

## 3-methyladenine 抑制自噬诱导胰腺癌细胞 SW1990 失巢凋亡

庄燕妍<sup>1</sup>, 庄晓虹<sup>2</sup>, 陈文博<sup>1</sup>, 黄凤婷<sup>1</sup>, 唐 健<sup>1</sup>, 程文捷<sup>1</sup>, 张世能<sup>1\*</sup>

(1 中山大学孙逸仙纪念医院消化内科, 广东 广州 510120; 2 海南省农垦总医院肿瘤血液科, 海南 海口 571103)

**摘要:** 【目的】探讨 3-methyladenine(3-MA) 对人胰腺癌 SW1990 细胞增殖、迁移及失巢凋亡的影响作用及其机制。【方法】以胰腺癌细胞 SW1990 及永生化胰腺导管上皮细胞 H6C7 为研究对象, 设 3-MA 处理组及 PBS 对照组, 采用软琼脂克隆培养法及 Poly-HEMA 悬浮培养法筛选抵抗失巢凋亡的细胞。Annexin V-FITC/PI 双染和 TUNEL 试剂盒法检测细胞凋亡; 免疫荧光法及透射电镜检测细胞自噬; CCK-8 法检测细胞增殖; Transwell 小室检测细胞迁移能力。【结果】永生化胰腺导管上皮细胞 H6C7 处理组及对照组均无集落形成, 胰腺癌细胞 SW1990 处理组形成  $(2.3 \pm 2.63)$  个集落, 对照组形成  $(9 \pm 3)$  个, 与 H6C7 相比, SW1990 具有较强的抵抗失巢凋亡的能力 ( $P < 0.05$ )。3-MA 可抑制胰腺癌 SW1990 细胞自噬 ( $P < 0.05$ ) 并抑制其增殖及迁移能力 ( $P < 0.01$ ) 且诱导失巢凋亡 ( $P < 0.01$ )。【结论】3-MA 可诱导胰腺癌细胞 SW1990 失巢凋亡, 其机制可能与细胞自噬受抑有关。

**关键词:** 胰腺癌; 自噬; 失巢凋亡; 3-甲基腺嘌呤

中图分类号: R735.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)02-0193-07

### 3-Methyladenine Impairs Anoikis Resistance of Pancreatic Cancer SW1990 Cells Through Inhibiting Autophagy In Vitro

ZHUANG Yan-yan<sup>1</sup>, ZHUANG Xiao-hong<sup>2</sup>, CHEN Wen-bo<sup>1</sup>, HUANG Feng-ting<sup>1</sup>, TANG Jian<sup>1</sup>,  
CHENG Wen-jie<sup>1</sup>, ZHANG Shi-neng<sup>1\*</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Department of Oncology and Hematology, Hainan Provincial Nongken Hospital, Haikou 571103, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effect and mechanism of 3-methyladenine (3-MA) on proliferation, migration, and autophagy of human pancreatic cancer cell line SW1990. 【Methods】The experimental objects were pancreatic cancer cell line SW1990 and human immortalized, nontumorigenic pancreatic ductal epithelial cell line H6C7. We divided them into the control group and 3-MA group. Acquisition of anoikis resistance cells was obtained by soft agar clone culture and poly-HEMA suspension culture. Cell apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI and TUNEL. Autophagy assay was measured by immunofluorescence and electronic microscope. Cell proliferation ability was detected by CCK-8. Transwell assay was performed to examine the migration ability. 【Results】Compared with H6C7 cells (no clones formation), pancreatic cancer SW1990 cells ( $2.3 \pm 2.63$ ) in treatment group, ( $9 \pm 3$ ) in control group showed anoikis resistance ( $P < 0.05$ ). 3-MA could inhibit autophagy of SW1990 cells under electronic microscope ( $P < 0.05$ ), which could also inhibit the proliferation and migration ability of SW1990 cells ( $P < 0.01$ ) and impair anoikis resistance ( $P < 0.01$ ). 【Conclusion】3-MA may induce anoikis of pancreatic cancer cell SW1990 through autophagy inhibition.

**Key words:** pancreatic cancer; autophagy; anoikis; 3-methyladenine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2): 193-199]

收稿日期: 2012-09-20

基金项目: 广东省自然科学基金(8151008901000139); 广东省医学科学基金(B2009066)

作者简介: 庄燕妍, 硕士, 研究方向: 消化内科学, E-mail: scorpius\_zhyy@163.com; \* 通信作者: 张世能, 主任医师, E-mail: shinengz@163.net

失巢凋亡(anoikis)是细胞程序性死亡的形式之一,是正常上皮细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)脱离接触后而诱发的凋亡,在维持正常组织细胞的生长、发育和分化平衡中发挥重要作用。失巢凋亡抗性是肿瘤原性转化的标志,失巢凋亡平衡的紊乱往往引起肿瘤的远处转移<sup>[1]</sup>。恶性肿瘤上皮细胞脱离相应的细胞外基质,借助失巢凋亡抗性能力,在血液和淋巴系统存活并迁移到远处器官组织、发生贴壁和增殖。近年来,自噬(autophagy)与凋亡间的关系日益受到重视,自噬是细胞利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,在氧化应激、缺氧等条件下对细胞具有一定程度的保护作用,但是过度激活的自噬会引发细胞凋亡。有研究表明相同诱导因素在不同细胞中可分别诱发自噬或凋亡,在某些情况下两者可以相互拮抗或促进,也可先后发生或同时存在于同一细胞<sup>[2-3]</sup>。检测自噬的金标准是通过电镜观察到膜状结构的自噬体及其亚细胞结构,主要是检测自噬体或者自噬标志物 LC3I 与 LC3II 的转换。3-甲基腺嘌呤(3-methyl adenine, 3-MA)为 III 型 PI3K( hVps34 )的抑制剂,是常见的自噬抑制剂,能抑制胞浆型 LC3 I 向自噬体膜蛋白 LC3 II 的转化从而抑制自噬的激活。自噬不仅与凋亡关系密切,还与肿瘤的增殖、迁移及耐药性息息相关<sup>[4-5]</sup>,目前肿瘤具备失巢凋亡抗性的机制尚未明了,因此研究肿瘤细胞抗失巢凋亡的机制,明确自噬是否在其中起关键作用及其涉及的信号通路和相关分子,有可能为肿瘤转移的防治提供新靶点。本研究通过观察 3-MA 对胰腺癌 SW1990 细胞失巢凋亡的影响作用,从而初步探讨自噬在胰腺癌 SW1990 细胞失巢凋亡抗性中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞及主要试剂

胰腺癌细胞系 SW1990 由中山大学孙逸仙纪念医院消化实验室保存,体外培养传代。永生化人胰腺导管上皮细胞系 H6C7 由加拿大安大略癌症研究所 Prof. Ming-sound Tsao 惠赠,体外培养传代。3-MA、TUNEL 试剂盒购自 Merck 公司;poly-HEMA、羊抗兔-FITC-IgG 购自 Sigma 公司;LC3 多克隆兔抗人抗体购自 Abcam 公司;CCK-8 购自日本同仁,低熔点琼脂糖及 Triton-X 100 购自美

国 Amersco 公司;胎牛血清购自 GIBCO 公司;K-SFM 培养基购自 Invitrogen 公司;Transwell 板购自 Corning 公司。3-MA 用无菌 PBS 配置为 100 mmol/L,避光存于 4 ℃冰箱,使用前 37 ℃水浴 5 min。

### 1.2 主要方法

1.2.1 细胞培养 人胰腺癌细胞系培养于含 RPMI-1640+体积分数 10%的胎牛血清的培养基,在 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养,每 2~3 d 换液或传代一次,以 0.2 g/L EDTA-2Na 和 2.5 g/L 胰蛋白酶的 1:1 混合液消化,完全培养基中和。H6C7 细胞培养于 K-SFM 培养基(含 100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素,0.2 ng/mL rEGF,20 mg/BPE)在 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养,采用 0.5 g/L 胰蛋白酶(含 EDTA)消化,以体积分数 0.4%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)1:1 中和。分组:处理组(3-MA,终浓度 5,10,20 mmol/L)及对照组(PBS),同时设置贴壁培养组作对照。

1.2.2 poly-HEMA 悬浮培养法 用体积分数 95%乙醇制备 10 mg/mL poly-HEMA 溶液。于 6 孔板中每孔加入 2 mL poly-HEMA 溶液后在超净工作台中风干 12 h,铺两次。用前于紫外灯下照射 30 min,用 PBS 洗 2 遍。用含体积分数 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基制备细胞悬液,每个孔加入  $5 \times 10^5$  个细胞后加入培养基及 3-MA(或 PBS),调整到所需的 3-MA 最终浓度(分别为 5,10,20 mmol/L),置于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。同时设置贴壁组作对照。

1.2.3 软琼脂培养基培养法 用三蒸水制备 10 g/L 及 6 g/L 的低熔点琼脂糖灭菌后备用。用 2 mL 含体积分数 10%胎牛血清及 5 g/L 软琼脂的 RPMI-1640 培养基(含终浓度 5 mmol/L 3-MA 或相应体积的 PBS)加入 6 孔板制作下层凝胶后冷凝;用含体积分数 10%胎牛血清及 3 g/L 软琼脂的 RPMI-1640 培养基重悬细胞(含终浓度 5 mmol/L 3-MA 或相应体积的 PBS),于含凝胶的 6 孔板内每孔加入 2 mL 含  $5 \times 10^3$  个细胞的悬液,避光于 37 ℃,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 温箱中孵育 14 d 后倒置显微镜下计数集落数目(>100 个细胞)。设置 2 个平行孔。实验重复 3 次。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖 具体方法参照 CCK-8 试剂盒说明书进行。将 SW1990 细胞按  $1 \times 10^4$ /孔接种于 poly-HEMA 预先包被的 96 孔培

养板(100  $\mu\text{L}$ /孔,含终浓度 5 mmol/L 3-MA 或相应体积的 PBS),避光于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数 5%  $\text{CO}_2$  温箱培养 24 ~ 48 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂,体积分数 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  的细胞培养箱中避光孵育 4 h,终止孵育,上机(WELLSCAN, MK3)检测 OD 值(以培养基+10  $\mu\text{L}$  CCK-8 作为空白调零孔),每组设 4 个复孔,实验重复 3 次,并按以下公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 处理组 OD 值) / 对照组 OD 值  $\times$  100%。

**1.2.5 Transwell 小室模型检测细胞迁移能力** 各组细胞用无血清的 RPMI-1640 培养基洗 2 次后,调整细胞密度为  $10^6$  /mL (含 5 mmol/L 3-MA 或相应体积 PBS),各取 100  $\mu\text{L}$  接种到 Transwell 小室上室内(孔径 8  $\mu\text{m}$ , Corning 公司),同时在 24 孔板内(下室)加入 500  $\mu\text{L}$  含体积分数 20% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(含 5 mmol/L 3-MA 或相应体积 PBS),设置 3 个复孔。避光于 37  $^{\circ}\text{C}$ ,体积分数 5%  $\text{CO}_2$  温箱培养 15 h 后取出小室,用棉签擦去上层细胞,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 2 次,1 g/L 结晶紫染色 15 min;洗涤残余染料,倒置显微镜观察并拍照,每组随机选取 10 个视野计数,重复实验 3 次。

**1.2.6 流式细胞技术及 TUNEL 试剂盒检测凋亡率** 收集细胞后 PBS 洗 2 次,根据 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒(Bender 公司,奥地利)实验步骤,用结合缓冲液重悬细胞后加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 溶液及 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶,室温避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测(FACSCalibur, 美国),结果以凋亡细胞百分率(%)表示。实验重复 3 次。收集的细胞用 40 g/L 多聚甲醛室温固定后用体积分数 80% 乙醇重悬,于 24 孔板每孔加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液,根据 TUNEL 试剂盒说明(Merck, 美国)完成剩下的步骤。于倒置显微镜视野下随机计数  $1 \times 10^4$  个细胞计算阳性细胞数比例。重复实验 3 次。

**1.2.7 免疫荧光检测 LC3** 用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞 15 min,加入体积分数 0.3% Triton-X 100 室温处理 20 min, PBS 洗 3 次,然后加入体积分数 1% BSA 室温封闭 30 min,加入体积分数 1% BSA 稀释的兔抗人多克隆 LC3 抗体(1:100),4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜, PBS 洗 3 次后,加入体积分数 1% BSA 稀释的 FITC 标记的羊抗兔 IgG(1:200)室温下避

光孵育 60 min, PBS 洗涤细胞后, DAPI 室温下细胞核染色 10 min, PBS 洗涤细胞 3 次,加入抗荧光淬灭液,显微镜(Nikon, 日本)下观察。

**1.2.8 透射电镜检测细胞自噬** 收集悬浮培养 24 h(含 20 mmol/L 3-MA 或相应体积 PBS)的细胞, 25 g/L 戊二醛前固定后送中山大学北校区电镜室予 10 g/L 锇酸后固定,梯度乙醇脱水后包埋,超薄切片机(Leica, 德国)切片,制片后透射电镜(Philips CM 10, 美国)下随机选取 10 个视野计数自噬体及自噬溶酶体数目。

**1.2.9 统计学方法** 数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间或两组间比较分别用单因素方差分析或  $t$  检验。应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学处理。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 胰腺癌 SW1990 细胞具有天然失巢凋亡抗性

软琼脂集落形成能力是观察细胞失巢凋亡的经典方法之一。胰腺癌细胞 SW1990 在软琼脂培养 14 d 后, 3-MA 处理组形成集落数为  $(2.3 \pm 2.63)$  个,显著低于对照组(PBS)  $(9 \pm 3)$  个( $P < 0.05$ )。而对于 H6C7 细胞,无论是处理组还是对照组均未见集落形成。结果表明胰腺癌 SW1990 细胞具有天然失巢凋亡抗性及转移潜能,并且可被 3-MA 抑制(图 1)。

### 2.2 3-MA 抑制 SW1990 细胞增殖

3-MA 作用 24 h 对胰腺癌细胞 SW1990 的增殖抑制率为  $(36.1 \pm 2.4)\%$ ,作用 48 h 对其的增殖抑制率为  $(24 \pm 6)\%$ 。结果表明 3-MA 可明显抑制胰腺癌 SW1990 细胞的增殖(图 2)。

### 2.3 3-MA 抑制悬浮培养 SW1990 细胞迁移

3-MA 处理的 SW1990 悬浮培养细胞,其穿膜数为  $25 \pm 4$ ,对照组为  $81 \pm 4$  ( $P = 0.00$ );而对于 SW1990 贴壁培养细胞,3-MA 处理组其穿膜数为  $1.3 \pm 0.5$ ,而对照组为  $3.2 \pm 1.0$  ( $P = 0.41$ )。结果显示经过悬浮培养的细胞迁移能力明显强于常规贴壁培养细胞者 ( $P < 0.01$ ),3-MA 处理组穿膜细胞数明显少于对照组,表明 3-MA 可抑制经悬浮培养的 SW1990 迁移能力(图 3)。

### 2.4 3-MA 诱导 SW1990 细胞凋亡

流式细胞技术结果显示 SW1990 凋亡率悬浮处理组为  $(16.6 \pm 2.4)\%$ ,悬浮对照组为  $(9.7 \pm$

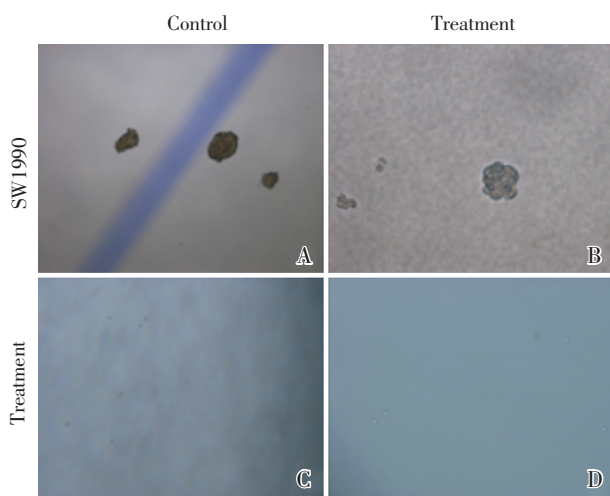


图 1 软琼脂克隆形成实验

Fig.1 soft agar clone formation culture

Treatment group: 3-methyladenine; Control group: PBS; 100 ×

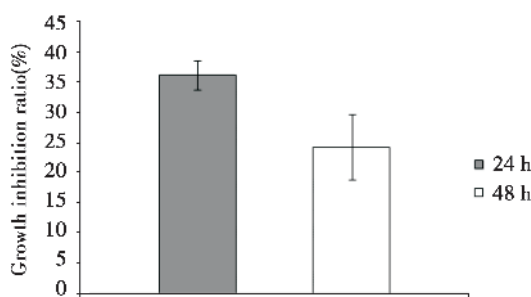


图 2 3-methyladenine 抑制胰腺癌细胞 SW1990 增殖

Fig.2 Cell viability assay: 3-methyladenine inhibits the proliferation of pancreatic cancer cell line SW1990

1.8)%, ( $P = 0.00$ ); 贴壁处理组为  $(5.1 \pm 2.4)\%$ , 贴壁对照组为  $(2.9 \pm 1.4)\%$ , ( $P = 0.22$ )。TUNEL 试剂盒结果显示 SW1990 凋亡率悬浮处理组为  $(1.7 \pm 0.4)\%$ , 对照组为  $(0.34 \pm 0.14)\%$ , ( $P = 0.00$ ); 贴壁处理组为  $(0.210 \pm 0.026)\%$ , 对照组为  $(0.14 \pm 0.03)\%$ , ( $P = 0.70$ )。流式细胞技术及 TUNEL 检测均提示悬浮处理组凋亡率明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而贴壁培养两组间凋亡率差异无统计学意义。3-MA 浓度与失巢凋亡率呈正相关, 流式细胞技术结果显示 3-MA 浓度增加为 10、20 mmol/L 时凋亡率分别上升至  $(17 \pm 6)\%$  及  $(26 \pm 9)\%$ ; 延长 3-MA 的作用时间凋亡率短期内上升, 但持续延长时间凋亡率反而下降, 猜测延长悬浮时间可能刺激自噬性死亡的发生 (占凋亡细胞大部分) 从而使凋亡率明显升高, 而 3-MA 抑制了自噬并减少自噬性死亡进而使处理组凋亡率下降 (图 4-7)。

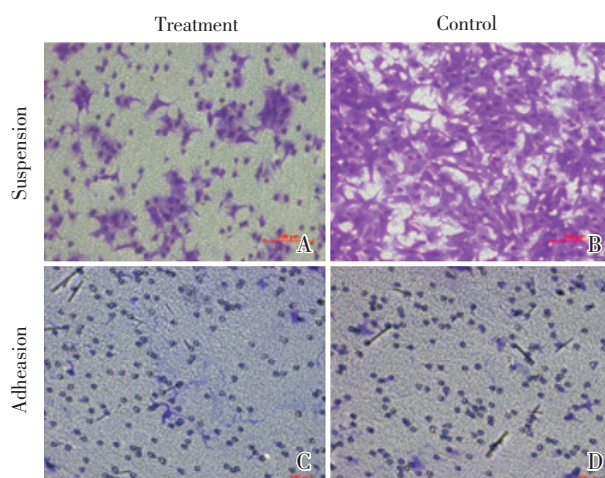


图 3 Transwell 小室细胞迁移实验

Fig.3 Transwell chamber migration assay of SW1990

The treatment group (A) and the control group (B) in suspension culture had significant differences. Less cells penetrating in adhesion culture, the treatment group (C) and the control group (D) had no significant differences. 200 ×

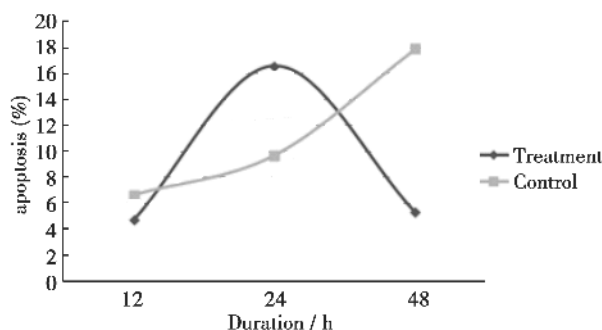


图 4 不同时间 3-methyladenine 诱导悬浮培养 SW1990 凋亡

Fig.4 Effect of 5 mmol/L 3-methyladenine on apoptosis rate of SW1990 depended on duration

Apoptosis rate increased with time in suspension culture, which decreased after 24 h culture in treatment group. It was supposed that long-time suspension culture lead to autophagic death and 3-methyladenine could inhibit the process.

## 2.5 3-MA 抑制 SW1990 细胞自噬

通过免疫荧光法标记自噬特异性蛋白 MAP1-LC3II 检测自噬水平, 结果显示各组均有荧光表达, 且悬浮细胞较贴壁细胞表达上调, 其中悬浮细胞中对照组较处理组有更强的荧光表达。透射电镜下可以观察到明显的线粒体肿胀, 周围可见大量的含细胞器或胞浆的空泡结构及自噬体或自噬

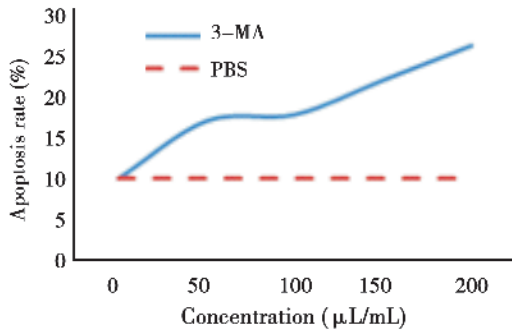


图 5 不同剂量 3-methyladenine 作用 24 h 对 SW1990 失巢凋亡的影响

Fig.5 Effect of 5 mmol/L 3-methyladenine on apoptosis rate of SW1990 was dose-dependent

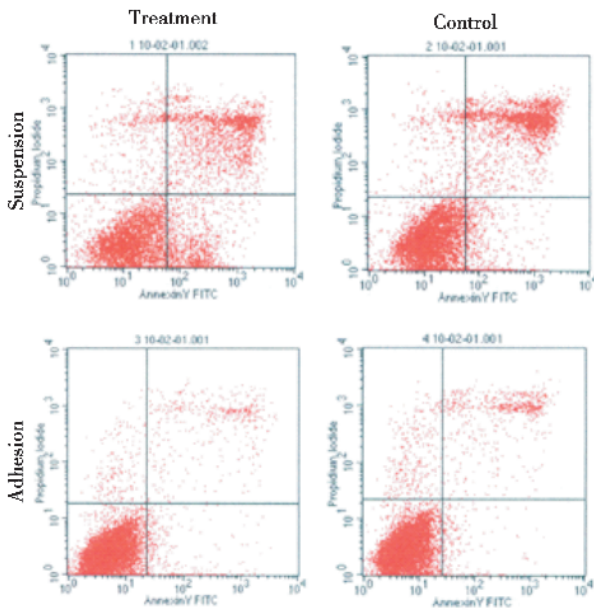
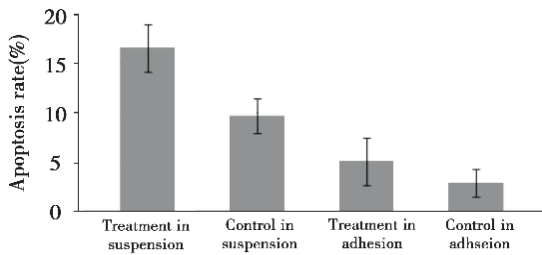


图 6 流式细胞技术检测 SW1990 凋亡  
Fig.6 One of the FCM result of SW1990

Apoptosis rate of treatment group was obviously higher than that of control group, both of which were higher than that of adherent.

溶酶体, 对照组较处理组明显; 而处理组细胞可见较多的不含胞浆或者细胞器的空泡结构。平均每个视野 SW1990 对照组及处理组自噬体或者自噬

溶酶体分别为  $8 \pm 5$  vs  $4.7 \pm 1.5$ , ( $P = 0.03$ ) (图 8-9)。

### 3 讨论

上皮细胞具有黏附依赖性, 正常上皮细胞与细胞外基质脱离接触后可诱发细胞凋亡, 称为失巢凋亡, 为了解胰腺癌细胞失巢凋亡状况, 我们通过软琼脂克隆形成及 poly-HEMA 悬浮培养实验模拟细胞失巢状态<sup>[1-3,6]</sup>, 结果表明: 与人永生化胰腺导管上皮细胞 H6C7 相比, 胰腺癌 SW1990 细胞具有失巢凋亡抗性, 肿瘤细胞产生失巢凋亡抗性的机制可能与 Bcl-2 途径、整合素途径、PI3K/AKT 途径、FAS-FADD 途径等有关<sup>[7-8]</sup>, Zhang 等<sup>[9]</sup>发现肿瘤细胞可通过激活 PI3K/AKT、ERK 途径使细胞发生重聚集、周期停滞、降低对外界敏感性等现象即通过 synoikis-like 模式获得失巢凋亡抗性。

新近研究表明自噬在细胞保护和细胞凋亡中发挥着重要作用。因此, 我们选择自噬抑制剂 3-MA 处理胰腺癌 SW1990 细胞, 观察 3-MA 对 SW1990 细胞增殖、凋亡及迁移能力等的影响, 初步探讨自噬在 SW1990 细胞失巢凋亡抗性中是否发挥作用, 抑制自噬是否影响 SW1990 细胞失巢凋亡抗性。结果表明: 自噬抑制剂 3-MA 确实能提高 SW1990 失巢凋亡率并明显抑制其增殖及迁移能力, 但对于非失巢状态的细胞影响并不大。原因考虑有二: 其一, 自噬是细胞处于不利应激时降解错误折叠的蛋白质或者老旧细胞器获取新能量的代谢反应。非失巢状态的细胞仅存在非常低的基础水平的自噬或者自噬未激活, 抑制自噬对其影响不大有关。本实验组免疫荧光法标记自噬体膜特征性蛋白 LC3 结果也显示悬浮对照组较贴壁组表现出更高的表达, 说明悬浮培养模拟失巢状态后细胞因处于不利于存活的应激状态而激活了细胞的自噬活性, 此时抑制自噬细胞凋亡率及增殖、迁移能力就明显受影响了; 其二, Zhang<sup>[9]</sup>等提出的 synoikis-like 模式, 本实验组也观察到了类似的表现: 细胞在悬浮状态下重新聚集, 呈现多个类似克隆的细胞团, 并且 3-MA 组表现出重贴壁时间延长、贴壁不牢的现象。PI3K 途径不仅参与细胞凋亡及自噬也参与细胞黏附, 悬浮培养可能在某种程度上激活了 PI3K 的活性, 此时抑制 PI3K 活性使细胞的黏附能力下降, 不利于细胞的重聚集, 凋亡率自然就增加了。

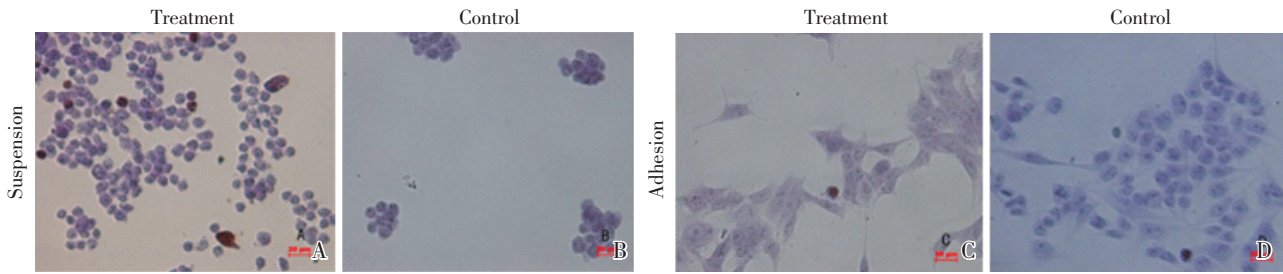


图 7 TUNEL 试剂盒检测 SW1990 凋亡

Fig.7 Apoptosis rate of SW1990 in TUNEL kit

A, B, C, D: The apoptosis rate of treatment group (A) was significantly higher than control group (B) in suspension and higher than that in adhesion culture (C, D). 400 ×

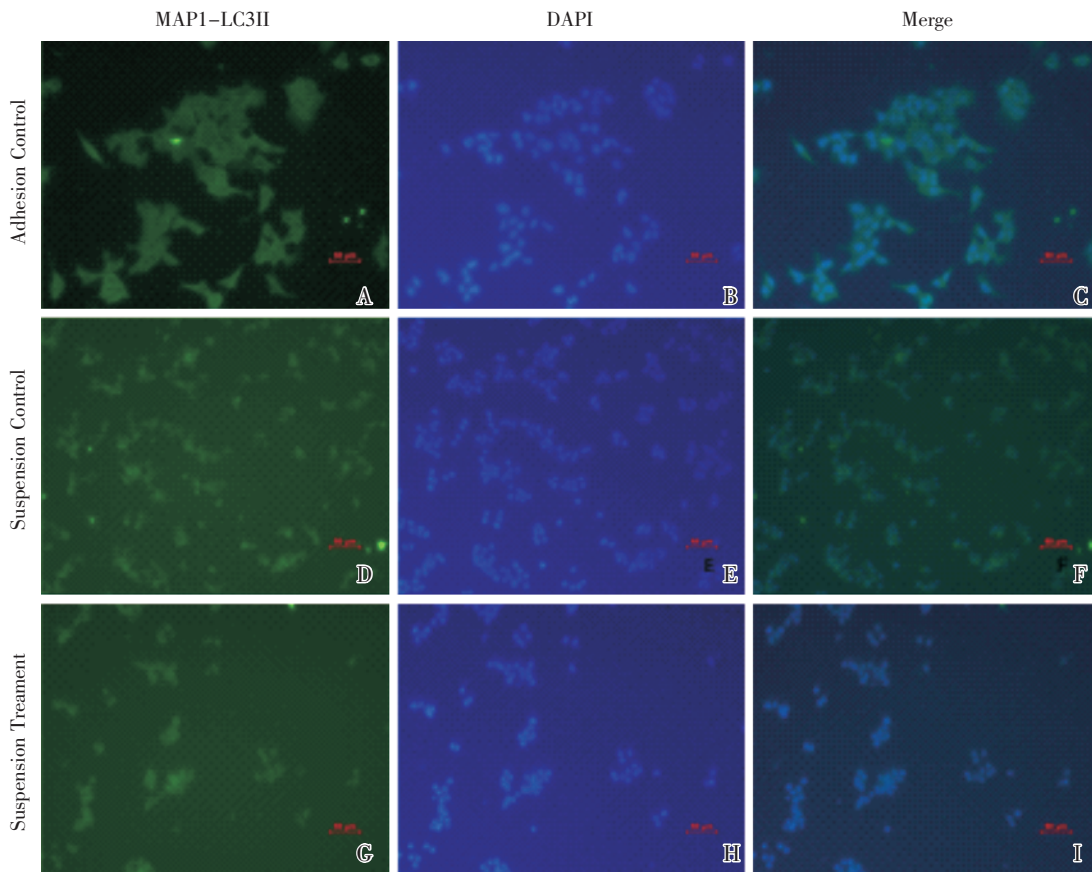


图 8 免疫荧光法检测不同组自噬特异性蛋白 MAP1-LC3II 水平

Fig.8 Immunofluorescence result of SW1990

A, B, and C were the photos of adhesion. D, E, and F were the photos of suspension without 3-methyladenine. G, H, and I were the photos of suspension with 3-methyladenine. B, E, and H were the photos showing DAPI nuclear staining. 200 ×

3-MA 抑制自噬诱导 SW1990 细胞失巢凋亡的机制:3-MA 作为一种自噬抑制剂明显提高胰腺癌细胞凋亡率提示自噬的激活可能与胰腺癌细胞抵抗失巢凋亡有关,而自噬的抑制有利于诱导胰腺癌细胞失巢凋亡。既往研究认为自噬及 PI3K-AKT 途径可能参与了细胞的增殖及迁移,3-MA

对 PI3K 的 3 种亚型都具有抑制作用,3-MA 可能通过抑制 class III PI3K 而抑制自噬体膜特征性蛋白 MAP1-LC3 II 的转化过程抑制自噬的激活进而抑制细胞增殖及迁移<sup>[10-13]</sup>。然而,Ito<sup>[14]</sup>等的研究显示 3-MA 抑制增殖、迁移可能通过抑制 class I PI3K 和 class II PI3K 或其他分子实现,但与抑制

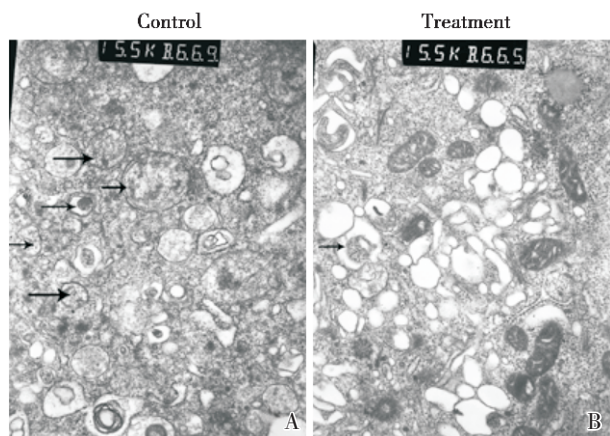


图 9 透射电镜观察 3-methyladenine 诱导细胞自噬  
Fig.9 Autophagosomes observed by TEM (Transmission electron microscopy)

More autophagosomes and autolysosomes could be observed in control group (A) than treatment group (B). However, great amount of vesicles without cytoplasm nor organelles containing displayed in treatment group.

自噬无关。我们通过透射电镜观察发现 SW1990 对照组较处理组可观察到线粒体明显肿胀, 周围可见到自噬体或自噬溶酶体, 而两组均可见较多的不含细胞器或者胞浆的空泡结构。然而, 免疫荧光法检测 MAP1-LC3II 两组却差异甚微。Kar<sup>[15]</sup>等观察到一种依赖于自噬标志性蛋白 MAP1-LC3II 却与自噬无关的不同于凋亡或自噬性死亡的细胞死亡模式: 胞浆聚集大量不含细胞器的液泡结构及内质网肿胀的, 其不能被 3-MA 等 PI3K 自噬抑制剂抑制, 考虑这种细胞死亡模式可能亦参与了失巢凋亡。3-MA 抑制自噬诱导 SW1990 细胞失巢凋亡的信号机制有待进一步明确。

#### 参考文献:

- [1] Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis [J]. *Cell Biology*, 1994, 124(4): 619-626.
- [2] Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12.
- [3] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer [J]. *Nature Rev Cancer*, 2007, 7(6): 961-967.
- [4] Maycotte P, Thorburn A. Autophagy and cancer therapy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(2): 127-137.
- [5] Roy S, Debnath J. Autophagy and Tumorigenesis [J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(4): 383-396.
- [6] Smit MA, Geiger TR, Song JY, et al. A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(13): 3722-3737.
- [7] Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells [J]. *Biochemical Pharmacol*, 2008, 76(6): 1352-1364.
- [8] Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD, et al. Anoikis resistance and tumor metastasis [J]. *Cancer Letters*, 2008, 272(1): 177-185.
- [9] Zhang Z, Cao L, Li J, et al. Acquisition of anoikis resistance reveals a synoikis-like survival style in BEL7402 hepatoma cells [J]. *Cancer Letter*, 2008, 267(1): 106-115.
- [10] Ren Y, Huang F, Liu Y, et al. Autophagy inhibition through PI3K/Akt increases apoptosis by sodium selenite in NB4 cells [J]. *BMB Report*, 2009, 42(9): 599-604.
- [11] Degtyarev M, Mazière AD, Orr C, et al. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents [J]. *Cell Biol*, 2008, 183(1): 101-116.
- [12] Isabelle V, Esteban R. Control of autophagy initiation by phosphoinositide-3-phosphatase jumpy [J]. *EMBO J*, 2009, 28(15): 2244-2258.
- [13] Wu YT, Tan HL, Shui G, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase [J]. *Biol Chem*, 2010, 285(14): 10850-10861.
- [14] Ito S, Koshikawa N, Mochizuki S, et al. 3-Methyladenine suppresses cell migration and invasion of HT1080 fibrosarcoma cells through inhibiting phosphoinositide 3-kinases independently of autophagy inhibition [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(2): 261-268.
- [15] Kar R, Singha PK, Venkatachalam MA, et al. A novel role for MAP1 LC3 in non-autophagic cytoplasmic vacuolation death of cancer cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28(28): 2556-2568.

(编辑 孙慧兰)