

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.12.008

CDA 基因沉默对人慢性髓系白血病细胞增殖和凋亡的影响 *

傅 菁¹ 唐 娜^{2Δ} 张 越³ 周 略⁴ 刘安生¹

(1 西安市儿童医院血液肿瘤科 陕西 西安 710003;

2 暨南大学第二临床医学院 南方科技大学第一附属医院 深圳市人民医院病理科 广东 深圳 518020;

3 西安市儿童医院中心实验室 陕西 西安 710003; 4 深圳市人民医院肿瘤放疗科 广东 深圳 518020)

摘要 目的:探讨胞苷脱氨酶(CDA)基因沉默在治疗人慢性髓系白血病(CML)中的潜在价值。**方法:**通过 RT-PCR 和 Western blot 检测 CML 患者和造血干细胞移植供体的骨髓单个核细胞中的 CDA 表达。对 CML KCL-22 细胞系转染 shRNA 和过表达 CDA 的 pBS / U6-Neo 质粒来诱导 CDA 基因沉默或过表达。通过细胞计数试剂盒 8(CCK-8)测定和细胞集落形成实验评价细胞增殖,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。此外,将 0.2 mL 不同处理的细胞悬浮液(10^6 个细胞 / mL)注射到裸鼠中建立裸鼠肿瘤异种移植模型。**结果:**与造血干细胞移植供体相比,CML 患者的骨髓单个核细胞中的 CDA mRNA 和蛋白表达显著升高($P<0.05$)。转染 shRNA-CDA 显著降低了 KCL-22 细胞的细胞活力和细胞集落数($P<0.05$)。与对照组(4.32%)相比,shRNA-CDA 组(13.45%)的细胞凋亡率显著升高($P<0.05$)。与对照组相比,shRNA-CDA 组的 BCL-2 蛋白表达水平显著降低,而 cleaved caspase-3 显著升高($P<0.05$)。与对照组相比,shRNA-CDA 组的 PI3K 蛋白表达水平和 Akt 磷酸化水平显著降低($P<0.05$)。接种 30 d 后,与对照组相比,shRNA-CDA 组裸鼠的肿瘤重量和肿瘤体积均显著降低($P<0.05$)。**结论:**CDA 在人慢性髓系白血病中高表达,CDA 基因沉默可在体内和体外抑制肿瘤细胞的生长。其机制与抑制 PI3K / Akt 信号通路的激活有关。

关键词:慢性髓系白血病;胞苷脱氨酶;KCL-22 细胞;PI3K / Akt 信号通路;基因沉默

中图分类号:R733.72 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)12-2239-07

Effect of CDA Gene Silencing on Proliferation and Apoptosis of Human Chronic Myeloid Leukemia Cells*

FU Qiang¹, TANG Na^{2Δ}, ZHANG Yue³, ZHOU Lue⁴, LIU An-sheng¹

(1 Department of Neoplastic Hematologic Disorder, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China;

2 Department of Pathology, 2nd Clinical Medical College of Jinan University, 1st Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518020, China;

3 The Central Laboratory, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710003, China;

4 Department of Radiotherapy, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518020, China)

ABSTRACT Objective: To explore the potential value of cytidine deaminase (CDA) gene silencing in the treatment of human chronic myeloid leukemia (CML). **Methods:** The expression of CDA in bone marrow mononuclear cells of CML patients and hematopoietic stem cell transplantation donors was detected by RT-PCR and Western blot. CML KCL-22 cell line was transfected with shRNA and overexpressing CDA pBS/U6-Neo plasmid to induce CDA gene silencing or overexpression. Cell proliferation was evaluated by the Cell Counting Kit 8 (CCK-8) assay and cell colony formation experiments, and apoptosis was detected by flow cytometry. In addition, 0.2 mL of differently treated cell suspensions (10^6 cells / mL) were injected into nude mice to establish nude mice tumor xenograft models. **Results:** Compared with hematopoietic stem cell transplantation donors, the expression of CDA mRNA and protein in bone marrow mononuclear cells of CML patients was significantly increased ($P<0.05$). Transfection of shRNA-CDA significantly reduced the cell viability and cell colony number of KCL-22 cells ($P<0.05$). Compared with the control group (4.32%), the apoptosis rate of the shRNA-CDA group (13.45%) was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression level of BCL-2 protein in the shRNA-CDA group was significantly reduced, while cleaved caspase-3 was significantly increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression level of PI3K protein and Akt phosphorylation level in shRNA-CDA group were significantly reduced ($P<0.05$). After 30 days of inoculation, the tumor weight and tumor volume of the nude mice in the shRNA-CDA group were significantly reduced compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** CDA is highly expressed in human chronic

* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81702359);深圳市科技计划项目(JCYJ20180301170035531)

作者简介:傅菁(1984-),女,硕士研究生,主要研究方向:血液肿瘤

Δ 通讯作者:唐娜(1983-),女,博士研究生,主要研究方向:结直肠癌转移机制及淋巴造血肿瘤机制,

E-mail:jessiel488@126.com,电话:18509287854

(收稿日期:2019-12-01 接受日期:2019-12-25)

myeloid leukemia, and CDA gene silencing can inhibit tumor cell growth in vivo and in vitro. Its mechanism is related to inhibiting the activation of PI3K / Akt signaling pathway.

Key words: Chronic myeloid leukemia; Cytidine deaminase; KCL-22 cells; PI3K / Akt signaling pathway; Gene silencing

Chinese Library Classification(CLC): R733.72 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)12-2239-07

前言

慢性髓系白血病(chronic myeloid leukemia, CML)也叫慢性粒细胞白血病,是一种造血系统恶性疾病,其特征是由于9号和22号染色体的相互易位形成费城染色体(Ph),该易位形成一种新的BCR-ABL融合基因并诱导白血病的发生^[1-3]。目前,针对BCR-ABL融合基因的治疗措施较不理想。酪氨酸激酶抑制剂治疗已被作为CML的一线 and 二线疗法,例如伊马替尼、达沙替尼、尼洛替尼等^[4]。另外,RNA干扰或基因沉默等CML的基因疗法也逐渐兴起。胞嘧啶脱氨酶(cytidine deaminase, CDA)是参与吉西他滨代谢的一种主要酶,吉西他滨是一种嘧啶类似物,可用于胆管癌等肿瘤的化疗^[5]。根据不同物种中CDA的晶体结构和氨基酸序列,CDA可分为两种类型,即同型二聚体和同型四聚体^[6]。其他研究显示,CDA表达的丧失可以作为癌症易感性的新预测指标^[7]。CDA在癌细胞中高表达,并且是胞嘧啶核苷类似物分解代谢中的重要酶^[8]。因此,靶向CDA的基因疗法可能是治疗CML的潜在疗法。然而,CDA基因沉默在CML细胞生物学过程中的潜在机制仍有待阐明。因此,本研究旨在探讨CDA基因沉默对CML细胞凋亡和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

2017年1月至2019年1月期间,本研究纳入了30名确诊的CML患者,其中20例男性和10例女性,年龄为8至14岁,平均年龄为12.20±2.15岁。此外,纳入30例造血干细胞移植供体作为对照组。使用人淋巴细胞分离液(FICOLL配置)(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)分离骨髓单个核细胞用于检测CDA的表达。本研究已获得医院伦理委员会的批准,所有患者均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CML KCL-22细胞系购自ATCC,将KCL-22细胞加入Roswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640培养基中(美国Gibco公司),培养基中添加10%胎牛血清(FBS),然后将细胞在37℃、5% CO₂、95%相对湿度的培养箱中培养。

1.2.2 CDA基因沉默和CDA过表达模型的构建 靶向CDA基因序列的短发夹RNA(shRNA-CDA)及阴性对照(shRNA-NC)由上海吉玛制药技术有限公司合成。序列如下:shRNA-CDA,5'-TGAAGGAGCATGGCTTCAA-3'; shRNA-NC,5'-GTTTGAACGTTCCCGTACG-3'。委托上海吉玛制药技术有限公司构建CDA基因沉默(shRNA-CDA)和CDA过表达(pBS/U6-Neo-CDA)的pBS/U6-Neo质粒。

1.2.3 细胞转染 选择处于对数生长期的KCL-22细胞进行

转染。转染过程中,将终浓度为50 nM的质粒加入250 μL无血清Opti-MEM培养基(美国Gibco公司)中,轻轻混合并在室温下孵育5 min。同时,将5 μL Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司)加入250 μL无血清Opti-MEM培养基中并孵育5 min。然后将以上两种溶液混合并在室温下孵育20 min,然后添加到细胞中。转染48 h后收集细胞用于进一步实验。

1.2.4 细胞活力测定 细胞转染24 h后,将细胞离心并用PBS洗涤3次,制成单细胞悬液。计数后,将细胞以6×10³个细胞/孔的密度接种到96孔板中,每孔含有100 μL培养基。然后每个孔中加入10 μL细胞计数试剂盒8(CCK-8)溶液(美国Sigma公司)进行培养。孵育24、48和72 h后,使用酶联免疫吸附测定(ELISA)在450 nm处检测每个孔的光密度(OD)。

1.2.5 细胞集落形成实验 用胰蛋白酶分离细胞,悬浮并计数。然后将细胞以1000个细胞/孔的密度接种到6孔板中,并在半固定培养基中于5% CO₂和37℃下培养。培养2周后将细胞用结晶紫染色,并观察细胞集落的数量和大小。

1.2.6 细胞凋亡测定 转染48 h后,将细胞以4000 r/min离心5 min。随后,将细胞用冰PBS冲洗3次,并再次离心。根据膜联蛋白-V-FITC凋亡测定试剂盒(美国BD Pharmingen公司)的说明,将150 μL结合缓冲液和5 μL膜联蛋白-V-FITC加入每个试管中。振荡后,将细胞在黑暗中室温孵育15 min。随后,将另外的100 μL结合缓冲液和5 μL PI染色剂(美国Sigma-Aldrich公司)添加到每个试管中。振荡后,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 RT-PCR 使用Trizol试剂(美国Invitrogen公司)提取细胞样品中的总RNA。将RNA溶解在用焦碳酸二乙酯(DECP)预处理的超纯水中,在分光光度计上测量260和280 nm的吸光度来评估RNA质量。根据试剂盒(Fermentas Inc.,汉诺威,马里兰州,美国)的使用说明,使用两步法反转录试剂盒(瑞士罗氏公司)对提取的RNA进行反转录,反应条件如下:70℃持续10 min,冰浴2 min,40℃持续60 min,70℃持续10 min。将获得的cDNA保存在-80℃的冰箱中。使用TaqMan探针法并根据试剂盒(美国Fermentas公司)的说明制备PCR反应体系,使用Bio-Rad iQ5实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)进行RT-PCR。CDA引物的上游和下游序列分别是5'-CCGCTCAT-ACGAAGTGAAG-3'和5'-GAATCACCACCCATATAGTGG-3'。PCR的反应条件如下:95℃预变性30 s,95℃变性10 s,60℃退火20 s,70℃延伸10 s,40个循环。3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内部对照,上游和下游序列分别是5'-ATTC-GACAGTCGCACAAAGG-3'和5'-GCAGGAGAGAGGATCGGGA-3'。使用2^{-ΔΔCt}计算CDA的相对表达。

1.2.8 蛋白质印迹分析 将细胞用1×SDS裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司)裂解,然后将提取的蛋白质在100℃下加热5 min,并将20 μL蛋白加载到10%聚丙烯酰胺凝

胶电泳(PAGE)上。随后,将蛋白在 48 V 电压下转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,然后在室温下用 5%牛血清白蛋白(BSA)孵育 2 h 进行封闭。用 1×tris 缓冲液和吐温 20(TBST)冲洗后,将膜与以下兔抗人一抗在 4℃ 过夜孵育。一抗包括 CDA、B 细胞淋巴瘤 / 白血病 2(BCL-2)、cleaved caspase-3、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、total-AKT、p-AKT 和 GAPDH,抗体均以 1:1000 稀释,均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)。GAPDH 用作内部参考。用 1×TBST 洗涤后,将细胞与过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (1:3000)(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)在室温下孵育 1 h。再次用 TBST 洗涤细胞后,用增强化学发光(ECL)试剂(上海碧云天生物技术有限公司)进行显影。

1.2.9 裸鼠肿瘤异种移植 从中国医学科学院医学实验动物研究所购买 30 只无特定病原体 (SPF) 雄性 BALB/c nu/nu 裸鼠,6 周龄,体重:18-25 g 用于肿瘤异种移植实验。将裸鼠饲养在 22-25℃、55±5% 相对湿度的 SPF 级实验室中。在这项研究中,将裸鼠分为对照组、shRNA-NC 组和 shRNA-CDA 组,每组 10 只。接种肿瘤之前,用 75% 的酒精对裸鼠皮肤进行消毒,将

0.2 mL 细胞悬浮液(10^6 个细胞 /mL)注射到裸鼠腋部皮下。接种后每 3 天测量一次肿瘤的长度(a)和宽度(b),并计算肿瘤体积($V=ab^2/2$)。接种 30 天后处死裸鼠,分离肿瘤并称重计算肿瘤体积。

1.3 统计分析

使用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。测量数据表示为平均值±标准差。通过 t 检验进行两组间比较。单因素方差分析(ANOVA)用于多组间比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CML 患者的骨髓单个核细胞中 CDA mRNA 和蛋白表达升高

结果显示,与造血干细胞移植供体对照组相比,CML 患者的骨髓单个核细胞中的 CDA mRNA 和蛋白表达显著升高($P<0.05$),分别是造血干细胞移植供体的 3.42 和 2.54 倍。见图 1。

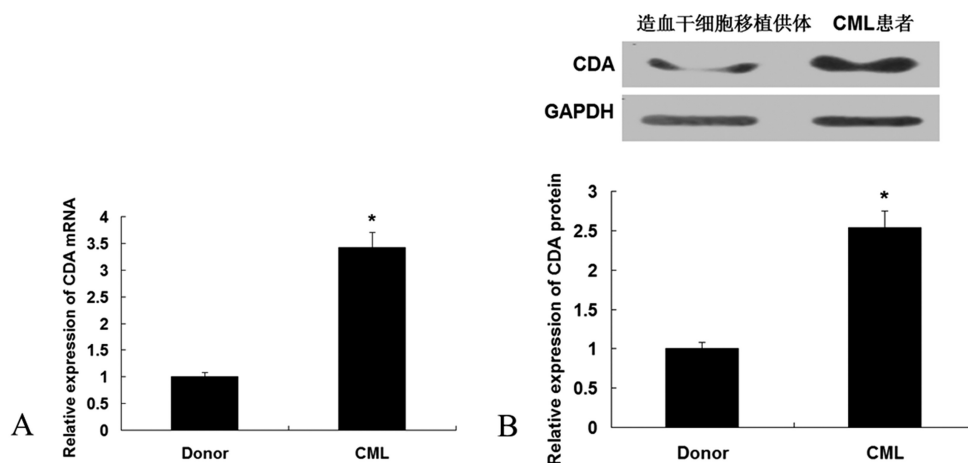


图 1 CML 患者 CDA mRNA 和蛋白表达升高

Fig.1 CDA mRNA and protein expression increased in CML patients

Note: Detection of CDA mRNA and protein expression in bone marrow mononuclear cells from CML patients and hematopoietic stem cell transplant donors by RT-PCR (A) and Western blot (B); Compared with hematopoietic stem cell transplant donors, * $P<0.05$.

2.2 CDA 基因沉默抑制细胞增殖

转染 48 h 后,与对照组相比,转染 shRNA-CDA 的 KCL-22 细胞中 CDA mRNA 和蛋白表达显著降低($P<0.05$),CDA mRNA 和蛋白表达分别降低了 56.03%和 57.14%($P<0.05$)。此外,与对照组相比,转染过表达 CDA 的 pBS/U6-Neo 质粒的 KCL-22 细胞中 CDA mRNA 和蛋白表达显著升高($P<0.05$),CDA mRNA 和蛋白表达分别升高了 131.34%和 102.79%($P<0.05$)。见图 2。

细胞活力测定结果显示,孵育 48 h 和 72 h 后,shRNA-CDA 组的细胞活力显著降低,而 pBS / U6-Neo-CDA 组的细胞活力显著升高。另外,细胞集落形成实验显示,shRNA-CDA 组的细胞集落数显著低于对照组,而 pBS/U6-Neo-CDA 组的细胞集落数显著高于对照组($P<0.05$)。见图 3。

2.3 CDA 基因沉默诱导细胞凋亡

流式细胞术检测结果显示,转染 48 h 后,与对照组(4.32%)相比,shRNA-CDA 组(13.45%)的细胞凋亡率显著升高,而 pBS / U6-Neo-CDA 组的细胞凋亡率显著降低(1.04%)($P<0.05$)。见图 4。

Western blot 结果显示,与对照组相比,shRNA-CDA 组的 BCL-2 蛋白表达水平显著降低,而 cleaved caspase-3 显著升高($P<0.05$)。另外,与对照组相比,pBS/U6-Neo-CDA 组的 BCL-2 蛋白表达水平显著升高,而 cleaved caspase-3 显著降低($P<0.05$)。见图 5。

2.4 CDA 基因沉默通过抑制 PI3K / Akt 信号通路发挥抗癌作用

Western blot 结果显示,与对照组相比,shRNA-CDA 组的 PI3K 蛋白表达水平和 Akt 磷酸化水平显著降低,而 pBS/U6-Neo-CDA 组的 PI3K 蛋白表达水平和 Akt 磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。见图 6。

2.5 CDA 基因沉默抑制肿瘤生长

裸鼠肿瘤异种移植实验结果显示,接种 30 d 后,与对照组 ($P<0.05$)。见图 7。
相比,shRNA-CDA 组裸鼠的肿瘤重量和肿瘤体积均显著降低

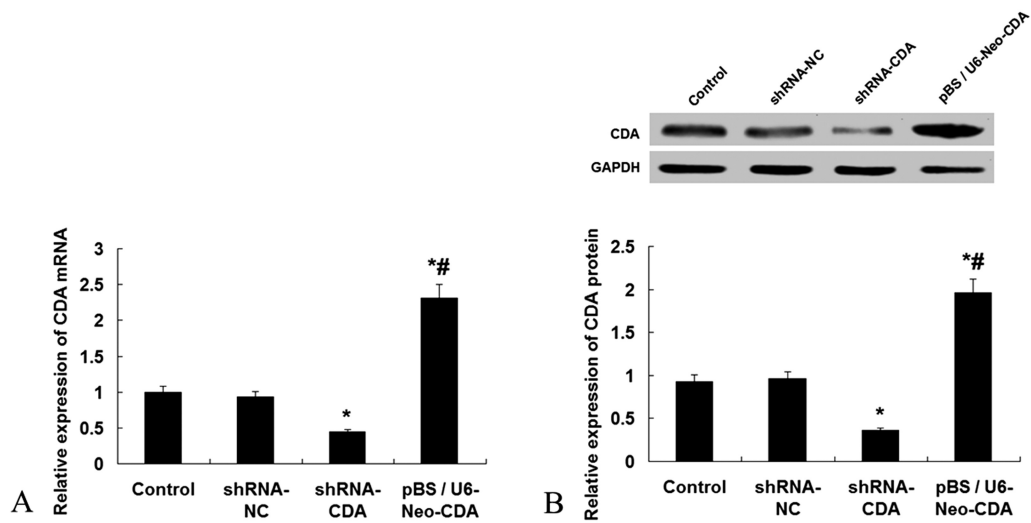


图 2 转染 shRNA 或过表达 CDA 的 pBS / U6-Neo 质粒对 CDA mRNA 和蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of transfected shRNA or pBS / U6-Neo plasmid overexpressing CDA on CDA mRNA and protein expression

Note: A: RT-PCR; B: Western blot; Compared with Control, * $P<0.05$; Compared with shRNA-CDA, # $P<0.05$.

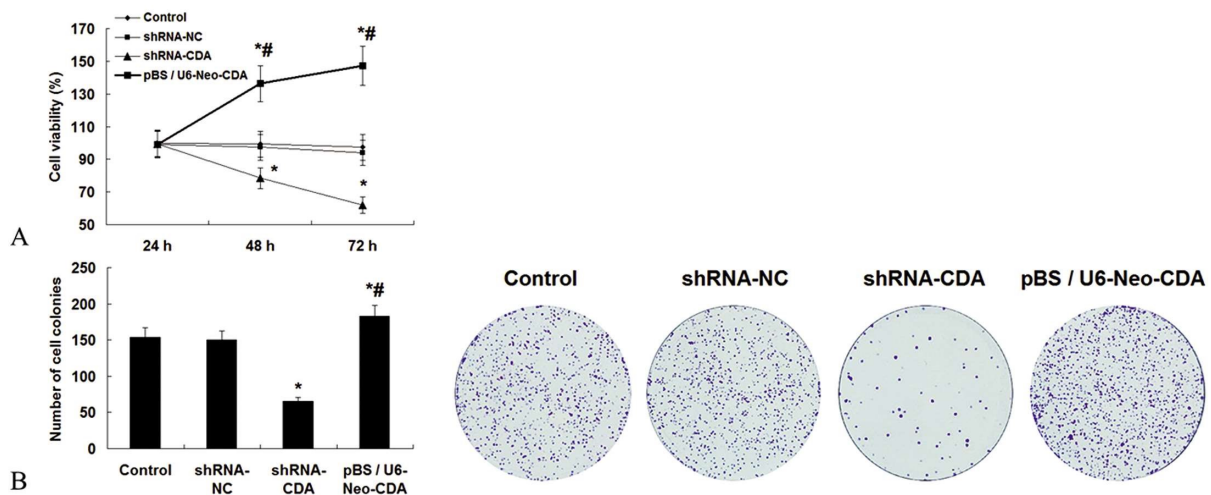


图 3 CDA 基因沉默抑制细胞增殖

Fig.3 CDA gene silencing inhibited cell proliferation

Note: A: Cell counting kit 8 (CCK-8) measurement; B: Cell colony formation experiment; Compared with Control, * $P<0.05$;

Compared with shRNA-CDA, # $P<0.05$.

3 讨论

胞嘧啶脱氨酶(CDA)是胞嘧啶核苷类似物分解代谢中的重要酶,也是治疗某些白血病的化疗药物,并在癌细胞中高表达^[8]。此外,据报道 CDA 是吉西他滨代谢中的重要酶,吉西他滨是一种嘧啶类似物,广泛用于多种肿瘤的治疗^[9,10]。无论在体外还是在体内,CDA 都可以调节对抗肿瘤 DCyd 类似物的敏感性,从而影响 2'-C- 氨基 -2'- 脱氧 -1-β-d- 阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶(CNDAC)的抗肿瘤活性^[11]。一项先前的研究发现,在包括髓样白血病在内的许多癌症中,男性癌症患者的 CDA 表达明显高于女性^[12]。另外,在 AML 患者中,CDA 水平与无病生存期密切相关^[13]。因此,CDA 可能成为白血病的有前途的生物标志物

和治疗靶标。本研究发现,与造血干细胞移植供体相比,CML 患者的骨髓单个核细胞中的 CDA mRNA 和蛋白表达显著升高,证实 CDA 也在人慢性髓系白血病中上调。

其他研究显示,CDA 治疗可通过以时间和剂量依赖性方式诱导绒毛膜癌细胞凋亡^[13]。本研究发现,通过转染 shRNA 使 CDA 基因沉默,导致 KCL-22 细胞活性和集落形成能力显著降低,并且提高细胞凋亡率。而通过转染过表达 CDA 的 pBS / U6-Neo 质粒则可促进细胞增殖并抑制细胞凋亡。此外,本研究建立了裸鼠肿瘤异种移植模型,发现 CDA 基因沉默明显降低了裸鼠的肿瘤重量和肿瘤体积,说明靶向 CDA 的基因疗法可能是治疗慢性髓系白血病的有效疗法。

Bcl-2 是线粒体凋亡信号通路的重要的调节剂,也是一种

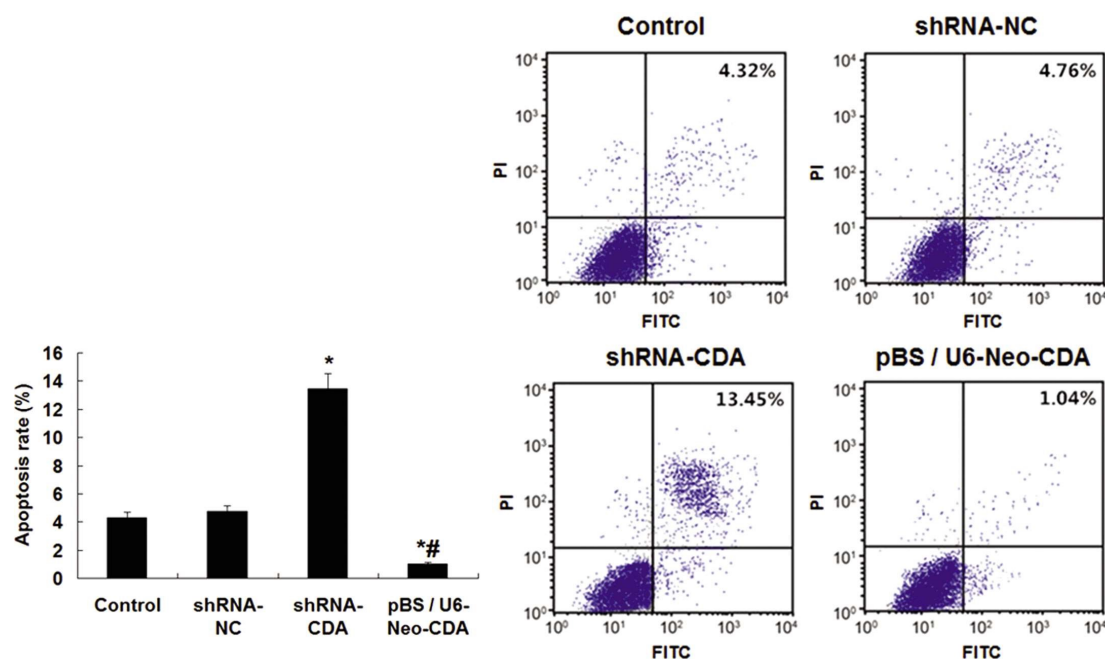


图4 膜联蛋白-V-FITC 凋亡测定试剂盒检测显示 CDA 基因沉默诱导细胞凋亡

Fig.4 Detection of Annexin-V-FITC Apoptosis Kit showed that CDA gene silencing induced apoptosis

Note: Compared with Control, * $P < 0.05$; Compared with shRNA-CDA, # $P < 0.05$.

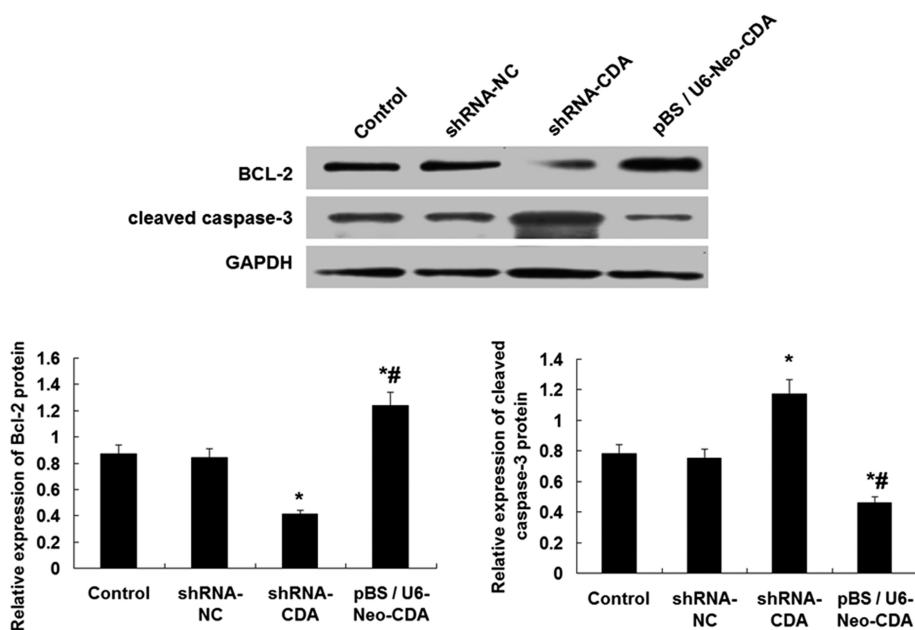


图5 Western blot 检测显示 CDA 基因沉默调控细胞凋亡相关蛋白 BCL-2 和 cleaved caspase-3 的表达

Fig.5 Western blot showed that CDA gene silencing regulated the expression of apoptosis-related proteins BCL-2 and cleaved caspase-3

Note: Compared with Control, * $P < 0.05$; Compared with shRNA-CDA, # $P < 0.05$.

抗凋亡蛋白,多项研究均证实 Bcl-2 的高表达会阻止癌细胞的凋亡^[14,15]。caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,通常情况下,caspase 3 以酶原的形式存在,当细胞凋亡时,caspase 3 发生活化后形成 cleaved caspase 3 并发挥促进细胞凋亡的作用^[16,17]。本研究发现 CDA 基因沉默导致 BCL-2 蛋白表达水平显著降低,而 cleaved caspase-3 显著升高。许多研究表明 PI3K / Akt 信号通路在细胞凋亡过程中发挥抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的作用,并且可介导凋亡因子 BCL-2、caspase-3 的表达^[18-20]。PI3K 是脂质激酶家族成员,可以调节多种细胞过程,例如增殖、黏附和存活^[21]。PI3K 在多种癌症中被上调,并且激活

的 PI3K 可进一步激活 AKT^[22-24]。据报道,慢性粒细胞白血病的 发生发展与 AKT 的过度表达密切相关^[25]。其他研究者发现, AKT 表达的降低增强了吉西他滨诱导的胰腺癌细胞凋亡及其抗肿瘤活性^[26]。PI3K / Akt 信号通路的活化可解聚促凋亡分子蛋白(Bad)与抗凋亡因子 BCL-2 形成的复合体,阻断 Bad 的促凋亡作用^[27,28]。Bcl-2 可以通过作用于线粒体细胞色素 c 释放的下游分子来保护细胞免于凋亡,从而防止 caspase-3 依赖性蛋白水解级联反应^[29,30]。本研究也发现 PI3K / Akt 信号通路在 KCL-22 细胞中被激活,然而,CDA 基因沉默则会抑制 PI3K / Akt 信号通路的激活,从而诱导癌细胞凋亡。这些结果表明

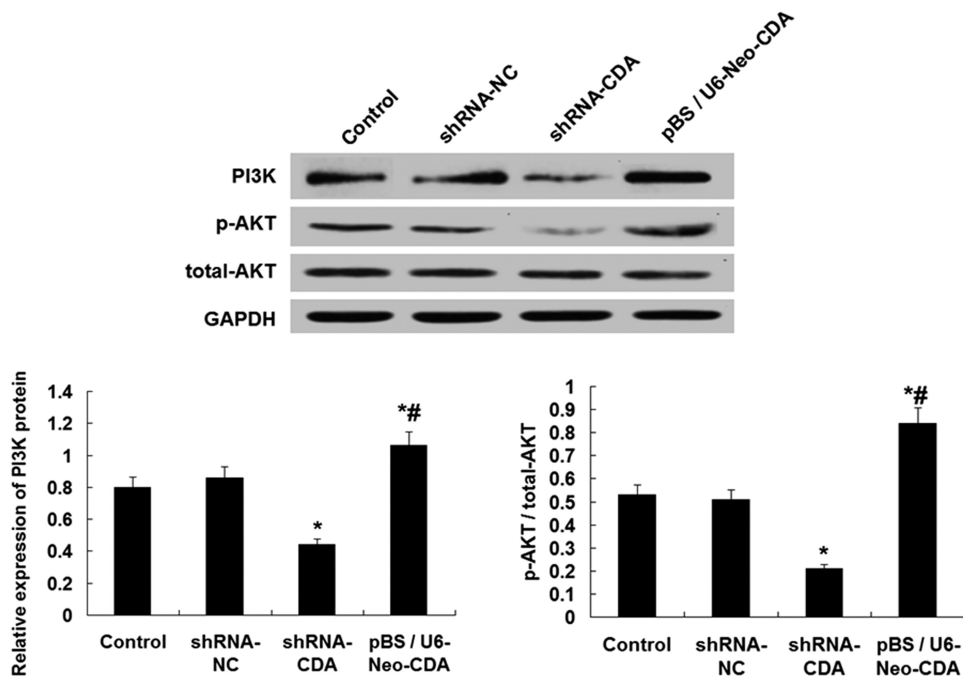


图6 Western blot 检测显示 CDA 基因沉默抑制 PI3K/Akt 信号通路

Fig.6 Western blot showed that CDA gene silencing inhibited PI3K/Akt

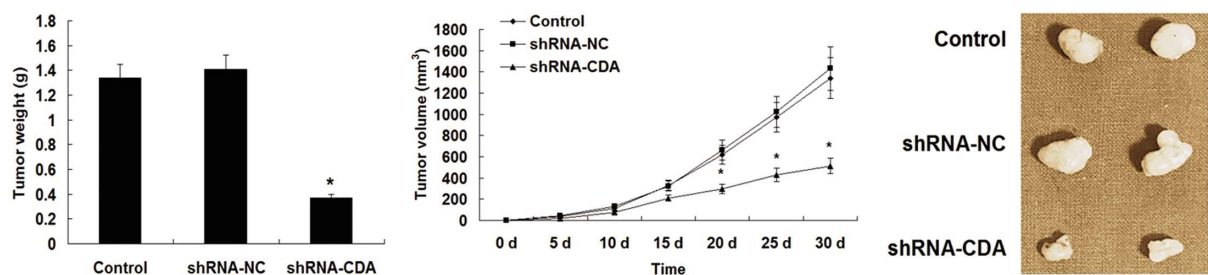
Note: Compared with Control, * $P < 0.05$; Compared with shRNA-CDA, # $P < 0.05$.

图7 CDA 基因沉默抑制裸鼠肿瘤生长

Fig.7 CDA gene silencing inhibited tumor growth in nude mice

Note: Compared with Control, * $P < 0.05$; Compared with shRNA-CDA, # $P < 0.05$.

CDA 基因沉默可通过抑制 PI3K / Akt 信号通路的激活在慢性髓系白血病中发挥抗癌作用。

总之, 本研究表明 CDA 在人慢性髓系白血病中高表达, CDA 基因沉默可在体内和体外抑制肿瘤细胞的生长。其机制与抑制 PI3K / Akt 信号通路的激活有关。因此, CDA 有望成为治疗人慢性髓系白血病的新型分子靶标。

参考文献(References)

- [1] 中华医学会血液学分会. 中国慢性髓系白血病诊断与治疗指南 (2016 年版)[J]. 中华血液学杂志, 2016, 37(8): 633-639
- [2] 乔建辉, 张泽川, 姚波, 等. 对伊马替尼反应差的慢性髓系白血病患者换用第 II 代酪氨酸激酶抑制剂的疗效观察[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(1): 65-69
- [3] Paola L, Claudio S. Accurate prediction of the age incidence of chronic myeloid leukemia with an improved two-mutation mathematical model[J]. Integrative Biology, 2016, 8(12): 1261-1275
- [4] 荆凌华, 刘松年, 马利敏, 等. 尼洛替尼和伊马替尼对慢性粒细胞白血病表达谱的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(19): 28-33
- [5] Yoon K A, Woo S M, Hong E K, et al. Cytidine Deaminase as a Molecular Predictor of Gemcitabine Response in Patients with Biliary Tract Cancer[J]. Oncology, 2015, 89(6): 345-350
- [6] Wu L, Wu X, Zhu B, et al. Identification and functional characterization of a novel cytidine deaminase in a gastropod abalone, *Haliotis diversicolor supertexta* [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2009, 33(5): 709-717
- [7] Mameri H, Bieche I, Meseure D, et al. Cytidine deaminase deficiency reveals new therapeutic opportunities against cancer [J]. Clinical Cancer Research, 2017, 23(8): 2116-2126
- [8] Naotake F, Ray L C, Kaori F, et al. Tetrahydropyridine inhibits cell proliferation through cell cycle regulation regardless of cytidine deaminase expression levels[J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37424
- [9] 赵培超, 张智峰, 刘献志, 等. 吉西他滨对人胶质瘤 SHG-44 细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(5): 790-792
- [10] 元建华, 李建旺, 张曙波, 等. 吉西他滨联合替吉奥治疗铂类方案化疗失败晚期鼻咽癌患者临床观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(3): 170-174
- [11] Yoshida T, Endo Y, Obata T, et al. Influence of cytidine deaminase on antitumor activity of 2'-deoxycytidine analogs in vitro and in vivo [J]. Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of

- Chemicals, 2010, 38(10): 1814-1819
- [12] Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahim Q, et al. Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy[J]. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19(4): 938-948
- [13] Kim G S, Heo J R, Kim S U, et al. Cancer-specific inhibitory effects of genetically engineered stem cells expressing cytosine deaminase and interferon- β against choriocarcinoma in xenografted metastatic mouse models[J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(1): 74-85
- [14] 李红光, 赵利红, 张振华, 等. 黏蛋白 1 基因调控酪氨酸蛋白激酶 / 信号转导与转录激活因子 3 信号通路抑制甲状腺癌细胞增殖及促进细胞凋亡机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(11): 1889-1891
- [15] 解建中, 赵睿, 王亮, 等. 青藤碱对体外人肝星状细胞增殖与凋亡的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(2): 146-148
- [16] Zhao T, Fu Y, Sun H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl 2 and caspase 3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia[J]. *Iubmb Life*, 2018, 70(1): 60-70
- [17] Jiang W, Chen Y, Li B, et al. DBA-induced caspase-3-dependent apoptosis occurs through mitochondrial translocation of cyt-c in rat hippocampus[J]. *Molecular Biosystems*, 2017, 13(9): 1863-1873
- [18] Fu X, Wen H, Jing L, et al. MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI3K/Akt pathway[J]. *Cancer Science*, 2017, 108(4): 620-631
- [19] Bahrami A, Hasanzadeh M, Hassanian SM, et al. The Potential Value of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway for Assessing Prognosis in Cervical Cancer and as a Target for Therapy[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(12): 4163-4169
- [20] Ebrahimi S, Hosseini M, Shahidsales S, et al. Targeting the Akt/PI3K signaling pathway as a potential therapeutic strategy for the treatment of pancreatic cancer[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 24(13): 1321-1331
- [21] 辛敏行. 选择性 PI3K δ 抑制剂的研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2016, 47(5): 503-510
- [22] 蔡鹏涛, 吴志强, 郭会, 等. 中药抑制非小细胞肺癌 PI3K/Akt /mTOR 信号通路克服 EGFR-TKIs 获得性耐药研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(12): 1849-1852
- [23] 程玉, 薛晶, 次云哲, 等. Oct4 和 PI3K 在胃癌组织中的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(34): 27-29
- [24] 史晓莉, 申红梅. PI3K/AKT 信号通路相关基因拷贝数变异与甲状腺癌关系的研究进展[J]. *中华地方病学杂志*, 2019, 38(1): 83-86
- [25] Soumyajit B M, Chakraborty P K, Sanghamitra R, et al. Modulation of Akt and ERK1/2 Pathways by Resveratrol in Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Cells Results in the Downregulation of Hsp70[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(1): e8719
- [26] 林永良, 陈良岂, 杜荣国, 等. 阿司匹林引起胰腺癌细胞株 SW1990 对吉西他滨耐药及其机制研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(17): 2267-2269
- [27] Cheng SM, Ho TJ, Yang AL, et al. Exercise training enhances cardiac IGF1-R/PI3K/Akt and Bcl-2 family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(2): 478-485
- [28] Dufour C, Holy X, Marie PJ. Transforming growth factor-beta prevents osteoblast apoptosis induced by skeletal unloading via PI3K/Akt, Bcl-2, and phospho-Bad signaling[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294(4): 794-801
- [29] Swanton E, Savory P, Cosulich S, et al. Bcl-2 regulates a caspase-3/ caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts[J]. *Oncogene*, 1999, 18(10): 1781-1787
- [30] Reshi L, Wang H V, Hui C F, et al. Anti-apoptotic genes Bcl-2 and Bcl-xL overexpression can block iridovirus serine/threonine kinase-induced Bax/mitochondria-mediated cell death in GF-1 cells[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2017, 61: 120-129

(上接第 2238 页)

- [29] 金呈强, 董海新, 刘仿. Itp 小鼠模型中 no/nos 对 ros 生成影响作用的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(3): 417-420
- [30] Gao XJ, Tang B, Liang HH, et al. Selenium deficiency inhibits micrna-146a to promote ros-induced inflammation via regulation of the mapk pathway in the head kidney of carp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 91: 284-292
- [31] Wang F, Liu J, Zhou L, et al. Senescence-specific change in ros scavenging enzyme activities and regulation of various sod isozymes to ros levels in psf mutant rice leaves [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 109: 248-261
- [32] Wang Y, Huo T, Feng C, et al. Chrysotile asbestos induces apoptosis via activation of the p53-regulated mitochondrial pathway mediated by ros in a549 cells[J]. *Applied Clay Science*, 2019, 182: 105245
- [33] Qi C, Lin X, Li S, et al. Sohc70 positively regulates thermotolerance by alleviating cell membrane damage, reducing ros accumulation, and improving activities of antioxidant enzymes [J]. *Plant Science*, 2019, 283: 385-395
- [34] 田华, 李严严, 丁明德, 等. 载脂蛋白 a-i 模拟肽 d4f 通过抑制 caspase-12 减轻氧化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(10): 1750-1755
- [35] Zhang Y, Li Y, Feng Q, et al. Polydatin attenuates cadmium-induced oxidative stress via stimulating sod activity and regulating mitochondrial function in musca domestica larvae [J]. *Chemosphere*, 2020, 248: 126009
- [36] Liu H, Zhang X, Du Y, et al. Leonurine protects brain injury by increased activities of ucp4, sod, cat and bcl-2, decreased levels of mda and bax, and ameliorated ultrastructure of mitochondria in experimental stroke[J]. *Brain Research*, 2012, 1474: 73-81