

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.01347

· 论 著 ·

## 芦荟大黄素介导的光动力诱导骨肉瘤 MG63 细胞自噬

涂平华<sup>1</sup>, 李开庭<sup>2</sup>, 陈青<sup>2</sup>, 欧云生<sup>1\*</sup>, 白定群<sup>2\*</sup>

1. 重庆医科大学附属第一医院骨科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第一医院康复科, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 探讨芦荟大黄素(aloe emodin, AE)介导的光动力(aloe emodin-photodynamic therapy, AE-PDT)诱导骨肉瘤 MG63 细胞产生自噬,并探讨自噬和凋亡的关系。**方法** 将细胞分为 AE-PDT 对照组(Control 组、AE 组、LED 组)和 AE-PDT 实验组。AE-PDT 作用于人骨肉瘤 MG63 细胞后,采用 CCK-8 法检测细胞活性,2',7'-二氯荧光二乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)染色检测细胞的自噬小体,透射电镜观察细胞的自噬体,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,Western 印迹检测自噬相关蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)和 Beclin-1 的表达。**结果** AE-PDT 能明显抑制人骨肉瘤 MG63 细胞的活性,且其抑制作用呈芦荟大黄素浓度-光动力能量剂量依赖性。AE-PDT 实验组细胞内 ROS 水平和自噬小体均较 3 个对照组增高;透射电镜下可见典型自噬体;AE-PDT 能诱导细胞产生自噬和凋亡,3-甲基腺嘌呤抑制自噬后能增加细胞的死亡率( $P < 0.05$ );Western 印迹检测 LC3-II/LC3-I 和 Beclin-1/ $\beta$ -actin 的表达高于阴性对照组。**结论** AE-PDT 能诱导骨肉瘤 MG63 细胞产生自噬。AE-PDT 作用早期,自噬能延缓凋亡的发生可能起保护作用。

**[关键词]** 芦荟大黄素;光动力疗法;骨肉瘤;自噬**[中图分类号]** R 738.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)12-1347-06

### Autophagy of osteosarcoma MG63 cells induced by aloe emodin-mediated photodynamic therapy

TU Ping-hua<sup>1</sup>, LI Kai-ting<sup>2</sup>, CHEN Qing<sup>2</sup>, OU Yun-sheng<sup>1\*</sup>, BAI Ding-qun<sup>2\*</sup>

1. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the autophagy of osteosarcoma MG63 cells induced by aloe emodin-mediated photodynamic therapy, and to discuss the relationship between autophagy and apoptosis. **Methods** The cultured MG63 cells were divided into 4 groups; empty control group, AE group, LED group, and AE-PDT group. MG63 cells in AE-PDT group were treated with aloe emodin combined with photodynamic therapy. The cell viability was measured by CCK-8, the DCFH-DA probe was used to detect cell ROS level, the autophagosomes were examined by MDC staining and electron microscope, the apoptosis of MG63 cells was detected by flow cytometry, and the autophagy-related protein (LC3 and Beclin-1) expressions were assessed by Western blotting analysis. **Results** Photosensitizer aloe emodin-mediated PDT significantly suppressed cell viability in a photosensitizer concentration- and energy density-dependent manner. The ROS level and autophagosomes were significantly increased in the AE-PDT group, with classical autophagosomes found under the electron microscope. AE-PDT induced autophagy and apoptosis of MG63 cells. The apoptosis rate was significantly increased when autophagy was inhibited by 3-MA ( $P < 0.05$ ). The results of Western blotting analysis showed that ratios of LC3-II/LC3-I and Beclin-1/ $\beta$ -actin in AE-PDT group were higher than those in the single AE treatment group, single light irradiation group, and the empty control group. **Conclusion** AE-PDT can induce autophagy in the MG63 cells. At the early stage of AE-PDT treatment, autophagy can postpone apoptosis and hence exert a protective effect.

**[Key words]** aloe emodin; photodynamic therapy; osteosarcoma; autophagy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(12):1347-1352]

**[收稿日期]** 2014-06-04 **[接受日期]** 2014-09-25**[基金项目]** 国家自然科学基金(81101692),重庆市科委自然科学基金(2011BB5136). Supported by National Natural Science Foundation of China (81101692) and Natural Science Foundation of Chongqing (2011BB5136).**[作者简介]** 涂平华, 硕士生. E-mail: tupinghua@126.com

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 023-89011019, E-mail: ouyunsheng2001@163.com; Tel: 023-89011019, E-mail: baidingqun@163.com

骨肉瘤在小儿恶性骨肿瘤患者中最常见,主要发生在儿童期和青春期,严重影响患者的生活质量<sup>[1-2]</sup>。目前手术联合辅助化疗能提高患者生存率,但对反复发作转移和产生耐药性的骨肉瘤患者的预后仍然不佳<sup>[3-4]</sup>。光动力疗法是通过肿瘤细胞吸收光敏剂,随后在肿瘤部位进行局部光照,产生细胞活性氧(ROS)杀伤肿瘤细胞达到靶向治疗,已被用于肿瘤的治疗中<sup>[5-7]</sup>。光动力疗法由于其独特的优点和良好的兼容性,在肿瘤的综合治疗中发挥重要作用。芦荟大黄素是从传统中药中提取的新型蒽醌化合物,已被证实具有抗肿瘤效应<sup>[8-10]</sup>。而且,研究表明芦荟大黄素具有一定的荧光性,可以作为一种很有前景的光敏剂<sup>[11-12]</sup>。芦荟大黄素(AE)介导的光动力疗法(AE-PDT)能降低药物使用浓度从而减少药物毒性,同时能诱导细胞凋亡,具有一定的抗肿瘤效应<sup>[13-14]</sup>。

自噬是真核细胞进化保守的降解自身细胞器或蛋白质的过程,在肿瘤的发生发展中起到重要作用。本研究旨在观察 AE-PDT 诱导人骨肉瘤 MG63 细胞发生自噬现象,并初步探讨自噬在 AE-PDT 治疗骨肉瘤中的作用及其与凋亡的关系。

## 1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 人骨肉瘤细胞 MG-63(购于 ATCC, USA); AE(Sigma); DMEM/F12 培养基及胎牛血清(Gibco);胰蛋白酶(碧云天);单丹磺酰尸胺(MDC, Sigma); 2', 7'-二氯荧光二乙酸盐(DCFH-DA, Sigma);  $\beta$ -actin、Beclin-1 和 LC3 兔抗鼠抗体(Sigma);羊抗兔辣根过氧化物酶 IgG(碧云天);细胞活力细胞毒性检测试剂盒(CCK-8, 碧云天);Annexin V-PI 双染检测试剂盒(凯基);光动力治疗仪。

1.2 细胞分组及处理 将细胞分成光动力对照组(Control 组、AE 组、LED 组)和 AE-PDT 实验组。AE 组和 AE-PDT 组加入梯度浓度(0、5、10、50、100  $\mu\text{mol/L}$ )的 AE,在 37.0 $^{\circ}\text{C}$ 和 5% $\text{CO}_2$ 的细胞培养箱避光孵育 6 h 后,用 PBS 缓冲液洗 3 次,再换成等量的培养基;LED 组和 AE-PDT 组使用 430 nm 波长、连续输出方式、光功率密度为 40  $\text{mW/cm}^2$  的 LED 光源照射为 0、60、120 和 160 s,使细胞接受的光能量密度达到 0、2.4、4.8 和 6.4  $\text{J/cm}^2$ 。

1.3 CCK-8 检测细胞活性 以细胞密度为  $5 \times 10^3$  个/孔将 MG63 细胞接种到 96 孔板,每组设置 3 个复孔,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液,在 37.0 $^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养 24 h 后使其贴壁,细胞处理 24 h 后每孔加入 CCK-8 试剂 10  $\mu\text{L}$ ,避光培养 1 h,用酶标仪检测 450 nm 波长处光密度(D)值。按公式计算细胞生长抑制率(%)=(空白对照组平均 D 值-实验组平均 D 值)/空白对照组平均 D 值 $\times 100\%$ 。我们最终选择 AE 的浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 、光照能量密度为 4.8  $\text{J/cm}^2$  作为后续实验的处理条件。

1.4 DCFH-DA 荧光染色检测 ROS 将 MG63 以细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/孔接种到 24 孔板,处理后各组细胞加入浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  DCFH-DA 染料 200  $\mu\text{L}$ ,37.0 $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min,PBS 洗 3 次后直接荧光显微镜下观察(激发波长 488 nm、发射波长 520 nm)。

1.5 MDC 染色观察自噬泡 将各组细胞进行爬片处理后,弃培养基,PBS 冲洗 3 次,4%多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 2 次,加入浓度为 0.05  $\text{mmol/L}$  MDC 染料 200  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 45 min,PBS 冲洗 2 次,荧光显微镜下(激发波长 425 nm、发射波长 525 nm)观察细胞自噬空泡积聚的变化。

1.6 透射电镜观察自噬体 EP 管收集光动力实验组细胞并离心,用 2.5%戊二醛和 1%锇酸进行固定,梯度乙醇及丙酮脱水,包埋固化后切片,3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电镜观察并摄片。

1.7 流式细胞术检测凋亡 将 MG63 细胞以  $1 \times 10^6$  个/孔接种于 6 孔板中,在 AE-PDT 处理细胞前 1 h 用 5  $\text{mmol/L}$  3-甲基腺嘌呤(3-MA)预处理细胞,收集所有组细胞进行 Annexin V-PI 双染,采用流式细胞仪检测。

1.8 Western 印迹检测 Beclin-1 和 LC3 蛋白的表达 收集各组细胞后按常规操作方法进行, $\beta$ -actin 和 Beclin-1 转至 0.45  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜,LC3 转至 0.20  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜, $\beta$ -actin 抗体(1:1 000)、Beclin-1 抗体(1:1 000)和 LC3 抗体(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;辣根过氧化物酶标记二抗(1:1 000),ECL 发光显影。

1.9 统计学处理 应用 SAS 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组数据间比较采用单因素方差分析及两因素方差分析,组内两两比较采用 SNK- $q$  检验分析。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 芦荟大黄素介导的光动力对人骨肉瘤细胞 MG63 的细胞活性抑制作用 光敏剂 AE 介导的光动力作用对人骨肉瘤 MG63 细胞的细胞活性有显著抑制作用, 且其抑制作用呈剂量依赖效应。在单纯光敏剂 AE 浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  或单纯光照能量密度为  $4.8 \text{ J/cm}^2$  时对细胞活性无明显抑制作用, 但光敏剂 AE 的浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  联合光照能量密度为  $4.8 \text{ J/cm}^2$  光动力处理细胞时抑制细胞活性 ( $P < 0.05$ )。因此, 我们最终选择芦荟大黄素的浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ , 光照能量密度为  $4.8 \text{ J/cm}^2$  作为后续实验的处理条件。

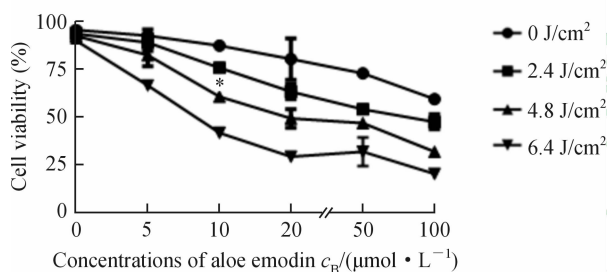


图 1 MG63 细胞活性检测

Fig 1 Viability of MG63 cells as detected by cell counting kit-8

\*  $P < 0.05$  vs control group,  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 细胞内 ROS 水平变化 AE-PDT 对照组 (Control 组、AE 组和 LED 组) 细胞基本无荧光; AE-PDT 作用 MG63 细胞 3 h 后, 细胞变为圆形, 荧光染色信号显著增强。

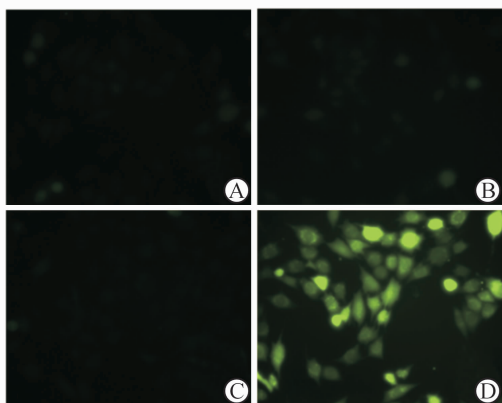


图 2 2',7'-二氯荧光二乙酸盐检测细胞活性氧水平

Fig 2 Level of reactive oxygen species as detected by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate staining

A: Empty control group; B: Single aloe emodin group; C: Single light emitting diode group; D: Aloe emodin-photodynamic therapy group

2.3 MDC 染色观察自噬泡 荧光显微镜下染上 MDC 荧光的自噬泡呈绿色点状结构, 主要分布于核周。光动力作用 MG63 细胞 3 h 后, 核周积聚大量自噬小泡, 与对照组 (Control 组、AE 组和 LED 组) 相比显著增加。

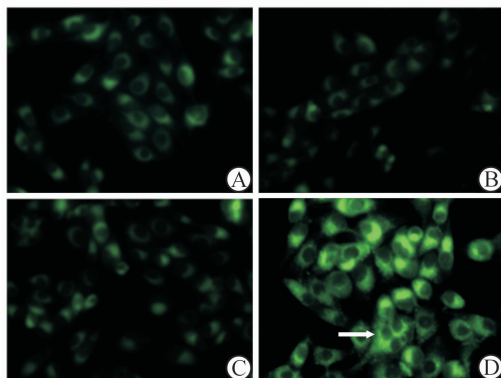


图 3 单丹磺酰尸胺染色检测细胞自噬体

Fig 3 Monodansylcadaverin staining of autophagosomes in MG63 cells

A: Empty control group, B: Single aloe emodin group, C: Single light emitting diode group, D: Aloe emodin-photodynamic therapy group

2.4 透射电镜下细胞的超微结构 AE-PDT 作用 MG63 细胞 3 h 后, 胞质内可见大量囊泡状结构包裹细胞器或蛋白质, 与溶酶体融合形成典型的自噬溶酶体, 此超微结构明显区别于凋亡及坏死细胞。

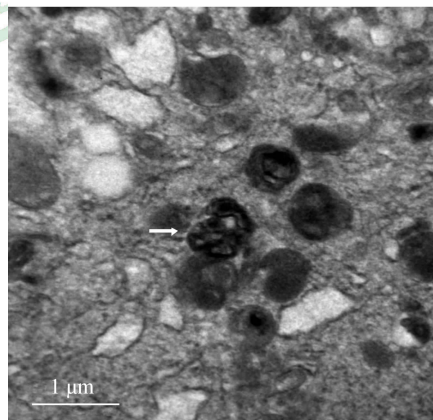


图 4 透射电镜下 MG63 细胞自噬体结构

Fig 4 Ultrastructure of MG63 cell autophagosomes under transmission electron microscope

2.5 AE-PDT 对骨肉瘤细胞凋亡的影响 AE-PDT 对照组 (Control 组、AE 组、LED 组和 3-MA 组) 之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), AE-PDT 处理细胞 3 h 后凋亡率高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 在 AE-PDT 处理细胞前 1 h 用 3-MA 预处理细胞 (AE-

PDT+3-MA 组)细胞凋亡率与对照组比上升( $P < 0.05$ )。

2.6 自噬蛋白 LC3 和 Beclin-1 的表达变化 AE-PDT 作用 MG63 细胞 1 h 后,LC3-II 蛋白表达逐渐

增加,处理 24 h 时 LC3-II/LC3-I 比值最高;AE-PDT 作用 MG63 细胞后 Beclin-1 蛋白表达逐渐增加,处理 6 h 时 Beclin-1 的表达达到峰值,此后随时间延长而降低。

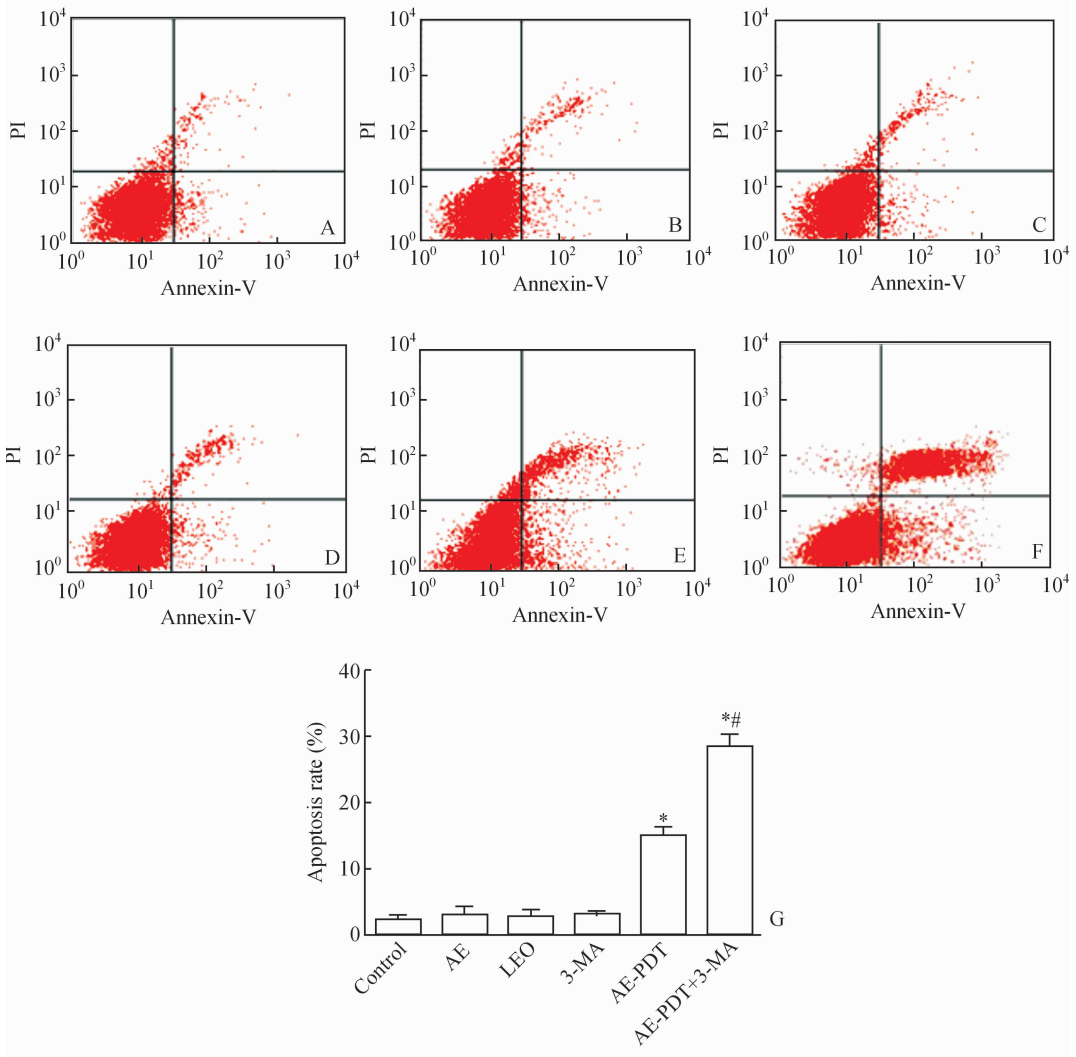


图 5 不同处理组作用下 MG63 细胞的凋亡情况及定量比较( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Fig 5 Analysis and quantification of apoptosis in MG63 cells in different groups by flow cytometry

A: Control group; B: Aloe emodin group; C: Light emitting diode group; D: 3-Methyladenine group; E: Aloe emodin-photodynamic therapy group; F: Aloe emodin-photodynamic therapy+3-Methyladenine group; G: Statistical analysis of apoptotic cells in each group, AE: aloe emodin, LEO: light emitting diode, 3-MA: 3-Methyladenine, AE-PED: aloe emodin-photodynamic therapy

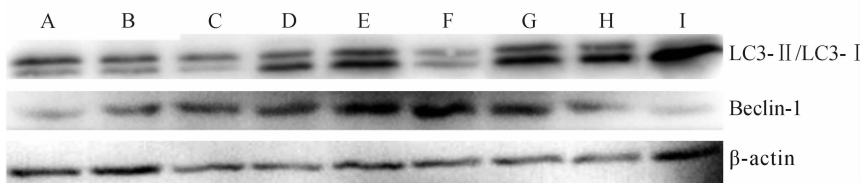


图 6 LC3 和 Beclin-1 的蛋白表达

Fig 6 Western blotting analysis of LC3 and Beclin-1 protein levels in different groups at different time points

A: Control group; B: Aloe emodin group; C: Light emitting diode group; D: Aloe emodin-photodynamic therapy group, 1 h; E: Aloe emodin-photodynamic therapy group, 3 h; F: Aloe emodin-photodynamic therapy group, 6 h; G: Aloe emodin-photodynamic therapy group, 9 h; H: Aloe emodin-photodynamic therapy group, 12 h; I: Aloe emodin-photodynamic therapy group, 24 h

### 3 讨论

光动力疗法是近年来广泛兴起的一种非侵袭性治疗肿瘤的方式,它是利用一定波长的可见光激发聚集于肿瘤组织中的光敏剂,诱导光敏剂发生一系列的光化学、光生物学反应,产生活性氧物质,进而损伤细胞内的亚细胞器,引发一系列信号通路的激活,导致细胞死亡,达到抗肿瘤的治疗效果。AE 是一种具有荧光性和广泛抗肿瘤效应的合成物。Pecere 等<sup>[15]</sup> 在小鼠动物模型中发现 AE 的细胞毒性作用呈剂量依赖性,神经外胚层肿瘤细胞系 ED<sub>50</sub> 为 1~13  $\mu\text{mol/L}$ , 上皮性肿瘤细胞系 ED<sub>50</sub> 为 40-100  $\mu\text{mol/L}$ 。Lee 等<sup>[13-14]</sup> 的研究表明, AE 浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  时不需要联合光动力就能诱导肺癌细胞凋亡,而 AE-PDT(AE 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , PDT 能量强度为 1.6 J/cm<sup>2</sup>) 治疗对肺癌 H460 细胞同样具有较好的抗肿瘤作用。因此, AE 介导的光动力疗法能减少药物的副作用,小剂量即可达到抗肿瘤作用。本研究发现 LED 光照激活 AE 可以明显抑制骨肉瘤 MG63 细胞活性,同时我们检测到了自噬现象的发生。

MDC 染色常被用来检测自噬体的存在,我们的研究结果显示 AE-PDT 处理细胞 3 h 后 MDC 阳性细胞和自噬体数量增多,表明 AE-PDT 能诱导人骨肉瘤 MG63 细胞产生自噬。电镜是证明自噬现象的金标准,我们通过透射电镜证实光动力处理细胞后可见胞质内大量囊泡状结构,包裹细胞器的双层膜结构自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体。

光动力治疗肿瘤过程中自噬可能起着双重作用,自噬能通过清除 ROS 和抑制凋亡过程来保护部分肿瘤细胞,而部分肿瘤细胞则发生自噬性死亡<sup>[16-17]</sup>。本实验发现 AE-PDT 作用于骨肉瘤 MG63 细胞 3 h 时能诱导细胞发生自噬和凋亡,用自噬抑制剂 3-MA 预处理细胞后,细胞凋亡率增加。推测在 AE-PDT 作用早期,自噬可能通过清除 ROS 和部分损害的细胞器延缓凋亡的发生,从而发挥保护性机制。

为进一步探讨细胞自噬保护性的机制,我们检测自噬重要调控因子 Beclin-1 和 LC3 的表达。LC3 以 LC3-I 和 LC3-II 两种形式存在,细胞发生自噬时 LC3-I 向 LC3-II 转化,其中 LC3 II 被认为是自噬体的标志分子,LC3-II/LC3-I 的比值反映自噬

强度<sup>[18]</sup>。我们的结果显示 LC3-II 表达水平随 AE-PDT 处理细胞时间的延长而增加,AE-PDT 作用 24 h 后 LC3-II/LC3-I 比值最高,提示在 AE-PDT 处理 MG63 细胞诱导自噬形成过程中自噬小体不断聚集。Beclin-1 是参与自噬的特异性基因,与多种蛋白相互作用共同调控自噬的起始<sup>[19]</sup>。研究表明自噬因子 Beclin-1 能通过磷酸化的 Bcl-2 和 Bax 结合来降低细胞的凋亡水平,从而起到细胞保护性作用<sup>[20]</sup>。本实验结果显示 AE-PDT 处理 MG63 细胞后诱导 Beclin-1 的表达逐步增高,在处理 6 h 达到峰值,之后表达逐渐降低。结果提示 Beclin-1 在 AE-PDT 处理早期可能通过与其他蛋白相互作用共同调控自噬和凋亡来维持细胞稳态。

本实验表明 AE-PDT 能诱导骨肉瘤 MG63 细胞发生自噬,并且自噬在 AE-PDT 作用早期发挥抗凋亡的保护性作用。自噬和凋亡共同参与了 AE-PDT 抗肿瘤治疗,如何调控自噬和凋亡水平来提高光动力治疗骨肉瘤的抗肿瘤效应仍需进一步研究。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Whelan J, McTiernan A, Cooper N, Wong Y K, Francis M, Vernon S, et al. Incidence and survival of malignant bone sarcomas in England 1979-2007[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131: E508-E517.
- [2] Ottaviani G, Jaffe N. The epidemiology of osteosarcoma [J]. *Cancer Treat Res*, 2009, 152: 3-13.
- [3] He H, Ni J, Huang J. Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma [J]. *Oncol Lett*, 2014, 7: 1352-1362.
- [4] Mittal N, Kent P M, Ording J. Metastatic and recurrent bone primary bone cancers [J]. *Curr Probl Cancer*, 2013, 37: 215-224.
- [5] Shirasu N, Nam S O, Kuroki M. Tumor-targeted photodynamic therapy [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33: 2823-2831.
- [6] Calabrò G, Patalano A, Lo Conte V, Chianese C. Photodynamic chemotherapy in the treatment of superficial mycoses: an evidence-based evaluation [J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2013, 148: 639-648.
- [7] Master A, Livingston M, Sen Gupta A. Photodynamic

- nanomedicine in the treatment of solid tumors: perspectives and challenges[J]. *J Contr Rel*, 2013, 168: 88-102.
- [8] Chen R, Zhang J, Hu Y, Wang S, Chen M, Wang Y. Potential antineoplastic effects of Aloe-emodin: a comprehensive review[J]. *Am J Chin Med*, 2014, 42: 275-288.
- [9] Tabolacci C, Lentini A, Mattioli P, Provenzano B, Oliviero S, Carlomosti F, et al. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells [J]. *Life Sci*, 2010, 87: 316-324.
- [10] Jeon W, Jeon Y K, Nam M J. Apoptosis by aloe-emodin is mediated through down-regulation of calpain-2 and ubiquitin-protein ligase E3A in human hepatoma Huh-7 cells[J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36: 163-167.
- [11] Zaffaroni M, Mucignat C, Pecere T, Zagotto G, Frapolli R, D'Incalci M, et al. High-performance liquid chromatographic assay for the determination of Aloe Emodin in mouse plasma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 796: 113-119.
- [12] Vargas F, Rivas C, Medrano M. Interaction of emodin, aloe-emodin, and rhein with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2004, 14: 227-231.
- [13] Lee H Z. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 134: 11-20.
- [14] Lee H Z, Yang W H, Hour M J, Wu C Y, Peng W H, Bao B Y, et al. Photodynamic activity of aloe-emodin induces resensitization of lung cancer cells to anoikis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 648: 50-58.
- [15] Pecere T, Gazzola M V, Mucignat C, Parolin C, Vecchia F D, Cavaggioni A, et al. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 2800-2804.
- [16] Gewirtz D A. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy [J]. *Cancer Res*, 2014, 74: 647-651.
- [17] Lambert L A, Qiao N, Hunt K K, Lambert D H, Mills G B, Meijer L, et al. Autophagy: a novel mechanism of synergistic cytotoxicity between doxorubicin and roscovitine in a sarcoma model [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 7966-7974.
- [18] Klionsky D J, Abdalla F C, Abeliovich H, Abraham R T, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008, 4: 151-175.
- [19] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12: 520-534.
- [20] Zhou F, Yang Y, Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *FEBS J*, 2011, 278: 403-413.

[本文编辑] 尹 茶