

# 一种新的咪唑通过 AMPK/mTOR 途径 诱导肿瘤细胞自噬

马梦娇, 金 冬, 张广芹, 于晓璐, 温传俊

(南京师范大学生命科学学院, 分子细胞生物学研究所, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 自噬与肿瘤的发生有着密切的关系. 通过防止受损蛋白质和细胞器的毒性积累, 自噬限制氧化应激、慢性组织损伤和致癌信号传导, 抑制癌症的发生, 这表明了自噬激活在癌症预防和治疗中的作用. 研究发现一种新的咪唑, 命名为 NO.143. 利用胰腺癌细胞 PANC-1 为模型, 用 MTS 检测不同浓度 NO.143 对细胞活力的影响, 共聚焦显微镜观察自噬荧光点, Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3B、ATG13、p62 的表达情况, 以及 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白的表达情况. 结果表明, NO.143 呈现浓度依赖性地抑制肿瘤细胞的增殖. NO.143 能够明显增加细胞中自噬荧光斑点、LC3B 表达、ATG13 的含量和 p62 的降解, 表明 NO.143 能够显著上调肿瘤细胞的自噬. 进一步研究显示, NO.143 能够增加 AMPK $\alpha$  的磷酸化水平, 降低哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 和 S6 的磷酸化水平. 相反的, 在抑制 AMPK $\alpha$  活性后, 这种现象发生逆转. 这些结果都可能表明 NO.143 通过 AMPK/mTOR 信号传导途径诱导肿瘤自噬, 抑制肿瘤细胞的增殖.

**[关键词]** NO.143, 自噬, 肿瘤, LC3B, AMPK/mTOR

**[中图分类号]** Q291 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2020)01-0115-07

## A New Kind of Imidazoles Induces Tumor Cell Autophagy via AMPK/mTOR Pathway

Ma Mengjiao, Jin Dong, Zhang Guangqin, Yu Xiaolu, Wen Chuanjun

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Institute of Molecular and Cell Biology, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Autophagy is closely related to the tumor occurrence. By preventing the accumulation of toxicities in damaged proteins and organelles, autophagy limits oxidative stress, chronic tissue damage and oncogenic signaling, inhibiting the development of cancer. This indicates the role of autophagy activation in cancer prevention and treatment. It was found a new imidazole named NO.143. PANC-1 was used as a model to detect the effect of different concentrations of NO.143 on cell viability by MTS. The autophagy fluorescence spots were observed by confocal microscopy. Western blot was used to detect the expression of autophagy-related proteins LC3B, ATG13, p62 and the expression of AMPK/mTOR signaling pathway-related proteins. The results showed that NO.143 showed a concentration-dependent inhibition of tumor cell proliferation. NO.143 can significantly increase autophagic fluorescent spots in cells, increase LC3B expression, ATG13 content and p62 degradation. These results show that NO.143 can significantly up-regulate autophagy in tumor cells. Further studies showed that NO.143 was able to increase the phosphorylation level of AMPK $\alpha$  and reduce the phosphorylation levels of mammalian rapamycin target protein (mTOR) and S6. Conversely, this phenomenon reverses after inhibiting AMPK $\alpha$  activity. These results may indicate that NO.143 induces tumor autophagy through the AMPK/mTOR signaling pathway and inhibits tumor cell proliferation.

**Key words:** NO.143, autophagy, tumor, LC3B, AMPK/mTOR

自噬是一种复杂的生理过程, 致力于降解和再循环细胞成分, 可以定期更新正常细胞代谢<sup>[1-2]</sup>. 自噬可以去除错误折叠蛋白、无用的生物大分子和细胞中受损的细胞器, 并允许细胞通过降解重复使用它

收稿日期: 2019-06-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (2012104GZ30057).

通讯作者: 温传俊, 副教授, 研究方向: 肿瘤分子细胞生物学. E-mail: wenchuanjun@hotmail.com

们. 自噬在细胞病理过程中也起着重要作用<sup>[3-4]</sup>.

与此同时,越来越多的研究表明自噬与肿瘤有着密切的关系,它在抑制和促进肿瘤发展方面具有双重作用. 正常的自噬水平可以预防恶性肿瘤的发生<sup>[5]</sup>. 当存在各种代谢应激或应激刺激时,肿瘤细胞可通过自噬维持其存活<sup>[6]</sup>;另一方面,自噬激活后可诱导肿瘤细胞自噬死亡<sup>[7]</sup>. 近年来,自噬已被广泛研究作为癌症治疗的新靶点<sup>[8]</sup>.

自噬相关基因(*Atg*)控制自噬过程<sup>[9-10]</sup>. 这些 *Atg* 基因的产物受到哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR, 能量敏感因子 AMPK 和缺氧诱导因子 HIFs 传感机制的影响打开和关闭<sup>[11-12]</sup>. 自噬的分子机制复杂且高度保守. 目前,已发现 mTOR 信号传导途径和磷酸肌醇-3-激酶途径参与自噬活性的调节,并且这些途径的变化导致异常自噬参与肿瘤发生、微生物感染、衰老和其他生理过程. 腺苷 5'-单磷酸(AMP)激活的蛋白激酶(AMPK)是丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶,在真核细胞生物学中作为重要的能量传感器<sup>[13]</sup>. 当缺乏能量或营养素时,ATP/AMP 的比例降低,激活 AMPK,阻断消耗 ATP 的途径,并激活促进 ATP 合成的分解代谢途径,从而调节细胞内能量的供需平衡<sup>[14]</sup>. 以前的研究已经证实,AMPK 可以作为能量传感信号的中继站,并可以将细胞内能量信号聚集到 mTOR 上<sup>[15]</sup>.

研究发现一种新的咪唑化合物(图 1)可以有效诱导肿瘤细胞自噬,并称之为 NO.143. 由于磷酸化 AMPK $\alpha$  水平的显著增加和 S6 磷酸化水平的降低,初步认为该化合物可能通过 AMPK/mTOR 信号通路诱导肿瘤细胞自噬,抑制肿瘤细胞的增殖.

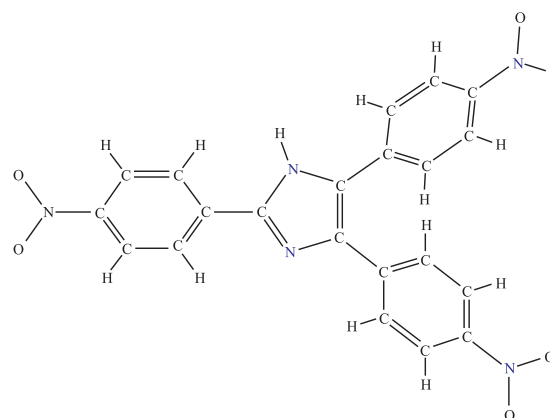


图 1 NO.143 的结构

Fig. 1 The structure of NO.143(2,4,5-tris(4-nitrophenyl)-1H-imidazole)

## 1 实验材料

### 1.1 实验试剂

合成产生 NO.143,纯度大于 98%. 将其粉末形式溶于 DMSO 中,浓度为 10mmol/L,并保存于-20 ℃. Compound C、AICAR 购自 Sigma 公司;高糖 DMEM 和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Gibco 生物公司;100U/ml 青霉素(penicillin)、100U/ml 链霉素(streptomycin)和含 0.25%的 EDTA 胰蛋白酶购自维森特公司;p-AMPK $\alpha$ 、AMPK、p-S6、S6、p-mTOR、mTOR 抗体购自 CST 公司;LC3B、p62、ATG13 抗体购自 ABCAM 公司; $\beta$ -actin 抗体购自迅贝生物科技有限公司,GAPDH 抗体购自巴傲得公司;MTS 试剂购自 Promega 公司;lip2000 购自 Invitroge 公司;ECL 高效发光液购自巴傲得公司.

### 1.2 实验细胞

人胰腺癌导管细胞系(PANC-1),人宫颈癌细胞系(HeLa)均为本实验室保存.

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

将冻存的细胞系从液氮罐中取出,在 42 ℃ 水浴锅中用镊子夹住快速晃动,直至完全融化. 用 75%的酒精消毒移入超净工作台中,打开冻存管将其悬液吸取进提前准备好的含有 7 mL 培养基(含 10%胎牛血清和 1%双抗青霉素和链霉素的 DMEM 完全培养基)的培养皿中,十字交叉法混匀细胞. 在皿盖上注明细胞名称、培养人、日期,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃ 培养箱中培养. 大约 8 h 后,细胞贴壁后用 PBS 清洗并更换掉含有 DMSO 的培养基,此后每天换一次培养液. 当细胞密度达到 80%左右,吸去培养基并用 PBS 清洗,用 1 mL 0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)消化细胞并传代.

### 2.2 体外细胞增殖(MTS)测定

取对数生长期的细胞用胰蛋白酶消化后接种于 96 孔板中(每孔约  $2 \times 10^4$  细胞),分成不同的浓度实验,每组设置 5 个复孔,每孔加入 100  $\mu$ L 培养基,混匀细胞后置于细胞培养箱中. 过夜后更换新鲜培养基,

每孔加入 100  $\mu\text{L}$  培养基和不同浓度的 NO.143. 浓度设置为:0、1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ , 培养 48 h 后,吸掉培养基用 PBS 洗一遍后,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  培养基和 20  $\mu\text{L}$  MTS/PMS(20:3)混合液,继续培养 3 h,在酶标仪上于 490 nm 处测定吸光值(OD 值)。

### 2.3 共聚焦显微镜

GFP-LC3 质粒由前实验室成员构建,携带质粒的酵母储存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 按照 Lip 2000 说明书将质粒转染到 PANC-1 细胞中. 24 h 后,用胰蛋白酶消化细胞,取适量均匀接种到铺有爬片的 24 孔板中,细胞长至 60%~80%时,用不同浓度 NO.143 处理细胞,避光培养 8 h,然后固定爬片,封片,使用共聚焦显微镜观察荧光自噬斑点. 通过使用 Image J 软件的粒子分析工具定量 GFP-LC3 荧光斑点密度。

### 2.4 Western blot 检测相关蛋白

取对数生长期的 PANC-1 细胞接种于 6 孔板中,分为 6 组:用 10  $\mu\text{mol/L}$  的 NO.143 分别处理 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h,弃去培养基,用预冷的 PBS 洗两遍,每孔中加入 150  $\mu\text{L}$  用 RIPA 强裂解液,100 $\times$ PMSF, 10 $\times$ cocktail 配制的裂解液,在冰上裂解 30 min,每隔 5 min 晃动一次,待全部裂解后,收集裂解液 1.5 mL 于离心管中,在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下,用离心机 12 000 r/min 离心 15 min,将上清移入新的离心管中,并加入 5 $\times$ Sample Buffer,涡旋混匀,99  $^{\circ}\text{C}$  煮样 10 min. 10%的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳恒压 80 V,待 Marker 在分离胶上清晰分开后,调节电压至 120 V,待溴酚蓝跑出胶时停止,恒流 350 V、90 min,将其转移到 PVDF 膜上,将膜在 5%的脱脂牛奶中室温封闭 2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育一抗过夜,二抗  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,用 ECL 显色液显色并在凝胶成像系统中曝光成像。

### 2.5 统计分析

使用 Origin 8 软件进行统计. 获得至少 3 次独立实验的所有数据,并表示为平均值 $\pm$ 标准偏差(S.D.). 使用单因素方差分析(ANOVA)分析数据以确定不同组之间的显著差异.  $P$  值 $<0.05$  被认为具有统计学意义。

## 3 结果与讨论

### 3.1 NO.143 抑制癌细胞增殖

将人胰腺导管上皮癌细胞 PANC-1 和宫颈癌 HeLa 细胞系用 NO.143 在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  处理 48 h. 通过酶标仪用 MTS 测定法分析细胞增殖. 如图 2(A,B)所示,NO.143 能抑制 PANC-1、HeLa 的增殖且作用是剂量依赖性的. 在 HepG2 细胞中也可以观察到这些结果,如图 2(E)所示. NO.143 的  $\text{IC}_{50}$  值在 PANC-1 细胞中为 5.25  $\mu\text{mol/L}$ ,在 HeLa 细胞中为 3.27  $\mu\text{mol/L}$ . 这些结果表明 NO.143 能够剂量依赖性抑制不同肿瘤细胞的生长。

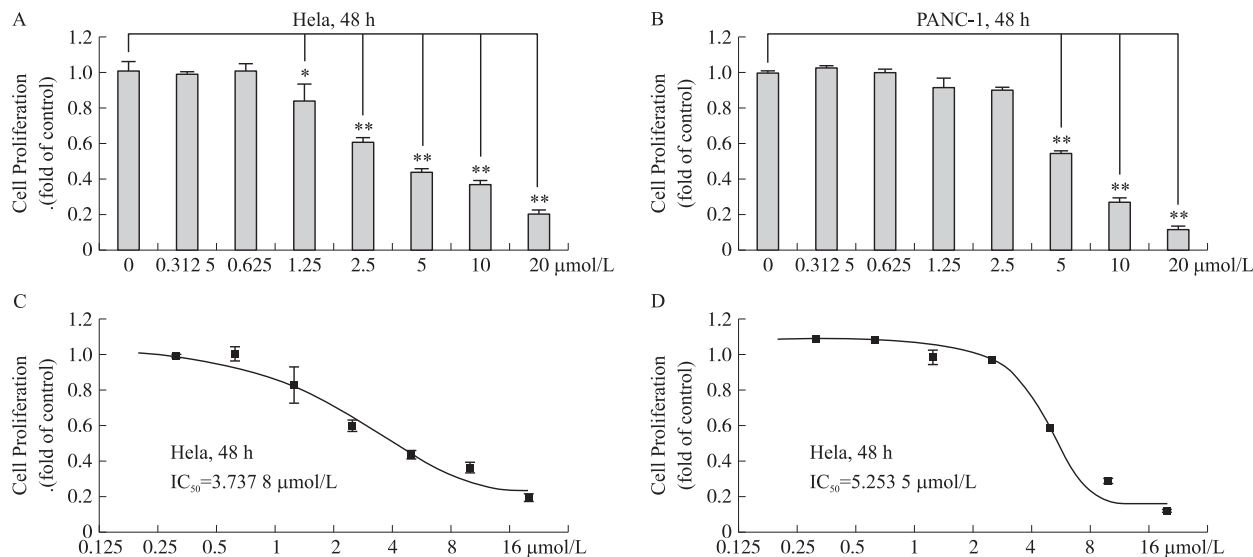
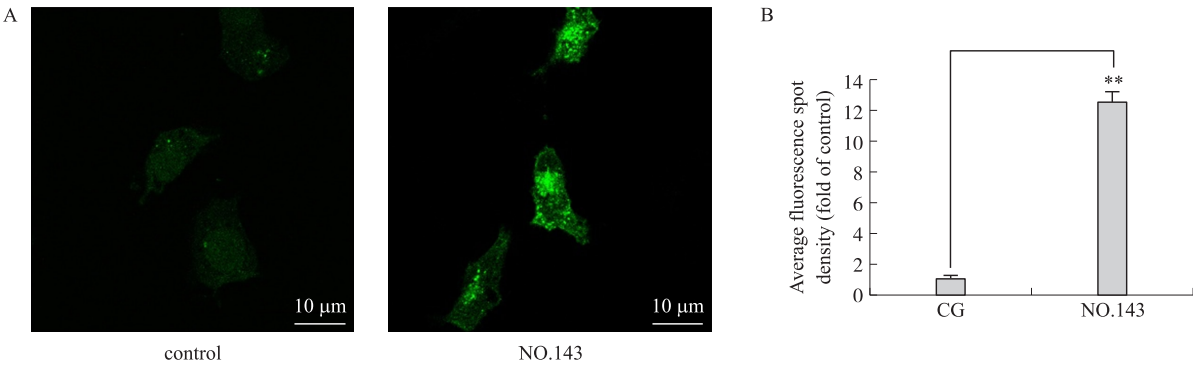


图 A、B 为分别用 0、0.3125  $\mu\text{mol/L}$ 、0.625  $\mu\text{mol/L}$ 、1.25  $\mu\text{mol/L}$ 、2.5  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、20  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 NO.143 处理 PANC-1 和 HeLa 细胞 48 h,MTS 检测,于 490 nm 处检测吸光值. 图 C、D 为拟合曲线,得到 NO.143 在 PANC-1 和 HeLa 细胞中的  $\text{IC}_{50}$  分别为 5.25  $\mu\text{mol/L}$  和 3.74  $\mu\text{mol/L}$ . \*:表示与对照组相比  $P<0.05$ , \*\*:表示与空白对照组相比  $P<0.01$ .

图 2 NO.143 对肿瘤细胞增殖的影响  
Fig. 2 Effect of NO.143 on tumor cell proliferation

3.2 NO.143 诱导肿瘤细胞自噬

自噬发生时,LC3 会参与自噬体的形成,用表达 GFP-LC3 的质粒转染 PANC-1 细胞并监测自噬体的形成. 对照组和 NO.143 治疗组,在 PANC-1 细胞中都可检测到典型的 GFP-LC3 阳性结构. NO.143 处理组的荧光自噬斑点远远多于对照组(图 3). 免疫印迹分析揭示了在 PANC-1 细胞中,LC3BII/LC3BI 的比例随处理时间的增加而显著增加,并显著高于对照组,这恰好验证了之前的实验结果. 同时,ATG13 在 1 h 时也显著增加,然后逐渐下降,并在 12 h 后恢复到正常水平. p62 在 8 h 后逐渐下降并恢复. 这些结果表明 NO.143 可以迅速诱导 PANC-1 细胞自噬并且可以维持更长的时间(图 4).



比例尺为 10 μm. \* 表示与对照组  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$

图 3 10 μmol/L 的 NO.143 处理 PANC-1 细胞 8 h 后细胞内荧光自噬斑点的变化

Fig. 3 Changes in intracellular fluorescence autophagic spots after treatment of PANC-1 cells for 8 h with 10 μmol/L NO.143. Scale is 10 μm

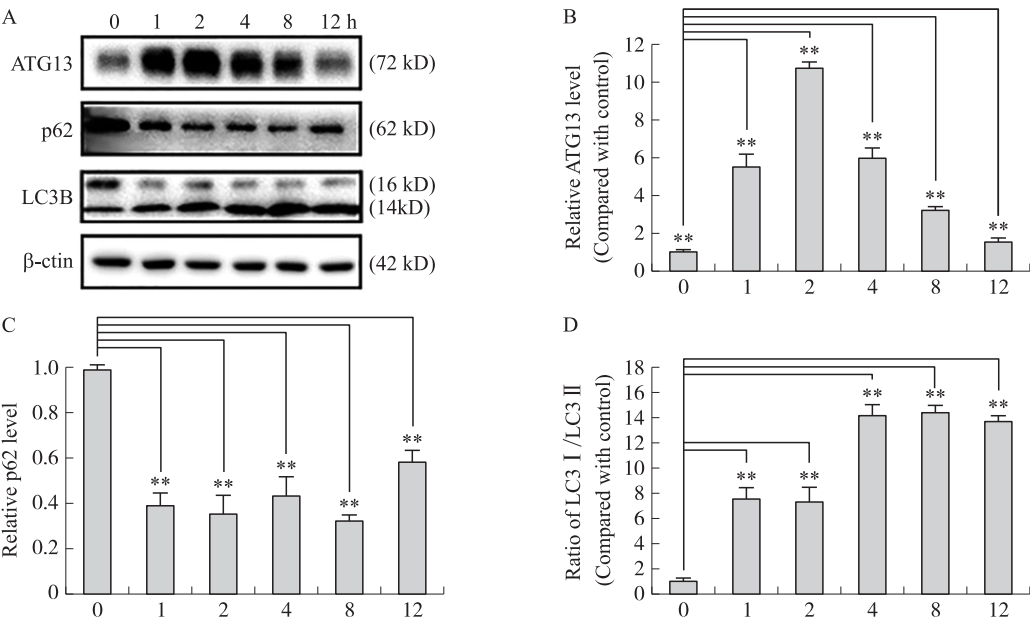


图 4 图 A:10 μmol/L 的 NO.143 分别处理 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 后,自噬通路中相关蛋白的变化. 图 B:ATG13 蛋白含量随着时间梯度的变化. 图 C:p62 蛋白含量随时间梯度的变化. 图 D:LC3-I/LC3-II 比值随时间的变化. \* 表示与对照组  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ .

Fig. 4 A, Changes in related proteins in the autophagy pathway after 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 12 h of treatment with 10 μmol/L NO. 143. B, Protein level of ATG13. C, Protein level of p62. D, Changes in LC3- I /LC3- II ratio over time. \* indicates  $P<0.05$  with the control group, \*\* indicates  $P<0.01$ .

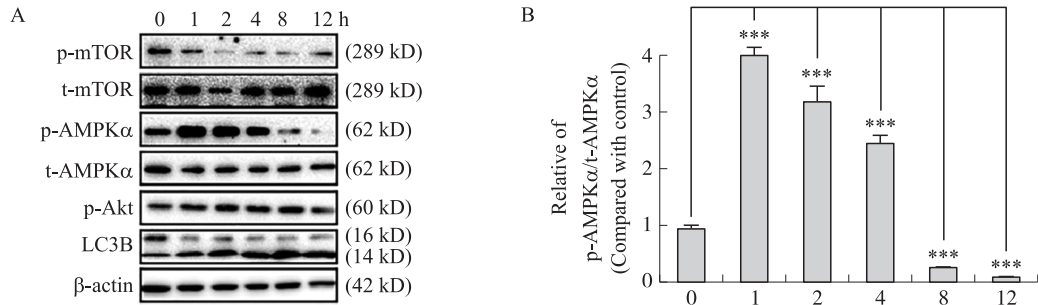
3.3 NO.143 介导的自噬与 AMPK/mTOR 信号传导有关

先前的研究报道发现,AMPK/mTOR 途径在自噬中起着最重要的作用. 因此,在证明自噬相关蛋白的变化后,本实验检测了 PANC-1 细胞中 AMPK 和 mTOR 的表达水平,以确定 NO.143 诱导的自噬的机制.

如图 5 所示,与空白对照组相比,用 NO.143 处理的细胞中磷酸化的 AMPKα 含量在短时间内显著增加,8 h 后恢复到正常水平. 作为 AMPKα 的下游靶蛋白,随着磷酸化 AMPKα 的增加,mTOR 的磷酸化水平



也显著降低.同时,mTOR下游蛋白的S6和4ebp1的磷酸化水平也被显著抑制(图6).作为mTOR上游的另一个重要激酶,AKT的磷酸化水平的变化不显著.这表明在NO.143诱导的肿瘤细胞自噬中AMPK/mTOR的信号通路起重要作用.



A:用10 μmol/L NO.143 分别处理 PANC-1 细胞 1 h、2 h、4 h、8 h、12 h. 图 B:NO.143 处理组细胞中 LC3-II/LC3-I 比值随处理时间的变化. \* 表示与对照组  $P<0.05$ , \*\* 表示  $P<0.01$ .

图5 mTOR 信号通路中不同蛋白表达量的变化

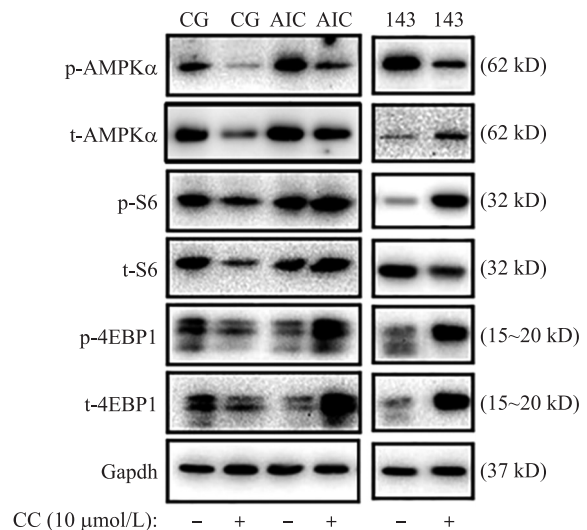
Fig. 5 Expression level of different proteins in the mTOR signaling pathway

### 3.4 NO.143 介导的自噬依赖 AMPK

为了验证 NO.143 是如何通过 AMPK/mTOR 信号发挥作用的. 本实验在 6 孔板中接种 PANC-1 细胞,并向每个孔中加入 10 μmol/L NO.143. 一组加入 Compound C. Dorsomorphin (Compound C) 2HCl 是一种有效的、可逆的选择性 AMPK 抑制剂. 此外,还使用 AMPK 激活剂 AICAR 作为阳性对照.

当加入 CC 时,阳性对照组和 NO.143 处理组中磷酸化 AMPKα 的水平显著降低,并且 mTOR 的下游靶蛋白 p-S6 和 p-4EBP1 的水平也显著增加(图6). 这进一步证明 AMPK 在 NO.143 诱导的自噬中起关键作用.

LKB1 和 CAMKK 是 AMPK 最重要的两种上游激酶. 根据文献,在 HeLa 细胞中缺失 LKB1. 因此,本实验在 HeLa 细胞中用 NO.143 处理以观察 AMPK 的活化. 如图 7A 所示,在 HeLa 细胞中,NO.143 仍然可以激活 AMPKα,并且 mTOR 下游的 S6 的磷酸化水平也被显著抑制,说明 LKB1 并不是 NO.143 激活 AMPK 所必需的激酶. STO-609 是 CAMKK 的特异性抑制剂,可有效抑制 CAMKK 的活性. 加入 STO-609 后,NO.143 治疗组中 AMPKα 的磷酸化水平降低(图 7C). 据此推测,CAMKK 可能是 NO.143 激活 AMPKα 的一种相对重要的激酶.



CC (10 μmol/L): - + - + - +  
CC 在药物处理前 1 h 加入,之后分别用 1 mmol/L AICAR、10 μmol/L NO.143 处理 PANC-1 细胞 4 h.

图6 加入 AMPK 抑制剂后信号通路中各个蛋白的变化情况  
Fig. 6 Protein level in the signal pathway after addition of AMPK inhibitors

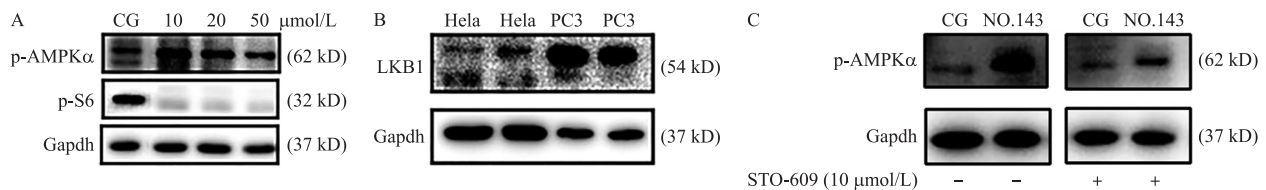


图7 图 A:HeLa 细胞用 10 μmol/L、20 μmol/L、50 μmol/L NO.143 处理 4 h 后 p-AMPK 和 p-S6 的变化. 图 B:HeLa 细胞中 LKB1 含量,PC3 细胞为 LKB1 阳性对照. 图 C:PANC-1 细胞中用 10 μmol/L NO.143 处理 4 h,STO-609 在加药前 1 h 加入.

Fig. 7 A,Protein level of p-AMPK and p-S6 in HeLa cells treated with 10 μmol/L, 20 μmol/L, 50 μmol/L NO.143 for 4 h. B,PANC-1 cells were treated with 10 μmol/L PQQ and NO.143, respectively, for 4 h and STO-609 was added 1 h before dosing. C,LKB1 levels in HeLa cells,PC3 cells is positive LKB1 control.

## 4 结论

研究报道,失调的自噬与许多疾病有关,包括神经退行性疾病、心肌病、传染病、II 型糖尿病、脂肪肝和癌症. 最近,自噬已被鉴定为包括癌症在内的许多疾病的治疗干预的靶标<sup>[16]</sup>. 当细胞处于应激状态时, DNA 和蛋白质受损,尽管自噬可以消除或修复它,然后在短时间内维持细胞稳态. 然而,如果自噬进一步增强,过度激活的自噬将损害肿瘤细胞的功能,并最终抑制肿瘤细胞的生长和增殖. 本实验从一定程度上验证了这个观点.

研究显示,AMPK 还可作为细胞存活或死亡的关键调节因子,以应对各种病理应激,包括氧化应激、内质网应激、缺氧和渗透应激<sup>[17]</sup>. AMPK 激活可调节肿瘤抑制基因 *p53*、*mTOR*、*ULK1* 和其他参与自噬的下游信号分子活性<sup>[18-19]</sup>. 本实验结果显示,NO.143 能够显著上调 AMPK 的磷酸化水平. AMPK 的磷酸化能够激活下游信号传导,mTOR 受到抑制并触发自噬,这与启动分解代谢过程的 AMPK 功能一致<sup>[17,20]</sup>. 数据显示,由于 AICAR 处理,AMPK 活化后 mTOR 及其下游靶标和 4EBP-1 的活性受到抑制. 相反,用 Compound C 预处理可以减弱 NO.143 诱导的 mTOR 及其下游靶标的抑制.

NO.143 是咪唑化合物,咪唑环是产生组胺、组氨酸生物活性并在生物体中起生理作用的重要基团. 目前,许多咪唑化合物已被临床用作抗癌药物,如甘氨酸双唑钠、法曲唑、达卡巴嗪、替莫唑胺等<sup>[22-23]</sup>. NO.143 通过上调自噬来抑制肿瘤细胞的生长,其关键机制可能是激活 AMPK. 这些提示 NO.143 可以通过自噬作为肿瘤治疗的潜在药物. 此外,NO.143 结构中存在 3 个硝基,是否通过产生活性自由基(ROS)激活 AMPK,有待进一步研究. NO.143 能否在动物模型中具有抑癌作用是下一步研究的重点.

## [参考文献]

- [1] GUO J Y, WHITE E. Autophagy, metabolism and cancer[J]. Cold spring harbor symposia on quantitative biology, 2016, 81: 73-78.
- [2] RAVANAN P, SRIKUMAR I F, TALWAR P. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses[J]. Life sciences, 2017, 188: 53-67.
- [3] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism[J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2891-2906.
- [4] LORENTE J, VELANDIA C, LEAL J A, et al. The interplay between autophagy and tumorigenesis: exploiting autophagy as a means of anticancer therapy[J]. Biological reviews, 2018, 93(1): 152-165.
- [5] LEVINE B. Cell biology: autophagy and cancer[J]. Nature, 2007, 446(7137): 745-747.
- [6] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [7] CHEN S, HAN Q, WANG X, et al. IBP-mediated suppression of autophagy promotes growth and metastasis of breast cancer cells via activating mTORC2/Akt/FOXO3a signaling pathway[J]. Cell death and disease, 2013, 4(10): e842.
- [8] KONDO Y, KONDO S. Autophagy and cancer therapy[J]. Autophagy, 2006, 2(2): 85-90.
- [9] OHSUMI Y. Molecular mechanism of autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences, 1999, 354(1389): 1577-1581.
- [10] KANG M R, KIM M S, OH J E, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability[J]. Journal of pathology, 2010, 217(5): 702-706.
- [11] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. Nature cell biology, 2011, 13(2): 132-141.
- [12] LI X, FAN Z. The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1 $\alpha$  and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex[J]. Cancer research, 2010, 70(14): 5942-5952.
- [13] KAHN B B, ALQUIER T, CARLING D, et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism[J]. Cell metabolism, 2005, 1(1): 15-25.
- [14] KANG S, CHEMALY E R, HAJJAR R J, et al. Resistin promotes cardiac hypertrophy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal kinase/insulin receptor substrate 1 (JNK/IRS1)

- pathways[J]. Journal of biological chemistry,2011,286(21):18465–18473.
- [15] ZHAO Y,DONOHUE D,HUANG E C,et al. Zyflamend,a polyherbal mixture,inhibits lipogenesis and mTORC1 signalling via activation of AMPK[J]. Journal of functional foods,2015(18):147–158.
- [16] SAHA S,PANIGRAHI D P,PATIL S,et al. Autophagy in health and disease;a comprehensive review[J]. Biomedicine & pharmacotherapy,2018,104:485–495.
- [17] HAYASHI T,HIRSHMAN M F,FUJII N,et al. Metabolic stress and altered glucose transport;activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism[J]. Diabetes,2000,49(4):527–531.
- [18] KIM J,KUNDU M,VIOLLET B,et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1[J]. Nature cell biology,2011;13(2):132–141.
- [19] ALERS S,LÖFFLER A S,WESSELBORG S,et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy;cross talk, shortcuts,and feedbacks[J]. Molecular cell biology,2012,32(1):2–11.
- [20] YU Y,HOU L,SONG H,et al. Akt/AMPK/mTOR pathway was involved in the autophagy induced by vitamin E succinate in human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Molecular and cellular biochemistry,2017,424(1):173–183.
- [21] YANG W L,PERILLO W,LIOU D,et al. AMPK inhibitor compound C suppresses cell proliferation by induction of apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells[J]. Journal of surgical oncology,2012,106(6):680–688.
- [22] HARRIS C B,CHOWANADISAI W,MISHCHUK D O,et al. Dietary pyrroloquinoline quinone(PQQ)alters indicators of inflammation and mitochondrial-related metabolism in human subjects[J]. The journal of nutritional biochemistry,2013,24(12):2076–2084.
- [23] PAZ M A,MARTIN P,RUDOLF F,et al. The catalysis of redox cycling by pyrroloquinoline quinone(PQQ),PQQ derivatives, and isomers and the specificity of inhibitors[J]. Analytical biochemistry,1996,238(2):145–149.

[责任编辑:黄 敏]