

S100A8通过自噬促进B细胞淋巴瘤耐药性的机制研究

周仕霞^{1,2} 张力³ 李晓明^{1,2*} 唐君玲^{1,2*}

¹西南医科大学附属医院血液内科, 泸州 646000; ²西南医科大学附属医院干细胞实验室, 泸州 646000;

³西南医科大学口腔医学院口腔颌面外科, 泸州 646000)

摘要 B细胞淋巴瘤是起源于淋巴造血系统的恶性肿瘤, 是由分化过程中淋巴细胞恶性转化的复杂过程引起的。B细胞淋巴瘤细胞的耐药性是制约B细胞淋巴瘤治疗的关键因素。自噬是细胞成分降解和再循环的重要细胞生物学过程, 近年来其与肿瘤耐药性的相关性受到越来越多的关注。S100A8是钙结合蛋白S100家族的重要成员, 其在淋巴瘤的耐药调控中发挥重要作用, 但具体机制尚不清楚。在该研究中, 以人Burkitt淋巴瘤细胞Daudi、人B淋巴瘤细胞SUDHL-4和人套细胞淋巴瘤细胞JeKo-1为研究对象, 揭示了B细胞淋巴瘤细胞的耐药性与S100A8的表达水平密切相关, 且S100A8可以显著激活淋巴瘤细胞的自噬进程。慢病毒感染稳定敲低S100A8的表达后, 一方面, 淋巴瘤细胞内质网和线粒体内的BNIP3蛋白的表达水平显著降低, 自噬受到抑制; 另一方面, 自噬起始复合物BECN1-PI3KC3的表达显著降低, 而BCL2与BECN1的结合显著增多, 进而抑制细胞自噬。

关键词 B细胞淋巴瘤; 耐药性; 自噬; S100A8

S100A8 Promotes Chemoresistance of B-Cell Lymphoma via Autophagy

ZHOU Shixia^{1,2}, ZHANG Li³, LI Xiaoming^{1,2*}, TANG Junling^{1,2*}

¹Department of Hematology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;

²Stem Cell Laboratory Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; ³Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatological Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract BCLs (B-cell lymphomas) are malignant tumors that originate from the lymphoid hematopoietic system, resulting from the complex process of malignant transformation of lymphocytes during various stages of differentiation. The efforts to control or even eradicate BCLs are frequently hampered by the development of drug resistance. Autophagy is a regulated process of degradation and recycling of cellular constituents, which recently received increasing attention for its roles in conferring resistance to various commonly used anticancer therapies. S100A8 is a member of the S100 calcium-binding protein family and plays an important role in the drug resistance of lymphoid tumors, while the mechanisms are particular unclear. In the present study, by employing three BCL cell lines (Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1), S100A8 was found to be crucial in regulating drug resistance and activating autophagy in BCL cells. Interference of *S100A8* could significantly down-regulate BNIP3 expression located in mitochondrial and endoplasmic reticulum to further inhibit autophagy. In addition, *S100A8* interference notably inhibited the formation of BECN1-PI3KC3 complex and promoted BCL2 expression, which collectively inhibited autophagy.

收稿日期: 2020-09-08 接受日期: 2020-10-23

四川省重点研发项目(批准号: 2019YFS0301)、四川省卫生健康委员会重点研发项目(批准号: 18ZD014)和泸州市科技局应用基础研究项目(批准号: 2019LZXNYDJ54)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13320789626, E-mail: PolycloneRES_TJL@163.com; Tel: 13700986866, E-mail: lxm6358@21cn.com

Received: September 8, 2020 Accepted: October 23, 2020

This work was supported by the Sichuan Province Key Research and Development Projects (Grant No.2019YFS0301), the Key Research Project of Sichuan Provincial Health Commission (Grant No.18ZD014), and the Basic Applied Research Project of Luzhou Science and Technology Bureau (Grant No.2019LZXNYDJ54)

*Corresponding authors. Tel: +86-13320789626, E-mail: PolycloneRES_TJL@163.com; Tel: +86-13700986866, E-mail: lxm6358@21cn.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5465>

Keywords B-cell lymphomas; chemoresistance; autophagy; S100A8

B细胞淋巴瘤是一种高度侵袭性的临床异质性肿瘤,具有较高的疾病特异性死亡率^[1],尤其对于弥漫性大B细胞淋巴瘤等非霍奇金淋巴瘤来说,疾病致死率更是居高不下^[2]。对于晚期B细胞淋巴瘤患者,使用多种化疗药物的联合化疗方案加重重组抗CD20抗体利妥昔单抗是最佳治疗选择^[3],单克隆抗体靶向药物的临床运用可以提高B细胞淋巴瘤的治愈率和淋巴瘤患者的5年生存率^[4-5]。但是,淋巴瘤细胞的耐药性会严重阻碍淋巴瘤的成功治疗,并导致淋巴瘤的复发,例如弥漫性大B细胞淋巴瘤患者中大约50%的患者出现疾病复发或对药物产生耐药性,而最终有1/3的患者死于具体机制尚不清楚的淋巴瘤细胞耐药性^[6-7]。因此,研究并阐明淋巴瘤细胞的耐药机制对于改善当前淋巴瘤治疗方法具有重大意义。

自噬在进化上呈现高保守性,是一种非常重要的细胞代谢机制。在环境压力条件下,细胞将细胞质内的蛋白质或细胞器以囊泡的形式包裹形成自噬小体,然后与溶酶体结合形成自噬溶酶体,降解包裹的蛋白质与细胞器,为细胞代谢提供生化反应的底物。同样,在正常生理条件下,细胞也会利用自噬清除损伤的细胞器。自噬概念最早是由比利时科学家DUVE在1963年提出的,DUVE在对哺乳动物细胞进行高分辨透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察之后,将自噬定义为溶酶体降解细胞质的过程。但真正深入认识自噬是90年代日本科学家OHSUMI在酵母中的相关研究,并且2016年OHSUMI因发现了自噬机制而被授予诺贝尔生理学或医学奖^[8-9]。自噬可以分为:巨自噬(macroautophagy),细胞内形成脂质双分子层结构的自噬小体包裹内容物,并与溶酶体结合;微自噬(microautophagy),溶酶体通过表面膜的内陷,直接吞入并降解细胞质中的组分;分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA),分子伴侣将靶蛋白运送至溶酶体进行降解^[10-11]。自噬与多种代谢性疾病、感染性疾病、心血管疾病及神经退行性疾病密切相关,目前研究较深入的是自噬与糖尿病和阿尔茨海默病的相关性^[12]。除此之外,自噬与淋巴瘤的耐药机制密切相关,值得深入探究。

S100A8也被称为髓样相关蛋白8(myeloid-related protein 8, MRP8),是一种细胞内钙结合蛋白,在基质

细胞、单核细胞以及嗜酸性粒细胞和嗜中性粒细胞中均有表达^[13]。S100A8属于包含22个成员的S100蛋白超家族,主要在先天免疫系统中起作用^[14]。S100A8在多种细胞类型中的表达水平具有明显差异,且在髓样细胞中表达丰富。据报道,S100A8可以调节细胞增殖和转移过程,诱导细胞凋亡并参与各种癌症的发展,已经证明S100A8与髓系细胞分化、自噬、细胞凋亡和化疗耐药有关^[15]。Bcl-2/腺病毒E1B相互作用蛋白3(Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3, BNIP3),主要定位于线粒体和内质网,BNIP3通过其C-端跨膜结构域锚定到外部线粒体和内质网膜上,而其N-端面对细胞质。BNIP3通过干扰线粒体功能诱导细胞死亡^[16-17]。此外,BNIP3特异性靶向内质网会干扰Ca²⁺稳态并促进细胞死亡,BNIP3还是许多不同类型细胞中自噬的有效诱导剂^[18-19]。

在这项研究中,我们揭示了B细胞淋巴瘤细胞对阿霉素(adriamycin, ADR)和长春新碱(vincristine, VCR)的耐药性与S100A8相关。S100A8通过促进BNIP3、BECN1和III类磷脂酰肌醇激酶复合物(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, PI3KC3)的表达激活淋巴瘤细胞的自噬,进而促进淋巴瘤细胞的耐药性,这可能为B细胞淋巴瘤的治疗提供新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人Burkitt淋巴瘤细胞Daudi、人淋巴瘤细胞SUDHL-4和人套细胞淋巴瘤细胞JeKo-1均购于中国科学院上海细胞库。

1.2 慢病毒

S100A8稳定干扰慢病毒(LV-shS100A8)及通用阴性对照慢病毒(LV-shNC)由上海吉玛制药技术有限公司提供。LV-shS100A8正义链序列为:5'-CCU GAA GAA AUU GCU AGA GTT-3';反义链序列为:5'-GGA CTT CTT TAA CGA TCT CAA-3'。阴性对照病毒LV-shNC正义链序列为:5'-TTC TCC GAA CGT GTC ACG T-3';反义链序列为:5'-AAG AGG CTT GCA CAG TGC A-3'。

1.3 主要试剂

细胞培养基RPMI-1640和胎牛血清(fetal bovine

serum, FBS)购于Gibco公司; 细胞裂解液等蛋白提取相关试剂和Ad-mCherry-GFP-LC3腺病毒购于上海碧云天生物技术有限公司; ADR和VCR购自北京索莱宝科技有限公司; 兔抗人LC3-I/II单克隆抗体、兔抗人P62单克隆抗体、兔抗人TUBULIN单克隆抗体、兔抗人BCL2单克隆抗体、兔抗人BECLIN1单克隆抗体和兔抗人PI3KC3单克隆抗体均购于武汉三鹰生物技术有限公司; 兔抗人S100A8单克隆抗体购于Sigma-Aldrich公司; 鼠抗人BNIP3单克隆抗体购于R&D公司; 兔抗人Calnexin单克隆抗体和兔抗人MnSOD2单克隆抗体购于Abcam公司。自噬抑制剂3-MA(3-methyladenine)和CQ(chloroquine)购于MCE生命科学试剂服务商。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 Daudi细胞和SUDHL-4细胞常规培养于含10% FBS的RPMI-1640培养基中, JeKo-1细胞常规培养于含20% FBS的RPMI-1640培养基中, 细胞均置于37 °C、5% CO₂、95%湿度的培养箱中进行培养。细胞呈单个悬浮生长。

1.4.2 细胞活性实验 使用CCK-8试剂盒进行细胞活性检测。Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞种植在96孔板中, 每孔均含100 μL细胞培养基和2 000个细胞, 并设置仅含100 μL/孔细胞培养基的空白对照孔。实验孔中分别加入1 μg/mL ADR或1 μg/mL VCR, ADR和VCR均使用二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解, 对照孔中加入等体积的DMSO。培养箱内孵育72 h后, 向实验孔、对照孔和空白孔中分别加入10 μL的CCK-8试剂, 摇匀后在37 °C培养箱内孵育1.5 h, 然后测定各孔在450 nm波长处的吸光度(D)值。按照 $D_{\text{真实}} = D_{\text{测定}} - D_{\text{空白}}$ 计算出实验孔和对照孔的D值, 相对细胞活性=实验孔平均D值/对照组平均D值。

1.4.3 总RNA提取与cDNA合成 用Trizol法提取细胞总RNA, 具体步骤如下: 收集细胞离心后, 向细胞沉淀中加入1 mL Trizol, 剧烈振荡以裂解细胞, 于室温静置5 min。向Trizol裂解液中加入200 μL氯仿, 振荡混匀, 室温静置5 min, 12 000 r/min、4 °C离心15 min。移液器收集上清液, 切记不要吸到白色和红色液体。室温静置10 min, 12 000 r/min、4 °C离心10 min。离心后移除上清液, 按照每1 mL Trizol加入1 mL 75%乙醇的比例加入适量75%乙醇, 上下颠倒洗涤RNA沉淀, 12 000 r/min、4 °C离心5 min。离心后去除乙醇, 室温干燥5~10 min, 待乙醇完全挥发

后, 加入RNAase-free水溶解RNA沉淀, 置于-80 °C冰箱保存备用。使用紫外分光光度计进行RNA浓度与纯度检测。通过RNA溶液的 A_{260}/A_{280} 来检测RNA纯度, 将比值范围1.9~2.1视为RNA纯度较好。按照PrimeScript™ RT Master Mix Kit试剂盒说明书配制逆转录反应体系, 加样完成后在PCR仪上完成逆转录反应, 逆转录反应条件: 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s。合成的cDNA用于后续qRT-PCR反应或放置于-20 °C保存备用。

1.4.4 qRT-PCR检测基因的mRNA表达水平 扩增S100A8的引物序列为: F: 5'-CCG AGC TGG AGA AAG CCT TG-3'; R: 5'-AGG TCA TCC CTG TAG ACG GC-3'。内参基因为GAPDH, 引物序列为: F: 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3'; R: 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC-3'。引物由生物工程(上海)有限公司合成。qRT-PCR实验使用TB Green® Premix Ex Taq™ II(TliRNaseH Plus)试剂盒。配制20 μL反应体系: 10 μL Premix Ex Taq™ II, 0.4 μL上游引物(10 μmol), 0.4 μL下游引物(10 μmol), 2 μL cDNA, 7.2 μL Nuclease-free水。qRT-PCR反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 循环39次, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达水平。

1.4.5 Western blot检测细胞中蛋白质水平 样品处理: 将蛋白样品和加样缓冲液按照4:1加入并混合摇匀, 100 °C恒温变性5 min, 冰上冷却。SDS-PAGE凝胶电泳: 根据待测样本蛋白分子量需求, 配制SDS-PAGE凝胶(8%~12%分离胶, 5%浓缩胶)。上样总蛋白为20 μg, 空置的泳道用等体积1×加样缓冲液补齐。电泳条件: 80 V 20 min; 120 V 60 min。转膜: 按照Marker使用切胶板切取目的条带, 裁剪大小适宜的PVDF膜, 从下到上依次放置硬质海绵-PVDF膜-胶-硬质海绵, 设置电转仪参数: 恒流300 mA, 80 min。封闭: 用脱脂奶粉和TBST配制5%封闭液, 待电转完成后, 浸泡PVDF膜于封闭液中, 室温封闭1 h。免疫反应: 弃掉封闭液, 加入1:1 000稀释后的一抗, 4 °C摇床孵育过夜。使用TBST按照1:2 000稀释二抗, 室温下在摇床上孵育2 h。化学发光及结果处理: 用ECL化学发光法进行显影, 凝胶成像系统扫描后使用Quantity One软件计算灰度值。

1.4.6 慢病毒感染细胞 收集细胞并进行细胞计数, 将细胞悬液按 2×10^5 个/孔接种于6孔板, 常规培养至细胞融合度达20%左右, 设置感染复数MOI分别为

10、50和100, 根据MOI值, 加入相应的病毒液。感染24 h后, 观察细胞状态, 弃掉含慢病毒的细胞培养液, 更换新鲜细胞完全培养液。感染72 h后, 在荧光显微镜下观察细胞, 确定细胞内荧光蛋白, 根据细胞荧光蛋白的表达, 进行流式筛选, 富集阳性感染细胞。

1.4.7 自噬流(autophagy flux)实验 感染前在6孔板中接种细胞, 每孔加入1.5 mL培养液、 1×10^5 个细胞。待细胞融合度达到50%左右时准备进行感染, 取6孔板中的1孔收集细胞并计数, 按照MOI分别为0、10、20、40、100, 计算所需病毒量, 通过最终荧光观察确定最佳MOI值。使用与24孔板配套的细胞爬片, 置于24孔板内, 向装有细胞爬片的24孔板内加入多聚赖氨酸, 在37 °C培养箱内处理30 min, PBS清洗含有细胞爬片的24孔板, 在24孔板内接种细胞, 孔内加入500 μ L完全培养基。待贴壁细胞融合度达到50%左右时, 按照最佳MOI加入适当Ad-mCherry-GFP-LC3腺病毒溶液和新鲜不含双抗的完全培养基。感染24~48 h后, 取出细胞爬片, PBS清洗后, 使用防荧光猝灭剂封片, 在荧光显微镜下观察LC3荧光蛋白的形态。

1.4.8 透射电镜观察细胞自噬溶酶体 细胞取材: 收集 10^6 数量级的细胞, 1 200 r/min离心10 min, 使细胞沉淀于1 mL EP管底部。固定: 使用2.5%戊二醛固定细胞沉淀, 固定时间为24 h以上, 用0.1 mol磷酸漂洗液漂洗3~5次, 每次15 min, 然后使用1%锇酸固定液固定3 h, 用0.1 mol磷酸漂洗液漂洗3~5次, 每次15 min。脱水: 使用50%乙醇、70%乙醇、90%乙醇和90%丙酮依次进行梯度脱水, 每次15 min, 且在4 °C环境下进行, 最后使用100%丙酮在常温下脱水3次, 每次15 min。包埋: 使用纯丙酮+包埋液(2:1)于室温下包埋3~4 h, 然后使用纯丙酮+包埋液(1:2)于室温下包埋12 h, 最后使用纯包埋液在37 °C环境下包埋2 h。固化: 在37 °C温度条件下固化6 h, 45 °C温度条件下固化12 h, 60 °C温度条件下固化48 h。切片: 使用超薄切片机切片, 厚度约为70 nm。染色: 3%醋酸铀-枸橼酸铅染色6 h。观察: 在透射电镜下, 细胞内自噬溶酶体呈双层膜结构, 且自噬溶酶体内可见或多或少的颗粒状内容物。

1.4.9 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP)实验 离心收集细胞后加入细胞裂解液裂解细胞, 提取蛋白并定量, 取200 μ L至1 mL蛋白样品, 蛋白量约为200 μ g至1 mg, 加入约1 μ g和免疫沉淀时使用的IgG种属相同的普通IgG和20 μ L充分重悬的Protein A+G Agarose, 4 °C缓慢摇动30 min至2 h。2 500 r/min

离心5 min, 取上清用于后续的免疫沉淀, 加入按照1:1 000比例稀释的一抗, 4 °C缓慢摇动过夜。加入20 μ L充分重悬的Protein A+G Agarose, 4 °C缓慢摇动1~3 h, 2 500 r/min离心5 min, 或瞬时高速离心, 小心吸除上清, 注意宁可留下少量上清也不能吸掉Protein A+G Agarose, 用准备蛋白样品时的裂解液或PBS洗涤沉淀5次, 裂解液或PBS的用量每次为0.5~1 mL, 洗涤时离心条件和吸除上清的要求同上面的步骤。完成最后1次洗涤后, 去除上清, 加入20~40 μ L $1 \times$ SDS-PAGE电泳上样缓冲液Vortex重悬沉淀, 瞬时高速离心把样品离心至管底, 100 °C或沸水浴处理3~5 min, 取部分或全部样品用于SDS-PAGE电泳, 剩余过程同1.4.5。

1.4.10 统计学分析 采用SPSS 19.0软件进行数据分析, 两组独立数据比较时采用独立样本 t 检验, 多组独立数据比较时采用单因素方差分析, 数据用平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 不同B细胞淋巴瘤细胞对ADR和VCR的耐药性差异

细胞活性实验检测结果显示, 人Burkitt淋巴瘤细胞Daudi、人B淋巴瘤细胞SUDHL-4和人套细胞淋巴瘤细胞JeKo-1对ADR和VCR均有一定的耐药性, 其中, ADR处理细胞后, Daudi细胞、SUDHL-4细胞和JeKo-1细胞的相对活性分别为0.50、0.61和0.69($P < 0.001$, 图1A); VCR处理细胞后, Daudi细胞、SUDHL-4细胞和JeKo-1细胞的相对活性分别为0.40、0.57和0.68($P < 0.001$, 图1B)。结果表明, JeKo-1细胞对ADR和VCR具有较高的耐药性, SUDHL-4细胞次之, Daudi细胞对ADR和VCR的耐药性最弱。

2.2 不同B细胞淋巴瘤细胞S100A8表达水平的差异

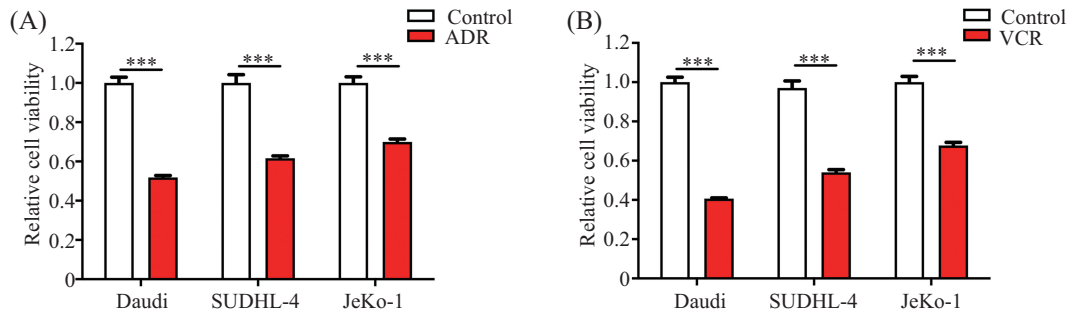
细胞活性实验确定了Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞对ADR和VCR具有不同的耐药性之后, 我们接下来检测了S100A8基因在三种细胞中的表达差异。首先, qRT-PCR结果表明, Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞中S100A8基因的mRNA转录水平各不相同, Daudi细胞中S100A8基因的mRNA表达水平最低, SUDHL-4和JeKo-1细胞中S100A8基因的mRNA表达水平分别是Daudi细胞中的1.4倍($P < 0.05$)和2.5倍($P < 0.01$)(图2A)。为了验证S100A8的蛋白质翻译水平, 我们进行了Western blot实验, 结果显

示, SUDHL-4($P<0.01$)和JeKo-1($P<0.001$)细胞中S100A8的蛋白质翻译水平显著高于Daudi细胞(图2B和图2C)。这些结果表明,对ADR和VCR具有不同耐药性的三种细胞Daudi、SUDHL-4和JeKo-1中S100A8基因的表达水平也各不相同,对ADR和VCR具有最弱耐药性的Daudi细胞,其S100A8表达水平最低;对ADR和VCR具有最强耐药性的JeKo-1细胞,

其S100A8表达水平最高。

2.3 干扰S100A8对B细胞淋巴瘤细胞耐药性的影响

为了进一步研究S100A8对不同B细胞淋巴瘤细胞耐药性的影响,我们利用慢病毒稳定感染的方法,在Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞中稳定干扰S100A8基因的表达水平。qRT-PCR结果表明,慢病毒感染后,Daudi-shS100A8、SUDHL-4-shS100A8和JeKo-

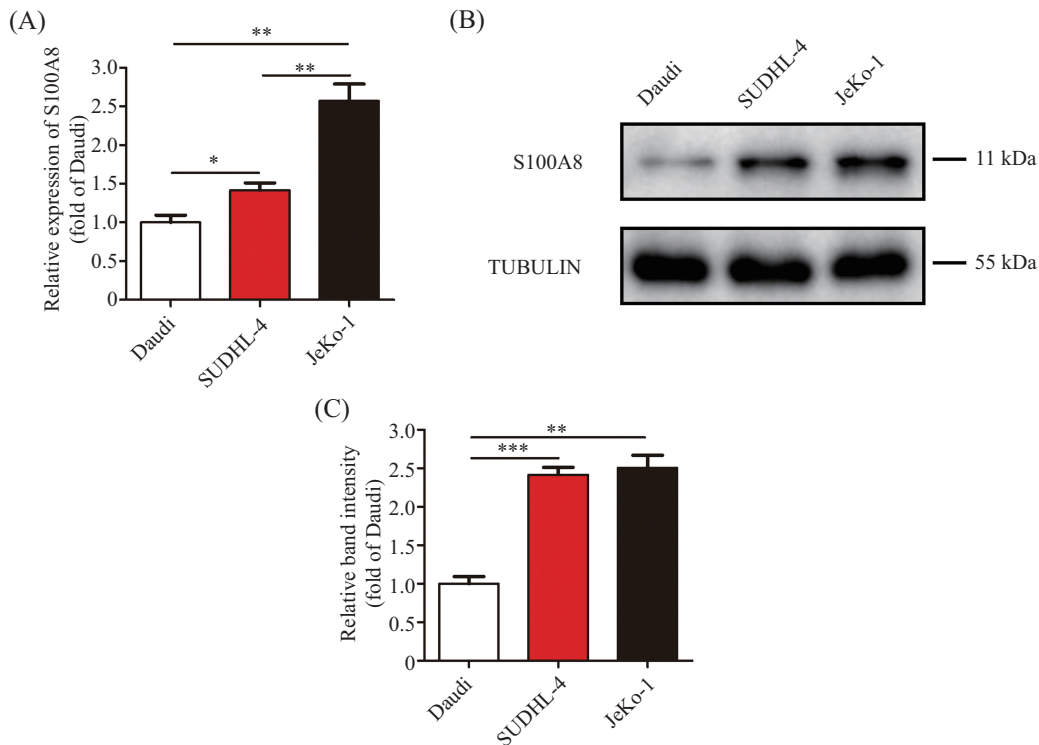


A: Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞对ADR的耐药性; B: Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞对VCR的耐药性。*** $P<0.001$ 。

A: resistance of Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1 cells to ADR; B: resistance of Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1 cells to VCR. *** $P<0.001$ 。

图1 不同淋巴瘤细胞对ADR和VCR的耐药性

Fig.1 Resistance of different lymphoma cells to ADR and VCR



A: Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞中S100A8基因mRNA的表达水平; B: Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞中S100A8蛋白的表达水平; C: S100A8蛋白的灰度分析。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: the mRNA expression levels of S100A8 gene in Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1 cells; B: the expression levels of S100A8 protein in Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1 cells; C: gray analysis of S100A8 protein. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图2 不同淋巴瘤细胞S100A8表达水平的差异

Fig.2 S100A8 expression differences in different lymphoma cells

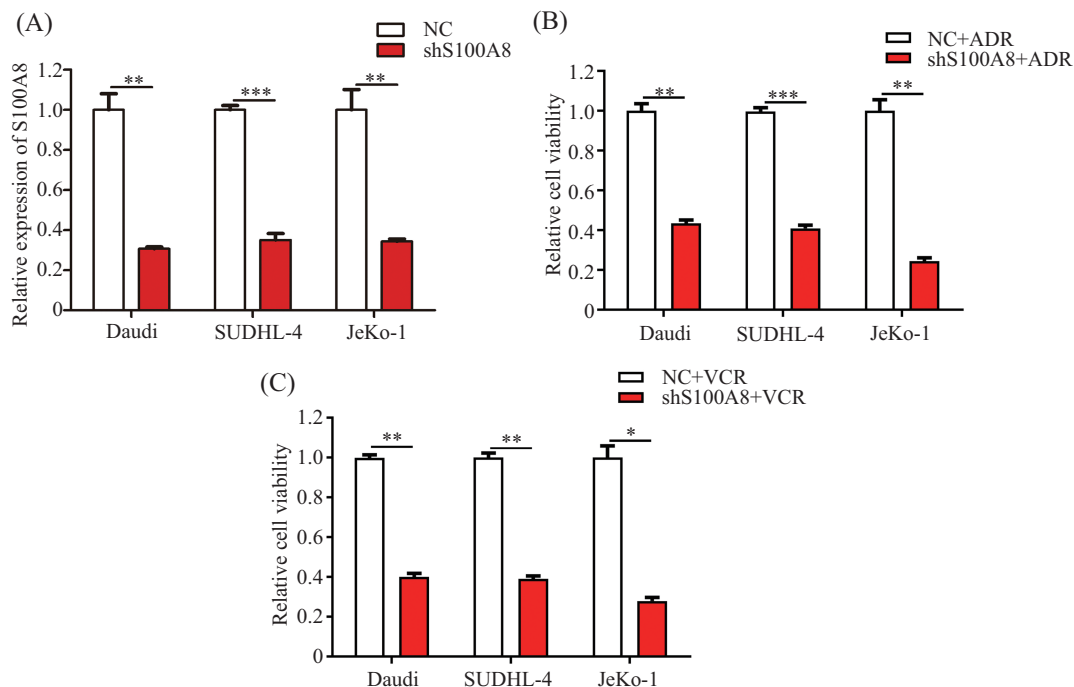
1-shS100A8细胞中 *S100A8* 的 mRNA 表达水平相对于其各自的阴性对照细胞分别降低了 70% ($P < 0.01$)、75% ($P < 0.001$) 和 73% ($P < 0.01$) (图 3A), 说明慢病毒感染稳定干扰了 Daudi、SUDHL-4 和 JeKo-1 细胞中 *S100A8* 基因的 mRNA 表达水平。细胞活性实验检测结果显示, 用慢病毒感染稳定干扰 *S100A8* 基因, ADR 处理细胞后, 与其各自阴性对照细胞相比, Daudi-shS100A8、SUDHL-4-shS100A8 和 JeKo-1-shS100A8 细胞的相对细胞活性分别为 0.42 ($P < 0.01$)、0.40 ($P < 0.001$) 和 0.26 ($P < 0.01$) (图 3B), VCR 处理细胞后, 与其各自阴性对照细胞相比, Daudi-shS100A8、SUDHL-4-shS100A8 和 JeKo-1-shS100A8 细胞的相对细胞活性分别为 0.39 ($P < 0.01$)、0.37 ($P < 0.01$) 和 0.28 ($P < 0.01$) (图 3C)。这些结果表明, 干扰 *S100A8* 基因的表达后, 淋巴瘤细胞对 ADR 和 VCR 的耐药性显著降低, 结合 *S100A8* 表达水平与淋巴瘤细胞对 ADR 和 VCR 的耐药性呈正相关的实验结果, 充分说明 *S100A8* 可以促进 B 细胞淋巴瘤细胞对 ADR 和 VCR 的耐药性。

2.4 干扰 *S100A8* 后 B 细胞淋巴瘤细胞中自噬活性的变化

Western blot 结果显示, 慢病毒感染稳定干扰 *S100A8* 基因后, Daudi、SUDHL-4 和 JeKo-1 细胞中 *S100A8* 蛋白的表达水平显著降低, 同时, LC3-II 蛋白水平显著降低, 而且 P62 蛋白水平显著增高, 这表明干扰 *S100A8* 基因后, 淋巴瘤细胞的自噬活性受到明显抑制 (图 4A)。自噬流实验结果显示, 干扰 *S100A8* 基因的表达后, 淋巴瘤细胞内的 LC3 蛋白斑块显著减少 (图 4B)。最后, 透射电镜观察淋巴瘤细胞内的自噬溶酶体结果显示, 干扰 *S100A8* 基因的表达后, 淋巴瘤细胞内的自噬溶酶体数量显著减少 (SUDHL-4, $P < 0.05$; JeKo-1, $P < 0.01$) (图 4C 和图 4D)。这些结果说明, 慢病毒感染稳定干扰 *S100A8* 基因的表达后, 淋巴瘤细胞内的自噬活性显著降低。

2.5 自噬抑制剂处理对不同 B 细胞淋巴瘤细胞耐药性的影响

使用自噬抑制剂 3-MA 或者 CQ 处理不同淋巴瘤细胞后, 细胞活性实验检测结果显示, 与单独



A: 感染shS100A8慢病毒后淋巴瘤细胞中*S100A8*基因的mRNA表达水平; B: 感染shS100A8慢病毒后淋巴瘤细胞对ADR的耐药性变化; C: 感染shS100A8慢病毒后淋巴瘤细胞对VCR的耐药性变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

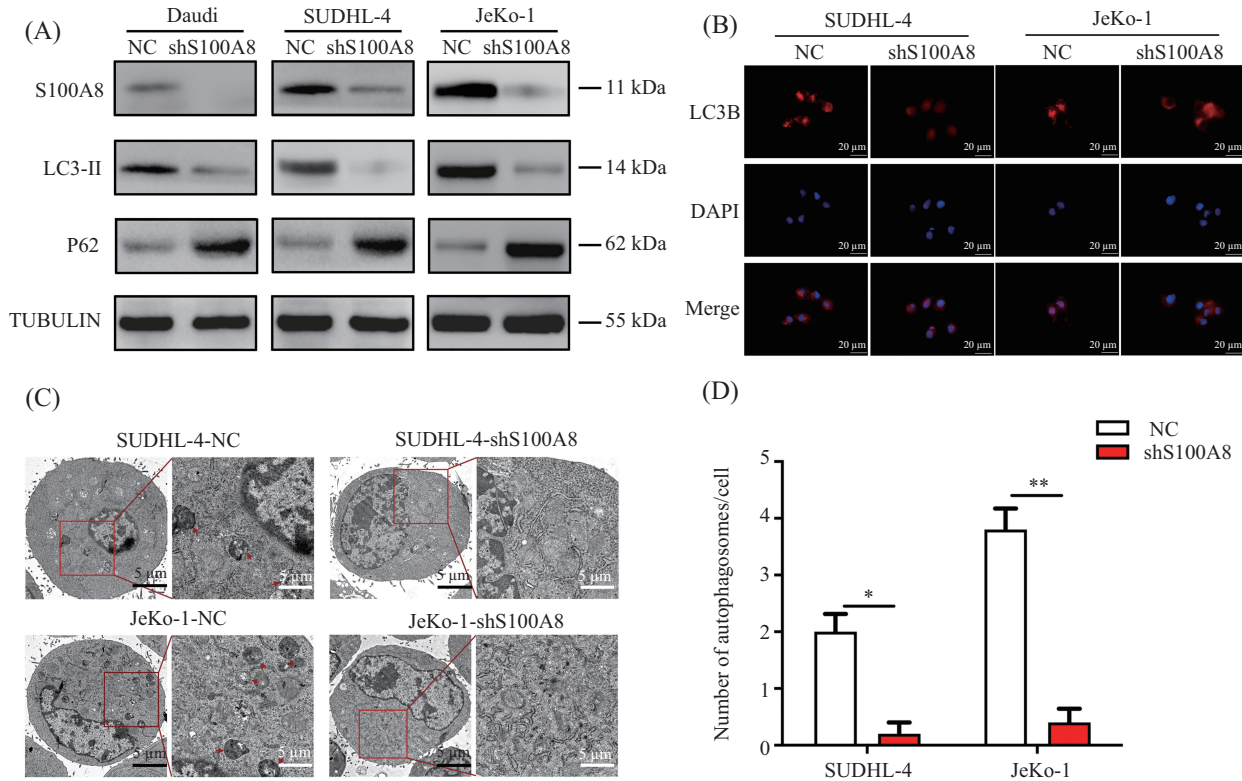
A: the mRNA expression level of *S100A8* gene in lymphoma cells infected by LV-shS100A8; B: effects of interference with LV-shS100A8 on the resistance of lymphoma cells to ADR; C: effects of interference with LV-shS100A8 on the resistance of lymphoma cells to VCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图3 干扰*S100A8*对淋巴瘤细胞耐药性的影响

Fig.3 Effects of *S100A8* interference on the drug resistance of lymphoma cells

进行ADR处理细胞相比, 结合使用3-MA或者CQ处理细胞后, Daudi细胞、SUDHL-4细胞和JeKo-1

细胞的相对活性分别为0.44/0.43、0.37/0.36和0.23/0.22($P<0.001$, 图5A), 与单独进行VCR处理细

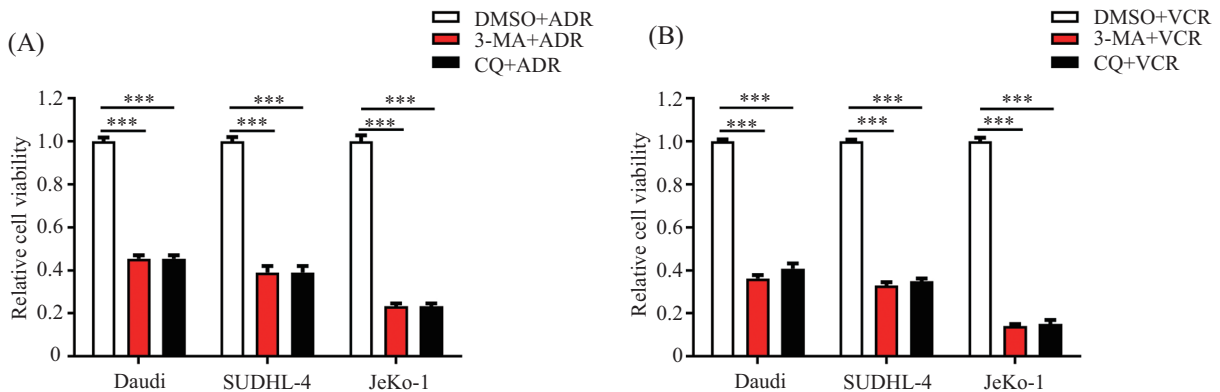


A: 感染shS100A8慢病毒后Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞中S100A8、LC3-I/II和P62蛋白的表达水平; B: 自噬流实验观察感染shS100A8慢病毒后SUDHL-4和JeKo-1细胞中LC3蛋白形态; C: 透射电镜观察感染shS100A8慢病毒后SUDHL-4和JeKo-1细胞中自噬溶酶体; D: 自噬溶酶体数量的统计。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: expression levels of S100A8, LC3-I/II and P62 proteins in Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1 cells infected by LV-shS100A8; B: observation of LC3 protein morphology in SUDHL-4 and JeKo-1 cells infected by LV-shS100A8 by autophagy flow assay; C: observation of autolysosomes in SUDHL-4 and JeKo-1 cells infected by LV-shS100A8 by transmission electron microscope; D: statistics of autolysosomes. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 感染shS100A8慢病毒后淋巴瘤细胞中自噬活性的变化

Fig.4 Changes of autophagy activity in lymphoma cells after interference with LV-shS100A8

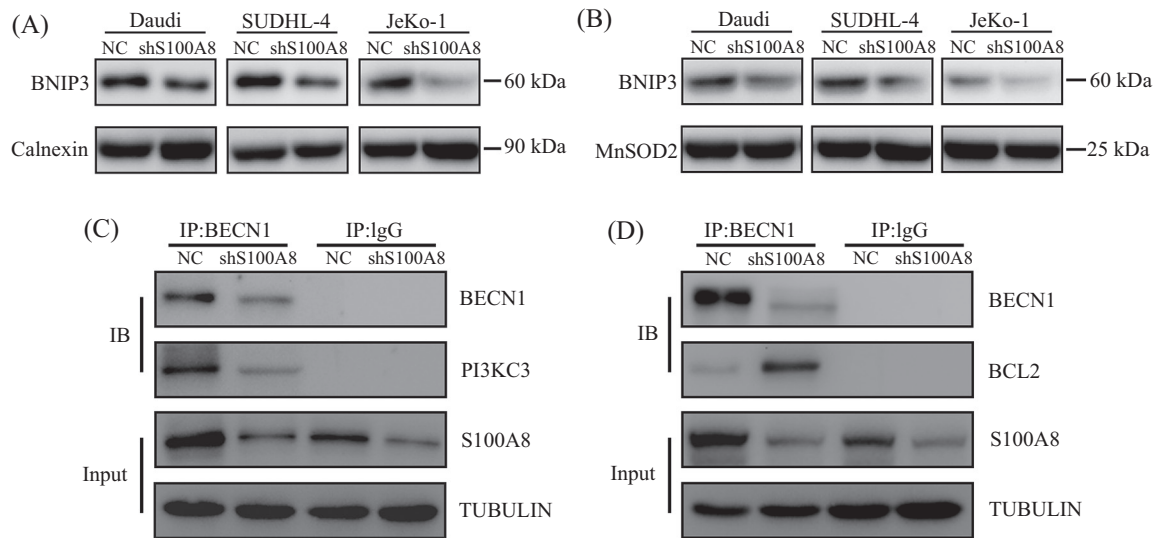


A: 3-MA和CQ处理后淋巴瘤细胞对ADR的耐药性变化; B: 3-MA和CQ处理后淋巴瘤细胞对VCR的耐药性变化。*** $P<0.001$ 。

A: effects of 3-MA and CQ treatments on the resistance of lymphoma cells to ADR; B: effects of 3-MA and CQ treatments on the resistance of lymphoma cells to VCR. *** $P<0.001$.

图5 自噬抑制剂处理对B细胞淋巴瘤细胞耐药性的影响

Fig.5 Effects of autophagy inhibitor treatment on the resistance of B-cell lymphoma cells to ADR and VCR



A: Western blot检测感染shS100A8慢病毒后Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞中内质网BNIP3蛋白的表达; B: Western blot检测感染shS100A8慢病毒后Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞中线粒体BNIP3蛋白的表达; C: 免疫共沉淀实验检测感染shS100A8慢病毒后JeKo-1细胞中BECN1-PI3KC3复合物的表达; D: 免疫共沉淀实验检测感染shS100A8慢病毒后JeKo-1细胞中BECN1-BCL2复合物的表达。

A: Western blot analysis for BNIP3 in ER of Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1 cells infected by LV-shS100A8; B: Western blot analysis for BNIP3 in mitochondria of Daudi, SUDHL-4 and JeKo-1 cells infected by LV-shS100A8; C: co-immunoprecipitation assay for BECN1-PI3KC3 complex in JeKo-1 cells after infection with shS100A8 lentivirus; D: co-immunoprecipitation assay for BECN1-BCL2 complex in JeKo-1 cells after infection with shS100A8 lentivirus.

图6 S100A8促进细胞自噬的机制研究

Fig.6 Study on the mechanisms of S100A8 promoting autophagy

胞相比, 结合使用3-MA或者CQ处理细胞后, Daudi细胞、SUDHL-4细胞和JeKo-1细胞的相对活性分别为0.37/0.42、0.34/0.37和0.15/0.16($P < 0.001$, 图5B)。这些实验结果表明, 使用自噬抑制剂抑制细胞自噬后, Daudi细胞、SUDHL-4细胞和JeKo-1细胞对于ADR和VCR的耐药性显著降低, 且对于自噬活性越高的细胞来说, 自噬抑制剂处理细胞后, 细胞对于ADR和VCR的耐药性的降低程度也越大。

2.6 S100A8促进细胞自噬的机制研究

为了深入研究S100A8促进细胞自噬的分子机制, 我们首先分离并提取了Daudi、SUDHL-4和JeKo-1细胞内质网蛋白和线粒体蛋白, 并通过Western blot实验检测了BNIP3蛋白在内质网和线粒体中的表达水平。实验结果显示, 以钙连蛋白Calnexin作为内质网蛋白内参, 敲低S100A8后, 与其各自阴性对照细胞相比, Daudi-shS100A8、SUDHL-4-shS100A8和JeKo-1-shS100A8细胞中内质网内BNIP3蛋白的表达水平显著降低(图6A); 同时, 以锰超氧化物歧化酶蛋白MnSOD2作为线粒体蛋白内参, 敲低S100A8后, 与其各自阴性对照细胞相比, Daudi-shS100A8、SUDHL-4-shS100A8和JeKo-1-shS100A8细胞中线粒

体内BNIP3蛋白的表达水平也显著降低(图6B)。接下来, 我们利用免疫共沉淀实验检测了S100A8对自噬起始复合物的影响, 实验结果显示, 敲低S100A8后, JeKo-1细胞中BECN1蛋白和BECN1-PI3KC3复合物的表达量显著降低(图6C); 同时, 敲低S100A8后, BECN1-BCL2复合物的表达量显著提高(图6D)。这些实验结果表明, S100A8一方面可以通过促进BNIP3蛋白在内质网和线粒体内的表达进而促进细胞自噬, 另一方面可以通过促进BECN1-PI3KC3复合物的表达、抑制BECN1-BCL2复合物的表达进而促进细胞自噬。

3 讨论

我们对B细胞淋巴瘤生物学的了解已大大增加, 对淋巴恶性肿瘤患者的治疗方案也已大大改进^[20]。化学疗法是几乎所有类型淋巴瘤的主要治疗策略。但是, 耐药性通常使化疗无效, 并对患者的长期无疾病生存产生负面影响。因此, 降低耐药性是目前治疗淋巴瘤的挑战^[21]。

自噬是进化上保守的溶酶体自我消化过程, 对细胞稳态和生存至关重要。癌细胞对化学疗法有多

种反应,从激活生存途径到引发细胞死亡^[22]。接触化疗药物后,淋巴瘤细胞的自噬增加^[23]。许多研究表明,抑制自噬增强了化疗诱导的淋巴瘤细胞死亡,然而,在淋巴瘤细胞中S100A8对自噬和化学耐药性的调控机制尚不清楚^[24]。我们的研究表明,B细胞淋巴瘤细胞的耐药性与自噬活性呈正相关,而S100A8通过激活自噬而与B细胞淋巴瘤细胞的耐药性密切相关。

在此研究之前,已有报道称S100A8通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)作用途径,介导线粒体与溶酶体之间的相互作用进而促进癌细胞的自噬^[18],或通过自噬起始复合物BECN1-PI3KC3的活化来促进癌细胞自噬^[25]。在这项研究中,我们证实了S100A8可以通过促进BECN1-PI3KC3复合物的形成、抑制BECN1-BCL2复合物的形成而促进细胞自噬。BECN1-PI3KC3复合物形成,这是早期自噬信号事件,可显著促进自噬,而S100A8促进BECN1-PI3KC3复合物的形成,正是其促进自噬的重要机制。BCL2与BECN1结合形成BECN1-BCL2复合物,是抑制自噬的重要途径,S100A8通过促进BCL2与BECN1的解离可以显著激活自噬。

LC3B在细胞内加工成其胞质形式LC3B-I,然后与脂质磷脂酰乙醇胺结合,生成LC3B-II形式,这是细胞自噬的核心分子生物学过程^[26]。BNIP3是细胞死亡诱导因子,是BCL-2家族蛋白仅含BH3结构域的亚家族的成员。该亚家族中的蛋白质不像其他BCL-2家族成员那样具有BH1和BH2结构域,而是通过共同的BH3结构域结合相应配体^[27]。BNIP3与LC3B的结合对于自噬小体的形成、自噬小体对目标内质网和线粒体部位的包裹至关重要,尤其对于内质网特异性自噬和线粒体特异性自噬更为重要^[28]。我们的研究表明,S100A8促进了内质网和线粒体中BNIP3的表达,从而促进自噬。

总的来说,我们的研究阐明了S100A8促进自噬的分子机制和通过自噬提高B细胞淋巴瘤细胞耐药性的作用原理,确定了“S100A8-BNIP3/BECN1-PI3KC3复合物-自噬-耐药性”分子机制在自噬调节淋巴瘤细胞耐药性中的作用。这些发现可以为研究B细胞淋巴瘤的耐药性提供新的实验证据。

参考文献 (References)

[1] HOPPE R T, ADVANI R H, AI W Z, et al. NCCN guidelines

- insights: Hodgkin lymphoma, version 1.2018 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2018, 16(3): 245-54.
- [2] SHEPHERD L, RYOM L, LAW M, et al. Differences in virological and immunological risk factors for non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(6): 598-607.
- [3] KLENER P, KLANOVA M. Drug resistance in non-Hodgkin lymphomas [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2081-105.
- [4] CAMPBELL P, MARCUS R. Monoclonal antibody therapy for lymphoma [J]. *Blood Rev*, 2003, 17(3): 143-52.
- [5] SURESH T, LEE L X, JOSHI J, et al. New antibody approaches to lymphoma therapy [J]. *J Hematol Oncol*, 2014, 9(7): 58-69.
- [6] TILLY H, GOMES DA SILVA M, VITOLO U, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(5): 116-25.
- [7] LIU Y, BARTA S K. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(5): 604-16.
- [8] OHSUMI Y. Historical landmarks of autophagy research [J]. *Cell Res*, 2014, 24(1): 9-23.
- [9] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011, 27: 107-32.
- [10] KIM K H, LEE M S. Autophagy—a key player in cellular and body metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(6): 322-37.
- [11] MIZUSHIMA N, KOMATSU M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-41.
- [12] SCRIVO A, BOURDENX M, PAMPLIEGA O, et al. Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(9): 802-15.
- [13] PRUENSTER M, VOGL T, ROTH J, et al. S100A8/A9: from basic science to clinical application [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 167: 120-31.
- [14] WANG S, SONG R, WANG Z, et al. S100A8/A9 in inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 11(9): 1298-311.
- [15] YANG J, ANHOLTS J, KOLBE U, et al. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9: investigation of their immune regulatory effect in myeloid cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(7): 1833-45.
- [16] CHOURASIA A H, MACLEOD K F. Tumor suppressor functions of BNIP3 and mitophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1937-44.
- [17] DHINGRA A, JAYAS R, AFSHAR P, et al. Ellagic acid antagonizes Bnip3-mediated mitochondrial injury and necrotic cell death of cardiac myocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 112: 411-22.
- [18] GHAVAMI S, ESHRAGI M, ANDE S R, et al. S100A8/A9 induces autophagy and apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes that involves BNIP3 [J]. *Cell Res*, 2010, 20(3): 314-31.
- [19] MA Z, CHEN C, TANG P, et al. BNIP3 induces apoptosis and protective autophagy under hypoxia in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: BNIP3 regulates cell death [J]. *Dis Esophagus*, 2017, 30(9): 1-8.
- [20] WITKOWSKA M, SMOLEWSKI P, ROBAK T. Investigational therapies targeting CD37 for the treatment of B-cell lymphoid malignancies [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27(2): 171-

- 7.
- [21] RICHTER-LARREA J A, ROBLES E F, FRESQUET V, et al. Reversion of epigenetically mediated BIM silencing overcomes chemoresistance in Burkitt lymphoma [J]. *Blood*, 2010, 116(14): 2531-42.
- [22] GUNJUR A. Short vs long course adjuvant chemotherapy for colon cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(5): e236.
- [23] GAYLE S, LANDRETTE S, BEEHARRY N, et al. B-cell non-Hodgkin lymphoma: selective vulnerability to PIKFYVE inhibition [J]. *Autophagy*, 2017, 13(6): 1082-4.
- [24] WU K, SUN X Q, WANG C Q, et al. Metronomic combination chemotherapy using everolimus and etoposide for the treatment of non-Hodgkin lymphoma [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(10): 4688-98.
- [25] YANG M, ZENG P, KANG R, et al. S100A8 contributes to drug resistance by promoting autophagy in leukemia cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97242.
- [26] SCHAAF M B, KEULERS T G, VOOIJS M A, et al. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions [J]. *Faseb J*, 2016, 30(12): 3961-78.
- [27] ZHANG J, NEY P A. Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(7): 939-46.
- [28] BIRGISDOTTIR A B, LAMARK T, JOHANSEN T. The LIR motif-crucial for selective autophagy [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 15): 3237-47.