

氯喹抑制自噬增强宫颈癌细胞SiHa对CPT处理的敏感性

王晓娜¹ 任云青^{2*} 吴惠文³ 赵嘉伟⁴ 游荷花² 宋彬好³ 杨赛² 任来峰^{2*}

¹山西医科大学第一临床医学院, 太原 030001; ²山西医科大学汾阳学院医学检验系, 汾阳 032200;

³山西医科大学汾阳学院科技中心, 汾阳 032200; ⁴厦门大学医学院临床医学系, 厦门 361000)

摘要 自噬诱导是肿瘤细胞对化疗药物抵抗性的原因之一, 该研究探讨溶酶体抑制剂氯喹对喜树碱(camptothecin, CPT)诱导的宫颈癌细胞SiHa死亡的增敏效果。CPT和/或氯喹处理宫颈癌SiHa细胞, MTT法检测细胞增殖, DAPI和TUNEL染色观察细胞凋亡, Western blot和免疫荧光检测自噬及凋亡相关蛋白。结果发现, CPT处理后, SiHa细胞MAP1LC3B荧光点和LC3II(microtubule-associated protein light chain 3II)蛋白水平增加, p62荧光点和蛋白质水平则减少; 而采用氯喹特异抑制自噬后, 可明显提高CPT诱导的细胞凋亡、caspase-9的激活和PARP(poly ADP-ribose polymerase)的切割, 而全长caspase-2水平显著下降。以上结果提示, 氯喹可通过抑制细胞自噬而增强宫颈癌细胞株SiHa对CPT诱导细胞凋亡的敏感性。

关键词 氯喹; 喜树碱; 自噬; 细胞凋亡; SiHa细胞

Autophagy Inhibition by Chloroquine Sensitizes Cervical Cancer SiHa Cells to CPT Treatment

Wang Xiaona¹, Ren Yunqing^{2*}, Wu Huiwen³, Zhao Jiawei⁴, You Hehua², Song Binyu³, Yang Sai², Ren Laifeng^{2*}

¹The First Clinical Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

²Department of Medical Laboratory Science, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;

³Science and Technology Center, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;

⁴Department of Clinical Medicine, Xiamen University School of Medicine, Xiamen 361000, China)

Abstract The autophagy induction is one of the reasons for the resistance of tumor cells to chemotherapy drugs. In this study, the enhanced sensitivity of cervical cancer SiHa cells to camptothecin (CPT)-induced cell death by chloroquine (a lysosome inhibitor) was investigated. The cell viability was detected by MTT assay, meanwhile, apoptosis was observed by DAPI and TUNEL, autophagy related proteins and apoptosis proteins were analyzed by immunofluorescence (IF) staining and Western blot in SiHa cells after CPT treatment alone or combined with chloroquine. The results found that in SiHa cells with CPT treatment the autophagy related protein LC3 foci and microtubule-associated protein light chain 3II (LC3II) protein level was increased, but p62 foci and protein level was decreased. When autophagy was inhibited by chloroquine, the CPT-induced apoptosis was obviously enhanced,

收稿日期: 2015-09-02 接受日期: 2015-12-10

山西省自然科学基金(批准号: 2014021037-9)、山西医科大学汾阳学院博士启动基金(批准号: 1301)和山西医科大学汾阳学院科研项目基金(批准号: 1422)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0358-7235075, E-mail: 15535875200@163.com; rlaifeng@163.com

Received: September 2, 2015 Accepted: December 10, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (Grant No.2014021037-9), the Doctoral Scientific Research Foundation of Fenyang College of Shanxi Medical University (Grant No.1301) and Science Research Foundation of Fenyang College of Shanxi Medical University (Grant No.1422)

*Corresponding authors. Tel: +86-358-7235075, E-mail: 15535875200@163.com; rlaifeng@163.com

网络发表时间: 2016-01-08 17:00:28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160108.1700.012.html>

and caspase-9 was activated and PARP was cleaved, but full length caspase-2 was decreased. Taken together, these results indicated that the inhibition of autophagy by chloroquine could sensitize cervical cancer SiHa cells to CPT inducing cell apoptosis.

Keywords chloroquine; camptothecin; autophagy; apoptosis; SiHa cells

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率高居全球肿瘤发病率的第二位^[1]。早期宫颈癌的治疗以手术结合放、化疗治疗为主, 顺铂类药物是最为常用的宫颈癌化疗药物; 但对于经顺铂治疗后仍出现的转移性、持续性或复发性宫颈癌的治疗, 目前仍效果不佳^[2]。因此, 开发新的非顺铂类化疗方法对治疗顺铂抵抗性的宫颈癌具有重要的意义。喜树碱(camptothecin, CPT)是一类以拓扑异构酶I为作用靶点的抗肿瘤药物, 可引起细胞内外源性凋亡信号活化, 从而诱导肿瘤细胞凋亡, CPT及其衍生物已被用于卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌等的治疗^[3]。

自噬是细胞进化中形成的保守性细胞应激信号通路。通过自噬, 部分细胞质内容物及细胞器被称为自噬体的双膜或多膜结构包裹, 输送到溶酶体与之融合形成自噬溶酶体, 从而降解。很多肿瘤细胞可通过诱导自噬, 抵抗营养缺乏、放化疗处理等恶劣的环境因素, 而有利于其存活^[4]。许多放化疗处理可以诱导肿瘤细胞活化自噬而产生对相应处理的抵抗性, 抑制自噬已成为目前肿瘤放化疗增敏治疗的热点之一^[5]。氯喹(chloroquine, CQ)可抑制自噬体与溶酶体的融合而抑制自噬晚期过程的自噬体降解过程, 在提高肿瘤放、化疗治疗效果方面有潜在的应用价值^[6]。本研究探讨通过CQ抑制自噬和提高化疗药物CPT对宫颈鳞癌SiHa细胞存活的影响, 以期改善临床宫颈癌的治疗提供新的策略和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌SiHa细胞株购自武汉博士德生物工程有限公司, 高糖DMEM培养基购自Hyclone公司, 胎牛血清购自Gibco公司, 喜树碱(Sigma公司)由四川大学华西第二医院发育与干细胞研究所刘聪教授惠赠, 氯喹购自Selleck公司, 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)及二甲基亚砜(DMSO)均购自北京索莱宝生物技术有限公司。抗 α -tubulin抗体、HRP标记的抗鼠和抗兔二抗、FITC标记的抗鼠二抗、Cy3标记的抗兔二抗均购于Sigma公司, 抗

LC3B、cleaved-caspase-9及caspase-2抗体购自Cell Signaling Technology公司, 抗p62及PARP抗体购自Abcam公司, 细胞核染料DAPI购自Vector公司, 原位细胞凋亡检测试剂盒购自Roche公司, ECL化学发光剂购自Millipore公司。酶标仪(Eon)购自BioTek公司, 荧光显微镜(DM4000)购自Leica公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 宫颈癌SiHa细胞接种在含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM高糖培养基中, 在37 °C含5% CO₂的培养箱中连续培养, 每隔1~2 d更换新鲜培养液, 待细胞长至80%~90%汇合度时, 用胰蛋白酶消化并进行传代。

1.2.2 MTT检测细胞活力 为检测不同浓度CPT对细胞活力的影响, 将生长至对数生长期的细胞以7 000/mL接种于96孔板, 设对照组和不同浓度药物组(1.0 μ mol/L、2.0 μ mol/L、4.0 μ mol/L), 每组设定5个复孔, 待细胞完全贴壁后, 分别加入相应浓度的CPT, 对照组加DMSO。分别放入培养箱中继续培养预定时间(8 h、20 h及44 h)后, 每孔加入10 μ L MTT(5 mg/mL)继续培养4 h, 然后移除孔中培养液, 加入150 μ L DMSO溶解孔中细胞, 用酶标仪测量各孔细胞在570 nm的吸光度(D)值。计算各组5个复孔的平均D值, 以对照组细胞活力为100%, 则各组细胞抑制率=[1-(药物组D值/对照组D值)] \times 100%。

为检测CQ在细胞对CPT处理的增敏作用, 将细胞分为4组, 分别为对照组(DMSO)、CPT组(2.0 μ mol/L)、CQ组(10 μ mol/L)及CPT+CQ组(2.0 μ mol/L+10 μ mol/L), 其余操作同前。

1.2.3 免疫印迹(Western blot)检测 离心收集各组细胞, 加入RIPA细胞裂解液, 在冰上裂解细胞后, 4 °C 12 000 \times g离心10 min, 取上清, 经BCA法定量并调整蛋白浓度, 加入4 \times 上样缓冲液经煮沸后得到蛋白质样品。细胞总蛋白质经12% SDS-PAGE电泳, 转移到PVDF膜上, 5% BSA封闭2 h后, 分别用抗LC3B(1:1 000)、p62(1:2 000)、caspase-2(1:1 000)、cleaved-caspase-9(1:1 000)、PARP(1:1 000)、 α -tubulin(1:4 000)于37 °C孵育3 h, TBST洗涤3次, 每次10 min, 再用HRP标记的抗兔

和抗鼠二抗(1:2 000)、室温孵育1 h, TBST洗3次, ECL底物显色、曝光、显影、定影后分析结果。

1.2.4 免疫荧光(immunofluorescence, IF)检测 参考文献[7]并作适当修改, 简述如下: 将SiHa细胞接种到载玻片上, 设立阴性对照组(DMSO), CPT组(2.0 $\mu\text{mol/L}$)和阳性对照组(10 $\mu\text{mol/L}$ CQ), 待加入相应药物作用16 h后, 吸弃培养液, PBS洗涤1次, 经4%多聚甲醛室温固定10 min或甲醇 -20°C 固定15 min(用于LC3B染色), PBS漂洗后, 用0.3% Triton X-100室温通透10 min; 经PBS漂洗后, 用免疫荧光封闭液(0.1% Triton X-100+1% BSA)室温封闭30 min以上, 加入抗LC3B(1:200)或p62(1:200)抗体, 于 37°C 孵育1 h, 用PBS洗3次; 再用Cyc3标记的抗兔二抗和FITC标记的抗鼠二抗, 于 37°C 湿盒中孵育1 h, PBS洗3次; 最后用DAPI封片, 在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 细胞凋亡分析 按方法1.2.4的步骤处理、收集细胞, 用DAPI染色细胞核, 荧光显微镜观察并拍照。按照参考文献[7]的方法计数正常和凋亡细胞数, 并计算细胞凋亡率。TUNEL法简介如下: 加药处理细胞48 h后, 按方法1.2.4的步骤收集、固定细胞, 在固定好的细胞上加50 μL TUNEL检测液, 湿盒中 37°C 避光孵育60 min, 然后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 统计分析 数据以均数 \pm 标准差的形式表示, 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 组间均数比较

采用 t 检验, 组间率的比较采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

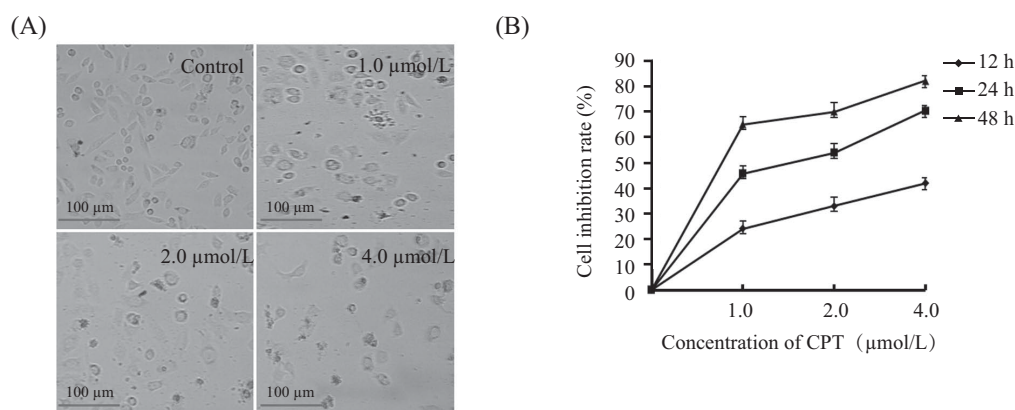
2 结果

2.1 CPT对宫颈癌SiHa细胞的增殖抑制作用

为评价CPT对细胞活力的影响, 我们用不同浓度CPT分别处理SiHa细胞12 h、24 h、48 h, 显微镜直接观察细胞生长状态(图1A), 并用MTT法检测CPT对细胞的抑制率。结果发现, 随着药物浓度的增加及时间的延长, CPT对细胞的抑制率逐渐增加, 呈现时间和剂量依赖性(图1B)。2.0 $\mu\text{mol/L}$ 的CPT作用细胞24 h后, 细胞的增殖抑制率接近50%(图1B), 因此, 我们选用该浓度作为后续实验剂量。

2.2 CPT诱导宫颈癌SiHa细胞自噬体的形成

为了解CPT处理是否可以诱导肿瘤细胞自噬信号的活化, 采用IF染色和Western blot的方法分析了自噬相关蛋白LC3、p62蛋白质水平。IF的结果显示, 与对照组(DMSO)相比, CPT处理组细胞LC3荧光点明显增强, 而p62荧光点明显减少, 提示CPT处理可诱导细胞自噬体的形成; CQ处理组(阳性对照)细胞LC3和p62荧光点均大量集聚, 表明CQ处理不影响细胞自噬体的形成但可抑制其后续的降解过程(图2)。Western blot实验表明, 与DMSO处理组相比, CPT处理组细胞LC3II蛋白水平显著升高、p62蛋白水平则明显下降, 而CQ处理组细胞LC3II、p62蛋白水平均显著升高, 进一步证实了免疫荧光的结果(图2D)。

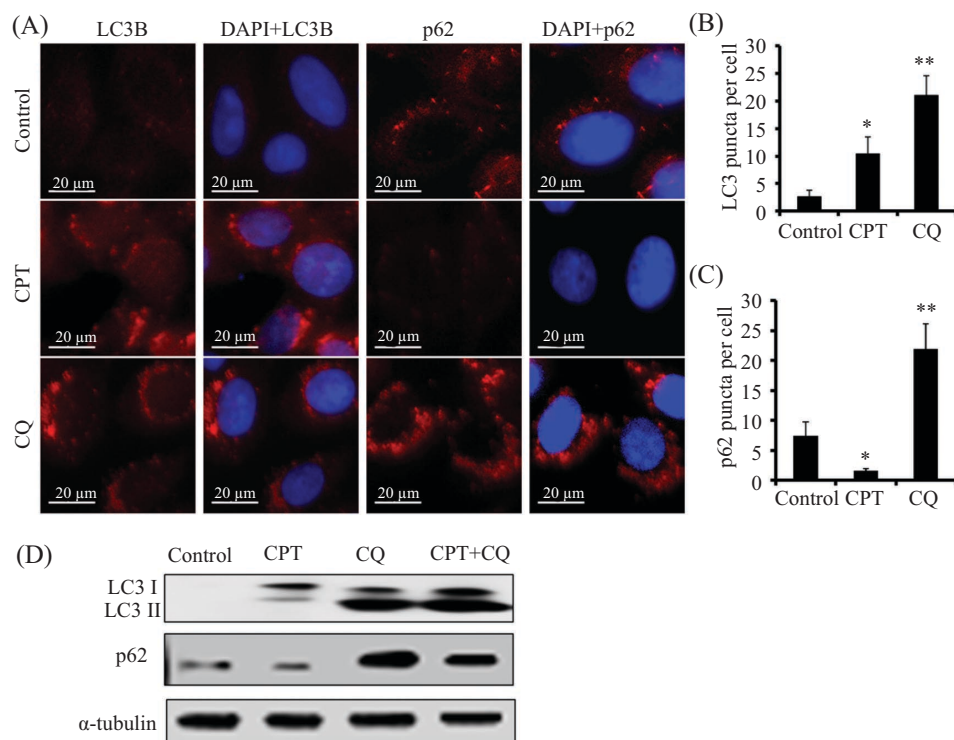


A: 不同浓度CPT作用24 h后的宫颈癌SiHa细胞形态; B: 不同浓度CPT处理宫颈癌SiHa细胞不同时间后, 用MTT法检测细胞的增殖抑制率。3次独立实验。

A: morphology of cervical cancer SiHa cells after CPT treatment for 24 h at indicated concentration; B: SiHa cells were treated with different concentration of CPT for different time-point, and the level of growth inhibition was determined using the MTT assay. $n=3$.

图1 CPT对宫颈癌细胞SiHa细胞的增殖的影响

Fig.1 The effect on the proliferation of cervical cancer SiHa cells by CPT



A: 宫颈癌SiHa细胞生长在载玻片上, 经CPT(2 μmol/L)、CQ(10 μmol/L)或DMSO处理16 h后固定, 并用LC3和p62抗体进行免疫荧光染色, 然后观察细胞的LC3和p62荧光点。B和C: 统计分析细胞LC3和p62荧光点, 3次独立实验, *t*检验, **P*<0.05, ***P*<0.01, 与对照组比较。D: 宫颈癌SiHa细胞在不同药物处理的LC3、p62的蛋白表达。

A: cervical cancer SiHa cells grown on coverslips were treated with CPT (2 μmol/L), CQ (10 μmol/L) or DMSO for 16 h and immunostained with LC3 and P62 antibody after fixation, and punctuated foci were detected in cells. B and C: statistical analysis of the punctuated foci of SiHa cells, *n*=3, *t* test, **P*<0.05, ***P*<0.01 compared with control group. D: cervical cancer SiHa cells were treated with different drugs and detect the protein levels of LC3 and p62.

图2 CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞LC3及p62变化

Fig.2 The changes of LC3 and p62 in cervical cancer SiHa cells induced by CPT treatment

2.3 CQ增强CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞死亡

为研究自噬抑制对CPT诱导的宫颈癌细胞SiHa死亡的影响, 以CQ为自噬抑制剂, 采用MTT法进行了分析。结果发现, 与DMSO组比较, 应用10 μmol/L CQ处理细胞基本不影响其增殖活力; 但CQ和CPT联合处理细胞后, 细胞增殖活力明显低于CPT单独处理组(*P*<0.05), 提示CQ可增强CPT对宫颈癌SiHa细胞的增殖抑制作用(图3A和图3B)。

我们进一步采用DAPI染色法调查了CQ对CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡的影响。结果发现, 各组(DMSO组、CQ组、CPT组及CPT+CQ组)细胞的凋亡率分别为: (1.23±0.15)%、(2.45±1.38)%、(9.45±2.70)%和(22.70±5.01)%; CPT+CQ组细胞凋亡率明显高于CPT组(*P*<0.05), 提示CQ可增强CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡(图3C和图3D)。TUNEL法进一步证实了CQ在CPT诱导的细胞凋亡中的促进作用, 结果所示, DMSO组、CQ组、CPT组及CPT+CQ组细胞的凋亡率分别为: (1.84±0.35)%、(2.65±1.01)%、(37.45±5.80)%和

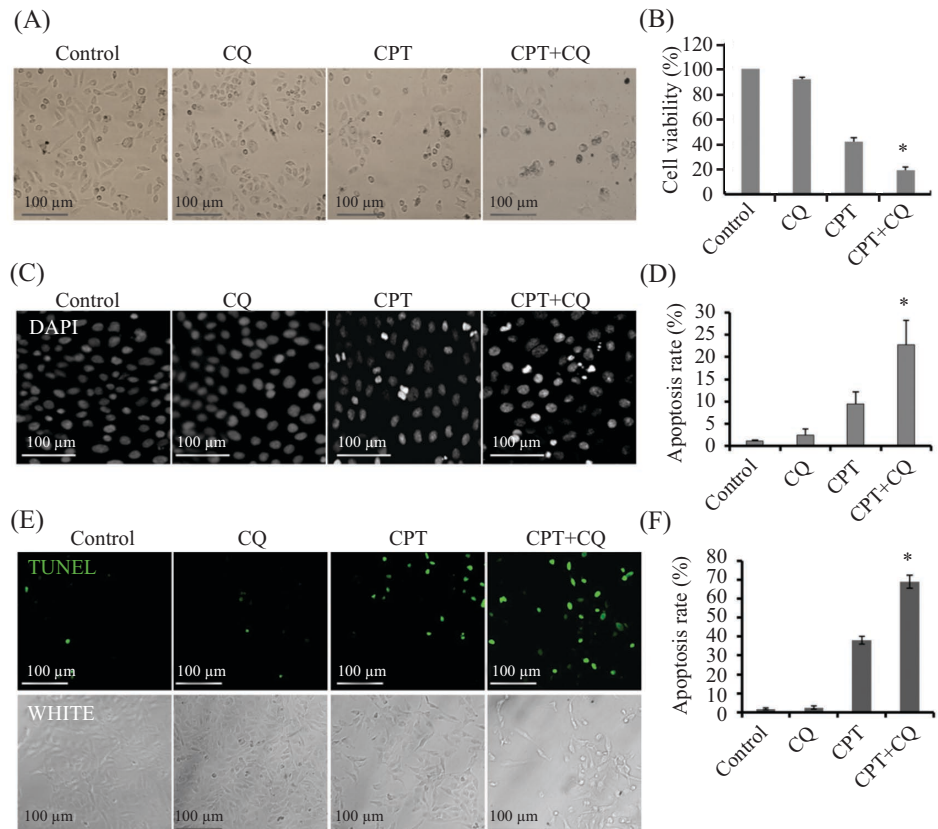
(68.50±7.03)% (图3E和图3F)。

2.4 CQ抑制自噬可增强CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡信号

为进一步评价CQ对CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡信号活化的影响, 采用Western blot检测了各处理组细胞的凋亡相关指标。结果发现, 与DMSO组比较, CPT处理组细胞cleaved-caspase-9和cleaved-PARP蛋白水平平均明显升高, 而总caspase-2和PARP蛋白水平明显降低, 提示CPT处理可诱导细胞凋亡信号活化; 而采用CQ抑制细胞晚期自噬后, 与CPT单独处理组比较, cleaved-caspase-9和cleaved-PARP蛋白水平显著升高, 总caspase-2和PARP蛋白水平显著降低, 提示CQ可增强CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡信号活化(图4)。

3 讨论

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁女性的生命健康。药物耐受是临床肿瘤治疗中面临

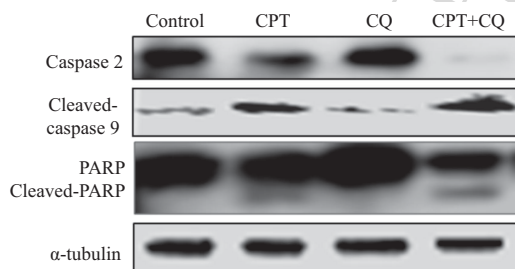


A: 不同药物处理24 h后的宫颈癌SiHa细胞形态(白光); B: MTT法检测细胞的增殖抑制率, 3次独立实验, *t*检验, **P*<0.05, 与CPT组比较; C和E: 不同药物处理24 h后(C)或48 h后(E)的细胞形态, DAPI染色(C)或TUNEL染色(E); D和F: 统计分析DAPI染色(D)和TUNEL染色(F)的细胞凋亡率, 3次独立实验, 卡方检验, **P*<0.05, 与CPT组比较。

A: morphology of cervical cancer SiHa cells after different drugs treatment for 24 h (ordinary microscope); B: the level of growth inhibition was determined by the MTT assay. *n*=3, *t* test, **P*<0.05 compared with CPT treatment. C and E: morphology of cells stained with DAPI (C) or TUNEL (E) after different drugs treatment for 24 h (C) or 48 h (E); D and F: statistical analysis of the apoptosis rate of SiHa cells by DAPI stains (D) and TUNEL stains (F), *n*=3, χ^2 test, **P*<0.05 compared with CPT group.

图3 CQ对CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞死亡的影响

Fig.3 The effect on CPT induced cell death of cervical cancer SiHa cells by CQ



宫颈癌SiHa细胞经不同药物处理36 h后收样提取细胞总蛋白, 并用免疫印迹分析caspase-2、cleaved-caspase-9、PARP、cleaved-PARP及 α -tubulin蛋白水平。

Cervical cancer SiHa cells were treated with different drugs for 36 h, total proteins were extracted and used to detect the protein levels of caspase-2, cleaved-caspase-9, PARP, cleaved-PARP and α -tubulin by Western blot.

图4 CQ抑制自噬对CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡信号活化的影响

Fig.4 Autophagy inhibition by chloroquine has an effect on the signaling of cervical cancer SiHa cells apoptosis induced by CPT treatment

的共同问题^[8], 提高化疗药物敏感性对临床肿瘤治疗非常重要。自噬是真核细胞普遍存在的生命现象, 在自噬过程中, 首先是在细胞质内形成双层膜结构包裹的成分(受损的、变性或衰老的蛋白质以及细胞器)称为自噬体; 继而自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 最后溶酶体中的酶消化降解包裹成分。许多研究表明, 癌细胞在放疗化疗过程中可活化自噬信号, 作为一种存活机制介导获得性耐药而保护细胞免遭死亡^[6,8]。因此, 通过抑制自噬信号增强肿瘤细胞对放化疗治疗的敏感性成为当前国内外抗肿瘤治疗研究的热点之一。

喜树碱(CPT)是以拓扑异构酶I为作用靶点的抗肿瘤药物, 可引起DNA损伤, 通过内、外源性细胞信号途径诱导凋亡, CPT及其衍生物被用于多种肿瘤的治疗^[3,9]。但是, CPT类药物具有剂量依赖性细

胞毒性,限制了其临床应用;此外,某些肿瘤细胞内在的和获得性的药物抵抗性也是其临床治疗失败的重要原因^[10-11]。因此,寻找新的提高CPT治疗效果的策略具有重要意义。考虑到细胞自噬在调控肿瘤细胞化疗效果中的重要作用,我们选取氯喹作为自噬抑制剂,探讨宫颈癌SiHa细胞对CPT处理的反应性。氯喹长期以来被用作抗疟疾药物,近年来又发现其可靶向溶酶体,通过改变溶酶体内pH阻断自噬溶酶体的形成和自噬体内容物的降解,可抑制自噬过程的晚期阶段。此外,氯喹及其衍生物是唯一被FDA(Food and Drug Administration)批准的可安全用于体内体外的自噬抑制剂^[8,12]。有研究发现,氯喹可增加顺铂诱导的人脑胶质瘤U251、鼠胶质瘤C6及鼠纤维肉瘤L929细胞细胞死亡^[13], Sasaki等^[14]和Liang等^[15]研究发现, CQ通过抑制自噬可增加5-氟尿嘧啶对胆囊癌SGC-996细胞及结肠癌HT-29细胞的杀伤作用。在本研究中,我们采用不同浓度CPT处理宫颈鳞癌SiHa细胞, MTT结果显示, CPT对细胞的毒性作用是时间和剂量依赖性的(图1)。当我们用10 $\mu\text{mol/L}$ 的CQ(抑制细胞自噬但不影响细胞活性)预处理细胞后,可明显增强CPT诱导的细胞增殖活力下降(MTT法)和凋亡(DAPI染色法和TUNEL法),说明CQ可增加CPT对宫颈鳞癌SiHa细胞的杀伤活性(图3)。

为进一步研究自噬信号在CQ和CPT杀伤SiHa细胞中的作用,我们以LC3和p62为自噬评价指标^[16-17]分析了处理过程中自噬信号的变化。通过IF染色,我们发现, CPT处理可诱导细胞自噬体的形成(LC3荧光点明显增多,而p62荧光点明显减少; CQ处理的细胞不影响细胞自噬体的形成但可抑制其后续的降解过程,表现为LC3和p62荧光点均大量集聚(图2)。该结果进一步被Western blot实验证实, CPT处理可致细胞LC3II蛋白水平显著升高、p62蛋白则明显下降,而CQ处理组细胞LC3II、p62蛋白水平均显著升高(图4)。

最后,我们采用Western blot分析了CQ抑制自噬对CPT诱导的SiHa细胞凋亡信号的影响(图4)。细胞凋亡是由基因控制的程序性细胞死亡,在个体发育、内环境的稳定的维持等过程中起着重要的作用。我们的结果表明, CQ抑制细胞晚期自噬后,可增强CPT诱导的宫颈癌SiHa细胞凋亡信号活化,表现为显著升高的cleaved-caspase-9和cleaved-PARP蛋白水平和显著降低的总caspase-2和PARP蛋白水平^[18]。

总之,喜树碱作为癌症治疗中常用的药物,在诱导宫颈癌SiHa细胞发生凋亡时,同时也诱导了保护性自噬的发生,加入溶酶体抑制剂氯喹抑制自噬能增强CPT对宫颈癌SiHa细胞的杀伤,提高化疗效果。因此,氯喹和CPT联合使用可能成为一种很有前途的治疗宫颈癌的策略,但其真正用于临床还有待进一步深入研究。

参考文献 (References)

- 1 Sun Y, Liu JH, Jin L, Lin SM, Yang Y, Sui YX, *et al.* Over-expression of the Beclin1 gene upregulates chemosensitivity to anti-cancer drugs by enhancing therapy-induced apoptosis in cervix squamous carcinoma CaSki cells. *Cancer Lett* 2010; 294(2): 204-10.
- 2 Tewari KS, Sill MW, Long HJ, Penson RT, Huang H, Ramondetta LM, *et al.* Improved survival with bevacizumab in advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 2014; 370(8): 734-43.
- 3 Xia S, Rosen EM, Laterra J. Sensitization of glioma cells to Fas-dependent apoptosis by chemotherapy-induced oxidative stress. *Cancer Res* 2005; 65(12): 5248-55.
- 4 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.
- 5 White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(17): 5308-16.
- 6 White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12(6): 401-10.
- 7 任来峰, 唐子执, 吴惠文, 许宁, 刘刚, 曾鸣, 等. HCV NS3/4A基因外来表达对Huh7细胞凋亡及DNA损伤应答的影响. *中国细胞生物学学报(Ren Laifeng, Tang Zizhi, Wu Huiwen, Xu Ning, Liu Gang, Zeng Ming, et al. Over-expression of HCV NS3/4A influences cell apoptosis and cellular response to DNA damage. Chinese Journal of Cell Biology)* 2014; 36(8): 1110-5.
- 8 Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: A promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis* 2013; 10(4): 350.
- 9 Zucco V, de Cesare M, Zaffaroni N, Lanzi C, Cassinelli G. PLK1 is a critical determinant of tumor cell sensitivity to CPT11 and its inhibition enhances the drug antitumor efficacy in squamous cell carcinoma models sensitive and resistant to camptothecins. *Oncotarget* 2015; 6(11): 8736-49.
- 10 Tomicic MT, Kaina B. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1: 11-27.
- 11 Beretta GL, Gatti L, Perego P, Zaffaroni N. Camptothecin resistance in cancer: Insights into the molecular mechanisms of a DNA-damaging drug. *Curr Med Chem* 2013; 20(12): 1541-65.
- 12 Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: A double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 2013; 73(1): 3-7.
- 13 Harhaji-Trajkovic L, Vilimanovich U, Kravic-Stevovic T, (下转第59页)