

Cdc37调控细胞自噬参与骨髓瘤细胞对硼替佐米耐药的研究

刘兰婷¹ 邓书会¹ 藏美蓉² 张金巧² 邱录贵¹

¹中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所),实验血液学国家重点实验室,国家血液系统疾病临床医学研究中心,天津 300020; ²河北医科大学第三医院血液科,石家庄 050000

通信作者:藏美蓉,Email:pumc_zangmeirong@163.com

【摘要】 目的 探索细胞分裂周期蛋白37(Cdc37)通过调控细胞自噬参与多发性骨髓瘤(MM)对硼替佐米(BTZ)耐药的机制,为MM的治疗提供新的思路。方法 应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blot(WB)技术测定BTZ耐药细胞株ANBL-6.BR中Cdc37及自噬相关基因LC3b的表达水平。采用慢病毒转染技术上调ANBL-6.BR细胞中Cdc37的表达水平,WB技术检测LC3b的表达,流式细胞术检测BTZ诱导的细胞凋亡。采用shRNA干扰技术下调MM细胞株NCI-H929中Cdc37的表达水平,CCK-8法进一步验证Cdc37低表达与BTZ耐药相关,WB技术检测AKT/mTOR信号通路及自噬相关蛋白的表达变化;通过流式细胞术检测自噬抑制剂氯喹(CQ)是否可以增加耐药MM细胞对BTZ的敏感性。结果 Cdc37在BTZ耐药细胞株ANBL-6.BR中低表达,而自噬相关基因LC3b在耐药株中高表达。上调ANBL-6.BR细胞中Cdc37的表达水平可抑制LC3b的表达,且增加了MM细胞对BTZ的敏感性。在MM细胞系NCI-H929中抑制Cdc37的表达导致BTZ耐药,同时引起自噬水平升高。而自噬抑制剂CQ可逆转Cdc37下调所引起的BTZ耐药。结论 Cdc37可能通过调控细胞自噬参与MM细胞对BTZ的耐药过程。

【关键词】 Cdc37; 自噬; 硼替佐米; 耐药

基金项目:国家自然科学基金(81700202、81630007)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.07.009

Cdc37 Contributes to bortezomib resistance in multiple myeloma via autophagy

Liu Lanting¹, Deng Shuhui¹, Zang Meirong², Zhang Jinqiao², Qiu Lugui¹

¹State Key Laboratory of Experimental Hematology, National Clinical Research Center for Blood Diseases, Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China

²Department of Hematology, The Third Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author: Zang Meirong, Email: pumc_zangmeirong@163.com

【Abstract】 Objective To explore the role of cell division cycle protein 37 (Cdc37) mediating bortezomib (BTZ) resistance in multiple myeloma (MM) via the regulation of autophagy activity to provide a novel strategy for MM therapy. **Methods** The expressions of Cdc37 and LC3b were investigated in BTZ-resistant MM cell line ANBL-6.BR using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and western blot (WB) analysis. Cdc37 was upregulated in ANBL-6.BR cells owing to lentivirus transfection. The LC3b expression was detected with WB, and BTZ-induced apoptosis was explored using flow cytometry. Cdc37 was then down-regulated by shRNA in the MM cell line NCI-H929. Sensitivity of BTZ was evaluated using CCK-8 analysis. WB analysis was performed to check the expression of the AKT/mTOR pathway and autophagy-associated proteins. The sensitivity of NCI-H929 cells to BTZ in the presence of autophagy inhibitor chloroquine (CQ) was analyzed using flow cytometry. **Results** Cdc37 was down-regulated, while autophagy-associated gene LC3b was upregulated in BTZ-resistant cell line ANBL-6.BR. Up-regulated Cdc37 in ANBL-6.BR cells could inhibit LC3b expression and increase the sensitivity of MM to BTZ. Suppressing Cdc37 expression in MM cell line NCI-H929 induced BTZ resistance and autophagy activation, while CQ could rescue BTZ resistance caused by Cdc37 inhibition.

Conclusion Cdc37 may participate in BTZ resistance in MM via the regulation of autophagy activity.

【Key words】 Cdc37; Cell autophagy; Multiple myeloma; Bortezomib resistance

Fund program: National Natural Science Foundation of China(81700202, 81630007)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2020.07.009

多发性骨髓瘤(MM)是一种以浆细胞克隆性增殖为特征的恶性血液系统肿瘤,至今不能治愈^[1]。自2003年获得美国食品药品监督管理局批准以来,以蛋白酶体抑制剂硼替佐米(BTZ)为基础的化疗方案已经成为MM的首选治疗之一。但有研究表明,近25%初治MM患者对BTZ原发耐药,而在复发难治患者中,BTZ的获得性耐药率更是高达70%^[2]。对BTZ耐药的MM患者预后极差,中位生存期只有6~9个月^[3]。因此,BTZ耐药是MM治疗的巨大障碍,也是其不可治愈的重要原因之一。我们在前期研究中发现,细胞分裂周期蛋白37(cell division cycle protein 37, Cdc37)可能与BTZ耐药相关,但其机制尚不明确。本研究拟通过调节Cdc37的表达观察Cdc37与BTZ耐药的关系,并进一步探讨其可能的机制,为克服BTZ耐药提供新的靶点和治疗策略。

材料与方 法

1. 细胞培养:MM细胞系NCI-H929购自ATCC细胞库,ANBL-6.WT和ANBL-6.BR细胞由Robert Orłowski教授(美国MD Anderson癌症中心)馈赠。上述细胞均保存于实验血液学国家重点实验室细胞库。NCI-H929细胞培养于含10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 IU/ml青霉素、100 IU/ml链霉素的RPMI 1640(美国Gibco公司产品)完全培养基。根据文献报道,ANBL-6.WT和ANBL-6.BR细胞培养于含1 ng/ml IL-6的RPMI 1640完全培养基^[4,5]。所有细胞均在37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养,每2~3 d换液传代1次。

2. 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测mRNA的表达:收集对数生长期细胞,TRIzol法提取总RNA,采用M-MLV逆转录cDNA合成试剂盒(美国Invitrogen公司产品)进行反转录,其反应体系及条件参照说明书进行。qRT-PCR采用SYBR Premix Ex Taq™(日本Takara公司产品)反应体系,反应条件为:预变性95℃ 30 s;PCR(40个循环)95℃ 5 s, 60℃ 34 s;熔解曲线95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s。反应结束后确认qRT-PCR的扩增曲线和熔解曲线,以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法进行结果分析。PCR引物序列分别为:Cdc37(F: 5'-TGAAGACGAGACGCACC-3'; R: 5'-TCAGTTTCCTCTGGCAC

TCG-3'), LC3b(F: 5'-TTCGAGAGCAGCATCCAACC-3'; R: 5'-ATGCTGTGTCCGTTACCAA-3'), GAPDH(F: 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3'; R: 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3')。

3. Western blot(WB)法检测蛋白的表达:收集细胞,裂解蛋白,采用BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司产品)测定蛋白浓度,按照每孔30 mg蛋白量进行SDS-PAGE电泳,并转移至PVDF膜上,5% BSA封闭1 h后,与一抗4℃孵育过夜。加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育1 h。加入化学发光剂,曝光显影。Cdc37抗体购自英国Abcam公司,β-actin抗体购自中国天津三箭生物技术有限公司,LC3b抗体、AKT抗体、p-AKT抗体、mTOR抗体、p-mTOR抗体、HRP标记二抗均购自美国Cell Signaling Technology公司。

4. 慢病毒转染建立稳定细胞株:pLKO.1-shRNA-Cdc37 vector 储存菌液购自美国Sigma公司,pLKO.1-scramble shRNA control vector购自美国Addgene公司。经质粒提取、病毒包装及病毒液收集制备Cdc37 shRNA病毒液。在六孔板内铺好细胞,待目的细胞达到70%汇合度时,更换1 ml新鲜培养基,加入1 ml病毒液到目的细胞中,同时加入终浓度为8 μg/ml的polybrene。培养8~12 h后更换新鲜培养基继续培养48~72 h。更换为含有嘌呤霉素的培养基进行阳性细胞筛选。

Cdc37慢病毒过表达质粒及对照质粒购自中国GeneCopoeia公司,两者均表达GFP荧光标志。经病毒包装、收集及细胞感染后,流式细胞术分选GFP阳性细胞。

5. CCK-8法检测细胞活力:参照CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所产品)进行操作。准备实验所需细胞悬液,细胞计数后接种于96孔培养板中,同样的标本设至少3个复孔。每孔为100 μl培养体系,接种2×10⁴个细胞,在37℃、5% CO₂、饱和湿度孵箱内静置培养24 h后,加入不同浓度BTZ作用48 h,在检测前4 h加入CCK-8,每孔10 μl,上机检测。

6. 流式细胞术检测细胞凋亡:将细胞接种于六孔板中,每孔2 ml培养体系,接种2×10⁵/ml细胞。分别加入2 nmol/L BTZ和(或)不同浓度氯喹(CQ),作用24 h,收集细胞。1 ml Binding Buffer重悬细

胞,取100 μl 细胞悬液加入流式管中,加入5 μl FITC-Annexin V 和5 μl PI 或者5 μl PE-Annexin V 和5 μl 7-AAD,室温避光孵育30 min。每管再加入400 μl 1×Binding Buffer,混匀,1 h内上机检测。

7. 统计学处理:应用SPSS 13.0软件进行统计学分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较使用t检验,多于两组间的比较使用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Cdc37 和自噬相关基因 LC3b 在 BTZ 耐药细胞株中的表达:qRT-PCR 及 WB 技术检测 BTZ 耐药细胞株 ANBL-6.BR 及其亲本细胞株 ANBL-6.WT 中 Cdc37 及 LC3b 的表达水平。结果显示,Cdc37 在 BTZ 耐药细胞株中低表达,而自噬相关基因 LC3b 在 BTZ 耐药细胞中高表达(图1、图2)。在 ANBL-6.BR 细胞中上调 Cdc37 的表达可抑制 LC3b 的表达(图3)。2 nmol/L BTZ 作用于 ANBL-6.BR-Cdc37-空载体(EV)及 ANBL-6.BR-Cdc37-过表达(OE)细胞 24 h,细胞凋亡比例分别为(11.6±1.2)%和(20.3±1.5)%($P < 0.01$)(图4)。上述结果提示,Cdc37 低表达及增强的细胞自噬可能参与了 BTZ 耐药的过程。

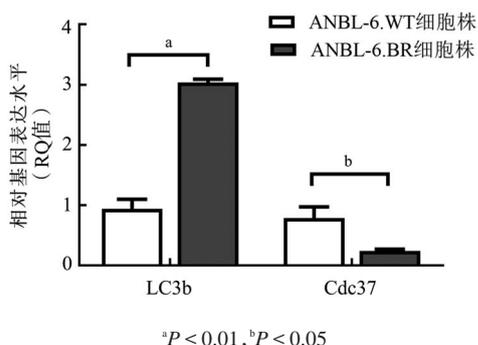
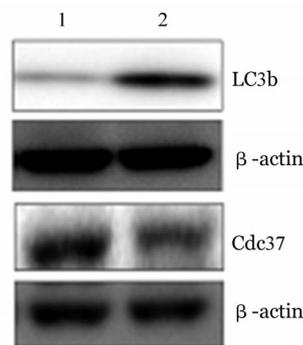


图1 实时荧光定量PCR检测 ANBL-6.WT 和 ANBL-6.BR 细胞中 LC3b、Cdc37 基因 mRNA 的表达水平(实验重复3次)

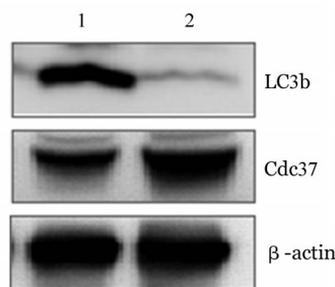
2. 在 NCI-H929 细胞中下调 Cdc37 的表达对 MM 细胞 BTZ 敏感性的影响:通过慢病毒感染技术,在 NCI-H929 细胞中建立 Cdc37 敲减的稳定细胞株 Cdc37 shRNA 及其对照细胞株 Cdc37 scramble, WB 法检测显示其敲减效率(图5)。不同浓度 BTZ 作用于 Cdc37 scramble 及 Cdc37 shRNA 细胞 48 h,其细胞活性的变化存在差异(表1),两种细胞的 IC₅₀ 分别是 3.3 nmol/L 和 5.2 nmol/L。

3. 在 NCI-H929 细胞中下调 Cdc37 的表达对 AKT-mTOR 通路及自噬水平的影响:WB 法检测



1:ANBL-6.WT 细胞;2:ANBL-6.BR 细胞

图2 Western blot 法检测 ANBL-6.WT 和 ANBL-6.BR 细胞中 LC3b、Cdc37 蛋白的表达水平



1:ANBL-6.BR-Cdc37-EV 细胞;2:ANBL-6.BR-Cdc37-OE 细胞

图3 Western blot 法检测 ANBL-6.BR-Cdc37-EV 及 ANBL-6.BR-Cdc37-OE 细胞中 LC3b、Cdc37 蛋白的表达水平

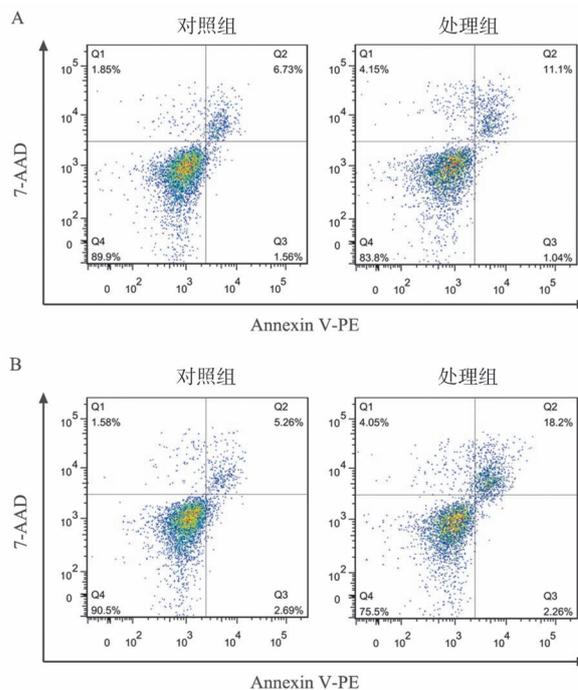


图4 2 nmol/L 硼替佐米作用 24 h 后流式细胞术检测 ANBL-6.BR-Cdc37-EV(A)及 ANBL-6.BR-Cdc37-OE(B)细胞凋亡比例

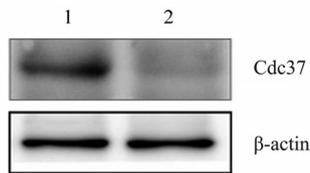
Cdc37 scramble 和 Cdc37 shRNA 细胞中 ATK/mTOR 细胞通路中的关键蛋白 AKT、p-AKT、mTOR、

表1 不同浓度硼替佐米作用于NCI-H929 scramble 和NCI-H929 shRNA 细胞 48 h后 CCK-8法检测细胞活力($\bar{x}\pm s$)

细胞株	样本量	硼替佐米浓度(nmol/L)						
		0	1	2	4	8	10	20
NCI-H929 scramble	4	1.173±0.014	1.000±0.010	0.637±0.007	0.536±0.002	0.398±0.001	0.244±0.001	0.183±0.004
NCI-H929 shRNA	5	0.782±0.011	0.646±0.012	0.424±0.005	0.412±0.011	0.327±0.004	0.301±0.002	0.260±0.002

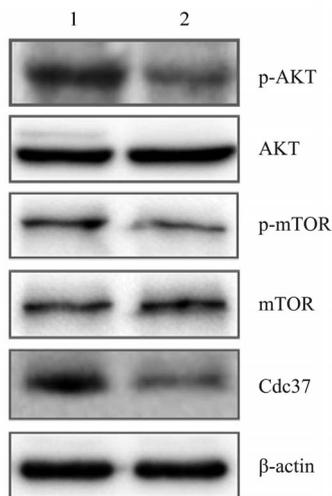
p-mTOR,结果显示 Cdc37 shRNA 细胞中 p-AKT、p-mTOR 水平较 Cdc37 scramble 细胞明显降低(图6)。而作为 AKT/mTOR 细胞通路的下游,自噬通路相关基因 LC3b 在 Cdc37 shRNA 细胞中显著升高(图7、图8)。

4. 自噬抑制剂对 Cdc37 shRNA 细胞 BTZ 敏感性的影响:不同浓度自噬抑制剂 CQ 与 BTZ 共同作用于 Cdc37 scramble 和 Cdc37 shRNA 细胞,流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示,低浓度 CQ ($\leq 10 \mu\text{mol/L}$)单独作用于 MM 细胞不会诱导细胞凋亡,细胞凋亡比例并不随着 CQ 浓度的增加而显著增加。当 CQ 浓度继续加大时才会诱导细胞凋亡,且 Cdc37 scramble 和 Cdc37 shRNA 细胞对 CQ 的敏感性无明显差异(图9)。但当低浓度 CQ ($\leq 10 \mu\text{mol/L}$)与 BTZ 共同作用时,CQ 可以显著增



1:NCI-H929 scramble 细胞;2:NCI-H929 shRNA 细胞

图5 Western blot 法检测 Cdc37 在 NCI-H929 scramble 及 NCI-H929 shRNA 细胞中的表达水平



1:NCI-H929 scramble 细胞;2:NCI-H929 shRNA 细胞

图6 Western blot 法检测 NCI-H929 scramble 和 NCI-H929 shRNA 细胞中 AKT/mTOR 信号通路的表达变化

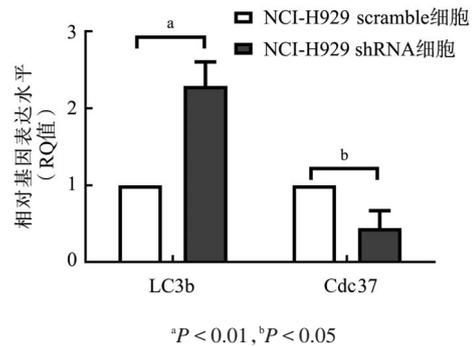
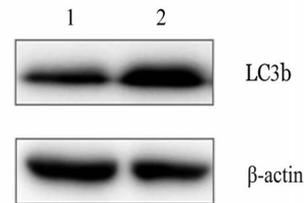


图7 实时荧光定量 PCR 检测 LC3b 在 NCI-H929 scramble 和 NCI-H929 shRNA 细胞中的表达水平(实验重复3次)



1:NCI-H929 scramble 细胞;2:NCI-H929 shRNA 细胞

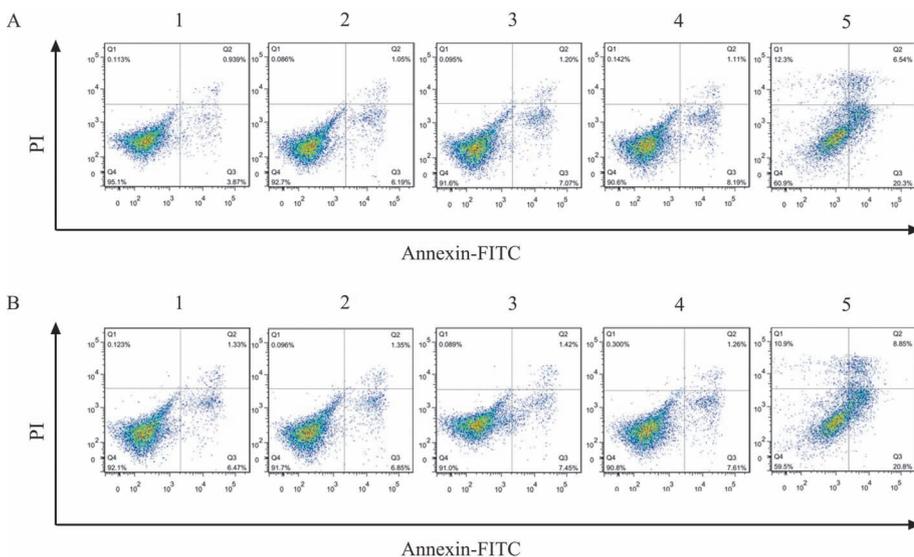
图8 Western blot 法检测 LC3b 在 NCI-H929 scramble 和 NCI-H929 shRNA 细胞中的表达

加 MM 细胞对 BTZ 的敏感性,这一作用在 Cdc37 shRNA 细胞中更加明显(图10)。上述结果提示采用小剂量 CQ 抑制细胞自噬活性即可增加 Cdc37 shRNA 细胞对 BTZ 的敏感性。

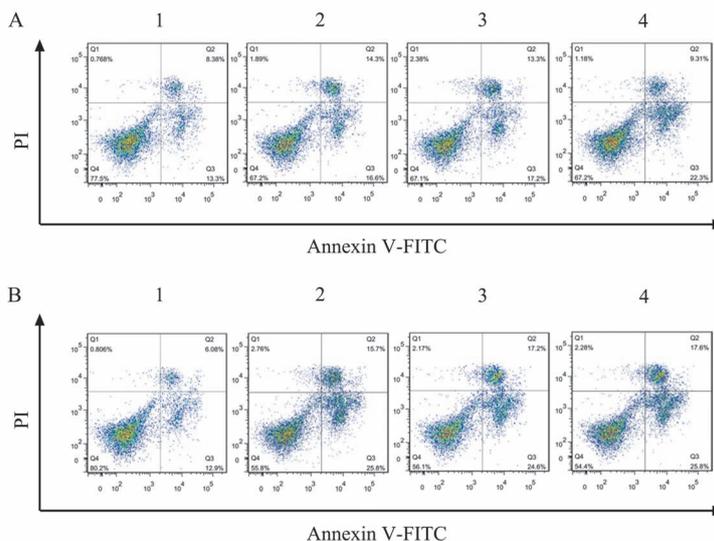
讨论

BTZ 耐药是 MM 治疗失败的主要原因之一。BTZ 耐药机制复杂,蛋白酶体 $\beta 5$ 亚基突变^[6]、药物外排泵(如 p-糖蛋白、多药耐药相关蛋白等)过表达^[7]、NF- κ B 等信号通路异常激活^[8]、骨髓微环境的保护作用^[9-10]均与 BTZ 耐药密切相关。近年来研究发现,细胞自噬与肿瘤耐药密切相关^[11]。自噬是一种高度保守的细胞内代谢途径,是细胞在应对饥饿、损伤等不良刺激时通过降解细胞内衰老受损的蛋白成分和细胞器来实现自我消化、自我供给,从而使细胞获得营养以维持生存的过程,是细胞在长期对抗外界环境压力时形成的自我保护机制。

MM 细胞合成大量免疫球蛋白,细胞内的蛋白



1: 氯喹 0 μmol/L 处理组; 2: 氯喹 2.5 μmol/L 处理组; 3: 氯喹 5 μmol/L 处理组; 4: 氯喹 10 μmol/L 处理组; 5: 氯喹 30 μmol/L 处理组
 图9 不同浓度氯喹作用于 NCI-H929 Cdc37-scramble(A) 和 NCI-H929 Cdc37-shRNA(B) 细胞 24 h 后流式细胞术检测细胞凋亡



1: 氯喹 0 μmol/L 处理组; 2: 氯喹 2.5 μmol/L 处理组; 3: 氯喹 5 μmol/L 处理组; 4: 氯喹 10 μmol/L 处理组

图10 不同浓度氯喹与 2 nmol/L 硼替佐米共同作用于 NCI-H929 Cdc37-scramble(A) 和 NCI-H929 Cdc37-shRNA(B) 细胞 24 h 后流式细胞术检测细胞凋亡

质代谢极为旺盛,而自噬对维持MM细胞内稳态具有重要作用。Lamy等^[12]的研究发现,将自噬通路上的关键分子Beclin-1敲除后,MM细胞生存受抑,证实基础水平的自噬对于MM细胞的存活至关重要。BTZ通过抑制蛋白酶体降解途径使大量未折叠蛋白或错误折叠蛋白在细胞内累积,最终引发细胞死亡^[13]。而自噬作为细胞内又一蛋白降解通路可以帮助细胞处理过剩蛋白^[14]。Escalante等^[15]证实,BTZ处理后短时间内就可以引发细胞内的自噬反应。而Hamouda等^[16]发现,与骨髓瘤细胞株U266亲本相比,BTZ引发的泛素化蛋白和蛋白聚集

物的累积在BTZ耐药的U266细胞株中明显减少,而且这种增强的蛋白处理能力与细胞抵抗BTZ杀伤进而存活下来的能力密切相关。随后的研究证实,在耐药细胞株中,BTZ所引起的过剩蛋白累积主要通过激活的自噬溶酶体途径清除,从而帮助细胞抵抗BTZ的杀伤作用。因此,抑制自噬成为克服BTZ耐药的另一手段。

我们的前期研究结果显示,自噬相关基因LC3b在BTZ耐药细胞株中高表达,与之前的研究结果一致。同时我们也发现,Cdc37在BTZ耐药细胞株中低表达,在MM细胞株NCI-H929细胞中下调Cdc37

的表达将引起MM细胞对BTZ的敏感性下降。两个结果相互印证,明确了Cdc37低表达与BTZ耐药相关。Cdc37是否可以通过调节细胞自噬参与MM细胞对BTZ耐药的过程是本研究重点要解决的问题。

Cdc37分子是最初在芽殖酵母中发现的细胞周期相关蛋白,而随后的研究发现Cdc37具有分子伴侣活性,可以作为接头蛋白特异地与蛋白激酶的催化结构域结合,并促进蛋白激酶与热休克蛋白90的结合,从而帮助蛋白激酶成熟^[17]。而Cdc37的一个重要底物蛋白就是mTOR蛋白^[18]。mTOR作为一种保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是调节细胞生长、增殖、存活和自噬等上游通路的汇合点,而AKT/mTOR信号通路是抑制细胞自噬的关键信号通路。因此我们假设Cdc37可能通过影响AKT/mTOR信号通路参与细胞自噬和BTZ耐药过程。我们的研究结果也证实,在NCI-H929细胞中下调Cdc37的表达抑制了AKT/mTOR信号通路中关键蛋白AKT、mTOR的磷酸化过程,从而解除了mTOR信号通路对自噬的抑制作用,细胞内的自噬活性增强。而小剂量自噬抑制剂就能逆转Cdc37下调所引起的BTZ耐药。

MM是一种异质性疾病,不同MM患者对同一药物的敏感性存在巨大差异。如何在治疗前预测不同MM患者对治疗的反应是MM治疗的又一难题。我们的研究显示Cdc37低表达与BTZ耐药相关,Cdc37分子能否成为预测BTZ治疗反应的分子标志还需更大的临床样本证实。

参考文献

- [1] Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma[J]. *Blood*, 2008, 111(6):2962-2972. DOI: 10.1182/blood-2007-10-078022.
- [2] Moreau P, Richardson PG, Cavo M, et al. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later[J]. *Blood*, 2012, 120(5):947-959. DOI: 10.1182/blood-2012-04-403733.
- [3] Kumar SK, Lee JH, Lahuerta JJ, et al. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study[J]. *Leukemia*, 2012, 26(1):149-157. DOI: 10.1038/leu.2011.196.
- [4] Kuhn DJ, Hunsucker SA, Chen Q, et al. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors[J]. *Blood*, 2009, 113(19):4667-4676. DOI: 10.1182/blood-2008-07-171637.
- [5] Kuhn DJ, Berkova Z, Jones RJ, et al. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma[J]. *Blood*, 2012, 120(16):3260-3270. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386789.
- [6] Zhou J, Chng WJ. Novel mechanism of drug resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma[J]. *World J Clin Oncol*, 2019, 10(9):303-306. DOI: 10.5306/wjco.v10.i9.303.
- [7] Chong KY, Hsu CJ, Hung TH, et al. Wnt pathway activation and ABCB1 expression account for attenuation of proteasome inhibitor-mediated apoptosis in multidrug-resistant cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(1):149-159. DOI: 10.4161/15384047.2014.987093.
- [8] Huynh M, Pak C, Markovina S, et al. Hyaluronan and proteoglycan link protein 1 (HAPLN1) activates bortezomib-resistant NF- κ B activity and increases drug resistance in multiple myeloma[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(7):2452-2465. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000667.
- [9] Zhang G, Miao F, Xu J, et al. Mesenchymal stem cells from bone marrow regulate invasion and drug resistance of multiple myeloma cells by secreting chemokine CXCL13[J]. *Bosn J Basic Med Sci*, 2020, 20(2):209-217. DOI: 10.17305/bjms.2019.4344.
- [10] Colombo M, Garavelli S, Mazzola M, et al. Multiple myeloma exploits Jagged1 and Jagged2 to promote intrinsic and bone marrow-dependent drug resistance[J]. *Haematologica*, 2019, DOI: 10.3324/haematol.2019.221077.
- [11] Li YJ, Lei YH, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1):52. DOI: 10.1186/s40880-017-0219-2.
- [12] Lamy L, Ngo VN, Emre NC, et al. Control of autophagic cell death by caspase-10 in multiple myeloma[J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(4):435-449. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.02.017.
- [13] David E, Kaufman JL, Flowers CR, et al. Tipifarnib sensitizes cells to proteasome inhibition by blocking degradation of bortezomib-induced aggregates[J]. *Blood*, 2010, 116(24):5285-5288. DOI: 10.1182/blood-2010-03-272393.
- [14] Ji CH, Kwon YT. Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(7):441-449. DOI: 10.14348/molcells.2017.0115.
- [15] Escalante AM, McGrath RT, Karolak MR, et al. Preventing the autophagic survival response by inhibition of calpain enhances the cytotoxic activity of bortezomib in vitro and in vivo[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(6):1567-1576. DOI: 10.1007/s00280-013-2156-3.
- [16] Hamouda MA, Belhacene N, Puissant A, et al. The small heat shock protein B8 (HSPB8) confers resistance to bortezomib by promoting autophagic removal of misfolded proteins in multiple myeloma cells[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(15):6252-6266. DOI: 10.18632/oncotarget.2193.
- [17] Gray PJ Jr, Prince T, Cheng J, et al. Targeting the oncogene and kinome chaperone CDC37[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(7):491-495. DOI: 10.1038/nrc2420.
- [18] Li X, Zhu G, Yao X, et al. Celastrol induces ubiquitin-dependent degradation of mTOR in breast cancer cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11:8977-8985. DOI: 10.2147/OTT.S187315.

(收稿日期:2020-02-13)

(本文编辑:律琦)