

自噬相关蛋白5在结肠癌中的表达及对结肠癌细胞迁移及侵袭能力的影响

刘爱静¹, 李雁儒¹, 高惠茹¹, 段伟丽¹, 李培龙¹, 李娟¹, 杜鲁涛², 王传新¹

(1.山东大学第二医院检验医学中心, 山东 济南 250033; 2.山东大学齐鲁医院检验医学中心, 山东 济南 250012)

摘要:目的 评估自噬相关蛋白5 (autophagy-related protein 5, ATG5) 在结肠癌中的表达及其与临床病理特征的关系, 分析 ATG5 对结肠癌细胞迁移及侵袭能力的影响。方法 运用在线分析工具 cProsite 分析 ATG5 mRNA 以及 ATG5 蛋白在结肠癌组织及癌旁正常组织中的表达水平。使用 Kaplan-Meier Plotter 分析 ATG5 表达水平对结肠癌患者预后的影响。免疫组织化学法检测 100 例结肠癌组织中 ATG5 表达, χ^2 和 Fisher's 检验分析 ATG5 表达水平与临床病理特征的相关性。转染质粒或干扰过表达或敲低 ATG5 后, Western blotting 检测转染效率及自噬相关标记物微管相关蛋白轻链3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 的变化, Transwell 实验评估过表达或敲低 ATG5 后结肠癌细胞的迁移及侵袭能力。使用 LinkedOmics 数据库分析结肠癌中与 ATG5 相关的差异表达基因, 并进行基因本体 (gene ontology, GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析。结果 结肠癌组织中 ATG5 mRNA 及蛋白的表达水平均低于癌旁正常组织 ($P < 0.001$)。低表达 ATG5 的结肠癌患者无复发生存期明显短于高表达 ATG5 的结肠癌患者 ($P < 0.001$)。免疫组化结果表明, 结肠癌组织中 ATG5 的表达水平与淋巴结转移相关, 低表达 ATG5 的结肠癌患者更容易发生淋巴结转移 ($P = 0.027$)。Western blotting 及 Transwell 实验显示在 SW1116 细胞中过表达 ATG5 后, LC3 II/LC3 I 增加, 细胞的迁移侵袭能力减弱 ($P_{ATG5} = 0.001$; $P_{LC3 II/LC3 I} = 0.04$; $P_{迁移} < 0.001$, $P_{侵袭} < 0.001$); 反之, 在 DLD1 细胞中敲低 ATG5 后, LC3 II/LC3 I 降低, 细胞的迁移侵袭能力增加 ($P_{ATG5\#1} = 0.021$, $P_{ATG5\#2} < 0.001$; $P_{LC3 II/LC3 I \#1} = 0.013$, $P_{LC3 II/LC3 I \#2} = 0.02$; $P_{迁移} < 0.001$, $P_{侵袭} < 0.001$)。ATG5 相关的差异表达基因富集分析结果显示, 结肠癌中 ATG5 可能通过影响 DNA 损伤反应、染色质重排及 Notch 信号通路等途径影响结肠癌的转移。结论 ATG5 在结肠癌中低表达, 并与患者淋巴结转移及预后显著相关, 结肠癌细胞中 ATG5 能够增加细胞自噬水平并抑制细胞侵袭转移, 提示 ATG5 及其调控的自噬过程可能成为结肠癌临床治疗的新靶点。

关键词: 自噬相关蛋白5; 转移; 自噬; 结肠癌; 微管相关蛋白轻链3

中图分类号: R735.3

文献标志码: A

Expression of autophagy-related protein 5 in colon cancer and its impact on the migration and invasion ability of colon cancer cells

LIU Aijing¹, LI Yanru¹, GAO Huiru¹, DUAN Weili¹, LI Peilong¹, LI Juan¹, DU Lutao², WANG Chuanxin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

Abstract: Objective To evaluate the expression of autophagy-related protein 5 (ATG5) in colon cancer and its relationship with clinicopathological features, and to analyze the effect of ATG5 on the migration and invasion ability of colon cancer cells. **Methods** The expression levels of ATG5 mRNA and ATG5 protein in colon cancer tissues and adjacent normal tissues were analyzed using the online analysis tool cProsite. Kaplan-Meier Plotter was used to analyze the effect of ATG5 expression level on the prognosis of colon cancer patients. The expression of ATG5 in 100 colon

cancer tissues was detected by immunohistochemistry, and the correlation between the expression level of ATG5 and clinicopathological features was analyzed by χ^2 and Fisher's test. ATG5 was overexpressed or knocked down in colon cancer cells by transfecting plasmid or small interfering RNA (siRNA), and then the transfection efficiency and changes of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) were detected by Western blotting. Transwell assay was used to evaluate migration and invasion ability of colon cancer cells after overexpression or knockdown. Differentially expressed genes associated with ATG5 in colon cancer were analyzed using the LinkedOmics database, and gene ontology (GO) and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses were performed. **Results** The expression levels of ATG5 mRNA and protein in colon cancer tissues were lower than those in adjacent normal tissues ($P < 0.001$). The recurrence-free survival of colon cancer patients with low ATG5 expression was significantly shorter than those with high ATG5 expression ($P < 0.001$). Immunohistochemistry showed that the expression level of ATG5 in colon cancer tissues was correlated with lymph node metastasis, and low expression of ATG5 in colon cancer patients was more likely to develop lymph node metastasis ($P = 0.027$). Western blotting and Transwell experiments showed that after overexpression of ATG5 in SW1116 cells, the expression of LC3 II/LC3 I increased, and the migration and invasion ability of cells was weakened ($P_{ATG5} = 0.001$; $P_{LC3\ II/LC3\ I} = 0.04$; $P_{migration} < 0.001$, $P_{invasion} < 0.001$). Conversely, ATG5 knockdown in DLD1 cells led to a decrease in the expression of LC3 II/LC3 I, and an increase in the migration and invasion ability of the cells ($P_{ATG5\#1} = 0.021$, $P_{ATG5\#2} < 0.001$; $P_{LC3\ II/LC3\ I\#1} = 0.013$, $P_{LC3\ II/LC3\ I\#2} = 0.02$; $P_{migration} < 0.001$, $P_{invasion} < 0.001$). ATG5-related differentially expressed gene enrichment analysis suggested that ATG5 might affect colon cancer metastasis by affecting DNA damage response, chromatin organization and Notch signaling pathway. **Conclusion**

ATG5 is lowly expressed in colon cancer and is significantly correlated with lymph node metastasis and prognosis of patients. ATG5 in colon cancer cells can increase the level of autophagy and inhibit cell migration and invasion, suggesting that ATG5 and its regulated autophagy process may become a new target for the clinical treatment of colon cancer.

Key words: Autophagy-related protein 5; Tumor metastasis; Autophagy; Colon cancer; Microtubule-associated protein light chain 3

结肠癌是最常见的一种消化系统恶性肿瘤,其发生与遗传、年龄、生活习惯等多种因素紧密相关^[1]。临床上,结肠癌的早期症状不明显,大部分患者在发现时已进入晚期,并常伴有转移,临床治疗效果不尽人意,亟需寻找新的治疗靶标^[2-3]。自噬是真核细胞内一种高度保守的生物学过程,利用溶酶体降解衰老损伤的蛋白质及细胞器,从而维持细胞内环境稳态^[4]。已有研究证明自噬能够参与结肠癌的发生发展,且在结肠癌的治疗及预后的过程中发挥着十分重要的作用^[5-7]。自噬过程受到约20种核心自噬相关蛋白(autophagy-related protein, ATG)的调控,其中自噬相关蛋白5(autophagy-related protein, ATG5)作为关键调控因子之一,可以与自噬相关蛋白12和自噬相关蛋白16结合形成蛋白复合物,不仅能够直接促进自噬体膜的形成,还能通过介导微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)从LC3 I转化为LC3 II,进一步促进自噬体膜的形成^[8-10],ATG5的异常表达可导致自噬通路异常。目前研究已经揭示了ATG5在多种肿瘤如胶质母细胞瘤^[11]、胰腺癌^[12]、甲状腺癌^[13]中的关键作用,但对于ATG5在结肠癌中的表达水平和具体作用仍缺乏深入的了解。因此,本研究旨在探讨ATG5在结肠癌中的表达及其对结肠癌

细胞恶性生物学行为的影响,并预测其潜在的下流靶点及通路,为临床治疗结肠癌提供新思路。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 公共数据

通过在线分析工具 cProsite (<https://cprosite.ccr.cancer.gov/>) 获得了肿瘤基因组图谱(the cancer genome atlas, TCGA) 数据库中 ATG5 mRNA 在结肠癌组织和癌旁正常组织中的表达数据,以及美国国家癌症研究所的临床蛋白质组肿瘤分析联盟(clinical proteomic tumor analysis consortium, CPTAC) 数据库中 ATG5 蛋白在结肠癌组织与癌旁正常组织中的表达数据。使用在线分析工具 Kaplan-Meier Plotter 分析 ATG5 表达水平对结肠癌患者预后的影响。使用 LinkedOmics 数据库分析 CPTAC 数据库结肠腺癌(colon adenocarcinoma, COAD) 队列中与 ATG5 相关的差异表达基因。

1.1.2 组织芯片

购自上海芯超生物科技有限公司,共包含100例结肠癌组织样本,所有样本均经病理组织学确诊并分型。本研究得到上海芯超生物科技有限公司伦

理委员会的批准(SHYJS-CP-1704001)。

1.1.3 主要仪器与试剂

化学发光凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司,倒置荧光显微镜购自德国 Carl Zeiss 公司;DMEM 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 公司,Transwell 小室购自美国 Corning 公司,基质胶购自美国 BD 公司,Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司,ATG5 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,GAPDH、LC3 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,姬姆萨染色液购自北京索莱宝科技有限公司,免疫组化试剂盒购自丹麦 DAKO 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化

组织芯片经烘片脱蜡后,放入预热的抗原修复液中,修复完毕后放入室温的蒸馏水中使其自然冷却。组织芯片清洗后加入一抗,4℃冰箱孵育过夜,次日加入二抗室温孵育 45 min,加入二氨基联苯胺显色,苏木素复染 1 min,封片。按照总评分(染色强度及染色阳性率的乘积)对免疫组化结果进行判读,中位数 1.35 为分界值,总评分<1.35 为低表达组,≥1.35 为高表达组。染色强度淡黄色计为 1 分,棕黄色计为 2 分,棕褐色计为 3 分;染色阳性率是选取 3 个染色强度不同的视野,每个视野随机选取 100 个细胞,计 100 个细胞中阳性细胞所占的百分比,最终阳性率为 3 个视野阳性率的平均值。

1.2.2 细胞培养及转染

人结肠癌细胞系 DLD1、HCT116、SW1116、HT-29、Lovo、SW620、SW480 均来源于中国科学院上海生命科学研究院。以上细胞使用 DMEM 培养基(10% FBS)培养,并置于 37℃、5% CO₂ 条件下的培养箱中。选取对数生长期的 SW1116 和 DLD1 细胞进行转染。其中,SW1116 细胞转染 ATG5 过表达质粒及其对照质粒,DLD1 细胞转染 ATG5 干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA),包括 siATG5#1、siATG5#2 及对照 siRNA。转染过程按照 Lipofectamine 3000 转染试剂的说明书进行操作,使用无血清培养基分别稀释转染试剂、siRNA 或质粒,并在室温下放置 5 min,稀释完成后按照 1:1 的比例分别将转染试剂与 siRNA 或质粒混合,并在室温下放置 15~20 min 后加入细胞,孵育 6 h 后更换为完全培养基,继续培养 48~72 h 后收集细胞沉淀。

1.2.3 Transwell 实验检测结肠癌细胞迁移及侵袭能力

使用无血清培养基将转染后的 DLD1 和

SW1116 细胞重悬,以每孔 5×10^4 个细胞的密度把细胞分别均匀接种于 Transwell 小室和铺了基质胶的 Transwell 小室中。下室中加入 600 μL 完全培养基,将小室置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h。随后,取出小室,使用甲醇固定 30 min,接着使用姬姆萨染液着色 30 min,使用棉签轻轻擦除上室细胞,最后使用显微镜拍照计数下室细胞数量。

1.2.4 蛋白质提取以及 Western blotting 检测目的蛋白表达水平

胰酶消化后,将待提取细胞收集于 1.5 mL 离心管中,离心弃掉上清液,获得细胞沉淀。根据细胞数量向细胞沉淀中加入含有蛋白酶抑制剂 Cocktail 的 RIPA 裂解液,4℃摇床裂解 30 min。随后,使用 12 000 r/min 的转速离心 30 min,吸取上清液至一个新的 1.5 mL 离心管中。将 Loading buffer 加入上清液中,充分混匀后,将离心管置于 95℃的金属浴中加热 10 min。配置 12% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶,将蛋白样品加入到凝胶中进行电泳分离。随后,将分离的蛋白样转移到聚乙烯醇膜上,使用脱脂奶粉室温封闭 1 h。接着,分别加入 ATG5 抗体(1:1 000)、LC3 抗体(1:1 000)和 GAPDH 抗体(1:1 000),在 4℃条件下过夜孵育。第 2 天,加入辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。最后,使用化学发光液进行显色。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件。对于数值变量,使用 Shapiro-Wilk(SW 检验)评估数据的正态分布特性,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用独立样本 *t* 检验,多组且方差齐的数据之间的比较采用单因素方差分析(*F* 检验);不符合正态分布的数据以中位数(四分位数间距)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示,两组间差异比较采用 Mann-Whitney *U* 检验。对于分类变量,理论频数 ≥ 5 时采用 χ^2 检验,1 ≤ 理论频数 < 5 时采用连续校正 χ^2 检验,理论频数 < 1 时采用 Fisher's 精确检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义(双尾)。

2 结果

2.1 ATG5 在结肠癌组织中低表达

TCGA 数据分析结果显示,ATG5 mRNA 在结肠癌中[989.1(8 578, 1 138)]的表达水平要显著低于癌旁正常组织[1 171(1 064, 1 282)],差异具有统

计学意义 ($U=2\,904, P<0.001$, 图 1A), Kaplan-Meier Plotter 分析结果显示低表达 ATG5 的结肠癌患者其无复发生存期明显低于高表达 ATG5 的患者, 差异具有统计学意义 ($P<0.001$, 图 1B)。进一步 CPTAC

数据分析发现, ATG5 蛋白在结肠癌组织中 $[-0.04(-0.209, 0.102\,2)]$ 的表达水平也显著低于癌旁正常组织 $[0.127(0.043, 0.207)]$, 差异具有统计学意义 ($U=2\,566, P<0.001$, 图 1C)。

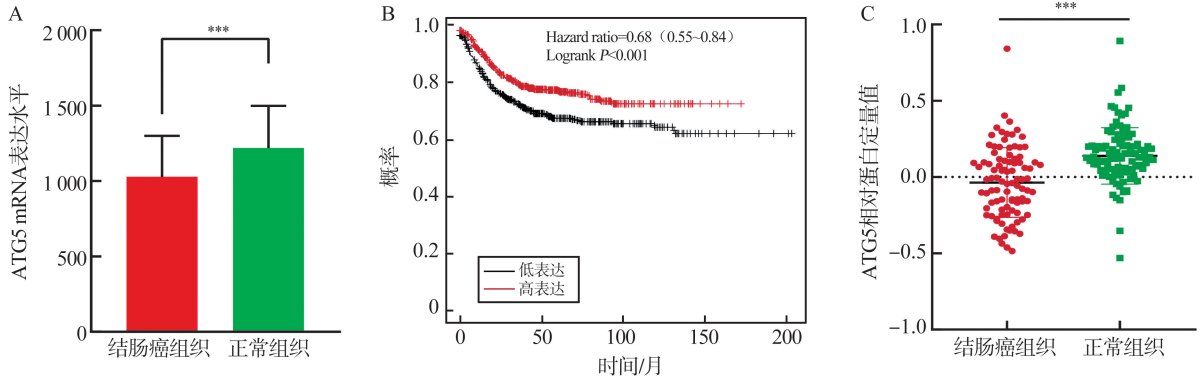


图 1 ATG5 在结肠癌组织中低表达
A: ATG5 mRNA 在结肠癌组织及癌旁正常组织中的表达; B: Kaplan-Meier Plotter 分析 ATG5 表达水平对结肠癌无复发生存期的影响; C: ATG5 蛋白在结肠癌组织及癌旁正常组织中的表达 (** $P<0.001$)。

Figure 1 Low expression of ATG5 in colon cancer tissues

A: Expression of ATG5 mRNA in colon cancer tissues and adjacent normal tissues; B: Kaplan-Meier Plotter analyzed the effect of ATG5 expression level on recurrence-free survival of colon cancer; C: Expression of ATG5 protein in colon cancer tissues and adjacent normal tissues (** $P<0.001$).

2.2 ATG5 表达水平与结肠癌患者淋巴结转移相关

免疫组化染色结果表明, 结肠癌组织中 ATG5 表达水平与结肠癌患者 TNM 分期、淋巴结转移、微卫星不稳定显著相关 (P 均 <0.05 , 表 1), 而与患者的性别、年龄和病理分级等因素无关。发生淋

巴结转移的结肠癌患者 ATG5 蛋白表达水平 $[1.1(0.6, 1.7)]$ 显著低于无淋巴结转移的结肠癌患者 $[1.413(1.106, 1.8)]$, 差异具有统计学意义 ($U=784.5, P=0.027$, 图 2A 和图 2B)。

表 1 ATG5 蛋白表达情况与患者临床病理特征的关系

Table 1 Relationship between ATG5 protein expression and clinicopathological features of patients

临床病理特征	低表达	高表达	总和	χ^2	P
年龄/岁(中位数 62.5)				0.094	0.759
<62.5	21	23	44		
≥ 62.5	25	31	56		
性别				0.017	0.897
男	27	31	58		
女	19	23	42		
T 分类				1.607	0.205
T1/T2	3	0	3		
T3/T4	42	50	92		
N 分类				5.212	0.022
N0	22	36	58		
N1/N2/N3	24	15	39		
M 分类				—	0.46
M0	45	54	99		
M1	1	0	1		
TNM 分期				5.329	0.021
I/II	21	35	56		
III/IV	24	15	39		
肿瘤病理分级				0.063	0.802
I/II	41	51	92		
III/IV	4	3	7		
微卫星不稳定				3.848	0.049
微卫星稳定	35	32	57		
高频微卫星不稳定	10	22	32		

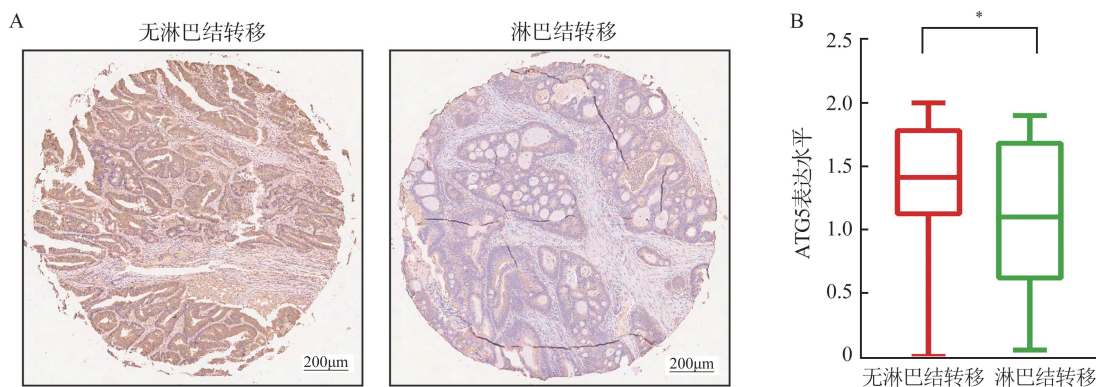


图2 ATG5表达水平与结肠癌患者淋巴结转移相关

A: 免疫组化分别检测 ATG5 在有淋巴结转移和没有淋巴结转移的结肠癌组织中的表达情况; B: ATG5 免疫组化结果箱线图 (* $P < 0.05$)。

Figure 2 Expression level of ATG5 was associated with lymph node metastasis in patients with colon cancer

A: The expression of ATG5 in colon cancer tissues with and without lymph node metastasis detected by immunohistochemistry; B: Box plot of ATG5 immunohistochemistry results (* $P < 0.05$).

2.3 ATG5 在结肠癌细胞中的表达水平

由图 3 可见, 结肠癌细胞 DLD1、HCT116、SW1116、HT-29、Lovo、SW620、SW480 中 ATG5 蛋白的表达水平, 其相对蛋白表达量分别为: 1.049 ± 0.014 、 0.867 ± 0.032 、 0.613 ± 0.003 、 0.845 ± 0.039 、 0.854 ± 0.021 、 0.741 ± 0.031 、 0.788 ± 0.018 , 符合正态分布。7 种细胞中, ATG5 的相对蛋白表达水平均值间差异有统计学意义 ($F = 352$, $P < 0.001$), 其中

DLD1 细胞的表达水平显著高于其他 6 种细胞系 ($P_{\text{HCT116}} = 0.011$, $P_{\text{SW1116}} < 0.001$, $P_{\text{HT29}} = 0.019$, $P_{\text{Lovo}} = 0.001$, $P_{\text{SW620}} = 0.003$, $P_{\text{SW480}} < 0.001$), SW1116 细胞的表达水平显著低于其他 6 种细胞系 ($P_{\text{DLD1}} < 0.001$, $P_{\text{HCT116}} = 0.013$, $P_{\text{HT29}} = 0.024$, $P_{\text{Lovo}} = 0.006$, $P_{\text{SW620}} = 0.0488$, $P_{\text{SW480}} = 0.008$), 因此本研究选择 DLD1 和 SW1116 细胞进行后续敲低或过表达 ATG5 的相关实验。

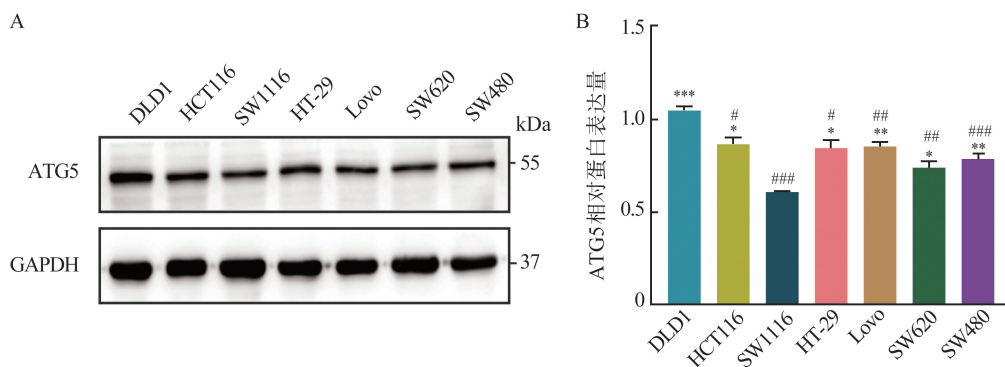


图3 ATG5在结肠癌细胞中的表达水平

A: Western blotting 检测 7 种结肠癌细胞中 ATG5 的表达; B: ATG5 相对表达量柱状图 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs SW1116; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs DLD1)。

Figure 3 Expression level of ATG5 in colon cancer cells

A: The expression of ATG5 in 7 colon cancer cells detected by Western blotting; B: Bar chart of relative expression level of ATG5 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs SW1116; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs DLD1)。

2.4 过表达 ATG5 增强结肠癌细胞的自噬水平并抑制其迁移及侵袭能力

在结肠癌细胞 SW1116 中分别转染 ATG5 过表达质粒以及对照质粒, Western blotting 结果显示, 与对照相比, 转染 ATG5 过表达质粒的细胞中, ATG5 表达水平增加 1.894 ± 0.196 倍, 同时自噬正相关标志物 LC3 II/LC3 I 增加 1.2 ± 0.115

倍, 差异具有统计学意义 ($t_{\text{ATG5}} = 7.889$, $P_{\text{ATG5}} = 0.001$; $t_{\text{LC3 II/LC3 I}} = 3.011$, $P_{\text{LC3 II/LC3 I}} = 0.04$; 图 4A 和图 4B)。Transwell 实验结果显示, 相较于对照, 转染 ATG5 过表达质粒的细胞迁移数降低 0.522 ± 0.026 倍, 细胞侵袭数降低 0.476 ± 0.059 倍, 差异具有统计学意义 ($t_{\text{迁移}} = 32.11$, $t_{\text{侵袭}} = 15.26$, P 均 < 0.001 , 图 4C-4F)。

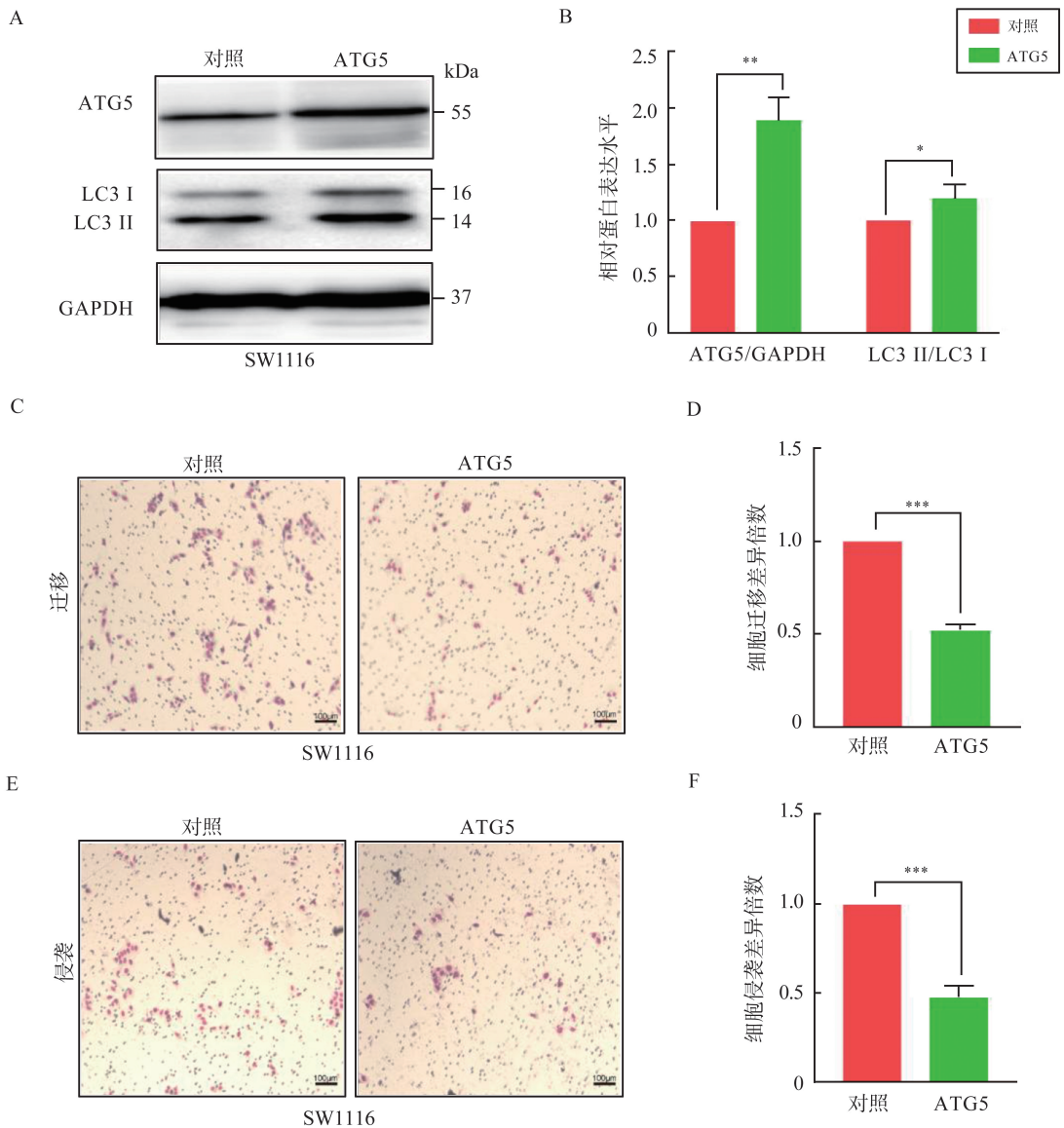


图4 过表达ATG5增强结肠癌细胞的自噬水平并抑制其迁移及侵袭能力

A: Western blotting验证ATG5质粒在SW1116细胞中的转染效率,同时检测ATG5过表达后LC3 II/LC3 I的变化; B: ATG5以及LC3 II/LC3 I相对表达量柱状图(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); C: Transwell实验检测ATG5过表达后SW1116细胞迁移能力的变化; D: 相对细胞迁移数目的柱状图(** $P < 0.001$); E: Transwell实验检测ATG5过表达后SW1116细胞侵袭能力的变化; F: 相对细胞侵袭数目的柱状图(** $P < 0.001$)。

Figure 4 Overexpression of ATG5 enhanced the autophagy level of colon cancer cells and inhibited their ability of migration and invasion

A: Western blotting analysis was performed to detect the transfection efficiency of ATG5 plasmid in SW1116 cells and the changes of LC3 II/LC3 I after ATG5 overexpression; B: The relative expression levels of ATG5 and LC3 II/LC3 I were presented in a bar chart (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); C: Transwell assay was used to detect the migration ability of SW1116 cells after ATG5 overexpression; D: The number of relative migratory cells was shown in a bar chart (** $P < 0.001$); E: Transwell assay was used to detect the invasion ability of SW1116 cells after ATG5 overexpression; F: The number of relative invasive cells was shown in a bar chart (** $P < 0.001$).

2.5 敲减ATG5抑制结肠癌细胞的自噬并增强其迁移及侵袭能力

在结肠癌细胞DLD1中转染了两条不同序列的siRNA来降低ATG5的表达,Western blotting结果显示,与对照相比,转染siATG5#1及siATG5#2的细胞中,ATG5表达水平分别降低 0.684 ± 0.148 倍和

0.772 ± 0.029 倍,同时自噬正相关标志物LC3 II/LC3 I分别下调 0.562 ± 0.179 倍和 0.458 ± 0.249 倍,差异具有统计学意义($t_{ATG5\#1} = 3.709$, $t_{ATG5\#2} = 13.79$, $P_{ATG5\#1} = 0.021$, $P_{ATG5\#2} < 0.001$; $t_{LC3\ II/LC3\ I\ \#1} = 4.245$, $t_{LC3\ II/LC3\ I\ \#2} = 3.766$, $P_{LC3\ II/LC3\ I\ \#1} = 0.013$, $P_{LC3\ II/LC3\ I\ \#2} = 0.02$;图5A和图5B)。Transwell实验结果显示,相

较于对照,转染 siATG5#1 和 siATG5#2 的细胞迁移数分别增加 1.874 ± 0.073 倍和 1.662 ± 0.05 倍,细胞侵袭数分别增加 2.232 ± 0.08 倍和 2.071 ± 0.08 倍,差

异具有统计学意义 ($t_{\text{迁移}\#1} = 20.28, t_{\text{迁移}\#2} = 22.92, P_{\text{迁移}} \text{均} < 0.001; t_{\text{侵袭}\#1} = 26.64, t_{\text{侵袭}\#2} = 23.14, P_{\text{侵袭}} \text{均} < 0.001$; 图 5C-5F)。

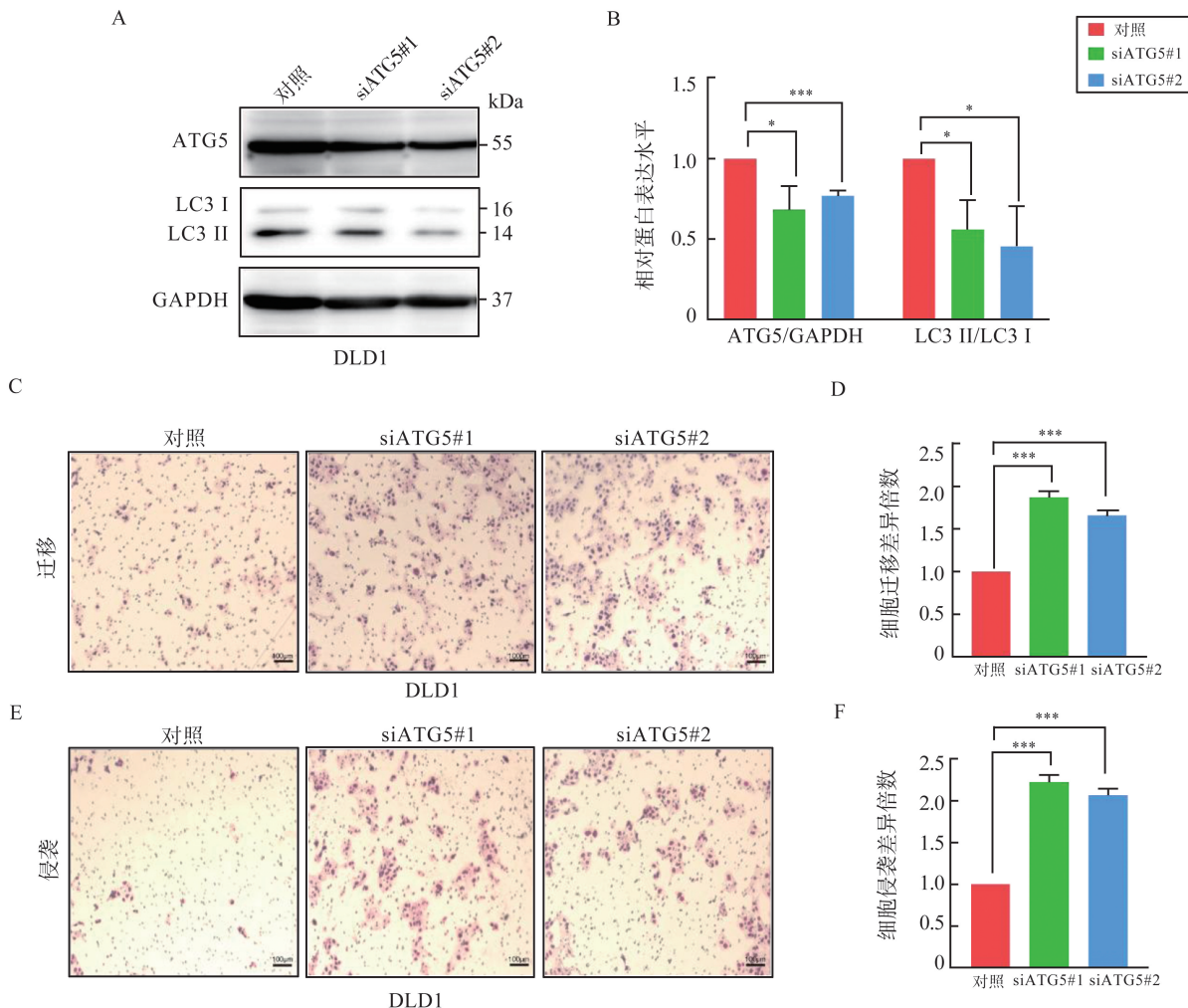


图 5 敲减 ATG5 抑制结肠癌细胞的自噬并增强其迁移及侵袭能力

A: Western blotting 验证 ATG5 siRNA 在 DLD1 细胞中的转染效率,同时检测 ATG5 敲减后 LC3 II/LC3 I 的变化; B: ATG5 以及 LC3 II/LC3 I 相对表达量柱状图 ($*P < 0.05, ***P < 0.001$); C: Transwell 实验检测 ATG5 敲减后 DLD1 细胞迁移能力的变化; D: 相对细胞迁移数目的柱状图 ($***P < 0.001$); E: Transwell 实验检测 ATG5 敲减后 DLD1 细胞侵袭能力的变化; F: 相对细胞侵袭数目的柱状图 ($***P < 0.001$)。

Figure 5 Knocking down ATG5 inhibited autophagy of colon cancer cells and enhanced their ability of migration and invasion

A: Western blotting analysis was performed to detect the transfection efficiency of ATG5 siRNA in DLD1 cells and the changes of LC3 II/LC3 I after ATG5 knockdown; B: The relative expression levels of ATG5 and LC3 II/LC3 I were presented in a bar chart ($*P < 0.05, ***P < 0.001$); C: Transwell assay was used to detect the migration ability of DLD1 cells after ATG5 knockdown; D: The number of relative migratory cells was shown in a bar chart ($***P < 0.001$); E: Transwell assay was used to detect the invasion ability of DLD1 cells after ATG5 knockdown; F: The number of relative invasive cells was shown in a bar chart ($***P < 0.001$).

2.6 结肠癌中 ATG5 共表达基因及其功能富集分析

本研究使用 LinkedOmics 数据库分析了 CPTAC-COAD 队列中与 ATG5 相关的差异表达基因,共发现 17 076 个与 ATG5 相关的差异表达基因,其中负相关基因 10 626 个,正相关基因 6 450 个 ($-1 \leq r \leq 1, P < 0.05$, 图 6A),热图显示的是在结肠癌中与 ATG5 呈正相关(图 6B)或负相关的前 50 个基因(图 6C)。使用 Metascape 对这些基因进行基

因本体(gene ontology, GO)分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析,结果显示与 ATG5 呈正相关的前 50 个基因主要富集于核糖核蛋白复合体生物发生、泛素样蛋白酶活性、DNA 损伤反应和转录调节等过程(图 6D),与 ATG5 呈负相关的前 50 个基因主要参与转录因子活性调节、染色质编排等过程,并在 Notch 信号通路中富集(图 6E)。

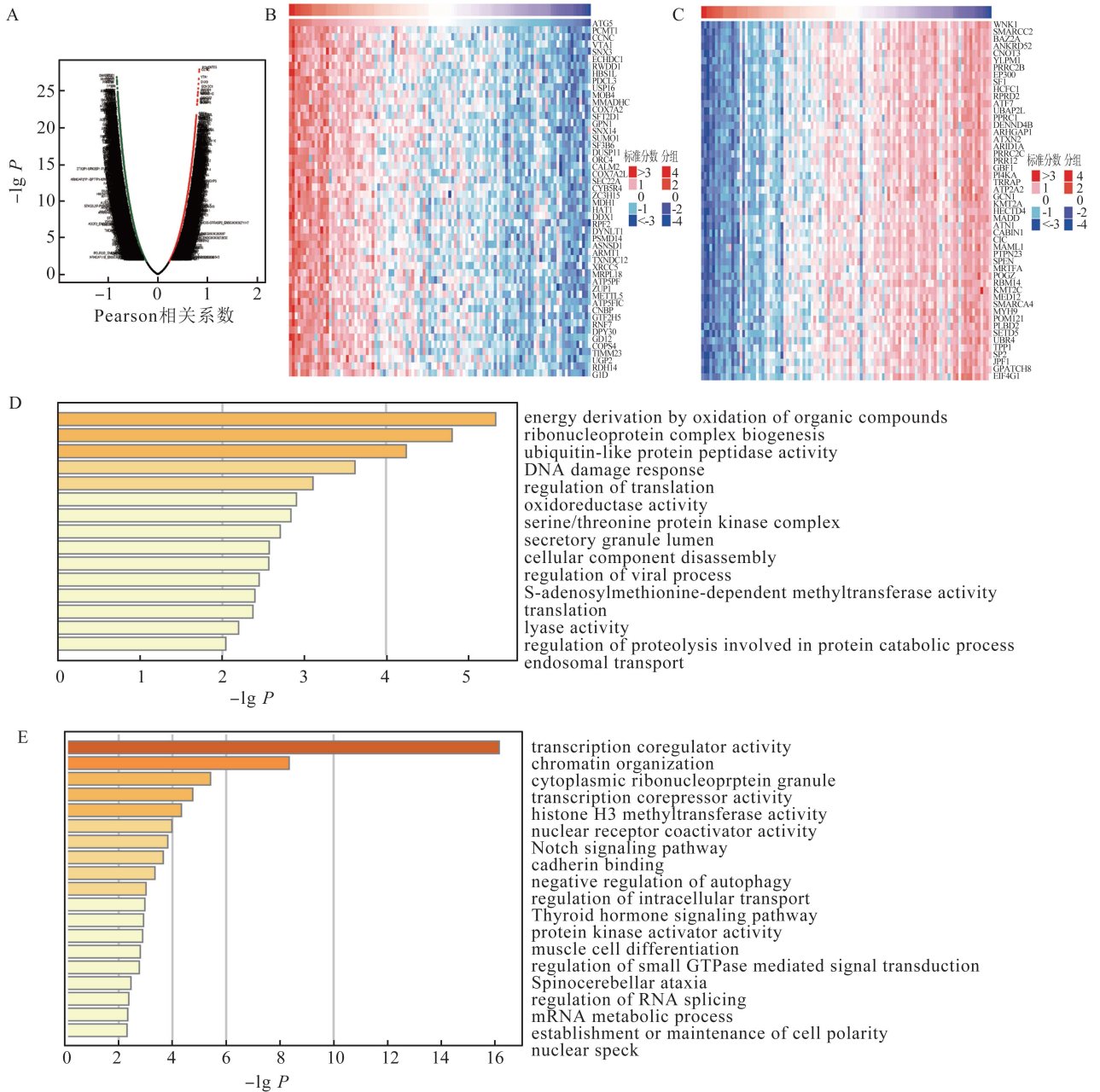


图6 结肠癌中 ATG5 共表达基因及其功能富集分析

A: 结肠癌中与 ATG5 相关的差异表达基因火山图; B: ATG5 正相关 TOP50 共表达基因热图; C: ATG5 负相关 TOP50 共表达基因热图; D: ATG5 正相关 TOP50 共表达基因的 GO/KEGG 富集分析; E: ATG5 负相关 TOP50 共表达基因的 GO/KEGG 富集分析。

Figure 6 Analysis of ATG5 co-expression genes and their functional enrichment in colon cancer

A: Volcano map of differentially expressed genes associated with ATG5 in colon cancer; B: Heat map of ATG5 positively correlated TOP50 co-expressed genes; C: Heat map of ATG5 negatively correlated TOP50 co-expressed genes; D: GO/KEGG analysis of TOP50 co-expressed genes positively correlated with ATG5; E: GO/KEGG analysis of correlated with ATG5 TOP50 co-expressed genes negatively.

3 讨论

自噬是一个高度保守的真核生物分解细胞内衰老损伤的细胞器和蛋白质的过程,该过程产生的脂肪酸、氨基酸等小分子物质可被细胞回收利用,用于提供细胞生长所需的能量及原材料进而维持细胞的

正常运作^[14]。已有研究证实自噬参与肿瘤的增殖、转移等阶段,是肿瘤治疗的潜在靶点^[15-18]。

ATG5 是自噬过程中必不可少的关键蛋白,已有文献报道 ATG5 参与了多种肿瘤的发生发展。例如,在胃癌中,ATG5 可以促进肿瘤细胞的增殖和转移^[19];在肺癌中,ATG5 能够增强肿瘤细胞对化疗药物多西他赛的敏感性^[20]。然而,关于 ATG5 在结

肠癌中的研究,国内外报道甚少。本研究首先从TCGA和CPTAC数据库中分析了ATG5 mRNA及蛋白在结肠癌组织中的表达,结果发现,与癌旁正常组织相比,ATG5在结肠癌中的表达显著下调。进一步的生存分析发现,ATG5低表达与结肠癌患者的不良预后相关,提示ATG5可能参与了结肠癌的发生发展。为进一步明确ATG5在结肠癌发生发展中的作用,本研究通过免疫组化实验检测了100例结肠癌组织中ATG5的表达,分析发现,ATG5的表达与结肠癌患者的淋巴结转移相关,低表达ATG5的患者更容易发生淋巴结转移,表明ATG5可能具有抑制结肠癌转移的作用。本研究进行了体外细胞实验以验证ATG5对结肠癌细胞转移能力的影响,将ATG5质粒以及ATG5 siRNA分别转入SW1116细胞及DLD1细胞,通过Western blotting验证ATG5的表达,同时检测自噬正相关标志物LC3 II/LC3 I的变化。此外,通过Transwell实验检测转染后结肠癌细胞迁移及侵袭能力的变化。本研究结果显示,过表达ATG5能够上调细胞自噬水平同时抑制结肠癌细胞的迁移及侵袭能力,而敲减ATG5则产生相反的效果。这证明了ATG5及其调控的自噬过程在抑制结肠癌细胞迁移和侵袭方面的关键作用,未来或许能通过调控ATG5及其自噬过程来开发新的结肠癌治疗方法。

为探索ATG5影响结肠癌转移的潜在机制,本研究使用LinkedOmics数据库筛选了CPTAC-COAD队列中与ATG5相关的差异表达基因,并进行了GO/KEGG富集分析。值得注意的是,这其中与ATG5负相关的基因富集到了Notch信号通路。Notch信号通路是一个在进化上高度保守的通路,对细胞的增殖、分化和凋亡等过程起着至关重要的作用^[21-22]。众多研究已经证实,Notch信号通路是促进结肠癌转移的重要机制,并且与自噬之间存在着紧密的联系^[23-26]。提示在结肠癌中低表达的ATG5可能通过某些机制促进Notch信号通路中相关基因的表达,进而增强结肠癌细胞的转移能力。为寻找ATG5与Notch信号通路之间的调控机制,本研究进一步分析了结肠癌中与ATG5负相关的共表达基因,发现Mastermind样转录共激活因子1(Mastermind-like transcriptional coactivator 1, MAML1)和染色质重塑复合物亚家族A成员4(SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 4, SMARCA4)均能正向调控Notch信号通路的活性。MAML1是Notch信号通路中最为关键的共激活因子,其可以与

Notch的胞内结构域相互作用,促进下游靶基因的转录^[27];而SMARCA4则已被发现在结肠癌中可以与Notch蛋白的胞内结构域结合,促进下游基因的转录,进而促进结肠癌的转移^[28]。推测MAML1与SMARCA4有可能是ATG5增强Notch信号通路,进而促进结肠癌转移的重要靶点。然而,目前这些结果只是初步探索,具体的调控机制还需要进一步的实验验证。

综上所述,结肠癌组织中ATG5呈低表达,低表达的结肠癌患者更容易发生淋巴结转移,其预后也更差。此外,体外实验证明ATG5低表达会降低结肠癌细胞的自噬水平并增强结肠癌细胞的迁移侵袭能力,具体机制有待进一步研究证实。本研究结果为临床治疗结肠癌提供了新的潜在靶点。

参考文献:

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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] 杨莹, 韩宇. 西妥昔单抗再挑战方案后线治疗晚期结直肠癌的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2024, 33(2): 147-152. YANG Ying, HAN Yu. Research progress on the rechallenge with cetuximab regimen as post-line therapy for advanced colorectal cancer[J]. *China Cancer*, 2024, 33(2): 147-152.
- [3] Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, et al. Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1732. doi: 10.3390/cancers14071732.
- [4] Gómez-Virgilio L, Silva-Lucero MD, Flores-Morelos DS, et al. Autophagy: a key regulator of homeostasis and disease; an overview of molecular mechanisms and modulators[J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2262. doi: 10.3390/cells11152262.
- [5] Luo M, Ji J, Yang K, et al. The role of autophagy in the treatment of colon cancer by chlorin e6 photodynamic therapy combined with oxaliplatin[J]. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2022, 40: 103082. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.103082.
- [6] Jin X, You L, Qiao J, et al. Autophagy in colitis-associated colon cancer: exploring its potential role in reducing initiation and preventing IBD-related CAC development[J]. *Autophagy*, 2024, 20(2): 242-258.
- [7] Zheng Y, Wu J, Chen H, et al. KLF4 targets RAB26 and decreases 5-FU resistance through inhibiting autophagy in co-

- lon cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2023, 24(1): 2226353. doi: 10.1080/15384047.2023.2226353.
- [8] Changotra H, Kaur S, Yadav SS, et al. ATG5: a central autophagy regulator implicated in various human diseases [J]. *Cell Biochem Funct*, 2022, 40(7): 650-667.
- [9] Corkery DP, Castro-Gonzalez S, Knyazeva A, et al. An ATG12-ATG5-TECPR1 E3-like complex regulates unconventional LC3 lipidation at damaged lysosomes [J]. *EMBO Rep*, 2023, 24(9): e56841. doi: 10.15252/embr.202356841.
- [10] Huang Q, Liu Y, Zhang S, et al. Autophagy core protein ATG5 is required for elongating spermatid development, sperm individualization and normal fertility in male mice [J]. *Autophagy*, 2021, 17(7): 1753-1767.
- [11] Feng X, Zhang H, Meng L, et al. Hypoxia-induced acetylation of PAK1 enhances autophagy and promotes brain tumorigenesis via phosphorylating ATG5 [J]. *Autophagy*, 2021, 17(3): 723-742.
- [12] Yan J, Wang M, Lv S, et al. SiATG5-loaded cancer cell membrane-fused liposomes induced increased uptake of albumin-bound chemotherapeutics by pancreatic cancer cells [J]. *J Control Release*, 2024, 367: 620-636. doi: 10.1016/j.jconrel.2024.01.055.
- [13] Hamada K, Kurashige T, Shimamura M, et al. MIEAP and ATG5 are tumor suppressors in a mouse model of BRAF(V600E)-positive thyroid cancer [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 932754. doi: 10.3389/fendo.2022.932754.
- [14] Cao W, Li J, Yang K, et al. An overview of autophagy: mechanism, regulation and research progress [J]. *Bull Cancer*, 2021, 108(3): 304-322.
- [15] Xing Y, Wei X, Liu Y, et al. Autophagy inhibition mediated by MCOLN1/TRPML1 suppresses cancer metastasis via regulating a ROS-driven TP53/p53 pathway [J]. *Autophagy*, 2022, 18(8): 1932-1954.
- [16] Rangel M, Kong J, Bhatt V, et al. Autophagy and tumorigenesis [J]. *FEBS J*, 2022, 289(22): 7177-7198.
- [17] Kao CH, Su TY, Huang WS, et al. TFEB- and TFE3-dependent autophagy activation supports cancer proliferation in the absence of centrosomes [J]. *Autophagy*, 2022, 18(12): 2830-2850.
- [18] 李淑敏, 王之枫, 刘宗绪, 等. 细胞自噬调控在肿瘤中作用的研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2023, 50(19): 1006-1010.
- LI Shumin, WANG Zhifeng, LIU Zongxu, et al. Research progress on autophagy regulation in tumors [J]. *Chinese Journal Clinical Oncology*, 2023, 50(19): 1006-1010.
- [19] Yang F, Peng ZX, Ji WD, et al. LncRNA CCAT1 up-regulates ATG5 to enhance autophagy and promote gastric cancer development by absorbing miR-140-3p [J]. *Dig Dis Sci*, 2022, 67(8): 3725-3741.
- [20] Yu Z, Tang H, Chen S, et al. Exosomal LOC85009 inhibits docetaxel resistance in lung adenocarcinoma through regulating ATG5-induced autophagy [J]. *Drug Resist Updat*, 2023, 67: 100915. doi: 10.1016/j.drug.2022.100915.
- [21] Sprinzak D, Blacklow SC. Biophysics of notch signaling [J]. *Annu Rev Biophys*, 2021, 50: 157-189. doi: 10.1146/annurev-biophys-101920-082204.
- [22] Suarez Rodriguez F, Sanlidag S, Sahlgren C. Mechanical regulation of the Notch signaling pathway [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2023, 85: 102244. doi: 10.1016/j.ceb.2023.102244.
- [23] Qiu L, Yang X, Wu J, et al. HIST2H2BF potentiates the propagation of cancer stem cells via Notch signaling to promote malignancy and liver metastasis in colorectal carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 677646. doi: 10.1016/j.ceb.2023.102244.
- [24] Li X, Liu W, Geng C, et al. Ginsenoside Rg3 suppresses epithelial-mesenchymal transition via downregulating Notch-Hes1 signaling in colon cancer cells [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(1): 217-235.
- [25] Yoshida G, Kawabata T, Takamatsu H, et al. Degradation of the NOTCH intracellular domain by elevated autophagy in osteoblasts promotes osteoblast differentiation and alleviates osteoporosis [J]. *Autophagy*, 2022, 18(10): 2323-2332.
- [26] Li Y, Ma L, Deng Y, et al. The Notch1/Hes1 signaling pathway affects autophagy by adjusting DNA methyltransferases expression in a valproic acid-induced autism spectrum disorder model [J]. *Neuropharmacology*, 2023, 239: 109682. doi: 10.1016/j.neuropharm.2023.109682.
- [27] Rogers JM, Guo B, Egan ED, et al. MAML1-dependent Notch-responsive genes exhibit differing cofactor requirements for transcriptional activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(11): e00014-20. doi: 10.1128/MCB.00014-20.
- [28] Yan X, Cheng Y, Zhang X, et al. NICD3 regulates the expression of MUC5AC and MUC2 by recruiting SMARCA4 and is involved in the differentiation of mucinous colorectal adenocarcinoma [J]. *Mol Oncol*, 2022, 16(19): 3509-3532.

(编辑:刘霞)