

# RNA 干扰 ATG16L1 抑制人胃癌细胞 BGC823 自噬并促进顺铂诱导的细胞凋亡

张玉梅<sup>1,2</sup>, 林方方<sup>1,2</sup>, 冯 凡<sup>2</sup>, 陈 琦<sup>2</sup>, 刘月琴<sup>2</sup>, 许文林<sup>2</sup>, 沈慧玲<sup>3</sup>

(1. 江苏大学第四附属医院, 江苏 镇江 212001; 2. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013;

3. 江苏大学附属人民医院, 江苏 镇江 212002)

**摘要:** [目的] 检测 RNA 干扰自噬相关基因 16L1 (autophagy-related gene 16L1, ATG16L1) 表达后胃癌细胞的自噬活性, 观察在 ATG16L1 敲减下顺铂(DDP)对胃癌细胞凋亡的影响。[方法] 用 ATG16L1 siRNA 技术构建 ATG16L1 低表达的人胃癌 BGC823 细胞株作为干扰组, 转染阴性干扰的 BGC823 细胞作为阴性转染组, 未转染的 BGC823 细胞作为对照组; Western blot 检测各组细胞中 ATG16L1 的表达和自噬标志物微管相关轻链蛋白 3(microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3) 及死骨片蛋白 1 (sequestosome 1, P62) 的表达; 免疫荧光观察 LC3II 情况。CCK-8 实验检测 DDP 处理后各组细胞增殖能力, 计算 IC<sub>50</sub> 值。经 DDP 刺激后, 流式细胞术检测细胞凋亡, 再用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9 蛋白表达。最后应用公共数据库 Kaplan-Meier 对多组胃癌患者 mRNA 表达谱进行分析, 预测 ATG16L1 的表达水平对患者预后的影响。[结果] ATG16L1 siRNA 干扰组较对照组蛋白表达水平明显降低( $P<0.001$ ); LC3II 水平下降( $P<0.01$ ), P62 水平上升( $P<0.01$ ), 并且 LC3 荧光强度下降( $P<0.05$ )。经 DDP 诱导后, 干扰组细胞增殖明显受抑( $P<0.001$ ), 细胞凋亡率明显增加( $P<0.01$ ); ATG16L1 干扰组中促凋亡分子 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 表达比对照组明显增加( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少( $P<0.001$ )。公共数据库 Kaplan-Meier 表达谱芯片分析结果显示高表达 ATG16L1 组较低表达组预后差, 差异有统计学意义( $P=0.001$ )。[结论] RNA 干扰 ATG16L1 抑制胃癌细胞自噬, 并能够明显增强顺铂诱导人胃癌细胞的凋亡, 提示靶向干扰 ATG16L1 抑制细胞自噬后可能通过调控细胞凋亡提高胃癌细胞对化疗药物的敏感性。

**关键词:** ATG16L1; 自噬; 胃肿瘤; 顺铂; 细胞凋亡

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2019)08-0636-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2019.08.A013

## Downregulation of ATG16L1 Gene Inhibits Autophagy and Promotes Cisplatin-induced Apoptosis in Human Gastric Cancer Cell Line BGC823

ZHANG Yu-mei<sup>1,2</sup>, LIN Fang-fang<sup>1,2</sup>, FENG Fan<sup>2</sup>, CHEN Qi<sup>2</sup>, LIU Yue-qin<sup>2</sup>, XU Wen-lin<sup>2</sup>, SHEN Hui-ling<sup>3</sup>

(1. The Fourth Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China; 2. Medical College of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. People's Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the effect of RNA knockdown of the ATG16L1 gene on autophagy and cisplatin-induced apoptosis in gastric cancer cells. [Methods] Gastric cancer BGC-823 cells were transfected with ATG16L1 siRNA or siRNA negative control, thus the cells were divided into 3 groups: siRNA ATG16L1, siRNA NC and control. Expression of autophagy-related proteins was detected by Western blot and immunofluorescence; CCK-8 assay was used to detect cell proliferation and IC<sub>50</sub> value was calculated. The cells were treated with cisplatin(DDP), cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were detected by Western blot. Kaplan-Meier plotter was used to analyze the on-line database of gastric cancer patients. The value of ATG16L1 mRNA expression in prognosis of gastric cancer patients was analyzed. [Results] The expression of ATG16L1 protein significantly decreased( $P<0.001$ ), LC3II levels were decreased( $P<0.01$ ), P62 expression was elevated( $P<0.01$ ) and the fluorescence intensity of LC3II was decreased ( $P<0.01$ ) in siRNA interference

收稿日期: 2018-11-10; 修回日期: 2018-12-21

基金项目: 国家自然科学基金(81672913); 江苏省高层次卫生人才

“六个一工程”科研项目(LGY2017021)

通信作者: 沈慧玲, E-mail: shenhuilin0826@163.com

group, compared with the control group. With the downregulation of ATG16L1 gene, cell proliferation was inhibited ( $P < 0.001$ ), the rate of apoptosis was increased ( $P < 0.01$ ), the expression of cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 was over-expressed ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), but the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was down-regulated ( $P < 0.001$ ). The result of Kaplan-Meier plotter showed that the prognosis in the high expression of ATG16L1 group was poorer ( $P = 0.001$ ). [Conclusion] Downregulation of ATG16L1 gene inhibits autophagy and promotes cisplatin-induced apoptosis in human gastric cancer cell line BGC823. It suggests that ATG16L1 may be associated with chemoresistance in human gastric cancer by regulating apoptosis.

**Key words:** ATG16L1; autophagy; gastric neoplasms; DDP; apoptosis

胃癌是全球第五大常见癌症,也是全球癌症死亡的第三大原因<sup>[1]</sup>。据统计,目前在中国胃癌的发病率、死亡率高居第2位,仅次于肺癌<sup>[2]</sup>。尽管近年来胃癌的根治性手术、化疗、放射治疗等取得了进展,但其5年总生存率低于25%,仍然不能令人满意<sup>[3]</sup>。顺铂是一种含铂的药物,1978年首次被批准为抗肿瘤药,在许多形式癌症的今天它仍然是一种重要和有效的治疗<sup>[4]</sup>,而靶向治疗的不断进步使胃癌全身治疗不再是单纯的化疗,2015年美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)指南更是废弃“化疗”或“系统化疗”的说法,全部替代为“系统治疗”,以兼顾化疗和靶向治疗。近年来肿瘤的基因靶向治疗与顺铂化疗联合为提高肿瘤治疗疗效带来新的希望<sup>[5]</sup>。自噬是细胞溶质成分的自降解过程,包括免疫的几个方面的多细胞死亡过程是由自噬引起的。自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)家族在细胞存活和细胞凋亡、细胞运输调节、细胞信号传导和自身免疫方面至关重要<sup>[6-8]</sup>。其中,ATG16L1是自噬必需的大蛋白质复合物ATG5-ATG12-ATG16L1的组分<sup>[9]</sup>,在自噬过程中发挥重要作用,同时ATG16L1还可调节自噬相关的促凋亡/抗凋亡基因<sup>[10]</sup>。经研究发现ATG16L1在多种疾病如克罗恩病、帕金森、强直性脊柱炎等中发挥重要作用<sup>[11-13]</sup>,近年来还发现其在部分肿瘤中异常表达,如在骨肉瘤、口腔鳞癌、非小细胞肺癌等中的表达水平高于正常组织,并且与癌细胞的生长有关<sup>[14-16]</sup>。本研究通过靶向抑制胃癌细胞中ATG16L1的表达,探讨其对胃癌细胞自噬、凋亡及顺铂敏感性的影响,从而为临床胃癌的系统治疗开辟一条新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

胃癌细胞株 BGC823 由本实验室传代培养。RPMI1640 培养基、小牛血清购自美国 Gibco 公司、0.25% 含 EDTA 胰酶、双抗购自美国 Hyclone 公司。DMSO 购自美国 Sigma 公司。靶向 ATG16L1 的 siRNA (siRNA ATG16L1-1286 正义链序列: 5'-CC-CGUGAUGACUUGC UAAATT-3', 反义链序列: 5'-UUUAGCAAGUCAUCACGGGTT-3'; siRNA ATG16L1-1136 正义链序列: 5'-GCACAGAGCAAUGUGUAAUTT-3', 反义链序列: 5'-AUUACACAUUGCUCUGUGCTT-3'; siRNA ATG16L1-906 正义链序列: 5'-CCUCU-UAGCAGCUUCAAUUTT-3', 反义链序列: 5'-AUUU-GAAGCUGCUAAGAGGTT-3') 及阴性干扰对照 (siR-NANC 正义链序列: 5'-UUCUCCGAACGUGU-CACGUTT-3', 反义链序列: 5'-ACGUGACACGU-UCGGAGAATT-3') 由上海吉玛制药技术有限公司设计与合成。转染试剂脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。CCK8 检测试剂盒购自南京凯基生物公司。PMSF、蛋白酶抑制剂、RAPI 裂解液购自江苏碧云天生物有限公司。凝胶配制试剂盒、顺铂购自北京索来宝生物科技有限公司。蛋白上样缓冲液 (5×)、ECL 曝光液购自江苏苏州新赛美生物公司。兔抗人 ATG16L1、P62、LC3A/B、鼠抗人  $\beta$ -actin 抗体以及 HRP 标记的山羊抗兔、抗小鼠二抗购自 Proteintech 公司; 兔抗人 BCL-2、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9、兔抗人 GAPDH 抗体、PVDF 膜购自美国 Cell Signaling Technology, 荧光二抗购自优

宁维生物科技有限公司。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细胞培养

人胃癌细胞系 BGC823 复苏后培养于含 10% FBS 及 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基在恒温 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度的条件下培养,每 2~3 天传代 1 次。

### 1.2.2 小干扰 RNA(siRNA)转染

取对数生长期的 BGC823 细胞( $5 \times 10^5$ /ml)种于 6 孔板中培养,每孔 3ml。将 Lipofectamine 2000 混合到含有 siRNA ATG16L1-906、siRNA ATG16L1-1286、siRNA ATG16L1-1136 及 siNC 的无血清无双抗的 1640 培养基中。另外,仅用 Lipofectamine 2000 转染模拟对照,在室温下孵育 20min 并分配到重复的孔中,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 湿润条件下孵育,4~6h 后更换为含有 10%FBS 的 1640 培养基。24h 后收取各组细胞提取总蛋白,Western blot 验证干扰效果。

### 1.2.3 免疫荧光观察转染后细胞自噬变化

取各组细胞制成细胞悬液( $1 \times 10^5$ /ml),接种于预先放置无菌细胞爬片的 24 孔板中,待细胞贴壁后取出细胞爬片,PBS 轻洗 3 次,每次 5min。4%多聚甲醛固定 20min,PBS 轻洗 3 次,每次 5min。0.2% Triton X 100 通透 10min。5%山羊血清封闭 20min,一抗(LC3 B,1:100)4℃孵育过夜,PBS 轻洗 3 次,每次 5min。荧光二抗(1:100)室温避光孵育 5min,PBS 轻洗 3 次,每次 5min。滴加 DAPI 室温避光静置染核 5min,PBS 轻洗 3 次,每次 5min。最后在干净的载玻片上滴一小滴甘油作封片剂,将爬片的细胞面扣在封片剂上,倒置荧光显微镜下观察。实验重复 3 次。

### 1.2.4 药物优化浓度筛选

将对照组、阴性转染组、干扰组细胞( $1 \times 10^4$ /ml)接种于 96 孔培养板,每孔 100μl,每组设 5 复孔。细胞贴壁后加入不同药物浓度的顺铂(0、0.25、0.5、1、2、4、8、16μg/ml)进行干预。待加药后 24h 取出 96 孔板,每孔中加入 10ml 的 CCK-8 溶液。继续置于培养箱中培养 1h 后,震荡混匀,用酶标仪在 450nm 波长条件下测定吸光度值。用 SPSS19.0 软件计算顺铂对细胞的半数抑制浓度,即 IC<sub>50</sub>,打开软件建立三个变量,分别是浓度、抑制率和总数,依次选择分析、回归、probit,设置响应频率为抑制率,观测值汇总为总数,协变量为浓度,转换选择对数底为 10,模型选择

logit,确定后在弹出的输出界面的置信限制中概率 0.50 对应的估计浓度即为 IC<sub>50</sub>,其中抑制率=[(阴性对照组平均 OD 值-实验组平均 OD 值)/(阴性对照组平均 OD 值-空白对照组平均 OD 值)]×100%,总数为复孔数,并筛选两种细胞的顺铂给药浓度。实验重复 3 次。

### 1.2.5 细胞体外增殖实验

取对数生长期的各组细胞( $1 \times 10^4$ /ml)接种于 96 孔培养板,每孔 100μl,每组设 5 复孔。24h 后加入 0.3μg/ml 的顺铂,分别于 0、24、48、72h 后加入 10μl CCK-8 试剂,用酶标仪在 450nm 波长条件下测定吸光度值。实验重复 3 次。

### 1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

将上述细胞接种在 24 孔板中( $1 \times 10^5$  个/ml),每孔 500μl,细胞贴壁后加入 0.3μg/ml 的顺铂诱导,24h 后收集旧的培养液于离心管中,加入适量不含 EDTA 的 0.05%胰酶消化细胞,用收集的旧培养基终止消化,轻轻将细胞吹成单细胞悬液,4℃ 1000g 离心 5min,弃上清,PBS 洗细胞 2 次,加入 100μl 1× Binding Buffer 重悬细胞并计数,向细胞悬液中加入 5μl Annexin V-FITC 和 10μl PI,轻混匀,室温避光孵育 15min,最后再加入 400μl Binding Buffer,上机检测。实验重复 3 次。

### 1.2.7 Western blot 检测蛋白表达

收集各组细胞,提取蛋白,每组均取 40μg 总蛋白。经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离、转膜和封闭后,分别加入兔抗人 ATG16L1、LC3 I/II、P62、Bcl-2、Cleaved-caspase 3、Cleaved-caspase 9 抗体孵育过夜,TBST 洗 3 遍,每次 10min。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,室温孵育 2h,TBST 洗 3 遍,每次 15min。加入 ECL 工作液,用分子成像系统曝光、拍照。实验重复 3 次。

### 1.2.8 公共数据库分析

ATG16L1 表达高低对临床患者预后的影响应用 Kaplan-Meier Plotter 网站对现有的所有有临床资料的胃癌患者信息(包括仅接受过手术治疗、5-Fu 辅助治疗、其他辅助治疗、HER 阳性、HER 阴性等患者)进行分析,选择 auto select best cutoff<sup>[17]</sup>定义 ATG16L1 表达水平的高低。

### 1.2.9 统计学处理

应用 GraphPad Prism 5 和 SPSS19.0 软件进行统计分析,计量资料用均数±标准差表示,试验为两

组样本之间比较采用  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 建立 ATG16L1 敲减的 BGC823 细胞株

Western blot 结果表明,与对照组( $0.626\pm 0.005$ )对比,阴性转染组和转染了 3 种 ATG16L1 siRNA 的干扰组 ATG16L1 的蛋白表达水平均有不同程度的改变 (siRNA NC: $0.740\pm 0.001$ ,  $t=20.82$ ,  $P<0.0001$ ; siRNA ATG16L1-906: $0.650\pm 0.006$ ,  $t=3.008$ ,  $P=0.0396$ ; siRNA ATG16L1-1286: $0.167\pm 0.012$ ,  $t=32.55$ ,  $P<0.0001$ ; siRNA ATG16L1-1136: $0.532\pm 0.046$ ,  $t=2.038$ ,  $P=0.1112$ ), 其中我们选取了干扰效率最高的 siRNA ATG16L1-1286, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (Figure 1)。

### 2.2 ATG16L1 敲低后抑制胃癌细胞自噬

转染后结果显示, 阴性转染组与对照组相比: $28.09\pm 2.51$  vs  $28.61\pm 3.22$ ,  $t=0.1261$ ,  $P=0.9057$ , 差异无统计学意义。ATG16L1 敲低后, 自噬底物 P62 水平较对照组明显增加 ( $1.97\pm 0.16$  vs  $0.99\pm 0.09$ ,  $t=5.282$ ,  $P=0.0062$ ) (Figure 2A、2B), 明显减低 ( $1.56\pm 0.16$  vs  $3.72\pm 0.45$ ,  $t=4.461$ ,  $P=0.0112$ ) (Figure 2A、2C), 并且免疫荧光结果显示 (倒置荧光显微镜,  $200\times$ ): 干扰组 LC3 荧光密度与对照组相比也降低 ( $17.31\pm 0.42$  vs  $28.61\pm 3.22$ ,  $t=3.478$ ,  $P=0.0254$ ) (Figure 3), 差异有统计学意义。

### 2.3 ATG16L1 敲低联合 DDP 对 BGC823 细胞增殖的影响

CCK-8 结果显示 ATG16L1 敲减对 BGC823 细胞在体外的增殖有较明显抑制作用,

对照组、阴性转染组、干扰组半数抑制浓度分别为  $0.771$ 、 $0.910$ 、 $0.342\mu\text{g/ml}$  (Figure 4A)。选用  $0.3\mu\text{g/ml}$  顺铂作用于各组细胞  $0$ 、 $6$ 、 $12$ 、 $24$ 、 $48$ 、 $72\text{h}$ , 结果  $24\text{h}$  时干扰组已经明显低于对照组 ( $0.84\pm 0.01$  vs  $0.81\pm 0.01$ ,  $t=5.732$ ,  $P=0.0004$ ), 差异具有统计学意义; 而阴性转染组 OD450 值较对照组无明显变化 ( $0.81\pm 0.04$  vs  $0.81\pm 0.01$ ,  $t=0.060$ ,  $P=0.953$ ) (Figure 4B)。

### 2.4 ATG16L1 敲低后促进 DDP 诱导的胃癌细胞凋亡

经 DDP 刺激  $24\text{h}$  后, 对照组、阴性转染组、干扰组的凋亡率分别为 ( $13.26\%\pm 1.70\%$ )、( $12.66\%\pm 1.41\%$ )、( $43.49\%\pm 3.89\%$ ), 相较于对照组, 阴性转染组的细胞凋亡率无显著变化 ( $P=0.7972$ ,  $t=0.275$ ); ATG16L1 敲低后, 凋亡率明显增加 ( $P=0.0020$ ,  $t=$

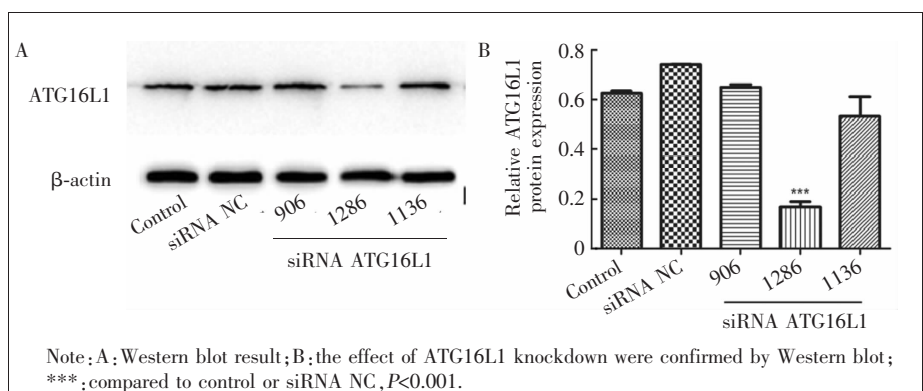


Figure 1 The effect of ATG16L1 knockdown confirmed by Western blot

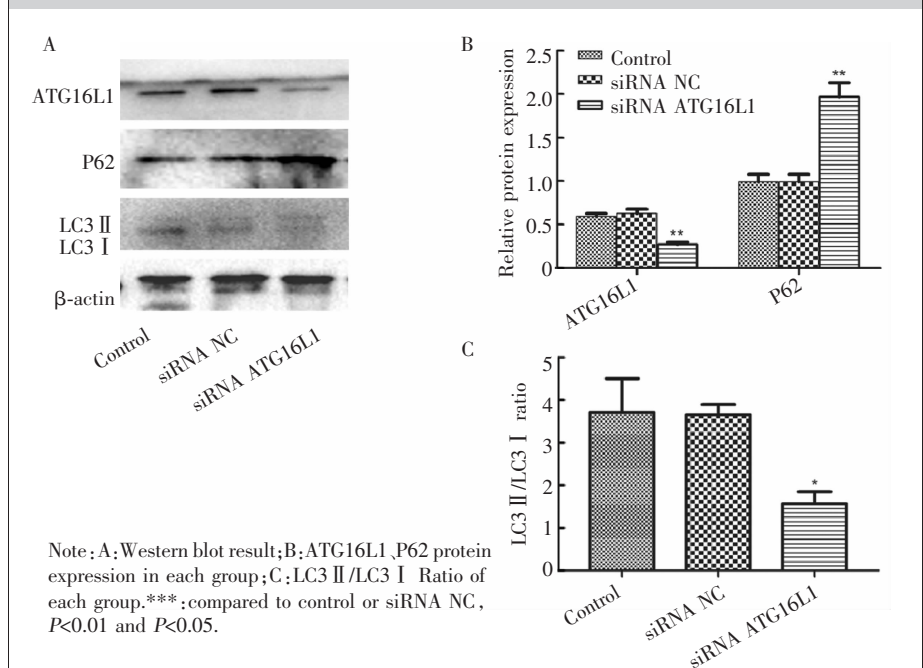


Figure 2 Autophagy levels measured by Western blot

7.129), 差异有统计学意义(Figure 5)。

## 2.5 ATG16L1 敲低对 BGC823 细胞中凋亡相关分子 Bcl-2、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9 表达的影响

经 DDP 刺激后, 干扰组中凋亡标志分子 Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9 蛋白表达量较对照组明显增加( $1.58 \pm 0.06$  vs  $0.80 \pm 0.02$ ,  $t=11.57$ ,  $P=0.0003$ ;  $1.60 \pm 0.03$  vs  $1.01 \pm 0.08$ ,  $t=7.086$ ,  $P=0.0021$ ); 抗凋亡分子 Bcl-2 蛋白表达明显降低( $0.44 \pm 0.04$  vs  $0.89 \pm 0.02$ ,  $t=10.98$ ,  $P=0.0004$ )(Figure 6)。

## 2.6 表达谱芯片分析 mRNA 水平 ATG16L1 表达高低与预后的关系

应用在线生物信息学分析软件 Kaplan-Meier plotter 分析 ATG16L1 mRNA 水平表达情况与生存情况的关系, 结果显示截断值为 172, ATG16L1 高表达组累积生存率显著低于低表达组,  $HR = 1.43$  (1.15, 1.77)。经秩和检验分析可知差异具有统计学意义( $P=0.0012$ ) (Figure 7)。表明 ATG16L1 在 mRNA 表达水平与患者预后显著相关。

## 3 讨论

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一, 预计由于人口增长, 总数将持续攀升。胃癌死亡率在男性中排第 3 位, 在女性中排第 5 位<sup>[1]</sup>。化疗是胃癌临床治疗中的常用方法之一, 而癌细胞对化疗药物的敏感性与肿瘤中多种基因的表达有关, 其中包括自噬相关蛋白。自噬相关蛋白通过与其自噬依赖性和非依赖性功能相关的独特机制促进癌细胞存活、代谢和细胞增殖<sup>[18]</sup>。ATG16L1 是哺乳动物 ATG16 直系同源基因, 存在于所有真核生物中, 它介导多聚体 ATG12-ATG5-ATG16L1 复合物的形成, 在自噬体形成中发挥重要作用。ATG12-ATG5 复合物位于吞噬细胞上, 一旦组装了自噬体, ATG16L1 就会从中解离出来<sup>[19]</sup>。ATG16L1 在癌症背景下的功能性

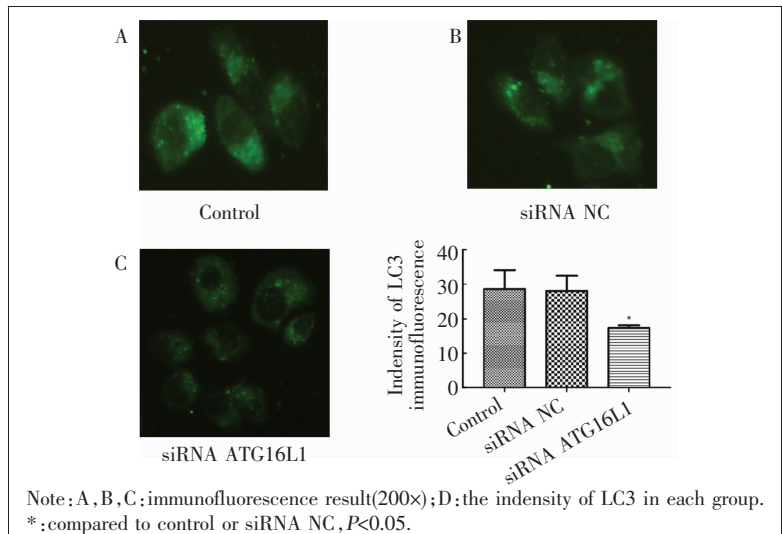


Figure 3 Autophagy levels detected by immunofluorescence assay

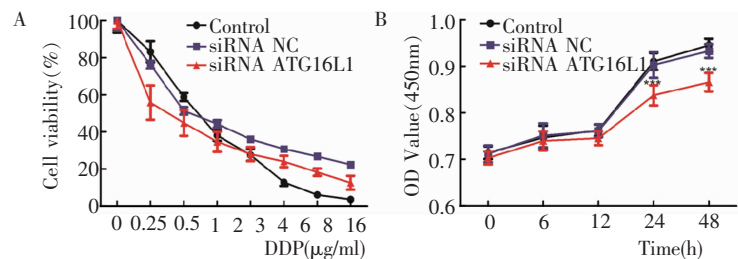


Figure 4 The viability of BGC823 after ATG16L1 knockdown

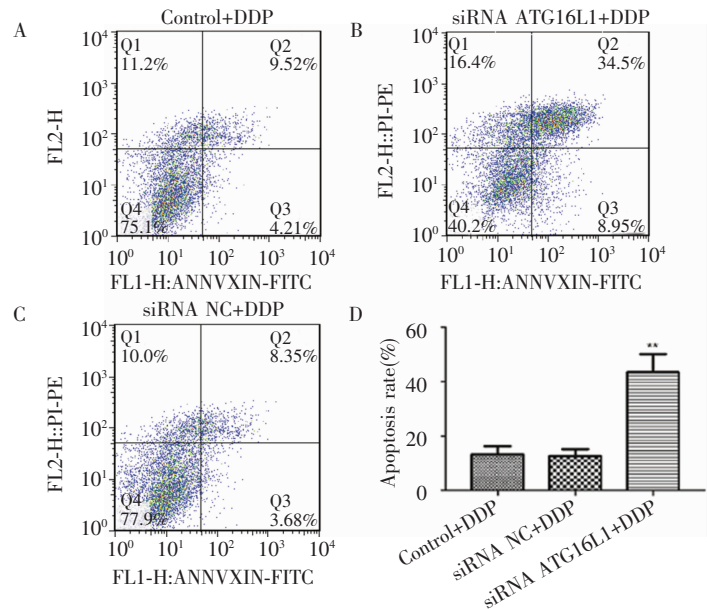
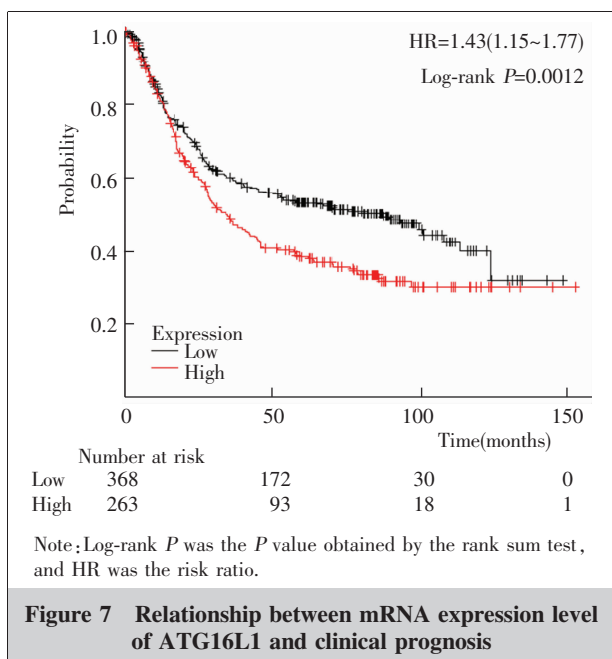
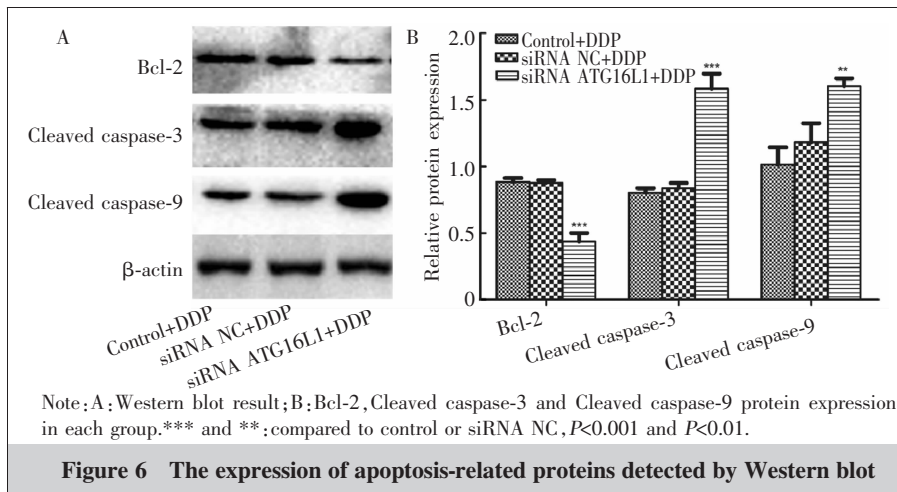


Figure 5 The cell apoptosis rate



贡献尚未有过多的探索,然而,近年的一些研究描述了 ATG16L1 在少数肿瘤中的作用。在这里,我们研究了 ATG16L1 在胃癌 BGC823 细胞系中的部分作用。

在我们的研究中,我们将胃癌细胞中 ATG16L1 敲低后,检测自噬相关蛋白的表达,结果显示 P62 蛋白表达明显升高,LC3 II/I 比值明显下降,且免疫荧光提示 LC3 的荧光强度也降低,表明干扰 ATG16L1 后,胃癌细胞的自噬过程受到抑制。据报道 ATG5、Beclin-1 在调控自噬和凋亡两种程序性细胞死亡过程中发挥关键作用<sup>[20-21]</sup>,那么作为自噬过程中重要复合物 ATG5-ATG12-ATG16L1 中一员的 ATG16L1 又是否参与细胞凋亡过程?因此,我们检测了 ATG16L1 敲减后细胞的增殖能力,结果提示干

扰 ATG16L1 后,细胞的增殖能力在一段时间后较干扰前明显下降。然后用流式细胞技术检测干扰联合顺铂诱导后胃癌细胞凋亡能力,研究发现细胞凋亡能力显著提高,这些结果表明 ATG16L1 可促进顺铂诱导的细胞凋亡。同时,本研究用 Western blot 检测也发现凋亡相关蛋白的表达发生了较大的变化,其中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显下调,促

凋亡蛋白 Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9 表达明显升高,提示 ATG16L1 表达下调后在细胞凋亡过程中可能通过抑制自噬,提高 Caspase 蛋白家族成员的活化能力,并抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 来协同发挥促细胞凋亡作用。以上结果进一步提示 ATG16L1 与细胞凋亡关系密切,发挥了在细胞自噬过程中诱导细胞凋亡的功能,即 ATG16L1 可被认为是导致程序性细胞死亡机制中细胞自噬触发凋亡的重要分子开关蛋白,为研究 ATG16L1 调控细胞自噬与细胞凋亡这两种程序性细胞死亡的具体分子机制奠定了基础。许多研究已表明自噬在肿瘤化疗中发挥着至关重要的作用,可提高或降低化疗疗效<sup>[22-23]</sup>。本实验中 ATG16L1 表达下调后顺铂诱导的胃癌细胞凋亡增加,说明干扰 ATG16L1 后胃癌细胞对顺铂的敏感性增加,提示靶向调控 ATG16L1 表达调节自噬可影响肿瘤化疗疗效。由此,在胃癌的临床治疗中可针对个体 ATG16L1 表达情况,进行基因靶向治疗联合化疗,为肿瘤的系统化治疗提供新思路。自噬相关基因中 P62、LC3、Beclin 等与肿瘤的临床预后密切相关<sup>[24-26]</sup>。我们用公共数据库 Kaplan-Meier plotter 表达谱芯片对多组胃癌患者 mRNA 表达谱进行分析,结果显示高表达 ATG16L1 组较低表达组预后差,这表明 ATG16L1 的表达可能是胃癌临床治疗的一种预后标志物。

综上所述,自噬活动异常与胃癌治疗和预后密切相关,其中 ATG16L1 起到重要作用。本研究表明 ATG16L1 在临床上治疗胃癌时,联合应用化疗药物有助于提高胃癌细胞的药物敏感性,从而达到相对理想的化疗效果。另外,其表达水平高低与胃癌患者

预后密切相关,对预测患者预后有一定的参考价值,很有希望成为胃癌治疗的新靶点。

## 参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394–424.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115–132.
- [3] Fu H, Yang H, Zhang X, et al. Exosomal TRIM3 is a novel marker and therapy target for gastric cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1):162.
- [4] Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature[J]. *J Nephrol*, 2017, 31(1):15–25.
- [5] Zhang Y, Duan LB, Song C, et al. Effect of Sox2 on chemoresistance of bladder cancer cells and its molecular mechanism[J]. *China Cancer*, 2018, 27(5):387–392. [张义, 段良斌, 宋超, 等. Sox2 对膀胱癌细胞化疗耐药的影响及其分子机制的探讨[J]. *中国肿瘤*, 2018, 27(5):387–392.]
- [6] Kunanopparat A, Kimkong I, Palaga T, et al. Increased ATG5-ATG12 in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and their role in apoptosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(37):8361–8374.
- [7] Wu DJ, Adamopoulos IE. Autophagy and autoimmunity[J]. *Clin Immunol*, 2017, 176:55–62.
- [8] Ye X, Zhou XJ, Zhang H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2334.
- [9] Bajagic M, Archana A, Büsing P, et al. Structure of the WD40-domain of human ATG16L1[J]. *Protein Sci*, 2017, 26(9):1828–1837.
- [10] Zhang C, Shen H, Lu Y, et al. MiR-142-3p regulates autophagy by targeting ATG16L1 in thymic-derived regulatory T cell (tTreg)[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3):290.
- [11] Tschurtschenthaler M, Adolph TE, Ashcroft JW, et al. Defective ATG16L1-mediated removal of IRE1 $\alpha$  drives crohn's disease-like ileitis[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(2):401–422.
- [12] Wang L, Huang J, Pang S, et al. Genetic analysis of the ATG16L1 gene promoter in sporadic parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 646:30–35.
- [13] Li X, Chen M, Zhang X, et al. Single nucleotide polymorphisms of autophagy-related 16-like 1 gene are associated with ankylosing spondylitis in females: a case-control study[J]. *Int J Rheum Dis*, 2017, 21(1):322–329.
- [14] Tang JY, Hsi E, Huang YC, et al. Overexpression of autophagy-related 16-like 1 in patients with oral squamous cell carcinoma[J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(2):301–305.
- [15] Chen R, Li X, He B, et al. MicroRNA-410 regulates autophagy-related gene ATG16L1 expression and enhances chemosensitivity via autophagy inhibition in osteosarcoma[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3):1326–1334.
- [16] Li Q, Zhou X, Huang T, et al. The Thr300Ala variant of ATG16L1 is associated with decreased risk of brain metastasis in patients with non-small cell lung cancer[J]. *Autophagy*, 2017, 13(6):1053–1063.
- [17] Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 123(3):725–731.
- [18] Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(8):52.
- [19] Zhang H, Wu F, Wang X, et al. The two C. elegans ATG-16 homologs have partially redundant functions in the basal autophagy pathway[J]. *Autophagy*, 2013, 9(12):1965–1974.
- [20] Xie K, Li MJ, Jiang CY, et al. Advances in autophagy-related protein ATG5 regulation of autophagy and apoptosis[J]. *National Medical Journal of China*, 2018, 98(11):875–877. [谢昆, 李密杰, 蒋成砚, 等. 自噬相关蛋白 ATG5 调控细胞自噬和凋亡的研究进展 [J]. *中华医学杂志*, 2018, 98(11):875–877.]
- [21] Wan B, Zang Y, Wang L. Overexpression of Beclin1 inhibits proliferation and promotes apoptosis of human laryngeal squamous carcinoma cell Hep-2[J]. *Oncol Targets Ther*, 2018, 11:3827–3833.
- [22] Guo XL, Hu F, Wang H, et al. Inhibition of autophagy in hepatocarcinoma cells promotes chemotherapeutic agent-induced apoptosis during nutrient deprivation [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2):773–783.
- [23] Yu X, Lin H, Wang Y, et al. D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer[J]. *Oncol Targets Ther*, 2018, 11:1833–1847.
- [24] Lu Y, Wang Q, Zhou Y, et al. Overexpression of p62 is associated with poor prognosis and aggressive phenotypes in osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6):9889–9895.
- [25] Schläfli AM, Adams O, Galván JA, et al. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26):39544–39555.
- [26] Huang X, Wang C, Sun J, et al. Clinical value of CagA, c-Met, PI3K and Beclin-1 expressed in gastric cancer and their association with prognosis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(1):947–955.