

# 顺铂通过诱导膀胱癌细胞自噬促进细胞凋亡

杨 轩<sup>1</sup>, 袁栋栋<sup>2</sup>, 姜学军<sup>2</sup>, 席志军<sup>1Δ</sup>

(1. 北京大学第一医院泌尿外科, 北京大学泌尿外科研究所, 北京 100034; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100101)

**[摘要]** **目的:** 研究自噬在顺铂引起膀胱癌细胞凋亡中的作用。 **方法:** 以膀胱癌细胞 T24 为细胞模型, 利用透射电镜观察自噬泡形成, 荧光显微镜观察转染绿色荧光蛋白和微管相关蛋白 1 轻链 3 融合蛋白 (green fluorescent protein and microtubule associated protein 1 light chain 3 fusion protein, GFP-LC3) 的质粒的荧光聚集情况。应用蛋白质免疫印迹检测 LC3-II 的积累, 检测顺铂能否诱导膀胱癌 T24 细胞发生自噬。此外, 蛋白质免疫印迹还被用来检测自噬相关信号通路哺乳动物雷帕霉素受体 (mammal target of rapamycin, mTOR) 及其下游相对分子质量 70 000 的核糖体蛋白质 S6 激酶 (70 000 ribosomal protein S6 kinase, P70S6K) 的变化, 以及凋亡标志蛋白聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 的切割, 之后利用 3-(4,5-二甲基)-5-(3-羧甲基苯环)-2-(4-硫基苯)-2H-四唑盐复合物检测法 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS] 观察在自噬促进剂雷帕霉素 (rapamycin) 存在与否的情况下顺铂引起的膀胱癌细胞活力变化。本实验还使用了 RNA 干扰技术敲降 LC3 表达。 **结果:** 电子显微镜显示相比对照组, 顺铂可以引起膀胱癌细胞出现大量自噬泡。荧光显微镜观察 GFP-LC3 聚集程度, 顺铂组也明显高于对照组。蛋白质免疫印迹检测 LC3 的结果发现顺铂组的 LC3-II 含量随时间延长和顺铂浓度增加而明显增加, 尤其是在 48 h 时, 50 与 100  $\mu\text{mol/L}$  顺铂处理下 LC3-II/Actin (%) 的灰度值分别升高了 30 和 44, 而 mTOR/P70S6K 的磷酸化也受到顺铂处理的抑制, 在 48 h, 100  $\mu\text{mol/L}$  顺铂处理下其磷酸化条带几乎完全被抑制。MTS 结果发现顺铂可导致细胞活力的丢失, 在 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  顺铂处理 24 h 时分别下降了 12% 和 35%, 而且用自噬促进剂雷帕霉素和顺铂联合处理组的细胞活力丢失大于单用顺铂处理的对照组 ( $F = 74.890, P < 0.01$ )。RNA 干扰实验显示, 敲降自噬相关基因 LC3, 可减少顺铂引起的 PARP 剪切, 细胞凋亡减少。 **结论:** 发现顺铂可以引起膀胱癌细胞 T24 发生自噬, 并发现该自噬的作用能促进顺铂诱导的细胞凋亡。

**[关键词]** 顺铂; 膀胱肿瘤; 自噬; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R737.14 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2013)02-0221-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-167X.2013.02.012

## Cisplatin enhances apoptosis in bladder cancer cells via autophagy

YANG Xuan<sup>1</sup>, YUAN Dong-dong<sup>2</sup>, JIANG Xue-jun<sup>2</sup>, XI Zhi-jun<sup>1Δ</sup>

(1. Department of Urology, Peking University First Hospital; Institute of Urology, Peking University, Beijing 100034, China; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China)

**ABSTRACT Objective:** To monitor the cisplatin-induced autophagy and investigate the function of autophagy in bladder cancer cells. **Methods:** The transmission electron microscope was used to detect autophagic vacuoles and the fluorescence microscope to detect GFP-LC3. The expressions of proteins, such as LC3, PARP, mTOR, P70S6K were analyzed by immunoblotting. Cell viability was analyzed by MTS assay, in which rapamycin was used to inhibit mTOR phosphorylation and enhance autophagy. LC3 expression was knocked down by RNA interference. **Results:** In bladder cancer cell T24, autophagic vacuoles were observed by the transmission electron microscope and GFP-LC3 aggregation was viewed by the fluorescence microscope after cisplatin treatment. The LC3-II accumulation was enhanced by cisplatin treatment. Particularly at the concentrations of 50, and 100  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h, the gray value of LC3-II/Actin (%) increased 30 and 44, respectively. Cisplatin treatment inhibited the phosphorylation of mTOR/P70S6K, which was most significant at the concentration of 100  $\mu\text{mol/L}$  for 48 h. Cisplatin also induced cell viability loss, which was 12% and 45% at the concentrations of 50, and 100  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h. This effect could be enhanced by rapamycin ( $F = 74.890, P < 0.01$ ). Furthermore, knocking down LC3 by RNA interference reduced PARP cleavage. **Conclusion:** Cisplatin could induce autophagy in bladder

cancer cell T24, which promoted cisplatin-induced apoptosis.

**KEY WORDS** Cisplatin; Bladder neoplasms; Autophagy; Apoptosis

膀胱癌是我国泌尿系统发病率最高的肿瘤<sup>[1]</sup>, 侵犯肌层的膀胱癌更是一种致命的疾病, 一旦出现转移, 中位生存期只有 15 个月<sup>[2]</sup>。顺铂(cisplatin, CP)是一种临床应用极为广泛的含铂类化疗药物, 其在膀胱癌的化疗中具有重要的地位, 无论是经典的甲氨蝶呤 + 长春新碱 + 多柔比星 + 顺铂(methotrexate + vincristine + adriamycin + cisplatin, M-VAC)方案, 还是近年来流行的吉西他滨 + 顺铂(gemcitabine + cisplatin, GC)方案, 顺铂的作用都是至关重要的<sup>[3]</sup>, 进一步了解顺铂作用于膀胱癌细胞的机制非常必要。近年来人们对细胞死亡的研究发现, 程序性细胞死亡除了凋亡, 还有自噬性细胞死亡与坏死性凋亡, 这给肿瘤治疗提供了新的思路<sup>[4]</sup>。

自噬是细胞在进化中高度保守的一种维持稳态的基本生命过程, 分为三大类: 巨自噬、微自噬与分子伴侣介导的自噬, 这里讨论的自噬主要是指巨自噬<sup>[5]</sup>。自噬可以降解细胞器和大分子蛋白质。在正常情况下, 细胞内的自噬处于较低的基础水平, 而在细胞受到不利因素影响时, 如饥饿、生长因子缺乏时, 自噬水平可快速调高以维持能量和养分的供给, 因此自噬一般被认为是细胞的存活机制, 但是, 自噬的过度激活也会导致细胞死亡, 自噬性细胞死亡也被称为 II 型程序性细胞死亡, 而自噬和凋亡的关系也十分复杂, 自噬可以抑制、促进或者伴随于凋亡<sup>[5-6]</sup>。同样, 在肿瘤方面的研究也发现, 一方面自噬可以是某些肿瘤逃避死亡的保护性因素<sup>[7]</sup>, 但另一方面自噬也可能抑制肿瘤。比如, 自噬基因缺陷可导致肿瘤生长, 部分肿瘤进展后自噬水平降低, 另外还有研究发现抑制自噬会间接抑制药物引起的细胞死亡<sup>[8-10]</sup>, 因此, 自噬也成为肿瘤药物治疗中的研究热点。在人宫颈癌细胞中的研究发现, 抑制自噬增加了顺铂诱导的细胞凋亡, 这说明自噬在其中起保护性作用, 可能是肿瘤的耐药机制之一<sup>[11]</sup>。

在膀胱癌中, 目前还未有顺铂与自噬关系的报道, 并且不清楚顺铂除了诱导凋亡之外有无其他的程序性死亡方式。该研究的目的是明确在顺铂引起膀胱癌细胞的凋亡过程中是否有自噬参与, 并探讨自噬对癌细胞死亡的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药品和试剂

McCoy' 5A 培养基和青链霉素购自南京凯基生

物科技发展有限公司, DMEM 培养基购自美国 HyClone 公司, 胎牛血清购自美国 GIBCO 公司, 顺铂、雷帕霉素、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司, Z-VAF-FMK (Z-V-FMK) 购自美国 R&D systems 公司, 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)、哺乳动物雷帕霉素受体 (mammal target of rapamycin, mTOR)、相对分子量 70 000 的核糖体蛋白质 S6 激酶 (70 000 ribosomal protein S6 kinase, P70S6K) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Actin 抗体、LC3 特异性 siRNA 与对照 siRNA 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。

### 1.2 仪器设备

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国 NUAIRE 公司, 小型台式离心机购自美国 Thermo 公司, 台式冷冻高速离心机购自美国 Sigma-Aldrich 公司, -20 °C 低温冰箱购自中国海尔公司, -80 °C 低温冰箱购自德国 Heraeus 公司, AL204 电子天平购自美国 Mettler Toledo 公司, 正置荧光显微镜 (Axio Imager A1) 购自德国 Zeiss 公司, Mini Trans-Blot 电转仪购自美国 Bio-RAD 公司, AE-6500 型电泳槽购自日本 ATTO 公司, JY600C 恒压恒流电泳仪购自中国北京君意东方电泳设备有限公司, MilliQ plus 超纯水系统购自美国 Millipore 公司。

### 1.3 细胞培养和 siRNA 干扰

人膀胱癌细胞系 T24 购自美国 ATCC 公司, 于中国科学院微生物研究所姜学军实验室保存。细胞用含 10% (体积分数) 胎牛血清的 McCoy' 5A 培养基培养。当细胞生长密度接近 100% 时, 弃去旧培养基, 用 PBS 洗 1 遍, 用胰酶 (含 EDTA) 消化贴壁细胞, 然后以 1 500 r/min 离心, 2 min 后收集细胞, 弃去上清液, 加入新鲜培养基重悬。将细胞分到新的培养皿中, 培养过夜, 使细胞生长至 60% ~ 70% 密度。弃去培养基, 换新鲜培养基, 分别按 50 μmol/L、100 μmol/L 的终浓度加入顺铂刺激 6、12、24、48 h 后收集细胞。

在准备 siRNA 干扰实验 12 h 前, 把所需细胞以上述方法按 30% 密度接种于培养皿中。参考转染试剂说明书将 siRNA 和转染试剂分别加入无血清 DMEM 培养基中, 静置 5 min 后混合, 再次静置 20 min, 之后将混合好的 DMEM 培养基加入换过新培

培养基(含血清)的细胞培养皿中,干扰 36 h 后换新鲜培养基,按 50  $\mu\text{mol/L}$  浓度加入顺铂刺激 24 h,然后收集细胞。

#### 1.4 电子显微镜样品的制备

将 T24 细胞接种于直径 6 cm 的培养皿中,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% (体积分数)  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养过夜,至细胞密度达到 60% ~ 70%。换新鲜培养基,按 50  $\mu\text{mol/L}$  终浓度加入顺铂处理 6 h。完成处理时间后立即用胰酶(不含 EDTA)消化细胞,4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000  $\times g$  离心 5 min 后收集细胞,冷 PBS 洗涤两遍。加入 3% (体积分数) 戊二醛溶液,4  $^{\circ}\text{C}$  固定,送样检验。

#### 1.5 质粒转染和荧光显微镜观察

在进行转染前 12 h 把所需细胞以前述方法按 80% 密度接种于培养皿中。参考转染试剂说明书将绿色荧光蛋白和微管相关蛋白 1 轻链 3 融合蛋白 (green fluorescent protein and microtubule associated protein 1 light chain 3 fusion protein, GFP-LC3) 质粒和 Lipofectamine 2000 转染试剂分别加入无血清 DMEM 培养基中,静置 5 min 后混合,再次静置 20 min。之后将混合好的 DMEM 培养基加入换过新培养基(含血清)的细胞培养皿中,转染 36 h 后将细胞接种至有盖玻片的六孔板中,培养 12 h。按 50  $\mu\text{mol/L}$  终浓度加入顺铂处理 6 h 后,弃去原培养基,用 40 g/L 多聚甲醛溶液室温固定 15 min,而后用 PBS 洗 2 遍,最后用 DAPI 染色并封片。制作好的细胞爬片以荧光显微镜观察 GFP-LC3 荧光聚集情况。

#### 1.6 细胞收集与蛋白质免疫印迹

按指定时间处理细胞,弃去培养液,用冷 PBS 洗一遍,加入一定量的细胞裂解液,组成: 1 mL 母液 [1% (体积分数) Triton X-100, 10% (体积分数) 甘油, 50 mmol/L Hepes, pH 7.4], 5 mol/L NaCl 20  $\mu\text{L}$ , 0.5 mol/L EGTA/EDTA 10  $\mu\text{L}$ , 0.1 mol/L NaF 10  $\mu\text{L}$ , 0.1 mol/L PMSF 20  $\mu\text{L}$ , DTT 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2  $\mu\text{L}$ , Protease inhibitor 1  $\mu\text{L}$ , 然后用细胞刮铲均匀收集培养皿所有部位的细胞。将收集好的细胞裂解液放于冰上裂解 20 min, 13 000 r/min 离心 15 min 收集上清液,加上样缓冲液并煮沸上样。按所需蛋白质相对分子质量配制 80 g/L (分离 mTOR, P70S6K, PARP 等蛋白质) 或 15 g/L (分离 Actin, LC3) 聚丙烯酰胺凝胶,并上样跑胶分离蛋白质,之后将蛋白质转移至 PVDF 膜上。将转有蛋白质的 PVDF 膜按如下次序处理:封闭液封膜 60 min,一抗孵育过夜,二

抗孵育 90 min,经适当漂洗后涂抹发光液,并于暗室曝光洗片。最后将底片扫描并进行分析。

1.7 3-(4,5-二甲基)-5-(3-羧甲基苯环)-2-(4-巯基苯)-2H-四唑盐复合物检测法 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS] 检测细胞存活率

将准备好的 T24 细胞消化并均匀接种于 96 孔板中,培养过夜,换无酚红 DMEM 培养基。每 3 个孔为一组平行对照,按 25  $\mu\text{mol/L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  的终浓度加入顺铂,连同空白对照组 0  $\mu\text{mol/L}$  共 4 个浓度。每个浓度分两组,一组同时加入顺铂和终浓度为 10 nmol/L 的雷帕霉素,另一组加入顺铂和等量溶剂 DMSO 为对照。处理 24 h 后,每孔加 MTS 和 PMS (20:1) 混合溶液 20  $\mu\text{L}$ ,使用酶联免疫检测仪于 490 nm 波长测定各孔光密度值,并记录结果。

#### 1.8 统计学分析

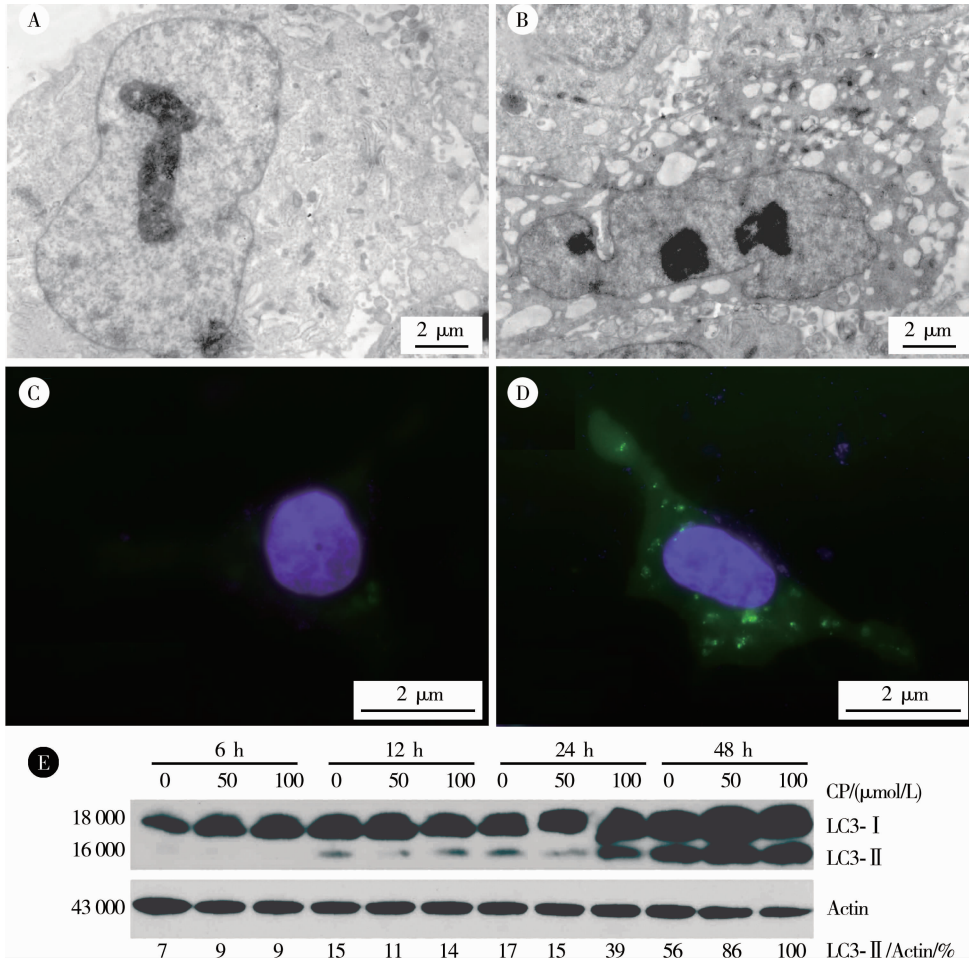
MTS 实验结果以单因素方差分析和 Student-Newman-Keuls (S-N-K) 法两两比较分析,使用 SPSS 13.0 软件处理,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 顺铂引起膀胱癌细胞 T24 自噬与凋亡

透射电镜是观察自噬最可靠的方法之一,也是首先发现并报道自噬的方法<sup>[12]</sup>。我们利用电镜观察 T24 细胞(图 1),发现顺铂处理组(图 1B)相对于对照组(图 1A)形成了大量自噬体 (autophagosome)。GFP-LC3 是一种带有绿色荧光的自噬标记蛋白,当细胞处在自噬水平较低的状态下时,GFP-LC3 弥散分布于细胞中,且较多处于细胞核中。自噬水平升高后,自噬体增加,GFP-LC3 以酯化的形式结合于自噬体,呈现点状聚集的荧光分布<sup>[13]</sup>。荧光显微镜的结果显示,顺铂处理后,T24 细胞的荧光聚集程度明显升高(图 1C 和 D)。

LC3 是自噬的标志性蛋白,它有 LC3-I 和 LC3-II 两种亚型,其中 LC3-II 的表达量与自噬的程度呈正比例<sup>[13]</sup>,因此我们利用免疫印迹检测了 LC3 以及内参照肌动蛋白 (Actin)。我们发现随着处理时间延长,尤其是 24 h 和 48 h 时,LC3-II/Actin 的值出现明显增加,而且较高浓度 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 增加量大于较低浓度 (50  $\mu\text{mol/L}$ ),尤其是在 48 h 时,50 与 100  $\mu\text{mol/L}$  顺铂处理下 LC3-II/Actin (%) 的灰度值分别升高了 30 和 44 (图 1E)。



T24 cells were viewed by electron microscope after treated with blank control and cisplatin (50 μmol/L) for 6 h and collected as described above in figure 1. Compared to control (A), autophagosomes (double-membrane structures which may have content in them) formation was obviously enhanced in cisplatin-treated cells(B). T24 cells were transfected with GFP-LC3 plasmid in C and D. C was control and cells were treated with cisplatin (50 μmol/L) for 6 h in D. In D, cisplatin enhanced GFP-LC3 aggregation and more positive dots were visualized than in C. E showed cisplatin induced LC3-II accumulation in T24 cells. T24 cells were treated with cisplatin (50, 100 μmol/L) for 6, 12, 24 and 48 h and harvested as described in methods. LC3 and actin were analyzed by immunoblotting with specific antibodies. The gray value represented the amount of protein, and the ratios of LC3-II to actin are presented below the blots.

图 1 不同方法检测顺铂引起的 T24 细胞自噬

Figure 1 Cisplatin induced autophagy in T24 cells

mTOR 通路是通常认为的自噬负调节通路<sup>[14]</sup>, 因此我们进行了检测, 发现同样在较长时间 (24 h 和 48 h)、较高浓度 (100 μmol/L) 的情况下, 顺铂处理明显抑制了 mTOR 及其下游 P70S6K 的磷酸化 (图 2)。同时也检测了凋亡的标志蛋白 PARP, 它是半胱天冬酶 (caspase) 的切割底物<sup>[15]</sup>, PARP 切割是凋亡发生的标志。我们在顺铂处理后检测到了 PARP 的切割, 证实凋亡的发生, 但是切割条带出现的时间 (24 h) 晚于 LC3-II, 并且其表达量呈现时间和剂量依赖性 (图 2)。

## 2.2 自噬促进顺铂引起的膀胱癌细胞凋亡

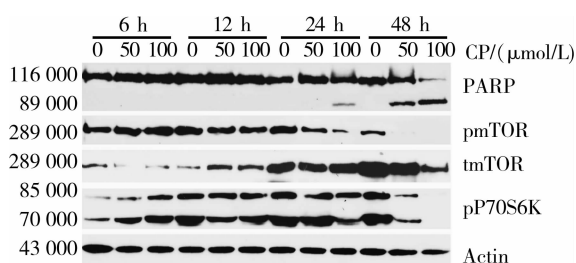
### 2.2.1 自噬促进剂雷帕霉素增强了顺铂对 T24 细胞的杀伤作用

雷帕霉素可特异性抑制 mTOR, 是一种普遍采用的自噬促进剂<sup>[16]</sup>。为了验证自噬在顺铂杀伤肿瘤细胞中的作用, 我们在顺铂与雷帕霉

素共同存在的处理条件下, 利用 MTS 法检测细胞存活率 (cell viability), 结果发现, 在 50 和 100 μmol/L 顺铂处理 24 h 情况下细胞存活率分别下降了 12% 和 35%, 而且用自噬促进剂雷帕霉素和顺铂联合处理组的细胞活力丢失大于单用顺铂处理的对照组。各组间差异经方差分析发现有统计学意义 ( $F = 74.890, P < 0.01$ ), 使用 S-N-K 两两比较发现其中顺铂浓度 25 μmol/L, 50 μmol/L, 100 μmol/L 下的每两组间比较差异也均有统计学意义 (图 3A)。

### 2.2.2 敲降自噬相关基因 LC3 表达抑制了顺铂引起的细胞凋亡

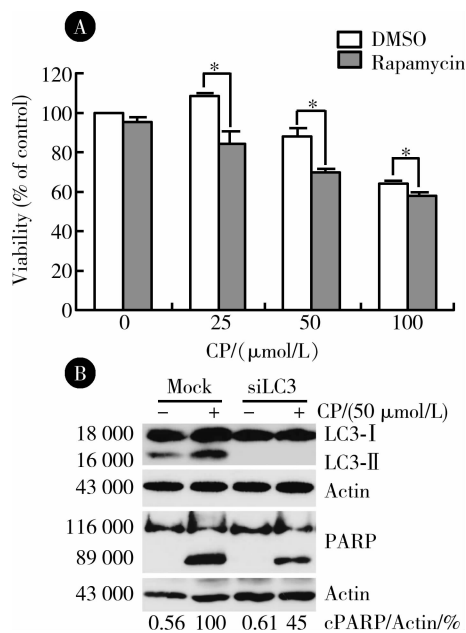
为了进一步验证上述结果, 我们干扰了自噬相关基因 LC3, 之后以顺铂处理。与对照组相比, 敲降 LC3 后, 顺铂引起的 PARP 剪切明显减少 (图 3B)。



T24 cells were treated with cisplatin (50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) for 6, 12, 24 and 48 h and harvested as described in methods. PARP, mTOR, P70S6K and actin were analyzed by immunoblotting with specific antibodies. The gray value represented the amount of protein. p, phosphorylation; t, total.

图2 顺铂引起 T24 细胞 PARP 剪切并抑制 mTOR/P70S6K 磷酸化

Figure 2 Cisplatin induced PARP cleavage and inhibited the phosphorylation of mTOR/P70S6K in T24 cells



A, MTS assay was carried out when cisplatin treated and rapamycin combined with cisplatin (25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h. Data are representatives of three independent experiments and presented as mean  $\pm$  SD. Differences between groups were tested by one-way ANOVA and the result has statistical significance ( $F = 74.890$ ,  $P < 0.01$ ). Differences between two different groups were tested by S-N-K. \*  $P < 0.05$ , indicates a significant difference between the two groups; B, After knocking down of LC3 (siLC3), T24 cells were treated with cisplatin (50  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h. Then, cells were harvested and indicated proteins were analyzed by immunoblotting. Compared to mock (control siRNA), cisplatin-induced PARP cleavage was obviously reduced. c, cleavage.

图3 自噬可调节顺铂引起的细胞存活率下降和 PARP 剪切

Figure 3 Autophagy regulated cisplatin-induced cell viability loss and PARP cleavage

### 3 讨论

顺铂是铂类的代表药物,为非细胞周期性细胞毒化疗药物<sup>[17]</sup>,在膀胱癌化疗中起着决定性的作用<sup>[3]</sup>。文献表明,顺铂可以引起膀胱癌细胞出现细胞凋亡,细胞凋亡的发生是顺铂引起膀胱癌细胞死亡的主要方式<sup>[18]</sup>。自噬是一种细胞降解自身细胞器的方式,同时也是细胞程序性死亡的一种形式,并

且越来越多的研究表明自噬与凋亡存在着内在的联系<sup>[19]</sup>,然而,在膀胱癌的相关研究中,自噬和凋亡的关系从未被涉及。在本研究中,我们通过电子显微镜和免疫荧光检测确定顺铂可以引起膀胱癌细胞 T24 出现细胞自噬,且这一作用出现在细胞凋亡之前。

在其他组织和细胞的研究中,顺铂引起的细胞自噬功能各异。比如,小鼠实验表明,自噬缺陷的小鼠相比对照组,顺铂引起的急性肾损伤更加严重并伴有严重的 DNA 损伤和更多的凋亡细胞<sup>[20]</sup>。在顺铂耐药的肺癌细胞 A549 中,用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)抑制自噬可加强顺铂对癌细胞的生长抑制和促凋亡作用<sup>[21]</sup>,而且同样的结果也发现在食管癌细胞 EC9706 中<sup>[22]</sup>;在喉癌细胞 Hep-2 中使用 3-MA 或敲降 Beclin-1 抑制自噬增强了顺铂引起的细胞凋亡<sup>[23]</sup>;顺铂在肝癌细胞 Huh-7 和 HepG2 中通过下调 miR-199a-5p 进而激活 ATG7 增强自噬,并通过自噬诱导癌细胞耐药<sup>[24]</sup>;人神经胶质瘤细胞 U251 和大鼠神经胶质瘤细胞 C6 通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)进而抑制 mTOR 上调自噬来抵抗顺铂引起的细胞凋亡<sup>[25]</sup>,但是自噬在肿瘤治疗中的作用非常复杂,在不同的药物、不同的肿瘤中的作用以及机制都可能不同<sup>[26]</sup>,因此了解顺铂作用于膀胱癌细胞时,自噬处于何种地位非常重要。在本研究中,设计了自噬加强或者抑制的情况,来观察顺铂对膀胱癌细胞的作用,结果出人意料地发现,在自噬促进剂雷帕霉素存在的情况下,顺铂的杀伤作用加强了,而且当敲降自噬相关基因 LC3 时,PARP 剪切变少,这说明自噬在顺铂治疗膀胱癌中起到促进细胞死亡的作用。

研究表明,顺铂引起膀胱癌细胞凋亡,主要通过 caspase 依赖的信号通路并受 p53、Bax 和 Bcl-2 等蛋白的调节<sup>[18]</sup>。研究发现自噬可能是凋亡的上游,诱导或者促进凋亡;或者是凋亡重要的替代途径,直接诱导细胞死亡<sup>[27]</sup>。本研究中,我们发现自噬的出现早于凋亡的发生,干预自噬可以影响凋亡的过程,但是自噬的两面性给我们在肿瘤治疗中利用它造成了一定困难,因此必须了解自噬与肿瘤细胞死亡的调节机制。目前研究比较热门的调节机制主要有:异常表达的癌基因 *Bcl-2* 可抑制自噬或凋亡,或者同时抑制二者;Erk、Akt、PI3K(I 型)等肿瘤相关信号通路能通过多种途径促进癌细胞存活并抑制自噬;TSC1/TSC2,PTEN,p53 等抑癌因子可激活自噬,此外 DAPk,Beclin-1,p19ARF 以及 UVRAG 等抑癌因

子也直接参与了自噬的调节<sup>[27]</sup>。另外,有研究发现自噬可降解激活的 caspase-8<sup>[28]</sup>,这提示了自噬与凋亡间可能具有反馈调节机制。虽然有大量的研究证据,但是现在对完整的调节机制还不甚明了,因此,在未来的研究中,我们将进一步寻找自噬作用于凋亡的节点和信号通路。

总而言之,自噬可以作为新的靶点设计新的药物或者联合治疗方案<sup>[29-30]</sup>。本实验的结果提示在膀胱癌的治疗中,诱导自噬的药物具有应用前景,因此,联合自噬调节药物和化疗药物可能会成为治疗膀胱癌的一种新手段。

### 参考文献

- [ 1 ] 陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2003-2007年中国癌症发病分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(3): 161-170.
- [ 2 ] von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(21): 4602-4608.
- [ 3 ] 姚欣,王华庆,马腾骧. 膀胱癌系统化疗临床研究新进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(12): 860-863.
- [ 4 ] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. Cell Death Differ, 2011, 19(1): 107-120.
- [ 5 ] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation [J]. Science, 2000, 290(5497): 1717-1721.
- [ 6 ] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.
- [ 7 ] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis [J]. Cancer Cell, 2006, 10(1): 51-64.
- [ 8 ] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2891-2906.
- [ 9 ] Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene [J]. J Clin Invest, 2003, 112(12): 1809-1820.
- [ 10 ] Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma [J]. J Clin Invest, 2007, 117(2): 326-336.
- [ 11 ] Xu Y, Yu H, Qin H, et al. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells [J]. Cancer Lett, 2012, 314(2): 232-243.
- [ 12 ] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36: 2491-2502.
- [ 13 ] Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. Autophagy, 2012, 8(4): 445-544.
- [ 14 ] Liang C. Negative regulation of autophagy [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(12): 1807-1815.
- [ 15 ] Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, et al. Importance of poly (ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant [J]. J Biol Chem, 1998, 273(50): 33533-33539.
- [ 16 ] Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast [J]. Science, 1991, 253(5022): 905-909.
- [ 17 ] Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(4): 307-320.
- [ 18 ] Gonzalez VM, Fuentes MA, Alonso C, et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis [J]. Mol Pharmacol, 2001, 59(4): 657-663.
- [ 19 ] Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, et al. Does autophagy have a license to kill mammalian cells [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 12-20.
- [ 20 ] Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, et al. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Am J Pathol, 2012, 180(2): 517-525.
- [ 21 ] Ren JH, He WS, Nong L, et al. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(1): 75-80.
- [ 22 ] Liu D, Yang Y, Liu Q, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 105-111.
- [ 23 ] Kang R, Wang ZH, Wang BQ, et al. Inhibition of autophagy-potentiated chemosensitivity to cisplatin in laryngeal cancer Hep-2 cells [J]. Am J Otolaryngol, 2012, 33(6): 678-684.
- [ 24 ] Xu N, Zhang J, Shen C, et al. Cisplatin-induced downregulation of miR-199a-5p increases drug resistance by activating autophagy in HCC cell [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(4): 826-831.
- [ 25 ] Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, et al. AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(9B): 3644-3654.
- [ 26 ] Notte A, Leclere L, Michiels C. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(5): 427-434.
- [ 27 ] Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(7): 966-975.
- [ 28 ] Hou W, Han J, Lu C, et al. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis [J]. Autophagy, 2010, 6(7): 891-900.
- [ 29 ] Janku F, Mcconkey DJ, Hong DS, et al. Autophagy as a target for anticancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2011, 8(9): 528-539.
- [ 30 ] Chen S, Rehman SK, Zhang W, et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1806(2): 220-229.

(2012-11-11 收稿)  
( 本 文 编 辑 : 刘 淑 萍 )