

细胞自噬及其在肿瘤发展中的作用

叶 军 王 辉 黄雪媚 郭建全 杨焕杰*

(哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150001)

摘要 自噬是指由膜包裹的自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,并在其中降解所包裹的内含物的过程。自噬包含自噬起始、自噬体的形成、自噬体的成熟和溶酶体的再生四个基本过程,目前已发现几十种Atg蛋白参与其中。此外,自噬受到mTOR、PI3K和ULK1的中心调控以及转录因子和microRNA的调控。自噬对维持细胞内环境的稳定起着关键性作用,在肿瘤的形成与发展中发挥着复杂的作用。

关键词 自噬; 肿瘤; 信号通路; 转录因子; microRNA

Autophagy and Its Role in Tumor Development

Ye Jun, Wang Hui, Huang Xuemei, Guo Jianquan, Yang Huanjie*

(School of Life Science and Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

Abstract Autophagy is a conserved process of protein degradation with characteristic of autophagosome formation followed by fusion with lysosome. Autophagy is composed of four basic steps, the initiation, autophagosome formation, maturation and lysosome reformation, all of which are controlled by autophagy related proteins. In addition, autophagy is regulated by mTOR, PI3K, ULK1 and transcription factors as well as microRNAs. Autophagy plays a key role in the maintenance of the homeostasis in cells, and also has a complex impact on tumor initiation and development.

Keywords autophagy; tumor; signaling pathway; transcription factor; microRNA

自噬 (autophagy)是指在真核细胞中由双层膜包裹部分胞质以及细胞内需降解的细胞器、蛋白质等形成自噬体 (autophagosome), 并与内涵体 (endosome) 融合形成自噬内涵体 (amphisomes), 最后与溶酶体融合形成自噬性溶酶体 (autophagolysosome), 并降解所包裹的内容物的过程。自噬在真核细胞中高度保守, 对于维持细胞内蛋白的代谢平衡和细胞内环境的稳定和保持细胞正常的生理功能具有非常重要的作用。

1 自噬的基本过程

自噬的过程很短, 只有8分钟左右, 是细胞对于

环境变化的快速反应。自噬发生的过程大致分为自噬的起始、自噬体的形成、与溶酶体融合、内容物的降解与释放和溶酶体的再生^[1-2]。

1.1 自噬的起始

自噬的整个过程开始于一段被称作自噬泡 (phagophore) 或隔离膜 (isolation membrane) 的区域。自噬泡组装的位置被称作PAS (phagophore assembly site), 约近二十种自噬相关蛋白被招募于此, 单独或以复合体的形式参与自噬体的起始过程。

哺乳动物细胞中自噬的起始阶段受到两大复合物的精确调控, 即PI3K (phosphatidylinositol

收稿日期: 2014-09-06 接受日期: 2014-12-31

黑龙江省自然科学基金(批准号: C201432)、哈尔滨市科技创新人才研究专项基金(批准号: 2012RFLXS011)和教育部留学回国人员科研启动基金资助的课题*通讯作者。Tel: 0451-86403616, E-mail: yanghj@hit.edu.cn

Received: September 6, 2014 Accepted: December 31, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (Grant No.C201432), Innovation Research Project of Harbin (Grant No.2012RFLXS011) and Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of State Education Ministry

*Corresponding author. Tel: +86-451-86403616, E-mail: yanghj@hit.edu.cn

网络出版时间: 2015-02-28 14:48 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150228.1448.004.html>

3-kinase)复合物和ULK1(UNC51-like kinase)复合物。在自噬起始阶段发挥作用的PI3K复合物为三型PI3K, 包括PI3K(hVps34)以及相应的调节性蛋白激酶p150(hVps15)、Beclin-1和Atg14L。hVps34催化磷脂酰肌醇形成磷脂酰肌醇-3磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)。有文章指出, 自噬即起源于内质网上富含PI3P的区域所形成的杯状的“ Ω ”小体, 电镜下亦可观察到该结构与内质网相联系, 提示自噬体的内质网起源^[3-5]。尽管自噬体膜的起源存在争议, 如有文献报道自噬体膜的高尔基体或质膜来源^[6-7]。但最近的研究指出, 自噬活动可能起始于内质网与线粒体接触点, 如饥饿处理后, 自噬相关蛋白Atg14和Atg5定位于内质网-线粒体接触处, 内质网驻留的SNARE(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors)蛋白STX17(Syntaxin-17)结合Atg14并将其招募至内质网-线粒体接触处。而破坏内质网与线粒体的接触点则能阻止Atg14蛋白在此处的聚集。在酵母细胞中也发现, 自噬相关蛋白Atg8与形成内质网-线粒体接触结构(endoplasmic reticulum-mitochondrial encounter structure)的Mmm1蛋白互相结合^[8], 支持自噬可能起始于内质网与线粒体接触点的观点。研究发现, 在自噬条件下, Atg14和PI3K富集于内质网上, 它们富集的区域即为“ Ω ”小体形成的区域; 饥饿条件下, “ Ω ”小体标记物ZFYVE1/DFCP1(double FYVE-domain containing protein 1)被检测到移至内质网-线粒体接触处^[9], 表明自噬活动可能起始于内质网与线粒体接触点, 由此开始后续的自噬过程。

哺乳动物中, ULK1起始复合物为ULK1:Atg13:FIP200(200 kDa focal adhesion kinase family-interacting protein), 该复合物始终稳定存在于细胞中, 并不受营养条件的控制^[10]。正常情况下, 自噬活动受到mTOR(mamalian target of rapamycin)的抑制而处于非常低的水平, 当用雷帕霉素或者饥饿处理时, mTOR的活性受到抑制, ULK1的活性被激活, Atg13和FIP200被磷酸化, 促进自噬的发生。

Atg9是参与自噬发生的唯一的膜整合蛋白, 其哺乳动物的同源物为Atg9L, 它作为脂类物质的载体, 或作为平台负责将其他的自噬相关蛋白募集到PAS处。Atg9可以在PAS和细胞质中非PAS处穿梭。在酵母中, Atg11与Atg23和Atg27共同作用将Atg9募集到PAS。Atg9被运送到PAS后, 继续招募其

他的自噬相关蛋白, 如Atg12和微管相关蛋白轻链LC3(micotubules associated protein light chain 3)^[11]。

Atg18则通过与PAS处富集的PI3P相互作用, 将Atg18:Atg2复合体携带至PAS。在Atg18:Atg2复合体、Atg1复合体以及PI3K复合体的帮助下, Atg9L离开PAS, 回到细胞质基质中, 完成其循环过程^[11]。

1.2 自噬体的形成

自噬体膜的伸展与封闭依赖于两类泛素样蛋白系统: Atg12及其相关蛋白和Atg8及其相关蛋白^[12]。Atg12由Atg7(类似于E1泛素激活酶)激活, 然后在Atg10(类似于E2泛素耦联酶)的介导下耦联到Atg5。Atg12与Atg5共价连接后与Atg16L结合, 后者指导Atg12-Atg5-Atg16L复合体到达自噬体膜上。

LC3为酵母Atg8的同源物, 它在合成后不久被Atg4切割成LC3-I, 暴露的C末端在Atg7(E1泛素激活酶活性)、Atg3(E2泛素耦联酶活性)和Atg12-Atg5复合体(E3泛素连接酶活性)的作用下耦联到磷脂酰乙醇胺的极性头, 成为脂化形式的LC3-II。LC3-II附着到自噬体的膜上并在自噬体膜上募集脂质分子, 保证自噬体膜的扩展并封闭^[13-14]。自噬体形成之后, Atg12-Atg5-Atg16L复合物离开自噬体, 并且自噬体胞质一侧的LC3被Atg4切割下来重新利用。

1.3 自噬体与溶酶体的融合及内容物降解与释放

大多数情况下, 自噬体形成之后会与一系列的囊泡融合, 包括早期和晚期内体, 自噬体最终与溶酶体融合并在其中进行底物的降解, 这些过程统称为自噬体的成熟。

自噬体与各种囊泡的融合需要一系列蛋白的参与。例如在囊泡识别过程中起作用的SNARE蛋白复合物、在融合过程中发挥作用的Hrs及其下游ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)蛋白^[15]。此外, LAMPs(lysosome-associated membrane proteins)、DRAM(damage regulated autophagy modulator)以及一些微管和微管相关蛋白也参与自噬体与各种囊泡的融合过程。

在经过一系列的融合之后, 自噬体的内膜及其内含物在溶酶体中被降解。这个过程需要在自噬体内的溶胶环境酸化完成之后才能进行, 并且依赖于自噬性溶酶体内一系列的水解酶, 如酸性蛋白水解酶Prb1(proline-rich protein BstNI subfamily 1)^[16]和负责去除氧化损伤蛋白的Pep4(phosphoenolpyruvate carboxylase 4)^[17]以及具有脂酶活性的Atg15^[18]。最

终,自噬溶酶体内各种大分子降解的产物会被释放至胞质中。目前,已知在哺乳动物中,有SLC36A1/LYAAT-1(lysosomal amino acid transporter-1)和SLC36A4/LYAAT-2^[19]参与氨基酸的释放,在酵母细胞中则还有Atg22参与此过程^[20],但其哺乳动物细胞内的同源类似物暂无报道。

1.4 溶酶体的再生

在自噬过程中,自噬体向溶酶体递送了膜和底物,使后者的体积扩展。自噬性溶酶体在完成对其内含物的降解之后,会向外侧突起形成管状结构或者芽状体,并且携带溶酶体膜标记蛋白LAMP1和LAMP2,然而,这些囊泡呈非酸化状态,也缺乏相关水解酶,即原溶酶体(proto-lysosome),最终成熟为有功能的溶酶体。这一过程被定义为自噬性溶酶体再生(autophagic lysosomal reformation, ALR)^[2],它对维持细胞内溶酶体平衡具有重要意义。

大分子物质经自噬性溶酶体降解为小分子物质后被释放到细胞质,刺激被抑制的mTOR再活化,mTOR作为自噬的负调控分子抑制自噬并启动ALR^[2]。进一步研究显示,Spinster蛋白对于mTORC1的重新激活也是必需的,在SPIN突变的细胞中,mTORC1无法被重新激活^[21]。最近,Rong等^[22]阐述了ALR的分子机制。自噬性溶酶体膜的特定区域产生磷脂酰肌醇-4-磷酸,磷脂酰肌醇-4-磷酸被进一步磷酸化成为磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸,招募接头蛋白AP2(adaptor protein 2)、AP4和网格蛋白到达自噬性溶酶体膜上,刺激再生小管的出芽。研究者认为,溶酶体的再生包含了原溶酶体形成和溶酶体成熟两部分^[23]。关于溶酶体的成熟,有报道指出这个过程涉及到了蛋白质的合成,利用放线菌酮处理细胞后将会阻止溶酶体成熟^[24]。

2 自噬的主要调控分子

2.1 mTOR

mTOR激酶包括mTORC1和mTORC2两种功能性复合物,它作为氨基酸、ATP和激素的感受器,可抑制自噬的发生,是自噬的负调控分子。mTOR是以怎样的机制感受细胞内氨基酸含量变化的尚不完全清楚,但有研究表明,hVps34参与了mTOR对氨基酸的信号感受过程^[25]。此外,也有研究指出,Rag GTPases能够感受氨基酸信号的变化进而改变mTOR在细胞内的分布,使其转移至Rheb(Ras

homolog enriched in brain)蛋白处,活化mTOR^[26]。L-谷氨酰胺是影响mTOR活性的关键氨基酸,细胞对它的吸收受到溶质载体家族成员SLC1A5、SLC7A5/SLC3A2的调控^[27]。因此,溶质载体家族成员通过调控细胞对L-谷氨酰胺的吸收来影响mTOR的活性。

mTORC1对自噬的抑制作用依赖于细胞的营养状况。在饥饿或者雷帕霉素处理的条件下,mTORC1离开ULK1-Atg13-FIP200复合物使ULK1被激活,活化的ULK1能够磷酸化Atg13和FIP200,进而启动自噬。

mTORC2对雷帕霉素的敏感性相对较低,它通过磷酸化Akt/PKB(protein kinase B)激酶的第473位的丝氨酸使其活化,活化的Akt/PKB下调转录因子FOXO3(forkhead box O3),而FOXO3能上调一系列自噬相关基因的表达,从而促进自噬^[28],因此mTORC2通过下调FOXO3抑制自噬。

2.2 p62/SQSTM1

自噬是一种批量的底物降解过程,选择性自噬是它的一种特殊类型,由自噬受体,如p62/SQSTM1(sequestosome 1)介导将蛋白聚集体、细胞器或进入细胞的原病原体包裹到自噬体被降解。在p62的C末端存在泛素相关(ubiquitin-associated, UBA)功能域,可以结合累积的多聚泛素化蛋白^[29]。研究显示,UBA与多聚泛素化蛋白的亲合性因其第403位苏氨酸的磷酸化而加强^[30]。在其UBA功能域的N-端附近有一个22个氨基酸组成的功能域,即LC3互作区(LC3-interacting region, LIR),可以结合微管相关蛋白LC3^[31]。因此,p62/SQSTM1作为接头蛋白,将累积的泛素化蛋白选择性地募集到自噬体上,最终通过与溶酶体融合完成蛋白质降解^[31]。p62是自噬受体的代表,类似的自噬受体如NBR1(neuromedin B receptor 1)和Nix同样介导泛素化标记的底物通过选择性自噬被降解^[32]。

p62在自噬信号通路的作用亦有报道。在自噬起始阶段,有文献报道,p62蛋白能够破坏Beclin-1和Bcl-2之间的联系,释放Beclin-1来促进自噬的发生^[33]。另外,p62是细胞通过mTOR通路感受氨基酸变化的关键调控蛋白,p62特异性地帮助mTOR1响应氨基酸刺激而活化,p62作为支架蛋白,为mTOR在溶酶体上的停靠提供位点以利于它的活化。在p62敲除的细胞中,因氨基酸缺乏诱导的自噬活动因mTOR的失活被进一步强化,也证实p62对自噬抑制子的正调控作用^[34]。

2.3 PI3K

PI3K及其脂质磷酸化产物在自噬活动中发挥重要作用。在哺乳动物细胞中,依据酶结构、底物特异性和形成产物的不同,将PI3K分成三种类型^[35]。

I型PI3K能够被胰岛素受体激活,在细胞膜的胞质侧生成磷脂酰肌醇二磷酸和磷脂酰肌醇三磷酸,这两种分子能够活化PDK1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1)和蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)/Akt。PKB在磷酸化抑制GTP酶以活化蛋白复合物TSC1(tuberous sclerosis complex 1)-TSC2,进而导致Theb-GTP稳定性增强并激活mTOR,抑制自噬。

III型PI3K即hVps34,通过Beclin-1与不同的分子结合在自噬的起始和成熟过程中发挥作用。在自噬的起始阶段,hVps34与其调控的蛋白激酶hVps15通过Beclin-1结合Atg14L形成复合物,该复合物促进“Ω”小体形成所必需的PI3P的生成,启动自噬体的形成;在自噬体的成熟阶段,hVps34通过Beclin-1分别结合Rubicon和UVRAG,Beclin-1:hVps34:UVRAG复合物下调自噬体的运输过程,而Beclin-1:hVps34:UVRAG则上调自噬体的成熟以及运输过程^[36]。

抗凋亡蛋白Bcl-2因与Beclin-1的BH3结构域结合而抑制自噬的发生^[36],相应地,影响二者稳定性的分子则促进自噬,如JNK-1(c-Jun N-terminal kinase-1)能磷酸化Bcl-2蛋白N端的三个氨基酸,促进二者的解离^[37];Bax通过自身的BH3结构域与Beclin-1竞争结合Bcl-2,促进Bcl-2与Beclin-1解离^[38]。JNK除了能够磷酸化Bcl-2促进Beclin-1与Bcl-2的解离外,还能够通过磷酸化c-Jun增强Beclin-1的表达进而促进自噬过程^[39-40]。

2.4 ULK1

ULK1是酵母细胞Atg1在哺乳动物细胞中的同源产物,如前所述,ULK1与Atg13和FIP200形成复合物ULK1:Atg13:FIP200,对自噬的起始具有极为重要的调控作用。小鼠胚胎成纤维细胞中ULK1被敲除后,由营养缺失诱导的自噬活动受到阻滞^[41]。在哺乳动物中,ULK1复合物存在于胞质中,在自噬被激活时转移到内质网的自噬体组装位点^[42]。

ULK1的活性受到mTORC1的磷酸化调节。亮氨酸缺乏或者雷帕霉素处理都会导致mTORC1活性受到抑制。相应地,ULK1的活性会提高并且促

进Atg13和FIP200的磷酸化^[10,43-44]。在营养充足的条件下,ULK1与mTORC1会有更强的结合,并且诱导ULK1的磷酸化,导致ULK1复合物活性下降^[10,44]。

在氨基酸饥饿或者雷帕霉素处理的条件下,ULK1能磷酸化Beclin-1的Ser-14,而Beclin-1的磷酸化可以激活另一自噬起始复合物hVps34^[45]。ULK1同样可以磷酸化hVps34复合物的配体AMBRA1(activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1),使得AMBRA1-hVps34复合物转移至PAS^[46]。

另外,有研究表明,ULK1可以通过Sestrin2蛋白与p62结合,进而将这两种蛋白磷酸化。p62蛋白第403位丝氨酸的磷酸化利于该蛋白及其靶蛋白的自噬性降解,而ULK1对p62的磷酸化正在此位点^[47]。

肌球蛋白轻链激酶样蛋白(myosin light chain kinase-like protein)也是ULK1复合体的底物之一,它通过myosin II的活化来调控Atg9介导的自噬体形成^[48]。此外,在酵母细胞和哺乳细胞中均发现Atg1或ULK1与微管相关蛋白Atg8或LC3相互作用,促进自噬体的形成^[49-50]。

2.5 AMPK

AMPK(AMP-activated protein kinase)是一个Ser/Thr激酶,能够调节细胞内的能量代谢。细胞在低糖或发生氧化应激反应后,AMPK被激活,从而促使细胞内ATP的合成,并阻止其分解。

AMPK参与由饥饿诱导的自噬过程,涉及多种方式,如糖饥饿诱导产生氧自由基(reactive oxygen species, ROS),通过Ca²⁺-CaMKKβ(Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase kinase β)通路来激活AMPK;糖饥饿也可通过降低细胞内ATP浓度直接激活AMPK^[51]。利用抗氧化物或者超氧化物歧化酶均可阻止脱氧葡萄糖处理对AMPK的活化,也说明糖饥饿诱导的ROS是激活AMPK的原因之一^[52]。同样地,血清或者氨基酸饥饿均不能激活线粒体电子传递链缺陷的HeLa细胞或者过表达超氧化物歧化酶的野生型HeLa细胞中的AMPK,也说明AMPK的激活是由血清或者氨基酸饥饿诱导的ROS引起的^[53]。

其他研究也显示,AMPK是一个重要的自噬调控因子。例如,由DHA诱导的自噬的发生依赖于mTOR信号通路的抑制。AMPK可以磷酸化TSC(tuberous sclerosis complex)复合物,而TSC复合物则是mTOR1的负调控因子^[54]。在自噬的调节

因子中, ULK1是AMPK的一个靶蛋白。黄芩苷诱导的自噬即通过激活AMPK/ULK1通路完成;在 *prkaal*(AMP-activated protein kinase α 1)敲除小鼠体内, *prkaal*的敲除导致了ULK1上的Ser-555不能发生磷酸化,从而阻止了起始复合物的形成,降低了自噬的水平^[55]。最近有研究表明,AMPK也可以通过磷酸化raptor蛋白第863位的Ser进而抑制mTORC1的活性,诱导自噬发生^[56]。

2.6 转录因子

NF- κ B在免疫反应和炎症反应等诸多方面发挥作用,其在自噬的调控方面所起的作用也很复杂。有文献表明, *Beclin-1*基因启动子区包含保守的NF- κ B结合域, NF- κ B能上调 *Beclin-1*的表达并促进自噬的发生^[57];在热休克反应中也观察到NF- κ B激活后自噬过程被激活^[58]。与此相反,有文献报道,抑制NF- κ B会促进饥饿诱导的自噬反应。在巨噬细胞中发现, NF- κ B的活化会下调 *Atg5*和 *Beclin-1*的表达从而阻止自噬的发生^[59-60]。

E2F在细胞的增殖、分化以及DNA修复中都会发生作用。在自噬过程中, E2F能够影响 *Beclin-1*的表达。有研究表明, E2F能够通过上调LC3、ULK1、*Atg5*以及DRAM蛋白的表达促进自噬的发生^[61]。

HIF-1(hypoxia-inducible factor-1)能够调控细胞在低氧条件下发生响应的基因的表达。在低氧条件下, HIF-1能够诱导BNIP3(Bcl-2/E1B-19 kDa interacting protein 3)的表达,后者含有BH3结构域,能够竞争性地与Bcl-2结合,促进其与 *Beclin-1*的解离,从而诱导线粒体自噬^[62]。此外,作为转录因子, HIF-1直接调控 *Beclin-1*和 *Atg5*基因的表达^[63]。

FOX蛋白家族是一群庞大的转录因子家族,有文献报道, FOXO3能够诱导许多自噬相关基因的表达,如 *LC3*、*Atg12*、*Beclin-1*、*Atg4b*、*ULK1*、*hVps34*等^[64]。另有研究证实, FOXO1能在肝细胞中以胰岛素依赖的形式调控自噬关键基因 *Pik3c3*、*Atg12*和 *Gabarapl1*的表达^[65]。

p53主要在调节细胞死亡与生存及细胞代谢方面发挥作用。当细胞的生存受到威胁时,会促进p53进入细胞核并且在细胞核中积累,细胞核中的p53作为一种转录因子激活多种自噬相关基因,如 *Dram*和 *Tigar*(TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator)^[66]。DRAM蛋白能够促进自噬体的积累并且调控自噬溶酶体的形成。*Tigar*能够调节细胞内的

氧化还原水平,并且通过不依赖于mTOR的途径抑制自噬^[67]。而在细胞质中的p53则抑制自噬的发生^[68]。

2.7 微小RNA

微小RNA(microRNA)是近年来的研究热点。microRNA并不编码蛋白质,但能够以不完全匹配的方式与靶mRNA的编码区或者3'-UTR区结合,从而抑制目的mRNA的翻译或破坏其稳定性。

近几年有文章陆续报道, microRNA在自噬过程中的调控作用,它们靶向自噬相关基因或自噬的负调控基因,达到抑制或激活自噬的效果。

在慢性骨髓瘤白血病肿瘤细胞中发现, miR-30a能有效地抑制由伊玛替尼(imatinib)所诱导的 *Beclin-1*和 *Atg5*的表达,以降低细胞的自噬水平,并且miR-30a对自噬的抑制能促进伊玛替尼所诱导的肿瘤细胞凋亡^[69];同样在慢性骨髓瘤白血病中发现, miR-130a通过沉默 *Atg2*从而抑制自噬活动^[70]。而miR-181a则作用于 *Atg5*来抑制自噬的发生^[71]。miR-101对自噬的抑制作用受到普遍关注,研究显示, miR-101靶向 *Atg4B*、*RAB5A*(Ras-related protein Rab-5A)和 *STMN1*(Stathmin 1),进而抑制LC3的转化、*Atg5-Atg12*的结合过程以及自噬体的运输^[72]。对 *Atg4*表达有负调控作用的microRNA还有miR-376b,这个微小RNA也靶向 *Beclin-1*抑制自噬基因^[73]。这些研究显示, microRNA在对自噬的调控过程中,一个microRNA可调控多个自噬相关基因,而多个microRNA也可以靶向同一个自噬相关基因。

microRNA也能靶向自噬的负调控分子,促进自噬的发生。mTOR是自噬的抑制因子,有报道指出miR-18a促进共济失调毛细血管基因的表达,同时抑制mTORC1的活性,从而促进自噬水平的提高^[74]。另有报道指出, miR-155能结合mTOR通路中的多个靶点,包括 *RHEB*、*RICTOR*以及 *RPS6KB2*,并藉此抑制mTOR信号通路以促进自噬的发生^[75]。

3 自噬对恶性肿瘤的发生与死亡诱导的影响

自噬对维持细胞内蛋白质的代谢平衡起着重要的调控作用,因此,这一代谢通路的异常往往与多种疾病的发生相关。

3.1 自噬对肿瘤发生的影响

研究表明,正常水平的自噬对细胞的恶性转化及肿瘤的形成具有抑制作用。例如,已发现自噬体

形成所必需的 *Beclin-1* 在部分人类肿瘤细胞内呈现等位基因缺失; 自噬抑制因子 mTOR 在肿瘤细胞内被异常激活^[76]; 在肝细胞癌患者中也发现, 肿瘤细胞自噬水平的受损降低, 且与原癌基因 miR-224 处于异常高水平状态相关^[77]。在小鼠模型中, 将 *Atg5* 或者 *Atg7* 基因从组织中随机敲除后, 产生的肝癌细胞主要是从 *Atg5*^{-/-} 细胞或 *Atg7*^{-/-} 细胞分化而来的^[78], 为自噬抑制肿瘤的发生提供了直接证据。

自噬能有效消除细胞内累积的受损大分子或老化细胞器, 降低由此产生的应激压力。p62 是自噬体膜上识别受损的生物大分子或细胞器的受体分子, 在自噬体与溶酶体结合后被降解。研究表明, p62 蛋白的积累会诱导细胞的恶性转化, 而自噬则能通过消除 p62 而抑制肿瘤的形成^[79]; 利用 p62 RNAi 沉默 p62 后会导致细胞内 LC3 和 *Beclin-1* 的表达增加, 而这种自噬水平的提高与肿瘤细胞在小鼠体内的成瘤能力下降具有相关性^[80]。

不仅如此, 正常水平的自噬能维持细胞内遗传物质的稳定性, 而部分肿瘤的形成正是由于自噬的遗传性缺陷而导致细胞内遗传物质的不稳定所造成的。在人肺癌细胞中, 自噬缺陷与 RhoA 的过度表达呈正相关, 而 RhoA 的异常表达则会导致细胞多核化和异倍性, 这些遗传物质倍性的变化是肿瘤形成的原因之一^[81]。在发芽酵母细胞中, 研究人员也发现在饥饿情况下, 自噬缺陷能够导致细胞核的异常分裂, 并且在氮源补充后, 酵母细胞遗传物质的异倍性仍然有所增加^[82], 说明自噬能维持细胞内遗传物质的稳定性。

虽然正常水平的自噬对细胞的恶性转化具有抑制作用, 但是在部分肿瘤细胞内, *Beclin-1* 仅仅是单等位基因缺失^[76], 其他的自噬调控基因 (如 *UVRAG*) 也存在着单等位基因缺失的现象, 因此研究人员提出激活自噬活动可能对肿瘤细胞的存活具有积极意义^[83]。实验证明, 乳腺癌细胞在饥饿处理后, 溶酶体相关跨膜蛋白 LAMP4 (lysosomal-associated protein transmembrane-4 beta) 表达增高, 增加了细胞的存活能力并促进了肿瘤异植体生长^[84]。在人淋巴瘤细胞中, Myc 诱导 PERK/eIF2 α /ATF4 (activating transcription factor 4) 通路的激活, 但它也能够促进自噬水平的升高, 并藉此缓解内质网应激压力, 使得细胞存活能力增强; 而自噬水平降低, 则会导致肿瘤细胞克隆形成与体内成瘤能力下降, 甚至诱导

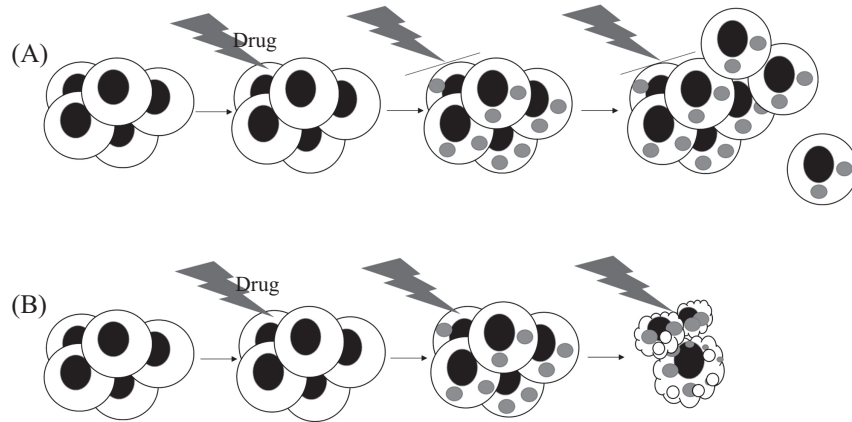
肿瘤细胞的凋亡^[85]。研究发现, 在胰腺癌细胞中, 基础自噬水平相对较高, 在自噬抑制后, 细胞内发生氧化应激反应、DNA 损伤以及细胞代谢水平下调, 不但肿瘤细胞的存活能力下降, 而且克隆形成能力也受到抑制^[86]。另外, *Atg5* 和 *Atg7* 的敲除也显著降低了由 *Ras* 诱导的肿瘤细胞在小鼠体内的成瘤能力, 而且, 各种实体瘤细胞系, 如 CT24、H1299、PC-3、PANC-1 和 HCT116, 在经过自噬抑制剂氯喹处理后, 细胞形成克隆的能力均显著下降^[87]; 在小鼠模型中, 敲除 *Atg7* 能够促使由 *K-Ras* 和 *Braf* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B) 诱导的肺癌细胞向良性肿瘤的转化^[88-89]。印记基因 *MEG3* (maternally expressed gene 3) 在膀胱癌细胞中被下调后激活了自噬, 从而促进了细胞的增殖^[90]。因此, 自噬的发生促进了恶性肿瘤的生长, 增强了肿瘤的成瘤能力。这在肿瘤干细胞中也得到了证实, 研究者发现, 在乳腺癌细胞中, 尤其乙醛脱氢酶 1 阳性 (aldehyde dehydrogenase 1-positive, ALDH1⁺) 细胞中, 自噬活动明显增强, 其中 *Beclin-1* 在肿瘤干细胞特性的维持及肿瘤的形成中具有至关重要的作用^[91]。

可见, 在正常细胞的恶性转化中, 自噬通过清除受损的生物大分子稳定遗传物质而抑制肿瘤细胞的形成; 已形成的肿瘤细胞, 其自噬活动的增加, 有助于肿瘤细胞抵抗不利的环境, 促进肿瘤细胞的生长与存活。

3.2 自噬与肿瘤细胞的抗药性

3.2.1 抑制自噬降低肿瘤细胞抗药性

研究显示, 自噬是肿瘤细胞产生抗药性的原因之一^[92]。例如, 西妥昔单抗在诱导肿瘤细胞凋亡的同时又激活了自噬, 这导致细胞凋亡率降低, 从而促进了细胞存活^[93]; 抗血管生成疗法能够抑制肿瘤的生长, 但是由此引起的低氧条件不可避免地激活了 HIF-1 α /AMPK 信号通路而诱导自噬的发生, 导致贝伐珠单抗抗药性的发生^[94]。强的松作用于 HeLa 细胞也因为自噬的激活而降低了错误折叠蛋白诱导的细胞凋亡, 利用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤或者氯喹可明显增加其诱导细胞凋亡的效果^[95]。在利用 Akt 抑制剂 AZD5363 (4-Piperidinecarboxamide) 抑制前列腺癌但效果并不理想的情况下, 研究发现, 3-甲基腺嘌呤通过抑制自噬有效增强了 AZD5363 对前列腺癌细胞 Du145 的促凋亡效果^[96]; 其他的研究也显示, 阻断自噬增强了 PC-3 和 DU145 前列腺癌细胞对 AZD5363 的反应, 尤



A: 自噬增强肿瘤细胞的抗药性, 促进肿瘤的发展; B: 抗肿瘤药诱导自噬, 发生自噬性细胞死亡。

A: autophagy enhances resistance of tumor cells to anti-tumor drugs and promotes their development; B: autophagy caused by anti-tumor drugs induces autophagic death.

图1 自噬在肿瘤治疗中的作用

Fig.1 The role of autophagy in the treatment of cancer

其在PC-3细胞的异植体中, 氯喹和AZD5363的联合应用表现出协同作用^[97]。通过氯喹抑制自噬后, 结肠癌细胞DLD-1对5-氟二氧嘧啶的化学敏感性明显增强^[98]。在非小细胞肺癌中, 3-甲基腺嘌呤和氯喹均能通过抑制细胞内基底水平自噬而增强强的松的药效^[99]。通过RNA干扰沉默*Atg7*和*Beclin-1*, 也明显促进了5-氟二氧嘧啶对肿瘤细胞的杀伤作用^[100]。这些研究提示, 利用抑制剂阻滞自噬是降低恶性肿瘤细胞抗药性的可供选择的策略之一。

3.2.2 通过自噬诱导肿瘤细胞死亡 如上所述, 自噬在肿瘤治疗过程中以一种保护机制存在, 但另外一些研究发现, 自噬对肿瘤细胞的生存也是致命性的。研究显示, 在细胞发生非凋亡性死亡时, 常伴有自噬相关蛋白, 例如*Atg5*、*Atg7*和*Beclin-1*的表达上调^[101-104]。并且, 在利用*Atg7*和*Beclin-1* RNAi或者药理性自噬抑制剂(如巴佛罗霉素-A1)抑制自噬后, 细胞死亡数量明显降低, 细胞活力显著上升^[101]。将小鼠细胞*Bax/Bak*基因敲除后, 在死亡刺激信号诱导下, 被敲除的细胞呈现出*Atg5*和*Beclin-1*依赖性的非凋亡性细胞死亡^[104]。这种非Caspase介导的死亡方式被界定为II型程序性细胞死亡, 即自噬性细胞死亡 (autophagic cell death)^[105]。

自噬性细胞死亡方式的存在提示, 激活自噬可能对肿瘤治疗也具有积极意义。目前, 也有不少研究为这个未来的治疗方案提供一些可供参考的实验数据。在梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma, MCC)细胞中, 利用PP242抑制mTOR活性能够诱导

自噬介导的非Caspase依赖性细胞死亡^[101]; 同样, 在非小细胞肺癌细胞A549和H23中发现, 经过白花丹素(Plumbagin)处理后细胞内PI3K/Akt/mTOR信号通路被抑制而发生自噬性细胞死亡^[106]。原癌基因*Ras*可以通过诱导*Noxa*(NADPH oxidases A)基因的表达以上调*Beclin-1*的表达, 导致肿瘤细胞的自噬性细胞死亡^[99]。在具有*Caspase-3*遗传缺陷的乳腺癌细胞MCF-7中, 芬维A胺(Fenretinide)能诱导细胞的自噬性死亡而非细胞凋亡^[107]。在HepG2细胞中, ABT737联合抗肿瘤药表阿霉素(Epirubicin)通过阻滞*Bcl-2*, 导致自噬性细胞死亡的发生^[108]。白藜芦醇在很多不同类型的肿瘤中发挥抗肿瘤作用, 其诱导细胞死亡的机制也涉及自噬性细胞死亡的发生^[109]。

可见, 自噬在肿瘤形成与发展中的作用较为复杂, 一方面, 自噬有利于清除发生突变的蛋白质, 抑制肿瘤的发生; 另一方面, 在已经形成的肿瘤细胞中, 自噬扮演着复杂的角色, 通过自噬可以增加肿瘤细胞的自噬性死亡; 降低自噬又可以降低肿瘤细胞的抗药性(图1)。自噬对于肿瘤细胞抵抗药物作用的压力究竟有利与否, 取决于细胞类型、药物本身的特性以及细胞与药物的相互作用, 如何将抗肿瘤药物诱导自噬的生物学效应转化为有效的癌症治疗方法使癌症患者受益, 尚有待于深入系统地研究。

4 展望

近十几年对自噬相关蛋白的研究, 使得自噬这一短暂过程在分子水平的调控日趋清晰, 但仍有一

些问题值得深入的探讨, 如自噬体膜的来源及其形成的机制、两大自噬起始复合体之间的相互作用、底物降解后在自噬性溶酶体的释放机制等。

自噬是真核细胞中极为保守的蛋白质降解途径, 其缺陷与包括肿瘤在内的多种人类疾病相关。已经明确, 在恶性肿瘤发生的起始阶段, 自噬对肿瘤的发生具有抑制作用。但在恶性肿瘤的发展与演进过程中, 自噬对肿瘤细胞应对药物干预的利弊仍需进一步明确。因此, 自噬在肿瘤的临床与基础研究方面的应用, 需要更多的关注和投入, 为肿瘤的预防与治疗提供合理的策略。

参考文献 (References)

- 1 He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 67.
- 2 Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 2010; 465(7300): 942-6.
- 3 Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2008; 182(4): 685-701.
- 4 Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 2009; 11(12): 1433-7.
- 5 Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen E-L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2009; 5(8): 1180-5.
- 6 Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 2010; 12(8): 747-57.
- 7 Geng J, Nair U, Yasumura-Yorimitsu K, Klionsky DJ. Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2010; 21(13): 2257-69.
- 8 Bockler S, Westermann B. ER-mitochondria contacts as sites of mitophagosome formation. *Autophagy* 2014; 10(7): 1346-7.
- 9 Bernard A, Klionsky DJ. Autophagosome formation: Tracing the source. *Dev Cell* 2013; 25(2): 116-7.
- 10 Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; 20(7): 1981-91.
- 11 Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9(10): 1102-9.
- 12 Fujioka Y, Noda NN, Fujii K, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Inagaki F. *In vitro* reconstitution of plant Atg8 and Atg12 conjugation systems essential for autophagy. *J Biol Chem* 2008; 283(4): 1921-8.
- 13 Longatti A, Tooze S. Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ* 2009; 16(7): 956-65.
- 14 Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19(21): 5720-8.
- 15 Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 2009; 458(7237): 445-52.
- 16 Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 1992; 119(2): 301-11.
- 17 Marques M, Mojzita D, Amorim MA, Almeida T, Hohmann S, Moradas-Ferreira P, *et al.* The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 2006; 152(12): 3595-605.
- 18 Nguyen LN, Bormann J, Le GT, Stärkel C, Olsson S, Nosanchuk JD, *et al.* Autophagy-related lipase FgATG15 of *Fusarium graminearum* is important for lipid turnover and plant infection. *Fungal Genet Biol* 2011; 48(3): 217-24.
- 19 Sagné C, Agulhon C, Ravassard P, Darmon M, Hamon M, El Mestikawy S, *et al.* Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(13): 7206-11.
- 20 Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* 2006; 17(12): 5094-104.
- 21 Rong Y, McPhee CK, Deng S, Huang L, Chen L, Liu M, *et al.* Spinster is required for autophagic lysosome reformation and mTOR reactivation following starvation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(19): 7826-31.
- 22 Rong Y, Liu M, Ma L, Du W, Zhang H, Tian Y, *et al.* Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat Cell Biol* 2012; 14(9): 924-34.
- 23 Shen HM, Mizushima N. At the end of the autophagic road: An emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem Sci* 2014; 39(2): 61-71.
- 24 Chen Y, Yu L. Autophagic lysosome reformation. *Exp Cell Res* 2013; 319(2): 142-6.
- 25 Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, *et al.* Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(40): 14238-43.
- 26 Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 2008; 10(8): 935-45.
- 27 Nicklin P, Bergman P, Zhang B, Triantafellow E, Wang H, Nyfeler B, *et al.* Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 2009; 136(3): 521.
- 28 Sini P, James D, Chresta C, Guichard S. 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.
- 29 Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol* 2004; 24(18): 8055-68.

- 30 Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell* 2011; 44(2): 279-89.
- 31 Rogov V, Dotsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell* 2014; 53(2): 167-78.
- 32 Dikic I, Johansen T, Kirkin V. Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res* 2010; 70(9): 3431-4.
- 33 Zhou L, Wang HF, Ren HG, Chen D, Gao F, Hu QS, *et al.* Bcl-2-dependent upregulation of autophagy by sequestosome 1/p62 *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(5): 651-6.
- 34 Duran A, Amanchy R, Linares JF, Joshi J, Abu-Baker S, Porollo A, *et al.* p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Mol Cell* 2011; 44(1): 134-46.
- 35 Thi EP, Reiner NE. Phosphatidylinositol 3-kinases and their roles in phagosome maturation. *J Leukoc Biol* 2012; 92(3): 553-66.
- 36 Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, *et al.* Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 2009; 11(4): 385-96.
- 37 Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 2008; 30(6): 678-88.
- 38 Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, *et al.* Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007; 26(10): 2527-39.
- 39 Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, *et al.* Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of Beclin 1. *J Biol Chem* 2004; 279(18): 18384-91.
- 40 Li D, Wang L, Deng R, Tang J, Shen Y, Guo J, *et al.* The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells. *Oncogene* 2009; 28(6): 886-98.
- 41 Lee EJ, Tournier C. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) and ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy* 2014; 7(7): 689-95.
- 42 Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 2010; 6(6): 764-76.
- 43 Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009; 20(7): 1992-2003.
- 44 Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1:ATG13:FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 2009; 284(18): 12297-305.
- 45 Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 2013; 15(7): 741-50.
- 46 Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, *et al.* The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* 2010; 191(1): 155-68.
- 47 Ro SH, Sempale IA, Park H, Park H, Park HW, Kim M, *et al.* Sestrin2 promotes Unc-51-like kinase 1 mediated phosphorylation of p62/sequestosome-1. *FEBS J* 2014; 281(17): 3816-27.
- 48 Tang HW, Wang YB, Wang SL, Wu MH, Lin SY, Chen GC. Atg1-mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy. *EMBO J* 2011; 30(4): 636-51.
- 49 Nakatogawa H, Ohbayashi S, Sakoh-Nakatogawa M, Kakuta S, Suzuki SW, Kirisako H, *et al.* The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation. *J Biol Chem* 2012; 287(34): 28503-7.
- 50 Kraft C, Kijanska M, Kalie E, Siergiejuk E, Lee SS, Semplicio G, *et al.* Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *EMBO J* 2012; 31(18): 3691-703.
- 51 Xi H, Barredo JC, Merchan JR, Lampidis TJ. Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKKbeta leading to autophagy. *Biochem Pharmacol* 2013; 85(10): 1463-77.
- 52 Wang Q, Liang B, Shirwany NA, Zou MH. 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One* 2011; 6(2): e17234.
- 53 Li L, Chen Y, Gibson SB. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal* 2013; 25(1): 50-65.
- 54 Tripathi DN, Chowdhury R, Trudel LJ, Tee AR, Slack RS, Walker CL, *et al.* Reactive nitrogen species regulate autophagy through ATM-AMPK-TSC2-mediated suppression of mTORC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(32): E2950-7.
- 55 Zhu H, Foretz M, Xie Z, Zhang M, Zhu Z, Xing J, *et al.* PRKAA1/AMPKalpha1 is required for autophagy-dependent mitochondrial clearance during erythrocyte maturation. *Autophagy* 2014; 10(9): 1522-34.
- 56 Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, *et al.* AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2008; 30(2): 214-26.
- 57 Copetti T, Bertoli C, Dalla E, Demarchi F, Schneider C. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol Cell Biol* 2009; 29(10): 2594-608.
- 58 Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Souquère S, *et al.* NF- κ B activation represses tumor necrosis factor- α -induced autophagy. *J Biol Chem* 2006; 281(41): 30373-82.
- 59 Schlottmann S, Buback F, Stahl B, Meierhenrich R, Walther P, Georgieff M, *et al.* Prolonged classical NF- κ B activation prevents autophagy upon *E. coli* stimulation *in vitro*: A potential resolving mechanism of inflammation. *Mediators Inflamm* 2008; 2008: doi: 10.1155/2008/725854.
- 60 Fabre C, Carvalho G, Tasdemir E, Braun T, Ades L, Grosjean J, *et al.* NF- κ B inhibition sensitizes to starvation-induced cell death in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2007; 26(28): 4071-83.
- 61 Polager S, Ofir M, Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 2008; 27(35): 4860-4.

- 62 Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, *et al.* Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* 2009; 29(10): 2570-81.
- 63 Bohensky J, Shapiro IM, Leshinsky S, Terkhorn SP, Adams CS, Srinivas V. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: Induction of the autophagic pathway. *Autophagy* 2007; 3(3): 207-14.
- 64 Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 2007; 6(6): 472-83.
- 65 Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, *et al.* Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: Inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin. *J Biol Chem* 2009; 284(45): 31484-92.
- 66 Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; 126(1): 121-34.
- 67 Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. *EMBO J* 2009; 28(19): 3015-26.
- 68 Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 2008; 10(6): 676-87.
- 69 Yu Y, Cao L, Yang L, Kang R, Lotze M, Tang D. microRNA 30A promotes autophagy in response to cancer therapy. *Autophagy* 2012; 8(5): 853-5.
- 70 Kovaleva V, Mora R, Park YJ, Plass C, Chiramel AI, Bartschlag R, *et al.* miRNA-130a targets ATG2B and DICER1 to inhibit autophagy and trigger killing of chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Res* 2012; 72(7): 1763-72.
- 71 Tekirdag KA, Korkmaz G, Ozturk DG, Agami R, Gozuacik D. MIR181A regulates starvation-and rapamycin-induced autophagy through targeting of ATG5. *Autophagy* 2013; 9(3): 374-85.
- 72 Frankel LB, Wen J, Lees M, Hoyer-Hansen M, Farkas T, Krogh A, *et al.* microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *EMBO J* 2011; 30(22): 4628-41.
- 73 Korkmaz G, Le Sage C, Tekirdag KA, Agami R, Gozuacik D. miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1. *Autophagy* 2012; 8(2): 165-76.
- 74 Qased AB, Yi H, Liang N, Ma S, Qiao S, Liu X. MicroRNA-18a upregulates autophagy and ataxia telangiectasia mutated gene expression in HCT116 colon cancer cells. *Mol Med Rep* 2013; 7(2): 559-64.
- 75 Wan G, Xie W, Liu Z, Xu W, Lao Y, Huang N, *et al.* Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway. *Autophagy* 2013; 10(1): 70-9.
- 76 Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132(1): 27-42.
- 77 Lan SH, Wu SY, Zuchini R, Lin XZ, Su IJ, Tsai TF, *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma through degradation of microRNA-224. *Hepatology* 2014; 59(2): 505-17.
- 78 Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25(8): 795-800.
- 79 Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137(6): 1062-75.
- 80 Islam MA, Shin JY, Yun CH, Cho CS, Seo HW, Chae C, *et al.* The effect of RNAi silencing of p62 using an osmotic polysorbitol transporter on autophagy and tumorigenesis in lungs of K-ras^{LA1} mice. *Biomaterials* 2014; 35(5): 1584-96.
- 81 Belaid A, Cerezo M, Chargui A, Corcelle-Termieu E, Pedeutour F, Giuliano S, *et al.* Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer Res* 2013; 73(14): 4311-22.
- 82 Matsui A, Kamada Y, Matsuura A. The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation. *PLoS Genet* 2013; 9(1): e1003245.
- 83 Tao H, Taylor Jr R, Zeng X, Jin S. Role of Autophagy in Tumorigenesis//Autophagy and Cancer. Springer New York 2013: 95-112.
- 84 Li Y, Iglehart JD, Richardson AL, Wang ZC. The amplified cancer gene LAPT4B promotes tumor growth and tolerance to stress through the induction of autophagy. *Autophagy* 2012; 8(2): 273-4.
- 85 Hart LS, Cunningham JT, Datta T, Dey S, Tameire F, Lehman SL, *et al.* ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest* 2012; 122(12): 4621.
- 86 Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, *et al.* Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 2011; 25(7): 717-29.
- 87 Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, *et al.* Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25(5): 460-70.
- 88 Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Kamphorst JJ, Strohecker AM, *et al.* Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytoomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev* 2013; 27(13): 1447-61.
- 89 Strohecker AM, Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Price SM, Chen GJ, Mathew R, *et al.* Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discov* 2013; 3(11): 1272-85.
- 90 Ying L, Huang Y, Chen H, Wang Y, Xia L, Chen Y, *et al.* Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer. *Mol BioSyst* 2013; 9(3): 407-11.
- 91 Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, Nicolas V, *et al.* Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* 2012; 32(18): 2261-72.
- 92 Kumar P, Zhang DM, Degenhardt K, Chen ZS. Autophagy and transporter-based multi-drug resistance. *Cells* 2012; 1(3): 558-75.
- 93 Li X, Lu Y, Pan T, Fan Z. Roles of autophagy in cetuximab-mediated cancer therapy against EGFR. *Autophagy* 2010; 6(8): 1066.
- 94 Hu Y-L, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, *et al.* Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in

- glioblastoma. *Cancer Res* 2012; 72(7): 1773-83.
- 95 Xu Y, Yu H, Qin H, Kang J, Yu C, Zhong J, *et al.* Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer Lett* 2012; 314(2): 232-43.
- 96 Lamoureux F, Zoubeidi A. Dual inhibition of autophagy and the AKT pathway in prostate cancer. *Autophagy* 2013; 9(7): 1119-20.
- 97 Lamoureux F, Thomas C, Crafter C, Kumano M, Zhang F, Davies BR, *et al.* Blocked autophagy using lysosomotropic agents sensitizes resistant prostate tumor cells to the novel Akt inhibitor AZD5363. *Clin Cancer Res* 2013; 19(4): 833-44.
- 98 Choi JH, Yoon JS, Won YW, Park BB, Lee YY. Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *APMIS* 2012; 120(7): 597-604.
- 99 Kaminsky VO, Piskunova T, Zborovskaya IB, Tchevkina EM, Zhivotovsky B. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and-independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy* 2012; 8(7): 1032-44.
- 100 O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna SL. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy* 2011; 7(5): 509.
- 101 Lin Z, McDermott A, Shao L, Kannan A, Morgan M, Stack BC Jr, *et al.* Chronic mTOR activation promotes cell survival in Merkel cell carcinoma. *Cancer Lett* 2014; 344(2): 272-81.
- 102 Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, *et al.* Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; 304(5676): 1500-2.
- 103 Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* 2011; 42(1): 23-35.
- 104 Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; 6(12): 1221-8.
- 105 Bergmann A. Autophagy and cell death: No longer at odds. *Cell* 2007; 131(6): 1032-4.
- 106 Zhang QJ, Zhu T, Xia EH, Shi C, Liu YL, Zhang Y, *et al.* Rapid diversification of five *Oryza* AA genomes associated with rice adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(46): E4954-62.
- 107 Fazi B, Bursch W, Fimia GM, Nardacci R, Piacentini M, Di Sano F, *et al.* Fenretinide induces autophagic cell death in caspasedefective breast cancer cells. *Autophagy* 2008; 4(4): 435.
- 108 Du P, Cao H, Wu HR, Zhu BS, Wang HW, Gu CW, *et al.* Blocking Bcl-2 leads to autophagy activation and cell death of the HEPG2 liver cancer cell line. *Asian Pac Cancer Prev* 2013; 14(10): 5849-54.
- 109 Miki H, Uehara N, Kimura A, Sasaki T, Yuri T, Yoshizawa K, *et al.* Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. *Int J Oncol* 2012; 40(4): 1020-8.