

自噬在人肝癌细胞Huh7对仑伐替尼耐药中的调节作用^Δ

陈大红*, 吴亚菲, 刁文婧, 杨蕙华, 毛鹏娟, 李 琴[#](上海交通大学医学院附属第一人民医院临床药学科, 上海200080)

中图分类号 R965;R735.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)08-0961-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.08.11



摘要 **目的** 研究自噬在人肝癌细胞Huh7对仑伐替尼耐药中的调节作用。**方法** 以人肝癌细胞Huh7为对象,采用低浓度逐渐递增联合长期给药的方式构建仑伐替尼耐药细胞模型Huh7-LR,以CCK-8实验和流式细胞术检测亲本细胞Huh7及耐药细胞Huh7-LR对仑伐替尼的敏感性,以Western blot实验和GFP-mCherry-LC3质粒转染实验分别检测细胞中自噬效应蛋白Beclin-1、自噬接头蛋白sequestosome 1(又名p62)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)的表达水平和细胞自噬水平。通过饥饿诱导构建自噬激活细胞模型,以Western blot实验和GFP-mCherry-LC3质粒转染实验分别检测细胞中p62蛋白表达水平和细胞自噬水平,以流式细胞术检测自噬激活对仑伐替尼敏感性的影响。**结果** 与亲本细胞相比,Huh7-LR细胞的耐药指数为6.2,其p62蛋白的表达水平显著升高,凋亡率、Beclin-1蛋白的表达水平和LC3 II/LC3 I比值均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),自噬水平有所下降。自噬激活可显著升高Huh7-LR细胞中p62蛋白的表达水平($P<0.05$)和自噬水平,并显著升高其凋亡率($P<0.05$)。**结论** 自噬参与了仑伐替尼耐药,激活自噬可一定程度逆转肝癌细胞对仑伐替尼耐药。

关键词 自噬;仑伐替尼;肝癌细胞;耐药

Regulatory effect of autophagy on the resistance of human liver cancer cell Huh7 to lenvatinib

CHEN Dahong, WU Yafei, DIAO Wenjing, YANG Huihua, MAO Pengjuan, LI Qin (Dept. of Clinical Pharmacy, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the regulatory effect of autophagy on the resistance of human liver cancer cell Huh7 to lenvatinib. **METHODS** Using human liver cancer cell Huh7 as subject, the lenvatinib-resist cell model (Huh7-LR) was generated by the low-dose gradient method combined with long-term administration. The sensitivity of parental cell Huh7 and drug-resistant cell Huh7-LR to lenvatinib was detected by using CCK-8 assay and flow cytometry. Western blot assay and GFP-mCherry-LC3 plasmid transfection were performed to detect the expression levels of autophagic protein Beclin-1, autophagic adapter protein sequestosome 1 (p62), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and autophagic level. Furthermore, an autophagy activation model was constructed by cell starvation, the protein expression of p62 and autophagy level were detected by using Western blot assay and GFP-mCherry-LC3 plasmid transfection, and the effect of autophagy activation on the sensitivity of Huh7-LR cells to lenvatinib was detected by flow cytometry. **RESULTS** Compared with parental cells, the drug resistance index of Huh7-LR cells was 6.2; protein expression of p62 was increased significantly, while apoptotic rate, protein expression of Beclin-1 and LC3 II/LC3 I ratio were all reduced significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); the level of autophagy was decreased to some extent. Autophagy activation could significantly increase the protein expression of p62 in Huh7-LR cells ($P<0.05$) and autophagy level, and significantly increase its apoptotic rate ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Autophagy is involved in lenvatinib resistance, and activating autophagy can reverse the resistance of liver cancer cells to lenvatinib to some extent.

KEYWORDS autophagy; lenvatinib; liver cancer cell; drug resistance

Δ 基金项目 上海市申康医院发展中心第二轮《促进市级医院临床技能与临床创新三年行动计划(2020—2022年)》重大临床研究项目(No.SHDC2020CR4076)

* **第一作者** 硕士研究生。研究方向:肿瘤药理学。E-mail: chendahong511@163.com

通信作者 副主任药师,硕士生导师。研究方向:肿瘤药理学。E-mail: liqin0626@hotmail.com

2020年全球肝癌确诊病例超90万,死亡病例达83万,是全球范围内第六大常见癌症和第三大常见癌症死亡原因^[1]。该统计数据显示,全世界超过半数的肝癌新发病例和死亡病例均发生在东亚地区(分别为54.3%和54.1%)^[1]。我国作为肝癌大国,确诊/死亡病例分别占世界肝癌确诊/死亡病例总数的45.3%和47.1%^[1]。肝细胞

癌(hepatocellular carcinoma, HCC)作为常见的原发性肝癌组织学类型,具有发病隐匿、转移快、易复发等特点,其临床治疗以外科切除、肝移植及射频消融、化疗、口服多激酶抑制剂等为主^[2]。其中,索拉非尼等多激酶抑制剂是中晚期肝癌患者的首选治疗方案。2018年,仑伐替尼在我国获批成为最新的肝癌一线治疗药物,打破了同类药物索拉非尼在肝癌治疗领域近10年的垄断局面^[3]。然而,随着仑伐替尼、索拉非尼等HCC全身性治疗药物临床应用的日益广泛,其有效性受到靶信号通路相关分子的干扰;同时,由于HCC的遗传异质性,以及Hippo、c-Myc等经典信号通路和N6-腺苷酸甲基化修饰等经典生物学行为的影响,其耐药问题日渐突显^[4-6]。因此,探讨仑伐替尼耐药机制,寻找逆转或减轻耐药的有效方法对仑伐替尼的临床应用至关重要。

自噬是一种细胞自我降解和胞内组分循环利用的过程,可参与细胞或机体营养物质的降解回收、细胞微环境稳态的维持和肿瘤的发生发展,并可通过信号通路改变等途径来发挥耐药调控作用^[7-9]。研究指出,自噬在肿瘤细胞耐药过程中的作用具有两面性:一方面,自噬信号通路被激活后能够分解药物分子,促进细胞存活并产生药物抵抗,如激活自噬能够增强肝癌细胞对奥沙利铂、索拉非尼等药物的耐药性;另一方面,激活自噬能增强肿瘤细胞对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂类药物的敏感性^[10-11]。在仑伐替尼耐药方面,毒性自噬小体的生成与该药细胞毒作用的发挥密切相关^[12],由腺苷一磷酸活化蛋白激酶信号通路介导的自噬激活途径能够提高肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性^[13]。由此可见,自噬可能在肝癌细胞对仑伐替尼耐药的发生过程中具有关键作用。基于此,本研究通过构建仑伐替尼耐药体外人源肝癌细胞模型,探究自噬与仑伐替尼耐药的相关性,以期为该药耐药机制的进一步探索提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究使用的主要仪器包括BB150型细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)、DMI8型倒置荧光显微镜(德国Leica公司)、Epoch 2t型全波长酶标仪(美国BioTek公司)、Accuri C6型流式细胞仪(美国BD公司)、Tannon 5200型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)、Mini-PROTEAN® Tetra型电泳系统(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

仑伐替尼原料药(批号HY-10981,纯度≥99.0%)、CCK-8试剂盒(批号HY-K0301)均购自美国MCE公司;

Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号0076884)购自美国BD公司;Trizol总RNA提取试剂(批号5596-026)、Lipofectamine 2000(Lipo2000)转染试剂(批号11668-019)均购自美国Invitrogen公司;胎牛血清(FBS,批号10099-141)、DMEM高糖培养基(批号C11995500BT)、Opti-MEM培养基(批号31985070)均购自美国Gibco公司;胰蛋白酶消化液(批号C100C1)、100×青霉素-链霉素溶液(批号C100C5)、蛋白磷酸酶抑制剂混合物(批号P002)、RIPA裂解液(批号WB3100)、彩色预染蛋白marker(批号P9005)、5×蛋白上样缓冲液(批号WB2001)、10×TBST缓冲液(批号WB20500)、BCA蛋白定量试剂盒(批号WB6501)、极敏ECL化学发光试剂盒(批号P10060)、快速封闭液(批号P30500)均购自苏州新赛美生物科技有限公司;10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)快速制备试剂盒(批号PG112)、10×SDS电泳缓冲液(批号PS105)、10×转膜缓冲液(批号PS109)均购自上海雅酶生物医药科技有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(批号IPVH00010)购自美国Millipore公司;兔源自噬接头蛋白sequestosome 1(SQSTM1,又名p62)、自噬效应蛋白Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)单克隆抗体和鼠源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(批号分别为#23214、#3495、#12741、#97166)均购自美国CST公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗和HRP标记的羊抗鼠IgG二抗(批号分别为abs20002ss、abs20039ss)均购自爱必信(上海)生物科技有限公司;GFP-mCherry-LC3质粒购自上海和元生物技术有限公司。

1.3 细胞

人肝癌细胞株Huh7来自中国科学院生物化学与细胞生物研究所,于-80℃下冻存。

2 方法

2.1 细胞复苏及培养

取冻存的Huh7细胞,于37℃下融化、复苏。待细胞融化后,加入等体积的完全培养基(即含10%FBS、1%青霉素-链霉素溶液的DMEM高糖培养基,下同)混合,以1 000 r/min离心3 min;收集细胞,使用完全培养基重悬并接种于完全培养基8~10 mL中,轻轻晃动,混匀后置于37℃、5%CO₂条件下培养。

2.2 仑伐替尼耐药株构建及验证

2.2.1 仑伐替尼耐药株构建

将仑伐替尼溶解于适量二甲基亚砜中,于-80℃下避光保存。临用前,使用完全培养基将上述药液稀释至

有效工作浓度。选取生长状态良好的 Huh7 细胞,采用低浓度逐渐递增联合长期给药的方式构建仑伐替尼耐药(Huh7-lenvatinib resistance, Huh7-LR)模型,具体流程(图 1)如下:待 Huh7 细胞生长融合至 50%~60% 时,用含 1 $\mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼的完全培养基首次干预 24 h;弃去培养基,更换为完全培养基;待细胞长满后传代并继续以含药培养基和完全培养基交替培养,2~3 个循环后再次传代;取传代后的细胞,用含 2 $\mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼的完全培养基干预,再次进行含药培养基及完全培养基的交替培养,并同法继续提高药物浓度至 10 $\mu\text{mol/L}$,即得 Huh7-LR 细胞模型(通过显微观察细胞形态和 CCK-8、流式细胞术实验评价细胞对仑伐替尼的敏感性来判定,具体实验内容见“2.2.2”项)。将所得耐药株继续培养于含 10 $\mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼的完全培养基中以维持其耐药特性。

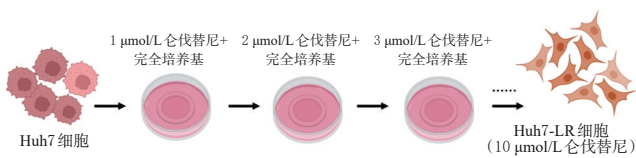


图 1 仑伐替尼耐药的 Huh7-LR 细胞构建流程图

2.2.2 Huh7-LR 细胞模型验证

(1)显微观察:取 Huh7 和 Huh7-LR 细胞,使用显微镜观察其外观形态。

(2)CCK-8 实验:取生长状态良好且处于对数生长期的 Huh7 和 Huh7-LR 细胞,以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中。待细胞生长融合至 60%~70% 时,分为对照组(含培养基但不含药物)及梯度药物干预组(含培养基和 2、4、8、16、32、64、128、256 $\mu\text{mol/L}$ 的仑伐替尼,药物浓度参考预实验结果设定),并设置不含细胞、不含药物的空白组,每组设置 6 个复孔。作用 24 h 后,弃去培养基,每孔加入 CCK-8 试剂适量,孵育 1 h 后,使用酶标仪检测各孔光密度(OD)值,计算细胞抑制率{细胞抑制率=[1-(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)] $\times$ 100%}和半数抑制浓度(IC_{50}),并计算耐药指数(耐药指数=耐药细胞 IC_{50} /亲本细胞 IC_{50})。

(3)流式细胞术实验:取生长状态良好且处于对数生长期的 Huh7 和 Huh7-LR 细胞,以 5×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h。待细胞生长融合至 60%~70% 时,分别用 10 $\mu\text{mol/L}$ 的仑伐替尼干预,每种细胞设置 3 个复孔。作用 24 h 后,收集细胞,经胰酶消化后,用流式缓冲液重悬,依次加入 Annexin V-FITC 和 PI 染料适量,混匀后避光孵育 15 min,使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

2.3 Huh7 和 Huh7-LR 细胞自噬水平检测

分别采用 Western blot 实验和 GFP-mCherry-LC3 质粒转染实验检测细胞中自噬相关蛋白的表达情况和细胞自噬水平。

2.3.1 细胞中自噬相关蛋白表达

取生长状态良好且处于对数生长期的 Huh7 及 Huh7-LR 细胞,以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中(每种细胞设置 3 个复孔),培养 24 h。收集 2 种细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,加入含蛋白磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液适量,于冰上裂解 15 min;取裂解液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 12 000 r/min 离心 15 min,取蛋白上清液,加入上样缓冲液适量,于 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中加热 10 min 变性;取变性蛋白适量,经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上,于室温下以快速封闭液封闭 10 min;用 TBST 缓冲液洗膜后,加入 Beclin-1、p62、LC3、GAPDH 一抗(稀释比例均为 1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;用 TBST 缓冲液洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为 1:5 000),室温下孵育 1 h;用 TBST 缓冲液洗膜后,经 ECL 显影、成像。使用 Image J 软件进行分析,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的条带灰度值比值表示目的蛋白的表达水平,结果以 Huh7 细胞为参照进行归一化处理。

2.3.2 细胞自噬水平

取生长状态良好且处于对数生长期的 Huh7 和 Huh7-LR 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 12 孔板中(每种细胞设置 3 个复孔),培养 24 h。待 2 种细胞生长融合至 40%~50% 时,弃去培养基;加入 Opti-MEM 培养基,培养 2 h 后进行 GFP-mCherry-LC3 质粒转染。转染时,将质粒溶解于适量 Opti-MEM 培养基中,并与 Lipo2000 转染试剂混合均匀,静置 15 min 后,将上述转染复合物分别加至 Huh7 和 Huh7-LR 细胞中;转染 6~8 h 后,弃去培养基,以完全培养基继续培养 24~28 h。待转染细胞生长稳定(可见荧光)后,使用荧光显微镜观察 2 种细胞的自噬情况(正常细胞呈现黄色荧光;若细胞红色、黄色荧光斑点点状聚集增加,提示细胞自噬水平增强)。

2.4 自噬激活对仑伐替尼耐药逆转作用的检测

为进一步明确自噬在仑伐替尼耐药中的作用,本研究借助无血清培养基致饥饿环境诱发自噬激活的方式^[14],考察自噬激活对仑伐替尼耐药的逆转作用。

取生长状态良好且处于对数生长期的 Huh7 和 Huh7-LR 细胞,分为对照组(Huh7 组)、耐药细胞组(Huh7-LR 组)、耐药细胞饥饿组(Huh7-LR+starv 组),每组设置 3 个复孔。Huh7-LR+starv 组细胞在不含血清的

完全培养基中进行饥饿处理 6 h。收集各组细胞,按“2.3.1”项下方法检测其中 p62 蛋白的表达情况;按“2.3.2”项下方法进行转染处理,待转染细胞生长稳定后,使用荧光显微镜观察其自噬情况;按“2.2.2(3)”项下方法,以 10 μ mol/L 的仑伐替尼干预 24 h 后,检测细胞凋亡情况。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 事后检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 仑伐替尼耐药株的鉴定结果

显微观察结果(图 2)显示,与亲本细胞(Huh7 细胞)相比,仑伐替尼耐药细胞(Huh7-LR 细胞)边缘不规则且触角增多,形态改变明显。CCK-8 实验结果(图 3)表明,仑伐替尼对 Huh7 细胞的 IC₅₀ 为 25.9 μ mol/L,对 Huh7-LR 细胞的 IC₅₀ 为 160.7 μ mol/L,耐药指数为 6.2。流式细胞术实验结果(图 4)显示,经 10 μ mol/L 的仑伐替尼干预 24 h 后,Huh7-LR 细胞的凋亡率为 (7.45 $\pm$ 2.67)%,显著低于 Huh7 细胞的 (41.38 $\pm$ 0.59)%(*P*<0.01)。上述结果表明,仑伐替尼耐药细胞 Huh7-LR 可稳定生长于含 10 μ mol/L 仑伐替尼的完全培养基中;该细胞株对仑伐替尼的敏感性低于亲本细胞,具有明显的耐药性。

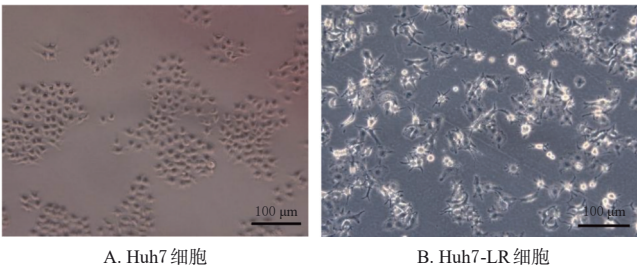


图 2 Huh7 和 Huh7-LR 细胞外观形态的显微图

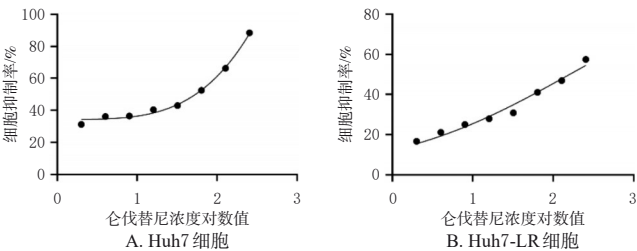


图 3 Huh7 和 Huh7-LR 细胞对仑伐替尼的敏感性 (CCK-8 实验)

3.2 2 种细胞中 Beclin-1、p62、LC3 蛋白表达和自噬水平的检测结果

Western blot 实验结果(图 5)显示,与 Huh7 细胞比较,Huh7-LR 细胞中 p62 蛋白的表达水平显著升高,

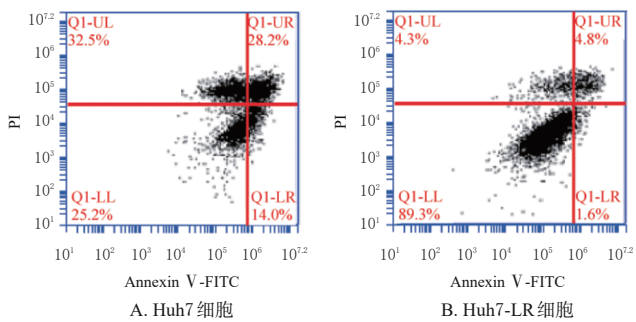
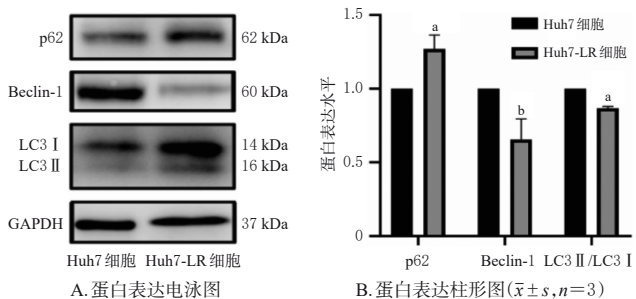


图 4 Huh7 和 Huh7-LR 细胞对仑伐替尼的敏感性(流式细胞术实验)

Beclin-1 蛋白的表达水平和 LC3 II/LC3 I 比值均显著降低(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。GFP-mCherry-LC3 质粒转染实验结果(图 6)显示,与 Huh7 细胞比较,Huh7-LR 细胞中的红色、黄色荧光斑点均有所减少。以上结果提示,相较于 Huh7 细胞,Huh7-LR 细胞的自噬水平降低。



a: 与 Huh7 细胞比较, *P*<0.01; b: 与 Huh7 细胞比较, *P*<0.05。

图 5 2 种细胞中 Beclin-1、p62、LC3 蛋白的表达情况

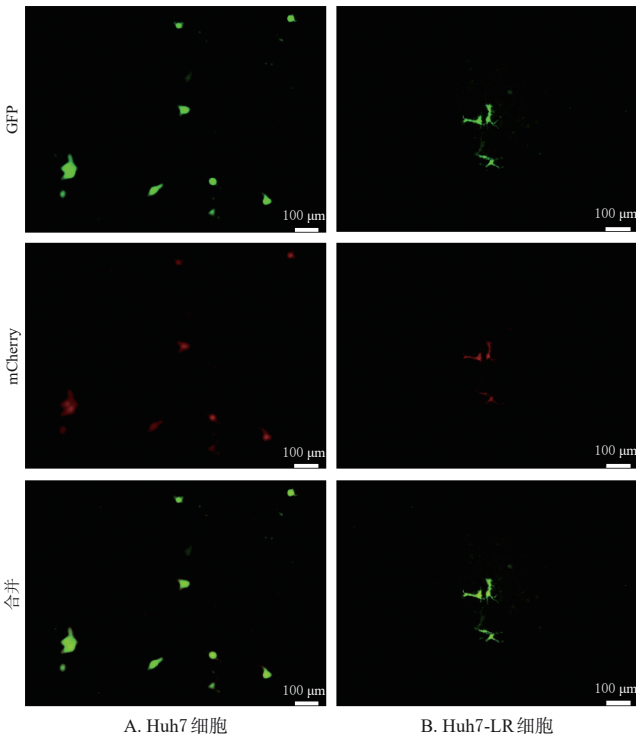


图 6 2 种细胞的自噬水平

3.3 自噬激活对仑伐替尼耐药的逆转作用

Western blot实验结果(图7)显示,与Huh7组比较,Huh7-LR组细胞中p62蛋白的表达水平显著升高($P<0.05$);与Huh7-LR组比较,Huh7-LR+starv组细胞中p62蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$)。GFP-mCherry-LC3质粒转染实验结果(图8)显示,Huh7-LR+starv组细胞的红色、黄色荧光斑点均较Huh7-LR组增多,提示饥饿处理能诱导Huh7-LR细胞自噬激活。流式细胞术实验结果(图9)显示,经10 $\mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼作用24 h后,Huh7-LR组细胞的凋亡率为 $(1.20\pm0.10)\%$,显著低于Huh7组细胞的 $(33.20\pm2.24)\%$ ($P<0.05$);而Huh7-LR+starv组细胞的凋亡率为 $(5.24\pm1.85)\%$,显著高于Huh7-LR组细胞($P<0.05$)。上述结果提示,自噬激活能够提高耐药细胞对仑伐替尼的敏感性。

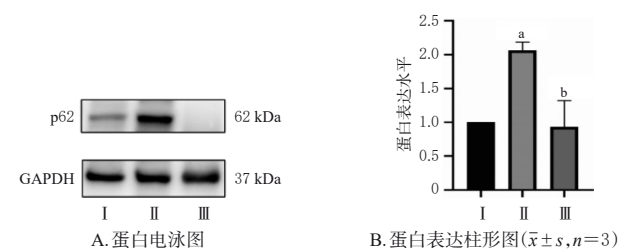


图7 自噬激活实验中各组细胞中p62蛋白的表达情况

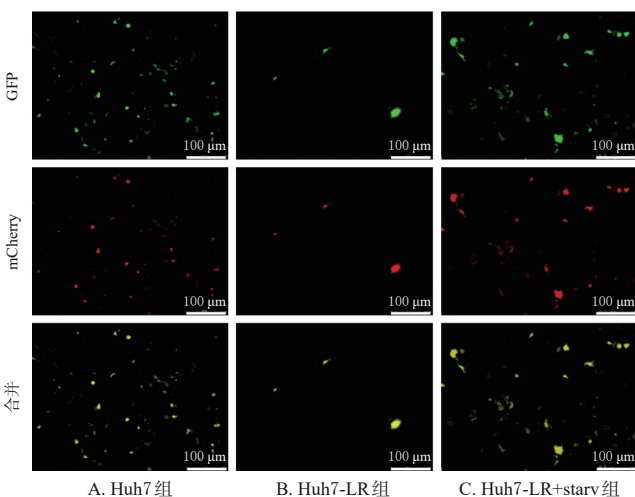


图8 自噬激活实验中各组细胞的自噬水平

4 讨论

HCC是高复发、难治愈的恶性肿瘤之一,患者的5年生存率仅为18%^[2]。中晚期肝癌患者的首选治疗药物以多激酶抑制剂为主,包括索拉非尼、仑伐替尼等^[15]。其中,仑伐替尼具有独特的分子靶点(包括血管内皮生长因子受体1~3、血小板衍生生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体1~4等),并因不低于索拉非尼的生存期及相对可控的耐受性等优势成为肝癌一线治疗的主

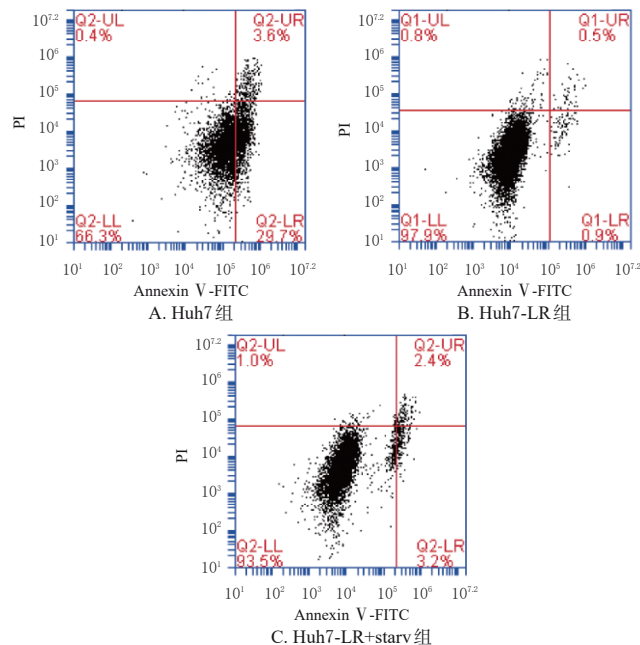


图9 自噬激活实验中各组细胞对仑伐替尼的敏感性

力军^[3]。然而临床实践显示,仑伐替尼的耐药问题逐渐成为限制其临床应用的一大原因^[3]。研究指出,仑伐替尼耐药受EGFR活化、c-Met信号失调等机制的调控^[16-17]。探讨仑伐替尼耐药机制,寻找关键信号通路或作用靶点,有助于为逆转仑伐替尼耐药或减轻耐药程度提供新靶点、新策略,切实改善患者治疗结局。

本研究采用低浓度逐渐递增联合长期给药的方式构建Huh7-LR细胞模型,通过显微观察和细胞抑制率、凋亡率检测来验证耐药细胞对仑伐替尼的敏感性,并通过Western blot实验和GFP-mCherry-LC3转染实验来综合评价细胞自噬水平。自噬关键蛋白Beclin-1、p62、LC3是反映自噬激活或抑制状态的重要指标:当Beclin-1蛋白表达下调、p62蛋白表达上调时,则预示细胞自噬受到抑制^[9];此外,自噬小体的膜变化过程伴随着LC3表达形式的转化,即胞浆型LC3(LC3 I)可与磷脂酰乙醇胺共价结合,转化成膜型LC3(LC3 II),后者的增多可能源于自噬小体膜生成的增多,也有可能是自噬流受阻引发代谢累积的结果^[18-19]。基于此,本研究以Beclin-1、p62蛋白的表达情况和LC3 II/LC3 I比值来反映细胞自噬状态。结果显示,与亲本细胞相比,Huh7-LR细胞的耐药指数为6.2,边缘不规则且触角增多,凋亡率和LC3 II/LC3 I比值、Beclin-1蛋白的表达水平均显著降低,p62蛋白的表达水平显著升高,同时结合GFP-mCherry-LC3转染实验结果可知,Huh7-LR细胞的自噬水平较亲本细胞明显下降。

为进一步探究自噬在仑伐替尼耐药中的作用,本研究通过饥饿诱导自噬激活,观察自噬对仑伐替尼耐药性

的影响。结果显示,自噬激活后,Huh7-LR+starv组细胞中p62蛋白的表达水平较Huh7-LR组显著降低,凋亡率则较Huh7-LR组显著升高,表明自噬激活能在一定程度上提高耐药株对仑伐替尼的敏感性。

综上所述,自噬参与了仑伐替尼耐药,激活自噬能一定程度逆转肝癌细胞对仑伐替尼耐药。这一研究提示自噬与仑伐替尼耐药密切相关,为今后临床改善仑伐替尼应用效果提供了基础研究依据,但其具体的分子机制仍有待进一步探究。

参考文献

- [1] RUMGAY H,ARNOLD M,FERLAY J,et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. J Hepatol,2022,77(6):1598-1606.
- [2] YANG J D,HEIMBACH J K. New advances in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. BMJ,2020,371:m3544.
- [3] AL-SALAMA Z T,SYED Y Y,SCOTT L J. Lenvatinib: a review in hepatocellular carcinoma[J]. Drugs, 2019, 79(6):665-674.
- [4] TANG W W,CHEN Z Y,ZHANG W L,et al. The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: theoretical basis and therapeutic aspects[J]. Signal Transduct Target Ther,2020,5(1):87.
- [5] CHEN D H,ZHANG J G,WU C X,et al. Non-coding RNA m6A modification in cancer: mechanisms and therapeutic targets[J]. Front Cell Dev Biol,2021,9:778582.
- [6] FU R D,JIANG S T,LI J Y,et al. Activation of the HGF/c-MET axis promotes lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma cells with high c-MET expression[J]. Med Oncol,2020,37(4):24.
- [7] DEVIS-JAUREGUI L,ERITJA N,DAVIS M L,et al. Autophagy in the physiological endometrium and cancer[J]. Autophagy,2021,17(5):1077-1095.
- [8] DEBNATH J,GAMMOH N,RYAN K M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2023,24(8):560-575.
- [9] WU Y F,ZHANG J G,LI Q. Autophagy, an accomplice or antagonist of drug resistance in HCC[J]. Cell Death Dis,2021,12(3):266.
- [10] FU X T,SONG K,ZHOU J,et al. Tumor-associated macrophages modulate resistance to oxaliplatin via inducing autophagy in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Cell Int, 2019,19:71.
- [11] LIN Z Y,NIU Y,WAN A,et al. RNA m⁶A methylation regulates sorafenib resistance in liver cancer through FOXO3-mediated autophagy[J]. EMBO J, 2020, 39(12): e103181.
- [12] ROBERTS J L,POKLEPOVIC A,BOOTH L,et al. The multi-kinase inhibitor lenvatinib interacts with the HDAC inhibitor entinostat to kill liver cancer cells[J]. Cell Signal,2020,70:109573.
- [13] MA X M,QIU Y M,SUN Y L,et al. NOD2 inhibits tumorigenesis and increases chemosensitivity of hepatocellular carcinoma by targeting AMPK pathway[J]. Cell Death Dis,2020,11(3):174.
- [14] GAMBARDELLA G,STAIANO L,MORETTI M N,et al. GADD34 is a modulator of autophagy during starvation [J]. Sci Adv,2020,6(39):eabb0205.
- [15] LLOVET J M,KELLEY R K,VILLANUEVA A,et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021,7(1):6.
- [16] SHI T T,IWAMA H,FUJITA K,et al. Evaluating the effect of lenvatinib on sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma cells[J]. Int J Mol Sci,2021,22(23):13071.
- [17] JIN H J,SHI Y P,LV Y Y,et al. EGFR activation limits the response of liver cancer to lenvatinib[J]. Nature,2021, 595(7869):730-734.
- [18] GALLUZZI L, GREEN D R. Autophagy-independent functions of the autophagy machinery[J]. Cell, 2019, 177(7):1682-1699.
- [19] LI X H,HE S K,MA B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. Mol Cancer,2020,19(1):12.

(收稿日期:2023-10-18 修回日期:2024-02-26)

(编辑:张元媛)