DOI:10.16016/j.1000-5404.201607106

# 吉西他滨诱导膀胱癌 T24 细胞自噬的实验研究

黄小龙[1,2],张 浩[1],谢香雨[1],杨潇宇[1,2],何卫阳[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院泌尿外科[1],分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室[2])

[摘要] **目的** 观察吉西他滨(gemcitabine,GEM)处理膀胱癌 T24 细胞后引起凋亡的同时是否诱导 T24 细胞自噬的产生,并初步探究其自噬产生的机制,以及自噬与凋亡之间的关系。**方法** 体外培养 T24 细胞,应用 CCK-8 法测定细胞抑制率;Western blot 检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、PARP 的活化,自噬标志蛋白 LC3-Ⅱ、底物蛋白 P62 和自噬潮,以及 JNK 通路相关蛋白 Jnk1、P-Jnk、Bcl-2 的表达情况;并通过透射电镜观察细胞超微结构自噬体的变化;Annexin V-PI 双流式细胞术检测抑制自噬后细胞凋亡率的变化情况。**结果** CCK-8 检测结果显示吉西他滨能有效抑制膀胱癌 T24 细胞增殖;1.0 μg/mL 吉西他滨处理 T24 细胞 4 h 即可发生明显的自噬,透射电镜观察可见自噬体小体的形成;Western blot 检测结果显示吉西他滨作用 T24 细胞后 cleaved-Caspase-3、PARP 和 LC3-Ⅱ表达增高,P62 表达降低;P-Jnk 出现活化,Bcl-2 发生降解;而抑制自噬后能显著增强吉西他滨诱导的膀胱癌 T24 细胞的凋亡。**结论** 吉西他滨介导膀胱癌 T24 细胞凋亡的同时又诱导保护性自噬,JNK 信号通路参与调控其自噬的发生,抑制自噬可以明显增强膀胱癌 T24 细胞对吉西他滨的化疗敏感性。

[关键词] 吉西他滨;T24 细胞;凋亡;自噬;JNK;化疗敏感性
[中图法分类号] R73-36; R737.14; R979.19 [文献标志码] A

# Gemcitabine induces autophagy in human bladder cancer T24 cells

Huang Xiaolong[1,2], Zhang Hao[1], Xie Xiangyu[1], Yang Xiaoyu[1,2], He Weiyang[1]([1]Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether gemcitabine (GEM) will activate autophagy when GEM induced apoptosis in human bladder cancer T24 cells, and explore the underlying mechanism and the relationship between autophagy and apoptosis induced by GEM. **Methods** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the growth inhibition in human bladder cancer T24 cells after GEM treatment. Western blotting was used to detect the apoptosis related proteins Caspase-3 and PARP, autophagy marker proteins LC3-Ⅱ, P62 and autophagy flux, and JNK signaling pathway related proteins Jnk1, P-Jnk and Bcl-2. Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe the intracellular autophagosome. Flow cytometry (FCM) was used to measure cell apoptosis with aid of Annexin V-FITC apoptosis detection kit after inhibition of autophagy. **Results** CCK-8 assay revealed that GEM effectively inhibited the proliferation of T24 cells. GEM treatment of 1.0 μg/mL resulted in obvious autophagy in the cells, and TEM displayed the formation of intracellular autophagosome. The results Western blotting showed the expression levels of cleaved-Caspase-3, PARP and LC3-Ⅱ were elevated, while that of p62 was reduced after GEM treatment. GEM also phosphorylated JNK and suppressed Bcl-2 to activate JNK signaling pathway. Inhibition of autophagy could enhance cell apoptosis in T24 cells after GEM treatment. **Conclusion** GEM induces cell apoptosis in T24 cells, and also induces autophagy to protect the cells against apoptosis at the same time. JNK signaling

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81372758);重庆市自然科学基金(CSTC 2013jcyjA10058)
[通信作者] 何卫阳,E-mail:weiyang361@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161108.1446.004.html

pathway is involved in the regulation of autophagy, and inhibition of autophagy will significantly enhance the chemosensitivity of T24 cells to GEM.

[**Key words**] gemcitabine; T24 cells; apoptosis; autophagy; JNK; chemosensitivity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372758) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jcyjA10058). Corresponding author: He Weiyang, E-mail: weiyang361@aliyun.com

据统计,在全球范围内膀胱癌发病率居全身恶性肿瘤第11位。欧美国家膀胱癌发病率居男性恶性肿瘤第4位,位列前列腺癌、肺癌、结肠癌之后;我国膀胱癌发病率居于泌尿生殖系统恶性肿瘤之首,其患病人数每年均呈上升趋势[1]。吉西他滨(gemcitabine,GEM)是一种抑制DNA合成的脱氧胞嘧啶核苷类似物抗癌药物[2],具有抗脱氧胞嘧啶核苷酸代谢的作用。GEM在脱氧胞嘧啶核苷酸激酶的作用下转化为具有活性的二磷酸及三磷酸核苷,发挥抗肿瘤的作用;并可在DNA聚合酶作用下整合人正在复制的DNA,形成错配,致DNA合成停止,从而抑制肿瘤细胞的生长。GEM还有自我强化的作用,进一步提高细胞内活性复合物浓度[3-4]。因其具有抗瘤谱广、作用机制独特、毒性反应低、与其他化疗药物无交叉耐药且毒性反应无叠加等特点,被广泛应用于非肌层浸润膀胱癌膀胱灌注化疗和肌层浸润性膀胱癌的静脉全身化疗。膀胱癌在组织病理学上以尿路上皮癌最常见,占90%以上,尿路上皮癌已被证明对吉西他滨、铂类以及紫杉醇类化疗药物敏感[5-6],因此,吉西他滨在膀胱癌的治疗上占有非常重要的地位。然而化疗耐药却成为影响吉西他滨治疗效果的重要因素。引起化疗耐药的因素很多。已有研究证实自噬(autophagy)是导致化疗耐药的重要机制,而抑制自噬可以增强肿瘤对化疗药物的敏感性[7]。本实验旨在研究吉西他滨在诱导膀胱癌T24细胞凋亡的同时是否引起自噬的产生,并探讨自噬对其所产生的作用,以期为克服化疗耐药提供新的治疗思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人膀胱癌T24细胞株由重庆医科大学表观遗传与肿瘤实验室赠予;1640培养基购自美国HyClone公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;吉西他滨购自江苏豪森药业股份有限公司,用0.9% NaCl注射液溶解,配制成储存液存放于-30 ℃;CCK-8购自北京碧云天生物技术研究所;兔抗人LC3-Ⅱ抗体购自美国Sigma公司;鼠抗人P62抗体、鼠抗人PARP、兔抗人Caspase-3抗体均购自美国BD公司;鼠抗人JNK1抗体、兔抗人P-JNK抗体、兔抗人Bcl-2抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司;Actin抗体购自钟鼎生物公司;山羊抗兔、山羊抗鼠二抗购自美国Abgent公司;氯喹(chloroquine,CQ)购自美国Selleck公司;3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3MA)购自美国Sigma公司;显影发光液购自美国Millipore公司;凝胶成像仪(法国Fusion FX),酶标仪(美国Themo公司),透射电镜(日本Olympus公司),流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人膀胱癌T24细胞用含10%胎牛血清的1640细胞培养基培养,于37 ℃,5% $CO_2$饱和湿度细胞培养箱中常规传代培养。取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 CCK-8检测不同浓度对T24细胞增殖的影响 取对数生长期的T24细胞,以$5.0\times10^3$/孔接种于96孔板中,待细胞贴壁后分别进行不同浓度药物干预(0、0.01、0.1、1.0、10、100 μg/mL),每孔设置5个复空,每孔终体积200 μL,37 ℃孵箱中培养24 h后取出,每孔加入20 μL CCK-8试剂,继续孵育1 h。用酶标仪于450 nm波长条件下测定各孔光密度值[$D(450)$]。实验重复3次,取均值。计算各组细胞增殖抑制率,并筛选出细胞处理浓度。

$$\text{增殖抑制率}=\frac{1-D(450)_{\text{实验组}}}{D(450)_{\text{细胞对照组}}}\times100\%$$

1.2.3 流式细胞仪Annexin V/PI双标法测细胞凋亡 取对数生长期的人膀胱癌T24细胞,设置空白对照组、吉西他滨(1.0 μg/mL)组、3MA(10 mmol/L)组、3MA(10 mmol/L)+吉西他滨(1.0 μg/mL)组,各组分别经药物处理24 h后,消化、离心(1 000 r/min,5 min)并收集处理后的细胞,按Annexin V-PI凋亡检测试剂盒操作说明进行操作,1 h内上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.4 透射电镜扫描 取对数生长期的人膀胱癌T24细胞,分为对照组、吉西他滨(1.0 μg/mL)组,处理4 h后收集细胞。PBS离心洗涤2次(1 000 r/min,5 min/次),然后将细胞收集于离心管中,加入2.5%戊二醛固定2 h,PBS洗3遍,再用4 ℃预冷的1%锇酸固定1 h,丙酮脱水,树脂包埋,超薄切片(50 nm),经乙酸双氧铀和枸橼酸铅双染色后,透射电镜观察细胞

内超微结构并摄像。

1.2.5　Western blot 检测　　分别收集各组细胞,经 PBS 洗涤,离心(1 000 r/min,5 min),细胞裂解后提取蛋白。并用 BCA 检测蛋白浓度,加热变性后每组取等量蛋白(40 μg)进行 SDS-PAGE 电泳分离,将蛋白转移至 PDVF 膜上,脱脂奶粉封闭 1.5 h 后,加入适当稀释浓度的一抗,4 ℃过夜,复温 1 h,TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min,再滴加适当稀释的二抗,结合 2 h,TBS-T 缓冲液洗膜后显色、曝光。

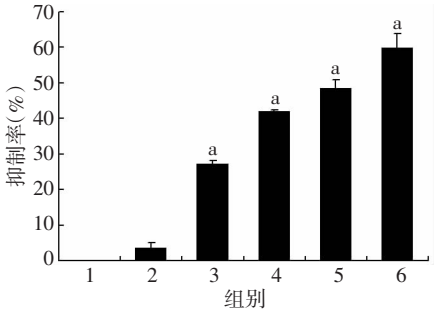
1.3　统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-$t$ 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$。

## 2　结果

2.1　不同浓度对 T24 细胞增殖的影响

用不同浓度 GEM(0、0.01、0.1、1.0、10、100 μg/mL)处理 T24 细胞 24 h,CCK-8 法检测细胞增殖抑制率,结果显示随 GEM 浓度上升,T24 细胞增殖抑制率逐渐上升($P<0.05$,图 1),$IC_{50}$ = (1.103 24 ± 0.055 91) μg/mL,选择 1.0 μg/mL 作为后续实验的处理浓度。




1:对照组;2~6:0.01、0.1、1.0、10、100 μg/mL 吉西他滨处理组;a:$P<0.05$,与对照组比较

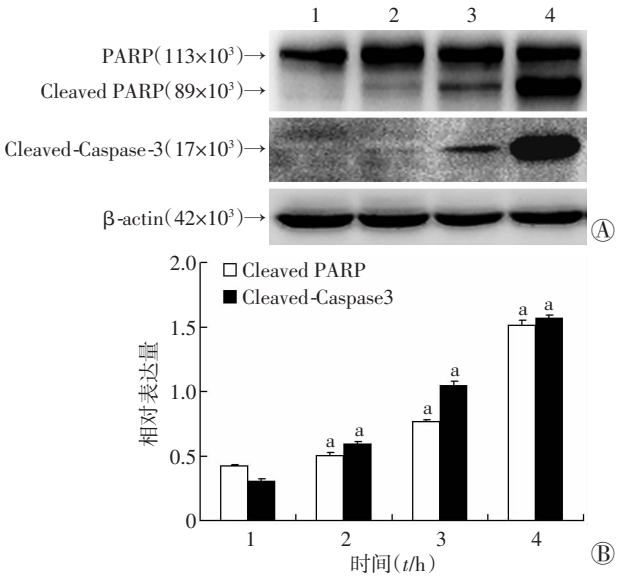
**图 1　CCK-8 法检测不同 GEM 浓度对 T24 细胞增殖的影响**

2.2　GEM 处理不同时间诱导 T24 细胞凋亡

GEM(1.0 μg/mL)处理 T24 细胞 0、12、24、48 h,Western blot 结果显示凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 PARP 随着时间增加活化增强($P<0.05$,图 2),表明 GEM 可以明显诱导膀胱癌 T24 细胞凋亡。

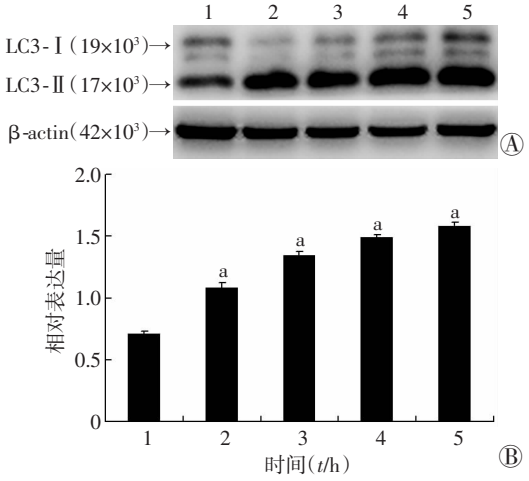
2.3　GEM 诱导 T24 细胞产生自噬

GEM(1.0 μg/mL)处理 T24 细胞 0、1、2、4、8 h,Western blot 检测结果显示自噬标志蛋白 LC3-Ⅱ随时间增加表达增加(图 3),相同浓度处理 T24 细胞 0、8、16、24、48 h,自噬底物蛋白 P62 随时间增加降解增加(图 4)。为进一步证实 LC3-Ⅱ的表达增强是由自噬发生所诱导,溶酶体抑制剂氯喹(CQ,20 μmol/L)预处理 T24 细胞 0.5 h 后加入 GEM(1.0 μg/mL)联合处理 4 h 后检测自噬潮,结果显示 CQ + GEM 组 LC3-Ⅱ表达量较 CQ 单药组高,GEM 组则较低,表明 GEM 引起 LC3-Ⅱ的表达是由自噬引起的,而非自噬下游通路受阻,LC3-Ⅱ降解障碍所导致(图 5)。通过透射电镜观察,GEM(1.0 μg/mL)处理 T24 细胞 4 h 后与对照组相比可出现明显增多的自噬小体(图 6)。提示 GEM 可以诱导 T24 细胞发生自噬。



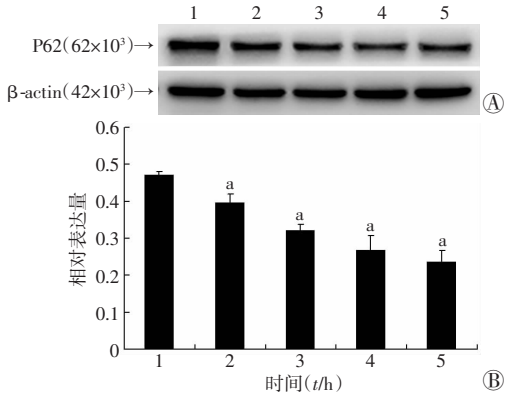

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果　1:0 h;2:12 h;3:24 h;4:48 h;a:$P<0.05$,与 0h 比较

**图 2　Western blot 检测 GEM 处理不同时间诱导 T24 细胞凋亡情况**



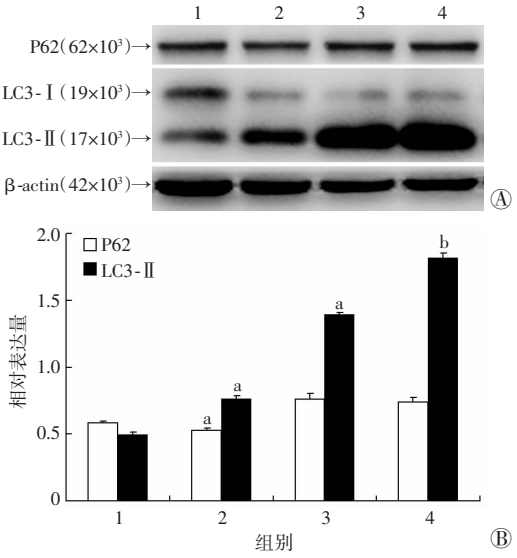

A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果　1:0 h;2:1 h;3:2 h;4:4 h;5:8 h　a:$P<0.05$,与 0 h 比较

**图 3　Western blot 检测 GEM 处理不同时间诱导 T24 细胞 LC3-Ⅱ的表达**



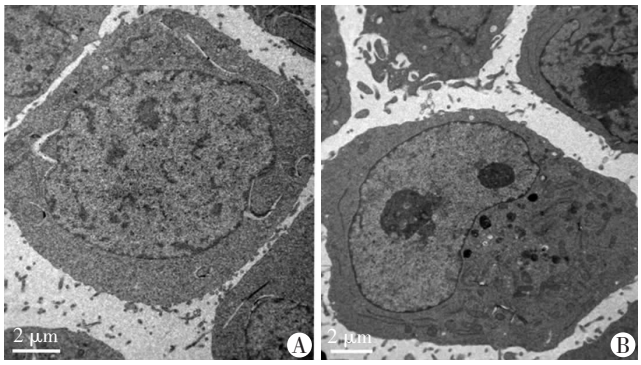

A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:0 h;2:8 h;3:16 h;4:24 h;5:48 h a:$P<0.05$,与 0 h 比较

**图 4 Western blot 检测 GEM 处理不同时间诱导 T24 细胞 P62 的表达**




A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:对照组;2:GEM 处理组;3:CQ 处理组;4:CQ + GEM 联合处理组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 GEM 处理组比较

**图 5 Western blot 检测 GEM 联合 CQ 处理 T24 细胞引起自噬潮及 LC3-Ⅱ、P62 的表达**

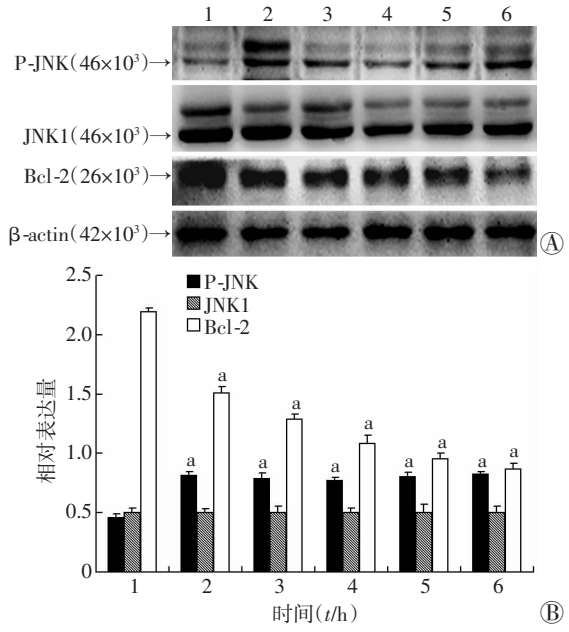



A:对照组;B:GEM 处理组

**图 6 透射电镜观察两组自噬小体变化**

### 2.4 JNK 信号通路参与调控 GEM 诱导 T24 细胞发生自噬

GEM(1.0 μg/mL)处理 T24 细胞 0、0.5、1、2、4、8 h, Western blot 检测 JNK 信号通路相关蛋白 JNK1、P-JNK、Bcl-2,结果随时间增加,P-JNK 出现活化,Bcl-2 逐渐降解(图 7);应用 Jnk 通路抑制剂 SP600125(10 μmol/L)、P38 MAPK 信号通路抑制剂 SB203580(5 μmol/L)预处理 T24 细胞 0.5 h 后加入 GEM(1.0 μg/mL)联合处理 4 h,Western blot 检测 P-JNK、Bcl-2 及自噬标志蛋白 LC3-Ⅱ的表达,结果显示 SP600125(SP) + GEM 组 LC3-Ⅱ表达被抑制,GEM 单药组和 SB203580(SB) + GEM 组 LC3-Ⅱ依然出现活化,SP600125(SP) + GEM 组 P-JNK 未表达,Bcl-2 未发生降解(图 8),进一步证实 JNK 信号通路参与调控 GEM 诱导 T24 细胞发生自噬。



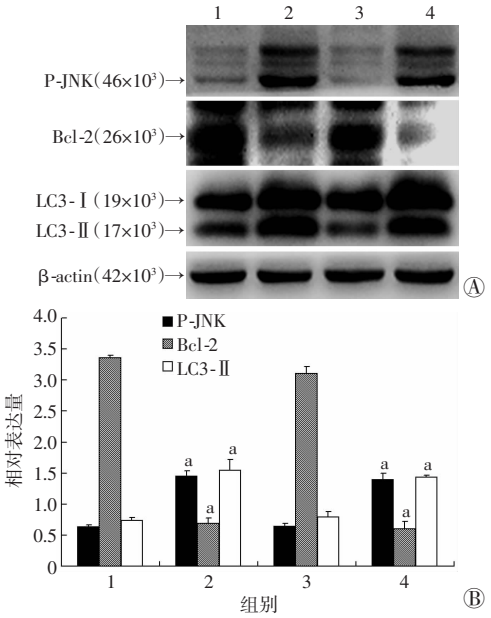

A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1: 0 h; 2: 0.5 h; 3: 1 h; 4: 2 h; 5: 4 h; 6: 8 h a:$P<0.05$,与 0 h 比较

**图 7 Western blot 检测 GEM 作用 T24 细胞后激活 JNK 信号通路**

### 2.5 GEM 诱导 T24 细胞产生保护性自噬

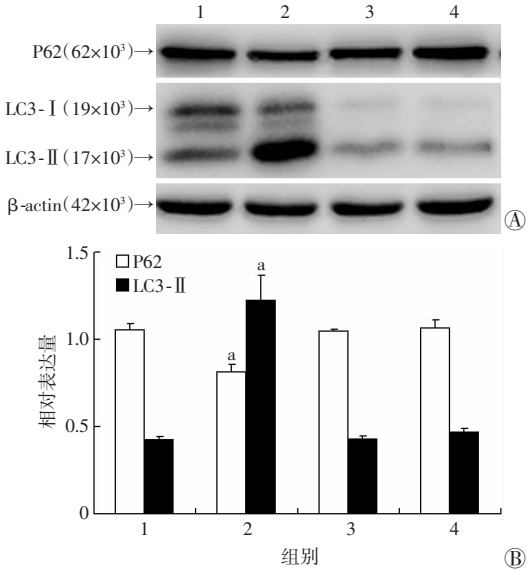
应用自噬抑制剂 3MA(10 mmol/L)预处理 T24 细胞 0.5 h 后加入 GEM(1.0 μg/mL)联合处理 4 h 后 Western blot 检测 LC3-Ⅱ和 P62 的表达,结果显示 GEM 组 LC3-Ⅱ表达增加,P62 发生降解,3MA 组与 3MA + GEM 组 LC3-Ⅱ及 P62 均未发生明显变化(图 9);相同分组处理 24 h 后检测凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 PARP,结果显示 3MA + GEM 组 Caspase-3 与 PARP 的活化较 GEM 单药组明显增强(图 10)。上述分组处理 T24 细胞 24 h 后流式细胞仪检测凋亡也得到了类

似结果,3MA + GEM 组凋亡率(38.17 ± 1.43)% 较 GEM 单药组(27.01 ± 1.39)% 增高($P < 0.05$),对照组(3.78 ± 0.27)% 及 3MA 单药组(4.29 ± 0.92)% T24 细胞的凋亡率均处于低水平。这提示抑制 GEM 诱导的自噬后 T24 细胞的凋亡水平明显增加,该自噬对 T24 细胞起保护作用。



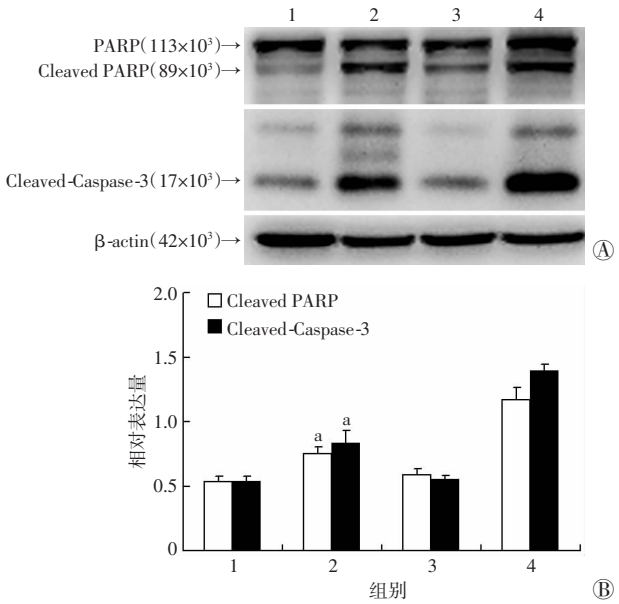

A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:对照组;2:GEM 组;3:SP + GEM 联合处理组;4:SB + GEM 联合处理组 a:$P < 0.05$,与对照组比较

**图 8 Western blot 检测抑制 JNK 通路后检测自噬表达情况**




A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:对照组;2:GEM 处理组;3:3MA 处理组;4:3MA + GEM 联合处理组 a:$P < 0.05$,与对照组及 3MA + GEM 联合处理组比较

**图 9 Western blot 检测 GEM 联合 3MA 抑制自噬的发生**




A: Western blot 检测结果;B:半定量分析结果 1:对照组;2:GEM 处理组;3:3MA 处理组;4:3MA + GEM 联合处理组 a:$P < 0.05$,与对照组及 3MA + GEM 联合处理组比较

**图 10 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达情况**

## 3 讨论

近年来膀胱癌的发病率及病死率已居占我国泌尿外科肿瘤的首位[8-9],化疗在膀胱癌的治疗中占有非常重要的地位。Kilani 等[10]研究发现,GEM 选择性地对人和鼠的膀胱移行细胞癌细胞株产生细胞毒作用,提示是治疗尿路移行细胞癌的有效药物。GEM 作为一种新型脱氧胞嘧啶核苷类似物,目前已被广泛应用于膀胱癌的化疗,特别是对于肌层浸润性膀胱癌,已把 GEM 列为标准方案的一线化疗用药。然而肿瘤耐药却成为化疗失败的常见原因,如何提高化疗药物的化疗敏感性是近年来的研究热点。自噬又称为Ⅱ型程序性细胞死亡,广泛存在于真核细胞,是以胞质内出现双层膜结构包裹长寿命蛋白和细胞器的自噬体为特征的细胞"自我消化"的一系列生化过程,对细胞的生长发育和调节细胞内环境的稳定起着重要作用[11]。目前普遍认为自噬是一种防御和应激调控机制,当肿瘤细胞受到各种损伤因素作用时,自噬可以成为细胞应激条件下的一种保护反应[12]。自噬与肿瘤的发生和发展具有重要关系,是当前国际肿瘤研究中的热题。大量研究表明,大多数抗肿瘤药物在诱导肿瘤细胞凋亡的同时也诱导了肿瘤细胞发生自噬[13-14],该自噬可以成为细胞应激条件下的一种保护性反应[15],使细胞维

持自身微环境的稳态,从而耐受化疗药物的细胞毒性;而通过使用 CQ、3MA、羟基氯喹等自噬抑制剂或者通过沉默自噬相关基因 ATG5、ATG6、ATG7、ATG8 等手段抑制自噬均能显著提高化疗的敏感性[16-17]。这提示肿瘤细胞发生的保护性自噬可能是肿瘤耐药的重要机制,这也使得自噬成为肿瘤治疗的一个新靶点。

以酶原形式存在于细胞质中的 Caspase-3 被激活生成活性片段 cleaved-Caspase-3,以及多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase,PARP)活化被看作是细胞发生凋亡的标志[18]。LC3-Ⅱ是哺乳动物细胞中酵母 Atg8 的同源物,定位于自噬体膜上,是自噬体的标志分子[19]。P62 是一个泛素结合蛋白,由自噬溶酶体降解,与自噬水平呈负相关,同样可用于自噬的检测[20]。在自噬的检测手段中,电镜可以定性的检测细胞自噬发生的一系列超微结构(如隔离膜、自噬泡、自噬溶酶体)变化,被视为检测自噬发生的金标准[21]。C-Jun 氨基末端蛋白激酶(C-jun N-terminal protein kinase,JNK)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)家族中的一员,是最常见的 Bcl-2 激酶并以非环状结构形式在 T69,S70 及 S87 多位点调节 Bcl-2 多位点的磷酸化,导致 Bcl-2 与 Beclin 1 的分离,从而调节自噬的发生,是目前研究较多的自噬信号通路之一[22]。当前国内外大多数研究表明自噬在肿瘤的放疗、化疗以及靶向治疗中呈现出保护作用[23-24],是导致肿瘤出现耐药的重要原因。本实验重点探究 GEM 诱导 T24 凋亡的同时是否也引起自噬的发生,并探讨该自噬与凋亡之间的关系。

本实验结果显示:用 GEM 处理膀胱癌 T24 细胞后,CCK-8 检测结果显示 T24 细胞增殖抑制率与 GEM 呈浓度相关性,Western blot 检测结果显示随着时间增加 cleaved-Caspase-3、PARP 和 LC3-Ⅱ均出现表达量增加,而 P62 的表达量逐渐下降,表明 GEM 在诱导 T24 细胞凋亡的同时也诱导了自噬的发生。透射电镜下观察到的自噬小体以及“自噬潮”的出现也进一步证实 GEM 诱导 T24 发生自噬。参与调控自噬发生的机制复杂,是目前的研究热点。文献[22]报道细胞在饥饿状态下可通过激活 JNK 信号通路而诱导自噬的发生,为了探究 JNK 信号通路是否参与 GEM 诱导 T24 所发生的自噬,Western blot 检测结果显示 JNK 信号通路相关蛋白被激活,提示 JNK 信号通路可能参与 GEM 诱导 T24 产生的自噬,使用 JNK 通路抑制剂 SP600125 抑制 JNK 信号通路后 LC3-Ⅱ的表达受到抑制,进一步证实 GEM 诱导 T24 细胞产生的自噬受 JNK 信号通路的调控。为了探讨 GEM 诱导的自噬与凋亡的关系,本实验应用自噬抑制剂 3MA 抑制自噬后通过 Western blot 检测凋亡标志蛋白及流式细胞术检测凋亡,结果显示抑制自噬后 T24 发生的凋亡率较 GEM 单药组高,表明 GEM 诱导的自噬对 T24 起保护作用。

综上所述,GEM 在诱导人膀胱癌 T24 细胞凋亡的同时还诱导产生自噬,该自噬对 T24 细胞起保护作用,JNK 信号通路参与调控其自噬的发生,抑制其自噬后可以增强 T24 对 GEM 化疗敏感性即凋亡增加。本实验的开展对增强 GEM 抗肿瘤疗效有一定的参考价值。

**参考文献:**


[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al*. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29. DOI: 10.3322/caac.21208

[2] Reddy L H, Couvreur P. Novel approaches to deliver gemcitabine to cauces[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14 (11): 1124-1137. DOI: 10.2174/138161208784246216

[3] Paola E D, Alonso S, Giuliani R, *et al*. An open-label, dose-finding study of the combination of satraplatin andgemcitabine in patients with advanced solid tumors[J]. Front Oncol, 2012, 2: 175. DOI: 10.3389/fonc.2012.00175

[4] Zhang J, Wang Z, Hu X, *et al*. Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer [J]. Int J Cancer, 2015, 136(1): 204-211. DOI: 10.1002/ijc.28966

[5] 顾方六. 尿路上皮肿瘤的诊断和治疗//吴阶平主编. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 2004: 959-980.

[6] 叶定伟, 戴波, 方银忠, 等. 吉西他滨联合顺铂方案治疗晚期尿路上皮移行细胞癌 18 例报告[J]. 中华泌尿外科杂志, 2005, 26: 331-333. DOI: 10.3760/j: issn: 1000-6702.2005.05.014

[7] Sui X, Chen R, Wang Z, *et al*. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e828. DOI: 10.1038/cddis.2013.350

[8] 温登瑰, 单保恩, 张思维, 等. 2003-2007 年中国肿瘤登记地区膀胱癌的发病与死亡分析[J]. 肿瘤, 2012, 32(4): 256-262. DOI: 10.3781/j.issn.1109-0721.2012.04.006

[9] 那彦群, 叶章群. 中国泌尿外科疾病诊断治疗指南手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.

[10] Kilani R T, Tamimi Y, Karmali S, *et al*. Selective cytotoxic-

ity of gemcitabine in bladder cancer cell lines[J]. Anticancer Drugs, 2002, 13(6): 557 – 566. DOI: 10.1097/00001813-200207000-00002

[11] Klionsky D J. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve[J]. Autophagy, 2008, 4(6): 740 – 743. DOI: 10.4161/auto.6398

[12] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, *et al*. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075. DOI: 10.1038/nature06639

[13] Kaminskyy V O, Zhivotovsky B. Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(1): 86 – 102. DOI: 10.1089/ars.2013.5746

[14] Mani J, Vallo S, Rakel S, *et al*. Chemoresistance is associated with increased cytoprotective autophagy and diminished apoptosis in bladder cancer cells treated with the BH3 mimetic (–)-Gossypol (AT-101)[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 224. DOI: 10.1186/s12885-015-1239-4

[15] 吴亚冉, 倪振洪, 闫小晶, 等. 盐酸吡柔比星通过上调ATG4B增强HeLa细胞保护性自噬[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(2): 129 – 135. DOI: 10.16016/j.1000-5405.201506001

[16] Liang B, Liu X, Liu Y, *et al*. Inhibition of autophagy sensitizes MDR-phenotype ovarian cancer SKVCR cells to chemotherapy[J]. Biomedecine & pharmacotherapie, 2016, 82: 98 – 105. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.04.054

[17] He W, Wang Q, Xu J, *et al*. Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2-and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK Activation[J]. Autophagy, 2012, 8(12): 1811 – 1821. DOI: 10.4161/auto.22145

[18] Napso T, Fares F. Zebularine induces prolonged apoptosis effects *via* the caspase-3/PARP pathway in head and neck cancer cells[J]. Int J Oncol, 2014, 44(6): 1971 – 1979. DOI: 10.3892/ijo.2014.2386

[19] Holt S V, Wyspianska B, Randall K J, *et al*. The development of an immunohistochemical method to detect the autophagy-associated protein LC3-Ⅱ in human tumor xenogrufts[J]. Toxicol Pathol, 2011, 39(3): 516 – 523. DOI: 10.1177/0192623310396903

[20] Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor[J]. FEBS J, 2015, 282(24): 4672 – 4678. DOI: 10.1111/febs.13540

[21] 郝刚, 孙天胜, 李绍光. 哺乳动物自噬检测技术的研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(6): 1531 – 1533. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.06.041

[22] Wei Y, Pattingre S, Sinha S, *et al*. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-inducedautophagy[J]. Mol Cell, 2008, 30(6): 678 – 688. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.06.001

[23] 彭文颖, 杨宇. 保护性自噬介导肿瘤细胞对化疗耐药研究进展[J]. 医学临床研究, 2015, 32(12): 2407 – 2411. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7171.2015.12.037

[24] 秦利燕, 王滨, 倪振洪, 等. 索拉非尼诱导肝癌HepG2细胞自噬的机制及意义[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(22): 2435 – 2438. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2013.22.025

(**收稿**:2016-07-16;**修回**:2016-11-02)

(编辑 龙 亮)