

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.001

· 基础研究 ·

低浓度 CO 暴露促进大鼠肝前体细胞增殖的体外研究 *

何大立 张 玄 慕喜喜 蒲 猛 黄启科 赵 戈 陶开山[△]

(第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察低浓度一氧化碳暴露对营养相对匮乏情况下大鼠肝前体细胞系生长的影响并探索其作用机制。**方法:**分别在营养充足(10%胎牛血清,10%FBS)和营养相对匮乏(4%胎牛血清,4%FBS)条件下对大鼠肝脏前体细胞系 WB-F344 进行体外培养,观察细胞的生长情况;同时,在不同两组 4%FBS 培养基中分别加入无活性的一氧化碳释放分子 iCORM-2 和有活性的一氧化碳释放分子 CORM-2,两者的浓度均为 100 μ M,观察比较低浓度一氧化碳暴露是否有利于 WB-F344 的生长和增殖;利用吖啶橙染色观察不同组别培养细胞酸性自噬小体的形成情况,并进行 Western-Blot,检测自噬相关蛋白 LC3-I 和 LC3-II 的转化情况,探讨其可能的作用分子机制。**结果:**在含有 10%FBS 的培养基中, WB-F344 细胞生长良好,呈指数生长,并在第 5 天达到生长高峰;与其相比,4%FBS 培养基对 WB-F344 的生长有明显抑制,细胞生长相对缓慢,并且相同时间点的细胞增殖数量明显不足。在进行浓度为 100 μ M 的一氧化碳分子暴露后, WB-F344 细胞生长情况有明显改善,细胞增殖的峰值有显著增加。吖啶橙染色显示,4%FBS 培养基条件下培养的 WB-F344 细胞,细胞内出现橘红色荧光,在暴露于低浓度的一氧化碳分子后,橘红色荧光的强度有明显增加。进一步的 Western-Blot 检测发现,营养相对匮乏的培养基(4%FBS)能使 WB-F344 细胞在生长过程产生 LC3-I 向 LC3-II 的转化,在暴露于低浓度的一氧化碳分子后,LC3-II 的量进一步增加,LC3-II/LC3-I 的比值显著增大($P<0.05$);进一步的研究显示在此过程中伴随着 p-AKT 和 mTOR 蛋白的表达降低,同时,HO-1 蛋白的表达增加。**结论:**低浓度一氧化碳暴露能促进 WB-F344 细胞产生自噬,有利于大鼠肝前体细胞系的生长和增殖,同时这和 AKT/mTOR 信号途径的抑制及 HO-1 的表达增加有关。

关键词:一氧化碳;肝前体细胞;自噬

中图分类号:R-33;Q593.1;Q813.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)09-1601-05

Low-concentration CO Exposure Promote the Proliferation of Rat Hepatic Progenitor Cell in Vitro*

HE Da-li, ZHANG Xuan, MU Xi-xi, PU Meng, HUANG Qi-ke, ZHAO Ge, TAO Kai-shan[△]

(Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role and molecular mechanism of hepatic progenitor cell (HPC) exposed to low-concentration exogenous CO molecular against relative nutrition deficiency. **Methods:** HPCs (WB-F344) were cultured in vitro in 10%FBS and 4% FBS medium respectively. Meanwhile, inactive CORM-2 (iCORM-2) and CORM-2 were administered respectively to different groups of WB-F344 cultured in 4%FBS medium. 100 μ M was chosen as the same CO exposure concentration both in iCORM-2 and CORM-2 groups. Cell viability and proliferation were observed in all groups. Acridine orange (AO) staining was used to detect the formation of Acidic autophagosomes in WB-F344 cells. The transformation between LC3-I and LC3-II was detected with western-blot. **Results:** WB-F344 cells exhibited an exponential growth in 10%FBS medium and achieved growth peak in the fifth day. On the contrary, WB-F344 cells showed an inhibitory viability and very slow growth rate in 4% FBS medium. The proliferative cell number decreased at the same time point compared to the control group. While exposed to 100 μ M CORM-2, WB-F344 cells' viability and growth situation improved significantly and had an increased growth peak. AO staining displayed obvious orange fluorescent in WB-F344 cells cultured in 4%FBS medium and the intensity of orange fluorescent enhanced after CO molecular exposure. Western-blot assay demonstrated that relative nutrition deficiency (4%FBS) promoted LC3-I to transform into LC3-II in the growth of WB-F344 cells. CO molecular exposure increased the production of LC3-II and the ratio between LC3-II and LC3-I ($P<0.05$). Further western-blot detection revealed that the expression of p-AKT and mTOR declined simultaneously in the CO exposure process in concurrence with the increased expression of HO-1. **Conclusion:** Low-concentration CO exposure could benefit the autophagy formation in WB-F344 cell against severe environment and promote its viability and proliferation. The molecular mechanism referred to AKT/mTOR signal pathway inhibition and HO-1 increase.

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81670593;81272648)

作者简介:何大立(1988-),硕士研究生,主要从事肝脏损伤与再生的相关研究,电话:86-29-84771094,E-mail:Adios365@163.com

[△] 通讯作者:陶开山,博士生导师,教授,主任医师,主要从事肝脏损伤与再生、肝移植等方面研究,E-mail:taokaishan0686@163.com

(收稿日期:2016-09-26 接受日期:2016-10-21)

Key words: CO; Hepatic progenitor cell; Autophagy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q593.1; Q813.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)09-1601-05

前言

自噬是一种生命现象,细胞在许多条件下可诱发自噬,形成自噬小体,随之与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的受损或衰老的细胞器和长寿蛋白质来维持细胞本身的代谢需要及某些细胞器的更新,利于细胞的循环稳定性^[1]。但是,细胞无序和过度的自噬最终会导致自身的胞膜和胞核被降解,导致细胞死亡^[2]。因此,自噬亦被称为 II 型程序性细胞死亡。在一些疾病模型中,一氧化碳分子(CO)具有抗炎和细胞保护作用^[3],并且能够促进细胞产生自噬,低浓度的 CO 可作为一种新型治疗干预手段^[4]。在肝损伤过程中,具有多向分化潜能的肝前体细胞系(hepatic progenitor cells, HPCs)能够对肝脏起到修复作用。因此本实验拟通过使大鼠肝前体细胞系 WB-F344 暴露于低浓度的 CO 分子,来检测 CO 对 WB-F344 诱发自噬的作用,及对细胞生长和增殖的影响,并探索其作用的分子机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

大鼠肝前体细胞 WB-F344 来源于中国科学院细胞库(中国上海)。一氧化碳释放分子 CORM-2(三羰基二氯代钨二聚物)购自美国 Sigma 公司(货号:288144),溶于微量 DMSO 溶液,然后用培养基稀释至浓度为 100 μ M,细胞培养时 DMSO 的浓度小于 0.5%。无活性的一氧化碳释放分子 iCORM-2 由 CORM-2 溶液配制,37℃过夜使用,浓度同 CORM-2。3-MA 购自美国 Sigma 公司(货号:M9281),使用的终浓度为 2 mM,参考 Ruan 等的使用剂量^[5]。DME/F-12 (1:1, 1 $\times$)培养基购自美国 Hyclone 公司。胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司。吖啶橙染色试剂购于美国 Sigma 公司。Western-Blot 所用的第一抗体 anti-LC3B(货号:ab192890)、anti-mTOR(货号:ab137133)、anti-HO-1(货号:ab137749)、anti- β -actin(货号:ab8226)购自英国 Abcam 公司,anti-AKTser473(货号:4691p)、anti-p-AKTser473(货号:4060p)购自美国 CST 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养实验分组 取对数生长期的 WB-F344 细胞,胰酶消化后,用 10%FBS 培养基制成细胞悬液,然后将细胞种植到 96 孔板,每孔加入 100 μ L 的细胞悬液,细胞数为 3000 个/孔,放入 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后分组干预。实验分为五组:1、10%FBS 组(不含 CORM-2);2、4%FBS 组(不含 CORM-2);3、4%FBS+iCORM-2 组;4、4%FBS+CORM-2 组;5、4%FBS+3-MA 组。每组设置 3 个复孔,重复种植 6 块 96 孔板,分别对应 6 个时间点(1、2、3、4、5、6 天)。更换每孔培养基,按分组加入不同的培养基,iCORM-2 和 CORM-2 的培养基终浓度均为 100 μ M,细胞培养过程中 3 天换一次培养基,各组干预措施不变,培养时间小于 3 天时不换液,重复实验 3 次。

1.2.2 细胞增殖检测 WB-F344 细胞增殖检测采用 CCK-8 检测试剂盒,分别于不同时间点(1、2、3、4、5、6 天)取各组培养细胞(每个时间点对应一块 96 孔培养板),向每孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液,将培养板在培养箱内孵育 2 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,各孔 OD 值为测得的 OD 值减去本底 OD 值(培养基加 CCK-8,无细胞),各重复孔的 OD 值取均值 $\pm$ SD。

1.2.3 吖啶橙染色 培养细胞进行吖啶橙(AO)染色,用荧光显微镜观察细胞内酸性囊性小体的形成。AO 是用来鉴定细胞凋亡或者自噬性死亡的荧光分子,它可以和 DNA 分子相互作用,发出绿色荧光或者在酸性囊泡中累积被质子化形成聚合物发出明亮的橘红色荧光。在 24 孔板培养孔中预先加入消毒处理过的细胞爬玻片,将对照组和实验组细胞在 24 孔板中培养 24 h,其中实验组培养基中加入了 CORM-2,能够缓慢释放 CO 分子。在观察终点去除各孔中的培养基,用 PBS 洗 3 遍,然后向各孔中加入 AO 染色液,染色液的 AO 终浓度为 20 μ g/mL,室温孵育 15 min。弃去染色液后用 PBS 洗 4 遍,用倒置的荧光显微镜观察染色结果。细胞发生的自噬效应采用细胞的自噬率(Autophagic Ratio)表示,即每高倍镜视野下,发生自噬的细胞与细胞总数的比值。

1.2.4 细胞总蛋白的提取及 Western-Blot 检测 取对数生长期的 WB-F344 细胞胰酶消化后,种植于直径 6 cm 的培养皿中,待细胞贴壁后按照方法 1.2.1 中的实验分组处理细胞,37℃、5% CO₂ 培养 24 h 后,弃去培养基,用含有蛋白酶和磷酸酶的 RIPA 裂解缓冲液消化,收集蛋白后 99℃变性 10 min。蛋白定量采用 BCA 蛋白定量试剂盒,具体操作按照说明书进行。提取的细胞蛋白用 12%SDS-PAGE 分离,然后转膜到 PVDF 膜,5%的牛奶封闭后用一抗孵育,4℃过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,洗涤同上,蛋白条带的检测采用 ChemiDocTM XRS+ 仪器和 Image Lab TM 软件。

1.3 统计学方法

实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS12.0 统计软件分析数据,采用单因素方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同条件培养基及低浓度 CO 对 WB-F344 细胞生长的影响

在含有 10%FBS 的完全培养基中,WB-F344 细胞生长良好,呈指数生长,并在第 5 天达到生长高峰,后生长放缓;与其相比,当培养基中血清的浓度降低时,即 4%FBS 培养基,WB-F344 细胞的生长有明显限制,细胞生长相对缓慢,相同时间点的细胞增殖数量明显不足。在进行浓度为 100 μ M 的一氧化碳分子暴露后,WB-F344 细胞生长情况有明显改善,细胞增殖的峰值有显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是仍然低于 10%FBS 培养基组。当细胞培养过程中加入 3-MA(终浓度为 2 mM)自噬抑制剂后,细胞生长情况明显受限,如图 1。

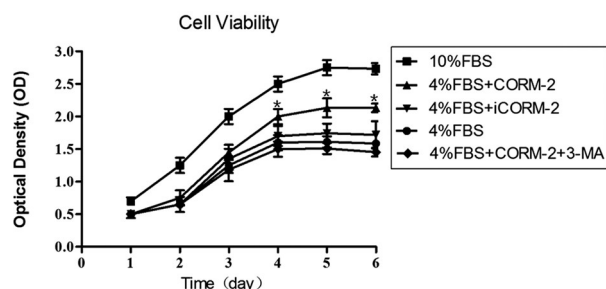


图1 不同条件培养基及低浓度 CO 分子对 WB-F344 细胞生长的影响 (* $P < 0.05$, 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS, 10%FBS, 4%FBS+CORM-2+3-MA)

Fig.1 The growth status of WB-F344 cells in low-concentration CO within different mediums (* $P < 0.05$, 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS, 10%FBS, 4%FBS+CORM-2+3-MA)

2.2 不同培养条件下 WB-F344 细胞胞质中酸性自噬小体的形成

营养充足的培养基(含 10%FBS)中 WB-F344 细胞生长良好,吖啶橙染色未观察到明显的橘红色荧光,提示没有明显的酸性自噬小体形成。当血清浓度降低时,4%FBS 培养基中的

WB-F344 细胞胞质中开始出现橘红色荧光,自噬囊泡开始出现。进一步加入 iCORM-2 后细胞的变化仍不明显,但是当加入 CORM-2 后,橘红色荧光明显增加,强度显著增强,提示 WB-F344 细胞自噬现象活跃,有大量的酸性自噬小体形成,如图 2。

2.3 不同培养条件下 WB-F344 细胞自噬相关蛋白 LC3-I 向 LC3-II 的转化

在进行不同条件下培养 WB-F344 细胞的同时,分别于不同时间点(24 小时和 48 小时)提取各组细胞的胞膜和胞浆蛋白,Western-Blot 检测各组培养细胞中自噬相关蛋白 LC3 的变化。由图 3 中我们可以看出,两组时间点均出现血清浓度的降低导致 LC3-I 的含量降低,而 LC3-II 的含量明显增加,LC3-I/LC3-I 的比值逐渐增大,当细胞进一步暴露于低浓度 CO 分子后,LC3-II/LC3-I 的比值达到最大,提示营养不足可以导致自噬的发生,同时,低浓度 CO 分子具有增强 WB-F344 细胞自噬的功能,促进 LC3-I 向 LC3-II 的转化。当使用 3-MA 抑制细胞的自噬现象后,LC3-II 的转化明显降低,蛋白表达量下降,如图 3。

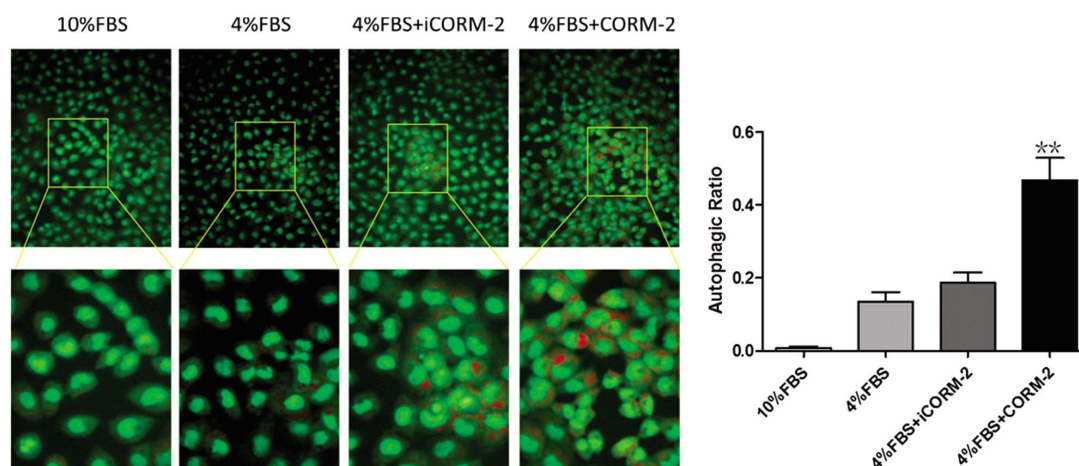


图2 不同培养条件下 WB-F344 细胞胞质中酸性自噬小体的形成情况(上图:× 200;下图:× 400) (** $P < 0.01$, 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS, 10%FBS)

Fig.2 The formation of acidic autophagosome in WB-F344 cell cytoplasm in different mediums (up:× 200; down:× 400) (** $P < 0.01$, 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS, 10%FBS)

2.4 不同培养条件下 WB-F344 细胞自噬过程中相关信号通路的活化情况

进一步的 Western-Blot 检测发现(细胞蛋白的提取时间点为 24 h),低浓度的 CO 分子暴露是 p-AKT 的表达量显著减少,具有明显的抑制 AKT 蛋白激酶磷酸化的作用;同时,我们还发现在此过程中,磷酸酰肌醇激酶相关激酶 mTOR(哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)的表达量有降低,提示低浓度 CO 暴露对其有抑制作用。在 CO 分子引起 WB-F344 细胞自噬增强的分子中,我们可以检测到 HO-1 的明显增加,提示 CO 和 HO-1 可以相互影响,共同促进自噬的发生,如图 4。

3 讨论

肝脏前体细胞(hepatic progenitor cells, HPCs)或称肝内干细胞(啮齿类动物称卵圆细胞)是肝脏损伤时一类重要细胞。研究显示 HPCs 由异质的细胞亚群组成,可向着肝细胞、胆管细

胞、肠上皮细胞、胰腺细胞分化^[5]。当肝脏受到严重损伤、正常的再生途径受到干扰时,HPCs 被激活并大量增殖从门脉周围延伸到肝实质,分化为肝细胞和胆管细胞从而修复肝损伤。在此过程中,复杂的体内微环境中多种因素均能对 HPCs 的增殖和分化造成影响,最终导致不同的肝修复结局。

一氧化碳(CO)是一种十分重要的细胞信使分子,具有传递细胞间信息、调节细胞功能等作用,并在体内的多个系统发挥及其重要的生理功能。新型的 CO 供体 CORMs(carbon monoxide releasing molecules)可不经机体代谢而直接作用于靶点组织释放 CO 发挥生理作用。CORM-2 是过渡金属化合物钌的羰基化合物二聚体分子,其化学式: $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$ 。CORM-2 能溶于 DMSO 释放出 CO,CO 的释放量取决于 CORM-2 的浓度,随着浓度的增大,CO 的释放量不断增多,每摩尔 CORM-2 大约能够释放 0.7 摩尔 CO,但当浓度增大到一定程度,CO 的释放量达到一个恒定值^[6]。

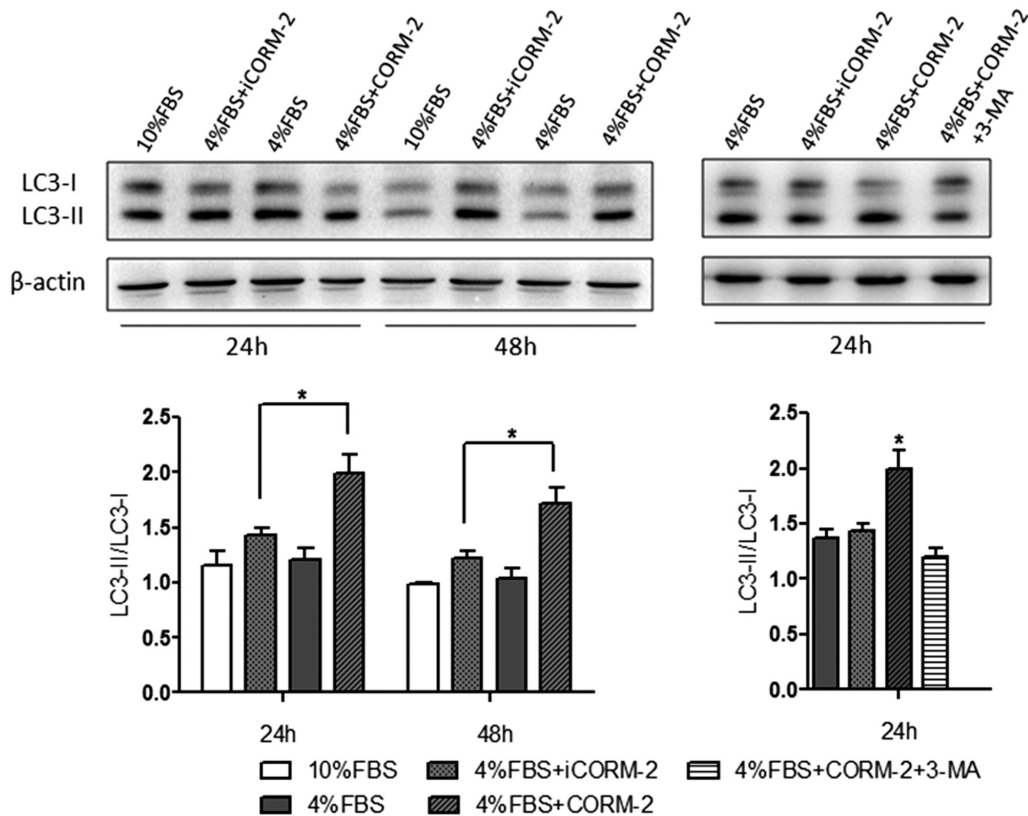


图 3 不同培养条件下 WB-F344 细胞自噬形成过程中 LC3-I 向 LC3-II 的转化 (* $P < 0.05$; 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS+CORM-2+3-MA)

Fig. 3 LC3-I transform into LC3-II in the process of autophagy in WB-F344 cells with different mediums (* $P < 0.05$; 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS+CORM-2+3-MA)

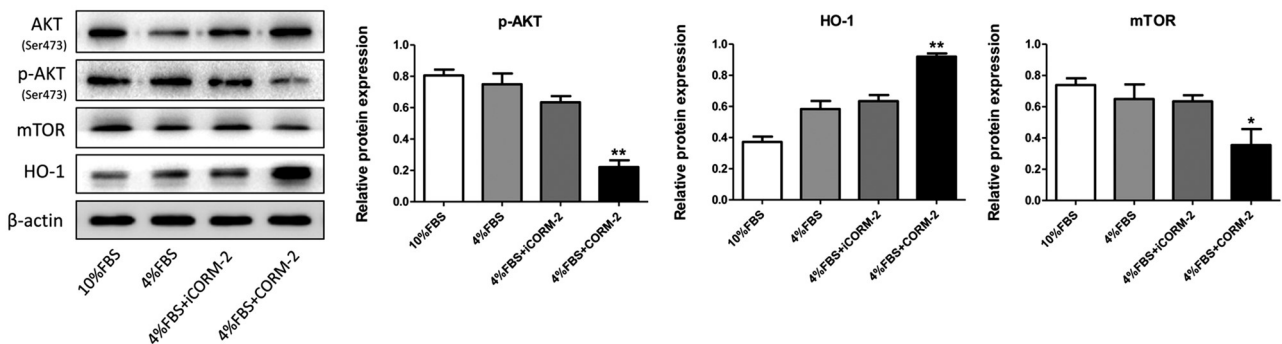


图 4 不同培养条件下 WB-F344 细胞自噬过程中相关分子蛋白的表达变化 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS, 10%FBS)

Fig. 4 The expression of proteins refer to autophagy in WB-F344 cells with different mediums (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; 4%FBS+CORM-2 vs 4%FBS+iCORM-2, 4%FBS, 10%FBS)

自噬是一种细胞消化自身受损或老化的细胞器及长寿命循环蛋白来维持自身稳态的生命现象,是物质和能量的再循环和再利用,以使细胞适应极端的环境变化,维持新陈代谢。很多因素能诱导细胞发生自噬,如饥饿、生长因子缺乏、微生物感染、细胞器损伤、蛋白质折叠错误或聚集、DNA 损伤、放疗等,这些因素均能刺激细胞维持一种很低的、基础的自噬活性。许多研究表明,在一定程度上强化细胞的自噬活性将有利于细胞的生长,自噬活性不足或功能受损将促进细胞凋亡^[7-9]。Jeong SM 等发现,抑制胰腺导管腺癌细胞的自噬活性,癌细胞的增殖受到明显抑制,同时伴随着细胞的凋亡增加^[10]。在大鼠的肝肺综合征模型中,抑制自噬可以明显改善肺微血管内皮细胞

(PMVECs)的过度增殖^[11]。同时,Yun 等证实,肝脏缺血再灌注时,细胞自噬功能受损加重了肝细胞的损伤^[12]。本实验中,4% FBS 的培养基造成了 HPC 生长过程中的营养相对不足,细胞增殖明显放缓,和对照组相比,细胞数峰值降低,而当给予了低浓度的 CO 后,细胞生长情况有明显改善。实验中 CORM-2 的给药浓度为 100 μ M,和 Ruan 等人的研究中所使用的浓度一致,100 μ M CORM-2 在血液中释放的 CO 不影响血红蛋白与氧的结合,同时能对缺氧条件下的肾小管上皮细胞起明显的保护作用^[3]。高浓度的 CO 容易引起 CO 中毒,同时,研究证明自噬活性过度会导致细胞代谢紊乱,不利于细胞的存活^[13]。研究表明,在临床前的各种组织损伤中,较低浓度生理剂量的 CO(250

ppm)能够调节细胞增殖,细胞凋亡,减少促炎因子的释放^[14]。目前细胞自噬涉及多种信号传导通路,如PI3K/Akt/mTOR^[15], ERK1/2, class I PI3K/PKB, Gαi3 protein, NF-κB 和 calcium^[16]等。CO也参与对细胞自噬的调节,如:CO能强化自噬蛋白 beclin-1 依赖的自噬在脓毒血症中发挥保护作用,自噬蛋白 beclin-1 缺陷(Becln1+/-)的脓毒血症小鼠对CO治疗无反应^[17]。CO通过上调线粒体相关活性氧的产生激活自噬,抑制高压氧相关的ROS形成,减少高压氧诱导的细胞死亡^[18]。本实验中,低浓度CO具有明显强化HPC自噬活性的作用,同时,Akt/mTOR信号通路明显受到抑制。有研究证实,激活Akt/mTOR可以抑制自噬,而Akt/mTOR途径受抑制时自噬活性明显增强^[19,20],和本研究结果一致。

体内CO的来源有多种途径,大部分CO主要是通过血红素在血红素氧合酶(heme oxygenase,HO)催化下氧化而产生。其中HO-1为诱导型,在紫外辐射、致癌物、缺血再灌注、内毒素休克及氧自由基等因素的诱导下其活性可显著增强。体外实验证实CORM-2可通过增强内源性HO的活性和HO-1的表达抑制LPS介导的RAW264.7小鼠巨噬细胞炎症反应。本实验中HPC在生长过程中暴露于CO后HO-1表达量显著升高。这可能与外源性的CO使蛋白激酶样内质网激酶(PERK)磷酸化,从而激活Nrf2,引起HO-1的表达增加有关。研究证实外源性的CO能够使HO-1的表达增加,减轻TNF-α诱导的成骨细胞MC3T3E1的凋亡^[21]。HO-1的表达增加促进了内源性CO的释放增加,进一步巩固了CO的细胞保护作用^[22]。

在肝损伤、肝再生过程中,HPC可受体内多种因素影响,需要进一步证实CORM-2在体内微环境中的作用和机制。本研究首次在体外实验中证实,外源性低剂量的CO可通过诱导HPC产生自噬效应,发挥细胞保护作用,为临床针对严重肝损伤的治疗提供了新的思路。

参考文献(References)

- [1] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation[J]. Science, 2000, 290(5497): 1717-1721
- [2] Bursch W, Ellinger A, Gerner C, et al. Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others?[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 926: 1-12
- [3] Ruan Y, Wang L, Zhao Y, et al. Carbon monoxide potently prevents ischemia-induced high-mobility group box 1 translocation and release and protects against lethal renal ischemia-reperfusion injury [J]. Kidney Int, 2014, 86(3): 525-537
- [4] Jin Y, Tanaka A, Choi AM, et al. Autophagic proteins: new facets of the oxygen paradox[J]. Autophagy, 2012, 8(3): 426-428
- [5] Anzai K, Chikada H, Tsuruya K, et al. Foetal hepatic progenitor cells assume a cholangiocytic cell phenotype during two-dimensional pre-culture[J]. Sci Rep, 2016, 6: 28283
- [6] Farouque HM, Worthley SG, Meredith IT, et al. Effect of ATP-sensitive potassium channel inhibition on resting coronary vascular responses in humans[J]. Circ Res, 2002, 90(2): 231-236
- [7] Pei J, Deng J, Ye Z, et al. Absence of autophagy promotes apoptosis by modulating the ROS-dependent RLR signaling pathway in classical swine fever virus-infected cells[J]. Autophagy, 2016: 1-21
- [8] Ling Y, Chen G, Deng Y, et al. Polydatin post-treatment alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury by promoting autophagic flux [J]. Clin Sci (Lond), 2016, 130(18): 1641-1653
- [9] Liu A, Huang L, Guo E, et al. Baicalein pretreatment reduces liver ischemia/reperfusion injury via induction of autophagy in rats [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25042
- [10] Jeong SM, Hwang S, Park K, et al. Enhanced mitochondrial glutamine anaplerosis suppresses pancreatic cancer growth through autophagy inhibition[J]. Sci Rep, 2016, 6: 30767
- [11] Xu D, Chen B, Gu J, et al. Inhibition of autophagy ameliorates pulmonary microvascular dilation and PMVECs excessive proliferation in rat experimental hepatopulmonary syndrome [J]. Sci Rep, 2016, 6: 30833
- [12] Yun N, Cho HI, Lee SM. Impaired autophagy contributes to hepatocellular damage during ischemia/reperfusion: heme oxygenase-1 as a possible regulator[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 68: 168-177
- [13] Wang XY, Li S, Wang G, et al. High glucose environment inhibits cranial neural crest survival by activating excessive autophagy in the chick embryo[J]. Sci Rep, 2015, 5: 18321
- [14] Zhou HC, Ding WG, Cui XG, et al. Carbon monoxide inhalation ameliorates conditions of lung grafts from rat brain death donors[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(15): 1411-1419
- [15] Huo R, Wang L, Liu P, et al. Cabazitaxel-induced autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to A549 cell death[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3013-3020
- [16] Zhang X, Yu L, Xu H. Lysosome calcium in ROS regulation of autophagy[J]. Autophagy, 2016, 12(10): 1954-1955
- [17] Lee S, Lee SJ, Coronata AA, et al. Carbon monoxide confers protection in sepsis by enhancing beclin 1-dependent autophagy and phagocytosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(3): 432-442
- [18] Lee SJ, Ryter SW, Xu JF, et al. Carbon monoxide activates autophagy via mitochondrial reactive oxygen species formation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(4): 867-873
- [19] Baskaran R, Poomima P, Priya LB, et al. Neferine prevents autophagy induced by hypoxia through activation of Akt/mTOR pathway and Nrf2 in muscle cells[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 1407-1413
- [20] Xia Q, Zheng Y, Jiang W, et al. Valproic acid induces autophagy by suppressing the Akt/mTOR pathway in human prostate cancer cells [J]. Oncol Lett, 2016, 12(3): 1826-1832
- [21] Chae HJ, Chin HY, Lee GY, et al. Carbon monoxide and nitric oxide protect against tumor necrosis factor-α-induced apoptosis in osteoblasts: HO-1 is necessary to mediate the protection [J]. Clin Chim Acta, 2006, 365(1-2): 270-278
- [22] Kim KM, Pae HO, Zheng M, et al. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress[J]. Circ Res, 2007, 101(9): 919-927