

ATG7对神经母细胞瘤增殖和耐药的影响及机制研究

石金, 于永波, 张杰, 鲁洁, 邵隽, 金雅琼, 杨业然, 李宏彬, 陈峰, 初平, 贾超, 李艳珍, 郭永丽, 倪鑫

(国家儿童医学研究中心, 首都医科大学附属北京儿童医院, 北京市儿科研究所, 儿童耳鼻咽喉头颈外科疾病北京市重点实验室, 北京 100045)

摘要: [目的] 研究自噬相关基因 ATG7 对神经母细胞瘤增殖和化疗耐药性的影响, 初步探索其分子机制, 为神经母细胞瘤临床治疗提供新的线索和理论依据。[方法] 在神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y 和 SK-N-BE2 中, 慢病毒转染敲减 ATG7 基因, 采用 MTT 染色检测 ATG7 对细胞增殖能力的影响, 同时通过 Western blotting 方法检测细胞内自噬标志蛋白 LC3 表达量来反映细胞内自噬水平; 通过检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 等凋亡相关蛋白研究 ATG7 对细胞凋亡的影响。SH-SY5Y 细胞经阿霉素处理后, 采用实时无标记细胞分析仪连续监测细胞增殖情况, 探讨 ATG7 在神经母细胞瘤耐药中的作用。[结果] 敲减 ATG7 基因能显著抑制细胞内自噬水平, 而且 ATG7 敲减后细胞在第 4、5d 的增殖倍数分别为 3.05 ± 0.05 和 3.92 ± 0.08 , 低于对照组的 3.40 ± 0.05 和 4.35 ± 0.13 ($P=0.0012$, $P=0.0085$); 与对照组相比, ATG7 敲减组其凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达明显降低, 促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达显著升高 ($P<0.05$)。经阿霉素处理后, ATG7 敲减组细胞增殖率明显低于对照组 ($P<0.05$)。[结论] 由于 ATG7 基因介导细胞自噬过程, ATG7 基因在神经母细胞瘤中可能通过自噬作用促进肿瘤细胞异常增殖, 抑制细胞凋亡, 进而增强细胞耐药性。

关键词: ATG7 基因; 神经母细胞瘤; 自噬; 细胞增殖; 耐药性

中图分类号: R733.71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)06-0562-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.06.B007

Effects of ATG7 Gene on Proliferation and Drug Resistance in Neuroblastoma

SHI Jin, YU Yong-bo, ZHANG Jie, et al.

(Beijing Key Laboratory for Pediatric Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, National Center for Children's Health, Beijing 100045, China)

Abstract: [Objective] To study the effects of autophagy related gene ATG7 on the proliferation and drug resistance in neuroblastoma cells. [Methods] Lentiviral was used to knockdown ATG7 gene and MTT staining was applied to evaluate cell proliferation in human neuroblastoma SH-SY5Y and SK-N-BE2 cells. To confirm the effects of ATG7 in autophagy, autophagy marker LC3 was detected; apoptosis-related proteins (Bcl-2, Bax, Caspase-3) was assessed by Western blotting. In addition, after doxorubicin (25nM) treatment, the proliferation of SH-SY5Y cells were monitored through real-time cell analyzer. [Results] Autophagy was suppressed after ATG7 knockdown in SH-SY5Y cells. The proliferation rates in ATG7 knockdown cells were significantly lower than those in the control group (3.05 ± 0.05 vs. 3.40 ± 0.05 , 3.92 ± 0.08 vs. 4.35 ± 0.13 , $P=0.0012$, 0.0085) at d4 and d5, respectively. Compared to control group, the expression of Bcl-2 decreased, while the pro-apoptotic protein Bax and Caspase-3 was significantly increased ($P<0.05$) in ATG7 knock-down group. Moreover, compared with the control group, cell proliferation rate in ATG7 knock-down cells was significantly reduced after doxorubicin treatment. [Conclusion] ATG7 may promote cellular proliferation, suppress apoptosis and enhance drug resistance through autophagy in neuroblastoma

Subject words: ATG7 gene; autophagy; neuroblastoma; cell proliferation; drug resistance

基金项目: 国家自然科学基金项目(81472369, 31401067, 81502144); 北京市科技计划(D131100005313014); 首都医科大学基础-临床科研合作基金(16JL57); 北京市优秀人才培养资助(2015000021469G210, 2015000021469G211)

通讯作者: 倪鑫, 主任医师, 教授, 博士生导师, 博士; 首都医科大学附属北京儿童医院耳鼻咽喉头颈外科, 北京市西城区南礼士路 56 号(100045); E-mail: nixin@bch.com.cn

收稿日期: 2017-05-08; **修回日期:** 2017-08-07

神经母细胞瘤(neuroblastoma,NB)是儿童最常见的神经外胚层实体肿瘤,约占所有儿童恶性肿瘤死亡率的15%^[1]。NB即使经过手术和化疗等多元治疗,患儿存活率仍然低于50%^[2,3]。近年来研究发现MYCN、ALK、LOMI、BARD1、TERT和HACE1等基因改变与NB密切相关,为NB临床预后评价及机制研究提供重要线索,但是NB的发病机制仍不清楚^[4-9]。目前有研究表明,细胞自噬在NB异常增殖和耐药中发挥重要作用^[10,11]。

自噬(autophagy)是细胞内蛋白质、细胞器和细胞质成分通过溶酶体降解和回收以维持细胞正常代谢的动态过程,此过程受一系列自噬相关基因(autophagy related genes,ATGs)调控。自噬也参与肿瘤发生发展过程^[12,13],研究表明促自噬体形成的关键基因ATG7与多种肿瘤的异常增殖及耐药性关系密切,包括肺癌、结直肠癌、前列腺癌等^[14-19]。由于肿瘤细胞无限增殖和耐药性是影响术后以及化疗效果的重要原因之一,而目前ATG7在NB发生发展中的作用仍然不清楚,因此,深入研究ATG7对NB增殖和耐药性的影响,可为NB的化疗策略及预后评价提供理论依据和线索。本研究旨在神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y和SK-N-BE2中敲减ATG7,检测ATG7基因对细胞增殖能力和耐药性的影响,并探讨其相关机制,揭示ATG7及其介导的自噬作为NB肿瘤治疗潜在靶点的可能性。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

人神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y及SK-N-BE2购自上海中科院细胞库;ATG7慢病毒LV-ATG7-RNAi、阴性对照慢病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。DMEM细胞培养基、Real-time PCR试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司;胎牛血清购自上海康宁公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、阿霉素(Adriamycin)购自美国Sigma公司;细胞增殖芯片购自杭州艾森生物;一抗、二抗均购自美国CST公司。

1.2 方法

1.2.1 人神经母细胞瘤细胞培养及慢病毒转染

取对数生长期的SH-SY5Y及SK-N-BE2细胞

以 5×10^4 个/ml分别重悬于含有10%胎牛血清的DMEM细胞培养基中,接种于6孔细胞板,放入5%CO₂细胞培养箱中37℃恒温培养。待细胞贴壁生长融合度达到80%~90%时,将ATG7敲减慢病毒及阴性对照慢病毒分别加入培养基中。继续培养8h,随后更换常规培养液继续培养72h。用倒置荧光显微镜观察细胞转染情况。

1.2.2 慢病毒转染效率检测

在倒置荧光显微镜下,观察慢病毒转染的各组细胞状态及绿色荧光表达情况,保证每组细胞转染效率在70%以上。采用Direct-zol™试剂盒提取各组细胞总RNA,RevertAid™试剂盒将总RNA逆转录为cDNA,最终采用Real-time PCR方法检测慢病毒转染后细胞内ATG7基因mRNA表达情况,并使用2^{-ΔΔCt}方法计算基因的相对表达量。ATG7基因和内参基因GAPDH的引物设计如下:(1)ATG7基因:上游引物5'-TGCTATCCTGCCCTCTGTCTT-3',下游引物5'-TGCCTCCTTTCTGGTTCTTTT-3';(2)GAPDH基因:上游引物5'-CGAGTCAACGGATTTGGTG-GTAT-3',下游引物5'-AGCCTTCTCCATGGTGAA-GAC-3'。

1.2.3 MTT方法检测细胞增殖

SH-SY5Y及SK-N-BE2细胞经慢病毒转染后,以 5×10^3 个/孔细胞密度接种于96孔板中,分别培养1、2、3、4、5d,然后每孔加入20μl MTT溶液(5mg/ml)染色。继续在37℃培养箱中培养4h后,将培养液吸净,每孔加入150μl DMSO,37℃震荡10min。应用多功能酶标仪(德国BMG公司)测定各孔492nm处吸光度值,计算细胞增殖倍数。每次每组设置6个重复孔,并进行3次重复实验。

1.2.4 实时监测阿霉素作用下细胞增殖

首先评估阿霉素对SH-SY5Y细胞杀伤能力,筛选适宜浓度探讨ATG7在肿瘤耐药中作用。将细胞以 4×10^3 个/孔的密度接种于E-plate板,24h后对细胞进行不同浓度阿霉素处理(0,12.5,25.0,50.0,100.0nM),使用xCELLigence RTCA DP多功能实时无标记细胞分析仪连续监测48h,统计分析筛选25nM为后续实验浓度。为探讨ATG7在肿瘤耐药中的作用,细胞经慢病毒转染后接种于E-plate板,24h后加入阿霉素处理,实时监测细胞的增殖能力48h,每次每组设置4个重复孔,并进行3次重复实验。

1.2.5 Western blotting 检测细胞凋亡情况

慢病毒转染 SH-SY5Y 细胞 48h 后,收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次后提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。配制 12%和 15% SDS-PAGE 后,每组上样 20 μ g 进行蛋白电泳并转移到 PVDF 膜上,进而在 5%脱脂牛奶中封闭 1h。然后分别孵育 LC3、Bcl-2、Bax、Caspase-3、GAPDH 抗体 (1:1000)4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗涤 3 次后,二抗(1:2000)孵育 1h,采用 ECL 发光液显影,凝胶成像系统曝光 (Bio-Rab)成像,使用系统自带软件分析目的条带吸光度,并用内参 GAPDH 条带进行校正。

1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 统计学软件分析,使用 *t* 检验比较不同组间差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒有效敲减细胞内 ATG7 基因表达

在荧光显微镜下观察细胞形态和荧光情况,发现 SH-SY5Y 细胞转染慢病毒后,对照组及 ATG7 敲减组细胞形态正常,且 80%以上细胞出现绿色荧光,说明 SH-SY5Y 细胞成功进行慢病毒转染(Figure 1A)。

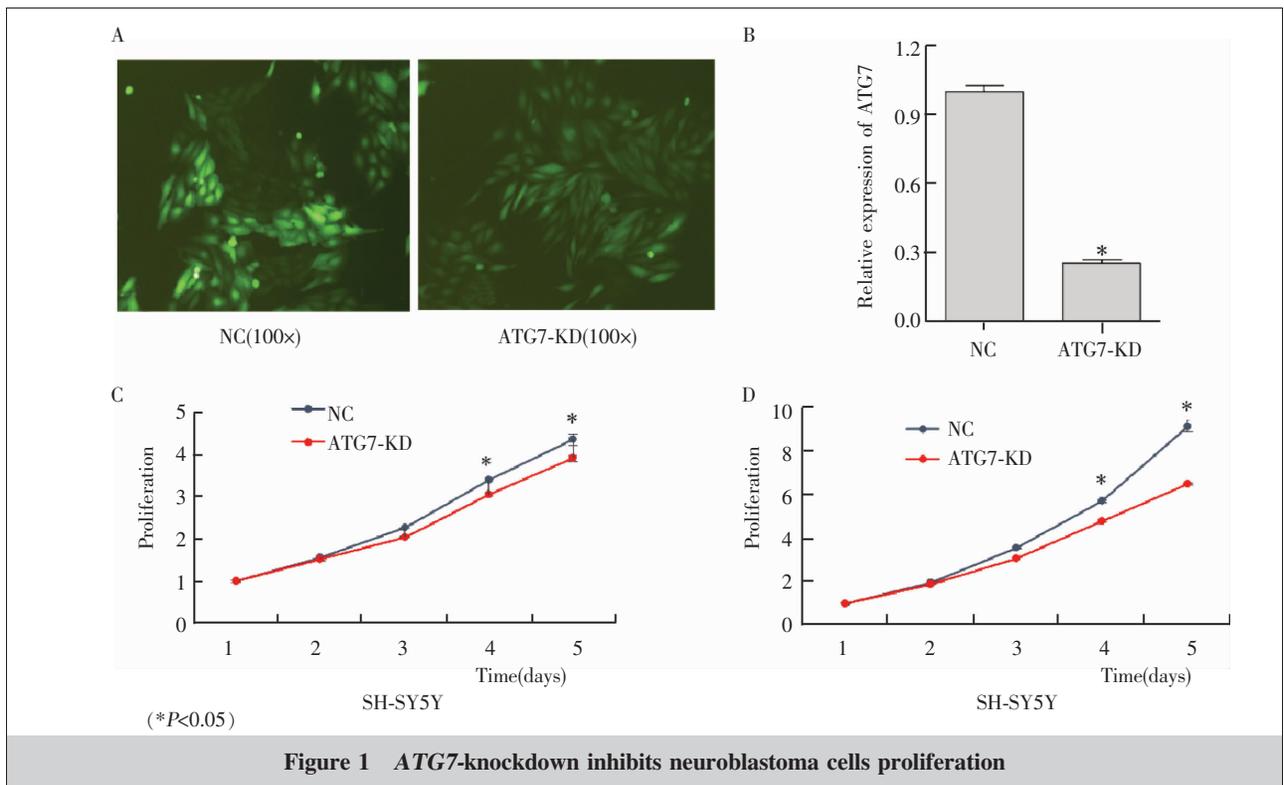
同时,采用 Real-time PCR 分别检测对照组和 ATG7 敲减组 ATG7 基因 mRNA 的表达情况,发现与对照组相比,ATG7 敲减组中 ATG7 基因表达明显降低,差异有统计学意义($t=12.50, P=0.0002$, Figure 1B)。证明 ATG7 慢病毒有效敲减细胞内 ATG7 基因表达。

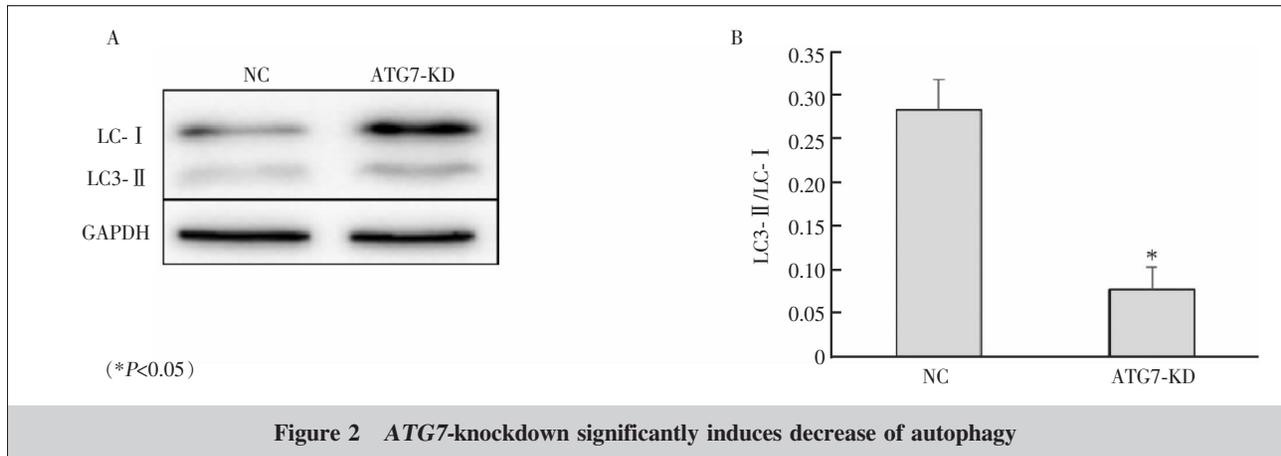
2.2 敲减 ATG7 基因对细胞增殖的影响

为进一步研究 ATG7 基因对细胞增殖的影响,我们采用 MTT 方法绘制细胞生长曲线,检测细胞增殖情况。研究发现,在 SH-SY5Y 细胞中,ATG7 敲减组细胞在第 4、5d 时增殖倍数分别为 3.05 和 3.92,显著低于对照组增殖倍数的 3.40 和 4.35($t=8.19, P=0.0012; t=4.83, P=0.0085$);另外,在 SK-N-BE2 细胞系中也出现类似结果,且存在统计学差异($t=25.09, P=0.0001; t=15.85, P=0.0001$)(Figure 1 C,D)。

2.3 敲减 ATG7 基因对细胞自噬的影响

由于 ATG7 是细胞自噬启动的关键基因,利用 Western blot 检测自噬标志性蛋白 LC3- II / I 比值的变化以评价自噬的形成,探讨 ATG7 介导的自噬在细胞增殖中的作用。结果显示,敲减 ATG7 基因后 SH-SY5Y 细胞内 LC3- I 蛋白水平升高(Figure 2A),说明自噬水平降低,LC3- I 型向 LC3- II 型转化受阻,且 LC3- II / I 比值在 ATG7 敲减组和对照组之间





差异有统计学意义($t=8.29, P=0.0012$)(Figure 2B)。

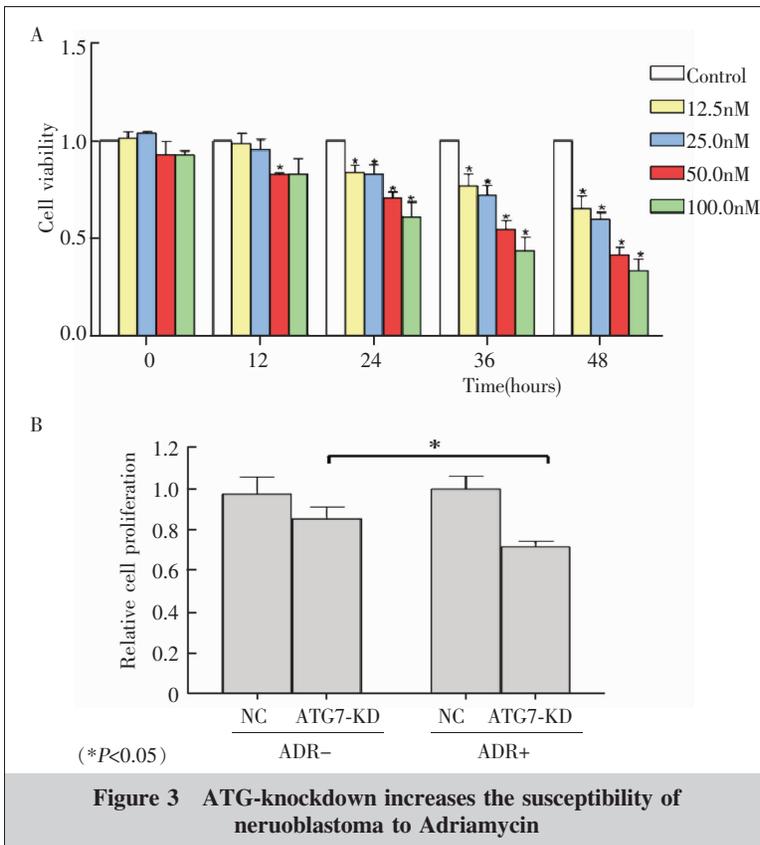
2.4 敲减 ATG7 基因降低 SH-SY5Y 细胞耐药性

阿霉素对 SH-SY5Y 的细胞杀伤能力随时间延长和浓度升高而增强,呈现时间和剂量依赖趋势(Figure 3A),由于 25nM 阿霉素浓度较低但是对细胞杀伤效果明显,因此选用 25nM 阿霉素分别处理对照组和 ATG7 敲减组细胞,探讨 ATG7 基因在肿瘤耐药中的作用。研究结果显示,阿霉素处理后 ATG7 敲减组细胞相比对照组细胞增殖率明显降低($t=2.36, P=0.0363$)(Figure 3B),说明敲减 ATG7 可

增加神经母细胞瘤细胞对阿霉素敏感性,即 ATG7 基因对神经母细胞瘤耐药性起重要作用,提示 ATG7 介导的自噬可能参与神经母细胞瘤的耐药性。

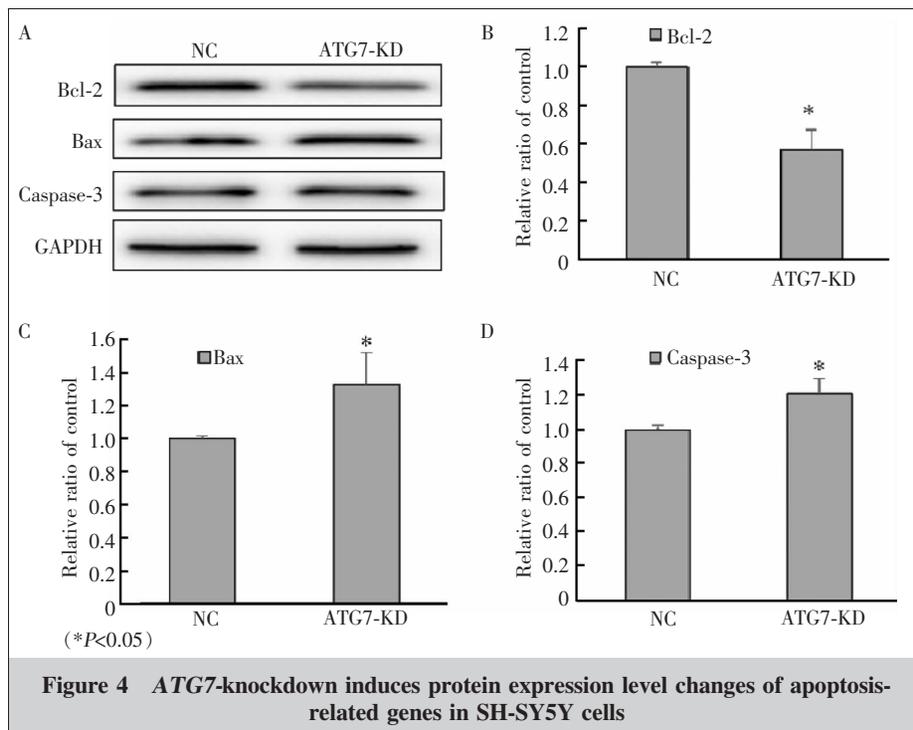
2.5 敲减 ATG7 基因促进 SH-SY5Y 细胞凋亡

细胞凋亡和细胞增殖密切相关,通过 Western blotting 方法检测细胞内凋亡相关蛋白表达情况,探讨敲减 ATG7 基因是否会影响细胞凋亡。研究发现,与对照组相比,在 ATG7 敲减组中凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达明显降低($t=9.53, P=0.0001$),而促凋亡蛋白 Bax($t=9.04, P=0.0008$)和 Caspase-3 表达显著升高($t=9.04, P=0.0008; t=4.39, P=0.0118$)(Figure 4)。由于 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 是细胞凋亡的重要调控因子,在本研究中敲减 ATG7 基因后激活了促凋亡蛋白而降低抑制凋亡蛋白表达,说明在神经母细胞瘤细胞中 ATG7 基因可能通过细胞自噬发挥凋亡抑制作用。



3 讨论

神经母细胞瘤(NB)是儿童最常见的神经外胚层实体肿瘤,虽然遗传学和分子生物学研究发现 MYCN 异常扩增、ALK 和 ATRX 突变以及 TERT 重排等基因改变与 NB 相关^[4-9],但是 NB 的发病机制仍然不清楚。自噬是细胞通过单层或多层膜结构包裹细胞内容物形成自噬体,进而与溶酶体融合,实现其内容物降解和物质循环利用的过程。当自噬功能紊乱时会引起机体严重的病理反应,如神经退行性疾病



病、心肌病以及癌症^[12,20]。自噬与肿瘤之间关系密切而且复杂。同时,自噬也拥有抑制肿瘤和促进肿瘤生长的双重作用。在肿瘤细胞中,自噬既可以促进肿瘤细胞死亡,减缓肿瘤恶化速度,又可以促进肿瘤细胞异常增殖^[21]。在自噬过程中,ATG7能同时调控泛素样蛋白 ATG12 和 ATG8 结合系统,是自噬泡形成和自噬启动的关键基因。Shimizu 等^[22]研究发现,在 ATG7-/-小鼠的肝细胞中自噬泡形成受阻^[22];而且阻断小鼠 L929 细胞中 ATG7 表达,可显著降低自噬性细胞凋亡的发生^[23]。然而,ATG7 及其介导的自噬在 NB 发生发展中的作用仍然不清楚。在本研究中,敲减 ATG7 基因能够抑制 LC3- I 型向 LC3- II 型的转换,进一步验证了 ATG7 对自噬体形成的调控作用,提示在 SH-SY5Y 细胞内 ATG7 可以明显介导自噬的发生。敲减 ATG7 可以抑制神经母细胞瘤增殖促进细胞凋亡,降低细胞的耐药性,提示 ATG7 介导的自噬可能参与 NB 肿瘤增殖和耐药性调控。

ATG7 与肺癌、结直肠癌、前列腺癌等多种肿瘤的异常增殖关系密切^[14-19]。在小鼠模型中,敲除 ATG7 基因能显著降低肿瘤细胞成瘤能力,促使肺癌细胞向良性肿瘤转化^[24];ATG7 缺失可完全抑制小鼠肠上皮细胞肿瘤的发生和发展,促进机体抗肿瘤免疫反应^[25]。与上述研究结果一致,我们也发现,

在神经母细胞瘤 SH-SY5Y 和 SK-N-BE2 细胞系中敲减 ATG7 基因,神经母细胞瘤细胞增殖明显降低。由于 ATG7 是启动细胞自噬过程的重要基因,本研究结果说明 ATG7 介导的自噬可能在维持神经母细胞瘤增殖过程中起重要作用。由于细胞凋亡与细胞增殖相关,而细胞自噬和凋亡之间的关系十分复杂,并且在分子层面存在串话(crosstalk)。研究表明,自噬相关蛋白能够直接激活 Caspase 依赖的细胞凋亡^[26],同时也可以分解细胞内老化的蛋白和细胞器为肿瘤细胞提

供能量和营养,从而抑制细胞凋亡^[23,27]。并且当细胞 DNA 损伤时,自噬可以保持基因组的完整性,如果自噬缺乏,大量损伤 DNA 会激活细胞凋亡应答。在长期代谢处理 ATG7 缺失的小鼠后,会导致小鼠体内 DNA 损伤的增加,从而促进 p53 诱导的细胞凋亡^[28]。同时,肿瘤细胞中自噬水平明显升高,可能是细胞对自身消化活动调节异常敏感,从而应对不同细胞外信号逃避细胞凋亡^[29]。这些研究表明,细胞自噬不仅能维持细胞稳态,也能保护细胞免于胞内应激引起的细胞凋亡,提示细胞自噬能够促进细胞的存活,维持细胞增殖能力。我们在 SH-SY5Y 细胞中研究发现,敲减 ATG7 显著降低凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达水平,升高促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达,证明 ATG7 介导的自噬不仅可以促进细胞增殖,而且能抑制 NB 肿瘤细胞凋亡。

近年来,大量研究表明 ATG7 介导的细胞自噬不仅与肿瘤异常增殖有关还能促进肿瘤耐药性的形成。在肝肿瘤细胞中 ATG7 上调可促进自噬,从而降低其对索拉非尼等化疗药物的抗药性^[30]。而抑制乳腺、前列腺或者结肠癌细胞自噬,其对放疗的敏感性明显增强^[31,32]。在本研究中,敲减 ATG7 基因,肿瘤细胞对阿霉素的敏感性显著增强,说明在 NB 中 ATG7 介导的细胞自噬同样能够增强肿瘤细胞对化

疗药物的耐药性, 课题组后续将深入研究 *ATG7* 影响 NB 肿瘤细胞耐药性的分子机制。

本研究发现敲减 *ATG7* 基因抑制神经母细胞瘤增殖并且促进细胞凋亡, 同时降低细胞的耐药性, 由于 *ATG7* 对自噬启动至关重要, 提示在肿瘤细胞中 *ATG7* 可能通过介导细胞自噬促进细胞的异常增殖、抑制细胞发生凋亡并且降低细胞对化疗药物的敏感性。因此, 本研究揭示了 *ATG7* 在 NB 肿瘤增殖、凋亡和耐药中的作用, 可为临床神经母细胞瘤的治疗提供新的数据支持和理论依据。

参考文献:

- [1] Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, et al. Neuroblastoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2016, 2:16078.
- [2] Maris JM. Recent advances in neuroblastoma[J]. N Engl J Med, 2010, 362(23):2202–2211.
- [3] Yu AL, Gilman MA, Ozkaynak LF, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma[J]. N Engl J Med, 2010, 363(14):1324–1334.
- [4] Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma [J]. Nat Genet, 2013, 45(3):279–284.
- [5] Molenaar JJ, Koster J, Zwiijnenburg DA, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neurogenesis genes[J]. Nature, 2012, 483(7391):589–593.
- [6] Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene[J]. Nature, 2008, 455(7215):930–935.
- [7] Lu J, Chu P, Wang H, et al. Candidate gene association analysis of neuroblastoma in Chinese children strengthens the role of LMO1[J]. PLoS One, 2015, 10(6):e0127856.
- [8] Zhang R, Zou Y, Zhu J, et al. The association between GWAS-identified BARD1 gene SNPs and neuroblastoma susceptibility in a Southern Chinese population [J]. Int J Med Sci, 2016, 13(2):133–138.
- [9] Zhang Z, Zhang R, Zhu J, et al. Common variations within HACE1 gene and neuroblastoma susceptibility in a Southern Chinese population [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10:703–709.
- [10] Belounis A, Nyalendo C, Le Gall R, et al. Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1):891.
- [11] Liu Y, Song L. HMGB1-induced autophagy in Schwann cells promotes neuroblastoma proliferation [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1):504–510.
- [12] Nixon RA, Yang DS. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(10):pii: a008839
- [13] Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism[J]. Semin Cell Dev Biol, 2012, 23(4):395–401.
- [14] Sun S, Wang Z, Tang F, et al. *ATG7* promotes the tumorigenesis of lung cancer but might be dispensable for prognosis predication: a clinicopathologic study[J]. Onco Targets Ther, 2016, 9:4975–4981.
- [15] Santanam U, Banach-Petrosky W, Abate-Shen C, et al. Atg7 cooperates with Pten loss to drive prostate cancer tumor growth[J]. Genes Dev, 2016, 30(4):399–407.
- [16] Piya SS, Kornblau M, Ruvolo VR, et al. Atg7 suppression enhances chemotherapeutic agent sensitivity and overcomes stroma-mediated chemoresistance in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2016, 128(9):1260–1269.
- [17] Hao H, Xia G, Wang C, et al. miR-106a suppresses tumor cells death in colorectal cancer through targeting [J]. Med Mol Morphol, 2017, 50(2):76–85.
- [18] Cao QH, Liu F, Yang ZL, et al. Prognostic value of autophagy related proteins ULK1, Beclin 1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG9, ATG10, ATG12, LC3B and p62/SQSTM1 in gastric cancer[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(9):3831–3847.
- [19] Gonzalez Y, Aryal B, Chehab L, et al. Atg7- and Keap1-dependent autophagy protects breast cancer cell lines against mitochinone-induced oxidative stress [J]. Oncotarget, 2014, 5(6):1526–1537.
- [20] Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. N Engl J Med, 2013, 368(7):651–662.
- [21] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword[J]. Science, 2004, 306(5698):990–995.
- [22] Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(12):1221–1228.
- [23] Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period [J]. Nature, 2004, 432(7020):1032–1036.
- [24] Strohecker AM, Guo JY, Karsli-Uzunbas G, et al. Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors [J]. Cancer Discov, 2013, 3(11):1272–1285.
- [25] Levy JW, Cacheux M, Bara A, et al. Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(8):1062–1073.
- [26] Chen ZH, Lam HC, Jin Y, et al. Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(44):18880–18885.
- [27] Komatsu M, Waguri S, Ueno T, et al. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice[J]. J Cell Biol, 2005, 169(3):425–434.
- [28] Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development[J]. Nature, 2013, 504(7479):296–300.
- [29] Rez G, Toth S, Palfia Z. Cellular autophagic capacity is highly increased in azaserine-induced premalignant atypical acinar nodule cells[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(10):1893–1898.
- [30] Luo T, Fu J, Xu A, et al. PSMD10/Gankyrin induces autophagy to promote tumor progression through cytoplasmic interaction with ATG7 and nuclear transactivation of ATG7 expression[J]. Autophagy, 2015, [Epub ahead of print].
- [31] Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, et al. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis[J]. Genes Dev, 2007, 21(13):1621–1635.
- [32] Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability[J]. Genes Dev, 2007, 21(11):1367–1381.