

自噬抑制剂硫酸羟氯喹对去势抵抗性 前列腺癌化疗敏感性的影响*

张云^{1,2}, 罗萍¹, 冷平^{1△}

1. 成都中医药大学(成都 611130); 2. 陆军军医大学新桥医院(重庆 400037)

【摘要】目的 探讨自噬抑制剂硫酸羟氯喹(HCQ)干预自噬对去势抵抗性前列腺癌22RV1细胞株体外化疗药物多西他赛(DOC)敏感性的影响,及其自噬基因Bcl-1、自噬特异性底物P62、促凋亡基因Bax mRNA的表达变化与自噬蛋白Bcl-1、自噬特异性标记物LC3B、促凋亡蛋白Bax的表达影响。**方法** 体外培养22RV1细胞株,分别设置空白对照组(不加药物)、DOC组、HCQ(20 $\mu\text{mol/L}$)+DOC组3个组,后两组DOC浓度均为 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L,分组培养72 h后CCK-8法检测细胞增殖。于裸鼠皮下一次性注射22RV1细胞悬液,建立22RV1细胞株裸鼠移植瘤,造模成功后随机分为模型组(生理盐水)、DOC组、HCQ+DOC组3个组,每组5只,均为腹腔注射,干预4周。观察移植瘤生长体积的变化。应用实时荧光定量PCR检测22RV1细胞株和移植瘤中自噬和凋亡相关基因(Beclin-1、P62、Bax)以及Western blot检测自噬和凋亡相关蛋白(Beclin-1、LC3B、Bax)的表达水平。**结果** 体外实验中,与空白对照组相比,DOC组和HCQ+DOC组细胞的增殖能力减弱($P<0.05$);在同一DOC浓度下,与DOC组相比,HCQ+DOC组细胞的增殖被抑制($P<0.05$);HCQ+DOC组DOC的半数抑制浓度 IC_{50} 较DOC组低。体内实验中,与模型组相比,各时点DOC组及HCQ+DOC组的移植瘤同时点周体积增长值均减小;HCQ+DOC组的周体积增长值均小于DOC组($P<0.05$),以第4周最为明显。在体内、外实验中,与其余两组比较,HCQ+DOC组Beclin-1、P62、Bax mRNA和Beclin-1、LC3B、Bax蛋白的表达均出现上调($P<0.05$)。**结论** HCQ可干预去势抵抗性前列腺癌细胞的自噬,抑制其增殖,增强其对化疗药物的敏感性。

【关键词】 硫酸羟氯喹 自噬 去势抵抗性前列腺癌 化疗敏感性 细胞增殖

Effect of Autophagy Inhibitor Hydroxychloroquine on Chemosensitivity of Castration-resistant Prostate Cancer

ZHANG Yun^{1,2}, LUO Ping¹, LENG Ping^{1△}. 1. Chengdu University of TCM, Chengdu 611130, China; 2. Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China

△ Corresponding author, E-mail: 596353806@qq.com

【Abstract】 Objective To determine the effects of autophagy inhibitor hydroxychloroquine (HCQ) on chemosensitivity of castration-resistant prostate cancer 22RV1 cell line *in vitro* and *in vivo*, and changes in its mRNA expressions of autophagy gene Bcl-1, autophagy specific substrate P62 gene, pro-apoptotic gene Bax. **Methods** 22RV1 cells were cultured *in vitro* and divided into blank control (no drug), DOC, and HCQ (20 $\mu\text{mol/L}$)+DOC groups. The concentration of DOC was set at 10^{-6} mol/L, 10^{-7} mol/L, and 10^{-8} mol/L in the tests. Cell proliferation activities were detected by CCK-8 method 72 h after drug treatments. The 22RV1 cell suspension was injected subcutaneously into nude mice to establish transplanted tumor. The successfully modeled mice were randomly divided into three groups (five each) treated by physiological saline, DOC and HCQ+DOC (injected intraperitoneally for 4 weeks), respectively. Changes in growth of the transplanted tumor were observed. The mRNA expressions of Beclin-1, P62, and Bax were detected by qPCR. The protein expressions of Beclin-1, LC3B, and Bax were detected by Western blot. **Results** *In vitro*: compared with the blank control, the DOC and HCQ+DOC groups showed decrease proliferation of cells($P<0.05$); HCQ further lowered cell proliferation in the presence of DOC ($P<0.05$), resulting in reduced half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of DOC. *In vivo*: compared with the model mice, the DOC and HCQ+DOC groups had decreased volume of transplanted tumor. HCQ slowed the weekly growth of tumor in the presence of DOC ($P<0.05$), most obvious at the 4th week. *In vitro* and *in vivo*, HCQ+DOC upregulated the mRNA and protein expressions of Beclin-1, P62 and Bax ($P<0.05$). **Conclusion** HCQ can interfere with the autophagy of castration-resistant prostate cancer cells, inhibiting its proliferation and enhancing its sensitivity to chemotherapeutic drugs.

【Key words】 Hydroxychloroquine Autophagy Castration-resistant prostate cancer
Chemotherapy sensitivity Cell proliferation

对化疗药物耐药是目前临床上去势抵抗性前列腺癌
(castration resistant prostate cancer, CRPC)患者面临的主
要问题,寻求一种可以提高其对化疗药物敏感性的方法

* 成都中医药大学科技发展基金(No. CGZH1709)资助

△ 通信作者, E-mail: 596353806@qq.com

对于CRPC患者来说显得尤为重要。现有的研究发现,自噬作为一种细胞自我调节机制,肿瘤细胞会上调自身的自噬活性来逃脱化疗药物的杀伤,进而出现对化疗药物敏感性的降低,甚至产生耐药;而抑制肿瘤细胞增殖的自噬则能一定程度上增强其对化疗药物的敏感性^[1-2]。

目前关于自噬对前列腺癌细胞化疗敏感性的影响正获得更多的关注,不过研究结果却不尽相同,唐礼功等^[3]的研究提示前列腺癌细胞自噬的上调会参与其对化疗耐药的产生,而PICKARD等^[4]的结果提示自噬或许不是前列腺癌细胞面临化疗药物杀伤时的保护机制。为更进一步探索自噬对前列腺癌化疗效果的影响及其相关的机制,及为将来临床通过调节自噬水平来提高CRPC对化疗药物的敏感性提供依据,本课题拟采用目前唯一进入临床试验的自噬抑制剂硫酸羟氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)对去势抵抗性前列腺癌22RV1细胞株进行体内外的自噬干预,观察其对CRPC一线化疗药物多西他赛(docetaxel, DOC)敏感性的改变,以及对细胞自噬、凋亡相关基因及蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人源性去势抵抗性前列腺癌22RV1细胞株购于南京贝瑞吉生物有限公司。

BALB/C裸鼠15只,雄性,4~6周龄,体质量(20±2)g,购于四川达硕动物有限公司,动物质量合格证号[SCXK(川) 2017-21],饲养于SPF环境中。

HCQ (Sanofi-Aventis), DOC (Selleck), 1640培养基、0.25%胰酶(Hyclone), Beclin-1、P62、Bax、GAPDH引物(上海生工), Trizol (Invitrogen), cDNA合成试剂盒、荧光定量PCR试剂盒(Roche),胎牛血清(四季青), Beclin-1兔来源抗体(Abcam), LC3B、Bax兔来源抗体及抗兔二抗(CST), 内参β-actin鼠来源抗体、抗鼠二抗及其他Western blot相关试剂(碧云天)。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠皮下移植瘤的建立

22RV1细胞株复苏后

于含10%胎牛血清的1640培养基中培养。取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 $(5 \sim 6) \times 10^7$ 个/mL,于裸鼠左侧腋部皮下一次性注射细胞悬液0.1 mL/只 $[(5 \sim 6) \times 10^6$ 细胞],共注射20只。

1.2.2 体外细胞增殖实验 22RV1细胞株复苏后于含10%胎牛血清的1640培养基中培养。取对数生长期细胞,以 2×10^4 /孔的密度接种于96孔板,设置空白对照组、DOC组、HCQ+DOC组3个组,其中DOC组和HCQ+DOC组下分别设置DOC浓度为 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L的3个亚组,每亚组设置6个复孔。空白对照组接种细胞进行常规培养,不加药物;DOC组在接种后36 h时加入相应浓度的DOC;HCQ+DOC组在接种后24 h时加入终浓度为20 μmol/L的HCQ,接种后36 h时加入相应浓度的DOC。加入DOC 72 h后,每孔加入10 μL CCK-8显色液并检测吸光度(A)值,比较各组细胞增殖能力(与A值呈正相关,故以A值表征)。按照 $(1 - A_{\text{实验孔}}/A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 计算细胞增殖抑制率,绘制细胞的增殖抑制曲线,得出DOC组和HCQ+DOC组DOC的半数抑制浓度(IC₅₀)值,并选取增殖差异最显著的DOC浓度组用于后续的mRNA与蛋白质检测。

1.2.3 体内移植瘤给药实验 建模期间每3 d观察并测量1次肿瘤体积,待肿瘤长至100 mm³,可判定建模成功。最终取15只肿瘤体积100~150 mm³的成模裸鼠,随机分为模型组、DOC组和HCQ+DOC组,每组5只。模型组腹腔注射生理盐水,每2 d注射1次,每次0.15 mL;DOC组腹腔注射DOC 10 mg/kg,1周/次,每次0.1~0.2 mL;HCQ+DOC组腹腔注射HCQ 50 mg/kg,每2 d注射1次,DOC 10 mg/kg,1周/次,每次均0.1~0.2 mL。给药时长共4周。

分组给药后每周测量1次肿瘤体积。测量瘤体长径a和短径b,运用公式 $V = a \times b^2 / 2$ 计算肿瘤体积。第2周起,根据每周测量的肿瘤体积计算肿瘤每周的增长体积(ΔV),并绘制肿瘤周体积增长折线。给药结束3 d后处死各组裸鼠,剥离出瘤体,于液氮中保存。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测自噬及凋亡相关基因

表 1 引物序列表

Table 1 The list of primer sequence

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Product length/bp
Beclin-1	CCCGTGGAATGGAATGAG	CGTAAGGAACAAGTCGGTAT	244
P62	GCGGCTGATTGAGTCCCT	CTCCGATGTCATAGTTCTTGGT	212
Bax	GCTGAGCGAGTGTCTCAAGC	TCCCGGAGGAAGTCCAAT	210
GAPDH	GACCTGACCTGCCGTCTA	AGGAGTGGGTGTCGCTGT	208

的表达 3组体外培养的22RV1细胞用胰酶消化后,采用Trizol直接裂解,提取总RNA。瘤体采用液氮碾磨成干粉后,加入Trizol匀浆后提取RNA。按照逆转录试剂盒将RNA转录成cDNA,以GAPDH为内参,进行实时荧光定量PCR,引物序列见表3。参数设置:95℃ 10 min 激活Taq酶,然后95℃ 15 s, 60℃ 60 s共循环40次。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的表达式,以空白对照组(或模型组)的表达式为1,计算各组目的基因的相对表达式。

1.2.5 Western blot检测自噬及凋亡相关蛋白的表达 自噬蛋白Bcl-1、自噬特异性标记物LC3B蛋白及促凋亡蛋白Bax的一抗稀释度为1:1 000。处理细胞和肿瘤组织,提取总蛋白,检测其蛋白浓度,按照40 μg/孔上样量进行SDS-PAGE电泳,将最终得到的蛋白条带图用Image J软件进行灰度值读取,以各条带与内参β-actin的灰度值的比值为各蛋白的相对表达式。

1.2.6 统计学方法 多组间比较采用方差分析,两组间比较采用t检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HCQ干预自噬对22RV1细胞株增殖的影响

2.1.1 体外细胞实验结果 见图1。72 h时,与空白对照组相比,DOC组和HCQ+DOC组中的细胞增殖能力降低($P<0.05$);在同一DOC浓度下,与DOC组相比,HCQ+DOC组细胞的增殖能力亦减弱($P<0.05$),其中DOC浓度为 10^{-7} mol/L时,两组差异最为显著。在DOC组和HCQ+DOC组下,各小组细胞的增殖程度随着化疗药物DOC浓度的降低逐渐升高($P<0.05$)。

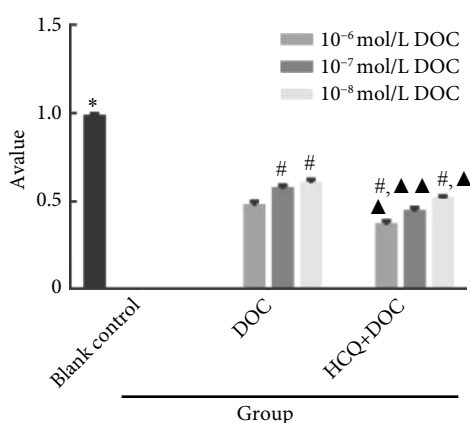


图1 各组72 h体外细胞的增殖情况

Fig 1 Proliferation of cells in vitro at 72 h in each group

* $P<0.01$, vs. other groups; # $P<0.05$, vs. former DOC concentration in the same group; ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$, vs. DOC group at the same DOC concentration

在DOC浓度分别为 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L时, DOC组细胞的平均抑制率分别为51.05%、

43.77%、38.28%, HCQ+DOC组细胞的平均抑制率分别为62.75%、52.11%、47.43%; DOC组和HCQ+DOC组化疗药物DOC的 IC_{50} 分别为 $10^{-6.120}$ mol/L、 $10^{-7.536}$ mol/L。

2.1.2 体内移植瘤实验结果 见图2。HCQ+DOC组与模型组相比, 各周 ΔV 均减小($P<0.05$); 与DOC组相比较, HCQ+DOC组各周 ΔV 更小, 以第4周最为显著, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

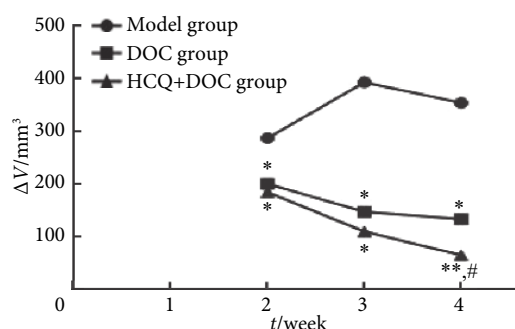


图2 各组肿瘤体积平均增长值周变化趋势

Fig 2 Average weekly trend of growth of tumor in each group

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. model group at the same time point; # $P<0.05$, vs. DOC group at the same time point

2.2 HCQ干预自噬对22RV1细胞株基因表达的影响

体外实验: 与空白对照组和DOC组相比较, HCQ+DOC组Beclin-1、P62、Bax的mRNA表达式均明显上调($P<0.05$)。体内实验: 与模型组和DOC组相比较, HCQ+DOC组基因Beclin-1、P62、Bax mRNA的表达式均上调($P<0.05$), 与体外实验结果一致。见图3。

2.3 HCQ干预自噬对22RV1细胞株蛋白表达的影响

体外细胞实验(图4): 相对于空白对照组和DOC组, HCQ+DOC组的Beclin-1、LC3B、Bax蛋白都出现表达上调, 差异有统计学意义($P<0.05$)。

体内移植瘤实验(图5): 相对于模型组和DOC组, HCQ+DOC组Beclin-1、LC3B、Bax蛋白的表达式均上调($P<0.05$), 与体外细胞实验结果一致。

3 讨论

自噬抑制剂种类很多, 不同的抑制剂对自噬流的抑制机理不同, 其中有研究提示自噬抑制剂3-MA并不能影响所有种类细胞的自噬活性^[5], 故本实验采用目前唯一一种已进入临床实验的自噬抑制剂HCQ对去势抵抗性前列腺癌22RV1细胞株进行体内外的自噬抑制, 实验结果发现: 在体外, 采用了HCQ进行自噬干预的HCQ+DOC组, 相对同一DOC浓度的DOC组, 细胞增殖的抑制程度明显增强, 且差异有统计学意义, HCQ+DOC组中化疗药物DOC的 IC_{50} 也由DOC组的 $10^{-6.120}$ mol/L下降为 $10^{-7.536}$ mol/L;

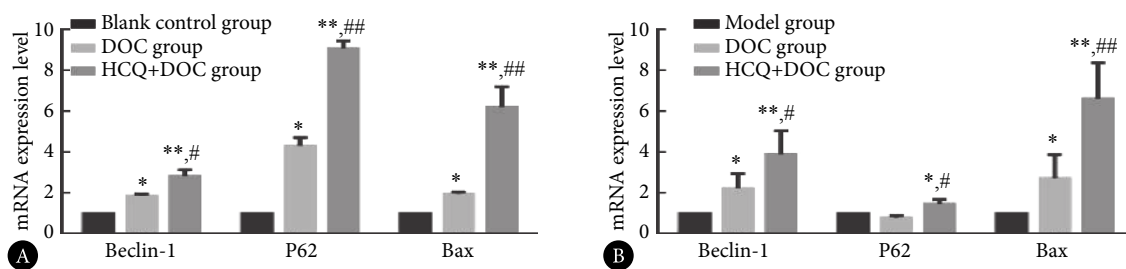


图3 自噬和凋亡相关基因的mRNA相对表达量

Fig 3 Relative mRNA expression levels of each group

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. blank control group or model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. DOC group; A: *In vitro*; B: *In vivo*

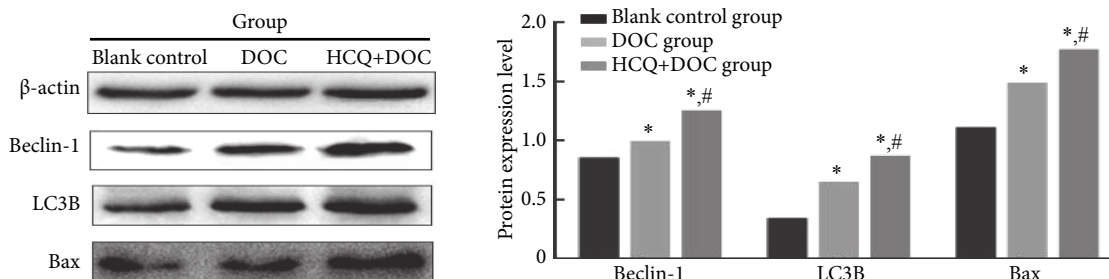


图4 体外实验中自噬和凋亡相关蛋白的表达

Fig 4 Expressions of autophagy-related proteins *in vitro*

* $P < 0.05$, vs. blank control group; # $P < 0.05$, vs. DOC group

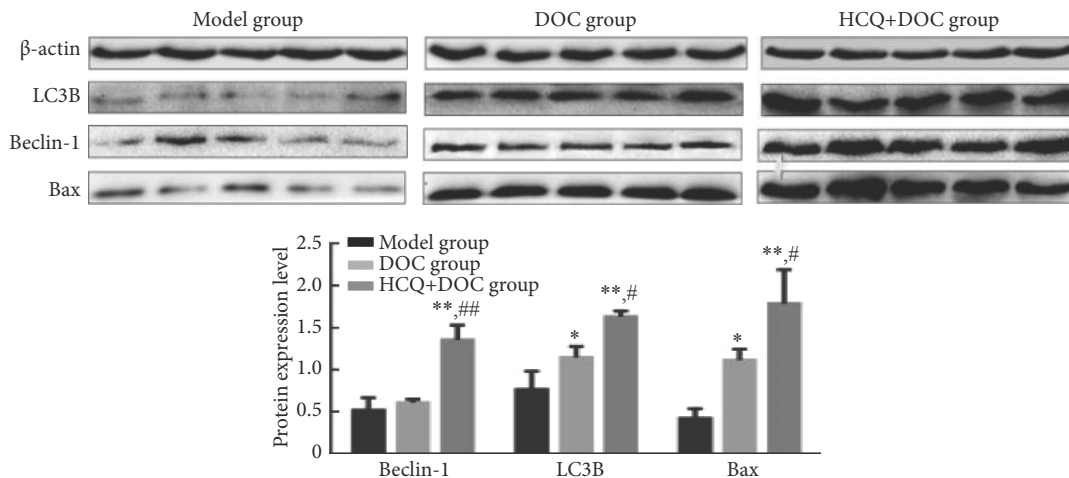


图5 体内实验中自噬和凋亡相关蛋白的表达

Fig 5 Expressions of autophagy-related proteins *in vivo*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. DOC group

在体内, HCQ+DOC组移植瘤的 ΔV 均不同程度地低于DOC组,表明在体内外自噬抑制剂HCQ均能够提高22RV1细胞株对化疗药物DOC的敏感性,抑制细胞增殖。

为进一步探讨HCQ通过抑制自噬增强去势抵抗性前列腺癌22RV1细胞株化疗敏感性的分子机制,我们选择了检测各组Beclin-1、P62、Bax基因及Beclin-1、LC3B、Bax蛋白。自噬基因Beclin-1表达的Beclin-1蛋白是自噬体形成的始动环节中必不可少的一个生物分子^[6],此外,

Beclin-1也被认为是一种肿瘤抑制因子,其表达的上调可降低前列腺的癌变风险^[7];多功能蛋白P62是自噬过程中重要的衔接蛋白,其蛋白水平能在一定程度上反映细胞的自噬强弱,并与自噬活性的强弱成反比^[8-9];自噬特异性标记物LC3B蛋白与P62一样,是反映自噬活性的重要标志物,但与P62不同的是,LC3B的表达水平与自噬体形成的数量成正比,是自噬流中唯一的自噬体蛋白标记物^[10-11];Bax基因是Bcl-2基因家族中的一员,是人体内最主要的促

凋亡基因,现有的研究发现,前列腺癌的临床疗效都与Bax的表达水平息息相关^[12]。

mRNA检测的实验结果显示:与其余两组比较,HCQ+DOC组的22RV1细胞株和移植瘤细胞自噬基因Beclin-1的表达均出现了上调,表明通过HCQ使肿瘤细胞的自噬活性受到抑制,可反馈性地增强具有肿瘤抑制因子特性的自噬基因Beclin-1的表达,协同HCQ增强对22RV1肿瘤细胞的增殖抑制,提高其对化疗药物DOC的敏感性;在HCQ+DOC组中,22RV1细胞株和移植瘤细胞P62基因的表达均较DOC组出现上调,表明HCQ对22RV1肿瘤细胞株进行自噬干预后,其自噬活性受到了抑制;在HCQ+DOC组中,促凋亡基因Bax的表达与Beclin-1及P62基因的表达上调一致。蛋白检测的实验结果显示:在HCQ+DOC组中,22RV1细胞株和移植瘤细胞LC3B蛋白的表达均较DOC组上调,这与HCQ在自噬流中的作用位点有关,HCQ是通过抑制自噬体和溶酶体的结合来抑制自噬活性的,而LC3B是定位于自噬体膜上的,没有和溶酶体结合的自噬体不会被降解消化,故在使用自噬抑制剂HCQ后,LC3B的表达量并没有减少,这反向说明了HCQ抑制了22RV1细胞的自噬活性;在HCQ+DOC组中,Beclin-1、Bax蛋白表达也出现上调,与mRNA检测结果一致,分别从基因和蛋白水平表明HCQ抑制22RV1细胞的自噬,能够促进其细胞凋亡,提高其对化疗药物DOC的敏感性,限制其恶性的增殖生长。

综上所述,本研究的体内外实验结果均显示,HCQ可以明显增强Beclin-1、P62、Bax基因及Beclin-1、LC3B、Bax蛋白的表达,参与自噬表达的下调过程,增强前列腺癌22RV1细胞株对化疗药物DOC的敏感性。本研究结果揭示了HCQ通过抑制自噬活性提高去势抵抗性前列腺癌22RV1细胞株对化疗药物敏感性可能的分子机制,亦为临床采用HCQ进行自噬干预治疗CRPC患者提供了一定的研究基础,Beclin-1、P62、LC3B、Bax等指标或可为将来采用HCQ进行自噬干预治疗CRPC患者的实验室检查提供分子靶标。

最后,本研究成果应用于临床实践尚有一定的距离,有待于开展更深入的临床应用研究。在进一步的研究中可通过扩大实验样本量和纳入临床样本进行广泛地验证;通过增加对自噬流及更多自噬相关蛋白等指标的观

察,更系统和完整地研究自噬抑制与肿瘤药物疗效的关系,为指导临床应用HCQ进行自噬干预治疗CRPC患者提供更加可靠的实验依据。

参 考 文 献

- [1] SHI TT, YU XX, YAN LJ, *et al.* Research progress of hydroxychloroquine and autophagy inhibitors on cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 79(2): 1-8.
- [2] KURDI A, CLEENWERCK M, VANGESTEL C, *et al.* ATG4B inhibitors with a benzotropolone core structure block autophagy and augment efficiency of chemotherapy in mice. *Biochem Pharmacol*, 2017(138): 150-162[2018-12-17]. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.119>.
- [3] 唐礼功, 谢森, 潘铁军, 等. 低氧通过诱导自噬增强小鼠前列腺癌细胞的化疗抵抗作用. *华中科技大学学报*, 2013, 42(6): 651-655.
- [4] PICKARD RD, SPENCER BH, MCFARLAND AJ, *et al.* Paradoxical effects of the autophagy inhibitor 3-methyladenine on docetaxel-induced toxicity in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2015, 388(7): 793-799.
- [5] HUANG K, LIU D. Targeting non-canonical autophagy overcomes erlotinib resistance in tongue cancer. *Tumor Biol*, 2016, 37(7): 9625-9633.
- [6] 谢 昆, 李密杰, 蒋成斌, 等. 自噬相关蛋白ATG5/BECLIN-1调控细胞自噬和凋亡的分子机理研究进展. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(3): 272-275.
- [7] 王钱虎. 自噬相关蛋白Beclin1、LC3-II、Atg5在前列腺癌组织中的表达及意义. *浙江医学*, 2018, 40(16): 1807-1810.
- [8] WANG Y, ZHU WG, ZHAO Y. Autophagy substrate SQSTM1/p62 regulates chromatin ubiquitination during the DNA damage response. *Autophagy*, 2017, 13(1): 212-213.
- [9] MOSCAT J, KARIN M, DIAZ-MECO MT. P62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy. *Cell*, 2016, 167(3): 606-609.
- [10] ZHANG M, ZHOU YF, GONG JY, *et al.* Expression of autophagy-related protein LC3B, p62, and cytoplasmic p53 in human retinoblastoma tissues. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(15): 3152-3160.
- [11] FU Q, QIN Z, ZHANG L, *et al.* A new long noncoding RNA alb regulates autophag by enhancing the transformation of LC3B I to LC3B II during human lens development. *Mol Ther Nucl Acids*, 2017(9): 207-217[2018-12-17]. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.09.011>.
- [12] 牛天力, 张青川. 蟾毒灵对人雄激素非依赖性前列腺癌DU145细胞增殖及Bcl-2、Bax基因的影响. *中医药导报*, 2016, 22(8): 29-32.

(2018-09-15收稿, 2019-01-15修回)

编辑 吕 熙