

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00595

细胞自噬在多柔比星诱导淋巴瘤细胞凋亡中的作用

范佳君¹, 曾 贤², 李玉彬³, 王晓丹¹, 王子玉², 鞠佃文^{1,2*}

1. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092
2. 复旦大学药学院生物合成教研室, 上海 200433
3. 南京农业大学生命科学学院农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

[摘要] **目的** 研究细胞自噬在多柔比星诱导 Raji 细胞发生细胞凋亡过程中所起的作用。**方法** 以含不同浓度多柔比星的培养液培养 Raji 细胞, 采用蛋白质印迹法观察 Raji 细胞自噬相关蛋白的表达, 并用 MDC 染色法观察 Raji 细胞内的自噬体和自噬溶酶体的形成情况; 在给予多柔比星的同时使用 PI3K 通路抑制剂 3-MA 和自噬溶酶体抑制剂 NH₄Cl 对细胞自噬进行抑制, 利用 MTT 法和流式细胞术测定 Raji 细胞的细胞活力与凋亡情况。**结果** 给予多柔比星后, Raji 细胞的 LC3 II 表达水平和 MDC 染色荧光强度均高于对照组 ($P < 0.05$), 证明多柔比星能诱导 Raji 细胞发生细胞自噬。给予多柔比星后, Raji 细胞生长受到抑制, 凋亡增加 ($P < 0.01$); 用细胞自噬抑制剂 3-MA 和 NH₄Cl 抑制自噬后, 细胞生长受抑和凋亡增加现象更加显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论** 在多柔比星杀伤 Raji 细胞的过程中会诱导细胞发生自噬, 抑制自噬能够增强多柔比星对 Raji 细胞的杀伤作用。

[关键词] 多柔比星; 自噬; 细胞凋亡; 淋巴瘤

[中图分类号] R 733.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)06-0595-04

Roles of autophagy in doxorubicin-induced apoptosis of lymphoma cells

FAN Jia-jun¹, ZENG Xian², LI Yu-bin³, WANG Xiao-dan¹, WANG Zi-yu², JU Dian-wen^{1,2*}

1. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China
2. Department of Biosynthesis, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200433, China
3. Key Laboratory for Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the role of autophagy in doxorubicin-induced apoptosis of Raji cells. **Methods** Raji cells were treated with different concentrations of doxorubicin. Western blotting analysis was used to observe the expression of autophagy-related protein during doxorubicin-induced cell death, and MDC staining was applied to detect autophagosomes and autolysosomes in Raji cells. Cell viability and apoptosis of Raji cells were examined by MTT assay and flow cytometry after the cells were treated with doxorubicin in combination with PI3K pathway inhibitor 3-MA or autolysosome inhibitor NH₄Cl. **Results** Doxorubicin treatment significantly increased LC3 II expression and the intensity of MDC staining in Raji cells compared with the control group ($P < 0.05$), indicating that doxorubicin can induce autophagy of Raji cells. Compared with the control group, doxorubicin treatment significantly inhibited cell growth and induced apoptosis of Raji cells ($P < 0.01$). PI3K pathway inhibitor 3-MA or autolysosome inhibitor NH₄Cl further enhanced the efficacy of doxorubicin in inhibiting cell growth and inducing apoptosis of Raji cells ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion** Doxorubicin can induce cell autophagy when killing Raji cells, and inhibition of autophagy can enhance the killing effect of doxorubicin against Raji cells.

[Key words] doxorubicin; autophagy; apoptosis; lymphoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(6): 595-598]

[收稿日期] 2012-03-27 **[接受日期]** 2012-05-07

[基金项目] 科技部新药重大创制项目(2011ZX09102-001-27), 上海市重点科技攻关项目(11431920104), 上海市科技人才项目(09XD1421800). Supported by Major Project for Drug Discovery of Ministry of Science and Technology of China (2011ZX09102-001-27), Major Science and Technology Project of Shanghai (11431920104), and Shanghai Science and Technology Talent Project (09XD1421800).

[作者简介] 范佳君, 硕士生. E-mail: andri3317504@gmail.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-51980037, E-mail: dianwenju@gmail.com

恶性淋巴瘤的发病率近年来呈逐年上升的趋势,多柔比星作为治疗恶性淋巴瘤的主要药物之一被广泛应用。研究表明多柔比星主要通过嵌入DNA的相邻碱基之间,扰乱模板功能,阻止DNA依赖性的RNA多聚酶作用,干扰转录过程,从而诱导肿瘤细胞凋亡,并且其对淋巴瘤细胞杀伤效果明显^[1]。然而多柔比星具有较强的毒性,长期使用对心脏有不良反应,且该不良反应为剂量累积型^[2],这使多柔比星的临床应用受到了一定限制。如果能增加多柔比星对淋巴瘤细胞的疗效就能减少多柔比星的给药剂量,从而减少其副作用的发生。

细胞自噬(autophagy)是一种广泛存在于真核生物中的细胞程序性死亡机制,它可通过降解受损细胞器和大分子来维持细胞内稳态,并实现细胞内成分的循环利用。近年来不断有报道称细胞自噬在药物杀伤肿瘤细胞过程中起了重要的作用,它与药物对肿瘤的杀伤、肿瘤细胞的药物抵抗等密切相关^[3-6]。据报道,多柔比星能诱导骨髓瘤细胞和肝癌细胞发生自噬,且抑制细胞自噬能增强其诱导骨髓瘤细胞的凋亡^[7]。多柔比星能否诱导恶性淋巴瘤细胞发生自噬及细胞自噬在多柔比星杀伤淋巴瘤细胞过程中所起的作用尚未见报道。本研究主要通过研究细胞自噬在多柔比星诱导的Raji细胞发生细胞凋亡的过程中所起的作用,从而揭示多柔比星诱导的细胞自噬与其诱导的细胞凋亡之间的关系。

1 材料和方法

1.1 实验试剂和耗材 细胞裂解液RIPA试剂盒、蛋白定量BCA试剂盒、DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒均购自上海碧云天公司生物技术有限公司;PVDF膜(美国Millipore公司);LC3b抗体、 β -actin抗体(美国Cell Signaling Technology公司);自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA,德国Merck公司)Raji细胞(中国科学院生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所);MDC染色液(美国Sigma公司);多柔比星(浙江海正药业有限公司馈赠);Annexin V-PI细胞凋亡检测试剂盒(上海蔚宏生物科技有限公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、十二烷基硫酸钠(SDS)、 N,N' -二甲基甲酰胺(DMF),均为上海生物工程技术有限公司产品;细胞培养耗材、培养基、血清(赛默飞世尔科技公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与实验分组 Raji细胞生长至对数生长期后以 5×10^5 个/ml的密度转入细胞培养板内培养。实验分为对照组(Raji细胞)、多柔比星治疗组(Raji细胞+多柔比星)、抑制剂单独给药组

(3-MA/ NH_4Cl +Raji细胞)和多柔比星联合抑制剂干预组(3-MA/ NH_4Cl +Raji细胞+多柔比星)。多柔比星治疗组及联合干预组均分别给予0、2、4和8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的多柔比星。自噬抑制剂(2 mmol/L的3-MA或5 mmol/L的 NH_4Cl)在给多柔比星1 h前加入。连续培养24 h,以1 000 r/min离心收集细胞。

1.2.2 蛋白质印迹法检测细胞自噬相关蛋白LC3(LC3I/LC3II)的表达水平 将收集到的Raji细胞用PBS洗1次,用RIPA试剂盒裂解细胞,定量后按照每个泳道50 μg 进行蛋白电泳,后转膜至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭1 h,分别加入LC3b和 β -actin抗体,于4 $^\circ\text{C}$ 孵育12 h。用TBST洗膜后加入二抗,室温孵育1.5 h,用DAB显色液显色。蛋白质印迹检测结果用ImageQuantTL进行灰度统计分析。

1.2.3 MDC染色法观察细胞自噬水平 将收集到的Raji细胞用PBS洗2次。加入1 ml 0.5% MDC染色液,避光孵育10 min,于1 000 r/min离心,5 min后收集细胞,再用PBS洗2次,在激发波长为365 nm的荧光显微镜下观察。

1.2.4 MTT法检测抑制细胞自噬后的细胞存活 连续培养24 h后直接加入10 μl MTT反应液,37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育4 h后加入三联液(50% DMF、20% SDS的水溶液),37 $^\circ\text{C}$ 孵育6 h,于570 nm处测定各组的光密度(D)值,计算细胞存活率。

1.2.5 流式细胞法检测抑制细胞自噬后的细胞凋亡 将收集到的Raji细胞用PBS洗1次,后加入Annexin V-PI细胞凋亡检测试剂盒内提供的500 μl 结合液和5 μl Annexin V-FITC染色液,避光室温孵育15 min,随即进行流式细胞检测。

1.3 统计学处理 采用SPSS statistics 19分析数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 多柔比星诱导Raji细胞发生细胞自噬

2.1.1 自噬相关蛋白LC3(LC3 I/LC3 II)的表达水平 结果如图1所示,Raji细胞经过多柔比星处理24 h后,给予8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星的Raji细胞的LC3 II的表达水平高于对照组($P < 0.05$)。

2.1.2 MDC染色的Raji细胞的荧光显微镜观察 经多柔比星处理24 h后,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星治疗组Raji细胞的荧光强度强于对照组($P < 0.05$),图2证明经过多柔比星处理的Raji的自噬体和自噬溶酶体的数量多于对照组,提示8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星的Raji细胞的自噬发生水平高于对照组。

2.2 抑制自噬后自噬相关蛋白LC3(LC3 I/LC3

II) 的表达水平检测 结果如图 3 所示: 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星治疗组 Raji 细胞 LC3 II 的表达量高于对照组, 而 2 mmol/L 3-MA 和 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星联合干预后 Raji 细胞 LC3 II 的表达量低于 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星治疗组, 而经过 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星和 5 mmol/L NH_4Cl 联合干预后 LC3 II 的表达量高于 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星治疗组, 证明多柔比星所诱导的 Raji 细胞的细胞自噬能被 PI3K 通路抑制剂 3-MA 和自噬溶酶体抑制剂 NH_4Cl 抑制。

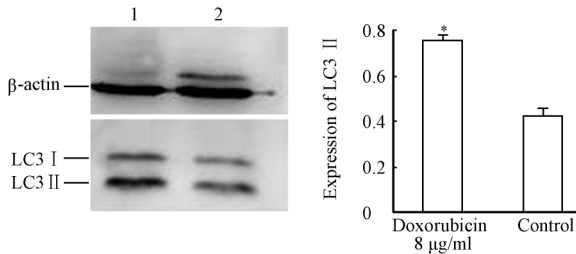


图 1 多柔比星杀伤 Raji 细胞时自噬相关蛋白 LC3(LC3 I /LC3 II) 的表达

Fig 1 Expression of LC3(LC3 I /LC3 II) in Raji cells treated with doxorubicin

1: Raji cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin; 2: Control. * $P < 0.05$ vs control group. $n=3, \bar{x} \pm s$

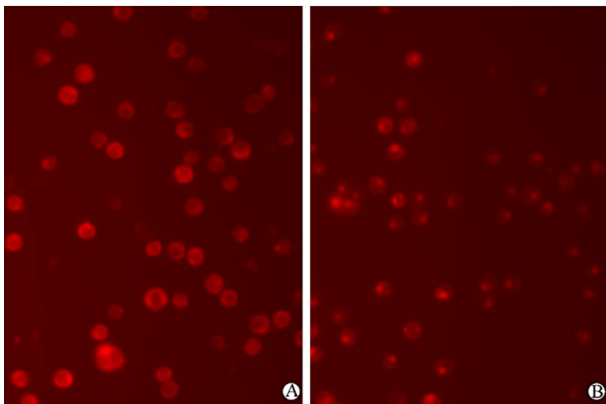


图 2 Raji 细胞的 MDC 染色

Fig 2 MDC staining of Raji cells

A: Raji cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin; B: Control. Original magnification: $\times 200$

2.3 抑制细胞自噬能增强多柔比星对 Raji 细胞的杀伤作用

2.3.1 抑制细胞自噬能增强多柔比星对 Raji 细胞的生长抑制 Raji 细胞经过各浓度多柔比星和自噬抑制剂处理 24 h 后, MTT 结果如图 4 所示: 与对照组相比, 所有经过 2、4、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星干预的 Raji 细胞的细胞活力都有下降 ($P < 0.01$), 证明多柔比星抑制了 Raji 细胞的细胞生长。并且加入自噬抑制剂 3-MA 或 NH_4Cl 后, Raji 细胞的细胞活力与相同

浓度的单纯多柔比星干预组相比有下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 证明抑制细胞自噬能显著增强多柔比星对 Raji 细胞的生长抑制作用。

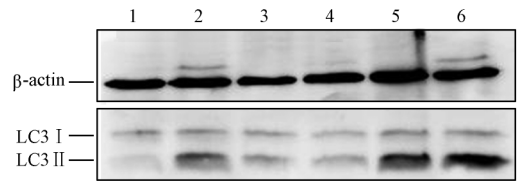


图 3 抑制自噬后自噬相关蛋白 LC3(LC3 I /LC3 II) 的表达水平

Fig 3 Expression of autophagy related protein LC3(LC3 I /LC3 II) after autophagy inhibition

1: Control; 2: Raji cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin; 3: Raji cells treated with 2 mmol/L 3-MA (3-Methyladenine); 4: Raji cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin and 2 mmol/L 3-MA; 5: Raji cells treated with 5 mmol/L NH_4Cl ; 6: Raji cells treated with 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxorubicin and 5 mmol/L NH_4Cl

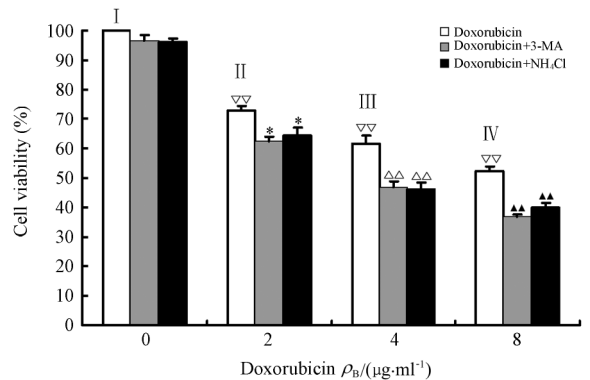


图 4 抑制自噬能增加多柔比星诱导的 Raji 细胞生长抑制 Fig 4 Autophagy inhibition enhanced doxorubicin-induced cell death in Raji cells

3-MA: 3-Methyladenine. * $P < 0.05$ vs group II; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group III; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs group IV; $\nabla\nabla P < 0.01$ vs group I

2.3.2 抑制细胞自噬能增强多柔比星诱导的 Raji 细胞凋亡 Raji 细胞经过多柔比星和抑制剂处理 24 h 经过流式细胞检测, 结果如图 5 所示, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星治疗组 Raji 细胞的凋亡率高于对照组 ($P < 0.05$), 而 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星+2 mmol/L 3-MA 或 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星+5 mmol/L NH_4Cl 联合干预组中 Raji 细胞的凋亡率高于 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 多柔比星干预治疗组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

细胞自噬是一种广泛存在于真核生物细胞中且能维持细胞内环境稳定的一种机制。近年来的研究发现, 细胞自噬既能通过诱导肿瘤细胞凋亡、坏死、衰老等机制发生或直接诱导细胞发生自噬性死亡从

而杀伤肿瘤细胞,也能通过抑制药物引起的细胞凋亡等来保护肿瘤细胞^[8-10]。不同的药物所引发自噬的作用不完全相同,并且同一种药物作用于不同的肿瘤细胞时所引发自噬的作用也不完全相同。

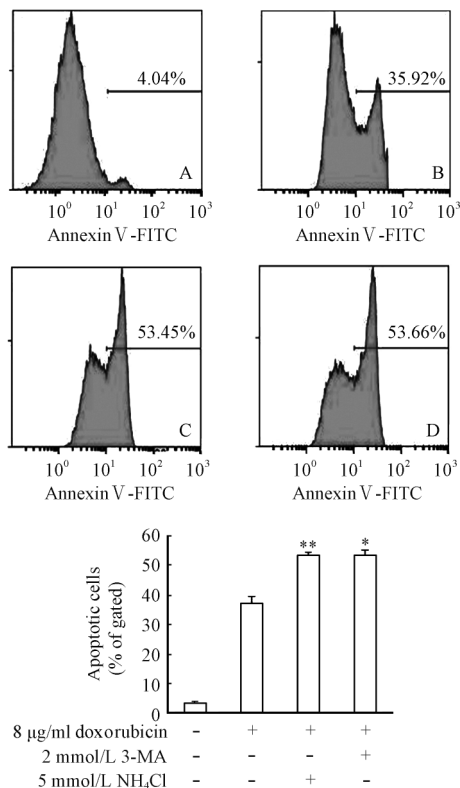


图 5 抑制细胞自噬增强了多柔比星诱导的细胞凋亡

Fig 5 Autophagy inhibition enhanced doxorubicin-induced apoptosis in Raji cells

A: Control; B: Raji cells treated with 8 μg/ml doxorubicin; C: Raji cells treated with 8 μg/ml doxorubicin and 5 mmol/L NH₄Cl; D: Raji cells treated with 8 μg/ml doxorubicin and 2 mmol/L 3-MA (3-Methyladenine). * P < 0.05, ** P < 0.01 vs 8 μg/ml doxorubicin treated group

本研究分别运用了蛋白质印迹法检测自噬相关蛋白 LC3(LC3 I /LC3 II)的表达水平及 MDC 染色法观察细胞自噬水平,证明了多柔比星能显著诱导 Raji 细胞发生细胞自噬。并在此基础上使用两种不同通路的自噬阻断剂,即 PI3K 通路的阻断剂 3-MA 和溶酶体抑制剂 NH₄Cl 抑制细胞自噬后发现抑制细胞自噬能显著增强多柔比星对 Raji 细胞的生长抑制,并能显著增强多柔比星诱导的细胞凋亡。证明了多柔比星诱导的细胞自噬会削弱多柔比星诱导的淋巴瘤细胞凋亡,同时也进一步揭示了抑制细胞自噬可能增强多柔比星在治疗淋巴瘤时的疗效。Pan 等^[11]在研究中发现:多柔比星可以诱导骨髓瘤细胞 H929 和 RPMI 8226 发生 caspase 依赖的细胞凋亡和细胞自噬,并且用自噬抑制剂 3-MA 和氯喹

抑制自噬后增强了多柔比星对 H929 和 RPMI 8226 细胞的杀伤作用。提示抑制细胞自噬可能增强多柔比星在治疗骨髓瘤的疗效,与本研究的结论相似。然而 Qian 等^[12]则发现细胞自噬在多柔比星杀伤肝癌细胞 HepG2 过程中诱导了细胞凋亡,这与本研究的结论相反。下一步工作将在本研究的基础上进行细胞实验及动物实验,以期获得更多的数据证实细胞自噬在多柔比星杀伤淋巴瘤细胞中所起的作用,并在将来在应用上使用多柔比星和自噬抑制类药物联合用药提供新的思路和实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Vitolo U, Chiappella A, Ferreri A J, Martelli M, Baldi I, Balzarotti M, et al. First-line treatment for primary testicular diffuse large B-cell lymphoma with rituximab-CHOP, CNS prophylaxis, and contralateral testis irradiation: final results of an international phase II trial [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29: 2766-2772.
- [2] Velez J M, Miriyala S, Nithipongvanitch R, Noel T, Plabplueng C D, Oberley T, et al. p53 Regulates oxidative stress-mediated retrograde signaling: a novel mechanism for chemotherapy-induced cardiac injury [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e18005.
- [3] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144: 646-674.
- [4] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132: 27-42.
- [5] Rabinowitz J D, White E. Autophagy and metabolism [J]. *Science*, 2010, 330: 1344-1348.
- [6] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2891-2906.
- [7] Manov I, Pollak Y, Broneshter R, Iancu T C. Inhibition of doxorubicin-induced autophagy in hepatocellular carcinoma Hep3B cells by sorafenib—the role of extracellular signal-regulated kinase counteraction [J]. *FEBS J*, 2011, 278: 3494-3507.
- [8] Guo G F, Jiang W Q, Zhang B, Cai Y C, Xu R H, Chen X X, et al. Autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 predict cetuximab efficacy in advanced colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17: 4779-4786.
- [9] Hou Y J, Dong L W, Tan Y X, Yang G Z, Pan Y F, Li Z, et al. Inhibition of active autophagy induces apoptosis and increases chemosensitivity in cholangiocarcinoma [J]. *Lab Invest*, 2011, 91: 1146-1157.
- [10] Harashima N, Inao T, Imamura R, Okano S, Suda T, Harada M. Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, 61: 667-676.
- [11] Pan Y, Gao Y, Chen L, Gao G, Dong H, Yang Y, et al. Targeting autophagy augments *in vitro* and *in vivo* antimyeloma activity of DNA-damaging chemotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 3248-3258.
- [12] Qian H, Yang Y. Alterations of cellular organelles in human liver-derived hepatoma G2 cells induced by adriamycin [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2009, 20: 779-786.

[本文编辑] 魏学丽, 孙岩