

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55(11):1392-1401; 4 November 2015  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150103

## PFKFB3 参与了 11'-deoxyverticillin A (C42) 诱导的 HeLa 细胞自噬和凋亡

秦鹏钧<sup>1,2</sup>, 陈同洋<sup>1,2</sup>, 鲁倩倩<sup>2</sup>, 胡风庆<sup>1\*</sup>, 杨怀义<sup>2</sup>

<sup>1</sup>辽宁大学生命科学学院, 辽宁 沈阳 110036

<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:**【目的】明确糖酵解调节基因 *PFKFB3* 参与 11-脱氧轮枝菌素 A (11'-deoxyverticillin A, C42) 诱导 HeLa 细胞自噬和凋亡中的作用。【方法】利用电镜、荧光显微镜、蛋白免疫杂交、转染、MTS 活性检测、siRNA 干扰、定量 RT-PCR 等对 C42 处理的 HeLa 细胞自噬和凋亡情况进行了检测。【结果】C42 能够引起 HeLa 细胞不同的死亡。敲降自噬关键基因 *BECL1* 或 *LC3* 后, 明显增加 PARP-1 的切割和促进 C42 引起的细胞活性丢失。尽管高浓度 C42 能更明显地抑制细胞增殖, 但却不能增加细胞的自噬流; C42 促进的自噬能被糖酵解调节基因 *PFKFB3* 的抑制剂所降低; 而过量表达糖酵解调节基因 *PFKFB3* 能促进细胞自噬。【结论】糖酵解调节基因 *PFKFB3* 直接参与了 C42 诱导的 HeLa 细胞自噬, 这种自噬的发生抑制了其诱导的细胞凋亡。

**关键词:** C42, 自噬, 凋亡, 糖酵解, PFKFB3

**中图分类号:** Q936      **文章编号:** 0001-6209(2015)11-1392-10

糖酵解途径 (glycolytic pathway) 是将葡萄糖降解为丙酮酸并伴随着 ATP 生成的一系列反应, 是一切生物有机体中普遍存在的葡萄糖降解途径<sup>[1]</sup>。与正常细胞不同, 肿瘤细胞无论缺氧与否都是通过糖酵解途径来提供能量, 这种现象被称为“Warburg 效应”<sup>[2]</sup>。在肿瘤细胞中, 葡萄糖经分布于胞膜上的葡萄糖转运蛋白从胞外转运至胞内, 然后经己糖激酶、磷酸果糖激酶等一系列催化酶的作用下, 最后形成乳酸<sup>[3]</sup>。

在哺乳动物细胞中存在着两种 6-磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase, PFK), 即 6-磷酸果糖-1-激酶 (PFK1) 和 6-磷酸果糖-2-激酶 (PFK2), 其中 PFK1 为糖酵解过程的限速酶。PFK2 家族有 4 种亚型, 他

们分别由不同的基因所编码, 即 *PFKFB1* (有肝、肌肉和胚胎型)、*PFKFB2* (心型)、*PFKFB3* (血小板、脑和广泛表达型) 和 *PFKFB4* (睾丸型)<sup>[4]</sup>。与正常组织相比, *PFKFB3* 在侵袭性肿瘤中表现为过表达且呈高度磷酸化, 导致肿瘤细胞中果糖-2,6-双磷酸的产量增加, 使 PFK1 异构激活而导致糖酵解速率增加。目前的研究表明, 抑制肿瘤细胞的糖酵解途径可以促进细胞死亡发生<sup>[5]</sup>。由于 *PFKFB3* 的激酶活性是其磷酸酶活性的 700 多倍, 因此该基因被作为治疗肿瘤药物的筛选靶点<sup>[6]</sup>。

现阶段认为细胞程序性死亡大体分为三种类型: 细胞凋亡、自噬性细胞死亡和程序性坏死<sup>[7]</sup>。

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (31370202)

\* 通信作者。Tel: +86-24-62202483; Fax: +86-24-62202232; E-mail: hfqing@lnu.edu.cn

**作者简介:** 秦鹏钧 (1990-), 女, 籍贯辽宁, 硕士研究生, 主要从事肿瘤细胞自噬信号通路的研究。E-mail: qpj120@163.com

**收稿日期:** 2015-03-10; **修回日期:** 2015-05-19

细胞凋亡, 即 I 型程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 具有依赖 caspase 参与, 伴随染色体浓缩、细胞皱缩以及凋亡小体的形成等特征<sup>[8]</sup>。自噬性细胞死亡, 即为 II 型程序性细胞死亡, 是过度的细胞自噬所造成的。细胞自噬以自噬体的出现为特征, 自噬体与溶酶体结合形成自噬溶酶体, 最终降解细胞内损伤的细胞器等成分。自噬是唯一能够降解细胞器的通路, 自噬的发生对于细胞成份更新、保持正常的生理状态是至关重要的<sup>[9]</sup>。现有研究表明自噬和凋亡不是独立的细胞活动体系。一方面, 自噬与凋亡之间存在显著的区别; 同时, 自噬与凋亡在调节和功能上存在紧密的联系<sup>[10]</sup>。

11-脱氧轮枝菌素 A (又称 11'-脱氧沃替西林 A, 11'-deoxyverticillin A, C42), 是一种从冬虫夏草共生菌中分离得到的多硫代二氧基哌嗪 (Epipolythiodioxopiperazines, ETPs) 族结构化合物<sup>[11]</sup>。已有研究报道称: C42 能诱导多种肿瘤细胞的自噬和凋亡<sup>[12]</sup>。但 C42 对 HeLa 细胞的自噬和凋亡影响鲜有报道, 且糖酵解调节基因 *PFKFB3* 是否参与其中还未见报道。本研究以 C42 引起 HeLa 细胞死亡为出发点, 对糖酵解调节基因 *PFKFB3* 在自噬和凋亡中的作用进行研究, 并观察了 C42 诱导 HeLa 细胞自噬和凋亡之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系和腺病毒:** HeLa 细胞为本实验室保存; *PFKFB3* 重组腺病毒和对照 vector 腺病毒由北京大学化学生物学与生物技术学院霍玉庆教授惠赠。

**1.1.2 药品和抗体:** 11'-Deoxyverticillin A (C42) 由军事医学科学院车永胜研究员提供。氯喹 (chloroquine diphosphate salt, CQ, C6628), Necrostatin-1 (Nec-1, N9037), 3-methyladenine (3-MA, M9281), 1,5-异喹啉二醇 (1,5-dihydroxyisoquinoline, ISO, I138), *PFK-15* (SML1009), *PARP* (9542), 3-PO (R628948) 和多克隆抗体 LC3B (L7543) 购自 Sigma 公司; Z-V-FMK (FMK001) 购于 R & D 公司; *actin* (TA-09) 抗体购自北京中杉金桥公司; p62/SQSTM1 (sequestosome 1, p62, sc-28359), *BECN1* (sc-11427), si*BECN1* (sc-297970), si*LC3* (sc-43390) 和对照 siRNA 购自 Santa Cruz 公司。

**1.1.3 试剂和耗材:** DMEM 培养基和胎牛血清购自

Gibco 公司, 青链霉素混合液和胰蛋白酶消化液购自南京凯基生物科技发展有限公司, TRIzol<sup>®</sup> Reagent 购自 Life technologies 公司, PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit 购自 TaKaRa 公司, SYBR real-time PCR kit 购自康为世纪公司; PVDF 膜购于 Amersham 公司; 发光液购自 Thermo 公司。Attractene Transfection Reagent 购于 QIAGEN 公司, DharmaFECT Transfection Reagent 购自 Thermo 公司。

**1.1.4 仪器设备:** CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (Panasonic SANYO 公司)、台式高速离心机 (Sigma 公司)、-20 °C 低温冰箱 (海尔公司)、-80 °C 低温冰箱 (Heraeus 公司)、Trans-Blot 电转仪 (Bio-Rad 公司)、AE-6500 型电泳槽 (ATTO 公司)、JY600C 恒压恒流电泳仪 (JUNYI 公司)、MilliQ plus 超纯水系统 (Millipore 公司)、CFX384 Touch<sup>™</sup> Real-time PCR 仪 (Bio-Rad 公司)、Biospec-nano UV-VIS 分光光度计 (日本岛津公司)。

### 1.2 细胞培养

HeLa 细胞系 DMEM High Glucose (含 10% 的胎牛血清、1% 的青链双抗) 培养, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中进行培养, 当细胞密度达到完全汇合的 70% 时进行传代。

### 1.3 药物处理和细胞收集

将细胞接种到 6 孔板内, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜, 至细胞汇合度达到 60%–70% 时加入药物进行刺激, 待指定时间后收集细胞。

待细胞到指定处理时间后, 用冷的 PBS 漂洗细胞一次, 吸弃 PBS, 用 TGH 裂解液刮收细胞 [TGH 的组成: 1 mL 母液 (1% TritonX-100, 10% 甘油, 50 mmol/L Hepes, pH7.4), 5 mol/L NaCl 20 μL, 0.5 mol/L EGTA/EDTA 10 μL, 0.1 mol/L NaF 10 μL, 0.1 mol/L PMSF 20 μL, 1 mol/L DTT 2 μL, 0.5 mol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 μL, Protease inhibitor 1 μL]。加入一半体积的 3 × loading buffer, 96 °C 30 min 后, 室温离心 (13000 r/min, 15 min), 上清即为全蛋白提取液。

### 1.4 腺病毒侵染和 GFP-LC3 质粒转染

将细胞分到 6 cm 培养皿中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜, 至细胞汇合度达到 70% 左右。加入腺病毒, 24 h 后将转染后细胞接种到铺好爬片的 6 孔板中, 培养过夜。加入 C42 处理细胞, 指定时间后收集细胞蛋白。

将细胞分到 6 cm 培养皿中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细

胞培养箱中培养过夜,至细胞汇合度达到60% - 70%。用 Attractene Transfection Reagent 转染 GFP-LC3 质粒 DNA,24 h 后将转染后细胞接种到 6 孔板中,培养过夜,加入 C42 处理,指定时间后取出爬片,用 4% 多聚甲醛室温固定 10 - 15 min,然后 PBS 洗 3 次,封片。在荧光显微镜下观察,对 GFP-LC3 的阳性点数进行统计。

### 1.5 电镜样品的制备

将 HeLa 细胞接种 6 cm 培养皿中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜,至细胞汇合度达到 60% - 70%。分别加 C42 和 DMSO 处理,处理指定时间。用胰酶消化细胞,4 °C、1000 × g 离心 5 min 收集细胞,冷 PBS 洗涤 2 遍。缓慢加入 3% 戊二醛,4 °C 固定过夜,使用二甲基胍缓冲液配制的 1% OsO<sub>4</sub> 室温固定 1 h,随后用乙醇做脱水处理,之后用环氧丙烷漂洗,最后将样品包埋于树脂中,切片观察。

### 1.6 免疫印迹检测

相同密度细胞用相应药物处理,待指定处理时间后,收取细胞蛋白,上清即为全蛋白提取液。等量全蛋白提取液样品经过 8% 或 15% SDS-PAGE 分离蛋白,转膜至 PVDF 膜上,PVDF 膜用 5% 奶粉封闭液室温封闭 1 h,加入相应要检测的蛋白一抗 4 °C 孵育过夜,回收一抗后适当 TBST 漂洗,二抗(一抗相对应的鼠抗或者兔抗)室温孵育 1 h,将漂洗后的 PVDF 膜放在大小合适的保鲜膜上,在膜上加发光液,放入暗盒中,将 X 光片压于膜上,适当时间后洗片。扫描记录结果,进行灰度值计算。

### 1.7 MTS ( Non-Radioactive cell proliferation assay) 细胞活性检测实验

将 5000 - 10000 个细胞分至 96 孔板中,每孔体积为 100 μL。过夜后换为新鲜的无酚红 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清),并加入不同浓度的药物处理。加入 20 μL MTS/PMS(MTS:PMS = 20:1),37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下持续培养,4 h 内检测,酶标仪测定 490 nm 处的 OD 值,每个样品设 3 次以上重复。

### 1.8 Real-time PCR 检测

**1.8.1 药物处理后收集细胞:**用 TRIzol 裂解细胞,按照 TRIzol 说明书提取总 RNA,使用 Biospec-nano UV-VIS 分光光度计测定总 RNA 浓度,然后定量至 0.5 μg,使用 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录成 cDNA,利用 β-actin 做内参,进行相对含量计算。采用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  进行相对定量计算,每个样品重复 3 次。

**1.8.2 引物序列:**β-actin 引物,上游引物:5'-GCCTGACGGCCAGGTCATCAC-3',下游引物:5'-CGGATGTCCACGTCACACTTC-3';p62 基因引物,上游引物:5'-CATCGGAGG ATCCGAGTGTG-3',下游引物:5'-TTCTTTTCCCTCCGTGCTCC-3';PFKFB3 基因引物,上游引物:5'-GTGCCTTAGCTGCCTTGAGA-3',下游引物:5'-CCGACTCGATGAAAAACGCC-3'。

**1.8.3 Real-time 反应体系:**上游引物/下游引物(10 nmol/L)0.5 μL,模板 1 μL,SYBR Mix 12.5 μL,补水至终体系为 25 μL。

## 2 结果和分析

### 2.1 C42 能引起 HeLa 细胞不同死亡方式。

MTS 是一种非放射性检测细胞活性的方法,能间接反映细胞的增殖。结果表明,用 C42 处理 HeLa 细胞 6 h 和 12 h,细胞活性随 C42 浓度的增加而减少(图 1-A)。多聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase,PARP-1)是一类存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶,116 kDa PARP-1 切割为 89 kDa 是 caspase 依赖性细胞凋亡的特异性标志<sup>[13]</sup>。C42 能切割 PARP-1(图 1-B),说明该化合物能诱导 HeLa 细胞发生 caspase 依赖性凋亡。细胞内 PAR 的积累是多种细胞死亡方式的标志,如坏死性凋亡,自噬性细胞死亡及 Parthanatos 等<sup>[14]</sup>。当使用高浓度 C42 处理细胞时,PAR 水平增加(图 1-C),表明高浓度的 C42 可能引发多种细胞死亡方式。为了验证上述结果,在接下来的试验中,我们利用了不同的细胞死亡抑制剂。Z-V-FMK 是 caspase 的广泛抑制剂<sup>[15]</sup>,加入该化合物后能抑制低浓度(0.1 μmol/L)(图 1-D)、却不能完全抑制高浓度 C42(2 μmol/L)引起的活性丢失(图 1-E)。加入 PARP 的抑制剂 ISO 也得到了类似的结果<sup>[16]</sup>(图 1-E)。Necrostatin-1(Nec-1)是坏死性凋亡的抑制剂<sup>[17]</sup>,该化合物对 C42 引起的细胞活性丢失具有一定的抑制作用。3-MA(3-methyladenine),是自噬的广泛抑制剂,它可以抑制早期自噬体的形成<sup>[18]</sup>。加入 3-MA 可以明显抑制 C42 引起的细胞活性的丢失(图 1-D)。与 ISO 和 Nec-1 不同,无论 3-MA 还是 Z-V-FMK 本身均可降低细胞活性。这些结果表明,C42 能引起 HeLa 细胞不同死亡方式。不同细胞死亡间可能存在着转换,即抑制一种死亡,由于刺激物持续存在,细胞可以转换成另外的死亡方式<sup>[19]</sup>。

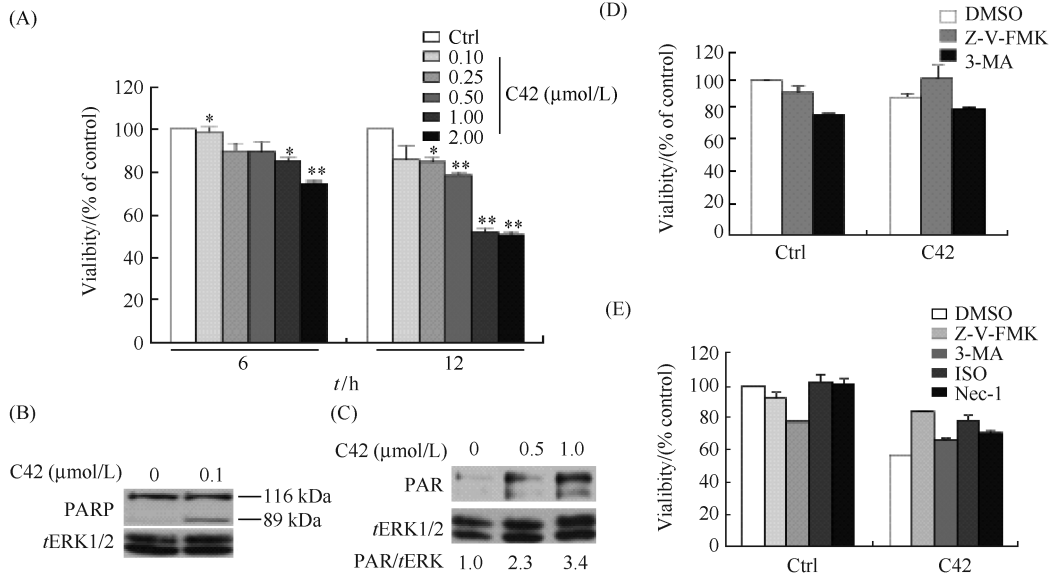


图 1. C42 可以引起 HeLa 细胞不同的死亡方式

Figure 1. C42 induces multiple cell death pathways in HeLa cells. A, D and E: HeLa cells were treated with C42 (D: 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ; E: 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ) upon to 12 h (D and E; 12 h) in the presence or absence of Z-V-FMK (20  $\mu\text{mol/L}$ ), 3-MA (2 mmol/L), ISO (30  $\mu\text{mol/L}$ ), or Nec-1 (30  $\mu\text{mol/L}$ ), cell viability was analyzed by MTS assay as described in materials and methods. Data are presented as mean  $\pm$  SD and are representatives of three independent experiments. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ . B: HeLa cells treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 12 h before analyzing by immunoblotting with the indicated antibodies. Similar experiments repeated three times. C: HeLa cells were treated with C42 (0.5  $\mu\text{mol/L}$  and 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 h before immunoblotting analysis with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification, and ratios of PAR to total ERK1/2 (tERK) are presented below the blots. Similar experiments repeated three times.

## 2.2 敲降自噬基因增加了 C42 诱导的 HeLa 细胞凋亡

*BECN1* 是自噬的一个重要起始基因,在酵母中同源类似物称为 Atg6,它是 III 型 PI3K 复合物的一部分<sup>[20]</sup>。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3, LC3) 是目前观察自噬现象是否存在、研究自噬活性较为可靠的生物学标志物<sup>[21]</sup>。氯喹 (Chloroquine, CQ) 是一种常用于自噬流检测的化合物,它通过改变溶酶体的 pH 值抑制自噬体与溶酶体的融合,CQ 的存在使 LC3-II 增加表明自噬的发生<sup>[22]</sup>。为了探讨自噬是否参与了 C42 引起 HeLa 细胞的凋亡,我们敲降了自噬基因 *LC3* 和 *BECN1*。结果表明:当自噬基因缺失时,C42 引起的 PARP-1 切割明显增加,而 CQ 的存在进一步增加了小片段 PARP 的量,表明自噬对 C42 诱导的 caspase 依赖的细胞凋亡具有抑制作用(图 2-A)。MTS 的结果显示,自噬基因的缺失会部分促进 C42 诱导的细胞活性的丧失(图 2-B)。上述结果表明,C42 引起的自噬能够抑制其诱导的凋亡。

## 2.3 C42 诱导 HeLa 细胞自噬体增加

透射电子显微镜是目前使用最广泛且是检测自噬体最可靠的方法<sup>[23]</sup>。为了进一步确认 C42 是否能够引起细胞自噬,经 C42 刺激 HeLa 细胞 2 h,电镜显示细胞内自噬体/自噬溶酶体的数量明显增加(图 3-A)。绿色荧光蛋白 GFP-LC3 是一种自噬体标记物,正常状态下,细胞基础的自噬水平较低,GFP-LC3 大部分在核里并呈弥散分布。当自噬被诱导后,GFP-LC3 出核并以酯化形式结合在自噬泡上,呈明显的点状分布。荧光显微镜结果显示,当 C42 刺激 HeLa 细胞后,GFP-LC3 阳性点数有所上升;而在 CQ 存在的情况下,GFP-LC3 点数明显升高(图 3-B),这应该是 CQ 阻断了 GFP-LC3 的降解,说明自噬流的增加。

## 2.4 C42 诱导的自噬伴随着 p62 的表达增高

自噬是一个动态过程,自噬过程中 pro-LC3 经一些列自噬相关蛋白酶的酶促反应,最终与 PE (phosphatidylethanolamine) 偶联形成 LC3-II,单独加药处理时 LC3-II 水平的降低可能是由于自噬流的增加,从而导致形成的 LC3-II 被快速降解,但这并



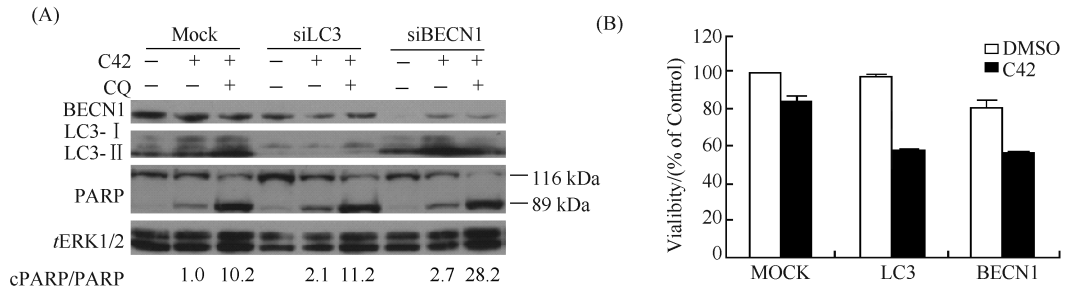


图 2. 敲降自噬基因增加了 C42 诱导的 HeLa 细胞凋亡

Figure 2. Autophagy attenuates C42-induced caspase-dependent apoptosis. A: HeLa cells were transfected with control (Mock) or BECN1 and LC3 siRNA; 48 h after transfection, cells were treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence or absence of CQ (25  $\mu\text{mol/L}$ ) for 12 h before immunoblotting analysis with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification, and cPARP to PARP are presented below the blots representing the results of three independent experiments. B: HeLa cells in (A) were treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) upon to 12 h; cell viability was analyzed by MTS assay. Data are presented as mean  $\pm$  SD and are representatives of three independent experiments.

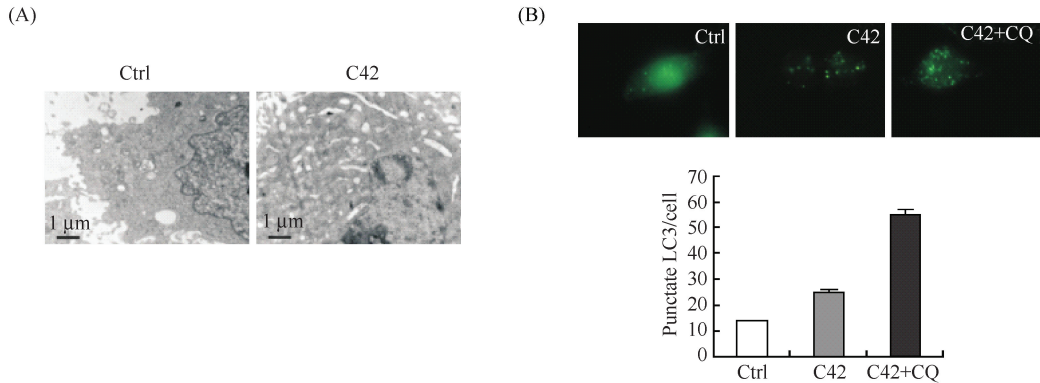


图 3. C42 诱导 HeLa 细胞自噬体增加

Figure 3. C42 induces autophagosomes in HeLa cells. A: Electron microscopy was performed on HeLa cells following C42 treated (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 h; B: HeLa cells were transfected with a plasmid expressing GFP-LC3. 24 h after transfection, the cells were split onto coverslip and incubated for 12 h before treatment with C42 in the presence or absence of CQ (25  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$  in DMEM medium with DMSO (Ctrl), C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ). Following fixation, cells were immediately visualized by fluorescence microscopy. The number of punctate GFP-LC3 in each cell was counted, and at least 100 cells were included for each group. The double asterisks denote significant differences from control.

不能代表自噬的减少;而 CQ 等自噬-溶酶体融合的抑制剂可以阻断 LC3-II 降解,从而提高 LC3-II 的水平,这样 LC3-II/Actin 比值能很好的反应细胞的自噬流<sup>[24]</sup>。尽管相对高浓度的 C42 降低了 LC3-II/Actin 的比值,但是 C42 和 CQ 共同处理比单独 C42 处理的 LC3-II 明显增加,说明不同浓度的 C42 均能引起细胞自噬(图 4-A)。p62(SQSTM1)是一个具有多种功能的泛素化结合蛋白。p62 有一个与 LC3 相互作用的区域,能够与 LC3 直接作用,p62 也可以作为脚手架蛋白参与多种信号的转导过程。p62 参与自噬的过程并被自噬降解,抑制自噬能够导致 p62 水平增高,因此 p62 可以作为一个自噬标志,可以反映自噬流的情况<sup>[25]</sup>。不过我们发现,单独的 C42 处理 p62 并没

有下降(图 4-B)。定量 RT-PCR 结果显示 C42 上调 p62 转录水平,这可能是 p62 在蛋白水平不下降的原因之一(图 4-C)。另外,是否 C42 需要 p62 来调节其引起的自噬有待于今后的研究加以证实。

## 2.5 PFKFB3 抑制剂增加了 C42 引起的细胞凋亡

PFKFB3 是近几年抗肿瘤治疗研究的热点靶基因,定量 RT-PCR 的结果显示, C42 可以上调 PFKFB3 的转录水平(图 5-A),因此,我们推测 PFKFB3 有可能参与了该化合物引起的凋亡。PFK-15 和 3-PO 均是 PFKFB3 的抑制剂,用 MTS 方法检测细胞活性,发现 PFK-15 和 3-PO 均能增加 C42 引起的细胞活性丢失(图 5-B)。同时,PFK-15 和 3-PO 均增加了 C42 引起的 PARP-1 切割(图 5-C)。上述

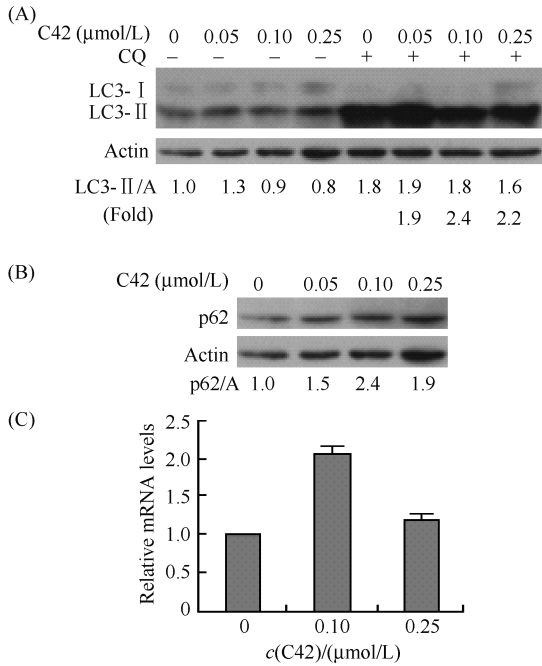


图 4. C42 诱导的自噬伴随着 p62 的表达增高

Figure 4. C42 activates autophagy concurring with an increase in p62 level. A and B: HeLa cells were treated with C42 (0.05 – 0.25  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 h before immunoblotting analysis with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification, and LC3-II and p62 to actin are presented below the blots representing the results of three independent experiments; C: HeLa cells were treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$  and 0.25  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 h, qPCR was used to detect the expression of p62. The ratios represent results of three independent experiments.

结果表明,糖酵解调节基因 *PFKFB3* 参与了 C42 引起的凋亡过程。

## 2.6 PFKFB3 参与 C42 诱导的自噬

为了验证 PFKFB3 是否参与了 C42 诱导的细胞自噬,我们检测了在 PFK-15 和 3-PO 存在的条件下自噬发生情况。在 CQ 存在的条件下,尽管 C42 和 3-PO 共同处理 2 h 可以增加 LC-II 的量,但是前者却不能抑制 p62 的降解。C42 与 PFKFB3 的抑制剂联合应用 12 h, CQ 既不能提高 LC-II 的水平,也不能抑制 p62 的降解。上述结果表明 PFKFB3 抑制剂能阻断 C42 诱导的自噬发生,却促进了细胞的凋亡(图 5-C 和图 6-A)。接下来,我们利用表达 PFKFB3 腺病毒侵染了 HeLa 细胞。由于腺病毒带有绿色荧光,其表达情况可以用荧光显微镜来观察(图 6-B)。免疫杂交结果显示,相比较空载体对照,过量表达 PFKFB3 的细胞自噬水平增加,同时转染 PFKFB3 后

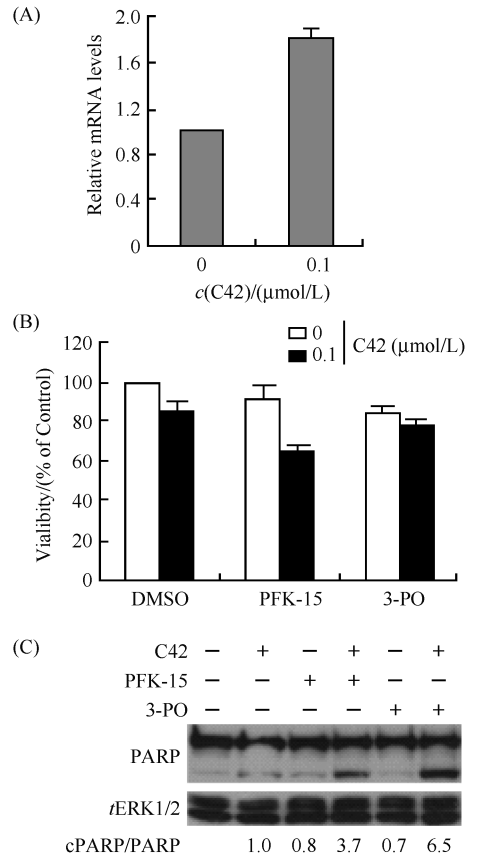


图 5. PFKFB3 抑制剂增加了 C42 引起的细胞凋亡

Figure 5. PFKFB3 inhibitors increase C42-induced apoptosis. A: HeLa cells were treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 h, qPCR was used to detect the expression of PFKFB3. B: HeLa cells were treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence or absence of PFK-15 (4  $\mu\text{mol/L}$ ) or 3-PO (15  $\mu\text{mol/L}$ ) upon to 12 h; cell viability was analyzed by MTS assay as described in materials and methods. Data are presented as mean  $\pm$  SD and are representatives of three independent experiments. C: HeLa cells were treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence or absence of PFK-15 (4  $\mu\text{mol/L}$ ) or 3-PO (15  $\mu\text{mol/L}$ ) upon to 12 h before immunoblotting analysis with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification, and the ratios of cPARP to PARP are presented below the blots. Similar experiments repeated three times.

单独加药刺激 p62 水平下降,这说明 C42 可以降低 p62 的表达,且与细胞糖酵解相关调节基因的表达状况有关(图 6-C)。上述结果表明 PFKFB3 不仅参与了 C42 引起的凋亡,同时影响了 C42 诱导的细胞自噬。另外,我们也观察到无论 PFK-15 还是 3-PO 均可以诱导细胞自噬的发生(图 6-A),这样 PFKFB3 很有可能在自噬过程中发挥双向作用。

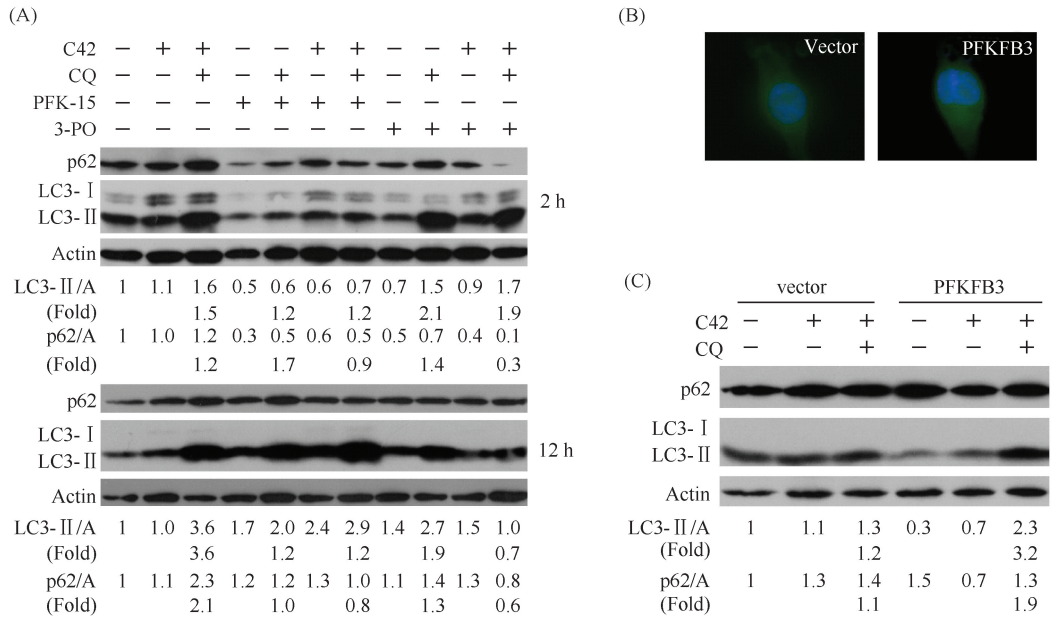


图 6. PFKFB3 参与 C42 诱导的自噬

Figure 6. PFKFB3 is involved in C42 induced-autophagy. A: HeLa cells were treated with the indicated compounds (C42: 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , PFK-15: 4  $\mu\text{mol/L}$ , 3-PO: 15  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence of CQ (25  $\mu\text{mol/L}$ ) before immunoblotting analysis with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification, and the ratios of p62 and LC3-II to actin are presented below the blots. B: HeLa cells were transfected with adenovirus (vector, PFKFB3). 24 h after transfection, the cells were split onto coverslip and incubated before treatment with DMSO for 2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Following fixation, cells were visualized by fluorescence microscopy. C: HeLa cells were treated with C42 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 2 h in the presence of CQ (25  $\mu\text{mol/L}$ ) before immunoblotting analysis with the indicated antibodies. Densitometry was performed for quantification, and the ratios of p62 and LC3-II to actin are presented below the blots. Similar experiments repeated three times.

### 3 讨论

糖酵解和自噬关系的研究目前还很少,在该研究中我们发现,参与糖酵解的磷酸果糖激酶 PFKFB3 能调节 C42 引起的细胞凋亡和自噬过程。研究表明,C42 与 PFKFB3 抑制剂的联合应用并不能增加细胞的自噬,但是能抑制细胞的增殖和促进细胞的凋亡。

许多肿瘤中都具有亚型选择性的糖酵解调控酶磷酸果糖激酶 2 (PFK2),它能够通过生成果糖-2,6-二磷酸 (F-2,6-BP) 来激活 PFK1,从而增加所需能量<sup>[26]</sup>。与氧化磷酸化不同的是,糖酵解不仅能产生能量,而且能提供肿瘤细胞快速增殖所需的一些大分子物质<sup>[27]</sup>。大部分 PFK2 的亚型都是双功能酶,他们同时具有磷酸果糖激酶和磷酸酶活性。PFK2 的亚型之一 PFKFB3 在很多癌症中都有过表达,且其激酶活性是磷酸酶的 700 多倍。PFKFB3 的激酶

活性受到控制癌症代谢的调控因子影响,如调节代谢水平的 RAS (rat sarcoma viral homolog) 和磷酸腺苷激活蛋白 (AMPK) 等信号通路<sup>[28]</sup>。有文献报道 PFKFB3 的小分子抑制剂能够抑制 RAS 突变的癌细胞生长。动物实验也发现靶向抑制 PFKFB3 的化合物能够降低果糖-2,6-二磷酸的水平,并减缓移植瘤的生长,因此以 PFKFB3 为靶点开发抗癌药物是目前研究的一个热点<sup>[29]</sup>。有人研究发现,PFKFB3 缺失会减少自噬发生同时伴随着细胞凋亡的增加<sup>[30]</sup>。与前面的结果类似,PFKFB3 的抑制剂减少了 C42 引起的细胞自噬,而增加了其诱导的细胞凋亡。过量表达 PFKFB3 能部分提高 C42 引起的自噬流。在转录水平上,C42 能提高 PFKFB3 的表达。在结肠癌细胞系 HCT116 中,有人发现抑制 PFKFB3 能促进细胞的自噬<sup>[31]</sup>。与此结果相似,我们也发现两种 PFKFB3 的抑制剂均能促进细胞自噬。这样,PFKFB3 影响自噬显然与细胞系有关。我们在研究中也发现,在肾癌和骨肉瘤细胞系中,PFK-15 却能

抑制生长和诱导自噬的发生(结果未列出)。上述的结果均显示了糖酵解调节基因与细胞自噬的关系联系密切。

细胞凋亡和自噬之间存在着密切的联系,一些调节凋亡的基因也可以调节自噬;而反之,调节自噬的基因对凋亡也有影响。具体到凋亡与自噬的关系,目前认为存在 3 种情况:自噬促进凋亡,自噬抑制凋亡以及自噬和凋亡相互协调促进细胞死亡。当凋亡和自噬都受到抑制时细胞会发生坏死。我们研究发现,C42 可以诱导 HeLa 细胞产生 3 种不同的死亡方式(自噬、凋亡、坏死)。当自噬基因缺失时,C42 能促进 PARP-1 的剪切,说明自噬对其诱导的细胞凋亡具有抑制作用。有研究者发现,Z-V-FMK 能诱导细胞自噬<sup>[32]</sup>,因此,我们推测,Z-V-FMK 引起 HeLa 细胞活性丢失可能与此有关。

自噬的发生往往伴随着 p62 蛋白的降低。而在该研究中,单独 C42 处理 HeLa 细胞时,p62 在蛋白水平上并没有下降。通过定量 RT-PCR 我们发现,C42 可以在转录水平上增加该基因的表达,这可能是 C42 促进自噬而不降低 p62 的原因之一。目前的研究已经证实,p62 的降低往往远慢于 LC3-II 的增加<sup>[33]</sup>。另一方面,很多研究表明,有些自噬的发生并不伴随着 p62 的降低。也有文献指出,p62 蛋白可以促进自噬的发生,也可以不降低自噬<sup>[34]</sup>。作为一个多功能的蛋白,有些自噬的发生需要 p62 的参与。如与泛素化蛋白降解相关的选择性自噬<sup>[35]</sup>和白藜芦醇(resveratrol)引起的自噬<sup>[36]</sup>。除此之外,p62 还与泛素化-蛋白酶体途径关系密切,抑制蛋白酶体也可能会影响其降解,这样 C42 是否会影响该蛋白降解途径有待于进一步的研究。不过在过量表达 PFKFB3 的细胞中,C42 可以引起 p62 的降低,说明 C42 调节 p62 的表达显然与糖代谢有关。结合之前的研究<sup>[37]</sup>,C42 诱导的自噬是否伴随着 p62 的降低与细胞系有关,我们推测这很有可能与细胞糖代谢水平相关联。在 HeLa 细胞中,p62 是否是该化合物诱导自噬所必须的有待今后研究证实。

总之,在该研究中我们发现了 C42 引起的凋亡和自噬与糖酵解途径有关,深入研究真菌来源的化合物与肿瘤细胞糖酵解途径之间的关系,不仅能更好地理解肿瘤的发生、发展;同时,也对这类化合物的筛选和用于可能的肿瘤治疗提供帮助。

**致谢:**衷心感谢军事医学科学院车永胜研究员提供的真菌次级代谢产物 C42!感谢中国科学院微生物研究所姜学军研究员给予本文的指导与帮助!

## 参考文献

- [ 1 ] Sun Q, Chen XX, Ma JH, Peng HY, Wang F, Zha XJ, Wang YN, Jing YL, Yang HW, Chen RR, Chang L, Zhang Y, Goto J, Onda H, Chen T, Wang MR, Lu YY, You H, Kwiatkowski D, Zhang HB. Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(10): 4129-4124.
- [ 2 ] Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(5): 325-337.
- [ 3 ] Song K, Xu XJ. Glycolytic mechanisms in cancer cells. *China Academic Journal Electronic Publishing House*, 2012, 39(16): 1239-1242. (in Chinese)  
宋奎,许晓军. 肿瘤细胞的糖酵解能量代谢机制. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(16): 1239-1242.
- [ 4 ] Ros S, Schulze A. Balancing glycolytic flux; the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2, 6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer & Metabolism*, 2013, 1(1): 8.
- [ 5 ] Peng QP, Liang HJ. Specific phenotype for glycolysis in malignant tumor cells and its significance. *Chinese Clinical Oncology*, 2009, 14(5): 470-473. (in Chinese)  
彭秋平,梁后杰. 糖酵解代谢在恶性肿瘤细胞中的特异性表型及其意义. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14(5): 470-473.
- [ 6 ] Chesney J. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2006, 9(5): 535-539.
- [ 7 ] Cho YS, Park SY. Harnessing of programmed necrosis for fighting against cancers. *Biomolecules & Therapeutics*, 2014, 22(3): 167-175.
- [ 8 ] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology*, 2005, 84(10): 627-639.
- [ 9 ] Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Development*, 2007, 21(22): 2861-2873.
- [ 10 ] Thorburn A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. *Apoptosis*, 2008, 13(1): 1-9.



- [11] Dong JY, He HP, Shen YM, Zhang KQ. Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *Journal of Natural Products*, 2005, 68(10): 1510-1513.
- [12] Shi YD, Zhang YQ, Ni YX, Shi GL, Yang HY. 11'-Deoxyverticillin A induces caspase-dependent cell apoptosis in PC3M cells. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2012, 28(1): 96-103. (in Chinese)  
时迎娣, 张迎秋, 倪扬笑, 史国利, 杨怀义. 11-脱氧轮枝菌素 A 引起前列腺癌 PC3M 细胞 Caspase 依赖的凋亡. *生物工程学报*, 2012, 28(1): 96-103.
- [13] Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Yamin TT, Nicholson DW. CPP32/Apopain is a key interleukin 1 $\beta$  converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(4): 1841-1844.
- [14] Aredia F, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochemical Pharmacology*, 2014, 92(1): 157-163.
- [15] González-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquère S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G. The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *Journal of Cell Science*, 2005, 118(Pt 14): 3091-3102.
- [16] Wieler S, Gagné JP, Vaziri H, Poirier GG, Benchimol S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1 arrest response following ionizing radiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(21): 18914-18921.
- [17] Degtarev A, Huang ZH, Boyce M, Li YQ, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan JY. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 2005, 1(2): 112-119.
- [18] Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1982, 79(6): 1889-1892.
- [19] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, DeDeiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 2012, 19(1): 107-120.
- [20] Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1*. *Nature*, 1999, 402(6762): 672-676.
- [21] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [22] Degtyarev M, De Mazière A, Orr C, Lin J, Lee BB, Tien JY, Prior WW, van Dijk S, Wu H, Gray DC, Davis DP, Stern HM, Murray LJ, Hoeflich KP, Klumperman J, Friedman LS, Lin K. Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 183(1): 101-116.
- [23] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. Monitoring autophagy by electron microscopy in mammalian cells. *Methods in Enzymology*, 2009, 452: 143-164.
- [24] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 2007, 3(6): 542-545.
- [25] Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, Stenmark H, Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *The Journal of Cell Biology*, 2005, 171(4): 603-614.
- [26] Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL, Moenner M, Caro J, Esumi H, Minchenko OH. Hypoxic regulation of *PFKFB-3* and *PFKFB-4* gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of *PFKFB* genes in gastric cancer. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, 53(4): 789-799.
- [27] Zhang WH, Liu Y, Chen XZ, Bergmeier SC. Novel inhibitors of basal glucose transport as potential anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(7): 2191-2194.
- [28] Atsumi T, Chesney J, Metz C, Leng L, Donnelly S, Makita Z, Mitchell R, Bucala R. High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Research*, 2002, 62(20): 5881-5887.
- [29] Yalcin A, Telang S, Clem B, Chesney J. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatases in cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, 2009, 86(3): 174-179.

- [30] Clem BF, O'Neal J, Tapolsky G, Clem AL, Imbert-Fernandez Y, Kerr DA II, Klarer AC, Redman R, Miller DM, Trent JO, Telang S, Chesney J. Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2013, 12(8): 1461-1470.
- [31] Niu SB, Yuan DD, Jiang XJ, Che YS. 11'-Deoxyverticillin A (C42) promotes autophagy through K-Ras/GSK3 signaling pathway in HCT116 cells. *Protein & Cell*, 2014, 5(12): 945-949.
- [32] Xu Y, Kim SO, Li YL, Han JH. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(28): 19179-19187.
- [33] Myeku N, Figueiredo-Pereira ME. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(25): 22426-22440.
- [34] Santoni M, Amantini C, Morelli MB, Liberati S, Farfariello V, Nabissi M, Bonfili L, Eleuteri AM, Mozzicafreddo M, Burattini L, Berardi R, Cascinu S, Santoni G. Pazopanib and sunitinib trigger autophagic and non-autophagic death of bladder tumour cells. *British Journal of Cancer*, 2013, 109(4): 1040-1050.
- [35] Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N. Serine 403 phosphorylation of p62/sqstm1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Molecular Cell*, 2011, 44(2): 279-289.
- [36] Zhang J, Ma K, Qi TT, Wei XN, Zhang Q, Li GW, Chiu JF. P62 regulates resveratrol-mediated Fas/Cav-1 complex formation and transition from autophagy to apoptosis. *Oncotarget*, 2015, 6(2): 789-801.
- [37] Zhang N, Chen YL, Jiang RX, Li EW, Chen XL, Xi ZJ, Guo YL, Liu XZ, Zhou YG, Che YS, Jiang XJ. PARP and RIP 1 are required for autophagy induced by 11'-deoxyverticillin A, which precedes caspase-dependent apoptosis. *Autophagy*, 2011, 7(6): 598-612.

## ***PFKFB3* regulates 11'-deoxyverticillin A (C42)-induced autophagy and apoptosis in HeLa cells**

Pengjun Qin<sup>1,2</sup>, Tongyang Chen<sup>1,2</sup>, Qianqian Lu<sup>2</sup>, Fengqing Hu<sup>1\*</sup>, Huaiyi Yang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, Liaoning Province, China

<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** [ **Objective** ] The aim is to reveal the role of *PFKFB3* in 11'-deoxyverticillin A(C42)-induced autophagy and apoptosis. [ **Methods** ] Electron and fluorescence microscopy, immunoblotting, MTS assay, siRNA interference and real time PCR were used. [ **Results** ] C42 could induce multiple cell death in HeLa cells. Knockdown of either *Beclin 1* or *LC3*, two important autophagic genes, increased both PARP-1 cleavage and cell viability loss. Although high dose of C42 triggered more cell viability loss, yet, it failed to augment autophagic flux. While *PFKFB3* inhibitors attenuated C42-induced autophagy, the overexpression of *PFKFB3* increased the induced autophagic flux. [ **Conclusion** ] *PFKFB3* is involved in C42 induced-autophagy, which blunts the caspase-dependent apoptotic process.

**Keywords:** C42, autophagy, apoptosis, glycolysis, *PFKFB3*

( 本文责编:李磊 )

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370202)

\* Corresponding author. Tel: +86-24-62202483; Fax: +86-10-64807728; E-mail: hfqing@lnu.edu.cn

Received: 10 March 2015/Revised: 19 May 2015