

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.002

# 自噬与非小细胞肺癌对吉非替尼耐药关系的实验研究\*

李 博 姜秀秀 曹 晶 李 楠 张 艰<sup>△</sup>

(第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:**探讨细胞自噬与非小细胞肺癌对 Gefitinib 耐药的相关性,寻找逆转非小细胞肺癌对 Gefitinib 耐药的新靶点。**方法:**以体外培养的人非小细胞肺癌 Gefitinib 敏感细胞 PC-9 与 Gefitinib 耐药细胞 PC-9/GR 为研究对象,通过 MTT 法检测 Gefitinib 对 PC-9 及 PC-9/GR 细胞存活率的影响;Western blot 检测 Gefitinib 对 PC-9 及 PC-9/GR 细胞中自噬相关蛋白 LC3 的表达的影响;流式细胞术检测自噬诱导剂雷帕霉素和 Gefitinib 对 PC-9/GR 细胞凋亡率的影响。**结果:**PC-9/GR 细胞 Gefitinib IC<sub>50</sub> 为 PC-9 细胞的 200 倍以上,具有非常明显的耐药性。PC-9/GR 细胞中 LC3II 的表达显著低于 PC-9/GR 细胞(P<0.05)。Rapamycin 联合 Gefitinib 作用于 PC-9/GR 细胞可以明显提高其细胞凋亡率(P<0.05)。**结论:**细胞自噬减弱与非小细胞肺癌对 Gefitinib 耐药有关,诱导细胞自噬可能逆转非小细胞肺癌对 Gefitinib 耐药。

**关键词:**非小细胞肺癌;吉非替尼;耐药;自噬

**中图分类号:**R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)27-5204-03

## Study on the Correlation of Autophagy with Gefitinib Resistance of Non-small-cell Lung Cancer\*

LI Bo, JIANG Xiu-xiu, CAO Jing, LI Nan, ZHANG Jian<sup>△</sup>

(Department of Pulmonary Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the correlation of autophagy with gefitinib resistance of non-small-cell lung cancer and investigate a novel approach to reverse drug resistance. **Methods:** Gefitinib-sensitive cell line PC-9 and Gefitinib-resistant cell line PC-9/GR were cultured in vitro. MTT assay was applied to test the cell viabilities of PC-9 and PC-9/GR cells after gefitinib treatment. Western blot analysis was used to determine the expression of autophagy related protein LC3. Flow cytometry was also used to measure the apoptosis after rapamycin and/or gefitinib treatments. **Results:** The IC<sub>50</sub> of PC-9/GR cells was 200-fold higher than that of PC-9 cells. PC-9/GR cells were obviously resistant to gefitinib. The expression of LC3 protein in PC-9/GR cells was significantly lower than that of PC-9 cells. Induction of autophagy by rapamycin reversed resistance and promoted the apoptosis in PC-9/GR cells. **Conclusion:** The decrease of autophagy was associated with gefitinib resistance in lung cancer, induction of autophagy might be a novel approach to reverse gefitinib resistance.

**Key words:** Non-small-cell lung cancer; Gefitinib; Resistance; Autophagy

**Chinese Library Classification:** R734.2 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)27-5204-03

### 前言

吉非替尼(Gefitinib)是一种口服的表皮生长因子受体酪氨酸酶抑制剂(epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs),在临床上广泛用于治疗具有 EGFR 第 19 外显子缺失或第 21 外显子点突变的非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC)<sup>[1,2]</sup>。IPASS 和 OPTIMAL 等大规模前瞻性随机对照临床试验显示 EGFR 突变的肺癌患者服用靶向药物在疾病控制、症状缓解、生活质量等方面优于常规化疗,患者疾病无进展期(progression free survival, PFS)显著延长<sup>[3]</sup>。但几乎全部 NSCLC 患者在使用 EGFR-TKIs 一段时间后出现对 EGFR-TKIs 的获得性耐药,导致疾病进展<sup>[4]</sup>,这也严重限制了 EGFR-TKIs 在临床上的应用价值。因此,阐明 NSCLC 患者对 EGFR-TKIs 的耐药机制,并寻找逆转耐药的策

略,是亟待解决的科学问题,对改善 NSCLC 患者的预后具有重要的临床意义。

目前已知的 EGFR-TKIs 耐药机制主要有两种:T790M 耐药突变和原癌基因 Met 扩增。肺癌细胞发生 T790M 突变后,吉非替尼与 EGFR 酪氨酸激酶结合位点的结合能力下降,以致于 EGFR 信号不能被完全阻断,细胞表现为对吉非替尼耐受<sup>[5,6]</sup>。Met 基因扩增后可与 ERBB3 形成异源二聚体,二者绕过 EGFR 直接活化其下游的 PI3K/Akt, STAT 和 Erk 细胞生长信号<sup>[7]</sup>。临床上 50% 的耐药标本可检出 T790M,约 30% 的耐药标本可检出 Met,另外还有 20% 的标本耐药机制不明<sup>[8]</sup>。

自噬(autophagy)是真核细胞中高度保守的生命过程,是细胞应对内外环境变化的一种应激反应,其目的是实现细胞内大分子物质的降解和再循环,满足细胞物质和能量代谢需要,维持细胞内环境稳定<sup>[9]</sup>。自噬对于肿瘤细胞具有保护和杀伤双重

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272518)

作者简介:李博(1987-),女,硕士研究生,研究方向:肺癌的发生和治疗,E-mail: leePHD@163.com

△ 通讯作者:张艰,副教授,副主任医师,研究方向:肺癌个体化治疗和耐药机制,电话: 029-84771135, E-mail: zhangjian197011@gmail.com

(收稿日期:2014-03-15 接受日期:2014-04-13)

作用,适度自噬可以促进细胞生存,过度自噬又可以促进细胞死亡,它在不同类型的组织细胞中发挥的作用不一而论<sup>[10]</sup>。近年研究显示放疗和化疗可以诱发肿瘤细胞自噬,临床上常用的紫杉醇、环磷酰胺、阿霉素、表柔比星、地塞米松等药物能够引起胃癌、肝癌、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤等恶性肿瘤自噬,亦有报道称 EGFR 分子靶向药物能够诱发肺癌细胞自噬<sup>[11,12]</sup>。自噬的双向调节作用可以影响放化疗和分子靶向药物杀伤肿瘤细胞的作用。此外,自噬信号还可能参与了耐药过程,但自噬到底是促进耐药还是抑制耐药,学术界尚未达成统一意见。本研究旨在探讨自噬信号是否参与了肺癌细胞对 EGFR-TKIs 耐药的过程,以期通过调控耐药细胞中异常的自噬恢复其对 EGFR-TKIs 的敏感性,逆转 EGFR-TKIs 耐药,进而改善 NSCLC 患者的临床疗效和预后。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Gefitinib 敏感的非小细胞肺癌 PC-9 细胞株由广东省人民医院吴一龙教授惠赠,在体外通过吉非替尼慢性刺激,我们建立了 PC-9 Gefitinib 耐药细胞株 PC-9/GR<sup>[13]</sup>,经测序和 PCR 鉴定,PC-9/GR 细胞中未发现 T790M 和 Met。吉非替尼由 AstraZenca 公司惠赠,雷帕霉素 (Rapamycin)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、青链霉素 (P/S)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司, RPMI 1640 培养基购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche 公司, RIPA 细胞裂解液和蛋白定量试剂盒购自博士德生物工程有限公司,兔抗 LC3B 抗体,鼠抗  $\beta$ -actin 抗体,辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG 购自 Cell Signaling Technology 公司, ECL 发光液购自 Millipore 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与加药处理** PC-9 和 PC-9/GR 细胞均用含 10 %胎牛血清和 1 %青链霉素的 RPMI 1640 培养基培养,于 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中培养,待细胞融合度达 80 % 时传代,每 2~3 天更换培养液。PC-9/GR 细胞培养液中另加入 10 nM Gefitinib 以维持其耐药性。

PC-9/GR 细胞分为 4 组,溶剂对照组 (Control)、Rapamycin 组、Gefitinib 组、Gefitinib+Rapamycin 组,Control 组给予等体积溶剂 DMSO 处理, Rapamycin 组加入终浓度 10 nM Rapamycin, Gefitinib 组加入终浓度为 10  $\mu$ M Gefitinib, Gefitinib+Rapamycin 组先用终浓度为 10 nM Rapamycin 预处理 2 h,再加入终浓度为 10  $\mu$ M Gefitinib。各组细胞均在药物处理 48 h 后行相关检测。

**1.2.2 MTT 法检测细胞的存活率** 分别取对数生长期的 PC-9、PC-9/GR 细胞,经 0.25 %胰酶消化后以 3000 个细胞 / 孔接种 96 孔板,培养箱中过夜使细胞完全贴壁。次日按梯度给予终浓度分别为 5 nM、10 nM、50 nM、100 nM、1  $\mu$ M 和 5  $\mu$ M Gefitinib,每个浓度设置 5 个复孔。培养 48 h 后每孔加入 20  $\mu$ L 无菌 5 mg/ml MTT 溶液,继续孵育 4 h 后吸去培养液,每孔加入 100  $\mu$ L DMSO,充分震荡,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值 (A),按下式计算细胞存活率,细胞存活率 (%) =  $\frac{A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}}{A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}} \times 100\%$ ,并计算出半数有效抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。

**1.2.3 Western blot 检测自噬相关蛋白的表达** 收集各处理组

细胞,冰浴 30 min,超声粉碎机粉碎细胞样品,继续冰浴 10 min, 4 °C 12000 r/min 离心 15 min,取上清,蛋白定量试剂盒测蛋白质浓度,向各组细胞蛋白样品中加入 1/5 体积的上样缓冲液,煮沸 5 min,使蛋白完全变性。取 50  $\mu$ g 蛋白进行 SDS-PAGE 并电转移至硝酸纤维素膜,5 %脱脂奶粉室温封闭 1 h,使用抗 LC3B (1/1000)、抗  $\beta$ -actin (1/1000) 抗体过夜杂交, HRP 标记的抗兔 IgG 或抗鼠 IgG (1/5000) 室温孵育 1 h 后滴加 ECL 发光液,化学发光成像系统成像分析。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞的凋亡率** 收集各处理组细胞,常规消化离心,预冷 PBS 漂洗 2 次,75 %乙醇固定 10 min,向各组细胞中加入 10  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 10  $\mu$ L PI,充分混合,避光孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次,流式细胞仪检测细胞 Annexin V-FITC 和 PI 信号,判定细胞凋亡情况。

### 1.3 统计学处理

每个实验重复 3 次。用 Graphpad Prism 5.0 软件、Image J 软件完成作图及数据分析。多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),两两比较采用 t 检验,数据以 mean  $\pm$  SD 表示, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Gefitinib 对 PC-9、PC-9/GR 细胞存活率的影响

将 Gefitinib 按照 5 nM、10 nM、50 nM、100 nM、1  $\mu$ M 和 5  $\mu$ M 浓度梯度分别作用于 PC-9 和 PC-9/GR 细胞,结果显示随着 Gefitinib 浓度的增加,PC-9 细胞的细胞存活率明显下降, Gefitinib 以剂量依赖性的方式抑制 PC-9 细胞的增殖,其 IC<sub>50</sub> 为 (99.21  $\pm$  14.42) nM; 而 Gefitinib 的耐药细胞 PC-9/GR 对 Gefitinib 耐受,其 IC<sub>50</sub> 为 (22.98  $\pm$  2.076)  $\mu$ M,二者的 IC<sub>50</sub> 相差 200 倍以上 (图 1)。

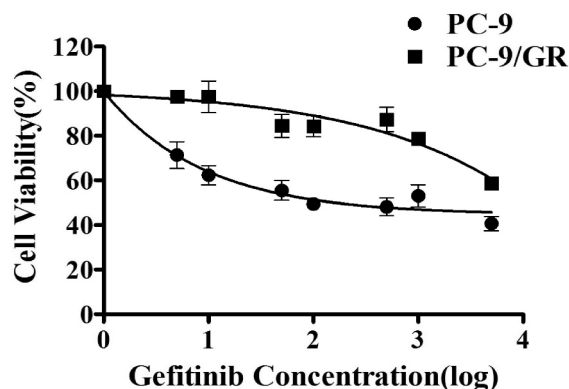


图 1 不同浓度的 Gefitinib 对 PC-9、PC-9/GR 细胞存活率的影响  
Fig. 1 The effect of different concentrations of Gefitinib on cell viability of PC-9 and PC-9/GR cells

### 2.2 Gefitinib 耐药对细胞自噬水平的影响

为了检测两种细胞的自噬水平,我们通过 Western blot 检测其自噬标记物 LC3 的表达。LC3 存在 LC3I 和 LC3II 两种亚型,当细胞发生自噬时 LC3I 可转化为 LC3II<sup>[14]</sup>。Western blot 结果显示 PC-9 细胞中的 LC3II 的表达显著高于 PC-9/GR 细胞 (图 2),表明 Gefitinib 耐药的细胞自噬水平降低。

### 2.3 雷帕霉素诱导自噬能够逆转 Gefitinib 耐药

上述结果表明 PC-9 细胞 Gefitinib 耐药后的自噬水平明显

减弱,我们设想能否通过诱导细胞自噬从而逆转耐药。雷帕霉素(Rapamycin)是一种常用的自噬诱导剂,我们使用 Rapamycin 处理 PC-9/GR 耐药细胞,结果显示溶剂对照组细胞的凋亡率为  $(2.08 \pm 0.1317) \%$ , Rapamycin 单药组为  $(2.61 \pm 0.1664) \%$ , Gefitinib 单药组为  $(11.75 \pm 0.7016) \%$ , 而 Gefitinib+Rapamycin 联合组的凋亡率为  $(21.64 \pm 1.39) \%$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

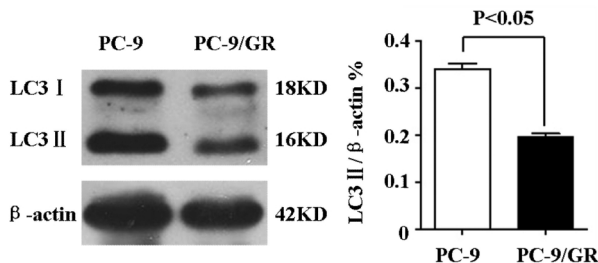


图 2 Western blot 检测 PC-9 和 PC-9/GR 细胞自噬标记物 LC3 的表达情况

Fig. 2 Expression of LC3 protein in PC-9 and PC-9/GR cells

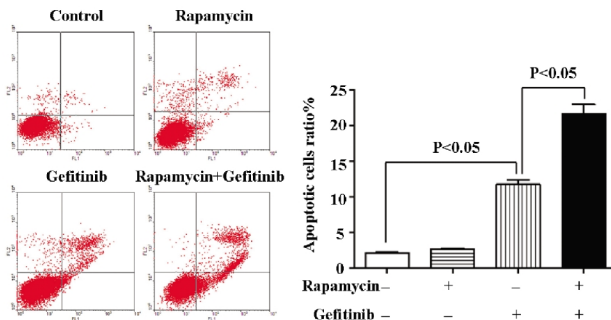


图 3 Rapamycin 和 / 或 Gefitinib 对 PC-9/GR 细胞凋亡率的影响

Fig. 3 The effect of Rapamycin and/or Gefitinib on apoptotic ratio of PC-9/GR cells

### 3 讨论

肺癌已成为我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,近 85 % 肺癌为非小细胞肺癌 (non-small-cell lung carcinoma, NSCLC), 寻求敏感高效的治疗方案迫在眉睫。NSCLC 的治疗方案除了手术切除和传统放化疗, 分子靶向治疗 (molecular targeted therapy) 亦具有一定的疗效, 且毒副反应较轻, 为延长肺癌患者的生存期带来希望。然而, 很多患者在治疗初期对该药高度敏感, 但经过约 10-14 个月的中位疾病无进展生存期后对药物发生抵抗而导致病情反复。因此, 深入研究肺癌细胞对 EGFR-TKIs 的耐药机制, 可为指导临床用药, 扩大药物获益人群提供依据。

自噬又称为 II 型程序性细胞死亡 (programmed cell death type II), 大量研究表明肿瘤细胞在缺氧、营养缺乏、细胞器受损等刺激下可以发生自噬。Ito H 等发现自噬通过清除受损的线粒体使肿瘤细胞逃避电离辐射引起的细胞凋亡, 使肿瘤细胞在不利的环境下得以生存<sup>[15]</sup>。而 Scott 等研究发现调控自噬基因 Atg1 活化细胞自噬可以使肿瘤细胞增殖明显变慢, 促进细胞凋亡<sup>[16]</sup>。自噬在肿瘤细胞中究竟是发挥“促生存”还是“促凋亡”作用, 这个问题一直存在争论, 至今尚无明确定论。目前的研究认为自噬对肿瘤细胞具有保护和杀伤双重作用, 适度的自噬维

持肿瘤细胞物质代谢和能量供给, 保护肿瘤细胞在不利环境中继续生存, 而过度自噬则导致重要蛋白质和细胞器受损, 促使细胞坏死或者凋亡<sup>[17]</sup>。

近期的研究表明肿瘤细胞耐药或许与异常自噬有关, 但不同实验室的结论却截然相反。Eimer 等认为抑制自噬能够增强 EGFR-TKIs 的细胞毒作用, siRNA 介导的自噬抑制可以使 EGFR-TKIs 更有效的杀伤胶质瘤细胞, 提示活化自噬可能导致 EGFR-TKIs 耐药<sup>[18]</sup>。而在 Moreira-Leite 等的研究中, 活化自噬信号则可逆转 T790M 突变后的 EGFR-TKIs 耐药, 自噬似乎又是逆转耐药的靶点<sup>[19]</sup>。这也进一步证明了自噬对肿瘤细胞保护和杀伤的双重作用, 研究肺癌细胞 EGFR-TKIs 耐药前后自噬信号的变化有望成为逆转耐药的新靶点。

本研究以 19 外显子缺失突变的 Gefitinib 敏感细胞株 PC-9 为亲本细胞, 利用 Gefitinib 慢性刺激诱导出具有良好耐药性的 PC-9/GR 细胞, 经测序和 PCR 鉴定, PC-9/GR 细胞中未发现 T790M 和 Met, 提示本研究所使用的 PC-9/GR 细胞具有新的耐药机制。研究结果显示 PC-9/GR 细胞自噬标记物 LC3 的含量下降, 表明 Gefitinib 耐药可能与自噬减弱有关, 恢复细胞的自噬活性可能逆转 Gefitinib 耐药。为了证明这一假设, 我们使用自噬诱导剂 Rapamycin 激活 PC-9/GR 细胞自噬, 通过流式细胞术评估自噬活化后 PC-9/GR 细胞对 Gefitinib 的反应, 结果显示 Gefitinib 单独作用于 PC-9/GR 细胞引起约 10 % 的细胞凋亡, 而 Rapamycin 预先激活自噬再给予 Gefitinib, 细胞凋亡率显著增加, 升至 20 % 左右, 表明活化自噬可能逆转 Gefitinib 耐药。

自噬是细胞生存和死亡的桥梁和纽带, 适当调节细胞自噬具有“促生存”或“促凋亡”双重作用。本研究通过 Rapamycin 增强自噬以逆转耐药, 促进了 Gefitinib 耐药细胞的凋亡。结合现有的数据, 我们认为调控细胞自噬对于改进现有的肿瘤治疗策略和抗肿瘤药物的研发具有重要意义, 调节自噬对于逆转 Gefitinib 耐药可能是一个新思路, 具有很好的研究前景。

### 参考文献 (References)

- [1] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. N Engl J Med, 2004, 350 (21): 2129-2139
- [2] Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy [J]. Science, 2004, 304(5676): 1497-1500
- [3] Mok TS, Wu YL, Yang CH, et al. Gefitinib or carboplatin paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma [J]. N Engl J Med, 2009, 361 (10): 947-957
- [4] Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361 (10): 958-967
- [5] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. N Engl J Med, 2005, 352(8): 786-792
- [6] Xu Y, Liu H, Chen J, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib [J]. Cancer Bid Ther, 2010, 9(8): 572-582
- [7] Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling [J]. Science, 2007, 316(5827): 1039-1043 (下转第 5216 页)

化效应的产生。

### 参考文献(References)

- [1] Schuster GS. Oral flora and pathogenic organisms [J]. Infect Dis Clin North Am, 1999, 13(4): 757-774
- [2] Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(9):629-641
- [3] Malik Z, Hanania J, Nitzan Y. Bactericidal Effects of Photoactivate Porphyrins -an Alternative Approach to Antimicrobial Drugs[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology, 1990, 5(3-4):281-293
- [4] Wilson M. Photolysis of Oral Bacteria and Its Potential Use in the Treatment of Caries and Periodontal Disease: A Review [J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1993, 75(4):299-306
- [5] Kömerik N, Wilson M, Poole S. The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria[J]. Photochemistry and Photobiology, 2000, 72(5):676-680
- [6] Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy [PACT] [J]. J. Antimicrob. Chemother, 1998, 42(1):13-28
- [7] Iwersen-Bergmann S, Schmoldt A. Acute intoxication with aniline: detection of acetaminophen as aniline metabolite [J]. Int J Legal Med, 2000, 113(3):171-174
- [8] Wong TW, Wang YY, Sheu HM, Chuang YC. Bactericidal Effects of Toluidine Blue-mediated Photodynamic Action on Vibrio Vulnificus [J]. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 2005, 49(3):895-902
- [9] Matevski D, Weersink R, Tenenbaum HC, et al. Lethal Photosensitization of Periodontal Pathogens by a Red-filtered Xenon Lamp in Vitro [J]. Journal of Periodontal Research, 2003, 38(4):428-435
- [10] Romanova NA, Brovko LY, Moore L, et al. Assessment of Photodynamic Destruction of Escherichia Coli O157:h7 and Listeria Monocytogenes by Using Atp Bioluminescence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(11):6393-6398
- [11] Qin Y, Luan X, Bi L, et al. Toluidine blue mediated photoinactivation of periodontal pathogens from supragingival plaques [J]. Lasers Med Sci, 2008, 23(1):49-54
- [12] Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG, Lin J, Zhou CN. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice [J]. Lasers Med Sci, 2009, 24(2):162-166
- [13] Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, et al. Fluorescence Biodistribution and Photosensitising Activity of Toluidine Blue On Rat Buccal Mucosa[J]. Lasers Med Sci, 2002, 17(2):86-92
- [14] 林江, 毕良佳, 董占海. 甲苯胺蓝介导的光动力对大鼠口腔创口金黄色葡萄球菌感染治疗的研究 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2009, 19(8): 462
- Lin Jiang, Bi Liang-jia, Dong Zhan-hai. Toluidine blue-mediated photodynamic therapy of oral wound infected with Staphylococcus aureus in rats[J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry, 2009, 19(8):462
- [15] Oura T, Tanaka H, Morimoto Y, et al. Sufficient PpIX production for PDT even with short contact time of topically applied 5-ALA in rabbit tongues[J]. Lasers Med Sci., 2008, 23(4):355-360
- [16] Dögnitz N, Salomon D, Zellweger M, et al. Comparison of ALA- and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth distribution in human skin carcinoma [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2008, 93(3):140-148
- [17] Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, et al. Fluorescence Biodistribution and Photosensitising Activity of Toluidine Blue On Rat Buccal Mucosa[J]. Lasers Med Sci, 2002, 17(2):86-92
- [18] Cross S E, Magnusson B M, Winckle G, et al. Determination of the effect of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers [J]. J Invest Dermatol, 2003, 120(5):759-764
- [19] Kanikkannan N, Kandimalla K, Lamba S S, et al. Structure-activity relationship of chemical penetration enhancers in transdermal drug delivery[J]. Curr Med Chem, 2000, 7(6):593-608
- [20] Schaefer H, Stüttgen G, Zesch A, et al. Quantitative determination of percutaneous absorption of radiolabeled drugs in vitro and in vivo by human skin[J]. Curr Probl Dermatol, 1978; 7: 80-94
- [8] Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, et al. Acquired resistance to gefitinib: the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status[J]. Lung Cancer, 2010, 68(2): 198-203
- [9] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: A history of macroautophagy[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822
- [10] Apel A, Hanswalter Z, Büchler MW, et al. Autophagy-A double-edged sword in oncology[J]. Int J Cancer, 2009, 125(5): 991-995
- [11] 潘耀柱. 抑制自噬增加阿霉素对骨髓瘤细胞的促凋亡活性[D]. 西安, 第四军医大学, 2009: 1-104
- Pan Yao-zhu. Autophagy inhibition enhances doxorubicin-induced apoptosis in myeloma cells [D]. Xi'an, Fourth Military Medical University, 2009: 1-104
- [12] Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, et al. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors [J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3336-3346
- [13] Yamamoto C, Basaki Y, Kawahara A, et al. Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations[J]. Cancer Res, 2010, 70(21): 8715-8725
- [14] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting [J]. Autophagy, 2007, 3(6): 542-545
- [15] Ito H, Daido S, Kanzawa T, et al. Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells[J]. Int J Oncol, 2005, 26(5): 1401-1410
- [16] Scott RC, Juhsz G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death [J]. Curr Biol, 2007, 17(1): 1-11
- [17] 王树彦, 周易明, 陈宗祐. 自噬与肿瘤的发生和治疗研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2008, 35(6): 928-934
- Wang Shu-yan, Zhou Yi-ming, Chen Zong-you. Advancement in the study of relations of autophagy, carcinogenesis and cancer therapy[J]. Fudan Univ J Med Sci, 2008, 35(6): 928-934
- [18] Eimer S, Belaud-Rotureau MA, Airiau K, et al. Autophagy inhibition cooperates with erlotinib to induce glioblastoma cell death[J]. Cancer biology & therapy, 2011, 11(12): 1017-1027
- [19] Moreira-Leite FF, Harrison LR, Mironov A, et al. Inducible EGFR T790M-mediated gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cells does not modulate sensitivity to PI103 provoked autophagy[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(6): 765-777

(上接第 5206 页)