



· 论 著 ·

干预自噬影响DPD的表达促进5-FU抗结直肠癌疗效的实验研究

崔忠泽, 何 双, 温菲菲, 李扬扬, 许晓阳, 路丽祯, 吴淑华

滨州医学院附属医院病理科, 山东 滨州 256600

[摘要] 背景与目的: 结直肠癌作为常见的消化系统恶性肿瘤之一, 其化疗与耐药一直以来备受关注, 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是结直肠癌的一线化疗药物, 其疗效常因耐药或不良反应而受到影响。二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)是5-FU代谢的关键限速酶, 其表达或降解可能成为影响5-FU疗效的因素。自噬是细胞内蛋白质代谢的重要途径, 其在化疗诱导的细胞死亡或增殖抑制中的作用仍存在争议。本研究旨在探讨自噬在结直肠癌化疗过程中的作用以及干预自噬影响5-FU耐药的机制。方法: 体外细胞培养人结肠癌HCT-8、COLO205、LOVO和SW480细胞系, 观察不同细胞系中DPD的表达对5-FU敏感性的影响, 通过药物敏感性实验筛选出5-FU敏感细胞, 检测5-FU敏感细胞株及其相对应的耐药细胞株中DPD的表达、自噬水平及自噬关键因子微管相关蛋白轻链3(light chain 3, LC3)、P62的表达, 并通过诱导/抑制细胞自噬, 观察调控自噬状态对DPD的表达变化以及肿瘤细胞生物学行为和化疗抵抗能力的影响, 通过UbiBrowser数据库筛选及免疫共沉淀实验(co-immunoprecipitation, Co-IP)实验验证DPD降解过程中的E3连接酶, 探讨自噬降解DPD逆转5-FU耐药的分子机制。结果: DPD低表达的细胞系对5-FU的敏感性更强, 其中COLO205细胞系在4种细胞中DPD表达量最高, 并对5-FU的耐药性最强, 而HCT-8细胞DPD表达最低并对5-FU最为敏感。与HCT-8细胞相比, HCT-8/FU耐药细胞表达较高水平的DPD, 以及较低的基础自噬水平; 雷帕霉素(rapamycin, RAPA)介导的自噬激活增强了细胞的自噬水平, 降低了DPD表达, 同时降低了细胞增殖、侵袭和5-FU耐药性; 3甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)及羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)介导的自噬抑制减弱了细胞的自噬水平, 增加了DPD表达, 增强了5-FU耐药性。5-FU与自噬激活剂联合应用对细胞的抑效果要远远强于单用5-FU及与自噬抑制剂联合应用的效果; DPD的降解需要完整的自噬流的参与, 其中自噬溶酶体的形成是DPD降解的关键步骤之一, 而单一的自噬体无法对DPD进行降解。E3连接酶NEDD4在HCT-8/5-FU细胞中与DPD和P62蛋白免疫共沉淀, 在DPD的自噬降解中发挥作用。结论: 自噬参与DPD降解影响结直肠癌细胞对化疗药物的敏感性, 激活自噬可促进DPD降解和抑制5-FU的分解代谢, 可能成为逆转结直肠癌5-FU耐药的新途径。

[关键词] 结直肠肿瘤; 二氢嘧啶脱氢酶; 自噬; 轻链3; P62

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2022.12.008

中图分类号: R735.3+4 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2022)12-1199-11

Experimental study on influence of autophagy on DPD expression and its effect on chemotherapy with 5-FU in colorectal cancer CUI Zhongze, HE Shuang, WEN Feifei, LI Yangyang, XU Xiaoyang, LU Lizhen, WU Shuhua (Department of Pathology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou, 256600, Shandong Province, China)

Correspondence to: WU Shuhua, E-mail: wsh6108@126.com.

[Abstract] **Background and purpose:** Colorectal cancer is one of the most common digestive system malignancies, and chemotherapy for colorectal cancer and drug resistance have always been concerns. 5-fluorouracil (5-FU) is the first-line chemotherapy drug for colorectal cancer, and its efficacy is often affected by drug resistance or adverse reactions. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is a key rate-limiting enzyme in 5-FU metabolism, and its expression or degradation may be a factor affecting the efficacy of 5-FU. Autophagy is an important pathway of intracellular protein metabolism, and its role in chemotherapy-induced

基金项目: 国家自然科学基金(81772637)。

第一作者: 崔忠泽 (ORCID: 0000-0003-2145-2156) 硕士研究生。

通信作者: 吴淑华 (ORCID: 0000-0001-5996-8057) 硕士研究生导师, 教授, 主任医师, E-mail: wsh6108@126.com。

cell death or proliferation inhibition is still controversial. This study aimed to investigate the role of autophagy in colorectal cancer chemotherapy and the mechanism by which autophagy affects 5-FU drug resistance. **Methods:** Human colon cancer HCT-8, COLO205, LOVO and SW480 cell lines were cultured *in vitro* to observe the effect of DPD expression on 5-FU sensitivity. 5-FU sensitive cells were screened by drug sensitivity test. The expression of DPD, the level of autophagy and the expressions of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) and P62 in 5-FU-sensitive cell lines and their corresponding drug-resistant cell lines were detected. The effect of autophagy on the expression of DPD and the biological behavior and chemotherapy resistance of tumor cells were observed. UbiBrowser database screening and co-immunoprecipitation (Co-IP) experiment were used to verify the E3 ligase in the process of DPD degradation, and to investigate the molecular mechanism of reversing 5-FU resistance caused by autophagy degradation of DPD. **Results:** The COLO205 cell line had the highest DPD expression and was the most resistant to 5-FU, while the HCT-8 cell line had the lowest DPD expression and was the most sensitive to 5-FU. Compared with HCT-8/5-FU cells, HCT-8/5-FU-resistant cells expressed higher levels of DPD and lower levels of basal autophagy. Rapamycin (RAPA)-mediated autophagy activation enhanced the autophagy level, decreased the expression of DPD, and decreased cell proliferation, invasion and 5-FU resistance. The inhibition of autophagy mediated by 3-Methyladenine (3-MA) and hydroxychloroquine (HCQ) attenuated the autophagy level, increased the expression of DPD, and enhanced the drug resistance of 5-FU. The inhibitory effect of 5-FU combined with autophagy activator was much stronger compared with 5-FU alone or combined with autophagy inhibitor. The degradation of DPD required the participation of complete autophagic flow, among which the formation of autophagic lysosomes was one of the key steps of DPD degradation, however a single autophagosome could not degrade DPD. E3 ligase NEDD4 co-immunoprecipitated with DPD and P62 proteins in HCT-8/5-FU cells and played a role in autophagic degradation of DPD. **Conclusion:** The involvement of autophagy in DPD degradation affects the sensitivity of colorectal cancer cells to chemotherapy drugs. Activation of autophagy can promote the degradation of DPD and inhibit the catabolism of 5-FU, which may be a new way to reverse 5-FU resistance in colorectal cancer.

[**Key word**] Colorectal cancer; Dihydropyrimidine dehydrogenase; Autophagy; Light chain 3; P62

结直肠癌是中国发病率第3位的恶性肿瘤^[1]。目前,对结直肠癌患者的临床一线化疗方法主要仍为以5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)为基础的传统化疗方法^[2],且由于部分患者在临床治疗中存在着耐药性和不良反应,导致治疗效果较差,进而影响患者的预后。

5-FU耐药机制十分复杂,5-FU代谢酶异常是引起5-FU耐药的重要机制之一^[3,4]。其中5-FU代谢的限速酶二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD),在此过程中起到了重要的作用^[5]。大量实验及本课题组的前期研究都表明,在部分结直肠癌中DPD呈高表达,且与患者的耐药及预后有关^[3,6]。因此,深入研究DPD的表达及其作用机制,探索逆转结直肠癌5-FU耐药的新途径,对于进一步提高5-FU的临床抗肿瘤效果、改善结直肠癌患者的生存预后具有重要的意义。

自噬是多步骤的细胞内蛋白降解途径^[7],在保持细胞代谢、稳态方面发挥着重要的作用。本文研究了自噬在调节结直肠癌DPD表达和5-FU耐药中的作用及机制。应用5-FU敏感和耐药的

人结肠癌细胞系,检测DPD及自噬-溶酶体途径的关键因子轻链3(light chain 3, LC3)^[8]、P62^[9-11]的表达,并通过调控自噬水平,观察其对5-FU疗效的影响,评估其在肿瘤细胞中对5-FU耐药作用的影响。同时利用生物信息学分析预测并验证参与自噬溶酶体途径的E3连接酶NEDD4^[12]与P62及DPD的关系,探讨自噬降解DPD的分子机制,为逆转结直肠癌5-FU耐药提供了新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

人结肠腺癌细胞系HCT-8、COLO205、LOVO和SW480及耐药细胞株HCT-8/5-FU均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,PRMI-1640培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司, β -actin、P62、LC3、DPD抗体购自英国Abcam公司,吉姆萨染液购自北京索莱宝科技有限公司,细胞内自噬染色测定试剂盒[单丹磺酰尸胺(dansylcadaverine, MDC)法]、蛋白质

印迹法 (Western blot) 检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司, 细胞增殖及细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自日本同仁化学研究所, 自噬干预药物购自美国Glpbio公司 (雷帕霉素、3-MA、HCQ), 蛋白A/G磁珠和正常IgG购自中国武汉戴安生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞系接种于含5%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中进行培养。在耐药细胞株中, 添加5-FU使其最终含量达到5 μmol/L, 以维持其对5-FU的耐药性。视细胞生长情况传代及换液。

1.2.2 Western blot检测

采用Western blot检测细胞系中LC3、P62和DPD蛋白含量。将细胞裂解充分后取上清液, 采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法检测其蛋白浓度。取10 μL的试样进行凝胶电泳分离, 并转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 转印膜上。一抗4℃过夜。经羊抗兔IgG二抗室温下温育1 h后, 用电化学发光 (electrochemical luminescence, ECL) 法显影。利用Image J软件解析目标图像。目的基因蛋白相对表达量 = 目的基因灰度值/β-actin灰度值 × 100%。

1.2.3 MDC法染色

MDC能够标记自噬体, 可反映自噬活性, 使用MDC染色检测细胞系中自噬体的形成。制备细胞悬液, 以 2×10^5 个/孔接种于6孔板内, 培养24 h。分别向各孔加入2 mL不同药物或培养基干预24 h。向每孔中加入1 mL MDC染色工作液, 温育30 min后置于荧光显微镜下观察, 以细胞质内出现点状荧光分布视为自噬激活, 高倍镜下随机选取5个视野, 计数自噬激活细胞数所占百分比, 取其平均值。

1.2.4 CCK-8实验

应用CCK-8实验对细胞系进行5-FU药物毒性测试。制备细胞悬液, 设置实验组与对照组, 以 1×10^3 个/孔接种于96孔板中, 每组设计4个复

孔。于实验组与对照组中分别注入200 μL含不同浓度5-FU的培养基和不含药物的培养基, 培养24 h。弃置液体后注入10 μL CCK-8染液, 37℃下温育1 h后于酶标仪450 nm处测量吸光度 (D) 值, 计算细胞存活率/抑制率。

1.2.5 细胞侵袭试验 (transwell实验)

Transwell小室模型置于24孔板中, 制备浓度为 5×10^5 /mL的细胞悬液。并于小室上层加入细胞悬液100 μL, 下室加入600 μL含20%的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 培养基, 每组细胞重复2个小室, 培养24 h。用棉签轻轻擦除上室侧细胞及基质胶, 用甲醇溶液和吉姆萨染液分别进行固定和染色, 显微镜下观察穿透细胞数。每个腔室随机取3个视野, 计算平均值。

1.2.6 平板克隆实验

选择呈指数生长的细胞制成细胞悬液, 每组细胞分别以每孔约100个、200个、500个细胞接种于6孔板内, 并加入2 mL完全培养基, 培养约1个星期, 至产生肉眼可见的克隆球时结束。用甲醇溶液和吉姆萨染液分别进行固定和染色, 肉眼下计算克隆数。

1.2.7 自噬抑制剂/激活剂干预细胞自噬实验

选取用于自噬抑制剂/激活剂干预的实验细胞, 并分为4组: 雷帕霉素干预组、羟氯喹干预组、3-MA干预组和对照组。根据预实验, 设诱导自噬改变的最低药物浓度为干预剂浓度, 在各组细胞系中分别加入自噬激活剂雷帕霉素 (0.10 μmol/L)、自噬抑制阻断剂羟氯喹 (10.00 μmol/L)、自噬抑制剂3-MA (100.00 μmol/L) 以及完全培养基各200 μL, 培养24 h。应用MDC染色检测自噬状态; 采用Western blot检测各组细胞株P62、DPD、LC3蛋白的表达; 采用CCK-8实验检测不同干预剂对细胞增殖活性的影响。确定干预成功后, 用于后续实验。

1.2.8 联合用药干预HCT-8/5-FU细胞株生物学活性实验

选取联合用药干预实验细胞株, 将其分为5组: 生理盐水对照组、5-FU实验对照组以及5-FU联合雷帕霉素、3-MA、羟氯喹的实验干预组。

分别在6孔板中加入2 mL自噬干预剂(药物浓度同1.2.7)及等量生理盐水预处理6 h,之后吸出培养液,取2 mL自噬干预剂及5-FU[5-FU浓度为半数抑制浓度(IC_{50})=140.30 $\mu\text{mol/L}$]混合液加入实验组中,5-FU对照组中加等量生理盐水,培养24 h后,进行生物学活性实验。

1.2.9 生物信息学预测E3连接酶

利用UbiBrowser在线网站(<http://ubibrowser.ncpsb.org.cn/>)预测DPD蛋白的E3泛素连接酶。并选取最有可能的E3连接酶进行体外实验分析。

1.2.10 NEDD4、DPD和P62免疫共沉淀实验 (co-immunoprecipitation, Co-IP)

为了确定E3连接酶在细胞中能否与DPD和(或)P62相互作用,我们进行了Co-IP实验。用IP裂解液裂解细胞,将5 mg蛋白裂解液与50 μL 蛋白A磁珠包被抗E3连接酶抗体混合,设置为IP组,将5 mg蛋白裂解液与同种属IgG混合,设置为Input组,温育16 h。采用Western blot检测两组中E3连接酶、DPD和P62的含量。

1.3 统计学处理

计数资料分析采用 χ^2 检验,两组间的比较采

用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。数据分析采用SPSS 25.0统计软件,并运用Graphpad 7.0等应用软件完成制图和信息处理。

2 结 果

2.1 不同细胞系中自噬与LC3、P62及DPD的表达情况及细胞耐药性

为了评估自噬在不同细胞系中对5-FU的耐药性,本研究检测了一组人类结肠癌细胞系中LC3、P62及DPD的表达及对5-FU的敏感性。Western blot检测结果结果显示,DPD的表达在COLO205细胞最高,而在HCT-8细胞中最低($P < 0.05$,图2A)。CCK-8实验结果显示,COLO205细胞的 IC_{50} 为269.20 $\mu\text{mol/L}$,LOVO细胞为187.40 $\mu\text{mol/L}$,SW480细胞为97.53 $\mu\text{mol/L}$,HCT-8细胞为25.42 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$,图2B),耐药细胞株HCT-8/5-FU的 IC_{50} 明显高于亲本细胞系(145 $\mu\text{mol/L}$ vs 25.42 $\mu\text{mol/L}$; $P < 0.05$,图2B)。此外,与HCT-8细胞相比,

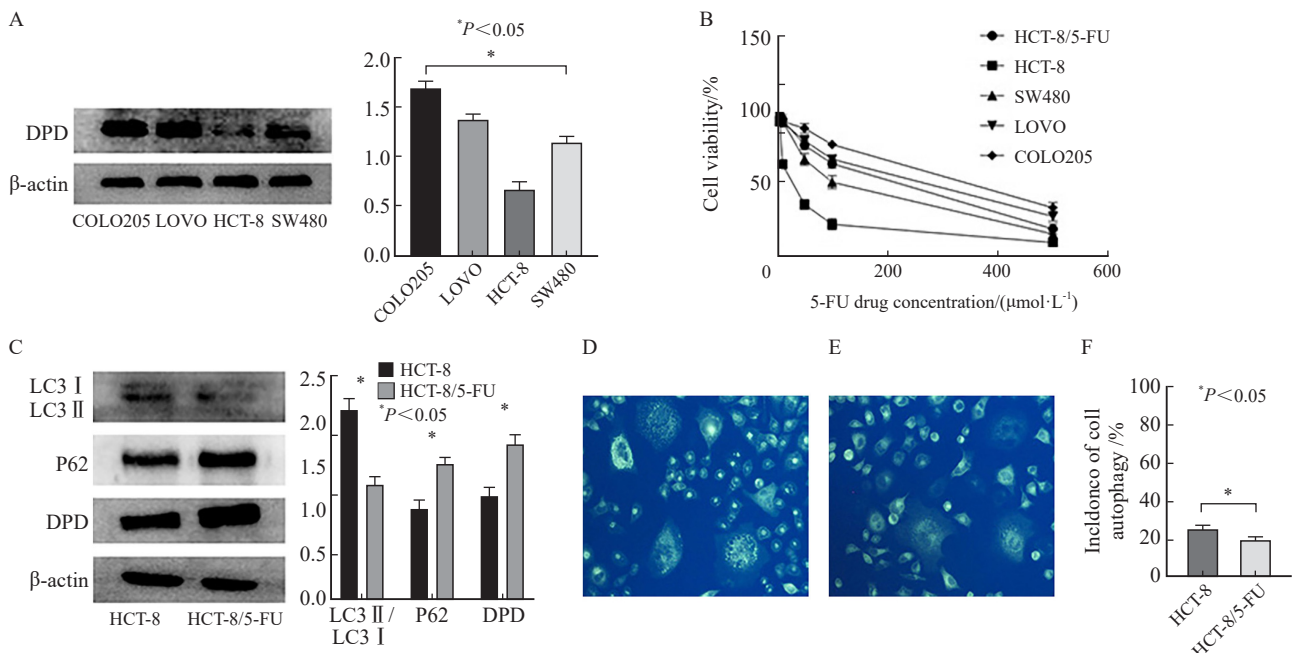


图1 结直肠癌细胞自噬、DPD及耐药水平

Fig.1 Levels of autophagy, DPD and drug resistance in colon cancer cells

A: Expression level of DPD in different colon cancer cell lines; B: Sensitivity of different cell lines to 5-FU (dose-response curve); C: Expression of LC3, P62 and DPD in HCT-8 and HCT-8/5-FU cells; D: MDC method was used to detect the autophagy level of HCT-8 cells. E: MDC method was used to detect the autophagy level of HCT-8/5-FU cells. F: Incidence of autophagy in HCT-8 and HCT-8/5-FU cells.

HCT-8/5-FU细胞中DPD和P62表达水平显著升高，而LC3-II/LC3-I表达比例显著降低 ($P < 0.05$ ，图2C)。上述结果表明，与HCT-8细胞相比，HCT-8/5-FU细胞的基础自噬活性可能较低。此外，本研究采用MDC法检测自噬水平。结果发现，与HCT-8细胞相比，HCT-8/5-FU细胞含有明显较少的光点样结构 ($P < 0.05$ ，图2D~2F)，这支持了5-FU耐药细胞自噬活性水平较低的假设。

2.2 自噬抑制剂与诱导剂干预后HCT-8/5-FU细胞株中LC3、P62及DPD的表达情况

选择HCT-8和HCT-8/5-FU细胞株进行药物干预实验。对HCT-8/5-FU细胞株进行药物干预，应用MDC染色法观察自噬的发生，Western blot

检测干预前后细胞内LC3、P62及DPD蛋白含量。雷帕霉素干预组中，自噬激活细胞数量较对照组明显增加，DPD的表达则明显下降，而LC3 II/LC3 I的比值升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$ ，图2、3)；3-MA干预组中，自噬激活细胞数量较对照组减少，而DPD表达明显增加，LC3 II/LC3 I的比值下降 ($P < 0.05$ ，图2、3)；羟氯喹干预组中，自噬激活细胞数量较对照组明显增多，DPD及P62的表达同步增加，而LC3 II/LC3 I比值上升 ($P < 0.05$ ，图2、3)。以同样方法干预HCT-8细胞株，运用MDC法检测自噬的发生 (图2F~2J)，采用Western blot检测DPD表达量 (图3F~3G)，其结果与HCT-8/5-FU细胞株一致。

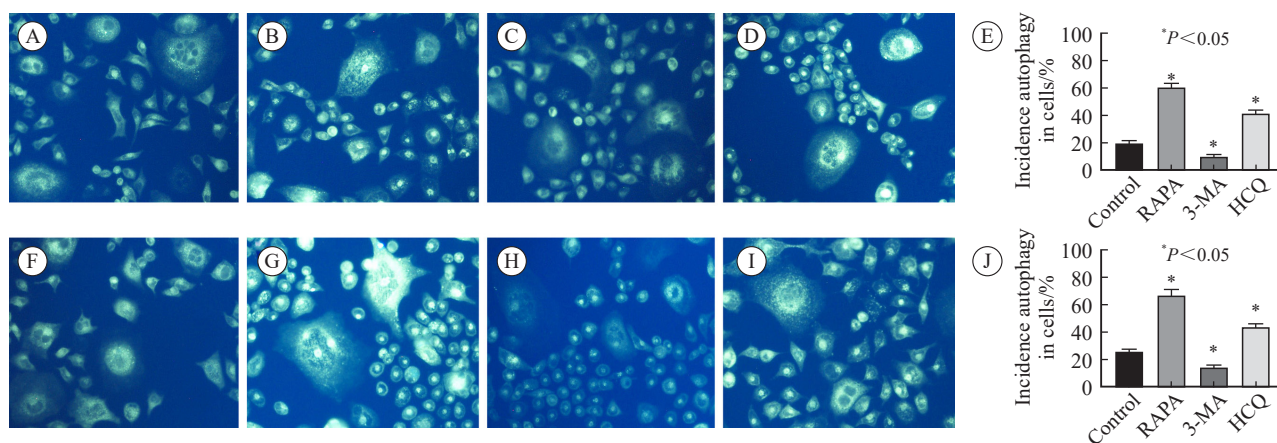


图2 MDC染色检测不同干预组中自噬水平

Fig.2 MDC staining to detect autophagy levels in different intervention groups

A: HCT-8/5-FU cell control group; B: HCT-8/5-FU cell rapamycin intervention group; C: HCT-8/5-FU cells 3-MA intervention group; D: HCT-8/5-FU cells hydroxychloroquine intervention group; E: Autophagy expression rate of HCT-8/5-FU cells in each group; F: HCT-8 cell control group; G: HCT-8 cell rapamycin intervention group; H: HCT-8 cells 3-MA intervention group; I: HCT-8 cell hydroxychloroquine intervention group; J: Autophagy expression rate of HCT-8 cells in each group.

2.3 不同自噬干预剂干预HCT-8和HCT-8/5-FU细胞株对5-FU的化学敏感性

CCK-8实验检测不同药物干预后HCT-8和HCT-8/5-FU耐药细胞株的生存率，结果显示，较生理盐水对照组相比，单独应用雷帕霉素 ($0.10 \mu\text{mol/L}$)、3-MA ($100.00 \mu\text{mol/L}$)、羟氯喹 ($10.00 \mu\text{mol/L}$) 干预，细胞增殖活性虽有所降低，但肿瘤细胞依然表现出较强的药物抵抗 (表1)。而联合应用5-FU (HCT-8为 $25.42 \mu\text{mol/L}$; HCT-8/5-FU为 $145.00 \mu\text{mol/L}$) 后，对肿瘤产生了不同程度的抑制，其抑制效果

因自噬干预剂的不同而不同。雷帕霉素+5-FU联合应用组较其他3组比较，对5-FU的化学敏感性显著增强 ($P < 0.05$ ，表1)。

2.4 自噬抑制剂与激活剂联合5-FU对耐药细胞株的克隆能力及侵袭能力的影响

平板克隆实验结果显示，雷帕霉素+5-FU组与其他3组比较，细胞克隆球数明显下降，差异有统计学意义 ($P < 0.05$ ，图4A~E，图5A~E)。Transwell实验结果显示，雷帕霉素+5-FU组与其他3组比较，穿膜细胞数量明显减少，差异有统计学意义 ($P < 0.05$ ，图4F~4J，图5F~5J)。

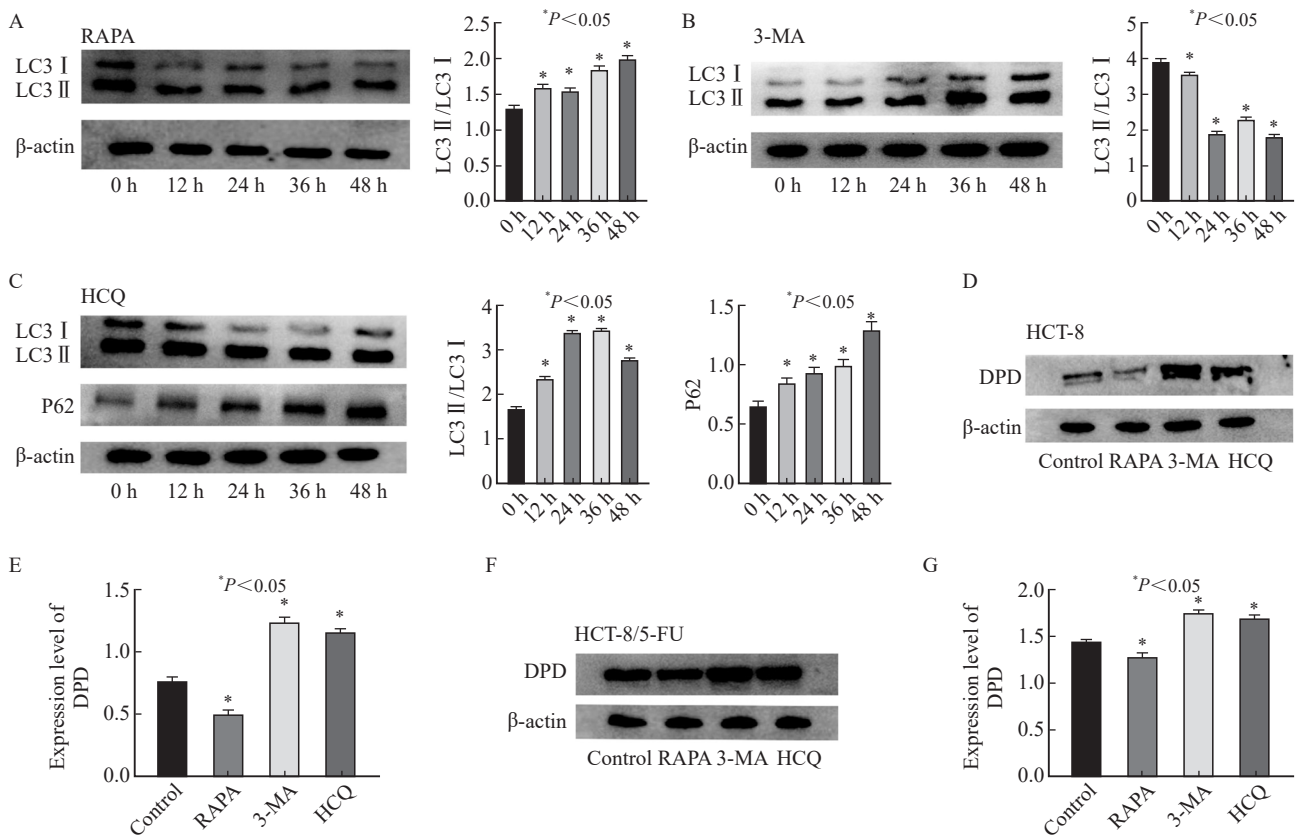


图3 自噬抑制剂及激活剂干预后细胞内自噬相关蛋白及DPD的改变

Fig. 3 Changes of autophagy-related proteins and DPD in cells after intervention with autophagy inhibitors and activators

A: HCT-8/5-FU cell rapamycin intervention group; B: HCT-8/5-FU cells 3-MA intervention group; C: HCT-8/5-FU cells hydroxychloroquine intervention group; D-E: DPD content after HCT-8 cell intervention; F-G: DPD content after intervention with HCT-8/5-FU cells. RAPA: Rapamycin.

表 1 CCK-8实验检测不同药物干预后HCT-8和HCT-8/5-FU细胞株的存活率

Tab. 1 CCK-8 assay was used to detect the survival rate of HCT-8 and HCT-8/5-FU cell lines after different drug intervention

Variable	Control	Rapamycin	3-MA	HCQ
($\bar{x} \pm s$)				
HCT-8				
Autophagy intervention	100 ± 1.91	93.41 ± 0.72	92.33 ± 1.11	91.21 ± 1.28
Combined application of 5-FU and autophagy intervention	50.00 ± 0.95	22.92 ± 2.36*	45.67 ± 1.98	44.42 ± 3.04
HCT-8/5-FU				
Autophagy intervention	100 ± 1.36	93.25 ± 1.32	92.67 ± 0.90	91.57 ± 0.95
Combined application of 5-FU and autophagy intervention	50.00 ± 1.04	26.26 ± 1.93*	46.56 ± 2.26	45.72 ± 2.05

*: $P < 0.05$, compared with each other.

2.5 E3连接酶的筛选及Co-IP检测NEDD4与DPD/P62相互作用

在线数据库UbiBrowser中的筛选结果发现, NEDD4是DPD最有价值的E3连接酶, 并选取其作为DPD的E3连接酶进行后续实验。

为证明在结肠腺癌HCT-8/5-FU细胞株中, NEDD4能够与DPD以及P62结合。采用Co-IP实

验使用NEDD4抗体温育, 经NEDD4抗体沉淀下来的蛋白分别用NEDD4抗体和DPD/P62抗体检测(图6)。IP组能检测到NEDD4目的诱饵蛋白; 而IgG不能检测到这种蛋白, 说明抗体富集成功; 同时IP组能检测到DPD或p62蛋白而IgG组检测不到, 说明DPD或P62可以与NEDD4结合。

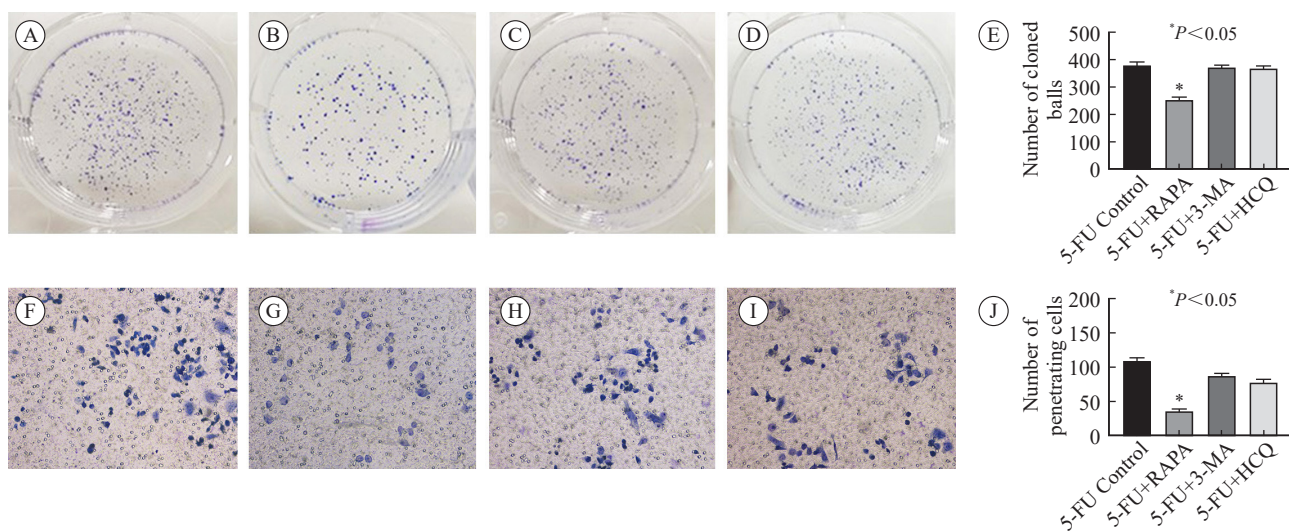


图4 平板克隆实验（接种细胞密度500个/孔）及Tran swell实验检测HCT-8细胞株在受到不同干预后的增殖能力及侵袭能力

Fig.4 Plate cloning assay (500 cells/hole) and transwell assay were used to detect the proliferation and invasion ability of HCT-8 cell lines after different interventions

A-E: Colony-forming assay: A: 5-FU control group; B: 5-FU+rapamycin group; C: 5-FU+3-MA group; D: 5-FU+ hydroxychloroquine group; E: Incidence of autophagy in HCT-8 cell lines after different interventions; F-I: Cell invasion assay: F: 5-FU control group; G: 5-FU+rapamycin group; H: 5-FU+3-MA group; I: 5-FU+ hydroxychloroquine group; J: Penetration cell number of HCT-8 cell line after different interventions.

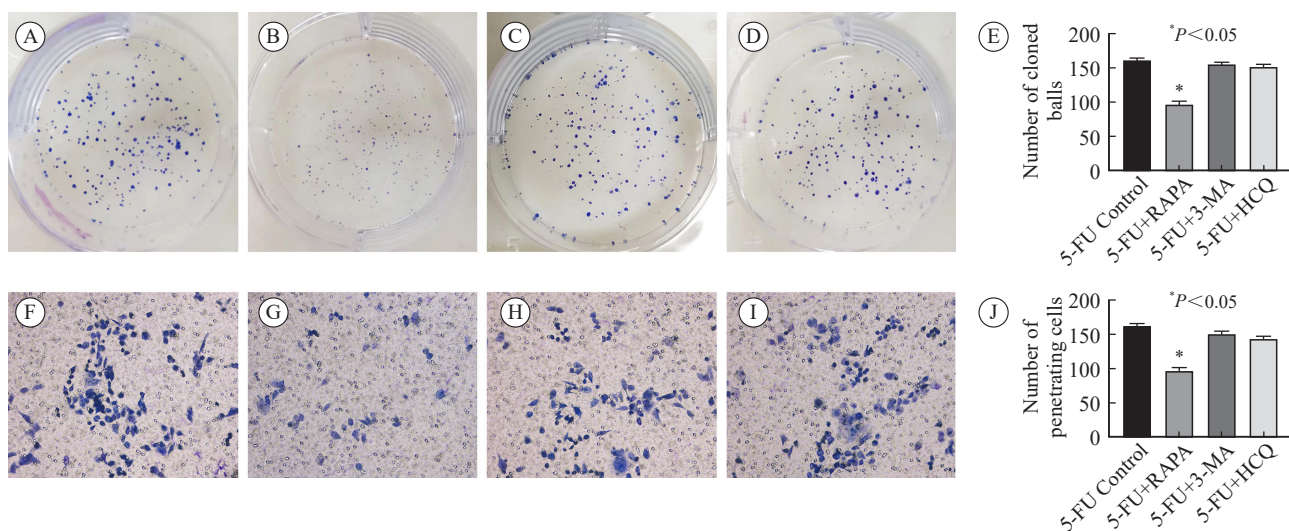


图5 平板克隆实验（接种细胞密度200个/孔）及transwell实验检测HCT-8/5-FU细胞株在受到不同干预后的增殖能力及侵袭能力

Fig. 5 Plate cloning assay (200 cells/hole) and transwell assay were used to detect the proliferation and invasion ability of HCT-8/5-FU cell lines after different interventions

Colony-forming assay: A: 5-FU control group; B: 5-FU+rapamycin group; C: 5-FU+3-MA group; D: 5-FU+ hydroxychloroquine group; E: Incidence of autophagy in HCT-8/5-FU cell lines after different interventions Cell invasion assay: F: 5-FU control group; G: 5-FU+rapamycin group; H: 5-FU+3-MA group; I: 5-FU+ hydroxychloroquine group; J: Penetration cell number of HCT-8/FU cell line after different interventions

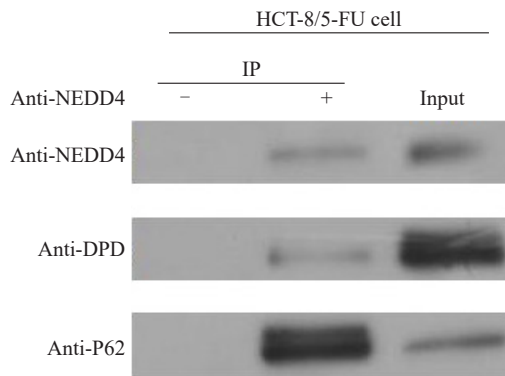


图6 Co-IP检测NEDD4与DPD/P62相互作用

Fig. 6 E3 Co-IP detection of NEDD4 interaction with DPD/P62

3 讨 论

自噬溶酶体途径通常被认为是细胞内蛋白质主要的降解途径之一,主要负责去除可溶性蛋白质、细胞器、生物大分子复合体及异物等^[7]。研究^[13]证明,自噬-溶酶体途径与多种疾病有关。Bonam等^[14]研究表明,自噬-溶酶体通路能够作为帕金森病的潜在治疗靶点,Yang等^[15]发现,溶酶体功能障碍和自噬阻断通过AMPK/mTOR途径参与自噬相关抑癌肽诱导的宫颈癌细胞毒性死亡。研究^[16]发现,自噬与肿瘤耐药密切相关,但其对肿瘤耐药的作用仍存在争议。一方面,自噬可以增强癌细胞对化疗药物的耐受,Xuan等^[17]发现,在结直肠癌中抑制伴侣蛋白介导的自噬可抑制肿瘤的生长和转移,提高药物敏感性。而另一方面,自噬在一定条件下又可增强化疗药物的效果,Yang等^[18]发现,自噬激活可促进5-FU在HCT-116细胞中的抗癌作用。因此,自噬在结直肠癌中对5-FU化疗作用的影响及其机制还有待进一步研究。

研究证实,DPD异常表达与肿瘤患者对5-FU的化疗耐受密切相关^[5]。DPD是5-FU代谢过程中的限速酶,体内80%以上的5-FU均是被DPD所代谢,只有极少部分的5-FU产生了抗肿瘤作用^[19],DPD的高表达可加速5-FU的分解代谢,从而减少药物浓度,进而降低药物的疗效^[20]。在结直肠癌的体外实验研究中,DPD的异常高表达可降低5-FU的化疗敏感性^[21-22]。本实验结果

表明,DPD高表达的细胞系往往伴随对5-FU更高的耐受。因此,通过调控DPD的表达,降低5-FU的分解代谢,可能成为提高5-FU疗效的有效途径。尽管自噬与5-FU耐药是肿瘤耐药研究的热点,但目前关于细胞自噬与5-FU代谢限速酶DPD之间的相关研究较少,而关于自噬溶酶体途径与DPD降解的关系及干预自噬溶酶体途径影响DPD的含量,从而逆转结直肠癌对5-FU耐药的相关研究鲜见报道。课题组前期研究^[6]表明,结直肠癌中自噬与DPD的表达密切相关,并且DPD高表达影响患者化疗效果及预后,但其机制尚缺乏深入研究。为了评估自噬与5-FU耐药的关系,选取DPD表达最低的HCT-8细胞,并购买其耐药株HCT-8/5-FU细胞株,检测其自噬与DPD表达水平及细胞的耐药性。结果显示,HCT-8/5-FU耐药细胞株与HCT-8亲本细胞系相比自噬活性减弱,LC3 II/LC3 I降低,而DPD表达显著增高。应用5-FU处理后细胞表现对5-FU耐受,细胞增殖活性依然保持较高水平。提示HCT-8/5-FU的耐药性与细胞的低水平自噬及DPD高表达有关。因此,深入研究自噬影响DPD与结直肠癌耐药的关系具有重要价值。为此,本实验就自噬发生、发展过程及不同水平自噬与DPD对5-FU耐药的关系进行了进一步研究。

众所周知,自噬溶酶体途径过程包括吞噬泡形成、自噬体产生、自噬溶酶体产生和分解,在细胞自噬体的生成过程中LC3-I会向LC3-II转移^[8],而在细胞自噬溶酶体途径中重要的环节是细胞自噬体和溶酶体的结合,才可完成蛋白质降解,完成细胞内经自噬溶酶体途径蛋白质代谢的全程。毋庸置疑,该过程的调控机制复杂,涉及多个步骤和众多因子。其中P62作为影响自噬体和溶酶体的结合的关键因子在该过程中的作用受到广泛关注。研究^[9-10]显示,P62是一种应激诱导的多功能蛋白,有多种结构域,其中与细胞自噬溶酶体途径密切相关的主要是LC3相互作用区和C端泛素相关结构域,P62通过在LC3相互作用区参与自噬溶酶体形成,并利用UBA结构域将多泛素化的底物传递给自噬体,从而实现了降解蛋白质的过程^[6]。与此同时,作为载体蛋白的

P62也会与底物同时被降解,故在细胞自噬激活时往往也会伴随着P62蛋白质水平的下降^[11],因此,P62在自噬与肿瘤相关研究领域受到广泛关注。研究^[23]表明,LC3-II/LC3-I比值下降和P62水平增加,是自噬活性被抑制的重要标志,而LC3 II/LC3 I的水平升高同时伴随P62水平的降低,则提示自噬流的产生。本课题组前期对201例结直肠癌临床样本组织中P62、LC-3和DPD表达的相关性及其临床意义进行了研究^[6],结果提示,LC3和P62可影响DPD的表达,自噬-溶酶体途径可能是DPD降解的重要途径。为进一步研究其机制,本实验通过检测HCT-8/5-FU耐药细胞和HCT-8亲本细胞中自噬活性及LC3和P62、DPD的表达,发现HCT-8/5-FU细胞中LC3的阳性率明显低于HCT-8细胞,而P62及DPD的表达则明显高于HCT-8细胞。我们推测,结直肠癌对5-FU的耐药可能是自噬溶酶体途径抑制、DPD积累而导致的。为证实自噬活性与P62、DPD的关系,我们又通过构建自噬抑制/激活的细胞模型,采用MDC染色和Western blot检测开展了进一步的验证。其中,自噬激活剂雷帕霉素通过抑制mTOR通路进而激活自噬的发生^[24],自噬抑制剂3-MA作为PI3K抑制剂可以干扰或阻断自噬体的形成^[25],而HCQ抑制自噬体与溶酶体的融合过程^[26],在此过程中LC3-I会不断向LC3-II转移而不会被消耗,进而使LC3 II异常积累,同时因自噬不能完成,P62的含量也会增加。

本实验结果显示,应用3-MA可导致自噬活性抑制,DPD表达量的升高。而雷帕霉素则可导致自噬激活,DPD表达下降,提示自噬的发生能够降低DPD的含量。本实验进一步应用羟氯喹阻断自噬流的发生,使自噬体与溶酶体不能融合成为自噬溶酶体,结果导致LC3、P62、DPD同时升高。提示自噬溶酶体途径参与了DPD的降解,而且这一过程需要完整的自噬流参与,即单一的自噬体形成并不能影响DPD的含量,只有形成自噬溶酶体才能降解DPD。因此,进一步研究通过改变自噬活性,影响DPD的表达,进而逆转肿瘤对5-FU的耐药性。

有研究^[27]表明,抑制自噬可增强多种抗肿瘤

药物的疗效,然而Yang等^[18]发现自噬促进化疗药物的抗癌作用,自噬诱导剂与5-FU联合应用将有利于HCT116癌细胞的化疗。我们推测这是由于5-FU特殊的药物代谢动力学所导致的,即自噬能够影响5-FU代谢关键酶DPD的表达水平,进而影响5-FU的有效药物浓度,但调控这一过程是否能逆转耐药肿瘤细胞对5-FU的耐药性尚不清楚。我们对HCT-8/5-FU细胞株进行自噬干预剂与5-FU联合用药的实验。结果显示,应用自噬激活剂可导致对细胞抑制率显著升高,其效果远大于自噬激活剂本身对细胞的杀伤作用,并且其增殖活性和侵袭能力均显著下降,而5-FU联合自噬抑制剂或阻断剂用药后的作用效果明显降低。我们推测,这可能是由于自噬溶酶体途径的激活,进而降解了细胞内的DPD,当DPD含量下降时,会导致5-FU降解减少,进而药物有效浓度上升,对细胞杀伤作用增强,从而起到逆转耐药的作用;而当应用自噬抑制剂时,自噬溶酶体途径受抑制,DPD不被降解而积累,进一步促进5-FU的分解代谢,导致肿瘤细胞对5-FU的耐受。另有研究^[28-29]表明,3-MA和HCQ通过自噬以外的机制促进5-FU对肿瘤细胞的毒性作用,虽然5-FU联合3-MA或HCQ降低了DPD的降解,但对细胞的杀伤作用相对强于对照组。因此,我们认为虽然自噬抑制剂可以通过降低DPD的降解在一定程度上保护肿瘤细胞免受5-FU的杀伤作用,但还有其他因素导致自噬抑制剂促进5-FU对肿瘤细胞的杀伤作用。在降解DPD逆转肿瘤细胞耐药、促进对5-FU敏感性的协同作用方面还有待进一步探讨。本实验结果提示,自噬的激活可逆转肿瘤细胞对5-FU的耐药性,提高5-FU的治疗效果。

本实验结果显示,DPD可以由自噬途径降解,但DPD的降解的过程及其机制尚未见报道。大量研究^[30-31]表明,蛋白质的降解信号是泛素化,而E3连接酶是蛋白泛素化标记过程中标记目标蛋白的关键酶^[32],本实验通过在线数据库UbiBrowser,预测并筛选了最有可能成为DPD泛素化过程中的E3连接酶—NEDD4,并通过Co-IP实验证实,在结肠癌HCT-8/5-FU细胞株中NEDD4能够与DPD及P62结合。NEDD4通过一个

保守的LIR结构域与LC3相互作用, 并受到LC3的调控从而调节自噬调节蛋白^[12]。而P62通过与LC3相互作用区参与自噬溶酶体形成, 并将多泛素化的底物传递给自噬体^[9-10]。本实验证实, NEDD4作为E3连接酶与DPD结合, 对其进行泛素化标记, 并与P62连接形成蛋白复合物, 共同参与DPD的自噬溶酶体降解。而在P62与LC3结合将泛素化底物DPD送往自噬体过程中, LC3又作为NEDD4激活剂促进这一过程。因此, 我们认为, NEDD4是链接DPD与P62、LC3的桥梁, 在自噬溶酶体降解DPD的过程中发挥重要作用。

综上所述, 自噬与肿瘤细胞耐药有关, 在结直肠癌细胞中激活自噬可通过降解DPD进而逆转耐药细胞对5-FU的耐药性。本研究从细胞生物学角度对LC3与P62组成的自噬-溶酶体途径与DPD的表达及肿瘤耐药进行了探讨, 其分子机制可能是通过NEDD4介导的DPD泛素化并通过P62转移到自噬溶酶体降解这一过程实现的。对于某些与自噬代谢途径有关的药物, 寻找其调控自噬代谢的有效途径, 对提高其疗效具有重要的指导意义。另外, 自噬降解DPD的过程中, 是否有其他途径参与以及其修饰位点和结合位点尚需进一步探究。总之, 自噬参与DPD降解影响结直肠癌细胞对化疗药物的敏感性, 激活自噬可促进DPD降解和抑制5-FU分解代谢, 可能成为逆转结直肠癌5-FU耐药的新途径。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] PATEL S G, KARLITZ J J, YEN T, et al. The rising tide of early-onset colorectal cancer: a comprehensive review of epidemiology, clinical features, biology, risk factors, prevention, and early detection [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2022, 7(3): 262–274.
- [2] BENSON A B, VENOOK A P, AL-HAWARY M M, et al. NCCN guidelines insights: colon cancer, version 2.2018 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2018, 16(4): 359–369.
- [3] MALIER M, GHARZEDDINE K, LAVERRIERE M H, et al. Hypoxia drives dihydropyrimidine dehydrogenase expression in macrophages and confers chemoresistance in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(23): 5963–5976.
- [4] DE FALCO V, NATALICCHIO M I, NAPOLITANO S, et al. A case report of a severe fluoropyrimidine-related toxicity due to an uncommon DPYD variant [J]. *Medicine*, 2019, 98(21): e15759.
- [5] DEAN L, KANE M. Fluorouracil therapy and DPYD genotype [M]. PRATT V M, SCOTT S A, PIRMOHAMED M, eds. *Medical genetics summaries*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); November 3, 2016.
- [6] 贾真真, 何双, 李扬扬, 等. 结直肠癌中DPD与LC3、P62表达的相关性及其临床意义 [J]. *中国癌症杂志*, 2022, 32(1): 24–33.
- [7] JIA Z Z, HE S, LI Y Y, et al. Correlations between expressions of DPD, LC3 and P62 in colorectal cancer and their clinical significance [J]. *China Oncol*, 2022, 32(1): 24–33.
- [8] YU L, CHEN Y, TOOZE S A. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207–215.
- [9] DIKIC I, ELAZAR Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 349–364.
- [10] ISLAM M A, SOORO M A, ZHANG P H. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1405.
- [11] JIN H, SEO G S, LEE S H. Isoliquiritigenin-mediated p62/SQSTM1 induction regulates apoptotic potential through attenuation of caspase-8 activation in colorectal cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 841: 90–97.
- [12] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 609–624.
- [13] SUN A Q, WEI J, CHILDRESS C, et al. The E3 ubiquitin ligase NEDD4 is an LC3-interactive protein and regulates autophagy [J]. *Autophagy*, 2017, 13(3): 522–537.
- [14] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. *Cell*, 2019, 176(1/2): 11–42.
- [15] BONAM S R, TRANCHANT C, MULLER S. Autophagy-lysosomal pathway as potential therapeutic target in Parkinson's disease [J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3547.
- [16] YANG Y, WANG Q, SONG D J, et al. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to autophagy-related cancer suppressing peptide-induced cytotoxic death of cervical cancer cells through the AMPK/mTOR pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 197.
- [17] LI J X, LIU G, LI L, et al. Research progress on the effect of autophagy-lysosomal pathway on tumor drug resistance [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 389(2): 111925.
- [18] XUAN Y, ZHAO S, XIAO X J, et al. Inhibition of chaperone-mediated autophagy reduces tumor growth and metastasis and promotes drug sensitivity in colorectal cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5): 360.
- [19] YANG J W, ZHANG Q H, LIU T. Autophagy facilitates anticancer effect of 5-fluorouracil in HCT-116 cells [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S1141–S1147.

- [19] TOZER T, HEALE K, MANTO CHAGAS C, et al. Interdomain twists of human thymidine phosphorylase and its active-inactive conformations: binding of 5-FU and its analogues to human thymidine phosphorylase versus dihydropyrimidine dehydrogenase [J] . Chem Biol Drug Des, 2019, 94(5): 1956-1972.
- [20] SHARMA V, GUPTA S K, VERMA M. Dihydropyrimidine dehydrogenase in the metabolism of the anticancer drugs [J] . Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 84(6): 1157-1166.
- [21] ZHANG Y H, SHI W N, WU S H, et al. SphK2 confers 5-fluorouracil resistance to colorectal cancer via upregulating H3K56ac-mediated DPD expression [J] . Oncogene, 2020, 39(29): 5214-5227.
- [22] ZHANG Y H, LUO D D, WAN S B, et al. S1PR2 inhibitors potently reverse 5-FU resistance by downregulating DPD expression in colorectal cancer [J] . Pharmacol Res, 2020, 155: 104717.
- [23] YOSHII S R, MIZUSHIMA N. Monitoring and measuring autophagy [J] . Int J Mol Sci, 2017, 18(9): 1865.
- [24] OZATES N P, SOĞUTLU F, LERMINOGLU F, et al. Effects of rapamycin and AZD3463 combination on apoptosis, autophagy, and cell cycle for resistance control in breast cancer [J] . Life Sci, 2021, 264: 118643.
- [25] ZHANG J, MAO W, LIU Y Y, et al. 3-MA enhanced chemosensitivity in cisplatin resistant hypopharyngeal squamous carcinoma cells via inhibiting beclin-1 mediated autophagy [J] . Curr Pharm Des, 2021, 27(7): 996-1005.
- [26] LIU L Q, WANG S B, SHAO Y F, et al. Hydroxychloroquine potentiates the anti-cancer effect of bevacizumab on glioblastoma via the inhibition of autophagy [J] . Biomedecine Pharmacother, 2019, 118: 109339.
- [27] ZAMAME RAMIREZ J A, ROMAGNOLI G G, KANENO R. Inhibiting autophagy to prevent drug resistance and improve anti-tumor therapy [J] . Life Sci, 2021, 265: 118745.
- [28] LI J, HOU N, FARIED A, et al. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model [J] . Eur J Cancer, 2010, 46(10): 1900-1909.
- [29] CHOI J H, YOON J S, WON Y W, et al. Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration [J] . APMIS, 2012, 120(7): 597-604.
- [30] LIU W J, YE L, HUANG W F, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation [J] . Cell Mol Biol Lett, 2016, 21: 29.
- [31] JOHANSEN T, LAMARK T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins [J] . Autophagy, 2011, 7(3): 279-296.
- [32] ZHENG N, SHABEK N. Ubiquitin ligases: Structure, function, and regulation [J] . Annu Rev Biochem, 2017, 86: 129-157.

(收稿日期: 2022-04-22 修回日期: 2022-10-17)

《中国癌症杂志》2023年征订启事

《中国癌症杂志》1991年创刊,是由中华人民共和国教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤类学术期刊。名誉主编为汤钊猷、曹世龙、沈镇宙教授,主编为邵志敏教授。其宗旨是“服务读者,成就作者”。

《中国癌症杂志》为中文核心期刊(《中文核心期刊要目总览(2020年版)》收录)、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊、“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊,并被国内多家大型数据库收录。国际上,《中国癌症杂志》目前被荷兰Scopus数据库、美国《化学文摘》(CA)、日本科学技术振兴机构数据库(JST)、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)、DOAJ数据库和波兰《哥白尼索引》收录。

《中国癌症杂志》主要报道国内外肿瘤学领域前沿的研究内容,包括肿瘤的临床医学、基础医学、流行病学等。开设栏目包括专家述评、专题论著、论著、综述、论著选登、个案报道、指南与共识等。

《中国癌症杂志》为月刊,A4开本,80页,铜版纸(随文彩图),每月30日出版,单价30元,全年360元。国际标准连续出版物号(ISSN)1007-3639,国内统一连续出版物号(CN)31-1727/R,邮发代号4-575,读者可在当地邮政局订阅。

联系地址:上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院10号楼415室

邮 编:200032

电 话:021-64188274;021-64175590-83574

网 址:www.china-oncology.com

电子邮箱:zgazzz@china-oncology.com

《中国癌症杂志》编辑部