

DOI: 10.13376/j.cbls/2015022

文章编号: 1004-0374(2015)02-0151-10

# 细胞自噬与肿瘤的关系研究进展

杨 晨, 李 萍, 梁廷明\*

(南京师范大学生命科学学院 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 南京 210023)

**摘要:** 细胞自噬 (autophagy) 在肿瘤的发生发展过程中扮演着非常重要的角色。自噬作用是细胞的一种自我保护机制, 是真核细胞用于清除细胞内聚物及受损细胞器, 进而维持细胞内稳态的一种蛋白质降解途径。从细胞自噬的类型及其形成, 细胞自噬的分子调控机制, 自噬对肿瘤发生及发展、以及治疗耐药等恶性行为的影响, 肿瘤中自噬与预后的关联, 干预自噬对肿瘤治疗的影响和细胞自噬的研究方法等方面进行综述, 以期为肿瘤的治疗提供新思路。

**关键词:** 细胞自噬; 肿瘤; 信号通路

**中图分类号:** Q25; R730.231 **文献标志码:** A

## Research progress on the relationship between autophagy and tumorigenesis

YANG Chen, LI Ping, LIANG Ting-Ming\*

(Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, College of Life Science,  
Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Autophagy plays an important role in the occurrence and development of tumor. Autophagy is one of self-protective mechanisms, and it is one of protein degradation pathways through removing polymer and damaged organelles to maintain cellular homeostasis. In this review, we mainly summarized the types of autophagy and its formation, the molecular regulation mechanism, the effects of autophagy in cancer development and drug resistance, the correlation between autophagy and prognosis in tumor, the effects of intervention of autophagy in tumor therapy and the research methods about autophagy, which may provide some new ideas for the treatment of tumor.

**Key words:** autophagy; tumor; signal pathways

## 1 细胞自噬

### 1.1 细胞自噬的概念

细胞自噬 (autophagy) 是进化上趋于保守的过程, 它包括溶酶体对细胞内细胞器和细胞胞质部分的降解<sup>[1]</sup>。自噬性细胞死亡是一种不同于凋亡、不依赖于 Caspase 途径的程序性细胞死亡过程, 营养匮乏、过氧化损伤、DNA 损伤等都可以诱导自噬发生。根据包裹内容物和运输方式的不同, 自噬可以被分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。巨自噬, 即细胞内老化或受损的细胞器或蛋白质被起源于内质网和高尔基体的双层膜性小泡包裹, 并送入溶酶体的过程。在微自噬中, 溶酶体直接内陷包裹损伤细胞器并降解, 没有自噬泡的形成过程。

分子伴侣介导的自噬则是胞浆内的蛋白质分子结合到分子伴侣上, 通过分子伴侣的作用转运到溶酶体中。结合分子伴侣的蛋白都是可溶的, 所以此途径是有选择性的, 而前两者则无选择性<sup>[2]</sup>。

### 1.2 自噬的动态发生过程

自噬是双层膜结构的自噬泡降解细胞内容物的代谢过程, 包括自噬体的形成、自噬底物向溶酶体的运送和在溶酶体内降解的整个过程<sup>[3]</sup>。主要由以

收稿日期: 2014-04-24; 修回日期: 2014-06-05

基金项目: 国家基础科学人才培养基金(J1103507);  
江苏省优势学科建设项目(PAPD); 江苏省高校自然科学基金(12KJB360001)

\*通信作者: E-mail: tmliang@njnu.edu.cn

下几个步骤组成,即自噬启动、囊泡成核、囊泡伸展、囊泡回缩,以及自噬小体与溶酶体融合,最终引起包裹物降解。当细胞受到 ULK 复合物的激活而启动自噬后,胞浆中的蛋白质和脂质在 Beclin1-PI3K III 复合物的作用下被不断募集用于形成自噬体膜。Phospho-mTOR (mammalian target of rapamycin) 和 Beclin1 为自噬启动的重要标志物,这是自噬泡双层膜形成的第一步,形成的小的膜性结构称为前自噬体,它与内质网和线粒体等膜性结构相似,都起源于原生质膜<sup>[4]</sup>。之后,前自噬体的双层膜开始扩大伸展,此过程中需要泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2 以及泛素连接酶 E3 的类似物共同参与<sup>[5]</sup>。不断延伸的前自噬体将胞浆中老化、受损的细胞器等包裹在双层膜内,形成球状自噬体。Atg16L1 前体的成熟需要经历依赖 SANRE 蛋白 VAMP7 及其伴侣 SANREs 的同型融合,这一过程调节着自噬泡的形成,并决定囊泡的大小<sup>[4]</sup>。囊膜成核后,p62 可与上调自噬的因子,如 ULK1 共定位于自噬泡膜上,这种定位需要的是 p62 的自身寡聚化而不是 LC3 的结合<sup>[6]</sup>。因此,p62 也可用于检测自噬的发生。最终,自噬泡运动到溶酶体附近,与溶酶体膜在 LC3 和 GATE-16 N 末端的参与下发生融合<sup>[7]</sup>,使包裹在自噬泡中的内容物降解。水解得到的产物如氨基酸、核酸等又可以被重新运回细胞质中,参与物质代谢。

### 1.3 细胞自噬的重要生理功能

在营养充足的条件下,自噬水平较低,仅在胞质中去除受损和老化的细胞器以维持细胞内环境稳态。营养匮乏时,细胞中的自噬基因迅速表达,启动自噬来维持细胞的能量供应和代谢状况,增强细胞在应激状态下的存活率<sup>[8]</sup>,维持细胞内稳态。细胞内环境的稳态可以使细胞免除毒素的侵害,因此,自噬是大多数细胞对于多方面的适应性反应<sup>[1]</sup>。

在人类肿瘤中,自噬扮演着十分重要的作用,这种作用是环境依赖性的。作为一个细胞存活的通路,自噬的激活能够防止长期的组织损伤和细胞死亡,这就能降低肿瘤发生的风险<sup>[9]</sup>。Rosenfeldt 等<sup>[10]</sup>的研究表明,携带致癌基因并且敲除 p53 的小鼠自噬受到抑制,导致葡萄糖摄取量增加,加速了肿瘤的发生。然而,一旦肿瘤形成后,自噬就能够促进肿瘤的发展,它能够去除肿瘤细胞中具肿瘤原性的蛋白底物、毒性蛋白和受损细胞器来促进肿瘤的发生,或者通过自噬介导的细胞内循环来提供新陈代谢底物,维持线粒体的重要功能<sup>[11]</sup>。

## 2 细胞自噬关键基因参与调控肿瘤发生的分子机制

### 2.1 促进细胞自噬的调控基因

自噬对于肿瘤有着双重作用。在肿瘤的早期生长阶段,自噬起着抑癌的作用,而随着肿瘤的生长,为了适应营养缺乏和低氧,细胞会启动自噬,从而保护自身,这一阶段自噬则有保护肿瘤细胞的作用。上调自噬的关键分子很多,现在仅以 Beclin1 和 FoxO 为例做具体阐述。Beclin1 作为一个重要的自噬调控蛋白,是一种重要的抑癌蛋白,其在乳腺癌、胃癌和肝癌中表达下调。2013 年,Deng 等<sup>[12]</sup>研究表明,LC3 和 Beclin1 的下调与肾的透明细胞癌相关。

#### 2.1.1 Beclin1 家族及相关基因

Beclin1 是酵母自噬基因 Atg6/Vps30 的同源物,也称为 BECN1。Beclin1 是 Liang 等<sup>[13]</sup>在致死性 Sindbis 病毒性脑炎的大鼠中发现的一种相对分子质量为  $60 \times 10^3$ ,与 Bcl-2 相互作用的蛋白质,并且这种蛋白质能抑制 Sindbis 病毒的复制,他们将编码这种蛋白质的基因命名为 *beclin1*。*beclin1* 位于人染色体 17q21,含有 12 个外显子,由 BH3、中央螺旋区 (CCD) 和进化保守区 (ECD) 3 个结构域组成,这些结构域是其与其他分子相互作用的部位。自噬体的形成受到自噬相关蛋白 Beclin1 的调控。Beclin1 与一个多蛋白复合体 (包括 hVps34、PI3KC3、p150 和 Atg14L 或 UVRAG) 相结合<sup>[14]</sup>。当 Beclin1-PI3KC3 复合物形成和激活时,会产生自噬效应器募集物的第二信使 PI3P<sup>[15]</sup>。AMPK 可以通过磷酸化 Beclin1 的 S91/S94 激活 Vps34 来诱导自噬<sup>[16-17]</sup>。最新研究发现,当激活的 EGFR (epidermal growth factor receptor) 与自噬相关蛋白 Beclin1 耦连时,导致 Beclin1 多个位点的磷酸化,提高了其对各个抑制物的结合活性,降低了与 Beclin1 结合的 Vps34 激酶的活性,从而抑制自噬的活性。对非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞使用 EGFR 抑制物处理,可以有效地诱导自噬的产生,这与其促进 Beclin1 酪氨酸磷酸化并降低其与其抑制物的结合有关<sup>[17]</sup>。调控 Beclin1 的分子有很多,其中与 Beclin1 相连的 UVRAG、Bif-1 和 Ambral (activating molecule in beclin 1-regulated autophagy) 可以促进自噬,而 Bcl-2 可以抑制自噬<sup>[14]</sup>。

Beclin1 与 Bcl-2 家族有关,Maiuri 等<sup>[18]</sup>证实了 Beclin1 通过 BH3 区与 Bcl-2 蛋白家族结合。Bcl-2 通过与 Beclin1 的 BH3 结合从而下调细胞的自噬。Beclin1-Vps34 复合体的激酶活性被 Bcl-2 家

族调控, 当 Beclin1 与 Vps34 相互作用受到干扰时, Beclin1 二聚体的形成受阻, 导致自噬体无法形成<sup>[19]</sup>。2010年, Maejima 等<sup>[20]</sup>研究表明, Mst 通过磷酸化 Beclin1 上 BH3 结构域中的 Thr108, 增强了 Beclin1 与 Bcl-2 或 Bcl-xl 的结合, 从而抑制了自噬。而 Bcl-2 从 Beclin1 上解离是通过激活 AMPK 实现的, 此时可以激活自噬从而使细胞免于凋亡, 这对于阻止糖尿病心肌病有重大意义<sup>[21]</sup>。

有研究表明, 在营养缺乏时, 刺激 ROCK1 (The Ser/Thr Rho kinase) 使其与 Beclin1 结合并磷酸化 Thr199 从而促进了自噬。这与其抑制 Beclin1 与 Bcl-2 的结合相关。当抑制 ROCK1 的活性时, Beclin1 与 Bcl-2 的结合活性提高, 因此, 减少了营养缺乏时自噬的产生。基因敲除 ROCK1 的小鼠, 自噬的产生也明显减少, 表明 ROCK1 可以上调 Beclin1 介导的自噬, 从而保持自噬与凋亡的平衡<sup>[22]</sup>。

作为抗紫外线相关基因的产物, UVRAG 是一个重要的肿瘤抑制因子, 它与 Beclin1 的 CCD 结构域结合, 激活 Beclin1-PI3KC3 复合物而促进自噬体的形成, 并且当肿瘤细胞受到凋亡刺激时, UVRAG 通过控制 Bax 在胞质中的定位, 从而保护了肿瘤细胞<sup>[23]</sup>, 而 PKB/Akt 可以通过抑制 UVRAG 的表达来抑制自噬。Yang 等<sup>[24]</sup>在 293T 瞬时转染系统和乳腺癌细胞中, 发现 Akt1 通过下调 UVRAG, 从而抑制了自噬。在 UVRAG 单等位基因突变的人类结肠癌细胞中, 细胞自噬的水平并没有发生显著改变, 这表明可能是其他机制而非细胞自噬水平的改变导致了结肠癌的发生<sup>[25]</sup>。

Bif-1 与细胞凋亡相关蛋白 Bax 相关, 是一个重要的抑癌蛋白。Schlauder 等<sup>[26]</sup>研究发现, Bif-1 在 Merkel 细胞癌中表达增加与 Bax 的蛋白表达水平低有关, 免疫组化实验结果表明 Bif-1 的下调与 Merkel 细胞癌的发生有关。Bif-1 通过其 SH3 结构域结合 UVRAG 激活 Class III -PI3K, 诱导自噬的发生<sup>[27]</sup>, 并且 Bif-1 对于依赖于自噬途径的受损伤的线粒体的清除是必不可少的, 因为 Bif-1 的缺失导致了内质网中未成熟自噬体的积累, 并且抑制了自噬体的成熟<sup>[28]</sup>。2012年, Runkle 等<sup>[29]</sup>的研究提示, Bif-1 通过抑制 EGFR 的内源性降解来抑制乳腺癌细胞的迁移。

Barkor 是与 Beclin1 相关的重要自噬调节蛋白, 与酵母菌 Atg14 同源。Barkor/Atg14 (L) 是 Beclin1-PI3KC3 复合物中必不可少的, 它通过羧基末端的 BATS 与自噬体膜相连, 并且通过 BATS 保持膜的

曲度<sup>[30]</sup>。值得一提的是, Barkor 与 UVRAG 竞争性地结合 Beclin1 的 CCD 结构域形成不同的复合物, 在自噬的不同阶段起作用<sup>[31]</sup>。同时, Barkor 与膜的结合可能受到 mTOR 的调控。2012年, Yan 等<sup>[32]</sup>研究表明, 在无细胞体系中, Barkor 与膜的结合活性受到某种抑制物调控, 而 mTOR 很有可能在其中扮演重要的角色, 并且亮氨酸通过 Barkor-mTOR 通路来调控自噬。

Ambra1 是 Beclin1 依赖的细胞自噬中一个正性调节蛋白, 它与 Beclin1 和 PI3KC3 形成复合物, 参与自噬的调控。2011年, Fimia 等<sup>[33]</sup>研究表明, Ambra1 可以特异地结合微管动力蛋白马达复合体上的 DLC1。当自噬发生时, Ambra1 即从 DLC1 上解离下来, 然后定位到内质网与 Beclin1 结合, 使吞噬泡聚集。

### 2.1.2 FoxO 家族基因

细胞的凋亡受到细胞内各种分子的调控, FoxO 亚家族在动物细胞的正常凋亡和异常癌变中起重要作用。FoxO 家族是一类转录因子, 普遍存在于真核生物中, 在进化上比较保守, 从线虫到哺乳动物细胞都有它的同源基因, 而人类的 FoxO 家族包括 FoxO1 (FKHR)、FoxO2 (FoxO6)、FoxO3 (FKHRL1) 和 FoxO4 (AFX)<sup>[34]</sup>。

FoxO 是胰岛素 / 胰岛素样生长因子 (INS/IGF-1) 信号通路中的关键分子, 这些转录因子在应激和饥饿条件下, 促进自噬及泛素化相关基因的转录以抵抗这些不利条件。当 INS/IGF-1 与受体结合时, 激活了 (PI3K)-AKT 信号通路, 相关的蛋白激酶 AKT 和 SGK 直接磷酸化 FoxO 的 3 个保守位点, 使其从细胞核内解离, 从而抑制自噬相关基因的表达。FoxO 蛋白的降解会造成细胞增长失控以及 DNA 损伤的积累, 最终会导致癌症。FoxO 转录因子不仅诱导了肌肉细胞和线粒体的自噬, 还促进了神经细胞中的自噬。同时, 对于肝脏中的一种特殊的自噬——脂肪耗失也有促进作用。FoxO 不仅能诱导自噬, 还与其他自噬相关通路相互作用, 调节自噬的发生<sup>[35]</sup>。FoxO3 在人工培养的哺乳动物细胞中过量表达时, 可引起谷氨酰胺合成酶的活性增加, 从而使谷氨酰胺的合成增多。而谷氨酰胺合成酶可以抑制 mTOR 通路 (下调自噬的关键通路) 的重要组成物 mTORC1 在溶酶体上的定位, 从而得知, FoxO 对自噬的上调可能与其抑制 mTOR 信号通路有关<sup>[36]</sup>。FoxO 除了与 mTOR 信号通路相互作用, 还与 Beclin1 相关, 蛋白激酶 AKT 不仅可以抑制

FoxO, 还可以抑制 BECN1/Vps34/Atg14(自噬激活复合体), 这是通过激活 INS/IGF-1 来实现的<sup>[35]</sup>。

## 2.2 抑制细胞自噬的关键基因

mTOR 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, 一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 相对分子质量为  $2.89 \times 10^5$ 。作为自噬启动阶段的关键调节因子, 活化的 mTOR 可抑制自噬的发生。mTOR 主要有两种不同的复合物存在形式, 即与 Raptor、mLST8 和 PRAS40 组成的 mTORC1 (mTOR complex 1) 和与 Rictor、mSIN1 及 Protor-1 组成的 mTORC2<sup>[37]</sup>。mTORC1 对雷帕霉素敏感, 能够在细胞营养匮乏、应激、生长因子信号降低的条件下诱导自噬; 而 mTORC2 则可通过骨骼细胞中的 Akt-FoxO3 通路对细胞的禁食状况作出应答<sup>[38]</sup>。

作为细胞生长的中心调节因子, mTOR 是调节细胞自噬多条信号通路的重要汇聚点, 受多条通路的调节。在 mTOR 上游, PI3K/AKT 信号通路激活 mTOR, 而 LKB1/AMPK、Ras/Raf1/MAPK<sup>[39]</sup> 和 TSC2/PTEN/CREB1 信号通路则对 mTOR 起到抑制作用。PI3K/AKT 信号通路主要是通过磷酸化 AKT473 位的 Ser 激活 AKT, 一方面, 激活的 AKT 可以通过抑制 TSC1/TSC2 复合物来激活 Rheb; 另一方面, 激活的 AKT 磷酸化 PRAS40, 使其结合 14-3-3 蛋白并与 mTORC1 解离, 从而激活 mTOR<sup>[40]</sup>。在细胞能量短缺时, 激活的 LKB1 将 AMPK 磷酸化, 活化的 AMPK 磷酸化 Ser863 活化 TSC2, 活化的 TSC2 能够激活 Rheb, 从而抑制 mTORC1<sup>[38]</sup>, 此通路需要由钙离子介导<sup>[41]</sup>。Ras 是一种小 G 蛋白, 它能够激活下游效应物 Raf, 从而磷酸化 MEK1/2 的两个丝氨酸残基, 进而使得 MAPK 被激活<sup>[42]</sup>。CREB1 (cAMP response element-binding protein 1) 是与细胞存亡相关的转录因子, 当缺乏 TSC2 或 PTEN 时, CREB1 的活性大增, 使得 mTOR 化学活性增加, 从而抑制细胞自噬<sup>[43]</sup>。

在 mTOR 下游有 5 条途径影响自噬: (1) mTORC1 与 ULK1 复合物解离, 不再磷酸化 ULK1 和 Atg13。此时, ULK1 自身的激酶域磷酸化 Atg13 和 FIP200, 下调自噬泡的形成过程<sup>[38]</sup>。(2) 通过促进 4E-BP1 的磷酸化, 使 4E-BP1 与 eIF4E 解离, 因而上调 cap 依赖的翻译过程, 抑制自噬。(3) mTORC1 能够磷酸化 p70S6K, 促进核糖体蛋白 S6 和 4E-BP1 的翻译, 从而抑制自噬<sup>[37, 44]</sup>。(4) 死亡相关蛋白 1(DAP1) 为 mTOR 下游底物, 被证明有抑制自噬的作用。营养充足时, DAP1 被 mTOR 磷酸

化失活; 反之, mTOR 活性降低, 促使 DAP1 活化, 抑制自噬<sup>[45]</sup>。(5) Ambra1 是 mTOR 鲜为人知的功能靶标, mTORC1 主要通过磷酸化 Ambra1 的 Ser52 来抑制其前自噬活性<sup>[46-47]</sup>。

## 2.3 p53对细胞自噬的双重调节作用

p53(在人类中被编码为 TP53, 鼠中为 Trp53) 是哺乳动物蛋白质组中大量表达的分子代表, 在这个多功能肿瘤抑制蛋白的调控下, 许多大量表达的生物过程可以被下调<sup>[48]</sup>。作为人类肿瘤中常见的突变部位, p53 基因全长 20 kb, 定位于人类 17 号染色体短臂上, 其编码的 p53 蛋白含有 4 个主要功能区: 可与 p53 负性调控因子结合的 N 末端转录激活区、特异性结合靶基因中顺式元件的中央 DNA 核心区、四聚化结构域以及 C 末端非特异性 DNA 结合区<sup>[49]</sup>。

在正常生理条件下, p53 表达水平由 USP10 (ubiquitin-specific peptidase 10) 和 USP13 (ubiquitin-specific peptidase 13) 调控。USP10 和 USP13 是 Beclin 1 的靶位点, 通过调节其去泛素化活性可使 p53 去泛素化, 从而激活或抑制细胞自噬。实验证明, 下调 USP10、USP13、Beclin1 和 Vps34 等的活性都能够抑制 p53 的表达量<sup>[50]</sup>。

Hock 和 Vousden<sup>[51]</sup> 认为 p53 对于肿瘤的抑制作用主要通过 3 条途径, 即终止细胞周期、诱导细胞凋亡和压力性细胞死亡, 但其核心作用是抑制早期肿瘤细胞的发展。当细胞遇到不同的压力应激, 如 DNA 损伤、癌基因过度表达或各种代谢受限时, p53 能够诱导细胞周期阻滞和 DNA 修复, 如若损伤不能被修复, p53 家族成员 p63、p73 就能够激活自噬, 诱导细胞凋亡<sup>[52]</sup>。p53 诱导的凋亡可分为转录依赖型和非转录依赖型<sup>[53]</sup>。转录依赖型通过编码多种促凋亡蛋白, 如 Fax、PUMA、Bax 等来诱导凋亡; 非转录依赖型主要是 p53 定位至线粒体, 引起 Bax 上调和 Bcl-2 下调, 从而改变 Bcl-2/Bcl-XL 比例促进细胞凋亡。当细胞遇到代谢应激时, p53 能够通过磷酸化 AMPK (Thr127) 抑制 mTOR 的活性来激活自噬<sup>[54]</sup>; 在基因毒性应激下, p53 促进 PTEN 的表达量, 通过 PI3K/PKB 通路来促进自噬。除此之外, 激活的 p53 还可以与 JNK 共同作用来激活自噬: 一方面促进 Bcl-2 的磷酸化使得 Beclin 1-Bcl-2 复合物解离<sup>[55]</sup>; 另一方面通过上调 DRAM1 (DNA damage-regulated autophagy modulator 1), 其编码的溶酶体蛋白是 p53 促进自噬的主要介体<sup>[56]</sup>。

p53 在促进自噬的同时也能抑制自噬。TP53 诱导的 TIGAR 对自噬有抑制作用, 这主要与其抗氧化作用相关。但也有人认为, TIGAR 在 p53 早期转录过程中对细胞的保护作用是由于其显著的抗氧化效果而不是通过抑制自噬来实现<sup>[1]</sup>。有研究表明, p53 缺陷型的小鼠糖酵解效率增加<sup>[10]</sup>。但关于 p53 是否通过抑制自噬来保护细胞仍需进一步的实验证明。另外, 有研究者发现, 在人类结肠癌中, 若去除核外的 p53, 自噬基础水平会不断升高。但若重新转入 p53, 细胞自噬水平开始降低<sup>[57]</sup>。细胞质中的 p53 主要是通过激活下调细胞自噬的 mTOR 和抑制 AMPK 的作用来实现抑制细胞自噬的目的, 关于这些通路的具体作用机制以及是否有其他途径来抑制自噬目前还不是十分清楚。

鉴于 p53 对于细胞自噬的双重作用, 其对于细胞自噬及肿瘤治疗的影响十分重大。一般认为, 细胞核中的 p53 能够诱导自噬, 而细胞质中的 p53 则抑制自噬。所以 p53 对于细胞自噬的作用就与其在细胞中的分布有关。当 p53 失去细胞核定位信号, 它将主要分布于细胞质中, 对于自噬的抑制作用也就最为强烈; 反之, 若失去出核信号, p53 将堆积在细胞核中, 自噬也就不会被 p53 抑制<sup>[58]</sup>。目前, 对于突变型 p53 的研究也是热点, Muller 和 Vousden<sup>[59]</sup> 研究表明, TP53 突变型的高表达能够产生 p53 突

变蛋白。这些突变体 p53(25、26、53 和 54) 不仅失去了野生型的肿瘤抑制因子活性, 还能够使肿瘤向恶性的方向发展<sup>[60]</sup>。所以, 研究野生型和突变型 p53 的功能对于治疗肿瘤的新方法意义重大。

细胞自噬与肿瘤发生息息相关, 作为调控自噬发生的重要分子, 极有可能成为肿瘤治疗的靶标。图 1 简要阐述了细胞自噬发生过程中涉及到的重要信号通路。

### 3 自噬与肿瘤的关系

#### 3.1 自噬与肿瘤的发生、发展

在物理、化学和生物致癌因子, 如辐射、黄曲霉素、病毒等的影响下, 细胞的 DNA 和细胞器受到损伤, 从而使细胞代谢发生紊乱。各种代谢废物的积累及能量的缺乏激活自噬相关基因, 从而启动自噬。自噬可以清除细胞中受损的细胞器、降解自身错误折叠的蛋白质并保持基因组的稳定性, 从而抑制肿瘤的发生。

在肿瘤的发展过程中, 肿瘤细胞的增殖速度快, 所需的营养物质多, 但其所处的生理环境却又不能满足这种快速生长, 特别是在肿瘤组织内没有形成足够的血管为其扩增提供营养时, 这往往会造成实体瘤的氧气和营养缺乏。当细胞能量短缺时, 激活的 LKB1 将 AMPK 磷酸化, 活化的 AMPK 磷酸化

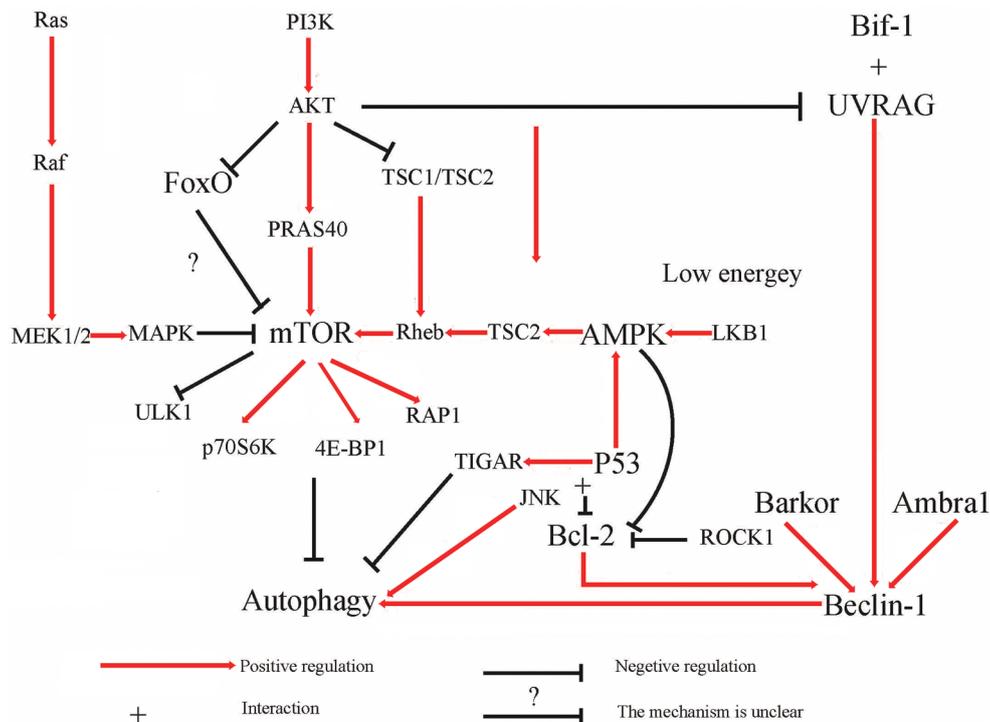


图1 细胞自噬相关的信号通路

Ser863 活化 TSC2, 活化的 TSC2 能够激活 Rheb, 从而抑制 mTORC1<sup>[38]</sup>, 激活自噬。当细胞处于缺氧状态时, 肿瘤细胞以无氧酵解的形式供能, 这就会产生大量的 ROS, 进一步诱发自噬<sup>[61]</sup>。在肿瘤的发展过程中, 细胞可以通过诱发自噬来抵抗环境中的各种压力。一方面, 自噬可以及时降解受损的细胞器和错误折叠蛋白, 为肿瘤细胞提供能量, 促进肿瘤细胞的转移; 另一方面, 自噬引起的部分肿瘤细胞的死亡可引起适度的炎症, 有利于新生血管扩张进入肿瘤组织中, 为肿瘤的生长提供营养支持。当环境压力十分严重时, 肿瘤细胞还可通过自噬进入可逆性休眠, 在宿主体内长期存在<sup>[62]</sup>。因此, 适度的自噬有利于肿瘤细胞在体内的生存发展。

## 3.2 自噬与肿瘤的治疗

### 3.2.1 自噬增强肿瘤放疗和化疗的耐受性

手术、放疗和化疗是目前治疗肿瘤最常见的 3 种方法, 但是由于恶性肿瘤常常复发和转移, 单纯的手术切除已无法治愈, 因此, 化疗和放疗就成为治疗恶性肿瘤必不可少的手段。然而, 细胞对化疗和放疗有一定耐受性, 这常常会影响治疗效果。

化学疗法是肿瘤治疗的主要方法之一, 其常通过诱导癌细胞凋亡达到治疗的目的; 但癌细胞常常通过自噬来保护自身, 从而逃避凋亡, 这就大大降低了化疗的疗效。Liu 等<sup>[63]</sup>用 MDD、Hoechst33342 染色和流式细胞仪检测化疗后的 A549 肺癌细胞的凋亡情况, 并且使用 3-MA (自噬抑制剂) 研究癌细胞中自噬与凋亡的联系。实验结果表明, 用顺铂和紫杉醇可以诱导 A549 肺癌细胞自噬与凋亡。自噬的耐药性在涎腺腺样囊性癌也有体现。研究表明, 由自噬引起的涎腺腺样囊性癌细胞对于顺铂 (DDP) 有耐药性, 并常常导致化疗的失败。用透射电子显微镜可以检测到自噬标记物 LC3 的表达, p62 免疫印迹的检测也都证明了由 DDP 诱导的自噬的存在。同时, 用 3-MA 或 RNA 干扰下调 Beclin-1 可增强 DDP 诱导的细胞凋亡。由此推断, 下调细胞自噬可以作为涎腺腺样囊性癌治疗的新疗法<sup>[64]</sup>。

放疗是治疗肿瘤的另一有效疗法。Gewirtz<sup>[65]</sup>研究发现, 许多肿瘤细胞在电离辐射作用下, 自我更新能力被破坏, 有丝分裂被阻断, 从而导致细胞发生自噬性死亡。由于众多肿瘤细胞对放疗产生了抗性, 使治疗效果往往不如人意, 而辐射诱导的自噬恰在其中扮演着重要的角色。Liang 等<sup>[66]</sup>在对人卵巢癌细胞及其多重耐药细胞株的研究中发现, 放射诱导产生的自噬对细胞起保护作用, 并且用自噬

抑制剂 3-MA 处理可以增强放射对肿瘤细胞的杀伤效果。因此, 为了提高肿瘤细胞的放化疗敏感性, 可以抑制自噬, 从而提高治疗效果。Zhao 等<sup>[67]</sup>用不同剂量的辐射处理肺癌 A549 和 3MA/A549 细胞, 结果发现, 使用自噬抑制物的细胞, 其辐射超敏感性 (HRS) 增强。这就表明, 自噬可能通过减少癌细胞的 DNA 损伤, 降低 HRS。因此, 在用低剂量辐射治疗肿瘤时辅以自噬抑制物, 可以成为治疗肿瘤的新思路。

### 3.2.2 诱导自噬, 促进肿瘤细胞死亡

在肿瘤的治疗中, 抑制自噬可以降低癌细胞对放疗和化疗的耐受性。但是, 在有些癌症的治疗中, 诱导自噬可以直接使肿瘤细胞发生 II 型程序性死亡。因此, 自噬抑制剂也就为肿瘤的治疗提供了一个思路, 自噬的抑制物 mTOR 和 Bcl-2 也就成为了研究的热点。

mTOR 是自噬通路的重要调节物, 在肿瘤的发生和转移中发挥了重要的作用。mTOR 的抑制物雷帕霉素和其衍生物替西罗莫斯 (CCI-779)、依维莫斯 (RAD-001) 可以有效地诱导自噬。在恶性神经胶质瘤、乳腺癌等细胞中使用雷帕霉素时, 可以有效地抑制细胞的生长并导致其死亡<sup>[68]</sup>。同时, mTOR 的抑制物可以影响肿瘤的血管发生<sup>[69]</sup>。但是, 雷帕霉素及其类似物会激活 Akt 激酶, 激活胰岛素受体 1, 从而影响自噬抑制物的抗癌功效。然而, 一种 ATP 竞争性物 NVP-BEZ235 被开发出来, 它可以抑制 mTORC1、mTORC2 和 PI3K-mTOR 信号通路, 从而有效地诱导自噬, 并能显著地抑制肾癌细胞的生长<sup>[70-71]</sup>。同时, 在肝癌细胞系中使用 mTOR 抑制剂 RAD001, 通过诱导自噬的产生显著增加了对辐射诱导的细胞生长的抑制作用<sup>[72]</sup>。Bcl-2 蛋白家族可通过与 Beclin1 的 BH3 区结合, 导致 Beclin1-Vps34 复合体形成受阻, 从而下调自噬。因此抑制 Bcl-2 蛋白, 可以有效地诱导自噬的产生。He 等<sup>[73]</sup>研究表明, 使用查耳酮 (Chalcone) 衍生物 Chal-24 诱导自噬的产生, 可促使癌细胞凋亡。Chal-24 通过 JNK 磷酸化 Bcl-2 和 Bcl-x1, 使其从 Beclin-1 上解离下来, 诱导细胞自噬。由此看出, 抑制自噬抑制物的活性也可以作为肿瘤治疗的一个新的思路。

## 3.3 自噬与肿瘤的预后

现在, 越来越多的证据表明, 自噬可以作为患者术后的一个检测目标。很多研究表明, 与正常组织相比, 肿瘤组织自噬相关蛋白, 如 Beclin1 的表达量存在明显差异, 且其表达程度与肿瘤的转移、

复发等相关,所以,我们可以通过检测这些自噬相关蛋白来预测肿瘤的预后。一般认为,低表达的Beclin1会导致预后较差<sup>[74-75]</sup>。但Cai等<sup>[76]</sup>的研究表明,在卵巢癌的预后中,卵巢组织Beclin1表达水平高的患者比表达低的有更高的存活率,Beclin1蛋白在卵巢上皮性癌的表达量,可作为卵巢癌预后的生物指标。原因可能为Beclin1能够稳定线粒体功能,减少基因突变率,从而减少肿瘤的发生;同时抑制细胞周期,通过促进自噬和凋亡来减少细胞激增,也有可能是由于Beclin1诱导缺乏凋亡能力的癌细胞自噬,从而使得患者存活率更高。Lee等<sup>[77]</sup>的研究发现,LC3可能是肝癌预后的有效检测指标,在手术切除癌组织的患者身上尤为明显。另外,Atg10也被认为与肿瘤患者的生存预后有关,在患者中,表达Atg10比不表达Atg10的生存期明显要长<sup>[78]</sup>。

#### 4 肿瘤发生过程中细胞自噬的研究方法

细胞自噬对于癌症的双面性作用,使它成为一种癌症治疗的有效方法。虽然现在对于细胞自噬的研究已经有很多,相关通路的分析也日趋完善,但是对于某一种病症的研究还不清楚。对于自噬我们可以从两个方面开始研究:(1)自噬泡和自噬体形成的稳态监测方法;(2)细胞自噬的过程(Flux)监测。关于自噬泡及自噬体的形成,我们可以用电镜,用免疫荧光测定LC3的方法以及TOR和Atg1激酶活性进行检测<sup>[79]</sup>。现仅对电镜技术LC3的测定,以及细胞自噬过程的检测作简要的阐述。

自从自噬过程在1960年被电子显微镜发现以来,电子显微镜是检测自噬现象最直接、最经典的方法。它不仅可以辨认自噬体的结构,还可以通过免疫金蛋白进行定位及定量测定<sup>[80]</sup>,但是很难反映自噬活性的强弱。

LC3是自噬的标志蛋白,因此对于LC3的测定至关重要。用免疫荧光的方法检测内源性LC3或转染GFP-LC3融合蛋白的表达。无自噬时,GFP-LC3融合蛋白弥散在胞浆中;自噬形成时,GFP-LC3融合蛋白转位至自噬体膜,在荧光显微镜下形成多个明亮的绿色荧光斑点,一个斑点相当于一个自噬体,可以通过计数来评价自噬活性的高低。由于自噬是一个连续的过程,检测自噬体的形态或是测定其数量仅仅是在自噬体的水平上,而不能有效地反映自噬活性的强弱。

细胞自噬过程检测则成为了一种有效手段。它

涵盖了自噬体的形成、自噬性底物向溶酶体的运送以及在溶酶体内降解的整个过程。通过LC3周转率测定、自噬底物总水平测定(LC3、GFP-LC3或p62)、mRFP-GFP-LC3颜色改变的分析,由GFP-LC3裂解产生的GFP测定和依赖于溶酶体降解的长寿命蛋白测定来检测自噬流,由于每种方法都具有其局限性,因此,应该把各种方法联合在一起应用。由于对自噬体的研究还不能全面地表达自噬的功能,因此,还需要对自噬通路的全面调控来全面评价自噬对于肿瘤的调控。实验上常用药物处理,自噬基因的敲除、沉默或过表达来激活或抑制细胞自噬,通过激活或抑制自噬,从而认识调控自噬的相关基因的具体作用<sup>[81]</sup>。

#### 5 小结与展望

近年来,越来越高的癌症发病率使得肿瘤成为众多学者的研究对象。自噬作为细胞的一种保护机制,能够在一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖和生长,但自噬对于肿瘤的作用也是争议颇多。而现今,我们对于自噬的相关通路方面的研究也不是很透彻,若能了解自噬发生的各个阶段的分子机制,就可将自噬引入肿瘤的治疗中,为肿瘤的治疗提出新的可能性。

#### [参 考 文 献]

- [1] Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, et al. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(5): 310-22
- [2] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(2): 453-8
- [3] Kuma A, Mizushima N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: With an emphasis on nutrient metabolism. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(7): 683-90
- [4] Moreau K, Ravikumar B, Renna M, et al. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell*, 2011, 146(2): 303-17
- [5] Otomo C, Metlagel Z, Takaesu G, et al. Structure of the human ATG12 similar to ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(1): 59-66
- [6] Itakura E, Mizushima N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol*, 2011, 192(1): 17-27
- [7] Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, et al. LC3 and GATE-16 N Termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Dev Cell*, 2011, 20(4): 444-54
- [8] Rao S, Tortola L, Perlot T, et al. A dual role for autophagy

- in a murine model of lung cancer. *Nat Commun*, 2014, 5: 3056
- [9] Chen HY, White E. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev Res*, 2011, 4(7): 973-83
- [10] Rosenfeldt MT, O' Prey J, Morton JP, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*, 2013, 504(7479): 296-300
- [11] White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(6): 401-10
- [12] Deng Q, Wang ZL, Wang L, et al. Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*, 2013, 43(12): 1261-8
- [13] Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, et al. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*, 1998, 72(11): 8586-96
- [14] Ryter SW, Cloonan SM, Choi AMK. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cell*, 2013, 36(1): 7-16
- [15] Wirth M, Joachim J, Tooze SA. Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23(5): 301-9
- [16] Kim J, Kim YC, Fang C, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, 2013, 152(1-2): 290-303
- [17] Wei Y, Zou Z, Becker N, et al. EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance. *Cell*, 2013, 154(6): 1269-84
- [18] Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*, 2007, 26(10): 2527-39
- [19] Funderburk SF, Wang QJ, Yue ZY. The Beclin 1-VPS34 complex - at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(6): 355-62
- [20] Maejima Y, Kyoji S, Zhai PY, et al. Mst1 inhibits autophagy by promoting the interaction between Beclin1 and Bcl-2. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1478-88
- [21] He C, Zhu H, Li H, et al. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes*, 2013, 62(4): 1270-81
- [22] Gurkar AU, Chu K, Raj L, et al. Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nat Commun*, 2013, 4: 2189
- [23] Yin XC, Cao LZ, Peng YH, et al. A critical role for UVRAG in apoptosis. *Autophagy*, 2011, 7(10): 1242-4
- [24] Yang W, Ju JH, Lee KM, et al. Protein kinase B/Akt1 inhibits autophagy by down-regulating UVRAG expression. *Exp Cell Res*, 2013, 319(3): 122-33
- [25] Knaevelsrud H, Ahlquist T, Merok MA, et al. UVRAG mutations associated with microsatellite unstable colon cancer do not affect autophagy. *Autophagy*, 2010, 6(7): 863-70
- [26] Schlauder SM, Calder KB, Khalil FK, et al. Bif-1 and Bax expression in cutaneous Merkel cell carcinoma. *J Cutan Pathol*, 2009, 36(1): 21-5
- [27] Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, et al. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(10): 1142-51
- [28] Takahashi Y, Hori T, Cooper TK, et al. Bif-1 haploinsufficiency promotes chromosomal instability and accelerates Myc-driven lymphomagenesis via suppression of mitophagy. *Blood*, 2013, 121(9): 1622-32
- [29] Runkle KB, Meyerkord CL, Desai NV, et al. Bif-1 suppresses breast cancer cell migration by promoting EGFR endocytic degradation. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(10): 956-66
- [30] Fan W, Nassiri A, Zhong Q. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19): 7769-74
- [31] Sun QM, Fan WL, Chen KL, et al. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(49): 19211-6
- [32] Yan XH, Sun QM, Ji J, et al. Reconstitution of leucine-mediated autophagy via the mTORC1-Barkor pathway *in vitro*. *Autophagy*, 2012, 8(2): 213-21
- [33] Fimia GM, Di Bartolomeo S, Piacentini M, et al. Unleashing the Ambra1-Beclin 1 complex from dynein chains Ulk1 sets Ambra1 free to induce autophagy. *Autophagy*, 2011, 7(1): 115-7
- [34] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol*, 2004, 25(5): 1495-500
- [35] Webb AE, Brunet A. FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 159-69
- [36] van der Vos KE, Eliasson P, Proikas-Cezanne T, et al. Modulation of glutamine metabolism by the PI(3)K-PKB-FOXO network regulates autophagy. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(8): 829-37
- [37] Sini P, James D, Chresta C, et al. Simultaneous inhibition of mTORC1 and mTORC2 by mTOR kinase inhibitor AZD8055 induces autophagy and cell death in cancer cells. *Autophagy*, 2010, 6(4): 553-4
- [38] Jung CH, Ro SH, Cao J, et al. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 2010, 584(7): 1287-95
- [39] Zhu B, Zhou Y, Xu F, et al. Porcine circovirus type 2 induces autophagy via the AMPK/ERK/TSC2/mTOR signaling pathway in PK-15 cells. *J Virol*, 2012, 86(22): 12003-12
- [40] Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, et al. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(3): 316-23
- [41] Zhang J, Chiu J, Zhang H, et al. Autophagic cell death induced by resveratrol depends on the Ca(2+)/AMPK/mTOR pathway in A549 cells. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(2): 317-28
- [42] Zhang Z, Miao L, Lv C, et al. Wentilactone B induces G2/M phase arrest and apoptosis via the Ras/Raf/MAPK signaling pathway in human hepatoma SMMC-7721 cells.

- Cell Death Dis, 2013, 4: e657
- [43] Wang Y, Hu Z, Liu Z, et al. mTOR inhibition attenuates DNA damage and apoptosis through autophagy-mediated suppression of CREB1. *Autophagy*, 2013, 9(12): 2069-86
- [44] Wang SY, Yu QJ, Zhang RD, et al. Core signaling pathways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(9): 1263-6
- [45] Koren I, Reem E, Kimchi A. DAPI, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr Biol*, 2010, 20(12): 1093-8
- [46] Nazio F, Cecconi F. mTOR, AMBRA1, and autophagy: an intricate relationship. *Cell Cycle*, 2013, 12(16): 2524-5
- [47] Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(4): 406-16
- [48] Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell*, 2009, 137(3): 413-31
- [49] Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med*, 2010, 16(11): 528-36
- [50] Liu J, Xia H, Kim M, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*, 2011, 147(1): 223-34
- [51] Hock AK, Vousden KH. Tumor suppression by p53: fall of the triumvirate? *Cell*, 2012, 149(6): 1183-5
- [52] Kenzelmann Broz D, Spano Mello S, Bieging KT, et al. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev*, 2013, 27(9): 1016-31
- [53] Sui X, Jin L, Huang X, et al. p53 signaling and autophagy in cancer: a revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy*, 2011, 7(6): 565-71
- [54] Jing K, Song KS, Shin S, et al. Docosahexaenoic acid induces autophagy through p53/AMPK/mTOR signaling and promotes apoptosis in human cancer cells harboring wild-type p53. *Autophagy*, 2011, 7(11): 1348-58
- [55] Lorin S, Pierron G, Ryan KM, et al. Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy*, 2010, 6(1): 153-4
- [56] Napoli M, Flores ER. The family that eats together stays together: new p53 family transcriptional targets in autophagy. *Genes Dev*, 2013, 27(9): 971-4
- [57] Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(6): 676-87
- [58] Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, et al. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *BBA: Mol Cell Res*, 2009, 1793(9): 1524-32
- [59] Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell*, 2014, 25(3): 304-17
- [60] Brady CA, Jiang D, Mello SS, et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. *Cell*, 2011, 145(4): 571-83
- [61] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36(1): 30-8
- [62] White E, DiPaola RS. The Double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5308-16
- [63] Liu FF, Liu DL, Yang Y, et al. Effect of autophagy inhibition on chemotherapy-induced apoptosis in A549 lung cancer cells. *Oncol Lett*, 2013, 5(4): 1261-5
- [64] Jiang LC, Huang SY, Zhang DS, et al. Inhibition of autophagy augments chemotherapy in human salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2014, 43(4): 265-72
- [65] Gewirtz DA. Autophagy as a mechanism of radiation sensitization in breast tumor cells. *Autophagy*, 2007, 3(3): 249-50
- [66] Liang B, Kong DJ, Liu Y, et al. Autophagy inhibition plays the synergetic killing roles with radiation in the multi-drug resistant SKVCR ovarian cancer cells. *Radiat Oncol*, 2012, 7: 213
- [67] Zhao YX, Cheng C, Zhu F, et al. Suppression of low-dose hyper-radiosensitivity in human lung cancer cell line A549 by radiation-induced autophagy. *J Huazhong Uni Sci-Med*, 2013, 33(5): 770-4
- [68] Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(9): 726-34
- [69] Shinohara ET, Cao C, Niermann K, et al. Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors. *Oncogene*, 2005, 24(35): 5414-22
- [70] Cho DC, Cohen MB, Panka DJ, et al. The efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 compared with rapamycin in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(14): 3628-38
- [71] Zhou ST, Zhao LJ, Kuang MC, et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett*, 2012, 323(2): 115-27
- [72] Altmeyer A, Josset E, Denis JM, et al. The mTOR inhibitor RAD001 augments radiation-induced growth inhibition in a hepatocellular carcinoma cell line by increasing autophagy. *Int J Oncol*, 2012, 41(4): 1381-6
- [73] He W, Wang Q, Srinivasan B, et al. A JNK-mediated autophagy pathway that triggers c-IAP degradation and necroptosis for anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 2014, 33(23): 3004-13
- [74] Zhou WH, Tang F, Xu J, et al. Low expression of Beclin 1, associated with high Bcl-xL, predicts a malignant phenotype and poor prognosis of gastric cancer. *Autophagy*, 2012, 8(3): 389-400
- [75] Dong M, Wan XB, Yuan ZY, et al. Low expression of Beclin 1 and elevated expression of HIF-1 $\alpha$  refine distant metastasis risk and predict poor prognosis of ER-positive, HER2-negative breast cancer. *Med Oncol*, 2013, 30(1): 355
- [76] Cai M, Hu Z, Liu J, et al. Beclin 1 expression in ovarian tissues and its effects on ovarian cancer prognosis. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 5292-303

- [77] Lee YJ, Ha YJ, Kang YN, et al. The autophagy-related marker LC3 can predict prognosis in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81540
- [78] Jo YK, Kim SC, Park IJ, et al. Increased expression of ATG10 in colorectal cancer is associated with lymphovascular invasion and lymph node metastasis. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52705
- [79] 杜海磊, 邱伟华, 杨卫平. 细胞自噬与肿瘤 3. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(2): 401-4
- [80] Swanlund JM, Kregel KC, Oberley TD. Investigating autophagy: quantitative morphometric analysis using electron microscopy. *Autophagy*, 2010, 6(2): 270-7
- [81] 马泰, 孙国平, 李家斌. 细胞自噬的研究方法. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(3): 204-9