

过表达MARCH2抑制自噬促进肝细胞癌HUH7细胞的生长

夏丹^{1,2*}, 韦志永²

¹山东医学高等专科学校病理教研室, 山东 临沂

²临沂市人民医院病理科, 山东 临沂

收稿日期: 2025年4月28日; 录用日期: 2025年5月21日; 发布日期: 2025年5月29日

摘要

目的: 探讨过表达MARCH2对肝细胞癌HUH7细胞自噬水平和生长的影响及其机制。方法: MTS和EDU检测MARCH2过表达的肝细胞癌HUH7细胞的生长情况。流式细胞术检测MARCH2过表达的肝细胞癌HUH7细胞凋亡、细胞周期的情况。Western blot和激光共聚焦法检测MARCH2过表达的肝细胞癌HUH7细胞自噬水平。结果: MTS和EDU检测表明, MARCH2的过表达促进了肝细胞癌HUH7的生长。流式细胞术检测表明, MARCH2过表达对肝细胞癌HUH7细胞凋亡和细胞周期没有明显影响。进一步的实验表明, MARCH2过表达损害了肝细胞癌HUH7的自噬。用常见的自噬诱导剂雷帕霉素挽救自噬可以使肝细胞癌HUH7的增殖率恢复到控制水平。结论: 我们的数据表明, MARCH2通过抑制自噬在肿瘤发展过程中起着至关重要的作用。因此, MARCH2是一种有前景的肿瘤治疗新靶点。

关键词

MARCH2, 肝细胞癌HUH7细胞, 自噬, 凋亡, 细胞周期

Overexpression of MARCH2 Promotes the Growth of Hepatocellular Carcinoma HUH7 Cells via Inhibiting Autophagy

Dan Xia^{1,2*}, Zhiyong Wei²

¹Department of Pathology, Shandong Medical College, Linyi Shandong

²Department of Pathology, Linyi People's Hospital, Linyi Shandong

Received: Apr. 28th, 2025; accepted: May 21st, 2025; published: May 29th, 2025

*通讯作者。

文章引用: 夏丹, 韦志永. 过表达 MARCH2 抑制自噬促进肝细胞癌 HUH7 细胞的生长[J]. 临床医学进展, 2025, 15(5): 2371-2380. DOI: 10.12677/acm.2025.1551629

Abstract

Aims: To investigate the effects and mechanisms of overexpression of MARCH2 on autophagy levels and growth of hepatocellular carcinoma HUH7 cells. **Methods:** MTS and EDU were used to detect the growth of MARCH2 overexpressing hepatocellular carcinoma HUH7 cells. Flow cytometry was used to detect apoptosis and cell cycle in MARCH2 overexpressing hepatocellular carcinoma HUH7 cells. Western blot and laser confocal microscopy were used to detect the autophagy levels in MARCH2 overexpressing HUH7 hepatocellular carcinoma cells. **Results:** In this study, MTS and EDU assays showed that the overexpression of MARCH2 promoted the growth of hepatocellular carcinoma HUH7 cells. Flow cytometry detection illustrated that MARCH2 overexpression had no obvious effect on the hepatocellular carcinoma HUH7 cell apoptosis and cell cycle. Further experiments displayed that MARCH2 overexpression impaired the autophagy of hepatocellular carcinoma HUH7 cells. Rescued autophagy with the common autophagy inducer rapamycin can bring the proliferation rate of hepatocellular carcinoma HUH7 cells back to the control level. **Conclusions:** Our data indicates that MARCH2 plays an essential role in the progression of tumor development through inhibiting autophagy. Therefore, MARCH2 is an attractive novel target for tumor therapy.

Keywords

MARCH2, Hepatocellular Carcinoma HUH7 Cell, Autophagy, Apoptosis, Cell Cycle

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

自噬是一种主要的降解机制, 其中细胞质蛋白质和细胞器被分离成自噬体并被溶酶体降解。自噬不仅对细胞应激和病原体清除很重要, 而且参与生物体的生长、发育和衰老。研究表明, 自噬可导致多种人类疾病, 如癌症[1]-[3]。

自噬在肿瘤生物学中起着双重作用[4] [5]。目前已证实, 自噬基因 BECN1 在子宫颈癌、癌症、卵巢癌过程中表达水平降低。尽管 BECN1-knockout 小鼠可以存活, 但淋巴瘤、癌症或癌症的发病率显著增加, 自噬活性明显减弱[1]。然而, BECN1 在癌症和其他肿瘤中高度表达[4]。

肝细胞癌是原发性肝癌最常见的病理类型, 占 75%~85%, 其发病率和病死率在肿瘤中分别位居第六位和第三位[6]。肝细胞癌起病隐匿, 患者就诊时多处于中晚期。迄今为止, 肝细胞癌的诊断和疗效评估主要依赖于影像学 and AFP、异常凝血酶原(PIVKA II)及 HSP90 α 等血清学标志物的检测, 但其灵敏度和特异性尚不能满足临床早期诊断和治疗的需求[7] [8]。因此, 亟需发现新的基因或蛋白为肝细胞癌的早期诊断、预后评估及治疗提供有效标志物或靶标。

自噬与肝细胞癌的发生、预后和治疗相关[9]-[14]。有文献报道 Hif-1 α 诱导 m6A 阅读蛋白 YTHDF1 的表达, 通过促进 ATG2A 和 ATG14 的转录, 驱动缺氧诱导的肝细胞自噬和肝癌的恶性化[9]。CDK9 抑制可通过调节 SIRT1-FOXO3-BNIP3 轴, 阻断 pink1-prkn3 介导的线粒体自噬的启动, 增强肝细胞癌线粒体功能障碍的治疗效果[10]。STOML2 通过促进 pink1 介导的线粒体自噬和调节对乐伐替尼的敏感性来增强肝细胞癌的转移[11]。PNO1 通过 MAPK 信号通路调控肝癌细胞自噬和凋亡[12]。Desideri E 课题组研究表明通过伴侣介导的自噬破坏 YAP1 和 IL6ST 的降解, 可促进正常细胞和肝癌细胞的增殖和迁移[13]。在肝细胞癌中, 淫羊藿苷增强线粒体自噬并与阿霉素协同诱导免疫原性细胞死亡[14]。

细胞自噬为肝细胞癌的治疗提供了一种新思路。通过抑制具有细胞保护效应的自噬反应或促进可诱导凋亡的细胞自噬有可能成为肝细胞癌生物治疗中的重要靶点。

MARCH2 是我们在 10,000 多的质粒库中通过生物信息学分析,找到同时具有 LC3 作用膜序和 Ub 结合膜序的 208 个基因,再经 SQSTM1-Luc 筛选平台筛选出的自噬相关基因[15]。

MARCH2 基因是 Bartee 课题组在 2004 年发现,定位于 19p13.2,基因全长 25,746 bp,其开放读码框编码 246 个氨基酸,相对分子量 27 kDa。MARCH2 是定位于内质网、溶酶体和内体的二次跨膜蛋白,能降解细胞表面转铁蛋白受体和共刺激分子 B7.2。MARCH2 与 STX6 结合,参与高尔基体和内体之间运输。MARCH2 与 DLG1 相互作用促进 DLG1 泛素化,减弱 DLG1 在细胞连接点的表达,影响细胞的极性。MARCH2 与 β 2AR 相互作用,促进 β 2AR 的泛素化,调节细胞表面的 β 2AR 水平。MARCH2 通过与 CAL 和 STX6 结合泛素化并降解 CFTR。

目前对 MARCH2 的研究主要是囊泡运输方面,而对 MARCH2 与自噬的相关性研究罕有报道。因此,我们的目的就是要研究 MARCH2 在肝细胞癌 HUH7 细胞自噬过程中的功能以及分子机制。由于在肝细胞癌发病机制中自噬有关键作用,增加对肝细胞癌中自噬的了解有助于发现治疗的靶点,降低疾病的发生率,改善生存。

2. 材料和方法

2.1. 抗体和试剂

p62/SQSTM1 抗体购自香港 MBL 公司; LC3B 抗体购自 Sigma Aldrich 公司; cleaved-PARP 抗体购自美国 CST 公司; cleaved-caspase 3 抗体购自美国 Abcam 公司; 二抗购自美国 Rockland 公司; bafilomycin A₁ (BafA₁)、Rapamycin 购自美国 Sigma Aldrich 公司。

2.2. 质粒构建

使用上游引物(5'-CGGAATTCATGCTGGAAGCCATGGCGGAGC-3')和下游引物(5'-CCCAAGCTTTCAGGGCTCTCCAGATTGGG-3')通过 PCR 从 HeLa 细胞中扩增 MARCH2 cDNA。然后通过 EcoRI 和 HindIII 消化将插入物从质粒中释放出来,亚克隆到 pcDNA.3.1/myc His(-)B(Life Technologies, V85520)的 EcoRI 位点,构建 pcDB-MACH2 质粒,在本研究中缩写为 MARCH2。GFP-LC3B 质粒由美国西奈山医学院岳振宇教授惠赠。

2.3. 细胞培养及转染

HUH7 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,常规传代。使用 MegaTran 1.0 进行 pcDB-MACH2 或空载体质粒转染,并用 G418 筛选,以建立 MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞系,空载体转染作为对照。

2.4. Western Blotting 法

HUH7 细胞总蛋白的提取,蛋白定量,10%牛奶(TBST 液配制)室温封闭 1 h; 加入相应的一抗,4 °C 过夜; 然后加入相应的 DyLight 680/800 标记的二抗(1:10,000),室温避光反应 1 h; 用 Odyssey Infrared Imager 检测荧光信号分析灰度值。

2.5. 细胞活力检测

使用 MTS 试剂盒检测细胞活力,取出 MTS 试剂于室温下静置 90 min 或 37°C 水浴 10 min 溶解。于

培养有 100 μ l 细胞(5000~10,000 个)/孔的 96 孔培养板中加入 20 μ l MTS 试剂, 复孔 3~5 组, 并设置对照组。将 96 孔培养板放回培养箱, 37℃、5% CO₂ 的环境下孵育 1~4 小时; 若立刻检测可直接进行下一步, 若之后检测, 可在每孔加入 25 μ l 10% SDS 终止反应, 室温下避光保存于湿盒中, 在 18 h 之内检测。用酶标仪于 490 nm 处测定 OD 值。结果分析: 将各测试孔的 OD 值减去对照孔或调零孔 OD 值。各平行孔的 OD 值取平均数。细胞活力% = 实验组 OD/对照组 OD $\times$ 100%。

2.6. EdU 掺入检测

使用 EdU 检测试剂盒检测细胞增殖, 细胞在普通培养基中培养, 并铺在盖玻片上。将 EdU 溶解在 0.9% 无菌 NaCl 中, 在 0.22 μ m 下过滤, 在收获细胞前 4 小时加入培养基中。然后立即将细胞固定在 4% 多聚甲醛中, 并按照说明进行。细胞核用 Hoechst 33342 复染。

2.7. 细胞周期检测

将细胞一式三份铺在六孔板上, 并在 37℃ 下孵育不同时间。然后收集细胞, 用冰冷的磷酸盐缓冲盐水(PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; pH 7.4; Solarbio, P1010)洗涤三次, 用 70% 冰冷的乙醇固定过夜。在测试前, 加入 RNase (100 μ g/ml), 再用碘化丙啶(PI, 50 μ g/ml)对细胞进行染色。于 30 分钟内收集细胞并用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson)进行分析。

2.8. 细胞凋亡检测

细胞凋亡水平通过 FITC-Annexin V 染色检测试剂盒和流式细胞术检测。将一式三份的六孔板中的细胞用胰蛋白酶消化并重新悬浮在含有 5 μ l FITC 偶联的膜联蛋白 V 的 100 μ l 缓冲液(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂)中, 在室温下在黑暗中孵育 30 分钟。然后, 收获细胞并用 FACSCalibur 流式细胞仪进行分析。

2.9. 激光共聚焦显微镜观察

将细胞铺入共聚焦小皿中大约长至 60%~80% 密度, 使用 Megatran1.0 转染带荧光蛋白标签或不带标签的相应蛋白表达质粒, 转染 24 小时后, 细胞用 4% 多聚甲醛固定或进一步进行免疫荧光染色, Hoechst33342 染核, PBS 冲洗三次, 置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。在 50 个细胞中评估每个细胞的 GFP-LC3B 数量, 并从三次独立的实验中获得统计数据。

2.10. 流式细胞术

将处理过的细胞用胰蛋白酶化并重新悬浮在 100 μ L 缓冲液(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂)中, 然后用 Annexin V-FITC (Solarbio, CA1020-20)避光染色 30 分钟, 加入碘化丙啶(PI, Solarbio)染色 5 分钟, 用 FACSCalibur 流式细胞仪进行分析。

2.11. 统计分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。使用 Student *t* 检验对连续变量进行组间差异分析。本研究中的统计学意义设定为 $p < 0.05$ 。所有报告的 p 值都是双侧的。所有分析均使用 GraphPad Prism 5 进行。

3. 结果

3.1. MARCH2 的过表达促进肝细胞癌 HUH7 细胞增殖

为了研究 MARCH2 对肝细胞癌 HUH7 细胞增殖的影响, 我们首先建立了能够稳定过表达 MARCH2

的肝细胞癌 HUH7 细胞系。如图 1(A)所示, MARCH2 在肝细胞癌 HUH7 细胞系中高度表达。接下来, 我们进行了 MTS 检测, 以评估 MARCH2 过表达细胞系的细胞存活率。生长曲线显示, 与对照组相比, MARCH2 过表达细胞系(HUH7)的细胞存活率显著提高(图 1(B))。

我们还测量了肝细胞癌 HUH7 细胞系中 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)掺入的水平(即, 一种替代[3H]胸苷摄取的非放射性测定方法, 用于测量体外细胞增殖)。我们观察到, 在 MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞(从~37%到 58%)中, EdU 阳性细胞(即增殖细胞)的百分比显著增加(图 1(C)和图 1(D))。

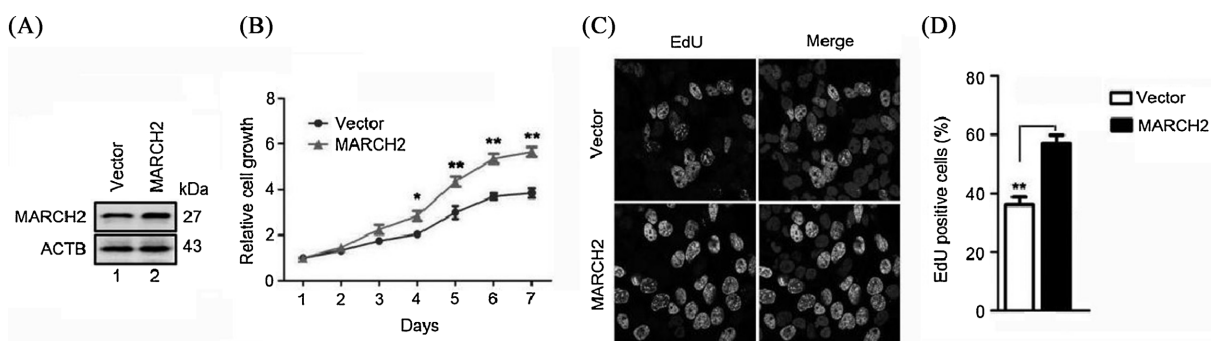


Figure 1. Overexpression of MARCH2 promotes hepatocellular carcinoma HUH7 cells growth. (A) Expression of MARCH2 in hepatocellular carcinoma HUH7 cells was analyzed by Western blot. ACTB was detected as the protein loading control. (B) Cells growth of hepatocellular carcinoma HUH7 cells with or without of MARCH2-overexpression was detected by MTS assay. Data were mean $\pm$ SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) Cells were plated in glass slides and incorporated with EdU. 4 h later, the indicated cells were performed by immunofluorescence assay. Nuclei were stained with Hoechst 33342. Representative confocal microscopy images were shown. (D) Quantification of the percentage of EdU positive cells in 200 cells were shown from five randomly selected areas from each slide. Each bar represents the mean $\pm$ SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

图 1. MARCH2 过表达促进肝细胞癌 HUH7 细胞的生长。(A) 通过 Western blot 分析 MARCH2 在肝细胞癌 HUH7 细胞中的表达。(B) MTS 法检测 MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞的生长情况。数据为三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。(C) 将细胞置于载玻片上, 并掺入 EdU。4 小时后, 通过免疫荧光法对指示的细胞进行检测。用 Hoechst 33342 对细胞核进行染色。显示了代表性的共聚焦显微镜图像。(D) 从每张载玻片中随机选择的五个区域显示了 200 个细胞中 EdU 阳性细胞百分比的定量。每条线代表三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

由于凋亡是影响细胞存活率的一个因素, 我们检测到磷脂酰丝氨酸(PS)的暴露, 这是细胞凋亡的关键生化标志。使用 FITC 标记的膜联蛋白 V (其特异性结合 PS)通过流式细胞术可以很容易地识别凋亡细胞表面 PS 的暴露。使用该检测方法, 我们检测了 MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞凋亡的百分比。通过 PI 染色评估质膜完整性。流式细胞术分析的数据显示, MARCH2 过表达和对照细胞之间的细胞凋亡没有显著差异(图 2(A)和图 2(B))。此外, 对凋亡相关蛋白 caspase-3 和 PARP 进行了测试, 切割的 caspase-3/PARP 水平在 MARCH2 过表达和对照细胞之间没有明显变化, 这意味着 MARCH2 过表达未能影响细胞凋亡(图 2(C))。

同时, 用流式细胞术进行细胞周期分析, 结果显示, MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞中 S 期细胞群增多, 与 MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞中 G0/G1 期细胞群减少有关, 肝细胞癌 HUH7 细胞中 G2/M 期没有变化(图 3(A)~(D)), 表明 MARCH2 过表达导致肝细胞癌 HUH7 细胞的生长加速。

总之, 这些数据表明, MARCH2 的过表达促进了肝细胞癌 HUH7 细胞的生长, 但未能诱导细胞凋亡。

3.2. MARCH2 抑制肝细胞癌 HUH7 细胞的自噬

在发现 MARCH2 促进肝细胞癌 HUH7 细胞增殖后, 我们研究了其可能的机制。由于肝细胞癌确实

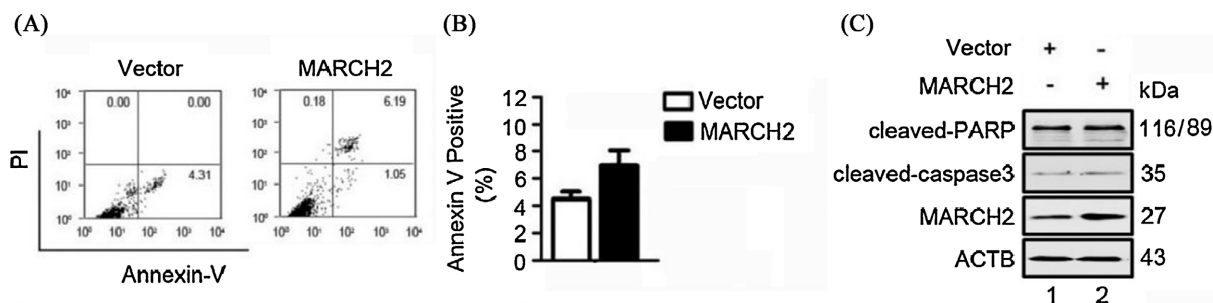


Figure 2. Overexpression of MARCH2 fails to affect hepatocellular carcinoma HUH7 cells apoptosis. (A) Representative apoptosis profiles of hepatocellular carcinoma HUH7 cells with or without of MARCH2-overexpression from flow cytometry with PI/Annexin-V double staining. (B) The percentage of apoptotic cells [Annexin]-[V Positive (%) + PI Positive (%)] was calculated. The data represent the means $\pm$ SEM of at least three independent experiments. (C) The level of cleaved-caspase 3 and cleaved-PARP in hepatocellular carcinoma HUH7 cells with or without of MARCH2-overexpression were tested by western blotting

图 2. MARCH2 的过表达不影响肝细胞癌 HUH7 细胞的凋亡。(A) 通过 PI/Annexin-V 双染色流式细胞术检测 MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞的凋亡情况。(B) 计算凋亡细胞的百分比[膜联蛋白]-[V 阳性(%) + 阳性(百分比)]。数据表示至少三个独立实验的平均值 $\pm$ SEM。(C) 通过蛋白质印迹检测肝细胞癌 HUH7 细胞中 MARCH2 过表达的 cleaved-caspase 3 和切割 cleaved-PARP 的水平

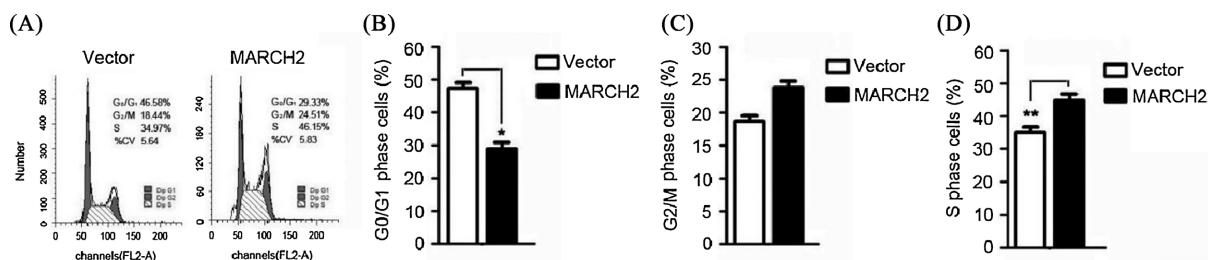


Figure 3. Overexpression of MARCH2 enhances cell population in the S phase. (A) Cell cycle of hepatocellular carcinoma HUH7 cells with or without of MARCH2-overexpression was detected by flow cytometry. (B-D) G0/G1, G2/M and S phase cells were calculated. Each bar represents the mean $\pm$ SD from three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

图 3. MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞中 S 期细胞群增多。(A) 流式细胞术检测有或没有 MARCH2 过表达的肝细胞癌 HUH7 细胞的细胞周期。(B-D) 计算 G0/G1、G2/M 和 S 期细胞。每条线代表三个独立实验的平均值 $\pm$ 标准差, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

有进行自噬的倾向[9]-[14], 肝细胞癌的增殖很可能受到自噬的调节。此外, 由于 MARCH2 是一种自噬相关蛋白, 我们假设 MARCH2 过表达引起的肝细胞癌 HUH7 细胞增殖加速可能与自噬有关。

我们评估了 MARCH2 对自噬活性的影响。共聚焦显微镜的数据显示, 与对照组相比, MARCH2 过表达减少了 GFP-LC3B 的点状分布。由于 GFP-LC3B 斑点与自噬体的数量相关, GFP-LC3B 斑点的减少可能是由于自噬体形成减少或溶酶体清除自噬体增加。为了分析 MARCH2 过表达细胞中的自噬状态, 我们在存在或不存在巴非霉素 A1 (BafA1) 的情况下培养细胞, BafA1 通过抑制液泡 HCATPase (V-ATPase) 来阻止自噬体和溶酶体之间的融合。我们观察到, BafA1 处理导致 MARCH2 转染细胞中的 GFP-LC3B 点比对对照细胞多(图 4(A)和图 4(B))。根据这些结果, 我们接下来通过蛋白质印迹测量了 LC3B 的转化率。我们观察到, MARCH2 在肝细胞癌 HUH7 细胞中的过表达降低了内源性 LC3B-II 的水平。在有或没有 BafA1 的葡萄糖饥饿细胞中观察到类似的结果(图 4(C)和图 4(D))。此外, 在 MARCH2 过表达细胞中观察到内源性自噬底物 SQSTM1 条带比对照细胞增加(图 4(E)和图 4(F)), 表明 MARCH2 过度表达阻断了自噬底物的清除, 从而抑制了肝细胞癌 HUH7 细胞的自噬通量。

接下来, 我们在 MARCH2 过表达细胞系中使用常用自噬诱导剂雷帕霉素来检测肝细胞癌 HUH7 细胞的生长。结果表明, 挽救的自噬可以逆转癌细胞加速的增殖率(图 5)。

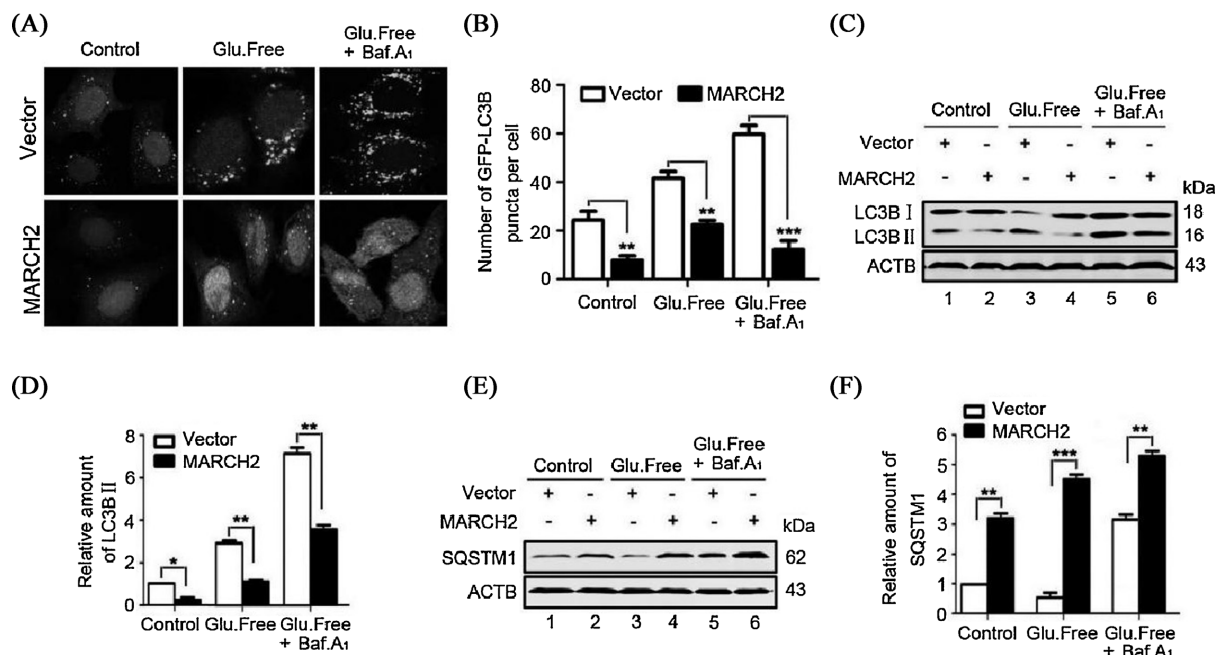


Figure 4. MARCH2 injures autophagy in hepatocellular carcinoma HUH7 cells. (A) The indicated cell lines with or without MARCH2-overexpression were infected with GFP-LC3 for 24 h, then treated with or without Glucose free DMEM for the last 8 h and/or BafA₁ (10 nM) for the last 6 h. Representative confocal microscopy images of GFP-LC3B distribution obtained from the indicated cell lines are shown. (B) Quantification of GFP-LC3B puncta per cell treated as in (A). Data are means ± SD of at least 100 cells scored. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) The levels of LC3B-II were detected in the cells treated as in (A) by western blot. (D) Quantification of LC3B-II levels relative to ACTB in cells treated as in (C). Average value in control cells was normalized as 1. Data are means ± SD of results from 3 experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). (E) The levels of SQSTM1 in the indicated cell lines with or without MARCH2-overexpression were analyzed by Western blot. (F) Quantification of amounts of SQSTM1 relative to ACTB in cells treated as in (E). The average value in control cells was normalized as 1. Data are means ± SD of results from 3 experiments (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

图 4. MARCH2 抑制肝细胞癌 HUH7 细胞的自噬。(A) 将具有或不具有 MARCH2 过表达的指示细胞系用 GFP-LC3 转染 24 小时, 然后在最后 8 小时用或不用无葡萄糖 DMEM 和/或在最后 6 小时用 BafA₁ (10 nM) 处理。显示了从指示细胞系获得的 GFP-LC3B 分布的代表性共聚焦显微镜图像。(B) 按(A)处理的每个细胞 GFP-LC3B 斑点定量。数据为至少 100 个细胞评分的平均值 ± 标准差, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。(C) 通过蛋白质印迹检测如(A)中处理的细胞中 LC3B-II 的水平。(D) 如(C)所述处理的细胞中 LC3B-II 水平相对于 ACTB 的定量。对照细胞的平均值标准化为 1。数据为 3 个实验结果的平均值 ± 标准差(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。 (E) 通过 Western blot 分析具有或不具有 MARCH2 过表达的指示细胞系中 SQSTM1 的水平。(F) 如(E)所述处理的细胞中 SQSTM1 相对于 ACTB 的定量。对照细胞的平均值被归一化为 1。数据为 3 个实验结果的平均值 ± 标准差(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

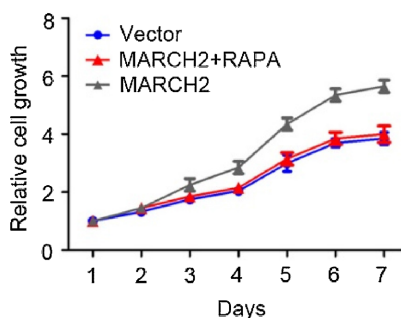


Figure 5. Rescued autophagy can bring the proliferation rate of tumor cells back to the control level. Cells growth of hepatocellular carcinoma HUH7 cells with or without MARCH2-overexpression and/or rapamycin was detected by MTS assay. Data were mean ± SD from three independent experiments

图 5. 挽救的自噬可以逆转癌细胞加速的增殖率。MTS 法检测有或没有 MARCH2 过表达和/或雷帕霉素的肝细胞癌 HUH7 细胞的生长情况。数据为三个独立实验的平均值 ± 标准差

这些数据表明, MARCH2 过表达通过抑制自噬对肝细胞癌 HUH7 细胞产生促肿瘤活性。

4. 讨论

众所周知, 自噬在肿瘤生物学中起着双重作用。自噬最初被认为可以抑制肿瘤的发生, 这种肿瘤抑制的间接证据是自噬的失活导致癌基因和肿瘤抑制基因的改变, 如 AKT 扩增、PI3K 突变和 PTEN²³ 缺失。这意味着自噬的激活可以阻断癌症细胞的转化。自噬作为肿瘤抑制因子的更直接证据是对 ATG5、ATG7 和 BECN1 等核心自噬分子的遗传研究。研究表明, 自噬缺陷会增加肿瘤的发生率^{[16] [17]}。从机制的角度来看, 自噬的抑制导致 ROS 的积累、DNA 损伤和线粒体缺陷的增加, 这些都与肿瘤发生有关^[18]。具体来说, 线粒体自噬可以减少受损线粒体, 相反, 自噬缺陷会导致受损线粒体在细胞内积累和线粒体氧化代谢所产生的活性氧(ROS)产生增加, 而 ROS 在肿瘤转移复发中呈现出双向性和复杂性, 一方面 ROS 可以通过损害线粒体基因、激活肿瘤相关通路等方式促进肿瘤进展; 另一方面, ROS 积累过量可能使线粒体等细胞器甚至细胞受到损伤, 从而抑制肿瘤进展^[18]。此外, 放疗是一种重要的肿瘤治疗策略, 可直接或间接引起肿瘤细胞的 DNA 损伤。自噬是一种与 DNA 损伤相关的生理过程。电离辐射可以引起 Parkin/BNIP3 介导的线粒体自噬, 增强 DNA 损伤, 提高肿瘤细胞的放射敏感性, 最终促进肿瘤细胞死亡^[18]。自噬的失活导致肿瘤发生中 SQSTM1 的增加^[17]。相比之下, 自噬可以通过 SQSTM1 减少来抑制肿瘤发生。SQSTM1 的过表达参与肾细胞癌的发展^[19]。在癌症组织中, SQSTM1 的表达上调, 并与胃癌的低分化有关^[20]。SQSTM1 缺乏抑制肿瘤发生^[21], 可能是因为氧化应激增加, 也可能是因为 SQSTM1 是多种癌症基因途径的信号适配器, 包括 MTOR、NRF2 和 NF- κ B^[22]。MAP1LC3B 的低表达与低 Beclin-1 相关, 预示着胃癌的淋巴结转移和预后不良^[23]。

肿瘤细胞也依赖于自噬, 可能是因为缺乏微环境, 而代谢增强、生物合成需要增加, 否则增殖会降低。例如, 自噬在缺氧环境中上调, 这对肿瘤细胞的生长很重要^[24]。在 RAS 转化的癌症细胞中自噬上调, 促进 RAS 转化的癌症细胞的生长、存活、肿瘤^{[25]-[27]}、侵袭和转移^[28]。在 RAS 驱动的肿瘤中, 自噬缺陷可导致线粒体代谢紊乱和对应激的敏感性。这些结果表明了一个新的概念, 即 RAS 驱动的肿瘤可能是自噬成瘾^{[25] [27] [29]}。ATG17/FIP200 的缺陷也抑制了 T 抗原驱动的乳腺癌的生长, 这表明自噬在促进肿瘤发生中起着重要作用。自噬成瘾在癌症中的概念可能更广泛地适用。自噬相关基因在肿瘤发生发展中的作用以及潜在的临床应用需要进一步探索。

在这项研究中, 我们研究了 MARCH2 与肝细胞癌之间的关系。我们发现 MARCH2 过表达通过负调控自噬促进肝细胞癌 HUH7 细胞的增殖, 表明自噬可以负调控肝细胞癌 HUH7 细胞的增殖。敲除 MARCH2 是否抑制肝细胞癌还有待确定。总之, MARCH2 可能是肝细胞癌治疗的新靶点。

基金项目

本研究由山东省医药卫生科技项目(202304010866); 临沂市重点研发计划(医学类)(2023YX0096)资助。

参考文献

- [1] Debnath, J., Gammoh, N. and Ryan, K.M. (2023) Autophagy and Autophagy-Related Pathways in Cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **24**, 560-575. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z>
- [2] Klionsky, D.J., Petroni, G., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., *et al.* (2021) Autophagy in Major Human Diseases. *The EMBO Journal*, **40**, e108863. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108863>
- [3] Cao, W., Li, J., Yang, K. and Cao, D. (2021) An Overview of Autophagy: Mechanism, Regulation and Research Progress. *Bulletin du Cancer*, **108**, 304-322. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.11.004>
- [4] Li, X., He, S. and Ma, B. (2020) Autophagy and Autophagy-Related Proteins in Cancer. *Molecular Cancer*, **19**, Article

- No. 12. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>
- [5] Rakesh, R., PriyaDharshini, L.C., Sakthivel, K.M. and Rasmi, R.R. (2022) Role and Regulation of Autophagy in Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Basis of Disease*, **1868**, Article ID: 166400. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166400>
 - [6] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
 - [7] 舒宏. AFP 阴性肝癌早期诊断的蛋白分子标志物[J]. 中国实验诊断学, 2022, 26(7): 1090-1093.
 - [8] Xing, M., Wang, X., Kirken, R., He, L. and Zhang, J. (2021) Immunodiagnostic Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma (HCC): The First Step in Detection and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article 6139. <https://doi.org/10.3390/ijms22116139>
 - [9] Li, Q., Ni, Y., Zhang, L., Jiang, R., Xu, J., Yang, H., *et al.* (2021) Hif-1 α -induced Expression of M6a Reader YTHDF1 Drives Hypoxia-Induced Autophagy and Malignancy of Hepatocellular Carcinoma by Promoting ATG2A and ATG14 Translation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **6**, Article No. 76. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00453-8>
 - [10] Yao, J., Wang, J., Xu, Y., Guo, Q., Sun, Y., Liu, J., *et al.* (2021) CDK9 Inhibition Blocks the Initiation of Pink1-Prkn-Mediated Mitophagy by Regulating the SIRT1-FOXO3-BNIP3 Axis and Enhances the Therapeutic Effects Involving Mitochondrial Dysfunction in Hepatocellular Carcinoma. *Autophagy*, **18**, 1879-1897. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.2007027>
 - [11] Zheng, Y., Huang, C., Lu, L., Yu, K., Zhao, J., Chen, M., *et al.* (2021) STOML2 Potentiates Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Promoting Pink1-Mediated Mitophagy and Regulates Sensitivity to Lenvatinib. *Journal of Hematology & Oncology*, **14**, Article No. 16. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01029-3>
 - [12] Han, Z., Liu, D., Chen, L., He, Y., Tian, X., Qi, L., *et al.* (2021) PNO1 Regulates Autophagy and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma via the MAPK Signaling Pathway. *Cell Death & Disease*, **12**, Article No. 552. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03837-y>
 - [13] Desideri, E., Castelli, S., Dorard, C., Toifl, S., Grazi, G.L., Ciriolo, M.R., *et al.* (2022) Impaired Degradation of YAP1 and IL6ST by Chaperone-Mediated Autophagy Promotes Proliferation and Migration of Normal and Hepatocellular Carcinoma Cells. *Autophagy*, **19**, 152-162. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2063004>
 - [14] Yu, Z., Guo, J., Hu, M., *et al.* (2020) Icaritin Exacerbates Mitophagy and Synergizes with Doxorubicin to Induce Immunogenic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *ACS Nano*, **14**, 4816-4828.
 - [15] 赵远波, 洪杜北琦, 陈英玉. 基于 p62/SQSTM1-luciferase 的细胞自噬水平检测方法的建立及鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(1): 55-62.
 - [16] Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., *et al.* (2011) Autophagy-Deficient Mice Develop Multiple Liver Tumors. *Genes & Development*, **25**, 795-800. <https://doi.org/10.1101/gad.2016211>
 - [17] Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., *et al.* (2011) Persistent Activation of Nrf2 through p62 in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Journal of Cell Biology*, **193**, 275-284. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102031>
 - [18] White, E. (2015) The Role for Autophagy in Cancer. *Journal of Clinical Investigation*, **125**, 42-46. <https://doi.org/10.1172/jci73941>
 - [19] Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H., *et al.* (2009) Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell*, **137**, 1062-1075. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048>
 - [20] Qian, H. and Yang, Y. (2016) Functional Role of Autophagy in Gastric Cancer. *Oncotarget*, **7**, 17641-17651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7508>
 - [21] Li, L., Shen, C., Nakamura, E., *et al.* (2013) SQSTM1 Is a Pathogenic Target of 5q Copy Number Gains in Kidney Cancer. *Cancer Cell*, **24**, 738-750.
 - [22] Duran, A., Linares, J.F., Galvez, A.S., Wikenheiser, K., Flores, J.M., Diaz-Meco, M.T., *et al.* (2008) The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF- κ B Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell*, **13**, 343-354. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.001>
 - [23] Yu, S., Li, G., Wang, Z., Wang, Z., Chen, C., Cai, S., *et al.* (2016) Low Expression of MAP1LC3B, Associated with Low Beclin-1, Predicts Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis of Gastric Cancer. *Tumor Biology*, **37**, 15007-15017. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5383-5>
 - [24] Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., *et al.* (2006) Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Restricts Necrosis, Inflammation, and Tumorigenesis. *Cancer Cell*, **10**, 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>
 - [25] Guo, J.Y., Chen, H., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., *et al.* (2011) Activated Ras Requires

- Autophagy to Maintain Oxidative Metabolism and Tumorigenesis. *Genes & Development*, **25**, 460-470.
<https://doi.org/10.1101/gad.2016311>
- [26] Lock, R., Roy, S., Kenific, C.M., Su, J.S., Salas, E., Ronen, S.M., *et al.* (2011) Autophagy Facilitates Glycolysis during Ras-Mediated Oncogenic Transformation. *Molecular Biology of the Cell*, **22**, 165-178.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e10-06-0500>
- [27] Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., *et al.* (2011) Pancreatic Cancers Require Autophagy for Tumor Growth. *Genes & Development*, **25**, 717-729. <https://doi.org/10.1101/gad.2016111>
- [28] Lock, R., Kenific, C.M., Leidal, A.M., *et al.* (2014) Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion. *Cancer Discovery*, **4**, 466-479.
- [29] Guo, J.Y., Xia, B. and White, E. (2013) Autophagy-Mediated Tumor Promotion. *Cell*, **155**, 1216-1219.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.019>