

RNA 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 原癌基因 AKT2 表达的影响

师晓华, 梁智勇, 吴焕文, 任新瑜, 刘彤华

中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院病理科, 北京 100730

通信作者: 刘彤华 电话: 010-65295523, E-mail: liuthpumch@yahoo.com.cn

【摘要】目的 探讨 RNA 干扰质粒抑制胰腺癌细胞系 Panc-1 原癌基因 AKT2 的表达对胰腺癌细胞生长和凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法** 选择胰腺癌细胞系 Panc-1, 构建特异性抑制 AKT2 表达的 RNA 干扰质粒, 瞬时和稳定转染胰腺癌细胞, 采用 MTT 法及软琼脂克隆形成实验检测胰腺癌细胞生长能力, Heochst 染色及 Annexin V-FITC/PI 染色法检测细胞凋亡情况, 通过 Western blot 方法检测凋亡蛋白 caspase-3 表达; 并进行裸鼠移植瘤体内转染实验。**结果** 采用 RNA 干扰质粒沉默胰腺癌细胞系 Panc-1 原癌基因 AKT2, 能够有效抑制胰腺癌细胞 Panc-1 体外生长能力、促进细胞凋亡, 诱导凋亡激酶 caspase-3 的表达; 动物体内实验结果显示, 干扰质粒能够有效抑制胰腺癌细胞系 Panc-1 在动物体内的成瘤能力。**结论** RNA 干扰质粒抑制原癌基因 AKT2 表达, 可有效抑制胰腺癌细胞生长, 促进凋亡, 针对原癌基因 AKT2 的基因治疗对胰腺癌具有重要的潜在应用价值。

【关键词】 RNA 干扰; 胰腺癌; Panc-1 细胞系; 基因治疗; 蛋白激酶 B

【中图分类号】 R737.9 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-9081(2012)01-0102-07

DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2012.01.021

Effect of RNA Interference Plasmid on the Expression of Oncogene AKT2 in Pancreatic Cancer Cell Line Panc-1

SHI Xiao-hua, LIANG Zhi-yong, WU Huan-wen, REN Xin-yu, LIU Tong-hua

Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences
& Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

Corresponding author: LIU Tong-hua Tel: 010-65295523, E-mail: liuthpumch@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of RNA interference (RNAi) plasmid on proliferation, apoptosis of status of Panc-1 cells by silencing oncogene AKT2, and investigate its possible mechanism. **Methods** Pancreatic cancer cell line Panc-1 was applied to construct the RNAi plasmid-targeting oncogene AKT2 and to transfect cells transiently and stably. The proliferation status was determined using CCK-8 method and soft agar colone formation test. The apoptosis status of the cancer cells in vitro was determined using Heochst and Annexin V-FITC/PI methods. The protein level of AKT2 and caspase-3 kinase were detected using Western blotting. Finally, we evaluate the in vivo effect of the recombinant plasmids on Panc-1 cells. **Results** By silencing the oncogenes AKT2, RNAi plasmid effectively down-regulate the mRNA and protein levels of of AKT2 in Panc-1 cells reduced cell proliferation and colony formation of Panc-1 cells, induced apoptosis in Panc-1 cells, increased the protein level of caspase-3 protein, and inhibited tumor growth in vivo. **Conclusions** RNAi can inhibit the expression of oncogene AKT2 and therefore effectively inhibit the growth of pancreatic cancer cells and promote their apoptosis. Gene therapy targeting AKT2 may be a promising target for pancreatic cancer.

【Key words】RNA interference; pancreatic cancer; Panc-1 cell line; gene therapy; protein kinase B

Med J PUMCH, 2012, 3(1): 102-108

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物体内由同源性双链 RNA (dsRNA) 引发的序列特异性转录后基因沉默机制, 由于 RNAi 能够高效而特异性地阻断特定靶基因表达, 因而在抗肿瘤治疗方面显示了巨大的潜力和良好的应用前景^[1]。蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, AKT) 是一种丝氨酸苏氨酸蛋白激酶, 含 AKT1、AKT2、AKT3 3 种亚型^[2], 其中 AKT2 在多种肿瘤中均有表达^[3], AKT2 在约 20% 的胰腺导管腺癌中过度表达^[4-5]。本实验采用 RNAi 技术, 构建特异性抑制 AKT2 原癌基因表达干扰载体, 转染胰腺癌细胞系 Panc-1 及裸鼠体内移植瘤, 观察胰腺癌细胞系及在体肿瘤生长与凋亡的变化。

材料和方法

材料

将胰腺癌细胞系 Panc-1 置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基、5% CO₂、37℃ 培养箱中培养; BALB/c 无胸腺小鼠 (简称裸鼠) 饲养于中国医学科学院北京协和医院动物中心, 无菌环境, 恒温 25 ~ 28℃, 恒湿度; pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR 载体系统购自美国 Invitrogen 公司。

AKT2 干扰序列设计、载体构建及细胞转染

利用 Invitrogen 网站 (www.invitrogen.com/rnai) 提供的设计工具设计特异性抑制 AKT2 干扰序列: 5'-TGCTGTTGCCAAGGAGTTTGAGATAGGTTTGGCC-
ACTGACTGACCTATCTCACTCCTTGGCAA-3', 5'-CCT-
GTTGCCAAGGAGTGAGATAGGTCAGTCAGTGGCCAAA-
ACCTATCTCAAACCTCCTTGGCAAC-3'。

阴性载体对照插入同人及鼠基因组 DNA 无同源的序列: 5'-TGCTGAAATGTACTGCGCGTGGAGACGT-
TTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCGAGTACATTT-3',
5'-CCTGAAATGTACTGCGTGGAGACGTCACTAGTGG-
CCAAAACGTCTCCACGCGAGTACATTTTC-3'。

将退火后产生的 dsDNA 与线性 pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR 载体相连接, 重组质粒转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 铺含大观霉素 30 g/ml LB 琼脂培养基平板, 37℃ 培养。挑取单个菌落接种于 5 ml LB 培养基试管中 (含大观霉素 50 μg/ml), 37℃ 振荡培养过夜后进行质粒提取, 通过 PCR 法及测序法

检测插入序列是否正确。实验设空白组 (untreated cell)、阴性载体组 (negative plasmid) 和质粒转染组 (anti-AKT2), 分别进行瞬时及稳定转染。

原癌基因 AKT2 mRNA 及蛋白水平检测

转染前 1 d 将无抗生素培养的 Panc-1 对数生长期细胞接种于 6 孔板, 每孔 5×10^5 个细胞; 并用 OptiMEM 分别稀释质粒 DNA 和 Lipofectamine-2000 脂质体 (DNA:脂质体为 1:2), 分别室温孵育 5 min 将两者混合, 20 min 后, 将混合物加入细胞培养基中, 收集转染后 1 和 5 d 的细胞, 离心, 弃上清, 取细胞沉淀进行以下实验。

实时定量 PCR 原癌基因 AKT2 mRNA 水平检测: 逆转录 AKT2 引物序列如下: 5'-CCCCCTTAAACAAC-TTCTCCG-3', 5'-CATCCACTCCTCCCTCTCGTC-3', 扩增产物为 100 bp; 逆转录内参 GAPDH 引物序列如下: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 5'-GCCTTCTCCA-TGCTGGTGAA-3' 扩增产物为 100 bp。

Western blot 原癌蛋白 AKT2 基因水平检测: 从细胞沉淀提取细胞总蛋白并采用 Bio-Rad 试剂盒测定蛋白浓度。裂解液上样前 100℃ 变性 10 min, 采用 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 上样量为每孔 20 μg, 冷室内转膜, 130 mA, 1 ~ 2 h, 转膜后采用 10% 脱脂牛奶封闭, 分别加入一抗, 二抗, 最后加入化学发光反应液, 暗室曝光。

胰腺癌细胞生长、凋亡检测

采用细胞计数试剂盒 8 (CCK-8) 方法绘制细胞生长曲线。将转染后的细胞分别接种于 96 孔板中, 1000 细胞/孔, CO₂ 孵箱培养 24 h; 从第 2 天开始, 每天在相同时间加入 100 μl 新鲜培养基, 其中含 10 μl CCK-8 溶液, 然后将 96 孔板置入培养箱 2 h; 在吸光度仪中读数, 测量波长为 450 nm, 参比波长为 650 nm。对 96 孔板中稳转细胞系进行 5 d 连续检测, 每次每种细胞检测 3 孔, 将数据绘制细胞生长曲线, 并对第 5 d 细胞生长情况进行统计学分析。

软琼脂细胞克隆形成能力检测: 超净台混合配置上层和下层含软琼脂培养液, 下层培养液含 10% 胎牛血清 + 0.5% 软琼脂溶液 + 1 × RPMI 1640 培养液; 上层培养液含 10% 胎牛血清 + 0.35% 软琼脂溶液 + 1 × RPMI 1640 培养液。首先铺下层软琼脂培养液, 24 孔板每孔加入 0.5 ml 下层软琼脂培养液,

4℃冰箱 20 min, 待其凝固后, 置入培养箱, 使其温度达到 37℃; 将上层软琼脂培养液分装至离心管中, 每管 1.5 ml, 加入 1500 个细胞, 混合均匀后平均加入 3 孔铺有下层软琼脂的 24 孔板中; 置 37℃ 培养箱中培养 14~21 d, 显微镜下观察克隆形成情况、计数并采用 MTT 法进行克隆染色。

Heochst 法细胞凋亡定性检测: 用各组质粒分别转染 6 孔板中的 Panc-1 胰腺癌细胞, 转染后第 4 天, 取出 6 孔板, 用 PBS 洗 3 次, 5 min/次; 4% 甲醛 (PBS 稀释) 固定 15 min; 弃甲醛, 再次用 PBS 洗 3 次, 5 min/次; 每孔加入 100 μ l Heochst 33342 工作液, 暗处放置 10 min; 洗去 Heochst 33342 工作液, 再次 PBS 洗 3 次, 5 min/次, 晾干; 加入抗荧光淬灭封片液, 用指甲油封片, 荧光显微镜下观察并照相记录。

Annexin-V-FITC/PI 法细胞凋亡定量检测: 用各组质粒分别转染 6 孔板中的 Panc-1 胰腺癌细胞, 转染后第 3 天收集培养基, 并加入 1% 胰酶消化贴壁细胞, 1000 r/min 离心 10 min, 收集细胞; 用冰预冷 PBS 清洗细胞 2 次, 最后用结合缓冲液重悬细胞, 使其终浓度为 1×10^6 /ml; 将 100 μ l 细胞悬液移入 5 ml 试管中, 每管加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 同时设 3 管对照, 分别为仅加入 5 μ l Annexin V-FITC 和仅加入 5 μ l PI 的未处理细胞及同时加入 Annexin V-FITC 和 PI 的未处理细胞; 轻柔混匀, 室温下, 暗处放置 15 min; 加入 400 μ l 结合缓冲液, 并在 1 h 内上机检测。

动物实验

选取 4~6 周龄 BALB/c (nu/nu) 裸鼠 24 只, 体重约 18~20 g, 雌性, 分为 4 组, 每组 6 只, 未处理组, PEI 处理组 (转染 PEI 试剂), 阴性对照组 (转染阴性载体质粒) 及实验组 (转染 anti-AKT2 质粒)。预先于每只裸鼠颈背部皮下成瘤。转染试剂为

PEI, 质粒转染剂量 20 mg, 采用肿瘤内多点注射方法, 共注射 2 次, 间隔时间为 1 周, 每周观察 2 次肿瘤生长情况, 测量并记录肿瘤体积和裸鼠体重, 共 5 周。实验结束时, 采用头颈断髓法处死小鼠, 拍照, 肿瘤取材, 切片, 记录存档并分析实验结果。

统计学分析

每种实验至少重复 3 次。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 软件进行 One way ANOVA 分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

结 果

AKT2 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 AKT2 mRNA 和蛋白表达的影响

实时定量 PCR 相对定量分析结果显示, 构建的干扰质粒可有效、特异地降低 Panc-1 细胞 AKT2 mRNA 水平 (图 1A): 干扰质粒 anti-AKT2 稳转细胞内 AKT2 mRNA 水平是未转染组的 14.5%, 和未转染组及同剂量阴性载体组比较 P < 0.001, 具有统计学意义; 干扰质粒 anti-AKT2 稳转细胞内 AKT2 蛋白水平亦下降 (图 1B)。

AKT2 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 生长的影响

第 5 天细胞生长曲线统计结果显示, 干扰质粒 anti-AKT2 组生长能力是未转染组的 48.6%, 与未转染组及同剂量阴性载体组比较差异具有统计学意义 (P < 0.001) (图 2)。MTT 结果显示, 干扰质粒 anti-AKT2 组克隆形成能力是未转染组的 24.6%, 与未转染组及同剂量阴性载体组比较差异具有统计学意义 (P < 0.001) (图 3)。

AKT2 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 凋亡的影响

Heochst 检测结果显示, 干扰质粒 anti-AKT2 可较

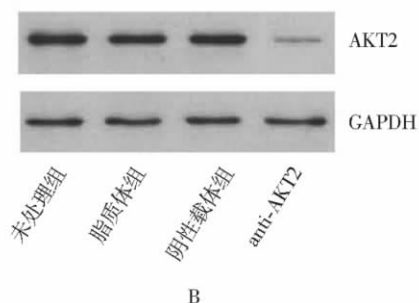
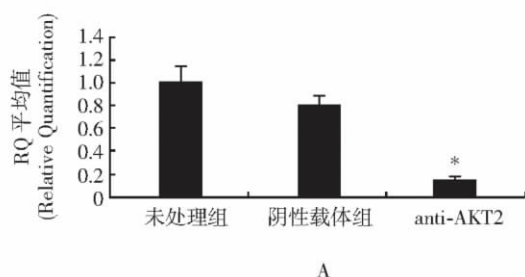


图 1 AKT2 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 AKT2 基因和蛋白表达的影响

A. Panc-1 细胞 AKT2 mRNA 水平变化, 与未处理组或阴性载体组比较, * P < 0.05; B. Panc-1 细胞 AKT2 蛋白水平变化



图 2 AKT2 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 生长的影响

A. 细胞生长曲线; B. 第 5 天 Panc-1 细胞生长情况, 与未处理组或阴性载体组比较, * $P < 0.05$

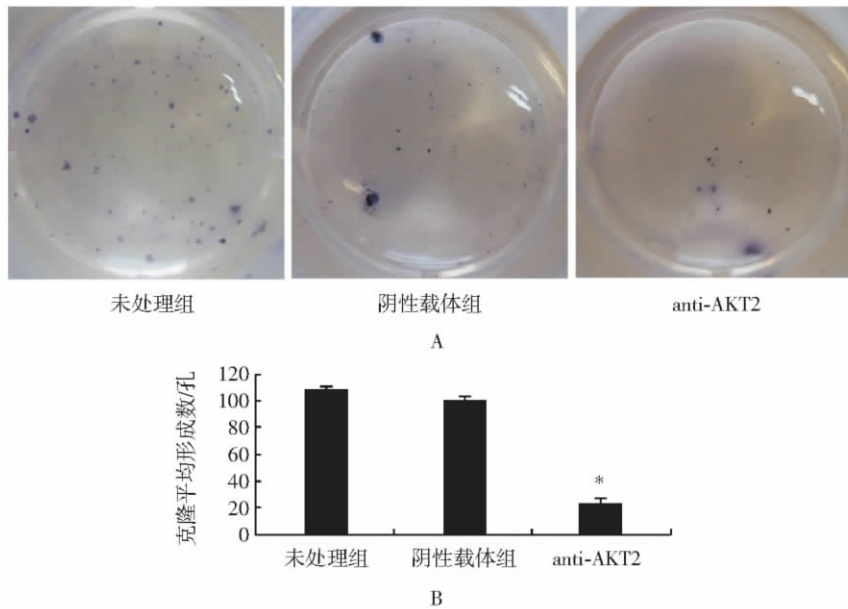


图 3 AKT2 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 软琼脂克隆形成能力的影响

A. Panc-1 细胞软琼脂克隆形成实验; B. MTT 法软琼脂克隆染色计数, 与未处理组或阴性载体组比较, * $P < 0.05$

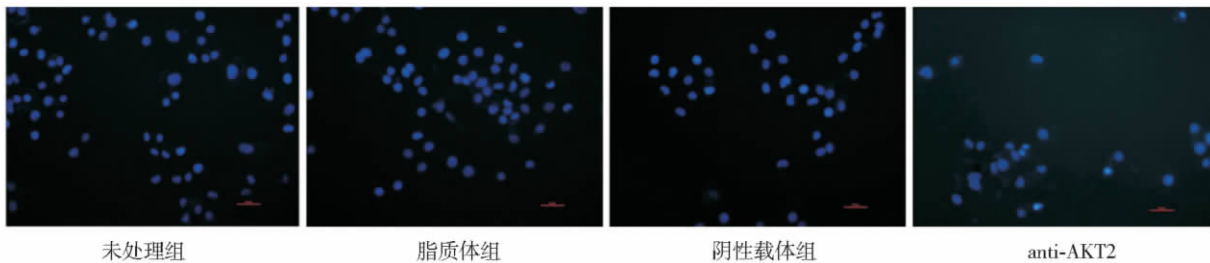


图 4 Hoechst 法示不同质粒转染胰腺癌细胞系 Panc-1 的凋亡

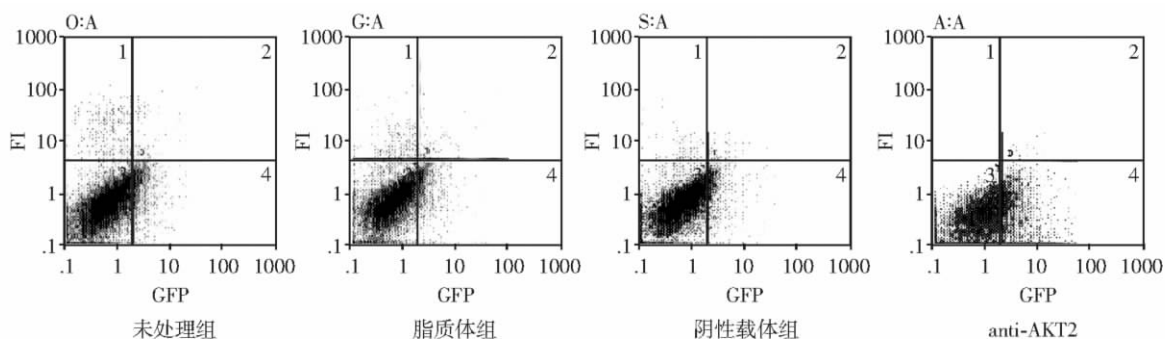
未转染组及同剂量阴性载体组更有效地诱导细胞凋亡 (图 4)。Annexin V-FITC/PI 凋亡实验研究结果显示, 干扰质粒 anti-AKT2 可以有效诱发细胞凋亡, 凋亡率为 15.3%, 与未转染组及同剂量阴性载体组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 5)。

AKT2 干扰质粒胰腺癌细胞系 Panc-1 中 caspase-3 激酶的诱导作用

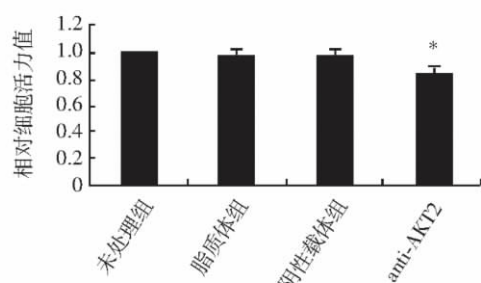
干扰质粒 anti-AKT2 可以有效诱导胰腺癌细胞系 Panc-1 激酶 caspase-3 的活化 (图 6)。

AKT2 干扰质粒对裸鼠体内移植瘤生长的影响

与未处理组和单独 PEI 转染组比较, 干扰质粒 anti-AKT2 组肿瘤生长减缓, 与各对照组比较差异具有统计学意义 (图 7)。



A



B

图5 Annexin V/PI法检测 anti-AKT2 干扰质粒对胰腺癌细胞系 Panc-1 凋亡的影响

A. 流式细胞术示加入 Annexin V/PI 后不同处理组胰腺癌细胞系 Panc-1 的凋亡; B. 不同质粒转染胰腺癌细胞系 Panc-1 凋亡细胞统计分析, 与未处理组或阴性载体组比较, * $P < 0.05$

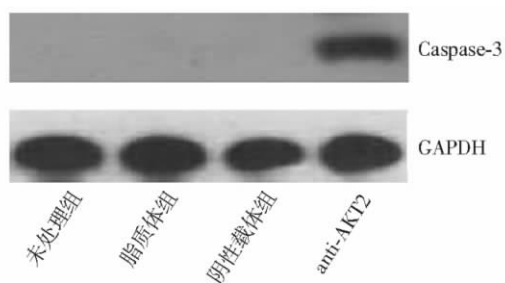
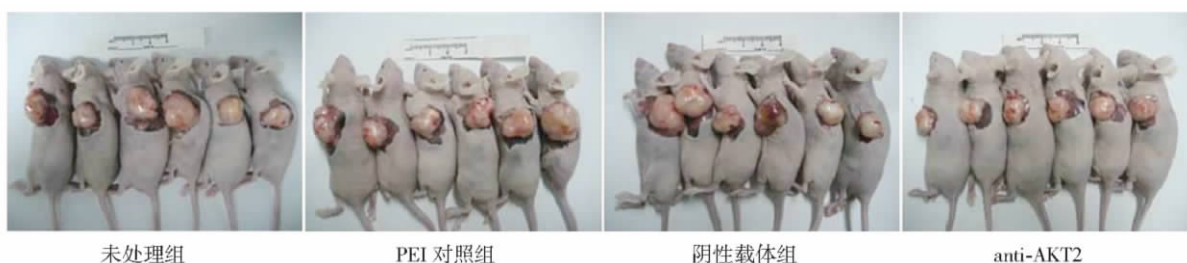
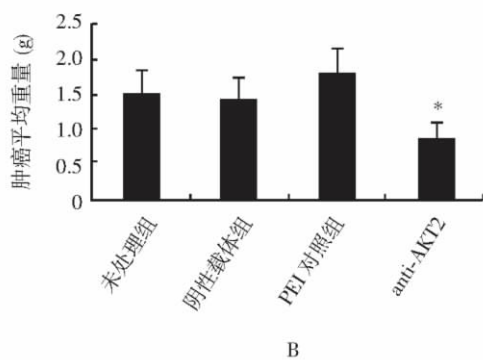


图6 AKT2 干扰质粒转染胰腺癌细胞系 Panc-1 后 caspase-3 酶的变化



A



B

图7 裸鼠种植瘤内多点 anti-AKT2 干扰质粒注射实验结果

A. 各组裸鼠体内移植肿瘤; B. 肿瘤平均重量, 与未处理组或阴性载体组比较, * $P < 0.05$

讨 论

胰腺癌是恶性程度极高的常见消化系肿瘤,近数十年其发病率明显升高,已成为世界第4或第5大癌症死亡原因。患者1年生存率低于25%,可手术切除者5年生存率也不超过5%,局部进展期和伴转移的胰腺癌患者中位生存时间分别为6~10个月和3~6个月^[6]。

胰腺癌的治疗包括外科手术治疗、放疗、化疗及基因治疗等多种手段。近年来,随着基因治疗研究的不断进展,基因疗法被认为是继手术、化疗、放疗等传统疗法后的崭新领域。

RNAi是1998年由Fire等^[7]首次发现并命名的转录后水平的基因沉默,1999年Tuschl等报道在哺乳动物中也存在RNAi,只是导入的RNA是小干扰RNA(small interference RNA, siRNA);2001年Bernstein等提出,只有长度为22个核苷酸的RNA才能特异性地阻断dsRNA,同时他们还发现了1个分解dsRNA为siRNA的Dicer酶。随着研究技术的不断进步,RNA干扰技术已广泛应用到疾病的基因治疗研究中,包括采用RNA干扰基因治疗爱滋病^[8]、血液病^[9]及结肠癌^[10]等,并在胰腺癌基因治疗中取得了一定的进展,研究表明针对突变型K-ras(V12)基因的腺病毒RNA干扰载体能够抑制胰腺癌细胞系的生长能力及在动物体内的成瘤能力^[11]。

本实验选用新一代RNAi表达载体,模拟体内微小RNA表达原理,采用哺乳动物RNA聚合酶II表达干扰RNA,载体可以同时表达绿色荧光蛋白,为阳性转染细胞提供可视或自动挑选标记。

AKT是一种丝氨酸苏氨酸蛋白激酶,其中AKT2在多种肿瘤中均有表达^[3],AKT2在20%的胰腺导管腺癌中过度表达^[4-5]。AKT2是PI3K信号通路中重要的蛋白激酶,是磷酸酰肌醇3激酶(PI3K)信号传导通路的中心环节。其功能除了涉及细胞周期调控,凋亡启动等细胞生存调节外,还参与血管生成、端粒酶活性和细胞侵袭性等诸多重要的生理及病理过程。有研究表明AKT2过表达及过度磷酸化在胰腺导管腺癌组织及正常胰腺组织中具有显著差异,认为AKT2是胰腺导管腺癌治疗的一个十分有价值的位点^[12]。

RNAi质粒抑制AKT2后有效地促进了胰腺癌细胞系的凋亡,这与AKT的重要调控功能相关,AKT

可调控多个与细胞凋亡有关的家族从而抑制细胞凋亡:(1)AKT对Bcl-2家族的调节作用:AKT可催化促凋亡分子Bcl-2/Bcl-XL相关的死亡启动因子(Bcl-2/Bcl-XL associated death promoter, BAD),其BH3结构域具有抑制抗凋亡作用^[13]。(2)AKT对caspase 9的调节作用:AKT可催化Caspase(半胱天冬蛋白酶)9前体第196位Ser磷酸化,第196位Ser位于caspase 9前体与凋亡蛋白酶激活因子1(Apoptotic protease activating factor 1, Apan)结合区域,因而其磷酸化有可能阻止caspase 9对Apan的结合与活化作用^[14]。(3)AKT对FKHRL的调节作用:AKT可催化转录因子叉头蛋白(forkhead transcription factor)的Ser253和Thr32磷酸化,与14-3-3蛋白结合,使之移出细胞核而阻止其诱导凋亡基因,如FasL转录^[15]。(4)AKT对NFκB的调节作用:AKT可通过激活核因子(nuclear factor κB, NFκB)调控细胞活化、增殖。NFκB是一种具有多向性调节作用的转录因子,对细胞内许多基因表达起关键性调控作用。研究提示,AKT可通过增强IκB(主要是IκBa)磷酸化,减少IκB蛋白合成而激活NFκB^[16-17]。(5)AKT对cFLIP的调节作用:AKT能够增加Fas相关死亡结构域(Fas-associating death domain, FADD)样IL-1β转化酶样抑制蛋白(Fas-associating death domain-like IL-1-converting enzyme-like inhibitory protein, cFLIP)。这可能是抑制TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)、FasL、TNF诱导细胞凋亡的机制之一,cFLIP被活化后,可以募集到死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),进而阻断caspase-8的活化^[18-19]。本实验证明抑制蛋白激酶AKT2后,可以通过增加凋亡蛋白激酶caspase-3的表达,发挥促进细胞凋亡的作用。

综上,本研究中采用质粒RNAi系统,沉默原癌基因AKT2探讨基因治疗对胰腺癌细胞的作用,结果显示抑制原癌基因AKT2后,能够有效地抑制胰腺癌细胞系Panc-1体外生长能力、促进细胞凋亡;动物体内实验结果显示AKT2干扰质粒可有效地抑制细胞系Panc-1的成瘤能力,提示采用RNAi质粒抑制原癌基因AKT2是胰腺癌基因治疗的一个有价值的位点。

参 考 文 献

- [1] Davidson BL, McCray PB Jr. Current prospects for RNA in-

- interference-based therapies [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 329-340.
- [2] Murthy SS, Tosolini A, Taguchi T, et al. Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt /protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 88: 38-40.
- [3] Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10983-10985.
- [4] Ruggeri BA, Huang L, Wood M, et al. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas [J]. *Mol Carcinog*, 1998, 21: 81-86.
- [5] Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, et al. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas [J]. *J Cell Biochem*, 2002, 87: 470-476.
- [6] Haller DG. New perspectives in the management of pancreas cancer [J]. *Semin Oncol*, 2003, 30: 3-10.
- [7] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [8] Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference [J]. *Nature*, 2004, 431: 371-378.
- [9] Scherr M, Battmer K, Winkler T, et al. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA [J]. *Blood*, 2003, 101: 1566-1569.
- [10] Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 882-891.
- [11] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2: 243-247.
- [12] Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, et al. Prognostic significance of activated Akt expression in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 2846-2850.
- [13] Liu X, Shi Y, Giranda VL, et al. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 494-501.
- [14] Shimamura H, Terada Y, Okado T, et al. The PI3-kinase-Akt pathway promotes masngial cell survival and inhibits apoptosis in vitro via NF-kappa B and Bad [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 1427-1434.
- [15] Guo S, Sonenshein GE. Forkhead box transcription factor FOXO3a regulates estrogen receptor alpha expression and is repressed by the Her-2/neu/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 8681-8690.
- [16] Terraqni J, Graham JR, Adams KW, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in proliferating cells maintains an anti-apoptotic transcriptional program mediated by inhibition of FOXO and non-canonical activation of NFkappaB transcription factors [J]. *BMC Cell Biol*, 2008, 9: 6.
- [17] Zhang X, Jin B, Huang C. The PI3K/Akt pathway and its downstream transcriptional factors as targets for chemoprevention [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7: 305-316.
- [18] Kang YC, Kim KM, Lee KS, et al. Serum bioactive lysophospholipids prevent TRAIL-induced apoptosis via PI3K/Akt-dependent cFLIP expression and Bad phosphorylation [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11: 1287-1298.
- [19] Panka DJ, Mano T, Suhara T, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 6893-6896.

(收稿日期: 2011-12-14)