

RNA 干扰抑制 *Beclin1* 基因对裸鼹鼠成纤维细胞增殖与凋亡的影响

赵善民, 肖邦, 林丽芳, 官晨, 王运慧, 程继帅, 余琛琳, 丛薇, 汤球, 孙伟, 崔淑芳*

(第二军医大学实验动物中心, 上海 200433)

【摘要】 目的 应用 RNA 干扰技术抑制自噬调控基因 *Beclin 1* 的表达, 检测 *Beclin 1* 表达对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞增殖与凋亡的影响以及 *p53*、*BAX*、*Bcl2* 等基因表达的影响。方法 分别检测裸鼹鼠成纤维细胞经饥饿、 H_2O_2 刺激等处理后 *Beclin 1* 的表达, 然后采用设计的 *Beclin 1* 基因的干扰 RNA 及阴性对照分别瞬时转染裸鼹鼠成纤维细胞。采用 real-time PCR 及 Western blot 法检测沉默效果后, 采用 CCK-1 实验检测沉默后细胞增殖活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 然后采用 Western blot 检测相关基因蛋白表达水平。结果 饥饿与 H_2O_2 刺激均能导致 *Beclin 1* 表达水平的改变。采用 gene expresso 转染试剂对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞转染效率可达到 90% 以上, real-time PCR 及 Western blot 结果显示所设计的 *Beclin 1* siRNA 可有效降低 *Beclin 1* 的表达。*Beclin 1* 基因沉默后, 裸鼹鼠皮肤成纤维细胞增殖抑制率均显著高于对照组, 细胞早期凋亡与晚期凋亡率均显著升高, 同时 *p53*、*BAX*、*Bcl2*、*LC3B*、*p-AKT*、*mTOR* 等表达量下降。结论 *Beclin 1* 在裸鼹鼠成纤维细胞抵抗饥饿、 H_2O_2 刺激等过程中表达量显著变化, 同时抑制 *Beclin 1* 的表达, 可抑制裸鼹鼠细胞增殖, 促进其凋亡, 这提示 *Beclin 1* 基因对裸鼹鼠自噬、增殖、凋亡起到调控作用。

【关键词】 裸鼹鼠; 成纤维细胞; *Beclin 1*; RNA 干扰; 增殖; 凋亡

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)06-0557-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.06.002

Inhibitory effects of *Beclin 1* gene expression by RNA interference on the proliferation and apoptosis in fibroblasts of naked mole rat

ZHAO Shan-min, XIAO Bang, LIN Li-fang, GONG Chen, WANG Yun-hui,
CHENG Ji-shuai, YU Chen-lin, CONG Wei, TANG Qiu, SUN Wei, CUI Shu-fang

(Laboratory Animal Center of the Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of down-regulation of *Beclin 1*, which is an autophagy regulatory molecule, expression induced by RNA interference on the proliferation and apoptosis in skin fibroblasts of naked mole rat. **Methods** The expression levels of *Beclin 1* were detected after starvation or H_2O_2 treatment. The fibroblasts were transiently transfected with specific siRNA targeting *Beclin 1* and then screened by real-time PCR and Western blot. Cell proliferation and apoptosis were determined using CCK-8 detection kit and flow cytometry (FCM). The expressions of related genes were detected by Western blot. **Results** The expression of *Beclin 1* gene at mRNA and protein levels was significantly lower in fibroblasts of the naked mole rat. Starvation and H_2O_2 treatment induced changes of the *Beclin 1* expression. Inhibition of *Beclin 1* gene expression can inhibit cell proliferation and induce early and late apoptosis. The protein levels of *p53*, *BAX*, *Bcl2*, *LC3B*, *p-AKT* and *mTOR* were reduced after transient transfection with *Beclin 1*-siRNA. **Conclusions** The expression of *Beclin 1* in fibroblasts of naked mole rat are changed in response to starvation or H_2O_2 stimulation. Inhi-

【基金项目】 国家科技支撑计划 (No. 2015BAI09B02); 国家自然科学基金 (No. 31402028) 与上海市卫计委课题 (No. 20144Y0205) 联合资助。

【作者简介】 赵善民 (1986-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 实验动物标准化及人类疾病动物模型研究。

【通讯作者】 崔淑芳, 教授, 研究方向: 实验动物标准化及人类疾病动物模型研究。Email: youngstar_sf@163.com,

bition of *Beclin 1* gene expression can inhibit cell proliferation and induce apoptosis. Therefore, *Beclin1* gene may play a regulatory role in autophagy, proliferation and apoptosis in the skin fibroblasts of naked mole rat.

【Key words】 Naked mole rat; Fibroblasts; *Beclin 1*; siRNA; Proliferation; Apoptosis

裸鼹鼠是一种具备抗肿瘤、抗衰老、耐低氧等优势生物学特征的新型实验动物资源,目前已被科学家应用于肿瘤学、免疫学及心血管学等领域的研究^[1-3]。研究表明裸鼹鼠在抗肿瘤方面具有多种特殊的分子信号机制抵抗细胞的过量增殖及肿瘤的产生,例如裸鼹鼠独特的早期接触抑制机制,其成纤维细胞分泌高分子质量的透明质酸(HMM-HA)等^[4,5]。*Beclin 1*是调控自噬的重要基因,研究显示乳腺癌、脑肿瘤、宫颈癌、卵巢癌中出现*Beclin 1*蛋白表达的下降^[6,7]。多种肿瘤已经证实存在*Beclin 1*等自噬基因的缺陷,能够逃避自噬性死亡。因此,多数学者认为*Beclin 1*是一种抑癌基因。同时*Beclin 1*作为参与自噬发生的特异性基因,是自噬发生的重要调控分子,在自噬形成过程中起重要作用。自噬的发生过程需要多种分子的参与,其调控机制非常复杂。前期我们发现,新生裸鼹鼠肝脏、肺脏等组织中自噬水平显著高于C57BL/6小鼠^[8,9]。本实验进一步研究了自噬相关基因*Beclin1*表达下调之后对裸鼹鼠细胞增殖与凋亡的影响,为深入探讨*Beclin 1*在裸鼹鼠自噬、凋亡中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

裸鼹鼠原代皮肤成纤维细胞按照本实验室前期方法分离培养^[10];主要试剂有细胞裂解液RIPA、PMSF、预染蛋白 marker 均购自上海碧云天生物技术有限公司;AKT(Phospho-Ser473)抗体、*mTOR*抗体、*BAX*抗体购自美国Signalway Antibody公司; β -actin、*p53*抗体、*Bcl2*抗体购自美国Proteintech公司;*Beclin 1*抗体购自英国Abcam公司;*LC3 B*抗体购自美国Cell Signaling公司;Annexin V-PI双染色试剂购自美国BD公司;gene expresso转染试剂购自南京迈极生物公司;CCK8检测试剂盒购自美国Signalway Antibody公司;DMEM培养基购自美国Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞准备

细胞接种于直径60 mm的培养皿中,接种密度 1×10^6 /皿,在37℃三气培养箱中培养。细胞培养采用三气培养箱控制条件为3% O₂、5% CO₂及

92% N₂。隔天换液一次,3 d传代。裸鼹鼠成纤维细胞的刺激分为3组:饥饿处理组、H₂O₂处理组、正常组。饥饿处理是指用无血清的培养基进行培养。H₂O₂处理采用900 μ mol/L H₂O₂进行共孵育。正常组为3% O₂、5% CO₂。用于*Beclin 1* siRNA转染的细胞于转染前一天进行铺板,细胞用不含抗生素的正常生长的培养基进行培养。用于细胞RNA、蛋白提取及凋亡率检测的细胞置于6孔板中培养,用于CCK8检测的细胞置于96孔板中培养。

1.2.2 siRNA转染

当6孔板中的细胞达到90%时进行转染,转染按照Gene Expresso转染试剂说明书进行,具体为,取240 μ L Opti-MEM培养液于EP管中,加入10 μ L siRNA,另取240 μ L Opti-MEM培养液加入10 μ L gene expresso,放置5 min后轻轻混匀,再室温放置20 min,然后向其中加入1.5 mL培养液混匀后置换培养细胞中的培养液,同时转染Cy3标记的siRNA,观察转染效率。培养48 h后,用荧光显微镜观察并拍照。*Beclin 1* siRNA序列为:5' - CUCAAGU-CAUGCUGACCAAdTdT - 3' 和 5' - UGGUCAG-CAUGAACUUGAGdTdT - 3'^[11],引物序列由百奥生物技术(南通)有限公司合成。

1.2.3 RNA的提取

Beclin 1 siRNA转染24 h后,采用TRIzol试剂盒抽取裸鼹鼠皮肤成纤维细胞总RNA,并用紫外分光光度计检测260/280比值,初步确定总RNA的浓度及纯度。然后用DNase I去除总RNA中的基因组DNA。将RNA按照Takara逆转录试剂盒操作程序反转录成cDNA。

1.2.4 Real-time PCR检测相关基因的表达

对各组织总RNA进行反转录合成cDNA,将cDNA进行2倍稀释作为检测模板,按照设定的反应体系和反应程序,检测各组织中*Beclin 1* mRNA的转录水平。荧光定量PCR仪(美国ABI公司)设置反应程序为:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,72℃ 30 s,40个循环,应用比较Ct法进行相对定量。Real-time PCR反应体系为:cDNA模板1 μ L,2 \times SYBR Premix Ex Taq 5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L) 0.2 μ L,ROX Reference Dye (50 \times) 0.2 μ L,ddH₂O 3.4 μ L,同时设置阴阳性对照,每个样品设3

个重复孔。参考 Genbank 上发表的裸鼹鼠 *Beclin1*、*GAPDH* 基因序列设计引物为: *Beclin 1*: 5'-GT-TCAAAGAGGAGGTGGAGAAG-3' 和 5'-GAGGAAACCCAGGCAAG AC-3'; *GAPDH*: 5'-CGCCTGCTTCACCACCTT-3' and 5'-CCTGCCGCCTGGAGAAA-3', 引物序列由上海生工合成。

1.2.5 细胞蛋白的提取

Beclin 1 siRNA 转染 24 h 后, 取 6 孔板细胞加 0.1 mL 预冷的 RIPA 裂解液 (含有 100 mmol/L FPM 进行匀浆), 冰浴 30 min 后 4°C、12 000 r/min 离心 30 min, 吸取上清蛋白, 采用 Micro BCA Protein Kit 测定细胞蛋白总浓度。

1.2.6 Western Blot 检测

取适量总蛋白加 2 × SDS 上样缓冲液, 100°C 变性 5 min。SDS-PAGE 分离后转印至硝酸纤维素膜, 用 1 × 封闭液室温封闭 1 h, 一抗用 *Beclin 1*、*LC3B*、*p53*、*BAX*、*BCL2*、*p-AKT*、*mTOR* 抗体 (1:2000 稀释), 4°C 过夜; TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 二抗 (1:2000 稀释) 室温孵育 1 h; TBST 洗 3 次, 每次 5 min, 用化学发光 (ECL, 普利莱公司) 显色。以 β -actin 为内参照, 凝胶成像系统扫描成像。

1.2.7 流式检测基因沉默后细胞凋亡率

Beclin 1 siRNA 转染 24 h 后, 取 6 孔板细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集, 用 PBS 洗涤 2 次 (1000 r/min 离心 5 min), 收集细胞, 加入 500 μ L 的 binding buffer 悬浮细胞, 加入 10 μ L annexin V-FITC 和 10 μ L PI, 混匀后室温避光防止 5 ~ 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.8 CCK8 检测基因沉默后细胞增殖率

Beclin 1 siRNA 转染 6、12、24、48 h 后进行 CCK8 计数, 按照说明书进行操作, 用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定其吸光度 (A) 值, 以间接反映各组活细胞数量。

1.2.9 数据处理

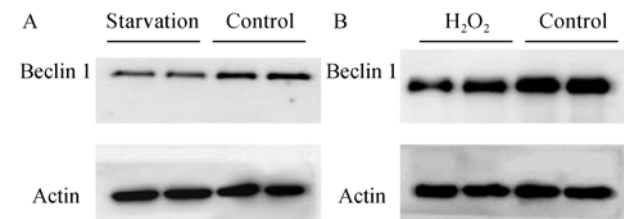
检测数据用 SPSS 12.0 软件进行统计, 分析不同处理组凋亡率的不同, 统计结果用“均数 \pm 标准差”表示, 并作 *t* 检验。

2 结果

2.1 不利刺激对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞 *Beclin1* 表达的影响

饥饿、 H_2O_2 刺激均能导致 *Beclin 1* 表达水平的改变。如图 1 所示, 裸鼹鼠成纤维细胞饥饿或者

H_2O_2 刺激 24 h 后, Western blot 检测结果均显示 *Beclin 1* 表达水平显著下降 (图 1A 和 1B)。



注: A. 饥饿组与正常对照组; B. H_2O_2 刺激组与正常对照组。

图 1 不同刺激下裸鼹鼠成纤维细胞 *Beclin1* 的表达水平

Note. A. Starvation group and control group; B. H_2O_2 group and control group.

Fig. 1 Expression of *Beclin1* in different stimulated fibroblasts from the naked mole rat

2.2 *Beclin1* 基因沉默效果的检测

采用 Gene Expresso 转染试剂对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞进行 siRNA 转染, 转染效率可达到 90% 以上 (如图 2A 和 2B)。同时 real-time PCR 及 Western blot 结果显示, 采用 *Beclin 1* siRNA 可有效降低 *Beclin 1* 的表达 (如图 2C 和 2D)。

2.3 *Beclin1* 基因沉默对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞增殖及凋亡的影响

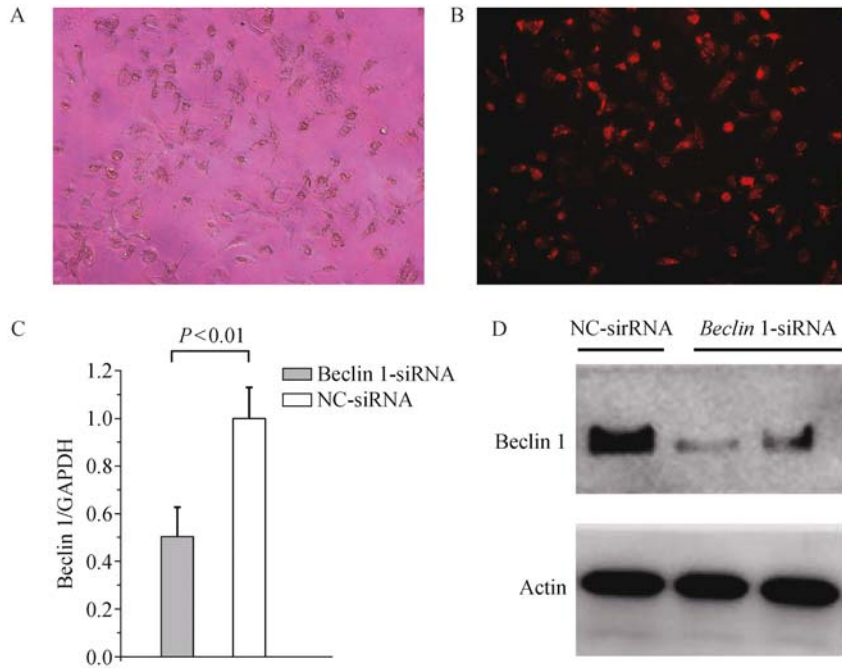
在转染后的各时间点, 裸鼹鼠皮肤成纤维细胞增殖抑制率均显著高于对照组。同时, *Beclin 1* 基因沉默 24 h 后, 细胞早期凋亡与晚期凋亡率均显著升高 (见图 3、4, *P* 值均 < 0.01)。

2.4 *Beclin1* 基因沉默对凋亡相关基因的影响

如图 5 所示, *Beclin 1* 基因沉默 24 h 后, *LC3B I* 与 *II* 总量及比值发生了变化, *PI3K/AKT/mTOR* 信号通路中 *p-AKT* (Ser473) 与 *mTOR* 表达量下调, 同时与凋亡密切相关的 *p53*、*Bcl2*、*BAX* 表达量亦下调。

3 讨论

Beclin 1 基因与酵母自噬基因 *Atg6* 同源, 是介导其他自噬蛋白定位于前自噬小体的关键因子, 也是参与哺乳动物自噬体形成调控的特异性基因^[12]。目前在多种肿瘤中发现了 *Beclin 1* 单等位基因的缺失或者 *Beclin 1* 蛋白表达下调, 提示其与肿瘤的发生、发展和疾病的发生密切相关。但 *Beclin 1* 相关抑癌机制目前仍不很清楚, 现有研究主要集中在 *Beclin 1* 作为一种自噬基因具有诱导自噬、凋亡及抗基因组突变的作用上。前期我们研究发现饥饿、

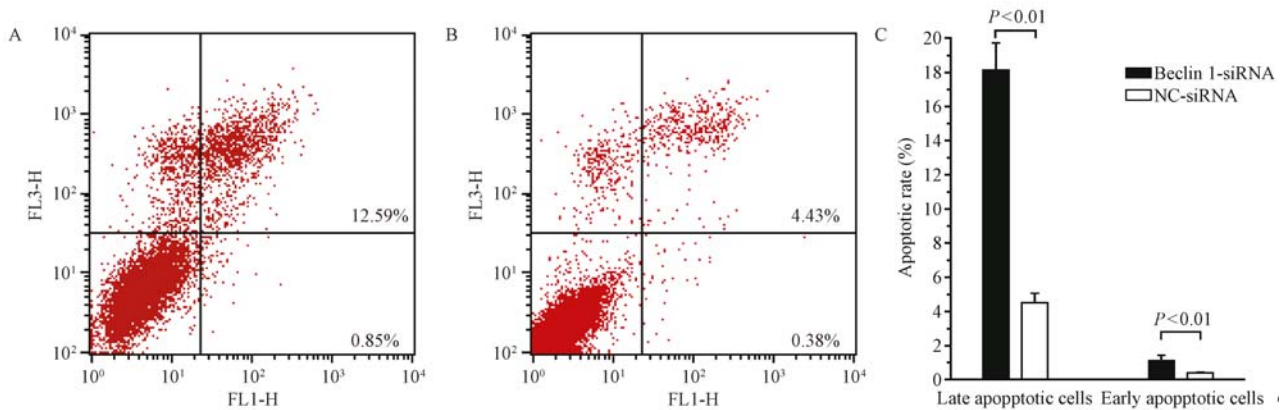


注:A. 转染后细胞自然光照片(×200);B. 转染后细胞荧光照片(×200);C. 转染 24 h 后,real-time PCR 检测 *Beclin1* 与 *GAPDH* 比值($n = 3$);D. 转染 24 h 后 Western blotting 检测 *Beclin 1* 与 β -*actin* 表达量。

图 2 *Beclin1* 基因沉默效果

Note. A. Light microscopic image of fibroblasts after transfection; B. Fluorescence microscopic image of fibroblasts after transfection.

Fig. 2 The effect of *Beclin 1* gene silencing



注:A. *Beclin 1*-siRNA 转染组;B. NC-siRNA 转染组;C. 沉默组与对照组凋亡率,*Beclin 1* siRNA 沉默后晚期与早期凋亡均显著高于对照组 ($P < 0.01, n = 4$)。

图 3 转染 24 h 后裸鼹鼠成纤维细胞凋亡率

Note. A. *Beclin 1*-siRNA group; B. NC-siRNA group; C. Apoptosis of *Beclin 1*-siRNA group and NC-siRNA group ($P < 0.01, n = 4$).

Fig. 3 Apoptosis of naked mole rat fibroblasts transfected for 24 h

H_2O_2 刺激均能诱导裸鼹鼠成纤维细胞及肝星形细胞自噬水平的升高^[11],本研究结果显示裸鼹鼠细胞饥饿条件下,*Beclin 1* 蛋白表达量显著降低, H_2O_2 刺激亦可导致 *Beclin 1* 表达水平的下调,这提示 *Beclin 1* 在裸鼹鼠细胞抵抗饥饿及 H_2O_2 刺激时起作用。*Beclin 1* 基因沉默可显著抑制裸鼹鼠皮肤成纤维细

胞增殖及诱导凋亡产生,与凋亡密切相关的 *Bcl2*、*BAX* 表达量亦下调,并且 *LC3B* 总量发生了变化,说明 *Beclin 1* 在裸鼹鼠自噬、增殖及凋亡中均发挥作用。McKnight 等证实对于人类骨肉瘤 HOS 细胞,下调 *Beclin 1* 基因能够增强顺铂等诱导的细胞凋亡^[13-15]。这也提示 *Beclin 1* 基因下调可以增强化

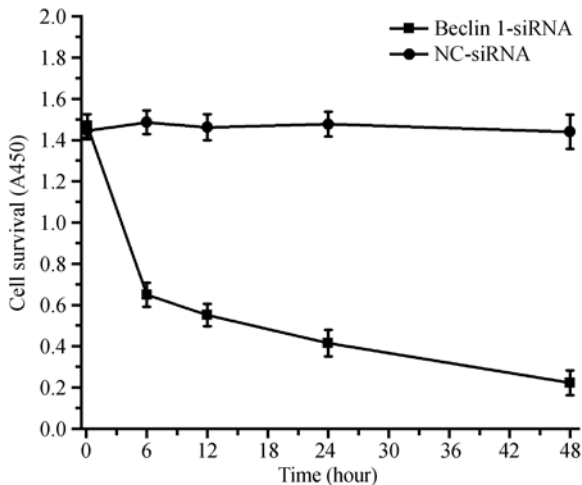
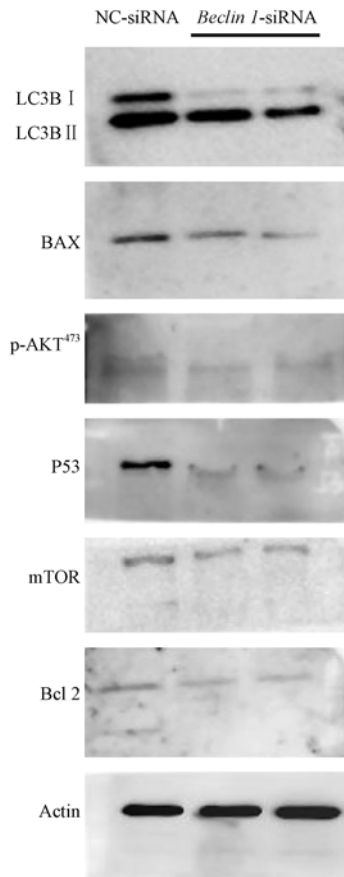


图4 转染 6、12、24、48 h 后裸鼹鼠成纤维细胞增殖率 (n = 5)

Fig. 4 Proliferation rate of fibroblasts of the naked mole rat at 6, 12, 24 and 48 h after transfection (n = 5)



注: *Beclin 1*-siRNA 与 NC-siRNA 转染 24 h 后, *LC3B*、*BAX*、*p-AKT*、*P53*、*mTOR*、*Bcl2* 表达水平

图5 *Beclin1* 沉默后蛋白表达水平

Note. Expressions of *LC3B*, *BAX*, *p-AKT*, *P53*, *mTOR* and *Bcl2* of the fibroblasts transfected with *Beclin 1*-siRNA and NC-siRN for 24 h.

Fig. 5 Protein expression of naked mole rat fibroblasts after siRNA inhibition of *Beclin 1*

疗药物对凋亡信号通路的激活,有助于控制肿瘤的增殖。因此,对 *Beclin 1* 基因进行更加深入的研究将有助于肿瘤的控制。

研究显示 *p53* 是平衡肿瘤及衰老的一个重要分界点,保持 *p53* 基因的稳态表达是预防肿瘤和早衰的策略之一^[16-18]。同时 *p53* 作为肿瘤抑制因子,在 DNA 损伤诱导细胞凋亡中发挥极其重要的作用。Jiang 等^[19]对头颈部的腺样囊性癌组织分析发现 *p53* 与 *Beclin 1* 表达量正相关。Liu 等^[13]研究发现 *Beclin 1* 可影响 *USP10* 和 *USP13* 的去泛素化活性,从而对 *p53* 蛋白水平进行调控。因此,裸鼹鼠皮肤成纤维细胞 *Beclin 1* 基因下调之后,*p53* 基因表达量的下调,提示 *Beclin 1* 可能调控 *p53* 的表达。同时 *Beclin 1* 基因沉默后细胞凋亡率升高,这表明下调裸鼹鼠细胞 *Beclin 1* 基因可以通过 *p53* 非依赖信号通路介导凋亡发生。此外,我们发现下调 *Beclin 1* 基因后,*p-AKT* (*Ser473*)、*mTOR* 表达量降低,提示 *PI3K/Akt/mTOR* 信号通路受到抑制。另有学者研究发现 *Beclin 1* 的缺失能够干扰 *PI3K-VPS34* 复合物的形成^[20]。*Beclin 1* 基因下调伴随 *PI3Kp85α* 与 *p-AKT* 的表达下调,同时细胞增殖率下降,凋亡率升高^[21]。这些数据说明 *Beclin 1* 基因下调可以通过 *PI3K/AKT* 信号通路介导细胞凋亡。

参 考 文 献

[1] 袁子彦, 赵懿宁, 张璐, 等. 裸鼹鼠肝脏显微结构与超微结构观察 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 373 - 377.

[2] 赵善民, 崔淑芳. 裸鼹鼠生物学特性的研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 400 - 405.

[3] 赵善民, 赵懿宁, 汤球, 等. 裸鼹鼠胸腺、脾脏及淋巴结解剖学、组织学与超微结构研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5): 395 - 399.

[4] Seluanov A, Hine C, Azpurua J, et al. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(46): 19352 - 19357.

[5] Tian X, Azpurua J, Hine C, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat [J]. Nature, 2013, 499(7458): 346 - 349.

[6] Cheng HY, Zhang YN, Wu QL, et al. Expression of *beclin 1*, an autophagy-related protein, in human cervical carcinoma and its clinical significance [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2012, 33(1): 15 - 20.

[7] Li Z, Chen B, Wu Y, et al. Genetic and epigenetic silencing of the *beclin 1* gene in sporadic breast tumors [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 98.

(下转第 566 页)

- 泌学分册, 2004, 24(1): 60-62.
- [6] 李素萍. 骨质疏松动物模型的研究现状 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3767-3770.
- [7] Jerome CP, Peterson PE. Nonhuman primate models in skeletal research [J]. Bone, 2001, 29(1): 1-6.
- [8] 吴强, 刘棒深, 刘玲玲, 等. 树鼩血浆生殖激素初步研究 [J]. 上海实验动物科学, 1989, 9(3): 140-141.
- [9] Yu F, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nature Comm, 2013, 4(2): 66-78.
- [10] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学 [M]. 第八版. 中国: 人民卫生出版社, 2013: 14.
- [11] Khalid M. Human Development Report 2014 [M]. USA, The United Nations Development Programme, 2014: 177.
- [12] 全国十三省市骨矿含量调查合作组. 骨骼生长衰老规律和原发性骨质疏松症预诊的研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1995, 1(1): 1-7.
- [13] Hubrecht R, Kirkwood J. The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals: Tree shrew [M]. Eighth Edition. Singapore: Robert Hubrecht and James Kiskwood, 2009: 262-275.
- [14] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2011年) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(1): 2-17.
- [15] Rejnister JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence [J]. Bone, 2006, 38(2): 4-9.
- [16] 吴海洋, 索欢, 王平. 绝经后骨质疏松症的临床中药治疗进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(2): 241-244.
- [17] Turner AS. Animal models of osteoporosis — necessity and limitation [J]. Eur Cells Mat, 2001, 1: 66-81.
- [18] 程群, 朱汉民. 建立骨质疏松动物模型的标准化问题 [J]. 老年医学与保健, 2003, 9(2): 122-124.
- [19] Link TM. Osteoporosis imaging: state of the art and advanced Imaging [J]. Radiology, 2012, 263: 3-17.

[收稿日期] 2015-09-24

(上接第 561 页)

- [8] Zhao S, Lin L, Kan G, et al. High autophagy in the naked mole rat may play a significant role in maintaining good health [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(2): 321-332.
- [9] 林丽芳, 赵懿宁, 赵善民, 等. 裸鼯鼠与 C57BL/6 小鼠自噬调节的比较研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(4): 301-305.
- [10] 林丽芳, 赵善民, 肖邦, 等. 裸鼯鼠成纤维细胞原代培养方法的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(6): 481-486.
- [11] Zhao S, Luo H, Kan G, et al. The protective role of autophagy in *Heterocephalus glaber* hepatic stellate cells exposed to H_2O_2 or nutritional stress [J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 34(2): 463-473.
- [12] Luo S and Rubinsztein DC. Apoptosis blocks *Beclin 1*-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by *Bcl-xL* [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 268-277.
- [13] Liu J, Xia H, Kim M, et al. *Beclin1* controls the levels of *p53* by regulating the deubiquitination activity of *USP10* and *USP13* [J]. Cell, 2011, 147(1): 223-234.
- [14] Hou YJ, Dong LW, Tan YX, et al. Inhibition of active autophagy induces apoptosis and increases chemosensitivity in cholangiocarcinoma [J]. Lab Invest, 2011, 91(8): 1146-1157.
- [15] Ren Y, Huang F, Liu Y, et al. Autophagy inhibition through *PI3K/Akt* increases apoptosis by sodium selenite in NB4 cells [J]. Bmb Reports, 2009, 42(9): 599-604.
- [16] 邵月, 胡玉玺, 杜纪锋, 等. *p53* 信号稳态调节线粒体能量代谢延缓衰老的运动适应 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(22): 2966-2968.
- [17] Hastay P and Vijg J. Accelerating aging by mouse reverse genetics: a rational approach to understanding longevity [J]. Aging Cell, 2004, 3(2): 55-65.
- [18] Rodier F, Campisi J, and Bhaumik D. Two faces of *p53*: aging and tumor suppression [J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(22): 7475-7484.
- [19] Jiang LC, Huang SY, Zhang DS, et al. Expression of *Beclin 1* in primary salivary adenoid cystic carcinoma and its relation to *Bcl-2* and *p53* and prognosis [J]. Braz J Med Biol Res, 2014, 47(3): 252-258.
- [20] Furuya N, Yu J, Byfield M, et al. The evolutionarily conserved domain of *Beclin 1* is required for *Vps34* binding, autophagy and tumor suppressor function [J]. Autophagy, 2005, 1(1): 46-52.
- [21] Zhang W, Li Q, Song C, et al. Knockdown of autophagy-related protein 6, *Beclin-1*, decreases cell growth, invasion, and metastasis and has a positive effect on chemotherapy-induced cytotoxicity in osteosarcoma cells [J]. Tumour Biol, 2015, 36(4): 2531-2539.

[收稿日期] 2015-11-15