文章编号:1000-5404(2013)18-1915-06

论著

氟尿嘧啶联合丝裂霉素通过改变自噬作用抑制胆管癌细胞QBC939衰老并促进凋亡

胡 惠[1],王宗鼎[2],李可洲[3],龚建平[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科[1];404600 重庆,重庆市奉节县人民医院普外科[2];610041 成都,四川大学华西医院肝胆胰外科[3])

[摘要] **目的** 观察氟尿嘧啶(5-Fu)联合丝裂霉素(mitomycin,MMC)对胆管癌细胞QBC939的自噬、衰老、凋亡的影响,并探讨自噬、衰老、凋亡之间的相互关系及相关机制。**方法** 5-Fu(25、50、100、150、200 μg/mL)、MMC(0.25、0.50、1.0、1.5、2.0 μg/mL)及两者相应终浓度的混合溶液分别对胆管癌QBC939细胞作用0、24、48 h后,分别用CCK-8法检测细胞增殖并确定后续实验中化疗药物作用时间及联合化疗药物浓度,Annexin V-FITC染色及流式细胞仪检测细胞凋亡,β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老,单丹磺酰尸胺(Monodansylcadaverin,MDC)染色及流式细胞仪检测细胞自噬;用广谱半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)抑制剂Z-VAD-FMK阻断凋亡,用3-甲基腺嘌呤(3-MA)阻断自噬并再次用上述方法检测增殖、自噬、衰老及凋亡变化情况。**结果** 5-Fu联合MMC(终浓度分别为100、1.0 μg/mL)作用24 h时,QBC939增殖受到明显抑制且细胞尚未出现大量死亡,利于各项指标的检测,各组差别有统计学意义($F=26.929$,$P<0.05$);自噬抑制剂作用后,自噬减少,增殖抑制,衰老细胞阳性率降低,细胞凋亡率明显增加($P<0.01$);凋亡抑制剂作用后,凋亡减少,增殖增强、衰老细胞阳性率增高明显,自噬变化不明显。**结论** 5-Fu联合MMC能明显抑制胆管癌细胞QBC939增殖及衰老,促进细胞凋亡,这些变化均与联合化疗药物作用后胆管癌细胞自噬作用的变化有关。

[关键词] 胆管上皮癌;氟尿嘧啶;丝裂霉素;自噬;细胞衰老;细胞凋亡
[中图法分类号] R735.8;R965;R979.1 [文献标志码] A

Combination of fluorouracil and mitomycin inhibits aging and promotes apoptosis in cholangiocarcinoma cell line QBC939 by changing autophagy

Hu Hui[1], Wang Zongding[2], Li Kezhou[3], Gong Jianping[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Department of General Surgery, Fengjie People's Hospital, Chongqing, 404600; [3]Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of fluorouracil and mitomycin on the autophagy, aging, and apoptosis in cholangiocarcinoma cell line QBC939, and investigate the relationship of autophagy, aging, and apoptosis, and the underlying possible mechanisms. **Methods** Fluorouracil (25 to 200 μg/mL), mitomycin (0.25 to 2.0 μg/mL) and their corresponding final concentration of the mixed solution were respectively used to treat QBC939 cells for 0, 24 and 48 h, respectively. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was employed to measure cell viability and determine the combined chemotherapy drug concentration by detecting of cell proliferation. Cell apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC staining, aging by SA-β-Gal staining, and autophagy by flow cytometry with monodansylcadaverin (MDC) staining. Above detections on proliferation, aging, apoptosis and autophagy were carried out again by the same methods after the apoptosis and autophagy were blocked by caspase inhibitor Z-VAD-FMK and 3-methyl adenine (3-MA) respectively. **Results** QBC939 proliferation was significantly inhibited when combination of fluorouracil and mitomycin (with final concentrations of 100 and 1.0 μg/mL respectively) for 24 h, though widespread cell death was not observed. There was significant differences among groups ($F=26.929$, $P<0.05$), and compared with the control group, the autophagy, aging and apoptosis were changed significantly ($P<0.01$). After the treatment of autophagy inhibitor, the level of autophagy was reduced, cell proliferation was inhibited, the amount of senescent cells was decreased, and apoptosis was significantly increased. On the other hand, after the treatment of apoptosis

[基金项目] 四川省中医药管理局重点项目(2012-F-028)
[通信作者] 龚建平,E-mail: Gongjianping11@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130530.0838.004.html(2013-05-30)

inhibitor, cell apoptosis was suppressed, proliferation was enhanced, cell aging was significantly increased, but no significant change was found in autophagy. **Conclusion** Combination treatment of fluorouracil and mitomycin significantly not only reduces cell proliferation but also induces apoptosis in cholangiocarcinoma cells. These changes were related with autophagy in cholangiocarcinoma cells after chemotherapy. Autophagy might be a mechanism for QBC939 cells to avoid adverse environment.

[**Key words**] cholangiocarcinoma; fluorouracil; mitomycin; autophagy; cell aging; apoptosis

Supported by the Key Project of Sichuan Provincial Bureau of Chinese Medicine Administration(2012-F-028). Corresponding author: Gong Jianping, E-mail: Gongjianping11@126.com

胆管癌是胆管上皮细胞发生成瘤性转变而形成的恶性肿瘤[1-2],发病率相比其他肿瘤少见,但在东亚地区,尤其是泰国呈高发趋势[3]。胆管癌在世界不同地区发病率有较大不同。胆管细胞癌在原发性肝癌类型中占第二位,全世界约为15%[3],在日本为5%[4],泰国孔敬地区高达90%[3]。多数胆管癌患者明确诊断时已是晚期,无法行根治性手术,化疗较其他胃肠道肿瘤的化疗敏感性差,可能是由于胆管癌的耐药性、肿瘤内药物浓度低等因素有关。目前全世界在胆管癌发病分子机制以及治疗的研究方面尚无重要的进展[5-6]。

自噬在生命活动中广泛存在于正常细胞生长发育和生理病理过程,自噬是细胞对内外界环境变化的一种反应,自噬在一定情况下还可导致细胞死亡,是区别于细胞凋亡的另外一种细胞程序性死亡形式[7]。自噬作用与恶性肿瘤的存在有密切关系。当细胞所处的环境发生改变,自噬水平发生变化,当免疫功能下降时,自噬抑制肿瘤;而肿瘤细胞在应激情况下,自噬的发生让细胞提高生存率,肿瘤细胞可以依靠自噬作用维持生存和活性,所以有促进肿瘤作用。因此对细胞自噬作用和自噬型细胞死亡的研究具有重要理论意义[8-9]。

化疗主要通过诱导肿瘤细胞发生凋亡、抑制细胞增殖,以及抑制肿瘤血管生成等抑制肿瘤生长,氟尿嘧啶(5-Fu)联合MMC是目前常用的联合化疗方案之一,较单一化疗药物作用显著。目前化疗药物作用具体机制及影响因素还不是很明确,联合化疗药物对肿瘤细胞有较强的促凋亡作用。有研究[10]认为细胞发生自噬是对不良环境下的保护,是一种逃避细胞死亡的方式。肿瘤细胞自噬、衰老、凋亡关系十分密切,其机制可能主要与调控自噬、衰老、凋亡的相关信号通路及P53、Bcl-2、P16等异常表达有关[11],联合化疗药物作用后,细胞环境发生巨大改变,自噬、衰老、凋亡可能都有较大的改变,本研究将通过以下实验探究它们之间的关系,为改进胆管癌化疗的疗效提供新的分子靶点和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞及主要试剂:QBC939由中南大学湘雅医学院细胞中心馈赠;QBC939以含10% 胎牛血清1640培养基于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养;CCK-8试剂盒,细胞凋亡检测试剂Annexin V-FITC,细胞衰老检测试剂盒SA-β-Gal Activity、Z-VAD-FMK均购于碧云天生物研究所;3-MA购自Satraz公司,氟尿嘧啶(5-Fu)注射剂、丝裂霉素(mitomycin,MMC)注射剂、单丹磺酰尸胺MDC染色试剂盒购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8检测QBC939在化疗药物作用下的增殖 取对数生长期的QBC939消化后成单个细胞悬液分空白组、5-Fu组、MMC组、5-Fu + MMC组共4组接种96孔板,12 h后换液,空白组只换液作为阴性对照组,5-Fu组加入5-Fu注射剂稀释溶液至终浓度分别为25、50、100、150、200 μg/mL,MMC组加入MMC终浓度为0.25、0.50、1.0、1.5、2.0 μg/mL,5-Fu + MMC组加入上述两种化疗药使其终浓度与5-Fu、MMC组中相对应的浓度相同。分别培养0、24、48 h后加入20 μL CCK-8继续孵育4 h,酶标仪波长为450 nm测定其光密度值[D(450)]。

1.2.2 CCK-8检测QBC939在化疗药物和自噬抑制剂及凋亡抑制剂作用下的增殖 取5-Fu、MMC抑制增殖明显时浓度联合作用下分别加入3-甲基腺嘌呤(3-MA)(6 mmol/L)、Caspase抑制剂Z-VAD-FMK(50 μmol/L)培养24 h后加入20 μL CCK-8孵育4 h,分别用酶标仪波长为450 nm测定其光密度值。其实验分组分别为:阴性对照组、化疗药物组(5-Fu为100 μg/mL、MMC为1.0 μg/mL)、化疗药物 + 3-MA组、化疗药物 + Z-V-F组、化疗药物 + 3-MA + Z-V-F组,每组设定3复孔。

1.2.3 荧光显微镜观察细胞爬片凋亡情况 取对数生长期的胆管癌细,加入0.25%胰酶消化成单个细胞悬液后计数,按照1×10^4/孔的细胞密度在铺有无菌处理后的盖玻片的24孔板中培养,待细胞贴壁后,去上清按照试验分组加含100 μg/mL 5-Fu及1.0 μg/mL MMC后分别加入Z-VAD-FMK(终浓度为50 μmol/L)和3-MA(6 mmol/L)及两者共培养24 h,设未加化疗药物为空白对照组。每组设置3复孔,按照说明加入Annexin V-FITC、碘化丙啶(propidine iodide, PI)混匀,避光反应5 min,去上清后固定,于荧光显微镜下,双色滤光片(FITC和罗丹明)观察,Annexin V-FITC呈绿色荧光,PI呈红色荧光。

1.2.4　流式细胞仪检测细胞凋亡　取对数生长期的胆管癌细胞，0.25% 胰酶(不含 EDTA)消化细胞后计数按照 1×10^6/孔铺于 24 孔板上，每组设 3 个复孔。待细胞贴壁后，按照试验分组分别按照上述方法加入药物，培养 24 h 后，按照说明书加入 Annexin V-FITC 及 PI，室温、避光、染色 5 ~ 15 min 后加入 400 μL 的 Binding Buffer 于 60 min 内用流式细胞仪检测(激发波长 EX = 488 nm，发射波长 Em = 530 nm)，同时以不加 AnnexinV-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照[Annexin V-FITC 的绿色荧光通过 FITC 通道(FL1)检测；PI 红色荧光通过 PI 通道(FL2 或 FL3)检测]。

1.2.5　β-半乳糖苷酶染色检测细胞衰老　取对数生长期的胆管癌细胞，同 1.2.3 方法制成单细胞悬液，计数后接种 24 孔板，常规条件下培养 12 h 后加入按照 1.2.3 加入试剂培养 24 h 后，按照细胞衰老检测试剂盒说明书配制染色，保鲜膜封住6 孔板防止蒸发，37 ℃孵育过夜。细胞衰老检测机制是 β-半乳糖苷酶催化下以 X-Gal 为底物特异性生成深蓝色产物，在不同处理条件下，SA-β-Gal 活性水平上调从而对衰老细胞进行染色，衰老细胞体积变大，用显微镜即可观察计数[12](每个高倍镜下计阳性率)。

1.2.6　荧光显微镜下观察细胞自噬　MDC 是一种荧光染料，被用作自噬泡的示踪剂，可作为细胞自噬泡的标记物，阳性细胞呈棕黄色。实验细胞以 2×10^5/孔接种于 6 孔培养板中，以 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养，置 37 ℃、饱和湿度 5% CO_2 培养箱，待细胞贴壁后，分别加入如上述不同药物处理 24 h 后，收获细胞 PBS 洗 2 次，去上清，用 0.05 mmol/L MDC 于 37 ℃温育 60 min 后，4% 多聚甲醛固定 15 min，PBS 洗 2 次，晾干后，使用荧光显微镜(Olympus 公司)加 356 nm 发射滤片和 545 nm 断滤片进行观察[13]。

1.2.7　细胞自噬的流式细胞术定量分析　同 1.2.6 方法，用 0.25% 胰蛋白酶消化后以上述 MDC 染色方法染色，用 Elite 流式细胞仪(Coulter 公司，USA)以 488 nm 激发波长，测定 MDC 染色的荧光强度[14]。用 WinMDI 2.9 软件分析结果。

1.3　统计学分析

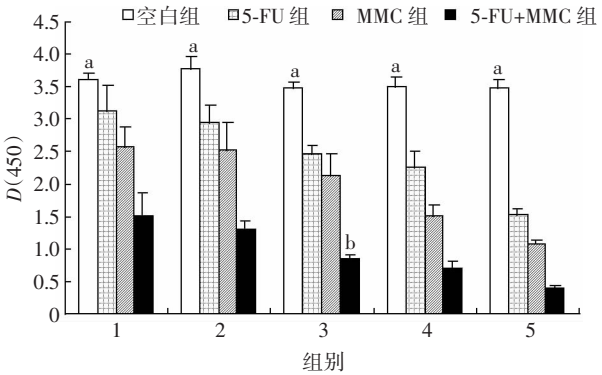
应用 SPSS 17.0 软件统计软件处理数据，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，2 组均数比较采用独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　CCK8 测定 QBC939 细胞增殖

2.1.1　CCK-8 检测 QBC939 在化疗药物作用后的增殖情况

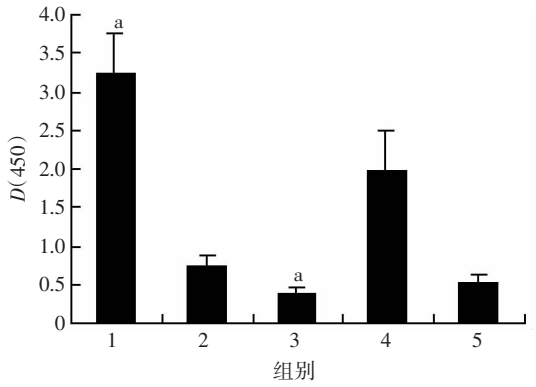
在加入化疗药物 24 h 时，各组有着明显的变化，且未出现大量细胞死亡而影响检测效果，故取 24 h 时各组变化情况进行统计。5-Fu 组、MMC 组、5-Fu + MMC 组随着浓度增加，光密度值逐渐下降，5-Fu + MMC 组药物作用后细胞增殖抑制程度明显高于单药物的 5-Fu 组及 MMC 组，从 5-Fu 和 MMC 分别为 100、1.0 μg/mL 时开始下降较明显，与空白组两两比较，各组差别有统计学意义($F = 26.929$，$P < 0.05$)。见图 1。



a：$P < 0.05$，与药物组比较；b：$P < 0.05$，与不同 MMC + 5-Fu 浓度组比较；空白组：MMC、5-Fu 浓度均为 0 μg/mL；5-Fu 组(1 ~ 5)：5-Fu 浓度分别为 25、50、100、150、200 μg/mL；MMC 组(1 ~ 5)：MMC 浓度分别为 0.25、0.5、1、1.5、200 μg/mL；5-Fu + MMC 组(1 ~ 5)：MMC、5-Fu 浓度分别为 0.25、25 μg/mL，0.5、50 μg/mL，1、100 μg/mL，1.5、150 μg/mL，2、200 μg/mL

图 1　CCK-8 检测 QBC939 细胞在化疗药物作用后的增殖情况

2.1.2　CCK-8 检测自噬抑制剂及凋亡抑制剂对 QBC939 增殖的影响　5-Fu 为 100 μg/mL、MMC 为 1.0 μg/mL 的化疗药物浓度下，加入自噬抑制剂 3-MA(6 mmol/L)、Caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK(20 μmol/L)及两者混合液后培养，在加入 3-MA 即自噬抑制剂组增殖抑制最明显($P < 0.01$)；加入 3-MA 和 Z-VAD-FMK 组和只加入化疗药物组均有明显抑制，而加入 Z-VAD-FMK 凋亡抑制剂组而增殖抑制有所减轻，各组与阴性对照组比较，差异有统计学意义($F = 1548.405$，$P < 0.01$)。见图 2。



a：$P < 0.01$，与其他各组比较；1：阴性对照组；2：化疗药物组(100 μg/mL 5-Fu + 1.0 μg/mL MMC)；3：化疗药物 + 3-MA 组；4：化疗药物 + Z-V-F 组；5：化疗药物 + 3-MA + Z-V-F 组

图 2　CCK-8 检测自噬抑制剂及凋亡抑制剂对各组细胞增殖的影响

2.2　荧光显微镜下观察 QBC939 细胞凋亡

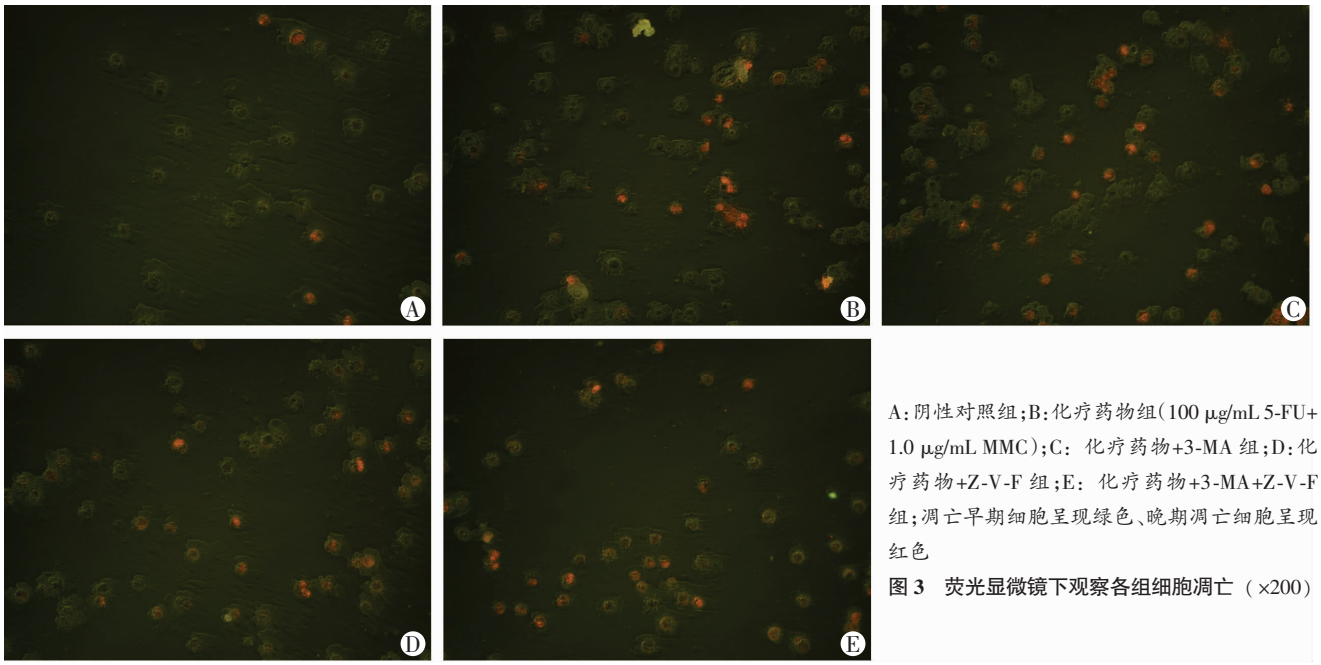
在 24 h 作用后，空白组中少量凋亡细胞被染色，化疗药物组、化疗药物 + 3-MA 组、化疗药物 + Z-V-F 组及化疗药物 + 3-MA、Z-V-F 组均被染色。在加入化疗药物后凋亡数量增加；在加入 3-MA 后凋亡数量增加明显；在加入 Z-V-F 组的数量则有所降低；在加入两者抑制剂后数量回升，但较 3-MA 组下降。见图 3。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

阴性对照组凋亡率为(12.65±0.76)%,化疗药物组为凋亡率为(40.04±0.67)%,化疗药物+3-MA组凋亡率为(50.28±0.65)%,化疗药物+Z-V-F组凋亡率为(23.24±0.61)%,化疗药物+3-MA+Z-V-F组凋亡率为(42.6±1.03)%,各组间差异有统计学意义($F=767.77$,$P<0.01$)。表明化疗药物抑制了细胞生长,诱导细胞发生凋亡;3-MA有促进QBC939发生凋亡;加入凋亡抑制剂后总凋亡率明显下降。

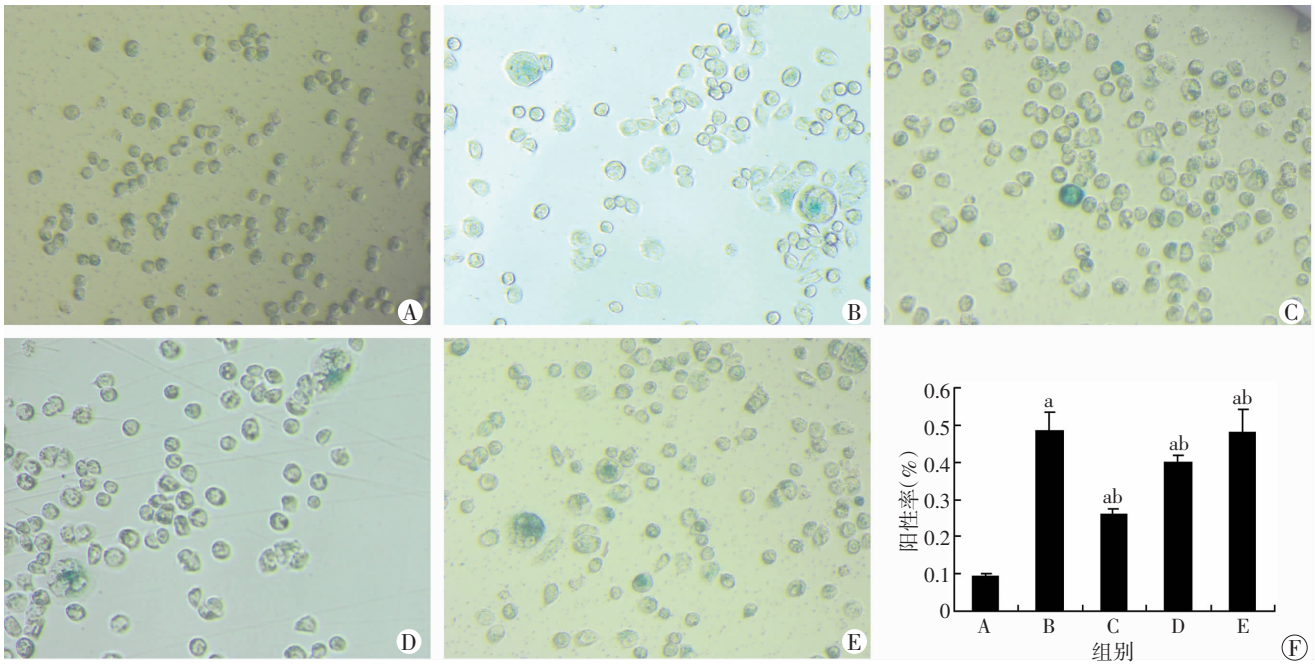
2.4 β-半乳糖苷酶染色检测QBC939细胞衰老

在阴性对照组中未见被染色细胞,化疗药物组、化疗药物+3-MA组、化疗药物+Z-V-F组及化疗药物+3-MA+Z-V-F组染色见衰老细胞,细胞变大,被染成深蓝色;除化疗药物组与化疗药物+3-MA+Z-V-F组组间无明显差异外,其余各组间差别有统计学意义($F=872.137$,$P<0.05$)。见图4。



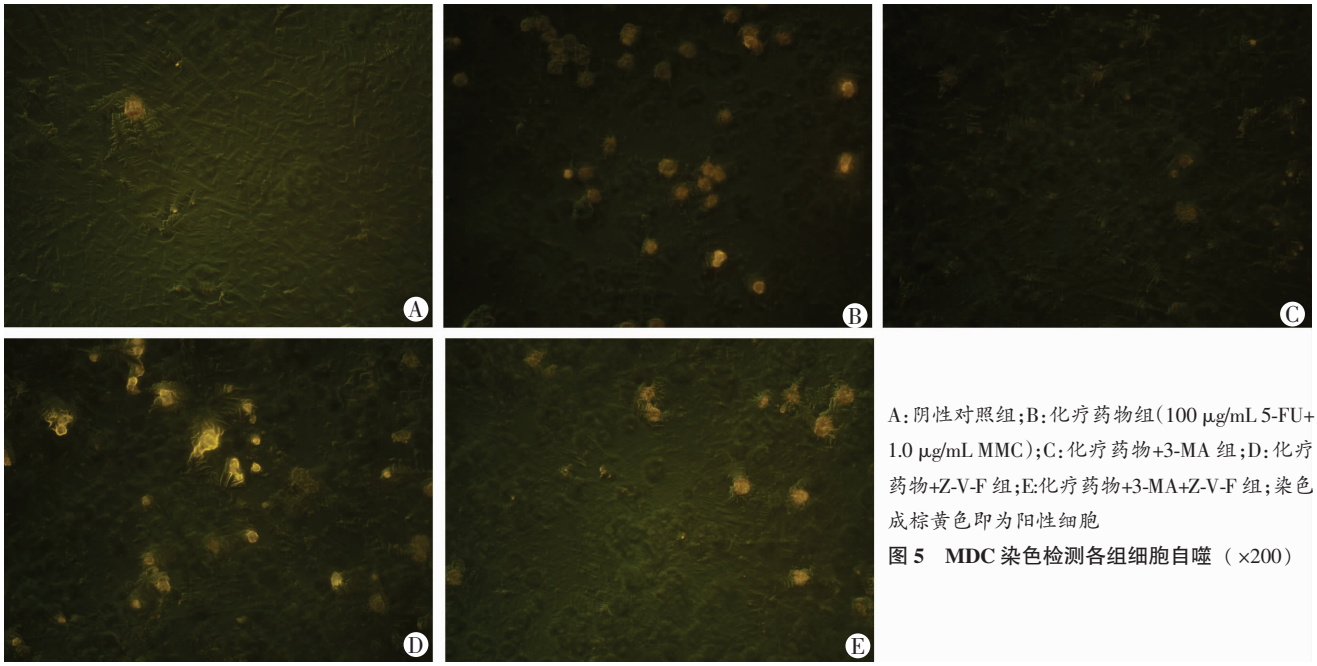
A:阴性对照组;B:化疗药物组(100 μg/mL 5-FU+1.0 μg/mL MMC);C:化疗药物+3-MA组;D:化疗药物+Z-V-F组;E:化疗药物+3-MA+Z-V-F组;凋亡早期细胞呈现绿色、晚期凋亡细胞呈现红色

图3 荧光显微镜下观察各组细胞凋亡(×200)



A:阴性对照组;B:化疗药物组(100 μg/mL 5-Fu+1.0 μg/mL MMC);C:化疗药物+3-MA组;D:化疗药物+Z-V-F组;E:化疗药物+3-MA+Z-V-F组;F:各组阳性率比较 a:$P<0.05$,与阴性对照组比较 b:$P<0.05$,与化疗药物组、化疗药物+3-MA+Z-V-F组比较

图4 β-半乳糖苷酶染色检测各组细胞衰老(×200)



A:阴性对照组;B:化疗药物组(100 μg/mL 5-FU+1.0 μg/mL MMC);C:化疗药物+3-MA组;D:化疗药物+Z-V-F组;E:化疗药物+3-MA+Z-V-F组;染色成棕黄色即为阳性细胞

图5 MDC染色检测各组细胞自噬(×200)

2.5 MDC染色检测细胞自噬

阴性对照组的MDC染色阳性细胞极少,化疗药物组阳性细胞明显增加,化疗药物+3-MA组阳性细胞减少明显,但较阴性对照组多,化疗药物+Z-V-F组阳性细胞较化疗药物组无明显变化,化疗药物+3-MA+Z-V-F组阳性介于化疗药物+3-MA组与化疗药物+Z-V-F组之间。见图5。

阴性对照组荧光强度最低[(17.90±0.98)%],化疗药物组明显升高[(42.41±1.12)%];化疗药物中加3-MA后组荧光强度明显降低[(18.96±0.63)%],加入凋亡抑制剂后升高[(44.34±1.49)%],同时加入两种抑制剂后的其荧光强度介于化疗药物+3-MA组和化疗药物+Z-V-F组之间[(37.35±0.79)%]。各组间差异有统计学意义($F=256.76$,$P<0.01$)。

3 讨论

在本实验中,联合化疗药物5-Fu和MMC对QBC939的作用不仅促进凋亡和抑制细胞增殖,也促进了肿瘤细胞自噬的发生。研究[15-17]表明自噬在肿瘤治疗中起以下两方面作用,在有些肿瘤细胞中,自噬能够承受微环境缺氧、饥饿、某些形式的治疗等刺激,使肿瘤细胞延长应激时间,提高细胞生存率,所以阻碍肿瘤细胞的应激能力、休眠及细胞再生,将可能是提高治疗效果方向之一;另外,自噬在有些情况下有减轻应激时细胞的反应破坏从而抑制肿瘤的发生,通过清除已破坏的蛋白质及细胞器来维持细胞内能量平衡,其机制主要通过减轻肿瘤细胞的基因组破坏,减少慢性细胞死亡和炎症从来抑制肿瘤发生[18-19]。但有不少观点认为自噬是有别于凋亡、坏死的另一种死亡方式[20]。本实验中通过MDC染色及流式细胞技术两种方式检测化疗药物作用后的自噬阳性率均明显增高,说明胆管癌细胞QBC939在联合化疗药物作用下自噬高表达,可能是一种不良环境下的逃避机制。

自噬体的形成在细胞增殖、胞内信号传导等方面起重要作用。我们在通过5-Fu及MMC联合作用24 h后,即确保自噬发生的条件下,通过加入自噬抑制剂3-MA后观察发现自噬数量明显减少,但其相应的凋亡率明显升高,衰老细胞阳性率减少,对细胞增殖的抑制较单纯联合化疗组明显;本研究中自噬抑制剂3-MA有效地抑制化疗时自噬的产生,可能作为细胞的保护机制,抑制自噬反应可以直接或间接促进凋亡细胞数量的增加[21]。

细胞衰老在抑制肿瘤发生方面起着重要作用,近年研究[22]发现了一种与衰老相关的重要标志物——衰老相关β半乳糖苷酶的活性HPIγ,其表示衰老相关异染色质灶形成。本实验根据前者标记用细胞衰老检测试剂盒(SA-β-Gal Activity)检测衰老情况,QBC939在联合化疗药物下出现衰老细胞染成蓝色。我们发现在单纯联合化疗下出现阳性的衰老细胞在加入自噬抑制剂3-MA后数量减少,而在加入凋亡抑制剂Z-VAD-FMK后,衰老细胞明显增加,在同时加入自噬和凋亡两者抑制剂时,衰老细胞明显增加。这些结果表明衰老细胞的出现可能是对联合化疗下的类似于凋亡发生的一种反应形式。

参与细胞凋亡的信号调节通路很多,常见的如P53的激活、抗凋亡家族的Bcl-2、Bcl-XL的抑制等,最终均会导致线粒体膜细胞色素C的释放增加[23-24]和

Caspase 下游级联激活增强,最终诱导凋亡的发生,Caspase 抑制剂则可通过抑制 Caspase-8 活性有效抑制凋亡的发生[25]。本实验中 Z-VAD-FMK 的加入促进了联合化疗药物作用下的细胞增殖,减少了凋亡的发生,其凋亡率较单纯化疗组明显降低,但其相应自噬小体与单纯化疗组比较增加不明显,而衰老细胞明显增加。自噬在联合化疗作用下的胆管癌细胞 QBC939 中可能扮演着保护者的角色,其保护作用可能与凋亡有着平衡的关系,即 QBC939 在不良环境(化疗药物)下,自噬是一种逃避机制,如果自噬量的增加,凋亡、衰老都将有所减弱。在不同的细胞种类上,自噬却扮演着不同的角色,自噬可能作为细胞死亡的一种协调作用,肿瘤细胞如果接受过多的刺激,自噬细胞可过表达 Beclin 1,最终导致细胞死亡,因过度的刺激将导致细胞产生过多的自噬小体,最终因细胞的过度自我消化而不能存活,故称之为自噬性死亡[26-27]。

综上所述,5-Fu 联合 MMC 化疗能明显抑制胆管癌细胞 QBC939 的增殖和衰老,并促进细胞凋亡发生,这些变化均与联合化疗药物作用后胆管癌细胞自噬作用的变化相关。本实验中自噬反应可能是胆管癌细胞 QBC939 逃避化疗药物环境从而逃避凋亡的一种有效机制。这为胆管癌的治疗中潜在的分子靶点以及胆管癌中自噬-衰老-凋亡之间关系的进一步研究提供了很好的基础。

参考文献:

[1] Nakeeb A, Pitt H A, Sohn T A, *et al*. Cholangiocarcinoma. A spectrum of intrahepatic, perihilar, and distal tumors[J]. Ann Surg, 1996, 224(4): 463-475.

[2] Esposito I, Schirmacher P. Pathological aspects of cholangiocarcinoma [J]. HPB (Oxford), 2008, 10(2): 83-86.

[3] Parkin D M, Ohshima H, Srivatanakul P, *et al*. Cholangiocarcinoma: epidemiology, mechanisms of carcinogenesis and prevention[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1993, 2(6): 537-544.

[4] Primary liver cancer in Japan. Clinicopathologic features and results of surgical treatment. Liver Cancer Study Group of Japan[J]. Ann Surg, 1990, 211(3): 277-287.

[5] Mosconi S, Beretta G D, Labianca R, *et al*. Cholangiocarcinoma[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 69(3): 259-270.

[6] Khan S A, Toledano M B, Taylor-Robinson S D. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. HPB (Oxford), 2008, 10(2): 77-82.

[7] Hippert M M, O'Toole P S, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bador both? [J]. Cancer Res, 2006, 66(19): 9349-9351.

[8] Toth S, Nagy K, Palfia Z, *et al*. Cellular autophagic capacity changes during azaserine-induced tumour progression in the rat pancreas. Up-regulation in all premalignant stages and down-regulation with loss of cycloheximide sensitivity of segregation along with malignant transformation [J]. Cell Tissue Res, 2002, 309(3): 409-416.

[9] Levine B. Cell biology: autophagy and cancer[J]. Nature, 2007, 446(7137): 745-747.

[10] 王宠, 张萍, 朱卫国. 细胞自噬与肿瘤发生的关系[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(11): 988-997.

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

[12] Bassaneze V, Miyakawa A A, Krieger J E. Chemiluminescent detection of senescence-associated β galactosidase[J]. Methods Mol Biol, 2013, 965: 157-163.

[13] Liang B, Kong D, Liu Y, *et al*. Autophagy inhibition plays the synergetic killing roles with radiation in the multi-drug resistant SKVCR ovarian cancer cells[J]. Radiat Oncol, 2012, 7: 213.

[14] Munafo D B, Colombo M I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation[J]. J Cell Sci, 2001, 114(Pt 20): 3619-3629.

[15] Jin S, White E. Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress[J]. Autophagy, 2008, 4(5): 563-566.

[16] Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, *et al*. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy[J]. Brain, 2012, 135(Pt 7): 2169-2177.

[17] Rubinsztein D C, Marino G, Kroemer G. Autophagy and aging[J]. Cell, 2011, 146(5): 682-695.

[18] Xu LW, Qian M, Jia R P, *et al*. Expression and significance of microsomal prostaglandin synthase-1 (mPGES-1) and Beclin-1 in the development of prostate cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(4): 1639-1644.

[19] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Assessing metabolic stress and autophagy status in epithelial tumors[J]. Methods Enzymol, 2009, 453: 53-81.

[20] Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(12): 1004-1010.

[21] Hirosako K, Imasato H, Hirota Y, *et al*. 3-Methyladenine specifically inhibits retrograde transport of cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor from the early endosome to the TGN [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(3): 845-852.

[22] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.

[23] Renault T T, Teijido O, Antonsson B, *et al*. Regulation of Bax mitochondrial localization by Bcl-2 and Bcl-x(L): keep your friends close but your enemies closer[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(1): 64-67.

[24] Moul J W. Angiogenesis, p53, bcl-2 and Ki-67 in the progression of prostate cancer after radical prostatectomy[J]. Eur Urol, 1999, 35(5/6): 399-407.

[25] Seth-Pasricha M, Bidle K A, Bidle K D. Specificity of archaeal caspase activity in the extreme halophile Haloferax volcanii[J]. Environ Microbiol Rep, 2013, 5(2): 263-271.

[26] Chaumorcel M, Lussignol M, Mouna L, *et al*. The human cytomegalovirus protein TRS1 inhibits autophagy *via* its interaction with Beclin 1 [J]. J Virol, 2012, 86(5): 2571-2584.

[27] Wang R C, Wei Y, An Z, *et al*. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation[J]. Science, 2012, 338(6109): 956-959.

(**收稿**:2013-04-03;**修回**:2013-05-13)

(编辑 邓强庭)