

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.17.008

过表达 CDX1 蛋白对直肠癌细胞增殖及能量代谢的影响及机制研究 *

刘光世 许新才 高 华 张文斌 肖开提·阿不都哈德尔 李 涛[△]

(新疆医科大学第一附属医院胃肠肿瘤外科 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要 目的:探讨过表达尾侧同源盒转录因子 1(CDX1)蛋白对直肠癌细胞增殖及能量代谢的影响。**方法:**以直肠癌细胞 SW117 为研究对象,细胞转染 pIRES(空载体组)、pIRES-CDX1(过表达组),同时设置对照组(只加入转染试剂)。培养 48 h 后,Western blot 检测细胞中 CDX1、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (Cleaved Caspase-3)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)表达水平,噻唑蓝(MTT)检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡,试剂盒检测细胞中三磷酸腺苷(ATP)含量、丙酮酸激酶活性、己糖激酶活性及培养液上清中乳酸含量。**结果:**空载体组细胞中 CDX1、Cleaved Caspase-3、Akt、p-Akt 表达水平及细胞存活率、凋亡率、ATP 含量、丙酮酸激酶活性、己糖激酶活性及培养液上清中乳酸含量与对照组相比均没有明显差异。过表达组细胞存活率、p-Akt 水平、ATP 含量、丙酮酸激酶活性、己糖激酶活性及培养液上清中乳酸含量与对照组相比均明显下降,凋亡率及细胞中 Cleaved Caspase-3 表达水平均明显高于对照组。**结论:**过表达 CDX1 蛋白能够促进直肠癌细胞凋亡,抑制直肠癌细胞增殖,影响直肠癌细胞能量代谢,作用机制可能与 p-Akt 水平有关。

关键词:直肠癌细胞;增殖;能量代谢;CDX1

中图分类号:R-33;R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)17-3240-05

Effects and Its Mechanism of Overexpression of CDX1 on Proliferation and Energy Metabolism of Rectal Cancer Cells*

LIU Guang-shi, XU Xin-cai, GAO Hua, ZHANG Wen-bin, Shawkati·Abduhadel, LI Tao[△]

(Department of Gastrointestinal tumor surgery, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830054, China)

ABSTRACT Objective: Effects of over expression of CDX1 protein on proliferation and energy metabolism of rectal cancer cells. **Methods:** Rectal cancer cell line SW117 was used as the research object, the cells were transfected with pIRES (empty vector group) and pIRES-CDX1 (over expression group), meanwhile, the control group (only adding transfection reagent) was set up. After culturing 48 h, Western blot was used to detect the expression levels of CDX1, Cleaved Caspase-3, Akt and p-Akt in the cells, cell proliferation was detected by MTT, cell apoptosis was detected by flow cytometry, kit for detecting ATP content of cells, pyruvate kinase activity, hexokinase activity and lactic acid content in the supernatant. **Results:** The empty vector group in cells of CDX1, Cleaved Caspase-3, Akt, p-Akt expression level and cell survival rate, apoptosis rate, ATP content, pyruvate kinase activity, hexokinase activity, and lactic acid content in the supernatant compared with the control group had no significant difference. Over expression group cell survival rate, p-Akt level, ATP content, pyruvate kinase activity, hexokinase activity and lactate levels in the supernatant fluids in the group decreased significantly compared with the control group. The apoptosis rate and the expression of Cleaved Caspase-3 in the cells were significantly higher than those in the control group. **Conclusion:** Overexpression of CDX1 protein can promote apoptosis of rectal cancer cells, inhibition of rectal cancer cell proliferation, disturbance of energy metabolism in rectal cancer cells, the mechanism may be related to p-Akt level.

Key words: Rectal cancer cell; Proliferation; Energy metabolism; CDX1

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)17-3240-05

前言

直肠癌指的是齿状线到直肠乙状结肠交界之间的癌症,是消化道最常见的恶性肿瘤之一。直肠癌由于接近骨盆,手术难以彻底治疗,手术后复发率极高,加上直肠癌早期发病症状不明

显、发展快,直肠癌严重危害着人类的生命健康^[1]。基因靶向治疗是目前研究较多的癌症治疗手段,寻找有效的靶基因,是治疗直肠癌的关键之一。尾侧同源盒转录因子 1 (Caudal related homeobox 1, CDX1) 参与人类肠道内细胞的生长和发育,是 CDX 家族的成员之一^[2]。有研究表明,CDX1 在胃癌、结直肠癌

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2016D01C275)

作者简介:刘光世(1990-),男,硕士研究生,主要研究方向:胃肠肿瘤,E-mail: lgs900629@126.com

[△] 通讯作者:李涛(1970-),男,博士研究生,主任医师,主要研究方向:胃肠肿瘤基础研究,E-mail: litao_@sina.com

(收稿日期:2017-12-30 接受日期:2018-02-08)

等多种肿瘤组织中表达缺失^[3,4]。本研究中通过体外细胞实验,运用细胞转染的方法过表达直肠癌细胞中的 CDX1 蛋白,探讨 CDX1 在直肠癌细胞增殖和能量代谢中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

直肠癌细胞 SW117 来自于中科院上海细胞库。Lipofectamine 2000 转染试剂购自于美国 Invitrogen; 新生牛血清、RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、青霉素、链霉素均购自于美国 Gibco; 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体、CDX1 抗体、 β 肌动蛋白 (β -actin) 抗体、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 抗体均购自于上海瑞奇生物科技有限公司; 丙酮酸激酶活性检测试剂盒、己糖激酶活性检测试剂盒、乳酸含量检测试剂盒均购自于武汉艾美捷科技有限公司; 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量测定试剂盒、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒均购自于碧云天研究所; CO_2 培养箱购自于日本 SANYO。

1.2 细胞培养及转染

取培养至对数生长期的直肠癌细胞 SW117, 胰蛋白酶消化后, 以 4×10^5 个 / 孔接种到 6 孔细胞培养板中, 按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书把 pIRES-CDX1 和对照空载体 pIRES 转染至 SW117 细胞中, 依次记为空载体组、过表达组。同时设置对照组, 对照组中只加入转染试剂。SW117 细胞用含有双抗的 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养。用 0.25% 的胰蛋白酶传代培养, 培养条件为: 37°C , 5% CO_2 培养箱。

1.3 Western blot 检测转染后细胞中 CDX1 表达水平

取 1.4 中的直肠癌细胞 SW117 继续培养 48 h 后, 收集细胞, 在细胞中添加适量的裂解液, 将细胞放在冰上, 孵育 30 min 以后, 蛋白存在于上层水相溶液中, 用移液枪吸取上清, 保存在 -80°C 。BCA 法对蛋白定量检测。按照每孔加入 30 μg 的蛋白样品, 加入同等体积的上样缓冲液, 放在 100°C 的水浴中变性。吸取蛋白样品 50 μL 加入 SDS-PAGE 凝胶上样孔中, 电泳初始电压为 80 V, 电泳 30 min 后, 把电压调整到 120 V 继续电泳, 待溴酚蓝进入到分离胶的底部以后, 把蛋白胶取出, 把蛋白转移至 PVDF 膜上, 转膜条件为: 4°C , 90V。封闭: 5% 脱脂奶粉放置于室温下孵育 90 min。一抗反应: 1:800, 4°C 过夜。二抗反应: 1:1000, 室温孵育 90 min, 显色后, 对蛋白进行定量, β -actin 为内参。

1.4 细胞增殖检测

对照组、空载体组、过表达组接种到 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 设置空白组, 空白组中不加入细胞, 培养 48 h。按照每孔中添加浓度为 5 mg/mL 的噻唑蓝 (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 20 μL , 放在 37°C , 5% CO_2 培养箱中反应 4h。用移液枪把上清溶液吸除以后, 每孔中添加 150 μL 的 DMSO, 缓慢震荡反应 10min 以后, 用酶标仪测定 490nm OD 值, 按照下面公式计算存活率。存活率 = (转染组 OD - 空白组 OD) $\div$ (对照组 OD - 空白组 OD)。

1.5 细胞凋亡检测

对照组、空载体组、过表达组细胞培养 48h 以后, 用胰蛋白酶消化传代后, 收集各组细胞, 用 400 μL 缓冲液重悬后, 分别加 5 μL 的碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI), 5 μL 的膜联蛋白

V-FITC (Annexin V-FITC), 放在避光环境, 室温条件孵育结合 20 min, 立即用流式细胞仪检测。

1.6 丙酮酸激酶和己糖激酶活性测定

取转染后的直肠癌细胞 SW117, 培养 48 h 后, 分别用丙酮酸激酶活性检测试剂盒和己糖激酶活性检测试剂盒检测并计算细胞中的丙酮酸激酶和己糖激酶的活性。

1.7 细胞中 ATP 含量检测

取转染后的直肠癌细胞 SW117, 培养 48 h, 加入胰蛋白酶消化细胞后, 1000 rpm 离心 5 min, 弃上清液。用 0.9% 的氯化钠洗涤细胞, 用超纯水将细胞制成悬浮液。匀浆器匀浆后, 转移至 EP 管中, 在 100°C 的水浴锅中孵育 10 min。按照 ATP 检测试剂盒说明书检测细胞中 ATP 的含量。

1.8 上清中乳酸含量检测

取转染后的直肠癌细胞 SW117, 培养 48 h 后, 将培养液上清转移到 EP 管中, 1000 rpm 离心 5 min, 吸取上清液, 根据乳酸含量检测试剂盒说明书检测上清液中的乳酸含量。

1.9 Western blot 检测细胞中 Akt、p-Akt 表达水平

对照组、空载体组、过表达组细胞培养 48 h 以后, Western blot 法测定 Akt、p-Akt 表达水平, 步骤同 1.3。

1.10 统计学分析

实验数据均通过 SPSS22.0 软件统计分析, 所有数据用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组之间的数据比较运用单因素方差进行分析, 两两数据之间的比较用 LSD-t 检验法, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后细胞中 CDX1 表达水平结果

结果见图 1 中所示, 对照组、空载体组、过表达组细胞中 CDX1 的相对表达水平依次为: 0.18 ± 0.04 , 0.19 ± 0.03 , 0.79 ± 0.07 。空载体组细胞中 CDX1 的表达水平与对照组相比没有明显差异 ($P > 0.05$)。过表达组细胞中 CDX1 的表达水平明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

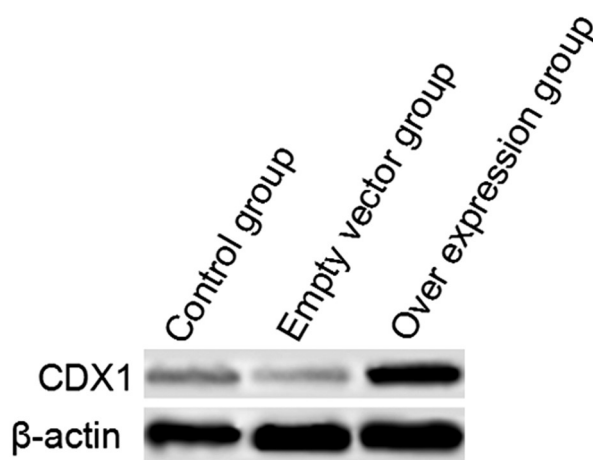


图 1 Western blot 检测转染后细胞中 CDX1 表达水平检测结果

Fig.1 Western blot detected the expression level of CDX1 in transfected cells

2.2 细胞增殖、凋亡检测结果

空载体组细胞存活率、凋亡率及细胞中 Cleaved Caspase-3 表达水平与对照组相比没有明显差异($P>0.05$)。过表达组细胞存活率与对照组相比明显降低,细胞凋亡率和细胞中 Cleaved

Caspase-3 水平与对照组相比明显升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。CDX1 抑制直肠癌细胞生长,诱导直肠癌细胞凋亡。将图 2 和表 1。

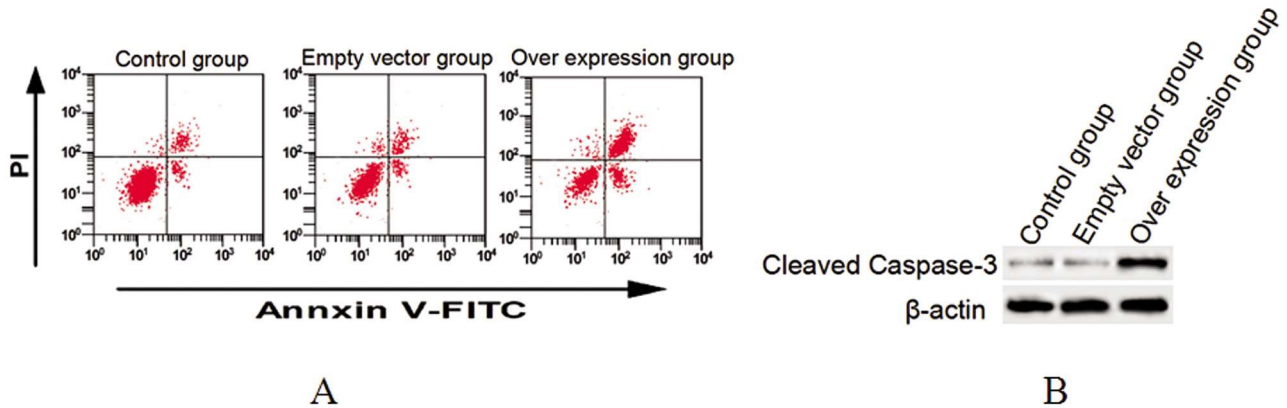


图 2 细胞凋亡及细胞中 Cleaved Caspase-3 表达水平检测结果

Fig.2 Apoptosis and Cleaved Caspase-3 expression level in cells

A:流式细胞仪检测细胞凋亡结果;B:Western blot 检测 Cleaved Caspase-3 表达水平结果

A: apoptosis was detected by flow cytometry; B: the expression of Cleaved Caspase-3 was detected by Western blot

表 1 细胞存活率、凋亡率及 Cleaved Caspase-3 相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Cell survival rate, apoptosis rate and relative expression level ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Cell survival rate(%)	Apoptosis rate(%)	Cleaved Caspase-3 level
Control group	100.01 $\pm$ 9.54	9.81 $\pm$ 5.92	0.15 $\pm$ 0.02
Empty vector group	99.99 $\pm$ 11.63 [#]	9.90 $\pm$ 3.55 [#]	0.16 $\pm$ 0.01 [#]
Over expression group	72.31 $\pm$ 4.81**	29.82 $\pm$ 8.67**	0.89 $\pm$ 0.05**

Note: compared with the control group, [#] $P>0.05$; compared with the control group, ** $P<0.05$.

2.3 细胞中丙酮酸激酶、己糖激酶活性及 ATP 含量检测结果

检测对照组、过表达组、空载体组细胞中丙酮酸激酶、己糖激酶活性及 ATP 含量。结果如表 2 中所示,空载体组细胞中丙

酮酸激酶、己糖激酶活性及 ATP 含量与对照组相比没有明显差异($P>0.05$)。过表达组细胞中丙酮酸激酶、己糖激酶活性及 ATP 含量明显低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 丙酮酸激酶、己糖激酶活性及 ATP 含量($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Pyruvate kinase, hexokinase activity and ATP content ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Pyruvate kinase activity(U/mg)	Hexokinase activity(U/mg)	ATP content(mmol/L)
Control group	0.72 $\pm$ 0.06	5.32 $\pm$ 0.39	31.53 $\pm$ 2.59
Empty vector group	0.71 $\pm$ 0.07 [#]	5.33 $\pm$ 0.41 [#]	31.67 $\pm$ 2.84 [#]
Over expression group	0.35 $\pm$ 0.04**	2.54 $\pm$ 0.26**	16.38 $\pm$ 1.83**

Note: compared with the control group, [#] $P>0.05$; compared with the control group, ** $P<0.05$.

2.4 培养液上清中乳酸含量检测结果

检测对照组、过表达组、空载体组细胞培养上清中乳酸含量。结果如表 3 中所示,空载体组细胞培养上清中乳酸含量与对照组相比没有明显差异($P>0.05$)。过表达组细胞培养上清中乳酸含量明显低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 细胞中 Akt、p-Akt 表达水平检测结果

Western blot 检测对照组、过表达组、空载体组细胞中 Akt、p-Akt 表达水平。结果如图 3、表 4 中所示,空载体组细胞中 Akt、p-Akt 表达水平与对照组相比没有明显差异($P>0.05$)。过表达组细胞中 p-Akt 表达水平明显低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 培养液上清中乳酸含量($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Lactic acid content in culture supernatant ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Lactic acid content(mmol/L)
Control group	21.35 $\pm$ 6.54
Empty vector group	21.57 $\pm$ 5.84 [#]
Over expression group	8.64 $\pm$ 1.25**

Note: compared with the control group, [#] $P>0.05$; compared with the control group, ** $P<0.05$.

3 讨论

CDX1 在肠上皮化生过程中发挥调控作用。CDX1 具有维持肠上皮细胞的分化、生长和功能维持等作用^[5,6]。正常情况下,

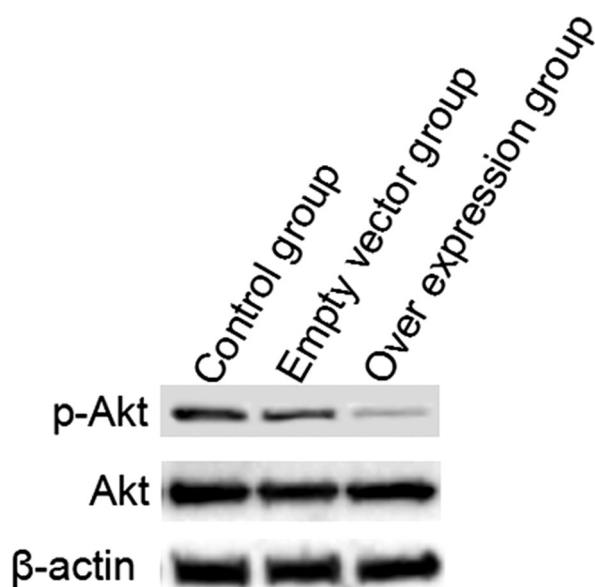


图3 细胞中 Akt、p-Akt 表达水平检测结果

Fig.3 Expression of Akt and p-Akt in cells

CDX1 在肠道细胞中特异性表达,而在胃组织中不表达。但在

胃黏膜肠化生组织中能够检测到 CDX1 的表达^[7-9]。最近的研究表明,与胃癌组织旁的肠化生组织相比,CDX1 在胃癌组织中表达下调,过表达 CDX1 后的胃癌细胞增殖受到抑制^[10]。同样的研究发现,CDX1 在结直肠癌组织中表达缺失^[11]。本研究中以直肠癌细胞 SW117 为研究对象,通过转染 CDX1 过表达载体,并通过 Western blot 检测结果证实 CDX1 过表达载体能够促进直肠癌细胞中 CDX1 的表达。这提示,成功构建了过表达 CDX1 的直肠癌细胞。进一步运用 MTT 检测了细胞的增殖情况,结果同样发现,过表达 CDX1 的直肠癌细胞增殖受到抑制,这与上述的实验报道相符合。

肿瘤细胞凋亡的发生与细胞凋亡蛋白的表达有关,是受到多种基因调控的共同结果^[12]。Caspase 蛋白酶家族参与肿瘤细胞的凋亡过程。Caspase 级联反应激活后能够启动细胞凋亡的发生。Caspase-3 在 Caspase 调反应中发挥凋亡执行的作用,其激活后可以促进细胞凋亡的发生^[13-15]。本研究中,用流式细胞术检测了细胞的凋亡情况,结果证实了过表达 CDX1 的直肠癌细胞凋亡增多,并且细胞中的 Caspase-3 活化水平也明显升高。这提示,过表达 CDX1 能够促进结肠癌细胞的凋亡。

表4 细胞中 Akt、p-Akt 相对表达水平($\bar{x} \pm s$)Table 4 Relative expression levels of Akt and p-Akt in cells($\bar{x} \pm s$)

Groups	Akt level	p-Akt level
Control group	0.74± 0.06	0.35± 0.02
Empty vector group	0.72± 0.08 [#]	0.34± 0.03 [#]
Over expression group	0.73± 0.08**	0.12± 0.01**

Note: compared with the control group, [#]P>0.05; compared with the control group, **P<0.05.

肿瘤细胞能量代谢与正常细胞不同。正常细胞能够将葡萄糖进行有氧分解,而肿瘤细胞以有氧糖酵解为主要方式^[16]。己糖激酶是癌细胞进行糖酵解的第一限速酶,具有催化葡萄糖磷酸化的作用^[17]。丙酮酸激酶是糖酵解途径中的另一个关键酶,能够催化形成第二个 ATP^[18]。乳酸是糖酵解过程中的产物^[19]。本研究中检测了细胞中丙酮酸激酶活性、己糖激酶活性、ATP 的含量和细胞培养液上清中的乳酸含量发现,过表达 CDX1 的直肠癌细胞中丙酮酸激酶活性、己糖激酶活性、ATP 含量和细胞培养液上清中的乳酸含量均明显低于对照组。这提示,过表达 CDX1 能够干扰直肠癌细胞的糖酵解途径,进而影响细胞的能量代谢。

Akt 信号通路能够作用于肿瘤细胞的生长、凋亡及细胞中的能量代谢过程^[20]。有研究表明,Akt 磷酸化水平增多后,Akt 信号通路激活,进而能够促进己糖激酶等细胞能量代谢过程中的关键调控因子的生成,从而促进肿瘤细胞的糖酵解^[21]。本研究中,进一步检测了细胞中 Akt 磷酸化水平发现,过表达 CDX1 的直肠癌细胞中 Akt 磷酸化水平降低。

综上所述,过表达 CDX1 能够抑制直肠癌细胞增殖,促进直肠癌细胞凋亡,影响直肠癌细胞能量代谢,作用机制可能与 Akt 信号通路有关。这为进一步研究 CDX1 在直肠癌中的作用机制奠定了基础,为治疗直肠癌提供了新思路。

参考文献(References)

[1] Richardson B, Preskitt J, Lichliter W, et al. The effect of multidisci-

plinary teams for rectal cancer on delivery of care and patient outcome: has the use of multidisciplinary teams for rectal cancer affected the utilization of available resources, proportion of patients meeting the standard of care, and does this translate into changes in patient outcome?[J]. Am J Surg, 2016, 211(1): 46-52

[2] Zheng H, Yang Y, Wang M, et al. Low CDX1 expression predicts a poor prognosis for hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy [J]. Surg Oncol, 2016, 25(3): 171-177

[3] Holst S, Deuss A J M, van Pelt G W, et al. N-glycosylation Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Association of Fucosylation with Differentiation and Caudal Type Homeobox 1 (CDX1)/Villin mRNA Expression[J]. Mol Cell Proteomics, 2016, 15(1): 124-140

[4] Shin C M, Kim N, Chang H, et al. Follow-up study on CDX1 and CDX2 mRNA expression in noncancerous gastric mucosae after Helicobacter pylori eradication[J]. Dig Dis Sci, 2016, 61(4): 1051-1059

[5] Sue S, Shibata W, Kameta E, et al. Intestine-specific homeobox (ISX) induces intestinal metaplasia and cell proliferation to contribute to gastric carcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2016, 51(10): 949-960

[6] Karpathakis A, Dibra H, Pipinikas C, et al. Prognostic impact of novel molecular subtypes of small intestinal neuroendocrine tumor [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(1): 250-258

[7] San Roman A K, Tovaglieri A, Breault D T, et al. Distinct processes and transcriptional targets underlie CDX2 requirements in intestinal stem cells and differentiated villus cells [J]. Stem Cell Reports, 2015, 5(5): 673-681

- [8] Sakamoto H, Asahara T, Chonan O, et al. Comparative Analysis of Gastrointestinal Microbiota Between Normal and Caudal-Related Homeobox 2 (Cdx2) Transgenic Mice [J]. *Intest Res*, 2015, 13(1): 39-49
- [9] Ye J, Ge J, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse neural stem cells and small intestinal epithelial cells by small molecule compounds[J]. *Cell Res*, 2016, 26(1): 34-45
- [10] Samadani A A, Akhavan-Niaki H. Interaction of sonic hedgehog (SHH) pathway with cancer stem cell genes in gastric cancer [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(3): 1-7
- [11] Abu-Remaileh M, Bender S, Raddatz G, et al. Chronic inflammation induces a novel epigenetic program that is conserved in intestinal adenomas and in colorectal cancer [J]. *Cancer Res*, 2015, 75 (10): 2120-2130
- [12] Sallmyr A, Matsumoto Y, Roginskaya V, et al. Inhibiting Mitochondrial DNA Ligase III α Activates Caspase 1-Dependent Apoptosis in Cancer Cells[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(18): 5431-5441
- [13] Barese C N, Felizardo T C, Sellers S E, et al. Regulated Apoptosis of Genetically Modified Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Via an Inducible Caspase-9 Suicide Gene in Rhesus Macaques [J]. *Stem Cells*, 2015, 33(1): 91-100
- [14] Cabahug Zuckerman P, Frikha Benayed D, Majeska R J, et al. Osteocyte apoptosis caused by hindlimb unloading is required to trigger osteocyte RANKL production and subsequent resorption of cortical and trabecular bone in mice femurs [J]. *J Bone Miner Res*, 2016, 31 (7): 1356-1365
- [15] Nejadnik H, Ye D, Lenkov O D, et al. Magnetic resonance imaging of stem cell apoptosis in arthritic joints with a caspase activatable contrast agent[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(2): 1150-1160
- [16] Wahlström T, Henriksson M A. Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849 (5): 563-569
- [17] Chang C H, Pearce E L. Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy[J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(4): 364-368
- [18] Giménez-Cassina A, Danial N N. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(4): 165-175
- [19] Liu J, Zhang C, Hu W, et al. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2): 197-203
- [20] Vander Broek R, Mohan S, Eytan D F, et al. The PI3K/Akt/mTOR axis in head and neck cancer: functions, aberrations, cross-talk, and therapies[J]. *Oral Dis*, 2015, 21(7): 815-825
- [21] Marques R B, Aghai A, de Ridder C M A, et al. High efficacy of combination therapy using PI3K/AKT inhibitors with androgen deprivation in prostate cancer preclinical models[J]. *Eur Urol*, 2015, 67(6): 1177-1185

(上接第 3229 页)

- [19] Wang Y, Zhao Y, Liu Y, et al. Chamaejasmine inactivates Akt to trigger apoptosis in human HEP-2 larynx carcinoma cells [J]. *Molecules*, 2011, 16(10): 8152-8164
- [20] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked[J]. *Science*, 1997, 275(5303): 1129-1132
- [21] Fujita E, Jinbo A, Matuzaki H, et al. Akt phosphorylation site found in human caspase-9 is absent in mouse caspase-9 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 264(2): 550-555
- [22] Walter T, Scoazec J Y, Couderc C, et al. Well-differentiated pancreatic islet cell carcinoma: Is there reversibility in mTOR inhibitor resistance?[J]. *Acta Oncologica*, 2011, 50(5): 731-732
- [23] Elghazi L, Balcazar N, Blandino-Rosano M, et al. Decreased IRS Signaling Impairs β -Cell Cycle Progression and Survival in Transgenic Mice Overexpressing S6K in β -Cells[J]. *Diabetes*, 2010, 59(10): 2390
- [24] Balcazar N, Sathyamurthy A, Elghazi L, et al. mTORC1 activation regulates beta-cell mass and proliferation by modulation of cyclin D2 synthesis and stability[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284 (12): 7832-7842
- [25] Nie J, Liu X, Lilley B N, et al. SAD-A kinase controls islet β -cell size and function as a mediator of mTORC1 signaling[J]. *Pnas*, 2013, 110 (34): 13857-13862
- [26] Wang Q, Cai Y, Van d C M, et al. Interaction of glibenclamide and metformin at the level of translation in pancreatic β cells [J]. *Journal of Endocrinology*, 2011, 208(2): 161-169
- [27] Shimodahira M, Fujimoto S, Mukai E, et al. Rapamycin impairs metabolism-secretion coupling in rat pancreatic islets by suppressing carbohydrate metabolism[J]. *Journal of Endocrinology*, 2010, 204(1): 37
- [28] Tanemura M, Nagano H, Taniyama K, et al. Role of rapamycin-induced autophagy in pancreatic islets [J]. *American Journal of Transplantation Official Journal of the American Society of Transplantation & the American Society of Transplant Surgeons*, 2012, 12(4): 1067