

RUNX3 调控胃癌细胞对赫赛汀耐药的非标记定量蛋白质组学研究

常晋霞¹, 王仕宝², 袁江北³, 刘文虎^{1*}

(1. 川北医学院基础医学院药学院, 四川 南充 637100; 2. 汉中职业技术学院药学院, 陕西 汉中 723000;
3. 北京大学深圳医院, 深圳北京大学-香港科技大学医学中心, 广东 深圳 518036)

摘要: 肿瘤耐药是多机制、多因子参与的复杂生物学过程, 而肿瘤细胞抗凋亡是导致其耐药的重要原因。前期研究显示, Runt 相关转录因子 3 (Runt-related transcription factor 3, RUNX3) 在胃癌赫赛汀耐药细胞中与 DNA 的结合活性显著增强, 然而其活性变化是否与耐药有关, 尚不明确。本实验以赫赛汀耐药细胞 (NCI N87R) 为对象, 采用 CRISPR/Cas9 构建 RUNX3 敲除细胞株 (Δ RUNX3/NCI N87R), 探究 RUNX3 在赫赛汀耐药中的作用及其潜在机制。在此基础上, 基于非标记定量蛋白质组学研究 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞蛋白质表达谱; 采用倍数变化及显著性水平筛选差异表达分子; 利用 GeneAnalytics 数据库通路富集分析; 使用 DAVID Bioinformatics Resources 数据库基因本体分析; 基于 STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作网络。结果表明, 敲除 RUNX3 使 NCI N87R 细胞对赫赛汀的敏感性增加。蛋白质组数据显示, 577 种基因在 Δ RUNX3/NCI N87R 中的表达显著改变, 其中上调 191 种、下调 386 种。根据通路富集率及显著性水平, 自噬、细胞周期、凋亡、线粒体脂肪酸 β 氧化、神经源性位点 notch 同源蛋白 1 (neurogenic locus notch homolog protein 1, NOTCH1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、Hedgehog 及 DNA 损伤响应信号变化显著 ($P < 0.05$), 表明敲除 RUNX3 干扰耐药细胞多条通路。免疫印迹证实, 自噬相关蛋白 (autophagy-related protein, ATG) 13、7 及 BECN1 在 Δ RUNX3/NCI N87R 中的表达显著增加, 而细胞周期调节分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Chk2 (serine/threonine-protein kinase Chk2, CHEK2) 及凋亡调节分子 Bcl-2 (apoptosis regulator Bcl-2, BCL2) 显著下调; 与 NCI N87R 细胞相比, 磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT (p-AKT) 在 Δ RUNX3/NCI N87R 中的表达显著降低 ($P < 0.01$), 且赫赛汀能够降低 p-AKT 水平, 表明敲除 RUNX3 改变了耐药细胞周期、增加赫赛汀对 p-AKT 的抑制作用, 促进其自噬并诱导凋亡, 提示 RUNX3 可能是逆转或降低胃癌赫赛汀耐药的潜在靶标。

关键词: Runt 相关转录因子 3; 赫赛汀; 耐药性; 非标记定量蛋白质组学; 自噬; 凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-1953-12

Label-free quantitative proteomic study of RUNX3 regulating Herceptin resistance in gastric cancer cells

CHANG Jin-xia¹, WANG Shi-bao², YUAN Jiang-bei³, LIU Wen-hu^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Department of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China; 2. Department of Pharmacy, Hanzhong Vocation and Technology College, Hanzhong 723000, China;
3. Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen Peking University-The Hong Kong University of Science and Technology Medical Center, Shenzhen 518036, China)

Abstract: Resistance of tumor cells is a complex biological process involving multiple mechanisms and factors, in which anti-apoptosis is the most important cause of drug resistance. Previous studies have shown that

收稿日期: 2021-03-16; 修回日期: 2021-03-29.

基金项目: 四川省应用基础科研项目 (2019YJ0378); 南充市市校合作项目 (18SXHZ0402, 19SXHZ0298); 川北医学院博士科研项目 (CBY17-QD05).

*通讯作者 Tel: 86-817-3352017, E-mail: wenhuliu@cqu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0376

the DNA binding activity of Runt related transcription factor 3 (RUNX3) increased prominently in Herceptin resistant gastric cancer cells (NCI N87R) while the relevance of which to drug resistance has not yet been confirmed. In this study, we employed CRISPR/Cas9 to establish RUNX3 knock-out cell line (Δ RUNX3/NCI N87R) to investigate the functions of RUNX3 in Herceptin resistance of NCI N87R cells and its potential mechanisms. We investigated proteomics profiling of Δ RUNX3/NCI N87R cells based on label free quantitative proteomics. Differentially expressed proteins were screened out according to fold change and significance level between Δ RUNX3/NCI N87R and NCI N87R cells. Pathway enrichment analysis was done using GeneAnalytics database, and gene ontology analysis was conducted by DAVID Bioinformatics Resources database. Protein-protein interaction networks were constructed based on STRING database. The results showed that Δ RUNX3/NCI N87R cells increased the sensitivity to Herceptin. Proteomic data demonstrated that the expression of 577 genes changed significantly in Δ RUNX3/NCI N87R cells, among which 191 genes were up-regulated while 386 ones down-regulated comparing with NCI N87R cells. Pathway analysis showed that autophagy, cell cycle, apoptosis, mitochondrial fatty acid β oxidation, neurogenic locus notch homolog protein 1 (NOTCH1), mammalian target of rapamycin (mTOR), Hedgehog and DNA damage response pathways exhibited notable changes based on pathway enrichment ratio and significance level ($P < 0.05$). These results indicated that RUNX3 knock-out altered multiple signaling pathways of NCI N87R cells. Western blotting manifested that the expression of autophagy regulatory molecules autophagy-related protein (ATG) 13, 7 and BECN1 increased remarkably while cell cycle molecules serine/threonine-protein kinase Chk2 (CHEK2) and apoptosis regulator Bcl-2 (BCL2) decreased prominently in Δ RUNX3/NCI N87R cells. The p-AKT expression decreased significantly in Δ RUNX3/NCI N87R cells compared with NCI N87R cells ($P < 0.01$) and was suppressed by Herceptin. These results indicated that RUNX3 knock-out altered cell cycle, increased inhibition to p-AKT by Herceptin, promoted autophagy and induced cell apoptosis of NCI N87R cells. These results suggested that RUNX3 may be a potential therapeutic target for reversing or reducing Herceptin resistance in gastric cancer cells.

Key words: Runt related transcription factor 3; Herceptin; resistance; label-free quantitative proteomics; autophagy; apoptosis

胃癌是全球死亡率最高的恶性肿瘤之一,多数患者确诊时已发展为进展期或晚期。靶向治疗、免疫治疗及多药联合化疗成为胃癌治疗的主要手段。人表皮生长因子受体2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER-2) 是由 *erbB2* 基因编码的致癌基因,其过表达与胃癌的发生及发展相关,且 HER-2 过表达与肿瘤耐药及不良预后关系密切^[1,2]。赫赛汀为靶向 HER-2 的免疫球蛋白 G1 型单克隆抗体药物,通过抑制 HER-2 信号转导及抗体依赖细胞介导的细胞毒作用发挥功能。尽管赫赛汀能延长胃癌进展期及提高患者生存期,然而肿瘤获得性耐药制约其在临床的有效治疗。因此,探究胃癌赫赛汀耐药机制,发现耐药靶标,对提高化疗有效性具有重要意义。

Runt 相关转录因子 3 (Runt related transcription factor 3, RUNX3) 属于 Runt 家族转录因子,具有保守的 Runt-DNA 结构域,在消化道上皮细胞及间叶细胞中广泛表达。研究显示, RUNX3 在上皮细胞增殖-凋亡平衡及信号转导过程中发挥重要作用,其缺失或异常表达与肿瘤发生、发展相关^[3-5]。RUNX3 具有广泛的生物学功能,作为抑癌基因,其功能失活与基因表观修饰改变、蛋白质错误定位有关^[5,6]; 作为致癌基因,

RUNX3 可激活 Myc 表达,引起癌细胞快速增殖并转移^[7]。

近年来, RUNX3 突变与肿瘤耐药备受关注,如 RUNX3 过表达可导致凋亡抑制因子 2 (apoptosis inhibitor 2, IAP2) 上调,诱导卵巢癌细胞对卡铂耐药^[8]; RUNX3 缺失可诱发多药耐药蛋白 (multidrug resistance proteins, MRP) 高表达,导致肝癌细胞对 5-氟尿嘧啶及顺铂耐药^[9]以及 RUNX3 缺失导致胰腺癌细胞对吉西他滨耐药^[10]。前期研究发现^[11],对赫赛汀耐药的胃癌细胞 NCI N87R 中, RUNX3 与 DNA 的结合活性显著增加,提示 RUNX3 可能与胃癌赫赛汀耐药有关,然而相关机制尚未阐明。本实验以 NCI N87R 为研究对象,基于 CRISPR/Cas9 构建 RUNX3 敲除细胞株 (Δ RUNX3/NCI N87R),基于非标记定量蛋白质组学研究 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞蛋白质表达谱的变化,结合生物信息学分析 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞信号通路的改变及 RUNX3 调控胃癌赫赛汀耐药的潜在机制。

材料与方法

主要仪器 LTQ Orbitrap Velos Pro 轨道阱质谱仪及 Easy-nLC 2000 nano 液相色谱仪、细胞培养箱 (美国

Thermo Fisher 公司); 2695 HPLC 液相色谱系统 (美国 Waters 公司); SP8 荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 化学发光成像系统 (Tanon 公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 多功能超声仪 (美国 Sonics 公司); 5810R 真空浓缩仪 (德国 Eppendorf 公司)。

细胞株及试剂 人源 NCI N87 细胞由国家蛋白质组研究中心提供; NCI N87R 及 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞由实验室自建。赫赛汀 (440 mg, S20060026, 罗氏制药); 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 美国 Gibco 公司); DMEM 培养基、胰酶 (美国 Mediatech 公司); 1% 青霉素-链霉素、抗兔/鼠二抗 (碧云天生物科技); 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT)、吲哚-3-乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、尿素、碳酸氢钠, 甲醇、乙醇、乙腈、甲酸、蛋白酶抑制剂 (美国 Thermo Fisher 公司); Bradford 蛋白浓度试剂盒 (北京康为生物有限公司); 一抗 RUNX3 (9647)、自噬相关蛋白 (autophagy-related protein, ATG) 13 (13468)、ATG7 (8558) 及丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Chk2 (serine/threonine-protein kinase Chk2, CHEK2, 6334) (美国 Cell Signaling Technology 公司); 凋亡调节分子 Bcl-2 (apoptosis regulator Bcl-2, BCL2, 7382)、BECN1 (48341)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT (271149)、磷酸化 AKT (p-AKT, 52940)、mitogen-activated protein kinase 3 (ERK1, 271291)、磷酸化 ERK1 (p-ERK1, 7383) 及 β -actin (376421) (美国 Santa Cruz 公司); Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司); BsmBI (美国 NEB 公司); T4 连接酶 (日本 TAKARA 公司); CCK-8 kit (日本同仁化学)。

细胞培养 NCI N87、NCI N87R 及 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞按常规方法培养于 DMEM 培养液 (10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素)。NCI N87R 在培养过程中按照文献方法^[12,13]加入赫赛汀, 药物终质量浓度为 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

向导 RNA (sgRNA) 寡核苷酸链合成及载体构建 依据 <http://www.e-crisp.org/E-CRISP> 设计 sgRNA RUNX3, 选取得分最高的两个核苷酸序列。核苷酸 1: 正向 5'-CACCGGCGCGCCCTCCGGGCCCA-3', 反向 5'-AAACTGGGGCCCGGAGGGCGCGCC-3'; 核苷酸 2: 正向 5'-CACCGCAAGATGGGCGAGAACAG-3', 反向 5'-AAACCTGTTCTCGCCATCTTGCC-3'。核苷酸序列由华大公司合成, 通过 T4 连接酶将其连入两个 BbsI 位点的 U6-sgRNA-SFFV-spCas9-puro 质粒中。

细胞转染及目标细胞株筛选 将 $2 \mu\text{g}$ Cas9、 $1 \mu\text{g}$ pMD 2.G 和 $1.5 \mu\text{g}$ psPAX2 混合质粒及 $15 \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000 混合, 加入 293T 细胞, 孵育 8 h 去除包含慢病毒质粒的培养基, 加入新鲜培养基, 培养

48 h, $10\ 000 \times\text{g}$ 离心 10 min, 收集包含病毒颗粒的上清液, 备用。将 NCI N87R 细胞按每毫升 1×10^5 个接种于六孔板, 培养至 70%~80% 更换培养液, 加入慢病毒感染, 48 h 后加入 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 嘌呤霉素培养细胞 72 h, 流式分选单细胞, 96 孔板培养, 免疫印迹 (Western blot) 验证。

细胞活力检测 对数期生长的 NCI N87、NCI N87R 和 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞分别接种于 96 孔板中, 细胞数约为 5 000 个/孔, 按文献方法^[14-16]检测细胞活力。

免疫荧光实验 对数期生长的 NCI N87、NCI N87R 和 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞分别用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 0.2% Triton X-100 透化 10 min; QuickBlockTM 封闭 2 h。一抗孵育过夜 (4 °C) (稀释倍数 1:300), 二抗孵育 1 h (稀释倍数 1:2 000); DAPI 染色 2~3 min, PBS 洗 3 次, 随机选取视野拍照。

Western blot 检测蛋白质的表达 收集对数期生长的 NCI N87R 和 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞, 提取蛋白, 依次进行变性、聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育过夜 (4 °C)、洗膜、孵育二抗 (常温)、洗膜、显影。一抗 ATG13、ATG7、CHEK2、BECN1、BCL2、AKT、ERK1、p-AKT、p-ERK1 及 β -actin 分别稀释 1 000 倍, 二抗稀释 3 000 倍; 使用 Image J 进行灰度值计算, GraphPad Prism 8.0 进行定量分析。

色谱及质谱

色谱条件 Easy-nLC 2000 纳升高效液相色谱系统 ($3 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$), 搭载反相 C18 分离柱 ($2 \text{ cm} \times 100 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$) 和 C18 分析柱 ($15 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$) 均购自美国 Thermo Fisher 公司。液相分离条件: 流动相 A 为水 (0.1% 甲酸, v/v), 流动相 B 为乙腈 (0.1% 甲酸, v/v), 梯度洗脱: 0~5 min, 0~5% B; 6~90 min, 6%~35% B; 91~110 min, 36%~98% B; 111~120 min, 2% B; 流速 $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

质谱及检测参数 LTQ rbtrap Velos Pro 型质谱仪, 纳升级电喷雾 (nano-ESI) 离子源, 电压为 2.5 kV, 离子传输毛细管温度 $300 \text{ }^\circ\text{C}$, Orbitrap 一级扫描质荷比 (m/z) 300~2 000, 一级扫描的分辨率为 30 000, 选取丰度最高的 Top 20 离子进行二级 (MS/MS) 分析, MS/MS 扫描分辨率为 7 500, 二级碎裂模式为碰撞诱导解离 (CID), 归一化碰撞能 (NCE) 为 35%, 活化 Q 值为 0.25; 活化时间为 30 ms; 排除同位素干扰峰, 动态排除时间为 40 s, 重复次数为 1, 重复持续时间为 30 s, 排除列表为 50, 排除离子时间为 180 s。

细胞蛋白质提取 收集细胞, 预冷 PBS 洗 2 次, 加入 $8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素 (1% 蛋白酶抑制剂), 充分震荡, 冰上裂解 10 min, 超声 2 min, $12\ 000 \times\text{g}$ 离心 15 min (4 °C),

取上清, Bradford法测定蛋白浓度。

还原烷基化及 FASP 酶切 还原烷基化及 FASP 酶切参照文献^[17]。100 μg 样品加入 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 56 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min, 加入 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA, 避光 30 min, 加入 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT, 避光 15 min, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清, 加入 10 kD 超滤管, 12 000 $\times g$ 离心 40 min, 加入 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 (300 μL), 12 000 $\times g$ 离心 3 次, 每次 40 min。加入 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 (50 μL) 和胰蛋白酶混合液 (5 μg), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 再加 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NH_4HCO_3 和胰蛋白酶 5 μg , 酶切至过夜, 离心, 收集肽段。

肽段预分离 肽段分离参照文献^[18]。采用 Waters 2695 HPLC 液相系统分离肽段, 流动相 A (水), 流动相 B (乙腈), 洗脱梯度为: 0~34 min, 0~98% B; 35~40 min, 98% B, 流速 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 收集洗脱液 (每分钟 1 管), 合并洗脱液: ① 1、6、11、16、21; ② 2、7、12、17、22; ③ 3、8、13、18、23; ④ 4、9、14、19、24; ⑤ 5、10、15、20、25; ⑥ 26~30; ⑦ 31~35; ⑧ 36~40, 将收集的混合组分减压浓缩, 质谱检测。

肽段检测、定量及差异表达蛋白筛选 肽段用 0.1% 甲酸复溶, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 取上清, 经 Easy-nLC 2000 nano 分离进入 LTQ Orbitrap Velos Pro 质谱仪, 采用 Proteome Discover 1.4 软件搜库, 数据库为 NCBI 人源蛋白质序列库。检索参数为: 母离子质量公差 20 ppm, 子离子 0.5 Da。蛋白质修饰为: 半胱氨酸甲酰基化为固定修饰, 蛋氨酸 *N*-乙酰化及氧化为动态修饰, 肽段水平错误发现率 (false discovery rate, FDR) 小于 1%。

基于数据依赖分析 (data dependence analysis, DDA) 采集数据, 按总面积进行归一化定量, 方法为每个蛋白峰面积除以样本中全部蛋白峰面积之和, 为便于计算, 将所有蛋白的相对峰面积扩大 10^5 倍。肽段筛选标准为: 每个蛋白质被检测到的特异性肽段数 ≥ 1 , Mascot ≥ 20 。采用差异倍数及 *t* 检验进行差异蛋白质筛选, 若某蛋白的定量值在两组样本中的均值之比 ≥ 2 或 ≤ 0.5 , 且 $P < 0.05$, 则认为该蛋白在两组样本中的表达具有显著差异。

统计学分析 数据用均值 \pm 标准误 (mean \pm SEM) 表示, *n* 表示样本量。使用 SPSS 26.0 进行统计学分析, 两组间均值比较用 *t* 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水平, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有显著统计学意义, $P < 0.001$ 表示差异具有极显著统计学意义。定量作图采用 GraphPad Prism 8.0 软件, 蛋白-蛋白网络图采用 Cytoscape (version 3.7.2) 软件, 生物信息学作图采用 RStudio (version 3.6.2)。

结果

1 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞株的构建

基于 CRISPR/Cas9 构建 RUNX3 敲除细胞株, 为防止基因编辑可能出现的脱靶效应, 设计能够靶向切割 RUNX3 的两条 sgRNA 序列。免疫印迹表明, 两条 sgRNA 均能发挥作用, 引导 Cas9 切除目标基因, 表明 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞株构建成功 (图 1A)。免疫荧光显示, NCI N87R 细胞由“不规则形”变为“卵圆形”, 生长状态由“弥散型”变为“抱团型”; 且 Δ RUNX3/NCI N87R 形态更接近于母本细胞 (图 1B), 提示敲除 RUNX3 导致 NCI N87R 细胞形态重塑。为探究赫赛汀对 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞的抑制作用, 采用 CCK-8 分别检测 Δ RUNX3/NCI N87R、NCI N87R 及 NCI N87 细胞在不同浓度赫赛汀作用下的细胞相对抑制率。结果显示, 赫赛汀对 3 种细胞的增殖抑制具有浓度依赖关系, 且抑制强度分别为: NCI N87 > Δ RUNX3/NCI N87R > NCI N87R。当药物的质量浓度达到 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, Δ RUNX3/NCI N87R 与 NCI N87R 的相对抑制率差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 当质量浓度大于 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 相对抑制率差异具有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。在实验条件下, 赫赛汀对 NCI N87、NCI N87R 及 Δ RUNX3/NCI N87R 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 134.2、651.8 和 328.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 1C), 提示敲除 RUNX3 增强了赫赛汀对耐药细胞的敏感性。蛋白质数据显示, RUNX3 在耐药细胞中被敲除, 证实 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞株构建成功 (图 1D)。

2 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞蛋白表达谱分析

为明确 RUNX3 敲除对耐药细胞表达谱的影响, 基于定量蛋白质组学分别检测了 NCI N87R 和 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞的蛋白质组, 采用生物信息学进行差异蛋白质筛选及通路分析。为保证肽段鉴定的可靠性及蛋白定量的准确性, 将肽段水平的卡值设定为“严格匹配”, 而蛋白水平的卡值设定为 $\text{FDR} < 1\%$ 。两组样本中共检测到蛋白 5 302 个, 且这些蛋白至少在 1 个样本中被鉴定。以此类推, 4 309 个蛋白至少在 2 个样本中被检测, 3 823 个蛋白至少在 3 个样本中被检测, 2 752 个蛋白在所有样本中被检测。根据经验, 将 3 个及以上样本中被检测到的蛋白 (3 823 个) 纳入生物信息学及统计学分析 (图 2A)。基于 Spearman 方法对各组数据进行相关性分析。结果显示, 样本组内相关系数均大于 0.95 (图 2B、C), 表明实验重复性良好。主成分分析 (principal composition analysis, PCA) 显示, NCI N87R 和 Δ RUNX3/NCI N87R 数据分别沿第 1 和第 2 主成分 (PC1 和 PC2) 方向分开, PC1 与 PC2 之和能够解释组间 65.5% 的变异, 且组内样本聚集良好, 而组间分离明显

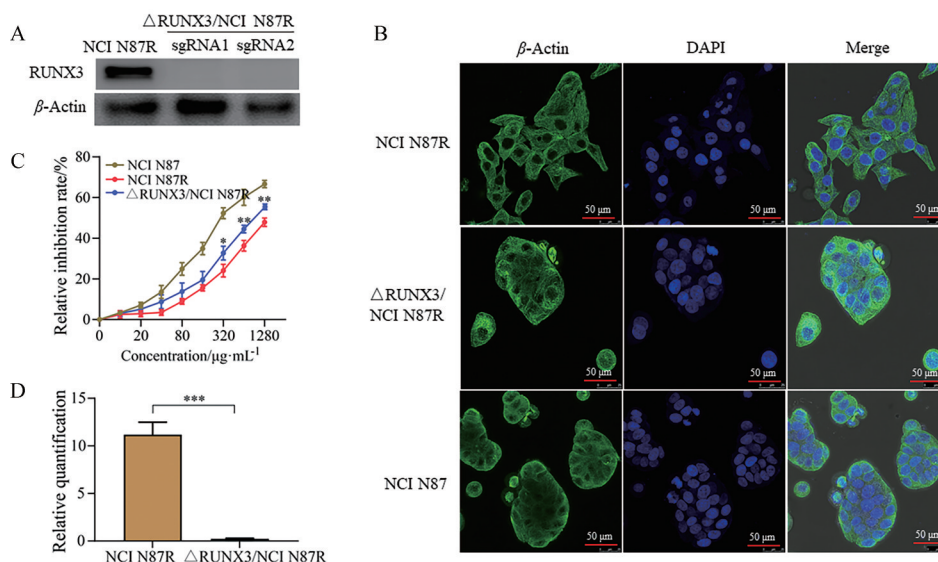


Figure 1 Establishment of Δ RUNX3/NCI N87R cell line. A: RUNX3 expression detected in NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cell lines by Western blot; B: The morphological comparison among NCI N87, NCI N87R, and Δ RUNX3/NCI N87R cells after immunofluorescence, respectively; C: Relative inhibition rate of NCI N87, NCI N87R, and Δ RUNX3/NCI N87R cells was detected by CCK-8 assays, respectively; D: RUNX3 in NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cell lines were quantified by mass spectrometry. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NCI N87R

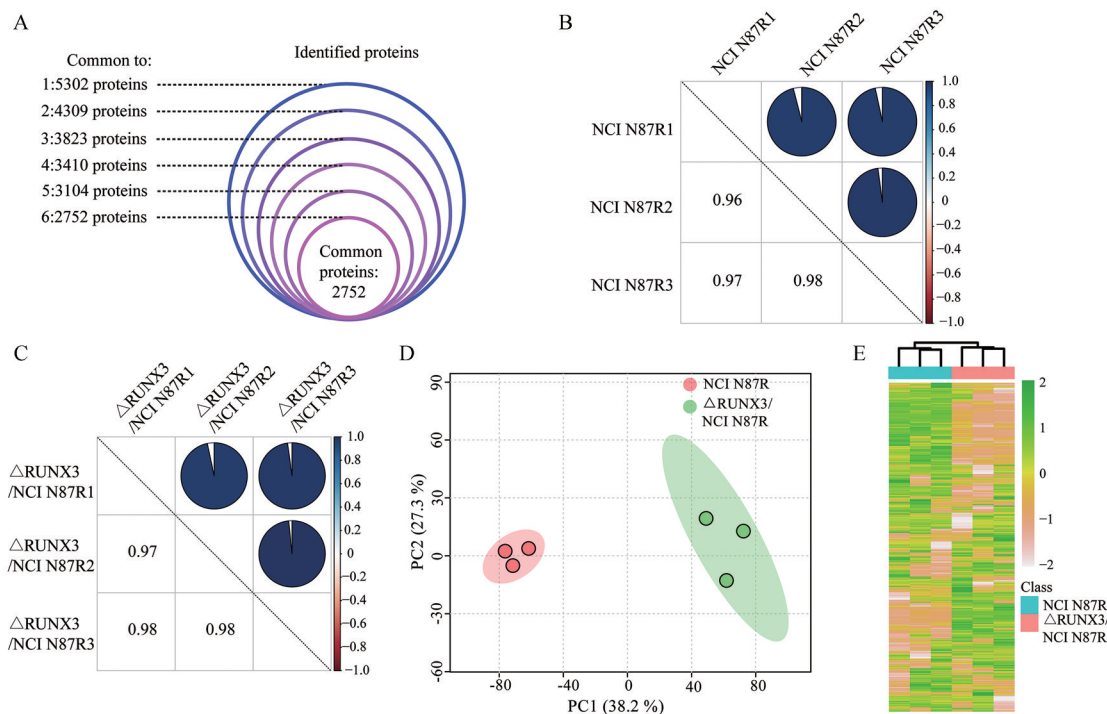


Figure 2 Proteomics profiling of NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cell lines. A: Proteins detected in different samples; B, C: Spearman's correlation coefficients analysis of NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cell samples. The lower-left half shows pairwise Spearman correlation coefficients of three biological repeats, the upper-right half shows pairwise pie plots; D: Principal component scores of NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cells, respectively; E: Clustering analysis of proteome of NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cells

(图 2D)。聚类分析证实, NCI N87R 和 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞的表达谱差异明显 (图 2E), 提示敲除 RUNX3 对 NCI N87R 细胞的蛋白质谱产生影响。

3 差异蛋白的筛选及分析

首先, 对样本中所有变量过滤 (将缺失值超过 50% 的蛋白以及角蛋白剔除)。随后, 基于 K-Nearest

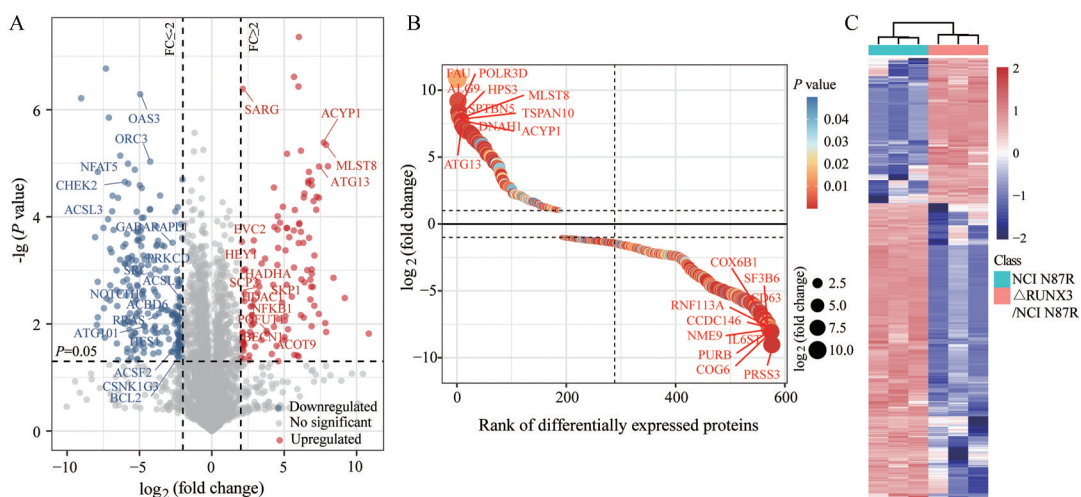


Figure 3 Identification and analysis of differentially expressed proteins. A: Differentially expressed proteins shown by volcano plot; B: Rank of differentially expressed proteins; C: Heat map of differentially expressed proteins

Neighbors (KNN, $K = 10$) 方法对剩余缺失值填补, 并对每个变量按总面积归一化。差异表达蛋白的筛选原则为: 若某蛋白在 3 次生物学重复数据中的均值在两组中的比值 ≥ 2 或 ≤ 0.5 ($FC \geq 2$), 且 $P < 0.05$, 则认为该蛋白在两组中的表达具有差异。火山图中上调蛋白被标注为红色, 下调蛋白被标注为蓝色, 除此以外的蛋白认为在两组中的表达无显著变化, 标注为灰色 (图 3A)。结果显示, 共有 577 种基因在 Δ RUNX3/NCI N87R 中的表达发生了显著改变, 其中上调 191 种, 下调 386 种, 未显著变化 3 246 种。进一步对差异表达基因按倍数变化排序, 发现上调倍数最大的分子分别为 MLST8、DNAH1 及 ATG13 等; 而下调倍数最大的分子分别为 PRSS3、COG6 及 CD63 等 (图 3B)。聚类分析显示, 与 NCI N87R 相比, Δ RUNX3/NCI N87R 细胞中多数分子显著下调 (图 3C), 提示敲除 RUNX3 对 NCI N87R 细胞具有潜在的抑制作用。

4 差异表达蛋白基因本体分析

通过 DAVID Bioinformatics Resources 6.8 数据库对差异表达蛋白从生物学过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 进行基因本体分析 (图 4A~F)。富集参数设置如下: 物种为 Homo sapiens, 富集最大层级为 4, 矫正后的阈值为 0.05, 显示数目为 TOP20, 基因背景为人类基因组。结果显示, 在生物学过程方面, 上调分子主要与调控细胞分裂、rRNA 处理、细胞周期调控及自噬有关; 而下调分子主要与 mRNA 剪接、有丝分裂核膜解体、调控内质网功能及细胞黏附有关。分子功能方面, 上调分子在蛋白、脂质及 RNA 连接方面发挥作用; 而下调分子在细胞-细胞黏附、激酶

活性及蛋白复合物链接方面具有作用。就细胞成分而言, 上调分子主要定位在胞浆、核质、细胞质等区域; 而下调分子主要定位于胞外分泌体、细胞核外围、线粒体外膜及细胞连接区域。

5 通路富集及定量分析

基于 GeneAnalytics 数据库对差异表达蛋白进行通路富集分析。根据显著性水平 (P) 及富集率 (enrichment ratio, ER), 采用气泡图对变化最显著的前 18 条通路进行可视化展示 (图 5A)。结果显示, 细胞周期 ($P = 3.28 \times 10^{-4}$, ER = 5.62)、NOTCH1 ($P = 3.24 \times 10^{-3}$, ER = 5.24)、自噬 ($P = 2.75 \times 10^{-4}$, ER = 6.32)、线粒体脂肪酸 β 氧化 ($P = 2.17 \times 10^{-3}$, ER = 6.93) 及凋亡通路 ($P = 6.11 \times 10^{-3}$, ER = 3.27) 在富集的所有通路中变化最显著; ATM ($P = 7.51 \times 10^{-3}$, ER = 3.37)、VEGFA-VEGFR2 ($P = 3.59 \times 10^{-3}$, ER = 1.75) 及铁死亡 ($P = 8.78 \times 10^{-3}$, ER = 3.87) 富集率相对较低; 而血管生成 ($P = 0.073 \times 10^{-3}$, ER = 1.72)、DNA 损失及细胞反应 ($P = 0.089$, ER = 1.91) 通路的显著性水平及富集率较低。从通路相关蛋白定量结果看, 在自噬通路中, 除了 RRAS、GABARAPL1、PRKCD 及 ATG101 表达下调外, 其他分子包括 ATG13、ATG7、BECN1、AKT1S1、MLST8、RRAGB、SH3GLB1 及 PIK3C3 在 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞中均显著上调 ($P < 0.001$, $P < 0.01$) (图 5B), 表明敲除 RUNX3 促进 NCI N87R 细胞自噬。在细胞周期通路中, 上调分子有 SKP1、HDAC1、CDC26、CDKN2C、ESPL1、STAG2、ANAPC1/5/10、CDK6、CDK2、CDK9、CDK13 及 CDKN2A ($P < 0.001$, $P < 0.01$); 而下调分子有 CDC25C、CHEK2、ORC3 及 CDK5RAP3 (图 5C)。在凋亡信号中, 抗凋亡分子 BCL2、BCL2L12 及 BIRC5/6 表达下调, 促凋亡分子 BCL2L13

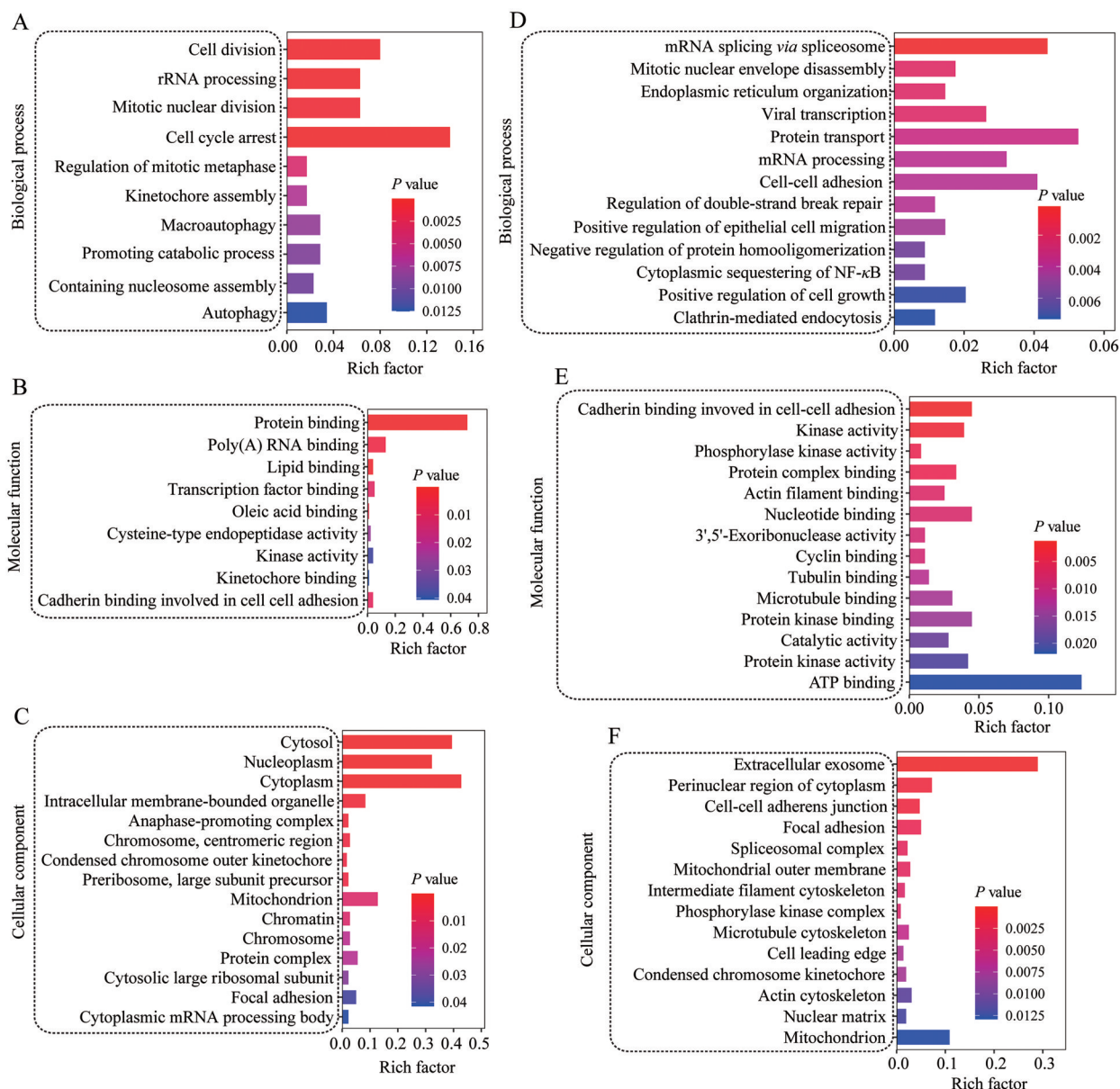


Figure 4 Gene ontology enrichment analysis of differential proteins. Analysis of upregulated (A–C) and downregulated (D–F) proteins involved in cell component, molecular function, and biological process

表达上调 (图 5D), 提示敲除 RUNX3 导致 NCI N87R 细胞的促凋亡能力增强、而抗凋亡能力降低; 线粒体脂肪酸 β 氧化信号中, ACOT9、HADHA、MCAT 及 SCP2 表达上调, 而 ACSM3、ACADVL、ACBD6、ACSL4/3 及 ACSF2 表达下调 (图 5E), 表明 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞线粒体功能异常。此外, NOTCH1、mTOR、Hedgehog 通路及 DNA 损伤分子在 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞中也显著改变 (图 5F~I), 且部分分子同时参与多条通路的信号调控, 如 MLST8、AKT1S1 和 RRA8 既是自噬调控分子, 又是 mTOR 通路核心分子; 而 CHEK2 在细胞周期及 DNA 损伤信号中具有重要作用, 也是 DNA 修复激活、DNA 双链断裂引起凋亡所需激酶。综上所述, RUNX3

对胃癌赫赛汀耐药具有重要作用, 敲除 RUNX3 导致耐药细胞多条通路异常, 提示这些通路异常可能是改变其耐药的重要机制, 也可能是逆转或降低耐药的潜在治疗靶标。

6 差异表达蛋白质网络互作分析

基于 STRING (version 11.0) 数据库对差异表达蛋白进行蛋白-蛋白网络分析, 网络构建参数设置为: 类型为全局 STRING 网络、最低互作得分为 0.7、聚类形式为马尔科夫算法 (inflation 参数 ≥ 3)。由网络可知, 功能相似的分子在网络中具有密切的互作关系, 且各分子依据不同的生物学功能组成独立的子网络, 实线相连的分子间具有较高的互作得分和相似的生物学功

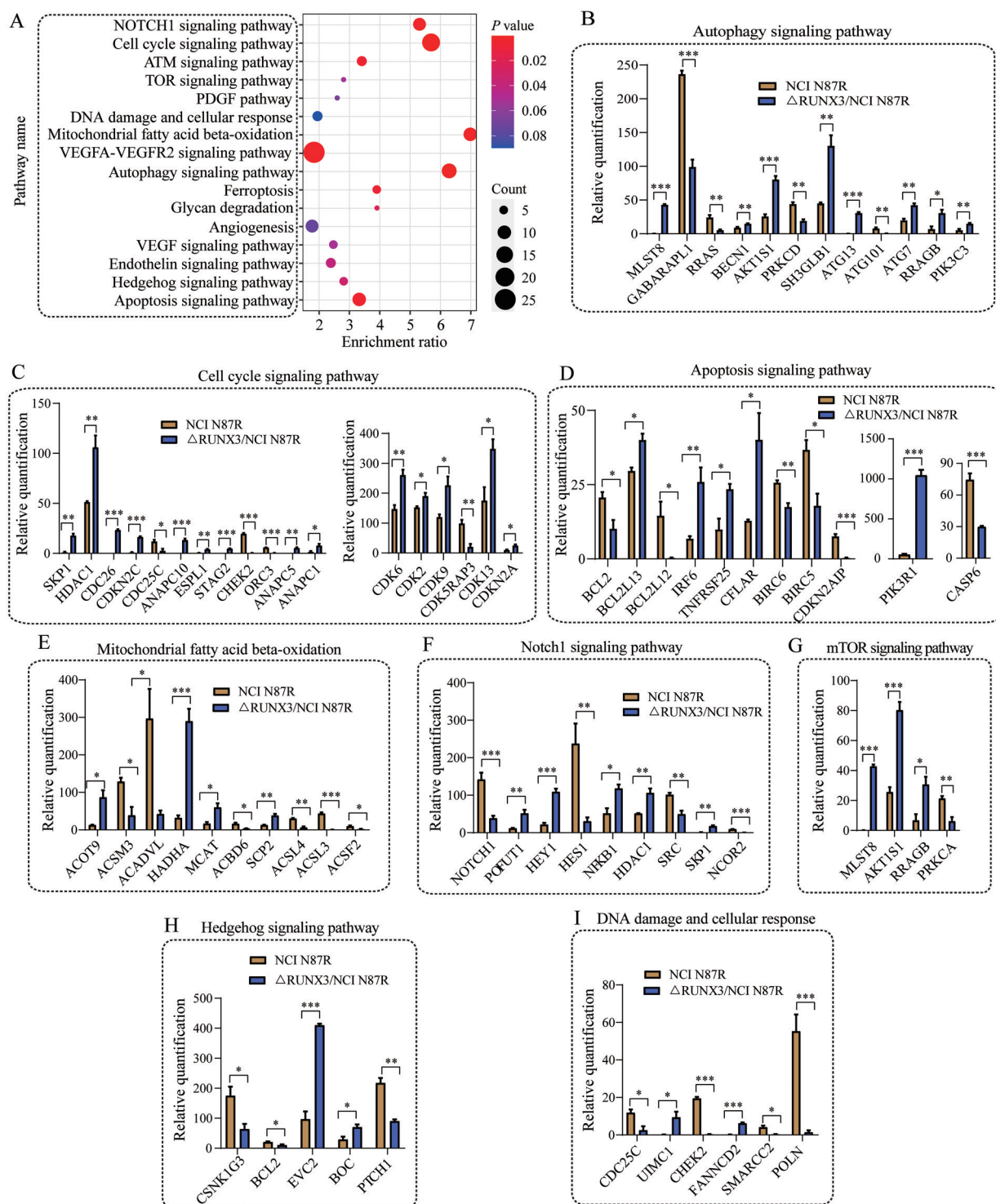


Figure 5 Enrichment analysis of signaling pathways of differentially expressed proteins. A: Bubble plot visualization of signaling pathways; B-I: Quantitative analysis of proteins in activated signaling pathways. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

能, 虚线相连的分子归属于不同的子网络, 节点蛋白为各子网络间的连接枢纽分子。结果显示, Δ RUNX3/NCI N87R 细胞中上调分子构成的网络主要包含 4 个子网络 (图 6A), 其中子网络 1 拥有最多的分子, 分析其功能, 它们在细胞周期调控 (CDK26、CKS1B、SKP1)、细胞凋亡 (NFKB1、NKKB2、PSMA2)、自噬 (ATG7)、蛋

白质泛素化修饰及分裂 (ANAPC1/5/10、TRIM41)、细胞骨架重构及组装 (LIMD1) 中发挥重要作用; 而子网络 2 相关分子 (RRP1、BYSL、DDX27、WDR3、LTV1、RIOK2、NIP7) 在 rRNA 加工处理、DNA 损伤响应、细胞凋亡及衰老 (RSL1D1、SRFBP1) 中具有重要作用; 子网络 3 分子在细胞有丝分裂、细胞周期、细胞信号交

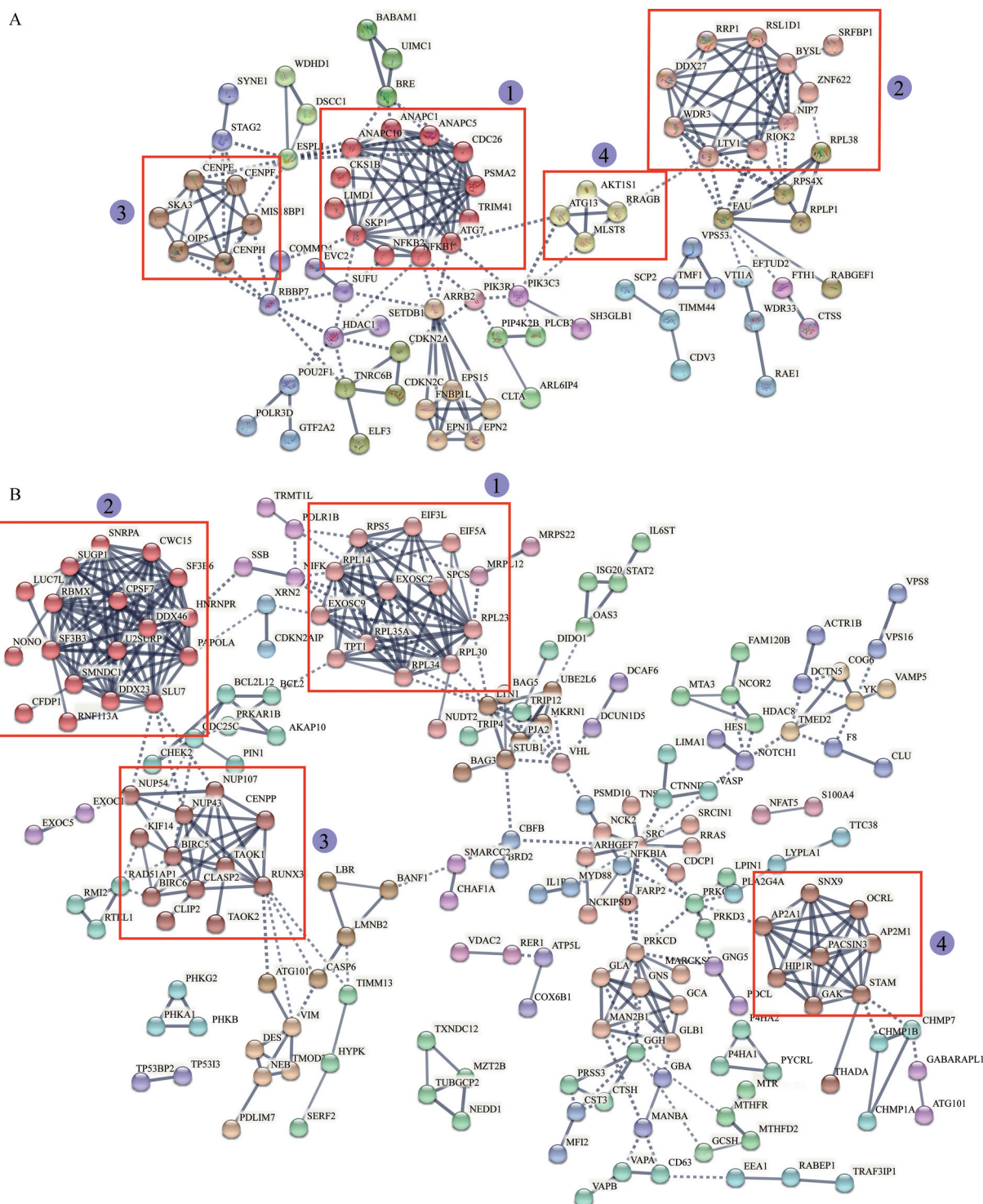


Figure 6 Protein-protein interaction network plot of up- (A) and down- (B) regulated proteins in Δ RUNX3/NCI N87R cells

流、细胞免疫、蛋白转运 (CENPE、CENPF、CENPH、SKA3、OIP5、MIS18BP1) 中至关重要。值得注意的是, 子网络4所有分子 (ATG13、AKT1S1、RRAGB、MLST8) 在细胞大自噬及线粒体自噬过程中具有重要作用, 且 AKT1S1、MLST8 及 RRAGB 是 mTOR 通路中关键信号分子, 它们在细胞能量感知、外界刺激响应及细胞形

态调控中起重要作用。相应地, 表达下调分子的互作网络主要包含4个子网络 (图6B), 其中子网络1含多个 RPL 家族成员 (RPL14/5/35A/34/30/23), 作为核糖体的重要组成部分, 它们在蛋白质的合成、基因表达、肽链延伸、rRNA 加工及蛋白泛素化调控过程中发挥重要作用; 作为线粒体核糖体蛋白, MRPL12 和 MRPS22 与线

粒体RNA聚合酶结合并激活其转录,在线粒体翻译起始、延伸及终止过程具有重要作用;子网络2包括多个与mRNA剪接相关的分子(SNRPA、CWC15、SUGP1、RBMX、NONO、SUL7、DDX23),它们在RNA加工、DNA修复及重组方面发挥重要作用;子网络3拥有的分子具有多功能特点,在蛋白磷酸化、DNA修复响应、信号通路活化(TAOK1/2、RUNX3)、细胞增殖、凋亡及分化(BIRC5/6、CLASP2、RUNX3)中至关重要;而子网络4分子在细胞分裂、内吞、蛋白质转运和脂质代谢过程中具有重要功能。值得注意的是,RUNX3不仅是构成子网络3的成员分子,而且作为枢纽分子与CASP6、ATG101、VIM及TIMM13相互作用。众所周知,CASP6与细胞凋亡、上皮细胞分化相关;ATG101作为自噬体形成的必需因子,对ATG13起稳定作用,保护其免受蛋白酶降解;VIM参与caspase调控的细胞骨架蛋白的切割;而TIMM13作为线粒体膜间伴侣分子、对线粒体蛋白的转运起重要作用。综上所述,差异表达分子网络从不同角度诠释了RUNX3调控分子互作的内在关系,为了解RUNX3调控胃癌赫赛汀耐药提供了广阔的洞察视角。

7 免疫印迹检测相关蛋白质的表达

采用免疫印迹分别检测了NCI N87R和 Δ RUNX3/NCI N87R细胞中ATG13、ATG7、BECN1、CHEK2、BCL2及HER-2下游分子p-AKT和p-ERK1的水平。结果显示,与NCI N87R相比,ATG13、ATG7及BECN1在 Δ RUNX3/NCI N87R中表达增加,而CHEK2和BCL2

的表达降低(图7A、B),提示敲除RUNX3改变NCI N87R细胞周期,促进其自噬。此外,敲除RUNX3导致耐药细胞p-AKT表达降低($P < 0.01$),且在实验条件下,赫赛汀对p-AKT的抑制作用具有依赖性。与NCI N87R相比,p-ERK1在 Δ RUNX3/NCI N87R中的表达无显著变化($P = 0.8$),当赫赛汀浓度达到 $320 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,其抑制作用具有统计学意义($P = 0.03$)(图7C、D),提示敲除RUNX3增强赫赛汀对耐药细胞敏感性可能与抑制p-AKT的表达有关。

讨论

自噬是真核细胞自我降解的生物学行为,也是独立于caspase依赖的细胞程序性死亡方式,在细胞代谢应激、维护基因组完整性及内稳态中具有重要作用^[19-22]。癌细胞凋亡耐受是导致其化疗失败的重要因素,也是诱发肿瘤耐药的重要机制^[23]。肿瘤细胞可通过增强自噬降低化疗药物的作用,然而,由于过度自噬导致的自噬性死亡也是耐药细胞的重要死亡途径^[24]。因此,自噬在肿瘤细胞耐药过程中具有双重作用,这为逆转或降低肿瘤耐药提供了一种新的治疗途径。

作为自噬体形成枢纽分子,ATG13直接与ATG1和ATG17连接,通过介导ATG1与ATG17-ATG29-ATG31复合物作用调控大自噬和线粒体自噬过程^[25]。ATG7为类泛素修饰剂激活酶,通过激活ATG12与ATG5以及ATG8家族蛋白与磷脂酰乙醇胺结合,参与调控caspase-8诱导的自噬性死亡^[26];ATG7还可通过调控

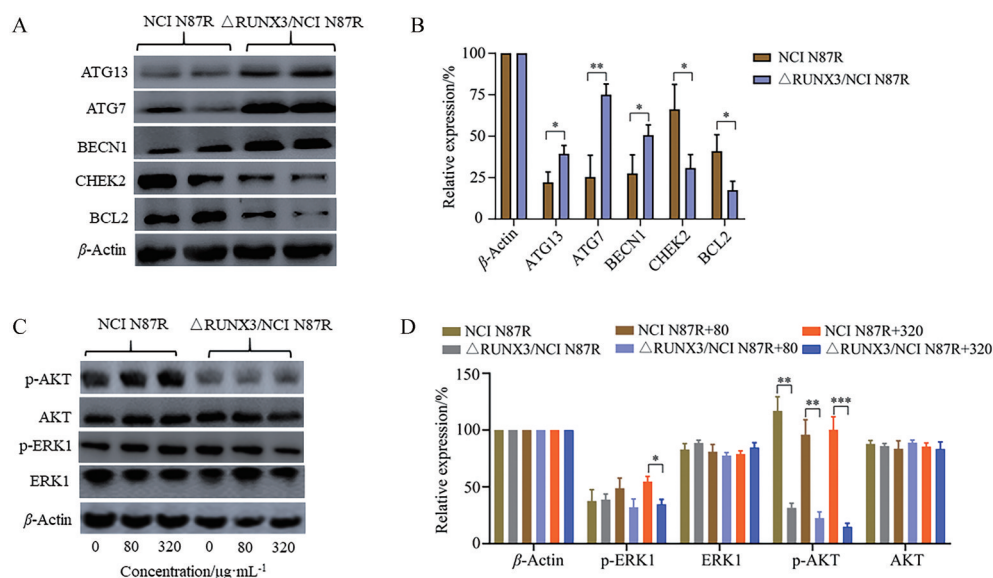


Figure 7 Expression of some proteins detected by Western blot. A, C: The expression of ATG13, ATG7, BECN1, CHEK2, BCL2, ERK1, p-ERK1, AKT, and p-AKT in NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cells by Western blot; B, D: Quantitative analysis of ATG13, ATG7, BECN1, CHEK2, BCL2, ERK1, p-ERK1, AKT, and p-AKT in NCI N87R and Δ RUNX3/NCI N87R cells. $n = 3$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

线粒体自噬,影响线粒体 ROS 水平,参与线粒体启动的内源性凋亡^[27]。而 ATG101 对维持 ATG13 的稳定性起重要作用,有效保护 ATG13 不被蛋白酶体降解而失活^[28]。作为自噬启动分子,ULK1 的磷酸化水平受 ATG13 的调节,当 ATG13 表达改变,ULK1 的磷酸化状态随之变化,诱发自噬启动^[29]。蛋白质组数据表明, Δ RUNX3/NCI N87R 细胞中自噬因子 ATG13、ATG7 及 ATG101 的表达显著改变,其中 ATG13 和 ATG7 上调,而 ATG101 下调,提示敲除 RUNX3 促进 NCI N87R 细胞自噬。此外,作为细胞增殖、凋亡及自噬的核心分子,mTOR 通路受到多条信号的调节,也是连接细胞自噬多条通路的枢纽中心,通过调控 ATG13 与 ULK1 的磷酸化水平及 ATG13-ULK1-RB1CC1 复合体来调节自噬。结果显示,mTOR 通路分子 AKT1S1、MLST8 及 RRAGB 均显著上调,而 PPKCA 显著下调,提示 mTOR 信号在 RUNX3 介导的细胞自噬中发挥作用。

作为自噬的特异性基因,BECN1 可结合 PI3K 形成复合物(PI3KC3-C1 和 PI3KC3-C2),以调节其他 ATG 基因在自噬中的定位,进而调节自噬的活性,且 PI3KC3-C1 参与自噬体的启动过程,而 PI3KC3-C2 参与自噬体的成熟和内吞作用^[30]。也有研究显示,BECN1 还可通过影响自噬活性,在肿瘤发生、发展及耐药过程中发挥作用,且通过与 BCL2 结合同时参与自噬和凋亡两种程序性死亡过程,成为连接细胞程序性死亡的交点^[31]。结果显示,BECN1 及 BCL2 在 Δ RUNX3/NCI N87R 中表达显著改变,前者上调,后者下调,提示 RUNX3 引起的耐药细胞自噬性凋亡可能与 BECN1 与 BCL2 之间的失衡有关。

另一方面,细胞凋亡分子在 Δ RUNX3/NCI N87R 中的表达显著改变,如与内源性凋亡相关的分子,包括 BCL2、BCL2L12、BIRC5 和 BIRC6 表达显著下调,而 BCL2L13 显著上调,前者具有抗凋亡作用,后者具有促凋亡作用;与内质网应激及外源性凋亡相关分子(PIK3R1)显著上调;通过 DNA 损伤调控细胞凋亡及老化的分子(CDKN2AIP)显著下调;通过影响半胱氨酸内肽酶活性诱导凋亡的分子既有上调(CFLAR),也有下调(CASP6);此外,TNFRSF25 表达显著上调,其直接与适配器 TRADD 作用,介导 NF- κ B 激活并诱导细胞凋亡,这些分子与多种凋亡途径有关,提示敲除 RUNX3 诱导 NCI N87R 细胞凋亡可能涉及多种凋亡机制,这可能是敲除 RUNX3 导致耐药细胞对赫赛汀增敏的重要机制。

众所周知,线粒体是细胞生命活动的重要场所,不仅对维持细胞稳态至关重要,而且是细胞能量交换所在地。应激状态时,线粒体脂肪酸 β 氧化是细胞代谢

所需能量的主要来源,而相关酶的表达或活性的改变是脂肪酸 β 氧化异常的主要原因,也是引起线粒体功能障碍的重要因素。蛋白质组数据显示,与线粒体脂肪酸合成、转运及代谢相关的多个分子在 Δ RUNX3/NCI N87R 中变化,其中 ACOT9 在调节线粒体酰基辅酶 A、游离脂肪酸和辅酶 A 的平衡中具有重要作用;HADHA 是线粒体三功能酶,能够催化单心磷脂酰化转化为心磷脂,后者为线粒体膜磷脂的主要成分,且在细胞凋亡中起关键作用;MCAT 与线粒体脂肪酸合成有关;而 SCP2 在支链脂肪酸的过氧化物酶体氧化中起作用,这些分子在 Δ RUNX3/NCI N87R 中显著上调。相应地,ACSM3、ACADVL、ACBD6、ACSL4/3 及 ACSF2 在 Δ RUNX3/NCI N87R 中显著下调,它们在线粒体酰基辅酶 A 的合成、转运及脂肪酸代谢中发挥重要作用。以上分子表达改变可能是导致线粒体功能异常的重要原因,进而引起线粒体代谢紊乱,促进线粒体自噬,并诱导细胞凋亡。

此外,与细胞周期、DNA 损伤响应相关分子在 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞中显著改变,这些分子在细胞周期调控、细胞代谢和细胞监控过程中具有重要作用。如 CHEK2 是 DNA 修复异常、DNA 双链断裂时诱导细胞凋亡的关键激酶,也是 DNA 损伤检控核心分子,在响应 DNA 损伤凋亡信号中至关重要;ORC3 是启动 DNA 复制所必需的复合体;CDC25C 在细胞 DNA 损伤响应、p53 信号转导引起细胞周期阻滞中发挥作用;而 CDK5RAP3 在细胞凋亡核膜破裂阶段起重要作用。这些分子在 Δ RUNX3/NCI 87R 中表达下调,提示敲除 RUNX3 导致耐药细胞周期异常、DNA 修复及监控失调。

NOTCH 为高度保守的跨膜蛋白,与细胞发育、分化及凋亡有关。文献报道^[32],IL-6/STAT3/Jagged-1/NOTCH 环路激活是胃癌赫赛汀耐药的重要机制,且 NOTCH 活化可上调 IL-6 表达,后者诱导肿瘤细胞表型转换。不同于文献报道,本研究数据表明,NOTCH1 在 Δ RUNX3/NCI N87R 细胞表达下调,推测敲除 RUNX3 可能对 NOTCH1 信号起抑制作用,而且 NOTCH 的靶基因 HES1 与 HEY1 表达趋势相反,其机制待进一步探究。

作者贡献: 刘文虎负责实验设计指导、实验操作、文章撰写及修改;常晋霞负责文献调研、参与文章撰写及数据分析;袁江北负责数据采集;王仕宝负责文献调研。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

References

- [1] Mitani S, Kawakami H. Emerging targeted therapies for HER2

- positive gastric cancer that can overcome trastuzumab resistance [J]. *Cancers*, 2020, 12: 400.
- [2] Sampera A, Sánchez-Martín FJ, Arpi O, et al. HER-family ligands promote acquired resistance to trastuzumab in gastric cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18: 2135-2145.
- [3] Liu Z, Zhang X, Xu X, et al. RUNX3 inhibits survivin expression and induces cell apoptosis in gastric cancer [J]. *Eur J Cell Biol*, 2014, 93: 118-126.
- [4] Tong D, Jiang Y, Li M, et al. RUNX3 inhibits cell proliferation and induces apoptosis by TGF-beta-dependent and -independent mechanisms in human colon carcinoma cells [J]. *Pathobiology*, 2009, 76: 163-169.
- [5] Whittle MC, Hingorani SR. RUNX3 and cell fate decisions in pancreas cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 962: 333-352.
- [6] Han Y, Liang D. The role of the tumor suppressor RUNX3 in giant cell tumor of the bone [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40: 673-678.
- [7] Selvarajan V, Osato M, Nah GSS, et al. RUNX3 is oncogenic in natural killer/T-cell lymphoma and is transcriptionally regulated by MYC [J]. *Leukemia*, 2017, 31: 2219-2227.
- [8] Barghout SH, Zepeda N, Vincent K, et al. RUNX3 contributes to carboplatin resistance in epithelial ovarian cancer cells [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 138: 647-655.
- [9] Kataoka J, Shiraha H, Horiguchi S, et al. Loss of Runt-related transcription factor 3 induces resistance to 5-fluorouracil and cisplatin in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35: 2576-2582.
- [10] Horiguchi S, Shiraha H, Nagahara T, et al. Loss of RUNT-related transcription factor 3 induces gemcitabine resistance in pancreatic cancer [J]. *Mol Oncol*, 2013, 7: 840-849.
- [11] Chang JX, Wang Y, Zhang F, et al. Proteomic study of transcription factors in trastuzumab-resistant gastric cancer based on liquid chromatography-mass spectrometry technique [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2019, 47: 1035-1044.
- [12] Liu W, Yuan J, Liu Z, et al. Label-free quantitative proteomics combined with biological validation reveals activation of Wnt/ β -catenin pathway contributing to trastuzumab resistance in gastric cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 1981.
- [13] Chang J, Wang Q, Bhetuwal A, et al. Metabolic pathways underlying GATA6 regulating trastuzumab resistance in gastric cancer cells based on untargeted metabolomics [J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17: 3146-3164.
- [14] Liu WH, Yuan JB, Chang JX. Label-free quantitative proteomics for investigation of signaling pathways of GATA6 regulating trastuzumab resistance in gastric cancer cells [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2020, 48: 187-196.
- [15] Liu WH, Wang Y, Li SM, et al. Label-free quantitative proteomic analysis of acquired Herceptin resistance in gastric cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 553-560.
- [16] Liu WH, Yuan JB, Yang L, et al. Mechanisms of curcumin to reverse Herceptin resistance in gastric cancer cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1818-1824.
- [17] Wi-Niewski JR, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis [J]. *Nat Methods*, 2009, 6: 359-362.
- [18] Fu Q, Yuan J, Wang L, et al. Proteomic analysis of murine macrophages mitochondria and lysosomes reveal cathepsin D as a potential broad-spectrum antimicrobial protein [J]. *J Proteomics*, 2020, 223: 103821.
- [19] Yu L, Chen Y, Tooze SA. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms [J]. *Autophagy*, 2018, 14: 207-215.
- [20] Denton D, Kumar S. Autophagy-dependent cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26: 605-616.
- [21] Yang WZ, Tu J, Liu N, et al. Advances in signal regulation and detection strategies for autophagy in fungal cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1431-1438.
- [22] Tan CY, Tian HZ, Kuang H, et al. Medications regulate autophagy for treatment of Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 984-990.
- [23] Ng CP, Bonavida B. A new challenge for successful immunotherapy by tumors that are resistant to apoptosis: two complementary signals to overcome cross-resistance [J]. *Adv Cancer Res*, 2002, 85: 145-174.
- [24] Chen P, Huang H, Wang Y, et al. Curcumin overcome primary gefitinib resistance in non-small-cell lung cancer cells through inducing autophagy-related cell death [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 254.
- [25] Li W, Zhang L. Regulation of ATG and autophagy initiation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 41-65.
- [26] Yu L, Alva A, Su H, et al. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 [J]. *Science*, 2004, 304: 1500-1502.
- [27] Yu L, Wan F, Dutta S, et al. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 4952-4957.
- [28] Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, et al. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13 [J]. *Autophagy*, 2009, 5: 973-979.
- [29] Li Z, Tian X, Ji X, et al. ULK1-ATG13 and their mitotic phosphorylation by CDK1 connect autophagy to cell cycle [J]. *PLoS Biol*, 2020, 18: e3000288.
- [30] Wang L, Ma H, Huang P, et al. Down-regulation of beclin1 promotes direct cardiac reprogramming [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12: 7856.
- [31] Lian J, Karnak D, Xu L. The Bcl-2-beclin 1 interaction in (-)-gossypol-induced autophagy *versus* apoptosis in prostate cancer cells [J]. *Autophagy*, 2010, 6: 1201-1203.
- [32] Yang Z, Guo L, Liu D, et al. Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of IL-6/STAT3/Jagged-1/Notch positive feedback loop [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 5072-5087.