

# Ca<sup>2+</sup>在顺铂诱导人卵巢癌SKOV3细胞自噬反应中的作用

曾林川<sup>1</sup>, 邓慧敏<sup>2</sup>, 陈君<sup>2</sup>, 窦茗瀚<sup>2</sup>, 徐冶<sup>2</sup>

1. 吉林医药学院公共卫生学院, 吉林 吉林 132013 ;  
2. 吉林医药学院医学科研实验室, 吉林 吉林 132013

**[摘要]** 背景与目的: Ca<sup>2+</sup>在维持细胞生物活性方面扮演着很重要的角色, 其在细胞内的储存、释放和摄取主要受内质网调节, 细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度的稳态是维持细胞生物能量代谢、蛋白质折叠和分泌的基础条件。本研究探讨Ca<sup>2+</sup>在顺铂诱导SKOV3细胞内质网应激-自噬反应中的作用机制。**方法:** 取人卵巢癌SKOV3细胞系为研究对象, 按以下步骤分组: ① 探讨顺铂诱导内质网应激与自噬反应, 用6 μg/mL的顺铂处理SKOV3细胞0、6、12和24 h; ② 了解顺铂和毒胡萝卜内酯(thapsigargin, TG)诱导内质网应激释放的Ca<sup>2+</sup>与自噬的关系, 分别用TG和顺铂处理SKOV3细胞0、9和12 h; ③ 探究Ca<sup>2+</sup>对自噬的作用机制, 分成对照组、顺铂组、TG组、BAPTA-AM组、顺铂联合BAPTA-AM组和TG联合BAPTA-AM组。用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测内质网应激相关蛋白GRP78和自噬标志性蛋白LC3蛋白的表达水平; 用Fluo-4钙离子荧光探针检测细胞质中的Ca<sup>2+</sup>浓度变化; 间接免疫荧光染色后, 用共聚焦显微镜检测LC3蛋白的表达情况。**结果:** SKOV3细胞经6 μg/mL顺铂作用6 h时GRP78灰度值(1.393±0.004)与其对照组(0.679±0.011)相比显著提高( $t=113.2, P=0.000$ ), 在12 h时LC3灰度值(0.072±0.002)与其对照组(0.038±0.000)相比显著提高( $t=25.5, P=0.000$ )。间接免疫荧光结果显示, 顺铂(6 μg/mL)组和TG(3 μmol/L)组随作用时间的延长, 细胞内LC3荧光斑点会逐渐增多, 并伴随着细胞质Ca<sup>2+</sup>浓度上升。后经钙离子络合剂BAPTA-AM干预后, 细胞内LC3荧光强度进一步增强。Westren blot结果显示, 顺铂组LC3灰度值(0.039±0.000)小于顺铂联合BAPTA-AM组(0.071±0.001), TG组(0.035±0.001)小于TG联合BAPTA-AM组(0.065±0.001), 差异有统计学意义( $P=0.000$ )。**结论:** 顺铂诱导SKOV3细胞内质网应激和自噬的发生, 并伴随着细胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度的上升。络合细胞质内Ca<sup>2+</sup>能增强顺铂诱导的自噬反应。

**[关键词]** 顺铂; Ca<sup>2+</sup>; 内质网应激; 自噬

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2016.04.005

中图分类号: R737.31 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)04-0313-07

**The effect of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> on cisplatin-induced autophagy in ovarian carcinoma SKOV3 cells and its mechanism** ZENG Linchuan<sup>1</sup>, DENG Huimin<sup>2</sup>, CHEN Jun<sup>2</sup>, DOU Minghan<sup>2</sup>, XU Ye<sup>2</sup> (1.School of Public Health, Jilin Medical University, Jilin 132013, Jilin Province, China; 2.Medical Research Laboratory, Jilin Medical University, Jilin 132013, Jilin Province, China)

Correspondence to: XU Ye E-mail: xuye\_9707@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Ca<sup>2+</sup> plays a very important role in the maintenance of cell biological functions. The storage, release and uptake capacity of Ca<sup>2+</sup> is controlled by endoplasmic reticulum (ER). Ca<sup>2+</sup> homeostasis is essential for cellular energy metabolism and proper protein folding. This study aimed to investigate the effect of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> on cisplatin induced ER stress-mediated autophagy in ovarian carcinoma SKOV3 and its underlying mechanism. **Methods:** The ovarian cancer SKOV3 was used as a study object. The experiment consisted of three parts: ① To explore the possible relationship between cisplatin-induced ER stress and autophagy, SKOV3 cells were treated with cisplatin for 0, 6, 12 and 24 h, respectively; ② To explore the possible relationship between ER stress induced Ca<sup>2+</sup> efflux and autophagy, SKOV3 cells were treated with cisplatin for 0, 9 and 12 h, respectively, and TG was used as

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81372793); 吉林省教育厅十三五科技项目(2016237);  
2014吉林省大学生创新创业项目(2014001)。

通信作者: 徐冶 E-mail: xuye\_9707@163.com

a positive control; ③ To explore the effects of blocking calcium efflux on autophagy, SKOV3 cells were divided into control group, cisplatin group, TG group, BAPTA-AM group, cisplatin combined with BAPTA-AM group and TG combined with BAPTA-AM group. Western blot was used to detect the protein levels of GRP78 and LC3. Fluo-4 calcium fluorescent probe was used to examine cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Confocal microscopy was used to detect LC3 level by immunofluorescence staining. **Results:** Compared to control group ( $0.679\pm 0.011$ ), GRP78 was significantly accumulated at 6, 12 and 24 h after cisplatin treatment and reached the maximum value at 6 h ( $1.393\pm 0.004$ ,  $P=0.000$ ). Similarly, compared to control group ( $0.038\pm 0.000$ ), LC3 puncta were clearly seen after cisplatin treatment and reached the maximum value at 12 h ( $0.072\pm 0.002$ ,  $P=0.000$ ). Using confocal microscopy, we found that cisplatin and TG increased LC3 punctate accumulation and cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels in a time-dependent manner. Immunofluorescent method showed that treatment with cisplatin combined with BAPTA-AM or TG combined with BAPTA-AM increased LC3 punctate accumulation induced by cisplatin or TG. The results of Western blot showed that cisplatin combined with BAPTA-AM ( $0.071\pm 0.001$ ) or TG combined with BAPTA-AM ( $0.065\pm 0.001$ ) significantly increased LC3 II / LC3 I ratio induced by cisplatin ( $0.039\pm 0.000$ ,  $P=0.000$ ) or TG ( $0.035\pm 0.001$ ,  $P=0.000$ ). **Conclusion:** Cisplatin induces intracellular ER stress and autophagy in SKOV3 cells, accompanied by increased cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  levels. Chelating cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  enhances cisplatin-induced autophagy.

[ **Key words** ] Cisplatin;  $\text{Ca}^{2+}$ ; ER Stress; Autophagy

卵巢癌是临床上常见的妇科恶性肿瘤之一, 发病率高居女性最常见癌症的第3位, 严重威胁女性的生命健康。由于卵巢癌早期没有具体的临床症状, 再加上很多女性忽视了定期体检, 造成绝大多数女性到卵巢癌晚期才发现<sup>[1-2]</sup>。目前, 卵巢癌在我国的死亡率高达3.13/10万<sup>[3]</sup>。临床上治疗卵巢癌的主要手段是化疗, 顺铂是临床上治疗癌症的主要化疗药物之一, 它的主要抗癌机制是抑制癌细胞的DNA复制过程<sup>[4]</sup>。已有研究报道, 顺铂在诱导卵巢癌细胞凋亡过程中促发了内质网应激和自噬, 抑制自噬增加了卵巢癌细胞对顺铂的敏感性<sup>[5]</sup>。

自噬是细胞吞噬自身蛋白质或细胞器并使之包被进入囊泡, 最终与溶酶体融合降解其内容物的过程, 自噬在细胞器的更新、体内蛋白质的平衡和细胞内环境的稳定方面发挥着主要的作用。同时, 自噬也是程序性细胞死亡的一种形式。因此, 自噬是细胞内的一把双刃剑, 但自噬在细胞内的作用以前者为主<sup>[6]</sup>。最近, 越来越多的文献表明,  $\text{Ca}^{2+}$ 在自噬发生过程中发挥重要的作用<sup>[7-8]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 是细胞的重要第二信使之一, 在维持细胞代谢、增殖、分化和凋亡过程中发挥着重要的作用。细胞内的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度依赖于内质网中 $\text{Ca}^{2+}$ 的释放和细胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 的摄入。内

质网应激会诱导细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的增高和自噬的增强<sup>[9-10]</sup>。本文旨在探讨 $\text{Ca}^{2+}$ 在顺铂诱导卵巢癌细胞发生自噬中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

本研究所用的人卵巢癌细胞株SKOV3购自中国科学院, RPMI 1640培养基和胎牛血清由Hyclone公司提供, BAPTA-AM、钙离子探针Fluo-4和顺铂均购自美国Sigma公司, LC3B抗体、GRP78抗体和 $\beta$ -actin抗体均购自美国Santa Cruz公司, PVDF膜( $0.45\ \mu\text{m}$ )购自Millipore公司。其他试剂为进口或国产分析纯。

### 1.2 细胞培养

人卵巢癌细胞株SKOV3用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)的RPMI 1640培养液培养, 置于37℃、 $\text{CO}_2$ 体积分数为5%、饱和湿度的培养箱中培养。每天换液1次, 待细胞生长至对数生长期时, 用0.25%胰酶进行消化, 按1:4比例进行传代, 待细胞传至第3代后进行实验。实验分组: ① 探讨顺铂诱导内质网应激与自噬的关系, 按顺铂给药时间分成0、6、12和24 h 4组; ② 观察顺铂和毒胡萝卜内酯(thapsigargin, TG)诱导内质网应激释放的 $\text{Ca}^{2+}$ 与自噬的关系, 分别检测0、9和12 h 3

个时间点;③探讨Ca<sup>2+</sup>对自噬的影响,实验分为对照组、顺铂组、TG组、BAPTA-AM组、顺铂联合BAPTA-AM组和TG联合BAPTA-AM组。每次实验重复3次。

### 1.3 Fluo-4检测细胞质内Ca<sup>2+</sup>

将SKOV3细胞用不含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶消化,收集总细胞。计数后,按每孔5×10<sup>4</sup>个细胞铺在24孔板内,放置在恒温培养箱中过夜。第2天,细胞长至80%密度,实验组分为顺铂(6 μg/mL)和TG(3 μmol/L)9、12 h两组和无药物作用的阴性对照组,每组设3个对照组。吸出每孔药物,并加入D-Hanks液洗3次,然后各加入稀释后的Fluo-4(5 μmol/L)。30 min后用D-Hanks液洗3次,处理完后在激光扫描共聚焦显微镜下观察并取图分析。

### 1.4 间接免疫荧光法检测自噬标志性蛋白LC3

高压消毒后无菌盖玻片置于24孔板中,取细胞密度1×10<sup>5</sup>/mL,每孔500 μL接种过夜,第2天,细胞长至80%密度,实验组分别用顺铂6 μg/mL处理9、12 h,同时设置未加顺铂的阴性对照组。弃去培养基,加入200 μL固定液(4%多聚甲醛)作用10 min,吸去固定液加0.01 mol/L的PBS洗涤后,爬片固定后经0.1%的PBS-Triton作用5 min,用0.01 mol/L的PBS洗涤,非免疫山羊血清封闭30 min,加入预混的一抗4 ℃过夜,用0.01 mol/L的PBS洗涤,加入预混的荧光二抗Alexa Fluor 488抗兔的IgG抗体作用30 min,用0.01 mol/L的PBS洗涤,抗荧光淬灭剂封片,用激光共聚焦显微镜观察并取图分析。

### 1.5 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测

通过Western blot检测人卵巢癌SKOV3细胞中内质网应激和自噬反应中相关蛋白的表达。提取细胞总蛋白,不同的药物处理后,经消化收集到离心管中,175×g离心取上清液转移到1.5 mL离心管中,进一步混匀,4 ℃,900×g

再次离心。吸净上清液,每管加入200~300 μL的RIPA蛋白裂解液(含1%PMSF),超声5 s左右打碎基因组后4 ℃放置45 min(以上全程冰上操作)。Bradford法测蛋白浓度,-20 ℃备用。取待测样本按30~60 μg上样,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳常规电泳、半干转膜法将蛋白转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭、一抗4 ℃过夜,二抗温育2 h,用0.01 mol/L的PBS洗膜3次,1次15 min,2次5 min,加ECL显色液进行显影结果。数据采用天能图像分析系统以及Quantity One软件进行分析。

### 1.6 统计学处理

实验中的各组计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件进行统计学分析,进行one-way ANOVA分析。各实验组间数据的均值比较采用*t*检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 顺铂诱导SKOV3细胞内GRP78表达和LC3的活化

用顺铂6 μg/mL处理SKOV3细胞0、6、12和24 h。Western blot检测结果表明,顺铂能够诱导SKOV3细胞GRP78和LC3高表达,且GRP78表达增强早于LC3,差异有统计学意义(*P*<0.05,图1)。

### 2.2 顺铂诱导SKOV3细胞细胞质内Ca<sup>2+</sup>水平的增加和LC3的活化

根据上述实验结果,用共聚焦显微镜观察细胞质中Fluo-4所标记的Ca<sup>2+</sup>荧光,通过间接免疫荧光法检测自噬标记蛋白LC3。结果显示,TG和顺铂处理9 h后,SKOV3细胞内荧光强度增强,表明细胞质中的Ca<sup>2+</sup>水平增加;与此同时,LC3荧光结果显示,细胞质中出现荧光斑点,说明顺铂和TG在诱导自噬的活化过程中,可能与细胞质中Ca<sup>2+</sup>浓度变化有关(图2)。

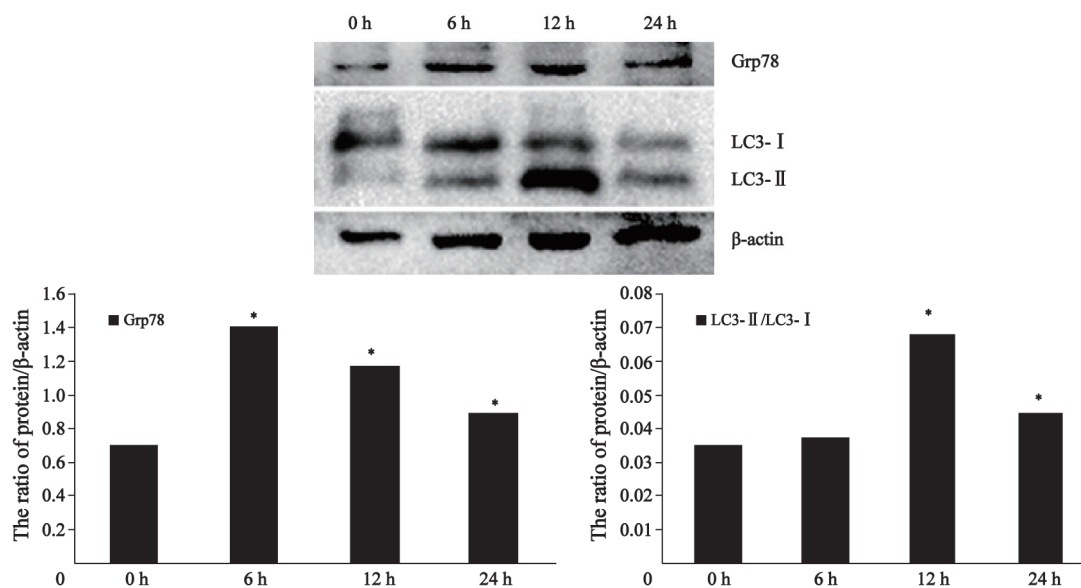


图1 Western blot检测顺铂对SKOV3细胞GRP78、LC3蛋白表达的影响

Fig. 1 Western blot detection of the expression of GRP78 and LC3 in SKOV3 cells treated with 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cisplatin

Quantitation of GRP78 and LC3-II/LC3-I protein levels at different time after cisplatin treatment was shown. Data were presented as ,  $n=3$ ; \*:  $P < 0.01$ , compared with control (0 h), Student's  $t$ -test

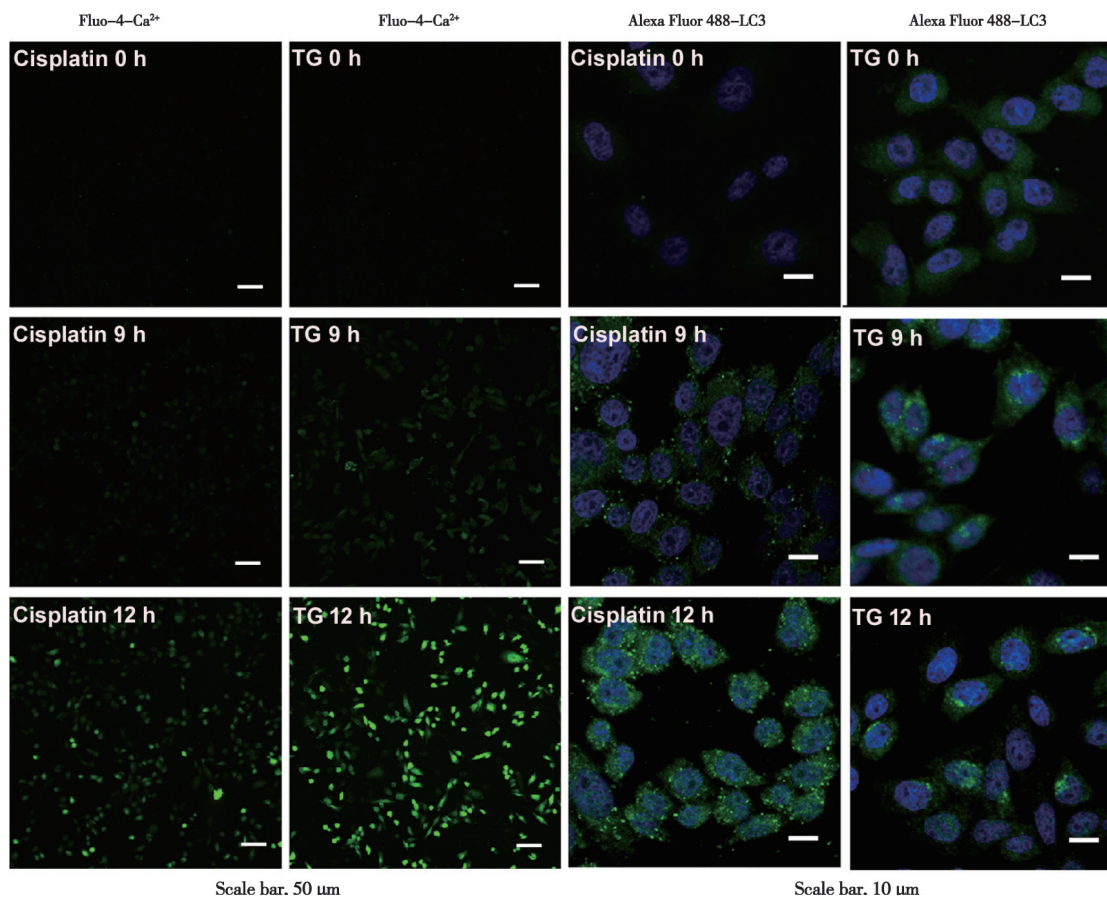


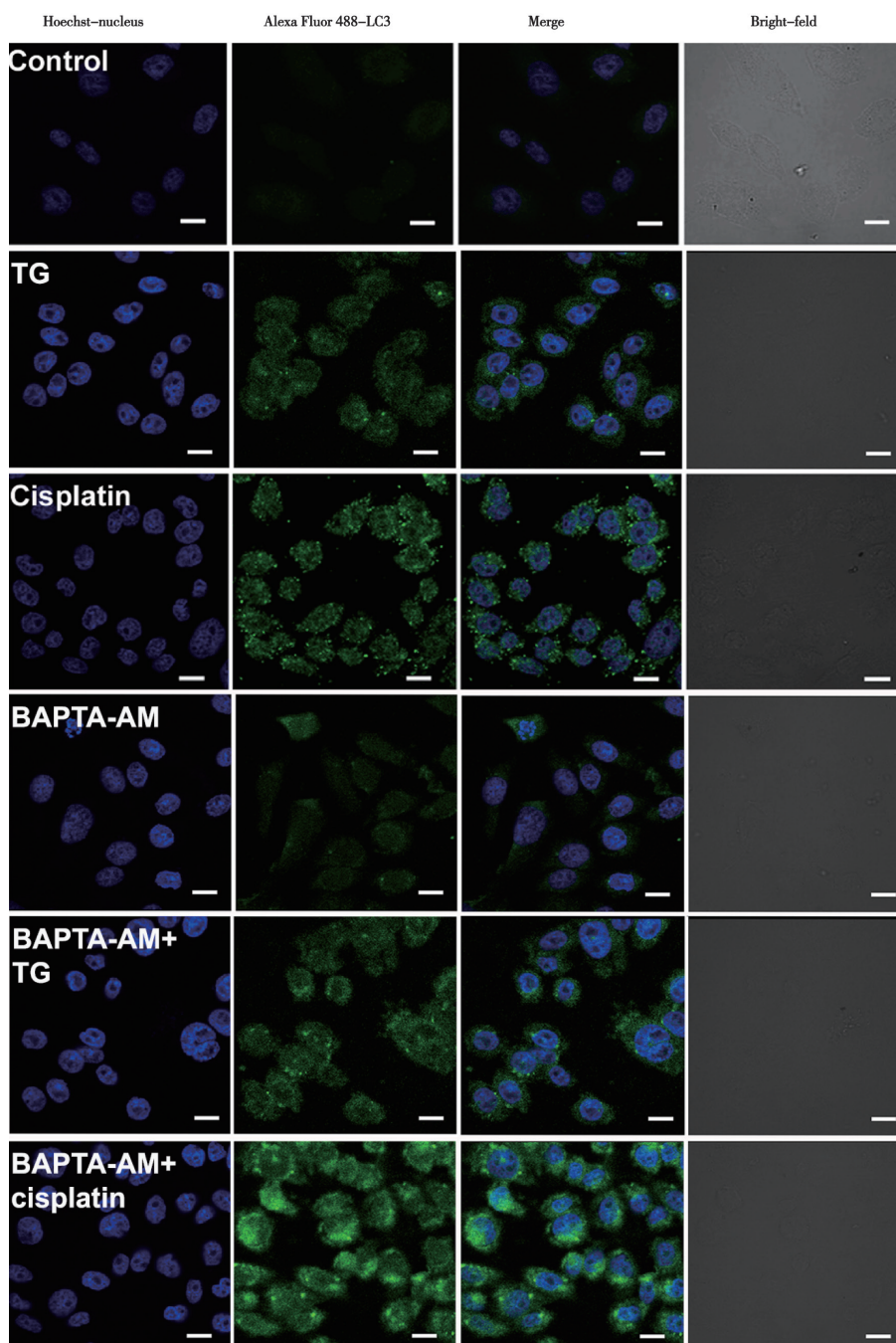
图2 共聚焦显微镜观察顺铂和TG处理不同时间后SKOV3细胞细胞质中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化和LC3蛋白的表达

Fig. 2 Observation of the distribution of  $\text{Ca}^{2+}$  and LC3 in the cytoplasm of SKOV3 cells treated with 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cisplatin or 3  $\mu\text{mol}/\text{L}$  TG for 0, 9, and 12 h by confocal microscopy

### 2.3 BAPTA-AM增强顺铂和TG所诱导LC3的表达

免疫荧光结果显示, 10  $\mu\text{mol/L}$  BAPTA-AM 作用于SKOV3细胞后出现LC3荧光小斑点。分别用6  $\mu\text{g/mL}$ 顺铂和3  $\mu\text{mol/L}$  TG联合钙离子络合剂BAPTA-AM时, LC3的绿色荧光要明显强

于各自的单独作用组(图3)。此外, 采用Western blot对顺铂和TG的单独作用组及各自联合钙离子络合剂后的LC3蛋白表达结果进行验证, 结果显示, LC3的蛋白表达情况与LC3免疫荧光结果一致, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图4)。



( $\times 1200$ )

图3 免疫荧光染色检测顺铂、TG、BAPTA-AM及联合用药组中LC3蛋白的表达情况

Fig. 3 Immunofluorescence staining for the LC3 expressions in SKOV3 cells treated with cisplatin, TG and/or BAPTA-AM

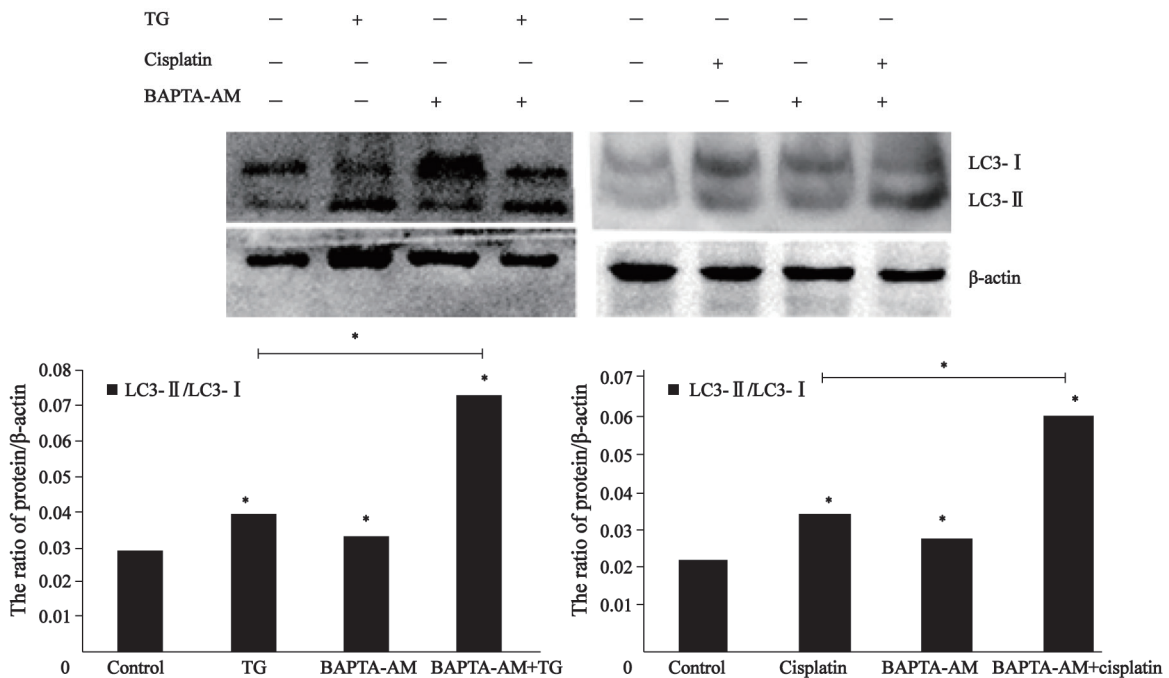


图4 Western blot检测顺铂、TG、BAPTA-AM以及联合用药组中LC3蛋白的表达情况

Fig. 4 Western blot analysis for the protein expressions of LC3 II /LC3 I in SKOV3 cells treated with cisplatin, TG and/or BAPTA-AM. Quantitation of LC3- II /LC3- I protein levels was presented as ,  $n=3$ ; \*,  $P < 0.01$ , compared with the respective control, Student's  $t$ -test

### 3 讨 论

内质网应激与自噬之间复杂的调控机制, 具有促进细胞存活和死亡的双向选择效应<sup>[11-12]</sup>。通过揭秘内质网应激与自噬复杂网络, 有可能提高化疗药物的治疗效果和克服肿瘤的耐药性<sup>[13-14]</sup>。GRP78作为一种内质网伴侣蛋白, 在内质网应激状态下会高表达, 被视为内质网应激反应的标志性蛋白<sup>[15]</sup>。细胞发生自噬时, 参与自噬体形成的LC3蛋白活化, 由LC3-I转化为脂质化的LC3-II。LC3-II/LC3-I比值的多少在某种程度上反映了细胞的自噬活性<sup>[16]</sup>。本实验结果显示, 顺铂作用SKOV3细胞6 h时, GRP78蛋白就已经明显上调, 然而, LC3蛋白的表达发生12 h左右。这说明顺铂能诱导SKOV3细胞发生内质网应激和自噬反应, 且自噬的发生可能是内质网应激所介导的下游效应。

已有研究表明, 刺激内质网内的 $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞质会促发自噬反应的活化<sup>[17-18]</sup>, 如维生素D<sub>3</sub>、离子霉素和三磷酸腺苷, TG诱导细胞中

的 $\text{Ca}^{2+}$ 水平升高, 通过激活 $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白依赖激酶 $\beta$ 使下游AMPK兴奋而诱导自噬。也有研究显示,  $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞质具有抑制自噬活化的作用<sup>[19]</sup>, 如Xestospongins B/siRNA阻滞剂, 抑制内质网的 $\text{Ca}^{2+}$ 释放通道1,4,5-三磷酸肌醇受体后, 会促发自噬。L型钙通道阻滞剂通过抑制钙蛋白酶活性也能诱导自噬。以上资料表明, 钙信号对自噬活化起着重要的调节作用, 但是具体的作用机制一直存在争议。这可能是由于探究的肿瘤细胞种类不同及技术条件限制, 导致很多机制都未被阐明所引起的。随着对细胞内钙信号检测手段的完善, 我们选择目前灵敏度较高的Fluo-4作为钙离子探针, 检测细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的变化, 运用国际公认的标准 $\text{Ca}^{2+}$ 络合工具药BAPTA-AM, 探究顺铂诱导SKOV3内质网应激介导的自噬反应与细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度波动的关系, 并以TG作为内质网应激模型组。实验结果表明, 单独顺铂或TG可以诱导SKOV3发生自噬, 在联合钙离子络合剂BAPTA-AM后, 自噬标志性蛋白LC3的表达明显上调。这说明缓冲顺铂和TG所诱导的细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ 上

升后,能够增强其下游的自噬反应。这一过程可能与溶酶体的功能有关,由于络合细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ ,使得溶酶体对自噬体的降解被抑制,从而抑制了自噬的降解<sup>[20]</sup>。也有可能是由于络合了细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ ,使得进入线粒体内的 $\text{Ca}^{2+}$ 减少,导致通过线粒体内呼吸链的电子流减少,三磷酸腺苷生成被抑制,激活下游AMPK途径诱导的自噬反应等<sup>[21]</sup>。

综上所述,顺铂能诱导SKOV3细胞发生内质网应激和自噬反应,并伴随着细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度上升,络合细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ ,增强其下游自噬反应的强度,说明细胞质中的 $\text{Ca}^{2+}$ 对自噬的发生具有抑制效应。这一结果有助于进一步探索 $\text{Ca}^{2+}$ 对自噬的调节机制,为肿瘤的治疗及药物开发提供新的思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] WU X, ZHI X, JI M, et al. Midkine as a potential diagnostic marker in epithelial ovarian cancer for cisplatin/paclitaxel combination clinical therapy [J]. *Am J Cancer Res*, 2015, 5(2): 629–638.
- [2] XIAO K, SUBY N, LI Y, et al. Telodendrimer-based nanocarriers for the treatment of ovarian cancer [J]. *Ther Deliv*, 2013, 4(10): 1279–1292.
- [3] DONG H, ZHANG Y, XI H. The effects of epidural anaesthesia and analgesia on natural killer cell cytotoxicity and cytokine response in patients with epithelial ovarian cancer undergoing radical resection [J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(5): 1822–1829.
- [4] VAN HAAFTEN C, BOOT A, CORVER W E, et al. Synergistic effects of the sesquiterpene lactone, EPD, with cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34(1): 3–8.
- [5] HE J, YU J J, XU Q, et al. Downregulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(2): 373–384.
- [6] TAIT S W, ICHIM G, GREEN D R. Die another way—non-apoptotic mechanisms of cell death [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 10): 2135–2144.
- [7] VICENCIO J M, LAVANDERO S, SZABADKAI G.  $\text{Ca}^{2+}$ , autophagy and protein degradation: thrown off balance in neurodegenerative disease [J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(2): 112–121.
- [8] MEDINA D L, DI PAOLA S, PELUSO I. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(3): 288–299.
- [9] BITTREMIEUX M, BULTYNCK G. p53 and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling from the endoplasmic reticulum: partners in anti-cancer therapies [J]. *Oncoscience*, 2015, 2(3): 233–238.
- [10] SHEN S, ZHANG Y, ZHANG R, et al. Ursolic acid induces autophagy in U87MG cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 21(8): 28–41.
- [11] MALLICK A, MORE P, GHOSH S, et al. Dual drug conjugated nanoparticle for simultaneous targeting of mitochondria and nucleus in cancer cells [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(14): 7584–7598.
- [12] DECUYPERE J P, BULTYNCK G, PARYS J B. A dual role for  $\text{Ca}^{2+}$  in autophagy regulation [J]. *Cell Calcium*, 2011, 236(1): 163–170.
- [13] HART L S, CUNNINGHAM J T, DATTA T, et al. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(12): 4621–4634.
- [14] SCHONTHAL A H. Endoplasmic reticulum stress and autophagy as targets for cancer therapy [J]. *Cancer Lett*, 2008, 275(2): 163–169.
- [15] MATSUMURA K, SAKAI C, KAWAKAMI S, et al. Inhibition of cancer cell growth by GRP78 siRNA lipoplex via activation of unfolded protein response [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37(4): 648–653.
- [16] KLIONSKY D J, ABDALLA F C, ABELIOVICH H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 48(4): 445–544.
- [17] HOYER-HANSEN M, BASTHOLM L, SZYNIAROWSKI P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- $\beta$ , and Bcl-2 [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(2): 193–205.
- [18] GAO W, DING W X, STOLZ D B, et al. Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium [J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 754–761.
- [19] WILLIAMS A, SARKAR S, CUDDON P, et al. Novel targets for Huntington's disease in an TOR-independent autophagy pathway [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(5): 295–305.
- [20] WILLIAMS J A, HOU Y, NI H M, et al. Role of intracellular calcium in proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress, autophagy, and cell death [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(9): 2279–2289.
- [21] RIZZUTO R, DE STEFANI D, RAFFAELLO A, et al. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signaling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(9): 566–578.

(收稿日期: 2015-04-24 修回日期: 2015-06-07)