

Glut5 在 Ph⁺ 急性淋巴细胞白血病伊马替尼 耐药中的机制研究*

严天友, 娜仁朵兰, 龚玉萍[△]

四川大学华西医院 血液科(成都 610041)

【摘要】 目的 采用费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病(Ph⁺ ALL)伊马替尼耐药细胞株 SUP-B15/R 研究伊马替尼耐药的可能机制。**方法** 通过基因芯片分析法对比找出伊马替尼耐药株 SUP-B15/R 与敏感株 SUP-B15/S 之间表达差异的基因,筛选出可能与耐药相关的基因 *SLC2A5*,分别采用实时荧光定量 PCR(qPCR)和 Western blot 进一步验证 *SLC2A5* 及其编码蛋白葡萄糖转运体 5(Glut5)在 SUP-B15/R 与 SUP-B15/S 之间表达的差异。采用 MTT 实验检测果糖对 SUP-B15/S 细胞伊马替尼敏感性的影响,以及 qPCR 检测相关信号通路的改变,探究 Glut5 表达增加在 SUP-B15 细胞伊马替尼耐药中的作用。**结果** 基因芯片结果发现,与细胞代谢相关的 *SLC2A5* 基因在 SUP-B15/R 中高表达,qPCR 和 Western blot 实验进一步验证了上述结果。而果糖处理后 SUP-B15/S 细胞对伊马替尼的敏感性下降,IC₅₀ 由(44.50±2.38) μmol/L 增加到(64.71±1.69) μmol/L,同时 *Glut5*、*PI3K*、*AKT* mRNA 表达增强。**结论** SUP-B15/R 细胞高表达 *SLC2A5*、*Glut5* 高表达促进细胞对果糖的吸收,激活伊马替尼作用下受到抑制的 PI3K/AKT 信号通路,导致 SUP-B15 细胞对伊马替尼耐药。

【关键词】 Ph⁺ 急性淋巴细胞白血病 伊马替尼耐药 葡萄糖转运体 5 果糖

The Roles of Glut5 in Imatinib Resistance in the Ph⁺ Acute Lymphoblastic Leukemia Cell YAN Tian-you, NAREN Duo-lan, GONG Yu-ping[△]. *Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

[△] Corresponding author, E-mail: gongyuping2010@aliyun.com

【Abstract】 Objective To explore the possible roles of glucose transport 5 (Glut5) in imatinib resistance in the Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia cell (Ph⁺ ALL). **Methods** The gene chip technique was used to detect different gene expression between Ph⁺ ALL cell line SUP-B15/R (imatinib resistant cell line) and SUP-B15/S (imatinib sensitive cell line), the gene of solute carrier family 2 member 5 (*SLC2A5*) and its coded protein Glut5 were screened out and were reconfirmed by qPCR and Western blot assay. The imatinib half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) to SUP-B15/S cells with or without fructose treatment was further detected by MTT assay, simultaneously signal pathway gene was detected by qPCR assay. **Results** Metabolism related gene *SLC2A5* was screened out with gene chip technique and the Western blot assay and qPCR confirmed the high expression of *SLC2A5* gene and its coded protein Glut5 in SUP-B15/R cells. IC₅₀ values of imatinib to SUP-B15/S cells after treatment with 25 μmol/L fructose were increased from (44.50±2.38) μmol/L to (64.71±1.69) μmol/L, in the meanwhile, *PI3K* and *AKT* mRNA level also increased in fructose treated SUP-B15/S cells compared to the control. **Conclusions** High expression of *SLC2A5* and Glut5 protein in SUP-B15/R cells leads to increased fructose absorption, and further activates PI3K/AKT pathway which cause the SUP-B15 cell resistance to imatinib.

【Key words】 Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia Imatinib resistance Glucose transport 5 Fructose

费城(Ph)染色体是由第 9 号和第 22 号染色体易位即 t(9;22)(q34;q11)形成,Ph⁺ 急性淋巴细胞白血病(Ph⁺ ALL)占成人 ALL 的 20%~30%^[1]。这种易位形成的 *BCR-ABL* 融合基因编码的 BCR-

ABL 融合蛋白具有较强的酪氨酸激酶活性,持续激活下游的一系列信号通路,促进白血病细胞的生长和增殖^[2]。甲磺酸伊马替尼(IM)可以特异地与 ABL 酪氨酸激酶区的 ATP 位点结合,抑制 BCR-ABL 激酶的活化,抑制白血病细胞增殖,诱导白血病细胞的凋亡^[3]。伊马替尼的应用使 Ph⁺ ALL 患者的预后得到了极大的改善,然而伊马替尼耐药的产生又对 Ph⁺ ALL 的临床治疗带来了新的挑战。

* 四川省中医药管理局项目(No. 2014A038)和四川省科技厅基金项目(No. 2015SZ0234-5)资助

[△] 通信作者, E-mail: gongyuping2010@aliyun.com

研究显示,伊马替尼耐药可能的机制包括 *BCR-ABL* 基因激酶区突变,*BCR-ABL* 的扩增,下游信号通路的活化,药物在细胞内转运(包括内吞和外排)的失调等^[4-8]。但在临床上仍有部分耐药不能由上述机制给出满意的解释。因此,本研究旨在探寻 Ph^+ ALL 发生伊马替尼耐药的可能新机制。

1 资料与方法

1.1 试剂

伊马替尼(# SML1027)、D-果糖(# F3510)、Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, # M2128) 为 Sigma 公司产品; TRIzol reagents (Invitrogen, # 15596-018); Primescript RT reagent Kit (TaKaRa, # RR037A); BCA Protein Assay Kit (Thermo, # 23227); 胎牛血清(FBS, # 10099141)、SYBR Green Mix (# 4472908) 为 Life 公司产品; IMDM 培养基 (Hyclone, # SH30228.01B); RIPA 裂解液(碧云天, # P0013C)。鼠抗人葡萄糖转运体 5 (Glut5) 单克隆抗体 (Abcam, # ab114018); 鼠抗人磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(成都正能, # 200306); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗(中杉金桥, # ZB-2305)。

1.2 细胞及细胞培养

伊马替尼敏感的 Ph^+ ALL 细胞株(SUP-B15/S)购于美国 ACTT。伊马替尼耐药的 Ph^+ ALL 细胞株(SUP-B15/R)系通过逐步增加 SUP-B15/S 细胞株培养液中伊马替尼的浓度获得,由四川大学华西医院血液病研究室建立。细胞培养于含 10% FBS 的 IMDM 培养基中, SUP-B15/R 耐药细胞的培养基中额外添加 5 $\mu\text{mol/L}$ 伊马替尼以维持其耐药性,实验前两周置于无伊马替尼的培养基中培养。

1.3 实验方法

1.3.1 基因芯片分析 提取 SUP-B15/S 和 SUP-B15/R 细胞株总 RNA 各 3 份,外送至康成生物公司进行基因芯片分析。通过基因芯片分析找出敏感细胞和耐药细胞之间表达差异的基因。通过筛查以及查阅相关文献,本研究选定一个与细胞能量代谢相关且在耐药细胞株中高表达的基因 *SLC2A5* 进行重点研究,该基因编码的蛋白 Glut5 为果糖特异性转运体。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 *SLC2A5* 基因的表达 为验证基因芯片结果的准确性,我们采用 qPCR 方法检测敏感细胞与耐药细胞间 *Glut5* mRNA(*SLC2A5* 基因)表达的差异。根据 TRIzol

试剂说明书提取细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明将 RNA 逆转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,通过 qPCR 的方法检测敏感和耐药细胞中 *Glut5* 基因的表达。*Glut5* 上游引物:5'-CCATACTGGAAGGATGACCC-3',下游引物:5'-GCAACAGGATCAGAGCATGA-3'(93 bp);*GAPDH* 上游引物:5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3',下游引物:5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA-3'(108 bp)。引物由 Invitrogen 公司合成。采用 ABI 7500 Real-time PCR 仪进行基因片段扩增。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 40 次循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以 *GAPDH* 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.3.3 Western blot 检测 Glut5 蛋白表达 取对数期生长的 SUP-B15/S 和 SUP-B15/R 细胞,根据细胞数加入适量 RIPA 裂解液重悬细胞后提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。灌制 100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每道上样 40 μg 。电泳分离蛋白后,将凝胶上的蛋白转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,用一抗(鼠抗人 Glut5 单克隆抗体 1:1 000、鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 1:5 000)进行孵育,再用辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗(1:5 000)孵育,最后显色。用扫描仪将胶片扫描成黑白照片,然后通过 Image J 软件测定各显色条带的灰度值,以目的条带与 GAPDH 灰度值的比值为目的蛋白的相对含量。

1.3.4 MTT 法检测果糖处理前后 SUP-B15/S 细胞对伊马替尼的敏感性 采用 MTT 实验检测。收集经加入终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 果糖处理 24 h 后的 SUP-B15/S 细胞及未经果糖处理的 SUP-B15/S 细胞,分别用含或不含果糖的培养基重悬,各取细胞悬液 90 μL (约 10^5 个细胞)加入含 10 μL 不同浓度伊马替尼(终浓度为 0、5、10、20、40、80 和 100 $\mu\text{mol/L}$,每个浓度 3 个复孔)放置于 96 孔板中,培养 72 h,每孔加入 MTT 20 μL ,继续培养 6 h,加入 MTT 溶解液 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后测定每个孔在 550 nm 波长处的吸光度,并通过 SPSS 软件计算细胞抑制率 50% 时的伊马替尼浓度(IC_{50} 值)^[9]。

1.3.5 qPCR 检测果糖处理前后 SUP-B15/S 细胞磷脂酰肌醇激酶(*PI3K*)/丝氨酸/苏氨酸激酶(*AKT*)的表达 检测未加果糖处理和加终浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 果糖处理 24 h 后的 SUP-B15/S 细胞中 *PI3K* 和 *AKT* 的表达,了解果糖对相关信号通路

的影响。*PI3K* 上游引物: 5'-CGTGGAGGCATTGTTCTGAT-3', 下游引物: 5'-GGAGCCTGGAAGAGCCC-3' (109 bp); *AKT* 基因上游引物: 5'-TGAAGGTGCCATCATTCTTG-3', 下游引物: 5'-ATGAGCGACGTGGCTATTGT-3' (106 bp)。引物由 Invitrogen 合成。采用 ABI 7500 Real-time PCR 仪进行基因片段扩增。反应条件: 50 °C 预变性 2 min, 然后 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 次循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。以 *GAPDH* 为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.4 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析, 利用 GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA) 软件对敏感细胞及耐药细胞间基因表达、蛋白表达差异, 以及敏感细胞果糖处理前后伊马替尼 IC₅₀ 差异进行两样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SUP-B15/S 与 SUP-B15/R 细胞株间表达差异

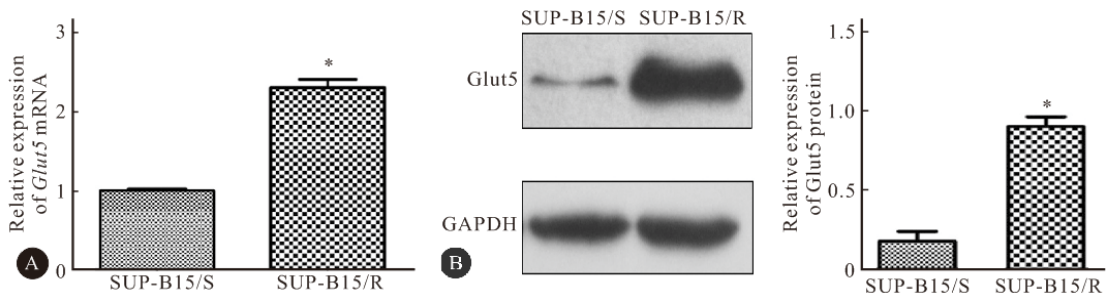


图1 SUP-B15/S 与 SUP-B15/R 细胞 *Glut5* mRNA(A) 和蛋白(B) 的表达

Fig 1 The expression of *Glut5* mRNA (A) and its protein level (B) in SUP-B15/S and SUP-B15/R cells

A: qPCR; B: Western blot; * $P < 0.01$, vs. SUP-B15/S

SUP-B15/S 细胞的 IC₅₀ 值为 $(44.50 \pm 2.38) \mu\text{mol/L}$, 在果糖处理后增加到 $(64.71 \pm 1.69) \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.001$), 提示果糖处理可以增加细胞对伊马替尼的耐药性。

2.4 果糖处理 SUP-B15/S 细胞 PI3K/AKT 信号通路活化的影响

结果发现, 果糖处理后细胞 *Glut5*、*AKT*、*PI3K* mRNA 表达均增加 (P 均 < 0.05 , 图 2), 提示果糖的存在刺激了细胞 *Glut5* 的表达, 并刺激了 *PI3K*/*AKT* 信号通路的活化。

的基因

SUP-B15/S 与 SUP-B15/R 细胞株基因芯片结果分析显示, 两种细胞间共有 2 454 个基因表达有显著差异, 其中 SUP-B15/R 相对于 SUP-B15/S 表达上调的基因有 1 337 个, 下调的基因有 1 117 个。通过筛查以及查阅相关文献, 本研究选定一个与细胞能量代谢相关且在耐药细胞株 SUP-B15/R 中高表达的 *SLC2A5* 基因, 其表达量是 SUP-B15/S 细胞的 13.54 倍, 差异有统计学意义。

2.2 qPCR 和 Western blot 检测敏感细胞与耐药细胞间 *Glut5* mRNA (*SLC2A5* 基因) 和蛋白表达的差异

qPCR 检测结果显示, SUP-B15/R 的 *SLC2A5* 基因表达较 SUP-B15/S 细胞的高, 差异有统计学意义 ($P = 0.0002$) (图 1A)。Western blot 结果显示, SUP-B15/R 细胞的 *Glut5* 蛋白的表达水平高于 SUP-B15/S, 差异有统计学意义 ($P = 0.0011$), 见图 1B。

2.3 果糖处理 SUP-B15/S 细胞对伊马替尼敏感性的影响

MTT 检测结果显示, 果糖处理前, 伊马替尼对

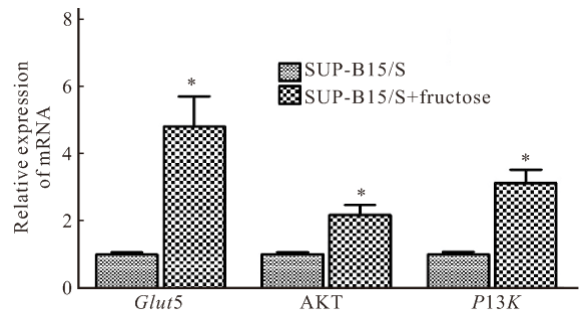


图2 果糖处理对 SUP-B15/S 细胞信号通路的影响

Fig 2 Effects of fructose treatment on the PI3K/AKT signal pathway in SUP-B15/S cells

* $P < 0.01$, vs. SUP-B15/S

3 讨论

肿瘤细胞具有较高的增殖、代谢活性,其能量消耗明显增加。作为人体细胞能量的主要来源,葡萄糖的需求也相应增加。而由于葡萄糖为水溶性物质,其跨膜转运需由转运蛋白来完成,因此,在多种肿瘤细胞中均检测到葡萄糖转运体 Glut1 表达的增高^[10-11]。而作为葡萄糖的同分异构体,果糖在肿瘤代谢中也起到一定的作用。

首先,果糖进入细胞后在果糖激酶的作用下生成 1-磷酸果糖^[12],这一步骤跳过了糖酵解过程中关键酶 6-磷酸果糖激酶-1 的作用而直接将 1 号位碳原子磷酸化,从而继续进行下游的糖酵解过程。与葡萄糖作为能量来源相比,这一不同代谢方式可以使细胞更快获得能量,更能满足肿瘤高代谢的需求。此外,与葡萄糖相比,果糖能被优先用于非氧化磷酸戊糖途径,生成大量核酸,为细胞增殖提供原料,并且果糖还可以诱导非氧化磷酸戊糖途径中的关键酶转酮醇酶 T(TKT)表达及活性的增强^[13],从而增强了非氧化磷酸戊糖途径,促进了肿瘤细胞的增殖代谢。与葡萄糖一样,果糖的跨膜转运也依赖于跨膜转运蛋白来完成。多项研究发现果糖特异性转运体 Glut5 表达的增强及果糖摄取的增加与肝癌、胰腺癌、乳腺癌等肿瘤相关^[14-16]。

本研究首先通过基因芯片检测发现,伊马替尼耐药细胞 SUP-B15/R 中 *Glut5* 基因表达增加,qPCR 以及 Western blot 进一步证实了该结果。因此,我们推测 *Glut5* 高表达以及由此引起的细胞代谢的改变可能在细胞伊马替尼耐药中起到一定作用。而作为果糖的跨膜转运蛋白,*Glut5* 在 SUP-B15/R 细胞中表达增加势必导致细胞内果糖含量的增加。由此,我们通过增加 SUP-B15/S 细胞培养基中果糖的含量来验证果糖对细胞伊马替尼敏感性的影响。结果发现,经果糖处理后,伊马替尼对 SUP-B15/S 细胞的 IC₅₀ 明显增加,同时 qPCR 检测到细胞 *Glut5* mRNA 表达水平增加,表明高果糖环境促进了细胞 *Glut5* 的表达,而 *Glut5* 表达的增加又促进了果糖向细胞内的转运^[17],同时也使得细胞对于伊马替尼的敏感性下降。随后,我们进一步研究了 *Glut5*-果糖引起 SUP-B15/S 细胞对伊马替尼敏感性下降的可能原因。众所周知,Ph⁺ ALL 的发生主要是因为 BCR-ABL 融合蛋白具有持续活化的酪氨酸激酶活性,持续激活了下游多条信号传导通路包括 Ras/MAPK、PI3K/AKT、JAK/STAT 等,

促进细胞增殖和存活,抑制细胞凋亡^[3]。而伊马替尼通过与 ATP 竞争 BCR-ABL 蛋白上的 ATP 结合位点^[3],抑制 BCR-ABL 酪氨酸激酶活性,进而抑制下游信号通路的持续活化。有报道显示,细胞内果糖的代谢可以刺激 PI3K/AKT 通路的活化^[18-19]。本研究结果显示,作为 BCR-ABL 酪氨酸激酶下游主要的信号通路,PI3K 以及 AKT 的 mRNA 水平在接受了果糖处理的 SUP-B15/S 细胞中明显增高。由此,我们推测细胞内果糖含量的增加可以促进细胞 PI3K/AKT 信号通路的活化,从而减弱了伊马替尼对于 BCR-ABL 下游重要信号通路的抑制作用,降低了细胞对伊马替尼的敏感性。

关于 Ph⁺ ALL 伊马替尼耐药机制的研究已有很多^[4-8],本研究主要通过伊马替尼耐药细胞株的建立,比较敏感、耐药细胞之间表达差异基因,从而发现了与耐药相关的细胞糖代谢的改变,这一变化引起了 Ph⁺ ALL 细胞通过活化下游信号而产生对伊马替尼的耐药。

综上所述,*Glut5* 在 SUP-B15/R 细胞高表达促进了细胞对果糖的吸收,而细胞内高果糖代谢激活了伊马替尼作用下抑制的 PI3K/AKT 信号通路,导致了 SUP-B15 细胞对伊马替尼的耐药。

参 考 文 献

- [1] FORGHIERI F, LUPPI M, POTENZA L. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, 2015, 20(10):618-619.
- [2] ANDREU EJ, LLEDO E, POCH E, *et al.* BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res*, 2005, 65(8):3264-3272.
- [3] MANLEY PW, COWAN-JACOB SW, BUCHDUNGER E, *et al.* Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur J Cancer*, 2002, 38(Suppl 5):S19- S27.
- [4] GORRE M E, MOHAMMED M, ELLWOOD K, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 2001, 293(5531):876-880.
- [5] SHAH NP, NICOLL JM, NAGAR B, *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2002, 2(2):117-125.
- [6] VON BUBNOFF N, SCHNELLER F, PESCHEL C, *et al.* BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukaemia to STI571: a prospective study. *Lancet*, 2002, 359(9305):487-491.
- [7] GORRE ME, ELLWOOD-YEN K, CHIOSIS G, *et al.* BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib

mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood*, 2002, 100(8):3041-3044.

- [8] HOFMANN WK, DE VOS S, ELASHOFF D, *et al.* Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*, 2002, 359(9305):481-486.
- [9] 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 等. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 方法. *中国医药工业杂志*, 1993, 24(10):455-457.
- [10] BOAG JM, BEESLEY AH, FIRTH MJ, *et al.* Altered glucose metabolism in childhood pre-B acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 2006, 20(10):1731-1737.
- [11] RIVENZON-SEGAL D, RUSHKIN E, POLAK-CHARCON S, *et al.* Glucose transporters and transport kinetics in retinoic acid-differentiated T47D human breast cancer cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279(3):E508-E519.
- [12] GABY AR. Adverse effects of dietary fructose. *Altern Med Rev*, 2005, 10(4):294-306.
- [13] LIU H, HUANG D, MCARTHUR DL, *et al.* Fructose induces transketolase flux to promote pancreatic cancer growth. *Cancer Res*, 2010, 70(15):6368-6376.
- [14] KUMAMOTO R, UTO H, ODA K, *et al.* Dietary fructose enhances the incidence of precancerous hepatocytes induced by administration of diethylnitrosamine in rat. *Eur J Med*

Res, 2013, 8: 54 [2016-10-15]. <http://www.eurjmedres.com/content/18/1/54>. doi:10.1186/2047-783X-18-54.

- [15] AUNE D, CHAN DS, VIEIRA AR, *et al.* Dietary fructose, carbohydrates, glycemic indices and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol*, 2012, 23(10):2536-2546.
- [16] ZAMORA-LEON SP, GOLDE DW, CONCHA II, *et al.* Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(5):1847-1852.
- [17] SHU R, DAVID ES, FERRARIS RP. Luminal fructose modulates fructose transport and GLUT-5 expression in small intestine of weaning rats. *Am J Physiol*, 1998, 274(2 Pt 1):G232-G239.
- [18] CUI XL, SCHLESIER AM, FISHER EL, *et al.* Fructose-induced increases in neonatal rat intestinal fructose transport involve the PI3-kinase/Akt signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(6):G1310-G1320.
- [19] BURANT CF, SAXENA M. Rapid reversible substrate regulation of fructose transporter expression in rat small intestine and kidney. *Am J Physiol*, 1994, 267(1 Pt 1):G71-G79.

(2016-11-22 收稿, 2017-01-13 修回)

编辑 沈进

(上接第 388 页)

参 考 文 献

- [1] CLARK PE. The role of VHL in clear-cell renal cell carcinoma and its relation to targeted therapy. *Kidney Int*, 2009, 76(9):939-945.
- [2] RAY R, CHEN G, VANDE-VELDE C, *et al.* BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem*, 2000, 275(2):1439-1448.
- [3] ZHANG H, BOSCH-MARCE M, SHIMODA LA, *et al.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 2008, 283(16):10892-10903.
- [4] GUO K, SEARFOSS G, KROLIKOWSKI D, *et al.* Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene *BNIP3*. *Cell Death Differ*, 2001, 8(4):367-376.
- [5] 黄龙, 赵涛, 田义阳, 等. 肾透明细胞癌组织中 BNIP3 的表达及意义. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(3):396-399.
- [6] 曾浩, 黄颖, 陈锐, 等. 促凋亡线粒体蛋白 BNIP3 的表达调控与功能. *现代泌尿生殖肿瘤杂志*, 2010, 2(2):117-120.
- [7] ERKAN M, KLEEFF J, ESPOSITO I, *et al.* Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene*, 2005, 24(27):4421-4432.
- [8] GUNARATNAM L, MORLEY M, FRANOVIC A, *et al.* Hypoxia inducible factor activates the transforming growth

factor-alpha/epidermal growth factor receptor growth stimulatory pathway in VHL (-/-) renal cell carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2003, 278(45):44966-44974.

- [9] 罗琳, 熊子兵, 曾浩, 等. BNIP3 在肾透明细胞癌中的表达及其与 HIF-1 α 、VEGF 的相关性研究. *四川大学学报(医学版)*, 2012, 43(1):79-82.
- [10] 王海舟. 肾细胞癌 BNIP3 的表达及其表观遗传调控机制的初步研究. *四川:四川大学华西临床医学院*, 2016.
- [11] MURAI M, TOYOTA M, SUZUKI H, *et al.* Aberrant methylation and silencing of the *BNIP3* gene in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3):1021-1027.
- [12] BACON AL, FOX S, TURLEY H, *et al.* Selective silencing of the hypoxia-inducible factor 1 target gene *BNIP3* by histone deacetylation and methylation in colorectal cancer. *Oncogene*, 2007, 26(1):132-141.
- [13] PARK KC, HEO JH, JEON JY, *et al.* The novel histone deacetylase inhibitor, N-hydroxy-7-(2-naphthylthio) heptonamide, exhibits potent antitumor activity due to cytochrome-c-release-mediated apoptosis in renal cell carcinoma cells. *BMC Cancer*, 2015, 15:19 [2017-02-20]. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-014-1003-1>. doi:10.1186/s12885-014-1003-1.
- [14] 徐米清, 洪明, 谢辉, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂通过激活 p-JNK 信号通路诱导肾癌细胞凋亡. *南方医科大学学报*, 2013, 33(10):1409-1415.
- [15] SANTOS N, WENGER JB, HAVRE P, *et al.* Combination therapy for renal cell cancer: what are possible options? *Oncology*, 2011, 81(3/4):220-229.

(2016-11-17 收稿, 2017-02-14 修回)

编辑 吕熙