



中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358

CN 31-1794/R

自噬相关基因5通过影响p53信号通路促进肝细胞癌发展

郭红英, 张婉沁, 刘志勇, 余湘南, 祝继敏, 刘韬韬, 董玲, 沈锡中

引用本文:

郭红英, 张婉沁, 刘志勇, 余湘南, 祝继敏, 刘韬韬, 董玲, 沈锡中. 自噬相关基因5通过影响p53信号通路促进肝细胞癌发展[J]. 中国临床医学, 2023, 30(1): 72-79.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2023.2022011>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

肝细胞肝癌组织c-Met、Fascin及CD44表达与临床病理特征及预后的相关性

Associations of c-Met, Fascin and CD44 with clinical pathological features and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma
中国临床医学. 2022, 29(5): 745-752 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20220599>

长链非编码RNA DBH-AS1通过下调AKT1表达抑制胰腺癌进展

Long non-coding RNA DBH-AS1 inhibits pancreatic cancer progression via down-regulation of AKT1 expression
中国临床医学. 2022, 29(2): 234-240 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20210070>

PROX1通过上皮间质转化促进非小细胞肺癌进展

PROX1 promoted the progression of non-small cell lung cancer via epithelial-mesenchymal transition
中国临床医学. 2021, 28(5): 802-807 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210443>

肿瘤-睾丸抗原联蛋白 α 2在肝细胞癌中的表达及临床意义的多组学研究

Multi-omics study on the expression of cancer-testis antigen catenin alpha 2 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance
中国临床医学. 2021, 28(1): 27-35 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20202336>

长链非编码RNA LINC00922促进胰腺导管腺癌的增殖、迁移和侵袭

The long non-coding RNA LINC00922 promotes the proliferation, migration and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma cell line
中国临床医学. 2022, 29(2): 161-165 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20212525>

DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2023.20222011

· 论 著 ·

自噬相关基因 5 通过影响 p53 信号通路促进肝细胞癌发展

郭红英^{1,2}, 张婉沁¹, 刘志勇¹, 余湘南¹, 祝继敏¹, 刘韬韬¹, 董 玲¹, 沈锡中^{1*}

1. 复旦大学附属中山医院消化科, 上海 200032

2. 上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心重症肝病科, 上海 201508

引用本文 郭红英, 张婉沁, 刘志勇, 等. 自噬相关基因 5 通过影响 p53 信号通路促进肝细胞癌发展[J]. 中国临床医学, 2023, 30(1): 72-79. GUO H Y, ZHANG W Q, LIU Z Y, et al. ATG5 interacts with the p53 signaling pathway to promote the development of hepatocellular carcinoma[J]. Chin J Clin Med, 2023, 30(1): 72-79.

[摘要] **目的** 探讨自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, ATG5) 在肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 进展中的作用及其影响的下游信号通路。**方法** 通过肿瘤基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库查找 ATG5 在 HCC 患者的组织表达及其亚组的差异分析。采用免疫印迹法明确 ATG5 在 HCC 细胞系中的表达水平。通过 CCK-8 实验、划痕实验和 Transwell 实验观察敲减 ATG5 基因后对 HCC 细胞系 (HCCLM3 和 MHCC97-H) 增殖、迁移和侵袭功能的变化。在 HCC 细胞系 MHCC97-H 敲减 ATG5 基因后, 使用有参转录组测序分析下游相关信号通路的变化。**结果** TCGA 数据库分析显示, 在 mRNA 水平, ATG5 在 HCC 组织的表达明显高于正常肝组织 ($P<0.0001$), HCC 3 期患者的 ATG5 水平高于 1 期患者的水平 ($P=0.013$), p53 变异组患者癌组织的 ATG5 水平高于非变异组 ($P<0.0001$)。免疫印迹结果显示, 与正常肝细胞 L02 相比, ATG5 蛋白水平在检测的 HCC 细胞株中均明显高表达。将 ATG5 基因敲减后发现, HCC 细胞的增殖、迁移、侵袭的能力下降, 有参测序发现其明显影响 p53 信号通路的基因表达, 富集分析发现与细胞周期有关, 同时影响了自噬相关基因的差异表达。**结论** ATG5 下调可抑制 HCC 细胞的增殖、迁移和侵袭, 同时可通过影响 p53 信号通路促进 HCC 发展。

[关键词] 肝细胞癌; 自噬相关基因 5; p53 信号通路**[中图分类号]** R 735.7**[文献标志码]** A

ATG5 interacts with the p53 signaling pathway to promote the development of hepatocellular carcinoma

GUO Hong-ying^{1,2}, ZHANG Wan-qin¹, LIU Zhi-yong¹, YU Xiang-nan¹, ZHU Ji-min¹, LIU Tao-tao¹, DONG Ling¹, SHEN Xi-zhong^{1*}

1. Department of Gastroenterology and Hepatology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Department of Severe Hepatitis Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, Shanghai 201508, China

[Abstract] **Objective** To explore the role and the signaling pathways of autophagy-related gene 5 (ATG5) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to investigate the expression of ATG5 in HCC tissues and differential analysis in its subgroups. Western blotting was performed to clarify its expression in HCC cell lines. Cell Counting Kit-8, wound healing assay, and Transwell assay were employed to unveil the function of ATG5 in HCCLM3 and MHCC97-H cells. RNA Sequencing and differentially expressed genes analysis were performed to discover the relevant signaling pathways. **Results** TCGA database showed that the mRNA expression of ATG5 was significantly higher in HCC tissues compared with that in normal liver tissues ($P<0.0001$), and higher expression in patients at stage 3 than those at stage 1 ($P=0.013$). Furthermore, its expression was higher in patients with p53 mutation ($P<0.0001$). Western blotting results showed that the levels of ATG5 were significantly higher in all tested HCC cell lines than L02. Knockdown of ATG5 was found to inhibit HCC cell proliferation, migration, and invasion, and it was also revealed to affect the expression of p53-related signaling pathway, cell cycle and autophagy-related pathway. **Conclusions** ATG5 downregulation inhibited the function of HCC cells and promoted HCC progression by affecting the p53 signaling pathway.

[Key Words] hepatocellular carcinoma; autophagy-related gene5; p53 signaling pathway**[收稿日期]** 2022-11-08**[接受日期]** 2023-01-02

[基金项目] 国家自然科学基金(81472673, 81672720, 82173122), 上海申康医院发展中心基金(SHDC2020CR1037B). Supported by the National Natural Science Foundation of China (81472673, 81672720, 82173122), and Shanghai Shenkang Hospital Development Center Funding (SHDC2020CR1037B).

[作者简介] 郭红英, 博士生, 副主任医师. E-mail: hyguo310@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: shen.xizhong@zs-hospital.sh.cn

2020 年全球统计数据^[1]显示,原发性肝癌发病率居肿瘤发病率的第 6 位,死亡率则高居第 3 位,每年有 90 万新发病例和 83 万死亡病例。原发性肝癌也是我国发病第 4 位的恶性肿瘤及排名第 2 位的肿瘤致死病因,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占原发性肝癌总数的 75%~85%,严重威胁我国人民的生命和健康^[2]。由于起病隐匿,首次诊断时只有少于 30% 的 HCC 患者适合接受根治性治疗,因此,需要更深入地研究癌基因和抑癌基因及其相关信号通路在 HCC 发生和发展中的重要作用^[3]。

自噬是通过适应各种应激条件来维持细胞内环境稳定的重要分解代谢过程,在肿瘤的发生发展也发挥重要作用^[4]。肝脏高度依赖自噬来维持肝脏的正常功能,小鼠的遗传学研究^[5]表明,自噬缺陷会导致肝脏肿大和肝脏肿瘤。自噬最初被认为是肿瘤抑制的一种机制,主要是因为自噬基因 BECN1 是肿瘤抑制因子,尤其在 HCC 中。BECN1 敲基因小鼠出现 3 种自发性肿瘤,HCC 为其中之一^[6]。NFE2L2 为一种转录因子,负责表达一系列抗氧化和解毒酶,在自噬缺陷的小鼠中,其活化将促进肿瘤的发生^[7]。自噬相关基因(autophagy-related genes, ATG)参与自噬小体的形成,维持正常的自噬活性必须对自噬相关基因的诱导进行严格的调控,但其在肝脏中的调控作用尚待阐明。

自噬相关基因 5(autophagy-related gene 5, ATG5)参与自噬体的形成,对自噬功能至关重要^[8]。肝脏特异性敲除 ATG5 基因促进 p62 介导的 Nrf2 稳定化,导致肝脏损伤、炎症、纤维化和自发性良性腺瘤^[5,9-10]。另一方面,自噬也会促进肿瘤的生长,这取决于肿瘤发展的不同阶段。在已形成的肿瘤中,自噬通过增加氨基酸、脂质和葡萄糖等形式的营养物质来满足肿瘤的代谢需求,进一步支持肿瘤的发展^[6]。在一个通过敲除肿瘤抑制因子 Palb2 导致的遗传性乳腺癌的小鼠模型中发现,其等位基因自噬相关的 Atg6/Becn1 同样出现缺失,导致小鼠的肿瘤缩小及延长生存时间,进一步激活 p53 通路,从而抑制肿瘤的生长^[11-12]。在一个由致癌性 K-ras^{G12D} 驱动的肺癌小鼠模型中,肿瘤细胞中 ATG7 的缺失激活了 p53,减少了增殖,增加细胞

死亡,并减少肿瘤负担^[13]。同样在缺失 ATG5 的模型^[14]中也有类似发现。而在 HCC 中,研究^[15]发现超过 50% 的黄曲霉毒素 B1 诱发的 HCC、约 45% 的 HBV 相关 HCC 和约 13% 的 HCV 相关 HCC 中都发现了 p53 突变。那么在 HCC 中 ATG5 是否影响 p53 信号通路促进 HCC 进展,尚需进一步研究。

本研究将探讨 ATG5 在 HCC 组织及 HCC 细胞系中的表达;在 HCC 细胞系中敲减 ATG5 基因,观察其对 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭能力的影响;有参测序后,分析其对下游信号通路的影响,以期 ATG5 是否可通过影响 p53 信号通路促进 HCC 发展提供参考及依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和数据库 HCC 细胞株(PLC/PRF/5、BEL-7402、SMCC-7721、HepG2、SK-Hep-1、Hep3B)和正常肝细胞株(L02)从中国科学院细胞库中获得,HCC 细胞系 MHCC97-H、MHCC97-L 和 HCCLM3 通过复旦大学附属中山医院肝癌研究所分离获得。检索网络公共数据库的数据进行分析,TCGA 数据可视化网站(<http://ualcan.path.uab.edu>),NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)。

1.2 小干扰素 RNA 的构建与转染 针对 ATG5 和阴性对照组(NC)的小干扰 RNA 来自中国上海吉玛公司。小干扰 RNA 的目标序列如下:si-ATG5-1, GCUAUAUCAGGAUGAGAUATT (siRNA416); si-ATG5-2, GCAGUGGC-UGAGUGAACAUUTT (siRNA1106)。通过荧光定量 PCR 及蛋白电泳验证,si-ATG5-1 和 si-ATG5-2 为有效的小干扰 RNA 片段。将小干扰 RNA 转染,使用 Lipo2000 转染试剂(Thermo 公司,美国)。将 MHCC97-H 细胞按 5×10^4 细胞/孔的浓度接种 6 孔板,混匀后于 37℃,5%CO₂ 培养 24 h,细胞被培养并达到 40%~50% 的融合度,将 siRNA 稀释到不含血清的培养基中。将 Lipo2000 转染试剂稀释到小干扰 RNA 中和其对照组中,快速涡旋 10 s,孵育 10 min,最后将形成的混合物加入细胞中。

1.3 免疫印迹实验 在含 10% 胎牛血清和 1% 青

霉素/链霉素的Eagle培养基[维森特生物技术(南京)有限公司,中国]中培养实验所需细胞,提取蛋白后进行免疫印迹。用细胞刮收集处理好的细胞,加入RIPA缓冲液于冰上裂解30 min, 4℃, 12 000×g离心10 min。将上清液转移到1个新的离心管中,加入4×SDS上样缓冲液,100℃,加热10 min。通过SDS-PAGE电泳分离蛋白质样品(Bio-Rad公司,美国)。将蛋白质转移到PVDF膜(Millipore公司,美国),该膜用5%脱脂牛奶封闭1 h,用特异性抗ATG5抗体于4℃孵育过夜(Santa Cruz公司,美国)。隔日,吸除液体, TBST清5次,每次间隔15 min,然后加入HRP结合的二抗,室温孵育1 h, TBST清洗5次,每次间隔15 min,使用ECL发光液显影。

1.4 CCK-8检测细胞活性 将细胞重复接种于96孔板中,每孔4 000个细胞。混匀后于37℃及5%CO₂培养24 h,细胞贴壁后,按完全培养基和CCK-8 20:1的比例配置CCK-8溶液,96孔板每孔加入100 μL,每组5个重复,同时设置调零组,即直接在空孔中加入100 μL配置CCK-8溶液,避光培养2 h,酶标仪450 nm波长分别检测0 h的光密度(*D*)值。在转染后24 h、48 h、72 h,每孔加入用培养基稀释好100 μL CCK-8试剂(同仁化学,日本),在细胞培养箱中孵育40 min。使用多功能酶标仪(Thermo公司,美国)在450 nm处测量光密度。

1.5 划痕修复实验 将这些细胞在6孔板中接种,每孔3个重复。当细胞几乎达到100%的融合时,用200 μL的移液枪的枪头尖端划伤单层细胞,产生交叉细胞伤口。用PBS洗涤细胞3次,以清除细胞碎片,并在不含胎牛血清的培养基中继续培养。用倒置显微镜观察0 h、72 h伤口闭合的速度。每条划痕在同一位置不同时段进行拍照,测量其间距,迁移率=0 h间距与72 h间距差值/0 h间距,最后,比较两组细胞迁移率。

1.6 细胞Transwell实验 为明确HCC细胞的侵袭功能变化,采用的5 μm孔径的聚碳酸酯膜Transwell小室(Corning公司,美国)。包被基底膜,用PBS 1:10稀释50 mg/L Matrigel基质胶,取60 μL包被Transwell小室底部膜的上室面,放37℃、5% CO₂培养箱孵育4 h,吸弃上清。细

胞转染至72 h后按5×10³细胞/孔的浓度接种Transwell小室,下室加入血清浓度为20%的培养液700 μL,37℃ 5% CO₂培养24 h。取出小室,PBS洗1次。加入预冷的无水乙醇,-20℃固定10 min。弃净无水乙醇,PBS洗1次。在PBS中用棉签轻轻刮去小室上表面的Matrigel胶,用PBS洗上表面3次。拿出小室倒置,风干。将小室放入1个新的24孔板中,加入300 μL 10%结晶紫,使膜浸没,37℃染色30 min。用一级纯水洗3次。小室风干后,放入孔中,倒置显微镜在200倍视野下取若干视野,使用ImageJ软件计数总穿膜细胞数,实验重复3次并进行统计。

1.7 转录组有参测序 在MHCC97-H HCC细胞中,转染si-ATG5小干扰RNA,3个实验组样品,3个对照组。采用TRIzol试剂依照说明书提取总RNA,鉴定纯度和定量,评估完整性。采用VAHTS Universal V5 RNA-seq Library Prep试剂盒依照说明书构建转录组文库。采用Illumina Novaseq6000测序平台对文库进行测序,采用fastp软件对fastq格式的raw reads进行处理。采用HISAT2软件进行参考基因组比对,并进行基因表达量FPKM计算,并通过HTSeq-count获得每个基因的reads计数(counts)。其中 q 值<0.05筛选差异表达基因。使用R包ggradar绘制雷达图,对差异表达基因进行KEGG、Reactome、GO富集分析。采用GSEA软件进行基因集富集分析。

1.8 统计学处理 采用GraphPad Prism 6.0进行统计学分析。采用双尾非配对 t 检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 HCC中ATG5的表达上调,并与p53的突变有关 TCGA数据库的分析显示,ATG5 mRNA水平在HCC组织表达水平明显高于正常肝组织(图1A, $P<0.0001$)。男性组或女性组HCC组织的ATG5表达水平均高于正常肝组织($P<0.0001$),但男性组与女性组之间ATG5水平差异无统计学意义(图1B, $P=0.56$)。将不同分期的HCC患者进一步分组,结果(图1C)显示,不同分期的HCC组织中ATG5水平均高于正常肝组织,且3

期患者的 ATG5 水平高于 1 期患者 ($P=0.013$), 提示 ATG5 表达水平与患者 HCC 分期有关。值得注意的是, p53 突变组 ATG5 的表达水平高于非突

变组 (图 1D, $P<0.0001$)。在 NCBI 数据库中分析 ATG5 表达结果 (图 1E) 显示, ATG5 在 HCC 组织中表达水平平均高于正常肝组织。

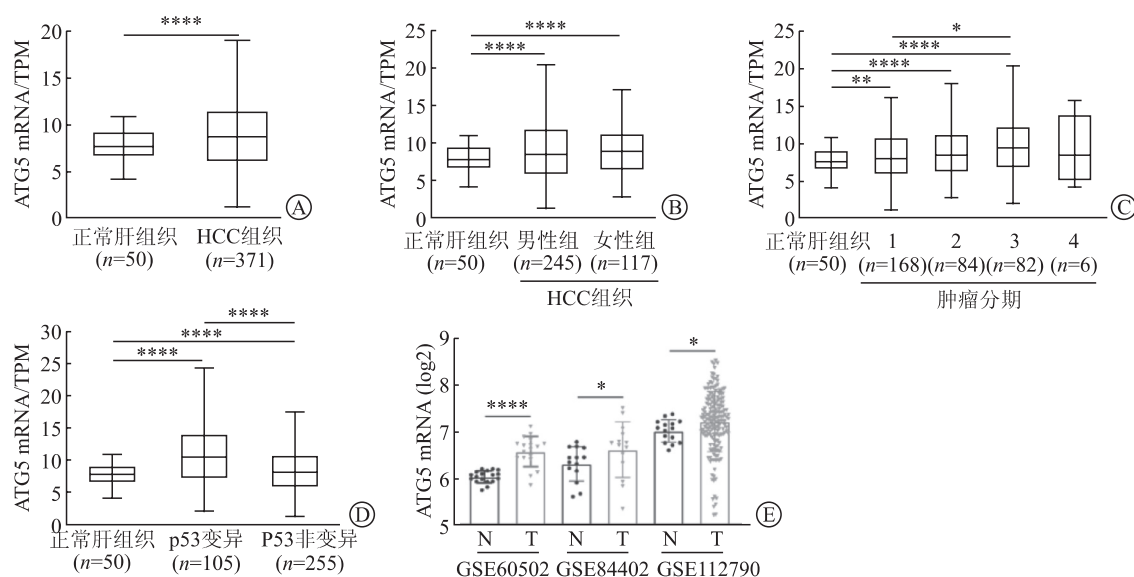


图 1 ATG5 在 HCC 患者组织中表达

A:TCGA 数据库中,ATG5 在 HCC 组织和正常肝组织的 mRNA 表达水平;B:ATG5 在男性和女性 HCC 患者的表达水平;C:ATG5 在 HCC 患者不同分期的表达水平;D:ATG5 在 p53 变异和非变异组的表达水平;E:N 为正常肝组织;T 为 HCC 组织。NCBI 数据库中,ATG5 在 HCC 组织和正常肝组织的 mRNA 表达水平。 $P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ 。

2.2 HCC 细胞系中 ATG5 的表达上调 结果(图 2)显示:与 L02 细胞相比,ATG5 蛋白水平在所有检测的 HCC 细胞株中明显高表达,尤其在 MHCC97-H、HCCLM3、Huh7 和 PLC/PRF/5 异常高表达。这表明,ATG5 可能是促进 HCC 细胞生长的癌基因。

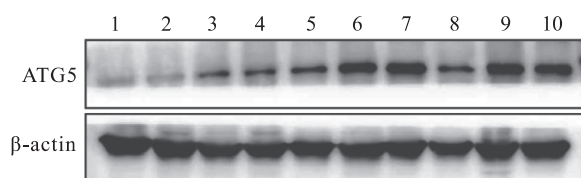


图 2 ATG5 在 HCC 细胞株和正常肝细胞株中蛋白水平表达

1: L02; 2: SK-Hep-1; 3: SMMC-7721; 4: BEL-7402; 5: Hep3B; 6: HCCLM3; 7: Huh-7; 8: MHCC97-L; 9: MHCC97-H; 10: PLC/PRF/5。

2.3 ATG5 促进 HCC 细胞增殖、迁移、侵袭能力 利用小干扰 RNA 在 MHCC97-H 中敲减 *Atg5* 基因结果 (图 3) 显示, siRNA416 和 siRNA1106 均能明显敲减 ATG5 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达。在表达量最高的 HCC 细胞株 (HCCLM3、

MHCC97-H) 中使用 siRNA1106 敲减 ATG5。CCK8 检测结果 (图 4A、4B) 显示,与空白对照组和阴性对照组相比,下调 ATG5 后 HCC 细胞增殖能力明显下降 ($P<0.001$)。划痕实验结果 (图 4C、4D) 显示,与空白对照组和阴性对照组相比,下调 ATG5 后 HCC 细胞迁移能力明显下降 ($P<0.05$)。Transwell 实验结果 (图 4E、4F) 显示,与空白对照组和阴性对照组相比,下调 ATG5 后, HCC 细胞穿过膜的细胞数明显减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。以上结果提示,ATG5 作为癌基因,促进了 HCC 细胞的增殖、迁移、侵袭能力。

2.4 ATG5 对 p53、自噬信号通路的影响 在 MHCC97-H HCC 细胞中,敲减 ATG5 基因进行有参转录组测序。p53 信号通路 GSEA 图显示,在敲减 ATG5 基因后, p53 信号通路基因出现富集 (图 5A)。上调的基因为 GADD45B、GADD45G、BBC3、CCNG1、CCNE2、TP53I3、APAF1 等;下调的基因为 SERPINE1、PMAIP1、BCL2L1、CCNG2、CCNE1 等 (图 5B)。进一步使用 KEGG、Reactome、GO 进行通路的富集分析,

提示主要与细胞周期各个环节相关,其次与凋亡过程有关(图5C)。此外,由于ATG5为自噬相关基因,分析自噬通路相关基因的变化结果(图

6A、6B)显示,ATG5下调后,基因PRAP1、GABARAPL1、ITPR1出现上调;基因CTSL、PIK3CA、ERN1、HIF1A出现下调。

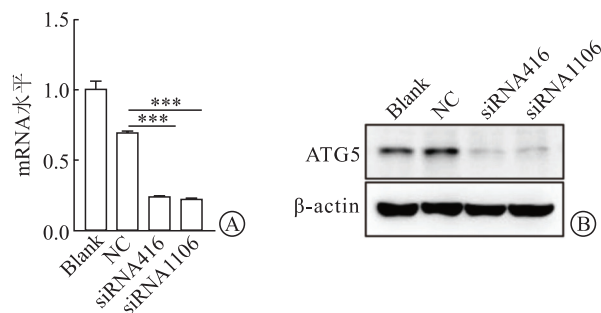


图3 敲减ATG5基因其mRNA水平及蛋白水平表达的验证

A:在MHCC97-H中敲减ATG5基因后,mRNA水平ATG5的表达下调;B:敲减ATG5基因后,蛋白水平ATG5的表达下调。

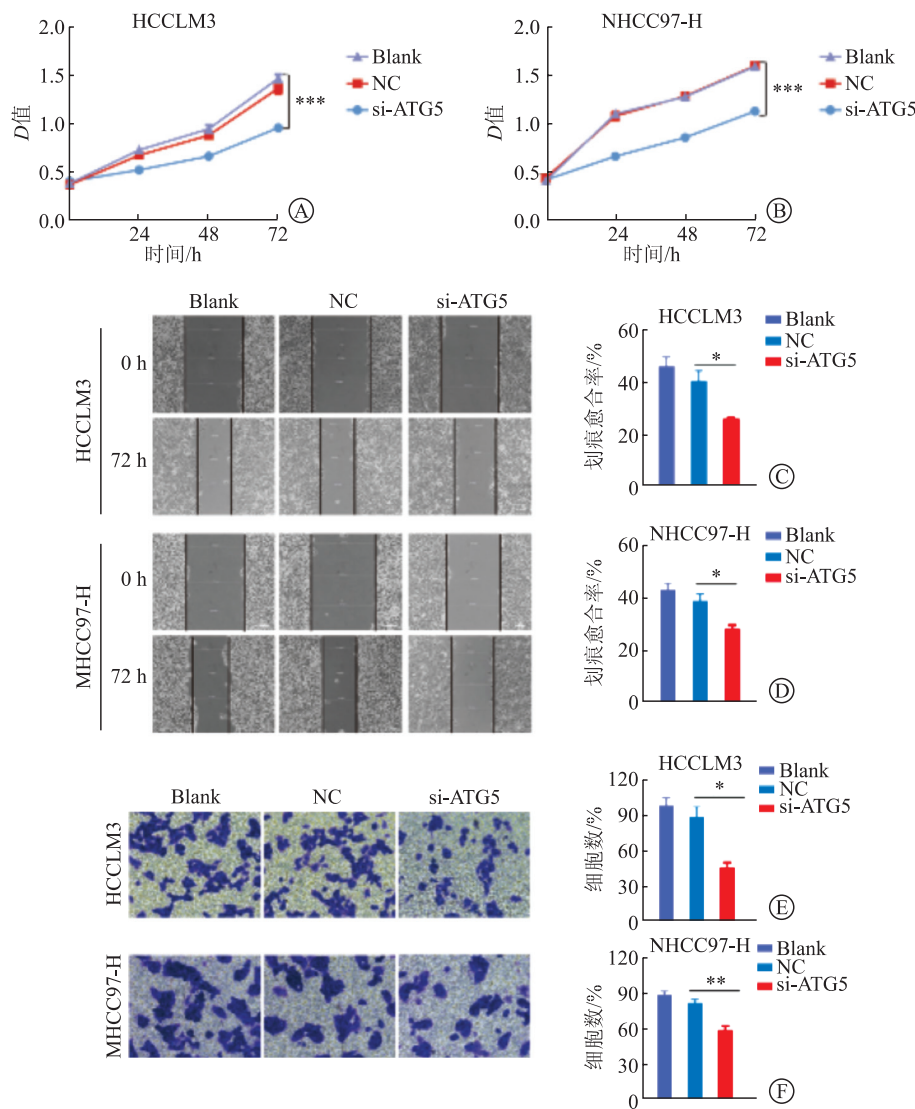


图4 敲减ATG5基因对HCC细胞功能的影响

A、B:在HCCLM3(A)和MHCC97-H(B)HCC细胞中敲减ATG5基因,使用CCK8实验检测HCC细胞增殖能力的影响;C、D:在HCCLM3(C)和MHCC97-H(D)HCC细胞中敲减ATG5基因,使用划痕实验检测HCC细胞迁移的影响;E、F:在HCCLM3(E)和MHCC97-H(F)HCC细胞中敲减ATG5基因,使用Transwell实验检测HCC细胞侵袭能力的影响,Original magnification: $\times 200$ 。

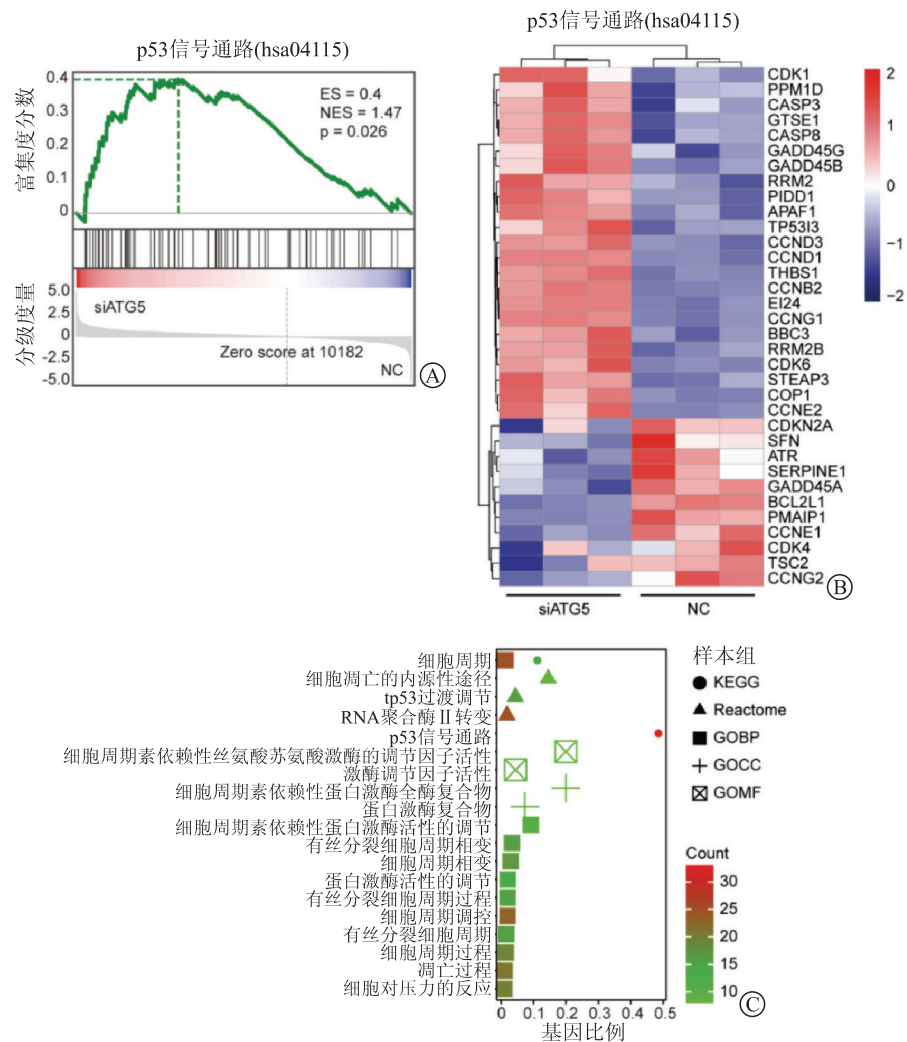


图5 敲减 ATG5 基因对 p53 信号通路的影响

A: GESA 图显示 p53 信号通路中差异基因富集; B: 敲减 ATG5 基因后, 分析有参测序结果中 p53 信号通路差异基因; C: KEGG、Reactome、GO 通路的富集分析。

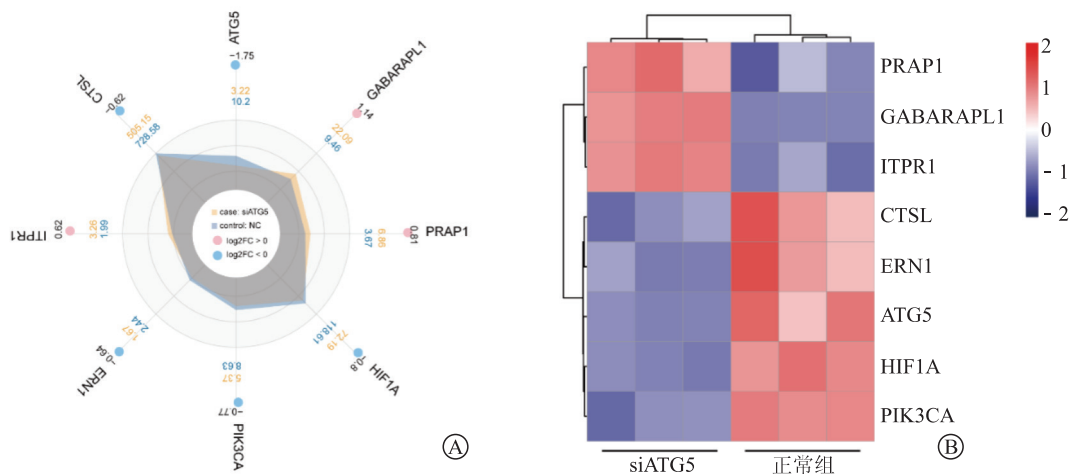


图6 敲减 ATG5 基因对自噬相关信号通路的影响

在 MHCC97-H HCC 细胞中, 敲减 ATG5 基因后进行有参转录组测序。A: 自噬信号通路差异基因的表达雷达图; B: 自噬差异基因的表达热图。

3 讨论

为了验证 ATG5 对 HCC 生物学功能的影响, 采用 CCK-8、划痕、Transwell 实验检测敲减 ATG5 基因后对细胞增殖、迁移、侵袭的变化。本研究结果提示, HCC 组织中 ATG5 水平明显高于正常肝组织, 在 p53 突变组的 ATG5 水平高于非突变组。在 HCC 细胞系的研究发现, 与对照细胞株 (L02) 相比, ATG5 在 HCC 细胞系中高表达, 敲减 ATG5 基因后, 可抑制 HCC 细胞的增殖、迁移、侵袭功能。有参测序结果显示, 敲减 ATG5 基因, 可广泛地影响下游 p53 和自噬相关的信号通路。

在过去几十年, 对自噬在恶性肿瘤中的研究较多。有研究^[16]显示, 自噬在胰腺癌中起到重要的作用, 抑制自噬可以在治疗肿瘤中起到临床疗效, 并不依赖 p53 的状态。ATG5 基因的消失导致自噬和凋亡的异常, 在胃肠道肿瘤病变中起到重要作用。但在黑素瘤的研究^[17]中, 下调 ATG5 的表达反而促进黑素瘤细胞的增殖。并非所有肿瘤中 ATG5 在癌组织中的表达均会增高, 分析 TCGA 数据库结果显示, 在膀胱尿路上皮癌、胰腺恶性肿瘤、大脑低级别胶质瘤、乳腺浸润性癌等肿瘤中, ATG5 在癌和癌旁组织中的表达无差别。本研究的结果显示 ATG5 在 HCC 组织比正常肝组织高表达。自噬在肿瘤发病机制中及肿瘤进展中的作用仍有争议。一方面, 自噬在肿瘤发展的早期阶段起着抑制作用, 促进有缺陷的细胞器和未折叠的蛋白质的重新利用, 防止氧化应激, 并保持基因组的稳定性。另一方面, 在已经形成的肿瘤中自噬也可以通过介导癌基因促进肿瘤的发展^[18], 通过提供营养物质和能量, 减少缺氧和氧化应激的压力, 并促进血管生成, 自噬也可促进肿瘤转移和侵袭^[19]。同样本研究亦发现, 在 HCC 细胞系中敲减 ATG5 基因后, 抑制了 HCC 细胞的迁移和侵袭的能力。

肝脏是一个代谢器官, 自噬在 HCC 发生发展中均起到重要的作用^[20]。有研究^[21]发现, 在肝脏特异性 ATG7 或 ATG5 缺失小鼠模型中, 自噬可能通过向微环境中提供额外的精氨酸的途径保护肿瘤细胞, 这说明自噬在这种情况下部分补偿了营养的损失, 因而促进细胞生长。但其在 HCC 发

展中作用, 目前的研究较少。本研究结果显示, 在 HCC 中, ATG5 在癌组织的水平明显高于正常肝组织, 本课题组既往研究数据显示其高表达与患者生存预后负相关。进一步在 HCC 细胞系中验证了 ATG5 在 HCC 中的高表达, 下调 ATG5 基因后会抑制 HCC 细胞的增殖、迁移、侵袭能力, 显示该基因促进 HCC 的发展, 可成为预测和监测 HCC 预后分子标志物。阐明自噬依赖性发病的分子机制有助于发现新的 HCC 治疗方法。有证据^[22]表明, 抑制或诱导通过调节 mTOR、AMPK 和 MAPK 途径的自噬在肝脏中发挥着影响肿瘤发展重要作用。

近期研究^[3]发现, 自噬在 HCC 发展中通过几个关键的信号通路发挥着双重作用, 这其中包括 EGF、Wnt/ β -catenin、p53 和 NF- κ B 途径。有研究提示自噬抑制 p53 功能, 进一步促进肿瘤的进展, 通过以下几方面的途径: 自噬通过影响氧化应激进一步抑制 p53 的活化; 自噬可以通过为 DNA 复制和修复提供底物, 进一步抑制 p53 的激活; 自噬通过维持代谢及内环境的稳定抑制 AMPK 的活化, AMPK 可以激活 p53^[23]; 伴侣介导的自噬可以降解 p53^[24]。本研究显示 ATG5 的高表达抑制 p53 通路相关基因, 通过 KEGG、Reactome、GO 富集分析, 显示与细胞周期各个环节的基因有关, 考虑 ATG5 下调, 激活 p53 信号通路相关基因, 影响了细胞周期, 进而调控 HCC 细胞的功能。自噬与 p53 信号通路存在相互影响, 自噬可被 p53 激活或抑制, 表明 p53 在调控 HCC 自噬中的双重作用。此外, 在没有 p53 的情况下, 自噬亦可被诱导, 促进细胞死亡^[24]。肿瘤细胞的 p53 突变状态及其参与调节自噬和凋亡的机制有待进一步研究。另外, 分析自噬通路相关基因发现, ATG5 基因敲减后, CTSL、PIK3CA、ERN1、HIF1A 基因出现下调, 既往研究^[24]低氧可激活 HIFs, 进而在转录水平激活 ATGs, 维持在低氧的情况下细胞的存活。自噬通过影响氧化应激进一步抑制 p53 的活化。最新研究^[25]显示消除内皮细胞 ATG7 后通过上调 Stat1, 进而抑制 HIF1A 基因表达, 抑制缺血后血管的生成。本研究发现 ATG5 基因敲减后, 基因 HIF1A 出现下调, 在 HCC 中 ATG5 是否通过同样的机制影响 HIF1A, 尚需进一步探讨。

综上所述,本研究探讨 ATG5 在 HCC 组织高表达,发现临床分期越高的患者, ATG5 水平越高,证实了 ATG5 下调可以抑制 HCC 细胞的功能,进一步有参测序结果显示其通过影响 p53 信号通路促进 HCC 发展。本研究仍存在不足之处,未在体内实验验证 ATG5 功能,将来需进一步动物实验验证 ATG5 的功能,并进一步探讨 p53 信号通路相关差异基因的具体功能及机制。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] ZHOU M G, WANG H D, ZENG X Y, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [3] CUI J Z, SHEN H M, LIM L H K. The role of autophagy in liver cancer: crosstalk in signaling pathways and potential therapeutic targets[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(12): 432.
- [4] UDRISTIOIU A, NICA-BADEA D. Autophagy dysfunctions associated with cancer cells and their therapeutic implications[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108892.
- [5] TAKAMURA A, KOMATSU M, HARA T, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(8): 795-800.
- [6] CZAJA M J, DING W X, DONOHUE T M, et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver[J]. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1131-1158.
- [7] TAGUCHI K, MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution[J]. *Genes Cells*, 2011, 16(2): 123-140.
- [8] VIJ A, RANDHAWA R, PARKASH J, et al. Investigating regulatory signatures of human autophagy related gene 5 (ATG5) through functional in silico analysis[J]. *Meta Gene*, 2016, 9: 237-248.
- [9] KOMATSU M, KUROKAWA H, WAGURI S, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(3): 213-223.
- [10] NI H M, WOOLBRIGHT B L, WILLIAMS J, et al. Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(3): 617-625.
- [11] GUO J Y, XIA B, WHITE E. Autophagy-mediated tumor promotion[J]. *Cell*, 2013, 155(6): 1216-1219.
- [12] WHITE E. The role for autophagy in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 42-46.
- [13] GUO J Y, KARSLI-UZUNBAS G, MATHEW R, et al. Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytoomas and maintains lipid homeostasis[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(13): 1447-1461.
- [14] RAO S, TORTOLA L, PERLOT T, et al. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3056.
- [15] SHIRAHARA H, YAMAMOTO K, NAMBA M. Human hepatocyte carcinogenesis (review)[J]. *Int J Oncol*, 2013, 42(4): 1133-1138.
- [16] YANG A N, RAJESHKUMAR N V, WANG X X, et al. Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations[J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(8): 905-913.
- [17] LIU H, HE Z Y, SIMON H U. Autophagy suppresses melanoma tumorigenesis by inducing senescence[J]. *Autophagy*, 2014, 10(2): 372-373.
- [18] GUO J Y, CHEN H Y, MATHEW R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(5): 460-470.
- [19] WONG P M, PUENTE C, GANLEY I G, et al. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation[J]. *Autophagy*, 2013, 9(2): 124-137.
- [20] DI FAZIO P, MATROOD S. Targeting autophagy in liver cancer[J]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3: 39.
- [21] POILLET-PEREZ L, XIE X Q, ZHAN L, et al. Autophagy maintains tumour growth through circulating arginine[J]. *Nature*, 2018, 563(7732): 569-573.
- [22] YANG J L, PI C C, WANG G H. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 699-707.
- [23] JONES R G, PLAS D R, KUBEK S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint[J]. *Mol Cell*, 2005, 18(3): 283-293.
- [24] WHITE E. Autophagy and p53[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(4): a026120.
- [25] YAO H M, LI J, LIU Z X, et al. Ablation of endothelial Atg7 inhibits ischemia-induced angiogenesis by upregulating Stat1 that suppresses HIF1A expression[J]. *Autophagy*, 2022: 1-21.

[本文编辑] 翟铨铨