

· 论 著 ·

# RNA 干扰骨肉瘤中抗增殖蛋白基因的表达 对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响

李强, 赵永生, 陈修福, 张承韶

青岛市市立医院脊柱外科, 山东 青岛 266011

**摘要:** **目的** 探讨 RNA 干扰骨肉瘤中抗增殖蛋白 (prohibitin) 基因的表达对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的影响和机制。**方法** 收集 2013 年 6 月至 2014 年 8 月行骨肉瘤穿刺和活检存档的骨肉瘤及相应瘤旁组织的蜡块标本共 40 例, 提取骨肉瘤及相应瘤旁组织中的总 RNA 及总蛋白, 应用实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 和蛋白印迹法 (Western blot) 分别检测 prohibitin 基因的 mRNA 和蛋白表达; 阴性对照小干扰 RNA (NC-siRNA) 组和 RNA 干扰 (prohibitin-siRNA) 组转染 MG63 细胞, 不经任何处理的细胞作为空白对照组; 转染 48 h 后提取细胞中的蛋白, Western blot 检测各组细胞中 prohibitin 的蛋白表达以及增殖细胞核抗原 (PCNA)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3 (Cleaved caspase-3)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、丝氨酸苏氨酸激酶 (AKT)、磷酸化 AKT (p-AKT) 的蛋白表达; CCK8 实验检测并计算细胞增殖率; 采用 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡, 流式细胞术测定细胞凋亡率。**结果** 患者骨肉瘤组织中 prohibitin 的 mRNA 和蛋白的相对表达量均显著高于瘤旁组织 ( $P$  均  $< 0.01$ )。与空白对照组及 NC-siRNA 组比较, 在 RNA 干扰组转染 prohibitin-siRNA 后 MG63 细胞的 prohibitin 蛋白相对表达量显著降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ); RNA 干扰组细胞存活率及 Ki67、PCNA、PI3K、p-AKT 蛋白相对表达量显著降低 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 细胞凋亡率及 Cleaved caspase-3 蛋白相对表达量显著升高 ( $P$  均  $< 0.01$ )。**结论** RNA 干扰沉默 prohibitin 的表达可显著降低骨肉瘤细胞的增殖活力, 并诱导细胞凋亡, 其机制与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

**关键词:** 骨肉瘤; 瘤旁组织; MG63 细胞; 抗增殖蛋白基因; 增殖; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸苏氨酸激酶信号通路

中图分类号: R 738.1 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2017)10-1301-05

## Influence of RNA-interferencing expression of antiproliferative protein gene in osteosarcoma on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells

LI Qiang, ZHAO Yong-sheng, CHEN Xiu-fu, ZHANG Cheng-shao

Department of Spinal Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong 266011, China

Correspondence author: ZHANG Cheng-shao, E-mail: zhchengshao@126.com

**Abstract: Objective** To investigate the effect of RNA interference of antiproliferative protein (prohibitin) gene expression in osteosarcoma on proliferation and apoptosis of osteosarcoma cells and its mechanism. **Methods** A total of 40 paraffin block specimens of osteosarcoma and the adjacent tumor tissues by puncture and biopsy from June 2013 to August 2014 kept in the archives were collected. After total RNA and total protein were extracted in osteosarcoma and corresponding tumor adjacent tissues, real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were respectively used to detect prohibitin mRNA and prohibitin protein expressions. Human osteosarcoma MG63 cells were cultured in vitro and transfected by negative control small interfering RNA (NC-siRNA) and prohibitin-siRNA respectively assigned as negative control group and RNA interference group. MG63 cells without any treatment were served as blank control group. After the protein in the MG63 cells was extracted 48 hours post-transfection, Western blot method was used to detect the protein expressions of prohibitin and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), activated aspartic acid proteolytic enzyme-3 containing cysteine (Cleaved caspase-3), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), serine threonine kinase (AKT), phosphorylated AKT (p-AKT) in MG63 cells; Cell Counting Kit (CCK8) assay was used to detect and

calculate the cell proliferation rate; Annexin V-FITC/PI double staining was used to detect cell apoptosis; flow cytometry was used to detect apoptosis rate. **Results** The relative expressions levels of prohibitin mRNA and protein in osteosarcoma tissues were significantly higher than those in adjacent tumor tissues (all  $P < 0.01$ ). Compared with blank control group and negative control group, the relative expression levels of prohibitin protein, Ki67, PCNA, PI3K and p-AKT proteins and cell survival rate decreased significantly (all  $P < 0.01$ ), and the relative expression levels of Cleaved caspase-3 and cell apoptosis rate increased significantly (all  $P < 0.01$ ) in RNA interference group. **Conclusion** After prohibitin expression is silenced with RNA, the proliferation of osteosarcoma cells reduces, while the cell apoptosis increases, and the mechanism is related to the inhibition of PI3K/AKT signaling pathway.

**Key words:** Osteosarcoma; Adjacent tumor tissue; MG63 cells; Antiproliferative protein gene; Proliferation; Apoptosis; Phosphatidylinositol 3-kinase /serine threonine kinase signaling pathway

骨肉瘤是常见于青少年和儿童的原发性骨肿瘤,具有早转移、高恶性、生存率低、预后差等特点。虽然随着医疗技术的发展,骨肉瘤患者的 5 年生存率已提高到 60% ~ 70%,但相当大一部分患者对化疗的敏感性差,即使在化疗和根治性治疗后都有转移和复发的风险<sup>[1-2]</sup>。肿瘤生物治疗特别基因治疗的发展为肿瘤治疗开辟了新的思路。抗增殖蛋白(prohibitin)属于 Prohibitin 家族,作为一种抑癌基因,在各种器官及组织中广泛分布,其编码的蛋白产物具有高度保守的结构,发挥分子伴侣的作用,对细胞的生长、凋亡、代谢、分化等有重要作用<sup>[3]</sup>。在其他肿瘤,如卵巢癌、食管癌等,其异常表达可影响肿瘤的发生及发展<sup>[4-5]</sup>。但 prohibitin 基因是否在骨肉瘤中也发挥重要作用,却少有报道。RNA 干扰技术是一种能使特异性基因在转录后发生沉默的现象,是基因治疗和研究基因功能有效的方法<sup>[6]</sup>。本研究通过 RNA 干扰沉默 prohibitin 基因表达,研究其对骨肉瘤细胞增殖凋亡的影响及机制,期望能找到新的分子靶向诊断和治疗骨肉瘤的方法。

## 1 材料与方法

**1.1 组织和细胞** 收集青岛市市立医院 2013 年 6 月至 2014 年 8 月行骨肉瘤穿刺和活检存档的骨肉瘤及相应瘤旁组织的蜡块标本,共 40 例,其中男性 25 例,女性 15 例;年龄 8 ~ 52 岁,平均 20 岁。所有患者术前均未行放疗及化疗,病理切片检测确诊为骨肉瘤。人骨肉瘤细胞 MG63 购自中国科学院细胞库。

**1.2 主要试剂和仪器** 胰酶、胎牛血清、青链霉素、RPMI1640 培养基均购自美国 Gibco 公司;prohibitin、Ki67、增殖细胞核抗原(PCNA)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Cleaved caspase-3)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、丝氨酸苏氨酸激酶(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)抗体均购自美国 Abcam 公司;Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自江苏凯基生物;二喹啉甲酸(BCA)试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡试剂盒均购

自碧云天生物技术有限公司;实时定量 PCR 试剂盒及反转录试剂盒购自日本 Takara;CO<sub>2</sub> 细胞培养箱购自美国 Thermo 公司;倒置显微镜购自日本 OLYMPUS;酶标仪购自 Bio-Rad 公司。

**1.3 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测骨肉瘤组织中 prohibitin mRNA 表达** 总 RNA 提取试剂盒提取骨肉瘤组织及相应瘤旁组织中的总 RNA,逆转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,采用 SYBR Green I 染料法检测组织中 prohibitin 基因的 mRNA 表达。prohibitin 引物序列:上游引物:5'-GCG GTG GAA GCC AAA CAG-3',下游引物:5'-TTC TTC TGC TGC TCA GCC TTT-3'。GAPDH 引物序列:上游引物:5'-AAG AGT GGG TTT AAG TGG AAG GCT-3',下游引物:5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'。所有引物由上海生工生物合成。PCR 反应条件,A:预变性 95 °C 10 min。B:变性 95 °C 10 s;退火 60 °C 15 s,延伸 72 °C 20 s,共 40 个循环。C:72 °C 15 min。4 °C 终止反应。每个样品设置 3 个重复,取均值采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法对数据进行相对定量分析。

**1.4 蛋白印迹法(Western blot)检测骨肉瘤及相应瘤旁组织中 prohibitin 蛋白表达** 组织蛋白提取试剂盒提取骨肉瘤组织及相应瘤旁组织中的总蛋白,BCA 试剂盒对蛋白进行定量,于 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,电泳结束后转印蛋白至硝酸纤维素膜上,5% 的脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,加入一抗(1:1 000 稀释的 prohibitin 单克隆抗体及 1:1 000 稀释的 GAPDH),4 °C 孵育过夜,加入二抗(1:1 000 稀释的 HRP 标记的荧光),37 °C 条件下反应 1 h,TBST 洗膜,ECL 发光剂显影,自动凝胶成像系统采集图像。以 GAPDH 作为内参,分析 prohibitin 靶基因的蛋白表达水平。

**1.5 细胞培养** 将人骨肉瘤 MG63 细胞置于 RPMI1640 细胞培养液中(含有 10% 胎牛血清及青链霉素双抗的混合液),于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、95% 饱和湿度的恒温培养箱中培养,每 3 天换液 1 次,观察到细

胞生长融合度达到 80% 以上时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞后根据实验需要传代,细胞进入对数生长期后再用于实验研究。

**1.6 小干扰 RNA (siRNA) 合成、细胞转染** siRNA 由上海生工合成。实验分为空白对照组 (Control)、阴性对照 (NC-siRNA) 组和 RNA 干扰 (prohibitin-siRNA) 组。阴性对照组 siRNA 序列,正义链:5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义链:5'-ACG GUA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。Prohibitin 的 siRNA 序列:正义链:5'-GCC AGA UUU GUG GUG GAA ATT-3',反义链:5'-UUU CCA CCA CAA AUC UGG CTT-3'。转染按照 Invitrogen 公司的脂质体 Lipofectamine™2000 方法操作。空白对照组不经任何处理,转染 6 h 后,更换细胞培养液继续培养。48 h 后收集各组细胞,提取细胞中的蛋白,Western blot 检测各组细胞中 prohibitin 的蛋白表达。

**1.7 细胞增殖活性检测** 取对数生长期的 MG63 细胞,以  $3 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔细胞培养板中,每组设置 3 个复孔,转染 48 h 后,每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 试剂,37  $^{\circ}$ C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 2 h,酶标仪测定 490 nm 的吸光度 (A)。计算细胞增殖率。细胞增殖率 = (转染组细胞 A/对照组细胞 A)  $\times$  100%。

**1.8 细胞凋亡检测** 采用 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡。收集转染 48 h 的上述三组不同转染后细胞,消化后调整细胞浓度为 (1 ~ 5)  $\times 10^5$  个/ml,48 h 后收集细胞,根据细胞凋亡试剂盒说明书进行操作,流式细胞仪测定细胞凋亡率。

**1.9 Ki67、PCNA、Cleaved caspase-3、PI3K、p-AKT 蛋白表达检测** 收集培养 48 h 的上述三组不同转染后细胞,提取细胞中的蛋白,按照 1.4 方法检测各组细胞中 Ki67、PCNA、Cleaved caspase-3、PI3K、p-AKT 的蛋白表达。

**1.10 统计学方法** 所有实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,并对结果绘制直方图。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

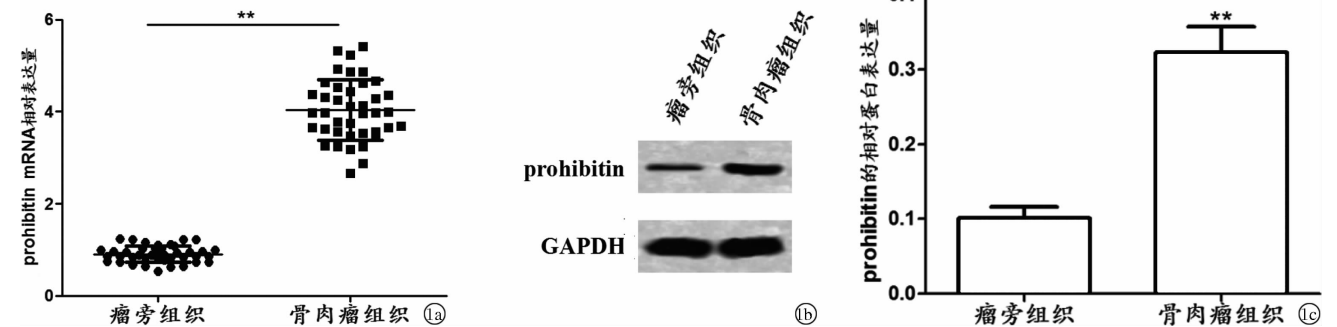
**2.1 Prohibitin 基因在骨肉瘤及相应瘤旁组织中 mRNA 和蛋白表达的比较** 结果显示,骨肉瘤组织中 prohibitin mRNA 和蛋白表达均显著高于瘤旁组织 (*P* 均 < 0.01)。见图 1。

**2.2 转染后各组细胞 prohibitin 基因的蛋白表达比较** 各组 siRNA 转染 48 h 后提取细胞中的总蛋白,Western blot 检测 prohibitin 的蛋白表达,结果显示,NC-siRNA 组与空白对照组 prohibitin 蛋白表达差异无统计学意义 (*P* > 0.05),RNA 干扰组 prohibitin 蛋白表达低于两个对照组 (*P* 均 < 0.01)。见图 2。

**2.3 抑制 prohibitin 表达对不同转染 MG63 细胞增殖的影响** 细胞增殖检测结果显示,与空白对照组及 NC-siRNA 组比较,RNA 干扰组细胞存活率显著降低 (*P* 均 < 0.01)。见图 3。

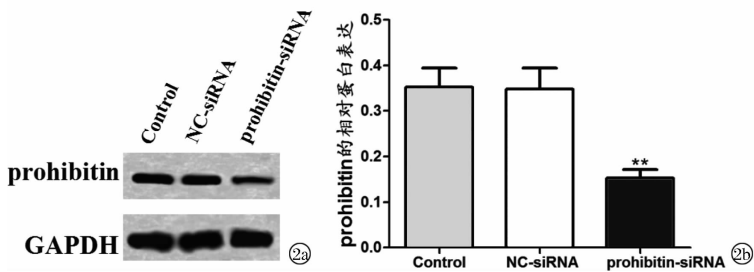
**2.4 抑制 prohibitin 表达对不同转染 MG63 细胞凋亡的影响** 流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示,与空白对照组及 NC-siRNA 组比较,RNA 干扰组细胞凋亡率显著升高 (*P* 均 < 0.01)。见图 4。

**2.5 抑制 prohibitin 表达对不同转染 MG63 细胞 Ki67、PCNA、Cleaved caspase-3、PI3K、p-AKT 蛋白表达的影响** Western blot 抑制 prohibitin 表达后各组细胞蛋白表达情况显示,与空白对照组及 NC-siRNA 组比较,RNA 干扰组 Ki67、PCNA、PI3K、p-AKT 蛋白表达显著下调 (*P* 均 < 0.01),Cleaved caspase-3 蛋白表达显著上调 (*P* 均 < 0.01)。见图 5。



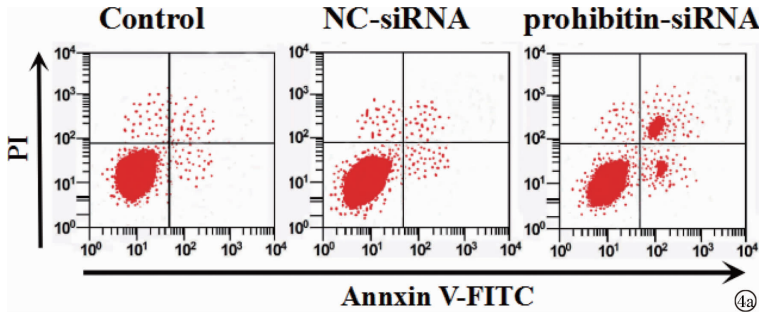
注:1a:骨肉瘤组织和相应瘤旁组织的 prohibitin mRNA 相对表达量;1b:骨肉瘤组织和相应瘤旁组织 prohibitin 蛋白表达电泳图 (GAPDH 为内参);1c:骨肉瘤组织和相应瘤旁组织的 prohibitin 蛋白相对表达量;与瘤旁组织比较, \* \* *P* < 0.01。

图 1 prohibitin 基因在骨肉瘤和相应瘤旁组织中 mRNA 和蛋白的表达



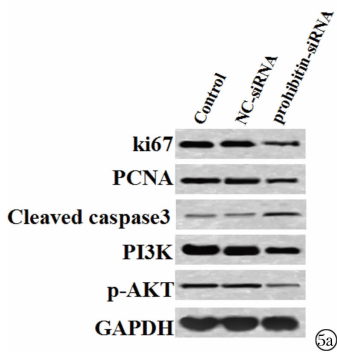
注:2a:Western blot 检测电泳图;2b:三组 prohibitin 蛋白相对表达量;与 Control 组、NC-siRNA 组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 2 prohibitin 基因在不同转染后 MG63 细胞中的蛋白表达



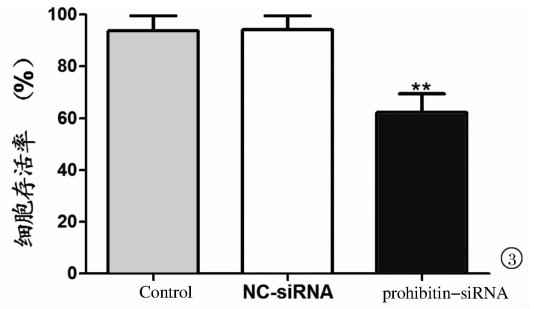
注:4a:Annexin V-FITC/PI 双染色法检测结果图,右下象限显示活细胞;左上象限显示坏死细胞;左下象限显示凋亡细胞;4b:流式细胞仪测定细胞凋亡率;与 Control 组、NC-siRNA 组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 4 抑制 prohibitin 表达对不同转染后 MG63 细胞凋亡的影响



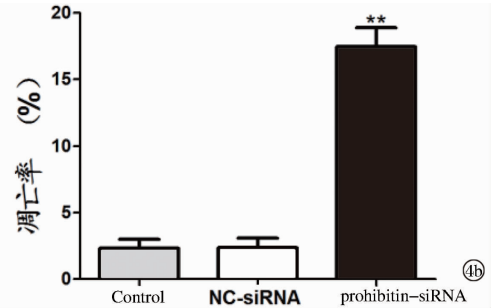
注:5a:Western blot 检测电泳图;5b:Ki67 等蛋白相对表达量;与 Control 组及 NC-siRNA 组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 5 抑制 prohibitin 表达对不同转染后 MG63 细胞 Ki67 等蛋白表达的影响



注:与 Control 组、NC-siRNA 组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。

图 3 抑制 prohibitin 表达对不同转染后 MG63 细胞增殖的影响



### 3 讨论

骨肉瘤的恶性程度高,预后差,虽然采用手术联合放疗的综合治疗方案,但目前其治疗效果仍不理想。基因水平的研究在骨肉瘤治疗方面一直是关注的热点,寻找有效的治疗靶点极关键<sup>[7]</sup>。prohibitin 定位于 17q21,是一个在进化上高度保守的蛋白,在不同种属的生物细胞中广泛分布,具有多种生物学功能,如调控细胞周期诱导细胞的凋亡和抑制细胞增殖、通过分子伴侣使细胞的功能和结构得以维持、介导细胞的生长和分化等<sup>[8-9]</sup>。已有大量研究显示 prohibitin 在肿瘤疾病中异常表达,如肺癌、乳腺癌、大肠癌等<sup>[10-12]</sup>。大肠癌中沉默 prohibitin 的表达可

显著抑制细胞的增殖,并诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。肺癌细胞中 prohibitin 的表达沉默可降低癌细胞增殖<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,抑制 prohibitin 的表达可降低骨肉瘤细胞的增殖、促进细胞凋亡。

Ki67 是存在于细胞核内的一种大分子蛋白质,定位于 10 号染色体,是在增殖细胞核中存在的与细胞增殖关系密切的核蛋白,Ki67 表达水平越高其预后和临床疗效就越差,并已在乳腺癌、宫颈癌等肿瘤中得到研究<sup>[15]</sup>,为目前已被用于评价增殖细胞核的标志物。PCNA 是在细胞 S 期中表达广泛的一种核蛋白,只在增殖细胞及正常细胞内存在,其阳性表达说明处在增殖期,是近些年已被用于评价细胞增殖状态的指标<sup>[16]</sup>。人 caspase-3 基因定位于 4q32 ~

4q35.1, 是 caspase 家族的关键蛋白, 正常情况下 caspase-3 在细胞质中无活性, 当受到凋亡刺激后被激活, 进而诱导细胞发生凋亡, 处在 caspase 级联反应的下游, 是细胞凋亡过程中的效应蛋白, 是多种凋亡信号传递的最终汇集点<sup>[17-18]</sup>。本研究检测抑制 prohibitin 的表达后对 MG63 细胞 Ki67、PCNA、Cleaved caspase-3 蛋白表达的影响, 结果显示, Ki67、PCNA 蛋白表达显著下调, Cleaved caspase-3 蛋白表达显著上调, 说明抑制 prohibitin 的表达后可通过下调 Ki67、PCNA 蛋白表达抑制骨肉瘤细胞增殖, 通过上调 Cleaved caspase-3 蛋白表达促进细胞凋亡。

PI3K/AKT 是细胞内一条重要的信号转导通路, 在多种人类肿瘤中表达失调, 如乳腺癌、鼻咽癌等, 可通过调节下游的效应分子影响细胞的增殖、凋亡过程<sup>[19-20]</sup>。PI3K 在细胞中广泛存在, 能被多种因子激活, 促进细胞的增殖、迁移、分化, 抑制细胞的凋亡。上游的分子可与 PI3K 结合, 引起构象改变, 从而磷酸化激活 AKT, 活化的 AKT 调控下游的分子, 参与肿瘤的调控通路<sup>[21]</sup>。本研究检测 PI3K、p-AKT 蛋白表达, 结果显示, 抑制 prohibitin 的表达后 MG63 细胞的 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平均显著降低。

综上所述, RNA 干扰沉默 prohibitin 的表达可显著降低骨肉瘤细胞的增殖活力, 并诱导细胞凋亡, 其机制与抑制 PI3K/AKT 信号通路有关。

## 参考文献

[1] Tiekens C, Verboom MC, Ruf W, et al. Tissue factor associates with survival and regulates tumour progression in osteosarcoma [J]. *Thromb Haemost*, 2016, 115(5): 1025 - 1033.

[2] Huang Q, Ou YS, Tao Y, et al. Apoptosis and autophagy induced by pyropheophorbide- $\alpha$  methyl ester-mediated photodynamic therapy in human osteosarcoma MG-63 cells [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(6): 749.

[3] Chowdhury I, Thomas K, Zeleznik A, et al. Prohibitin regulates the FSH signaling pathway in rat granulosa cell differentiation [J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 56(4): 325 - 336.

[4] Sripathi SR, Sylvester O, He W, et al. Prohibitin as the Molecular Binding Switch in the Retinal Pigment Epithelium [J]. *Protein J*, 2016, 35(1): 1 - 16.

[5] Fan NJ, Chen HM, Song W, et al. Macrophage mannose receptor 1 and S100A9 were identified as serum diagnostic biomarkers for colorectal cancer through a label-free quantitative proteomic analysis [J]. *Cancer Biomark*, 2016, 16(2): 235 - 243.

[6] Watanabe C, Cuellar TL, Haley B. Quantitative evaluation of first, second, and third generation hairpin systems reveals the limit of mammalian vector-based RNAi [J]. *RNA Biol*, 2016, 13(1): 25.

[7] Li Z, Li Y, Wang N, et al. miR-130b targets NKD2 and regulates the Wnt signaling to promote proliferation and inhibit apoptosis in osteosarcoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(4):

479 - 485.

[8] Chowdhury D, Kumar D, Bhadra U, et al. Prohibitin confers cytoprotection against ISO-induced hypertrophy in H9c2 cells via attenuation of oxidative stress and modulation of Akt/Gsk-3 $\beta$  signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 425(1/2): 155 - 168.

[9] Karthikeyan B, Harini L, Krishnakumar V, et al. Insights on the involvement of (-)-epigallocatechin gallate in ER stress-mediated apoptosis in age-related macular degeneration [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(1): 72 - 85.

[10] Khaghanzadeh N, Nakamura K, Kuramitsu Y, et al. Immune-associated proteins with potential in vivo anti-tumor activities are upregulated in lung cancer cells treated with umbelliprenin: A proteomic approach [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 5295 - 5302.

[11] Ande SR, Nguyen KH, Padilla-Meier GP, et al. Expression of a mutant prohibitin from the ap2 gene promoter leads to obesity-linked tumor development in insulin resistance-dependent manner [J]. *Oncogene*, 2016, 35(34): 4459 - 4470.

[12] Milone MR, Pucci B, Colangelo T, et al. Proteomic characterization of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) overexpressing or silenced colorectal cancer cells unveils a novel protein network associated with an aggressive phenotype [J]. *Mol Oncol*, 2016, 10(8): 1344 - 1362.

[13] Sun Y, Yang X, Liu M, et al. B4GALT3 up-regulation by miR-27a contributes to the oncogenic activity in human cervical cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2): 284 - 292.

[14] Zhong Y, Cheng H, Peng H, et al. Heat shock factor 2 is associated with the occurrence of lung cancer by enhancing the expression of heat shock proteins [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 5106 - 5112.

[15] Khanna M, Sharma M, Manjari M, et al. Correlation of Ki67 with ER, PR, Her2neu and other prognostic factors in breast carcinoma [J]. *Annals of Pathology and Laboratory Medicine*, 2016, 3(6 Suppl): A539 - A544.

[16] Nicolae CM, Moldovan GL. ERKing Trypanosoma: PCNA phosphorylation as novel target [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(23): 3167 - 3168.

[17] 王灯亮, 余良宏, 林章雅, 等. 辛伐他汀体外对人 U251 脑胶质瘤细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(12): 2837 - 2840.

[18] Liu C, Vojnovic D, Kochevar IE, et al. UV-A irradiation activates Nrf2-regulated antioxidant defense and induces p53/Caspase3-dependent apoptosis in corneal endothelial cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(4): 2319 - 2327.

[19] Bago R, Sommer E, Castel P, et al. The hVps34-SGK3 pathway alleviates sustained PI3K/Akt inhibition by stimulating mTORC1 and tumour growth [J]. *EMBO J*, 2016, 35(17): 1902 - 1922.

[20] Chamcheu JC, Chaves-Rodriguez MI, Adhami VM, et al. Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FABP5 and PPAR $\beta/\delta$  in human psoriasis and imiquimod-induced murine psoriasiform dermatitis model [J]. *Acta Derm Venereol*, 2016, 96(6): 854 - 856.

[21] Cai CX, Buddha H, Castelino-Prabhu S, et al. Activation of Insulin-PI3K/Akt-p70S6K pathway in hepatic stellate cells contributes to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(4): 968 - 978.