

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.21.002

Spautin-1 通过抑制自噬可增强舒尼替尼诱导的肾癌细胞凋亡*

董凯¹ 沈梦君¹ 颜廷芒¹ 韩厦¹ 黄正楠¹ 徐东亮^{1,2Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海 200080; 2 海军军医大学附属长征医院泌尿外科 上海 200003)

摘要 目的:研究 spautin-1(一种自噬抑制剂)是否能抑制舒尼替尼诱导的肾癌细胞的自噬以及对舒尼替尼诱导的肾癌细胞凋亡的影响。**方法:**以肾癌细胞系 786-O 细胞为模型, Western Blot 检测 spautin-1 对舒尼替尼诱导 786-O 细胞自噬的影响; Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测 spautin-1 和舒尼替尼对 786-O 细胞增殖的影响;应用流式细胞术,检测 spautin-1 对舒尼替尼诱导的 786-O 细胞凋亡的影响; Western Blot 检测 spautin-1 的促凋亡作用与 PI3K/AKT/GSK3β 信号通路及抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 的关系。**结果:**与舒尼替尼单独处理组相比, spautin-1 能通过降低 Beclin-1 的表达显著抑制舒尼替尼在 786-O 细胞中诱导的自噬; Spautin-1 和舒尼替尼联合作用明显增强舒尼替尼对 786-O 细胞增殖的抑制作用; Spautin-1 能进一步增强舒尼替尼诱导的 786-O 细胞的凋亡; Spautin-1 和舒尼替尼联合处理 786-O 细胞时,可以显著降低 p-AKTSer473 和 p-GSK3βSer9 的蛋白表达水平,增强 GSK3β 的活性,进而下调 Bcl-2、Mcl-1 的表达。**结论:**Spautin-1 能通过抑制 AKT 活性并活化 GSK3β,进一步降低抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 的表达,增强舒尼替尼诱导的肾癌细胞凋亡。

关键词: Spautin-1; 自噬; 舒尼替尼; 肾癌

中图分类号: R-33; R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)21-4006-05

Spautin-1 Enhances Sunitinib-induced Apoptosis in Renal Carcinoma Cells Via Inhibiting Autophagy*

DONG Kai¹, SHEN Meng-jun¹, YAN Ting-mang¹, HAN Sha¹, HUANG Zheng-nan¹, XU Dong-liang^{1,2Δ}

(1 Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Department of Urology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether spautin-1, a specific and potent autophagy inhibitor, can enhance sunitinib-induced apoptosis in renal carcinoma cells via inhibiting autophagy. **Methods:** Renal carcinoma cell line 786-O was used as cellular model and Western Blot was used to detect the effect of spautin-1 on sunitinib-induced autophagy; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the effect of sunitinib on the proliferation of 786-O cells in the presence or absence of spautin-1. Flow cytometry was used to detect the effect of spautin-1 on sunitinib-induced apoptosis. Western Blot was used to detect the effects of spautin-1 on the PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway and the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1. **Results:** Spautin-1 markedly inhibited sunitinib-induced autophagy by downregulating the autophagy protein beclin-1. Co-treatment with spautin-1 enhanced sunitinib-induced inhibition of cell proliferation. Spautin-1 enhanced sunitinib-induced apoptosis. Spautin-1 can decrease the phosphorylation levels of AKT and GSK3β in the PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway, co-treatment of spautin-1 and sunitinib downregulated anti-apoptotic proteins including Bcl-2 and Mcl-1. **Conclusions:** Spautin-1 enhanced sunitinib-induced autophagy and promoted sunitinib-induced cell apoptosis by activating GSK3β in PI3K/AKT/GSK3β signaling pathway, which downregulated the expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Mcl-1.

Key words: Spautin-1; Autophagy; Sunitinib; Renal cancer

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)21-4006-05

前言

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)起源于肾小管上皮细胞,是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一^[1]。肾癌对放疗和化疗均不敏感,手术是目前最主要的治疗方式,但部分患者术后仍会

复发转移。随着肾癌基础研究的深入,以舒尼替尼(Sunitinib, ST)为代表的受体酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)被作为进展期肾癌患者的一线靶向药物^[2],但 10-20%进展期肾癌患者对舒尼替尼先天耐药,而其余患者在 6-15 个月治疗后出现耐药和肿瘤进展^[3]。因此,探索肾癌发生的生物学机

* 基金项目:申康医院研究发展中心基金项目(SHDC12014215)

作者简介:董凯(1994-),硕士研究生,主要研究方向:肾癌,E-mail: ivandongkai@163.com

Δ 通讯作者:徐东亮(1976-),硕士生导师,教授,主要研究方向:肾癌,E-mail: urologistdx@126.com,电话:13918829767

(收稿日期:2019-03-27 接受日期:2019-04-21)

制,以及如何增强肾癌对舒尼替尼敏感性的研究十分迫切。

自噬是细胞逃避外界应激、维持细胞稳态的分解代谢途径^[4]。肿瘤细胞可利用自噬来增强自身对药物的耐药性,以此逃避抗癌药物的杀伤作用^[5-7]。有研究表明,舒尼替尼可诱导肾癌及其他肿瘤细胞发生自噬进而产生耐药性^[8-10],自噬可能作为新的潜在靶点协助治疗舒尼替尼耐药的肾癌患者,然而其中的具体作用机制尚不明确。Specific and potent autophagy inhibitor-1 (spautin-1),是一种新型小分子自噬抑制剂,对自噬具有很强的抑制效应。有研究表明^[11],spautin-1 可抑制核因子 κ B受体活化因子和 $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ 诱导的自噬进而调节破骨细胞的生成。在炎症研究方面,spautin-1 还能通过抑制胰腺细胞自噬,进而缓解蛙肽以及脂多糖诱导的急性胰腺炎^[12]。在肿瘤研究方面,spautin-1 能通过抑制自噬,提高骨肉瘤^[13]和慢性髓细胞白血病^[14]对化疗药物的敏感性。然而 spautin-1 对肾癌细胞的影响还未见报道,本课题旨在探究新型小分子自噬抑制剂 spautin-1 (SP)影响舒尼替尼诱导的肾癌 786-O 细胞的凋亡及其机制,为临床上肾癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

Spautin-1、舒尼替尼购自美国 Selleck Chemicals 公司;人肾癌细胞系 786-O 细胞由上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科研究所提供;DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青霉素、链霉素购自美国 Gibco 公司;BCA 试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Cell Counting Kit-8 (CCK-8)试剂购自上海碧云天公司;二甲亚砜(DMSO)购自于美国 Sigma 公司;LC3 抗体购自美国 Sigma 公司;AKT 抗体、p-AKT^{Ser473} 抗体、GSK3 β 抗体、p-GSK3 β ^{Ser9} 抗体、Tubulin 抗体购自于美国 Cell Signaling Technology 公司;Beclin-1 抗体、Bcl-2 抗体、Mcl-1 抗体购自于美国 Abcam 公司,ECL 试剂购自上海天能公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 配制培养 786-O 细胞需要的完全培养基,在 DMEM 培养基中加入胎牛血清,终浓度为 10%,然后加入 100 mg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素。从液氮容器中取出人肾癌细胞系 786-O 的细胞冻存管,迅速浸入 37 °C 水浴箱中解冻,待细胞完全融化成液体后,用吸管吸出细胞悬液至离心管中,并加入 10 倍体积的培养液,吹打混匀后,1000 r/min,5 min 离心,弃上清,加入配制好的完全培养基重悬并摇匀,将细胞接种到培养皿中。将细胞静置于 37 °C,5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每隔 24 h-48 h 观察细胞状态并根据需要更换培养液或传代。

1.2.2 Cell Counting Kit-8 将处于对数生长期的 786-O 细胞以 10⁴ 个 / 孔均匀接种于 24 孔板中,细胞分为四组,每组细胞做 3 个复孔,spautin-1 单独处理组细胞的培养基加入 10 μ M spautin-1,舒尼替尼单独处理组细胞的培养基加入 4 μ M 舒尼替尼,spautin-1 和舒尼替尼联合处理组细胞的培养基加入 10 μ M spautin-1 和 4 μ M 舒尼替尼,对照组细胞中加入相应体积的 DMSO。连续四天在每天相同时间点观察。检测时,每孔中加入 40 μ L 的 CCK-8 溶液和 400 μ L 的 PBS 溶液,37 °C,5% CO₂ 培养箱中孵育 2 小时。用酶标仪测定在波长 450 nm 条件下每孔的吸光度值,每组测得的吸光度值进行统计分析后绘制

细胞生长曲线。

1.2.3 蛋白印记 (Western Blot) 收集各组细胞,加入含蛋白酶、磷酸酶抑制剂的细胞裂解液提取蛋白,并用 BCA 试剂盒对细胞总蛋白浓度进行定量。再将蛋白样品与上样缓冲液混匀,煮沸 10 min 使蛋白变性。然后将样品分别进行电泳及转膜。用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液进行封闭。孵育一抗 (LC3、Beclin-1、p-AKT^{Ser473}、AKT、p-GSK3 β ^{Ser9}、GSK3 β 、Bcl-2、Mcl-1、Tubulin),4 °C 摇床过夜,第二天用 TBST 溶液漂洗三次,每次 10 min,孵育二抗,室温 2 h, TBST 溶液漂洗三次,每次 10 min, ECL 化学发光剂显影。统计分析各组蛋白表达水平。

1.2.4 流式细胞仪测定细胞凋亡 786-O 细胞以 2 \times 10⁵ / 孔均匀接种于 6 孔板中,以 4 μ M 舒尼替尼或 DMSO 处理细胞 12 小时后,加入 10 μ M spautin-1 或者 DMSO 后继续培养 36 个小时。收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞,离心后重悬取 100 μ l 至流式管,并加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 1 μ L PI,室温避光孵育 10 min,上机待检。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 对所有数据进行统计分析,计量资料均采用平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。两组间比较采用 t 检验,P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Spautin-1 抑制舒尼替尼诱导的肾癌 786-O 细胞自噬

有研究表明^[15],舒尼替尼能够诱导肾癌细胞发生自噬,这可能与肾癌治疗中舒尼替尼耐药相关。我们利用 Western Blot 检测 spautin-1 对舒尼替尼诱导的 786-O 细胞自噬的影响,结果显示,4 μ M 舒尼替尼单独处理 786-O 细胞后,LC3 II 和 Beclin-1 蛋白水平明显上调,说明舒尼替尼能诱导 786-O 细胞发生自噬。同时,我们发现 4 μ M spautin-1 和 10 μ M 舒尼替尼联合处理组细胞的 LC3 II 和 Beclin-1 蛋白表达量,较 4 μ M 舒尼替尼单独处理组明显降低,表明 spautin-1 能显著抑制舒尼替尼诱导的肾癌细胞自噬。

2.2 Spautin-1 和舒尼替尼对肾癌 786-O 细胞增殖的影响

10 μ M spautin-1、4 μ M 舒尼替尼以及 10 μ M spautin-1 联合 4 μ M 舒尼替尼分别处理 786-O 细胞 0、24、48、72、96h 后,CCK-8 方法检测 786-O 细胞的增殖情况,测定 450 nm 吸光度,绘制细胞生长曲线。结果表明,舒尼替尼单独处理 786-O 细胞具有抑制细胞增殖的作用,spautin-1 单独处理对 786-O 细胞的增殖无明显影响,表明单用 spautin-1 对细胞的生长影响较小,具有较高的安全性。而在舒尼替尼的基础上,联合应用 spautin-1,786-O 细胞的增殖被更明显地抑制,表明 spautin-1 能增强舒尼替尼对 786-O 细胞增殖的抑制作用。

2.3 Spautin-1 促进舒尼替尼诱导的 786-O 细胞凋亡

接下来,我们通过流式细胞仪检测,spautin-1 联合舒尼替尼对 786-O 细胞的凋亡影响,结果显示,spautin-1 单独处理 786-O 细胞后,细胞的凋亡情况无明显变化,表明 spautin-1 单独使用对细胞的影响较小,舒尼替尼单独处理能显著增加 786-O 细胞的凋亡率,表明舒尼替尼具有杀伤 786-O 细胞的作用。而相对于舒尼替尼单独处理组,联合应用 spautin-1 和舒尼替尼后,凋亡细胞数进一步明显增加,表明 spautin-1 能显著增强舒尼替尼的促凋亡作用。

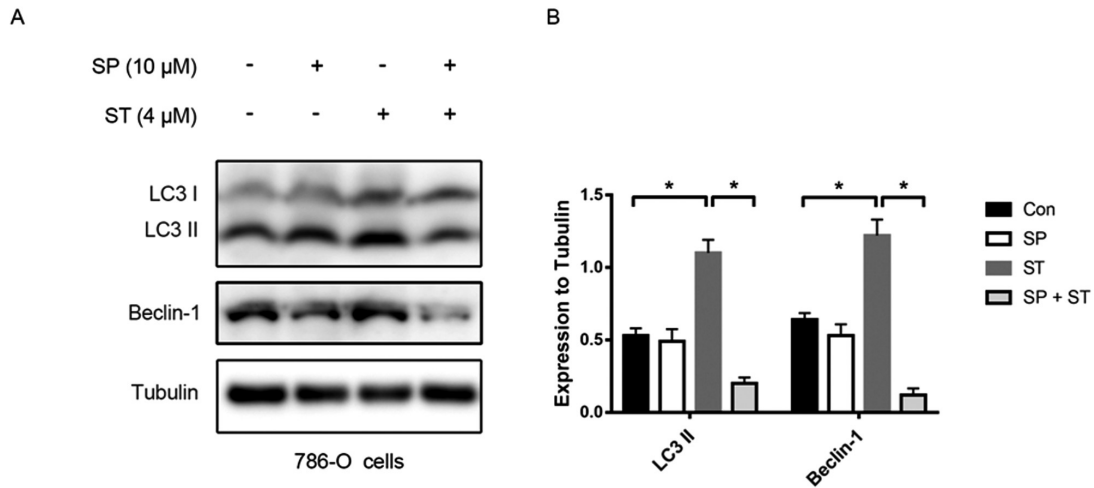


图1 Spautin-1 抑制舒尼替尼在 786-O 细胞中诱导的自噬;舒尼替尼(4 μM,ST)或 DMSO 处理细胞 12 小时后,加入 spautin-1 (10 μM,SP)或者 DMSO 后继续培养 36 个小时。A: Western Blot 检测各组 786-O 细胞中 LC3 I、LC3 II 和 Beclin-1 表达水平;B: LC3 I、LC3 II、Beclin-1 蛋白相对表达量
Fig.1 Spautin-1 inhibits sunitinib-induced autophagy in 786-O cells. A: Protein expression of LC3 I, LC3 II and Beclin-1 were detected by Western Blotting; B: LC3 I, LC3 II and Beclin-1 relative protein expression level.

所有数值用均数± 标准差表示,* 表示 $P < 0.05$
Data represent mean± SD, * $P < 0.05$

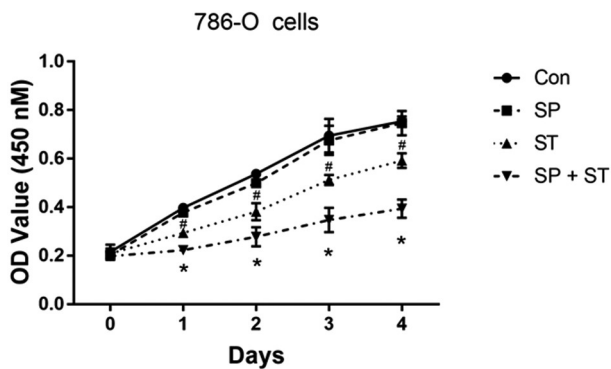


图2 Spautin-1 和舒尼替尼对 786-O 细胞增殖的影响;SP: spautin-1 (10 μM)处理 786-O 细胞;ST: sunitinib (4 μM,ST)处理 786-O 细胞; SP+ST: spautin-1 (10 μM)联合 sunitinib (4 μM)处理 786-O 细胞
Fig.2 Effects of spautin-1 and sunitinib on the proliferation of 786-O cells
所有数值用均数± 标准差表示,与 Con 组比较,# $P < 0.05$,与 ST 组比较,* $P < 0.05$
Data represent mean± SD, # $P < 0.05$ vs Con group, * $P < 0.05$ vs ST group

2.4 Spautin-1 协同舒尼替尼对 AKT/GSK3β 信号通路的影响

研究表明,AKT/GSK3β 信号通路与自噬、凋亡相关^[16],我们利用 Western Blot 检测 spautin-1 联合舒尼替尼处理 786-O 细胞后,AKT/GSK3β 信号通路相关蛋白表达的变化。结果显示,相较于舒尼替尼单独处理组,spautin-1 联合舒尼替尼处理组细胞的 p-AKTSer473,p-GSK3βSer9 明显降低,而 AKT 和 GSK3β 无明显变化,研究表明^[17,18],GSK3β 在 Ser9 位点的去磷酸化与该激酶活性增高密切相关,所以 spautin-1 联合舒尼替尼实际上增强了 GSK3β 的活性。由于 spautin-1 联合舒尼替尼处理 786-O 细胞后,细胞凋亡明显增加,我们又检测了抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 的表达,结果表明,spautin-1 联合舒尼替尼处理 786-O 细胞后,Bcl-2 和 Mcl-1 表达较舒尼替尼单独处理组降低。因此 spautin-1 可能通过抑制 AKT 的活性并活化了 GSK3β,进一步下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 的表达,来促进

spautin-1 和舒尼替尼联合处理组的细胞凋亡。

3 讨论

肾癌是泌尿生殖系统高发肿瘤,但目前肾癌发生发展的生物学机制尚未阐明,进展期肾癌的治疗效果不尽如人意。目前进展期肾癌治疗方法主要分为生物治疗、靶向治疗和免疫靶向治疗^[19],其中舒尼替尼为进展期肾癌的一线药物^[20]。舒尼替尼是多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂,它能抑制血小板源生长因子受体(PDGFR)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)、干细胞生长因子等,因此具有杀伤肿瘤和减少肿瘤血管的双重作用^[21]。然而,舒尼替尼的不响应和耐药问题不容忽视,Sandy Giuliano 报道了肾癌细胞可自我保护性地调节溶酶体活动和自噬反应来逃避舒尼替尼的杀伤效应,进而产生耐药性^[8]。另有文献报道,舒尼替尼能引起肾癌细胞自噬活动增强^[22]。

自噬是细胞重要的自我防护机制,自噬与肿瘤的发生发展关系密切,当肿瘤细胞处于放疗、化疗等应激情况下,自噬能协助肿瘤细胞应对环境压力,帮助肿瘤细胞逃逸各种治疗手段,导致肿瘤的耐药和自身生长^[23]。有研究指出,使用自噬抑制剂或敲除自噬相关基因能增强化疗药物的杀伤肿瘤的效应^[24]。例如,miR-30a 能抑制自噬关键蛋白 Beclin-1 的表达进而影响肾癌细胞的自噬活动,增强索拉非尼杀伤肿瘤的作用^[25]。这些研究都表明,自噬在肿瘤药物治疗的生物学反应过程中扮演重要的角色。但是,自噬介导的肿瘤细胞耐药的具体机制尚不清楚,通过抑制自噬进而缓解肿瘤耐药仍需要继续深入研究。

目前研究中常用的自噬抑制剂主要有,3MA、Wortmannin、巴弗洛霉素 A1、氯喹、羟氯喹等,这些药物虽然可以抑制自噬,但是往往作用于多个信号通路,特异性差,对正常细胞的功能也有影响,或者效应差,需要较高浓度才能有效抑制自噬反应。本实验探究了 spautin-1 增强舒尼替尼杀伤肾癌 786-O 细胞的作用。Spautin-1 是一种新型小分子自噬抑制剂,命名取自 specific and potent autophagy inhibitor-1(spautin-1),意为 "高特异

性、高效应自噬抑制剂”。Spatin-1 已被一些研究团队证明,能抑制饥饿导致的乳腺癌细胞的自噬反应 [26]。Shao 等报道,spautin-1 能通过抑制自噬,协同增强靶向药物甲磺酸伊马替尼杀伤慢粒白血病细胞 [14]。Solano JD 报道了 spautin-1 能抑制药

物诱导的 Hela 细胞自噬反应 [27],另有研究证明,spautin-1 能抑制血小板生长因子诱导的主动脉平滑肌细胞自噬 [28]和雷帕霉素诱导的肝癌细胞自噬 [29]。但目前,spautin-1 对肾脏肿瘤自噬抑制的研究仍未见报道。

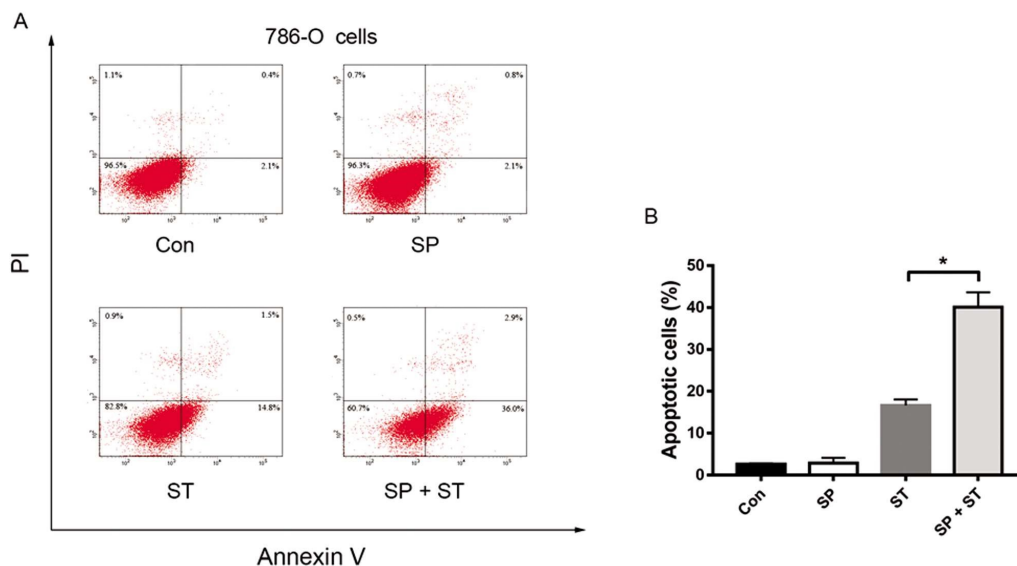


图3 Spautin-1 增强舒尼替尼对 786-O 细胞的促凋亡作用;舒尼替尼(4 μM,ST)或 DMSO 处理细胞 12 小时后,加入 spautin-1 (10 μM,SP)或者 DMSO 后继续培养 36 个小时。A: 流式细胞仪检测各组 786-O 细胞凋亡情况;B: 凋亡细胞定量分析

Fig.3 Spautin-1 promotes sunitinib-induced apoptosis in 786-O cells. A: The apoptotic cells were detected using flow cytometry;

B: The percentage of apoptotic cells

所有数值用均数± 标准差表示,*表示 $P<0.05$

Data represent mean± SD, * $P<0.05$

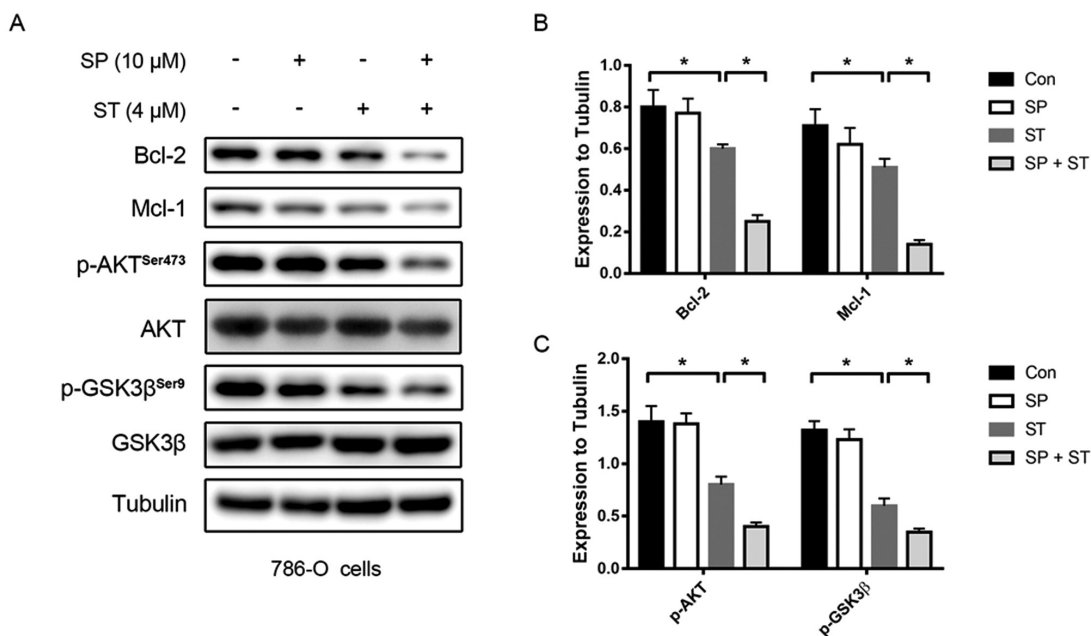


图4 AKT/GSK3β 参与了 Spautin-1 对 786-O 细胞的促凋亡作用;舒尼替尼(4 μM,ST)或 DMSO 处理细胞 12 小时后,加入 spautin-1 (10 μM,SP)或者 DMSO 后继续培养 36 个小时。A: Western Blot 检测各组 786-O 细胞中 Bcl-2、Mcl-1、p-AKT、AKT、p-GSK3βSer9 和 GSK3β 表达水平;

B、C: Bcl-2、Mcl-1、p-AKT 和 p-GSK3βSer9 蛋白相对表达量

Fig.4 AKT/GSK3β is involved in spautin-1 pro-apoptotic activity in 786-O cells A: Protein expression of Bcl-2, Mcl-1, p-AKT, AKT, p-GSK3β and GSK3β were detected by Western Blotting; B, C: Bcl-2, Mcl-1, p-AKT and p-GSK3βSer9 relative protein expression level.

所有数值用均数± 标准差表示,*表示 $P<0.05$

Data represent mean± SD, * $P<0.05$

本研究实验结果显示,spautin-1 能明显抑制舒尼替尼在 786-O 细胞株中诱导的自噬反应,这主要和下调 Beclin-1 蛋白

的表达有关。Beclin-1 是自噬体形成过程中的重要蛋白,能与 VPS34 形成复合物,促进自噬体的形成^[26]。而单独使用 spautin-1 对 786-O 细胞的自噬没有影响,表明此药物不影响细胞基础自噬,此特点使得 spautin-1 对正常细胞自噬影响较小,优于其他自噬抑制剂。我们进一步探讨了 spautin-1 联合舒尼替尼对肾癌细胞株 786-O 细胞的增殖影响,结果表明,spautin-1 联合应用舒尼替尼可以更明显地抑制该细胞的增殖,有趣的是,单独使用 spautin-1 不影响细胞增殖,表明此浓度的 spautin-1 对细胞活性影响小,具有较高的安全性。同时,我们探究了肾癌细胞 786-O 的凋亡情况,发现 spautin-1 能明显增强舒尼替尼诱导的 786-O 细胞凋亡。

许多研究表明,PI3K/AKT 信号通路可广泛调节自噬和凋亡,它参与了多种肿瘤的发生发展,可作为肿瘤治疗的靶点^[30]。如在肾细胞癌动物模型中,LY294002 作为一种 PI3K 抑制剂,能抑制 AKT 磷酸化和肿瘤的生长^[31],提示我们 spautin-1 和舒尼替尼联合诱导肾癌细胞凋亡的作用可能与此通路有关。本实验中,我们发现 spautin-1 和舒尼替尼联合处理组细胞的 P-AKT 表达明显抑制,我们又检测了 AKT 下游的激酶 GSK3 β ,它的 Ser9 位点磷酸化降低,研究认为 GSK3 β 的 Ser9 位点磷酸化与该激酶活性降低相关^[32],因此 spautin-1 实际上抑制了 AKT 的活性,增强了 GSK3 β 的活性。有研究表明^[33],活化的 GSK3 β 能促进抗凋亡蛋白 Mcl-1 的磷酸化,并促使其通过蛋白酶体途径降解,进而促进细胞凋亡。因此 Spautin-1 可能通过抑制 AKT 活性并活化 GSK3 β 进一步下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 的表达,从而增强肾癌细胞对舒尼替尼的敏感性。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2018, 68(1): 7-30
- [2] Hsieh JJ, Chen D, Wang PI, et al. Genomic Biomarkers of a Randomized Trial Comparing First-line Everolimus and Sunitinib in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma[J].European urology, 2017, 71(3): 405-414
- [3] Qu L, Ding J, Chen C, et al. Exosome-Transmitted lncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by Acting as a Competing Endogenous RNA[J]. Cancer cell, 2016, 29(5): 653-668
- [4] Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice[J]. Autophagy, 2017, 13(10): 1619-1628
- [5] Sun T, Liu H, Ming L. Multiple Roles of Autophagy in the Sorafenib Resistance of Hepatocellular Carcinoma [J]. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology, 2017, 44(2): 716-727
- [6] Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. Chinese journal of cancer, 2017, 36(1): 52
- [7] Chen C, Lu L, Yan S, et al. Autophagy and doxorubicin resistance in cancer[J]. Anti-cancer drugs, 2018, 29(1): 1-9
- [8] Giuliano S, Cormerais Y, Dufies M, et al. Resistance to sunitinib in renal clear cell carcinoma results from sequestration in lysosomes and inhibition of the autophagic flux [J]. Autophagy, 2015, 11(10): 1891-1904
- [9] Santoni M, Amantini C, Morelli MB, et al. Pazopanib and sunitinib trigger autophagic and non-autophagic death of bladder tumour cells [J]. British journal of cancer, 2013, 109(4): 1040-1050
- [10] Abdel-Aziz AK, Shouman S, El-Demerdash E, et al. Chloroquine synergizes sunitinib cytotoxicity via modulating autophagic, apoptotic and angiogenic machineries [J]. Chemico-biological interactions, 2014, 217: 28-40
- [11] Ji L, Gao J, Kong R, et al. Autophagy exerts pivotal roles in regulatory effects of 1 α , 25-(OH)2D3 on the osteoclastogenesis[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2019
- [12] Xiao J, Feng X, Huang XY, et al. Spautin-1 Ameliorates Acute Pancreatitis via Inhibiting Impaired Autophagy and Alleviating Calcium Overload [J]. Molecular medicine (Cambridge, Mass), 2016, 22: 643-652
- [13] Schott CR, Ludwig L, Mutsaers AJ, et al. The autophagy inhibitor spautin-1, either alone or combined with doxorubicin, decreases cell survival and colony formation in canine appendicular osteosarcoma cells[J]. PloS one, 2018, 13(10): e0206427
- [14] Shao S, Li S, Qin Y, et al. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia [J]. International journal of oncology, 2014, 44(5): 1661-1668
- [15] Li ML, Xu YZ, Lu WJ, et al. Chloroquine potentiates the anticancer effect of sunitinib on renal cell carcinoma by inhibiting autophagy and inducing apoptosis[J]. Oncology letters, 2018, 15(3): 2839-2846
- [16] Long Q, Li X, He H, et al. Autophagy activation protects shock wave induced renal tubular epithelial cell apoptosis may through modulation of Akt/ GSK-3beta pathway[J]. International journal of biological sciences, 2016, 12(12): 1461-1471
- [17] Qin C, Li S, Yan Q, et al. Elevation of Ser9 phosphorylation of GSK3beta is required for HERV-W env-mediated BDNF signaling in human U251 cells[J]. Neuroscience letters, 2016, 627: 84-91
- [18] Gao X, He Y, Gao LM, et al. Ser9-phosphorylated GSK3beta induced by 14-3-3zeta actively antagonizes cell apoptosis in a NF-kappaB dependent manner [J]. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 2014, 92(5): 349-356
- [19] Sanchez-Gastaldo A, Kempf E, Gonzalez Del Alba A, et al. Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review [J]. Cancer treatment reviews, 2017, 60: 77-89
- [20] Powles T, Albiges L, Staehler M, et al. Updated European Association of Urology Guidelines Recommendations for the Treatment of First-line Metastatic Clear Cell Renal Cancer [J]. European urology, 2017
- [21] Nassif E, Thibault C, Vano Y, et al. Sunitinib in kidney cancer: 10 years of experience and development [J]. Expert review of anticancer therapy, 2017, 17(2): 129-142
- [22] 曹珮,姜学军,席志军.舒尼替尼通过抑制 Akt/mTOR 信号通路诱导肾癌细胞自噬[J].北京大学学报(医学版), 2016, 48(04): 584-589
- [23] White E. The role for autophagy in cancer [J]. The Journal of clinical investigation, 2015, 125(1): 42-46
- [24] Salomoni P, Calabretta B. Targeted therapies and autophagy: new insights from chronic myeloid leukemia [J]. Autophagy, 2009, 5(7): 1050-1051
- [25] Zheng B, Zhu H, Gu D, et al. MiRNA-30a-mediated autophagy inhibition sensitizes renal cell carcinoma cells to sorafenib [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2015, 459(2): 234-239

- [18] Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Rodríguez A, et al. Involvement of serum vascular endothelial growth factor family members in the development of obesity in mice and humans [J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(8): 774-780
- [19] Sun CY, Lee CC, Hsieh MF, et al. Clinical association of circulating VEGF-B levels with hyperlipidemia and target organ damage in type 2 diabetic patients [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2014, 28(2): 225-236
- [20] Cheng F, Zhao L, Wu Y, et al. Serum vascular endothelial growth factor B is elevated in women with polycystic ovary syndrome and can be decreased with metformin treatment[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2016, 84(3): 386-393
- [21] Wu J, Wei H, Qu H, et al. Plasma vascular endothelial growth factor B levels are increased in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus and associated with the first phase of glucose-stimulated insulin secretion function of β -cell [J]. *J Endocrinol Invest*, 2017, 40(11): 1219-1226
- [22] Carmeliet P, Wong BW, De Bock K. Treating diabetes by blocking a vascular growth factor[J]. *Cell Metab*, 2012, 16(5): 553-555
- [23] Bonnefond A, Saulnier PJ, Stathopoulou MG, et al. What is the contribution of two genetic variants regulating VEGF levels to type 2 diabetes risk and to microvascular complications?[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55921
- [24] Falkevall A, Mehlem A, Palombo I, et al. Reducing VEGF-B signaling ameliorates renal lipotoxicity and protects against diabetic kidney disease[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(3): 713-726
- [25] Dijkstra MH, Pirinen E, Huusko J, et al. Lack of cardiac and high-fat diet induced metabolic phenotypes in two independent strains of Vegf-b knockout mice[J]. *Sci Rep*, 2014, 4(8): 6238
- [26] Robciuc MR, Kivelä R, Williams IM, et al. VEGFB/VEGFR1-induced expansion of adipose vasculature counteracts obesity and related metabolic complications[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(4): 712-724
- [27] Kivelä R, Bry M, Robciuc MR, et al. VEGF-B-induced vascular growth leads to metabolic reprogramming and ischemia resistance in the heart[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(3): 307-321
- [28] Karpanen T, Bry M, Ollila HM, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2008, 103(9): 1018-1026
- [29] Reihill JA, Ewart MA, Salt IP. The role of AMP-activated protein kinase in the functional effects of vascular endothelial growth factor-A and -B in human aortic endothelial cells[J]. *Vasc Cell*, 2011, 3(8): 9
- [30] Ariunan P, Lin X, Tang Z, et al. VEGF-B is a potent antioxidant[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(41): 10351-10356
- [31] Di G, Zhao X, Qi X, et al. VEGF-B promotes recovery of corneal innervations and trophic functions in diabetic mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 40582
- [32] Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 149(1-2): 29-40

(上接第 4010 页)

- [26] Liu J, Xia H, Kim M, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13 [J]. *Cell*, 2011, 147(1): 223-234
- [27] Solano JD, Gonzalez-Sanchez I, Cerbon MA, et al. The products of the reaction between 6-amine-1,3-dimethyl uracil and bis-chalcones induce cytotoxicity with massive vacuolation in HeLa cervical cancer cell line [J]. *European journal of medicinal chemistry*, 2013, 60: 350-359
- [28] Salabei J K, Cummins TD, Singh M, et al. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress [J]. *The Biochemical journal*, 2013, 451(3): 375-388
- [29] Mateo R, Nagamine C M, Spagnolo J, et al. Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation [J]. *Journal of virology*, 2013, 87(3): 1312-1321
- [30] Huang G, Zou B, Lv J, et al. Notoginsenoside R1 attenuates glucose-induced podocyte injury via the inhibition of apoptosis and the activation of autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *International journal of molecular medicine*, 2017, 39(3): 559-568
- [31] Sourbier C, Lindner V, Lang H, et al. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy[J]. *Cancer research*, 2006, 66(10): 5130-5142
- [32] Frame S, Cohen P, Biondi R M. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation[J]. *Molecular cell*, 2001, 7(6): 1321-1327
- [33] Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, et al. SCF (FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction [J]. *Nature*, 2011, 471(7336): 104-109