

转铁蛋白受体对宫颈癌细胞自噬的影响

刘一萌^{1,2}, 赵天南¹, 张维娜¹, 张萍^{1*}

¹青岛市市立医院妇科, 山东 青岛

²青岛大学医学部, 山东 青岛

收稿日期: 2024年5月28日; 录用日期: 2024年6月23日; 发布日期: 2024年6月30日

摘要

目的: 探讨敲低转铁蛋白受体(TFRC)对宫颈癌Hela细胞增殖、迁移和自噬的影响及可能的作用机制。方法: 慢病毒构建敲低TFRC宫颈癌细胞系, 分为空白对照组、TFRC敲低阴性对照组、TFRC敲低组。通过蛋白质印迹验证各组目的基因TFRC、自噬相关蛋白Beclin-1、P62、LC3和细胞外信号调节激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(ERK/AKT/mTOR)信号通路相关蛋白的表达水平。利用CCK8法检测各组细胞增殖活性; 流式细胞术检测各组细胞周期分布; 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力。结果: 与空白对照组相比, TFRC敲低组自噬相关蛋白Beclin-1、LC3蛋白表达水平降低($P < 0.05$), P62蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。p-ERK、p-AKT、p-mTOR蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)。细胞增殖能力减弱($P < 0.05$), 细胞迁移能力被抑制($P < 0.01$), 细胞周期被阻滞在G2/M期($P < 0.01$)。结论: 敲低转铁蛋白受体(TFRC)可能通过抑制ERK/AKT/mTOR信号通路抑制宫颈癌细胞自噬, 进而抑制其增殖、迁移。

关键词

宫颈癌, 转铁蛋白受体, ERK/AKT/mTOR信号通路, 自噬, 细胞增殖, 细胞迁移

Effect of Transferrin Receptor on Autophagy of Cervical Cancer Cells

Yimeng Liu^{1,2}, Tiannan Zhao¹, Weina Zhang¹, Ping Zhang^{1*}

¹Department of Gynecology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong

²Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: May 28th, 2024; accepted: Jun. 23rd, 2024; published: Jun. 30th, 2024

Abstract

Objective: To investigate the effects of knockdown of transferrin receptor on proliferation, migra-

*通讯作者。

文章引用: 刘一萌, 赵天南, 张维娜, 张萍. 转铁蛋白受体对宫颈癌细胞自噬的影响[J]. 临床医学进展, 2024, 14(6): 1694-1701. DOI: 10.12677/acm.2024.1461966

tion and autophagy of HeLa cells of cervical cancer, and to study of possible molecular mechanisms. **Methods:** Lentiviral construction of knockdown TFRC cervical cancer cell lines, and were divided into the blank control group, TFRC knock-down negative control group, TFRC knock-down group. The expression of target gene TFRC, autophagy-related proteins Beclin-1, P62, LC3, and extracellular signal-regulated kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (ERK/AKT/mTOR) signaling pathway-related proteins was detected by Western blotting. The activities of cells in various group were detected by CCK-8 assay. Cell cycle distributions in various group were detected by flow cytometry. Cell migration abilities in various group were detected by cell scratch assay. Observation cellular autophagic vesicles in various group by electron microscopy. **Results:** Compared with the blank control group, the protein expression levels of autophagy-related proteins Beclin-1 and LC3 in cervical cancer cells in TFRC knock-down group decreased ($P < 0.05$), the protein expression levels of P62 increased ($P < 0.05$). The protein expression levels of p-ERK, p-AKT, p-mTOR increased ($P < 0.01$). The proliferation ability of the cells decreased ($P < 0.05$), cell migration capacity decreased ($P < 0.01$), arrest the cell cycle in G2/M phase ($P < 0.01$). **Conclusions:** Knockdown of transferrin receptor (TFRC) may inhibit autophagy of cervical cancer cells by suppressing the ERK/AKT/mTOR signaling pathway, which in turn inhibits their proliferation and migration.

Keywords

Cervical Cancer, Transferrin Receptor, ERK/AKT/mTOR Signaling Pathway, Autophagy, Cell Proliferation, Cell Migration

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

宫颈癌(Cervical Cancer, CC)是中低收入国家中女性癌症死亡的主要原因, 尽管同步放化疗是治疗晚期宫颈癌常规的治疗方式, 但宫颈癌相关死亡率仍然很高[1]。研究表明, 体内铁水平与肿瘤联系密切, 铁蓄积会导致肿瘤的发生、生长和转移。反之, 肿瘤的生长可以通过操纵铁代谢相关蛋白质来调节[2]。转铁蛋白受体(Transferrin Receptor, TFRC)作为铁摄取和细胞生长的重要调节因子, 已被证明为许多肿瘤中的促癌基因。我们前期研究已证实, TFRC 在宫颈癌中呈高表达, 在癌组织中 TFRC 阳性表达率为 73.33%, 而在正常宫颈组织中仅为 25%, 且其高表达与预后不良相关[3]。

自噬作为一种适应性分解代谢过程, 在应对各种代谢压力时被激活。其最重要的生理功能是调动细胞内能量资源, 来满足细胞和生物体对代谢底物的需求, 并消除有缺陷或受损的蛋白质和细胞器, 防止有毒物质积累[4]。自噬通过铁蛋白的吞噬回收铁蛋白复合物来调节铁的生物利用率[5]。自噬功能障碍可以导致多种疾病的发生, 并促进肿瘤生长。在胰腺导管腺癌中, 铁蛋白自噬上调以维持铁的可用性, 从而促进肿瘤进展[6]。在宫颈癌中, 过表达 CCAT1 可能通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制宫颈癌细胞自噬, 促进肿瘤细胞增殖[7]。然而, TFRC 是否能调控宫颈癌细胞自噬尚不清楚。本研究探讨敲低 TFRC 是否影响宫颈癌细胞自噬, 进而影响其增殖和迁移, 并探究其作用机制。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

宫颈癌细胞系 HeLa (由青岛市市立医院细胞移植重点实验室提供), 胎牛血清(FBS)和细胞培养基

(DMEM)购自大连美仑生物有限公司, BCA 试剂盒购自上海爱必信生物科技有限公司, TFRC 抗体、Beclin-1 抗体、P62/SQSTM1 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, ERK 抗体、p-ERK 抗体、AKT 抗体、p-AKT 抗体, mTOR 抗体、p-mTOR 抗体、LC3B 抗体、GAPDH 抗体购自上海艾比玛特医药科技有限公司, 细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 小干扰 siRNA 购自广州市锐博生物科技有限公司, 转染试剂 Lipofectamine2000 购自赛默飞世尔科技中国公司, 慢病毒购自上海吉凯基因科技有限公司。

2.2. 细胞培养及分组

将宫颈癌细胞系 HeLa 放置在含有 10% FBS 和 1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM 中, 37°C, 5% CO₂, 饱和湿度培养, 待细胞密度达到对数生长期时按 1:2 传代及用于后续实验。由锐博生物科技有限公司设计 siRNA 三个敲低位点; 通过上海吉凯基因科技有限公司将敲低效率最高位点构建成敲低 TFRC 的慢病毒, 用于感染细胞。感染后, 用嘌呤霉素筛选细胞, 获得敲低 TFRC 的稳转株。将细胞分为空白对照组、TFRC 敲低阴性对照组、TFRC 敲低组。

2.3. CCK-8 法检测细胞增殖活性

将各组宫颈癌细胞(约 5×10^3 个/孔)接种于 96 孔板, 每组设 6 个复孔。细胞贴壁后培养基继续培养 24、48、72 h, 根据 CCK-8 试剂操作说明, 每孔加入 CCK8 试剂 10 μ l, 培养箱孵育 1.5 h。在波长 450 nm 下, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度, 每组去掉一个最大值、一个最小值, 其余四孔取平均值, 计算相对细胞活力。

2.4. 划痕实验检测细胞迁移能力

先在 6 孔板背面间隔 0.5~1 cm 划线, 接种各组宫颈癌细胞(约 5×10^5 个), 置于培养箱中培养过夜细胞贴壁后。用 10 μ L 枪头垂直划线, 分别于 0、24、48 h 在显微镜下观察、拍照, Image J 软件分析划痕面积。划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 当前划痕面积) \times 100%/0 h 划痕面积。

2.5. 流式细胞术检测细胞周期

收集各组宫颈癌细胞约 2×10^5 个, 用预冷的 PBS 洗涤、离心后弃上清, 将细胞加入 1 ml 预冷的 70% 乙醇中, 吹打混匀, 4°C 固定 2 小时。固定好的细胞再次清洗、离心后弃去上清, 加入配置好的碘化丙啶染色液中 37°C 避光温浴 30 分钟。用流式细胞仪在激发波长 488 nm 波长处检测红色荧光, 同时检测光散射情况。采用 modfit 软件进行分析。

2.6. 采用 Western Blotting 法检测相关蛋白表达

将各组宫颈癌细胞密度培养至为 90% 以上时, 加入 RIPA 中效裂解液和蛋白酶抑制剂后充分裂解, 于 4°C 离心机中 12,000 g 离心 7 min, 取上清, 用 BCA 法检测蛋白浓度, 于剩余上清内加入约 1/4 体积的 5 \times 上样缓冲液与其混合均匀, 100°C 变性 5 min。根据测得的蛋白浓度, 进行电泳。电泳结束后, 转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液中室温封闭 2 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 分别孵育 TFRC (1:1500)、ERK (1:1000)、P-ERK (1:1000)、AKT (1:1000)、p-AKT (1:1000)、m-TOR (1:1000)、p-mTOR (1:1000)、Beclin-1 (1:1000)、P62 (1:1000)、LC3(1:1000)和 GAPDH (1:4000)一抗, 置于 4°C 冰箱中过夜。室温孵育兔/鼠二抗(1:8000) 1 h, 清洗后用 ECL 化学发光法显影。用 GAPDH 作为内参, Image J 软件分析蛋白条带的灰度值, Graphpad Prism 8.0 软件计算各蛋白的相对表达量。

2.7. 统计学分析

本研究采用 Graphpad Prism 8.0 软件分析数据, 所有数据均采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 多组间差异采用单因素方差分析, 两组间差异比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 实验结果

3.1. 敲低 TFRC 对宫颈癌细胞自噬相关蛋白表达的影响

Western Blot 结果显示, TFRC 敲低组 TFRC 蛋白表达量(0.1153 ± 0.01471), 明显低于 TFRC 敲低阴性对照组(0.9364 ± 0.01508), 差异有统计学意义($t = 67.53, P < 0.01$)。TFRC 敲低组自噬相关蛋白 Beclin-1 蛋白表达量(0.5602 ± 0.02051)、LC3II/LC3I 蛋白表达量(0.5482 ± 0.02462)较 TFRC 阴性对照组(0.9030 ± 0.09905)、(0.9286 ± 0.03370)表达降低, P62 蛋白表达量(1.111 ± 0.02134)较 TFRC 阴性对照组(0.9204 ± 0.04766)表达升高, 差异均有统计学意义($t = 5.885, P < 0.05$; $t = 6.305, P < 0.05$; $t = 15.79, P < 0.01$) (见图 1)。

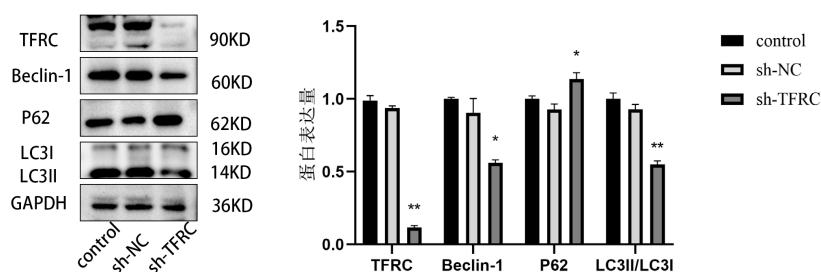


Figure 1. Expression of TFRC and autophagy-related proteins in each group of cells
图 1. 各组细胞中 TFRC 及自噬相关蛋白表达

3.2. TFRC 促进宫颈癌细胞增殖

通过 CCK8 实验检测各组细胞的增殖能力, 结果表明, TFRC 敲低组细胞吸光值在 24 h (0.2580 ± 0.01473)、48 h (0.4793 ± 0.02084)和 72 h (0.7593 ± 0.05652)均小于阴性对照组(24 h: 0.3550 ± 0.03291 ; 48 h: 0.06957 ± 0.0076 ; 72 h: 1.057 ± 0.177), 差异均有统计学意义($t = 4.660, P < 0.05$; $t = 16.90, P < 0.01$; $t = 5.181, P < 0.01$), 而空白对照组和阴性对照组比较差异无统计学意义($t = 0.059, P > 0.05$; $t = 2.026, P > 0.05$; $t = 0.563, P > 0.05$)。通过时间曲线(0、24、48 h 和 72 h)发现, 敲低 TFRC 对抑制宫颈癌细胞的增殖能力呈现时间依赖性(见图 2)。

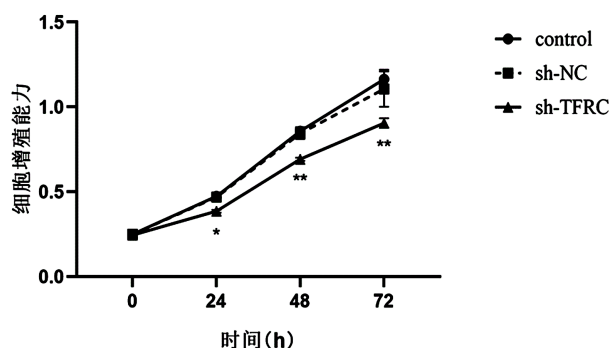


Figure 2. TFRC promotes cervical cancer cell proliferation
图 2. TFRC 促进宫颈癌细胞增殖

3.3. TFRC 促进宫颈癌细胞迁移

通过细胞划痕实验表明, TFRC 敲低组细胞迁移率在处理 24 h 和 48 小时后分别为 $(20.39 \pm 2.124)\%$ 、 $(42.59 \pm 1.993)\%$, 与阴性对照组相比 $(39.09 \pm 1.257)\%$ 、 $(54.47 \pm 2.33)\%$ 明显降低, 差异均有统计学意义($t = 4.614, P < 0.01$; $t = 0.6.802, P > 0.05$)。而空白对照组和 TFRC 敲低阴性对照组比较差异无统计学意义($t = 0.798, P > 0.05$; $t = 0.580, P > 0.05$) (见图 3)。

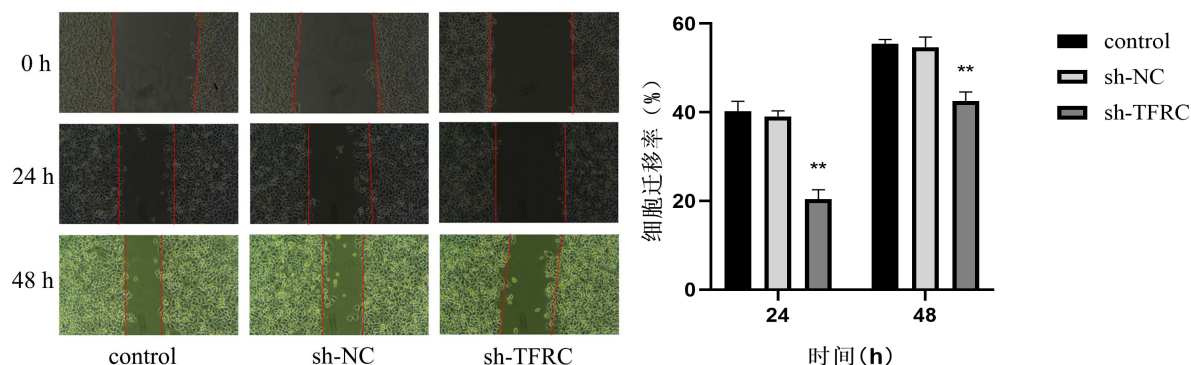


Figure 3. TFRC promotes cervical cancer cell migration

图 3. TFRC 促进宫颈癌细胞迁移

通过流式细胞术检测细胞周期表明, TFRC 敲低组 G0/G1 期细胞比例为 $(36.44 \pm 1.195)\%$, 较阴性对照组 $(52.34 \pm 0.9878)\%$ 显著降低, G2/M 期细胞比例 $(33.54 \pm 1.087)\%$, 较阴性对照组 $(17.07 \pm 0.5315)\%$ 显著升高, 差异均有统计学意义($t = 17.75, P < 0.01$; $t = 23.57, P < 0.01$) (见图 4)。

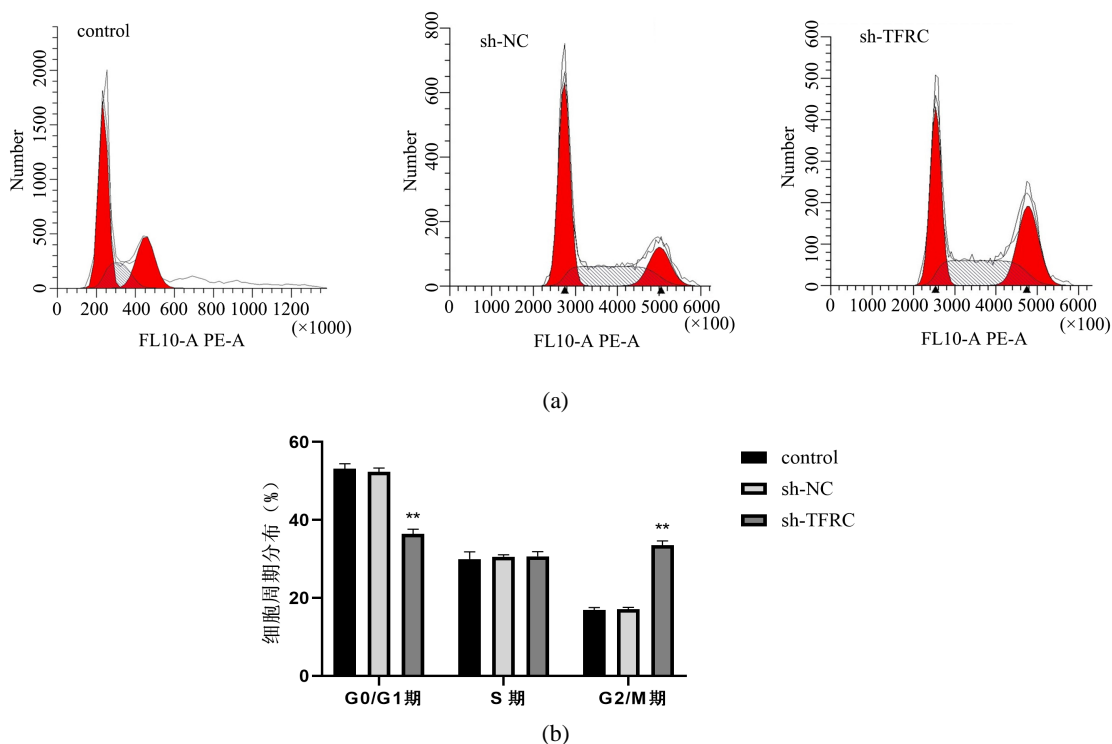


Figure 4. Effect of TFRC on the cell cycle of cervical cancer

图 4. TFRC 对宫颈癌细胞周期的影响

3.4. 敲低 TFRC 对宫颈癌细胞 ERK/AKT/mTOR 通路蛋白表达的影响

Western Blot 结果显示, TFRC 敲低组磷酸化 ERK (p-ERK)、磷酸化 AKT (p-AKT)、磷酸化 m-TOR (p-mTOR) 蛋白表达量分别为 (0.4528 ± 0.01231) 、 (0.7491 ± 0.02534) 、 (0.7645 ± 0.03308) , 与阴性对照组相比 (1.048 ± 0.01587) 、 (1.054 ± 0.02285) 、 (1.094 ± 0.01587) 表达水平明显降低, 差异均有统计学意义($t = 36.95, P < 0.01$; $t = 15.45, P < 0.01$; $t = 15.54, P < 0.01$)。总蛋白 ERK、AKT、mTOR 的表达量基本不变(见图 5)。

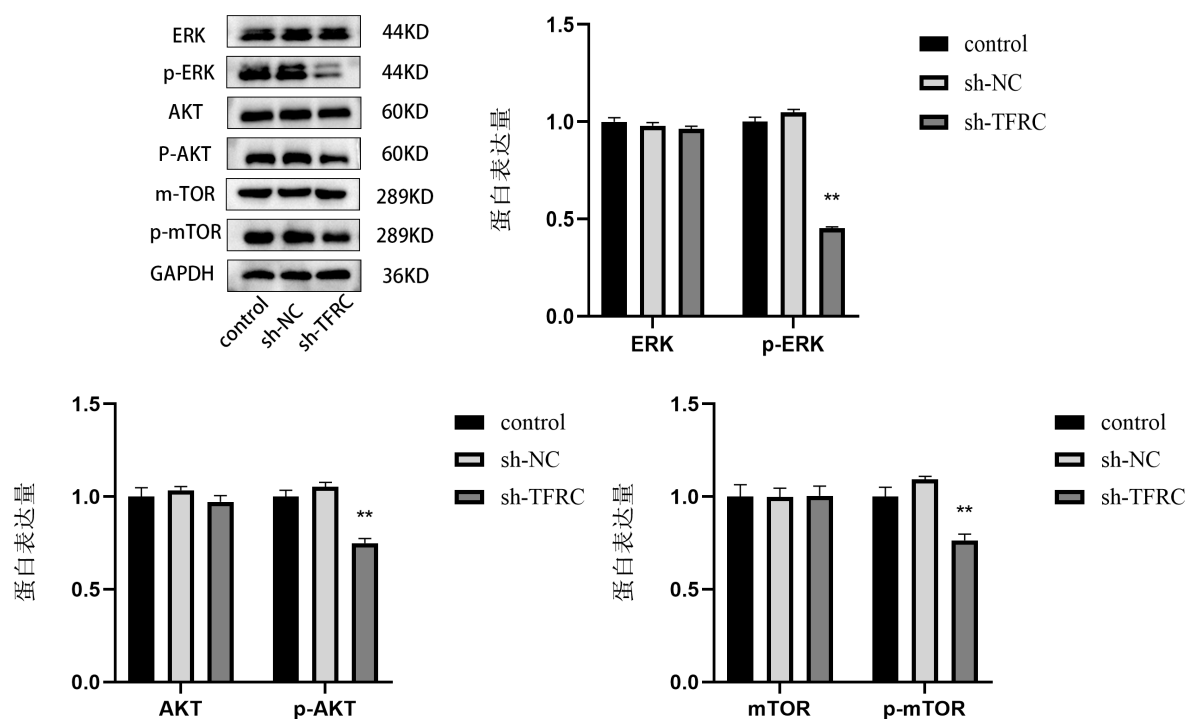


Figure 5. Expression of ERK/AKT/mTOR Protein in in each group

图 5. 各组细胞中 ERK/AKT/mTOR 蛋白表达

4. 讨论

宫颈癌是全球常见的妇科恶性肿瘤, 其发病率和死亡率位于女性恶性肿瘤前列[8]。近些年, 随着生活方式的改变, 如宫颈细胞学筛查的普遍实施和 HPV 疫苗的广泛接种, 使得宫颈癌及癌前病变能够早期发现和治疗, 然而在中低收入国家和地区宫颈癌的发病率和死亡率仍处于较高水平[9] [10]。铁参与细胞内多种功能性活动, 在铁与癌症的流行病学研究中表明, 体内铁水平升高与癌症发病率增加呈正相关[2]。肿瘤细胞在增殖过程中对代谢和生物合成的需求增加。在转铁蛋白受体(TFRC)是调节细胞铁稳态的关键因子, TFRC 通过与转铁蛋白复合物结合以促进铁离子进入细胞[11]。在恶性肿瘤中, 许多与铁代谢相关的蛋白质和信号通路被改变, 例如, MEK 信号转导的激活可以调节转铁蛋白受体和铁蛋白的表达水平[12], 铁通过 GP130/STAT3 信号促进肺癌发生[13]。铁相关蛋白的异常表达影响癌症进展和转移[14]。不同类型肿瘤细胞, TFRC 影响癌症进展的机制也不相同。在弥漫型胃癌细胞中, TFRC 与成纤维细胞生长因子受体 2 (FGFR2)相结合, 促进癌细胞的增殖和致癌性[15]。我们前期研究表明, TFRC 可能通过调控 JAK-STAT 促进宫颈癌细胞恶性生物学行为[3]。

自噬是维持细胞和生物体稳态的核心分子途径, 几乎存在于所有真核细胞中。自噬参与生长发育调

节、维持干细胞自我更新潜力和细胞分化[16]。细胞自噬功能障碍会导致疾病和肿瘤发生。在神经退行性疾病中，自噬增加导致神经细胞受损，神经突缩短，损害神经元，相反，抑制自噬可以保护神经突缩短或变性[17]。自噬在肿瘤中具有双重作用，自噬既可以抑制肿瘤增长又能促进肿瘤生成。近期研究表明，在甲状腺癌细胞系中，抑制自噬可消除甲状腺癌干细胞活力，同时减少细胞迁移和侵袭[18]。自噬增强了胃癌细胞的恶性生物学行为，促进肿瘤生长[19]，自噬还通过增强肿瘤细胞的迁移率和抗性来增加肿瘤细胞的化疗耐药性和转移性[20]。相反，在头颈癌中，自噬相关蛋白 Beclin 1 表达增加可能会激活自噬并抑制肿瘤发生[21]。本研究结果表明，敲低 TFRC 可抑制宫颈癌细胞自噬，进而抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移能力，细胞周期阻滞在 G2/M 期。

AKT/mTOR 信号通路和 MAPK/ERK 通路都参与调节包括自噬、细胞周期调节、癌细胞的增殖、侵袭、迁移和凋亡等多个细胞过程[22] [23]。MAPK 级联反应是参与调节正常细胞增殖、存活和分化的关键信号通路，ERK 是 MAPK 信号通路的下游组分[24]。mTOR 作为细胞生长信号传导和增强蛋白质翻译的中心元件，ERK 介导的 Bcl-2 磷酸化以及抑制 mTOR 均可诱导细胞自噬[25]。已有文献证实，MAP4K4 通过抑制 PI3K-AKT-mTOR 通路和激活 MAPK/ERK 通路介导 SOX6 诱导宫颈癌细胞自噬[26]。本研究检测了 ERK/AKT/mTOR 通路相关蛋白的表达，结果提示敲低 TFRC 后明显降低 p-ERK、p-AKT、p-mTOR 蛋白表达水平，说明 TFRC 抑制宫颈癌 HeLa 细胞自噬可能是通过抑制 ERK/AKT/mTOR 信号通路调控。

综上所述，TFRC 是宫颈癌细胞的促进因子，敲低 TFRC 可以抑制宫颈癌细胞自噬，进而抑制其增殖、迁移，为靶向 TFRC 联合自噬治疗宫颈癌提供新方向。但本研究仍不全面，还需加入相关通路激动剂来观察细胞功能及自噬相关蛋白表达变化，进一步完善其分子机制。

基金项目

青岛市市南区科技计划项目(2020-2-019-YY)。

参考文献

- [1] Mayadev, J.S., Ke, G., Mahantshetty, U., Pereira, M.D., Tarnawski, R. and Toita, T. (2022) Global Challenges of Radiotherapy for the Treatment of Locally Advanced Cervical Cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*, **32**, 436-445. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2021-003001>
- [2] Torti, S.V., Manz, D.H., Paul, B.T., Blanchette-Farra, N. and Torti, F.M. (2018) Iron and Cancer. *Annual Review of Nutrition*, **38**, 97-125. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082117-051732>
- [3] 杨克鑫, 刘一萌, 赵天南, 郭丽, 张萍. TFRC 通过 JAK-STAT 信号通路影响宫颈鳞状细胞癌的增殖、迁移和侵袭[J]. 中国计划生育和妇产科, 2023, 15(11): 101-106+112.
- [4] Levine, B. and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, **132**, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- [5] Mancias, J.D., Wang, X., Gygi, S.P., Harper, J.W. and Kimmelman, A.C. (2014) Quantitative Proteomics Identifies NCOA4 as the Cargo Receptor Mediating Ferritinophagy. *Nature*, **509**, 105-109. <https://doi.org/10.1038/nature13148>
- [6] Santana-Codina, N., del Rey, M.Q., Kapner, K.S., Zhang, H., Gikandi, A., Malcolm, C., et al. (2022) NCOA4-Mediated Ferritinophagy Is a Pancreatic Cancer Dependency via Maintenance of Iron Bioavailability for Iron-Sulfur Cluster Proteins. *Cancer Discovery*, **12**, 2180-2197. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-22-0043>
- [7] 李沫, 宓淑芳, 王孝信. lncRNA-CCAT1 通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对宫颈癌 HeLa 细胞自噬的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(15): 1855-1859.
- [8] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., et al. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [9] Buskwofie, A., David-West, G. and Clare, C.A. (2020) A Review of Cervical Cancer: Incidence and Disparities. *Journal of the National Medical Association*, **112**, 229-232. <https://doi.org/10.1016/j.jnma.2020.03.002>
- [10] Rahangdale, L., Mungo, C., O'Connor, S., Chibwasha, C.J. and Brewer, N.T. (2022) Human Papillomavirus Vaccination and Cervical Cancer Risk. *BMJ*, **379**, e070115. <https://doi.org/10.1136/bmj-2022-070115>

- [11] Shen, Y., Li, X., Dong, D., Zhang, B., Xue, Y. and Shang, P. (2018) Transferrin Receptor 1 in Cancer: A New Sight for Cancer Therapy. *American Journal of Cancer Research*, **8**, 916-931.
- [12] Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y. and Chen, G. (2016) Ferroptosis, a New Form of Cell Death, and Its Relationships with Tumourous Diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **21**, 648-657. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13008>
- [13] Kuang, Y. and Wang, Q. (2019) Iron and Lung Cancer. *Cancer Letters*, **464**, 56-61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.08.007>
- [14] Forciniti, S., Greco, L., Grizzi, F., Malesci, A. and Laghi, L. (2020) Iron Metabolism in Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 2257. <https://doi.org/10.3390/ijms21062257>
- [15] Shirakihara, T., Yamaguchi, H., Kondo, T., Yashiro, M. and Sakai, R. (2022) Transferrin Receptor 1 Promotes the Fibroblast Growth Factor Receptor-Mediated Oncogenic Potential of Diffused-Type Gastric Cancer. *Oncogene*, **41**, 2587-2596. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02270-5>
- [16] Klionsky, D.J., Petroni, G., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., *et al.* (2021) Autophagy in Major Human Diseases. *The EMBO Journal*, **40**, e108863. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021108863>
- [17] Lizama, B.N. and Chu, C.T. (2021) Neuronal Autophagy and Mitophagy in Parkinson's Disease. *Molecular Aspects of Medicine*, **82**, Article ID: 100972. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100972>
- [18] Holm, T.M., Bian, Z.C., Manupati, K. and Guan, J. (2022) Inhibition of Autophagy Mitigates Cell Migration and Invasion in Thyroid Cancer. *Surgery*, **171**, 235-244. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2021.08.024>
- [19] Liu, P., Li, L., Wang, W., He, C. and Xu, C. (2023) MST4 Promotes Proliferation, Invasion, and Metastasis of Gastric Cancer by Enhancing Autophagy. *Heliyon*, **9**, e16735. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16735>
- [20] Abd El-Aziz, Y.S., Gillson, J., Jansson, P.J. and Sahni, S. (2022) Autophagy: A Promising Target for Triple Negative Breast Cancers. *Pharmacological Research*, **175**, Article ID: 106006. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.106006>
- [21] Hu, Y., Zhong, J., Gong, L., Zhang, S. and Zhou, S. (2020) Autophagy-Related Beclin 1 and Head and Neck Cancers. *Oncotargets and Therapy*, **13**, 6213-6227. <https://doi.org/10.2147/ott.s256072>
- [22] Harsha, C., Banik, K., Ang, H.L., Girisa, S., Vikkurthi, R., Parama, D., *et al.* (2020) Targeting AKT/mTOR in Oral Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, Article No. 3285. <https://doi.org/10.3390/ijms21093285>
- [23] Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y. and Hu, L. (2020) ERK/MAPK Signalling Pathway and Tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, **19**, 1997-2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- [24] Barbosa, R., Acevedo, L.A. and Marmorstein, R. (2021) The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. *Molecular Cancer Research*, **19**, 361-374. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-20-0687>
- [25] Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T. and Tang, D. (2011) The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, **18**, 571-580. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.191>
- [26] Huang, H., Han, Q., Zheng, H., Liu, M., Shi, S., Zhang, T., *et al.* (2021) MAP4K4 Mediates the SOX6-Induced Autophagy and Reduces the Chemosensitivity of Cervical Cancer. *Cell Death & Disease*, **13**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04474-1>