

骨髓瘤细胞中阿霉素诱导的 ATP 变化与自噬的关系*

余 芳 陈协群[△] 陈娟娟 黄晓梅

(第四军医大学西京医院血液内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:检测用阿霉素(doxorubicin DOXO)处理的骨髓瘤细胞株 NCI-H929 中 ATP 与自噬表达水平的变化,探讨两者之间的关联。方法:分别以 DOXO 2μmol/l 24h、DOXO 2μmol/l 联用自噬抑制剂 3MA 10mmol/l 24h 处理 H-929 细胞后,采用 MTT 法检测细胞存活率;ATP 生物发光法检测 ATP 表达量;Western Blot 检测靶细胞自噬标志分子 LC3 蛋白的表达。结果:各组相对未处理组存活率分别为 54%、35%,相对未处理组 ATP 分别为 400%、150%;DOXO 24h LC3 表达显著上调。结论:经 DOXO 处理 H-929 细胞系自噬形成,进而 ATP 上升以保护细胞。

关键词 阿霉素;骨髓瘤;三磷酸腺苷;自噬;NCI-H929 细胞;LC3

中图分类号 R733.3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1030-03

Relationship between ATP and Autophagy in Myeloma Cell Lines NCI-H929 Induced by Doxorubicin*

YU Fang, CHEN Xie-qun[△], CHEN Juan-juan, HUANG Xiao-mei

(Department of Hematology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: As a major intracellular degradation system that is found ubiquitously in eukaryotes, autophagy plays a key role in maintaining protein metabolic equilibrium, cell homeostasis, regulating cellular constituent recycling, cell development and differentiation. In different cell types or different stress modes, the role or function of autophagy changes. What's the function of autophagy in myeloma cells? We don't have experience at present. Based on the background above, in this study, by means of the model of myeloma cells (H-929 cells), we try to explore the effects of autophagy on cell death induced by DOXO and the correlating mechanism. **Methods:** After treated with DOXO (2μmol/l for 24 h) with or without 3MA (10mmol/l), cells were collected and subjected to MTT assay, cellular ATP measurement and western blot for analysis. The ATP level was presented as percentage to the untreated control group. **Results:** The survival ratio was significantly higher in the DOXO group (54%) than that in the DOXO+3-MA group (35%); The ATP level changed (DOXO group 400%, DOXO+3-MA group 150%); Western blot showed that there was a high level of LC3II in DOXO singly treating cells and a low level in DOXO+3-MA group. **Conclusions:** 1. Autophagy as protective mechanism responses to the death induced by DOXO; 2. Autophagy inhibition by chemical inhibitor enhances the death induced by DOXO in myeloma cell lines; 3. It has a relation with ATP.

Key words: Doxorubicin; Multiple myeloma; ATP; Autophagy; NCI-H929 cell; LC3

Chinese Library Classification: R733.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1030-03

前言

自噬是广泛存在于真核细胞中的生命现象,是生物在其发育、老化过程中都存在的一个净化自身多余或受损细胞器的共同机制,是目前细胞生物学研究的热点之一^[1]。1992年,由 Yoshinori Ohsumi's 实验室^[2]在酵母中发现了同哺乳动物相似的自噬形态,为自噬的研究打开了一扇大门,1993年雷帕霉素的靶基因 TOR 被从酵母中分离出来^[3],同年 Ohsumi's 实验组首次对自噬缺陷突变体进行了基因筛选^[4],1997年第一个自噬基因 (autophagy-related gene 1, ATG1) 被克隆^[5],至 2007 年已经有 31 个自噬基因被鉴定。自噬与肿瘤关系的研究更被广泛关注,

自噬的功能具有细胞类型依赖性,不同的肿瘤类型、不同的肿瘤发展阶段,自噬所起作用不同^[6]。MM 细胞中具有分泌大量免疫球蛋白的生物学特性,蛋白质代谢压力大,而做为细胞内的主要蛋白质代谢途径之一,自噬扮演了什么样的角色?目前尚无研究。本研究通过观察 H-929 细胞内 ATP 与 LC3 表达量的变化,以探讨 DOXO 诱导的 MM 细胞 ATP 与自噬的相互作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

注射用盐酸阿霉素 (Pharmacia Italia); ATP 发光检测试剂

* 基金项目:国家自然科学基金(NO.30871089)

作者简介:余芳(1985-),女,硕士研究生,医师,主要研究方向:骨髓瘤的机制与治疗

电话:13488190667, E-mail: yufang 24@163.com

[△]通讯作者:陈协群, E-mail: exoflyer@gmail.com

(收稿日期:2010-12-05 接受日期:2010-12-12-28)

(Vigorousbio);Super Signal West Pico 化学发光底物(Thermo Scientific) β MA、MTT、兔抗人 LC3 单克隆抗体、 β -actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标羊抗兔二抗(Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与试剂 人 MM NCI-H929 细胞系, 来源于美国 ATCC,保存于本室。细胞悬浮于 RPMI 1640 培养液(含 10%热灭活小牛血清,100U/ml 青霉素和 100ug/ml 链霉素), 置 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养。所有实验均取对数生长期细胞。

1.2.2 实验分组 随机分为 4 组:①未处理组 ;②DOXO 2umol/l 24h;③DOXO 2umol/l 联用 3MA 10mmol/l 24h。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞存活率 选取对数生长期 H929 细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml,取 100 μ l 孔接种于 96 孔培养板。按前述分组,每组设 5 个复孔。处理后,分别培养加入 MTT 溶液(5mg/ml)10ul,37℃ 孵育 4 小时,每孔加入 100 μ l 10%SDS (含 0.01 N HCl),充分溶解结晶物,570nm 波长测定各孔 OD 值,试验重复 3 次,取平均值。计算细胞存活率并统计结果。

1.2.4 ATP 生物发光法测相对 ATP 按前述分组处理细胞,收集细胞(2×10^6),PBS 洗涤后加入 200ul 细胞裂解液,混匀。取待测样品上清 5ul 加入测量管底部,取 Assay Reagent 50ul 加入管底部,混匀,立即测定,记录发光值为 Firefly Luciferase 的发光单位 (RLU)。

1.2.5 Western blot 取上述不同实验组细胞 (2×10^6),PBS 洗涤后,按 10^7 个细胞 /500 μ l 加入上样缓冲液,煮沸 10 分钟,4℃ 12000rpm 离心 15 分钟。收集 15 μ l 上清,行 SDS-PAGE 电泳,并转印至 PVDF 膜(Millipore),5%脱脂奶粉室温封闭 1 小时,分别加入 LC3(1 :1000)和 β -actin 抗体(1 :4000),4℃ 过夜,分别加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1 :30000),室温孵育 1 小时,化学发光法显色。

1.3 统计学方法

数据采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm SD$) 表示,采用统计软件 SPSS13.0 进行数据的统计学分析。组间均数两两比较采用独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $p<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 各处理组细胞活力

按分组处理 H-929 细胞后,用 MTT 法检测细胞活力。相对未处理组细胞存活率分别为 54%、35%。DOXO 2umol/l 24h 细胞存活率显著下降($P<0.05$),自噬抑制剂 3MA 促进阿霉素诱导的细胞死亡($P<0.05$)(图 1)。

2.2 各处理组 ATP 表达的变化

按分组处理细胞后,用 ATP 生物发光法检测细胞 ATP。相对未处理组%ATP 分别为 400%、150%。DOXO 2umol/l 24h 处理组 ATP 较未处理组 ATP 上升 ($P<0.05$),3MA+DOXO 组 ATP 较 DOXO 24h 组显著下降($P<0.05$)(图 2)。

2.3 各处理 LC3 的变化

DOXO 2umol/l 24h 处理组 LC3-II 显著增多,自噬产生。3MA 抑制自噬,LC3-II 表达下降(图 3)。

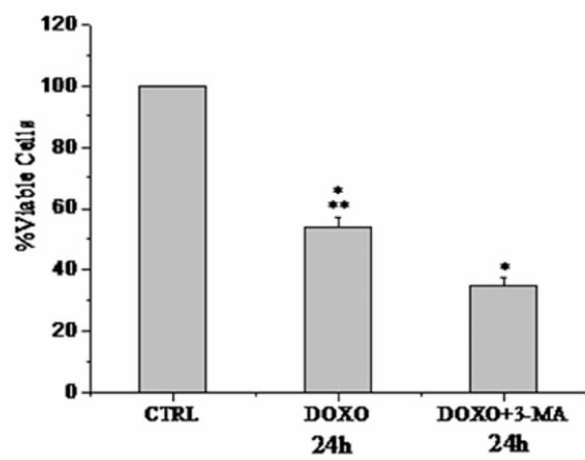


图 1 不同处理对细胞存活率的影响

Fig.1 Cell death analysis after treatment in cells. Data are shown as $\bar{X} \pm S.D.$ of three independent experiments. (* $P<0.05$ comparing to the untreated group and** $P<0.05$ respect to DOXO+3MA treated cells, t-test)

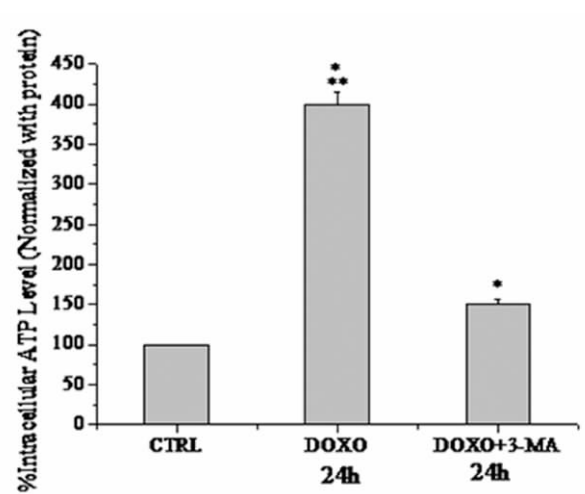


图 2 不同处理组的相对未处理组 ATP%

Fig.2 Effects after DOXO treatment on ATP levels. $\bar{X} \pm S.D.$, n=3(* $P<0.05$ comparing to the untreated group, ** $P<0.05$ respect to DOXO+3MA 24h treated cells, t-test)

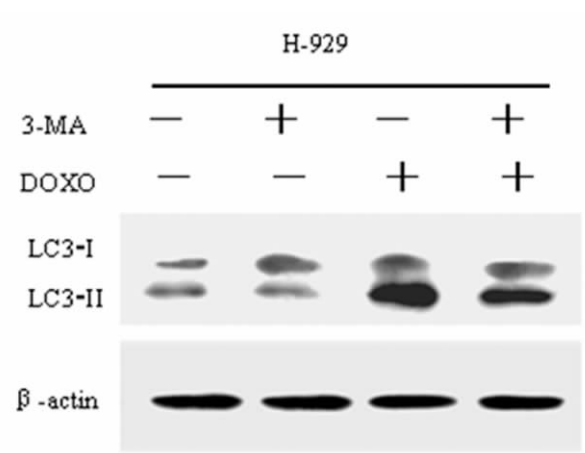


图 3 3MA、DOXO 对自噬的影响

Fig.3 Effect of 3MA on the conversion of LC3-I to LC3-II induced by DOXO. Cells were treated as described in Figure 1 and subjected to western blot for analysis.

3 讨论

自噬作为广泛存在于真核细胞中的生命现象,是细胞成分更新、发育、分化及组织重塑的重要调控机制,在维持蛋白代谢平衡及细胞内环境稳定具有重要意义。自噬是目前细胞生物学研究的热点之一,自噬与肿瘤关系的研究更被广泛关注。自噬基因 Beclin1 单等位基因缺失可致乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等^[7];抑癌基因(如 PTEN,TSC1/TSC2,P53,DAPK 等)都可诱导自噬,而癌基因如(Akt,Ras,Bcl-2)具有抑制自噬作用^[8]。这些都提示:自噬活性降低可导致肿瘤发生。有学者探寻活化自噬用于治疗肿瘤:在 MCF-7 细胞系中,基因学手段恢复 Beclin1 表达水平可抑制肿瘤生长,被广泛用于乳腺癌治疗的他莫西芬等可诱发自噬^[9]。但另一方面,结肠癌及胰腺癌标本中用抗 LC3 多抗免疫染色,90%的病例 LC3 特异地聚集在肿瘤上皮细胞,而在周围正常粘膜细胞中不表达^[10]。而胰腺癌和结肠癌细胞系,较正常成纤维细胞更能耐受营养缺乏应激,阻断自噬则对营养缺乏应对能力下降^[11]。以上研究提示:自噬在肿瘤中的角色具有两面性,具有细胞类型依赖性。有文献报道:致 DNA 损伤烷化剂可诱导自噬依赖的 ATP 能量峰,用 3-MA 处理或采用 RNAi 抑制自噬后可取消 ATP 峰^[12]。这可能是化疗药物诱发的自噬的细胞保护机制之一。自噬在 MM 细胞中的机制如何?目前尚无研究,亦无前人的经验可遁。为此我们进行了前述试验。结果发现:自噬提高 ATP 的量以保护细胞,联用自噬抑制剂 ATP 下降,抑制自噬可增加阿霉素诱导的 MM 细胞凋亡。我们以 MM 为靶细胞,进行自噬在 MM 中作用的探索,为 MM 的治疗开辟一条新的途径。

参考文献(References)

- [1] Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell [J]. Eukaryot Cell, 2002, 1(1):11-21
- [2] Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, et al. Autophagy in yeast demonstrated

with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction [J]. J Cell Biol, 1992, 119(2):301-11

- [3] Kunz J, Henriquez R, Schneider U, et al. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression [J]. Cell, 1993,73(3):585-96
- [4] Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. FEBS Lett, 1993, 333(1-2):169-74
- [5] Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, et al. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Gene, 1997,192 (2):245-50
- [6] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. Science, 2004,306 (5698):990-5
- [7] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 [J]. Nature, 1999,402 (6762): 672-676
- [8] Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes [J]. Cell Death Differ, 2009, 16 (1):87-93
- [9] Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Mathiasen IS, et al. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death [J]. Cell Death Differ, 2005, 12(10):1297-1309
- [10] Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, et al. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation [J]. Cancer Res, 2007, 67(20):9677-9684
- [11] Izuishi K, Kato K, Ogura T, et al. Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy [J]. Cancer Res, 2000, 60(21):6201-6207
- [12] Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, et al. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells [J]. Cell Death Differ, 2007, 14(3): 548-558