

自噬在癌症的预防、发展和治疗中的作用

高原¹ 王莹^{2,3} 黄智慧^{1*}

(¹温州医科大学基础医学院, 温州 325005; ²检验医学教育部重点实验室, 温州医科大学, 温州 325005;

³浙江省人民医院输血研究中心, 杭州 325000)

摘要 自噬(autophagy)是发生在所有哺乳动物细胞确保稳态和质量控制的过程。自从自噬提出以后, 自噬分子原理和信号传导机制方面的研究有了很大进展。近几年, 自噬在肿瘤中的作用已受到了很多关注, 并且通过调节自噬来治疗肿瘤的方法已用于临床试验。该文对自噬的下游机制和调节机制的最新发现作了简要总结, 并探讨自噬在健康和疾病状态下的作用, 重点探讨自噬在癌症预防、发展和治疗中的作用。同时, 总结了最新的通过调节自噬, 单独或者结合放疗、化疗、靶向疗法的临床试验结果。

关键词 抗癌治疗; 自噬体; 氯喹; 慢性粒细胞性白血病; 造血干细胞; 羟化氯喹; 肿瘤发生

Role of Autophagy in Cancer Prevention, Development and Therapy

Gao Yuan¹, Wang Ying^{2,3}, Huang Zhihui^{1*}

(¹School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325005, China; ²Ministry of Education, Key Laboratory of Laboratory Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325005, China;

³Research Center of Blood Transfusion Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 325000, China)

Abstract Autophagy is a process that ensures cellular homeostasis and quality control in all mammalian cells. Since the concept of autophagy is put forward, substantial progress has been made in understanding of the molecular signaling mechanism underlying regulation of autophagy. Recently, many studies has focused on the roles of autophagy in cancer and several treatments to cancers by regulating autophagy have been tested in clinical trials. In this study, we give a brief overview of recent findings of the downstream signaling pathways of autophagy, discuss the roles of autophagy in physiological conditions and diseases, and focus on the roles of autophagy in cancer prevention, development and treatment. Meanwhile, we summarize the current clinical trials to treat cancers by regulating autophagy alone or combination with radio-, chemo- or targeted therapy.

Keywords anticancer therapy; autophagosome; chloroquine; chronic myeloid leukaemia; haemopoietic stem cell; hydroxychloroquine; tumorigenesis

细胞自噬(autophagy)是细胞胞质内清除长寿蛋白(long-lived proteins)和衰老或受损细胞器的主要代谢通路。根据包裹物和运输方式不同, 可以分为大自噬(macroautophagy)、小自噬(microautophagy)和

分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy)。其中, 对大自噬的研究最为深入, 简称自噬。自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所

收稿日期: 2015-05-24 接受日期: 2015-08-24

国家自然科学基金(批准号: 81371350)、浙江省自然科学基金(批准号: LY15C090006)和浙江省科技厅项目(批准号: 2013C33167)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13706664346, E-mail: hzhzju021@163.com

Received: May 24, 2015 Accepted: August 24, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81371350), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY15C090006) and the Science Technology Department of Zhejiang Province (Grant No.2013C33167)

*Corresponding author. Tel: +86-13706664346; E-mail: hzhzju021@163.com

网络出版时间: 2015-11-12 15:15:53

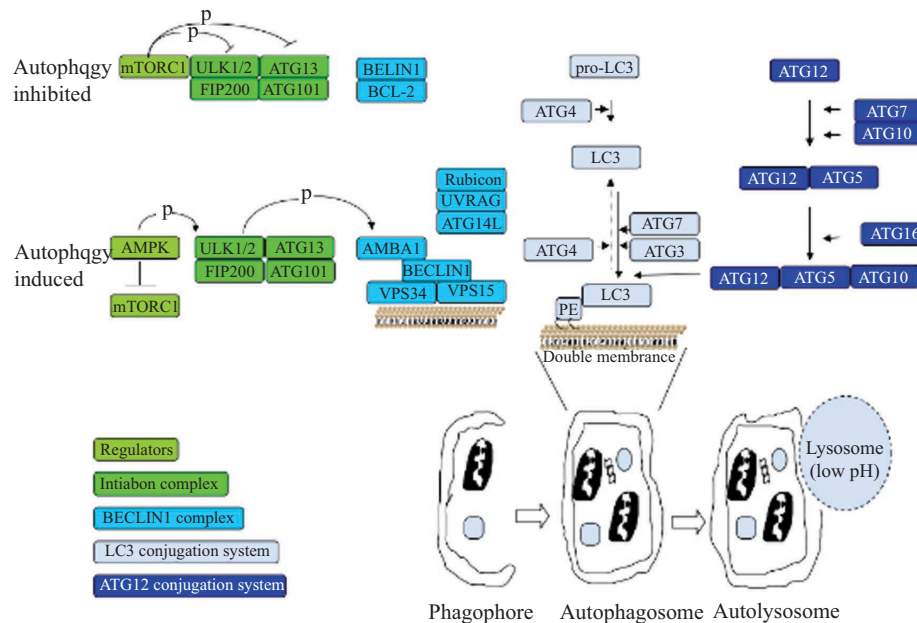
URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151112.1515.018.html>

包裹的内容物的过程,借此满足细胞本身的代谢和某些细胞器的更新需要。它是一个进化上保守的过程,这些细胞内组分的循环利用可以作为替代能源,在有代谢压力或饥饿时(如生长因子/营养的损失)维持细胞的稳态和生存。在自噬的过程中,双层膜泡称为自噬体(autophagosomes),它吞噬长寿蛋白和细胞器并将这些物质转运到溶酶体中(图1)。随着自噬体外膜和溶酶体膜的融合,自噬体内膜和这些物质一起被溶酶体酶降解。尽管早在20世纪50年代,人们就在电子显微镜下看到哺乳动物细胞内的自噬体,但

直到最近20年,随着自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)的鉴定,才逐渐解析出自噬大部分的分子机制^[1]。这些自噬相关基因最初是在出芽酵母中被发现,随后其同源蛋白的功能在哺乳动物身上得到验证。

1 哺乳动物自噬的分子机制

在正常营养充足的条件下,自噬的基础水平很低,通常是被抑制的。自噬可以通过以下两种方式被抑制:一种是通过有活性的哺乳动物雷帕霉素靶



在正常营养充足的条件下,自噬会以两种方式被抑制。一种是通过活跃的mTORC1磷酸化ULK1和ATG13,另一种是通过Bcl-2介导抑制Beclin1来抑制自噬。自噬会在细胞感受到压力和饥饿时被诱发,因为在这些状态下会引起mTORC1从ULK1复合体(包括ULK1/2、ATG3、FIP200和ATG101)中分解出来。AMPK通过磷酸化ULK1的活性位点来诱发自噬。活化的ULK1磷酸化AMBRA1,释放Beclin1与吞噬泡膜结合。Beclin1也与几个辅因子相互作用如AMBRA1,导致酯酶VPS34(第三类PI3K)的激活,它的激活对吞噬泡的延伸有至关重要的作用。Beclin1也与UVRAG、ATG14和Rubicon相结合,参与自噬的调控。自噬体的成熟依赖于两个类泛素连接系统。(1)LC3连接系统,起始于ATG3对LC3的C-末端的裂解,此时,LC3被ATG7(类E1酶)激活,转运给ATG3(类E2酶),最终与PE结合。ATG4还通过裂解LC3与PE之间的酰胺键来释放膜中的蛋白质。(2)ATG12连接系统,起始于通过ATG7和ATG10(类E2酶)结合起来的ATG5和ATG12。ATG12-ATG5相互作用然后,与ATG16形成一个类E3酶的复合物,该复合物完成LC3连接系统的反应。在自噬的过程中,双层膜自噬体吞噬蛋白质和细胞器。自噬过程的完成包括自噬体外膜与溶酶体的融合形成自噬溶酶体、内膜以及内容物被降解。

Under normal nutrient-rich conditions, autophagy can be inhibited following phosphorylation of ULK1 and ATG13 by active mTORC1 or by Bcl-2-mediated inhibition of Beclin1. Induction of autophagy can occur following cellular stress or starvation that leads to mTORC1 dissociation from the ULK1 complex (that involves ULK1/2, ATG13, FIP200 and ATG101). AMPK induces autophagy by phosphorylating ULK1 on active sites. Active ULK1 phosphorylates AMBRA1, freeing Beclin1 to associate with membranes of the phagophore. Beclin1 interacts with several cofactors, such as AMBRA1, leading to activation of the lipid kinase VPS34, a class III PI3K that is critical for the expansion of phagophores. Beclin1 is also associated with UVRAG, ATG14L and Rubicon that are involved in the regulation of autophagy. Autophagosome maturation depends on two ubiquitin-like conjugation systems. (1) the LC3-conjugation system that starts when ATG4 cleaves the C-terminal of LC3 that is then activated by ATG7 (E1-like enzyme), transferred to ATG3 (E2-like enzyme) and eventually conjugated to PE. ATG4 also cleaves the amide bond between LC3 and PE to release the protein from membranes. (2) the ATG12-conjugation system that starts with conjugation of ATG5 with ATG12 by ATG7 and ATG10 (E2-like enzyme). ATG12-ATG5 interacts then with ATG16 to form an E3-like complex that completes the LC3-conjugation reaction. During the autophagy process, doublemembraned autophagosomes engulf proteins and organelles. Completion of the process involves fusion of the outer membrane of autophagosomes with lysosomes to form autolysosomes, where the inner membrane, along with the cargo, is degraded.

图1 自噬的分子调控

Fig.1 Molecular regulation of autophagy

蛋白1(mammalian target of rapamycin 1, mTORC1)磷酸化Polo样激酶1(unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1)和自噬相关蛋白13(autophagy-related protein 13, ATG13); 另一种是以B淋巴细胞瘤-2蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)为介导抑制Bcln1。自噬会在细胞受到压力或饥饿时被诱发, 这一过程始于起始复合物(ULK1复合物)的形成^[2], 该复合物是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 包含ULK1、ULK2(酵母*Atg1*)、ATG3、家族相互作用蛋白200(family interactive protein 200, FIP200)、一个哺乳动物的*Atg17*功能同源体和ATG101。其中, ULK1是自噬激活唯一且最关键的蛋白激酶。这些蛋白与吞噬泡(又称为隔离膜)结合激活自噬。

哺乳动物细胞中自噬的主要抑制剂是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物mTORC1。mTORC1在正常生长条件(营养丰富)下是有活性的, 它会通过磷酸化起始复合物上的ULK1和ATG13蛋白来抑制复合物的膜靶向定位^[3]。而饥饿或者雷帕霉素的治疗会抑制mTORC1的活性, 使其从ULK1复合物上分离, AMP依赖的蛋白激酶[adenosine 5-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK]可以直接自由地磷酸化ULK1, 使得复合物与膜结合促使自噬体初始物的形成^[4]。

自噬蛋白Beclin1(酵母*Atg6*的同系物)也是自噬体形成的必要和重要蛋白, 它与其他辅酶因子相互作用激活液泡分选蛋白34(vacuolar sorting protein 34, VPS34)。VPS34是第三类磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-hydroxy kinase, PI3K), 对从吞噬泡的伸展扩张到形成双层膜的自噬体都至关重要^[5]。在正常条件下Beclin1通过它的Bcl-2同源结构域3(Bcl-2 homology 3, BH3)与Bcl-2或Bcl-2的同源体Bcl-x结合而处于抑制状态^[6]。仅含BH3结构域的蛋白和BH3结构域模拟分子可以竞争性地破坏Beclin1和Bcl-2之间的相互作用而诱发自噬^[7]。Beclin1还被发现参与形成自噬/苜蓿素1调节因子1(activating molecule in beclin 1 regulated autophagy, AMBRA1)复合物, AMBRA1是由Beclin1调控的自噬过程中的激活分子, ULK1磷酸化AMBRA1使其从复合物上游离出来定位到内质网膜上与Beclin1结合, 使吞噬泡能够聚集。其他与Beclin1结合的蛋白, 如耐UV相关基因产物(UV radiation resistance-associated gene, UVRAG)、ATG14L和Rubicon, 均能

通过与Beclin1相互作用正向或者负向地调节自噬。

自噬泡的延伸对自噬体和自噬体的成熟依赖于两个类泛素连接系统, 这两个系统对自噬都是必不可少的。每个系统都是由两个类泛素蛋白ATG8也被称为微管相关蛋白1轻链3(microtubules association protein 1 light chain 3, LC3)和ATG12以及三个连接反应必需的酶(ATG3、ATG7和ATG10)组成。LC3连接系统起始于ATG3对LC3的C-末端的裂解, 同时LC3被ATG7(类E1酶)激活, 转运给ATG3(类E2酶)并最终与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)结合。ATG4还通过裂解LC3与PE之间的酰胺键来释放自噬膜中的蛋白质。ATG12连接体系, 起始于ATG7连接的ATG5和ATG12, 这一连接体系类似于LC3连接反应除了ATG10代替的ATG3的类E2酶功能。ATG12-ATG5相互作用, 然后与ATG16形成一个类E3酶的复合物, 该复合物完成LC3连接系统的反应^[8]。大多数实验都通过检测LC3来监测自噬。

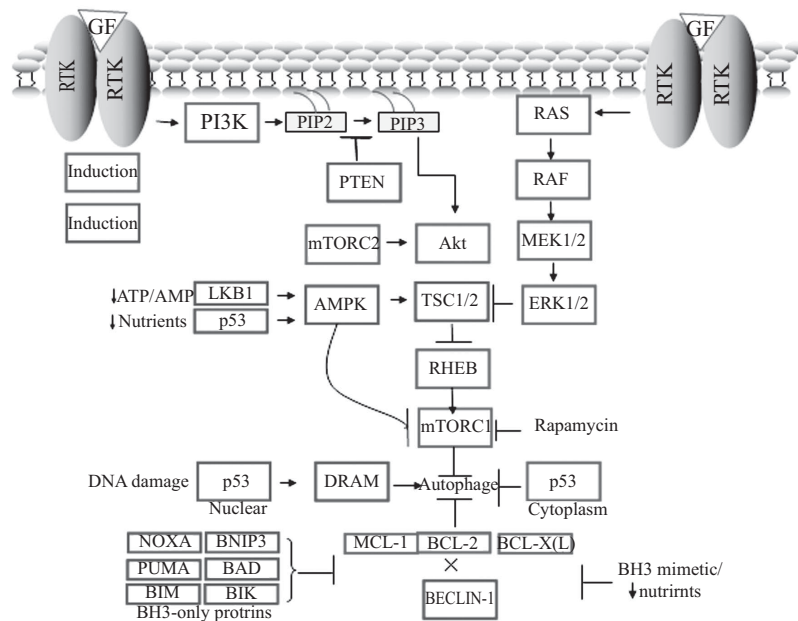
自噬过程的完成包括自噬体外膜与溶酶体的融合, 形成自噬溶酶体。随着融合, 自噬体的单层内膜和它的内容物通过溶酶体酶(尤其是组织蛋白酶)降解。研究已经证明, 这个过程需要溶酶体相关膜蛋白-2(lysosome-associated membrane protein-2, LAMP-2), 小GTP酶Ras相关蛋白7(ras-like protein in rat brain7, RAB7)和UVRAG^[9-10]。

2 哺乳动物自噬的信号调节通路

一些信号能调控自噬通路, 如生长因子信号通路、能量感知、内质网(endoplasmic reticulum, ER)压力、低氧、氧化压力和病原体感染等。本文我们针对癌症中失控且对癌症发生发展非常重要的信号通路如何调节自噬进行讨论, 如RAS-RAF-MEK1/2、[促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)/细胞外调节蛋白激酶(extracellular-signal-regulated kinase, ERK)1/2]-ERK1/2、PI3K-Akt-mTORC1和p53(图2)。

2.1 生长因子信号传导: RAS和PI3K-Akt-mTORC1通路

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)活性的增强不但对癌症的发病机理很重要, 而且有助于癌细胞维持高水平的细胞生长状态。mTOR存在于保守的蛋白质复合物



细胞自噬是被几个信号传导通路紧密调控的生理过程。生长因子(growth factor, GF)介导的酪氨酸激酶受体(receptor tyrosine kinase, RTKs)的活化可以通过激活PI3K-Akt-mTORC1或者RAS-RAF-MEK-ERK通路来抑制自噬。有活性的PI3K把膜边缘的PIP2磷酸化成PIP3, 这是一个会被10号染色体上染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)肿瘤抑制蛋白抑制的过程。PIP3增加Akt的膜募集, 这会抑制TSC1-TSC2复合物(Rheb的一个GTP酶激活蛋白)从而激活mTORC1。结节性硬化蛋白1(tuberous sclerosis complex protein 1, TSC1)-TSC2复合物也会被ERK1/2抑制导致mTORC1的激活。在降低ATP/AMP的比率或者用葡萄糖饥饿法时, LKB1激酶或者p53会激活AMPK, 导致TSC1-TSC2复合物的活化, 经由Rheb、mTORC1的抑制导致自噬的诱发。mTORC1也会由雷帕霉素治疗被直接抑制, 诱发自噬。有研究表明, 细胞核中的p53可以诱导依赖DRAM-1的自噬, 而细胞质中的p53会抑制自噬。这表明, p53在自噬的调控中有双重的复杂的作用。研究表明, Bcl-2蛋白家族对自噬调控也有双重作用, 抗凋亡蛋白Bcl-2、Bcl-xL和MCL-1, 会跟Beclin1结合并抑制它的活性而抑制自噬, 而只有BH3结构域的促凋亡蛋白(Noxa、PUMA、BIM、BNIP3和BIK)会通过干扰抗凋亡蛋白/Beclin1间的联系来诱发自噬。使用BH3 mimetics或者减少营养物质会抑制Bcl-2/Beclin1间的联系而诱发自噬。

Autophagy is tightly controlled by several signalling pathways. GF (growth factor)-mediated stimulation of RTKs can inhibit autophagy through activation of the PI3K-Akt-mTORC1 or the RAS-RAF-MEK-ERK pathways. Active PI3K phosphorylates membrane-bound PIP2 to form PIP3, a process that can be inhibited by the PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) tumour suppressor protein. PIP3 increases membrane recruitment of Akt that activates mTORC1 by inhibiting the TSC1-TSC2 complex (a GTPase-activating protein for Rheb). The TSC1-TSC2 complex can also be inhibited by ERK1/2 resulting in mTORC1 activation. Decreased ATP/AMP ratio or glucose starvation can lead to AMPK activation via LKB1 kinase or p53, leading to activation of the TSC1-TSC2 complex and through Rheb, inhibition of mTORC1, resulting in autophagy induction. mTORC1 can also be directly inhibited by rapamycin treatment, leading to autophagy induction. Nuclear p53 has been shown to induce DRAM-1-dependent autophagy, whereas cytoplasmic p53 has been shown to inhibit autophagy, indicating a dual and complex role of p53 in autophagy control. The Bcl-2 family proteins have also been shown to play a dual role in autophagy regulation; the anti-apoptotic proteins Bcl-2, Bcl-xL and MCL-1, can inhibit autophagy by binding to and inhibiting Beclin1, whereas the pro-apoptotic BH3-only proteins (Noxa, PUMA, BIM, BNIP3, BAD and BIK) can induce autophagy by interfering with the antiapoptotic protein/Beclin1 association. BH3 mimetics or reduction in nutrients has also been shown to induce autophagy through inhibition of the Bcl-2/Beclin1 association.

图2 自噬的信号传导

Fig.2 Signaling regulation of autophagy

中, 它包括mTORC1和mTORC2。mTORC1对调节自噬有一重要功能, 即担任营养传感器的角色, 它已被证明是自噬的主要调节器^[11]。mTORC1的上游是I型PI3K和Akt激酶, mTORC1被激活后会抑制自噬。人类癌症中常可见到PI3K的突变, PI3K在质膜上催化形成三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate, PIP3), PIP3反过来增加Akt的膜募集。有活性的Akt通过抑制下游蛋白质复合物TSC1-TSC2, 活化mTORC1。TSC1-TSC2复合物是

Rheb(Ras同源体, 在大脑中表达量高, 也是一种小GTP结合蛋白, 能结合并激活mTORC1)的GTP酶活性激活蛋白。TSC1-TSC2复合物也能感知其他信号通路传来的信号(如ERK1/2)。研究表明, Akt或ERK1/2导致TSC2磷酸化会破坏该复合物, 从而激活mTORC1^[12]。因此, RAS对自噬的调节作用是复杂的, 有双重作用; 它既可通过激活ERK1/2或者PI3K-Akt-mTORC1通路^[13]抑制自噬, 又可通过激活RAF-MEK1/2-ERK1/2通路导致Gα相互作用蛋白(Gα-

interacting protein, GIAP)磷酸化继而诱发自噬^[14]。这些结果提示, 人类肿瘤细胞系中产生活化的RAS突变, 能引起高水平的自噬, 而这对维持氧化代谢水平和肿瘤发生发展是必需的。

2.2 能量感知途径: AMPK正向调节自噬

AMPK能量压力传感器, 它在营养或能量消耗(ATP/AMP的比率降低)时, 由肝蛋白激酶B1(liver kinase B1, LKB1)激活。与Akt和ERK1/2通路激活相反, 活化的AMPK能磷酸化并激活TSC1-TSC2复合物, 且能通过Ras蛋白脑组织同源类似物(Ras homolog enriched in brain, Rheb)抑制mTORC1。AMPK还能通过磷酸化Ser317和Ser777激活ULK1从而促进自噬, 因此, AMPK是自噬的正调节因子。mTORC1还能通过磷酸化ULK1的Ser757, 从而扰乱AMPK和ULK1之间的相互作用, 阻止AMPK对ULK1的激活。AMPK也会通过直接磷酸化raptor(mTOR调节相关蛋白, 是mTORC1的一个亚单位)来抑制mTORC1的活性, 此磷酸化作用可能对mTORC1的抑制至关重要^[15]。

2.3 应激反应途径: p53的双重作用

在大多数肿瘤病人中, 抑癌基因p53是突变的。研究已经证明, 它在自噬的调节中具有双重作用。p53诱导自噬在某种意义上依赖于它的一个靶蛋白, 损伤调控的自噬调节因子-1(damage-regulated autophagy modulator-1, DRAM-1)^[16]。DRAM-1参与p53诱导的细胞死亡, 这进一步显示了细胞死亡、p53和自噬之间的关系。p53可以在葡萄糖饥饿时通过AMPK的活化/mTORC1的抑制来诱发自噬^[17]。细胞质内的野生型和突变的p53都抑制自噬, 相反定位于细胞核的p53促进自噬的^[18]。

2.4 细胞凋亡途径: Bcl-2蛋白家族

Bcl-2是包含至少一个Bcl-2同源结构域(Bcl-2 homology, BH)的蛋白家族中的典型。根据对细胞凋亡是促进或抑制及其BH结构域可以把Bcl-2家族蛋白分成三个亚家族: (1)抗凋亡多结构域, 类Bcl-2蛋白质, 如Bcl-2、Bcl-xL和骨髓细胞白血病序列-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1), 它们包含四个BH结构域(BH1~BH4); (2)促凋亡多结构域, 类Bcl-2相关蛋白(Bcl-2 Associated X protein, BAX)蛋白质(如BAX和BAK)它们也包含四个BH结构域; (3)促凋亡但只有BH3的蛋白质家族, 如BH3结构域凋亡诱导蛋白(Bcl-2 homology 3 interacting-domain death

agonist, BID)、与Bcl-2相互作用的细胞死亡调节子(Bcl-2-interacting mediator of cell death, BIM)、Bcl-2/Bcl-xL细胞死亡受体拮抗剂(Bcl-2/Bcl-xL-antagonist, causing cell death, BAD)、损伤蛋白Noxa和p53上调凋亡调节因子(recombinant p53 upregulated modulator of apoptosis, PUMA)。只含BH3的蛋白质通过与抗细胞凋亡的类Bcl-2蛋白质相互作用影响细胞凋亡, 该蛋白有一个疏水的裂口(与BH3相连的凹槽), 通过相互作用抑制类Bcl-2蛋白的功能和/或通过直接作用激活类BAX蛋白(BAX和BAK)的功能。活化以后, BAX和BAK与线粒体膜结合并引起外膜的透化作用, 这一作用诱导细胞色素C和其他的促凋亡因子从线粒体中释放, 导致Caspase激活和细胞凋亡。Bcl-2蛋白家族除了调节细胞凋亡也在自噬的调节中扮演双重角色。抗凋亡的Bcl-2、Bcl-xL和MCL-1能抑制自噬, 而促凋亡的只有BH3的蛋白BNIP3、BAD、BIK、Noxa、PUMA和BIM能诱发自噬^[7]。如前所述, 与Beclin1结合的Bcl-2破坏Beclin1与VPS34的结合, 降低VPS34的活性从而抑制自噬。研究表明, Beclin1与VPS34的相互作用可以减少饥饿和BH3类似物的药物治疗用量, 释放Beclin1参与诱发自噬^[19]。

3 自噬在癌症中的双重作用

第一次报道自噬和癌症之间的紧密联系是在1999年, 报道显示Beclin1能抑制肿瘤发生并且在人类乳腺癌中它的水平是降低的, 这表明减少自噬蛋白的表达可能会导致人类癌症的发展或者进展^[20]。随后的研究显示, *Beclin1*^{-/-}敲除小鼠胚胎发育早期就会死亡, *Bcl-1*^{+/-}杂合小鼠自发肿瘤的概率增加^[21]。与此一致的是有研究显示, 在人类的癌症中也发现了*Atg2B*、*Atg5*、*Atg9B*和*Atg12*的框移突变^[22], 并且对小鼠去除自噬的关键性调控因素会促使细胞向恶性转变^[23]。

3.1 自噬作为肿瘤抑制因素

最近, 关于自噬在造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的生存和功能的基础研究显示, 自噬在维持HSC方面有重要作用, 并且可能抵抗白血病的发生^[24]。第一个证据出现在2010年, 发现FIP200对胎儿的HSC的数量维持和功能是必需的, 并且FIP200基因的敲除会导致线粒体量的增多和高水平的活性氧(reactive oxygen species, ROS)继而导致严重的贫血和围产期死亡。在另一项研究中, 在造血

系统中的 $Atg7$ 的条件性敲除会导致大量的线粒体增生, ROS产生和DNA生物损伤, 然后是HSC功能的丧失。因此, 淋巴和骨髓祖细胞的生成在 $Atg7$ 敲除的小鼠中是被破坏的, 而且小鼠会发生骨髓增生性疾病并在几周内死亡。这一现象表明, 自噬也许能防御白血病的发生。自噬有限抑制肿瘤发生的作用进一步证据来自一个精妙的研究, 该研究敲除了 $Atg5$ 或者 $Atg7$ 导致氧化应激和基因组损伤反应产物的积累引起原发性肝癌的癌前病变的发展^[25-26]。综上所述, 在正常细胞尤其是干细胞内的基础自噬是很关键的, 因为自噬的功能像监护人一样, 在变换的环境和/或压力下提高细胞的适应能力, 维持蛋白质/细胞器的质量调控和新陈代谢, 以避免p62的堆积^[27]; 调控受损线粒体的降解, 以避免其产生ROS和DNA受损, 从而促进遗传稳定性^[28]。

3.2 自噬作为肿瘤促进因素

越来越多的证据表明, 自噬也是癌症细胞的生存机制。白血病干细胞存在于骨髓和其他癌症细胞中, 特别是在实体瘤核心的细胞, 必须克服不利条件, 如低氧和有限的通路才能到达血管小环境并获

取营养物质, 所以可能比正常细胞更依赖自噬。因此自噬在压力和抗癌治疗条件下对癌细胞的生存尤其重要。最新的研究发现, 介导伊马替尼(imatinib, IM)抑制Bcr-Abl的过程, 能通过激活BIM和BAD的表达和活化来促进凋亡, 从而促进慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)细胞中的保护性自噬过程^[29]。针对性的诱导自噬, 如用基因手段沉默 $Atg7$ 或 $Atg5$, 或者用药物氯喹(chloroquine, CQ), 能通过抑制自噬, 促进IM引起的细胞系和CML干细胞的死亡。此外, 研究证明, 抑制自噬能在放疗后^[30]、p53激活^[31]和其他凋亡激活剂(如烷化物^[32]和BH3类似物^[33])的治疗后显著地增加细胞凋亡。这就为开展化疗/靶向治疗时联合使用自噬抑制剂的临床试验提供了理论依据。这些联用自噬抑制剂和化学药物疗法的临床试验已在进行中(表1和表2)。

3.3 自噬对肿瘤细胞代谢的控制

现在我们能理解自噬对肿瘤发展有双重作用, 它维持稳态的功能限制了基因组损伤发生, 而这对于肿瘤发生有促进作用, 它还帮助减轻细胞的压力促进肿瘤发展。致癌基因的激活和 Atg 的删除会促

表1 目前使用的与HCQ-介导的抑制自噬通路结合的药物在不同介入方法下的分子靶标

Table 1 Drugs used in intervention combined with HCQ-mediated autophagy inhibition in currently active clinical trials

介入 Intervention	药物 Drug	靶标 Target
Chemotherapy	5-Fluorouracil	Thymidylate synthase
	Capecitabine	DNA synthesis
	Carboplatin	DNA
	Gemcitabine	DNA replication
	Leucovorin	Chemoprotectant
	Oxaliplatin	DNA synthesis
	Paclitaxel	Microtubules
	Temozolomide	DNA(alkylating agent)
	Cyclophosphamide	DNA(alkylating agent)
Targeted therapy	Bevacizumab	Angiogenesis
	Bortezomib	Proteasome
	Erlotinib	TK
	Gefitinib	EGFR
	Imatinib	TK
	MK2206	Akt
	RAD001	mTOR
	Sirolimus/rapamycin	mTOR
	Sorafenib	TK
	Sunitinib malate	RTK
	Temsirolimus	mTOR
	Vorinostat	HDAC

ERGF: 表皮生长因子受体; HDAC: 脱乙酰化酶; RTK: 酪氨酸激酶受体; TK: 酪氨酸激酶。

EGFR: epidermal growth factor receptor; HDAC: histone deacetylase; RTK: tyrosine kinase receptor; TK: tyrosine kinase.

表2 选择性诱导自噬的抑制临床试验
Table 2 Selective active clinical trials where autophagy inhibition is being tested

条件	干预	阶段	赞助者, 合作者	编号
Condition	Intervention	Phase	Sponsor, collaborator	Identifier
Adult solid tumour	HCQ+radiotherapy	I	VCU, NCI	NCT01417403
	HCQ+temsirolimus	I	Upenn, NCI	NCT00909831
Advanced cancers	HCQ+sirolimus or vorinostat	I	M.D.Anderson Cancer Center	NCT01266057
Advanced solid tumours	HCQ + temozolomide	I	UPenn, NCI	NCT00714181
	HCQ+MK2206	I	NCI	NCT01480154
	HCQ+ vorinostat	I	DM, Merck	NCT01023737
	HCQ+sunitinib malate	I	NCI	NCT00813423
Breast cancer	HCQ	II	Radboud University	NCT01292408
CML	HCQ+IM mesylate	I	LM, MRC, CRUK Trials unit	NCT01227135
Colorectal cancer	HCQ+bevacizumab,	II	Glasgow UMDNJ, NCI	NCT01006369
	capecitabine, oxaliplatin			
Glioblastoma multiforme	HCQ+oxaliplatin, leucovorin,	I/II	Upenn	NCT01206530
	5-fluorouracil, bevacizumab			
	HCQ+radiotherapy	I	UCL, CRUK	NCT01602588
Metastatic pancreatic cancer	HCQ+temozolomi	I/II	SKCCC, NCI	NCT00486603
	HCQ	II	DFCI, BWH, MGH	NCT01273805
Multiple myeloma	HCQ+bortezomib	I/II	UPenn, NCI	NCT00568880
	HCQ+rapamycin	I	OHSU Knight Cancer Institute	NCT01689987
	CQ+cyclophosphamide,	II	NYU School of Medicine, MP	NCT01438177
	bortezomib			
Non-small-cell lung cancer	HCQ+gefitinib	I/II	NUH, MGH, AstraZeneca	NCT00809237
	HCQ+paclitaxel, carboplatin,	I/II	UMDNJ, NCI	NCT00933803
	bevacizumab			
	HCQ+erlotinib	II	MGH, Stanford University, Yale University, University of Maryland, Genentech	NCT00977470
Pancreatic cancer	HCQ+paclitaxel, carboplatin,	II	UMDNJ, NCI	NCT01649947
	bevacizumab			
	HCQ+capecitabine,	II	MGH	NCT01494155
	radiotherapy			
Prostate cancer	HCQ+gemcitabine	I/II	Upenn	NCT01506973
	HCQ+gemcitabine	I/II	University of Pittsburgh, NIH	NCT01128296
Renal cell carcinoma	HCQ	II	UMDNJ, NCI	NCT00726596
Small-cell lung cancer	HCQ	I	University of Pittsburgh, NIH	NCT01144169
Small-cell lung cancer	HCQ+RAD001	I/II	Upenn	NCT01510119
Solid tumours	CQ	I	MAASTRO, MUMC, NCI	NCT00969306
	HCQ+sorafenib	I	Tyler Curiel	NCT01634893

BWH: 布莱根妇女医院; CRUK: 英国癌症研究中心; DFCI: Dana Farber癌症研究所; DM: Devalingam Mahalingam; LM: 林恩麦克马洪; MAASTRO: Maastricht放射肿瘤科; MGH: 麻省总医院; MP: 千禧制药; MRC: 英国医学研究会; MUMC: 荷兰马斯垂克大学医学中心; NCI: 美国国家癌症研究所; NIH: 美国国立卫生研究所; NYU: 纽约大学; NYU: 酪氨酸激酶受体; SKCCC: 悉尼金梅尔综合癌症中心; TKI: 酪氨酸激酶抑制剂; UCL: 伦敦学院大学; UMDNJ: 新泽西口腔医科大学; UPenn: 宾夕法尼亚大学; VCU: 弗吉尼亚联邦大学。
BWH: Brigham and Women's Hospital; CRUK: Cancer Research UK; DFCI: Dana Farber Cancer Institute; DM: Devalingam Mahalingam; LM: Lynn McMahon; MAASTRO: Maastricht Radiation Oncology; MGH: Massachusetts General Hospital; MP: Millennium Pharmaceuticals; MRC: Medical Research Council; MUMC: Maastricht University Medical Center; NCI: National Cancer Institute; NIH: National Institutes of Health; NYU: New York University; RTK: receptor tyrosine kinase; SKCCC: Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center; TKI: tyrosine kinase inhibitor; UCL: University College, London; UMDNJ: University of Medicine and Dentistry New Jersey; UPenn: University of Pennsylvania; VCU: Virginia Commonwealth University.

进早期癌症的发展,但是会抑制晚期癌症^[34-37](表3)。

除了自噬的突出特点,直到最近,自噬在肿瘤细胞代谢中的重要作用才被重视。致癌基因*Ras*激活的研究中首次发现致癌基因被激活时自噬对肿瘤细胞增殖和维持代谢功能的作用。在转染了致癌的Harvery鼠肉瘤病毒癌基因(V-ha-ras harveyrat sarcoma viral oncogene homolog, *HRAS*)和*MDA-MB-231*人乳腺癌细胞胎鼠成纤维细胞基因(mouse embryonic fibroblasts, *MEFs*)中,该癌细胞中包含有致癌的Kirsten鼠肉瘤病毒癌基因(V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, *KRAS*),自噬基因的抑制诱发了锚定不依赖转化,减慢了增殖和糖

降解。在由多瘤病毒T(polyoma middle T, PyMT)致癌因子诱发的乳腺癌转基因模型中发现了相似的结果;自噬起始的必需基因*FIP200*的删除会损害体外肿瘤细胞的糖酵解以及减少体内乳腺癌的发生^[38]。在癌细胞代谢中自噬增加的这一现象随后也在被*Ras*基因激活的HRas稳转的幼鼠肾脏(imortalized baby mouse kidney epithelial cells, iBMK)细胞和胰腺导管癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)细胞中发现。这些研究显示, *Ras*基因的激活会增加自噬,这表明持续的自噬让*Ras*转染的肿瘤细胞能够应对高水平的代谢。因此,在这些模型中抑制自噬导致线粒体代谢的多重缺陷,包括三羧酸循环

(tricarprintricarboxylic acid cycle, TCA)中间产物的减少,减少线粒体呼吸功能,ATP产物减少。尽管这些各种各样的关于Ras转染的研究揭示了糖酵解时自噬对线粒体代谢的不同需要,同样地,它们都说明了,自噬对维持不同瘤型的多样代谢要求都很重要。

人们已经探索了自噬在GEMMs中在维持Ras调节的代谢方面由致癌基因*KRas*或者*Ras*效应器*Braf*诱发的肺和胰腺癌的作用(表3)。重要的是人们对癌症转基因小鼠模型(genetically engineered mouse models, GEMMs)的研究已经阐明了自噬的这些矛盾功能,在致癌基因*KRas*诱发的肺癌模型中删除*Atg5*和*Atg7*会减轻整体肺癌的压力,尤其是在自噬缺乏的肿瘤中表现出的嗜酸性细胞的不同,其标志就是在肿瘤细胞内异常线粒体的累积^[34,39-40]。在肿瘤抑制基因*p53*缺乏时线粒体稳态的缺失导致脂

肪酸氧化缺陷而*Atg7*缺乏时最终的脂代谢损伤。以上述结果为基础,研究者认为,减少的脂质分解代谢会危害缺乏自噬的肿瘤细胞处理营养缺失的能力。在*Braf*诱发的肺癌模型和*Atg7*删除诱发的肿瘤的晚期发展情况相似^[37]。*p53*缺乏的细胞系是来自于那些线粒体有异常的肿瘤,并且这些细胞在线粒体代谢中有代谢物谷氨酸盐的缺乏,这表明自噬被抑制的肿瘤细胞由于缺乏来自线粒体代谢通路的媒介物而使线粒体代谢压力增大从而减慢了细胞生长。尽管并没有发现有*KRas*基因型肺模型的脂解缺陷,但是这些研究还是能说明,自噬通过广泛控制自身的线粒体功能对调节代谢稳态的重要性,而且自噬抑制也会减少*Braf*激活的中枢神经系统肿瘤细胞的生长和生存。虽然,还没有研究自噬对代谢的影响,但是*Braf*基因型肺模型的研究结果显示了一个潜在的

表3 *Atg*敲除对癌症发展的影响以及患癌症的GEMMs的代谢
Table 3 Effects of *Atg* deletion on cancer progression and metabolism in GEMMs of cancer

癌症转基因模型 GEMMs		<i>Atg</i> 敲除 ^a	对自噬的抑制型 Phenotype upon autophagy inhibition		参考文献
癌症类型 Cancer type	基因类型 Genotype	<i>Atg</i> deletion ^a	肿瘤发展 ^b Tumor progression ^b	肿瘤细胞代谢 ^c Tumor cell metabolism ^c	Reference
Mammary carcinoma	MMTV-PyMT	<i>FIP200</i> (MMTV-Cre)	Decreased initiation progression	Impaired glycolysis	38
Non-small cell lung cancer	lox-stop-lox-Kras ^{G12D} ; Tp53 ^{fllox/fllox}	<i>Atg7</i> (intranasal adenoviral Cre)	Decreased progression, oncocyoma formation	Impaired mitochondrial metabolism and fatty acid oxidation, lipid accumulation	39
Non-small cell lung cancer	lox-stop-lox-Kras ^{G12D}	<i>Atg5</i> (intranasal adenoviral Cre)	Increased initiation, decreased progression, oncocyoma formation	Impaired mitochondrial metabolism	34
Non-small cell lung cancer	frt-stop-frt-Kras ^{G12D} ; Tp53 ^{fltr/fltr}	<i>Atg7</i> (Ubc-CreERT2)	Decreased progression, oncocyoma formation	Lipid accumulation	40
Non-small cell lung cancer	Braf ^{V600E} ;Tp53 ^{fllox/fllox}	<i>Atg7</i> (intranasal adenoviral Cre)	Increased initiation, decreased progression, oncocyoma formation	Impaired mitochondrial glutamine metabolism	37
Pancreatic cancer	lox-stop-lox-Kras ^{G12D} ; Pdx-cre	<i>Atg5</i> or <i>Atg7</i> (Pdx-Cre)	Increased initiation, decreased progression	ND	35
Pancreatic cancer	lox-stop-lox-Kras ^{G12D} ; Tp53 ^{fllox/fllox} ;Pdx-cre	<i>Atg5</i> or <i>Atg7</i> (Pdx-Cre)	Increased progression	Increased glycolysis	35
Pancreatic cancer	lox-stop-lox-Kras ^{G12D} ; Tp53 ^{fllox/+} ;Pdx-cre	<i>Atg5</i> (Pdx-Cre)	Increased initiation, decreased progression	ND	36

a: Cre重组酶介导的删除方法括号内有介绍。MMTV-Cre表达是乳腺上皮细胞的特性, Ubc-CreERT2表达是普遍存在的且他莫昔芬可诱导, Pdx-Cre是内分泌腺特有的外分泌。b: 对肿瘤起始物的影响与早期肿瘤的起始和发展有关。对肿瘤发展的影响与晚期肿瘤有关。c: ND表示代谢表型在*Atg*敲除的环境尚未确定。

a: the method of Cre recombinase-mediated deletion is indicated in parentheses. MMTV-Cre expression is mammary epithelial cell specific, Ubc-CreERT2 expression is ubiquitous and tamoxifen-inducible, and Pdx-Cre is exocrine and endocrine pancreatic specific. b: effects on tumor initiation are related to tumor onset and development of early-stage tumors. Effects on progression are related to advanced tumorigenesis. c: ND indicates that the metabolic phenotype was not determined in the context of *Atg* deletion.

机制, 那就是自噬可能会影响*Braf*诱导的多个肿瘤类型。未来我们在探索自噬在不同压力以及在不同致癌基因存在条件下, 多种需求之间的联系可能会揭开自噬对肿瘤发生控制的保守机制。

4 自噬相关的肿瘤治疗

由于自噬在肿瘤中的双重作用, 所以说自噬调节用于治疗肿瘤也是一把双刃剑。不同程度的自噬状态都会影响治疗的效果, 因此需要考虑建立有利于治疗的自噬水平很重要。以下是一些临床实验例子用于阐明如何诱导或如何抑制自噬是有利的, 且能提高疗效。

4.1 自噬的诱导在癌症预防和改善化疗中的作用

既然, 自噬有助于保护细胞的完整性, 那么能不能通过提高自噬的水平引发更强的肿瘤预防或治疗作用。卡路里限制(caloric restriction, CR), 即限制食物摄入但不达到营养不良的程度, 能影响一些分子通路, 而这些通路在肿瘤中也是被改变了的。卡路里限制通过AMPK或长寿蛋白1(sirtuin type 1, SIRT1)的激活或者生长因子信号的抑制, 从而导致mTOR1的抑制, 这也是大多数生理情况下诱发自噬的因素。在动物模型^[33,41-42]中已经被证明卡路里限制能有效地预防肿瘤, 并且可以降低猴子50%的肿瘤发病率^[43]。流行病学调查研究表明, 卡路里限制也有利于人类健康^[44]。卡路里限制在降低癌症(如乳腺癌)发病风险方面的有效性, 目前正在临床研究阶段。但是, 目前仍不清楚是否CR仅抑制某些超重作为明确危险因素的癌症疾病的发生以及是否这一因素部分依赖于自噬。

降低热量摄入引起的自噬能防止肿瘤的发展或者提高抗癌治疗的效果, 一方面可能是提高肿瘤细胞对死亡的敏感性, 另一方面可能是保护正常细胞免于高毒性药物治疗的伤害。有趣的是, 卡路里限制已经被证明在p53缺失的小鼠中能降低肿瘤进展^[45]并且减慢乳腺肿瘤的生长^[46]。另外, 已证明卡路里限制在胰腺癌的小鼠动物模型中, 与通过降低mTORC1活性和减小肿瘤体积的雷帕霉素这一药物有相似的作用和机制^[47], 这表明自噬可能在减慢肿瘤发展方面有重要的作用。

另一种诱发自噬的方法是禁食, 最近已经有研究证明, 禁食能增强癌细胞对放疗或化疗的敏感性并会提高在体多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma

multiforme, GBM)模型的生存率, 这表明禁食可能会提高病人对已有的癌症的治疗效果^[48]。禁食也有保护正常细胞而非癌细胞的作用, 使其免受化疗的伤害^[49], 这表明自噬的调控可能会放大正常细胞和癌症细胞之间对化疗毒性反应差别的潜力。然而, 这一过程的机制尚不清楚, 并且这一影响是否依赖于禁食诱导的自噬仍然需要进一步的研究。目前, 已经开展的几个临床试验结果将会揭示诱发自噬的措施是否能减慢或抑制肿瘤的发生、发展及其对化疗药物的反应。

4.2 联用自噬抑制剂与抗癌疗法

临床上抗疟疾药物羟化氯喹(hydroxychloroquine, HCQ)可以抑制自噬, 这已在多种疾病的治疗中证实。HCQ是由4-氨基喹啉化合物构成的硫酸羟氯喹, 不是特异性的自噬抑制剂, 但它能提高溶酶体的pH值, 从而损害溶酶体功能并导致自噬蛋白的降解。HCQ已经在治疗疟疾和风湿性关节炎中广泛应用并且被很好地耐受, 有将近三十个临床试验, 在癌症病人中连续单用HCQ或者和细胞毒素制剂联合使用(表2)。在体外联用伊马替尼(imatinib, IM)/CQ治疗慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukaemia, CML)残存的干细胞的结果是可喜的^[29]。CML是骨髓造血干细胞克隆性增殖形成的恶性肿瘤。其标志是Ph染色体, 它是HSC中的9号和22号染色体之间产生易位导致Bcr-Abl融合蛋白的表达, 导致骨髓细胞的膨胀和分化继而引起疾病。IM是一个酪氨酸激酶抑制剂, 能抑制Bcr-Abl的活性, 有效杀死分化后的Ph⁺的CML细胞, 是CML治疗的一线药物。然而, Ph⁺的CML干细胞对IM不敏感, 导致大多数病人的疾病难以完全治愈。IM在CML干细胞上有诱发自噬的作用, 在体外试验中联合使用CQ抑制自噬能几乎全部消除CML干细胞。这推动了研究向第二临床阶段(Chloroquine and IM combination to eliminate stem cells, CHOICES)发展, 第一临床阶段检测了CML中的自噬的抑制程度^[50]。CHOICES试验的目的是, 在对IM敏感并且有由残存的CML干细胞引起的残留病变的CML病人中, 检测IM和HCQ联用的效果。CML被公认是肿瘤靶向治疗的经典案例, 因此, CHOICES试验不仅能揭示自噬是否能在病人中被有效抑制, 而且能观察肿瘤干细胞/肿瘤初始细胞是否在自噬抑制后更易被根除, 这就能为其他基于干细胞的抗肿瘤研究提供平台。最新的关于自噬在多形性胶质

母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)干细胞中的作用方面的研究表明, DRAM-1参与调控GBM干细胞的侵袭性以及DRAM-1的表达与GBM病人总体生存时间较短是密切相关的^[51]。最近, 两个临床试验也在检测HCQ与放疗结合的治疗是否对GBM病人有利。

如前所述, 由于在小鼠模型中完全抑制自噬对小鼠的生存有显著的影响^[52]以及自噬对肿瘤的抑制功能和对化疗药物反应的作用, 那么对人类来说是否会存在与自噬抑制相关的潜在风险呢? 这一问题已经在最近的Michaud等^[53]研究中得到了回答, 他们证明了, 抑制自噬可能会限制由依赖自噬的抗癌免疫应答引起的化疗反应, 在某些免疫反应起重要作用的癌症中过分地限制自噬可能限制化疗效果。然而, 如果治疗方案是短暂的和/或降低而非完全抑制自噬, 可能不仅会限制毒性而且能预防发展成继发性恶性肿瘤, 同时, 还能获得更好的治疗效果。

5 未来研究方向

尽管很多临床试验已在进行, 但是自噬抑制真正用于临床仍有一定距离。大部分的病人用HCQ 200~800 mg/d, 在大多数情况下这样的治疗病人是可以耐受的。然而尽管在体外1~10 $\mu\text{mol/L}$ 的HCQ能抑制自噬, 但仍不清楚是否在所有的接受达800甚至1 200 mg/d的病人中自噬是否被限制在稳定的浓度。另外, 是否HCQ或CQ产生的所有疗效都与自噬的抑制有一定的关系, 就这一点而言, 最新的离体实验现实无论细胞有没有自噬功能, CQ都能提高化疗的效果^[54]。所以, 有必要开发更有效更特异的自噬抑制剂, 用于将来的临床试验。最近研发的Lys05是一种CQ衍生物, 其效果是HCQ的10倍^[55]。另外, spautin-1、VPS34的一种小分子抑制剂^[56]和克拉霉素(大环内酯类抗菌素)^[57]在临床前模型或病人都取得了较好的效果^[58]。

在数据方面的一个主要研究限制是所有的癌症模型只在肿瘤中有自噬的作用不能与正常组织中的自噬缺乏做一个直接的对比。因为我们知道自噬对一些正常组织是很重要的, 但是一个至关重要的问题是全身的自噬失活能否有足够能力选择得到在减少肿瘤的生长同时使正常组织免于毒害的结果。事实上, 最近也有人正在从遗传学方面做这个研究, 与正常组织相比全身Atg7敲除可以选择性地

损害创建的肺肿瘤^[59]。因此, 我们需要找出癌症治疗方面在疗法上抑制自噬最好的方法, 并找出哪类的病人最适合这种方法。HCQ是最近临床上用于干扰线粒体功能的药物, 并且能降解自噬产物, 但是它的这一功能是否有选择性、是否对治疗有利、是否有特异性尚不明确。因此, 以参与自噬的必要成分为靶标的疗法还需要进一步的研究。

6 结论

自噬在癌症中的作用在近几年被广泛研究。最近的研究结果表明, 自噬可以一方面保护正常细胞防止损伤DNA/蛋白质堆积从而阻止肿瘤发生, 另一方面帮助癌细胞适应不利环境并保护它们免受或耐受抗癌治疗。尽管自噬有双重作用, 许多研究仍然坚持自噬在癌细胞中的保护作用, 在许多临床试验中是用没有特异性的自噬抑制剂HCQ来抑制这一过程, 更多的特异性或潜在的抑制剂正处于临床前开发中。新的自噬调节药物的开发, 不仅有助于我们对正常组织或者肿瘤细胞中自噬的特异性作用有更深入的了解, 还有利于寻找肿瘤或者其他疾病在自噬过程中的治疗靶点。

参考文献 (References)

- 1 Klionsky DJ. Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(11): 931-7.
- 2 Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22(2): 132-9.
- 3 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.
- 4 Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim M, Otto NM, Ca J, *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009; 20(7): 1992-2003.
- 5 Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* 2009; 186(6): 773-82.
- 6 Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, *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.
- 7 Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008; 4(5): 600-6.
- 8 Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *Protein modifications: Beyond the usual suspects*' review series. *EMBO Rep* 2008; 9(9): 859-64.
- 9 Gutierrez MG, Munaf0 DB, Beron W, Colombo MI. Rab7 is

- required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 13): 2687-97.
- 10 Liang C, Lee JS, Inn K S, Gack M U, Li Q, Roberts, *et al.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 2008; 10(7): 776-87.
 - 11 Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim D H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 2010; 584(7): 1287-95.
 - 12 Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121(2): 179-93.
 - 13 Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* 2004; 23(22): 3898-904.
 - 14 Pattingre S, Bauvy C, Codogno P. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem* 2003; 278(19): 16667-74.
 - 15 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(2); 30: 214-26.
 - 16 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.
 - 17 Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(23): 8204-9.
 - 18 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.
 - 19 Pattingre S, Tassa A., Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122(6): 927-39.
 - 20 Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402(6762): 672-6.
 - 21 Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1809-20.
 - 22 Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, *et al.* Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol* 2009; 217(5): 702-6.
 - 23 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.
 - 24 Warr MR, Binnewies M, Flach J, Reynaud D, Garg T, Malhotra R, *et al.* FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* 2013; 494(7437): 323-7.
 - 25 Takamura A, Masaaki K, Taichi H, Ayako S, Chieko K, Satoshi Wi, *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25(8): 795-800.
 - 26 Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, *et al.* Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* 2011; 193(2): 275-84.
 - 27 Mathew R, Karp C M, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137(6): 1062-75.
 - 28 Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, *et al.* Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21(11): 1367-81.
 - 29 Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera A R, Ronchetti M, *et al.* Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest* 2009; 119(5): 1109-23.
 - 30 Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahon M, Sphicas E, *et al.* A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 2001; 61(2): 439-44.
 - 31 Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI, *et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007; 117(2): 326-36.
 - 32 Zinn RL, Gardner EE, Dobromilskaya I, Murphy S, Marchionni L, Hann CL, *et al.* Combination treatment with ABT-737 and chloroquine in preclinical models of small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2013; 12(5): 16.
 - 33 Tannenbaum A, Silverstone H. The influence of the degree of caloric restriction on the formation of skin tumors and hepatomas in mice. *Cancer Res* 1949; 9(12): 724-7.
 - 34 Rao S, Tortola L, Perlot T, Wirsberger G, Novatchkova M, Nitsch R, *et al.* A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun* 2014; 5(1): 3056.
 - 35 Rosenfeldt MT, O'Prey J, Morton JP, Nixon C, MacKay G, Mrowinska A, *et al.* p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* 2013; 504(7479): 296-300.
 - 36 Yang A, Rajeshkumar NV, Wang XX, Chi SN, Chi YB, Brian MA, *et al.* Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov* 2014; 4(9): 905-13.
 - 37 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.
 - 38 Wei H, Wei S, Gan B, Peng X, Zou W, Guan JL. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25(14): 1510-27.
 - 39 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 oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes Dev* 2013; 27(13): 1447-61.
 - 40 Karsli-Uzunbas G, Guo JY, Price S, Teng X, Laddha SV, Khor S, *et al.* Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance. *Cancer Discov* 2014; 4(8): 914-27.
 - 41 Thompson HJ, Zhu Z, Jiang W. Dietary energy restriction in breast cancer prevention. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8(1): 133-42.
 - 42 Klurfeld DM, Welch CB, Davis MJ, Kritchevsky D. Determination of degree of energy restriction necessary to reduce DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats during the

- promotion phase. *J Nutr* 1989; 119(2): 286-91.
- 43 Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, *et al.* Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 2009; 325(5937): 201-4.
 - 44 Rubinsztein DC, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 2011; 146(5): 682-95.
 - 45 Dunn SE, Kari FW, French J, Leininger JR, Travlos G, Wilson R, *et al.* Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice. *Cancer Res* 1997; 57(21): 4667-72.
 - 46 de Lorenzo MS, Baljinnyam E, Vatner DE, Abarzua P, Vatner SF, Rabson AB. Caloric restriction reduces growth of mammary tumors and metastases. *Carcinogenesis*. 2011; 32(9): 1381-7.
 - 47 Lashinger LM, Malone LM, Brown GW, Daniels EA, Goldberg JA, Otto G, *et al.* Rapamycin partially mimics the anticancer effects of calorie restriction in a murine model of pancreatic cancer. *Cancer Prev Res* 2011; 4(7): 1041-51.
 - 48 Safdie F, Brandhorst S, Wei M, Wang W, Lee C, Hwang S, *et al.* Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy. *PLoS One* 2012; 7(9): e44603.
 - 49 Raffaghello L, Lee C, Safdie FM, Wei M, Madia F, Bianchi G, *et al.* Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(4): 8215-20.
 - 50 Helgason GV, Karvela M, Holyoake T L. Kill one bird with two stones: Potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML. *Blood* 2011; 118(28): 2035-43.
 - 51 Galavotti S, Bartesaghi S, Faccenda D, Shaked-Rabi M, Sanzone S, McEvoy A, *et al.* The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene* 2013; 32(6): 699-712.
 - 52 Liu F, Lee J Y, Wei H, Tanabe O, Engel JD, Morrison SJ, *et al.* FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood* 2010; 116(23): 4806-14.
 - 53 Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, *et al.* Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; 334(6062): 1573-7.
 - 54 Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* 2012; 8(2): 200-12.
 - 55 McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, Levi SM, Ma XH, Piao S, *et al.* Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(21): 8253-8.
 - 56 Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, *et al.* Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell* 2011; 147(1): 223-34.
 - 57 Schafranek L, Leclercq TM, White DL, Hughes TP. Clarithromycin enhances dasatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia cells, by inhibition of late stage autophagy. *Leuk Lymphoma* 2013; 54(1): 198-201.
 - 58 Carella AM, Beltrami G, Pica G, Carella A, Catania G. Clarithromycin potentiates tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with resistant chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 2012; 53(7): 1409-11.
 - 59 Karsli-Uzunbas G, Guo JY, Price S, Teng X, Laddha SV, Khor S, *et al.* Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance. *Cancer Discov* 2014; 4(8):914-27.