

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.06.009

· 基础研究 ·

## 甘草素通过影响鼻咽癌 CNE-2 细胞的自噬增强其放疗敏感性

张荣芳<sup>1</sup>, 王春玲<sup>1</sup>, 李申<sup>1</sup>, 靳海科<sup>1</sup>, 姬颖华<sup>2</sup> (1. 河南护理职业学院, 河南 安阳 455000; 2. 新乡医学院第一附属医院 肿瘤科, 河南 卫辉 453100)

**[摘要]** **目的:** 探讨甘草素(licorice)对鼻咽癌 CNE-2 细胞放疗增敏的影响及其作用机制。**方法:** 体外培养构建放射抵抗性的鼻咽癌细胞株 CNE-2-RR。MTT 细胞实验检测不同浓度的甘草素对鼻咽癌细胞增殖活性的影响, 透射电镜检测甘草素处理鼻咽癌细胞后自噬体的变化情况, Western blotting 检测甘草素对鼻咽癌细胞自噬蛋白水平的影响, 彗星实验检测不同组鼻咽癌细胞 DNA 损伤修复情况, 流式细胞术检测鼻咽癌细胞株凋亡率的变化。**结果:** 成功构建放射抵抗细胞株 CNE-2-RR, 20 mmol/L 甘草素对鼻咽癌细胞的最高抑制率为(58.86±5.02)%。甘草素处理鼻咽癌 CNE-2-RR 细胞后胞内自噬体数量增加, 线粒体和细胞核形态异常; 细胞中自噬体蛋白 LC3-II 水平升高、LC3-I 水平降低( $P<0.05$ ); 甘草素作用 CNE-2-RR 细胞后彗星尾距长度大于对照组, 表明对 DNA 损伤修复能力明显降低。甘草素作用导致 CNE-2-RR 细胞的凋亡率明显增加( $P<0.05$ )。**结论:** 甘草素通过影响鼻咽癌 CNE-2-RR 细胞的自噬行为及 DNA 修复能力增强其对放疗的敏感性。

**[关键词]** 甘草素; 鼻咽癌; CNE-2-RR 细胞; 自噬体; 放射敏感性

**[中图分类号]** R739.63; R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)06-0601-06

## Licorice enhances radio-sensitivity of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells by affecting autophagy

ZHANG Rongfang<sup>1</sup>, WANG Chunling<sup>1</sup>, LI Shen<sup>1</sup>, JIN Haike<sup>1</sup>, JI Yinghua<sup>2</sup> (1. Henan Nursing Career Academy, Anyang 455000, Henan, China; 2. First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Weihui 453100, Henan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of licorice on radio-sensitization of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells and its mechanism. **Methods:** The radio-resistant nasopharyngeal carcinoma cell line (CNE-2-RR) was constructed and cultured *in vitro*. MTT assay was used to detect the effect of different concentrations of licorice on the proliferation activity of nasopharyngeal carcinoma cells. The changes of autophagosome in CNE-2-RR cells after licorice treatment were observed by transmission electron microscopy (TEM). Western blotting was used to detect the effect of licorice on the level of autophagy protein in CNE-2-RR cells. Single cell gel electrophoresis (comet assay) was used to detect the DNA damage and repair of different groups of CNE-2-RR cells. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate of CNE-2-RR cell line. **Results:** Low-radiation resistant CNE-2-RR cell line was successfully constructed; MTT assay showed that 20 mmol/L licorice exhibited highest inhibition on CNE-2-RR cells (58.86 ± 5.02)%. Transmission electron microscopy showed increased autophagicbody and abnormal mitochondria and nuclei morphology in CNE-2-RR cells after treatment. Western blotting showed that autophagic protein LC3-II level was increased and LC3-I level was decreased in CNE-2-RR cells ( $P < 0.05$ ). The results of single cell gel electrophoresis showed that the length of comet tail distance of CNE-2-RR cells after licorice treatment was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ), indicating weakened repair ability of DNA damage. **Conclusion:** Licorice enhances the radio-sensitivity of CNE-2-RR cells by influencing autophagy and DNA repair ability.

**[Key words]** licorice; nasopharyngeal carcinoma; CNE-2-RR cell; autophagy; radio-sensitivity

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(6): 601-606. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.06.009]

鼻咽癌在全球范围内都有广泛的发病情况, 其中在东南亚地区发病率最高, 在中国华南地区是病死率较高的恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>。目前, 放射治疗是鼻咽癌的主要治疗方法, 辅助一定的化学药物治疗可以提升一定的治疗有效性<sup>[3-4]</sup>。然而, 在许多情况下鼻咽癌的放射性抵抗十分常见, 是影响治疗效果的严重阻碍<sup>[5]</sup>。因此, 研究鼻咽癌放射抗性的机制及提高鼻

**[基金项目]** 河南省医学科技攻关计划资助项目(No.201203068)。Project supported by the Medical Science and Technology Program of Henan Province (No.201203068)

**[作者简介]** 张荣芳(1979-), 女, 学士, 讲师, 主要从事肿瘤治疗疗效的调查研究

**[通信作者]** 张荣芳(ZHANG Rongfang, corresponding author), E-mail: chenteng4yy@sina.com

咽癌细胞的放射敏感性是目前临床研究的热点。自噬 (autophagy) 是细胞分解代谢的病理过程, 其参与维持细胞生长发育, 保持细胞产物的合成、降解和再循环之间的微平衡状态<sup>[6]</sup>。自噬过程开始于自噬体 (autophagic body) 或自噬液泡的形成, 将胞内容物输送到细胞器中, 然后逐步被降解, 参与分子再循环过程<sup>[7]</sup>。最近的研究<sup>[8-10]</sup>显示, 自噬在免疫反应、炎症反应、心血管疾病、恶性肿瘤和神经变性疾病中的起重要的作用。然而, 对自噬在恶性肿瘤中的主要作用仍存在争议的, 有研究<sup>[11-12]</sup>显示, 敲除自噬相关基因可以增强自发性恶性肿瘤的发展, 而存在自噬相关基因缺陷小鼠对放疗、化疗甚至免疫治疗都具有更高的敏感性。甘草素 (licorice) 是从中药甘草中提取的一种黄酮类化合物, 具有抗肿瘤、抗病毒、抗自由基氧化和抑制脂质过氧化等多种生物学活性<sup>[13]</sup>。近年有研究<sup>[14]</sup>发现, 甘草素可以增强对不同肿瘤细胞株对化疗和放疗等治疗的敏感性, 在一定程度上增强临床治疗效果。然而针对鼻咽癌细胞株的放疗抵抗性, 甘草素的作用效果及机制尚未有相关研究报道。本研究通过使用适宜浓度的甘草素作用于鼻咽癌细胞, 检测放射线对其自噬体形成、DNA 损伤及细胞凋亡等行为的影响, 探讨甘草素对鼻咽癌细胞株放疗敏感性的影响及其作用机制, 以及自噬体的形成与鼻咽癌细胞株放射敏感性的相关性, 为临床鼻咽癌的放射治疗提供新的参考方向。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株与主要试剂

人鼻咽癌细胞株 CNE-2 由上海细胞研究所提供。RPIM 1640 培养基购于美国赛默飞公司, 胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司, LC3 和 GAPDH 抗体均购于美国 Abcam 公司, MTT 试剂购于美国 Sigma 公司, TRIzol 购自美国 Ambion 公司, 逆转录试剂盒 (FSQ-101) 购自日本 TOYOBO 公司, FITC 试剂盒购自美国 Sigma 公司, 甘草素试剂购买于中国上海碧云天生物公司, 自噬检测试剂盒购于美国赛默飞生物公司。

### 1.2 建立稳定耐受放射线能力的鼻咽癌细胞株

体外培养人鼻咽癌细胞株 CNE-2, 待细胞汇合度为 60%~70% 且细胞生长处于对数生长期时, 给予适量剂量的放射线照射 (X 线 2、4、6、8、10 Gy 剂量分别照射 2 次, 每次 3 min, 共 60 Gy)。照射后继续于细胞培养箱中培养, 密切观察细胞状态。待细胞状态恢复良好后, 重复以上步骤, 并逐渐加大每次照射的剂量, 直至建立具有稳定耐受放射线能力的鼻咽癌细胞株 CNE-2, 筛选出的耐放射细胞株命名为 CNE-2-

RR (CNE-2 radiation resistance), 后续试验使用 5~10 代传代优良的细胞。

### 1.3 MTT 法检测 CNE-2-RR 细胞增殖情况

CNE-2-RR 细胞以为  $3 \times 10^4$  细胞/孔接种到 96 孔板中。用不同浓度的 (5、10、15、20、25 mmol/L) 甘草素处理细胞, 作用 24 或 48 h 后, 继续孵育 4 h, 然后离心。除去上清液, 然后加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砷 (DMSO)。在 37  $^{\circ}$ C 测量每个孔的光密度 (D) 值。MTT 法检测不同浓度的甘草素对鼻咽癌细胞增殖活力的抑制作用, 采用 CompuSyn 软件计算组合指数 (CI) 计算 MTT 值。实验重复 3 次。

### 1.4 透射电子显微镜观察 CNE-2-RR 细胞自噬体

通过胰蛋白酶消化收集 CNE-2-RR 细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 并用冰冷的戊二醛固定 24 h。将细胞固定在 OsO<sub>4</sub> 中, 并以 70%~100% 丙酮的分级系列脱水, 用四乙酸铀和柠檬酸三水合物双重染色, 并使用透射电子显微镜观察、扫描并分析 CNE-2-RR 细胞中自噬体的超微结构图像。

### 1.5 Western blotting 检测 CNE-2-RR 细胞中自噬蛋白的表达

将 CNE-2-RR 细胞用冰冷 PBS 洗涤 2 次, 在 4  $^{\circ}$ C 下加入裂解液裂解 15 min, 然后在 4  $^{\circ}$ C 下以 12 000 $\times$ g 离心 30 min。使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定上清液中的蛋白质浓度。将 25  $\mu$ l 蛋白质提取到 15% SDS-PAGE 凝胶上, 然后通过电泳、电转转移到 PVDF 膜上。使用 5% 牛奶封闭 2 h 后, 将膜与 LC3 (1:2 000)、GAPDH (1:800) 抗体孵育过夜。次日使用 PBS 充分冲洗后, 使用荧光标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:5 000) 孵育 2 h, 再次使用 PBS 冲洗后, 使用 ECL 显影液成像, 检测蛋白荧光强度。实验重复 3 次。

### 1.6 彗星实验检测 CNE-2-RR 细胞的 DNA 损伤修复能力

常规接种对照组和甘草素组对数期的细胞于 6 孔板, 接种密度为  $5 \times 10^5$ /孔, 待细胞贴壁并恢复状态后, 给予 0、10 Gy 照射, 置于细胞培养箱中培养。分别于照射后 1、6 h 收集细胞, 胰酶消化、离心后, 以 1 ml 冰冷的 PBS 重悬细胞, 在暗室低温下进行。采用 Invitrogen 公司的彗星实验试剂盒低熔点琼脂糖 LMA 沸水浴 5 min, 完全溶化后置于 37  $^{\circ}$ C 达 20 min, 取 20  $\mu$ l 细胞悬液与 80  $\mu$ l LMA 混匀, 置于 4  $^{\circ}$ C 避光 10 min。轻轻加入预冷的新鲜配制的细胞裂解液, 4  $^{\circ}$ C 裂解过夜。从细胞裂解液中取出并排干载玻片上的水份, 置于新鲜配制的 DNA 解旋液中, 4  $^{\circ}$ C 避光处理 1 h。取出载玻片, 轻轻置于电泳槽中, 有标记的一侧朝向阴极 (黑色), 轻轻倒入电泳液 500 ml, 恒压 21V、30 min、避光。充分漂洗后染色, 每孔加入 100

$\mu\text{l}$  DAPI, 室温避光染色 30 min, 蒸馏水充分冲洗 3 次,  $37^\circ\text{C}$  避光干燥载玻片。荧光显微镜下每个样本随机拍照 100 个细胞并保存, 用 CASP 软件分析实验结果。

### 1.7 流式细胞术检测 CNE-2-RR 细胞凋亡情况

将 CNE-2-RR 细胞用 PBS 洗涤 2 次, 并以  $1\ 800\times g$  的转速离心 5 min, 将细胞悬浮于  $500\ \mu\text{l}$  结合缓冲液 (Annexin V-PI) 中, 在含有  $5\ \mu\text{l}$  的 Annexin V-FITC 和  $5\ \mu\text{l}$  PI 中检测细胞外质膜上暴露的磷脂酰丝氨酸。在光保护区域室温孵育 5~15 min 后, 通过流式细胞术检测细胞凋亡率的变化。

### 1.8 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件, 计数资料以百分率 (%) 表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验; 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析。应用 GraphPadPrism5 软件进行统计图形制作。以  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 确定甘草素对 CNE-2-RR 细胞的最佳抑制浓度

MTT 法检测不同浓度的甘草素对鼻咽癌 CNE-2-RR 细胞的抑制结果 (图 1) 显示, CNE-2-RR 细胞增殖呈不同程度的抑制, 抑制率随甘草素浓度的增加而增高, 在一定范围内呈浓度依赖性;  $20\ \text{mmol/L}$  甘草素对 CNE-2-RR 细胞为最佳抑制剂量, 故以  $20\ \text{mmol/L}$  甘草素药物作为后续实验最适浓度。

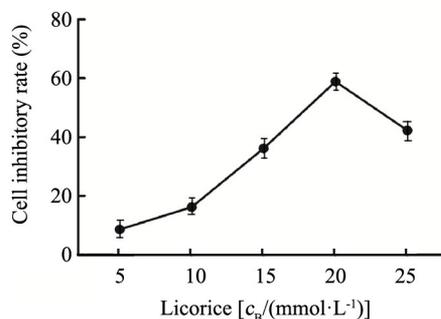


图 1 甘草素对 CNE-2-RR 细胞的最佳抑制浓度

Fig. 1 The most optimal concentration of licorice on CNE-2-RR cells

### 2.2 甘草素处理后 CNE-2-RR 细胞的自噬体数量明显增加

接受放射线处理过后, 加入  $20\ \text{mmol/L}$  浓度的甘草素处理 CNE-2-RR 细胞, 48 h 后透射电子显微镜观察结果 (图 2) 显示, 放射对照组 CNE-2-RR 细胞呈现出正常的线粒体和细胞核, 仅偶尔观察到自噬体; 而  $10\ \text{Gy}$  照射与甘草素联合治疗组 (放射+甘草素组) 的 CNE-2-RR 细胞中, 自噬体数量明显增加, 线粒体和

细胞核形态异常。

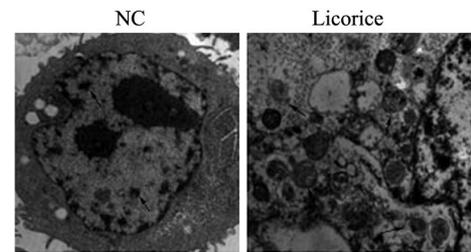
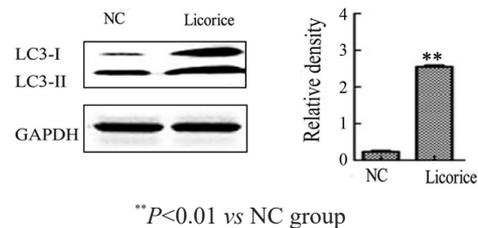


图 2 透射电子显微镜观察 CNE-2-RR 细胞经甘草素处理后自噬体明显增加 ( $\times 10\ 000$ )

Fig. 2 Transmission electron microscopy revealed a significant increase in autophagosome in CNE-2-RR cells after licorice treatment ( $\times 10\ 000$ )

### 2.3 甘草素处理上调 CNE-2-RR 细胞中自噬蛋白的表达

为了进一步确定甘草素对 CNE-2-RR 细胞接受放射后胞内自噬体的影响, 采用 Western blotting 检测 CNE-2-RR 细胞中检测自噬蛋白 LC3-I 转化 LC3-II 的情况, 结果 (图 3) 显示, LC3-II 水平升高, LC3-I 水平降低, 甘草素组中鼻咽癌细胞内的 LC3-II 蛋白水平与 LC3-I 蛋白水平的比值明显高于对照组 [ $(2.78\pm 0.59)\%$  vs  $(0.15\pm 0.01)\%$ ,  $P<0.01$ ]. 表明放射诱导了自噬发生, 破坏溶酶体的结构, 导致自噬溶酶体聚集。同时甘草素处理鼻咽癌细胞过后, 可以在一定程度上促进自噬体形成, 增强鼻咽癌细胞对放射治疗的敏感性。



\*\* $P<0.01$  vs NC group

图 3 甘草素对 CNE-2-RR 细胞中自噬蛋白的表达水平的影响  
Fig. 3 Effect of licorice on the expression level of autophagic protein in CNE-2-RR cells

### 2.4 甘草素处理降低了 CNE-2-RR 细胞 DNA 的损伤修复能力

CNE-2-RR 细胞经过甘草素药物处理后, 分别于  $10\ \text{Gy}$  照射后 1、6 h 收集鼻咽癌细胞, 彗星实验结果 (图 4) 显示, 照射 1 h 后, 2 组细胞核明显出现彗星尾, 彗星头较大, 彗星尾巴细长的状态, 而照射 6 h 后, 2 组细胞的彗星尾均缩短, 表明对照组和甘草素组细胞均有一定程度的修复能力。但甘草素组细胞的尾距长度明显大于对照组, 表明甘草素组 CNE-2-RR 细胞

胞对放射线的敏感性强于对照组。

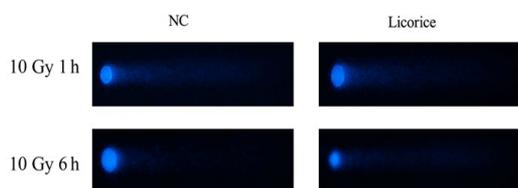


图4 彗星实验检测甘草素处理后 CNE-2-RR 细胞 DNA 的损伤修复能力

Fig. 4 DNA repair ability of CNE-2-RR cells after licorice treatment detected by comet assay

### 2.5 甘草素处理提高 CNE-2-RR 细胞的凋亡率

为了研究甘草素对 CNE2-RR 细胞的放射增敏效应,流式细胞术检测两组细胞的凋亡结果(图 5)显示,甘草素处理过后的 CNE-2-RR 细胞株的凋亡率明显高于对照组 [0 Gy: (42.15 ± 3.75)% vs (15.32 ± 1.05)%,  $P < 0.05$ ; 10 Gy: (58.62 ± 5.09)% vs (27.16 ± 2.65)%,  $P < 0.05$ ]. 表明在相同放射剂量的照射下,甘草素处理过后的 CNE2-RR 细胞株对放射线更敏感。

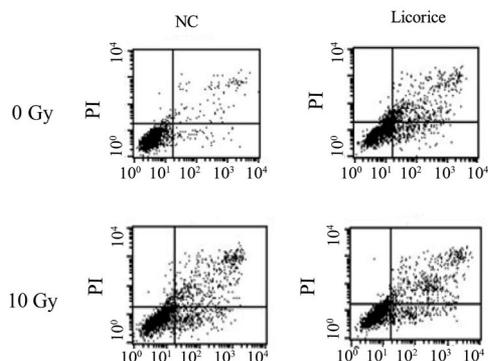


图5 流式细胞术检测甘草素对 CNE-2-RR 细胞凋亡的影响  
Fig.5 Effect of licorice on apoptosis of CNE-2-RR cells by flow cytometry

## 3 讨论

鼻咽癌是威胁全球人类健康的常见头颈部恶性肿瘤之一,具有明显的地域聚集性,病理类型以低分化鳞癌为主<sup>[15]</sup>。据世界卫生组织不完全统计,中国鼻咽癌的发病率远远高于世界其他地区,75%的鼻咽癌患者存在于中国<sup>[16]</sup>。目前鼻咽癌患者临床治疗方案是以放射治疗为主,以化疗和生物治疗作为辅助疗法,但是近年来鼻咽癌放疗抵抗患者的比例逐年增加,而且放疗的副作用呈现不断加剧的趋势<sup>[17]</sup>。尽管随着放疗器械和放疗技术的不断提升,鼻咽癌的治疗疗效得到明显的改善,但由于缺乏准确预测放射敏感性的分子指标,以及在临床实践中存在众多放

射抵抗的鼻咽癌患者,鼻咽癌的临床治疗仍存在很多问题。部分中药提取物与恶性肿瘤放疗敏感性之间的关系是肿瘤放射治疗基础研究的重要方向,但是针对鼻咽癌患者自身存在的放疗抵抗的具体机制仍不完全清楚<sup>[18]</sup>。所以研究中药提取物和鼻咽癌放疗增敏特性的相互关系,是解决临床治疗丰富放疗方案的重要研究方向。在鼻咽癌细胞系中,CNE-2 细胞属于低分化鳞癌,对放射线相对敏感,所以本研究选择 CNE-2 细胞建立放射线抵抗细胞株 CNE2-RR 用于后续实验。

细胞凋亡是指为了维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的、有序的死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同,细胞凋亡不是一件被动的过程,而是主动过程,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用,它并不是病理条件下,自体损伤的一种现象,而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程<sup>[19]</sup>。如果细胞内存在异常的自噬行为则可能会破坏细胞,影响细胞功能,甚至在某些情况下,自噬会诱导细胞死亡<sup>[20]</sup>。目前,关于自噬与肿瘤细胞放射敏感性的关系有许多争论,有研究<sup>[21]</sup>显示,一定程度内增加肿瘤细胞自噬可以加强放射治疗的效果。YU 等<sup>[22]</sup>发现,抑制食管癌细胞株的自噬可以增加放射治疗对细胞的毒性影响,并加速 G2/M 期细胞周期的进展,增加食管癌细胞对放射治疗的抵抗性。还有研究<sup>[23-24]</sup>显示,诱导自噬可以改善放疗对乳腺癌细胞的疗效,有利于提高乳腺癌细胞的放射治疗效果。然而关于中药提取物甘草素与肿瘤细胞自噬和放疗敏感性的关系目前研究结果较少,故其研究具有潜在的临床应用价值。

本研究结果表明,甘草素处理鼻咽癌 CNE-2-RR 细胞株后可以诱导细胞内自噬水平的增加,线粒体和细胞核形态受到一定的破坏,而自噬蛋白 LC3-II/LC3-I 的比例也呈现增加趋势。LC3-II 是目前唯一存在于自噬体和自噬溶酶体膜中的蛋白质,LC3-II/LC3-I 比例的增加可以有效证实自噬水平的增强<sup>[25]</sup>。本研究通过透射电子显微镜检测鼻咽癌细胞内自噬体的数量和形态,这也是自噬体检测的金标准<sup>[26]</sup>,Western blotting 实验进一步证实了自噬蛋白的检测结果,表明甘草素可以在一定程度上影响鼻咽癌 CNE-2 细胞接受放射后自噬行为的发生,从而刺激鼻咽癌细胞增强其对放疗的敏感性。也有研究<sup>[27]</sup>显示,甘草素可以对黑色素瘤细胞的肿瘤侵袭性有一定的影响作用,可以抑制其肿瘤细胞的侵袭性,同时可以激活相关信号通路的活性。SCHÜLER-TOPRAK 等<sup>[28]</sup>研究显示,甘草素可以抑制卵巢癌细胞的增殖行为,从而从肿瘤的生物特性方面验证甘草素的抑

制作用。

彗星实验是实验室检测肿瘤细胞DNA损伤常用的技术,可以通过其检测DNA双链的损伤程度来推测DNA损伤的修复能力<sup>[29]</sup>。本实验通过彗星实验证实甘草素处理鼻咽癌细胞过后,接受放射线刺激后DNA的损伤修复能力受到一定的抑制,对放射线的敏感性强于对照组CNE-2-RR细胞。表明甘草素处理过后可以在一定程度上增强鼻咽癌细胞的放射敏感性,阻碍其放疗抵抗性的产生。流式细胞术实验结果也显示,甘草素处理过后,接受放射后鼻咽癌细胞的凋亡率明显增高,表明甘草素可以有效提升鼻咽癌细胞对放疗的敏感性,促进肿瘤细胞凋亡。结合前述实验结果,可以推测甘草素可能是通过影响鼻咽癌细胞自噬和凋亡参与其对放疗治疗的敏感性的调控。

综上所述,甘草素通过影响鼻咽癌CNE-2-RR细胞株的自噬和凋亡调节其接受放射后DNA损伤修复能力,进而增强鼻咽癌细胞对放疗的敏感性。因此,适宜浓度的甘草素有助于提高鼻咽癌CNE-2细胞的辐射敏感性。这一结论为鼻咽癌的临床辅助治疗提供了新的参考方向,但是仍需要进一步的动物实验和临床测试去验证。

## [参考文献]

- [1] 陈嘉羽, 蒿艳蓉, 陈甲信, 等. 集落刺激因子1受体介导Bax和Bcl-2表达对人鼻咽癌6-10B细胞凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(12): 1386-1390. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.12.008.
- [2] NIE Y, LIU X, QU S, et al. Long non-coding RNA HOTAIR is an independent prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma progression and survival[J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(4): 458-464. DOI: 10.1111/cas.12092.
- [3] 曾谷清, 黄丽芳, 廖力. 鼻咽癌放疗抵抗的分子机制研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(3): 82-86. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8992.2016.03.017.
- [4] XIAO L, HU Z Y, DONG X, et al. Targeting epstein-Barr virus oncoprotein LMP1-mediated glycolysis sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy[J]. *Oncogene*, 2014, 33(37): 4568-4578. DOI:10.1038/onc.2014.32.
- [5] 邱元正, 刘超, 李果. 鼻咽癌放疗治疗的现状与对策[J]. 中国耳鼻喉咽喉底外科杂志, 2015, 21(6): 435-438. DOI: 10.11798/j.issn.10071520.201506001.
- [6] KLIONSKY D J. Coming soon to a journal near you - the updated guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. *Autophagy*, 2014, 10(10): 1691-1699. DOI:10.4161/autophagy.36187.
- [7] PEDRO J M, WEI Y, SICA V, et al. BAX and BAK1 are dispensable for ABT-737-induced dissociation of the BCL2-BECN1 complex and autophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(3): 452-459. DOI:10.1080/15548627.2015.1017191.
- [8] 王晴, 闫克芹, 赵树涛, 等. 自噬在抵御微生物免疫反应中的功能[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015, 24(3): 275-280. DOI: 10.3872/zgzzhx.2015.03.014.
- [9] ZHONG Z, SANCHEZ-LOPEZ E, KARIN M. Autophagy, inflammation, and immunity: a troika governing cancer and its treatment[J]. *Cell*, 2016, 166(2): 288-298. DOI:10.1016/j.cell.2016.05.051.
- [10] MEI Y, THOMPSON M D, COHEN R A, et al. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 243-251. DOI:10.1016/j.bbdis.2014.05.005.
- [11] KARSLI-UZUNBAS G, GUO J Y, PRICE S, et al. Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance[J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(8): 914-927. DOI:10.1158/2159-8290.CD-14-0363.
- [12] SUI X, CHEN R, WANG Z, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e838[2018-03-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3824660/>. DOI: 10.1038/cddis.2013.350.
- [13] 陈传本, 黄超雄, 黄丽洁, 等. 鼻咽癌患者外周血共刺激分子的表达水平及其临床意义[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(7): 767-772. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.07.012.
- [14] 郭俊宇, 陈应超. 异甘草素对人鼻咽癌CNE2细胞裸鼠移植瘤模型的放疗增敏作用[J]. 河北医药, 2016, 38(24): 3704-3707. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7386.2016.24005.
- [15] CHIA W K, TEO M, WANG W W, et al. Adoptive T-cell transfer and chemotherapy in the first-line treatment of metastatic and/or locally recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(1): 132-139. DOI:10.1038/mt.2013.242.
- [16] 陈佩娟, 苏艳, 杜真真, 等. 中晚期鼻咽癌患者调强放疗联合化疗不良反应分析及预防护理对策[J]. 护理学报, 2014, 21(2): 34-37.
- [17] SUN X, SU S, CHEN C, et al. Long-term outcomes of intensity-modulated radiotherapy for 868 patients with nasopharyngeal carcinoma: an analysis of survival and treatment toxicities[J]. *Radiother Oncol*, 2014, 110(3): 398-403. DOI:10.1016/j.radonc.2013.10.020.
- [18] XIAO L, HU ZY, DONG X, et al. Targeting Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1-mediated glycolysis sensitizes nasopharyngeal carcinoma to radiation therapy[J]. *Oncogene*, 2014, 33(37): 4568-4578. DOI:10.1038/onc.2014.32.
- [19] SU Z, YANG Z, XU Y, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis[J/OL]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 48[2018-03-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/25743109/>. DOI: 10.1186/s12943-015-0321-5.
- [20] 郭鑫, 杨俊. Beclin1调控自噬, 凋亡与炎症反应的分子机制[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(18): 5289-91. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2014.18.140.
- [21] GALLUZZI L, BRAVO-SAN PEDRO J M, DEMARIA S, et al. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(4): 247-258. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.183.
- [22] YU L, GU C, ZHONG D, et al. Induction of autophagy counteracts the anticancer effect of cisplatin in human esophageal cancer cells with acquired drug resistance[J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(1): 34-45. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.09.020.
- [23] 陈菊英, 刘朝纯, 曾智, 等. 紫草素通过PI3K/Akt通路促进人乳腺癌MCF-7细胞自噬[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 194-198. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2013.02.11.
- [24] MAYCOTTE P, JONES K L, GOODALL M L, et al. Autophagy

- supports breast cancer stem cell maintenance by regulating IL6 secretion[J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(4): 651-658. DOI: 10.1158/1541-7786.
- [25] CHU S C, HSIEH Y S, YU C C, et al. Thymoquinone induces cell death in human squamous carcinoma cells via caspase activation-dependent apoptosis and LC3-II activation-dependent autophagy[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101579[2018-03-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4085014/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0101579
- [26] ESKELINEN E L, REGGIORI F, BABA M, et al. Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research[J]. *Autophagy*, 2011, 7(9): 935-956.
- [27] SHI H, WU Y, WANG Y, et al. Liquiritigenin potentiates the inhibitory effects of cisplatin on invasion and metastasis via downregulation MMP-2/9 and PI3 K/AKT signaling pathway in B16F10 melanoma cells and mice model[J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(5): 761-770. DOI: 10.1080/01635581.2015.1037962.
- [28] SCHÜLER-TOPRAK S, MOEHLE C, SKRZYPCZAK M, et al. Effect of estrogen receptor  $\beta$  agonists on proliferation and gene expression of ovarian cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 319-325. DOI: 10.1186/s12885-017-3246-0.
- [29] AWASTHI K K, AWASTHI A, VERMA R, et al. Silver nanoparticles and carbon nanotubes induced DNA damage in mice evaluated by single cell Gel electrophoresis[J/OL]. *Part Fibre Toxicol*, 2014, 11: 41[2018-03-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4251791/>. DOI: 10.1186/s12989-014-0041-9.

[收稿日期] 2018-01-11

[修回日期] 2018-03-20

[本文编辑] 王映红