

## 雷帕霉素诱导人黑素瘤细胞 M14 自噬及 Bcl-2、Bax 表达的变化

沈景刚,周梅华,李 雪,吴 迪,鲁 严\*

(南京医科大学第一附属医院皮肤科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:对雷帕霉素诱导黑素瘤细胞发生自噬的过程进行观察,并初步探讨其可能的机制。方法:不同浓度雷帕霉素(10、50、100 nmol/L)处理黑素瘤细胞 M14,采用 MDC 荧光染色检测自噬囊泡;免疫细胞化学法检测自噬蛋白 LC3B 的表达;透射电子显微镜观察黑素瘤细胞超微结构的变化;Western blot 检测细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达;采用罗丹明 123 染色(Rhodamine 123)流式细胞术检测线粒体膜电位的变化;MTT 比色法检测雷帕霉素对 M14 细胞增殖的抑制作用。结果:经不同浓度的雷帕霉素处理后,MDC 阳性细胞数增多,M14 细胞发生自噬;自噬蛋白 LC3B 的表达增强;自噬水平随雷帕霉素浓度的升高而逐渐增强。透射电子显微镜观察可见 M14 细胞质内有大量独立双层膜结构、线粒体肿胀并出现自噬体、自噬溶酶体。Western blot 结果显示雷帕霉素可以下调 M14 细胞中的凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,同时上调凋亡诱导蛋白 Bax 的表达。雷帕霉素可引起 M14 细胞的线粒体膜电位下降,与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )。10~100 nmol/L 的雷帕霉素明显抑制黑素瘤细胞 M14 的增殖,该作用呈剂量依赖性,随着药物浓度的升高,抑制率增加,与空白对照组比较均有显著性差异( $P < 0.01$ )。结论:10~100 nmol/L 的雷帕霉素可诱导黑素瘤细胞发生自噬,抑制细胞的生长。其机制可能与蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达水平有关。

**[关键词]** 黑素瘤细胞;雷帕霉素;自噬;Bcl-2;Bax

**[中图分类号]** R978.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)03-343-06

## Study on autophagy induced by rapamycin in melanoma cell line M14 and changes in the expression of Bcl-2 and Bax in progress of autophagy

SHEN Jing-gang,ZHOU Mei-hua,LI Xue,WU Di,LU Yan\*

(Department of Dermatology,the First Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210029,China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the autophagy of melanoma cell induced by rapamycin and explore the possible mechanism. **Methods:** M14 cells were cultured *in vitro* in the presence of rapamycin at three concentrations (10,50,100 nmol/L) for 24 hours. MDC fluorescent staining was used to detect autophagic vesicles. Immunocytochemistry was used to detect the expression of autophagy protein LC3B. Autophagosome was observed under transmission electronic microscopy. The expression levels of apoptosis-related protein Bcl-2 and Bax were measured by Western blot. Changes of mitochondrial membrane potential were examined by Rhodamine 123 dye and flow cytometry. The effects of rapamycin on proliferation of M14 cells were assessed using the MTT assay. **Results:** After rapamycin treatment,autophagy was induced in M14 cells as detected by MDC staining. The expression of LC3B increased. The intensity of autophagy was correlated with the concentration of rapamycin. Independent double membranes,swelling mitochondrias, autophagosomes and autolysosomes were observed in rapamycin-treated M14 cells under transmission electronic microscopy. Western blot revealed an upregulated expression of Bcl-2 and downregulated expression of Bax. Rapamycin at the concentrations of 10 to 100 nmol/L could markedly reduce the mitochondrial membrane potential compared with the control group ( $P < 0.05$ ),and inhibit the proliferation of M14 cells in a dose-dependent manner. The growth inhibition was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Rapamycin at the concentrations of 10 to 100 nmol/L could induce autophagy in melanoma cells,and inhibit the growth of melanoma cells. The mechanism may be associated with the expression level of protein Bcl-2 and Bax.

**[Key words]** melanoma;rapamycin;autophagy;Bcl-2;Bax

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 343-348]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81171517);江苏省社会发展计划项目(BS2007072)

\*通讯作者,E-mail:luyan1971@yahoo.com.cn

雷帕霉素是一种大环内酯类抗生素,它具有抑制免疫细胞增殖的功能和自噬激活作用。自噬是目

前肿瘤研究的热点问题之一,其特征为细胞质中出现大量的自噬体和自噬溶酶体。有研究表明凋亡相关基因 Bcl-2 可能参与自噬的机制。本实验通过研究不同浓度的雷帕霉素对黑素瘤细胞 M14 自噬水平、凋亡蛋白 Bcl-2 的表达及细胞增殖能力的影响,探讨 Bcl-2 与自噬的关系,同时为雷帕霉素治疗黑素瘤提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株与细胞培养

人黑素瘤细胞株 M14 来自美国 ATCC 细胞库。M14 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中,在含有 10% 的胎牛血清(FBS)的 DMEM 高糖培养基中培养,取处于对数生长期的细胞作为实验对象。

#### 1.1.2 试剂和仪器

DMEM 培养基、FBS、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;雷帕霉素、单丹磺酰戊二胺(MDC)、LC3B 抗体、Cy3 标记羊抗兔二抗、四甲基偶氮唑盐(MTT)、罗丹明 123(Rhodamine 123, Rh123)购自美国 Sigma 公司;鼠抗人 Bcl-2 和 Bax 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。FACScan 型流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司,透射电镜购自日本 JEOL 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 MDC 荧光染色法

取对数生长期的 M14 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/ml 接种于共聚焦细胞培养皿,过夜贴壁后,加入不同浓度的雷帕霉素(10、50、100 nmol/L),并设阴性对照组,每组设 4 个复孔,继续培养 24 h 后除去含血清培养基,PBS 洗 2 次,加入 0.05 mmol/L MDC 于 37℃ 避光孵育约 1 h,PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 2 次,置于倒置荧光显微镜下观察和摄片。

#### 1.2.2 免疫细胞化学法

细胞接种和分组方法同 1.2.1,培养 24 h 后弃去原培养基,PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 2 次;0.5% Triton X-100 破膜 10 min,PBS 洗 2 次;5% BSA 封闭 30 min,加入 LC3B 抗体(1:400 稀释),4℃ 过夜,PBS 洗 2 次,加 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 抗体(1:500 稀释),37℃ 避光孵育 1 h。PBS 再次洗涤后,加入 10 μg/ml DAPI 室温下染核 5 min,PBS 洗 2 次,置于倒置荧光显微镜下观察和摄片。

1.2.3 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达情况

取对数生长期的 M14 细胞,调整细胞密度后接种于培养瓶,待细胞贴壁后分别加入不同浓度的雷帕霉素(10、50、100 nmol/L),并设阴性对照组,每组设 4 个培养瓶,24 h 后提取各组细胞的总蛋白,考马斯亮蓝法测定待测样品浓度,将样品调成相同浓度,计算上样量,经蛋白变性、电泳、转膜、封闭、抗体孵育及曝光,图像分析系统测定各条带积分光密度值。实验以 β-actin 为内参照。

#### 1.2.4 透射电镜下观察自噬

取对数生长期 M14 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/ml 接种于 6 孔板,待细胞贴壁后加入浓度为 100 nmol/L 的雷帕霉素,设阴性对照,24 h 后将细胞收集于离心管中,用 2.5% 的戊二醛及 1% 锇酸双重固定,乙醇、丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,切片,醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色后,透射电镜观察,拍照,记录。

#### 1.2.5 流式细胞术检测线粒体膜电位

细胞接种和分组方法同 1.2.3,收集 M14 细胞并调整密度为  $1 \times 10^6$  个/ml,用 PBS 洗涤 2 次,将细胞悬浮于 10 mg/L Rh123 染液中,37℃ 避光水浴 30 min,PBS 洗涤 2 次,流式细胞仪测定 Rh123 的荧光强度。

#### 1.2.6 MTT 检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的 M14 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/ml 接种于 96 孔培养板,过夜贴壁后加入不同浓度的雷帕霉素(10、50、100 nmol/L),并设阴性对照组,每组设 4 个复孔,5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37℃ 条件下继续培养 24 h。于结束前 4 h,加入 MTT 液(5 g/L)20 μl;4 h 后弃上清液,加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl,振荡 10 min 左右;置酶标仪于 490 nm 波长测吸光度值(D)。计算细胞生长抑制率=[对照组 D(490 nm)-实验组 D(490 nm)]/对照组 D(490 nm) × 100%。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计学软件,计量资料的组间差异测定采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验(Newman-Keuls 法), $P < 0.05$  为有统计学意义。

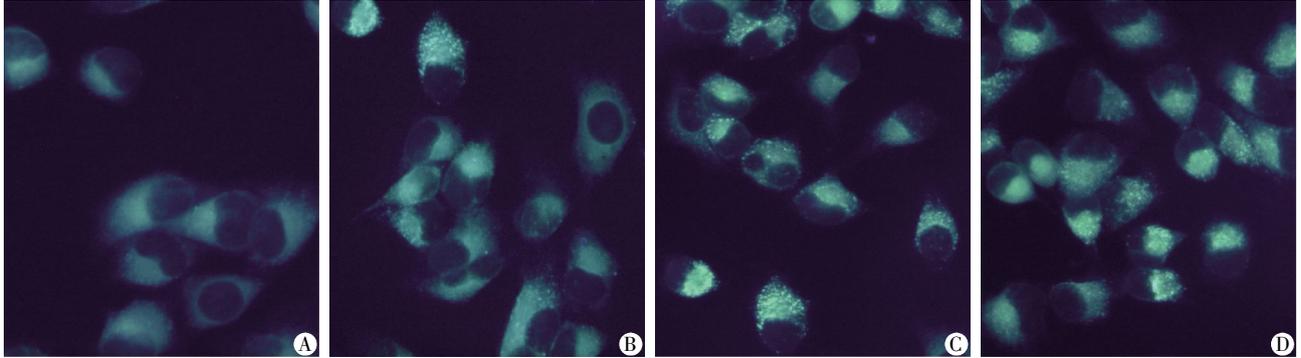
## 2 结果

### 2.1 雷帕霉素对 M14 细胞自噬水平的影响

对照组 MDC 荧光染色后可以见到绿色荧光,但荧光强度较低(图 1A);不同浓度雷帕霉素(10、50、100 nmol/L)给药 24 h 后,可见明显的点状荧光颗粒散布于 M14 细胞的胞浆内,随着雷帕霉素浓度

升高,荧光颗粒的强度和数量增加(图 1B~D),明显高于对照组,说明雷帕霉素可以诱导 M14 细胞产生自噬囊泡。

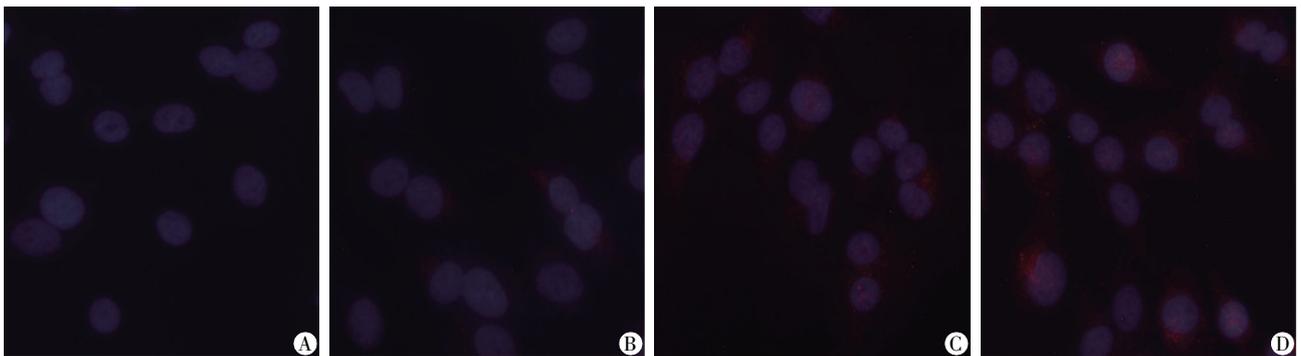
## 2.2 雷帕霉素对 M14 细胞 LC3B 表达的影响



雷帕霉素作用 M14 细胞 24 h 后,随着药物浓度的增加 MDC 染色自噬泡荧光强度和数量有所增加。A:对照组;B~D:雷帕霉素 10、50、100 nmol/L 处理组。

图 1 MDC 荧光染色观察 M14 细胞内自噬泡( $\times 200$ )

Figure 1 MDC fluorescent staining was used to detect autophagic vesicles of M14 cells( $\times 200$ )



雷帕霉素作用 M14 后,LC3B 红色荧光染色随着浓度的上升强度逐渐增加。A:对照组;B~D:10、50 和 100 nmol/L 浓度雷帕霉素处理组。

图 2 免疫荧光染色观察 LC3B 蛋白表达( $\times 200$ )

Figure 2 Immunocytochemistry was used to detect the expression of autophagy protein LC3B( $\times 200$ )

## 2.3 雷帕霉素对 M14 细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

雷帕霉素作用 24 h 后,M14 细胞内 Bcl-2 蛋白表达含量随药物浓度升高而降低,Bax 蛋白表达含量随药物浓度升高而增加。表明雷帕霉素可以下调 M14 细胞中的凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达,同时上调凋亡诱导蛋白 Bax 的表达(图 3)。

## 2.4 透射电镜观察 M14 细胞超微结构的改变

阴性对照组 M14 胞浆内各细胞器、细胞核形态和分布均正常,多数细胞器不发达,线粒体、内质网形态正常,且较发达(图 4A)。雷帕霉素给药 24 h 后,M14 胞浆内出现大量独立双层膜结构,线粒体发生肿胀,个别细胞空泡化,基质变浅,峭变少。同时可观察到自噬体和自噬溶酶体的出现(图 4B~D)。

## 2.5 流式细胞术检测 M14 细胞的线粒体膜电位

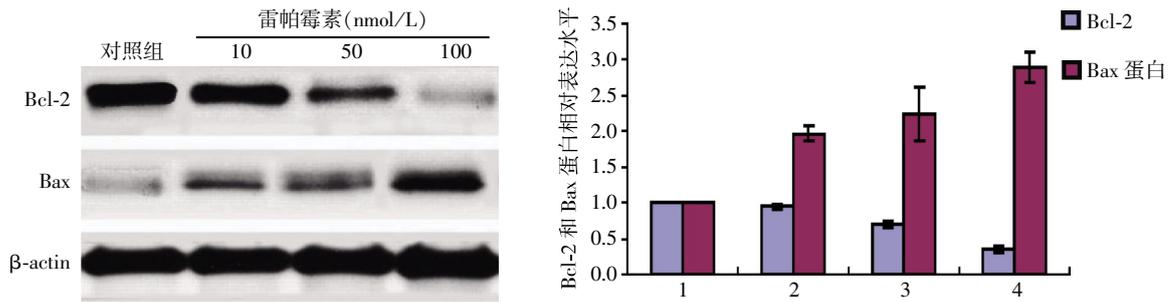
罗丹明 123 染色后在 530 nm 处检测其荧光强

对照组 M14 细胞的 LC3B 免疫荧光为阴性(图 2A),雷帕霉素组细胞的 LC3B 免疫荧光信号显示强阳性,且随着药物浓度升高,LC3B 阳性表达范围增大(图 2B~D)。

度,对照组荧光强度最高( $24.26 \pm 2.29$ );随着雷帕霉素浓度的上升,荧光强度值呈下降的趋势,其中 10 nmol/L 雷帕霉素组为( $18.24 \pm 1.69$ );50 nmol/L 雷帕霉素组为( $13.11 \pm 1.41$ );100 nmol/L 雷帕霉素组为( $8.79 \pm 1.36$ )。雷帕霉素不同浓度组与对照组比较,差异显著( $P < 0.05$ )。说明雷帕霉素可引起的 M14 细胞线粒体膜电位下降(图 5)。

## 2.6 雷帕霉素对 M14 细胞增殖的影响

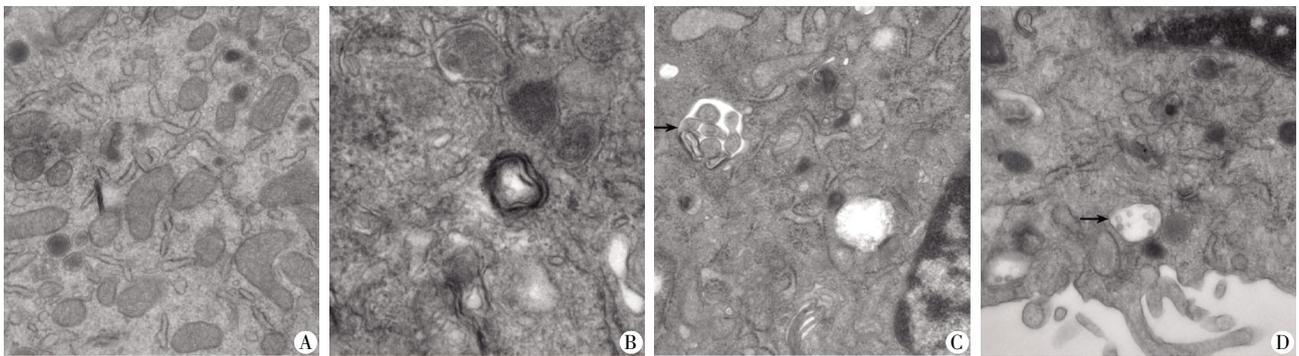
10、50、100 nmol/L 雷帕霉素对 M14 细胞的增殖均具有抑制作用,且随着药物浓度的升高,抑制率增加。作用 24 h 后,10 nmol/L 雷帕霉素对 M14 细胞的抑制率为( $8.42 \pm 2.88$ )%,50 nmol/L 雷帕霉素对 M14 细胞的抑制率为( $16.58 \pm 4.43$ )%,100 nmol/L 雷帕霉素对 M14 细胞的抑制率为( $24.15 \pm 3.69$ )%,与对照组比较差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );表明雷帕霉素可抑制 M14 细胞的增殖活力(表 1)。



1:对照组;2,3,4:分别为 10、50、100 nmol/L 雷帕霉素处理组。

图 3 雷帕霉素对人黑素瘤 M14 细胞中凋亡相关 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

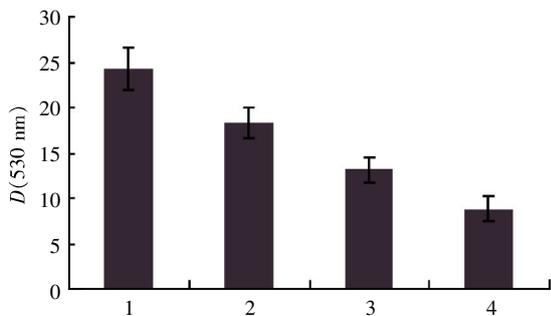
Figure 3 The expression levels of apoptosis-related protein Bcl-2 and Bax were observed in rapamycin-treated M14 cells under Western blot



A:对照组的 M14 细胞胞浆内含有大量线粒体和内质网结构,形态和分布均正常;B~D:100 nmol/L 雷帕霉素作用 24 h 后,M14 细胞胞浆内线粒体肿胀空泡化,出现双层膜结构,可见自噬体和自噬溶酶体。

图 4 雷帕霉素作用 M14 细胞后电镜下超微结构变化( $\times 40\ 000$ )

Figure 4 The ultrastructural changes of rapamycin-treated M14 cells were observed under transmission electronic microscopy ( $\times 40\ 000$ )



1:对照组;2,3,4:分别为 10、50、100 nmol/L 雷帕霉素处理组。

图 5 雷帕霉素对 M14 线粒体膜电位的影响

Figure 5 The changes of mitochondrial membrane potential were observed in rapamycin-treated M14 cells under Rhodamine 123 dye and flow cytometry

表 1 不同浓度雷帕霉素对 M14 细胞细胞增殖的影响  
Table 1 The effects of rapamycin on proliferation of M14 cells (n = 4,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞增殖抑制率(%)
对照组	0
雷帕霉素处理组	
10 nmol/L	8.42 $\pm$ 2.88*
50 nmol/L	16.58 $\pm$ 4.43**
100 nmol/L	24.15 $\pm$ 3.69**

与对照组比较,\* $P < 0.01$ 。与 10 nmol/L 雷帕霉素处理组比较,\*\* $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

自噬是一种细胞自我降解的过程,以清除受损或多余的蛋白质和细胞器。当细胞代谢能量不足时,细胞依靠自噬作用实现细胞内成分的循环利用。目前的相关研究已经基本明确 Beclin-1(ATG6)可能是自噬的“守门人”,其表达强度与自噬活性密切相关<sup>[1-2]</sup>。观察自噬现象可以通过 MDC 染色、吖

啶橙染色、透射电镜以及 LC3B 蛋白染色(自噬特异性蛋白)等多种手段<sup>[3]</sup>。本实验利用不同浓度的雷帕霉素作用于 M14 细胞,通过 MDC 染色、LC3B 蛋白染色以及透射电镜观察自噬现象。自噬体形成时可见 MDC 荧光在胞浆内从弥散分布变成点状分布,对照组 MDC 荧光染色后可以见到绿色荧光,但荧光强度较低,10 nmol/L 雷帕霉素给药 24 h 后,即可见明显的点状荧光颗粒散布于 M14 细胞的胞浆内,而且强度高于对照组,随着药物浓度上升,荧光颗粒的强度和数量均增加,表明雷帕霉素可促进黑素

瘤细胞自噬的发生。微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain3, LC3) 是目前确认的唯一可信的自噬体标志物。本研究发现雷帕霉素浓度为 10 nmol/L 时, LC3B 蛋白荧光染色较对照组稍增强, 当雷帕霉素浓度升至 50 和 100 nmol/L, 荧光染色明显增强, 表明雷帕霉素诱导自噬在一定范围内与浓度呈正相关。透射电镜可观察到细胞内包括自噬小体、线粒体、高尔基体在内各细胞超微结构的变化。实验中阴性对照组 M14 细胞胞浆内各细胞器形态和分布均正常, 线粒体、高尔基体较发达。100 nmol/L 的雷帕霉素给药 24 h 后, 黑素瘤细胞胞质内出现较多的独立双层膜, 线粒体发生肿胀和空泡化, 肿胀变圆, 基质变浅, 嵴变少, 提示线粒体受到损伤。

线粒体是生物细胞能量代谢的中心, 并在细胞的自噬和凋亡过程中起着重要作用<sup>[4]</sup>。细胞常通过线粒体自噬来进行更新, 而在这个过程中起重要作用的可能是线粒体膜通透性的改变<sup>[5]</sup>。外界刺激较弱时, 有限的线粒体膜通透性改变只能破坏小部分线粒体, 从而激活线粒体自噬。随着外界刺激的增强, 当线粒体自噬不足以清除损伤的线粒体时, 细胞选择凋亡。本研究采用 Rh123 流式细胞术检测线粒体膜电位 ( $\Delta\psi_m$ ) 的变化。Rh123 荧光强度能反映线粒体数量减少和  $\Delta\psi_m$  的降低或丧失。流式细胞仪结果显示对照组荧光强度最高, 随着雷帕霉素处理浓度的上升, 荧光强度值呈下降的趋势, 与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。说明雷帕霉素可引起 M14 细胞线粒体膜电位下降, 影响线粒体功能。结合电镜结果, 推测雷帕霉素引起 M14 细胞线粒体肿胀和空泡化等损伤, 可能影响了线粒体的调控转换机制, 导致细胞自噬与凋亡同时被异常地高启动, 细胞的增殖活力降低, 甚至导致细胞的死亡。

本研究采用 MTT 法检测不同浓度的雷帕霉素对黑素瘤细胞增殖的影响, 结果显示 10~100 nmol/L 雷帕霉素对黑素瘤细胞增殖具有显著的抑制作用, 且这一作用呈明显的剂量依赖性。给药 24 h 后, 10 nmol/L 的雷帕霉素就可以引起细胞增殖明显下降 ( $P < 0.05$ ), 随着浓度的增加, 细胞的增殖率也随之降低, 雷帕霉素在浓度 50 和 100 nmol/L 的增殖率明显低于对照组, 说明雷帕霉素在 50 nmol/L 和 100 nmol/L 已经可以引起细胞死亡。提示雷帕霉素可以促进细胞凋亡。

近来, 在分子水平的研究揭示自噬与凋亡机制存在着多种联系。有学者研究认为 Bcl-2 不但能降

低自噬水平还可以抑制自噬性细胞死亡<sup>[6]</sup>。稳定转染 Bcl-2 至内源性表达 Beclin-1 的 HT-29 结肠癌细胞, 可以抑制饥饿诱导的细胞自噬, 降低 Beclin-1 与 Vps34 的结合并能减弱 Beclin-1 相关的 PI3K 活性, 表明 Bcl-2 的过度表达抑制了能促进自噬的 Beclin-1-Vps34 复合体的形成<sup>[7]</sup>。这些结果揭示 Bcl-2 可能是自噬的负调节物, 这和癌细胞大多存在 Bcl-2 高表达相符合。Bcl-2 与 Bax 是 Bcl-2 家族中功能相反的两个重要成员, 二者的比例决定着细胞的存亡。Bcl-2 通过抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>参与肿瘤的发生, 而 Bax 是促凋亡基因。研究表明, Bcl-2 与 Bax 的表达之间呈负相关<sup>[9]</sup>, Bcl-2 过量表达, 细胞存活; 反之, 细胞死亡。本研究应用 Western blot 技术检测不同浓度的雷帕霉素作用 24 h 后 M14 细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的情况, 结果表明雷帕霉素可以下调 M14 细胞中凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达, 同时上调凋亡诱导蛋白 Bax 的表达。其机制可能是通过调节线粒体通透性转变通道 (mitochondrial permeability transition pores, MPTP) 的开放。有研究者认为, MPTP 的形成是由 Bcl-2 家族蛋白与线粒体外的蛋白相互作用产生的, Bax 能够促进线粒体 MPTP 开放<sup>[10]</sup>; 也有研究认为 Bcl-2 蛋白可以抑制  $Ca^{2+}$  从内质网中的释放, 而 Bax 可促使  $Ca^{2+}$  从内质网中被释放<sup>[11]</sup>, 雷帕霉素下调 Bcl-2、上调 Bax 就能引起线粒体中  $Ca^{2+}$  的超负荷并导致线粒体 MPTP 的开放及线粒体的肿胀, 进而线粒体外膜破裂, 导致细胞凋亡。

最近的研究表明, 尽管自噬和凋亡有着显著差别, 但它们的调控是紧密联系的, 且相同的调节器有时可以同时控制细胞自噬和凋亡。如 Beclin-1 在自噬与细胞凋亡中起到了交叉作用。Wirawan 等<sup>[12]</sup>利用细胞模型系统 (ba/f3 细胞), 发现蛋白酶介导的裂解不仅废除了 Beclin-1 和 PI3KC3 的自噬功能, 还产生一个可以增强细胞凋亡途径的 Beclin-1C 片段, 说明在持续应激刺激下, Beclin-1 可以创建一个放大环逐渐增强细胞凋亡而抑制细胞自噬。

目前黑素瘤在世界范围内发病率逐年升高。转移性黑素瘤对放、化疗不敏感, 进展快, 预后差, 寻找新的有效的、不良反应较小的免疫抑制剂一直是生物治疗的研究热点。雷帕霉素具有较强的抗真菌和抗肿瘤活性, 同时还具有较强的免疫抑制作用<sup>[13]</sup>。另外, 雷帕霉素作为一种自噬诱导剂, 可以通过抑制 mTOR 而激活细胞自噬<sup>[14]</sup>。细胞自噬的发生受 PI3K/TOR 的调控, 其启动阶段的关键分子是丝氨酸/苏氨酸激酶, 即雷帕霉素作用的靶位点, 为负调

节信号。在哺乳动物细胞中,核糖体蛋白质 S6 (p70S6)可强烈抑制自噬,而它的活性受 mTOR 激酶的调节。雷帕霉素通过抑制 mTOR 的活性,从而抑制 p70S6 的活性而诱导自噬发生<sup>[15]</sup>。但肿瘤的自噬存在相矛盾的两方面:一方面,高水平的自噬可以通过细胞的自我拆用促使其死亡;而另一方面,自噬可以为肿瘤的生长和细胞的存活提供一个替代能源。因此,自噬表达的强度和持续时间,直接关系到其作用是促进或是抑制肿瘤生长<sup>[16-17]</sup>。换言之,需要研究出一个合适的雷帕霉素用药浓度,从而为黑素瘤的治疗提供一个有效的新途径。

[参考文献]

[1] Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein [J]. Cell Res, 2007, 17(10): 839-849

[2] Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein [J]. Oncogene, 2008, 27 (Suppl 1): S137-148

[3] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agestini SP, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. Autophagy, 2008, 4 (2): 151-175

[4] Xue L. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis [J]. Curr Biol, 2001, 11(5): 361-365

[5] Dunn WA Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole [J]. J Cell Biol, 1990, 110(6): 1923-1933

[6] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy [J]. Cell, 2005, 122(6): 927-939

[7] Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? [J]. Cancer Res, 2006, 66 (6): 2885-2888

[8] Rodriguez D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Integrating stress

signals at the endoplasmic reticulum: The BCL-2 protein family rheostat [J]. Biochimica Biophysica Acta Molecular Cell Res, 2011, 1813(4): 564-574

[9] Yi XH, Wu QS, Li HH, et al. The expressions of Bcl-2 and Bax in gastric carcinoma and precancerous lesions [J]. Chin-Ger J Clin Oncol, 2008, 7(1): 14-16

[10] Duan X, Ji B, Yu K, et al. Acidic buffer or plus cyclosporine A post-conditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury [J]. Perfusion, 2011, 26(3): 245-252

[11] Lao Y, Chang DC. Study of the functional role of Bcl-2 family proteins in regulating Ca(2+) signals in apoptotic cells [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(5): 1038-1039

[12] Wirawan E, Walle LV, Kersse K, et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria [J]. Cell Death and Dis, 2010, 1(1): e18

[13] El-Ani D, Stav H, Guetta V, et al. A rapamycin (sirolimus) protects against hypoxic damage in primary heart cultures via Na (+)/Ca (2+) exchanger activation [J]. Life Sci, 2011, 89(1-2): 7-14

[14] Fabri M, Realegeno SE, Jo EK, et al. Role of autophagy in the host response to microbial infection and potential for therapy [J]. Curr Opin Immunol, 2011, 23(1): 65-70

[15] Qureshi HY, Ahmad R, Sylvester J, et al. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway for regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-β in human chondrocytes [J]. Cell Signal, 2007, 19(8): 1643-1651

[16] Karantza-Wadsworth V. AACR Annual Meeting 2008: autophagy in the forefront of cancer research [J]. Autophagy, 2008, 4(5): 731-733

[17] Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy [J]. Apoptosis, 2009, 14(4): 376-391

[收稿日期] 2011-11-23