

## 吴茱萸碱激活结肠癌细胞自噬抑制其增殖的研究

吕艳伟<sup>1</sup>, 郭星娴<sup>1</sup>, 周 鹏<sup>1</sup>, 李 静<sup>1\*</sup>, 陈地龙<sup>1,2\*</sup>

1. 重庆医科大学基础医学院 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016

2. 三峡医药高等专科学校, 重庆 400016

**摘要:**目的 探讨吴茱萸碱(evodiamine, Evo)对结肠癌 HCT-116 细胞自噬、增殖的影响及其可能的分子机制。方法 CCK-8 法检测 Evo 对 HCT-116 细胞增殖的影响; Evo (3、6  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 48 h 后, MDC 法检测细胞内自噬小泡的数量, DHE 法检测细胞内活性氧(ROS)的量, Western blotting 法检测细胞自噬相关蛋白和腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路相关蛋白的表达; Evo (6  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别与自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)和凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 共同作用 48 h 后, Western blotting 法检测细胞内自噬及凋亡相关蛋白的表达。结果 与对照组比较, Evo 对 HCT-116 细胞呈现浓度依赖性的增殖抑制作用; Evo (3、6  $\mu\text{mol/L}$ ) 使 HCT-116 细胞内的 ROS 量升高、自噬小泡数量增加、自噬相关蛋白 LC3 表达增加、p62 表达降低、p-AMPK 及 mTOR 表达增加; Evo 与自噬抑制剂联合给药后, 细胞内 LC3 蛋白表达减少, 而有活性的 Caspase-3 表达增加, Evo 与凋亡抑制剂联合给药后, 细胞内 LC3 表达增加, 而有活性的 Caspase-3 表达被抑制。结论 Evo 能够通过 AMPK/mTOR 通路激活自噬、抑制 HCT-116 细胞增殖, 且细胞自噬与凋亡呈现互补作用。

**关键词:** 吴茱萸碱; 氧化应激; 自噬; 结肠癌; HCT-116 细胞; AMPK/mTOR 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)20-4851-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.022

## Evodiamine activates autophagy and inhibits the proliferation in colon cancer cell

LV Yan-wei<sup>1</sup>, GUO Xing-xian<sup>1</sup>, ZHOU Peng<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, CHEN Di-long<sup>1,2</sup>

1. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 400016, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of evodiamine (Evo) on the autophagy and proliferation of colon cancer HCT-116 cells and the underlying mechanism. **Methods** The effect of Evo on proliferation of HCT-116 cells was detected by CCK-8 method. After being processed with Evo (3 and 6  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h, the number of autophagic vesicles were detected by MDC method. The amount of ROS in HCT-116 cells was measured by DHE assay, and the protein related with autophagy and AMPK/mTOR pathway was detected by Western blotting. After the treatment of Evo (6  $\mu\text{mol/L}$ ) combined with autophagy inhibitor 3-MA (3-methyladenine) or apoptosis inhibitor Z-DEVD-FMK respectively for 48 h, Western blotting was used to detect the expression of autophagy and apoptosis-related protein in HCT-116 cells. **Results** Compared with the control group, Evo inhibited the proliferation of HCT-116 cells in a dose-dependent manner; After treated with Evo (3 and 6  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h, the amount of intracellular ROS and autophagic vesicles were increased, the protein expression levels of LC3, p-AMPK, and mTOR were increased while the expression of p62 was increased. After being treated with Evo and autophagy inhibitor, the protein expression of LC3 was decreased while activated Caspase-3 was increased; Combination of Evo and apoptosis inhibitor increased the expression of LC3 and inhibited the expression of activated Caspase-3. **Conclusion** Evo can activate autophagy of HCT-116 cells through AMPK/mTOR pathway and inhibit the proliferation, and the effect of autophagy and apoptosis on cells are complementary.

**Key words:** evodiamine; oxidative stress; autophagy; colon cancer; HCT-116 cell; AMPK/mTOR pathway

收稿日期: 2018-07-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271368); 重庆市渝中区科技计划项目(20140123)

作者简介: 吕艳伟(1987—), 女, 医学硕士, 主要从事中草药的抗肿瘤研究。E-mail: 2237676066@qq.com

\*通信作者 李 静, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药物抗肿瘤。Tel: (023)68485614 E-mail: li-jingyangyang@126.com  
陈地龙, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中草药抗肿瘤。Tel: (023)68485614 E-mail: chendilong@21cn.com

结肠癌是世界上常见的癌症之一,发病率居恶性肿瘤的第 3 位,死亡率居第 2 位,每年近一百万人死于结肠癌<sup>[1]</sup>。目前,手术切除仍是其主要治疗手段,然而结肠癌的手术治疗效果并不理想,只有约 70% 的患者适合手术治疗,且存活率仅有 75%<sup>[2]</sup>。仍有许多患者需要辅助化疗,然而化疗造成的经济负担及对患者身体的伤害导致其有很大的局限性,所以亟需寻求一种温和有效的药物治疗方法。

自噬是真核细胞内溶酶体隔离并降解细胞质内容物的过程,是经典的细胞自我更新机制。近年来,大量的研究发现其与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[3]</sup>。因此,阐明自噬的分子机制及其与肿瘤发生发展的关系是研究抗肿瘤药物的新思路。

中药因其较小的毒副作用及良好的抗肿瘤活性被广泛运用到肿瘤的治疗中。近年来研究表明,多种中药通过激活自噬发挥抗肿瘤作用,而吴茱萸碱(evodiamine, Evo)是其中代表药物之一<sup>[4]</sup>。研究表明 Evo 具有抗乳腺癌、肝癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞的活性,其抗肿瘤活性主要依赖于引起细胞凋亡及自噬的发生。本课题组前期研究结果表明, Evo 能够明显抑制人结肠癌 HCT-116 细胞增殖,促进其凋亡,然而对于其自噬的激活及相关信号通路仍未见报道。因此,本实验以 HCT-116 细胞为研究对象,探讨 Evo 对其自噬的作用及相关的机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

HCT-116 细胞购于 ATCC 细胞库。

### 1.2 药品与试剂

Evo (批号 ZL20131015, 质量分数>98%), 南京泽朗医药公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒, 碧云天生物技术研究所; 兔抗人腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-AMPK、p-mTOR、LC3 及 p62 抗体购于 CST 公司; cleaved Caspase-3、 $\beta$ -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 均购于 Proteintech 公司; 3-甲基腺嘌呤(3-MA)和 Z-DEVD-FMK 购于 Sigma 公司; DHE 及 MDC 试剂盒购自于凯基生物公司。

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, 美国 Forma Scientific 公司; 倒置显微镜、荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; Bio-Rad M450 酶标测定仪、垂直电泳仪、电转仪、化学发光成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

HCT-116 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下常规培养, 每 2~3 天传代 1 次, 所有实验均在细胞对数生长期进行。

### 2.2 细胞增殖实验

取处于对数生长期的 HCT-116 细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^8/L$ , 以每孔 100  $\mu L$  的细胞悬液接种于 96 孔板, 培养过夜贴壁后弃去培养上清液。实验分为空白组、对照组和 Evo 各浓度给药组。空白组只加入 100  $\mu L$  完全培养基。对照组只含有细胞和 100  $\mu L$  完全培养基。药物组加入含 Evo 的完全培养基, 使其终浓度分别为 1.5、3.0、6.0、12.0、24.0、48.0、96.0  $\mu mol/L$ , 每孔 100  $\mu L$ , 每组设 3 个复孔。细胞培养 48 h 后, 每孔加入 10  $\mu L$  的 CCK-8 试剂并置于 37 °C 孵箱中孵育 2 h, 酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔的吸光度(A)值, 并计算各药物组细胞增殖抑制率和半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>), 以 IC<sub>50</sub> 为标准确定药物最适作用浓度和时间, 实验重复 3 次。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 MDC 法检测自噬小泡

细胞接种到 3.5 cm 培养皿中, 分为对照组及 Evo 3.0、6.0  $\mu mol/L$  组, 对数期加药处理 48 h 后, 去除培养基, 加入 500  $\mu L$  autophagosome 检测试剂工作溶液孵育 40 min。每孔加入 1 $\times$ 洗涤缓冲液洗 3 次, 冲洗后立即用显微镜观察并拍照。

### 2.4 DHE 检测细胞活性氧(ROS)水平

细胞接种到 3.5 cm 培养皿中, 分为对照组及 Evo 3.0、6.0  $\mu mol/L$  组, 对数期加药处理 48 h 后, 去除培养基, 加入 100  $\mu L$  DHE 检测试剂工作液, 37 °C 避光孵育 30 min, 荧光显微镜红色荧光通道拍摄图片。

### 2.5 Western blotting 法检测自噬相关蛋白表达

取对数生长期的细胞, 分为对照组、Evo 组(6.0  $\mu mol/L$ )、抑制剂组(自噬抑制剂 3-MA 或凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK)及 Evo+抑制剂组(同时给予 Evo 6.0  $\mu mol/L$  及相应抑制剂), 药物作用 48 h 后收集细胞, RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度后加 Loading buffer 高温变性。SDS 凝胶电泳后转印至 PVDF 膜, 一抗 LC3 (1:10 000)、AMPK/p-AMPK (1:2 000)、mTOR/p-mTOR (1:1 000)、p62 (1:5 000)、cleaved

Caspase-3 (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:3 000) 低温孵育过夜, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 37 °C 孵育 1 h。ECL 化学发光试剂盒显影。实验重复 3 次, 结果用 Image J 软件处理。

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件对所得数据进行统计处理, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。

## 3 结果

### 3.1 Evo 对 HCT-116 细胞增殖的影响

CCK-8 实验结果显示 (图 1), 与对照组比较, 经不同浓度 Evo 处理 48 h 后, 能够观察到明显的 HCT-116 细胞增殖抑制, 且具有浓度依赖性。经计算  $IC_{50}$  为 5.82  $\mu\text{mol/L}$ , 故选用 3.0、6.0  $\mu\text{mol/L}$  作为后续实验药物浓度。

### 3.2 Evo 对 HCT-116 细胞自噬的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, Evo 3.0  $\mu\text{mol/L}$  组细胞无明显变化, Evo 6.0  $\mu\text{mol/L}$  组细胞内自噬小泡明显增加 ( $P < 0.01$ )。

如图 3 所示, 与对照组比较, Evo 6.0  $\mu\text{mol/L}$  组细胞内自噬相关蛋白 LC3-II/LC3-I 显著增加, p62 表达量显著减少 ( $P < 0.01$ ), 表明 HCT-116 细胞自

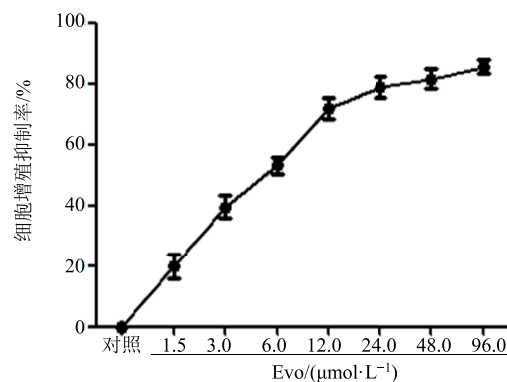


图 1 Evo 对 HCT-116 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of Evo on proliferation of HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

噬被明显地激活。

### 3.3 Evo 对 HCT-116 细胞内 ROS 产生的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, Evo 3.0  $\mu\text{mol/L}$  组细胞内 ROS 的产生不明显, 而 Evo 6.0  $\mu\text{mol/L}$  组细胞内 ROS 量显著增加 ( $P < 0.01$ )。

### 3.4 Evo 对 HCT-116 细胞内 AMPK/mTOR 信号通路的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, Evo 各浓度组细胞内 AMPK 蛋白的表达水平未见明显变化, 但

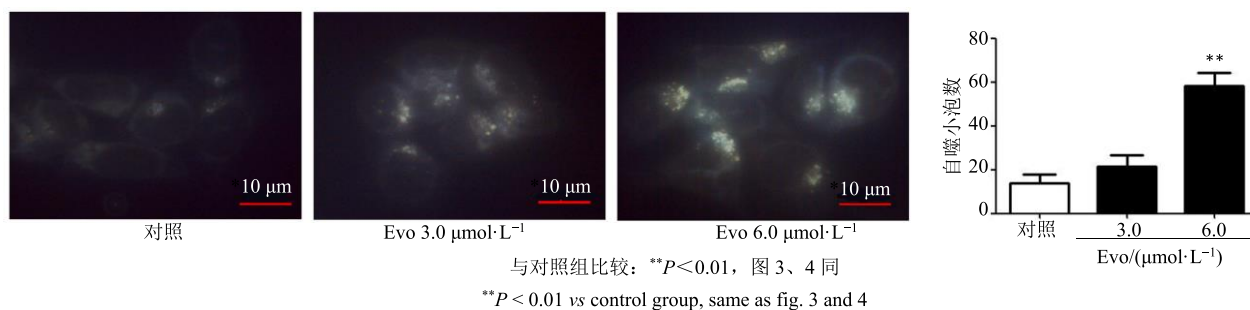


图 2 Evo 对 HCT-116 细胞自噬的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of Evo on autophagy of HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

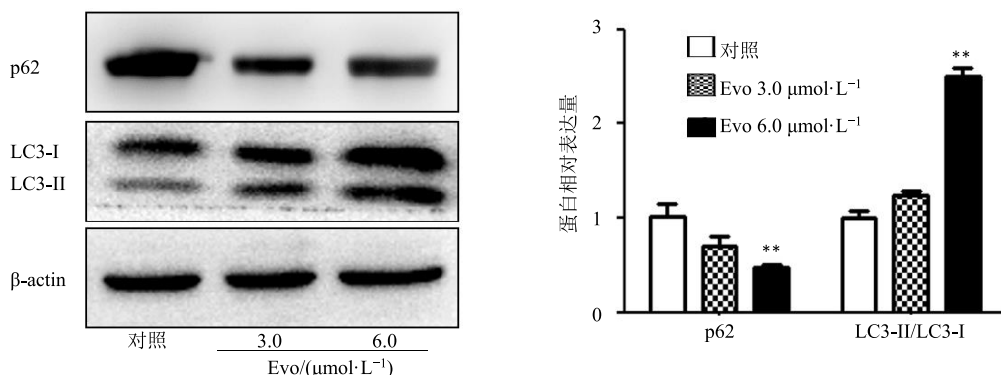


图 3 Evo 对 HCT-116 细胞自噬相关蛋白 p62 和 LC3 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of Evo on expression of autophagy-related proteins p62 and LC3 in HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

p-AMPK 蛋白表达量显著增加 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 且呈浓度依赖性。Evo 6.0  $\mu\text{mol/L}$  组细胞内 mTOR 磷酸化水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。由此可以表明 Evo 可以通过激活 AMPK 抑制 mTOR 的磷酸化。

### 3.5 Evo 联合 3-MA、Z-DEVD-FMK 对 HCT-116 细胞自噬和凋亡相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与 Evo 组比较, Evo 6.0  $\mu\text{mol/L}$  + 3-MA 处理 HCT-116 细胞 48 h 后, 由于抑制剂的存

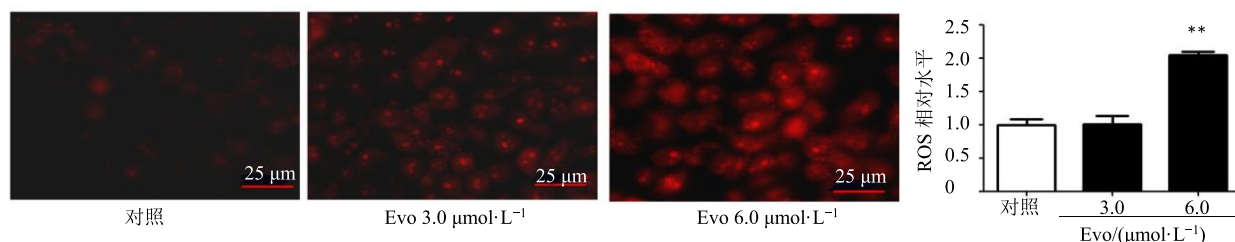
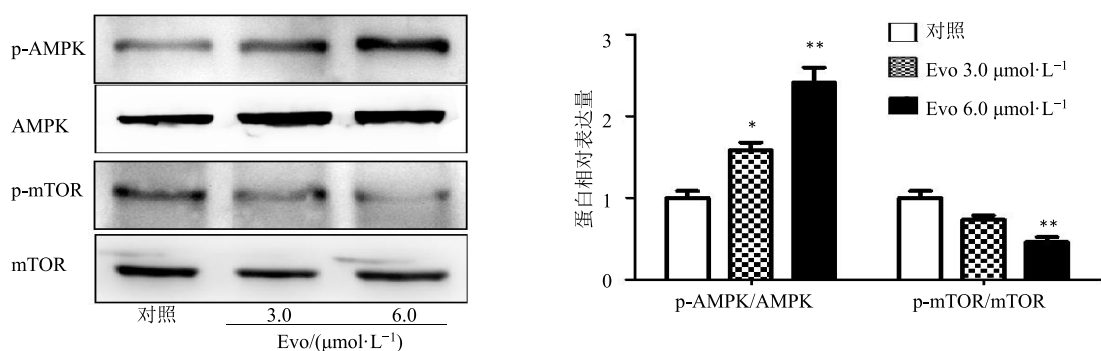


图 4 Evo 对 HCT-116 细胞内 ROS 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of Evo on ROS production in HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

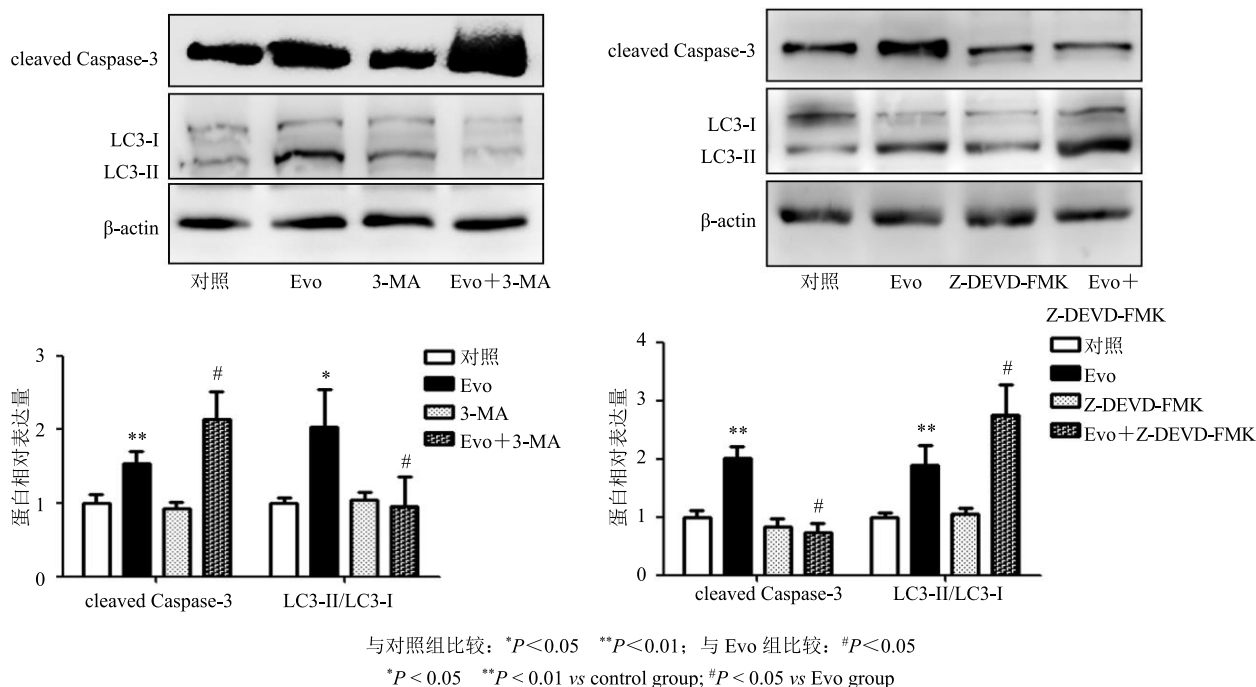


与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

图 5 Evo 对 HCT-116 细胞 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effect of Evo on expression of AMPK/mTOR pathway related proteins in HCT-116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与 Evo 组比较: # $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  vs Evo group

图 6 Evo 联合自噬或凋亡抑制剂对细胞自噬和凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of Evo combined with autophagy or apoptosis inhibitor on cellular autophagy and apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

在, LC3 蛋白表达及表型转换均被抑制 ( $P<0.05$ ), 自噬被抑制, 而同时 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显增加 ( $P<0.05$ ), 表明凋亡作用明显增加。

与 Evo 组比较, Evo 6.0  $\mu\text{mol/L}$  + 凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 处理 HCT-116 细胞 48 h 后, 由于凋亡抑制剂的存在, 细胞凋亡被明显抑制, 表现为 cleaved Caspase-3 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ), 此时细胞自噬被加强, 表现为 LC3 蛋白表达及表型转换增强 ( $P<0.05$ )。

#### 4 讨论

Evo 是芸香科植物吴茱萸的主要药效成分, 具有抗炎、抗癌、抗心血管疾病及抗肥胖的作用, 并且其抗癌作用在胃癌、胰腺癌、肝癌等常见癌症疾病中已经得到了证实。目前报道的 Evo 抗癌机制多为诱导凋亡及周期阻滞, 但王强等<sup>[5]</sup>证明了其在胰腺癌细胞内具有诱导自噬的作用, 而其在结肠癌细胞中是否也能诱导自噬, 目前尚无报道。

自噬是指细胞通过溶酶体降解内源性底物的重要过程, 又被称为 II 型程序型细胞死亡, 在细胞内出现缺氧、药物诱导及氧化应激时会被激活<sup>[6]</sup>。自噬已被证明与多种癌症的发生发展关系密切<sup>[7]</sup>。自噬相关蛋白 Beclin-1 缺失会促进肿瘤的发生; 自噬的缺失会损伤双链 DNA 进而激活原癌基因, 导致肿瘤发生; 而自噬激活后, 能诱导抗肿瘤的炎症反应, 抑制肿瘤转移等。另一方面, 多种抑癌基因如 p53、PTEN 等均被证实能够通过调节自噬抑制肿瘤的增殖和转移。细胞内自噬小体的数量及 LC3、p62 蛋白的表达水平可以作为自噬激活的检测指标<sup>[8]</sup>。现有研究表明, 在细胞自噬被激活时, 能够促进 LC3 蛋白的转型, 而自噬的损伤会导致 p62 蛋白的沉积, 因此 p62 与自噬呈负性相关。本研究结果表明, Evo 能够抑制 HCT-116 细胞增殖, Evo 6.0  $\mu\text{mol/L}$  能够明显增加细胞内自噬小泡的数目, 促进 LC3 的表型转换 (即 LC3 I 型转换为 II 型) 及改善 p62 的堆积, 证明 Evo 能够激活 HCT-116 细胞的自噬, 从而抑制其增殖。

自噬是一个多阶段连续的过程, 受 ROS/AMPK/mTOR、PI3K/Akt、MEK/ERK、JNK 等多种信号通路调控, 其中 ROS/AMPK/mTOR 信号通路研究最广泛<sup>[9]</sup>。ROS 是一组具有高活性的含氧化合物, 具有带负电荷的自由基。生理浓度的 ROS 是细胞所必须的, 而过量的 ROS 则具有细胞毒性, 抑制细胞增殖。人体内生成的 ROS 多达 20 余种, 其中

过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )、超氧阴离子自由基 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、高活性羟基自由基 ( $\cdot\text{OH}$ ) 等在肿瘤中发挥着关键的作用。多种中药如人参皂苷等能够通过调节 ROS 发挥抗肿瘤的作用。有研究表明在胰腺癌细胞、血管平滑肌细胞等多种细胞中, Evo 能够诱导 ROS 的产生, 进而抑制细胞增殖<sup>[10]</sup>。本实验也证明了在 HCT-116 细胞中, 经 Evo 处理后, 细胞内的 ROS 明显增加。

AMPK 是一种由 1 个催化亚基 ( $\alpha$ ) 绑定到 2 个调控亚基 ( $\beta$  和  $\gamma$ ) 组成的一种三聚体活性酶, 3 个亚基的不同排列导致了 AMPK 以 12 种不同的形式存在于不同的组织中<sup>[11-12]</sup>。一般情况下, AMPK 的活性是受细胞内 AMP/ATP 比例调控的, 同时一些药物、物理刺激、ROS 等也能激活 AMPK。AMPK 信号参与细胞增殖、细胞分化等多种生物学过程, 最近研究证明 AMPK 能够通过影响 mTOR 通路调控自噬。mTOR 是蛋白激酶家族的一员, 又属于磷脂酰肌醇相关激酶 (PIKKs), 调控 mTOR 的信号通路众多, 主要的正性调控信号为 PI3K/Akt/mTOR, 而负性调控主要为 AMPK/mTOR 信号通路。已有研究表明, 在细胞缺氧或者缺乏营养的状况下, 能激活 AMPK 并明显的增加 AMPK 蛋白的表达, 抑制 mTOR 的活性, 进而激活自噬相关蛋白的表达<sup>[13]</sup>。本研究也证明了 Evo 处理后的 HCT-116 细胞中 AMPK 被激活, 且呈浓度依赖性, 而 mTOR 被抑制 (虽然低浓度的 Evo 也能激活 AMPK, 但其效应不足以抑制 mTOR 的活性), 进而导致了自噬的发生, 抑制细胞增殖。

自噬在癌症中的作用具有两面性, 而自噬与凋亡的关系也相当复杂, 而其互补的作用最为常见且被广泛的认同<sup>[14]</sup>。本实验结果证明了在 Evo 对 HCT-116 细胞的自噬或者凋亡功能被阻滞的时候, 另一方面的功能会增加, 这证明在 HCT-116 细胞中, 二者是相辅相成、互相补充的作用。

综上所述, Evo 能够抑制 HCT-116 细胞的增殖、提高其 ROS 的产生, 激活 AMPK 信号通路, 导致自噬的发生。而 Evo 诱导自噬的作用能够与诱导凋亡的作用相互补充, Evo 联合自噬抑制剂能够更好地诱导 HCT-116 细胞凋亡, 而对于有抗凋亡活性的癌细胞可以通过激活自噬发挥抑癌效应, 这为临床治疗相关疾病的用药和治疗手段提供了新的理论基础。

#### 参考文献

- [1] Doubeni C A, Laiyemo A O, Major J M, et al.

- Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: An analysis of over one-half million adults in the NIH-AARP diet and health study [J]. *Cancer*, 2012, 118(14): 3636-3644.
- [2] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. *CA-Cancer J Clin*, 2014, 64(2): 104-117.
- [3] Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, *et al.* Autophagy modulation in cancer: Current knowledge on action and therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/8023821.
- [4] Jiang J L, Hu C P. Evodiamine: A novel anti-cancer alkaloid from *Evodia rutaecarpa* [J]. *Molecules*, 2009, 14(5): 1852-1859.
- [5] 王 强, 王志敏. 吴茱萸碱抑制 Wnt 通路诱导人胰腺癌细胞凋亡和自噬的作用研究 [J]. *全科医学临床与教育*, 2015, 13(4): 368-371.
- [6] Mrakovcic M, Fröhlich L F. p53-Mediated molecular control of autophagy in tumor cells [J]. *Biomolecules*, 2018, doi: 10.3390/biom8020014.
- [7] Anna K M, Andrea P, Maria L C G, *et al.* Induction of autophagy promotes the growth of early preneoplastic rat liver nodules [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5788-5799.
- [8] Yoshii S R, Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy [J]. *Inter J Mol Sci*, 2017, doi: 10.3390/ijms18091865.
- [9] Jang E J, Sang C K, Lee J H, *et al.* Fucoxanthin, the constituent of *Laminaria japonica*, triggers AMPK-mediated cytoprotection and autophagy in hepatocytes under oxidative stress [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, doi: 10.1186/s12906-018-2164-2.
- [10] Wang R, Deng D, Shao N. Evodiamine activates cellular apoptosis through suppressing PI3K/AKT and activating MAPK in glioma [J]. *Oncotarget Ther*, 2018, doi: 10.2147/OTT.S155275.
- [11] Hong S P, Leiper F C, Woods A, *et al.* Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases [J]. *P Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(15): 8839-8843.
- [12] Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, *et al.* A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome [J]. *Duodecim*, 1998, 114(7): 667-668.
- [13] Holczer M, Besze B, Zámbo V, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) promotes autophagy-dependent survival via influencing the balance of mTOR-AMPK pathways upon endoplasmic reticulum stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/6721530.
- [14] Song Y, Zhang P, Sun Y, *et al.* AMPK activation-dependent autophagy compromises oleanolic acid-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(40): 67942-67954.