

- 10 Zhang H, Liu H, Davies KJ, *et al.* Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(9): 2038-2046
 - 11 Kim HJ, Zheng M, Kim SK, *et al.* CO/HO-1 induces NQO-1 expression via Nrf2 activation[J]. *Immune Netw*, 2011, 11(6): 376-382
 - 12 Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591(1-3): 66-72
 - 13 Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(2): 319-333
 - 14 Ma Q, Kinneer K, Bi Y, *et al.* Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction[J]. *Biochem J*, 2004, 377(Pt 1): 205-213
 - 15 Glenn MB, Lexell J. Ginseng[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2003, 18(2): 196-200
 - 16 Sun Q, Meng QT, Jiang Y, *et al.* Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia reperfusion induced renal injury by activating Nrf2/ARE pathway[J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 7195-7205
- (收稿日期: 2013-10-19)
(修回日期: 2013-12-10)

3-甲基腺嘌呤诱发 HeLa 细胞自噬及抑制辐照细胞自噬的双重作用

杨艳丽 刘 玲 王 豫 刘晓丹 周平坤

摘 要 目的 了解 PI₃K 抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)对电离辐射后细胞自噬的影响,初步探讨作用机制。方法 细胞增殖-毒性试剂盒 CCK-8 检测不同浓度 3-MA 处理及⁶⁰Co γ 射线 4Gy 照射或联合 3-MA 作用的 HeLa 细胞细胞生长变化和毒性,Annexin V-FITC/PI 双标记检测细胞凋亡,Western blot 检测自噬相关蛋白 SQSTM1/p62 表达, Lipofectamine 2000 介导转染 GFP-LC3 质粒,共聚焦显微镜检测自噬体形成。结果 3mmol/L 以上浓度 3-MA 作用 24h 对 HeLa 细胞增殖有明显的抑制作用,作用更长时间产生致死毒性效应。无论是 5mmol/L 3-MA 单独作用还是单独 4Gy 照射,均能诱发 HeLa 细胞自噬。但 3-MA 与(射线辐照联合作用时,HeLa 细胞自噬受到抑制,细胞凋亡显著增加。结论 PI₃K 抑制剂 3-MA 既诱发细胞自噬又能抑制电离辐射诱发细胞自噬,以在不同的条件下两种方式影响细胞存活。

关键词 3-甲基腺嘌呤 细胞自噬 细胞凋亡 细胞存活

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Dual Effects of 3-Methyladenine on HeLa Cells Autophagy: Induction by the Action Alone and Inhibition on Autophagy Induced by Ionizing Radiation. Yang Yanli, Liu Ling, Wang Yu, *et al.* University of South China, Hunan 421001, China

Abstract Objective To investigate the cell survival effect of phosphoinositide 3-kinase (PI₃K) inhibitors 3-Methyladenine (3-MA) in response to ionizing radiation (IR) and the possible mechanism. **Methods** Firstly, HeLa cells were treated with 3-MA in different concentration, cell counting Kit-8 (CCK-8) assay were used to detect the viability rate. Afterwards, HeLa cells were either treated with 5mmol/L 3-MA or not treated, then irradiated with ⁶⁰Co γ-ray, cultivated for a certain time, cell counting kit-8 (CCK-8) assay and annexin V-FITC/PI double staining were used respectively to detect the viability rate and observe apoptosis rate in order to make a clear understanding about the cell proliferation toxic-effect of 3-MA and IR. The GFP-LC3 puncta were examined under a confocal microscope after transfect GFP-LC3 by lipofectamin 2000. Western blot was performed to explore the expressions of autophagy-related proteins SQSTM1/p62. **Results** The proliferation inhibition and cytotoxicity of 3-MA were demonstrated after the treatment for more than 24h at the concentration 3mmol/L and higher. 5mmol/L 3-MA action alone can induce HeLa cells autophagy. However, 5mmol/L 3-MA can inhibit the 4Gy γ-ray-induced HeLa cell autophagy, and promote the apoptosis. **Conclusion** The cell survival

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31370843)

作者单位:421001 衡阳,南华大学公共卫生学院环境医学与放射卫生研究所(杨艳丽);100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所(杨艳丽、刘玲、王豫、刘晓丹、周平坤)

通讯作者:周平坤,电子信箱:zhoupk@bmi.ac.cn

rate was impeded in two ways, that were by inhibiting and inducing autophagy respectively after prolonged treated with the PI₃K inhibitors 3 - MA.

Key words 3 - Methyladenine; Autophagy; Aupoptosis; Cell survival

自噬是指细胞将一些聚集或错误折叠蛋白、损伤的细胞器等胞质成分通过包裹并最终运送至溶酶体降解的过程,可促进细胞代谢的原料的循环再利用^[1]。目前认为,自噬的主要功能之一是真核细胞在营养缺乏、生长因子撤除、能量匮乏或受到应激性的死亡威胁时,使细胞获得对抗不利的生长环境、维持稳态、实现更新的一种重要的自我保护性反应机制^[2]。但是,当细胞受到严重的不可修复的损伤,如大剂量的电离辐射辐照、某些化疗药物的作用,自噬就会转变成成为细胞的一种死亡机制。正是由于自噬在决定细胞命运中具有双面性,有关其调控机制的研究受到极大关注。

生长因子刺激信号通过激活磷脂酰肌醇 3 - 激酶 (phosphatidylinositol 3 - kinase, PI₃K)/Akt/mTOR 信号途径抑制自噬,而Ⅲ型磷脂酰肌醇 3 - 激酶复合物 (PI₃KC3/ Vps34) 是启动细胞自噬的一个关键调控复合体,PI₃KC3/Vps34 被激活后会产生磷脂酰肌醇 3 - 磷酸 (phosphatidylinositol 3 - phosphate, PIP), PIP 则促进其他自噬相关蛋白家族成员 (autophagy related protein family, Atg) 的募集,启动自噬过程^[3, 4]。3 - 甲基腺嘌呤 (3 - methyladenine, 3 - MA) 是一种磷脂酰肌醇 3 激酶抑制剂,因其能抑制参与自噬调节的Ⅲ型 PI₃K 的活性,而被广泛用于自噬研究^[6]。笔者前期的实验也证实,3 - MA 可以抑制饥饿诱导的细胞自噬,并增加细胞的放射敏感度。本研究发现,3 - MA 单独作用也能诱导细胞自噬和促进细胞凋亡。因此,进一步对 3 - MA 在辐射诱导的细胞自噬及凋亡中的作用进行探讨,将为今后 3 - MA 合理使用以及放射诱发自噬机制的阐述提供新的依据。

材料与方法

1. 细胞培养和试剂:人宫颈癌细胞 HeLa 为本实验室留存。细胞在含 10% 胎牛血清 (Hyclone 公司) 的 DMEM (Hyclone 公司) 中,37℃ 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。3 - 甲基腺嘌呤 (3 - MA) 购自 Sigma 公司。

2. 细胞照射:利用军事医学科学院放射与辐射医学研究所的⁶⁰Co 放射源 γ 射线照射,照射剂量率为 128.81 cGy/min。

3. CCK - 8 细胞增殖毒性检测试验分析细胞存活:将预定数量细胞接种于 A、B 两个 96 孔板中,A 板 4Gy γ 射线照射,B 板不照射。照射组和不照射组分别又分为加 3 - MA 组和不加 3 - MA 组,细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,分别于

不同时间吸干培养液 (每个时间设 3 ~ 5 个复孔),加入含 10 μl CCK - 8 (DojinDO 公司) 的新鲜培养液 100 μl,孵育 1h 后,450nm 波长测量吸光值 (OD 值),根据 OD 值计算细胞存活率。细胞存活率 (%) = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白 OD 值) × 100%。其中实验组为照射和 (或) 3 - MA 处理细胞组,对照组为未经任何处理的细胞组,空白组为单纯培养基加上 CCK - 8 试剂。

4. Annexin V - FITC/PI 双标记检测细胞凋亡:将细胞分为照射和不照射两组,每组又分为照射前 3h 加 3 - MA 和不加 3 - MA 两个亚组,分别 4Gy 照射后 0、6、24、30、48、72h 后,用 0.25% 胰酶消化,并用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次;以 1 × 10⁶/ml 的密度重悬细胞于 500 μl 缓冲液 (含 Ca²⁺) 中;分别加入 5 μl annexin V - FITC 和 5 μl 碘化丙啶 (propidium iodide, PI),轻轻混匀,室温避光孵育 15min,用流式细胞仪检测细胞凋亡。进行 3 次重复实验取平均值。

6. Western blot 法检测蛋白表达:用 PBS 洗涤各组细胞 2 次后,使用 M - PER 蛋白裂解液冰上裂解蛋白 30min,12000 × g 离心 15min,收集上清液。采用二喹啉甲酸法 (BCA 法) 测定蛋白浓度后,将蛋白与 6 × 上样缓冲液混匀,100℃ 煮沸 5min,蛋白上样量为 20 μg,行 8% SDS - PAGE 分离蛋白,将蛋白转印至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂牛奶于室温下封闭 1h;分别加入一抗 SQSTM1/p62/GAPDH (Santa Cruz 公司),4℃ 培育过夜后,TBST 清洗 3 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (北京中杉金桥公司) 室温摇晃孵育 1h 后,TBST 清洗 3 次,显影。

7. GFP - LC3 转染及免疫荧光分析:采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司) 转染带荧光标记 GFP 的自噬标记蛋白轻链 3 (GFP - LC3) 的质粒于 HeLa 细胞;转染后 24h 4Gy γ 射线照射,不同时间点收集细胞,4% 多聚甲醛固定并置于 4℃ 冰箱。将固定好的细胞 PBS 洗 3 次,每次 5min。用终浓度 0.3% TritonX - 100 透膜处理 15min,PBS 洗 3 次每次 5min,最后用 DAPI 染色细胞核 20min,再用 PBS 洗 3 次每次 5min,封片。荧光显微镜观察自噬体的形成,计数自噬体数量,实验重复 3 次。

8. 统计学方法:所有数据均利用 SPSS 13.0 统计学软件进行,多样本间比较采用方差分析,组间两两比较采用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1.3 - MA 的细胞增殖毒性及对 γ 放射损伤的影响:由于 5mmol/L 是文献报道中 3 - MA 较常用的的工作浓度,为此笔者设定 3 - MA 作用浓度为 5mmol/L,将 HeLa 细胞分为 4 组即:⁶⁰Co γ 射线 4Gy 照射组、3 - MA 处理组、照射加 3 - MA 组和实验对照组 (Control)。分别于照后 3 (细胞贴壁后)、6、9、12、48

和 72h,用 CCK-8 试剂检测了不同处理后 HeLa 细胞的增殖和毒性效应(表 1),结果显示各处理组与对照组相比,在 12h 以内细胞增殖没有明显的影响;3-MA 作用 24h 可发现明显的细胞增殖毒性,单独 4Gy 照射组与不做任何处理的对照组相比尚无明显变化;在照射后或 3-MA 作用 48h 以上时间,各实验组的

OD 值不但不增加,反而低于 24h 时间节点值,显示出明显的致死性细胞毒效应,而且 5mmol/L 3-MA 处理比 4Gy 照射的致细胞死亡毒性更大;72h 则显示复合毒性效应,细胞存活率更是下降到正常细胞的 40% 左右。

表 1 4Gy 照射和 3-MA 单独和复合作用的细胞毒性的时间效应(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

时间(h)	处理方式				P
	0	3-MA	4Gy	4Gy+3-MA	
3	1.21 ± 0.03	1.23 ± 0.05	1.21 ± 0.03	1.22 ± 0.06	0.93
6	1.27 ± 0.02	1.27 ± 0.06	1.22 ± 0.06	1.22 ± 0.02	0.10
9	1.29 ± 0.03	1.29 ± 0.12	1.24 ± 0.06	1.29 ± 0.08	0.26
12	1.49 ± 0.03	1.48 ± 0.08	1.44 ± 0.07	1.48 ± 0.04	0.61
24	1.86 ± 0.04	1.63 ± 0.02 ^{a,b}	1.80 ± 0.04	1.73 ± 0.02 ^{a,b}	0.00 ^c
48	1.96 ± 0.09	1.14 ± 0.11 ^{a,b}	1.73 ± 0.09 ^a	1.13 ± 0.05 ^{a,b}	0.00 ^c
72	1.88 ± 0.09	1.00 ± 0.10 ^{a,b}	1.36 ± 0.05 ^a	0.91 ± 0.02 ^{a,b}	0.00 ^c

^a 与相应时间对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与相应时间的 4Gy 照射组相比, ^b $P < 0.05$; 相应时间的各组方差分析, ^c $P = 0.00$

2.3-MA 促进受照射细胞凋亡:细胞经 4Gy 照射或 5mmol/L 3-MA 单独或联合作用后不同时间,Annexin V-FITC/PI 标记流式细胞术检测细胞凋亡(图 1)。与未经过任何处理的对照组相比,加 3-MA 作用或 4Gy 照射细胞 24h 以后,凋亡率显著高于对照组。而且,5mmol/L 3-MA 的细胞凋亡效应比 4Gy 照射更大,并随作用时间延长而增加,作用 48h,显示出 3-MA 与照射的复合效应,说明 3-MA 大于 48h 的长时间处理能显著促进受照射细胞的凋亡发生。

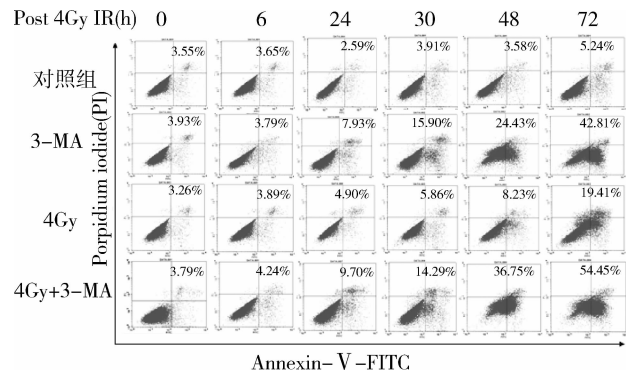


图 1 Annexin V-FITC/PI 标记流式细胞术检测 3-MA 对 4Gy γ 射线诱发细胞凋亡的影响

3.3-MA 自身及对 γ 射线诱导自噬的影响:在荧光显微镜下采用 GFP-LC3 融合蛋白来观察自噬体形成,并计数每个细胞质内的自噬体数目。结果显示:5mmol/L 3-MA 单独作用的 HeLa 细胞,可观察

到自噬体的形成,并随着时间的延长显著增多(图 2A),作用后 12h,可以明显观察由 3-MA 单独诱导的自噬体数目比单独 4Gy 照射更多(图 2B);4Gy 照射 HeLa 细胞,在照后 6~9h 自噬体的形成达到最高峰;意外的是,当 γ 射线照射前 3h 加入 3-MA 作用时,自噬在各个时间点均处于抑制状态。自噬选择性底物 SQSTM1/p62 蛋白的降解是细胞自噬的标志之一,各组细胞在 4Gy 或 5mmol/L 3-MA 单独或联合作用后不同时间点收集细胞,通过 Western blot 检测 SQSTM1/p62 的蛋白量变化。3-MA 和 4Gy 照射单独处理的 HeLa 细胞,SQSTM1/p62 蛋白量在 3h 内是表达增加的。随时间延长逐渐减少(图 3)。而细胞在照射前 3h 加 3-MA 处理后,SQSTM1/p62 表达基本处于同一水平,说明 3-MA 与辐射联合作用,抑制了 SQSTM1/p62 蛋白的降解,显示辐射诱导的细胞自噬受到抑制,此结果与图 3 一致。

讨 论

自噬被认为是除 DNA 修复和细胞周期检查点反应以外的细胞免受电离辐射 DNA 损伤致死效应的保护性机制之一^[8,9]。也有研究报道,自吞噬如同凋亡一样,是电离辐射所致细胞死亡的通路之一^[10]。由此可见,电离辐射作用细胞的自噬机制和生物学后果比较复杂。而在自噬的研究中,3 甲基腺嘌呤因被视为自噬关键调节分子 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶的抑制剂,而用于包括辐射在内的多种理化因子和环境因素诱发自噬的研究,在运用中普遍采用 5mmol/L 的

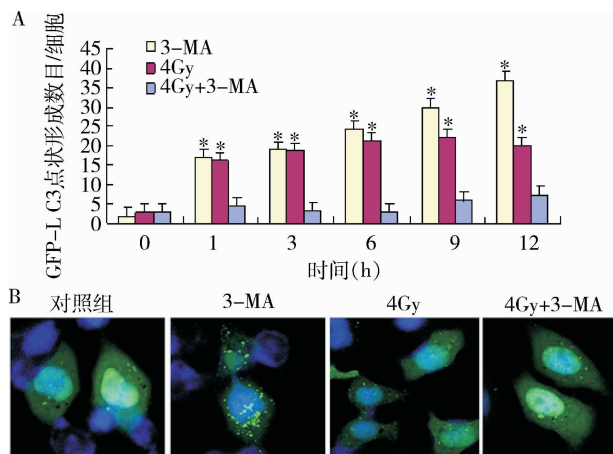


图 2 免疫共聚焦检测 5mmol/L 3-MA 处理后, 照射及未照射细胞自噬体的形成

A. 免疫荧光检测 HeLa 细胞经 5mmol/L 3-MA 作用 and (或) 4Gy γ 射线照射后不同时间的自噬体形成, * $P < 0.01$; B. 免疫荧光检测 HeLa 细胞经 5mmol/L 3-MA 作用 and (或) 4Gy γ 射线照射后 12h, 计数视野内自噬体形成数量, 每种处理每个时间点重复 3 次, 实验重复 2 次

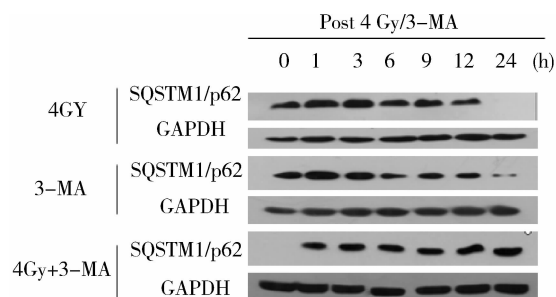


图 3 Western blot 检测 5mmol/L 3-MA 处理后, 照射及未照射细胞自噬蛋白 SQSTM1/p62 表达变化

较高作用浓度。本研究发现, 3-MA 在较高浓度下 (如 5mmol/L) 长时间作用超过 24h 能显著影响细胞存活率, 并比 4Gy 照射更能促进细胞凋亡, 3-MA 与辐射同时作用超过一定的时间, 则显示出更强的复合毒性。因此 3-MA 抑制自噬作用的时间和剂量特异性还有待进一步明确。本研究显示辐射可以诱导细胞自噬, 但 3-MA 单独作用于细胞也可以促进自噬, 这很可能与 3-MA 持续抑制 I 型 PI_3K 从而促进自噬有关^[11]。实验还发现, 3-MA 与 4Gy 照射联合作用的 24h 内, HeLa 细胞自噬和自噬底物 SQSTM1/

p62 蛋白的降解得到了有效的抑制, 其机制还有待进一步明确, 可能是 3-MA 诱发自噬后, 使细胞对后来的 4Gy 照射产生了适应性反应, 也可能是辐射后, 3-MA 作为 PI_3K 抑制剂发挥功能, 通过抑制 III 类 PI_3K 抑制了细胞自噬。

对照之前的细胞存活及凋亡结果, 笔者得出结论, 3-MA 能有效抑制辐射诱导的细胞自噬, 也能有效促进正常培养的细胞自噬。长时间作用能促进细胞凋亡, 尤其促进辐射后的细胞凋亡。细胞毒性效应浓度下的 3-MA 诱发自噬和凋亡作用的揭示, 为今后工作中 3-MA 作为自噬抑制剂的合理使用和结果的解释提供了有价值的信息。

参考文献

- Mizushima N. Autophagy: process and function [J]. Genes Development, 2007, 21(22):2861-2873
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease; a double-edged sword [J]. Science, 2004, 306(5698):990-995
- Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. The Beclin 1 - VPS34 complex - at the crossroads of autophagy and beyond [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(6):355-362
- Mah LY, Ryan KM. Autophagy and cancer [J]. Cold Spring Harbor perspectives Biol, 2012, 4(1):a008821
- Kong D, Yamori T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy [J]. Cancer Sci, 2008, 99(9):1734-1740
- 李俊英, 杨艳丽, 张赫, 等. 自吞噬促进电离辐射之后细胞的存活 [J]. 辐射防护, 2013, 33(4):193-198, 248
- Qiang L, Wu C, Ming M, et al. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress [J]. J Biol Chem, 2013, 288(3):1603-1611
- Liang B, Kong D, Liu Y, et al. Autophagy inhibition plays the synergistic killing roles with radiation in the multi-drug resistant SKVCR ovarian cancer cells [J]. Rad Oncol, 2012, 7:213
- Anbalagan S, Pires IM, Blick C, et al. Radiosensitization of renal cell carcinoma in vitro through the induction of autophagy [J]. Radiotherapy Oncol, 2012, 103(3):388-393
- 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]. J Biol Chem, 2010, 285(14):10850-10861

(收稿日期: 2014-01-24)

(修回日期: 2014-02-24)