

1, 25-二羟维生素 D₃ 对人结肠癌细胞凋亡和自噬的影响及机制研究

李祎龙, 雷 凯, 张小昭, 丁敬健, 张升涛, 乔 伟, 郭永峰

(陕西省西安市第九医院 普外一科, 陕西 西安, 710054)

摘要:目的 观察 1, 25-二羟维生素 D₃ [1, 25-(OH)₂D₃] 对人结肠癌 HCT-116 细胞凋亡和自噬的影响并初步探讨其机制。方法 体外培养人结肠癌细胞 HCT-116, 分成对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和联合组 [1, 25-(OH)₂D₃ 高剂量联合腺苷单磷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 抑制剂] 共 5 组, 观察并比较各组细胞凋亡和自噬情况。结果 低剂量组、中剂量组、高剂量组的 HCT-116 细胞凋亡程度、自噬程度及 cleaved Caspase3、cleaved Caspase8、LC3 II/LC3 I、Beclin-1、p-AMPK 蛋白表达水平高于对照组, p-mTOR 蛋白表达水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。联合组的 HCT-116 细胞凋亡程度、自噬程度及 cleaved Caspase3、cleaved Caspase8、LC3 II/LC3 I、Beclin-1、p-AMPK 蛋白表达水平低于高剂量组, p-mTOR 蛋白表达水平高于高剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 1, 25-(OH)₂D₃ 可通过调控 AMPK/mTOR 信号通路增强结肠癌细胞凋亡和自噬, 发挥抗肿瘤作用。

关键词: 1, 25-二羟维生素 D₃; 结肠癌; 细胞凋亡; 自噬; AMPK/mTOR 信号通路

中图分类号: R 735.3; R 574.62 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2021)13-005-05 DOI: 10.7619/jcmp.20211388

Study in effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on apoptosis and autophagy of colon cancer cells and its mechanism

LI Yilong, LEI Kai, ZHANG Xiaozhao, DING Jingjian, ZHANG Shengtao, QIAO Wei, GUO Yongfeng

(First Department of General Surgery, Xi'an Ninth Hospital in Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi, 710054)

Abstract: Objective To observe the effects of 1, 25 dihydroxyvitamin D₃ [1, 25-(OH)₂D₃] on apoptosis and autophagy of human colon cancer HCT116 cells and explore its mechanism. **Methods** HCT-116 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, low-dose group, medium-dose group, high-dose group and combined group [high-dose 1, 25-(OH)₂D₃ combined with adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) inhibitor]. Apoptosis and autophagy were observed and compared in each group. **Results** The degrees of apoptosis and autophagy, the expression levels of cleaved Caspase 3, cleaved Caspase 8, LC3 II/LC3 I, Beclin-1 and p-AMPK proteins in HCT-116 cells in low-dose group, medium-dose group and high-dose group were significantly higher, and the expression level of p-mTOR protein was significantly lower compared with those in the control group ($P < 0.05$). The degrees of apoptosis and autophagy, the expression levels of cleaved Caspase 3, cleaved Caspase 8, LC3 II/LC3 I, Beclin-1 and p-AMPK proteins in HCT-116 cells in the combined group were significantly lower, while the expression level of p-mTOR protein was significantly higher compared with those in the high-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** 1, 25-(OH)₂D₃ can enhance apoptosis and autophagy of colon cancer cells by regulating AMPK/mTOR signaling pathway thereby playing anti-tumor roles.

Key words: 1, 25-dihydroxyvitamin D₃; colon cancer; apoptosis; autophagy; AMPK/mTOR signaling pathway

结肠癌是一种普遍存在于发达国家和发展中国家的常见恶性肿瘤,在全世界与癌症相关的死亡原因中排名第 2 位,占有所有癌症的 10% ~ 15%^[1]。细胞凋亡是对抗癌症的重要防御机制,可导致潜在的有害细胞死亡^[2]。自噬可能在癌症的发生和进展中发挥不同的作用,同时也可能在肿瘤生长的不同阶段促进或抑制细胞增殖^[3-4]。在应激反应中,自噬调节是由激酶介导的,如哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和腺苷单磷酸活化蛋白激酶(AMPK)^[5]。WEI Q 等^[6]研究发现,山楂酸可通过 AMPK/mTOR 信号通路抑制结肠肿瘤的发生。1, 25-二羟维生素 D₃ [1, 25-(OH)₂D₃]作为一种多效激素,除具有对钙和磷酸盐代谢以及骨骼生物学的经典调节作用外,还具有抗增殖、促凋亡和促分化等作用,这些作用表明 1, 25-(OH)₂D₃ 具有显著的抗癌活性^[7-9]。相关研究^[10]发现,1, 25-(OH)₂D₃ 对结肠癌有保护作用,但其作用机制尚不明确。本研究以 HCT-116 人结肠癌细胞为模型,观察 1, 25-(OH)₂D₃ 对细胞凋亡和自噬的影响,并通过 AMPK/mTOR 通路探究其作用机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人结肠癌细胞 HCT-116 购自中国科学院细胞库。1, 25-(OH)₂D₃, 货号 705942, 购自美国 Sigma 公司。Dorsomorphin(AMPK 抑制剂), 货号 ab120843, 购自美国 Abcam 公司。Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒, 序号 G003-1-2, 购自南京建成生物工程研究所。cleaved Caspase 3 一抗(货号 9664), cleaved Caspase 8 一抗(货号 8592), LC3A/B 一抗(货号 12741), Beclin-1 一抗(货号 3495), mTOR 一抗(货号 2983), p-mTOR 一抗(货号 5536), 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(货号 7074), 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。AMPK 一抗, 货号 MA5-15815; p-AMPK 一抗, 货号 44-1150G, 购自美国 Thermo Fisher Science 公司。

1.2 实验仪器

二氧化碳细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 流式细胞仪(ZS-AE7S)购自中生(苏州)医疗科技有限公司, 凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养: 人结肠癌细胞 HCT-116 用含有 10% 胎牛血清和青链霉素(100 U/mL)的 RPMI-1640 培养基培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中。将细胞培养至生长对数期用于后续实验。

1.3.2 分组及给药: 经前期预实验筛选 1, 25-(OH)₂D₃ 对 HCT-116 细胞的处理浓度, 分为 5 组, 即对照组(正常培养基培养)、低剂量组[1, 25-(OH)₂D₃ 10 nmol/L]、中剂量组[1, 25-(OH)₂D₃ 100 nmol/L]、高剂量组[1, 25-(OH)₂D₃ 1 000 nmol/L]和联合组[1, 25-(OH)₂D₃ 1 000 nmol/L 加 AMPK 抑制剂 Dorsomorphin 10 μmol/L]。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡情况: 将生长对数期的 HCT-116 细胞(1 × 10⁶ 个/mL)取 1 mL 接种于 6 孔板中, 于 37 °C 孵育 24 h。不同组别采用相应浓度的 1, 25-(OH)₂D₃ 和 Dorsomorphin 处理, 再连续培养 48 h, 收集细胞, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒的方案进行检测。应用流式细胞仪检测细胞, 以 FlowJo 软件分析数据。

1.3.4 透射电镜观察细胞自噬情况: 根据 1.3.3 方法处理细胞, 收集药物处理后的细胞, 胰蛋白酶处理, 用 2.5% 磷酸盐缓冲的戊二醛固定 30 min, 再固定在 1% 四氧化锇中。将细胞包埋、切片, 用乙酸铀酰和柠檬酸铅双重染色, 并应用 JEM-1200EX 透射电子显微镜进行观察。

1.3.5 Western blot(WB)分析凋亡相关蛋白、自噬相关蛋白和 AMPK/mTOR 通路相关蛋白: 根据 1.3.3 方法处理细胞, 用预冷的 PBS 洗涤经药物处理后的 HCT-116 细胞, 收集细胞, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白, 以 BCA 法检测蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转膜, 加一抗(Caspase 3、Caspase 8、LC3 I、LC3 II、Beclin-1、p-AMPK、AMPK、mTOR、p-mTOR, 稀释比例为 1: 1 000), 4 °C 孵育过夜, 洗膜加二抗, 在 37 °C 条件下孵育 1 h, 曝光显色。以 β-actin 为内参蛋白, 分析各蛋白的相对表达量。

1.4 统计学分析

本研究所得数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1, 25-(OH)₂D₃ 对 HCT-116 细胞凋亡的影响

低剂量组、中剂量组、高剂量组的 HCT-116 细胞凋亡率均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组的 HCT-116 细胞凋亡率低于高剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。联合组的 HCT-116 细胞凋亡率与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、表 1。

2.2 1, 25-(OH)₂D₃ 对 HCT-116 细胞自噬情况的影响

与对照组相比, 低剂量组、中剂量组、高剂量组存在更高水平的自噬; 与高剂量组相比, 联合组的 HCT-116 细胞自噬程度降低。见图 2。

2.3 1, 25-(OH)₂D₃ 对 HCT-116 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

低剂量组、中剂量组、高剂量组的 cleaved Caspase3、cleaved Caspase8 蛋白表达水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组的

cleaved Caspase3、cleaved Caspase8 蛋白表达水平低于高剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3、表 2。

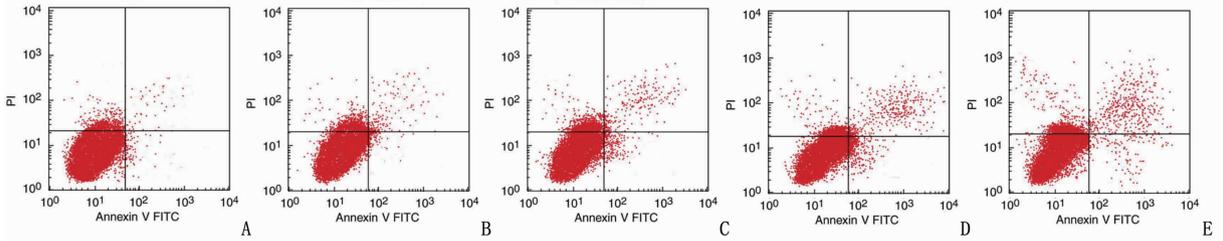
2.4 1, 25-(OH)₂D₃ 对 HCT-116 细胞自噬相关蛋白表达的影响

低剂量组、中剂量组、高剂量组的 LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白表达水平高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组的 LC3 II/LC3 I、Beclin-1 蛋白表达水平低于高剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4、表 3。

表 1 各组 HCT-116 细胞凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

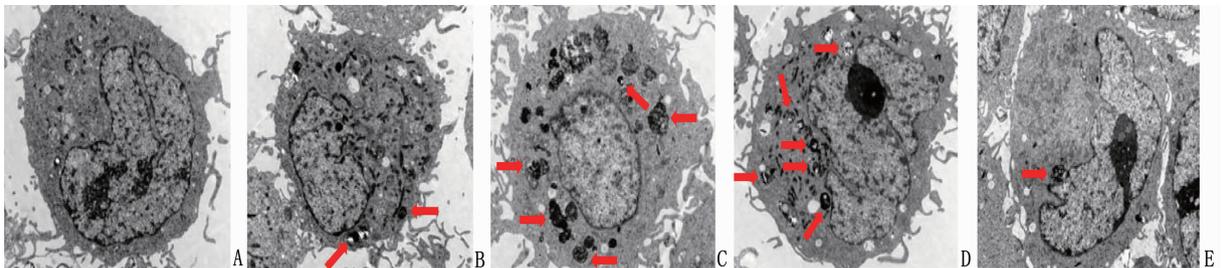
组别	n	细胞凋亡率/%
对照组	6	4.63 ± 1.08
低剂量组	6	15.03 ± 1.17*
中剂量组	6	21.42 ± 1.26*#
高剂量组	6	27.18 ± 1.19*#△
联合组	6	6.23 ± 1.04▲

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$; 与中剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与高剂量组比较, ▲ $P < 0.05$ 。



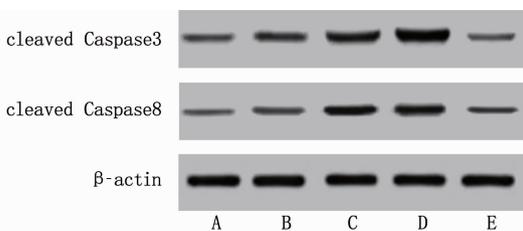
A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; E: 联合组。

图 1 流式细胞仪对各组 HCT-116 细胞凋亡情况的检测结果



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; E: 联合组。

图 2 电镜检测各组 HCT-116 细胞自噬情况 (放大倍数 30 000 倍)



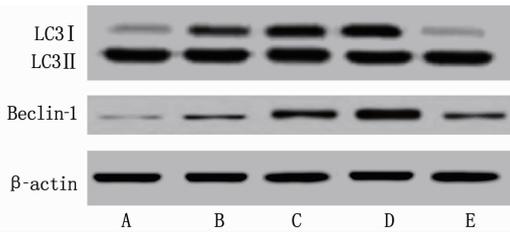
A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组; E: 联合组。

图 3 凋亡相关蛋白的 WB 结果

表 2 各组 HCT-116 细胞凋亡相关蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cleaved Caspase3/ β-actin	cleaved Caspase8/ β-actin
对照组	6	0.21 ± 0.07	0.16 ± 0.08
低剂量组	6	0.46 ± 0.10*	0.39 ± 0.13*
中剂量组	6	0.77 ± 0.12*#	0.75 ± 0.14*#
高剂量组	6	0.98 ± 0.14*#△	0.97 ± 0.11*#△
联合组	6	0.23 ± 0.08▲	0.19 ± 0.07▲

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$; 与中剂量组比较, △ $P < 0.05$; 与高剂量组比较, ▲ $P < 0.05$ 。



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组;
D: 高剂量组; E: 联合组。

图 4 自噬相关蛋白的 WB 结果

表 3 各组 HCT-116 细胞自噬相关蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LC3 II / LC3 I	Beclin-1 / β -actin
对照组	6	0.34 \pm 0.08	0.15 \pm 0.06
低剂量组	6	0.56 \pm 0.07*	0.33 \pm 0.10*
中剂量组	6	0.82 \pm 0.11*#	0.86 \pm 0.15*#
高剂量组	6	1.01 \pm 0.15*# Δ	1.12 \pm 0.14*# Δ
联合组	6	0.42 \pm 0.06 \blacktriangle	0.42 \pm 0.09 \blacktriangle

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$;
与中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与高剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

2.5 1, 25-(OH)₂D₃ 对 HCT-116 细胞

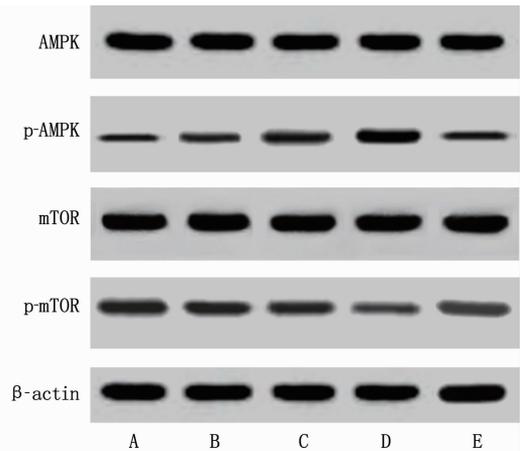
AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

低剂量组、中剂量组、高剂量组的 p-AMPK/AMPK 蛋白水平高于对照组, p-mTOR/mTOR 蛋白水平低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 联合组的 p-AMPK/AMPK 蛋白水平低于高剂量组, p-mTOR/mTOR 蛋白水平高于高剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 5、表 4。

3 讨论

结肠癌是世界范围内最常见的消化系统恶性肿瘤, 临床常选择手术、放疗、化疗等方法治疗结肠癌^[11]。尽管结肠癌的治疗已经取得进展, 但结肠癌的复发率和病死率仍然很高。1, 25-(OH)₂D₃ 是具有强大抗癌活性的激素, 具有广泛的抗肿瘤谱^[12]。近年来, 学者们对 1, 25-(OH)₂D₃ 在肿瘤中的作用机制开展了大量研究, 并揭示了其作用的一些潜在分子机制, 本研究则观察了 1, 25-(OH)₂D₃ 对人结肠癌 HCT-116 细胞凋亡和自噬的影响并初步探讨其机制。

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是细胞维持生命活动的重要过程^[13]。细胞凋亡被认为是有效的抗癌治疗方案的关键。1, 25-(OH)₂D₃ 可上调 p53 并调节其下游线粒体介导的凋亡途径, 发挥抑制人肝癌细胞增殖和诱导其凋亡的作用^[14]。LEE J 等^[15]研究发现, 1, 25-(OH)₂D₃ 可通过上调 FOXO3 抑制肾癌细胞的肿瘤活性, 促进细胞凋



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组;
D: 高剂量组; E: 联合组。

图 5 AMPK/mTOR 通路相关蛋白的 WB 结果

表 4 各组 HCT-116 细胞 AMPK/mTOR 通路
相关蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR
对照组	6	0.26 \pm 0.08	0.96 \pm 0.15
低剂量组	6	0.46 \pm 0.10*	0.70 \pm 0.12*
中剂量组	6	0.67 \pm 0.11*#	0.51 \pm 0.09*#
高剂量组	6	0.98 \pm 0.14*# Δ	0.31 \pm 0.08*# Δ
联合组	6	0.31 \pm 0.07 \blacktriangle	0.86 \pm 0.11 \blacktriangle

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与低剂量组比较, # $P < 0.05$;
与中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与高剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

亡。Caspase 家族是哺乳动物中程序性细胞死亡的“发起者”和“执行者”。Caspase 启动子首先被凋亡信号激活, 然后激活下游级联的 Caspase 效应分子; 细胞中的一系列底物被特异性地水解, 最后导致细胞解体。Caspase-3 是最重要的凋亡效应分子, 其位于每个凋亡信号传导途径的中心。Caspase-3 激活后, 细胞死亡是不可避免的^[16-17]。本研究 WB 结果显示, 1, 25-(OH)₂D₃ 处理显著上调 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-8 表达, 诱导 HCT-116 细胞凋亡, 这与 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术结果一致, 表明 1, 25-(OH)₂D₃ 可刺激 Caspase-3、Caspase-8 蛋白激活, 增强结肠癌 HCT-116 细胞凋亡。

自噬是一个关键的细胞过程, 通常保护细胞和生物体免受营养缺乏等应激源的影响, 除了在正常生理过程中的作用外, 还在癌症等病理过程中发挥重要作用。相关研究^[18]发现, 自噬可抑制肿瘤生长, 自噬基因的缺失会导致肿瘤发生。Beclin-1 最初被鉴定为肿瘤抑制基因, 是凋亡和自噬之间的关键分子之一, 可通过促进细胞自噬来抑制肿瘤^[19]。当自噬过程开始时, LC3 I

(16 kDa)被转换为 LC3 II (14 kDa), 通过检测 LC3II/LC3I 水平获得 LC3II/LC3I, 可反映自噬水平^[20]。本研究透射电镜结果证实, 1, 25-(OH)₂D₃ 处理可诱导细胞发生自噬特征的改变。WB 结果显示, 1, 25-(OH)₂D₃ 可上调 Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达, 表明 1, 25-(OH)₂D₃ 可增强 HCT-116 细胞自噬诱导。

AMPK 作为一种能量传感器, 具有调节细胞代谢和稳态、促进自噬等功能, 而 mTOR 为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 可调节细胞生长、增殖、运动和生存, 是自噬的抑制剂^[5]。AMPK/mTOR 作为与细胞自噬相关的信号传导途径, 与肿瘤抑制作用密切相关。WANG F 等^[21] 研究发现, 通过激活 AMPK-mTOR-ULK1 轴增强自噬, 天然植物提取物 10-羟基喜树碱可促进人膀胱癌细胞凋亡。百里香亦可通过 AMPK/mTOR 信号通路诱导自噬, 抑制肾癌细胞的转移^[22]。本研究结果发现, HCT-116 细胞经 1, 25-(OH)₂D₃ 处理后, AMPK 磷酸化水平升高, mTOR 磷酸化水平降低, 表明 1, 25-(OH)₂D₃ 可促进 AMPK 蛋白激活, 抑制 mTOR 蛋白激活。此外, 在 AMPK 抑制剂的作用下, 1, 25-(OH)₂D₃ 诱导的结肠癌细胞凋亡和自噬作用减弱, 表明 1, 25-(OH)₂D₃ 通过调控 AMPK/mTOR 信号通路改变结肠癌细胞凋亡和自噬。

综上所述, 1, 25-(OH)₂D₃ 可通过调控 AMPK/mTOR 信号通路增强结肠癌细胞凋亡和自噬, 发挥抗肿瘤作用。然而, 结肠癌细胞的自噬过程比较复杂, 仍有很多作用机制尚未阐明, 未来还需进一步深入研究。

参考文献

[1] WEN J, MIN X, SHEN M, *et al.* ACLY facilitates colon cancer cell metastasis by CTNBN1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 401–413.

[2] ZHOU P, WANG C, HU Z, *et al.* Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial-to-mesenchymal via a Notch1/NF-κB/slugg/E-cadherin pathway [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 813–823.

[3] KOCATURK N M, AKKOC Y, KIG C, *et al.* Autophagy as a molecular target for cancer treatment [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 134: 116–137.

[4] AMARAVADI R K, KIMMELMAN A C, DEBNATH J. Targeting autophagy in cancer: recent advances and future directions [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(9): 1167–1181.

[5] ZHAO W, ZHANG L, CHEN R, *et al.* SIRT3 protects against acute kidney injury via AMPK/mTOR-regulated autophagy [J]. *Front Physiol*, 2018, 9(1): 1526–1536.

[6] WEI Q, ZHANG B, LI P, *et al.* Maslinic acid inhibits colon

tumorigenesis by the AMPK-mTOR signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(15): 4259–4272.

[7] CAI L J, LUO L F, TANG Z M, *et al.* Combined antitumor effects of 1, 25-dihydroxy vitamin D₃ and Notch inhibitor in liver cancer [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(3): 1515–1524.

[8] LI B, LV L, LI W. 1, 25-Dihydroxy vitamin D₃ inhibits the Ras-MEK-ERK pathway and regulates proliferation and apoptosis of papillary thyroid carcinoma [J]. *Steroids*, 2020, 159(1): 108585–108612.

[9] SUN H Y, JIANG C W, CONG L L, *et al.* CYP24A1 inhibition facilitates the antiproliferative effect of 1, 25(OH)₂D₃ through downregulation of the WNT/β-catenin pathway and methylation-mediated regulation of CYP24A1 in colorectal cancer cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2018, 37(9): 742–749.

[10] FERRER-MAYORGA G, LARRIBA M J, CRESPO P, *et al.* Mechanisms of action of vitamin D in colon cancer [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 185: 1–6.

[11] JIANG F, ZHOU J Y, ZHANG D, *et al.* Artesunate induces apoptosis and autophagy in HCT116 colon cancer cells, and autophagy inhibition enhances the artesunate induced apoptosis [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1295–1304.

[12] VANOIRBEEK E, KRISHNAN A, EELLEN G, *et al.* The anti-cancer and anti-inflammatory actions of 1, 25(OH)₂D₃ [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(4): 593–604.

[13] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 582–592.

[14] HUANG J, YANG G, HUANG Y, *et al.* 1, 25(OH)₂D₃ induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and inhibited their growth in a nude mouse xenograft model by regulating histone deacetylase 2 [J]. *Biochimie*, 2018, 146: 28–34.

[15] LEE J, PARK S H. Tumor-suppressive activity of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ against kidney cancer cells via up-regulation of FOXO3 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(10): 1947–1953.

[16] XU X, LAI Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(1): BSR20180992–BSR20181009.

[17] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2018, 36: 489–517.

[18] KIMMELMAN A C, WHITE E. Autophagy and tumor metabolism [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(5): 1037–1043.

[19] DING G B, SUN J, WU G, *et al.* Robust anticancer efficacy of a biologically synthesized tumor acidity-responsive and autophagy-inducing functional beclin 1 [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10(6): 5227–5239.

[20] CAO Y, LUO Y, ZOU J, *et al.* Autophagy and its role in gastric cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 489: 10–20.

[21] WANG F, CAO M, FAN M, *et al.* AMPK–mTOR–ULK1 axis activation-dependent autophagy promotes hydroxycamptothecin-induced apoptosis in human bladder cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(5): 4302–4315.

[22] ZHANG Y, FAN Y, HUANG S, *et al.* Thymoquinone inhibits the metastasis of renal cell cancer cells by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(12): 3865–3873. (本文编辑: 陆文娟)