

· 论 著 ·

自噬在 A549 肺腺癌细胞耐厄洛替尼中的作用研究*

徐睿, 孙建国, 陈正堂[△]

(第三军医大学附属新桥医院全军肿瘤研究所, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨自噬在 A549 肺腺癌细胞耐厄洛替尼中的作用。方法 不同水平厄洛替尼处理 A549 细胞及其获得性耐厄洛替尼细胞(A549/ER)后,细胞免疫荧光和 Western blot 观察自噬标记蛋白微血管相关蛋白 1 轻链 3-II (MAP1-LC3-II)的变化;应用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)抑制自噬,流式细胞仪(FCM)检测用药后细胞周期及凋亡率。结果 低水平(1.5 μmol/L)厄洛替尼作用下两种细胞 MAP1-LC3-II 表达水平较对照组(0.1% DMSO)均升高,高水平(25 μmol/L)厄洛替尼作用下 A549 细胞 MAP1-LC3-II 表达水平较低水平时降低,而 A549/ER 细胞 MAP1-LC3-II 表达水平较低水平时仍升高。厄洛替尼水平提高至 100 μmol/L 可诱导 A549/ER 细胞凋亡,3-MA 抑制自噬后 A549/ER 细胞的凋亡率从 7.76% 上升至 18.85%。结论 自噬增强了 A549/ER 的耐厄洛替尼作用,抑制自噬可增强厄洛替尼的抗肿瘤作用。

关键词:肺肿瘤;自噬;厄洛替尼;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)12-1324-03

Research on the role of autophagy in A549's resistance of erlotinib*

Xu Rui, Sun Jianguo, Chen Zhengtang[△]

(Institute of Cancer, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of autophagy in A549's resistance of erlotinib. **Methods** After A549 cells were treated with different levels of erlotinib, autophagy was determined by cell immunofluorescence and protein lever of LC3-II was determined by Western blot at certain times. And then afer inhibiting autophagy by the pharmacological inhibitor 3-methyladenine(3-MA), the cell cycle and apoptosis rate were determined by flow cytometry(FCM). **Results** Compared to control group (0.1%DM-SO), the protein levers of MAP1-LC3-II in both A549 and A549/ER were upregulated at low levels(1.5 μmol/L). The protein lever of MAP1-LC3-II in A549/ER was still upregulated while the protein lever of LC3-II in A549 was downregulated at the high level(25 μmol/L). Moreover, A549/ER's apoptosis induced by erlotinib was enhanced after inhibiting autophagy by 3-MA, the apoptosis rate rose from 7.76% to 18.85%. **Conclusion** Autophagy thus represents a role in A549/ER resistance of erlotinib TKIs and inhibiting autophagy may be an approach to improve the efficacy of erlotinib.

Key words: lung neoplasms; autophagy; erlotinib; apoptosis

肺癌中非小细胞肺癌(non-small cell cancer, NSCLC)约占 80%^[1]。近年来分子靶向治疗在 NSCLC 的治疗中表现出良好的临床效果,尤以厄洛替尼(erlotinib)为代表^[2]。然而,临床上部分患者在应用厄洛替尼过程中逐步产生耐药,导致治疗的有效率降低甚至无效^[3]。因此,研究厄洛替尼的耐药机制及增加药物敏感性的方法,已成为亟待解决的问题。

自噬的作用是在细胞营养不良时分解较不重要的细胞结构来提供养分,以满足细胞代谢需要并维持细胞内稳态^[4-5]。已有文献表明,肿瘤细胞可通过提高自噬水平来抵抗放疗打击^[6-10],因此,自噬可能在 NSCLC 细胞耐厄洛替尼作用中发挥作用。本研究中将探讨自噬在 A549 肺腺癌细胞耐厄洛替尼中的作用。

1 材料与与方法

1.1 材料 细胞株:人肺腺癌 A549 细胞株购自上海复祥生物有限公司, A549 获得性耐厄洛替尼细胞(A549/ER)为本实验室诱导所得^[11]。药品与试剂:盐酸厄洛替尼购自南京安格化工有限公司,纯度为 99.13%。RPMI-1640 培养基及新生胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司。蛋白质提取和定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒、细胞免疫荧光试剂盒、细胞

周期和细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天公司。3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)购自 Santa-Cruz 公司。四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、兔抗人 Anti-LC3B 抗体购自 Sigma 公司。GAPDH 抗体购自美国 Signalway 公司,羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌 A549 细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, A549/ER 细胞培养于厄洛替尼终水平为 25 μmol/L 的 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清),两种细胞均置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养,取对数生长期细胞为实验对象。

1.2.2 MTT 实验 A549 细胞及 A549/ER 细胞以 5×10³/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h 后加厄洛替尼 0.01、0.10、1.00、10.00 和 100.00 μmol/L,同时设对照组(0.1% DMSO)和空白组,每组 5 个复孔。培养 48 h 后,每孔加入水平 5 mg/mL MTT 的溶液 20 μL,孵育 4 h 后,弃上清液,加入 150 μL DMSO,置摇床低速振荡 10 min,用酶标仪检测求出 570 nm 处的 OD 值。根据公式求出相应的细胞生长抑制率,求得 IC₅₀ 值。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172070);军队临床高新技术重大项目(2010gxj070)。作者简介:徐睿(1988~),在读研究生,主要从事肺癌靶向药物耐药方面的研究。△ 通讯作者, Tel: (023)68755625; E-mail: zhengtangchen@yahoo.com.cn。

1.2.3 细胞免疫荧光测定 MAP1-LC3-II A549 细胞及 A549/ER 细胞以 1×10^5 /孔接种于 24 孔板,培养 24 h 细胞贴壁后,分别加入含 5、25 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼的培养基继续培养 6 h,同时设对照组(0.1%DMSO),每组 3 个复孔。6 h 后 4%多聚甲醛固定 15 min,含 0.1%的 Triton-X100 的洗涤液于摇床上洗涤 3 次,每次 3~5 min,含 5%BSA 的封闭液封闭 60 min,500 μL 稀释的兔抗人 Anti-LC3B(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 作用过夜,洗涤液洗涤 3 次,每次 3~5 min,加 1 mL 稀释的抗兔 FITC(1:1000),室温下置于摇床避光孵育 60 min,洗涤液洗涤 3 次,每次 3~5 min(避光操作),DAPI 染核 5 min 后置于荧光倒置相差显微镜下观察。

1.2.4 Western blot 检测 MAP1-LC3-II 的表达 按 5×10^4 /孔接种 A549 细胞及 A549/ER 细胞于六孔板中,培养 24 h 后加入厄洛替尼 1、5、25 $\mu\text{mol/L}$,同时设对照组(0.1%DM-SO),分别于加药后 3、6、9、12 h 后提取蛋白质,调整蛋白水平后变性,12%SDS-PAGE 分离蛋白质,转膜后 5%脱脂牛奶封闭 6 h,加一抗[Anti-LC3B(1:1000);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为(1:1000)],4 $^{\circ}\text{C}$ 作用过夜,Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)洗膜,ECL 化学发光检测试剂显影,重复 3 次实验后用 Quantity One 软件 ChemiDOCXRS 成像系统采集图像,计算各组 LC3-II/GAPDH 灰度比值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期与细胞凋亡率 A549/ER 细胞按 1×10^6 /瓶接种于 4 瓶 75 mL 的培养瓶内,培养 24 h 后分别予以以下处理:(1)0.1%DMSO;(2)3-MA 5 mmol/L 处理 2 h;(3)厄洛替尼 100 $\mu\text{mol/L}$;(4)3-MA 5 mmol/L 预处理 2 h 后加入厄洛替尼 100 $\mu\text{mol/L}$ 。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中培养 24 h 后收集细胞加入 70%预冷乙醇 1 mL,混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h,离心去上清液,磷酸盐缓冲液

(PBS)洗两次,加入碘化丙啶(propidium iodide,PI)染液 1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱静置 30 min,用流式细胞仪检测细胞周期与细胞凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

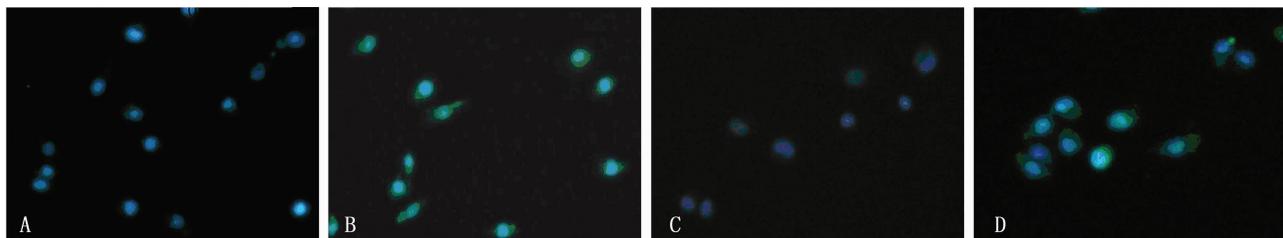
2 结 果

2.1 MTT 法检测 A549/ER 细胞耐药性 不同水平的厄洛替尼对 A549 细胞及 A549/ER 细胞的抑制效应见表 1。根据 SPSS 软件及 IC_{50} 计算软件得到的厄洛替尼对 A549 细胞的 IC_{50} 值为 15.71 $\mu\text{mol/L}$;厄洛替尼对 A549/ER 细胞的 IC_{50} 值为 109.41 $\mu\text{mol/L}$ 。A549/ER 细胞的 IC_{50} 值是 A549 细胞的 IC_{50} 值的 6.95 倍。说明 A549/ER 细胞具有耐药性。

表 1 厄洛替尼对 A549 细胞及 A549/ER 细胞的抑制效应($\bar{x} \pm s, n=3$)

厄洛替尼水平 ($\mu\text{mol/L}$)	抑制率(%)	
	A549 细胞	A549/ER 细胞
0.01	8.18 \pm 3.12	8.31 \pm 4.05
0.10	27.42 \pm 3.65	15.43 \pm 6.50
1.00	31.45 \pm 2.18	23.24 \pm 4.31
10.00	36.14 \pm 4.21	30.54 \pm 6.95
100.00	67.53 \pm 7.85	52.68 \pm 7.94

2.2 免疫荧光检测自噬标记蛋白 MAP1-LC3-II MAP1-LC3-II 为自噬体膜上的特异蛋白,利用 Anti-LC3B 的一抗与之特异性结合,进而利用 FITC 标记的二抗特异性与 Anti-LC3B 的一抗结合,在荧光倒置显微镜下观察。可见厄洛替尼作用后细胞中有绿色荧光分布于胞质内,而对照组未见明显绿色荧光,见图 1。



A: A549/ER 对照组(0.1%DMSO);B: A549/ER 25 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼;C: A549 对照组(0.1%DMSO);D: A549 5 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼。

图 1 免疫荧光检测自噬标记蛋白 LC3-II (FITC 染色 $\times 100$)

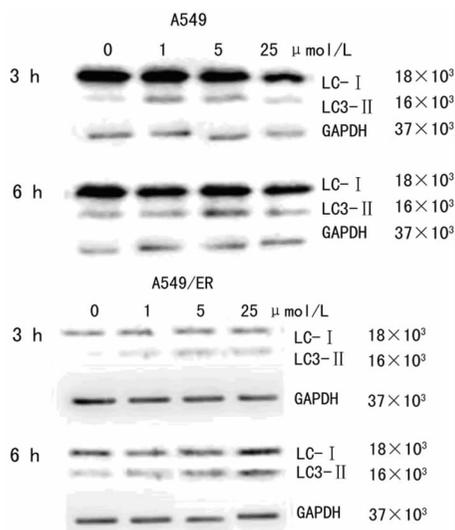


图 2 不同水平厄洛替尼作用 3、6 h 后 LC3-II 的表达

2.3 Western blot 检测 MAP1-LC3-II 的表达 在 1、5 $\mu\text{mol/L}$ 水平厄洛替尼作用 3、6 h 后,A549 细胞及 A549/ER 细胞 LC3-II 的表达较对照组均增强;在 25 $\mu\text{mol/L}$ 水平厄洛替尼作用 3、6 h 后,A549 细胞 LC3-II 的表达与 5 $\mu\text{mol/L}$ 时相比降低,LC3-II 与 GAPDH 光密度比值分别由 0.84 ± 0.07 、 1.49 ± 0.07 下降至 0.36 ± 0.04 、 0.72 ± 0.06 ($P < 0.05$),而 A549/ER 细胞 LC3-II 的表达与 5 $\mu\text{mol/L}$ 时相比仍然增强,LC3-II 与 GAPDH 光密度比值分别由 0.24 ± 0.04 、 0.52 ± 0.07 增加至 0.26 ± 0.08 、 0.75 ± 0.10 ($P < 0.05$),见图 2、3。

2.4 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期与细胞凋亡率 Western blot 证实厄洛替尼为 25 $\mu\text{mol/L}$ 时,A549 细胞已不发生明显的自噬,经 FCM 检测后发现此水平下 A549 细胞即发生凋亡,凋亡率为 12.96%,而此水平下 A549/ER 细胞无凋亡产生。将厄洛替尼水平提高至 100 $\mu\text{mol/L}$ 后,FCM 检测后发现此水平下 A549/ER 细胞发生凋亡,凋亡率为 7.76%;而此水平下 A549/ER 细胞 LC3-II 的表达水平仍高于低水平下 LC3-II

II 的表达水平(图 4);应用自噬抑制剂 3-MA^[12-14]抑制细胞自噬作用后,可以看出相对于单独应用 100 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼组,联合应用了 5 mmol/L 3-MA 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼组细胞的凋亡率升高,为 18.85%,可见抑制自噬后,细胞的凋亡增多。

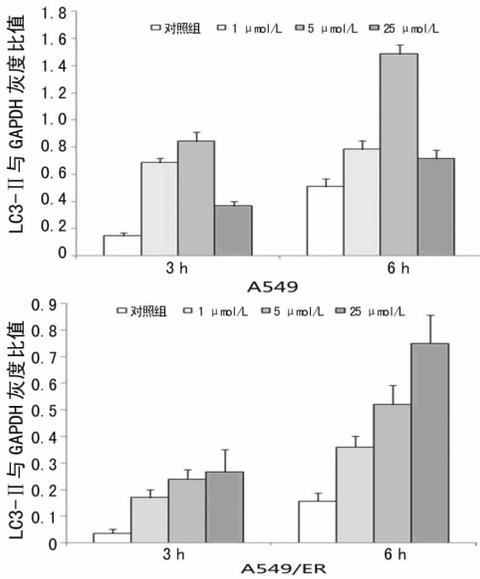


图 3 不同水平厄洛替尼作用 3、6 h 后 LC3-II 与 GAPDH 光密度比值

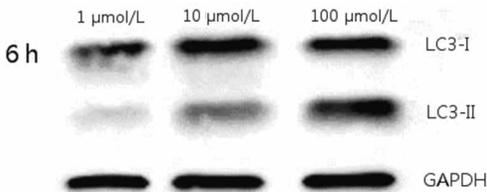


图 4 100 $\mu\text{mol/L}$ 作用 6h 后 A549/ER 细胞 LC3-II 的表达增强

3 讨论

近年来厄洛替尼已经作为治疗 NSCLC 的二线乃至一线药物被逐渐推广开来,原发性或者继发性耐药的问题也随之凸显出来。因此,研究其耐药的机制成为临床前和临床研究的热点。

自噬是细胞一种重要的防御和自我保护机制。已有文献表明,自噬是肿瘤细胞对抗各种抗肿瘤作用的有效手段,针对恶性肿瘤的化疗及放疗均已被证明可以诱导肿瘤细胞的自噬作用^[6-10]。最近研究发现,多种针对不同恶性肿瘤的分子靶向药物,如针对慢性粒细胞白血病的伊马替尼以及针对乳腺癌的曲妥珠单抗^[15-16],亦可诱导肿瘤细胞的自噬作用。本实验中,应用 Western blot 检测 A549 细胞和 A549/ER 细胞在不同水平厄洛替尼作用下不同时间的自噬水平,发现 A549/ER 的 LC3-II 表达水平随着厄洛替尼水平(1~25 $\mu\text{mol/L}$)的增加而升高,而在 A549 细胞中,当厄洛替尼水平为较高的水平(25 $\mu\text{mol/L}$)时,自噬水平较低水平厄洛替尼时降低;同时,FCM 检测出 25 $\mu\text{mol/L}$ 厄洛替尼即可诱导出 A549 细胞的凋亡,其凋亡率为 12.96%,而在同种水平下,未诱导出 A549/ER 细胞的凋亡;当将厄洛替尼水平提高至 100 $\mu\text{mol/L}$ 时才检测出 A549/ER 细胞凋亡的发生,且此时 A549/ER 细胞的 LC3-II 表达水平仍显著高于低水平时的 LC3-II 表达水平;应用自噬

抑制剂抑制 A549/ER 细胞的自噬后,A549/ER 细胞的凋亡率升高。以上研究说明,A549/ER 细胞耐受厄洛替尼的可能原因之一是 A549/ER 细胞有较强的自噬能力,在较高水平的厄洛替尼作用下产生的自噬水平比低水平厄洛替尼下以及非耐药 A549 细胞更高,自噬增强了耐药细胞在高水平厄洛替尼中生存能力,而抑制自噬可以降低 A549/ER 细胞的存活能力,细胞凋亡增加,提示抑制 A549 细胞自噬可增强厄洛替尼的抗肿瘤作用。

参考文献:

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [2] Belani CP, Goss G, Blumenschein G Jr. Recent clinical developments and rationale for combining targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(3): 173-184.
- [3] Jackman D, Pao W, Riely GJ, et al. Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(2): 357-360.
- [4] Coates JM, Galante JM, Bold RJ. Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death [J]. *J Surg Res*, 2010, 164(2): 301-308.
- [5] Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues [J]. *Cancer Lett*, 2009, 278(2): 130-138.
- [6] Altmeyer A, Josset E, Denis JM, et al. The mTOR inhibitor RAD001 augments radiation-induced growth inhibition in a hepatocellular carcinoma cell line by increasing autophagy [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(4): 1381.
- [7] Mohapatra P, Preet R, Das D, et al. Quinacrine-mediated autophagy and apoptosis in colon cancer cells is through a p53- and p21-dependent mechanism [J]. *Oncol Res*, 2012, 20(2/3): 81-91.
- [8] Apel A, Herr I, Schwarz H, et al. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1485-1494.
- [9] Hoyer-Hansen M, Jäättelä M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy [J]. *Autophagy*, 2008, 4(5): 574-580.
- [10] Lomonaco SL, Finnis S, Xiang C, et al. The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(3): 717-722.
- [11] Ma H, Yao Q, Zhang AM, et al. The effects of artesunate on the expression of EGFR and ABCG2 in A549 human lung cancer cells and a xenograft model [J]. *Molecules*, 2011, 16(12): 10556-10569.
- [12] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2491-502.
- [13] Punnonen EL, Marjomäki VS, Reunanen H. 3-Methyladenine inhibits transport from late endosomes to lysosomes in cultured rat and mouse fibroblasts [J]. (下转第 1329 页)

的 FT4/Cr 值进行配对 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=2.436$, $P<0.05$), 见表 1。

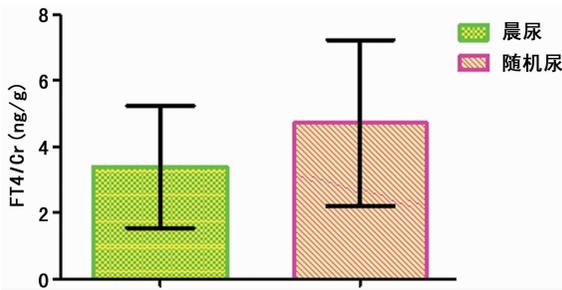


图 5 晨尿和随机尿中 FT4/Cr 的平均水平

3 讨论

除尿常规检查外, 临床应用最广泛的是尿清蛋白检测^[5-6], 其次包括尿液中 Cr、尿酸、电解质、Ig 及几种肿瘤标记物^[7]的检测, 与血液的检测项目相比仅是冰山一角。与其他留取方式相比, 随机尿标本最容易留取, 如能用随机尿代替晨尿(或 8、24 h 尿)进行检测和研究, 则可使尿液检测和研究更加简便易行。

多种疾病后期均可发展成肾脏疾病, 而 RBP 是评判肾小管损伤的理想指标, 并可估计损伤范围^[8-9], 本研究参照本实验室醇类沉淀法提取尿液蛋白的最优策略^[10], 提取尿蛋白并行 Western blot 验证, 可以用随机尿代替晨尿来检测和研究 RBP, 这使 RBP 在肾脏疾病诊断及预后判断方面的应用和研究更加方便可行。

甲状腺是机体重要的内分泌器官, 甲状腺功能紊乱影响人体的生长发育和新陈代谢, 特别是对孕妇及胎儿影响极大^[11-13]。有研究表明, 妊娠期合并亚临床甲状腺功能减退、亚临床甲状腺功能亢进、甲状腺功能减退和甲状腺功能亢进的发生率分别为 3.53%、2.57%、1.12% 和 0.32%^[14], 其中妊娠合并甲减对孕妇和胎儿的健康造成不可逆影响, 及早诊断及干预治疗可大大降低对孕妇和胎儿健康的损害^[15]。本研究尝试开拓尿液检测的新领域, 探索甲状腺功能检测的新途径。结果表明, 经 Cr 校正后, 晨尿和随机尿中 TSH、FT3 水平的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 可以尝试用随机尿研究这些项目与相关疾病的关系; 晨尿和随机尿中 FT4 水平的差异有统计学意义, 需要进一步探讨和研究。

参考文献:

- [1] Methven S, Macgregor MS, Traynor JP, et al. Assessing proteinuria in chronic kidney disease; protein-creatinine ratio versus albumin-creatinine ratio [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(9): 2991-2996.
- [2] Shahbazian N, Hosseini-Asl F. A comparison of spot urine

protein-creatinine ratio with 24-hour urine protein excretion in women with preeclampsia [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2008, 2(3): 127-131.

- [3] 陈晓婷, 李云飞, 张炳峰, 等. 随机尿标本蛋白与肌酐比值在显著性蛋白尿预测中的应用 [J]. *实用医学杂志*, 2006, 22(19): 2305-2307.
- [4] 成守金, 罗云杰, 赵丽萍. 随机尿蛋白/肌酐比值与 24 h 尿蛋白定量的关系及其临床应用的研究 [J]. *中外健康文摘*, 2011, 8(12): 419-420.
- [5] Poudel B, Yadav BK, Nepal AK, et al. Prevalence and association of microalbuminuria in essential hypertensive patients [J]. *N Am J Med Sci*, 2012, 4(8): 331-335.
- [6] Viana LV, Gross JL, Camargo JL, et al. Prediction of cardiovascular events, diabetic nephropathy, and mortality by albumin concentration in a spot urine sample in patients with type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Complications*, 2012, 26(5): 407-412.
- [7] Ganti S, Weiss RH. Urine metabolomics for kidney Cancer detection and biomarker discovery [J]. *Urol Oncol*, 2011, 29(5): 551-557.
- [8] Chinen R, Câmara NO, Nishida S, et al. Determination of renal function in long-term heart transplant patients by measurement of urinary retinol-binding protein levels [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2006, 39(10): 1305-1313.
- [9] 夏运成, 彭灿辉, 屈申, 等. 尿视黄醇结合蛋白与肾小管间质受损的相关性研究 [J]. *中南大学学报: 医学版*, 2011, 36(10): 1008-1011.
- [10] 周慧, 雷婷, 张曼. 醇类沉淀法提取尿液蛋白的优化策略 [J]. *广东医学*, 2012, 33(11): 1534-1536.
- [11] Zimmermann MB. The effects of Iodine deficiency in pregnancy and infancy [J]. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2012, 26 Suppl 1: S108-117.
- [12] El Baba KA, Azar ST. Thyroid dysfunction in pregnancy [J]. *Int J Gen Med*, 2012, 5: 227-230.
- [13] 赵艳晖, 吴富菊, 张炜旸, 等. 妊娠合并甲状腺功能减退症对孕妇及胎儿的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2009, 24(35): 4982-4984.
- [14] 苏会璇, 韦慈, 连冬梅. 妊娠各期孕妇甲状腺激素变化的探讨 [J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(6): 725-727.
- [15] Sahay RK, Nagesh VS. Hypothyroidism in pregnancy [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2012, 16(3): 364-370.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-01-22)

(上接第 1326 页)

- [14] Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, et al. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism [J]. *Eur J Biochem*, 1988, 175(2): 325-329.
- [15] Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including

primary CML stem cells [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(5): 1109-1123.

- [16] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7): e6251.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-01-22)