

自噬在熊果酸抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖中的作用

卢文¹, 杨艳梅², 马敬全¹, 王虹³, 刘倩¹, 邵嘉艺¹, 唐丽萍¹

(1. 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学肿瘤研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 3. 哈尔滨红十字中心医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: [目的] 分析自噬在熊果酸抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖中的作用。[方法] 体外培养人宫颈癌 HeLa 细胞, 不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的熊果酸处理 48h 后, 采用 MTT 法检测 HeLa 细胞增殖抑制率的变化; 透射电镜观察细胞自噬超微结构的改变; Western blotting 检测自噬相关蛋白 p62 及 Beclin-1 的表达情况; 微管相关蛋白 1 轻链 3A/B (microtubule-associated protein 1 light chain 3 A/B, LC3A/B) 免疫荧光检测熊果酸对 HeLa 细胞自噬水平的影响; 检测自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 抑制自噬前后对熊果酸增殖抑制作用的影响。[结果] 不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的熊果酸处理组对 HeLa 细胞的抑制率分别为 $20.1\% \pm 1.3\%$ 、 $35.6\% \pm 2.6\%$ 和 $49.0\% \pm 1.0\%$, 熊果酸可抑制 HeLa 细胞增殖并呈剂量依赖性 ($F=446.177, P<0.001$); 熊果酸能诱导 HeLa 细胞发生自噬; 透射电镜观察发现经熊果酸处理后 HeLa 细胞中自噬囊泡明显增加; Western blotting 分析表明熊果酸可呈剂量依赖性增加 Beclin-1 的表达, 降低 p62 的表达; 免疫荧光检测显示熊果酸处理后, HeLa 细胞的荧光强度与对照组相比明显增强; 3-MA 与熊果酸联合作用于 HeLa 细胞时可抑制细胞增殖。[结论] 熊果酸抑制 HeLa 细胞增殖, 并诱导其发生自噬, 自噬抑制剂 3-MA 能够增强熊果酸对 HeLa 细胞的增殖抑制作用。

关键词: 熊果酸; 自噬; 宫颈癌; p62; Beclin-1; 3-MA

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2016)07-0553-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.07.A011

Role of Autophagy in Ursolic Acid Inhibiting Human Cervical Cancer HeLa Cells Proliferation

LU Wen¹, YANG Yan-mei², MA Jing-quan¹, et al.

(1. Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081, China;

2. The Cancer Research Institute of Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the role of autophagy in the proliferation inhibition to HeLa cells by ursolic acid (UA). [Methods] Human cervical cancer HeLa cells were cultured in vitro with various concentrations (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) of UA for 48h and the proliferation inhibition rate of HeLa cells was detected by MTT method. The change of ultrastructure was observed under transmission electronic microscope (TEM). The expressions of autophagy-associated proteins in HeLa cells treated with UA were determined by fluorescent staining of microtubule-associated protein 1 light chain 3A/B (LC3A/B). The protein levels of autophagy-associated protein p62 and Beclin-1 were detected by Western blotting analysis. Detect the impact to cell proliferation inhibition after autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) inhibited autophagy in HeLa cells. [Results] The inhibition rate in 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ UA group was $20.1\% \pm 1.3\%$, $35.6\% \pm 2.6\%$ and $49.0\% \pm 1.0\%$, UA at various concentrations showed significantly proliferation inhibition of HeLa cells in a dose-dependent manner. Autophagy was induced in HeLa cells treated with UA as observed by TEM that autophagic vesicles were strikingly increased in HeLa cells. Western blotting analysis showed that UA aroused a dose-dependent increase in the expression of Beclin-1 and reduced the expression of p62. The fluorescent density of LC3A/B positive in HeLa cells increased significantly as compared with those in control group. 3-MA+UA remarkably decreased HeLa cell viability. [Conclusions] UA can inhibit HeLa cell proliferation and induce autophagy. Autophagy inhibitor 3-MA can enhance the proliferation inhibition of UA to HeLa cells.

Key words: ursolic acid; autophagy; cervical carcinoma; p62; Beclin-1; 3-MA

收稿日期: 2016-01-07; 修回日期: 2016-03-25

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(D201136); 黑龙江省博士后科学研究基金(LBH-Z06252)

通讯作者: 唐丽萍, E-mail: hanzhigang@medmail.com.cn

宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一,持续感染高危型人乳头瘤病毒(HPV)是宫颈癌发生发展过程中的明确病理因素。宫颈癌是少数能早期预防、早期诊断和治疗的恶性肿瘤之一,随着宫颈癌筛查技术的开展,大量癌前病变、早期宫颈癌和年轻宫颈癌都被早期诊断和治疗^[1]。但近年来,宫颈癌患者的发病年龄趋向年轻化,未经生育的宫颈癌患者增多,且宫颈癌的组织学类型比例也发生了巨大的变化,宫颈腺癌的发病率明显上升^[2]。因此,宫颈癌患者的临床治疗及预后仍面临着巨大的挑战。

熊果酸(ursolic acid,UA)又称乌索酸或乌苏酸,是一种来源于传统中草药的提取物,属五环三萜类化合物。它具有抗肿瘤、抗血管生成、抗氧化、抗抑郁、保肝、降血脂、抗病毒及抗菌作用等多种生物学效应,且毒副作用较小^[3]。Cristina等^[4]发现,熊果酸可通过调节自噬诱导耐药结肠癌细胞死亡,但其作用机制目前尚未明确。自噬是广泛存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖性细胞自我降解途径。众多研究表明自噬在肿瘤发生及发展过程中具有促进和抑制的双重作用:自噬能够在饥饿及外界刺激下回收大分子物质并清除受损的线粒体及其它细胞器,为细胞提供能量及蛋白质供应,以实现物质和能量再循环并维持细胞生存^[5]。最新的研究表明,在肿瘤细胞中抑制自噬对肿瘤的治疗是有益的,由于它可以增强肿瘤细胞对治疗的敏感性,包括DNA损伤药物、激素拮抗剂(如他莫昔芬)以及放射治疗^[6]。因此,抑制自噬可增强抗肿瘤药物对肿瘤细胞的杀伤作用,协同抗肿瘤药物发挥更好的抗肿瘤效应。本研究采用不同浓度UA处理人宫颈癌HeLa细胞,检测UA对HeLa细胞的增殖抑制作用,通过不同的方法检测UA诱导Hela细胞自噬情况,采用3-MA抑制Hela细胞自噬后检测熊果酸对HeLa细胞增殖的影响。初步判断自噬在熊果酸抑制人宫颈癌HeLa细胞增殖中的作用,以期为其临床应用奠定理论基础和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

人宫颈癌HeLa细胞株由哈尔滨医科大学附属肿瘤医院研究所提供,细胞常规培养于含10%胎牛

血清、1%双抗(100U/ml链霉素,100U/ml青霉素)的RPMI-1640培养液,于37℃,5%CO₂孵箱中单层传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2 实验材料

胰蛋白酶、RPMI-1640及胎牛血清购自美国Gibco公司;熊果酸(纯度>98%)、3-MA、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)、青霉素和链霉素购自Sigma公司;兔抗人p62多克隆抗体购自Abcam公司;兔抗人Beclin-1多克隆抗体、兔抗人LC3A/B单克隆抗体、兔抗人β-actin多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗购自Cell signaling公司。

1.3 增殖抑制实验

HeLa细胞以4×10³/孔接种于96孔细胞培养板。对照组只加培养液,UA组用不同浓度(5、10、20μmol/L)UA处理,3-MA+UA组先用5mmol/L 3-MA预处理1h后加入20μmol/L UA,培养48h,加入MTT继续培养4h后,再加入DMSO振荡溶解后,用酶标仪于490nm波长下读取吸光度(A)值,计算增殖抑制率。增殖抑制率(%)=(对照组A值-UA组A值)/对照组A值×100%。

1.4 透射电镜法检测熊果酸对HeLa细胞超微结构的影响

取对数生长期HeLa细胞,以每瓶5×10⁵的密度接种于25ml培养瓶中,每瓶加5ml培养液。熊果酸(20μmol/L)给药48h后常规收集细胞,正常对照组用完全培养基培养48h。PBS离心洗涤1次,1000r/min离心10min,2.5%戊二醛4℃固定。经乙醇、丙酮逐级脱水,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色,环氧树脂包埋后,60nm超薄切片,放入扫描电镜中观察,拍照。

1.5 Western Blotting检测p62和Beclin-1蛋白的表达

取对数生长期HeLa细胞以每瓶5×10⁵密度接种于25ml培养瓶中,每瓶加5ml培养液,24h后加入不同浓度UA(5、10、20μmol/L),作用48h后,提取总蛋白,Bradford法测定蛋白浓度,取30μg总蛋白经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至PVDF上,5%脱脂牛奶常温下封闭后,4℃孵育一抗过夜;洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1h;洗膜后,ECL显影。Alpha化学发光凝胶成像系统照相记录结果。

1.6 免疫细胞化学检测LC3A/B的表达

取对数期生长的细胞,以5×10⁴个细胞/孔接种

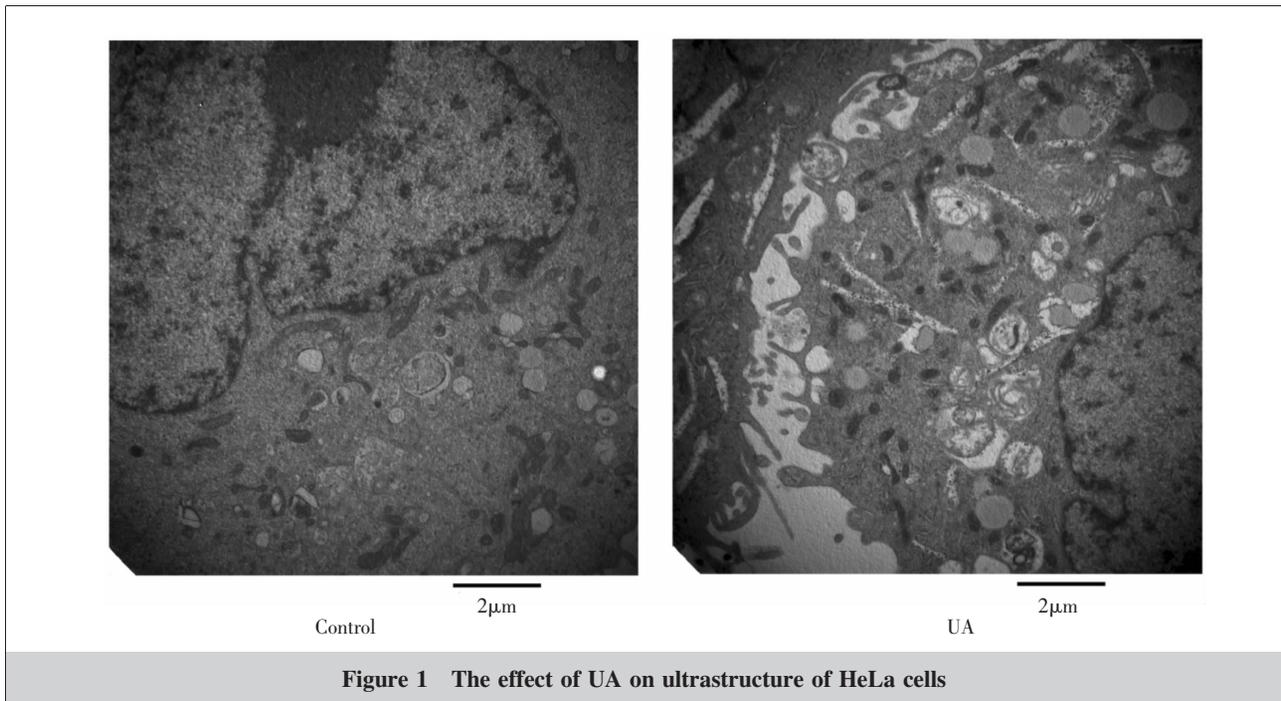


Figure 1 The effect of UA on ultrastructure of HeLa cells

于6孔板中,24h后加入终浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ UA,置37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 培养箱中培养48h。4%多聚甲醛室温固定15min,PBS漂洗3次,每次5min。0.1% Triton-100透膜10min,PBS漂洗3次,每次5min。加入山羊血清封闭1h后,加入兔抗人LC3A/B单克隆抗体(1:100稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。加入FITC标记羊抗兔IgG(1:100稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育1h。PBS漂洗3次,每次5min;DAPI染色3min。加抗荧光淬灭剂封片,Treiz共聚焦显微镜拍照,实验重复3次。

1.7 统计学处理

应用SPSS21.0统计软件,计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 熊果酸对 HeLa 细胞增殖的影响

不同浓度熊果酸(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)作用48h后,均对HeLa细胞的增殖有抑制作用,且呈明显的剂量依赖性,与对照组相比,5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 熊果酸处理后,对HeLa细胞增殖的抑制率分别为20.1% \pm 1.3%、35.6% \pm 2.6%和49.0% \pm 1.0%,与对照组相比差异均有统计学意义($F=446.177$, $P<0.001$)。

2.2 熊果酸诱导 HeLa 细胞产生自噬

2.2.1 熊果酸对 HeLa 细胞超微结构的影响

正常对照组细胞核膜完整,染色质结构正常,胞浆内各细胞器、细胞核形态和分布基本正常,未见明显自噬空泡,溶酶体数目未见明显增多。UA(20 $\mu\text{mol/L}$)处理48h后胞浆中可见大量空泡状结构及包含部分胞浆成分形成双层膜结构的自噬体,表明UA可诱导HeLa细胞发生自噬,见Figure 1。

2.2.2 p62 和 Beclin-1 蛋白表达情况

使用不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)UA处理HeLa细胞48h后,随UA浓度增高,HeLa细胞中p62蛋白表达逐渐降低,Beclin-1蛋白表达逐渐增高,见Figure 2。

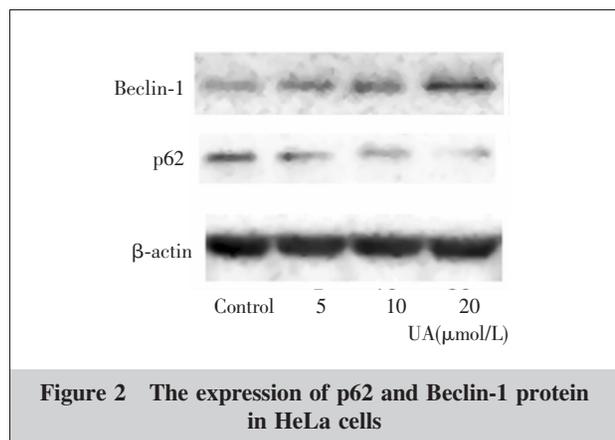
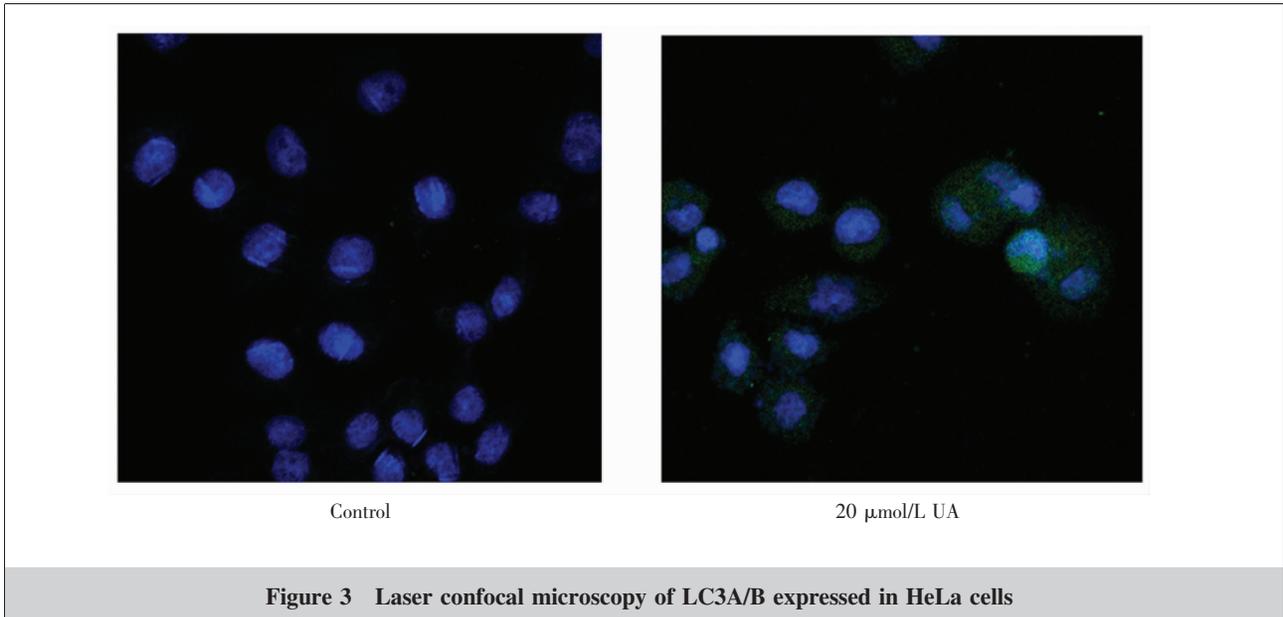


Figure 2 The expression of p62 and Beclin-1 protein in HeLa cells

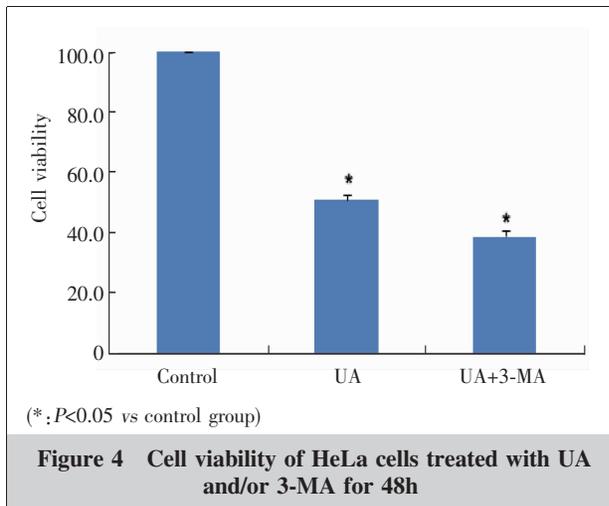


2.2.3 UA 对 LC3A/B 表达的影响

激光共聚焦显微镜下观察可见,对照组 HeLa 细胞中可见 LC3A/B 绿色荧光分布,但荧光强度较弱;20 μmol/L UA 处理组 HeLa 细胞胞浆中可见大量 LC3A/B 绿色荧光分布,且荧光强度较强,见 Figure 3。

2.3 抑制自噬后熊果酸对 HeLa 细胞增殖的影响

3-MA 是特异性的自噬抑制剂,在加入 UA 前 1h 加入 3-MA 用来抑制自噬的发生,观察 UA 抑制 HeLa 细胞增殖的能力有无改变。MTT 结果显示:熊果酸单独作用于 HeLa 细胞或 3-MA 与熊果酸联合作用对细胞增殖均有抑制作用,后者抑制作用更为显著,其细胞存活率差异显著 ($F=1277.211, P<0.001$)。见 Figure 4。



3 讨论

肿瘤细胞在抗肿瘤治疗过程中产生获得性耐药,引起瞬变反应导致肿瘤进展,是阻碍肿瘤治疗效果的重要因素^[7]。由于调节自噬过程可以在肿瘤治疗中有效预防化疗耐药并提高肿瘤治疗的疗效,因此研究自噬在肿瘤耐药中的机制将为肿瘤治疗提供新的思路。传统抗肿瘤中草药主要是通过诱导肿瘤细胞分化增殖或抑制肿瘤血管生成而发挥抗肿瘤作用,但由于大多数抗肿瘤中草药有效成分不稳定、难提纯、毒性不明确且价格昂贵,因此临床应用受到限制^[8]。熊果酸作为一种高效低毒的天然药物,可抑制多种肿瘤细胞的生长,有望成为一种新型抗肿瘤药物。已有报道熊果酸可通过多种途径抑制肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞凋亡发挥抗肿瘤效应^[9]。

自噬在疾病进展中的角色随疾病病程不断发生变化,在正常细胞中自噬是一种重要的自我保护机制,在各种应激反应中维持细胞代谢平衡而保持细胞存活^[10]。细胞受到外界刺激发生自噬时,细胞质中的异常蛋白质、受损细胞器和部分胞浆即被隔离至自噬体中与溶酶体结合并进一步降解,为细胞提供营养及能量实现再循环。在肿瘤细胞中,自噬是细胞在一系列应激条件下(如:代谢需求增加、缺氧微环境和细胞毒药物)维持细胞生存的过程。自噬还可以作为细胞应对饥饿和环境应激的一种自我保护机制

(如营养夺获、缺氧和药物应激),并促使肿瘤对治疗产生抵抗^[11]。自噬具有两面性:一方面可通过降解有害物质保护细胞以避免坏死和凋亡的危险;另一方面,自噬异常激活则会维持肿瘤细胞生存,在血供不良、缺氧或营养不足等条件下通过提供能量而促进肿瘤的发生和发展^[12]。因此自噬作为一种潜在的通过其促存活机制治疗肿瘤的新方法已成为抗肿瘤研究的热点。研究发现,自噬功能失调与DNA损伤、染色体稳定性降低密切相关,恶性肿瘤的发生发展与肿瘤治疗的过程中都出现了自噬功能失调^[13]。

已有研究证实,在肿瘤细胞中抑制自噬能增强化疗药物诱导肿瘤细胞死亡,从而发挥靶向性治疗优势^[14],这一点与我们的研究结果一致。熊果酸作为一种有效的抗肿瘤中药已被多种研究证实^[15],我们的研究发现,熊果酸可以明确诱导宫颈癌 HeLa 细胞发生自噬,且自噬阻断剂与熊果酸联合应用可增强熊果酸的抗肿瘤作用。研究表明:自噬在 5-Fu 诱导的肝癌细胞损伤中起一定的保护作用,抑制自噬会促进肝癌细胞发生凋亡,对肿瘤细胞产生损伤作用^[16]。另有研究报道抑制自噬可促进 Nara-H 细胞发生凋亡^[17]。本研究通过 MTT 法检测证明熊果酸对 HeLa 细胞具有细胞毒作用,并呈明显的剂量依赖性。采用透射电子显微镜法(TEM)观察自噬体的超微结构,发现 20 μ mol/L 熊果酸作用 48 h 后 HeLa 细胞中自噬体(即包裹着胞浆成分的囊泡样结构)较对照组明显增多,并出现大量自噬空泡积聚。说明熊果酸在抑制 HeLa 细胞增殖的过程中诱导自噬的发生,与文献中描述的自噬过程出现的空泡一致。

LC3 是哺乳动物细胞中酵母 ATG8(Aut7/Apg8)的同源基因,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的形成。未发生自噬时,细胞内表达的前 LC3 融合蛋白并无自噬活性,前 LC3 融合蛋白大量弥散在胞浆中;当细胞自噬活性增强时,前 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^[18]。LC3A 和 LC3B 是 LC3 的两个不同亚型,因此,LC3A/B 荧光染色可作为检测细胞自噬活性的标志。本研究结果显示在宫颈癌 HeLa 细胞中 LC3A/B 荧光强度较弱,以阴性和弱阳性表达为主,表达水平显著低于熊果酸处理组,提示宫颈癌 HeLa 细胞中存在 LC3A/B 表达缺失和下调。熊果酸可诱导宫颈癌 HeLa 细胞表达 LC3,增加 HeLa 细

胞中 LC3 的可形成量,促进 HeLa 细胞发生自体吞噬,即增强了 HeLa 细胞的自噬活性或者发生自噬的潜能显著上升,这种改变可能在宫颈癌的治疗中发挥有效性。自噬受自噬特异性基因(ATG)调节,Beclin-1 和 p62 是两种不同的自噬调节蛋白。Beclin-1 是酵母 *Atg6* 基因在人类基因中的同源体,它与第 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)和膜泡分选蛋白 34(VPS34)结合形成络合物,调节自噬体形成^[19]。Beclin-1 结合过程和 p62 修饰过程在哺乳动物自噬泡形成过程中起着重要作用。Beclin-1 结合过程参与前自噬泡的形成,Beclin-1 也是一种缺陷型肿瘤抑制基因,Beclin-1(+/-)杂合子小鼠更易发生肿瘤^[20]。目前已在人乳腺癌、卵巢癌和前列腺癌等患者中发现 Beclin-1 等位基因的丢失^[21]。Beclin-1 的过表达可大量激活自噬过程,并在肿瘤的发展过程中表现出抑制作用。在结肠癌细胞系中,利用慢病毒的 shRNA 敲除 Beclin-1 或 LC3 基因,可以增强 5-Fu 的诱导凋亡效应,但 Beclin-1 的过度表达能对肿瘤细胞起保护作用^[22]。Beclin-1 具有增强自噬活性的功能,但抗凋亡蛋白 Bcl-2 或 Bcl-xL 可以结合 Beclin-1 的 BH3 结构域并抑制自噬反应,使自噬反应终止^[23]。因此,通过检测 Beclin-1 细胞内的含量变化,可以基本判断是否发生自噬及自噬是被诱导还是被抑制。本实验结果显示熊果酸处理 HeLa 细胞后与对照组相比,Beclin-1 的表达明显增加,且 p62 表达水平明显下降。Sinicrope 等^[24]的研究发现:3-MA 能够一定程度地抑制塞来昔布诱导的结肠癌 HT-29 细胞发生自噬并且促进其发生凋亡。本实验也证实了这一点,我们通过 MTT 检测发现,单纯熊果酸作用于 HeLa 细胞后,HeLa 细胞的增殖受到抑制,并呈剂量依赖性关系,而自噬特异性抑制剂 3-MA 与熊果酸联合作用后,熊果酸对 HeLa 细胞的增殖抑制作用明显增强($P<0.05$)。因此,我们认为熊果酸诱导宫颈癌 HeLa 细胞损伤过程中会诱导自噬发生,抑制自噬则会增强熊果酸的抗肿瘤活性。

参考文献:

- [1] Youssef MA, Abdelsalam L, Harfoush RA, et al. Prevalence of human papilloma virus (hvp) and its genotypes in cervical specimens of egyptian women by linear array hvp genotyping test[J]. Infect Agent Cancer, 2016, 11: 6.
- [2] Sander B, Wong WW, Yeung MW, et al. The cost-utility of

- integrated cervical cancer prevention strategies in the ontario setting-can we do better?[J]. *Vaccine*,2016,34(16): 1936-1944.
- [3] Yarla NS, Bishayee A, Sethi G, et al. Targeting arachidonic acid pathway by natural products for cancer prevention and therapy [J]. *Semin Cancer Biol*,2016.Feb 4.[Epub ahead of print]
- [4] Xavier C, Lima CF, Pedro DF, et al. Ursolic acid induces cell death and modulates autophagy through jnk pathway in apoptosis-resistant colorectal cancer cells [J]. *J Nutr Biochem*,2013,24(4):706-712.
- [5] Karagiannidis I, Katakaki A, Glustianou G, et al. Extended cytoprotective effect of autophagy in the late stages of sepsis and fluctuations in signal transduction pathways in a rat experimental model of kidney injury[J]. *Shock*,2016,45(2):139-147.
- [6] Zhang H, Ramakrishnan SK, Triner D, et al. Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of yap1[J]. *Sci Signal*,2015,8(397): ra98.
- [7] Jha S, Morris EJ, Hruza A, et al. Dissecting therapeutic resistance to erk inhibition[J]. *Mol Cancer Ther*,2016 Feb 1. [Epub ahead of print]
- [8] Zhuang SR, Chiu HF, Chen SL, et al. Effects of a chinese medical herbs complex on cellular immunity and toxicity-related conditions of breast cancer patients [J]. *Br J Nutr*,2012,107(5):712-718.
- [9] Kashyap D, Tuli HS, Sharma AK. Ursolic acid: A metabolite with promising therapeutic potential [J]. *Life Sci*,2016,146:201-213.
- [10] Capasso S, Alessio N, Squillaro T, et al. Changes in autophagy, proteasome activity and metabolism to determine a specific signature for acute and chronic senescent mesenchymal stromal cells[J]. *Oncotarget*,2015,6(37):39457-39468.
- [11] Wu H, Huang S, Zhang D. Autophagic responses to hypoxia and anticancer therapy in head and neck cancer[J]. *Pathol Res Pract*,2015,211(2):101-108.
- [12] Wang Z, Shi X, Li Y, et al. Blocking autophagy enhanced cytotoxicity induced by recombinant human arginase in triple-negative breast cancer cells [J]. *Cell Death Dis*,2014,5:e1563.
- [13] Suman S, Sharma PK, Rai G, et al. Current perspectives of molecular pathways involved in chronic inflammation-mediated breast cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2016,472(2):401-409.
- [14] Lin YC, Lin JF, Wen SI, et al. Inhibition of high basal level of autophagy induces apoptosis in human bladder cancer cells[J]. *J Urol*,2015,pii:S0022-5347(15)05148-4.
- [15] Doudican NA, Mazumder A, Kapoor S, et al. Predictive simulation approach for designing cancer therapeutic regimens with novel biological mechanisms [J]. *J Cancer*,2014,5(6):406-416.
- [16] Wu J, Hu D, Zhang R. Depletion of bmi-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncol Lett*,2012,4(4):723-726.
- [17] Nakamura O, Hitora T, Akisue T, et al. Inhibition of induced autophagy increases apoptosis of nara-h cells[J]. *Int J Oncol*,2011,39(6):1545-1552.
- [18] Olsvik HL, Lamark T, Takagi K, et al. Fcyl1 contains a c-terminally extended, lc3a/b-preferring lc3-interacting region (lir) motif required for efficient maturation of autophagosomes during basal autophagy [J]. *J Biol Chem*,2015,290(49):29361-29374.
- [19] Liu JL, Chen FF, Chang SF, et al. Expression of beclin family proteins is associated with tumor progression in oral cancer[J]. *PLoS One*,2015,10(10):e0141308.
- [20] Lee SJ, Kim HP, Jin Y, et al. Beclin 1 deficiency is associated with increased hypoxia-induced angiogenesis [J]. *Autophagy*,2011,7(8):829-839.
- [21] Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene [J]. *J Clin Invest*,2003,112(12):1809-1820.
- [22] Zhang CJ, Zhang LF, Zhou L. Clinical significance of expression of autophagy-related proteins Beclin1, LC3 and P62 in advanced pancreatic cancer [J]. *World Chinese Journal of Digestology*,2015,23(2):318-323. [张创杰,张连峰,周琳.自噬相关蛋白 Beclin1、LC3和P62在进展期胰腺癌中的表达及临床意义[J].*世界华人消化杂志*,2015,23(2):318-323.]
- [23] Zalckvar E, Berissi H, Mizrachi L, et al. Dap-kinase-mediated phosphorylation on the bh3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from bcl-xl and induction of autophagy[J]. *EMBO Rep*,2009,10(3):285-292.
- [24] Sinicrope FA, Huang S. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by abt-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells [J]. *Autophagy*,2010,6(2):256-269.