



· 论 著 ·

DDX46调控食管鳞癌TE-11细胞恶性生物学行为的机制探讨

李 斌, 蔺军平, 冯海明, 杨建宝, 宋铁牛, 敬 涛, 孟子琪

兰州大学第二医院胸外科, 兰州大学第二临床医学院, 甘肃 兰州 730030

[摘要] **背景与目的:** DDX46是一种三磷酸腺苷依赖的RNA解旋酶, 在mRNA前体剪接和核糖体组装中发挥核心作用, 其在人类肿瘤中的表达及与肿瘤的相关性少见报道。该研究旨在探讨DDX46与食管鳞癌细胞恶性生物学行为之间的关系及可能的调控机制。**方法:** 构建慢病毒载体和shDDX46质粒, 转染食管鳞癌TE-11细胞, 建立沉默DDX46表达的稳转细胞株, 采用反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)鉴定转染效果; 采用细胞计数和克隆形成实验检测细胞增殖能力; 采用Annexin V-APC单染法流式细胞术检测细胞凋亡情况; 采用Western blot检测PI3K-Akt-mTOR信号通路相关分子及自噬相关蛋白的表达水平。**结果:** 慢病毒介导的RNAi有效抑制DDX46在TE-11细胞中的表达($P<0.001$)。与对照组相比, 靶向沉默DDX46基因后细胞计数显示, TE-11细胞生长被显著抑制($P<0.01$); 克隆形成实验显示, 细胞克隆形成能力被显著抑制($P<0.01$); 流式细胞术凋亡检测显示, 细胞凋亡率显著增加($P<0.01$); Western blot检测发现, PIK3CG、Akt、P-Akt和mTOR表达水平显著下降($P<0.01$), PTEN表达水平无显著变化($P>0.05$), 而Beclin 1和LC3表达显著上调($P<0.01$)。**结论:** DDX46与食管鳞癌细胞增殖和凋亡相关; 沉默DDX46可能通过PI3K-Akt-mTOR信号转导通路, 同时激活了细胞凋亡和自噬, 进而影响食管鳞癌细胞生长增殖。

[关键词] DDX46; 食管鳞癌; 增殖; 凋亡; 自噬

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.09.005

中图分类号: R735.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)09-0671-08

The role of DDX46 in regulating the malignant process of esophageal carcinoma TE-11 cells LI Bin, LIN Junping, FENG Haiming, YANG Jianbao, SONG Tieniu, JING Tao, MENG Yuqi (Department of Thoracic Surgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou University Second Clinical Medical College, Lanzhou 730030, Gansu Province, China)

Correspondence to: LI Bin E-mail: dr.leebin@outlook.com

[Abstract] **Background and purpose:** DDX46 plays critical roles in cellular metabolism, and in many cases it has been implicated in cellular proliferation. The expression pattern of DDX46 in tumor tissues and its biologic role in neoplastic transformation have rarely been reported previously. This study aimed to elucidate the role of DDX46 in regulating the malignant process of esophageal squamous cell carcinoma. **Methods:** Lentivirus-mediated RNA interference was applied to silencing DDX46 in esophageal squamous carcinoma cell line TE-11. Cell growth was monitored using high-content screening (HCS). Cell colony-forming capacity was measured by colony formation assay. Cell apoptosis was determined by flow cytometry. Furthermore, the changes of proteins related to PI3K-Akt-mTOR and autophagy were measured by Western blot. **Results:** Lentivirus-mediated RNAi efficiently decreased DDX46 expression in TE-11 cells ($P<0.001$). DDX46 silencing led to decreased cell growth ($P<0.01$), reduced the number and size of cell colonies ($P<0.01$), and increased the percentage of apoptotic cells in TE-11 ($P<0.01$). Moreover, DDX46 silencing

induced the apparent down-regulation of PIK3CG, Akt, P-Akt and mTOR ($P < 0.01$), and significantly increased expression of Beclin 1 and LC3 ($P < 0.01$), without change in expression level of PTEN ($P > 0.05$). **Conclusion:** DDX46 plays an essential role in the progression of esophageal squamous cell carcinoma, and DDX46-mediated regulation of autophagy and apoptosis probably affects tumorigenesis in esophageal squamous cell carcinoma via PI3K-Akt-mTOR signaling pathway.

[**Key words**] DDX46; Esophageal squamous cell carcinoma; Growth; Apoptosis; Autophagy

最近研究发现, DNA和蛋白质之间的中介物质mRNA可能成为一种很有前景的抗肿瘤药物靶点^[1]。涉及RNA的生物进程需要RNA解旋酶。它参与RNA代谢的所有环节^[2-3], RNA解旋酶还可以通过改变癌基因表达水平, 调控肿瘤启动和进展相关信号转导通路, 参与肿瘤的发生、发展^[4]。DDX46是DDX蛋白家族RNA解旋酶成员, 其在人类肿瘤中的表达及与肿瘤的相关性罕见报道。我们的前期研究发现, 食管鳞癌组织中DDX46蛋白和mRNA的表达均明显高于相对应食管正常组织, DDX46基因沉默能够显著抑制食管鳞癌细胞的增殖^[5]。然而, DDX46表达与食管鳞癌恶性生物学行为之间的关系及可能的调控机制目前尚不清楚。本研究采用短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA) 干扰技术, 观察靶向沉默DDX46基因对食管鳞癌TE-11细胞恶性生物学行为的影响, 探讨其可能的分子机制, 为寻找食管鳞癌新型肿瘤标志物和治疗靶点提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

本实验所用主要试剂包括: RNAlater (德国Qiagen公司), TRIzol试剂、LipofectamineTM2000转染试剂 (美国Invitrogen公司), 胎牛血清 (澳大利亚Ausbian公司), 胰蛋白酶、EDTA (上海生工生物工程股份有限公司), dNTPs、Rnase Inhibitor及M-MLV反转录酶 (美国Promega公司), Primer (广州锐博生物科技有限公司), SYBR premix ex taq、PCR扩增试剂盒 (日本TaKaRa公司), RPMI-1640细胞培养基 (美国Lonza公司), Giemsa (上海鼎国生物技术有限公司), D-Hanks液 (美国Sigma公司), GAPDH、Akt及P-Akt抗体 (美国Santa Cruz公司), mTOR、Beclin 1抗体 (美国Cell Signaling

Technology公司), DDX46、PIK3CG、PTEN及LC3抗体 (美国Abcam公司), Annexin V-APC single-staining凋亡试剂盒 (美国eBioscience公司), ECL蛋白质印迹法 (Western blot) Substrate试剂盒 (美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 细胞培养及转染

人食管鳞癌细胞株TE-11购自上海拜力生物科技有限公司, 置于RPMI-1640培养液中, 于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱内培养。DDX46基因RNAi靶点序列和shRNA慢病毒 (shDDX46) 制备和包装由上海吉凯基因化学技术有限公司设计完成, DDX46基因shRNA序列: 5'-AGAAATCACCAGGCTCATA-3', 阴性对照序列 (shCtrl) 应用公认序列: 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'^[6]。胰蛋白酶消化对数生长期TE-11细胞, 然后RPMI-1640完全培养基重悬制成(3~5) × 10⁴个细胞/mL的悬液, 均匀接种至6孔板中继续培养; 铺板量达到30%左右时, 更换感染培养基, 加入最适病毒量进行感染 (感染复数为10), 实验组 (shDDX46组) 病毒滴度2 × 10⁸ TU/mL、病毒感染用量10 μL, 对照组 (shCtrl组) 病毒滴度4 × 10⁸ TU/mL、病毒感染用量5 μL; 感染后12 h, 更换为常规培养基继续培养; 观察细胞状态良好, 未出现大量死亡现象, 实验组与对照组细胞状态相当; 感染后72 h, 使用荧光显微镜观察报告基因绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 的表达情况, 荧光率即为阳性感染率, 细胞感染率达到70%以上者可以继续下游实验。采用反转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 及Western blot检测转染效果。

1.3 RT-PCR

收集对数生长期的目的细胞，经TRIzol试剂充分裂解后提取总RNA，采用紫外分光光度计检测其纯度，用1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定样品的完整性。依据美国Promega公司的M-MLV操作说明书反转录RNA获得cDNA。引物来自广州市

锐博生物科技有限公司，以GAPDH基因为内参（表1）。两步法进行RT-PCR， $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算DDX46基因mRNA的相对表达量（ $\Delta CT = \text{目的基因} CT \text{值} - \text{内参基因} CT \text{值}$ ； $\Delta\Delta CT = \text{样品} \Delta CT \text{值} - \text{对照组} \Delta CT \text{平均值}$ ）。实验重复3次。

表 1 PCR引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Gene	Primer sequences (5'-3')	Length //bp
DDX46	Forward: AAAATGGCGAGAAGAGCAACG	110
	Reverse: CATCATCGTCCTCTAAACTCCAC	
GAPDH	Forward: TGACTTCAACAGCGACACCCA	121
	Reverse: CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA	

1.4 细胞计数检测

收集对数生长期的目的细胞，经胰蛋白酶消化，完全培养基重悬细胞成悬液并计数；以2 000个细胞/孔接种于96孔板中，每组3个复孔，培养体系为100 μL /孔，铺板过程中每孔加入细胞数一致，于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的培养箱中培养；铺板后第2天开始，每天用Cellomics高内涵筛选成像系统（high content screening, HCS）检测读板1次，连续5 d；计算出每次HCS检测扫描孔板中带绿色荧光的细胞数量，绘出5 d的细胞增殖曲线图；根据细胞计数值和时间点，绘制基于细胞计数值的细胞生长曲线；计算各组细胞各时间点细胞计数值与该组第1天的细胞计数值的比值，获得该组细胞各时间点的增殖倍数，根据该增殖倍数和时间点，绘制基于细胞增殖倍数的细胞生长曲线。

1.5 克隆形成实验

收集对数生长期的目的细胞，经胰蛋白酶消化，完全培养基重悬细胞成悬液并计数；以600个细胞/孔接种于6孔板培养板中，每组设3个复孔，培养体系为2 mL/孔；将接种细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 体积分数为5%的培养箱中持续培养15 d，中途每5 d换液并观察细胞状态。实验终止时PBS洗涤细胞1次；每孔加入4%多聚甲醛溶液1 mL，固定细胞30~60 min，PBS洗涤细胞1次；每孔加入Giemsa染液500 μL ，染色细胞

10~20 min；ddH₂O洗涤细胞数次，晾干后拍照，克隆计数（含有50个以上细胞的克隆计为1个细胞克隆）。

1.6 细胞凋亡检测

收集6孔板对数生长期目的细胞胰蛋白酶消化，完全培养基重悬细胞成悬液，与孔板上清液细胞收集于同一5 mL离心管中（细胞数 $\geq 5 \times 10^5$ 个），每组设3个孔；1 300 r/min离心5 min，弃去上清液，4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的D-Hanks液（pH值为7.2~7.4）洗涤细胞沉淀1次；Binding Buffer洗涤细胞沉淀1次，1 300 r/min离心3 min收集细胞；200 μL Binding Buffer重悬细胞沉淀；加入10 μL Annexin V-APC染色，室温避光10~15 min，上流式细胞仪检测。

1.7 蛋白表达Western blot检测

取出目的细胞，PBS洗涤2次后，刮下细胞转移入EP管中，经10~15 min冰上裂解后，超声200 W破碎细胞4次（每次5 s，间隔2 s），4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min离心15 min，完成细胞总蛋白抽提。取上清BCA法测定蛋白浓度，按每孔上样量20 μg 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE），4 $^{\circ}\text{C}$ 稳压将蛋白电转移至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride, PVDF）膜上，封闭液室温封闭PVDF膜1 h；封闭液稀释一抗（DDX46稀释度

1 : 200, PIK3CG稀释度1 : 1 000, Akt稀释度1 : 500, P-Akt稀释度1 : 500, PTEN稀释度1 : 1 000, mTOR稀释度1 : 1 000, Beclin 1稀释度1 : 1 000, LC3稀释度1 : 1 000, GAPDH稀释度1 : 2 000), 然后稀释的一抗温育封闭好的PVDF膜4 ℃过夜, 洗膜缓冲液洗膜3次, 每次10 min; 封闭液稀释相应的二抗(稀释度1 : 2 000), 然后稀释的二抗室温下温育PVDF膜2 h, 洗膜缓冲液再洗膜3次, 每次10 min; 按照ECL Western Blot Substrate试剂盒说明书完成X线显影, 晾干后用凝胶成像处理系统扫描拍照, 进行灰度值分析。

1.8 统计学处理

应用SPSS 19.0统计软件分析数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间差异的比较采用 t 检验, 率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

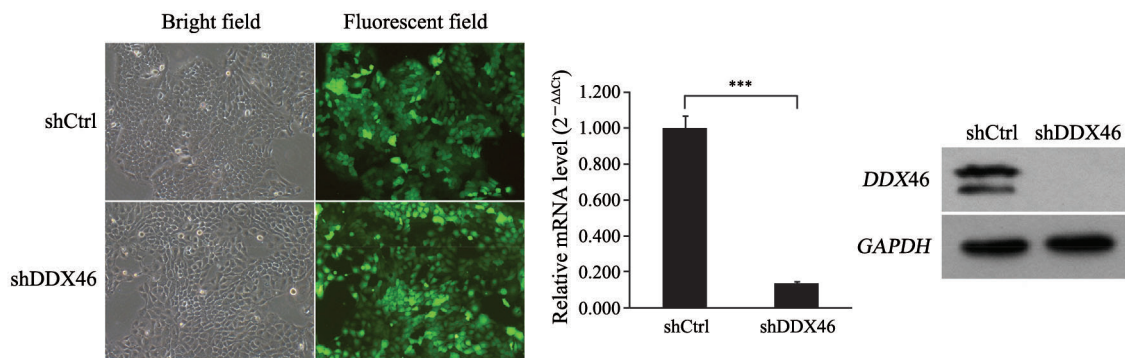


图1 荧光显微镜观察慢病毒目的细胞感染率($\times 100$), RT-PCR和Western blot检测DDX46基因敲减效率

Fig. 1 Transfection efficiency monitored under fluorescence microscope ($\times 100$), RT-PCR and Western blot analysis showing that lentivirus-mediated RNAi efficiently decreased *DDX46* expression

***: $P < 0.001$

2.2 靶向沉默DDX46基因抑制TE-11细胞生长

感染慢病毒的目的细胞带有绿色荧光, HCS可连续读取带荧光信号的细胞并拍照, 然后通过软件分析计算出各孔板中不同组别含有的目的细胞数目。慢病毒感染目的细胞3 d后, HCS连续检测5 d, 记录同一视野各时间点带绿色荧光的细胞数目, 分别绘制计数值细胞生长曲线和增殖倍数细胞生长曲线。与对照组(shCtrl组)相比, 实验组(shDDX46组)TE-11细胞生长被显著抑制($P < 0.01$, 图2)。

2 结 果

2.1 慢病毒介导的RNAi有效抑制DDX46基因的表达

慢病毒感染72 h后, 荧光显微镜观察目的细胞GFP的表达情况, 100倍视野计数各组荧光细胞数(shCtrl组: 446 ± 13 , shDDX46组: 465 ± 16)和总细胞数(shCtrl组: 539 ± 21 , shDDX46组: 560 ± 23), 荧光细胞占比即为阳性感染率, 本实验细胞感染率达到80%以上。经shDDX46慢病毒转染后, RT-PCR检测结果显示, TE-11细胞DDX46基因mRNA表达明显受到抑制(图1, $P < 0.001$), 敲减效率为86.5%; Western blot检测结果见图1, 条带灰度分析显示, TE-11细胞DDX46蛋白表达明显受到抑制($P < 0.001$)。

2.3 靶向沉默DDX46基因抑制TE-11细胞克隆形成

单个细胞在体外持续6次传代以上所组成的细胞群称为克隆。通过计数克隆形成率, 可以了解细胞的独立生存和增殖成瘤能力。目的细胞持续培养15 d后终止实验, 数码相机拍照, 克隆计数, 收集数据进行统计分析。每组3个重复平板, 相对于shCtrl组克隆形成数(133 ± 8), 靶向沉默DDX46基因后, TE-11细胞克隆形成数(shDDX46组, 37 ± 2)显著减少($P < 0.01$), 细胞增殖能力被显著抑制(图3)。

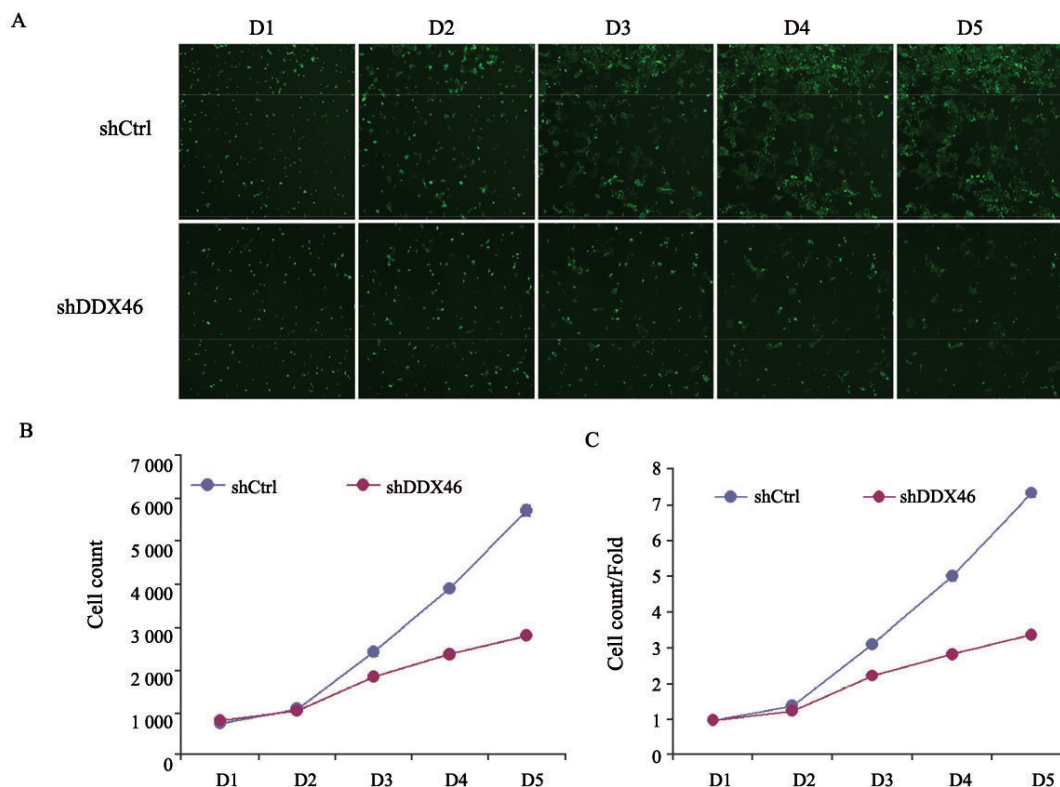


图2 细胞计数检测显示沉默DDX46基因抑制TE-11细胞生长

Fig. 2 HCS monitoring showed that silencing DDX46 inhibited proliferation of TE-11 cells

A: Dynamic growth of GFP-labeled TE-11 cells transfected with shCtrl and shDDX46 was monitored once a day for 5 consecutive days using HCS ($\times 50$). B and C: GFP-labeled transfected TE-11 cells were counted and cell growth curves were drawn accordingly; $P < 0.01$, compared with shCtrl group

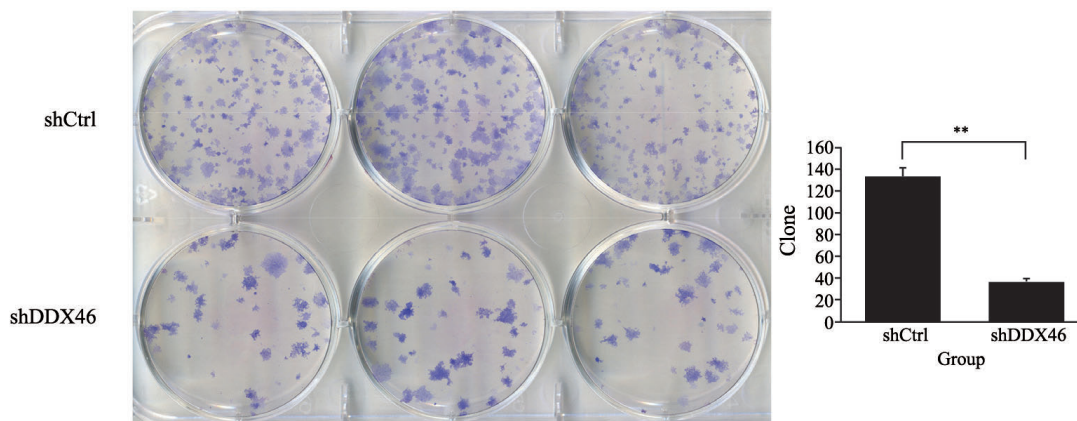


图3 克隆形成实验显示靶向沉默DDX46基因抑制TE-11细胞克隆形成

Fig. 3 Silencing DDX46 suppressed colony formation capacity in TE-11 cells

** $: P < 0.01$, compared with shCtrl group

2.4 靶向沉默DDX46基因诱导TE-11细胞凋亡

用Annexin V-APC单染法流式细胞仪检测细胞凋亡能力，相对于shCtrl组（ $13.2\% \pm 0.23\%$ ），靶向沉默DDX46基因后，TE-11细胞凋亡率（shDDX46组， $25.6\% \pm 0.28\%$ ）显著升高（ $P < 0.01$ ，图4）。

2.5 Western blot检测蛋白的表达水平

靶向沉默DDX46基因后，Western blot检测PI3K-Akt-mTOR信号通路关键信号分子以及自噬相关蛋白的表达水平，条带灰度分析结果显示，PIK3CG、Akt、P-Akt和mTOR表达水平显著下降（ $P < 0.01$ ），PTEN表达水平无显著变化

($P > 0.05$), 而Beclin 1和LC3表达显著上调 ($P < 0.01$, 图5), 提示靶向沉默DDX46可能通过

下调PI3K-Akt-mTOR信号通路, 同时激活细胞凋亡和自噬, 进而影响食管鳞癌细胞生长增殖。

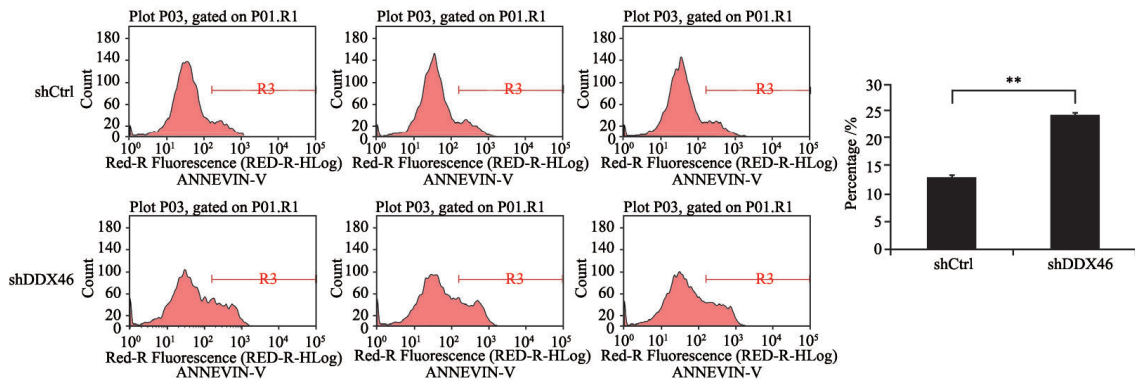


图4 单染法流式细胞术凋亡检测显示靶向沉默DDX46基因诱导TE-11细胞凋亡

Fig. 4 Flow cytometry showed that silencing DDX46 promoted apoptosis of TE-11 cells

**: $P < 0.01$, compared with shCtrl group

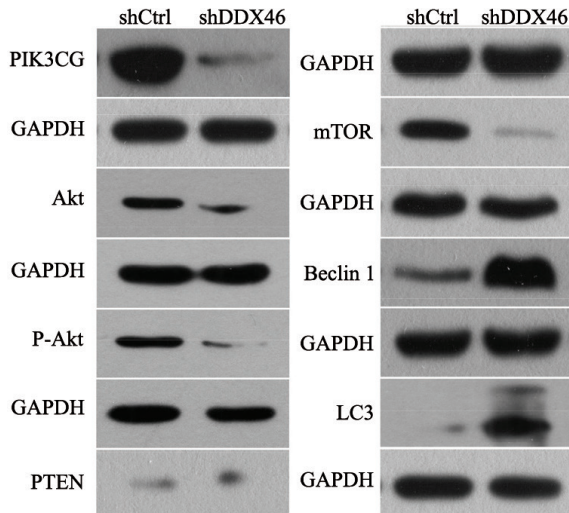


图5 Western blot检测关键信号蛋白表达

Fig. 5 Expression levels of key signaling protein measured by Western blot

3 讨 论

基因表达水平可以揭示某一信号转导通路是否参与肿瘤细胞的增殖或分化。前期研究我们收集了19例食管鳞癌患者新鲜手术癌及癌旁组织(癌组织及距肿瘤边缘5 cm以上食管正常组织)样本, 应用人全基因组表达谱芯片进行成对分析筛选差异表达基因, 并使用RT-PCR验证, 发现一个先前未被关注的在食管鳞癌组织显著高表达的基因DDX46, 免疫组织化学染色显示, DDX46蛋白主要定位于细胞核, 食管鳞癌组织中的表达

明显高于相对应食管正常组织^[5]。

DDX46是17S U2 snRNP复合物的组分^[7], 在mRNA前体剪接和核糖体组装中发挥核心作用^[8-9]。人类DDX46基因位于染色体5q31.1上, 有26个外显子, 编码的DDX46蛋白相对分子质量为 131×10^3 ^[10]。有文献报道, DDX46在人结肠腺癌中表达明显上调^[11], 沉默DDX46基因可显著抑制结肠腺癌细胞的增殖能力, 可能是DDX46沉默后Caspase-3和PARP表达上调诱导细胞凋亡的结果, 但具体机制仍不清楚。本研究发现, 靶向沉默DDX46基因能够显著抑制TE-11细胞增殖和克隆形成能力, 凋亡细胞占比显著增加; DDX46基因沉默后Western blot检测发现, PIK3CG、Akt、P-Akt和mTOR表达显著下调, PTEN表达水平无显著变化, 而Beclin 1和LC3表达上调。众所周知, PI3K-Akt信号通路在许多人类肿瘤中异常激活^[12-13]。Akt作为PI3K下游的关键效应分子, 是调节细胞生长、增殖、凋亡和自噬等通路的汇合点^[12]。mTOR作为PI3K-Akt信号通路下游的重要效应蛋白, 是控制细胞自噬的中心蛋白, 可通过上游各种信号因子的激活或抑制引起自身活性的变化, 同时通过调节下游自噬复合物的形成, 发挥对细胞自噬的直接调控作用^[14-15]。正常情况下, mTOR处于活化状态, 通过磷酸化自噬起始分子ULK1(自噬泡形成所必需的一种蛋白激酶), 抑制自噬的发

生；mTOR活性被抑制，mTOR对ULK1的磷酸化抑制作用减弱，使ULK1激活并磷酸化mAtg13、FIP200和ULK1自身，从而启动自噬^[16]。之后，ULK1蛋白复合体从细胞质转移到内质网或其他自噬发生的特定位置，形成自噬发生的原核，从而募集下游的PI3K复合物、LC3等分子产生自噬泡^[17]，LC3是自噬泡形成的标志蛋白^[18]。Beclin 1（调节自噬现象的关键蛋白）是Akt的一个靶标，Beclin 1上Akt特异性磷酸化作用位点突变可以提高自噬，并抑制Akt诱导的肿瘤形成；Akt通过磷酸化Beclin 1促进Beclin 1定位于细胞骨架，抑制它的自噬功能，这些结果确定了Beclin 1自噬功能与肿瘤抑制功能之间的关联，两者均通过Akt特异性磷酸化作用受到调控^[19]。抑癌基因PTEN是PI3K-Akt信号通路中的关键负调节分子，人类肿瘤中广泛存在PTEN基因突变或缺失，使PTEN蛋白失活，PTEN低表达间接刺激PI3K-Akt活动从而导致肿瘤形成^[20]。本研究发现，PTEN蛋白在食管鳞癌TE-11细胞中低表达，并且PTEN蛋白表达水平在DDX46基因沉默后无明显变化，而PI3K和Akt在DDX46基因沉默后表达水平明显下调，提示DDX46可能是PI3K-Akt信号通路中的另一个关键调节分子。

目前研究发现，在多种人类肿瘤中均存在自噬活性的改变^[21-23]，某些情况下，自噬抑制凋亡，是细胞的存活途径，但自噬本身也会诱发细胞死亡，或与凋亡共同作用及在凋亡缺陷的情况下作为备份机制诱导细胞死亡。细胞自噬和凋亡通路相互关联、互为调控，两者的多重交互作用方式间存在共同的信号通路和调节蛋白：凋亡相关蛋白Caspase-3通过剪切灭活Beclin 1抑制自噬促进凋亡^[24]，而Beclin 1可通过提高Caspase-9活性而增强凋亡诱导剂诱发的细胞凋亡^[25]。目前自噬调控用于治疗肿瘤的潜力，因与凋亡之间的复杂交互作用而尚不清楚，究竟二者之间如何对话共同决定食管鳞癌细胞的命运，是下一步研究面临的主要问题。

综上所述，DDX46的异常表达介导了食管鳞癌细胞的非正常增殖，沉默DDX46可能同时激活细胞自噬和凋亡，进而影响食管鳞癌细胞生长增

殖，PI3K-Akt-mTOR信号通路可能扮演重要角色。进一步研究阐明DDX46调控自噬与凋亡的交互作用及分子机制，将为寻找食管鳞癌新型生物学标志物和潜在治疗靶点提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] LEE A S, KRANZUSCH P J, DOUDNA J A, et al. eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation [J]. *Nature*, 2016, 536(7614): 96-99.
- [2] LINDER P, FULLER-PACE F V. Looking back on the birth of DEAD-box RNA helicases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1829(8): 750-755.
- [3] HOOPER C, HILLIKER A. Packing them up and dusting them off: RNA helicases and mRNA storage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1829(8): 824-834.
- [4] ROBERT F, PELLETIER J. Perturbations of RNA helicases in cancer [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013, 4(4): 333-349.
- [5] LI B, LI Y M, HE W T, et al. Knockdown of DDX46 inhibits proliferation and induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(1): 223-230.
- [6] ZIELSKE S P, STEVENSON M. Importin 7 may be dispensable for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus infection of primary macrophages [J]. *J Virol*, 2005, 79(17): 11541-11546.
- [7] WILL C L, URLAUB H, ACHSEL T, et al. Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein [J]. *EMBO J*, 2002, 21(18): 4978-4988.
- [8] LIANG W W, CHENG S C. A novel mechanism for Prp5 function in pre-spliceosome formation and proofreading the branch site sequence [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(1): 81-93.
- [9] ZHENG Q, HOU J, ZHOU Y, et al. The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m6A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(10): 1094-1103.
- [10] ABDELHALEEM M, MALTAIS L, WAIN H. The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases [J]. *Genomics*, 2003, 81(6): 618-622.
- [11] LI M, MA Y, HUANG P, et al. Lentiviral DDX46 knockdown inhibits growth and induces apoptosis in human colorectal cancer cells [J]. *Gene*, 2015, 560(2): 237-244.
- [12] TESTA J R, BELLACOSA A. AKT plays a central role in tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(20): 10983-10985.
- [13] JANKU F, YAP T A, MERIC-BERNSTAM F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(5): 273-291.
- [14] JUNG C H, RO S H, Cao J, et al. mTOR regulation of autophagy [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(7): 1287-1295.
- [15] RABANAL-RUIZ Y, OTTEN E G, KOROLCHUK V I.

- mTORC1 as the main gateway to autophagy [J]. *Essays Biochem*, 2017, 61(6): 565–584.
- [16] HOSOKAWA N, HARA T, KAIZUKA T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1–Atg13–FIP200 complex required for autophagy [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1981–1991.
- [17] ITAKURA E, MIZUSHIMA N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins [J]. *Autophagy*, 2010, 6(6): 764–776.
- [18] WEIDBERG H, SHPILKA T, SHVETS E, et al. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 20(4): 444–454.
- [19] Wang R C, Wei Y, An Z, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation [J]. *Science*, 2012, 338(6109): 956–959.
- [20] PULIDO R. PTEN inhibition in human disease therapy [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 285.
- [21] HIPPERT M M, O'TOOLE P S, THORBURN A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(19): 9349–9351.
- [22] THORBURN A. Autophagy and its effects: making sense of double-edged swords [J]. *PLoS Biol*, 2014, 12(10): 1001967.
- [23] MARINKOVIĆ M, ŠPRUNG M, BULJUBAŠIĆ M, et al. Autophagy modulation in cancer: current knowledge on action and therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 8023821.
- [24] FU L L, CHENG Y, LIU B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(5): 921–924.
- [25] FURUYA D, TSUJI N, YAGIHASHI A, et al. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 307(1): 26–40.

(收稿日期: 2018-05-04 修回日期: 2018-06-27)