

注射用胸腺法新对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响

杨兆辉^{1*}, 段瑞祥², 杨 晶³, 熊姝妮¹, 郎建敏¹(1. 青岛经济技术开发区第一人民医院呼吸科, 山东 青岛 266555; 2. 山东省医学科学院糖尿病医院外科, 济南 250014; 3. 枣庄矿业集团枣庄医院外五科, 山东 枣庄 277100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0906-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.13

摘要 目的: 研究注射用胸腺法新对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响。方法: 以 0 (空白对照)、25、50、100、200、400 mg/L 注射用胸腺法新作用于肺癌 A549 细胞 24、48、72 h 后, 用 MTT 法检测并计算细胞增殖抑制率。以 0 (空白对照)、50、100 mg/L 注射用胸腺法新作用于肺癌 A549 细胞 48 h 后, 用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况, 用 Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bcl-2、Bax 的表达和蛋白激酶 B (Akt) 的磷酸化水平。结果: 与空白对照比较, 注射用胸腺法新作用后 A549 细胞的增殖抑制率增加, 与浓度和作用时间呈正相关 ($P < 0.05$); 50、100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞的凋亡率增加 ($P < 0.05$); 100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞中 Caspase-3 表达增强、Bcl-2/Bax 和 Akt 磷酸化水平降低 ($P < 0.05$)。结论: 注射用胸腺法新可通过激活 Caspase-3、下调 Bcl-2/Bax 比例、抑制 Akt 信号通路来抑制 A549 细胞增殖, 并促进其凋亡。
关键词 注射用胸腺法新; 人肺癌 A549 细胞; 增殖; 凋亡; Akt 信号通路

Effects of Thymalfasin for Injection on the Apoptosis of Humun Lung Cancer A549 Cells
YANG Zhaohui¹, DUAN Ruixiang², YANG Jing³, XIONG Dani¹, LANG Jianmin¹ (1. Dept. of Respiratory Medicine, Qingdao Economic and Technological Development Area First People's Hospital, Shandong Qingdao 266555, China; 2. Dept. of Surgery, Diabetes Hospital, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250014, China; 3. Fifth Surgical Department, Zaozhuang Mining Group Zaozhuang Hospital, Shandong Zaozhuang 277100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of Thymalfasin for injection on the apoptosis of human lung cancer A549 cells. **METHODS:** After treated with 0 (blank control), 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L Thymalfasin for injection for 24, 48 and 72 h, the cell proliferation inhibitory rate was analyzed with MTT and calculated. After treated with 0 (blank control), 50 and 100 mg/L Thymalfasin for injection for 48 h, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax and the phosphorylation level of Akt were detected by Western blot. **RESULTS:** Compared with blank control group, proliferation inhibitory rate of A549 cells increased after treated with Thymalfasin for injection, in concentration and time-dependent manner ($P < 0.05$). The apoptotic rate of A549 cells increased after treated with Thymalfasin for injection 50, 100 mg/L for 48 h ($P < 0.05$). The expression of Caspase-3 increased while the Bcl-2/Bax and phosphorylation level of Akt decreased in A549 cells after treated with Thymalfasin for injection 100 mg/L ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Thymalfasin for injection can inhibit the proliferation of A549 cells by activating Caspase-3, decreasing Bcl-2/Bax ratio, inhibiting Akt signal pathway and induce the apoptosis of A549 cells. **KEYWORDS** Thymalfasin for injection; Human lung cancer A549 cells; Proliferation; Apoptosis; Akt signal pathway



encephalomyelitis reveal neutrophils as a potential target in multiple sclerosis[J]. *Front Neurosci*, 2015, doi: 10.3389/fnins.2015.0028.

[6] Bustamante MF, Morcillo-Suarez C, Malhotra S, *et al.* Pharmacogenomic study in patients with multiple sclerosis: responders and nonresponders to IFN-beta[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2015, 2(5):e154.

[7] Thiele S, Rosenkilde MM. Interaction of chemokines with their receptors: from initial chemokine binding to receptor activating steps[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(31):3 594.

[8] Chen XZ, Mao XH, Zhu KJ, *et al.* Toll like receptor ago-

nists augment HPV 11 E7-specific T cell responses by modulating monocyte-derived dendritic cells[J]. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302(1):57.

[9] Herges K, de Jong BA, Kolkowitz I, *et al.* Protective effect of an elastase inhibitor in a neuromyelitis optica-like disease driven by a peptide of myelin oligodendroglial glycoprotein[J]. *Mult Scler*, 2012, 18(4):398.

[10] Wu F, Cao W, Yang Y, *et al.* Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice[J]. *Histochem Cell Biol*, 2010, 133(3):313.

* 主治医师, 硕士。研究方向: 肺部感染性疾病、肺癌、胸膜疾病、肺部分介入诊疗。电话: 0532-86977085。E-mail: sdysh0917@126.com
(收稿日期: 2015-11-16 修回日期: 2015-12-21)
(编辑: 邹丽娟)

注射用胸腺法新是一类免疫调节剂,主要成分是胸腺肽 $\alpha 1$,通过调节机体的免疫系统发挥抗肿瘤作用^[1],已经应用于多种肿瘤的辅助治疗之中^[2-3]。但是除了通过调节机体的免疫发挥抗肿瘤作用,研究发现注射用胸腺法新还可以直接诱导肾癌细胞的凋亡^[4],发挥肿瘤抑制效应。细胞的增殖与凋亡与肿瘤的发生及发展密切相关。注射用胸腺法新是否同样可以直接通过抑制肺癌细胞增殖及促进其凋亡而发挥抗肿瘤效应,目前还未见相关文献报道。因此,本研究中笔者观察了注射用胸腺法新对人肺癌 A549 细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料

1.1 仪器

Thermo CO₂细胞培养箱(上海旦鼎国际贸易有限公司);MSS 全波长紫外分光光度计和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳设备(美国 Thermo Fisher 有限公司);BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);Quantity One v4.62 凝胶定量软件(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 药品与试剂

注射用胸腺法新(美国赛生药品有限公司,批号:20140709,规格:每支 1.6 mg);MTT(上海谱振生物科技有限公司,批号:20140108);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司);兔抗人 Caspase-3、Bcl-2、Bax、蛋白激酶 B(Akt)抗体(武汉艾美捷科技有限公司);Western blot 完整检测试剂盒(美国 ThermoFisher 有限公司)。

1.3 细胞

人肺癌 A549 细胞株(中国科学院上海细胞库)。

2 方法

2.1 细胞增殖抑制率检测

采用 MTT 法检测注射用胸腺法新对 A549 细胞增殖的抑制率。取对数生长期的 A549 细胞,细胞吹打混匀计数,每孔 2 000 个细胞接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后加入含 0(空白对照)、25、50、100、200、400 mg/L 的注射用胸腺法新的培养液,培养 24、48、72 h 后检测细胞生长情况。检测前 4 h 每孔加入 20 μ l 的 5% MTT,4 h 后吸弃培养液,每孔加入 150 μ l 的二甲基亚砷(DMSO),振荡混匀,于 490 nm 波长下检测每孔光密度(OD)。细胞增殖抑制率(%)=(1-给药孔 OD 值/空白对照 OD 值) \times 100%。试验重复 3 次。

2.2 细胞凋亡率检测

采用流式细胞术检测注射用胸腺法新处理后 A549 细胞的凋亡率。取对数生长期的 A549 细胞,接种于 6 cm 培养皿中,待细胞贴壁后加入含 0(空白对照)、50、100 mg/L 的注射用胸腺法新的培养液,培养 48 h 后收取细胞。用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化细胞,细胞消化后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,用结合缓冲液(Binding buffer)将细胞制备成单细胞悬液,加入 Annexin V-FITC 染料避光处理 15 min,再加入碘化丙啶(PI)染料,1 h 内上机检测细胞凋亡率。试验重复 3 次。

2.3 细胞中凋亡相关蛋白表达及 Akt 磷酸化水平检测

采用 Western blot 法检测 A549 细胞中凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达及 Akt 磷酸化水平。取对数生长期的 A549 细胞,按“2.2”项下培养细胞 48 h 后收取细胞,加入 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞提取蛋白,应用二喹啉甲酸(BCA)法

检测蛋白浓度。取相同量的蛋白加入缓冲液煮沸 10 min,每孔加入 50 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后转于聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,三羟甲基氨基甲烷盐酸盐溶液(TBST)清洗 2 次,每次 5 min。加入相应一抗(兔抗人 Caspase-3、Bax、Bcl-2、Akt 抗体,1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次,每次 10 min,加入增强化学发光液(ECL)进行检测。以 β -actin 为内参,以相关蛋白与内参的灰度值比值为相应蛋白的相对表达量,以磷酸化 Akt(p-Akt)与 Akt 灰度值的比值表示 Akt 磷酸化水平。试验重复 3 次。

2.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料比较采用单因素方差分析,两组间的比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率

与空白对照比较,注射用胸腺法新作用后 A549 细胞的增殖抑制率增加,与质量浓度和作用时间呈正相关,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。不同质量浓度注射用胸腺法新作用不同时间后 A549 细胞的增殖抑制率见表 1。

表 1 不同质量浓度注射用胸腺法新作用不同时间后 A549 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Proliferation inhibitory rate of A549 cells after treated for different time with different concentrations of Thymalfasin for injection($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

注射用胸腺法新 质量浓度,mg/L	培养时间		
	24 h	48 h	72 h
0(空白对照)	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
25	0.30 \pm 0.03*	2.10 \pm 0.22* [#]	15.90 \pm 2.04* [#]
50	1.70 \pm 0.32*	5.70 \pm 1.47* [#]	23.50 \pm 3.44* [#]
100	5.40 \pm 1.89*	15.60 \pm 3.01* [#]	31.90 \pm 5.04* [#]
200	7.20 \pm 2.01*	18.90 \pm 2.78* [#]	48.50 \pm 6.05* [#]
400	15.80 \pm 2.38*	23.40 \pm 3.17* [#]	58.30 \pm 8.36* [#]

注:与空白对照比较,* $P < 0.05$;与作用 24 h 比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. blank control, * $P < 0.05$; vs. treated for 24 h, [#] $P < 0.05$

3.2 细胞凋亡率

与空白对照[(0.80 \pm 0.07)%]比较,50、100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞的凋亡率[(5.36 \pm 1.07)%、(10.00 \pm 2.97)%]增加($P < 0.05$)。与 50 mg/L 比较,100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞的凋亡率增加($P < 0.05$)。不同质量浓度注射用胸腺法新对 A549 细胞凋亡的影响见图 1。

3.3 细胞中凋亡相关蛋白表达

与 0、50 mg/L 比较,100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞中 Caspase-3 表达增强、Bcl-2/Bax 比例降低($P < 0.05$)。不同质量浓度注射用胸腺法新作用后 A549 细胞中凋亡相关蛋白表达的电泳图见图 2,检测结果见表 2。

3.4 细胞中 Akt 磷酸化水平

与 0、50 mg/L (p-Akt/Akt: 1.41 \pm 0.12、0.89 \pm 0.10) 比较, 100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞中 Akt 磷酸化水平降低(p-Akt/Akt: 0.72 \pm 0.07)($P < 0.05$)。不同质量浓

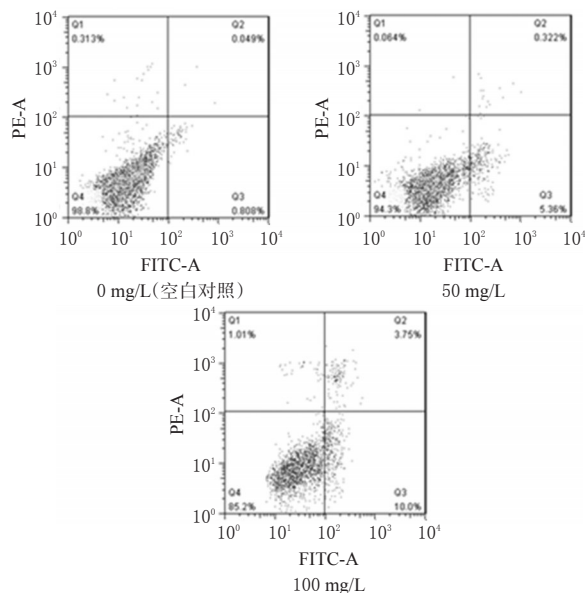


图1 不同质量浓度注射用胸腺法新对A549细胞凋亡的影响
Fig 1 Effects of different mass concentrations of Thymalfasin for injection on the apoptosis of A549 cells

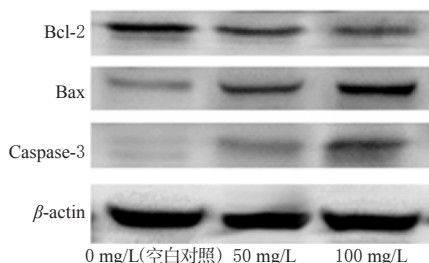


图2 不同质量浓度注射用胸腺法新作用后A549细胞中凋亡相关蛋白表达的电泳图
Fig 2 Electrophoretograms of the expression of apoptosis-related protein in A549 cells after treated with different concentrations of Thymalfasin for injection

表2 不同质量浓度注射用胸腺法新作用后A549细胞中凋亡相关蛋白的表达情况($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 The expression of apoptosis-related protein in A549 cells after treated with different concentrations of Thymalfasin for injection ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

注射用胸腺法新质量浓度, mg/L	Caspase-3/ β -actin	Bcl-2/Bax
0(空白对照)	0.00 \pm 0.00	3.91 \pm 0.84
50	0.09 \pm 0.04	1.14 \pm 0.25
100	0.32 \pm 0.08*	0.61 \pm 0.11*

注: 与50 mg/L比较, * $P < 0.05$

Note: vs. 50 mg/L, * $P < 0.05$

度注射用胸腺法新作用后A549细胞中p-Akt、Akt蛋白表达的电泳图见图3。

4 讨论

肺癌是当今世界发病率和病死率都居首位的恶性肿瘤,而其中非小细胞肺癌占80%。非小细胞肺癌早期诊断率低,多数患者确诊后已丧失手术治疗机会,传统的放射治疗和化疗效果很差,新的化学治疗也无突破性进展。因此,寻求新的更有效的治疗手段非常迫切^[5-6]。

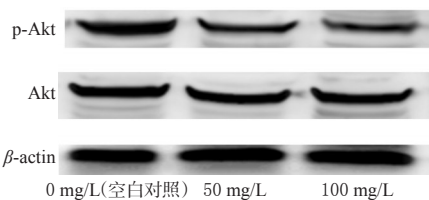


图3 不同质量浓度注射用胸腺法新作用后A549细胞中p-Akt、Akt蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretograms of the expression of p-Akt and Akt protein in A549 cells after treated with different concentrations of Thymalfasin for injection

大部分肿瘤细胞都是一种过度增殖、凋亡减少的状态。抑制增殖、促进细胞凋亡是肿瘤治疗的重要思路,也是多种抗肿瘤药物的最终发挥抗肿瘤效应的机制^[7]。注射用胸腺法新的主要成分为胸腺肽 $\alpha 1$,可以调节机体的免疫、增强免疫功能、解除免疫抑制,在多种肿瘤如肺癌、乳腺癌、结肠癌等肿瘤治疗中作为一种辅助抗肿瘤药物应用于临床。但是其具体的抗肿瘤机制仍然不太清楚。除了已知的可以通过调节免疫发挥抗肿瘤作用外,研究表明注射用胸腺法新的主要成分胸腺肽 $\alpha 1$ 也可以通过直接作用于肿瘤细胞发挥抗肿瘤效应。注射用胸腺法新可以抑制肾癌细胞的增殖并促进其凋亡^[4],同时还可以抑制白血病细胞的增殖并促进其凋亡^[8]。

本研究中,注射用胸腺法新可以抑制肺癌细胞株A549细胞的增殖,并呈现时间和浓度依赖性。同样应用流式细胞仪对注射用胸腺法新对肺癌细胞株A549凋亡的影响进行检测发现,其可以诱导A549细胞的凋亡,且在浓度增加的同时凋亡也随之增加。这一结果说明,在肺癌中注射用胸腺法新还可以通过直接作用于肺癌细胞抑制其增殖、促进其凋亡,发挥抗肿瘤效应。凋亡发生是一个由Caspase家族成员介导的蛋白酶级联反应过程,即Caspase在凋亡诱导信号的作用下,启动型Caspase先通过结合特异辅因子而激活,发挥水解蛋白的作用,从而激活下游效应型Caspase,一旦效应型Caspase被激活,便大范围地水解细胞内的靶物质,从而降解细胞内蛋白,最终使细胞凋亡^[9]。Caspase-3是一种凋亡蛋白,是多种凋亡通路的最终执行者,Caspase-3的活化将促进细胞凋亡的发生。

本文研究注射用胸腺法新对A549细胞Caspase-3活化水平的影响。研究发现,不同质量浓度的注射用胸腺法新对细胞Caspase-3的活化能力的影响不同:在浓度增加的同时Caspase-3的活化也随之增加。

定位于线粒体外膜上的Bcl-2至少在3个水平上发挥凋亡抑制作用:(1)通过抑制谷胱甘肽的外泄、改变线粒体巯基的氧化还原状态以控制其膜电位,从而抑制细胞凋亡的发生;(2)通过介导线粒体外膜通透转运孔-孔道复合体的开放,抑制细胞色素C(CytC)和凋亡诱导因子等促凋亡蛋白的释放,阻止凋亡的进程;(3)通过与胱冬肽酶的间接作用,将凋亡蛋白酶激活因子Apaf-1定位至线粒体膜,通过对其结构的调控阻断凋亡蛋白酶的激活,阻滞CytC作用的发挥,使细胞免于死亡。Bax蛋白多以非活性的单体形式分布于胞质中,只有在接收到凋亡信号刺激被激活后,发生分子构象改变,移位并插入线粒体外膜后形成Bax大孔道,破坏线粒体膜的完整性,并于Bcl-2等抑制凋亡的蛋白对抗,阻止其抗凋亡作用的发挥^[10-11]。

Caspase-3 作为 Caspase 级联反应下游最关键的凋亡执行者,其激活在很大程度上依赖 CytC 的释放,而 Bcl-2 家族中的 Bcl-2、Bax 基因是可通过线粒体途径介导 CytC 等物质的释放。随着近年来关于 Bcl-2、Bax 和 Caspase 在细胞凋亡信号传导过程中的关系研究发现,Bcl-2、Bax 可作为 Caspase-3 的上游调控因子,参与对 Caspase-3 激活和与之相关的细胞凋亡途径的调节。因此在细胞凋亡的信号转导途径中,Bcl-2/Bax 比例是启动细胞凋亡的“分子开关”^[12]。

本次研究通过观察 Bcl-2/Bax 研究不同质量浓度的注射用胸腺法新对 A549 细胞凋亡的影响。结果表明高质量浓度的注射用胸腺法新可以明显抑制 Bcl-2 的表达,上调 Bax 的表达,降低 A549 细胞中 Bcl-2/Bax 的比例。这一结果说明注射用胸腺法新可以通过调控 A549 细胞的 Bcl-2/Bax,从而调控 Caspase 的活化过程,启动细胞的凋亡。

对注射用胸腺法新调控 A549 细胞凋亡的机制进一步进行研究:通过用 Western blot 法分析 p-Akt/Akt 比值发现,注射用胸腺法新可以抑制 Akt 通路的活化,并随着质量浓度的增加对 AKT 通路的抑制性增强。磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)家族参与多种信号通路,调节细胞的主要功能。在 PI3K 家族中,1A 型 PI3K 和其下游分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 所组成的信号通路与肿瘤发生发展有一定相关性,这条通路不仅参与调节肿瘤细胞的增殖和存活,更与肿瘤的侵袭转移行为也密切相关^[13]。Akt 可以发挥抗凋亡作用:持续激活 Akt 能够阻止由活性被类脂磷酸酶(PTEN)介导的凋亡。目前对 Akt 作用的研究发现,Akt 至少通过以下几方面发挥抗凋亡作用:(1)Akt 能通过磷酸化 Bcl-2 家组成员 BAD 蛋白和蛋白水解酶 Caspase-9,进而阻止凋亡;(2)Akt 还能磷酸化转录因子 Forkhead 家族成员 FKHR,通过抑制 FKHR 的核转录以及 FKHR 的基因靶点 BIM 和 FAS 配体的激活而抑制凋亡;(3)Akt 还能通过对 P53 的间接作用影响细胞存活,即通过磷酸化 p53 结合蛋白来影响 p53 的活性,并加强 p53 降解,发挥抗凋亡作用^[14-16]。本次研究表明注射用胸腺法新可以抑制 Akt 通路的活化。这可能是其抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的机制之一。

综上,注射用胸腺法新可以通过直接抑制 A549 细胞的增殖、促进其凋亡发挥抗肿瘤效应;其具体的机制可能与激活 Caspase-3、下调 Bcl-2/Bax 比例、抑制 Akt 信号通路有关。

参考文献

- [1] Li C, Bo L, Liu Q, *et al.* Thymosin alpha1 based immunomodulatory therapy for sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, doi: 10.1016/j.ijid.2014.12.032.
- [2] Ioannou K, Samara P, Livaniou E, *et al.* Prothymosin alpha: a ubiquitous polypeptide with potential use in cancer diagnosis and therapy[J]. *Cancer Immunol Immun*, 2012, 61(5):599.
- [3] Ni C, Wu P, Wu X, *et al.* Thymosin alpha1 enhanced cytotoxicity of iNKT cells against colon cancer via upregulating CD1d expression[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 579.
- [4] 席菁乐.新型微管蛋白抑制剂的研发和抗肿瘤机制研究[D].广州:南方医科大学,2013.
- [5] 张旖骁,赵俊华,赵玉霞,等.日达仙联合抗结核治疗治愈肺癌合并肺结核一例[J].*实用药物与临床*,2013,16(7): 662.
- [6] 李洁,钱春艳,邹素兰,等.临床药师参与肺癌药物治疗切入点的探讨[J].*中国药房*,2015,26(32):4 586.
- [7] Shin D, Kwon HY, Sohn EJ, *et al.* Upregulation of death receptor 5 and production of reactive oxygen species mediate sensitization of PC-3 prostate cancer cells to TRAIL induced apoptosis by vitisin A[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015,36(3):1 151.
- [8] 涂晓维.重组人胸腺肽 $\alpha 1$ 和克罗拉滨三磷酸酯生物样品分析方法建立及药动学研究[D].北京:中国科学院大学,2014.
- [9] 赵雅瑞,张立凡,刘特,等.姜黄素上调 caspase-3 和 p53 表达后对人肺癌干细胞增殖与侵袭的影响[J].*中国临床医学*,2013,20(3):259.
- [10] Hwang JW, Baek YM, Jang IS, *et al.* An enzymatically fortified ginseng extract inhibits proliferation and induces apoptosis of KATO3 human gastric cancer cells via modulation of Bax, mTOR, PKB and I κ B α [J]. *Mol Med Rep*, 2015,11(1):670.
- [11] 董雅洁,高维娟. bcl-2、bax、caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J].*中国老年学杂志*,2012,32(21):4 828.
- [12] 李文军.大蒜素和辛伐他汀对肺癌 A549 细胞凋亡和增殖抑制的研究[D].济南:山东大学,2013.
- [13] Supak Y, Hasaya D, Anchalee T, *et al.* Increased activation of PI3K/AKT signaling pathway is associated with cholangiocarcinoma metastasis and PI3K/mTOR inhibition presents a possible therapeutic strategy[J]. *Tumor Biology*,2013,34(6):3 637.
- [14] Dhruv K, Sharmila S, Srivastava RK. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Cancer Letters*, 2014,343(2):179.
- [15] Felix MS, Bauer S, Darlot F, *et al.* Activation of Akt/FKHR in the medulla oblongata contributes to spontaneous respiratory recovery after incomplete spinal cord injury in adult rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, doi: 10.1016/j.nbd.2014.05.022.
- [16] Paul A, Bishayee K, Ghosh S, *et al.* Chelidone isolated from ethanolic extract of chelidonium majus promotes apoptosis in HeLa cells through p38-p53 and PI3K/AKT signalling pathways[J]. *J Chin Int Med*, 2012, 10(9): 1 025.

(收稿日期:2015-10-10 修回日期:2015-12-14)

(编辑:邹丽娟)