

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00238

· 论 著 ·

肝癌组织中多种自体吞噬的形态测量学分析

王昊,周东勋,周华邦,汪慧,涂芊茜,胡和平*

第二军医大学东方肝胆外科医院肝脏内科,上海 200438

[摘要] **目的** 调查不同类型自体吞噬在肝癌及癌旁组织中的分布情况。**方法** 通过电子显微镜观察 15 对肝癌组织标本的超微结构,并使用相关软件量化图像指标以分析不同类型自体吞噬分布与细胞超微结构特征之间的联系。**结果** 数据提示肝癌细胞中主要分布巨型自噬,分布与肿瘤细胞的活动及代谢情况相关;而癌旁细胞主要分布微型自噬,且分布与细胞的炎症损伤程度相关。**结论** 巨型自体吞噬和微型自体吞噬在肝细胞癌组织及癌旁组织中呈现不对称分布,该现象可能与肝癌的发生相关。

[关键词] 自噬;亚细胞部分;肝细胞癌

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0238-05

Morphometric analysis of various types of autophagy in hepatocellular carcinoma tissues

WANG Hao, ZHOU Dong-xun, ZHOU Hua-bang, WANG Hui, TU Qian-qian, HU He-ping*

Department of Internal Medicine of Liver, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution of various types of autophagy in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and the adjacent non-tumor tissues. **Methods** We observed the ultrastructure of 15 HCC tissues and the matched adjacent non-tumor tissues under electron microscope. Scion Image software was used to analyze the relationship between distribution of various types of autophagy and cell ultrastructure. **Results** The data showed that macroautophagy was the dominant one in HCC cells, and the distribution was associated with the activity and metabolism of HCC cells. We also found that the microautophagy was the dominant one in the cells of adjacent tissues, and the distribution was associated with the inflammation injury of cells. **Conclusion** Our study suggests that macroautophagy and microautophagy are asymmetrically distributed between HCC cells and hepatocytes of the adjacent tissues, which might be related to the development of HCC.

[Key words] autophagy; subcellular fractions; hepatocellular carcinoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(3): 238-242]

自体吞噬是细胞存活、分化、进展及保持稳态所必需的一种依赖于溶酶体的降解途径^[1]。在细胞处于代谢性应激的阶段,通过自噬转化损坏或过剩的蛋白质和细胞器作为替代的能量从而维持稳态和活力^[2]。在凋亡功能缺失的肿瘤细胞中,自噬有助于延长生存时间。相关研究^[3-4]证明,自噬不仅在肿瘤的进展过程而且在对抗肿瘤治疗的反应过程中起着重要的支持作用。而让人感觉矛盾的是,自噬功能的缺失又和肿瘤的发生联系在一起。如作为必要的自噬调节基因,beclin1 在人类卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌中是缺失的,并且 beclin1(+/-)基因敲除的小鼠有发生肿瘤的倾向性。自噬功能的缺失还可以激活细胞 DNA 的损伤反应,连同凋亡功能的缺失就可以

导致肿瘤的生成^[5-6]。目前,自噬对于肿瘤双重作用的机制尚不明了。

原发性肝癌,病理绝大多数是肝细胞癌(HCC),是世界上第五大常见肿瘤,第三大肿瘤死亡原因^[7]。在肝细胞癌中自噬的作用也是非常复杂的,相关研究甚至有着完全不同的结论。研究显示在肝细胞癌中自噬相关基因及自噬活动是被抑制的。自噬作用的缺失连同凋亡活动的异常可能促进肿瘤恶性程度的分化^[8]。但另外一些研究^[9-10]证明作为自噬相关基因在肝癌组织中表达是增加的,而且增加的自噬活动可以降低肝癌细胞对化疗药物的敏感性。

通过电镜监测自噬活动有利于细致地分析和评估各种自噬结构的变化,判定细胞质中哪些细胞器

[收稿日期] 2011-02-03 **[接受日期]** 2011-02-28

[作者简介] 王昊,主治医师. E-mail: howard_123@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875141, E-mail: hp-hu@medmail.com.cn

或范围会被靶定降解^[11]。事实上,肝细胞中自噬活动非常丰富,形态上至少可以分为3种类型:巨型自体吞噬、微型自体吞噬及分子伴侣介导的自噬,区别在于细胞质被传递到溶酶体的方式。巨型自噬通过一种双层膜结构隔离,待降解物形成自噬体随后与溶酶体融合;而微型自噬指溶酶体通过膜内陷直接摄取胞质成分;分子伴侣介导的自噬与其他两类自噬的不同主要存在于吞噬泡的缺失,降解底物的类型及细胞器降解的缺失^[12]。尽管很多年前巨型自噬和微型自噬就已经被发现是肝细胞降解胞质中蛋白质的两种主要途径^[13],但两者的确切作用至今仍未明确。

1 材料和方法

1.1 组织标本来源及临床资料收集 肝脏组织标本均来自于在第二军医大学东方肝胆外科医院接受肝癌根治手术的患者,所有参与研究的患者在标本收集前已签署由医院医学伦理委员会审核通过的知情同意书。15对肝癌及相匹配的非肿瘤肝组织标本,术后立即被切割成直径1~2 mm的小块并固定在戊二醛溶液中,在经病理确诊为肝细胞癌后进行超微结构观察及图像定量分析。

1.2 超微结构观察及形态测量学分析 肝癌组织及癌旁组织固定在2.5%的戊二醛2 h以上,然后用1%的四氧钼酸孵化2~3 h,经乙醇和丙酮脱水固定后,树脂包埋,使用LKB-I超薄切片机切割成厚度50~60 nm薄片并置于电镜铜网上,经乙酸双氧铀和枸橼酸铅染色后,在日立H-600 TEM电子显微镜下观察,并按预定的间隔随机拍摄完整细胞的照片。通常每2~5个铜网网格拍摄1张。分析每个被拍摄细胞的超微形态特征,记录细胞及细胞核外形,自噬体、溶酶体、线粒体、内质网、核糖体等细胞器的分布情况,并对细胞自噬活动情况使用软件Scion Image Beta 4.02 (Scion Corporation, Frederick, MD)进行图像定量测量分析,通过测量自体吞噬体面积占细胞总面积的比例判断细胞自噬活动情况。详细方法见文献^[11]。

1.3 统计学处理 所有数据采用SAS 9.1.3软件进行统计分析。图像量化后数字资料采用 χ^2 检验。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 肝细胞癌组织细胞与非癌肝组织细胞的超微结构特点 随机拍摄了共158个完整细胞的电镜照片。80个细胞来自于肿瘤组织,78个细胞来自于非癌肝细胞。正常肝细胞呈对称的多角形,结构清晰

匀称,线粒体、核糖体等细胞器分布均匀,溶酶体较常见而自噬体分布较少。但许多肝细胞受炎症及肝硬化等因素影响,出现细胞及细胞器水肿,细胞多角外形丧失,细胞核轻度增大及粗面内质网少量增生,这类受炎症影响的肝细胞常伴有明显的微型自体吞噬活动亢进,表现为溶酶体数量增多,体积明显增大,溶酶体出现空泡或吞噬泡(图1E~1H)。肿瘤细胞超微结构异形严重,细胞核形态不规则增大,呈伪足样改变,细胞内核糖体大量丧失增生并出现聚集,线粒体的数量减少并且体积减小,线粒体嵴趋向消失,粗面内质网增生甚至呈指纹样改变等特异现象,其中多层膜的自噬体结构也较为常见(图1A~1D)。

在80个肝癌细胞中,46个细胞可观察到明显巨型自噬体,78个肝细胞中只有15个细胞可以观察到巨型自噬体。78个肝细胞中有42个细胞可以观察到微型自体吞噬的明显活动。而80个肝癌细胞未能观察到明显的溶酶体活动,两种类型自噬在肝癌和肝细胞中分布差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 巨型自体吞噬在各类细胞中分布的形态学分析 正常肝细胞中巨型自体吞噬不仅数量少,体积小且内容物少有细胞器。经超微结构图像定量测量,正常肝细胞中的巨型自噬体,直径通常为0.6~1.5 μm ,自噬面积约占细胞横截面积的0.1%~0.8%。而肿瘤细胞中巨型自体吞噬体积相对巨大,直径为1~8 μm ,自噬面积约占细胞横截面体积的0.5%~18%。包涵物多为细胞器,包括线粒体(图2A)、核糖体(图1A、1D)、内质网(图2B)等。

按肿瘤细胞的形态学差别,肿瘤细胞按照状态可以大致分为3类。I类肿瘤细胞相对稳定处于静息状态,这些细胞没有明显的代谢亢进征象,细胞器无过度增生,细胞核、线粒体等细胞器也未见明显的损伤(图2C)。此类肿瘤细胞共观察了23个,出现巨型自噬仅有4个。II类肿瘤细胞具有代谢亢进的征象,细胞核极度增大,细胞器过度增生,粗面内质网增生呈指纹状(图2D),或核糖体大量增生堆积等(图1A),此类肿瘤细胞有29个,出现巨型自噬的有20个。巨型自噬体包涵物主要为过剩的核糖体(图1A、1D)、内质网(图2B)及水肿的线粒体(图2A)。III类肿瘤细胞有明显受损的征象,细胞核浓缩甚至碎裂,线粒体高度水肿,线粒体内部结构模糊甚至消失,细胞器数量包括线粒体数量明显减少,甚至缺失(图2E)。此类肿瘤细胞有28个,出现巨型自噬有22个。巨型自噬体包涵物主要为线粒体。在III类肿瘤细胞中,少量的细胞损伤状态非常严重,且处于过度的巨型自噬状态中,在这些细胞中巨型自噬体隔离包裹了大多数细胞器(图2F)。3类肿瘤细胞巨型自噬分布

差异有统计学意义($P < 0.05$),提示肿瘤细胞在代谢

亢进或功能受损的情况下巨型自噬更易出现。

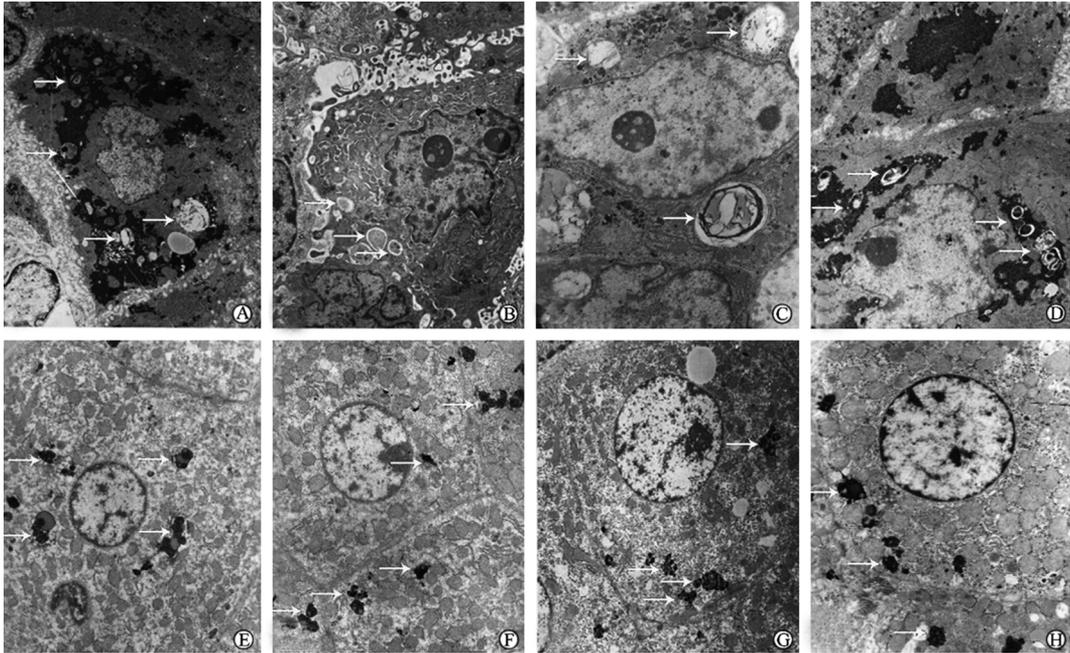


图 1 在肝癌细胞(A~D)和肝细胞(E~H)中巨型自噬和微型自噬的不对称分布

Fig 1 Asymmetric distribution of macroautophagy and microautophagy between HCC cells(A-D) and hepatocytes(E-H) in adjacent tissues

A-D were liver tumor cells; several double membrane or multi-membrane autophagosomes were present in the cytoplasm (arrows). E-H were hepatocytes; several dense multivesicular lysosomes were present in the cytoplasm (arrows). Original magnification; $\times 8\ 000$

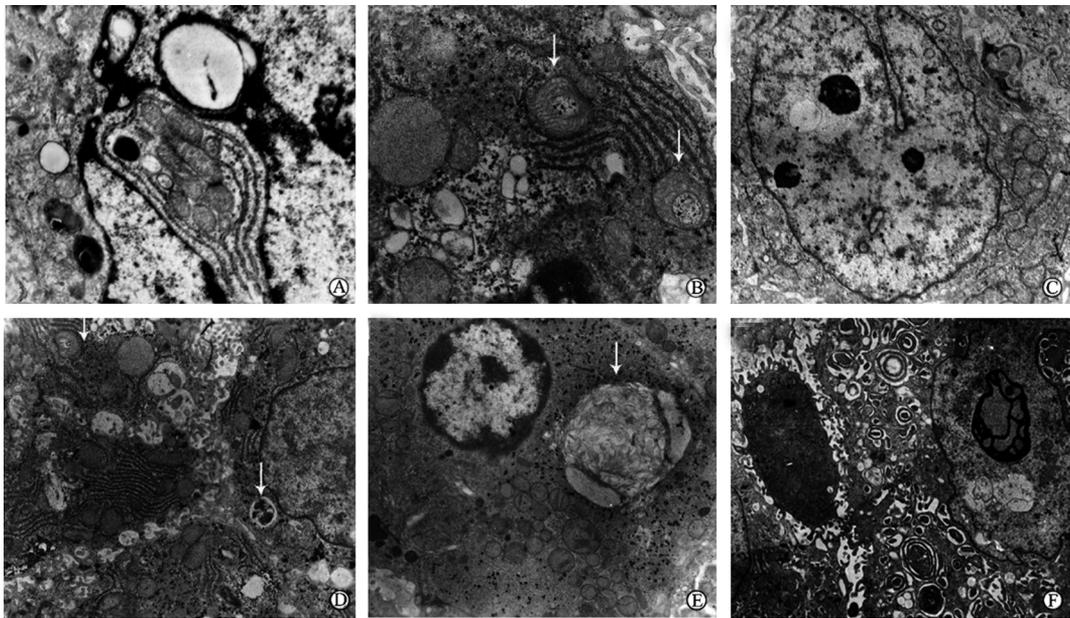


图 2 不同状态肝肿瘤细胞中巨型自噬的超微结构形态

Fig 2 Ultrastructure of macroautophagy in HCC cells of various statuses

A: A giant autophagosome with many mitochondria sequestered by multiply membrane. B: Autophagic degradation of ER; some endoplasmic reticulum was sequestered in double membrane vacuolus (arrows). C: A tumor cell with signs of homeostasis; autophagosome was absent in the cytoplasm. D: A tumor cell with signs of active metabolism; there was fingerprint change of endoplasmic reticulum in the cytoplasm; and autophagosome was present in the cytoplasm (arrows). E: A tumor cell with signs of grave impairment; many mitochondria were sequestered in large double membrane vacuolus (arrow); other mitochondria in the cytoplasm were with pale and balloon appearance. F: A tumor cell in the status of autophagic death, with most cellular organelles sequestered. Original magnification; $\times 40\ 000$ (A,B); $\times 10\ 000$ (C); $\times 12\ 000$ (D-F)

2.3 微型自体吞噬在肝细胞中分布的形态学分析 正常肝细胞有对称的多角形外形,细胞内细胞器分布均匀,溶酶体的活动很常见,一个细胞截面通常可以看到多个溶酶体,溶酶体内无明显的空泡出现(图 3A)。共观察了 18 个正常肝细胞,溶酶体直径约为 $1.0\sim 1.5\ \mu\text{m}$,溶酶体面积约占细胞横截面积的 $0.2\%\sim 0.8\%$ 。但肝细胞因受多种原因引起炎症的影响,细胞及细胞内细胞器会出现水肿,细胞会丧失多角形外形甚至气泡样变。在这样的细胞胞质中,溶酶体的数量与体积均有增加,且溶酶体会出现多个空泡成为多腔溶酶体(图 3B),此类肝细胞共观察了 29 个,溶酶体直径约为 $1.0\sim 2.5\ \mu\text{m}$,面积

约占细胞横截面积的 $0.5\%\sim 2.0\%$ 。反复长期的炎症可引起肝硬化,此阶段的肝细胞周边有明显胶原纤维,细胞水肿明显,边界不清;细胞还有核改变、粗面内质网轻度增生,溶酶体体积增大及多腔化明显等不典型改变,细胞表现出较重的损伤(图 3C)。此类肝细胞共观察到 31 个,溶酶体直径约为 $1.5\sim 2.5\ \mu\text{m}$,面积约占细胞横截面积的 $1.5\%\sim 3.5\%$ 。通过图像软件分别求得 3 类细胞的细胞总截面面积及微型自噬截面面积,3 类细胞中微型自噬的分布差异有统计学意义($P<0.05$),提示微型自噬的分布可能与细胞的炎性程度相关,肝细胞的炎症情况越重,微型自噬的分布就越多。

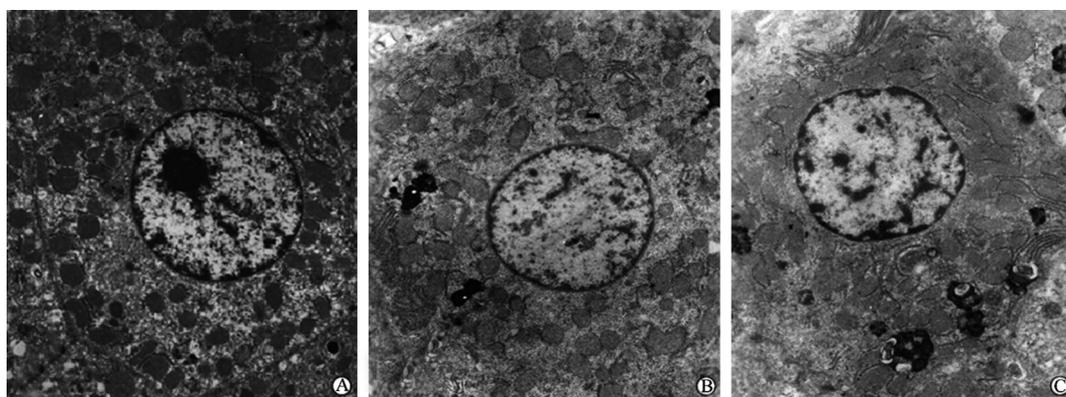


图 3 处于不同炎症状态肝细胞的超微结构形态

Fig 3 Ultrastructure of hepatocytes under various inflammation statuses

A: A normal hepatocyte with neat architecture. B: A hepatocyte with inflammation; some multivesicular lysosomes directly taking in cytosolic components. C: A hepatocyte from cirrhosis liver with severe inflammation; the cell architecture is vague, many enlarged lysosomes were present with great multivesicular appearance, taking in cytosolic components through membrane invagination. Original magnification: $\times 8\ 000$

3 讨论

在本实验中,图像量化数据显示巨型自体吞噬和微型自体吞噬在肝细胞癌组织及癌旁组织中是不对称分布的,该现象文献尚未见报道。分析其原因可能是微型自噬没有特异性的分子标志物,仅能靠透射电镜去鉴别。另一方面,相关研究也发现微型自噬与巨型自噬有共同的分子通路^[14-15]。有研究证明在巨型自噬相关 Atg 基因变异的细胞中微型自噬被有效抑制,电镜观察到 Atg7、Atg8、Atg9 基因变异的细胞中微型自噬可以形成小囊泡但无消化功能^[16]。研究表明,微型自噬活动与巨型自噬活动可能有共同的生化标志。而近 20 年对自体吞噬的研究主要集中在生物化学方面,超微影像学研究只是最近才被重新重视。在很多方面微型自噬与巨型自噬的作用可能被混淆了。

本实验发现,微型自噬主要分布在受炎症影响的肝细胞中,且炎症损伤越重,微型自噬活动越明显,而肿瘤细胞中微型自噬活动却是缺失的。我们推测,微噬有维持细胞内环境稳态的重要作用,当微噬功能缺失时,细胞内环境恶化,肿瘤细胞由此生成。有研究证明微型自噬作为一种多用途的降解方式,不仅可以为细胞提供能量转换,还可以维护细胞的内环境稳定,微型自噬可降解细胞内外源性的蛋白质^[17-18]。在酵母细胞中微型自噬可以清除过氧化物酶体保持细胞内的稳态^[19]。同时受损肝细胞中大量分布的微型自噬也压制了巨型自噬活动,有研究证明 EGO 复合体可以通过与 TOR 酶结合,上调微型自噬的活动同时压制雷帕霉素引起的巨型自噬活动^[20]。

在那些凋亡功能缺失的肿瘤细胞中,代谢性应激可以引起无止尽的巨型自噬。当缺少外源性的营

养源,巨型自噬就可以作为能量源维持细胞活力。氨基酸缺乏,缺氧、缺糖、低生长因子及细胞毒损伤均可以引起细胞内巨型自噬,在这种情况下,抑制巨型自噬可能直接导致细胞坏死^[2-4,21]。现在一些研究发现90%的实体肿瘤中存在着缺氧^[22-23],缺氧可以直接引起细胞线粒体噬,线粒体噬作为一种适应性应激反应可以降低细胞内活性氧簇的水平,防止细胞死亡^[24-25]。这可能是肿瘤细胞中尤其是受损严重的肿瘤细胞中大量出现线粒体噬的原因。如果肿瘤细胞一直处于这种无止境的巨型自噬状态,当耗尽所有细胞器时,细胞死亡就不可避免了。

综上所述,多种自体吞噬的不对称分布可能与自噬对肝癌的双重作用相关,微型自噬可以维持细胞稳态压制肿瘤发生,而作为看家功能的巨型自噬可以在肝肿瘤细胞缺乏能量情况下提供能量,帮助肿瘤细胞存活。我们将在进一步研究中验证多种自体吞噬在细胞中的功能,从而为肝肿瘤病因的研究及治疗提供新的线索。

[参考文献]

- [1] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132: 27-42.
- [2] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 961-967.
- [3] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10: 51-64.
- [4] Levine B. Cell biology: autophagy and cancer[J]. *Nature*, 2007, 446: 745-747.
- [5] Liang X H, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. *Nature*, 1999, 402: 672-676.
- [6] Edinger A L, Thompson C B. Defective autophagy leads to cancer[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4: 422-424.
- [7] El-Serag H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132: 2557-2576.
- [8] Ding Z B, Shi Y H, Zhou J, Qiu S J, Xu Y, Dai Z, et al. Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 9167-9175.
- [9] Song H, Xia S L, Liao C, Li Y L, Wang Y F, Li T P, et al. Genes encoding Pir51, Beclin 1, RbAp48 and aldolase b are up or down-regulated in human primary hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10: 509-513.
- [10] Song J, Qu Z, Guo X, Zhao Q, Zhao X, Gao L, et al. Hypoxia-induced autophagy contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Autophagy*, 2009, 5: 1131-1144.
- [11] Swanlund J M, Kregel K C, Oberley T D. Investigating autophagy: quantitative morphometric analysis using electron microscopy[J]. *Autophagy*, 2010, 6: 270-277.
- [12] Yin X M, Ding W X, Gao W. Autophagy in the liver[J]. *Hepatology*, 2008, 47: 1773-1785.
- [13] Mortimore G E, Hutson N J, Surmacz C A. Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 2179-2183.
- [14] Uttenweiler A, Mayer A. Microautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 245-259.
- [15] Krick R, Muhe Y, Prick T, Bredschneider M, Bremer S, Wenzel D, et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits[J]. *Autophagy*, 2009, 5: 270-272.
- [16] Krick R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eske-Linen E L, et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 4492-4505.
- [17] Ahlberg J, Glaumann H. Uptake—microautophagy—and degradation of exogenous proteins by isolated rat liver lysosomes. Effects of pH, ATP, and inhibitors of proteolysis[J]. *Exp Mol Pathol*, 1985, 42: 78-88.
- [18] Doherty F J, Osborn N U, Wassell J A, Laszlo L, Mayer R J. Insoluble disulfide cross-linked polypeptides accumulate in the functionally compromised lysosomes of fibroblasts treated with the cysteine protease inhibitor E-64[J]. *Exp Cell Res*, 1989, 185: 506-518.
- [19] van Zutphen T, van der Klei I J, Kiel J A. Pexophagy in *Hansenula polymorpha*[J]. *Methods Enzymol*, 2008, 451: 197-215.
- [20] Dubouloz F, Deloche O, Wanke V, Cameroni E, De Virgilio C. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast[J]. *Mol Cell*, 2005, 19: 15-26.
- [21] White E. Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis[J]. *Autophagy*, 2008, 4: 399-401.
- [22] Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brune B. Tumor hypoxia and cancer progression[J]. *Cancer Lett*, 2006, 237: 10-21.
- [23] Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 266-276.
- [24] Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda L A, Tan Y S, Baek J H, Wesley J B, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 10892-10903.
- [25] Kim E H, Choi K S. A critical role of superoxide anion in selenite-induced mitophagic cell death[J]. *Autophagy*, 2008, 4: 76-78.