

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.15.001
文章编号: 1005-8982 (2018) 15-0001-06

基础研究·论著

ATG5 介导肝癌细胞对抗营养危机的作用研究*

马成¹, 马孙强², 李济宇¹

(1. 安徽医科大学上海临床学院, 上海 200072; 2. 上海市第十人民医院, 上海 200072)

摘要: **目的** 探索在小鼠肿瘤细胞中对抗营养缺乏的分子途径。**方法** 构建 ATG5 基因表达的质粒并瞬时转染至细胞内; 用不同靶基因的 si-RNAs 转染到细胞来沉默基因的表达; 不同条件下提取小鼠正常肝细胞 AML-12 和肝癌细胞 Hepa1-6 的 RNA 和蛋白; 用 qRT-PCR 检测基因的表达; 用 Western blot 检测蛋白的表达; 用流式细胞仪检测细胞周期; 用 CCK-8 的试剂测定细胞活性。**结果** 与小鼠正常肝细胞 AML-12 比较, 肝癌细胞 Hepa1-6 对缺血引发的细胞死亡有抵抗性。缺血使 Hepa1-6 细胞内诱导自噬相关蛋白 ATG5 表达升高 ($P < 0.05$); 沉默内源 ATG5 基因后 Hepa1-6 细胞对缺血的敏感性升高, 且 ATG5 诱导细胞周期抑制蛋白 p21 (cip1/waf1) 表达增加使细胞滞留在 G₁ 期。**结论** 在营养缺乏的环境中, Hepa1-6 细胞内 ATG5 表达升高, 且 ATG5 增加 p21 (cip1/waf1) 的表达量使细胞滞留在 G₁ 期, 可能与对抗缺血引起的死亡有关。

关键词: 缺血; 细胞死亡; 自噬; ATG5; p21 (cip1/waf1)

中图分类号: R34

文献标识码: A

Effect of ATG5-mediated anti-nutritional crisis in hepatocellular carcinoma*

Cheng Ma¹, Sun-qiang Ma², Ji-yu Li¹

(1. Shanghai Clinical college, Anhui Medical University, Shanghai 200072, China;
2. Tenth People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200072, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of anti-nutritional crisis in tumor cells and potential molecular mechanisms. **Methods** Normal mouse liver cell AML-12 as well as hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6 was utilized in this study. ATG5 expressing construct was transfected into cells. Si-RNA technology was performed for silencing of targeted genes. Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis and Western blot were carried for RNA levels and proteins, respectively. Cell cycle status and cellular activity were identified by flow cytometry and CCK-8 kit, respectively. **Results** Hepa1-6 was more resistant to nutrition deprivation compared with AML-12. Serum withdrawal induced remarkable increased expression of ATG5 in Hepa1-6 cells ($P < 0.05$). Knockdown of ATG5 reversed resistance of cells to nutrition deprivation. Further, ATG5 induced increase of p21 (cip1/waf1), which rested the Hepa1-6 cells in G₁ phase. **Conclusion** Resistance of tumor cells to nutrient deficiency may be achieved through ATG5-p21 (cip1/waf1) signaling pathway which rests cells on G₁ stage.

Keywords: serum withdrawal; cell death; autophagy; ATG5; p21 (cip1/waf1)

自噬是细胞内最重要的 house-keeping 的功能之一。自噬通过依赖溶酶体降解或消化细胞内受损的器

官和蛋白或入侵微生物来获取再生的能量: 先围圈这些物质形成双膜的隔间被称为“自噬体”之后被溶酶

收稿日期: 2017-11-03

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81470897)

[通信作者] 李济宇, E-mail: leejiyu@sina.com

体消化。当细胞对外源压力比如营养缺乏时,启动自噬补充细胞所需的营养是细胞生存的重要手段^[1-2]。

自噬和人类疾病的关系是近年来的研究热点。研究已经明确自噬是人体引发免疫功能和清除病原体所必需的^[3-6]。自噬是细胞生存的重要途径,但其与细胞死亡的关系不清楚^[7]。尤其是肿瘤细胞的自噬以及其和对抗营养缺乏的分子途径了解很少^[8-10]。

研究表明,ATG5 是细胞自噬途径中非常关键的蛋白。自噬体形成中需要二组接合(conjugation)系统(ATG12 和 ATG8)的协同作用,这二组接合系统都需要 ATG5 的参与^[11-12]。缺乏 ATG5 导致小鼠 B 细胞发育不全^[13],小鼠出生后立刻死亡^[14-15]。

p53 是细胞中最负盛名的肿瘤抑制因子,在 60% 以上人类肿瘤中发现该基因存在突变^[16]。在细胞内,p53 会诱导 p21 (cip1/waf1) 这个下游产物的表达来抑制细胞增殖^[17-18]。p21 (cip1/waf1) 是细胞中重要的细胞周期的负调控蛋白质(CDKI)。通过与细胞周期中的 cyclins/CDKs 形成复合物从而抑制 Rb 的磷酸化从而使细胞停留在 G₁ 或者 G₂ 期^[19-20]。现在有很多研究证明,p21 (cip1/waf1) 在很多生物环境中帮助肿瘤的生存。

本研究将小鼠正常肝细胞 AML-12、肝癌细胞 Hepa 1-6 在缺血条件下进行培养,探讨自噬基因 ATG5 在肿瘤细胞中对抗营养危机的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

鼠细胞系 AML-12 和 Hepa 1-6 (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),胎牛血清、DMEM/F12 培养液、1000×青霉素/链霉素溶液及 0.25% 含 EDTA 胰酶(美国 Gibico 公司),Lipofectamine[®]3000 试剂、二氧化碳 CO₂ 无菌培养箱和实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪(美国 Thermo 公司);ATG5、p21 小干扰 RNA (si-ATG5, si-p21)、对照小干扰 RNA (si-con) 及 ATG5 过表达质粒(上海捷瑞生物工程有限公司构建),RNAiso plus、逆转录试剂盒及 SYBR[®]Green 染料(大连宝生物工程有限公司),定量引物(上海捷瑞生物工程有限公司),碘化丙啶(PI)、RNase A、Triton X-100、RIPA 裂解液及 CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),兔抗人 ATG5 单克隆抗体、兔抗人 p21 单克隆抗体、鼠抗人 GAPDH 单克隆

抗体及抗鼠兔二抗(美国 Abcam 公司),PVDF 膜(德国 merckmillipore 公司),酶标仪(美国 Biotek 公司),Odyssey 双色红外荧光成像系统(美国 LI-COR 公司),流式细胞仪(美国 BD biosciences 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞株和细胞培养 小鼠的 AML-12 和 Hepa 1-6 细胞于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,覆盖率达 80% ~ 90% 进行细胞传代;实验过程所需材料(血清和培养基除外)均需放置在超净台上并用紫外灯照射 30 min 灭菌,先用酒精棉球擦拭培养瓶瓶盖,打开后瓶口在酒精灯上过火焰,再用吸管轻轻吸出旧的培养液至废液缸,加入 2 ml 无菌 PBS 洗 1 次;加入 1 ml 的 2.5% 胰蛋白酶-EDTA 消化液于 37℃ 消化细胞数分钟。倒置显微镜观察到细胞突起消失变圆后,加入等体积的培养基(10% FBS+100 u/ml 青霉素+100 u/ml 链霉素+90% DMEM/F12 培养基)终止消化。用移液枪吹打细胞,使其悬浮,将细胞吸到 15 ml 的离心管中,用培养基清洗培养瓶合并入离心管,1 000 r/min 5 min。弃上清液至废液缸,加入 1 ml 培养基,将细胞混匀成细胞悬液,以 1:2 或 1:3 进行传代,放入培养箱中培养,当细胞处于对数生长期时,进行缺血处理或者其他后续实验。对处于对数生长期的细胞进行缺血培养实验,将培养基换成 90% DMEM/F12 培养基+100 u/ml 青霉素+100 u/ml 链霉素的无血清培养基放入培养箱中培养,24 h 后进行后续实验作为研究组。以 90% DMEM/F12 培养基+100 u/ml 青霉素+100 u/ml 链霉素的含血清培养基放入培养箱中培养,作为对照组。

1.2.2 转染质粒及 si-RNAs 细胞转染应用 Lipofectamine[®]3 000 试剂,按照用户手册进行转染。转染质粒时 6 孔板每孔 5 μl Lipofectamine[®]3 000+5 μl P3 000 转染试剂+2 500 ng 目的质粒,转染 si-RNA 时 6 孔板每孔 5 μl Lipofectamine[®]3 000+75 pmol 目的 si-RNAs。

1.2.3 细胞的 RNA 提取和 qRT-PCR 分析 待细胞转染 24 h 后,收集各组细胞,用 TaKaRa 公司的 RNAiso plus 试剂按照操作手册提取细胞总 RNA;取 1 μg RNA 逆转录得到 cDNA,用 SYBR Green 染料检测 ATG5 或 p21 mRNA 的表达水平。ATG5 mRNA 正向引物:5'-GAAAGAGTGTGTCCTCCTCG-3',反向引物:5'-TTGCCTCCACTGAACTTGAC-3';p21 正向引物:5'-CTTGCCTCTGGTGTCTGAG-3',反向引物:

5'-CTGCCGCTTGGAGTGATAGAA-3'; 内参引物 GAPDH 正向引物: 5'-GCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3', 反向引物: 5'-TTGAATTTGCCGTGAGTGGA-3'。ATG5 或 p21 mRNA 转录水平的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析。

1.2.4 CCK-8 法检测转染后细胞增殖能力变化 胰酶消化对数生长的细胞, 收集细胞并进行细胞计数, 每孔种 3×10^3 个细胞于 96 孔细胞板内每组设 6 个复孔, 在每组实验细胞周围的孔加 $10 \mu\text{l}$ PBS 于 7°C 、5% CO_2 培养箱中培养。细胞缺血培养或者转染 24 h 后检测细胞增殖活性, 检测前在每个待检测孔加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8, 将细胞板放入培养箱中继续孵育 2 h, 在全自动酶标仪上测定各孔吸光度值 (450 nm 为测定波长, 630 nm 为参比波长)。细胞生长抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.2.5 Western bolt 检测蛋白表达 收取各组细胞, 用冰浴的 PBS 洗涤 2 次; 加入 RIPA 裂解液收取总蛋白, 测定蛋白浓度; 将 $30 \mu\text{g}$ 蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温封 1 h, 4°C 下结合 ATG5、p21 或 GAPDH (内参) 一抗过夜; PBST 洗 3 次, 室温结合二抗 1 h; PBST 洗 3 次, Odyssey 显影, 凝胶成像仪对蛋白条带进行灰度分析, 计算目的蛋白与内参蛋白条带的灰度值比值。

1.2.6 细胞周期实验 细胞转染后 24 h 后每样收集 1×10^6 个细胞, 离心收集细胞, 弃上清液, 用预冷 PBS 洗细胞 2 次, 加入预冷 70% 乙醇, 于 4°C 固定过夜, 或置入 -20°C 长期固定。离心收集细胞, 以 1 ml 的 PBS 洗细胞 1 次, 加入 $500 \mu\text{l}$ PBS 含 $50 \mu\text{g/ml}$ 碘化丙啶 (PI), $100 \mu\text{g/ml}$ RNase A, 0.2% Triton X-100, 4°C 避光孵育 30 min。以标准程序用流式细胞仪检测, 一般计数 2 万 ~ 3 万个细胞, 结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析, 若方差齐, 则两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种细胞缺血培养的增殖情况

缺血 24 h 后 AML-12 细胞和没有全营养的对照比较, 细胞的死亡增加近 10%; 而 Hepa1-6 的 24 h

缺血导致的死亡增加约 3%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两种细胞缺血处理后与对照细胞的死亡率比较
($n=6$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	AML-12	Hepa1-6
对照组	2.488 ± 0.652	1.888 ± 0.584
研究组	12.163 ± 1.056	4.758 ± 0.425
差值	9.675 ± 0.404	2.870 ± 0.159
t 值	19.091	8.031
P 值	0.000	0.000

2.2 两种细胞缺血对内源 ATG5 表达的影响

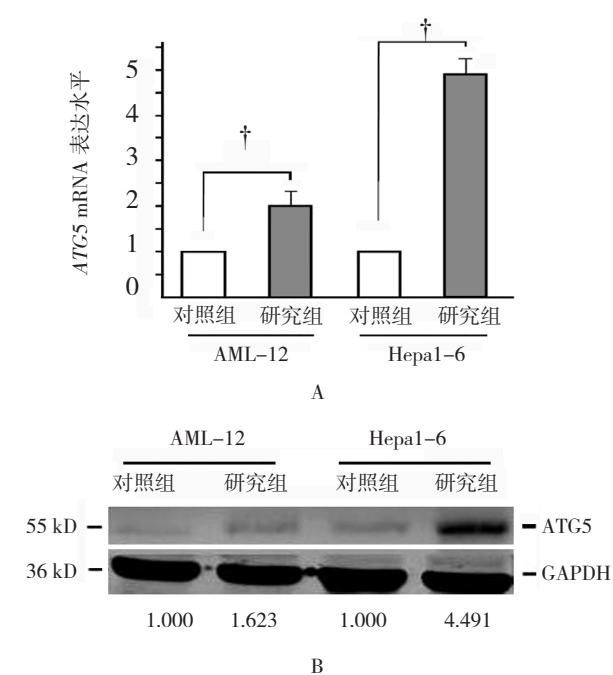
与对照组比较, 缺血 24 h 后 AML-12 细胞内的自噬相关基因 ATG5 的表达升高约 1 倍; 而 Hepa1-6 细胞缺血 24 h 导致 ATG5 基因表达升高近 4 倍, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 1A 和表 2)。Western blot 的结果显示, 缺血 24 h 后 AML-12 细胞内的自噬相关蛋白 ATG5 的表达升高达 1.6 倍。而 Hepa1-6 细胞的缺血 24 h 导致 ATG5 蛋白表达升高达 4.5 倍 (见图 1B)。

2.3 转染 si-RNAs、质粒后 Hepa1-6 细胞的增殖情况

转染 si-RNAs 后, 与对照组比较两种细胞 ATG5 蛋白表达降低 60% 以上 (见图 2A)。转染 si-RNAs 后两种细胞缺血培养 24 h, 与对照组比较, AML-12 细胞的死亡未增加 ($P > 0.05$); 而 Hepa1-6 细胞死亡升高 13%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 2B 和表 3)。转染外源 ATG5 基因表达的质粒后, 与对照组比较, ATG5 蛋白表达升高达 4.3 倍 (见图 2C)。转染质粒后 Hepa1-6 细胞缺血培养 24 h, 细胞死亡百分率为 $(2.413 \pm 0.601)\%$, 与对照组 $(5.542 \pm 0.838)\%$ 比较, 降低 3.1%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 7.168$, $P = 0.000$) (见图 2D)。

2.4 ATG5 对细胞周期抑制蛋白 p21 (cip1/waf1) 的影响

转染外源 ATG5 表达的质粒后, p21 (cip1/waf1) mRNA 表达 $(2.397 \pm 0.212)\%$, 与对照组 $(1.000 \pm 0.000)\%$ 比较升高达 2.4 倍, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 16.173$, $P = 0.000$) (见图 3A)。细胞内源 p21 (cip1/waf1) 蛋白表达升高达 3.5 倍 (见图 3B)。流式细胞仪测定显示, Hepa1-6 细胞的细



A: 缺血培养后 ATG5 基因的表达 (†与对照组比较, $P < 0.05$) ; B: 缺血培养后 ATG5 蛋白的表达

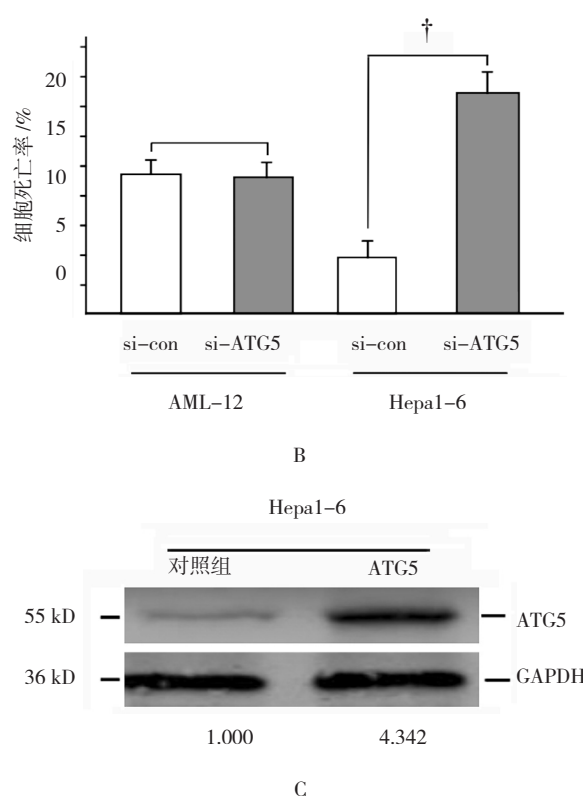
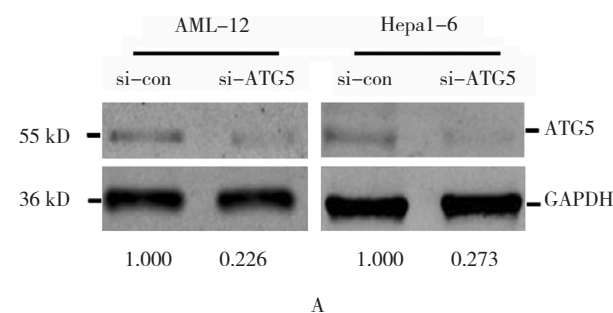
图 1 两种细胞缺血处理后对内源 ATG5 表达的影响

表 2 两种细胞缺血处理后 ATG5 的表达比较

($n = 6, \%, \bar{x} \pm s$)

细胞	AML-12	Hepa1-6
对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
研究组	1.953 ± 0.392	4.825 ± 0.467
差值	0.953 ± 0.392	3.825 ± 0.467
<i>t</i> 值	7.041	20.078
<i>P</i> 值	0.000	0.000

胞周期 G₁ 期从空载体的 (31.467 ± 1.583) % 升高到 ATG5 转染的 (38.067 ± 1.780) % , 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t = 6.787, P = 0.000$) (见图 3C)。si-RNAs 沉默 p21 (cip1/waf1) 后 p21 蛋白的表达降低 (见图 3D)。转染 si-RNAs 后细胞缺血培养 24 h, 细胞死亡率 (15.085 ± 1.156) % , 与对照组 (4.792 ± 0.609) %

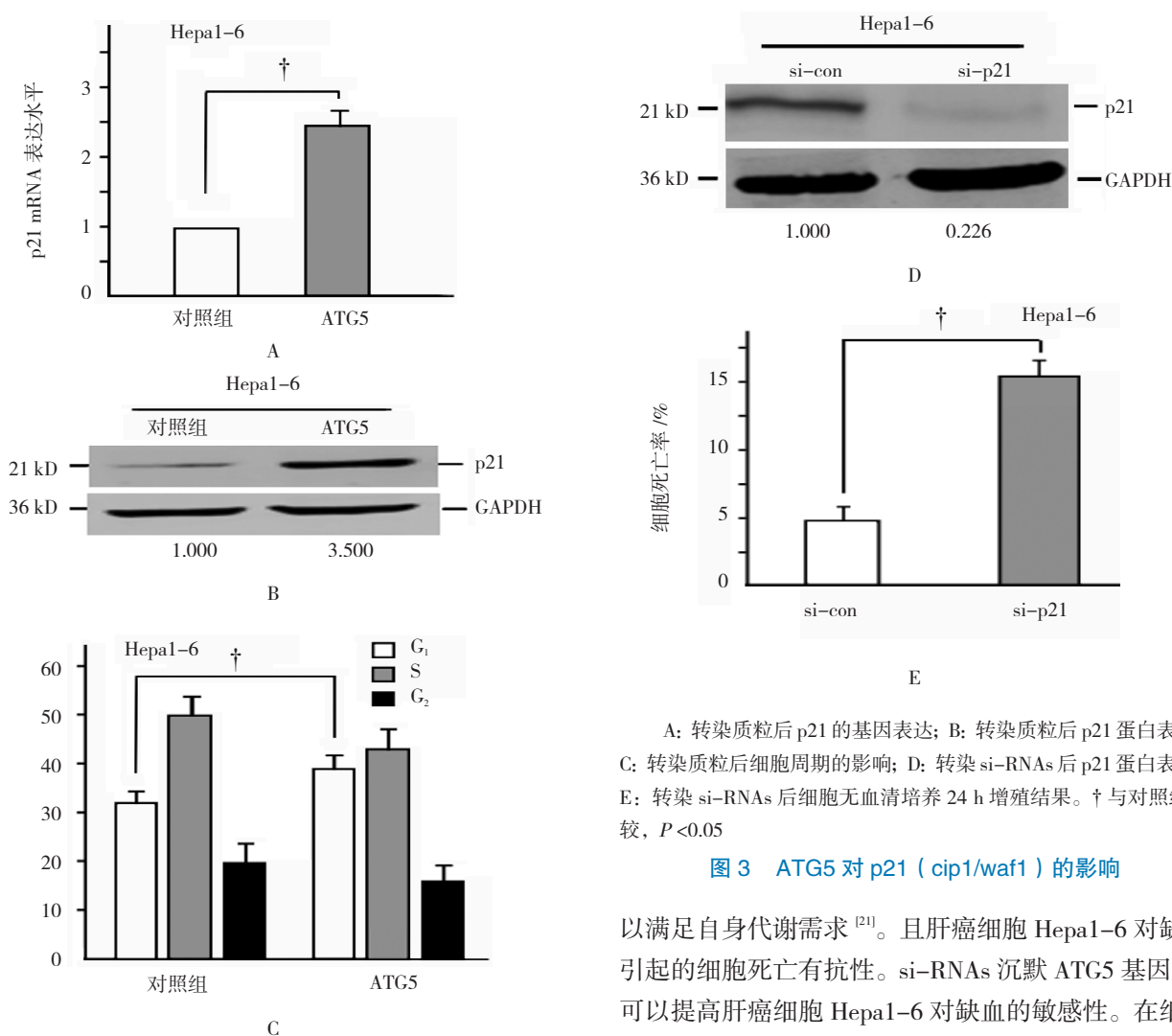


A : 转染 si-RNAs 后 ATG5 基因的表达 ; B : 转染 si-RNAs 后细胞无血清培养 24 h 增殖结果 ; C : 转染质粒后 ATG5 蛋白的表达 ; D: 转染质粒后细胞无血清培养 24 h 增殖结果。†与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 转染 si-RNAs、质粒后细胞增殖比较

表 3 两种缺血处理细胞下调 ATG5 后与对照组细胞的死亡率比较 ($n = 6, \%, \bar{x} \pm s$)

细胞	AML12	Hepa1-6
对照组	12.200 ± 0.460	4.792 ± 0.609
ATG5 下调组	12.167 ± 0.638	18.108 ± 1.138
差值	0.033 ± 0.178	13.316 ± 0.529
<i>t</i> 值	0.104	20.078
<i>P</i> 值	0.919	0.000



A: 转染质粒后 p21 的基因表达; B: 转染质粒后 p21 蛋白表达; C: 转染质粒后细胞周期的影响; D: 转染 si-RNAs 后 p21 蛋白表达; E: 转染 si-RNAs 后细胞无血清培养 24 h 增殖结果。† 与对照组比较, $P < 0.05$

图 3 ATG5 对 p21 (cip1/waf1) 的影响

以满足自身代谢需求^[21]。且肝癌细胞 Hepa1-6 对缺血引起的细胞死亡有抗性。si-RNAs 沉默 ATG5 基因后, 可以提高肝癌细胞 Hepa1-6 对缺血的敏感性。在细胞外源表达 ATG5 蛋白情况下, 会进一步降低细胞对缺血的不敏感性。且 ATG5 提高细胞内细胞周期的抑制蛋白 p21 (cip1/waf1) 的表达, 导致细胞滞留在 G₁ 期, 可能以此逃避缺血带来的死亡危机。

自噬是细胞通过消耗自体而获得能量从来寻求生存的分子途径。肿瘤细胞的自噬和自噬的调节的研究还未完全清楚。许多研究也指出, 营养剥夺可以诱导自噬并促进肝癌细胞增殖侵袭现象, 但其根本的分子途径并不明确。本研究说明小鼠肝癌细胞通过升高自噬蛋白 ATG5 的表达来对抗生存环境中营养缺乏的危机。而且 ATG5 是通过提高细胞内细胞周期的抑制蛋白 p21 (cip1/waf1) 的表达量, 从而导致细胞滞留在 G₁ 期, 可能以此来逃避缺血带来的细胞死亡危机。

自噬作为细胞内的一个重要代谢途径, 其可以抑癌也可以促癌, 但在治疗肿瘤过程中是促进自噬还是抑制自噬, 还有待研究。但不可否认的是与正常组织比较, 癌细胞更具有自噬依赖性, 说明存在治疗窗口。

比较增加了 10%, 差异有统计学意义 ($t = 19.297, P = 0.000$) (见图 3E)。

3 讨论

肝脏作为体内最重要的代谢器官, 本身可能会发生代谢失衡, 特变是在慢性肝病中会伴有大量的肝脏细胞自噬和凋亡, 自噬与凋亡的失衡也可导致肝脏疾病的发生, 肝损伤的病理特征多为肝细胞的自噬与凋亡。研究发现, 自噬失调与病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝、酒精性肝病、纤维化、肝硬化和肝细胞癌有关^[9-10], 且肿瘤细胞依赖自噬在肝癌中存活^[11]。因此研究自噬相关基因与肝脏疾病的关系对了解肝脏疾病显得尤为重要。

本研究将小鼠正常肝细胞和癌细胞在不同条件下缺血培养, 发现缺血导致一定程度上两种细胞内自噬蛋白 ATG5 升高, 与前人的研究结果相符, 即在营养缺乏的环境中细胞产生应激, 启动自噬, 自噬增强,

本研究结果提示,自噬基因 *ATG5* 在肝癌细胞中发挥重要作用, *ATG5* 帮助其对抗营养缺乏带来的生存危机,有望成为治疗进展期肝癌的潜在靶点。

参 考 文 献:

- [1] MIZUSHIMA N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 12(Suppl 2): 1535.
- [2] YORIMITSU T, KLIONSKY D J. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2005, 2(12 Suppl): 1542-1552.
- [3] LEE H K, LUND J M, RAMANATHAN B, et al. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells[J]. *Science*, 2007, 315(5817): 1398-1401.
- [4] LEVINE B, DERETIC V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7(10): 767.
- [5] TALLOCY Z, JIANG W, LEVINE B, et al. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2 alpha kinase signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 190-195.
- [6] GUTIERREZ M G, COLOMBO M I, MASTER S S. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages[J]. *Cell*, 2004, 119(6): 753.
- [7] LUM J J, BAUER D E, KONG M, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis[J]. *Cell*, 2005, 120(2): 237.
- [8] LIANG X H, JACKSON S, SEAMAN M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672.
- [9] VQU X, YU J, BHAGAT G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112(12): 1809.
- [10] MATHEW R, KONGARA S, BEAUDOIN B, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability[J]. *Genes & Development*, 2007, 21(11): 1367.
- [11] MIZUSHIMA N, YAMAMOTO A B A, HATANO C M, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells[J]. *Journal of Cell Biology*, 2001, 152(4):657-668.
- [12] BURMAN C, KTISTAKIS N T. Autophagosome formation in mammalian cells[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2010, 32(4): 397-413.
- [13] MILLER B C, ZHAO Z, STEPHENSON L M, et al. The autophagy gene *ATG5* plays an essential role in B lymphocyte development[J]. *Autophagy*, 2008, 4(3): 309-314.
- [14] KUMA A, HATANO M, MATSUI M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period.[J]. *Nature*, 2004, 432(7020): 1032.
- [15] HARA T, NAKAMURA K, MATSUI M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice.[J]. *Nature*, 2006, 441(7095): 885.
- [16] AYROLDI E, PETRILLO M G, BASTIANELLI A, et al. L-GILZ binds p53 and MDM2 and suppresses tumor growth through p53 activation in human cancer cells[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2015, 22(1): 118-130.
- [17] LUO Y, HURWITZ J, MASSAGUÉ J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21 Cip1[J]. *Nature*, 1995, 375(6527): 159-161.
- [18] CAO W, MA S L, TANG J, et al. A combined treatment TNF-alpha/doxorubicin alleviates the resistance of MCF-7/Adr cells to cytotoxic treatment[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2006, 1763(2): 182.
- [19] LI R, SHOU W, HANNON G J, et al. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair[J]. *Nature*, 1994, 371(6497): 534-537.
- [20] LU Y, YAMAGISHI N, YAGI T, et al. Mutated p21WAF1/CIP1/SDI1 lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 1998, 16(6): 705-712.
- [21] GONG L, DI C, XIA X, et al. AKT/mTOR signaling pathway is involved in salvianolic acid B-induced autophagy and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6): 2538-2548.

(王荣兵 编辑)