细胞生

长的作用,而自噬的过度激活诱导胶质瘤细胞发生自噬性细胞死亡。研究表明自噬对胶质瘤细胞的放射敏感性有重大影响,自噬抑制剂 3-methyladenine 和 bafilomycin A1 能够增加胶质瘤细胞的放射敏感性^[7]。众所周知,低分化的胶质瘤对抗癌药物具有耐药性,其中一个重要原因是胶质瘤的凋亡抵抗。而自噬性细胞死亡则使克服凋亡抵抗成为可能。口服二代烷化剂替莫唑胺 (temozolomide) 能够诱导恶性胶质瘤细胞发生自噬的过度激活,诱导胶质瘤细胞发生自噬性细胞死亡,增强其抗肿瘤效应^[8]。在胶质瘤细胞的死亡中自噬可能比凋亡扮演更重要的角色。

饥饿法是诱导细胞自噬的一种经典方法。在肝癌^[9]、前列腺癌^[10]等肿瘤细胞的自噬研究中均有应用。本研究以无氨基酸培养液 EBSS 代替含 10% FBS、1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM 培养液,37℃、5% CO₂ 条件下培养大鼠胶质瘤细胞 C6,随着饥饿时间的延长,细胞内特异性蛋白 LC-3 的表达逐渐增加,12 h 时达到高峰。免疫荧光观察到点状的自噬体形成,透射电镜下也观察到典型的包裹了细胞器和蛋白的自噬体。证实饥饿可以诱导大鼠胶质瘤细胞 C6 自噬的发生。

3.2 Beclin-1 与大鼠胶质瘤细胞 C6 的自噬相关

Beclin-1 与酵母自噬基因 Atg6 同源,是介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体的关键因子,参与哺乳动物自噬体形成的调控。Beclin-1 与 PI3K、Vps34 形成复合体,该复合体使磷脂酰肌醇磷酸化,产生三磷酸磷脂酰肌醇 (PI3P)。PI3P 在自噬前体复合物的形成及自噬小体膜的来源中发挥重要作用^[4]。Beclin-1 还是一种抑癌基因,多种肿瘤存在 Beclin-1 自噬基因的缺陷,能够逃避自噬性死亡。人类偶发性乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌细胞中,Beclin-1 存在等位基因缺失突变^[11]。本研究表明在大鼠胶质瘤细胞 C6 发生自噬的同时,能够检测到自噬相关蛋白 Beclin-1 表达的上调,并在 3 h 时达到高峰,说明 Beclin-1 在大鼠胶质瘤细胞的自噬中会发生表达上调,与胶质瘤的细胞自噬关系密切。

本研究成功采用饥饿法诱导大鼠胶质瘤细胞 C6 产生自噬,检测了自噬的标记蛋白 LC-3 的变化,建立了胶质瘤自噬的细胞模型,同时检测了自噬相关蛋白 Beclin-1 的表达变化,结果显示,Beclin-1 与

胶质瘤细胞 C6 的自噬相关。这为进一步研究自噬对胶质瘤细胞活性的影响及自噬的作用机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Tyler M A, Ulasov I V, Lesniak M S. Cancer cell death by design: apoptosis, autophagy and glioma virotherapy[J]. *Autophagy*, 2009, 5: 856-857.
- [2] Zhao Y, Huang Q, Yang J, Lou M, Wang A, Dong J, et al. Autophagy impairment inhibits differentiation of glioma stem/progenitor cells[J]. *Brain Res*, 2010, 1313: 250-258.
- [3] Jinno-Oue A, Shimizu N, Hamada N, Wada S, Tanaka A, Shinagawa M, et al. Irradiation with carbon ion beams induces apoptosis, autophagy, and cellular senescence in a human glioma-derived cell line [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 76: 229-241.
- [4] Pirtoli L, Cevenini G, Tini P, Vannini M, Oliveri G, Marsili S. The prognostic role of Beclin-1 protein expression in high-grade gliomas[J]. *Autophagy*, 2009, 5: 930-936.
- [5] Jiang H, White E J, Conrad C, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Autophagy pathways in glioblastoma[J]. *Methods Enzymol*, 2009, 453: 273-286.
- [6] Graf M R, Jia W, Johnson R S, Dent P, Mitchell C, Loria R M. Autophagy and the functional roles of Atg5 and beclin-1 in the anti-tumor effects of 3beta androstene 17alpha diol neuro-steroid on malignant glioma cells[J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2009, 115(3-5): 137-145.
- [7] Benzina S, Altmeyer A, Malek F, Dufour P, Denis J M, Gueulette J, et al. High-LET radiation combined with oxaliplatin induce autophagy in U-87 glioblastoma cells[J]. *Cancer Lett*, 2008, 264: 63-70.
- [8] Ulasov I V, Sonabend A M, Nandi S, Khramtsov A, Han Y, Lesniak M S. Combination of adenoviral virotherapy and temozolomide chemotherapy eradicates malignant glioma through autophagic and apoptotic cell death *in vivo* [J]. *Br J Cancer*, 2009, 100: 1154-1164.
- [9] Tang H, Da L, Mao Y, Li Y, Li D, Xu Z, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy *via* up-regulation of beclin 1 expression[J]. *Hepatology*, 2009, 49: 60-71.
- [10] DiPaola R S, Dvorzhinski D, Thalasila A, Garikapaty V, Doram D, May M, et al. Therapeutic starvation and autophagy in prostate cancer: a new paradigm for targeting metabolism in cancer therapy[J]. *Prostate*, 2008, 68: 1743-1752.
- [11] Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, et al. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours[J]. *Int J Oncol*, 2007, 30: 429-436.

[本文编辑] 尹 茶