

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01191

· 论 著 ·

## *H-RasV<sub>12</sub>*诱导的人成纤维细胞早期衰老中自噬的调节

王玲<sup>1△</sup>, 赵丹<sup>3△</sup>, 余乐<sup>1</sup>, 李亦蕾<sup>2\*</sup>

1. 南方医科大学药学院, 广州 510515

2. 南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515

3. 解放军第85医院药剂科, 上海 200052

**[摘要]** **目的** 研究癌基因 *H-RasV<sub>12</sub>* 过度表达或激活与自噬活性的关系, 在人成纤维细胞中观察 *Ras* 过度表达对自噬活性的影响。 **方法** 在 BJ 人成纤维细胞中转染原癌基因 *H-RasV<sub>12</sub>* 或其空载体, 通过形态学、细胞生长曲线、 $\beta$ -半乳糖苷染色、衰老和自噬相关蛋白表达、流式细胞分析、siRNA (small interfering RNA, siRNA) 抑制自噬关键基因 5 (*ATG5*), 来分析 *Ras* 过度表达的细胞效应。 **结果** 与对照细胞相比, *H-RasV<sub>12</sub>* 过度表达的 BJ 细胞出现明显的早期衰老, 其自噬活性受到抑制, 表现为蛋白 p62 和微管相关蛋白 1 轻链 3 II (Light chain 3 II, LC3 II) 的显著蓄积, 在研究时间区间内这种抑制作用保持稳定, 同时细胞凋亡率增加; 利用 siRNA 抑制 *ATG5* 表达, 抑制自噬可进一步加重衰老。 **结论** 人成纤维细胞稳定表达癌基因 *H-RasV<sub>12</sub>* 后, 可出现自噬活性受到抑制的现象, 且自噬抑制处于自噬过程的后期。这一现象可能与 *Ras* 相关性癌症的癌变机制有关。

**[关键词]** 自噬; *H-RasV<sub>12</sub>*; 过早衰老; 成纤维细胞**[中图分类号]** R339.38 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)11-1191-06

### Autophagy activity is inhibited in human fibroblast cells stably overexpressing *H-RasV<sub>12</sub>*

WANG Ling<sup>1△</sup>, ZHAO Dan<sup>3△</sup>, YU Le<sup>1</sup>, LI Yi-lei<sup>2\*</sup>

1. School of Pharmaceutical Science, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

2. Department of Pharmacology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

3. Department of Pharmacology, No. 85 Hospital of PLA, Shanghai 200052, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the relationship between oncogenic *H-RasV<sub>12</sub>* overexpression/activation and the autophagic activity by observing the effect of *Ras* overexpression on autophagic activity in human fibroblast cells. **Methods** Human BJ fibroblast cells were transfected with *H-RasV<sub>12</sub>* or control vector, and then the cellular responses to *H-RasV<sub>12</sub>* overexpression were analyzed by observing the morphology, cell growth curve, senescence-associated  $\beta$ -Gal staining, Western blotting analysis, flow cytometry, and suppression of autophagy-related protein 5 (*ATG5*) by siRNA. **Results** Compared with control group, BJ cells overexpressing *H-RasV<sub>12</sub>* developed prominent premature senescence and inhibited autophagic activity, as manifested by significant accumulation of p62 and light chain 3 II (LC3 II). The autophagy inhibition by *H-RasV<sub>12</sub>* remained stable during the study period; the apoptosis rate was increased in *H-RasV<sub>12</sub>* overexpressing BJ cells compared with that in the control cells. Suppression of *ATG5* by siRNA led to more severe senescence in *Ras*-overexpressing BJ cells. **Conclusion** Our results suggest that the autophagy activity is inhibited in human fibroblast cells stably overexpressing oncogenic *H-RasV<sub>12</sub>*, and the inhibition is in the later stage of autophagy, which may be related to *H-RasV<sub>12</sub>*-related tumorigenesis.

**[Key words]** autophagy; *H-RasV<sub>12</sub>*; premature aging; fibroblasts

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(11):1191-1196]

*H-RasV<sub>12</sub>* 癌基因的构成性激活, 无论是由于点突变或是过度表达, 与很多人类癌症相关。单纯激活 *H-RasV<sub>12</sub>* 癌基因在原代培养的正常细胞并不会造成癌变, 而是导致生长停滞, 也就是早期衰老或癌

**[收稿日期]** 2014-06-04 **[接受日期]** 2014-10-19**[基金项目]** 国家自然科学基金(81102475); 南方医科大学南方医院高层次课题匹配基金(81102475)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81102475) and the Matching Fund for High-level Foundation of Nanfang Hospital, Southern Medical University (81102475).**[作者简介]** 王玲, 硕士。E-mail: zouzailubian@126.com; 赵丹, 主管药师。E-mail: zdandzjw@sina.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 020-62787215, E-mail: lei@fimmu.com

基因相关性衰老 (oncogene-induced senescence, OIS)<sup>[1]</sup>。除了 OIS, 尚有其他防御机制来对抗癌变。自噬是一种维持细胞内环境稳定的重要过程, 其特征是通过形成自噬体包裹内吞细胞质蛋白和细胞器并加以降解。目前已发现当癌基因 *H-RasV12* 过度表达或激活后, 自噬活性在癌细胞及非癌细胞均上调, 并产生抑癌作用<sup>[2-3]</sup>。当自噬关键基因缺失导致自噬缺陷时, 能够促进细胞存活和发生癌变<sup>[4]</sup>。如果细胞损伤严重至无法修复, *H-RasV12* 可诱导凋亡和自噬性细胞死亡<sup>[5-6]</sup>。显然, 这些保护机制的存在都是为了确保损伤细胞被修复或处于生长增殖停滞状态, 抑或走向死亡。然而, 癌症前体细胞是如何克服这些保护机制发生癌变的, 目前尚不明确。本实验的目的是研究在人类细胞, *H-RasV12* 过度表达对自噬活性的影响, 以期探讨自噬调控在癌症形成机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及仪器

细胞培养基 DMEM、MEM (美国 Cellgro's 公司)、0.25% 胰蛋白酶; 胎牛血清 (美国 Gmini 公司)、*H-RasV12* 和其病毒载体 WH (美国圣地亚哥 Scripps 研究所的惠赠)、相关抗体 pRb、p53、Phospho-p53 (Ser15)、p16<sup>INK4A</sup>、p21、自噬关键基因 5(ATG5)、 $\beta$ -actin (美国 Cell Signal 公司)、p53、*H-Ras* (C-20, 美国 Santa Cruz 公司)、Alph 的化学荧光成像系 FluorChem-8900。感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  (TaKaRa 公司)。

### 1.2 细胞系

病毒传代细胞系 LinX-A 来自美国圣地亚哥 Scripps 研究所的惠赠, 高糖 DMEM 培养基中含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和链霉素和 2 mmol/L L-谷氨酰胺培养。在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 孵箱中培养。BJ 人成纤维细胞来自美国 ATCC 公司 (CRL-2522), 在含有 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素和链霉素、1% 非必需氨基酸、2 mmol/L L-谷氨酰胺的 MEM 培养基中, 在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 孵箱中培养。

### 1.3 反转录病毒磷酸钙法转染及稳定筛选

LinX-A 细胞生长在 10 cm<sup>2</sup> 细胞培养盘中, 当其约 70%~80% 融合时, 更换新鲜培养基 10 mL。15  $\mu$ g 反转录病毒质粒、15  $\mu$ g 的 sss DNA、2.5 mol/L 的 CaCl<sub>2</sub>、水以及 2 $\times$  BBS, 混匀, 加入到 2 h 前替换的新细胞培养基中。48 h 后收集已经含有反转录病毒的上清液, 用 0.45  $\mu$ m 的微孔过滤器过滤, 将含有反转录病毒的上

清液与 20% 的新鲜 MEM 细胞培养基、polybrene (终浓度是 8  $\mu$ g/mL) 混合后, 加到 BJ 细胞上, 以高速离心 45 min 后细胞移至 5% CO<sub>2</sub>、32℃ 培养箱中过夜。24 h 后更换新鲜的培养基, 37℃ 再培养 1 d。细胞用质粒相应的药物筛选 1  $\mu$ g/mL 的 Puromycin 或 50  $\mu$ g/mL 的 Hygromycin B。收集经过反转录病毒转染后, 经药物筛选存活的细胞, 备用。

### 1.4 Western 印迹检测

将 BJ 细胞或转染了的细胞裂解于免疫沉淀裂解缓冲液中 (缓冲液中含有 pH 值 7.5 的 Tris-HCl 50 mmol/L, 150 mmol/L 氯化钠, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 0.5% 胆酸钠酸, 2 mmol/L EDTA、10% 甘油含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂)。在冰上超声 30 s 后 4℃ 离心 12 000 $\times$ g, 15 min, 收集细胞沉淀, 蛋白浓度用 Bradford 法分析测定。统一蛋白浓度 20~80  $\mu$ g, 上样于 12% 或 15% SDS-PAGE 膜上, 再转到尼龙纤维膜上, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 加入一抗 [p62, LC3, p16<sup>INK4A</sup>, p21, p53, Phospho-p53 (Ser15), Ha-Ras (C-20), p-Rb, ATG5,  $\beta$ -actin] 于 4℃ 孵育 2 h。在室温加入相应的辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育 1 h。洗膜后加显色液, 采用 Kodak 膜曝光。相同实验重复 3 次。

### 1.5 细胞生长曲线

细胞转染适当的反转录病毒并用适当的药物筛选 4 d, 筛选掉没有被感染的细胞之后分析早期衰老的行为。将转染后的第 6 天定义为细胞生长曲线的第 0 天。把 10<sup>4</sup>/孔细胞种在 12 孔细胞培养板上, 平行种 2~3 孔。每 3~4 d 计数 1 次后, 仍以 10<sup>4</sup>/孔细胞种回到新的细胞培养板中。细胞倍增数 (PD) 的计算公式: PD = log(N<sub>2</sub>/N<sub>1</sub>) / log2。N<sub>1</sub> 是种植的细胞数, N<sub>2</sub> 是长到第 3~4 天的细胞数。相同实验重复 3 次。

### 1.6 $\beta$ -半乳糖苷 ( $\beta$ -Gal) 染色

对 6 孔板中培养的细胞, 去除细胞培养液, 用 PBS 洗涤 1 次, 加入 1 mL  $\beta$ -Gal 染色固定液 (0.5% 戊二醛在 PBS 中), 室温固定 15 min。然后去除固定液, 用含 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 PBS 洗涤 3 次, 除去 PBS, 每孔加入 1 mL  $\beta$ -Gal 染色工作液。37℃ 孵育 2~4 h, 最多 12~16 h。在普通光学显微镜下观察, 计数, 并计算被染上蓝色的细胞数目的百分比。

### 1.7 细胞凋亡检测

消化离心收集细胞, 经 PBS 洗过 2 遍。细胞沉淀加入 Banding buffer 重悬细胞后, 加入 FITC-Annexin V 和 5  $\mu$ L PI, 室温避光 15 min,

流式细胞仪检测 BD FACS Canto II 细胞凋亡, 分析软件 Flowjo7.6.2。相同实验重复 3 次。

**1.8 ATG5 siRNA 设计与载体构建** 根据 Genbank 数据库中人 ATG5 基因(NM\_001286106.1)的 mRNA 序列, 使用 I Score Designer 在线设计工具, 本着 siRNA 设计原则选取 GC 含量在 40%~60% 的 siRNA 靶位点, 针对 ATG5 基因编码区设计特异性序列两对, 由 Qiagen 公司合成。ATG5 siRNA-1 目标基因序列: 5'-TCC AAC TTG TTT CAC GCT ATA-3', 正义链 5'-CAA CUU GUU UCA CGC UAU ATT-3', 反义链 5'-UAU AGC GUG AAA CAA GUU GGA-3'。ATG5 siRNA-2 目标基因序列: 5'-AAC CTT TGG CCT AAG AAG AAA-3', 正义链 5'-CCU UUG GCC UAA GAA GAA ATT-3', 反义链 5'-UUU CUU CUU AGG CCA AAG GTT-3'。阴性对照序列购自 Qiagen 公司, 经 Blast 比对与人类其他基因编码序列无同源性。

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计学软件, 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间差异比较采用单因素方差(ANOVA)检验, 检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

**2.1 *H-RasV12* 诱发早期衰老** 在 *H-RasV12* 转染后第 7 天裂解细胞提取蛋白行 Western 印迹分析可见, BJ 细胞表达高水平的 *H-RasV12* (图 1)。形态学观察和生长曲线显示, 细胞处于生长停滞状态, 细胞变大而扁平, 而两组对照细胞生长情况和形态正常,  $\beta$ -Gal 阳性率在 *H-RasV12* 过度表达细胞显著高于两组对照细胞(图 2、图 3)。Western 印迹结果进一步证实 *H-RasV12* 过度表达诱发细胞衰老, 表现为与两组对照细胞相比, *H-RasV12* 过度表达细胞的衰老相关蛋白 p16<sup>INK4A</sup>、Phospho-p53 (Ser15) 升高和 p-Rb 降低(图 1)。两组对照细胞之间细胞衰老相关蛋白的表达水平基本相同。

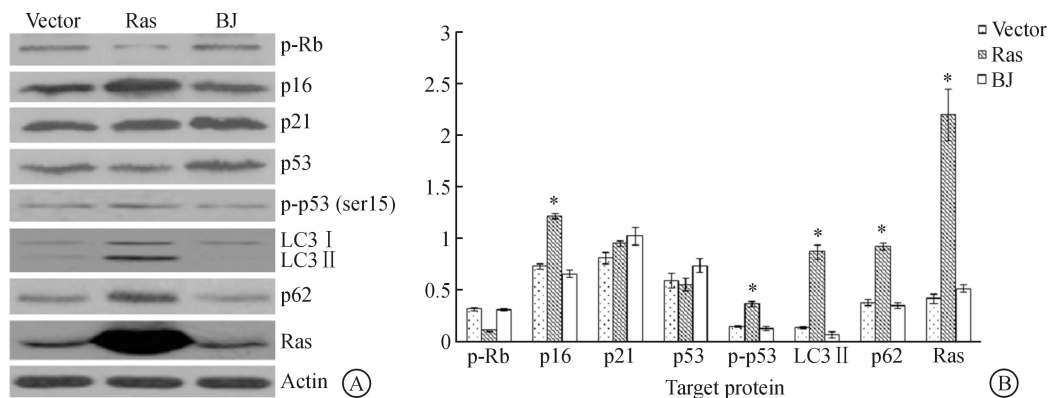


图 1 细胞衰老和自噬相关蛋白的表达水平

Fig 1 Expression of senescence- and autophagy-associated proteins

A: Western blotting analysis; B: Relative expression of target proteins. Ras: *H-RasV12*, LC: Light chain, \*  $P < 0.05$  vs two control groups;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

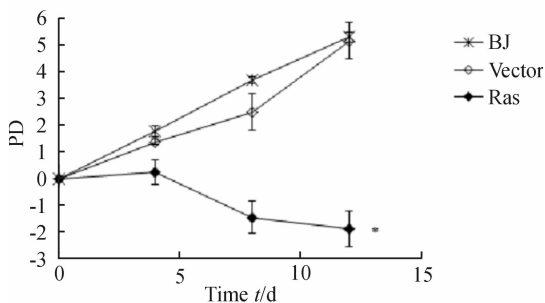


图 2 BJ 细胞、转染空载体或 *H-RasV12* 的 BJ 细胞生长曲线

Fig 2 Growth curve of BJ cells and BJ cells transfected with vector or *H-RasV12*

\*  $P < 0.05$  vs the two control groups. Ras: *H-RasV12*;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

**2.2 *H-RasV12* 抑制自噬活性** 空白 BJ 细胞、转染空载体或 *H-RasV12* 的 BJ 细胞在转染后第 7~10 天裂解细胞提取蛋白, Western 印迹结果显示, 两组对照细胞 p62 和 LC3 II 的蛋白水平保持较低水平, 且水平基本相同(图 1), 经用氯喹(CQ)处理后二者均可升高(图 4、表 1), 说明对照细胞基础自噬活性较低。而 *H-RasV12* 过度表达细胞, p62 和 LC3 II 的明显高于两组对照细胞(图 1、图 4、表 1), 经用氯喹处理后二者水平进一步显著升高(图 4), 说明在 *H-RasV12* 过度表达细胞, 自噬活性处于被抑制状态。

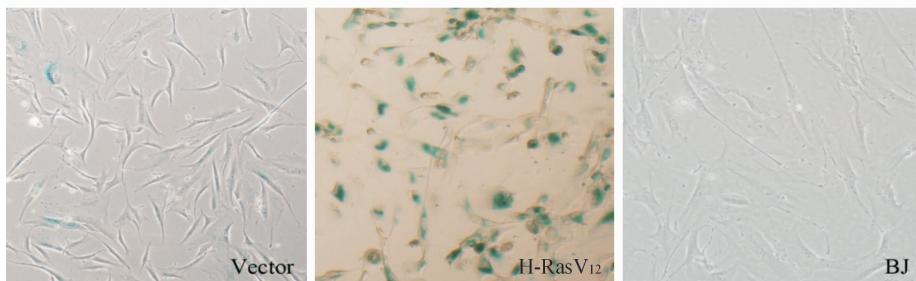


图 3 细胞衰老的  $\beta$ -半乳糖苷酶染色比较

Fig 3 Comparison of senescence-associated  $\beta$ -Gal actoside staining in different groups

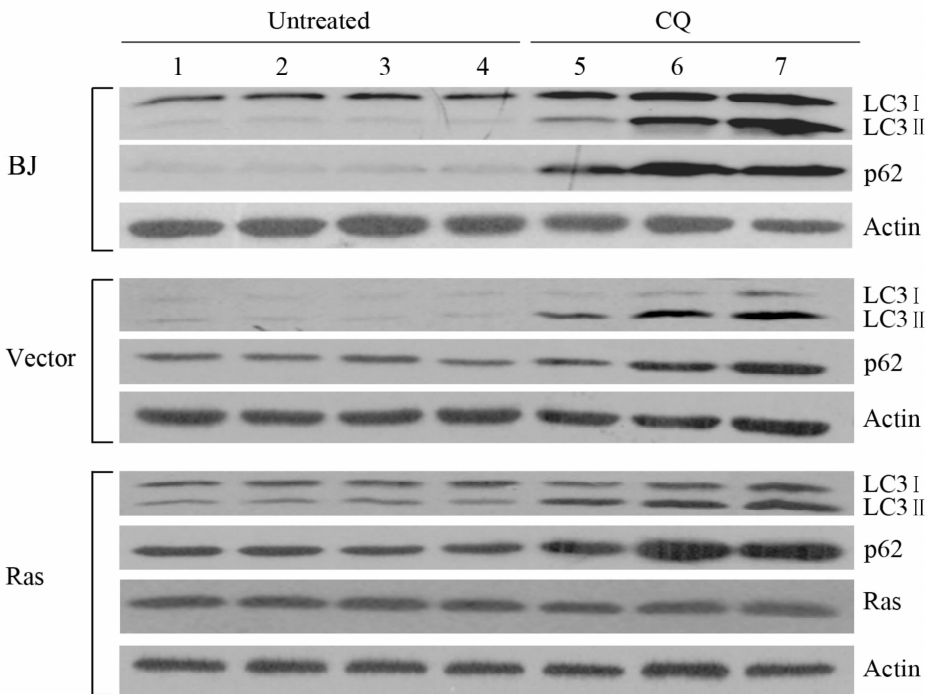


图 4 自噬相关蛋白动态表达水平的 Western 印迹结果

Fig 4 Western blotting analysis of autophagy-associated proteins

1: D7 post-infection; 2: D8; 3: D9; 4: D10; 5: D7+CQ 24 h; 6: D7+CQ 48 h; 7: D7+CQ 72 h. Ras: *H-RasV12*; LC: Light chain

表 1 Western 印迹检测自噬相关蛋白动态表达水平的相对表达量(目的蛋白/内参)

Tab 1 Changes of relative expression of autophagy-associated proteins by Western blotting analysis

$n=3, \bar{x} \pm s$

Day	BJ		Vector		Ras		
	LC3 II	p62	LC3 II	p62	LC3 II	p62	Ras
1	0.018±0.006	0.015±0.003	0.069±0.055	0.231±0.024	0.046±0.011	0.348±0.022	0.416±0.017
2	0.017±0.002	0.019±0.005	0.064±0.046	0.233±0.029	0.041±0.006	0.336±0.012	0.423±0.020
3	0.015±0.005	0.016±0.002	0.075±0.006	0.243±0.187	0.049±0.007	0.330±0.023	0.046±0.012
4	0.016±0.002	0.013±0.004	0.070±0.061	0.213±0.376	0.041±0.009	0.349±0.100	0.408±0.029
5	0.219±0.022**	0.441±0.011**	0.131±0.015	0.262±0.041	0.273±0.018**	0.544±0.039**	0.418±0.017**
6	0.499±0.057 $\Delta\Delta$	0.685±0.033 $\Delta\Delta$	0.358±0.033 $\Delta\Delta$	0.399±0.025 $\Delta\Delta$	0.336±0.021 $\Delta\Delta$	0.897±0.078 $\Delta\Delta$	0.405±0.014 $\Delta\Delta$
7	0.791±0.033 $\Delta\Delta\Delta$	0.662±0.029 $\Delta\Delta\Delta$	0.360±0.126 $\Delta\Delta\Delta$	0.704±0.194 $\Delta\Delta\Delta$	0.437±0.029 $\Delta\Delta\Delta$	0.861±0.049 $\Delta\Delta\Delta$	0.399±0.023 $\Delta\Delta\Delta$

1: D7 post-infection; 2: D8; 3: D9; 4: D10; 5: D7+CQ 24 h; 6: D7+CQ 48 h; 7: D7+CQ 72 h, Ras: *H-RasV12*, LC: Light chain. \*\*  $P < 0.01$  vs 1 and 2;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 1 and 3;  $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$  vs 1 and 4



2.3 *H-RasV12* 对凋亡的影响 在生长曲线研究中, *H-RasV12* 过度表达细胞不仅出现生长停滞, 还表现为曲线逐渐降低至 0 以下, 说明存在细胞死亡, 因此我们通过流式细胞分析研究了 *Ras* 过度表达对于细胞凋亡的影响。结果表明, 与两组对照细胞相比, *H-RasV12* 过度表达能够轻度增加细胞的凋亡率 ( $P < 0.01$ , 图 5), 因此细胞生长曲线中细胞数量的减少与凋亡率增加有关。

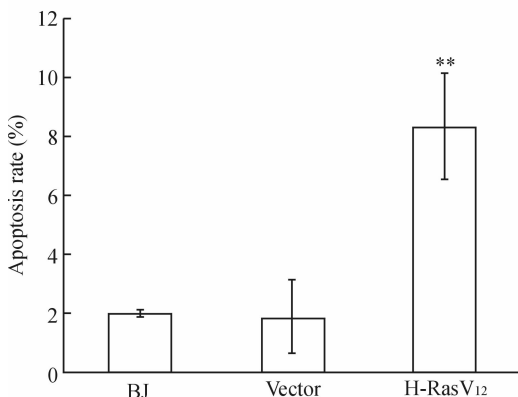


图 5 *H-RasV12* 过度表达时细胞凋亡率的流式细胞分析

Fig 5 Apoptosis rates in each group as analyzed by flow cytometry

\*\*  $P < 0.01$  vs the two control groups;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.4 利用敲低 ATG5 蛋白表达对 *H-RasV12* 过度表达 BJ 细胞的影响 在用两种针对自噬关键基因 ATG5 的 siRNA 处理 48 h 后, 在 *H-RasV12* 和转染

空载体的 BJ 细胞均达到了较好的 ATG5 敲低效果。Western 印迹分析可见(图 6、表 2), 在转染空载体或 *Ras* 的 BJ 细胞, siRNA 处理后的细胞自噬标记物 p62 出现蓄积或蓄积进一步加重。细胞衰老相关蛋白 p16<sup>INK4A</sup> 和 Phospho-p53 (Ser15) 蛋白水平在 BJ 细胞 siRNA 处理者较未处理者明显升高 ( $P < 0.05$ ), 而在转染空载体细胞变化不明显。这些结果说明, 利用 siRNA 敲低 ATG5 抑制自噬可促使转染 *Ras* 的 BJ 细胞发生更加严重的细胞衰老。

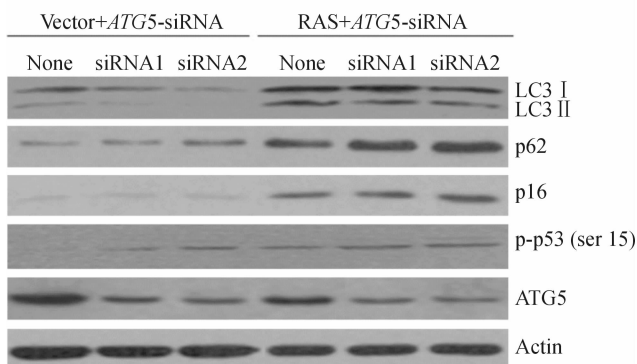


图 6 转染 *H-RasV12* 或空载体的 BJ 细胞以 siRNA 敲低自噬基因 ATG5 后的细胞衰老和自噬相关蛋白的 Western 印迹分析  
Fig 6 Western blotting analysis of senescence- and autophagy-associated proteins in BJ cells transfected by *H-RasV12* or empty vector after knockdown of ATG5 by siRNA

Ras: *H-RasV12*; LC: Light chain; siRNA: Small interfering RNA; ATG5: Autophagy-related protein 5

表 2 转染 *H-RasV12* 和空载体的 BJ 细胞在敲低自噬基因 ATG5 前后的细胞衰老和自噬相关蛋白的相对表达量

Tab 2 Relative expression of senescence- and autophagy-associated proteins in *H-RasV12* and vector transfected BJ cells before and after knockdown of ATG5 by siRNA

$n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

Target protein	Vector			Ras		
	Control	siRNA1	siRNA2	Control	siRNA1	siRNA2
LC3 II	0.024 ± 0.005	0.012 ± 0.003	0.009 ± 0.002	0.325 ± 0.023	0.137 ± 0.009 <sup>△△</sup>	0.126 ± 0.012 <sup>△△</sup>
p62	0.144 ± 0.007	0.149 ± 0.009	0.262 ± 0.011*	0.568 ± 0.043	0.867 ± 0.072 <sup>△△</sup>	1.093 ± 0.058 <sup>△△</sup>
p16	0.037 ± 0.006	0.050 ± 0.006	0.035 ± 0.004	0.403 ± 0.007	0.563 ± 0.021 <sup>△△</sup>	0.622 ± 0.025 <sup>△△</sup>
p-p53	0.008 ± 0.002	0.019 ± 0.004	0.040 ± 0.003	0.039 ± 0.007	0.126 ± 0.014 <sup>△△</sup>	0.168 ± 0.016 <sup>△△</sup>
ATG5	0.749 ± 0.049	0.329 ± 0.035**	0.343 ± 0.037**	0.591 ± 0.033	0.364 ± 0.047 <sup>△△</sup>	0.330 ± 0.023 <sup>△△</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Vector control; <sup>△△</sup>  $P < 0.01$  vs Ras control. Ras: *H-RasV12*; siRNA: Small interfering RNA

### 3 讨论

研究表明自噬在肿瘤整个发生、发展过程中的作用是不同的<sup>[7-8]</sup>。在癌症的后期, 由于需要适应肿瘤快速生长和血供相对不足造成的缺血、缺氧, 癌细胞的自噬活性明显上调来满足代谢需求<sup>[9]</sup>。然而在早期, 自噬在癌症发生过程的作用更为复杂<sup>[2,5]</sup>。多

数学者认为在正常细胞, 癌基因 *H-RasV12* 转染会诱导自噬活性的增高, 并且这是细胞存活和发生细胞癌变所必需的<sup>[2,10]</sup>。Young 等<sup>[2]</sup>利用 *H-RasV12* 诱导性表达的细胞模型, 研究了 OIS 情况下自噬活性的动态变化情况。结果表明, 在转染并表达 *H-RasV12* 的 IMR90 人成纤维细胞, 转染后早期可进一步分为 3 个时期: 分裂期、过渡期和衰老期。自噬的活性在

分裂期即开始升高,在过渡期达到峰值。在本研究中,我们主要观察的是细胞转染 *Ras* 后经过药物筛选后的时期,也就是稳定表达 *H-RasV<sub>12</sub>* 的衰老期。理论上,此时间段的细胞已经度过了转基因后早期应激反应导致的自噬活性上调。但我们发现在 *H-RasV<sub>12</sub>* 转染后的 6~12 d, BJ 人成纤维细胞自噬活性是受到抑制的,表现为 p62 蛋白水平的显著升高。由于 p62 是“载货蛋白”并在自噬过程中被降解,所以是评估自噬活性调控良好的标记物<sup>[11]</sup>。此抑制结果在人类非癌细胞的研究中目前尚未见报道<sup>[12-14]</sup>。

既往对信号通路的研究表明, *H-RasV<sub>12</sub>* 是通过 PI3K/AKT/mTOR 通路来负性调控自噬的<sup>[14]</sup>。然而,本研究中自噬活性的抑制表现为 LC3 II 和 p62 蛋白均蓄积。LC3 II 水平的变化情况取决于自噬过程被抑制是在早期还是在后期。自噬早期抑制或阻断可抑制 LC3 II 的形成,而自噬后期抑制或阻断可导致 LC3 II 的蓄积。这就提示, *H-RasV<sub>12</sub>* 过度表达对自噬活性的抑制作用,发生于自噬过程的后期,也就是自噬体形成以后。因此, *H-RasV<sub>12</sub>* 过度表达抑制自噬可能还可通过 PI3K 通路之外的其他机制进行调控。

我们认为 *H-RasV<sub>12</sub>* 过度表达对自噬的抑制在 *H-RasV<sub>12</sub>* 相关的肿瘤的发生方面可能具有重要的意义。目前的研究表明,自噬后期的抑制和阻断可将本是保护机制的自噬变为破坏性强的负面机制。因为自噬环路后段的干扰会严重破坏细胞的质量控制,从而导致功能障碍的内质网释放具有细胞毒性的氧自由基,这些可导致基因完整性的改变<sup>[15]</sup>。虽然 *H-RasV<sub>12</sub>* 过度表达的细胞绝大多数会进入 OIS 状态,甚至发生细胞死亡,但是少部分细胞可能通过瓶颈效应,即通过发生有利于癌变的基因突变,来克服各种保护机制发生癌变<sup>[7]</sup>。然而,本研究尚并不能回答 *H-RasV<sub>12</sub>* 过度表达抑制自噬与 *Ras* 诱导的癌变之间是否有直接的关系。并且,这种抑制作用是否具有广泛的代表性也需要进一步研究。

#### 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] 蔡世忠,王亚平. 细胞衰老与细胞自噬的生物学关联及其意义[J]. 生命科学, 2011, 23: 335-341.
- [2] Young A R, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot J F, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition[J]. *Genes Dev*, 2009, 23: 798-803.
- [3] 郑志超,李西川,杜 玮,刘 喆. 在人类非小细胞肺癌细胞 A549 中沉默 K-Ras 降低自噬水平[J]. 天津医科大学学报, 2013, 19: 264-266.
- [4] 董郁红,刘立鑫,赵小玲,韩晓静,董久玲,刘宏侠. 自噬基因 Beclin 1 在甲状腺乳头状癌中的表达及意义[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2013, 20: 217-219.
- [5] 唐中园,张 宁,狄 文,李卫平. 自噬在癌症中的双重作用[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2013, 33: 1405-1410.
- [6] 梁蓓蓓,郭亚军,赵 健. 营养缺乏状况下干扰 ASPP2 通过调节自噬促进肝癌细胞增殖[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34: 266-270.  
Liang B B, Guo Y J, Zhao J. ASPP2 gene silence promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation via regulating autophagy under starvation[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2013, 34: 266-270.
- [7] Marino G, Martins I, Kroemer G. Autophagy in Ras-induced malignant transformation: fatal or vital [J]. *Mol Cell*, 2011, 42: 1-3.
- [8] 郑海燕,王兴芬,孙保存,张晓阳,许丽萍. 大肠癌发生发展中自噬基因 Beclin1 的表达及其与增殖和凋亡相关基因的关系探讨[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38: 617-625.
- [9] 赵建祥,贺 华,马建芳,孙青芳,沈建康,卞留贵. 饥饿诱导胶质瘤细胞自噬发生及 Beclin-1 表达的变化[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 933-936.  
Zhao J X, He H, Ma J F, Sun Q F, Shen J K, Bian L G. Starvation-induced autophagy in glioma and changes in Beclin-1 expression [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31: 933-936
- [10] Lock R, Roy S, Kenific C M, Su J S, Salas E, Ronen S M, et al. Autophagy facilitates glycolysis during ras-mediated oncogenic transformation [J]. *Nat Rev Mol Biol Cell*, 2011, 22: 165-178.
- [11] Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171: 603-614.
- [12] Wang Y, Wang X D, Lapi E, Sullivan A, Jia W, He Y, et al. Autophagic activity dictates the cellular response to oncogenic RAS [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 109: 13325-13330.
- [13] Schmukler E, Grinboim E, Schokoroy S, Amir A, Wolfson E, Kloog Y, et al. Ras inhibition enhances autophagy, which partially protects cell from death [J]. *Oncotarget*, 2013, 4: 142-152.
- [14] Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 3898-3904.
- [15] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12: 401-410.