

沉默 SIRT1 降低胆管癌细胞对 5-氟尿嘧啶的耐药 :基于抑制 FOXO1/Rab7 自噬通路

辛辰¹, 王笑影², 李响¹, 陈宇¹, 王雪¹, 宁佳曦¹, 杨适¹, 王忠琼¹
西南医科大学附属医院¹消化内科,²麻醉科, 四川 泸州 646000

摘要:目的 探讨 SIRT1 靶向 FOXO1/Rab7 自噬通路调节胆管癌细胞 5-氟尿嘧啶(5-FU)耐药的机制。方法 不同浓度(50、100、150、200 μg/mL)的 5-FU 处理 HCCC-9810 细胞构建 HCCC-9810/5-FU 耐药细胞模型,免疫荧光检测细胞中 SIRT1 表达情况,Western blot 和 q-PCR 检测 SIRT1、FOXO1、Rab7 表达水平,Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin1、LC3、p62 表达水平。SIRT1 siRNA 和 NC siRNA 转染 HCCC-9810/5-FU 耐药细胞,CCK-8 检测细胞耐药性,划痕实验检测细胞迁移能力,RT-qPCR 检测 FOXO1、Rab7 mRNA 水平,Western blot 检测 SIRT1、FOXO1、Rab7、Beclin1、LC3、p62 蛋白表达水平。结果 不同浓度(50、100、150、200 μg/mL)的 5-FU 均能抑制 HCCC-9810 细胞增殖。与对照组相比,HCCC-9810/5-FU 耐药细胞中 SIRT1 荧光强度略有增强;SIRT1、Rab7、p62、FOXO1 和 Beclin 1 蛋白表达上调($P<0.01$),LC3II/LC3I 比值增加($P<0.001$);SIRT1、Rab7 和 FOXO1 mRNA 水平上调($P<0.05$)。沉默 SIRT1 表达后,HCCC-9810 细胞的 5-FU 耐药性降低,细胞迁移能力降低,SIRT1($P<0.01$)、Rab7($P<0.05$)、p62($P<0.05$)、FOXO1($P<0.01$)和 Beclin1($P<0.001$)蛋白表达降低,LC3II/LC3I 比值降低($P<0.001$);FOXO1 和 Rab7 mRNA 水平降低($P<0.05$)。结论 沉默 SIRT1 的表达抑制 FOXO1/Rab7 自噬通路激活。
关键词:SIRT1;FOXO1/Rab7 自噬通路;胆管癌细胞;5-氟尿嘧啶;耐药性

Silencing SIRT1 reduces 5-fluorouracil resistance of cholangiocarcinoma cells by inhibiting the FOXO1/Rab7 autophagy pathway

XIN Chen¹, WANG Xiaoying², LI Xiang¹, CHEN Yu¹, WANG Xue¹, NING Jiayi¹, YANG Shi¹, WANG Zhongqiong¹

¹Department of Gastroenterology, ²Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which SIRT1 silencing reduces 5-fluorouracil (5-FU) resistance of cholangiocarcinoma cells and the role of FOXO1/Rab7 autophagy pathway in mediating this effect. **Methods** Human cholangiocarcinoma HCCC-9810 cells were treated with 50, 100, 150, and 200 μg/mL 5-FU to construct a 5-FU-resistant cell model, whose expressions of SIRT1, FOXO1 and Rab7 were detected with immunofluorescence assay, Western blotting and RT-qPCR, and the expression levels of autophagy related proteins (Beclin1, LC3, and p62) were detected with Western blotting. The 5-FU resistant cells were transfected with a SIRT1 siRNA, and the changes in 5-FU resistance and migration ability of the cells were evaluated using CCK-8 assay and wound healing assay; The changes in FOXO1 and Rab7 mRNA levels and protein expressions of SIRT1, FOXO1, Rab7, Beclin1, LC3 and P62 were detected with RT-qPCR and Western blotting. **Results** Treatments with 5-FU at 50, 100, 150, and 200 μg/mL all inhibited the proliferation of HCCC-9810 cells. Immunofluorescence assay revealed significantly enhanced SIRT1 expression in 5-FU-resistant HCC-9810 cells, and Western blotting also showed significantly up-regulated protein expressions of SIRT1, Rab7, P62, FOXO1 and Beclin 1 ($P<0.001$) and an increased LC3II/LC3I ratio in the cells ($P<0.001$). The mRNA levels of SIRT1, Rab7 and FOXO1 were also up-regulated in 5-FU-resistant cells ($P<0.05$). SIRT1 silencing significantly attenuated 5-FU resistance and migration ability of HCCC-9810 cells, and obviously decreased the protein expressions of SIRT1, Rab7, P62, FOXO1 and Beclin1 and the LC3II/LC3I ratio as well ($P<0.001$). FOXO1 and Rab7 mRNA levels were significantly decreased in 5-FU-resistant HCC-9810 cells after SIRT1 silencing ($P<0.05$). **Conclusion** Silencing SIRT1 attenuates 5-FU resistance in HCC-9810 cells by inhibiting the activation of the FOXO1/Rab7 autophagy pathway.

Keywords: SIRT1; FOXO1/Rab7 autophagy pathway; cholangiocarcinoma cells; 5-fluorouracil; drug resistance

胆管癌(CCA)是一种高度恶性的肿瘤,其发病率和死亡率在全球范围内呈上升趋势^[1,2]。5-氟尿嘧啶(5-FU)是已被用作治疗CCA的一线化疗药物,然而由于其副作用和耐药性,5-FU的临床应用受到很大限制^[3,4]。因此,深入了解CCA的多重耐药分子机制有助于开发

CCA新的治疗策略。研究表明,自噬的发生可能与CCA的恶性表型和预后不良有关,自噬可能参与了EMT相关的CCA细胞侵袭^[5]。自噬促进癌症进展和耐药性。多个基因在自噬诱导的肿瘤发生和耐药性中起重要作用,包括 Beclin-1、HMGB1、p53等^[6,7]。调节自噬是癌症药物开发的一个新的未来方向,可能有助于预防疾病进展和克服耐药性问题。一些 Rab 蛋白在 TNF-α 诱导的侵袭性 CCA 细胞中被上调,特别是 Rab7,它是小 GTPase 超家族的成员,在吞噬体的转运

收稿日期:2022-08-16

基金项目:西南医科大学校级课题(2020ZRQNB054)

作者简介:辛辰,硕士,E-mail: 644765240@qq.com

通信作者:王忠琼,副教授,E-mail: xewyxx20220712@163.com

和与溶酶体的融合过程中发挥了重要作用^[8]。Rab7的改变已被引入多种癌症,以促进或抑制癌细胞增殖、迁移、侵袭、转移和自噬等功能。FOXO1在肿瘤的自噬调节中发挥关键作用,但其机制未明^[9]。SIRT1作为NAD⁺依赖性脱乙酰酶,在肿瘤代谢和营养调节中有着极其重要的作用,参与到细胞衰老、凋亡和自噬等生理活动^[10]。然而,SIRT1抑制肿瘤细胞自噬的机制尚不清楚,特别是SIRT1对FOXO1/Rab7通路的调控作用。

胆管细胞肝癌诊断困难,切除率低,HCCC-9810是一株胆管细胞肝癌细胞系,它的细胞形态以方形、多边形和梭形为主,经历多次传代,梭形细胞持续存在是其特征之一,这与多数肝细胞癌细胞以方形为主明显不同,可作为了解胆管细胞肝癌的生物学特性的理想模型。因此,本研究选择HCCC-9810细胞,建立HCCC-9810/5-FU耐药细胞模型,将siRNA转染到耐药细胞中,探讨SIRT1 siRNA对自噬的影响,从而研究胆管癌5-FU耐药的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

胆管癌细胞HCCC-9810来源于西南医科大学附属医院。HCCC-9810细胞用含100 μg/mL链霉素、100 U/mL青霉素及10%胎牛血清的DMEM培养基进行常规培养,细胞板放置于37 °C,5% CO₂的细胞培养箱,在细胞生长、融合至80%~90%时,使用胰蛋白酶消化及分瓶传代,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.2 试剂与仪器

RIPA裂解缓冲液、Bradford蛋白浓度测定试剂盒、RapidStep™ ECL试剂(中国成都里来佳诺生物科技有限公司)。Anti-Beclin 1 antibody、Anti-LC3-I/II antibody、Anti-SIRT1 antibody、Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647)、Anti-Rab7 antibody、Anti-FOXO1 antibody、胎牛血清(中国成都睿琪生物科技有限公司)。DMEM培养基、Trizol试剂、5-FU、实时荧光定量PCR检测试剂盒、RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、CCK-8试剂盒、siRNA和NC siRNA(中国成都旭海润东生物科技有限公司)。

1.3 HCCC-9810/5-FU耐药细胞模型

取对数生长期的HCCC-9810细胞接种于96孔板,将不同浓度(0、50、100、150、200 μg/mL)的5-FU依次加入96孔板,每孔设3个复孔,每孔加入含有FBS胎牛血清的RPMI 1640培养基,置于37 °C,5% CO₂培养箱中培养。24 h后,CCK-8法检测IC₅₀及癌细胞耐药指数(判断造模是否成功),耐药指数≥2表明耐药细胞模型建立成功。分组可标记为对照组(HCCC-9810细胞)和模型组(HCCC-9810/5-FU耐药细胞)。

1.4 细胞转染

将HCCC-9810/5-FU耐药细胞接种于96孔板,每孔 2×10^5 细胞,根据Lip3000转染试剂说明书将SIRT1 siRNA和NC siRNA分别转染HCCC-9810/5-FU耐药细胞,培养24 h后,用于后续实验检测。转染分组为:SIRT1 siRNA组和NC siRNA组。按实验分组处理细胞48 h后,加入10 μL的CCK-8溶液,在37 °C下再孵育2 h,使用酶标仪测量450 nm处的吸光度值A,检测细胞耐药性。

1.5 检测指标

1.5.1 划痕实验检测细胞迁移能力 将HCCC-9810细胞接种于六孔板中,100 μL枪头垂直于孔板制作细胞划痕,尽量保证各个划痕宽度一致。吸去细胞培养液,用PBS冲洗孔板3次,洗去划痕产生的细胞碎片。加入无血清培养基,拍照记录。将培养板放入培养箱培养,24 h后再取出拍照,记录特定位置细胞的生长迁移能力。

1.5.2 Western blot检测SIRT1、FOXO1、Rab7、Beclin1、LC3和p62蛋白表达 将HCCC-9810细胞接种于六孔板中,按实验分组处理细胞24 h后收集细胞,然后加入RIPA裂解液在冰上裂解细胞,提取细胞蛋白,并用Bradford蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行测定。每孔上样10 μg总蛋白,通过SDS-PAGE电泳分离,然后转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,再用Tris-buffer稀释的5%的脱脂奶粉封闭2 h,随后,滴加50 μL的一抗,4 °C孵育过夜,PBS洗膜,滴加二抗山羊抗兔IgG (HRP)抗体,室温下与膜孵育1 h。最后,采用Rapid-Step™ ECL试剂显影目的条带。β-actin被用作内参。采用image J软件计算各组灰度值,并采用SPSS统计分析结果的差异性。

1.5.3 实时定量PCR法检测相关mRNA 将HCCC-9810细胞接种于六孔板中,按实验分组处理细胞24 h后收集细胞,加入Trizol试剂提取总RNA提取,使用无RNA酶水溶解后测定RNA纯度和浓度。使用TakaRa反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,利用PCR仪扩增cDNA进行实时定量聚合酶链反应。扩增cDNA反应条件为:95 °C预变性10 min,95 °C变性20 s,58 °C退火30 s,72 °C延伸45 s,一共40个循环。以GAPDH作为内参,PCR仪中读取Ct值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算(Beclin 1、LC3I和LC3II mRNA)相对表达量。引物序列见表1。

1.5.4 免疫荧光检测SIRT1表达 将HCCC-9810细胞接种于六孔板中, 2×10^5 /孔,培养过夜。取出在培养板中已爬好细胞的玻片,PBS浸洗3次,3 min/次;爬片在4%多聚甲醛中固定30 min,0.2% Triton X-100室温通透5 min,非特异性抗原(山羊血清)封闭20 min,加入SIRT1抗体37 °C下孵育2 h,PBS清洗,加Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 647)二抗在37 °C孵育

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

| Primer | Sequences |
|---------|--|
| SIRT1 | upstream 5'-CTACTGGTCTACTTTGAGGG-3' |
| | downstream 5'-CAAGGGATGGTATTTATGCT-3' |
| FOXO1 | Upstream 5'-AAGGATAAGGGTGACAGCAACAG-3' |
| | downstream 5'-TTGCTGTGTAGGGACAGATTATGAC-3' |
| Rab7 | upstream 5'-CTGTCCTGGAACACTACTCT-3' |
| | downstream 5'-AACTCAGCCTACACCCTAG-3' |
| β-actin | upstream 5'-ACAGAGCCTCGCCTTTGC-3' |
| | downstream 5'-CCACCATCACGCCCTGG-3' |

30 min, PBS清洗, 滴加DAPI避光孵育5 min, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然后在荧光显微镜下观察采集图像。

1.6 统计学分析

实验数据用SPSS 17.0统计软件和GraphPad Prism 5软件进行统计分析。所有的数据都以均数±标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析; 当方差齐时, 采用LSD-*t*检验, 当方差不齐时, 采用Dunnett's-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8检测HCCC-9810细胞增殖抑制率和耐药指数

CCK-8检测结果显示, 与对照组相比, 不同浓度(50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$)的5-FU均能抑制HCCC-9810细胞增殖(图1)。随着5-FU浓度的增加, 细胞抑制率随之增加。5-FU诱导耐药HCCC-9810细胞的 IC_{50} 是400.028 $\mu\text{g/mL}$, 5-FU诱导前的HCCC-9810细胞 IC_{50} 是153.673 $\mu\text{g/mL}$, 耐药指数是400.028/153.673=2.60。耐药指数 ≥ 2 , 耐药细胞模型(HCCC-9810/5-FU组)建立成功。

2.2 耐药细胞HCCC-9810/5-FU中SIRT1及FOXO1/Rab7自噬通路表达情况

免疫荧光结果显示, 与对照组相比, SIRT1在5-FU诱导的HCCC-9810细胞核内表达稍有增加(图2A)。Western blot结果显示, 与对照组相比, 模型组SIRT1和Rab7蛋白表达轻微增加($P < 0.05$), p62、FOXO1和Beclin1蛋白表达明显增加($P < 0.001$), LC3II/LC3I比值明显增加($P < 0.001$, 图2B)。RT-qPCR显示, 与对照组相比, 模型组SIRT1、FOXO1和Rab7 mRNA水平增加($P < 0.05$, 图2C)。

2.3 沉默SIRT1 mRNA对耐药细胞HCCC-9810/5-FU中SIRT1及FOXO1/Rab7自噬通路表达情况的影响

CCK-8结果显示, SIRT1 siRNA组细胞对5-FU的 IC_{50} 值(199.712 $\mu\text{g/mL}$)较NC siRNA组细胞对5-FU的

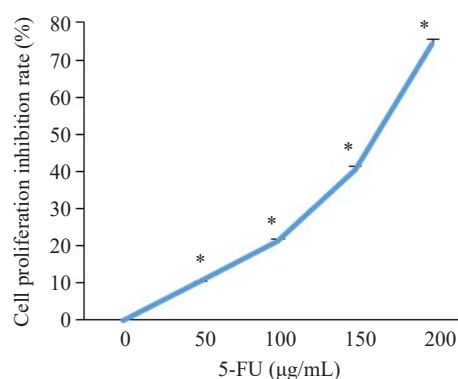


图1 CCK-8检测HCCC-9810细胞增殖抑制率

Fig.1 CCK-8 assay for assessing the inhibitory effect of different concentrations of 5-FU on HCCC-9810 cell proliferation. * $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g/mL}$.

IC_{50} 值(347.702 $\mu\text{g/mL}$)降低。划痕实验显示, 与NC siRNA组相比, SIRT1 siRNA组细胞迁移能力下降(图3A)。Western blot显示, 与NC siRNA组相比, SIRT1 siRNA组SIRT1 ($P < 0.05$)、Rab7 ($P < 0.05$)、p62 ($P < 0.05$)、FOXO1 ($P < 0.01$)和Beclin1 ($P < 0.01$)蛋白表达降低, LC3II/LC3I比值降低($P < 0.001$, 图3B)。RT-qPCR显示, 与NC siRNA组相比, SIRT1 siRNA组FOXO1和Rab7 mRNA水平降低($P < 0.05$, 图3C)。

3 讨论

CCA被普遍认为是难以诊断和治疗的疾病。尽管治疗方法有所改进, 但患者的生存率仍然很低, 这归因于早期广泛的局部肿瘤侵袭和远处转移, 以及化疗抵抗^[11]。因此, 探讨CCA患者5-FU耐药的分子机制, 对于提高患者预后具有十分重要的意义。研究表明, 化疗诱导的自噬水平增加有助于肿瘤多重耐药^[12]。单独使用5-FU处理诱导CCA细胞体外自噬, 而自噬激活剂雷帕霉素可以使CCA细胞对5-FU更具抗性^[13]。辣椒素抑制了5-FU诱导的自噬, 增强了CCA细胞的药物敏感性^[14, 15]。由此可见, 自噬失活可能有助于药物诱导的细胞凋亡, 增强化疗敏感性, 因此阻断癌细胞自噬有望成为提高癌症治疗中化疗效率的新方法^[16]。本研究使

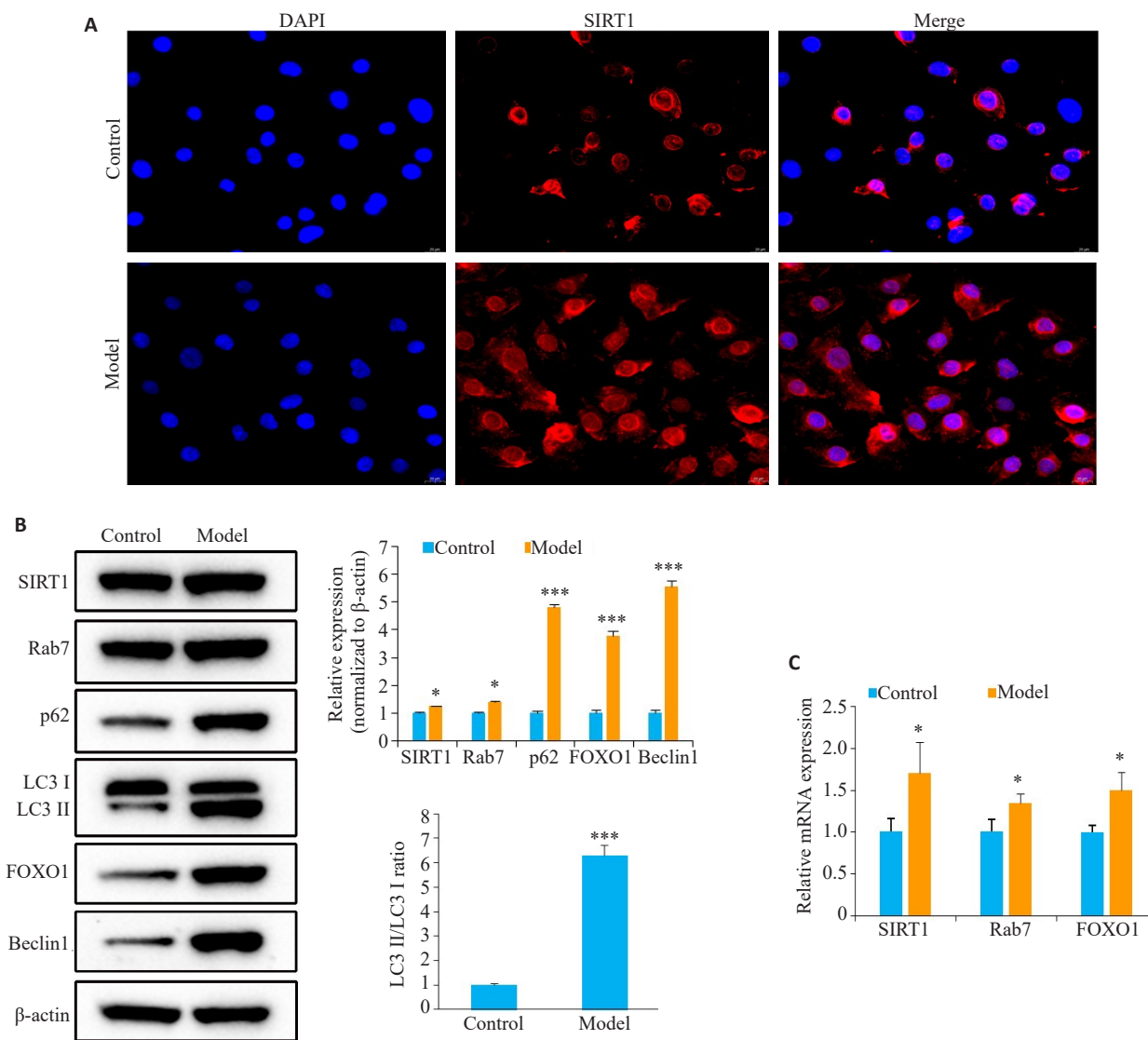


图2 耐药细胞HCCC-9810/5-FU中SIRT1及FOXO1/Rab7自噬通路表达情况

Fig.2 Expressions of SIRT1 and the molecules of the FOXO1/Rab7 autophagy pathway in 5-FU-resistant HCCC-9810 cells. A: SIRT1 expression detected by immunofluorescence assay (Original magnification: $\times 400$). B: Protein expressions of SIRT1, Rab7, p62, FOXO1, and Beclin1 and the LC3II/LC3I ratio determined by Western blotting. C: Expression levels of SIRT1, FOXO1, and Rab7 mRNA determined by RT-qPCR. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group.

用5-FU耐药的胆管癌HCCC-9810,研究自噬在化疗药物耐药中的作用和机制。

SIRT1是一种NAD依赖性蛋白脱乙酰酶,能够对组蛋白和非组蛋白底物进行乙酰化,从而调节肿瘤发生过程中的各种生理活动^[17]。研究表明,SIRT1参与肿瘤发生、转移、自噬调节和化疗耐药性,但在不同的致病过程中发挥相反的作用,起着不同的作用^[18]。研究表明SIRT1调控叉头蛋白FOXK2的去乙酰化修饰降低肿瘤细胞化疗敏感性^[19]。FOXO1是重要的自噬诱导因子^[9]。Rab蛋白是一种小的GTP酶,调节囊泡运输过程^[20]。许多Rab蛋白已被证明参与自噬的各个阶段,其中Rab7参与自噬体形成^[21]。在口腔鳞状细胞癌患者中检测到Rab5、Rab7和Rab11基因和蛋白质的表达增加。在

CCA化疗过程中自噬被激活。Beclin 1是自噬关键调控蛋白之一,参与自噬体膜形成^[22-24]。LC3II/LC3I比值的大小可估计自噬水平的高低^[25,26]。p62作为重要的自噬受体,参与多种细胞信号转导调控、氧化应激及自噬过程^[27,28]。本研究中,5-FU诱导的HCCC-9810耐药细胞中,Beclin 1、p62、SIRT1、FOXO1和Rab7表达上调,LC3II/LC3I比值增加。其中,SIRT1和Rab7的蛋白表达和mRNA水平都是轻微增加,FOXO1的mRNA水平变化不明显,但是蛋白水平改变比较大,这说明表达的改变可能不是来自转录水平,可能是蛋白翻译水平或者降解受到抑制。

SIRT1在5-FU耐药胃癌细胞中高表达,干扰SIRT1表达后可通过抑制细胞增殖与促进细胞凋亡来

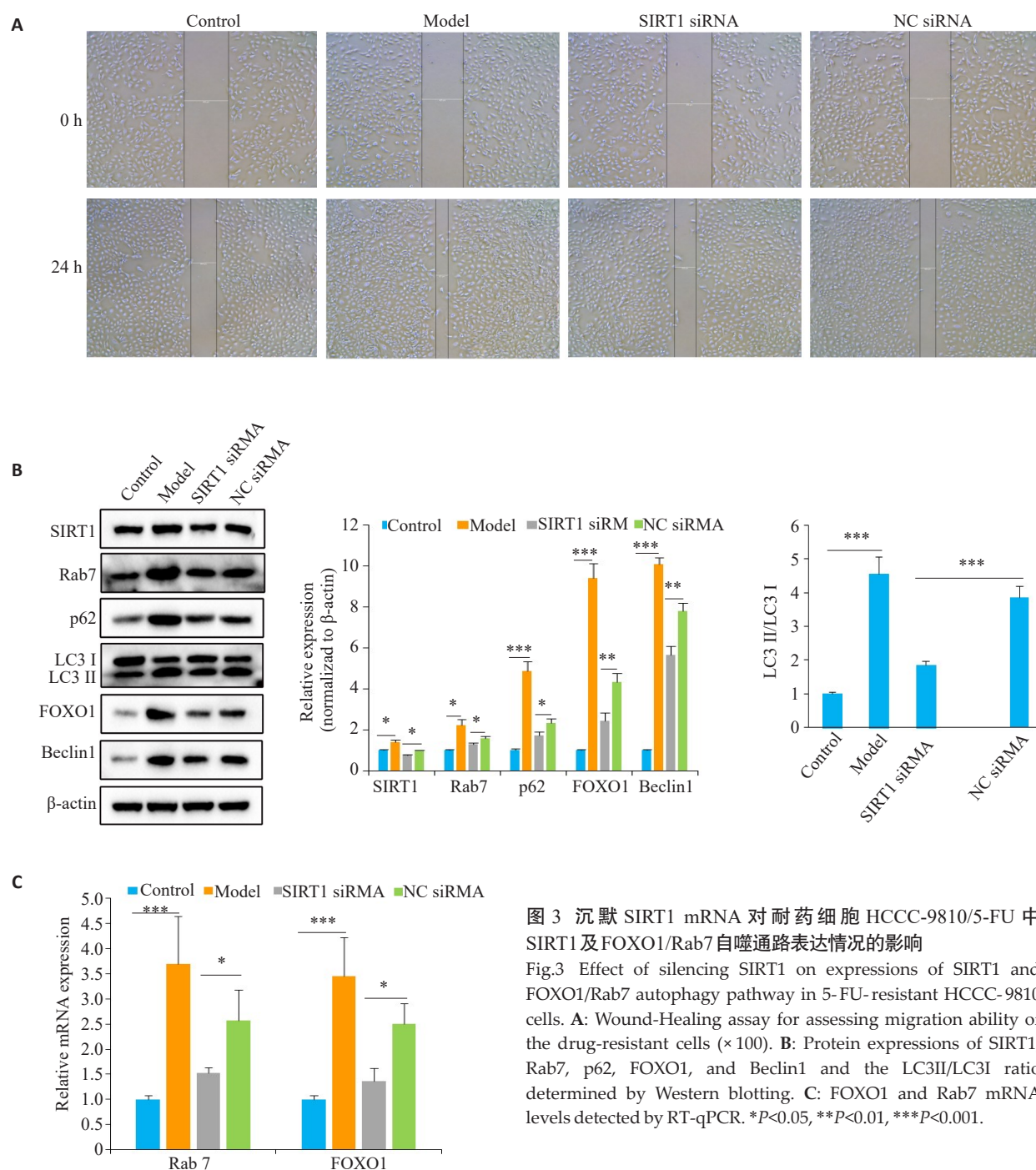


图3 沉默 SIRT1 mRNA 对耐药细胞 HCCC-9810/5-FU 中 SIRT1 及 FOXO1/Rab7 自噬通路表达情况的影响

Fig.3 Effect of silencing SIRT1 on expressions of SIRT1 and FOXO1/Rab7 autophagy pathway in 5-FU-resistant HCCC-9810 cells. **A:** Wound-Healing assay for assessing migration ability of the drug-resistant cells (×100). **B:** Protein expressions of SIRT1, Rab7, p62, FOXO1, and Beclin1 and the LC3II/LC3I ratio determined by Western blotting. **C:** FOXO1 and Rab7 mRNA levels detected by RT-qPCR. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

提高耐药胃癌细胞对 5-FU 的敏感性,这可能与细胞增殖通路相关蛋白、凋亡以及细胞多药耐药性相关蛋白变化相关。本研究中,沉默 SIRT1 的表达,HCCC-9810 细胞的 5-FU 耐药性降低,细胞迁移能力降低,提示抑制 SIRT1 可作为降低胃癌多药耐药性及提高胃癌对化疗药物敏感性研究的一个新思路^[29]。目前已有研究表明,SIRT1 可能参与胰腺癌细胞自噬的调控,其机制可能与 FOXO1/RAB7 信号通路有关^[30]。在这项研究中,敲除 SIRT1 抑制胰腺癌细胞自噬,过表达 SIRT1 能够增强 Panc-1 细胞中 FOXO1 和 RAB7 的蛋白表达,而当敲除 SIRT1 时,SIRT1 与 FOXO1 蛋白可能有相互作用,

FOXO1 和 RAB7 表达受到抑制。本研究也证明类似的结果,沉默 SIRT1 的表达抑制 HCCC-9810 细胞自噬蛋白 Beclin1 和 P62 表达下调,LC3II/LC3I 比值降低,Rab7 和 FOXO1 的表达均降低。

综上所述,敲低 SIRT1 的表达,FOXO1/Rab7 信号通路表达降低。要证明这个通路对于 SIRT1 耐药的影响,还需进一步实验,需要抑制 FOXO1/Rab7 通路,然后敲低 SIRT1,观察是否还能发挥作用。如果抑制 FOXO1/Rab7 通路,SIRT1 的敲低和过表达不再影响细胞耐药,说明 SIRT1 确实通过这个通路发挥作用。

参考文献:

- [1] Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, et al. Cholangiocarcinoma-evolving concepts and therapeutic strategies[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(2): 95-111.
- [2] Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 557-88.
- [3] Chen M, Li Y, Ma N, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes loaded with 5-Fu against cholangiocarcinoma *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(6): 213-21.
- [4] 刘小方, 于绍平, 张翠生, 等. 5-氮-2-脱氧胞苷调控胆管癌p53-Bax线粒体凋亡通路DNA甲基化诱导化疗敏感性的研究[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(21): 6266-72.
- [5] Nitta T, Sato Y, Ren XS, et al. Autophagy may promote carcinoma cell invasion and correlate with poor prognosis in cholangiocarcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(8): 4913-21.
- [6] Zhaoshi BAI, Yaling PENG, Xinyue YE, 等. 自噬与癌症的治疗: 自噬的四种功能形式及其在癌症治疗中的应用[J]. *Journal of Zhejiang University-Science B: Biomedicine & Biotechnology*, 2022, 23(2): 89-102.
- [7] Usman RM, Razzaq F, Akbar A, et al. Role and mechanism of autophagy-regulating factors in tumorigenesis and drug resistance [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2021, 17(3): 193-208.
- [8] Suwandittakul N, Reamtong O, Molee P, et al. Disruption of endocytic trafficking protein Rab7 impairs invasiveness of cholangiocarcinoma cells[J]. *Cancer Biomark*, 2017, 20(3): 255-66.
- [9] 刘维华, 谭娜, 郑洪. FOXO1在肿瘤中的自噬调节作用及其研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2021, 37(12): 1469-72.
- [10] 王卓, 郭文东, 张潇文, 等. 组蛋白去乙酰化酶SIRT1调控肿瘤微环境的研究进展[J]. *解剖科学进展*, 2021, 27(4): 501-3.
- [11] Peng F, Jiang J, Yu Y, et al. Direct targeting of SUZ12/ROCK2 by miR-200b/c inhibits cholangiocarcinoma tumorigenesis and metastasis[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(12): 3092-104.
- [12] Naveed S, Aslam M, Ahmad A. Starvation based differential chemotherapy: a novel approach for cancer treatment[J]. *Oman Med J*, 2014, 29(6): 391-8.
- [13] 辛辰. 5-FU通过上调自噬水平介导胆管癌化疗不敏感的机制研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2018.
- [14] Hong ZF, Zhao WX, Yin ZY, et al. Capsaicin enhances the drug sensitivity of cholangiocarcinoma through the inhibition of chemotherapeutic-induced autophagy [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0121538-45.
- [15] 郑启忠, 申九妹, 熊共鹏, 等. 辣椒素提高胆管癌细胞对5-氟尿嘧啶的敏感性[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(22): 3714-8.
- [16] 何宇. 白杨素通过促进ROS介导的Akt/mTOR通路失活在子宫内膜癌细胞中诱导自噬[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2021.
- [17] Garcia-Peterson LM, Li XL. Trending topics of SIRT1 in tumorigenicity [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj*, 2021, 1865(9): 129952-61.
- [18] Chen J, Chen H, Pan L. SIRT1 and gynecological malignancies (review)[J]. *Oncol Rep*, 2021, 45(4): 43-52.
- [19] 王希文. SIRT1调控叉头蛋白FOXK2的去乙酰化修饰降低肿瘤细胞化疗敏感性的机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2021.
- [20] Langemeyer L, Fröhlich F, Ungermann C. Rab GTPase function in endosome and lysosome biogenesis [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(11): 957-70.
- [21] Ao X, Zou L, Wu Y. Regulation of autophagy by the rab GTPase network[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(3): 348-58.
- [22] Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, bcl-2 and autophagy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 109-26.
- [23] Li X, Yang KB, Chen W, et al. CUL3 (cullin 3)-mediated ubiquitination and degradation of BECN1 (beclin 1) inhibit autophagy and promote tumor progression[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4323-40.
- [24] Vega-Rubín-de-Celis S, Kinch L, Peña-Llópez S. Regulation of beclin 1-mediated autophagy by oncogenic tyrosine kinases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): E9210-9.
- [25] Marafon BB, Pinto AP, da Rocha AL, et al. Hepatic LC3 II/I ratio is not modulated in exercised mice[J]. *Physiol Res*, 2020, 69(6): 1103-11.
- [26] Wang SL, Shao BZ, Zhao SB, et al. Intestinal autophagy links psychosocial stress with gut microbiota to promote inflammatory bowel disease[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 391-405.
- [27] Lamark T, Svenes S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 609-24.
- [28] Zhang H, Zhang Y, Zhu X, et al. DEAD box protein 5 inhibits liver tumorigenesis by stimulating autophagy *via* interaction with p62/SQSTM1[J]. *Hepatology*, 2019, 69(3): 1046-63.
- [29] 邓晓晶, 郑海伦, 燕善军, 等. SIRT1在5-FU耐药胃癌细胞中的表达及其对细胞化疗耐药的影响[J]. *河北北方学院学报: 自然科学版*, 2020, 36(10): 1-7, 11.
- [30] 田舍, 江建新, 喻超, 等. SIRT1通过调节FOXO1/RAB7信号通路促进低氧诱导的胰腺癌细胞自噬[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(9): 1545-50.

(编辑: 林萍)