DOI:10.16016/j.2097-0927.202504012

*ATG5*通过调控自噬流对抗人肝母细胞瘤HepG2细胞的营养应激

赵 莲[1],向冬云[1],吴惠仪[2],孙 昊[1],邓敬桓[1] 广西医科大学:[1]公共卫生学院,[2]第一临床医学院,广西南宁

［**摘要**］ **目的** 探究营养缺乏对人肝母细胞瘤HepG2细胞自噬流的影响及*ATG5*介导的对抗营养应激的自噬依赖性分子途径。**方法** 将慢病毒转染到HepG2细胞,敲降*ATG5*基因的表达,通过Western blot和qRT-PCR双向验证转染情况,使用HBSS盐缓冲液饥饿诱导处于对数生长的人肝癌细胞HepG2细胞0、1、2、3、4、5、6、7 h后,采用单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine,MDC)荧光染色法检测细胞内自噬小体的形成;运用Western blot分析微管相关蛋白1A/1B-轻链3(microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3,LC3)、自噬受体蛋白(sequestosome 1,P62)、自噬相关基因5(autophagy-related gene 5,ATG5)和营养应激通路(AMPK/mTOR通路)的表达变化;用CCK-8检测细胞的增殖活性。**结果** 与常规培养比较,饥饿处理HepG2细胞后,胞内MDC荧光颗粒数显著增加,饥饿6 h达峰值($P<0.000\ 1$),LC3B-Ⅱ、ATG5蛋白表达上升($P<0.05$),P62蛋白表达下降($P<0.05$),AMPK/mTOR通路随着饥饿时间增加逐渐被激活,自噬流强度增大;饥饿处理敲降ATG5的HepG2细胞,ATG5的表达降低($P<0.05$),LC3B-Ⅱ与P62的变化无显著差异,自噬流强度受抑制,细胞增殖活性降低($P<0.000\ 1$)。**结论** 人肝母细胞瘤HepG2细胞可以通过诱导*ATG5*表达调控自噬流对抗营养应激。

［**关键词**］ 肝母细胞瘤;营养应激;自噬流;*ATG5*

［**中图法分类号**］ R364.22;R730.23;R735.2 ［**文献标志码**］ A

ATG5 counteracts nutritional stress in human hepatoblastoma HepG2 cells by regulating autophagic flux

ZHAO Lian[1], XIANG Dongyun[1], WU Huiyi[2], SUN Hao[1], DENG Jinghuan[1] [1]School of Public Health, [2]First School of Clinical Medicine, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China

［**Abstract**］ **Objective** To investigate the effect of nutritional deficiency on autophagic flux in human hepatoblastoma HepG2 cells and the autophagy-dependent molecular pathway mediated by *ATG5* against nutritional stress. **Methods** Lentiviral siRNA knockdown of *ATG5* was performed to knock down the expression in HepG2 cells, and the transfection was verified by Western blotting and qRT-PCR. HBSS was used to treat HepG2 cells for 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 h for starvation-induced autophagy. Monodansylcadaverine (MDC) fluorescence staining was employed to detect the formation of intracellular autophagic vesicles. Western blotting was performed to measure the expression changes in microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), autophagy receptor protein (sequestosome 1, P62), autophagy-related gene 5 (ATG5) and nutrient stress pathway (AMPK/mTOR pathway) related proteins. CCK-8 assay was utilized to test cell proliferation. **Results** Compared with the HepG2 cells under conventional culture medium, starvation induction resulted in more autophagic vacuoles (accumulation of autofluorescent marker,

［**基金项目**］ 国家自然科学基金地区科学基金项目(82060434);广西硕士研究生创新项目(YCSW2024260)

［**通信作者**］ 邓敬桓,E-mail:502696499@qq.com

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:赵莲,向冬云,吴惠仪,等.*ATG5*通过调控自噬流对抗人肝母细胞瘤HepG2细胞的营养应激[J].陆军军医大学学报,2025,47(13):1454-1462.DOI:10.16016/j.2097-0927.202504012.

Citation:ZHAO L,XIANG D Y,WU H Y,*et al*.*ATG5* counteracts nutritional stress in human hepatoblastoma HepG2 cells by regulating autophagic flux[J].J Army Med Univ,2025,47(13):1454-1462.DOI:10.16016/j.2097-0927.202504012.

MDC), which peaked at 6 h of starvation (P<0.000 1), up-regulated protein levels of LC3B-Ⅱ and *ATG5* (P<0.05), decreased protein expression of P62 (P<0.05), gradual activation of the AMPK/mTOR pathway with elapse of starvation time, and increase in the intensity of autophagic flux. However, in the HepG2 cells with ATG5 knockdown, starvation treatment led to decreased ATG5 expression, no significant difference in LC3B-II and P62 changes, inhibited autophagic flux, and suppressed cell proliferation (P<0.000 1). **Conclusion** Human hepatoblastoma HepG2 cells can regulate autophagic flux to against nutritional stress by inducing *ATG5* expression.

[**Key words**] hepatoblastoma; nutritional stress; autophagic flow; *ATG5*

Supported by the Regional Science Fund Program of National Natural Science Foundation of China (82060434) and the Innovation Project for Master's Students of Guangxi Zhuang Autonomous Region (YCSW2024260). Corresponding author: DENG Jinghuan, E-mail: 502696499@qq.com

肝细胞癌(以下简称为肝癌)是一种常见的消化系统恶性肿瘤,位居我国恶性肿瘤死亡原因的第二位[1]。肝癌细胞作为合成和分解体内营养物质的癌变细胞,对营养的需求量较大,代谢水平较高,进而使营养缺乏成为肝癌的肿瘤微环境常态,贯穿肝癌发生、发展过程[2]。肿瘤血管是输送营养物质的主要通道,在实体瘤不断增大的过程中,瘤内异常的血管结构和功能及高间质压力严重损害了营养物质向肿瘤细胞的递送,且抗血管治疗也会导致癌细胞出现营养摄取受限[3]。营养缺乏本身是制约细胞生长、增殖和存活的关键因素,常作为肝癌的治疗机制,如:经动脉化疗栓塞阻断肿瘤血管,在改善中晚期肝癌患者预后中发挥重要作用[4]。然而,癌细胞在营养缺乏的肿瘤微环境中仍能生存和增殖,临床实践中抗血管治疗尚存在大量肝癌患者出现治疗耐受,导致肿瘤进展[5]。因此,探索癌细胞营养缺乏环境下的凋亡抵抗机制,将为肝癌治疗提供新的策略。

营养应激是细胞受外界的营养素供给异常引起的代谢紊乱并最终导致细胞应激,是一种细胞感知营养水平变化的反应性状态。为应对营养缺乏环境,处于营养应激状态的肿瘤细胞会做出适应性的应答。自噬是存在于真核生物体内的高度保守的一种饥饿应答机制,通过溶酶体途径"自食"细胞内异常折叠的蛋白质,受损或老化的DNA及细胞器,以维持细胞的内环境代谢稳态。自噬的发生涉及一组自噬相关基因(autophagy related gene,ATG)家族的严格调控,ATG通过参与自噬小体的形成、成熟及溶酶体的融合过程,主导自噬的调节[6]。其中自噬相关基因5(autophagy-related gene 5,ATG5)是细胞自噬途径中非常关键的调节基因,涉及自噬体形成的二组接合(ATG12、ATG8)系统。目前研究发现ATG5参与肿瘤细胞营养应激的应答机制[7],但在营养缺乏环境中对人肝癌细胞自噬的诱导作用尚未明确,营养应激过程中的自噬流强度变化与ATG5的相关性也缺乏有效的证据。

本研究选用适合肝癌代谢研究的人肝母细胞瘤(HepG2)[8],建立细胞自噬的体外模型,探讨*ATG5*调控肝癌细胞自噬流对抗营养应激的作用,为进一步研究自噬在营养缺乏的肿瘤微环境中对肝癌发生、发展的作用和机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

人肝癌细胞株HepG2(ATCC)、DMEM培养液、0.25%含EDTA无酚红胰蛋白酶、PBS缓冲液、HBSS、RIPA细胞裂解液、PMSF、BCA试剂盒、GAPDH鼠抗人单克隆抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司;胎牛血清购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;100×青链霉素混合液、细胞自噬染色检测试剂盒(MDC法)购自北京索莱宝科技有限公司;无血清细胞冻存液、免氯仿Trizol购自武汉汇宇诚生物科技有限公司;ATG5兔抗人单克隆抗体、HRP-山羊抗小鼠IgG(H+L)、HRP-山羊抗兔IgG(H+L)购自苏州博奥龙科技有限公司;微管相关蛋白1A/1B-轻链3(microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3,*LC3*)兔抗人单克隆抗体购自艾比玛特医药科技有限公司;自噬受体蛋白(sequestosome 1,P62)兔抗人单克隆抗体、mTOR兔抗人单克隆抗体、p-mTOR兔抗人单克隆抗体、AMPK兔抗人单克隆抗体、p-AMPK兔抗人单克隆抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司;CCK-8试剂盒购自苏州优逸兰迪生物科技有限公司;慢病毒LV-*ATG5*-RNAi和对照慢病毒LV-GFP购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司;特超敏ECL化学发光底物购自安徽白鲨生物科技有限公司;去基因组与逆转录一管化三代预混液购自莫纳(苏州)生物科技有限公司;高特异性qPCR试剂TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 HepG2接种于含10%胎

牛血清、1%青链霉素双抗的DMEM培养基中,置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。待细胞融合度达90%时,按1∶3比例进行传代培养。弃去原培养液,用预冷PBS清洗3 min。加入1 mL 0.25%胰蛋白酶溶液,37 ℃静置消化3 min。倒置显微镜下观察细胞变圆且部分脱落时,加入3 mL含血清培养基终止消化。用移液枪轻柔吹打瓶底细胞,转移至15 mL离心管中,1 000 r/min离心3 min。弃上清后,用1 mL新鲜培养基重悬细胞。取10 μL细胞悬液于细胞计数板,显微镜下计数后,以每皿6×10^5个接种于60 mm培养皿,继续培养至对数生长期。待细胞贴壁后,用1 mL PBS清洗2 min。实验组加入3 mL HBSS溶液,对照组补充等量DMEM完全培养基。两组均在37 ℃、5%CO_2条件下培养,分别于1、2、3、4、5、6、7 h收集细胞样本,其余培养条件保持一致。

1.2.2 慢病毒转染shRNA敲低*ATG5* 将对数生长期的HepG2细胞以5×10^4个/孔的密度接种于6孔板,加入2 mL DMEM高糖培养基常规培养,待细胞汇合度达20%~30%时进行病毒感染操作。根据预标定的病毒滴度1×10^8 TU/mL及目标感染指数值(multiplicity of infection,MOI),向每孔精准加入定量病毒悬液,同时补充含40 μL聚凝胺感染增强剂的DMEM培养基至终体积1 mL。感染后6 h更换为新鲜完全培养基继续培养18 h,确保病毒颗粒有效内化。培养24 h后移除感染培养基,更换为2 mL含2 μg/mL嘌呤霉素的筛选培养基,每48 h更换新筛选培养基,持续处理至空白对照组细胞完全死亡。采用倒置荧光显微镜观察GFP阳性细胞比例,当转染效率>80%时进行传代扩增,用于后续功能实验。用敲低*ATG5*基因及空载体的慢病毒感染HepG2细胞,分别记为敲低组(sh-*ATG5*)及空载对照组(NC-*ATG5*)。

1.2.3 MDC荧光染色法检测自噬小体形成 单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverine,MDC)是一种亲溶酶体荧光探针,在荧光显微镜下可特异性标记自噬小体并呈现绿色荧光。HepG2细胞培养至对数生长期,按5×10^3个/孔接种于96孔板,每孔加入100 μL培养基,继续培养24 h。弃原培养液,用预冷PBS清洗3 min,加入100 μL HBSS溶液建立0~7 h饥饿自噬模型。实验组与对照组均在此条件下培养,其间保持其他条件(温度、湿度、CO_2浓度)一致。去除HBSS溶液后,用PBS清洗3 min。每孔加入100 μL 10倍稀释的MDC染色液(PBS配制),室温避光孵育60 min。染色完成后,弃染色液并用PBS清洗2次,每次3 min。倒置荧光显微镜下观察绿色荧光(激发滤光片波长335~385 nm,阻断滤光片波长512 nm),记录并分析自噬小体形成情况。通过动态监测HBSS饥饿处理后HepG2细胞的自噬小体数量变化,定量分析MDC阳性细胞率和相对荧光强度,确定营养缺乏诱导自噬活性的关键时间节点。

1.2.4 Western blot检测蛋白表达 将对数生长期细胞以6×10^5个/皿接种于60 mm培养皿,待细胞贴壁且密度达75%时,进行自噬模型处理。使用细胞刮刀轻柔刮取皿底细胞,转移至1.5 mL离心管中,4 ℃下5 000 r/min离心5 min,弃上清。每管加入70 μL RIPA强裂解液(含1 mmol/L PMSF和蛋白酶抑制剂),冰上裂解15 min。采用超声破碎法(3×10 s脉冲,间隔30 s冰浴)充分破碎细胞,随后95 ℃金属浴孵育5 min使蛋白变性。BCA法测定蛋白浓度后,每孔加入等量蛋白样品经12%SDS-PAGE电泳分离(浓缩胶90 V 30 min,分离胶140 V 60 min),待溴酚蓝迁移至胶底部停止电泳。采用300 mA冰浴转膜,转膜时间根据目标蛋白分子量调整。转膜后用1×TBST洗膜3次,5%脱脂奶粉室温封闭90 min,1×TBST洗膜后,4 ℃孵育ATG5(1∶1 000)、LC3B(1∶1 000)、P62(1∶1 000)、mTOR(1∶1 000)、p-mTOR(1∶1 000)、AMPK(1∶1 000)、p-AMPK(1∶1 000)、GAPDH(1∶4 000)一抗过夜。次日,1×TBST洗膜后,室温孵育HRP标记二抗(1∶10 000)1 h,再次洗膜后进行化学发光检测。采用Image J软件计算目的蛋白与GAPDH内参的灰度值比值,通过多级曝光确保条带清晰且无过曝。

1.2.5 qRT-PCR检测基因表达 将待处理细胞培养皿置于超净工作台中,弃培养液,每个皿加入500 μL免氯仿Trizol,充分覆盖底部贴壁细胞,枪头轻吹至溶液澄清。转移裂解物至1.5 mL EP管,加200 μL RNase-free H_2O震荡混匀,室温静置5 min;12 000 r/min离心15 min,小心吸取上层水相。加入等体积异丙醇沉淀RNA,12 000 r/min离心10 min收集沉淀。75%乙醇洗涤两次后,空气干燥1 min,加入50 μL RNase-free H_2O溶解,将得到的RNA溶液进行浓度和纯度测定。配制20 μL逆转录反应体系:2 μL总RNA(700 ng)、4 μL 5×RTIII All-in-One Mix、1 μL dsDNase、Nuclease-Free Water补足至20 μL;随后37 ℃ 2 min去除gDNA,55 ℃ 15 min逆转录,85 ℃ 5 min灭活酶活性;产物立即置于冰上行后续实验或-80 ℃长期保存。配制qRT-PCR反应体系:10 μL SYBR Premix Ex Taq Ⅱ,0.8 μL正/反向引物(10 μmol/L),0.4 μL ROX校正染料,2 μL cDNA模板,6 μL ddH_2O。运用两步法扩增程序:预变性:95 ℃ 30 s(1次循环);循环参数:95 ℃ 5 s →

60 ℃ 30 s(40次循环);采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算基因相对表达量。

1.2.6　CCK-8法检测细胞增殖能力　取对数生长期细胞,以1×10⁴个/孔的密度均匀接种于96孔板,外周孔加入等体积PBS缓冲液以减少边缘效应。常规培养24 h后实验组更换为无血清HBSS缓冲液进行饥饿处理,处理时间梯度设置为1~7 h,对照组持续使用完全培养基培养。每孔避光加入10 μL CCK-8试剂(终浓度10%),轻微震荡混匀后继续避光孵育1 h;采用多功能酶标仪进行双波长检测(主波长450 nm,参比波长630 nm)。

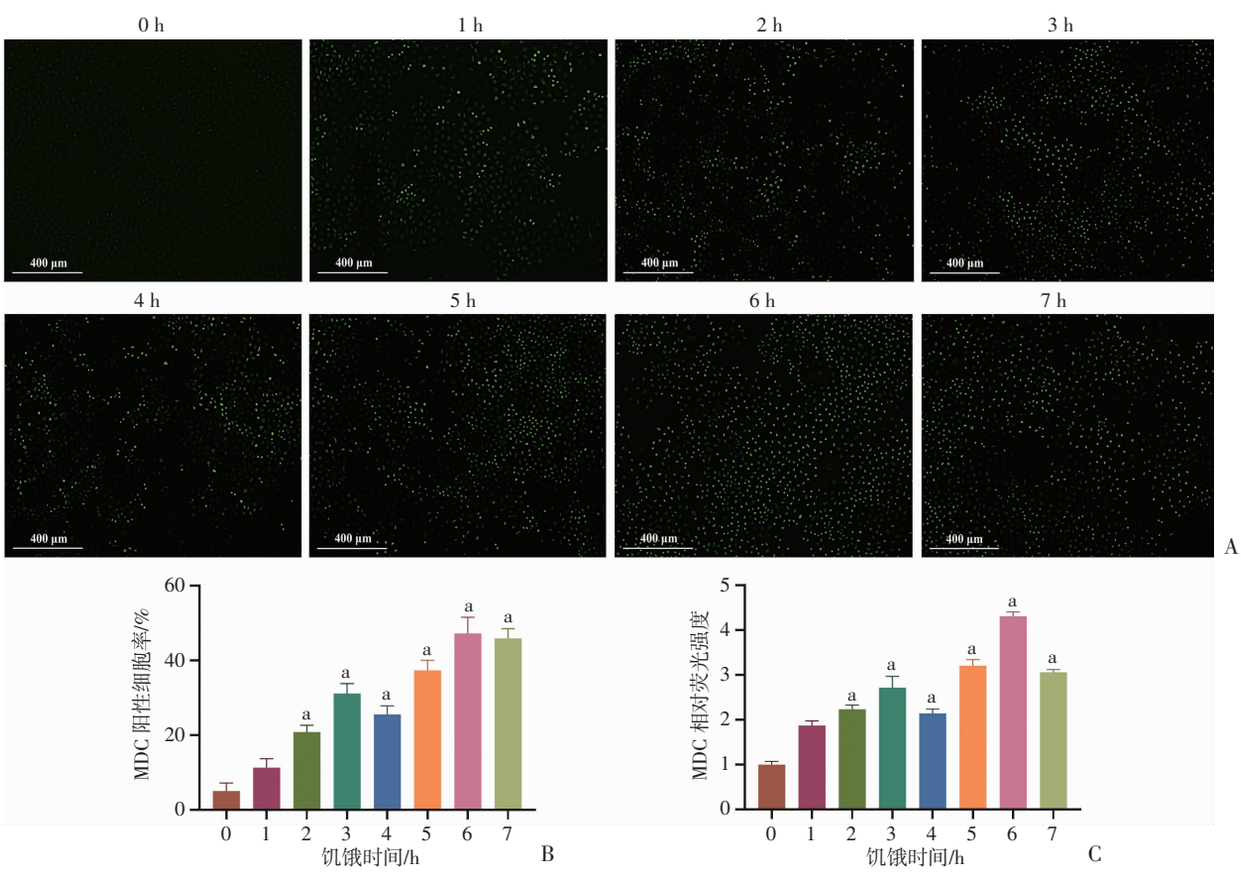
1.3　统计学方法

采用SPSS 23.0统计软件分析数据,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。所有连续变量均通过Shapiro-Wilk正态性检验($P>0.05$)确认服从正态分布,通过Levene检验验证满足方差齐性($P>0.05$)。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用LSD-t检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　饥饿处理HepG2细胞后的自噬小体数量呈时间依赖性增加

MDC染色液进入细胞后与自噬小体特异性结合,呈环状或聚集状形态,并在荧光显微镜下呈现为蓝绿色荧光颗粒。结果显示,与对照组相比,饥饿处理1 h的荧光标记呈散在分布(图1A),自噬小体密度处于基线水平,自噬处于静默期。随着饥饿时间延长,饥饿处理的MDC阳性细胞比例逐渐增加,细胞内MDC荧光强度及胞浆内荧光颗粒数量呈时间依赖性上升,提示自噬处于激活态。其中在饥饿处理4 h时的荧光标记出现减弱,随后逐渐增强,直至6 h的荧光标记呈密集分布且达到峰值,之后逐渐趋缓($P<0.000\ 1$,图1)。这提示自噬小体数量在饥饿处理前4 h逐步增加,4 h时出现短暂3下降后回升,6 h时达到峰值,6 h后数量趋于稳定,整个过程的自噬水平呈现出一个非线性的递增变化($P<0.000\ 1$,图1B、C)。



a:$P<0.000\ 1$,与饥饿时间0 h组比较

A:MDC法检测饥饿处理HepG2细胞0~7 h后自噬小体数量变化;B:饥饿处理HepG2细胞0~7 h后阳性细胞率统计分析;C:饥饿处理HepG2细胞0~7 h后相对荧光强度统计分析

图1　荧光显微镜观察饥饿处理HepG2细胞的MDC荧光染色($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.2 饥饿处理HepG2细胞后自噬流增加且应激通路被激活

与对照组相比,饥饿处理HepG2细胞2 h后,LC3B-Ⅱ开始升高(P<0.05),并随饥饿时间的延长逐渐增加,6 h时达峰值(P<0.000 1,图2C)。作为自噬底物的P62蛋白呈现与LC3B-Ⅱ相反的动态变化模式,饥饿处理2 h后,P62表达量开始降低(P<0.05),6 h时降至最低值(P<0.000 1),表明自噬介导的蛋白降解通路被充分激活(图2B)。随后P62水平逐渐回升,提示自噬流后期可能因底物耗竭进入反馈调节阶段。

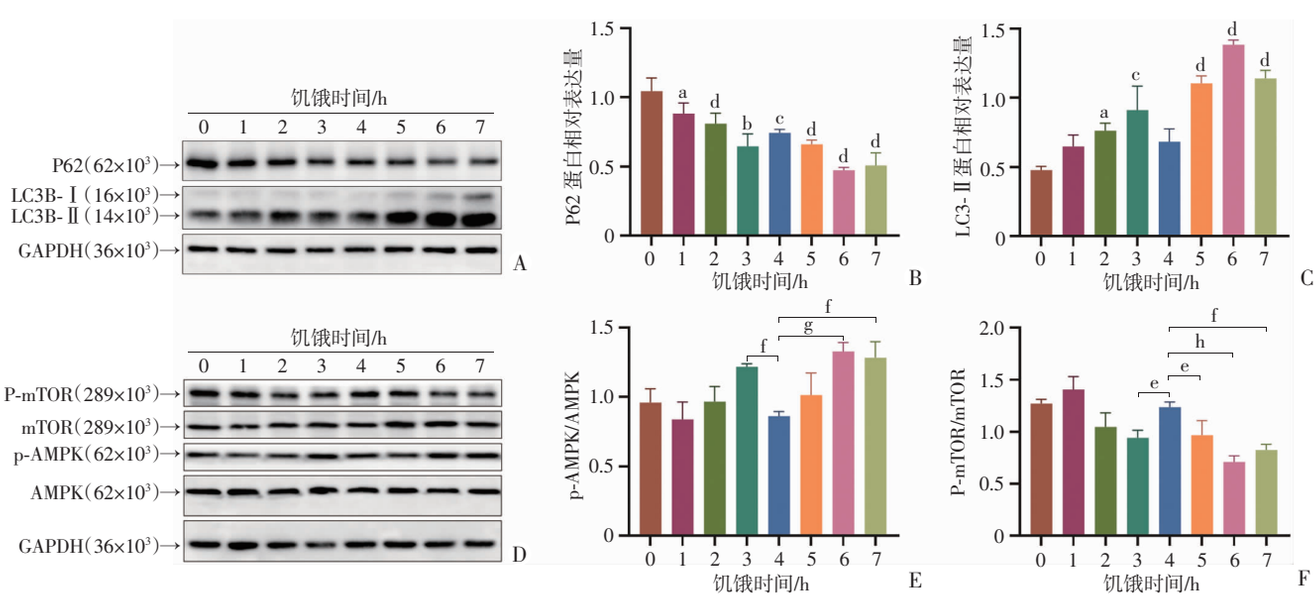
经饥饿处理HepG2细胞后,营养应激AMPK/mTOR通路关键蛋白的磷酸化水平及总蛋白表达出现变化。随着饥饿时间增加,p-AMPK/AMPK的比值升高,p-mTOR/mTOR的比值降低,通路活性呈现时间依赖性的非线性激活(图2D)。其中饥饿4 h的p-AMPK/AMPK比值出现显著降低(P<0.05),提示AMPK激酶活性(Thr172位点磷酸化)受到特异性抑制(图2E);同时p-mTOR/mTOR比值却出现显著升高(P<0.05),表明mTORC1复合物核心亚基Ser2448位点磷酸化水平上调(图2F)。提示AMPK/mTOR通路失衡可能耐受期自噬流下降的相关机制。值得注意的是,处理4 h时营养应激AMPK/mTOR通路关键蛋白的磷酸化水平及总蛋白表达变化与LC3B-Ⅱ水平突然短暂下降及MDC荧光染色检测自噬小体的结果一致。

2.3 饥饿处理HepG2细胞后引起ATG5的时序性表达

运用Western blot检测ATG5蛋白的动态表达变化,结果发现饥饿处理HepG2细胞诱导的营养应激可引起细胞ATG5蛋白的时序性表达。在饥饿处理前4 h,营养应激可使ATG5的表达逐渐升高,在饥饿4 h时ATG5表达出现下降,随后继续增加,至6 h达峰值(P<0.05),饥饿处理超过6 h后,表达趋于稳定,但略有下降(图3)。可见,饥饿处理HepG2细胞的ATG5蛋白表达变化与自噬小体、自噬蛋白(LC3和P62)一致,ATG5直接参与饥饿诱导的营养应激性自噬的启动过程。

2.4 敲低ATG5显著抑制HepG2细胞的增殖

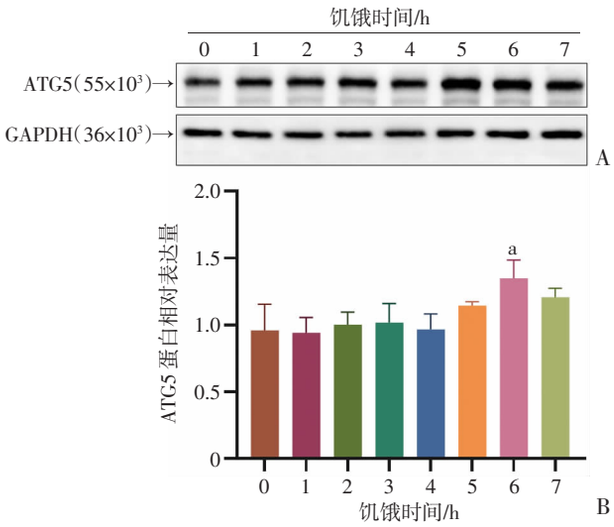
通过Western blot和qRT-PCR分别检测*ATG5*的表达,Western blot实验结果显示,与对照相比,sh-ATG5蛋白表达显著降低(P<0.05,图4A、B),qRT-PCR实验结果显示,与对照组相比,sh-*ATG5*的mRNA表达显著降低(P<0.01,图4C),结果提示成功构建敲降ATG5的HepG2细胞,证实ATG5表达被有效抑制。利用细胞增殖实验检测饥饿诱导的营养应激下的细胞存活率(图5),结果显示对照组(NC-ATG5)在饥饿处理6 h时细胞存活率为(75.4±5.6)%,与0 h组(100%)相比仅下降24.6%,提示自噬激活对细胞存活具有保护作用。而ATG5敲低组在饥饿处理6 h时存活率骤降至(27.5±6.8)%,表明自噬流被阻断导致细胞无法通过降解途径维持能量稳态(图5)。细胞存活



a:P<0.05,b:P<0.01,c:P<0.001,d:P<0.000 1,与饥饿时间0 h组比较;e:P<0.05,f:P<0.01,g:P<0.001,h:P<0.000 1

A:Western blot检测饥饿处理HepG2细胞后P62、LC3B蛋白的表达;B:饥饿处理后各组P62蛋白的相对表达量;C:饥饿处理后各组LC3B-Ⅱ的相对表达量;D:Western blot检测饥饿处理HepG2细胞后AMPK/mTOR通路蛋白的表达;E:饥饿处理后的p-AMPK蛋白相对表达量;F:饥饿处理后的p-mTOR蛋白相对表达量

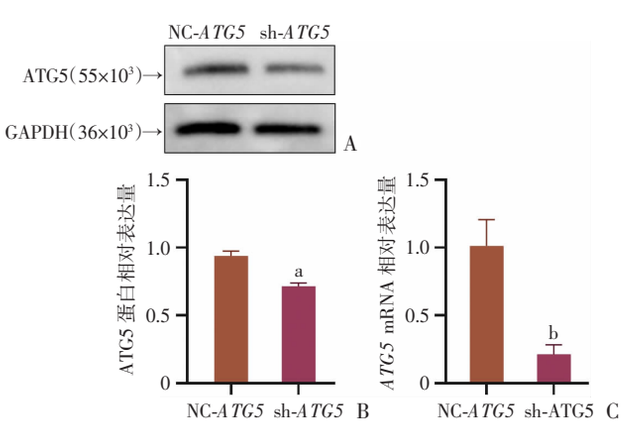
图2 Western blot检测饥饿处理HepG2细胞后自噬及AMPK/mTOR通路的蛋白表达(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.05$,与饥饿时间0 h组比较

A:Western blot检测饥饿处理后各组ATG5蛋白的表达;B:饥饿处理后各组ATG5蛋白的相对表达量

图3　Western blot检测饥饿处理HepG2细胞后ATG5蛋白的表达($n=3,\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.05$,b: $P<0.01$,与NC-*ATG5*组比较

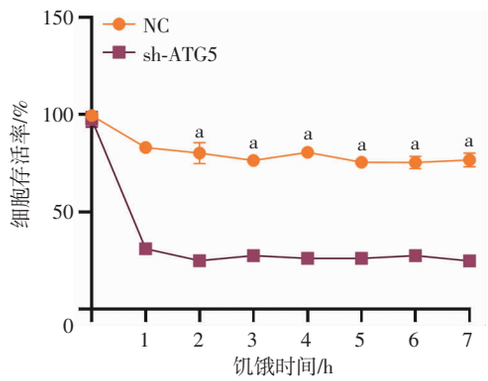
A:Western blot检测HepG2细胞转染后ATG5蛋白表达;B:转染后ATG5蛋白的相对表达量;C:qRT-PCR检测*ATG5*基因的表达

图4　HepG2细胞转染LV-ATG5-RNAi后*ATG5*蛋白和基因表达($n=3,\bar{x}\pm s$)

率、自噬强度与ATG5表达量呈显著正相关,说明ATG5依赖性自噬是细胞抵抗营养应激的关键机制。

2.5　饥饿处理转染sh-ATG5后HepG2细胞显著抑制自噬小体形成

使用MDC特异性标记饥饿处理和常规培养的sh-ATG5转染的HepG2细胞,结果显示:与常规培养比较,随着饥饿时间的延长,sh-ATG5转染的HepG2细胞仅被检测到转染载体携带的ATG5-GFP绿色荧光信号



a: $P<0.0001$,与NC组比较

图5　CCK-8检测饥饿处理sh-*ATG5*-HepG2细胞的增殖情况($n=3,\bar{x}\pm s$)

(激发波长488 nm),未观察到MDC特异性标记荧光,荧光强度及胞浆内荧光颗粒数量与常规培养的HepG2细胞的差异无统计学意义。这提示敲降*ATG5*基因显著性地抑制HepG2细胞在饥饿诱导营养应激中的自噬小体形成(图6)。

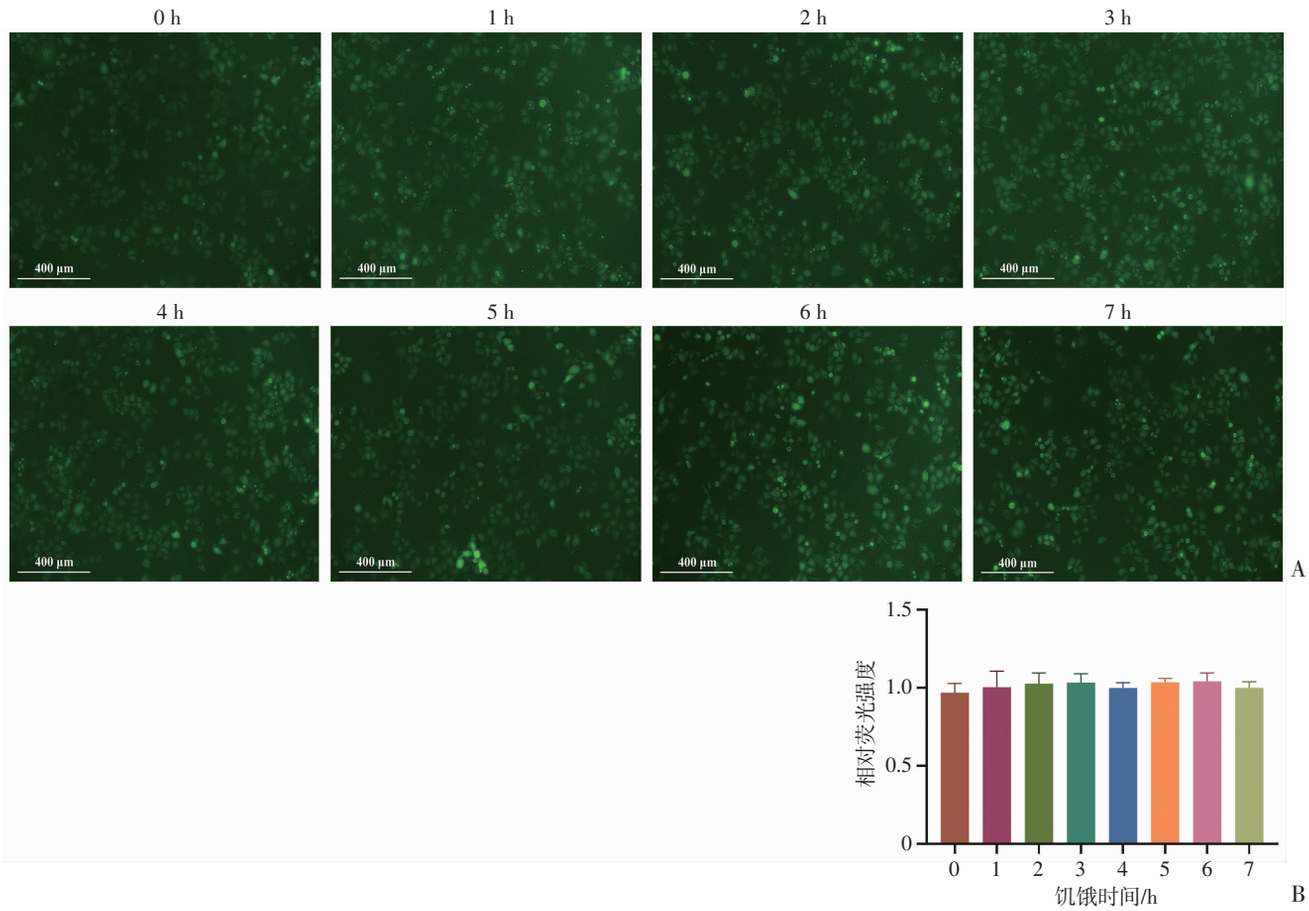
2.6　饥饿处理转染LV-ATG5-RNAi后的HepG2出现细胞自噬流减弱

运用Western blot技术检测sh-*ATG5*转染的HepG2细胞在饥饿处理时间(0~7 h)内的自噬蛋白(LC3和P62)表达情况,结果显示sh-*ATG5*转染的HepG2细胞在饥饿处理期间,LC3B-Ⅱ蛋白表达量低,差异无显著性统计学意义(图7C);与0 h比较,P62蛋白在饥饿处理期间表达相对稳定且未出现明显变化(图7B),差异无显著性统计学意义,这提示P62蛋白降解可能处于停滞状态,自噬底物降解通路失活。这些结果说明敲降*ATG5*基因阻断了营养应激诱导的自噬流的激活,进一步证实了*ATG5*与饥饿诱导的营养应激性自噬密切相关。

3　讨论

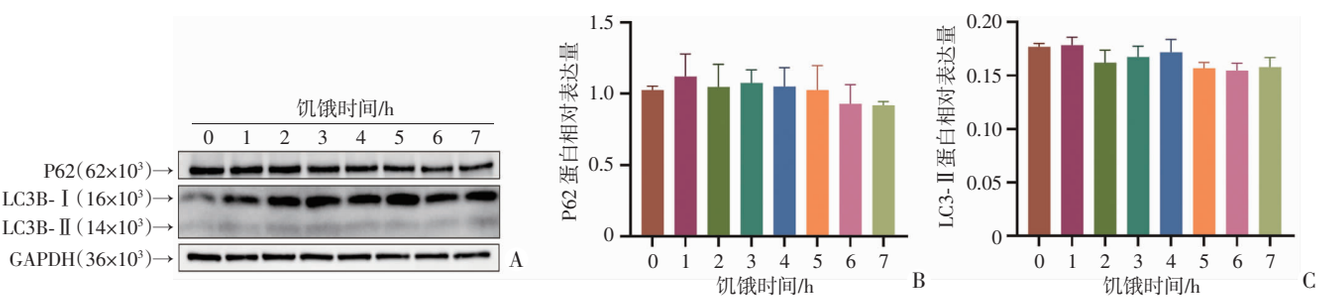
3.1　肝癌营养应激性自噬流的研究意义

肝癌是人体代谢中枢的恶性肿瘤,肝癌细胞富含能分解蛋白质、核酸、多糖等生物大分子的溶酶体[9],这一特性使其成为肿瘤自噬研究的焦点。自噬是真核生物特有的一种依赖溶酶体的高度保守的应激调控机制,在营养缺乏、缺氧、氧化应激等应激时,通过溶酶体将异常、受损或相对冗余的细胞器、生物大分子物质降解为小分子用于重新合成氨基酸、脂肪酸等有机分子以维持细胞存活所需营养和能量[10-11]。自噬流是指自噬通路中物质降解的动态流程,涉及自噬



A:MDC法检测饥饿处理sh-ATG5-HepG2细胞0~7 h后自噬小体数量变化;B:饥饿处理sh-ATG5-HepG2细胞0~7 h后相对荧光强度统计分析

图6 荧光显微镜观察饥饿处理sh-ATG5-HepG2细胞MDC荧光染色(n=3,$\bar{x}\pm s$)



A:饥饿处理sh-ATG5-HepG2细胞后P62、LC3B蛋白的表达;B:饥饿处理后各组P62蛋白的相对表达量;C:饥饿处理后各组LC3B-Ⅱ的蛋白相对表达量

图7 Western blot检测饥饿处理sh-ATG5-HepG2细胞的自噬相关蛋白表达(n=3,$\bar{x}\pm s$)

启动、自噬双层膜形成、自噬体形成、自噬溶酶体形成、自噬溶酶体降解的一系列动态过程。自噬流的顺畅与否决定了自噬的最终生物学效应。供血不足导致营养供应缺乏是肿瘤微环境的常见特征,这种营养应激状态成为调控癌细胞自噬流动态变化的关键微环境因素[12]。因此,对解析肝癌细胞在肿瘤微环境中的发病机制至关重要。

3.2 营养缺乏对人肝母细胞瘤HepG2细胞自噬流的影响

本研究用HBSS平衡盐溶液饥饿处理人肝母细胞瘤HepG2细胞,模拟营养缺乏的肿瘤微环境,连续时间动态研究营养应激对肝癌细胞自噬发生的诱导作用。结果表明,随着饥饿时间增加,营养缺乏使肝癌细胞产生应激,启动自噬,与既往研究结果相符[13]。

在启动自噬过程中,通过自噬囊泡和自噬相关蛋白的动态检测,发现自噬流随着饥饿时间增加逐渐增强,其中饥饿4 h出现一个突然而短暂的下降,随后自噬流强度逐渐回升,直到饥饿6 h达峰值,建立了体外营养缺乏诱导的人肝癌细胞自噬模型。HBSS平衡盐溶液是一种没有氨基酸、血清和生长因子但含有少量糖类的平衡盐溶液,能够维持渗透压、控制酸碱平衡和供给无机盐成分,对细胞自噬依赖时间诱导而不依赖药物浓度,且没有药物毒性[14]。HepG2细胞由常规培养转为HBSS平衡盐溶液饥饿处理,细胞的营养摄入突然减少,出现应激状态,在饥饿4 h出现一个短暂的耐受期,自噬流强度不升反而下降,营养应激通路的AMPK/mTOR通路活性出现抑制,随着平衡盐中的营养物质被消耗,细胞的代谢应激性状态逐渐加重,自噬流强度开始上升,激活营养应激的AMPK /mTOR通路,饥饿至6 h启动自噬。由此可见,癌细胞自噬启动前需经历自噬流储备过程,呈现非线性上升的变化模式,可能与营养应激的自身耐受性及对应激状态的感应有关,这些变化反映细胞在营养缺乏条件下的复杂生理反应,其中饥饿4 h可能成为逆转自噬的"窗口期",为干预自噬进程提供了新思路。

3.3 ATG5通过调控自噬流对抗营养应激

ATG5作为细胞自噬的关键分子,在细胞自噬过程中不可或缺。其基因序列为276个氨基酸,分布在人类染色体6q2上[15]。它主要依赖泛素样结合系统参与自噬体的形成:ATG12-ATG5系统作用于自噬泡延伸膨胀的进程,靶向自噬小体双分子膜上的LC3系统,促进LC3的脂化作用,加速吞噬泡膜的扩张和闭合,P62作为适配器与LC3结合[16]。KUMA[17]首次对ATG5缺陷小鼠进行饥饿实验,发现自噬缺陷新生鼠在出生后因无法承受断食,在12 h内死亡。已有文献报道,敲除ATG5通过凋亡相关因子抑制细胞增殖促进凋亡[18];有文献指出,ATG5可诱导细胞周期抑制蛋白的表达使细胞滞留G1期,对抗应激所致的细胞凋亡[19]。当前ATG5的研究集中于通过非自噬依赖途径对抗营养危机[20-21],而利用自噬途径参与肿瘤细胞应对营养应激的机制却鲜有报道,特别是ATG5与饥饿处理人肝癌细胞对自噬流的作用仍缺乏有效证据。本研究通过动态连续检测不同饥饿时间点的自噬小体、自噬标志性分子(LC3和P62)和ATG5的表达水平,结果显示ATG5的表达与饥饿诱导的自噬流强度变化正相关,即使在4 h出现短暂的自噬流强度下降,ATG5与自噬流变化始终保持高度一致。sh-RNAs沉默*ATG5*基因后,人肝癌细胞HepG2对饥饿的敏感性增加,细胞增殖下降,可见ATG5能增强人肝癌细胞HepG2对抗饥饿引起的细胞死亡。这些结果说明,饥饿处理的人肝癌细胞HepG2随着饥饿时间延长导致营养缺乏性应激加重,癌细胞在此过程中通过调控ATG5水平,调节自噬流强度对抗营养危机。因此,在营养应激过程中,ATG5既是肿瘤细胞能量"感应器",也是自噬启动"调节阀"。

综上所述,自噬流作为反映自噬从诱导到完成的全过程强度的重要指标,包含自噬体形成、自噬体与溶酶体的融合以及内容物的降解速率,在肿瘤营养缺乏诱发的应激性自噬中发挥重要的指示作用。本研究结果提示,肝癌细胞营养应激呈现的非线性自噬流中存在逆转自噬启动的时间点,ATG5在对抗营养缺乏带来的生存危机中发挥自噬流的调控作用。构建的肝癌体外代谢应激性自噬模型,可为进一步探究ATG5在肿瘤适应代谢压力中的作用机制、筛选靶向自噬的干预策略及推动个体化治疗提供重要研究工具。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] COURI T, PILLAI A. Goals and targets for personalized therapy for HCC[J]. Hepatol Int, 2019, 13(2): 125-137. DOI: 10.1007/s12072-018-9919-1.

[2] SEYDI H, NOURI K, REZAEI N, *et al*. Autophagy orchestrates resistance in hepatocellular carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 161: 114487. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114487.

[3] WANG Y J, XIE Y, WANG X, *et al*. Tumor cells-derived extracellular vesicles carry circ_0064516 competitively inhibit microRNA-6805-3p and promote cervical cancer angiogenesis and tumor growth[J]. Expert Opin Ther Targets, 2024, 28(1/2): 97-112. DOI: 10.1080/14728222.2024.2306353.

[4] MA K, LIU J Y, WANG Y J, *et al*. Relationship between plasma cell-free DNA (cfDNA) and prognosis of TACE for primary hepatocellular carcinoma[J]. J Gastrointest Oncol, 2020, 11(6): 1350-1363. DOI: 10.21037/jgo-20-509.

[5] PAN W X, ZHANG X M, HAO S L, *et al*. Progress in immunotherapy for neuroendocrine neoplasm of the digestive system[J]. World J Gastroenterol, 2023, 29(26): 4174-4185. DOI: 10.3748/wjg.v29.i26.4174.

[6] LEVINE B, KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. Cell, 2019, 176(1/2): 11-42. DOI: 10.1016/j.cell.2018.09.048.

[7] XU X B, LAI Y Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body:

disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep,2019,39(1):BSR20180992.DOI:10.1042/BSR20180992.

[8] 刘力, 范文芳, 贺晓旭, 等. 二甲双胍对人肝癌细胞系HepG2增殖、迁移能力的影响及其机制探讨[J]. 山东医药, 2019, 59(15): 6-9. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2019.15.002.
LIU L, FAN W F, HE X X, *et al*. Effects of metformin on proliferation and migration of human hepatoma cell line HepG2[J]. Shandong Med J, 2019, 59(15): 6-9. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2019.15.002.

[9] LI X, RAMADORI P, PFISTER D, *et al*. The immunological and metabolic landscape in primary and metastatic liver cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2021, 21(9): 541-557. DOI: 10.1038/s41568-021-00383-9.

[10] YAMAMOTO H, ZHANG S D, MIZUSHIMA N. Autophagy genes in biology and disease[J]. Nat Rev Genet, 2023, 24(6): 382-400. DOI: 10.1038/s41576-022-00562-w.

[11] 易言,陈青松,吴忠均. 下调IL35通过上调自噬相关蛋白表达而抑制肝细胞癌侵袭和迁移[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(05): 441-449. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202102042.
YI Y, CHEN Q S, WU Z J. Knockdown of IL35 inhibits migration and invasion of hepatocellular carcinoma byup-regulating autophagy-related proteins in HCC cells[J]. J Army Med Univ, 2023, 45(05): 441-449. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202102042.

[12] KLIONSKY D J, ABDEL-AZIZ A K, ABDELFATAH S, *et al*. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)[J]. Autophagy, 2021, 17(1): 1-382. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280.

[13] NGUYEN T H, NGUYEN T M, NGOC D T M, *et al*. Unraveling the Janus-faced role of autophagy in hepatocellular carcinoma: implications for therapeutic interventions[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(22): 16255. DOI: 10.3390/ijms242216255.

[14] BLOEMBERG D, QUADRILATERO J. Autophagy displays divergent roles during intermittent amino acid starvation and toxic stress-induced senescence in cultured skeletal muscle cells[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(4): 3099-3113. DOI: 10.1002/jcp.30079.

[15] GARCÍA-FERNÁNDEZ M, KARRAS P, CHECINSKA A, *et al*. Metastatic risk and resistance to BRAF inhibitors in melanoma defined by selective allelic loss of ATG5[J]. Autophagy, 2016, 12(10): 1776-1790. DOI: 10.1080/15548627.2016.1199301.

[16] CHANGOTRA H, KAUR S, YADAV S S, *et al*. ATG5: a central autophagy regulator implicated in various human diseases[J]. Cell Biochem Funct, 2022, 40(7): 650-667. DOI: 10.1002/cbf.3740.

[17] KUMA A, HATANO M, MATSUI M, *et al*. The role of autophagy during the early neonatal starvation period[J]. Nature, 2004, 432(7020): 1032-1036. DOI: 10.1038/nature03029.

[18] LIAO Z H, DAI Z K, CAI C Y, *et al*. Knockout of Atg5 inhibits proliferation and promotes apoptosis of DF-1 cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2019, 55(5): 341-348. DOI: 10.1007/s11626-019-00342-7.

[19] LV M H, ZHUANG X B, ZHANG Q, *et al*. Acetyl-11-keto-β-boswellic acid enhances the cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through cell cycle arrest, apoptosis induction, and autophagy suppression *via* p21-dependent signaling pathway[J]. Cell Biol Toxicol, 2021, 37(2): 209-228. DOI: 10.1007/s10565-020-09541-5.

[20] GAO Y L, CHEN S L, JIAO S M, *et al*. ATG5-regulated CCL2/MCP-1 production in myeloid cells selectively modulates anti-malarial $CD4^+$ Th1 responses[J]. Autophagy, 2024, 20(6): 1398-1417. DOI: 10.1080/15548627.2024.2319512.

[21] YOUSEFI S, PEROZZO R, SCHMID I, *et al*. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis[J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(10): 1124-1132. DOI: 10.1038/ncb1482.

(收稿:2025-04-02;修回:2025-04-20)
(编辑 严 涵)