

羟喜树碱对体外培养的人 Tenon 囊成纤维细胞自噬的诱导作用

徐心雨 童俊 范舒欣 袁志兰

【摘要】 背景 滤过道瘢痕化及人 Tenon 囊成纤维细胞 (HTFs) 增生是抗青光眼滤过手术失败的主要原因。目前已有羟喜树碱诱导成纤维细胞凋亡及其机制的相关报道,但是羟喜树碱对 HTFs 自噬的影响鲜见报道。目的 探讨羟喜树碱对体外培养的 HTFs 自噬的影响。方法 收集 3 例接受斜视手术患者的 Tenon 囊组织,以组织块培养法,用含体积分数 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基原代培养 HTFs 并传代,取第 3 ~ 6 代细胞进行培养。分别在培养基中加入 0.0、0.5、1.0、4.0、10.0 mg/L 羟喜树碱,继续培养 HTFs 24 h,以细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 检测各组细胞的增生情况。选取 4.0 mg/L 羟喜树碱作用 HTFs 24 h,用 Cyto-ID 自噬检测试剂盒进行荧光染色,观察各组细胞中自噬小体和自噬溶酶体成分的分布,用荧光显微镜和流式细胞仪分别对 Cyto-ID 染色阳性细胞数量及其荧光强度进行测定,并与对照组比较。用逆转录定量检测 PCR (qRT-PCR) 和 Western blot 法分别检测各组 HTFs 中自噬相关蛋白 Beclin-1、自噬相关基因 5 (ATG-5) 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC-3) 蛋白及其 mRNA 的相对表达水平。结果 随着羟喜树碱质量浓度的增加,HTFs 细胞活力逐渐下降,0.0、0.5、1.0、4.0、10.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 细胞活力的总体差异有统计学意义 ($F = 19.040, P < 0.001$),1.0、4.0、10.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 的细胞活力均低于对照组,以 10.0 mg/L 组最低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$)。qRT-PCR 检测显示,4.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 中 Beclin-1 mRNA、ATG-5 mRNA 和 LC-3 mRNA 的相对表达量分别是对照组的 (3.225 ± 0.346)、(2.839 ± 0.418) 和 (3.761 ± 0.224) 倍,与对照组比较差异均有统计学意义 ($P = 0.020, 0.027, 0.007$)。Western blot 检测表明,4.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 中 Beclin-1、ATG-5 和 LC-3 蛋白表达的灰度值较对照组明显上升,LC-3 II / I 灰度比值分别为 0.965 ± 0.159 和 0.275 ± 0.860,差异均有统计学意义 ($P = 0.003$)。Cyto-ID 染色结果显示,4.0 mg/L 羟喜树碱处理后,HTFs 自噬阳性细胞的比例由未处理的 (11.333 ± 4.010)% 上升到 (55.000 ± 9.013)% ,差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。流式细胞仪检测表明,4.0 mg/L 羟喜树碱处理后 24 h Cyto-ID 染色的平均荧光强度是对照组的 (3.037 ± 0.513) 倍,差异有统计学意义 ($P = 0.003$)。结论 羟喜树碱能诱导体外培养的 HTFs 发生自噬。

【关键词】 自噬; 羟喜树碱; 人, Tenon 囊; 成纤维细胞; 细胞培养; 青光眼

Inducing effect of hydroxycamptothecin on autophagy of human Tenon capsule fibroblasts *in vitro* Xu Xinyu, Tong Jun, Fan Shuxin, Yuan Zhilan. Department of Ophthalmology, Affiliated Jiangsu Province Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China
Corresponding author: Yuan Zhilan, Email: zhilanyuan@vip.sina.com

【Abstract】 **Background** The fibrosis of filtering area caused by proliferation of human Tenon fibroblasts (HTFs) is one of failure causes following glaucoma surgery. Researches revealed that hydroxycamptothecin can induce the apoptosis of HTFs, but its influence on autophagy of HTFs is unclear. **Objective** This study attempted to investigate whether hydroxycamptothecin can cause an alteration of autophagic activity in HTFs. **Methods** Human Tenon capsular tissue was obtained from 3 patients during strabismus correction surgery under the informed consent of patients and their parents for the primary culture and passaged of HTFs in DMEM containing 10% fetal bovine serum. The generation 3 to 6 cells then were incubated with 0.0, 0.5, 1.0, 4.0, 10.0 mg/L hydroxycamptothecin for 24 hours, respectively. A cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect the cell viability in different treated groups. The autophagic activity of HTFs was evaluated by a Cyto-ID autophagy detection kit, and then the autophagic flux was evaluated by counting the Cyto-ID positive cells under a fluorescence microscope, and the green fluorescence intensity was determined by flow cytometry. Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) and Western blot analysis were employed to assay the relative expressions of autophagic-associated genes and their proteins in HTFs, including Beclin-1, autophagy related gene 5 (ATG-5) and light chain 3 (LC-3). **Results** The cell viability of HTFs in the 0.0, 0.5, 1.0, 4.0 and 10.0 mg/L hydroxycamptothecin groups were (100.00 ± 6.44)%, (91.70 ± 6.36)%, (81.47 ± 6.00)%, (68.43 ± 6.69)% and (59.97 ± 6.98)% respectively, showing a gradually declining trend with the

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.03.002

作者单位:210029 南京医科大学附属江苏省人民医院眼科

通信作者:袁志兰, Email: zhilanyuan@vip.sina.com

increase of hydroxycamptothecin doses, with a significant difference among them ($F=19.040, P<0.001$), and the viability of HTFs in the 1.0, 4.0 and 10.0 mg/L hydroxycamptothecin groups were significantly decreased than the control group ($P<0.05, P<0.01, P<0.01$). qRT-PCR analysis revealed that the relative expression levels of Beclin-1 mRNA, ATG-5 mRNA and LC-3 mRNA in 4.0 mg/L hydroxycamptothecin group were (3.225 ± 0.346), (2.839 ± 0.418) and (3.761 ± 0.224) folds higher than those of the control group. The expressions of Beclin-1 and ATG-5 proteins were significantly increased in the 4.0 mg/L hydroxycamptothecin group in comparison with the control group, and the expression intensity ratio of LC-3-II/I was 0.965 ± 0.159 in the hydroxycamptothecin group, which was significantly higher than 0.275 ± 0.860 of the control group ($P=0.003$). Cyto-ID staining showed that the percentage of autophagic cells increased dramatically from (11.333 ± 4.010)% to (55.000 ± 9.013)% upon the exposure of HTFs to 4.0 mg/L hydroxycamptothecin ($P=0.002$). Flow cytometry analysis showed that the green fluorescence intensity in the 4.0 mg/L hydroxycamptothecin group was (3.037 ± 0.513) fold relative to that in the control group, showing a significant difference between the two groups ($P=0.003$). **Conclusions** Hydroxycamptothecin can induce autophagy in HTFs *in vitro*.

[Key words] Autophagy; Hydroxycamptothecin; Human, Tenon capsule; Fibroblast; Cell culture; Glaucoma

抗青光眼滤过手术是目前青光眼治疗的重要手段,术后滤过道瘢痕化是导致手术失败的主要原因。有报道显示,抗青光眼滤过手术中联合使用抗代谢药物丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu), 术后 5 年的失败率仍达 30%, 低眼压、滤过泡渗漏、黄斑病变、眼内炎等为其常见的并发症^[1-2]。因此,亟需研究安全、高效、不良反应少的药物来抑制手术区成纤维细胞的增生,减轻滤过道瘢痕化,提高滤过手术的成功率。羟喜树碱是 S 期特异性细胞周期阻断剂,通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I 起到抗肿瘤的效应^[3]。本课题组的前期研究证实,小梁切除术中局部应用羟喜树碱能够减轻滤过道瘢痕化,提高手术成功率^[4]。此外,羟喜树碱能抑制体外原代培养的人 Tenon 囊成纤维细胞 (human Tenon capsule fibroblasts, HTFs) 增生,诱导其凋亡^[5-7]。自噬是真核细胞进化过程中高度保守的一种生命现象,细胞可以通过自噬清除老化受损的亚细胞器和清除长寿蛋白而获得更新。在细胞饥饿、损伤、缺氧和生长因子缺乏等条件以及某些病理状态下,自噬对维持细胞的存活有保护作用,过度的自噬可以导致细胞出现程序性死亡^[8]。在某些因素,如抗代谢药物的刺激下,细胞的自噬和凋亡现象可以同时被观察到^[9]。因此我们提出假设,羟喜树碱在诱导 HTFs 凋亡的同时,对另一种程序性细胞死亡方式——自噬也可产生一定的影响。本研究探讨羟喜树碱是否能诱导 HTFs 发生自噬,从而为其在抗青光眼滤过手术中的应用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、质量分数 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) (日本 Dojindo 公司); 逆转录试剂盒 (大连宝生物技术公司);

逆转录定量 PCR (quantitative reverse transcriptase PCR, qRT-PCR) 检测试剂盒 (美国 ABI 公司); Cyto-ID 自噬检测试剂盒 (美国 ENZO 公司); Trizol 试剂、Beclin-1、ATG-5、LC-3-II qPCR 引物 (美国 Invitrogen 公司); 兔抗人自噬相关蛋白 Beclin-1、自噬相关基因 5 (autophagy related gene 5, ATG-5)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (light chain 3, LC-3)、GAPDH 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling 公司); 羟喜树碱、HRP 标记羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 方法

1.2.1 HTFs 的培养及传代 收集在江苏省人民医院眼科斜视手术过程中获取的 3 例 3 眼的 Tenon 囊组织,患者年龄分别为 4、15 和 29 岁,其中男 1 例,女 2 例。本研究经江苏省人民医院伦理委员会审核批准,患者及其监护人了解研究目的并签署知情同意书。将 Tenon 囊组织置于无菌 PBS 中,取材后 1 h 内转移至超净工作台。组织块经 PBS 冲洗 2 遍后剪切至 5 mm×5 mm 大小,接种于 6 cm 培养皿内。待组织块贴附牢固后浸没于含体积分数 10% FBS、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,小心移至 37 °C、体积分数 5% CO₂ 的培养箱内静置培养。1 周后 HTFs 从组织块中爬出,吸除组织碎片并换液,每 3 天更换培养基,待细胞铺满培养皿时进行传代,取第 3~6 代细胞进行实验。**1.2.2 CCK-8 法检测细胞的增生能力** 将第 3~6 代 HTFs 以 5 000~10 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔含 100 μl 培养基,待细胞生长至 70%~80% 融合状态时分别加入 0.0、0.5、1.0、4.0、10.0 mg/L 羟喜树碱,置培养箱中继续培养 24 h,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后于每孔中加入 10 μl 含有 WST-8 的 CCK-8 试剂,置培养箱中继续培养约 1 h,观察培养基颜色的变化。用 ELX800 型酶标仪 (美国 BioTek 公司) 读取各孔 450 nm 处的吸光度 (A) 值,以其余各组 A 值与 0.0 mg/L 羟喜树碱组 (对照组) A 值的比值来表示不同

质量浓度的羟喜树碱对 HTFs 增生能力的影响,确定羟喜树碱的最适质量浓度。

1.2.3 Cyto-ID 染色法鉴定 HTFs 用 4.0 mg/L 羟喜树碱处理的细胞作为处理组,不加羟喜树碱的细胞作为对照组,每组设 3 个复孔,然后将细胞接种于 6 孔板中。待细胞生长至 70% ~ 80% 融合状态时在培养基中加入 4.0 mg/L 羟喜树碱,置培养箱中继续培养 24 h,收集细胞,用 Cyto-ID 自噬检测试剂盒中的 1 倍测试缓冲液清洗细胞 2 次,每孔中加入 100 μ l 发光液,置 37 $^{\circ}$ C 培养箱内避光孵育 20 min。弃发光液,小心用 1 倍测试缓冲液清洗细胞 3 次,在荧光显微镜(日本 Olympus 公司)下观察,核周围和细胞质的自噬小体及自噬溶酶体成分呈绿色荧光,为 Cyto-ID 染色阳性细胞,即自噬阳性细胞。任意取 200 个细胞,计算染色阳性细胞数,以染色阳性细胞数所占百分比表示 HTFs 的自噬水平。

1.2.4 流式细胞仪测定 Cyto-ID 染色细胞的平均荧光强度 选取 4.0 mg/L 羟喜树碱作用的细胞作为处理组,不加羟喜树碱的培养细胞作为对照组。将细胞接种于 6 cm 培养皿中,每组设 3 个复孔。待细胞长至 70% ~ 80% 融合状态时加入 4.0 mg/L 羟喜树碱,置培养箱中继续培养 24 h,用胰蛋白酶消化,置于高速离心机中,离心半径 12 cm,1 000 r/min 离心 3 min,收集细胞,每个样本管含 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/ml 细胞。用 1 倍测试缓冲液清洗细胞 2 次,用 250 μ l 含 5% FBS 的完全培养基悬浮样本,再加入 250 μ l 染色液,小心吹打混匀,置 37 $^{\circ}$ C 培养箱中避光孵育 30 min。离心并收集细胞,用 1 倍测试缓冲液清洗,将细胞悬浮于 500 μ l 的 1 倍测试缓冲液中,FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)进行荧光强度检测。

1.2.5 qRT-PCR 法检测 HTFs 中 Beclin-1、ATG-5 及 LC-3-II mRNA 的相对表达 接种细胞于 6 cm 培养皿中,实验组和对照组处理方法同上,处理后的细胞用 PBS 冲洗 2 遍,加入 1 ml Trizol 试剂轻轻吹打使细胞脱落,收集上述混合液。按照说明书指示提取细胞总 RNA,使用紫外分光光度仪测 RNA 浓度及纯度。参照逆转录试剂盒说明书加入相应试剂,进行逆转录,反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s,4 $^{\circ}$ C 静置,所得 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。根据 qRT-PCR 试剂盒所述步骤操作,反应条件:42 $^{\circ}$ C 60 min,70 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 静置,GAPDH 为内参对照。实验所用的引物序列:Beclin-1 上游引物为 5'-CAAGATCCTGGACCGTGTC-3',下游引物为 5'-TGGCACTTCTGTGGACATCA-3';ATG5 上游引物为 5'-ATGCAGGGAACACTAAGCTG-3',下游引物为

5'-TCTAGGGCATTGTAGGCTTG-3';LC3 上游引物为 5'-CAACATGAGCGAGTTGGTCAA GA-3',下游引物为 5'-ACTCACCATGCTGTGCTGGTTC-3'。mRNA 的相对表达量以 4.0 mg/L 羟喜树碱组与对照组的基因 mRNA 表达量的比值来表示。

1.2.6 Western blot 法检测 HTFs 中 Beclin-1、ATG-5、LC-3 蛋白的表达水平 细胞分组及处理同 1.2.5,处理后的细胞用 PBS 冲洗 2 遍,每个培养皿加入 60 μ l 1 倍十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS)细胞裂解液(radio immunoprecipitation assay,RIPA)和 0.6 μ l 100 倍苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)的混合液以裂解细胞,于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 $\times g$ 离心 10 min,所得上清即为目的蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。根据上清量加入进样缓冲液,置于 100 $^{\circ}$ C 环境中 10 min,使蛋白变性。冰上冷却后置 -20 $^{\circ}$ C 容器中保存留用。取处理组和对照组各 10 μ l 样品,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)法先将不同相对分子质量的蛋白分离,再转移至 PVDF 膜上。转膜结束用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,根据标志物标记的相对分子质量分别孵育兔抗人 Beclin-1、ATG-5、LC-3 蛋白的一抗(1:1 000),置于摇床 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗 3 次,用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:5 000)室温摇床孵育 1 h。PBS 洗 3 次,加发光液显影。选取 GAPDH 作为内参。蛋白的表达量以各组目的蛋白条带的灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值表示。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。本研究测试指标的数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各均数经 Levene 检验方差齐。羟喜树碱剂量对细胞活力影响的评估采用均衡分组单因素干预五水平实验设计,不同质量浓度羟喜树碱处理组间 HTFs 活力的总体差异比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 Dunnett *t* 检验。羟喜树碱对 HTFs 自噬影响的评价采用均衡分组单因素干预两水平实验设计,4.0 mg/L 羟喜树碱处理组与对照组间 Cyto-ID 阳性细胞比例及自噬蛋白相对表达量的差异比较均采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度羟喜树碱作用后 HTFs 增生情况

0.0、0.5、1.0、4.0、10.0 mg/L 羟喜树碱组的 *A* 值与 0.0 mg/L 羟喜树碱组 *A* 值的比值分别为(100.00 \pm

6.44)%、(91.70±6.36)%、(81.47±6.00)%、(68.43±6.69)%和(59.97±6.98)%，随着羟喜树碱质量浓度的增加，HTFs 的活力逐渐下降，以 10.0 mg/L 羟喜树碱组最低，各组间差异有统计学意义 ($F = 19.040, P < 0.001$)。1.0、4.0、10.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 的细胞活力均低于对照组，以 10.0 mg/L 羟喜树碱组最低，差异均有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$) (图 1)。

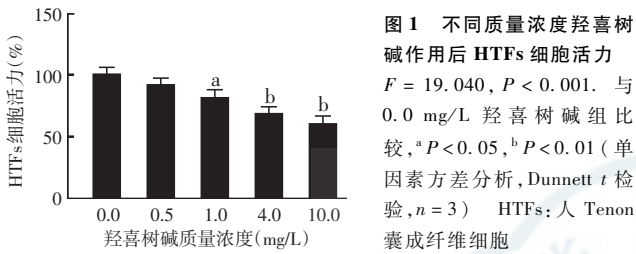


图 1 不同质量浓度羟喜树碱作用后 HTFs 细胞活力 $F = 19.040, P < 0.001$ 。与 0.0 mg/L 羟喜树碱组比较, $^a P < 0.05, ^b P < 0.01$ (单因素方差分析, Dunnett t 检验, $n = 3$) HTFs: 人 Tenon 囊成纤维细胞

2.2 羟喜树碱作用后 HTFs 中 Beclin-1、ATG-5 和 LC-3 的表达

qRT-PCR 检测提示, 4.0 mg/L 羟喜树碱作用 HTFs 后 24 h, Beclin-1 mRNA、ATG-5 mRNA 和 LC-3 mRNA 在 HTFs 中的相对表达水平较对照组均明显升高, 分别是对照组的 (3.225±0.346)、(2.839±0.418)、(3.761±0.224) 倍, 与对照组比较差异均有统计学意义 ($P = 0.020, 0.027, 0.007$) (图 2)。Western blot 检测显示, 4.0 mg/L 羟喜树碱作用 HTFs 后 24 h 细胞中 Beclin-1、ATG-5、LC-3 蛋白的相对表达量均较对照组显著升高, LC-3 II/I 灰度值比值分别为 0.965±0.159 和 0.275±0.860, 差异有统计学意义 ($P = 0.003$) (图 3)。

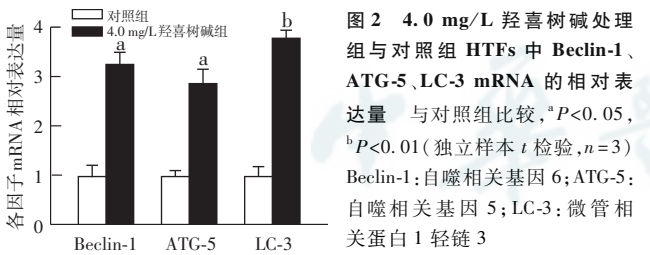


图 2 4.0 mg/L 羟喜树碱处理组与对照组 HTFs 中 Beclin-1、ATG-5、LC-3 mRNA 的相对表达量 与对照组比较, $^a P < 0.05, ^b P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) Beclin-1: 自噬相关基因 6; ATG-5: 自噬相关基因 5; LC-3: 微管相关蛋白 1 轻链 3

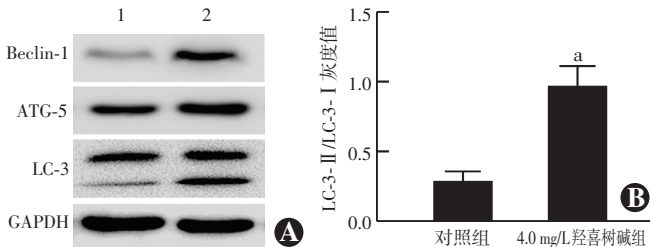


图 3 自噬相关蛋白的表达检测 A: Western blot 检测 Beclin-1、ATG-5、LC-3 蛋白在 4.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 中的表达 1: 对照组 2: 4.0 mg/L 羟喜树碱组 B: LC-3-II/I 灰度值定量分析 与对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$) Beclin-1: 自噬相关基因 6; ATG-5: 自噬相关基因 5; LC-3: 微管相关蛋白 1 轻链 3; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

2.3 羟喜树碱作用后 HTFs 自噬水平的变化

4.0 mg/L 羟喜树碱处理后 24 h, Cyto-ID 染色显示 HTFs 的核周和细胞质区呈现浓聚的绿色荧光, 而对照组绿色荧光较羟喜树碱处理组减弱 (图 4)。对照组和 4.0 mg/L 羟喜树碱组的 Cyto-ID 染色阳性细胞百分比分别为 (11.333±4.010)% 和 (55.000±9.013)%, 差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。流式细胞仪检测显示, 4.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 的自噬平均荧光强度为 18.911±0.367, 对照组为 57.433±0.859, 4.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 的自噬荧光强度是对照组的 (3.037±0.513) 倍, 2 个组间差异有统计学意义 ($P = 0.003$) (图 5)。

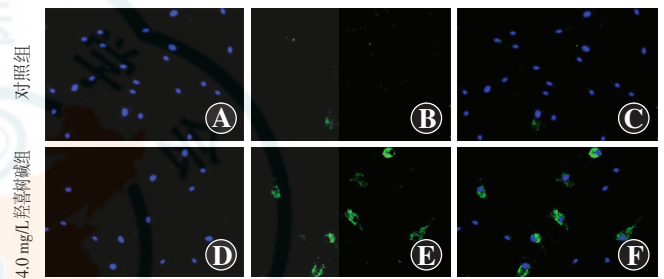


图 4 荧光显微镜下观察 HTFs 经羟喜树碱作用后自噬情况 细胞核呈蓝色荧光, 核周及细胞质内的自噬小体及自噬溶酶体成分对 Cyto-ID 呈绿色荧光 A: 对照组 HTFs 中细胞核呈蓝色荧光 ($\times 100$) B: 对照组 HTFs 中核周及细胞质内绿色荧光微弱 (Cyto-ID $\times 100$) C: A 与 B 的融合图像 D: 4.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 细胞核呈蓝色荧光 (Hoechst33342 $\times 100$) E: 4.0 mg/L 羟喜树碱组 HTFs 核周和细胞质区域呈现浓聚的绿色荧光 (Cyto-ID $\times 100$) F: D 与 E 的融合图像 G: Cyto-ID 染色阳性细胞百分率分析与对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

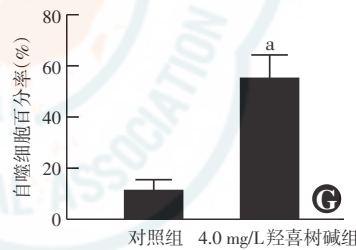


图 5 流式细胞仪检测 HTFs 经羟喜树碱作用后自噬荧光强度变化 A: 流式细胞仪检测显示, 4.0 mg/L 羟喜树碱组 Cyto-ID 绿色荧光平均强度明显高于对照组 B: 自噬平均荧光强度量化分析 与对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

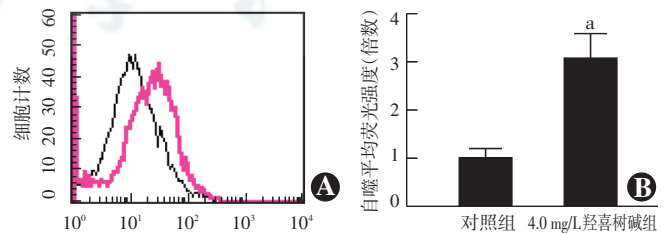


图 5 流式细胞仪检测 HTFs 经羟喜树碱作用后自噬荧光强度变化 A: 流式细胞仪检测显示, 4.0 mg/L 羟喜树碱组 Cyto-ID 绿色荧光平均强度明显高于对照组 B: 自噬平均荧光强度量化分析 与对照组比较, $^a P < 0.01$ (独立样本 t 检验, $n = 3$)

3 讨论

羟喜树碱对多种恶性肿瘤均显示出抗肿瘤活性, 已应用于临床的一些领域^[10-12]。在动物模型中, 羟喜树碱能抑制成纤维细胞增生、减少椎板切除术后硬膜

外瘢痕粘连^[13-14]。我们的前期研究证实,羟喜树碱通过内质网应激和线粒体凋亡途径诱导体外培养的 HTFs 发生凋亡^[7]。因此,近年来羟喜树碱在临床抗青光眼术后瘢痕形成方面的应用受到广泛关注。

自噬是动物和植物进化过程中古老的生物学现象。正常情况下,细胞自噬维持在较低水平,当细胞遭受饥饿或某些药物刺激时,自噬被激活。起初我们认为这是细胞对刺激启动了自噬机制,通过清除受损的细胞器,实现降解产物的再利用发挥保护自身的作用。随着刺激因素的持续存在,大量的细胞出现自噬性死亡,此时刺激因素诱导的自噬则成为加速细胞死亡的重要机制。*Beclin-1* 又称 *ATG-6*, 是首个已知的哺乳动物自噬相关基因,其表达水平与自噬体的形成密切相关。*ATG-5* 与 *ATG-12* 的结合在自噬体的形成中发挥至关重要的作用。*LC-3* 被公认为自噬的特征性标志物,细胞质中可溶性 *LC-3-I* 与磷脂酰乙醇胺结合形成 *LC-3-II* 并移至自噬体膜上,*LC-3-II* 含量与自噬泡数量成正比,可反映自噬活性^[15-16]。本研究证实羟喜树碱能够诱导 HTFs 自噬,结果显示,经 4.0 mg/L 羟喜树碱处理后 24 h,自噬相关蛋白 *Beclin-1*、*ATG-5*、*LC-3* 的 mRNA 水平和蛋白水平以及 *LC-3-II/I* 比值均有显著增加,经 Cyto-ID 染色后自噬阳性细胞数量上升,平均荧光增强。体外药物实验常使用无血清培养液以避免药物与血清中诸多成分的相互影响,但由于无血清饥饿是公认的诱导细胞自噬的刺激因素,故本实验未采用无血清培养,以排除无血清饥饿对细胞自噬水平的影响。

抗代谢药物,如 5-氟尿嘧啶、雷帕霉素等均可诱导细胞发生自噬,与本研究中同为抗代谢药物的羟喜树碱诱导 HTFs 发生自噬相一致,但是由于自噬的双重作用及其与凋亡之间的密切关系,抗代谢药物引起的自噬在其抑制增殖效应中的作用尚不能肯定^[17-18]。*Furuya* 等^[19]报道抗代谢药物引起的自噬导致细胞凋亡,自噬能提高药物的促凋亡效应。另一研究则显示自噬对细胞对抗抗代谢药物起保护作用,即自噬抑制,药物的促凋亡效应提高^[20]。因此,关于自噬的激活和羟喜树碱抑制 HTFs 的增殖效应之间的关系及机制尚有待进一步研究。总之,自噬性细胞死亡是羟喜树碱对 HTFs 增殖抑制的重要机制之一,为我们研究羟喜树碱的作用机制开辟了新思路,也为羟喜树碱在临床上应用于抑制抗青光眼术后瘢痕形成提供了新靶点。

参考文献

[1] Palanca-Capistrano AM, Hall J, Cantor LB, et al. Long-term outcomes of

intraoperative 5-fluorouracil versus intraoperative mitomycin C in primary trabeculectomy surgery [J]. *Ophthalmology*, 2009, 116 (2) : 185-190. doi:10.1016/j.ophtha.2008.08.009.

- [2] Wendling J, Marchand A, Mauviel A, et al. 5-Fluorouracil blocks transforming growth factor- β -induced $\alpha 2$ type I collagen gene (COL1A2) expression in human fibroblasts via c-Jun NH2-Terminal kinase/activator protein-1 activation [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 4 (3) : 707-713. doi:10.1124/mol.64.3.707.
- [3] Zhang R, Li Y, Cai Q, et al. Preclinical pharmacology of the natural product anticancer agent 10-hydroxycamptothecin, an inhibitor of topoisomerase I [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998, 41 (4) : 257-267. doi:10.1007/s002800050738.
- [4] 夏丹,孙红,刘溢,等.羟喜树碱对抗青光眼滤过术后功能性滤过泡的维持作用[J].中华实验眼科杂志,2014,32(2):131-136. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2014.02.007.
- [5] 殷雪,傅煜轩,袁志兰.羟喜树碱诱导的人 Tenon 囊成纤维细胞凋亡及其机制[J].中华实验眼科杂志,2013,31(3):221-225. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.03.004.
- [6] Tang W, Zhang Y, Qian C, et al. Induction and mechanism of apoptosis by hydroxycamptothecin in human Tenon's capsule fibroblasts [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53 (8) : 4874-4880. doi:10.1167/iov.11-8968.
- [7] Yin X, Sun H, Yu D, et al. Hydroxycamptothecin induces apoptosis of human Tenon's capsule fibroblast by activating PERK signaling pathway [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54 (7) : 4749-4758. doi:10.1167/iov.12-11447.
- [8] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132 (1) : 27-42. doi:10.1016/j.cell.2007.12.018.
- [9] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (9) : 741-752. doi:10.1038/nrm2239.
- [10] Zhang XW, Jiang JF, Xu B. Differentiation-inducing action of 10-hydroxycamptothecin on human hepatoma Hep G2 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21 : 364-368.
- [11] Ling YH, Perez-Soler R, Tseng MT. Effect of DNA topoisomerase I inhibitor, 10-hydroxycamptothecin on the structure and function of nuclei and nuclear matrix in bladder carcinoma MBT-2 cells [J]. *Anticancer Res*, 1993, 13 (5A) : 1613-1617.
- [12] Zhang G, Ding L, Renegar R, et al. Hydroxycamptothecin-loaded Fe₃O₄ nanoparticles induce human lung cancer cell apoptosis through caspase-8 pathway activation and disrupt tight junctions [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102 : 1216-1222. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01930.x.
- [13] Sun Y, Wang L, Sun S, et al. The effect of 10-hydroxycamptothecin in preventing fibroblast proliferation and epidural scar adhesion after laminectomy in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 593 (1-3) : 44-48. doi:10.1016/j.ejphar.2008.07.28.
- [14] Yang J, Ni B, Liu J, et al. Application of liposome-encapsulated hydroxycamptothecin in the prevention of epidural scar formation in New Zealand white rabbits [J]. *Spine J*, 2011, 11 (3) : 218-223. doi:10.1016/j.spinee.2011.01.028.
- [15] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451 (7182) : 1069-1075. doi:10.1038/nature06639.
- [16] Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy [J]. *Dev Cell*, 2004, 6 (4) : 463-477. doi:10.1016/S1534-5807(04)00099-1.
- [17] Pan X, Zhang X, Sun H, et al. Autophagy inhibition promotes 5-fluorouracil-induced apoptosis by stimulating ROS formation in human non-small cell lung cancer A549 cells [J/OL]. *PloS one*, 2013, 8 (2) : e56679 [2014-05-19]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0056679>. doi:10.1371/journal.pone.0056679.
- [18] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease [J]. *Nat Genet*, 2004, 36 (6) : 585-595. doi:10.1038/ng1362.
- [19] Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 307 (1) : 26-40. doi:10.1016/j.yexcr.2005.02.023.
- [20] Daniel F, Legrand A, Pessayre D, et al. Partial Beclin 1 silencing aggravates doxorubicin-and Fas-induced apoptosis in HepG2 cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12 (18) : 2895-2900. doi:10.3748/wjg.v12.i18.2895.

(收稿日期:2014-11-24)

(本文编辑:尹卫靖 杜娟)