

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.06.004

· 基础研究 ·

下调 Beclin1 抑制卵巢癌 A2780/DDP 细胞对顺铂的耐药性

郭云鸿, 田晓予, 邓巧子, 张克群(河南科技大学 第一附属医院 妇产科, 河南 洛阳 471000)

[摘要] **目的:** 探究敲减 Beclin1 表达对卵巢癌细胞 A2780 对顺铂耐药的影响及其相关机制。**方法:** 以 Western blotting 及 qPCR 检测卵巢癌细胞株 A2780 及耐药细胞株 A2780/DDP 中 Beclin1 的表达情况; A2780/DDP 细胞转染 Beclin1 siRNA 后, 用 MTT 法检测细胞对顺铂敏感性的变化, 克隆形成实验检测各组细胞的克隆形成情况, 流式细胞术检测各组细胞的凋亡, MDC 荧光染色检测细胞的自噬情况, Western blotting 检测自噬相关蛋白、溶酶体相关膜蛋白 Lamp-2 以及组织蛋白酶 Cathepsin B 的表达情况。**结果:** 顺铂耐药细胞株 A2780/DDP 中 Beclin1 mRNA 及蛋白的表达水平均明显高于 A2780 细胞株(均 $P < 0.05$), 在 A2780 细胞中加入顺铂刺激后 Beclin1 蛋白的表达水平显著升高($P < 0.05$)。敲减 Beclin1 表达可促进顺铂诱导的 A2780/DDP 细胞的凋亡($P < 0.05$)、抑制细胞自噬的发生($P < 0.05$)、减少细胞克隆形成($P < 0.05$)和增加细胞对顺铂的敏感性($P < 0.05$); Western blotting 结果显示, 敲减 Beclin1 可上调 A2780/DDP 细胞中 cleaved-caspase 3 和 Cathepsin B 的蛋白水平, 下调 Atg3、Atg7、LC3II/I、Lamp-2 的表达水平(均 $P < 0.05$)。**结论:** 敲减 Beclin1 表达可提高 A2780/DDP 细胞对顺铂的敏感性, 其机制可能与调节自噬相关蛋白表达抑制细胞保护性自噬和影响溶酶体功能, 从而促进顺铂诱导耐药细胞凋亡有关。

[关键词] Beclin1; 卵巢癌; A2780 细胞; 顺铂; 耐药; 细胞自噬; 凋亡

[中图分类号] R730.54; R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)06-0615-07

Down-regulation of Beclin1 inhibits the resistance of ovarian cancer A2780/DDP cells for the cisplatin

GUO Yunhong, TIAN Xiaoyu, DENG Qiaozi, ZHANG Kequn (Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Beclin1 knockdown on cisplatin resistance in ovarian cancer A2780 cells and its related mechanisms. **Methods:** The mRNA and protein expressions of Beclin1 in A2780 cells and drug resistant A2780/DDP cells were determined by qPCR and Western blotting. After transfection with Beclin1 siRNA, the sensitivity of A2780/DDP cells to cisplatin was detected by MTT assay; Cell clone formation and apoptosis were detected by the Colony formation assay and Flow cytometry assay, respectively; cell autophagy was monitored by monodansylcadaverin (MDC) staining. Furthermore, the protein levels of cell autophagy related proteins, lysosomal associated membrane protein Lamp-2 and Cathepsin B were detected by Western blotting. **Results:** The mRNA and protein expression levels of Beclin1 in cisplatin-resistant A2780/DDP cells were significantly higher than those in A2780 cells (all $P < 0.05$). The expression of Beclin1 was significantly increased in A2780 cells after treated with cisplatin ($P < 0.05$). Beclin1 knockdown promoted cisplatin induced apoptosis of A2780/DDP cells ($P < 0.05$), inhibited autophagy and cell colony formation (all $P < 0.05$), and increased cell sensitivity to cisplatin ($P < 0.05$). Meanwhile, Western blotting showed that Beclin1 knockdown increased the protein levels of cleaved-caspase 3 and Cathepsin B in A2780/DDP cells, while down-regulated the protein expressions of Atg3, Atg7, LC3II/I and Lamp-2 (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Beclin1 knockdown can improve the sensitivity of A2780/DDP cells to cisplatin, and the mechanism may be related to the inhibition of protective autophagy of cells by regulating the expressions of autophagy related proteins, and the regulation of lysosomes, thus further promoting cisplatin-induced apoptosis of drug-resistant cells.

[Key words] Beclin1; ovarian cancer; A2780 cells; cisplatin; drug-resistant; cell autophagy; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(6): 615-621. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.004]

卵巢癌(ovarian cancer)是妇科常见的恶性肿瘤之一,严重威胁着妇女的身心健康^[1]。由于卵巢癌早期确诊率低,大部分患者确诊时已进入晚期;且最初以顺铂为基础的化疗药物对大多数患者治疗效果好,然而最终的结果显示导致患者死亡的主要原因是化疗药物的耐受^[2-3]。虽然目前仍无法阐释卵巢癌

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(No. 201503140)。Project supported by Medical Science and Technology Key Research Program of Henan Province (No. 201503140)

[作者简介] 郭云鸿(1974-),女,硕士,副主任医师,主要从事妇科肿瘤的基础与临床方面的研究, E-mail: guoyunhong4433@aliyun.com

[通信作者] 田晓予(TIAN Xiaoyu, corresponding author), 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, E-mail: tianxiaoyu@sohu.com

顺铂耐受的确切机制,但研究表明,化疗药物耐受的肿瘤细胞会出现多种改变,例如细胞修复、凋亡、基因突变、肿瘤微环境的变化等^[4-5]。故而探讨肿瘤细胞对顺铂等化疗药物的耐药性及其产生机制,寻找逆转耐药性的潜在方法策略,对于提高卵巢癌的临床治疗效果具有非常重要的意义。

自噬(autophagy)过程是细胞内的一种自我吞噬过程,可维持细胞的代谢平衡以及内环境的稳态;然而过度的自噬也可导致细胞死亡^[6-7]。Beclin1基因位于人染色体17q21上,是最早被发现的一个自噬调控基因^[8]。Beclin1不仅参与影响自噬体的形成,还可通过调节自噬活性参与影响肿瘤的发生发展^[9-10]。YANG等^[11]的研究显示,miR-30a-5p可通过抑制Beclin1影响细胞周期和凋亡,进而提高小细胞肺癌对化疗药物的敏感性。JU等^[12]的研究表明,Beclin1在卵巢癌组织中表达显著升高,且与肿瘤的FIGO分期显著相关;此外顺铂(cisplatin)敏感患者的Beclin1阳性表达率较低,提示Beclin1可能参与调控卵巢癌的发生发展,但是Beclin1在卵巢癌细胞A2780化疗耐药中的作用及相关机制目前并没有明确的诠释。本课题通过小分子干扰RNA敲减卵巢癌耐药细胞株A2780/DDP中Beclin1的表达,观察Beclin1在卵巢癌细胞A2780对顺铂耐药中的作用,并从细胞增殖、凋亡和自噬等方面探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞和主要试剂

卵巢癌细胞株A2780及卵巢癌耐药细胞株A2780/DDP购买于中科院上海细胞库。胎牛血清(FBS)、RPMI-1640及Opti-MEM培养基均购买于美国Gibco公司,Beclin1 siRNA、阴性对照siRNA(negative control siRNA, NC siRNA)、细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, LipofectAMINE²⁰⁰⁰及相关转染试剂由美国Invitrogen公司提供,Beclin1、Atg3、Atg7抗体购自美国Abcam公司,cleaved-caspase 3、caspase3、LC3II/I、Lamp-2、Cathepsin B及 β -actin抗体购于美国Santa Cruz公司,SYBR Green I real-time PCR kit由上海吉玛制药技术有限公司提供,MTT细胞计数分析试剂盒及单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)购自美国Sigma公司,顺铂购自山东齐鲁制药有限公司。其余试剂均为国产市售分析纯。

1.2 细胞培养、分组及转染

卵巢癌细胞株A2780及卵巢癌耐药细胞株A2780/DDP常规培养于含10% FBS的RPMI-1640完全培养基中,培养条件设置为37℃、5% CO₂、饱和湿

度。为维持耐药性,A2780/DDP的培养基中需另加终浓度为2 nmol/L的顺铂。所有细胞均隔天换液1次,每隔3~4 d用0.25%胰蛋白酶进行消化和传代。过表达质粒的转染:首先将生长状态良好、密度为 2×10^5 个/ml的A2780/DDP细胞接种至6孔板中,待细胞生长至60%~80%汇合度时进行转染。组别设置为空白对照组(Control, Ctrl)、阴性对照组(negative control siRNA, NC-siRNA)和Beclin1干扰组(Beclin1 siRNA, si-Beclin1)3组,每组设3个平行孔。取LipofectAMINE²⁰⁰⁰,溶解于Opti-MEM培养基中,室温孵育5 min,标记为A液;同时将Beclin1 siRNA和NC siRNA分别溶解于Opti-MEM培养基中,室温孵育5 min,标记为B液。之后将A液和B液轻轻混匀,室温孵育25 min,待其形成复合体。最后将复合体加入到相应组别的细胞中,转染6 h后更换为正常细胞培养基继续培养48 h。收集细胞进行蛋白检测以分析转染效率。

1.3 qPCR检测转染前后细胞中Beclin1 mRNA表达

采用TRIzol一步法抽提细胞总RNA。取2 μ g总RNA经逆转录酶合成cDNA,之后采用SYBR Green实时荧光PCR方法检测Beclin1 mRNA的表达。Beclin1的正向引物为5'-AAGACAGAGCGATGGTAG-3',反向引物为5'-CTGGGCTGTGGTAAGTAA-3'; β -actin为内参,其正向引物为5'-TGGACATCCGCAAAGAC-3';反向引物为5'-GAAAGGGTGTAACGCAACTA-3'。PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃45s、60℃30s,共42个循环。记录并分析循环数Ct值,计算目的基因的相对拷贝量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。实验重复4次。

1.4 MTT法检测卵巢癌细胞对顺铂的敏感性

采用MTT法检测顺铂对A2780、A2780/DDP和已转染Beclin1 siRNA的A2780/DDP细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。将生长状态良好的细胞接种于96孔板中(细胞密度为 1×10^5 个/ml),待细胞生长至80%~90%汇合度时更换培养基为无血清培养基同步化12 h,然后加入终浓度分别为0、10、20、40、80、120、160 μ mol/L的顺铂,继续培养48 h,加入20 μ l的MTT试剂孵育2 h,弃培养基后加入150 μ l的DMSO,低速振摇10 min,经酶标仪测定490 nm波长处的光密度值(D),计算顺铂的IC₅₀。实验重复4次。

1.5 克隆形成实验检测各组细胞克隆数

将转染前后各组A2780/DDP细胞接种至培养皿中(500个/皿),轻柔晃动使细胞均匀分散,待细胞贴壁生长后更换为无血清的培养基同步化12 h,然后加入含顺铂(终浓度为10 μ mol/L)的培养基,置于细胞培养箱中培养14 d。待细胞培养皿上出现明显的细胞克隆后,终止培养并加入甲醇固定液处理细胞约

15 min, 而后加入 Giemsa 染液染色 10 min; 去除染液后将培养皿置于空气中干燥。最后在显微镜下计数细胞克隆集落数(以>10 个细胞为 1 个集落), 并计算细胞克隆集落形成率。实验重复 4 次。

1.6 流式细胞术检测各组细胞的凋亡状况

将转染前后各组 A2780/DDP 细胞接种至 6 孔板(细胞密度为 1×10^6 个/ml), 然后加入含顺铂(终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$)的培养基, 置于细胞培养箱中培养 24 h。细胞经不含 EDTA 的胰蛋白酶消化后离心收集, 加入结合缓冲液重悬细胞, 加 Annexin V-FITC 至细胞悬液混匀, 避光染色孵育 15 min; 然后加 PI 染液, 避光孵育 10 min, 采用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。检测条件为激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 实验重复 4 次。

1.7 MDC 免疫荧光法检测各组细胞的自噬状况

将转染前后各组细胞接种于细胞培养皿中(细胞密度为 1×10^6 个/ml), 然后加入含顺铂(终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$)的培养基, 置于细胞培养箱中培养 24 h 后, 更换为含 $50 \mu\text{mol/L}$ MDC 的新鲜细胞培养基于细胞培养箱中孵育 1 h, 加 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗后, 经荧光显微镜观察并拍照, 判断细胞的自噬程度。实验重复 4 次。

1.8 Western blotting 检测细胞中 cleaved caspase-3 和自噬相关蛋白的表达

经蛋白裂解液提取各组细胞的蛋白样品, 用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 调整各组蛋白上样量(保证每组蛋白量为 $80 \mu\text{g}$)后加入加样缓冲液, 经 $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴变性 5 min。上样后行 SDS-PAGE, 将分离的蛋白于冰浴条件下电转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶室温振摇封闭 90 min, 加入一抗[Beclin1 (1:2 000 稀释)、Atg3 (1:1 000 稀释)、Atg7 (1:1 000 稀释)、cleaved-caspase 3 (1:3 000 稀释)、caspase3 (1:5 000 稀释)、LC3II/I (1:1 000 稀释)、Lamp-2 (1:4 000 稀释)、Cathepsin B (1:3 000 稀释)和 β -actin (1:8 000 稀释)]于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 次日复温后经 TBST 洗涤 5 min, 3 次; 分别加入二抗 HRP 标记 IG(H+L) (1:4 000 稀释), 室温振摇孵育 120 min, TBST 洗涤 10 min 3 次。于暗室中将 PVDF 膜的蛋白面浸入 HRP-ECL 发光液中, 压 X 片、显影并定影, 冲洗胶片。采用 Image J 灰度分析软件进行蛋白半定量分析。实验重复 4 次。

1.9 统计学处理

将本组研究涉及数据录入 SPSS17.0 标准版统计软件包行数据分析, 正态分布的计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用方差分析, 计数数据间两两比较采用 Bonferroni 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Beclin1 表达与卵巢癌细胞 A2780 顺铂敏感性相关

MTT 结果(图 1A)显示, 在 $20 \sim 160 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围的顺铂处理下, A2780/DDP 细胞的细胞增殖活力明显高于 A2780 细胞($P < 0.05$), 其中 A2780 细胞对顺铂的 $\text{IC}_{50} = (42.43 \pm 1.14) \mu\text{mol/L}$, A2780/DDP 细胞对顺铂的 $\text{IC}_{50} = (123.7 \pm 2.15) \mu\text{mol/L}$, 结果表明 A2780/DDP 细胞对顺铂的耐药性显著强于 A2780 细胞。同时 qPCR 及 Western blotting 结果(图 1B、C)显示, A2780/DDP 中 Beclin1 mRNA 及蛋白的表达水平均明显高于 A2780 细胞株(均 $P < 0.05$); 并且在 A2780 细胞中加入梯度顺铂后, Beclin1 的蛋白表达水平呈现剂量依赖性升高(图 1D), 提示 Beclin1 可能与卵巢癌细胞 A2780 顺铂耐药之间存在相关关系。

2.2 敲减 Beclin1 使耐药细胞株 A2780/DDP 顺铂敏感性增加

Western blotting 结果(图 2A)显示, 转染 Beclin1 siRNA 后, A2780/DDP 细胞中 Beclin1 蛋白的表达水平显著降低($P < 0.05$)。MTT 实验结果(图 2B)显示, 敲减 Beclin1 表达后, A2780/DDP 细胞对顺铂的敏感性明显增加($P < 0.05$); 其中敲减 Beclin1 表达后顺铂对 A2780/DDP 细胞的 IC_{50} 为 $(55.35 \pm 3.62) \mu\text{mol/L}$, 明显低于敲减前的 $(123.7 \pm 2.15) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$)。

2.3 敲减 Beclin1 对耐药细胞株 A2780/DDP 克隆和凋亡的影响

细胞克隆形成实验的结果(图 3A)显示, 在 $10 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下, 敲减 Beclin1 表达的 A2780/DDP 细胞的相对克隆形成率由 $(53.27 \pm 3.41)\%$ 降低至 $(32.46 \pm 2.57)\%$ ($P < 0.05$), 表明在 $10 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下, 敲减 Beclin1 可明显抑制 A2780/DDP 细胞的克隆形成能力。

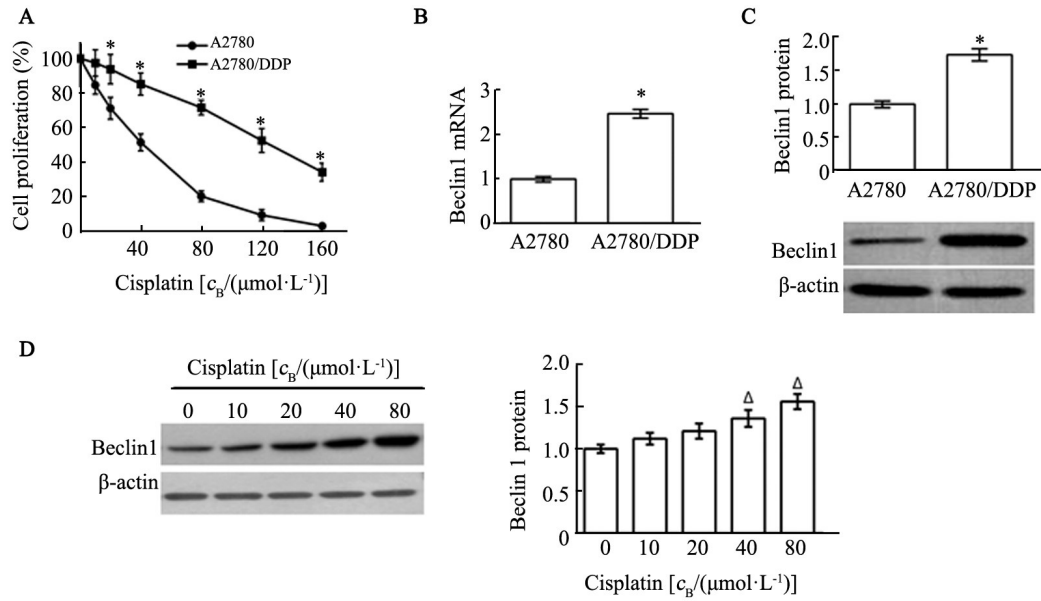
流式细胞术检测细胞凋亡结果(图 3B)显示, 在 A2780/DDP 细胞中转染 Beclin1 siRNA 之后, 顺铂 ($10 \mu\text{mol/L}$) 所致的细胞早期凋亡率由 $(12.27 \pm 2.29)\%$ 增加至 $(33.82 \pm 3.15)\%$ ($P < 0.05$), 中晚期细胞凋亡/细胞坏死率由 $(8.23 \pm 2.14)\%$ 增加至 $(10.16 \pm 2.47)\%$, 同时细胞中 cleaved-caspase 3 的表达(图 3C)显著升高($P < 0.05$)。结果表明, 敲减 Beclin1 可显著促进顺铂诱导的 A2780/DDP 细胞的凋亡。

2.4 敲减 Beclin1 对耐药细胞株 A2780/DDP 自噬的影响

MDC 荧光染色后荧光显微镜下可见(图 4A)显示, 低浓度的顺铂 ($10 \mu\text{mol/L}$) 可刺激 A2780/DDP 细胞出现自噬, 而敲减 Beclin1 表达的 A2780/DDP 细胞中的荧光颗粒减少, 自噬囊泡的数量也明显减少。

Western blotting 结果(图 4B)显示,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下,敲减 Beclin1 表达的 A2780/DDP 细胞 LC3II/I 的表达显著降低($P<0.05$),说明出现 LC3I 向 LC3II 的

转换。以上结果表明,敲减 Beclin1 可显著降低顺铂诱导 A2780/DDP 细胞的自噬水平。

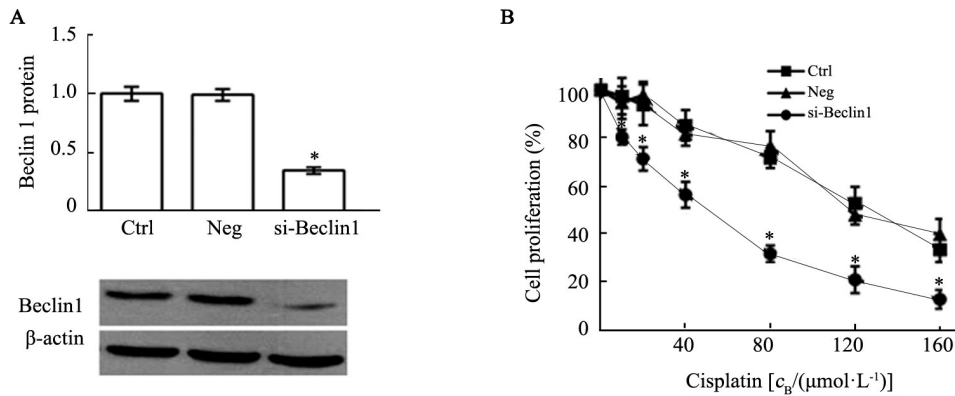


* $P<0.05$ vs A2780 cells; $\Delta P<0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$

A: The cell proliferation viabilities of A2780 and A2780/DDP cells after treated with various concentrations of cisplatin; B: The mRNA expression level of Beclin1 in the A2780 and A2780/DDP cells. C: The protein expression level of Beclin1 in the A2780 and A2780/DDP cells. D: The protein expression of Beclin1 was increased in the A2780 cells after treated with various concentrations of cisplatin

图 1 Beclin1 的表达与卵巢癌细胞系 A2780 顺铂耐药之间的关系

Fig.1 The relationship between Beclin1 expression and cisplatin-resistance in ovarian cancer cell line A2780



* $P<0.05$ vs Ctrl or 0 $\mu\text{mol/L}$ group

A: The expression of Beclin1 in the A2780/DDP cells after transfected with Beclin1 siRNA; B: The cell viabilities of A2780/DDP cells transfected with or without Beclin1 siRNA after treated with various concentrations of cisplatin

图 2 敲减 Beclin1 对 A2780/DDP 细胞的顺铂敏感性的影响

Fig.2 Effect of Beclin1 knockdown on the cisplatin-sensitivity of A2780/DDP cells

2.5 敲减 Beclin1 对自噬相关基因表达和溶酶体功能的影响

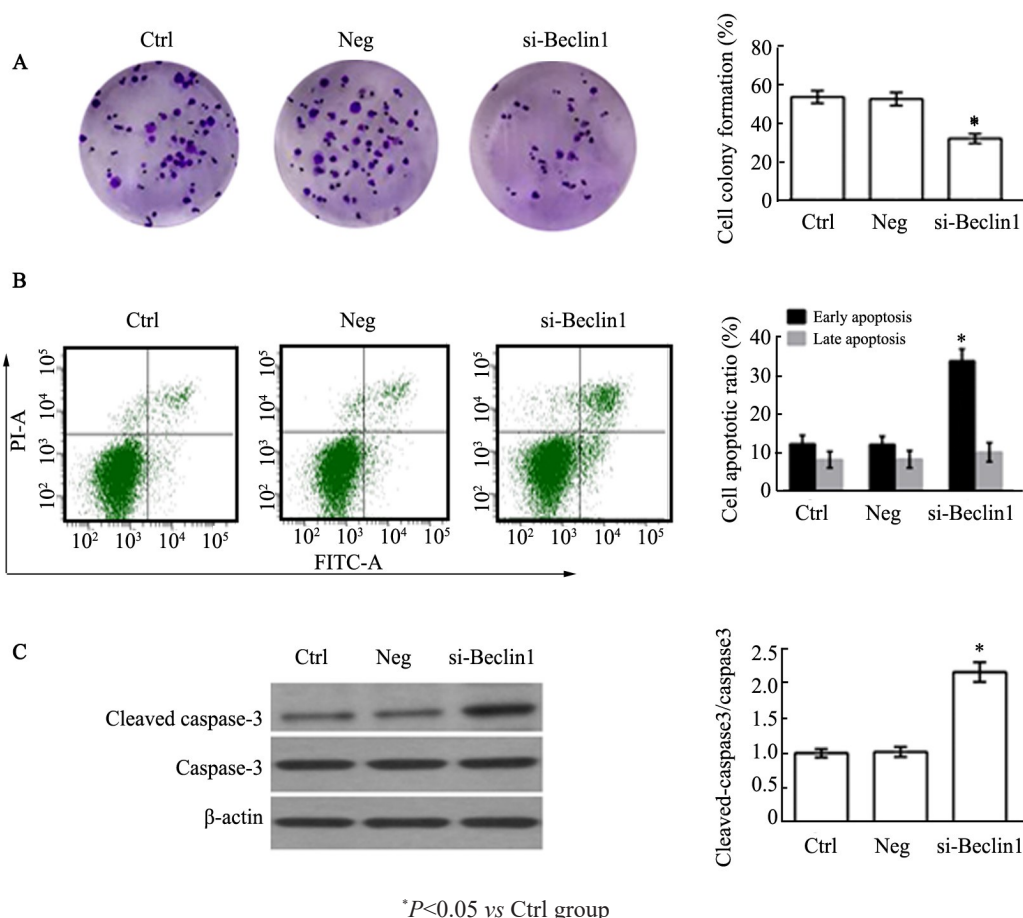
Western blotting 结果(图 5)显示,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下,敲减 Beclin1 表达的 A2780/DDP 细胞中自噬相关基因 Atg3 和 Atg7 的蛋白水平明显降低($P<0.05$),提示敲减 Beclin1 可抑制自噬相关基因

Atg3 和 Atg7 的表达。

自噬体形成后,会与溶酶体融合,之后再经蛋白质水解酶进行降解。溶酶体相关膜蛋白 2(Lamp-2)参与维持溶酶体膜的完整性,可用于监测自噬体与溶酶体的融合。实验结果(图 5)显示,在 10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下,敲减 Beclin1 表达的 A2780/DDP 细胞中

Lamp-2 的表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。溶酶体内含有大量的水解酶, 其中 CathepsinB 是含量最丰富、功能最主要的一种, 不仅可降解肿瘤细胞的基质蛋白, 影响细胞的转移及浸润, 还可促进溶酶体介导的细

胞凋亡。本实验结果(图 5)显示, 在 $10 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下, 敲减 Beclin1 可上调 A2780/DDP 中 CathepsinB 的表达, 结果提示敲减 Beclin1 可影响溶酶体的功能, 进而降低肿瘤细胞的自噬。



A: Effect of Beclin1 knockdown on cell colony formation in A2780/DDP cells after treated with $10 \mu\text{mol/L}$ cisplatin;

B: Effect of Beclin1 knockdown on apoptosis in A2780/DDP cells after treated with $10 \mu\text{mol/L}$ cisplatin;

C: Expression of proteins related apoptosis in A2780/DDP cells

图3 敲减 Beclin1 对 $10 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下的 A2780/DDP 细胞克隆形成和凋亡的影响

Fig.3 Effect of Beclin1 knockdown on colony formation and apoptosis in A2780/DDP cells treated with $10 \mu\text{mol/L}$ cisplatin

3 讨论

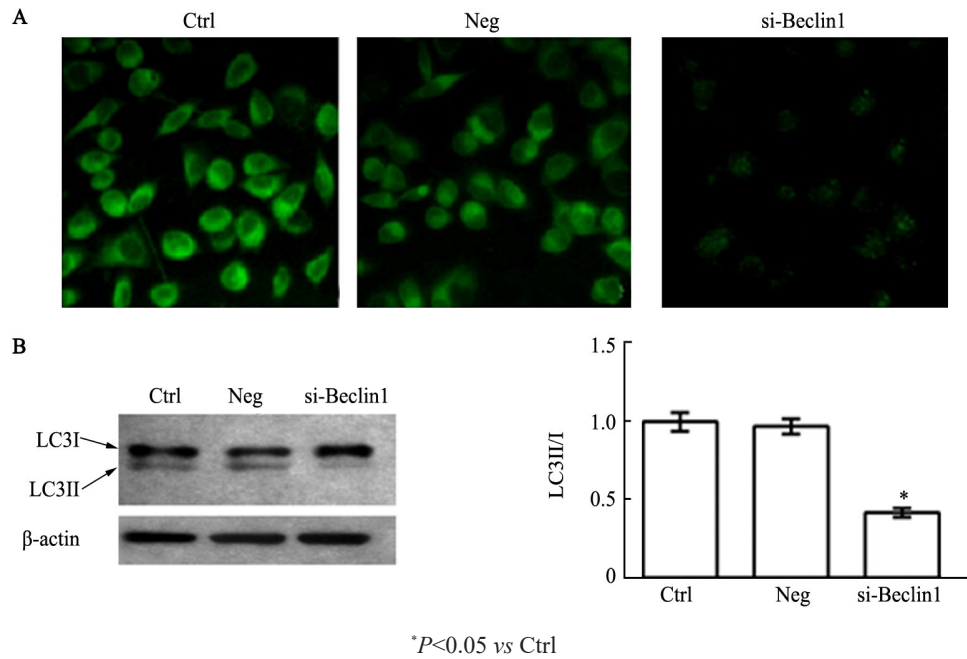
Beclin1 已被证实参与影响包括卵巢癌在内的多种肿瘤的进展^[10-12]。本研究显示, 在卵巢癌耐药细胞株 A2780/DDP 中 Beclin1 mRNA 及蛋白的表达水平均显著高于 A2780 细胞株; 在 A2780 细胞中加入梯度浓度的顺铂后, Beclin1 的蛋白表达水平呈现剂量依赖性升高; 此外通过转染 Beclin1 siRNA 下调耐药细胞 A2780/DDP 中 Beclin1 的表达可提高细胞对顺铂的敏感性。因此认为, Beclin1 参与调控卵巢癌细胞 A2780 的顺铂耐药性。

肿瘤细胞化疗耐受性的出现往往与肿瘤细胞自身生物学行为的改变密不可分。为进一步了解 Beclin1 调控卵巢癌细胞 A2780 顺铂耐药的作用机

制, 本实验在 $10 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下敲减 Beclin1 表达可显著抑制耐药细胞 A2780/DDP 的克隆集落形成和促进顺铂诱导的细胞凋亡, 表明敲减 Beclin1 可引起卵巢癌耐药细胞增殖与凋亡的失衡, 促进顺铂所致的细胞死亡, 进而提高细胞对化疗药物的敏感性。在许多情况下, 肿瘤区可因乏氧、营养受限以及失调的细胞增殖而需要更多的代谢物质, 故而高水平的自噬有利于胞内物质的循环利用, 可促进肿瘤细胞的增殖^[13-14]。本实验进一步检测了敲减 Beclin1 对耐药细胞自噬的影响, 结果显示, 在 $10 \mu\text{mol/L}$ 顺铂处理下转染 Beclin1 siRNA 可下调细胞中 LC3II/I 的表达, 降低耐药细胞的自噬水平。众所周知, 细胞的自噬是一个高度保守的细胞活动, 接受自噬相关基因 (autophagy associated gene, Atg) 的精细调控^[15]。故

而本研究检测了敲减 Beclin1 对自噬相关基因的影响,结果发现,在 10 μmol/L 顺铂处理下,敲减 Beclin1 可下调耐药细胞 A2780/DDP 中 Atg3 和 Atg7 的表达,表明敲减 Beclin1 可抑制自噬相关基因的表达,进而降低细胞的基础自噬水平,抑制耐药的保护性自噬。溶酶体作为细胞内各种物质降解的核心细胞器,不仅对维持细胞内环境的稳定起着至关重要的作用,也是自噬过程必需的细胞器之一^[16-17]。LIU 等^[18]研究

提示,破坏溶酶体可导致包括 CathepsinB 在内的酶释放进入胞质,并启动细胞凋亡。本研究结果显示,在 10 μmol/L 顺铂处理下,敲减 Beclin1 表达可减低 Lamp-2 的表达,同时上调 CathepsinB 的表达,提示敲减 Beclin1 可影响溶酶体的功能,进而促进 A2780/DDP 的凋亡;但是其具体的调控机制还有待进一步深入的研究。



A: Effect of Beclin1 knockdown on Acidic vesicular organelles formation in A2780/DDP cells after treated with 10 μmol/L cisplatin was detected by MDC staining (×200); B: Effect of Beclin1 knockdown on the expression of LC3II/I in A2780/DDP cells after treated with 10 μmol/L cisplatin was detected by Western blotting assay

图4 在 10 μmol/L 顺铂处理下敲减 Beclin1 对 A2780/DDP 细胞自噬的影响(×200)

Fig.4 Effect of Beclin1 knockdown on cell autophagy in A2780/DDP cells treated with 10 μmol/L cisplatin (×200)

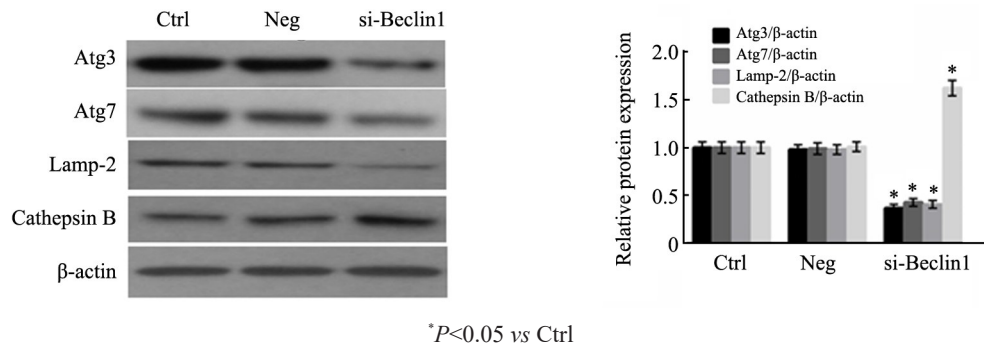


图5 在 10 μmol/L 顺铂处理下敲减 Beclin1 对 A2780/DDP 细胞的自噬相关蛋白表达和溶酶体功能的影响

Fig.5 Effect of Beclin1 knockdown on the expression of proteins related autophagy and function of lysosomes in A2780/DDP cells treated with 10 μmol/L cisplatin

综上所述,在卵巢癌耐药细胞 A2780/DDP 中抑制 Beclin1 可增加细胞对顺铂的敏感性,其中的涉及的作用机制可能与调节自噬相关基因及蛋白的表达导致抑制细胞保护性自噬,同时影响溶酶体的功能,

从而促进顺铂诱导的耐药细胞凋亡有关。

[参考文献]

[1] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer

- statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4): 284-296. DOI: 10.3322/caac.21456.
- [2] JESSMON P, BOULANGER T, ZHOU W, et al. Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer[J]. *Expert Rev Anti-cancer Ther*, 2017, 17(5): 427-437. DOI: 10.1080/14737140.2017.1299575.
- [3] NAROD S. Can advanced-stage ovarian cancer be cured[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(4): 255-261. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.224.
- [4] DAUER P, NOMURA A, SALUJAA, et al. Microenvironment in determining chemo-resistance in pancreatic cancer: neighborhood matters[J]. *Pancreatol*, 2017, 17(1): 7-12. DOI: 10.1016/j.pan.2016.12.010.
- [5] NOROUZI-BAROUGH L, SAROOKHANI M R, SHARIFI M, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(6): 4546-4562. DOI: 10.1002/jcp.26289.
- [6] LEVY J M M, TOWERS C G, THORBURN A. Targeting autophagy in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 528-542. DOI: 10.1038/nrc.2017.53.
- [7] PARZYCH K R, KLIONSKY D J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 460-473. DOI: 10.1089/ars.2013.5371.
- [8] SAHNI S, MERLOT A M, KRISHAN S, et al. Gene of the month: BECN1[J]. *J Clin Pathol*, 2014, 67(8): 656-660. DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202356.
- [9] HUANG F, WANG B R, WANG Y G. Role of autophagy in tumorigenesis, metastasis, targeted therapy and drug resistance of hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(41): 4643-4651. DOI: 10.3748/wjg.v24.i41.4643.
- [10] FU L L, CHENG Y, LIU B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(5): 921-924. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.02.007.
- [11] YANG X, BAI F, XU Y, et al. Intensified Beclin-1 mediated by low expression of miR-30a-5p promotes chemoresistance in human small cell lung cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 1126-1139. DOI: 10.1159/000481754.
- [12] JU L L, ZHAO C Y, YE K F, et al. Expression and clinical implication of Beclin1, HMGB1, p62, survivin, BRCA1 and ERCC1 in epithelial ovarian tumor tissues[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(10): 1993-2003.
- [13] LI Y J, LEI Y H, YAO N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 52. DOI: 10.1186/s40880-017-0219-2.
- [14] BHAT P, KRIEL J, SHUBHA Priya B, et al. Modulating autophagy in cancer therapy: advancements and challenges for cancer cell death sensitization[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 147: 170-182. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.11.021.
- [15] YIN Z, PASCUAL C, KLIONSKY D J. Autophagy: machinery and regulation[J]. *Microb Cell*, 2016, 3(12): 588-596. DOI: 10.15698/mic2016.12.546.
- [16] NAKAMURA S, YOSHIMORI T. New insights into autophagosome-lysosome fusion[J]. *J Cell Sci*, 2017, 130(7): 1209-1216. DOI: 10.1242/jcs.196352.
- [17] PIAO S, AMARAVADI R K. Targeting the lysosome in cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2016, 1371(1):45-54. DOI: 10.1111/nyas.12953.
- [18] LIU L, ZHANG N, DOU Y, et al. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to IMB-6G-induced apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41862. DOI: 10.1038/srep41862.

[收稿日期] 2020-02-15

[修回日期] 2020-05-08

[本文编辑] 韩丹