

研究论文

硼替佐米通过阻断自噬溶酶体途径抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖及其作用机制

石小敏, 王 玮, 马铭帅, 张荣娟, 郝长来, 杨新宏, 邢恩鸿, 王丽红, 张志华*

(承德医学院附属医院血液科, 承德 067000)

摘要: 本文探讨了硼替佐米对多发性骨髓瘤细胞系增殖的抑制作用及自噬溶酶体途径在其中可能发挥的作用机制。采用CCK-8法检测了体外培养多发性骨髓瘤细胞株RPMI8226及U266细胞的增殖情况。采用Western blot和RT-PCR法检测自噬相关因子LC3, 溶酶体相关因子LAMP1, 自噬体溶酶体融合相关因子STX17、SNAP29、VAMP8的蛋白质及RNA表达量变化。采用免疫荧光法检测LC3的荧光强度变化。采用溶酶体探针法观察溶酶体数量变化。采用吖啶橙染色法观察酸性小体的数量。结果发现, 硼替佐米对RPMI8226及U266细胞株具有增殖抑制作用, 且随着时间的延长和浓度的增大其抑制作用更明显($P<0.05$); 硼替佐米可以使LC3蛋白、RNA及荧光表达增强、LC3-II/LC3-I蛋白表达水平降低($P<0.05$), 使LAMP1的蛋白质表达上调($P<0.05$)、溶酶体数量增加, 使STX17、SNAP29、VAMP8的蛋白质及RNA表达减少($P<0.05$)。吖啶橙检测结果显示, 硼替佐米抑制的是自噬体溶酶体的融合过程。结果表明, 硼替佐米对多发性骨髓瘤细胞具有增殖抑制作用, 自噬通路的阻断可能是其发挥抗肿瘤功能的作用机制之一; 硼替佐米可以阻断自噬通路引起自噬体及溶酶体的累积增加。这可能是通过其阻断自噬体溶酶体融合实现的。

关键词: 多发性骨髓瘤; 自噬; 溶酶体; 硼替佐米

Mechanism of bortezomib inhibits the proliferation of multiple myeloma cells by blocking autophagosome pathway

SHI Xiaomin, WANG Wei, MA Mingshuai, ZHANG Rongjuan, HAO Changlai,

YANG Xinhong, XING Enhong, WANG Lihong, ZHANG Zhihua*

(Department of Hematology, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

Abstract: To investigate the inhibitory effect of bortezomib on the proliferation of multiple myeloma cell lines and the possible mechanism of autophagic lysosomal pathway, multiple myeloma cell lines RPMI8226 and U266 were cultured *in vitro*, and cell proliferation was detected by CCK-8 method. Western blot and RT-PCR were used to detect the protein and RNA expression levels of autophagy related factors LC3, lysosome related factors LAMP1, and autophagy lysosome fusion related factors STX17, SNAP29 and VAMP8. The fluorescence intensity of LC3 was detected by immunofluorescence method. The quantity of lysosome was observed by lysosome probe. Acridine orange staining was used to observe the number of acidic bodies. Bortezomib had proliferation inhibition on RPMI8226 and U266 cell lines, and for inhibition increased with

收稿日期: 2024-04-03

基金项目: 河北省自然科学基金项目(H2022406041)

第一作者: Email: 2371050200@qq.com

*通信作者: Email: zzhangzhihua@163.com

the increase of time and concentration ($P<0.05$). Bortezomib enhanced the expression of LC3 protein, RNA and fluorescence, decreased the expression level of LC3- II /LC3- I protein ($P<0.05$), increased the protein expression of LAMP1 ($P<0.05$), and increased the number of lysosomes. The protein and RNA expressions of STX17, SNAP29 and VAMP8 were decreased ($P<0.05$). Acridine orange results showed that bortezomib inhibited the fusion process of autophagosomal lysosomes. Bortezomib can inhibit the proliferation of multiple myeloma cells, and the blocking of autophagy pathway may be one of the mechanisms of its anti-tumor action. Bortezomib can block the autophagy pathway and cause the accumulation of autophagosome and lysosome, which may be caused by blocking the fusion of autophagosome lysosome.

Key Words: multiple myeloma; autophagy; lysosome; bortezomib

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是骨髓浆细胞恶性克隆性疾病,其临床表现包括骨质破坏、血钙升高、贫血和肾功能受损等,严重影响患者的身体健康和生活质量^[1]。硼替佐米是治疗MM最常用的药物之一,其抗MM细胞的主要机制有抑制核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)的活性、上调p53和激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路诱导细胞凋亡、通过内质网相关途径发挥细胞毒性作用、抗肿瘤细胞迁移和血管生成等^[2]。有研究发现,自噬机制也参与MM的发生发展和治疗过程,并发挥保护肿瘤细胞生存的作用^[3]。自噬是真核细胞用于降解回收生物大分子的过程,主要包括以下步骤:自噬的起始、自噬体的形成、自噬体与溶酶体的融合、底物的降解。其中,自噬体与溶酶体的融合是自噬完成的关键,二者融合障碍将导致自噬的阻断及待降解物质的堆积^[4]。

目前,针对硼替佐米作用于多发性骨髓瘤自噬的相关研究并不完善,大多数研究只局限在自噬体(LC3、Beclin-1)^[5,6]或溶酶体方面,而对其最关键的融合部分的研究却没有。为了了解完整的自噬过程在硼替佐米治疗MM中发挥的作用机制,本研究将硼替佐米作用于MM细胞株,观察药物抑制作用及自噬体、溶酶体的变化情况、自噬体溶酶体融合情况,探讨硼替佐米治疗MM中完整的自噬溶酶体途径的参与机制,以期对硼替佐米治疗MM的机制研究及自噬在其中的作用提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

RPMI8226和U266细胞购自中美合资博慧斯生

物医药科技有限公司。硼替佐米(规格5 mg/支,型号S1013)、Bafilomycin A1(规格1 mg/支,型号S1413)购自Selleck公司。兔抗人LC3、LAMP1、STX17、SNAP29、VAMP8单克隆抗体购自Abcam公司。 β -actin单克隆抗体、羊抗兔二抗、荧光二抗[ABflo®594-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)]购自Abclonal公司。吖啶橙、溶酶体探针(Lyso-Tracker-Red)购自碧云天生物技术有限公司。Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自DOJINDO公司。BCA蛋白浓度试剂盒购自Solarbio公司。TRIzol试剂购自Invitrogen公司。反转录试剂盒购自TIANGEN公司。引物购自Bebolabs公司。RPMI-1640培养基、胎牛血清购自Procell公司。实时定量PCR仪购自Invitrogen公司。DYY-6C电泳仪购自北京六一生物科技有限公司。OLYMPUS BX60荧光显微镜购自Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含有10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基培养RPMI8226和U266细胞株。将其置于37℃、含有5% CO₂的培养箱中,并进行常规传代培养。

1.2.2 CCK-8法检测硼替佐米对MM细胞增殖的影响

将对数生长期细胞配制成 6×10^4 /孔的最终密度,以每孔100 μ L接种到96孔板中。实验组(As):以细胞与药物体积比为9:1的比例制成细胞药物混悬液后接种于96孔板内,药物浓度为:硼替佐米(3、6、9、12、15 nmol/L),孵育12 h、24 h、48 h。对照组(Ac):细胞90 μ L+10 μ L完全培养基。空白组(Ab):完全培养基100 μ L。每组5个复孔,重复3

次。在培养箱中培养相应时间后, 每孔添加10 μ L CCK-8溶液(避免产生气泡), 然后将96孔板再次孵育2 h后放入酶标仪中, 测定其在450 nm处的吸光度。去除最大值和最小值, 求出平均值, 计算细胞增殖抑制率(%)=(Ac-As)/(Ac-Ab) $\times$ 100%。并求出IC50, 用于确定后续实验药物浓度。

1.2.3 实验分组

运用硼替佐米观察自噬的同时, 将自噬晚期抑制剂巴弗洛霉素A1(Bafilomycin A1, Baf-A1)作为观察自噬的对照, 实验分为4组: 空白对照组(Con)、巴弗洛霉素组(Baf-A1)、硼替佐米组(Bortezomib, Bor)和硼替佐米联合巴弗洛霉素组(Bor+Baf-A1)。

1.2.4 Western blot法检测各组细胞LC3、LAMP1、STX17、SNAP29、VAMP8蛋白的表达量

根据CCK-8方法确定硼替佐米最终实验浓度为6 nmol/L。查阅文献及CCK8法确定Baf-A1浓度为0.5 μ mol/L, 共同作用至24 h。将各组细胞收集后, 加入适量RIPA裂解液裂解细胞并提取蛋白质, 使用BCA法测定浓度。确定50 μ g为蛋白质上样质量, 根据质量/浓度的比值计算上样体积, 进行SDS-PAGE电泳, 后转膜至PVDF膜上, 然后在37 $^{\circ}$ C温箱中用脱脂奶粉溶液封闭1 h。接着加入一抗: LC3(1 : 5 000)、LAMP1(1 : 5 000)、STX17(1 : 2 500)、SNAP29(1 : 2 500)、VAMP8(1 : 2 500), 在4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜。第二天在室温下洗膜3次, 加入羊抗兔二抗(1 : 5 000), 在37 $^{\circ}$ C温箱中孵育0.5 h, 再次洗膜3次。最后, 化学发光仪中显影, 用Image J软件对条带进行灰度值分析, 然后, 将数据归一化处理。

1.2.5 RT-PCR法检测LC3、STX17、SNAP29、VAMP8的mRNA表达水平

首先使用TRIzol法提取总RNA, 然后根据反转录试剂盒说明书的指导合成cDNA。接下来, 以合成的cDNA为模版, 分别使用LC3、STX17、SNAP29、VAMP8基因引物和GAPDH内参引物对目的片段进行扩增。在进行预变性、变性、退火、延伸等步骤后, 绘制熔解曲线并记录Ct值, 最后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算实验结果。各引物序列参见表1。

1.2.6 免疫荧光法检测LC3的荧光强度表达

提取各组细胞, PBS清洗3次, 多聚甲醛固定20 min。PBS清洗3次后将各组细胞均匀涂至玻片上, 待其干燥后, 组化笔圈住所涂细胞部位, PBS孵育15 min, 曲拉通X-100通透10 min, PBS清洗5 min $\times$ 3次。用牛血清白蛋白在室温下封闭30 min后, 加入100 μ L一抗LC3(1 : 500), 4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。第二天, 复温10 min后, 使用PBST清洗3次, 接下来操作于暗室中进行, 滴加100 μ L荧光二抗(1 : 500), 孵育1 h。PBS洗3次, 滴加DAPI工作液, 染色4 min, 再次进行3次清洗, 然后添加抗荧光衰减剂封片。最后, 在荧光显微镜下观察各组LC3表达量的变化。

1.2.7 溶酶体探针(Lyso-Tracker-Red)检测溶酶体的变化

Lyso-Tracker Red工作液的配制。首先将工作液稀释10倍(1 μ L Lyso-Tracker Red+9 μ L细胞培养液), 再取1 μ L稀释好的工作液加入6 mL细胞培养液中, 混匀, 37 $^{\circ}$ C预温育。收集各组细胞至1.5 mL EP管中, 倒掉上清液, 每管加入1 mL预热好的工作液, 37 $^{\circ}$ C培养箱中孵育3 min, 离心去除工作液, 用新的培养液重悬细胞, 滴一滴于玻片

表1 q-PCR引物序列

引物名称	引物序列	扩增片段大小(bp)
LC3-F	5'-GCC TTC TTC CTG CTG GTG AAC C-3'	86
LC3-R	5'-TCC TCG TCT TTC TCC TGC TCG TAG-3'	
GAPDH-F	5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'	138
GAPDH-R	5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGG A-3'	
STX17-F	5'-CGC CGT CTT GAA CCA GCT ATC C-3'	121
STX17-R	5'-ACT TGT CCC AGA TTC TGC ACC TTT G-3'	
SNAP29-F	5'-CGC ACA GAG AAG ATG GTG GAC AAG-3'	147
SNAP29-R	5'-GAG GGT GCC ATT CTG TTC AGG TG-3'	
VAMP8-F	5'-GCA AAG TGA GGT GGA GGG AGT TAA G-3'	136
VAMP8-R	5'-TGT CGT CTT GAA GTG CTC AGA TGT G-3'	

上, 荧光显微镜下观察。

1.2.8 吖啶橙法检测酸性小体的表达量

首先收集各组细胞, 随后进行3次PBS清洗, 最终将细胞用1 mL PBS重悬至EP管中。取0.1 μ L吖啶橙混于细胞悬液中避光染色3 min, PBS清洗2次, 滴一滴于载玻片上, 荧光显微镜下蓝色荧光观察并拍照。

1.2.9 统计学处理

数据分析和绘图使用SPSS 25.0和Graphpad Prism9.0软件, 符合正态分布的计量资料, 可用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异采用独立样本 t 检验; 不符合正态分布的计量资料以M(Q1, Q3)表示, 使用单因素方差分析进行多组均数比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 硼替佐米对MM细胞具有杀伤作用

硼替佐米以不同浓度(3、6、9、12、15 nmol/L)处理RPMI8226和U266细胞株不同时间(12、24、48 h)后, 用CCK-8法检测细胞的增殖抑制率, 相关数据见图1。实验结果表明, 随着硼替佐米浓度和处理时间的增加, 两种细胞系的增殖抑制率逐渐增加, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。计算IC₅₀分别为10.88 nmol/L、10.09 nmol/L。经查阅文献得知做自噬相关实验时药物浓度应小于IC₅₀较适合, 且预实验结果证实, 硼替佐米在6 nmol/L时后续实验结果相对稳定, 所以确定最终实验浓度为6 nmol/L。

2.2 硼替佐米可以促进RPMI8226及U266细胞株自噬体的表达增加

如图2A和图2B所示, 与对照组比较, 硼替佐

米组RPMI8226及U266细胞株LC3总蛋白质表达增强、LC3-II/LC3-I蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时观察到, 硼替佐米与巴弗洛霉素联合应用后与巴弗洛霉素组比较, LC3-II/LC3-I蛋白水平无上升趋势。结果证明, 硼替佐米的作用不是促进自噬体合成, 其自噬体增多可能是由于自噬流被抑制导致的。

与对照组比较, 硼替佐米组RPMI8226及U266细胞株LC3 mRNA表达增加(图2C和图2D)、免疫荧光强度表达增强(图2E和图2F), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

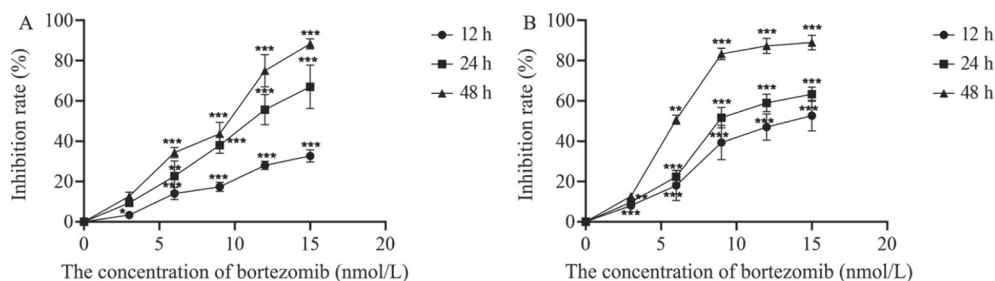
2.3 硼替佐米可以促进RPMI8226及U266细胞株溶酶体的表达增加

2.3.1 Western blot法检测不同药物对RPMI8226及U266细胞系溶酶体相关因子LAMP1蛋白表达的影响

如图3所示, 与对照组比较, 硼替佐米单药组及Baf-A1单药组溶酶体相关因子LAMP1的蛋白质表达水平上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

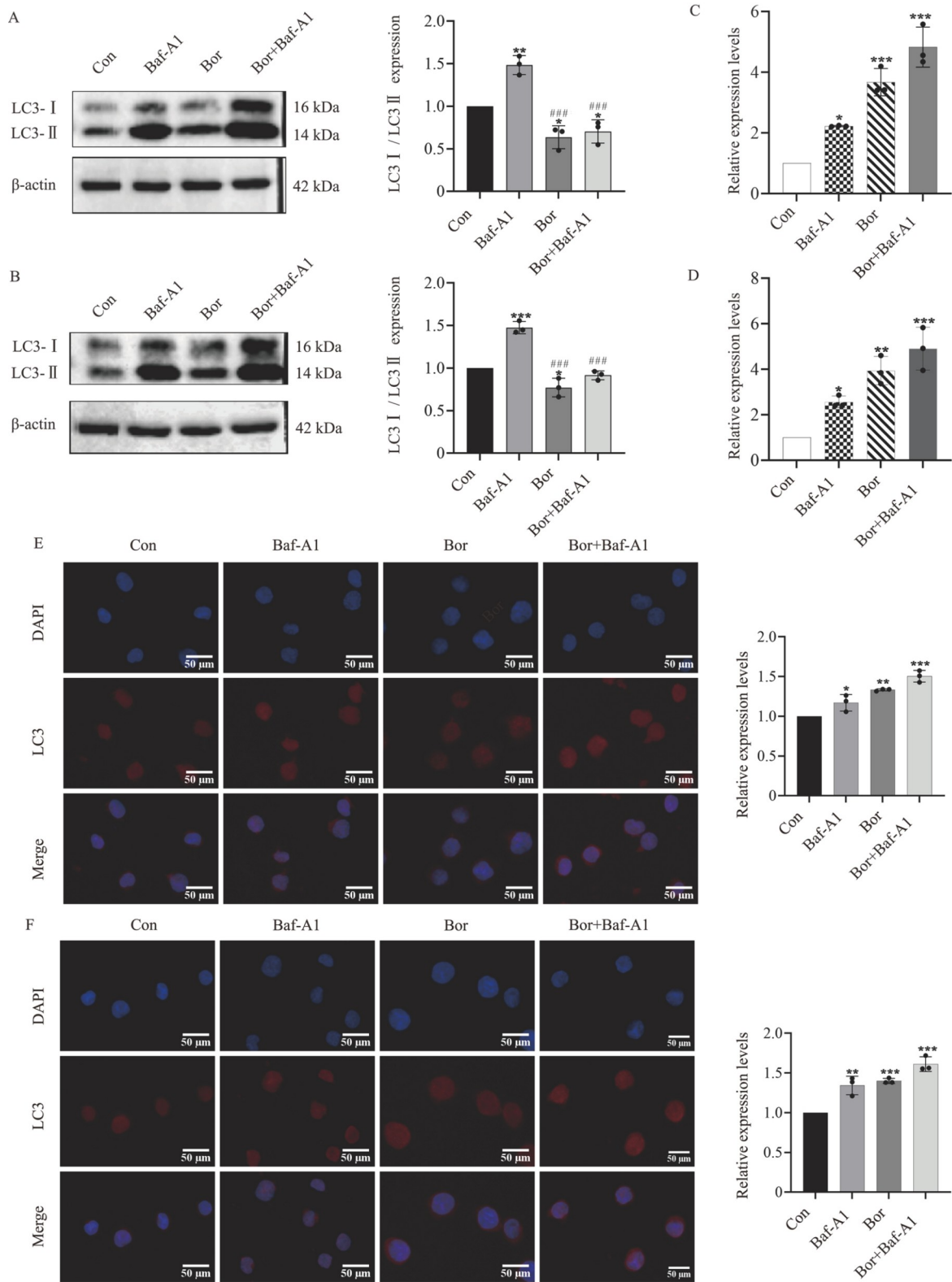
2.3.2 溶酶体探针法检测不同药物组处理MM细胞株溶酶体数量的变化

溶酶体探针(lysotracker)是一种碱性荧光染料, 用于活细胞溶酶体染色, 可以与细胞内的酸性环境相互作用, 用于标记细胞内的溶酶体。荧光信号强度与溶酶体内的酸性程度成正比。结果提示, 与对照组比较, 硼替佐米组红色点状溶酶体增加, 即硼替佐米可以使RPMI8226和U266细胞系溶酶体增加; 与空白对照组相比, Baf-A1组红色点状消失, 因为Baf-A1可以抑制溶酶体酸化, 所以观察不到红色点状(图4和图5)。



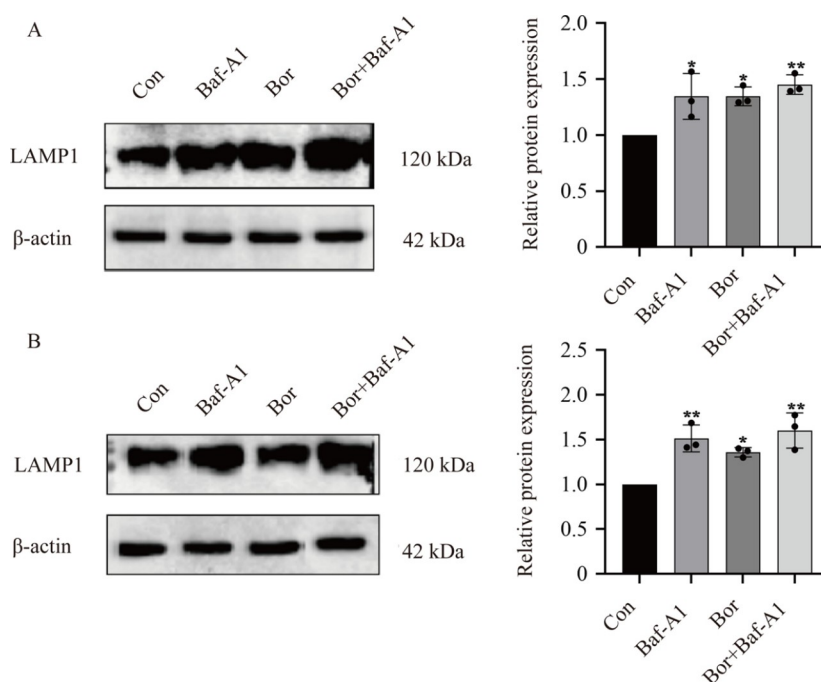
A: 硼替佐米对RPMI8226细胞系的抑制率; B: 硼替佐米对U266细胞株的抑制率。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与空白对照组比较

图1 CCK-8法检测不同浓度硼替佐米处理MM细胞不同时间的增殖抑制率



A、B: Western blot法检测不同药物处理RPMI8226(A)及U266(B)细胞系LC3蛋白表达条带及LC3-II/LC3-I 蛋白相对表达量的变化; C、D: RT-PCR法检测不同药物处理RPMI8226(C)和U266(D)细胞系LC3 mRNA相对表达量的变化; E、F: 免疫荧光法检测不同药物组对RPMI8226(E)和U266(F)细胞系LC3荧光强度及相对表达量的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与空白对照组比较; ### $P<0.001$, 与Baf-A1组比较

图2 硼替佐米对RPMI8226及U266细胞株自噬体的影响



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较

图3 Western blot法检测不同药物处理RPMI8226细胞系(A)及U266细胞系(B) LAMP1蛋白表达量的变化

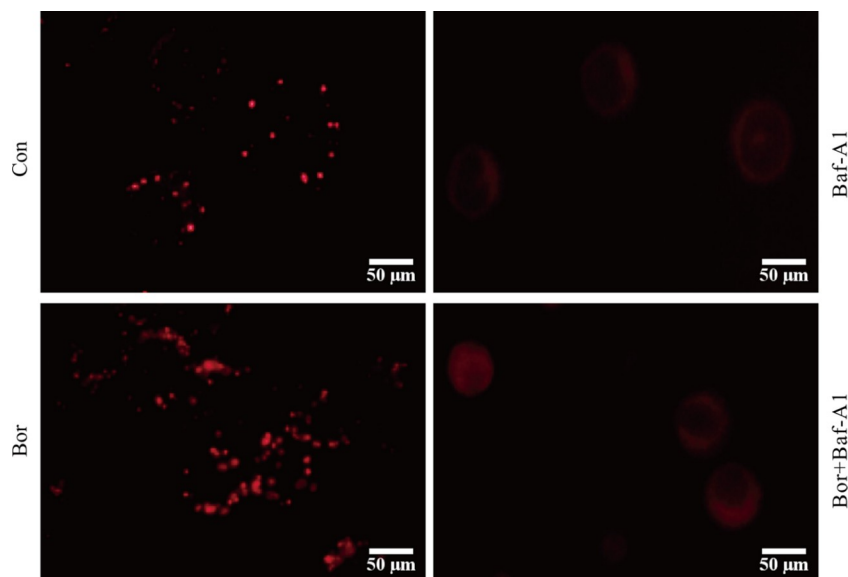


图4 溶酶体探针法检测不同药物处理RPMI8226细胞系溶酶体表达量的变化

2.4 硼替佐米可以阻断RPMI8226及U266细胞株自噬体溶酶体的融合

2.4.1 Western blot法及RT-PCR法检测不同药物组自噬体溶酶体融合相关因子的蛋白质及mRNA表达的变化

与对照组比较, 硼替佐米组自噬溶酶体融合相关因子STX17、SNAP29、VAMP8的蛋白质及

mRNA表达水平下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 即硼替佐米可以阻止自噬体与溶酶体融合; Baf-A1对这些因子的影响无统计学意义, 可能原因是Baf-A1通过抑制 H^+ -ATPase来阻止自噬体酸化从而阻断自噬体溶酶体融合及溶酶体的降解过程, 而不是通过阻止STX17、SNAP29、VAMP8复合体的生成(图6)。

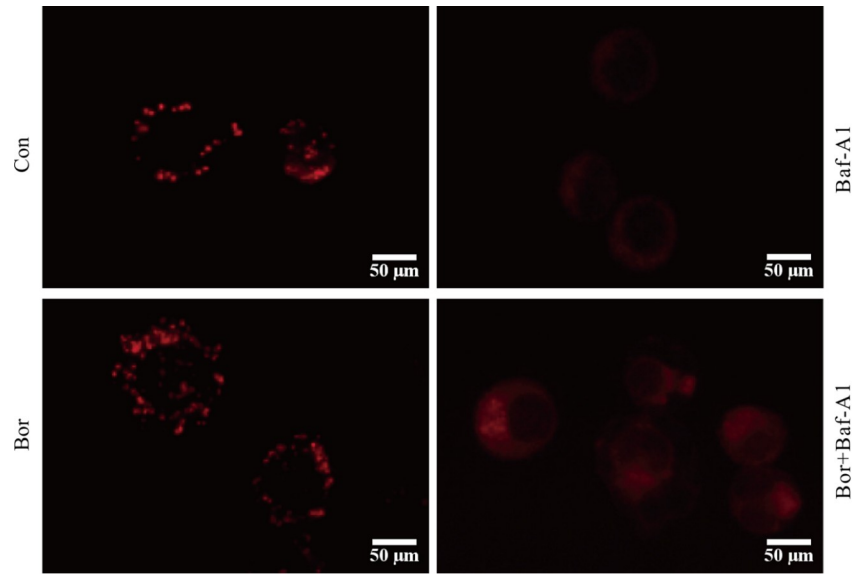


图5 溶酶体探针法检测不同药物处理U266细胞系溶酶体表达量的变化

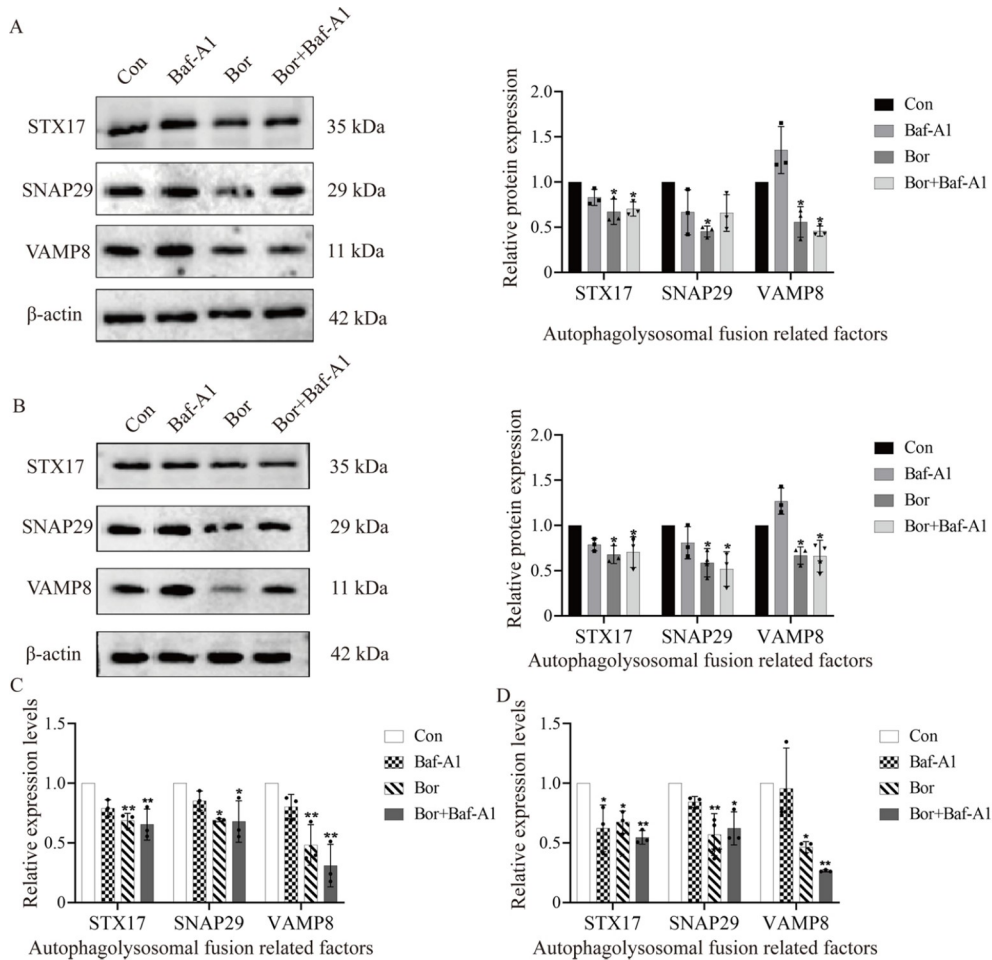

 A、B: Western blot法检测不同药物处理RPMI8226(A)及U266(B)细胞系自噬溶酶体融合相关因子蛋白表达条带和蛋白质相对表达量的变化; C、D: RT-PCR法检测不同药物处理RPMI8226(C)和U266(D)细胞系自噬溶酶体融合相关因子mRNA相对表达量的变化。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与空白对照组比较

图6 硼替佐米对RPMI8226及U266细胞株自噬体溶酶体融合的影响

2.4.2 吖啶橙染色检测自噬体溶酶体融合的变化

吖啶橙是一种特异性染料,可穿透完整细胞膜的细胞,并使细胞核DNA发出亮绿色荧光。它还可进入酸性细胞器,在显微镜下呈现红色斑点,被称为酸性小体。结果显示,硼替佐米组较空白对照组红色的点状酸性小体增多。因为自噬体内腔pH约为7,而溶酶体pH约为4,自噬体与溶酶体融合后,腔内pH值降为4,因此红色点状小体可能为溶酶体或自噬溶酶体。众所周知,Baf-A1为 H^+ -ATPase抑制剂,可以通过抑制 H^+ -ATPase阻止自噬体酸化,从而阻止自噬体溶酶体融合,也可以抑制细胞溶酶体的酸化和蛋白质的降解。因此,当联合Baf-A1后,红色点状消失,证明不是已经合成的自噬溶酶体的减少、而是硼替佐米导致的增多的溶酶体酸化减少。由此亦证明,硼替佐米阻碍的是自噬体和溶酶体的合成过程(图7和图8)。

3 讨论

多发性骨髓瘤是血液系统第二大肿瘤,以单克隆浆细胞恶性增殖为特征,导致未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网大量堆积。但当骨髓中未折叠蛋白质过多而泛素-蛋白酶体系统不足以处理时,自噬-溶酶体途径被激活以作为一种促进肿瘤细胞生存的策略,帮助肿瘤细胞清除大量积累的有害的、错误折叠的蛋白质聚集物并为其提供能量,以促进MM细胞的存活^[7]。研究发现,自噬广

泛存在于骨髓瘤细胞中并作为一种保护机制,然而,过度的自噬激活也可能引起细胞自噬性死亡^[8]。此外,有研究证明,MM细胞还可以通过多种机制诱导自噬,引起细胞对硼替佐米耐药^[3,9]。因此,深入研究自噬在硼替佐米治疗多发性骨髓瘤中的作用机制具有重要意义。

细胞自噬是一个动态过程。首先,ULK1复合物介导自噬的起始并形成吞噬泡;接下来,吞噬泡逐渐延伸形成自噬体,LC3-II是自噬体成熟的标志;然后,自噬体与溶酶体融合,在此过程中,STX17-SNAP29-VAMP8复合体的形成发挥着重要作用^[10]。如果此复合体形成发生障碍,就会影响自噬体与溶酶体的融合过程,进而导致自噬过程受阻和自噬体的积累^[11]。最后,自噬溶酶体对底物进行降解并回收利用,自噬结束。

目前关于硼替佐米在不同疾病中影响自噬机制的研究结果并不统一,有人认为,硼替佐米可以诱导自噬的发生^[12];也有人认为,硼替佐米的作用是阻断自噬过程,其阻断机制也各有异同^[13,14]。然而在多发性骨髓瘤中,硼替佐米影响自噬的具体机制并不明确,大多数人只验证了自噬的前半部分,却忽略了最关键的后半部分。因此,本文通过检测LC3的变化间接反应自噬体的水平,检测LAMP1的变化反应溶酶体的水平,检测STX17、SNAP29、VAMP8的变化反应自噬体溶酶体融合的过程,以验证完整的自噬通路在硼替佐米治疗MM中的作用机制。

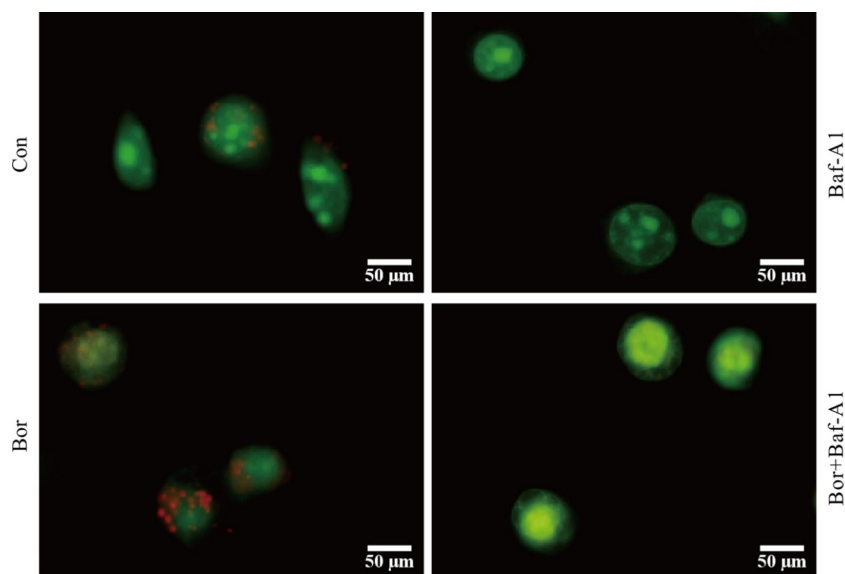


图7 吖啶橙染色法检测不同药物处理RPMI8226细胞系酸性小体的表达量

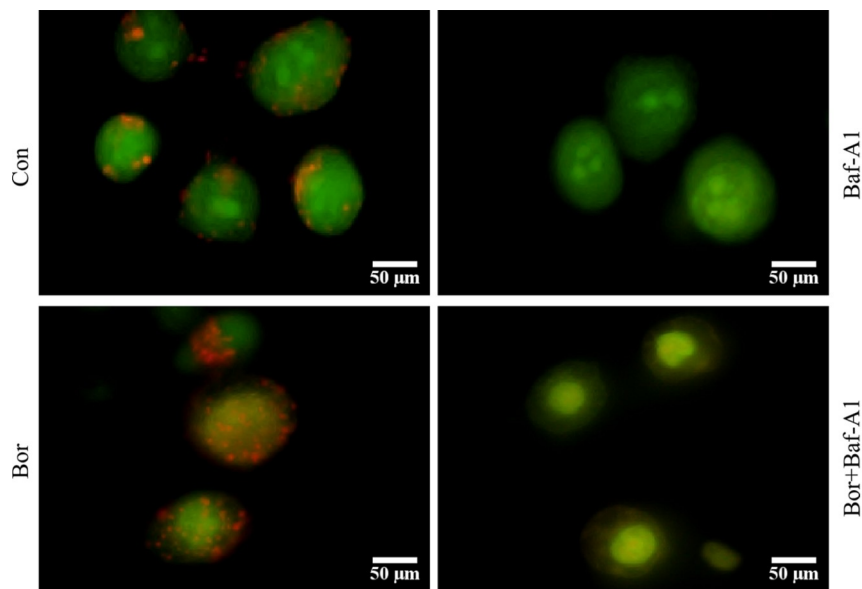


图8 吡啶橙染色法检测不同药物处理U266细胞系酸性小体的表达量

本课题组既往实验结果证明, 硼替佐米作用于多发性骨髓瘤RPMI8226及U266细胞系, 可以抑制其增殖, 使TFEB表达增加并且向细胞核易位, 并且可以使自噬体及溶酶体表达增加, *TFEB*基因沉默可逆转硼替佐米对MM细胞系的抑制作用^[15]。然而, 关于自噬体增加主要有两种途径, 一是促进自噬的诱导(自噬起始和自噬体合成), 二是抑制自噬体降解(抑制自噬体与溶酶体融合或阻碍溶酶体降解)。为此本实验重点观察了自噬体与溶酶体融合的部分, Western blot及RT-PCR结果显示, 与对照组相比, 硼替佐米组自噬体溶酶体融合相关因子STX17、SNAP29、VAMP8的蛋白质及RNA的表达是下降的, 结合吡啶橙结果显示硼替佐米抑制的是二者的融合过程, 因此说明了硼替佐米的作用是阻断自噬。

为了更加明确此想法, 我们以巴弗洛霉素作为对照共同作用于骨髓瘤细胞系, 巴弗洛霉素是一种明确的自噬晚期抑制剂, 可以干扰自噬体与溶酶体的融合从而阻断自噬通路^[12,16]。结果显示, 与空白对照组比较, Baf-A1单药组LC3及LAMP1的表达增加, 即其诱导的自噬阻滞与硼替佐米引起的结果一致, 说明硼替佐米确实可以阻断自噬通路。因为自噬是一个动态过程, 自噬阻断便会导致自噬体和溶酶体的积累增加。

大多数研究单方面认为, LC3等自噬因子的升

高即表明自噬诱导, 但是由于自噬体的积累可能是由于通量的增加或“货物”降解的减少导致, 因此在不调查货物降解是否也发生了的情况下, 不能仅根据LC3脂化得出自噬通量调节的结论。本文通过验证硼替佐米作用于多发性骨髓瘤细胞中完整的自噬溶酶体通路的参与机制, 证明了硼替佐米可以通过阻断自噬体-溶酶体的融合过程, 阻断自噬通路, 引起自噬体及溶酶体的表达增加, 完善了硼替佐米治疗MM中自噬通路的机制研究。然而, 我们的实验也有一些不足之处: 没有检测待降解物质的降解情况, 以进一步证明自噬通路被阻断; 由于实验条件有限, 没有在电子显微镜下观察自噬体的形态及检测自噬流的变化情况, 以更明确地观察自噬体溶酶体融合情况, 后期将进一步完善。

综上所述, 我们的实验首次证明了硼替佐米在多发性骨髓瘤细胞中的作用是阻断自噬过程; 相当于破坏了MM细胞的一种自我保护机制, 这也许是硼替佐米发挥抗MM细胞功能的新的作用机制。目前, 各种各样的小分子自噬调节药物层出不穷, 上述结论为硼替佐米联合靶向自噬治疗MM提供了新思路。

参考文献

- [1] Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J*

- [Hematol](#), 2020, 95(5): 548-567
- [2] 赵娜, 杨俊杰. 蛋白酶体抑制剂硼替佐米治疗多发性骨髓瘤的分子机制. 白血病·淋巴瘤, 2011, 20(11): 698-700
- [3] Hamed KR, Harmon KA, Goodwin RL, et al. Autophagy and the bone marrow microenvironment: a review of protective factors in the development and maintenance of multiple myeloma. [Front Immunol](#), 2022, 13: 889954
- [4] Pellegrini FR, De Martino S, Fianco G, et al. Blockage of autophagosome-lysosome fusion through SNAP29 O-GlcNAcylation promotes apoptosis via ROS production. [Autophagy](#), 2023, 19(7): 2078-2093
- [5] 王静, 李芳, 蒋鸣, 等. 猪苓多糖联合硼替佐米促进多发性骨髓瘤U266细胞的凋亡和自噬. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(12): 923-928
- [6] 姚建作, 吴远博, 赵钢军, 等. SNAP25蛋白亚家族在细胞自噬中的作用. 生命的化学, 2021, 41(8): 1796-1802
- [7] Yun Z, Zhichao J, Hao Y, et al. Targeting autophagy in multiple myeloma. [Leukemia Res](#), 2017, 59: 97-104
- [8] Zheng Z, Wang L, Cheng S, et al. Autophagy and Myeloma. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 625-631
- [9] Kozalak G, Koşar A. Autophagy-related mechanisms for treatment of multiple myeloma. [Cancer Drug Resist](#), 2023, 6: 838-57
- [10] Jian F, Wang S, Tian R, et al. The STX17-SNAP47-VAMP7/VAMP8 complex is the default SNARE complex mediating autophagosome-lysosome fusion. [Cell Res](#), 2024, 34: 151-168
- [11] Tang Q, Gao P, Arzberger T, et al. Alpha-synuclein defects autophagy by impairing SNAP29-mediated autophagosome-lysosome fusion. [Cell Death Dis](#), 2021, 12(10): 854
- [12] Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, et al. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. [Int J Oncol](#), 2011, 38(3): 643-654
- [13] Rahman MA, Engelsen AST, Sarowar S, et al. Bortezomib abrogates temozolomide-induced autophagic flux through an ATG5 dependent pathway. [Front Cell Dev Biol](#), 2022, 10: 1022191
- [14] 曹倩颖, 郑豪, 王娅玲, 等. 玉米赤霉烯酮致PC12细胞自噬流阻滞的相关作用机制. 畜牧兽医学报, 2022, 53(4): 1270-1279
- [15] Zhang R, Yang X, Shi X, et al. Bortezomib modulated the autophagy-lysosomal pathway in a TFEB-dependent manner in multiple myeloma. [Leukemia Res](#), 2024, 138: 107455
- [16] 闫玉梅. 巴弗洛霉素A1诱导肝癌细胞死亡机制的研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2017