

异芒果苷通过调节 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路抑制 恶性胶质瘤的恶性行为*

唐春花¹, 宁志丰², 周雄飞^{3△}, 毛开新³, 胡美纯², 吴 喆²,
王 龙², 苏延婷², 刘星吟²

(1. 湖北科技学院附属第二医院, 湖北 咸宁 437100; 2. 湖北科技学院基础医学院, 湖北 咸宁 437100;
3. 湖北科技学院国家级全科医学实验教学示范中心, 湖北 咸宁 437100)

摘要: 目的 探索异芒果苷对恶性胶质瘤细胞 U251 的抑制作用及可能机制。方法 常规培养 U251 细胞,以一定浓度梯度的异芒果苷与 U251 细胞共孵育, MTT 法检测细胞增殖能力, 平板克隆形成实验检测集落形成能力, Transwell 小室迁移和侵袭实验检测纵向迁移能力, 划痕实验检测横向迁移能力, western blot 实验检测 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路的变化, PTEN-siRNA 予以验证。结果 与一定浓度梯度的异芒果苷共孵育后, MTT 法检测发现 U251 细胞的增殖能力以时间依赖性和浓度依赖性下降, 平板克隆形成实验检测发现 U251 细胞的集落形成能力浓度依赖性下降, Transwell 小室迁移和侵袭实验检测发现 U251 细胞的纵向迁移和侵袭能力浓度依赖性下降, 划痕实验发现 U251 细胞的横向迁移能力浓度依赖性下降, 免疫印迹检测发现, PTEN 表达呈浓度依赖性上调, 而磷酸化的 PI3K、磷酸化的 AKT 及磷酸化的 mTOR 呈浓度依赖性下降。PTEN-siRNA 沉默 PTEN 可抵消异芒果苷的抑制作用。结论 异芒果苷可以抑制恶性胶质瘤 U251 细胞的恶性生物学行为, 作用机制与调控 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路有关。

关键词: 神经胶质瘤; U251 细胞; 异芒果苷; PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2022)01-0065-07

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2022.01.013

Isomangiferin Inhibits Glioblastoma through Regulating PTEN-PI3K-Akt-mTOR Pathway

TANG Chunhua¹, NING Zhifeng², ZHOU Xiongfei³, MAO Kaixin³, HU Meichun²,
WU Zhe², WANG Long², SU Yanting², LIU Xingyin²

(1. Second Affiliated Hospital of Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China;
2. School of Basic Medicine Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China;
3. National Experimental Teaching Demonstration Center of General Medicine Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

ABSTRACT: Objective To explore the action and possible mechanism of isomangiferin suppression to malignant glioma cells U251. **Method** U251 cells were cultivated routinely and then treated with bergenin. Next, the cells were detected by MTT assay to test the viability, plate clone formation assay to test colony formation ability, transwell small chamber migration and invasion assay to test longitudinal migration and invasion ability, scratch healing assay to test lateral migration ability, and western blot to test the change of PTEN-PI3K-AKT-mTOR pathway. **Results** After the cells treated with certain concentrate gradient isomangiferin, the U251 cell viability declined in a time and concentration dependent way by MTT assay, the colony formation ability of U251 cells was suppressed in a concentration dependent manner by plate

收稿日期: 2021-12-04

* 基金项目: 湖北科技学院专项基金(2020LCZ003)

第一作者简介: 唐春花(1982-),女,副主任护师,从事护理管理工作。

△通信作者: 周雄飞, E-mail: 814882747@qq.com

clone formation assay, the longitudinal invasion and migration ability were inhibited in a concentration dependent manner through transwell chamber migration and invasion assay, and simultaneously the lateral migration ability was also restrained in same way. Subsequent western blot assay found the expression of PTEN was upregulated, but the phosphorylated PI3K, AKT and mTOR expression quantity declined in a concentration dependent way. **Conclusion** Isomangiferin can inhibit the malignant biological behavior of malignant glioma cells and the mechanism have relation with regulating PTEN-PI3K-AKT-mTOR pathway.

KEY WORDS: malignant glioma, U251 cells, isomangiferin, PTEN-PI3K-AKT-mTOR pathway

神经胶质瘤亦称胶质细胞瘤,简称胶质瘤,是发生于神经外胚层的肿瘤,亦称神经外胚层肿瘤或神经上皮肿瘤。肿瘤起源于神经间质细胞,即神经胶质、室管膜、脉络丛上皮和神经实质细胞,即神经元。大多数肿瘤起源于不同类型的神经胶质,但根据组织发生学来源及生物学特征类似,对发生于神经外胚层的各种肿瘤,一般都称为神经胶质瘤。据统计在美国,癌症的发病率为 21%,其中神经系统肿瘤占常见儿童癌症的 27%^[1]比 2020 统计数据增加 1%^[1-2],目前胶质瘤治疗以手术切除辅以放疗化疗为主,但疗效不理想。尽管胶质瘤的治疗方案不断优化,但大多数恶性胶质瘤患者的 2 年预后仍然很差^[3]。近年来随着对中药活性成分的分离鉴定等研究,也发现越来越多具有抗肿瘤活性的活性成分如芒果苷^[4]和异芒果苷^[5]。异芒果苷是鸚尾科植物的主要活性成分,尚未见关于异芒果苷抑制恶性胶质瘤的报道。本文旨在研究异芒果苷对恶性胶质瘤的影响及可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 恶性胶质瘤 U251 和人脑正常胶质细胞株 HEB 购于武汉大学中国培养物典藏中心,DMEM 高糖培养基、胎牛血清选自 Hyclone 公司,异芒果苷来源于上海源叶,MTT 和 Hoechst 细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司,实验所用抗体全部来自 ABclonal。

1.2 细胞培养 按常规方法用含 10%胎牛血清和 100×青霉素及/链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基,在 37℃、5%CO₂ 及 100%湿度的培养箱中培养,根据细胞的生长状况每 2~3 d 传代 1 次,取处于对数生长期的细胞进行实验。

1.3 MTT 实验 取对数生长期的 U251 细胞,调整细胞浓度 8×10⁴ 个/mL 后,以每孔 100 μL 即 8 000 个细胞接种至 96 孔板,并使每个孔的细胞均匀分布后,将其放入细胞培养箱中培养 5 h 待细胞贴壁后,用异芒果苷处理细胞,异芒果苷的给药浓度为 0、1、2、4、

8、16 μM,每个浓度 4 个复孔,给药浓度为 0 的一组为对照组,培养 48h,选取 4 μM 作为给药时间考察的浓度,分别培养 24、72、96 h,实验终止时,使用 MTT 法检测每孔的吸光值(A 值),计算肿瘤细胞生长率=(A 给药组-A 空白对照组)/A 对照组×100%。

1.4 平板克隆形成实验 取对数生长期的 U251 细胞,调整细胞浓度 1 000 个/mL,以每孔 1 mL 即 1 000 个细胞接种至 6 孔板,并使每个孔的细胞均匀分布后,将其放入细胞培养箱培养 24 h 待每个低倍显微镜(20×)下能观察到生长良好的单个细胞后,用异芒果苷处理细胞,异芒果苷的给药浓度为 0、1、2、4、8、16 μM,给药浓度为 0 的 1 组为对照组。3 d 左右换 1 次细胞培养液,随后在细胞培养箱中静置培养 1 周时间后终止培养(以对照组生成均匀的肉眼可见的细胞群落为止)。然后用 PBS 浸洗 3 遍 6 孔板中的细胞,接着用预冷的甲醇室温固定细胞 20 min,后用 0.1%结晶紫染液对细胞染色 20 min 并用清水冲洗掉多余结晶紫染色液,最后在显微镜下观察并计数含 50 个以上细胞的克隆数目。然后按公式计算克隆形成率:克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数×100%。

1.5 Transwell 小室迁移和侵袭实验 用 DMEM 高糖无血清培养基按照 1:3 稀释 matrigel 胶包被上室,每孔 70 μL,室温孵育 4 h。取对数生长期的 U251 细胞,用无血清培养基重悬细胞后,调整细胞浓度为 2×10⁶ 个/mL,以每孔 100 μL 即 2×10⁵ 个细胞接种至接种于上室即 Transwell 小室内。下室即 24 孔板中加入 500 μL 含 20% FBS 和不同浓度的异芒果苷的完全培养基,其中 20% FBS 作为趋化剂,异芒果苷的给药浓度为 0、4、16 μM 培养 24 h 左右,其中给药浓度为 0 的 1 组为对照组,培养结束后,去除培养液,用棉签擦去上室的细胞,然后用预冻甲醇固定细胞 20 min,随后用 PBS 清洗细胞 3 遍,接着用 0.1%结晶紫染液对细胞染色 20 min 并用清水冲洗掉多余结晶紫染色液,室温静置 24 h 使 Transwell 小室和细胞干燥,后

在显微镜下计数移至微孔膜下层的细胞,每个样本计数 5 个视野。迁移实验与细胞侵袭实验相同,但不需要在上室包被 matrigel 胶。

1.6 细胞划痕实验 取对数生长期的 U251 细胞,调整细胞浓度 25×10^4 个/mL,以每孔 1 mL 即 25 万个细胞接种至 6 孔板,并使每个孔的细胞均匀分布后,将其放入细胞培养箱培养 48 h 待每个孔的细胞愈合率达到 90%~100%时,用 1 mL 的枪头在每孔中间划一道竖线,去掉线上的细胞即可,不要划伤六孔板底部的包被膜。随后用 PBS 冲洗掉脱落的细胞。最后用异芒果苷处理细胞,异芒果苷的给药浓度为 0、4 和 16 μM 每个浓度 2 个复孔,给药浓度为 0 的 1 组为对照组。并在给药培养 12 h 和 24 h 时显微镜下观察并记录划痕的愈合情况。

1.7 细胞凋亡实验 取对数生长期的 U251 细胞,调整细胞浓度 6.5×10^4 个/mL 后,以每孔 100 μL 即 6500 个细胞接种至 96 孔板,并使每个孔的细胞均匀分布后,将其放入细胞培养箱培养 5 h 待细胞贴壁后,用异芒果苷处理细胞,异芒果苷的给药浓度为 0、4、16 μM ,每个浓度 3 个复孔,其中给药浓度为 0 的 1 组为对照组,培养 48 h 后,使用 Hoechst 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞的凋亡情况,染色后将不同给药浓度的细胞在荧光显微镜下观察并拍照记录。

1.8 Western blot 实验 取对数生长期的 U251 细胞,调整细胞浓度 3.4×10^6 个/mL 后,以每培养皿 1 mL 即 340 万个细胞接种至培养皿,并使每个培养皿的细胞均匀分布后,将其放入细胞培养箱培养 5 h 待细胞贴壁后,用异芒果苷处理细胞,异芒果苷的给药浓度为 0、4、16 μM ,其中给药浓度为 0 的 1 组为对照组。培养 48 h 后,用 RIPA 细胞裂解液提取每个培养皿的细胞的总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度后,取等量蛋白上样,通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,以 GAPDH 作为内参、PTEN、总 PI3K、总 AKT、mTOR、磷酸化的 PI3K、磷酸化的 Akt 和磷酸化的 mTOR 作为一抗,恒压 100 v 电泳。以 400 mA 电流转膜 45 min 后,用 5% BSA 进行室温封闭 1 h,一抗稀释液孵育 PVDF 膜 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。1 \times TBST 洗膜 3 次,二抗稀释液室温孵育 1 h,显色曝光获得条带灰度值,并进行统计学分析。

1.9 RNA 干扰 利用 siRNA 在线设计工具 siDirect 2.0 设计 3 对针对 PTEN3'-UTR 区的小干扰 RNA,

siRNA 序列如表 1。利用 Lipofectamine 2000 将 siRNA 和 siRNA-control 转染 HEB 细胞,western blot 检测沉默效果,以沉默效率达 85%以上的 siRNA 进行下一步实验。

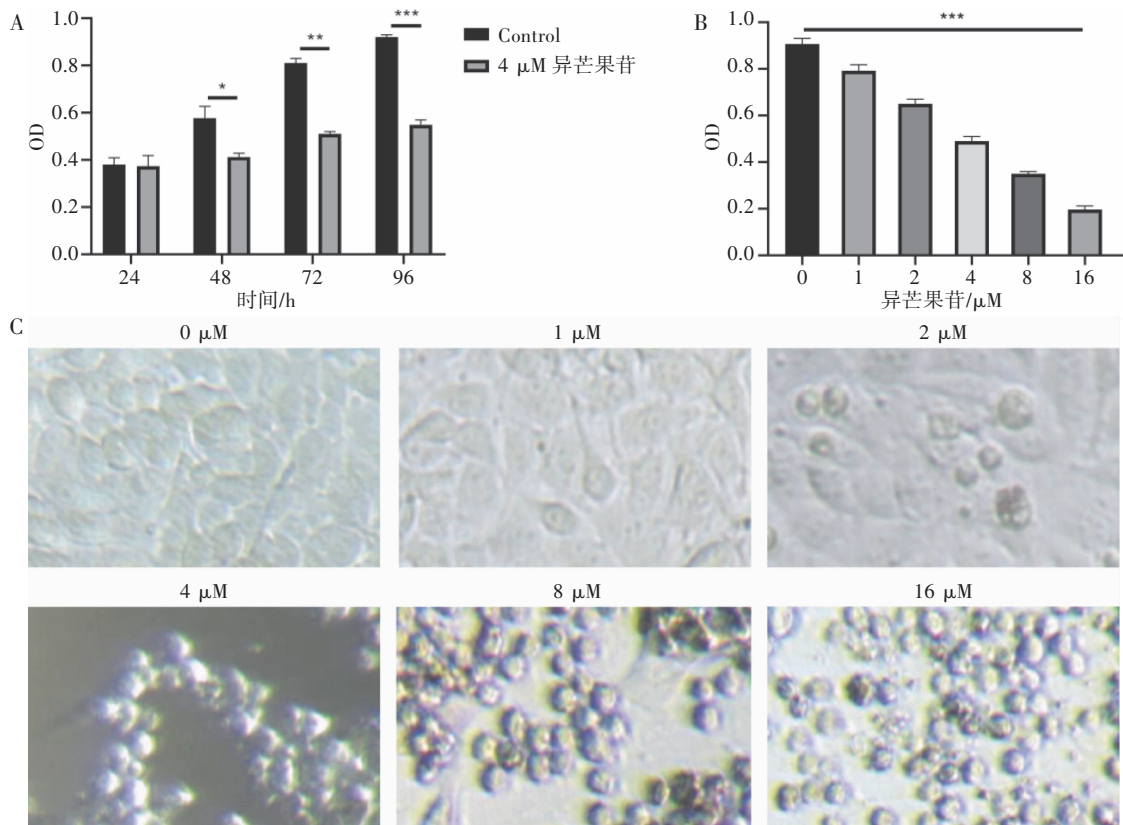
表 1 siRNA 序列

Name of siRNA for PTEN	RNA oligo sequences	
	21nt guide (5'→3')	21nt passenger (5'→3')
siRNA-1	AUAAACAUAUAUGUAUUCAG GAAUACAUAUAUGUUUAUUAU	
siRNA-2	AAUGUGUAAGGUCAAAAAGGGU CCUUUUGACCUUACACAUUCU	
siRNA-3	AAUAAGUGCAUCAUAAAUCUU GAUUUAUGAUGCACUUAUUCA	
siRNA-control	UUCUCCGAACGUGUCACG UTT AAACGUGACACGUUCGGAGAA	

1.10 统计学方法 应用 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析处理,随后用 GraphPad 5 进行统计图绘制。运用 *t* 检验或单因素方差分析进行组间比较,以 $P < 0.05$ 判断为差异有统计学意义,所有实验重复 3 次。

2 实验结果

2.1 异芒果苷抑制 U251 细胞的增殖 根据 MTT 的实验结果,计算出异芒果苷对 U251 的 IC₅₀ 为 $(4.4 \pm 0.25) \mu\text{M}$,且随着异芒果苷的浓度增加,U251 细胞的抑制率随之升高,呈浓度依赖性(见图 1A),通过考察给药 24、48、72、96 h,4 μM 异芒果苷对 U251 的抑制作用,发现与对照组相比,异芒果苷给药 24 h,两者的 U251 细胞生存率无明显差异,但给药 48 h 两者出现统计学差异($P < 0.05$),并随着给药时间的延长两者的差异越来越显著,表明异芒果苷对 U251 的抑制作用呈显著的时间依赖性(见图 1B)。且随着药物浓度增加,细胞逐渐变圆(见图 1C)。由此可知异芒果苷对恶性胶质瘤细胞 U251 的抑制效果随着异芒果苷的给药浓度增加和给药时间的延长而增加;即异芒果苷对 U251 的抑制作用呈浓度和时间依赖性,根据 MTT 实验结果,transwell 迁移和侵袭实验以及细胞划痕实验的给药浓度和时间分别定为 0、4、16 μM 和 24 h(划痕试验增加 1 个 12 h);western blot 实验和凋亡实验的给药浓度和时间分别定为 0、4、16 μM 和 48 h。

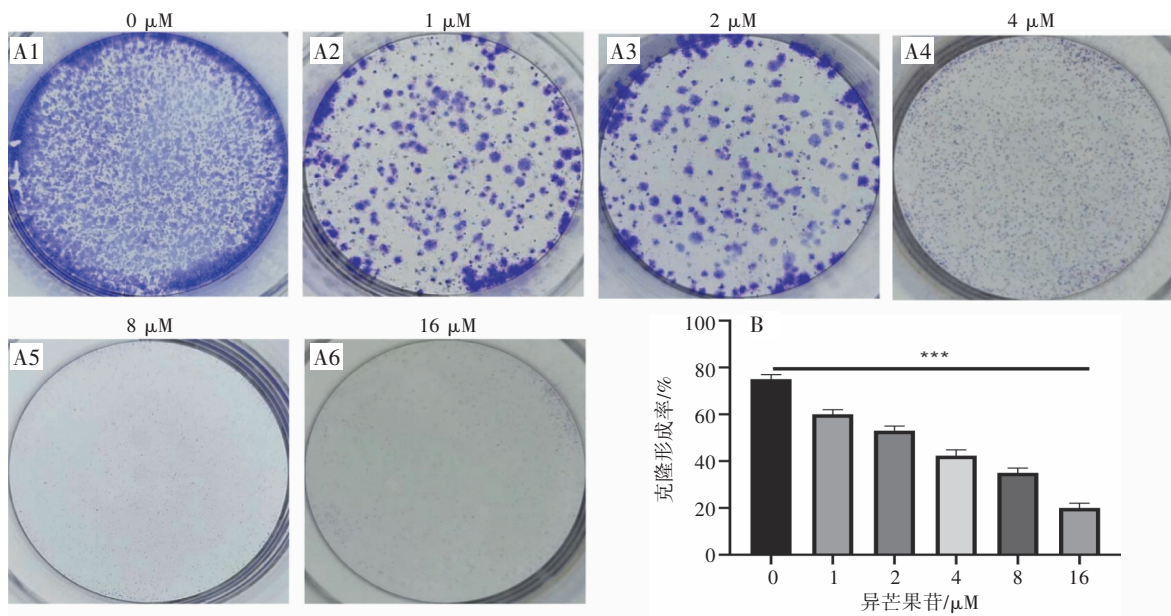


注:A. 异芒果苷时间依赖性抑制 U251; B. 异芒果苷浓度依赖性抑制 U251; C. 异芒果苷引起 U251 细胞形态改变

图 1 异芒果苷抑制 U251 细胞的存活和增殖

2.2 异芒果苷抑制 U251 细胞的平板克隆形成能力
根据平板克隆形成实验结果,1 μM 异芒果苷就可以初步抑制 U251 细胞的克隆形成,4 μM 异芒果苷就可以抑制 50%左右的 U251 细胞的克隆形成,16 μM

异芒果苷处理后 U251 只能形成 20%的克隆群落。故异芒果苷能有效抑制恶性胶质瘤 U251 细胞的克隆形成,并随着异芒果苷的浓度增加呈现浓度依赖性。(见图 2)

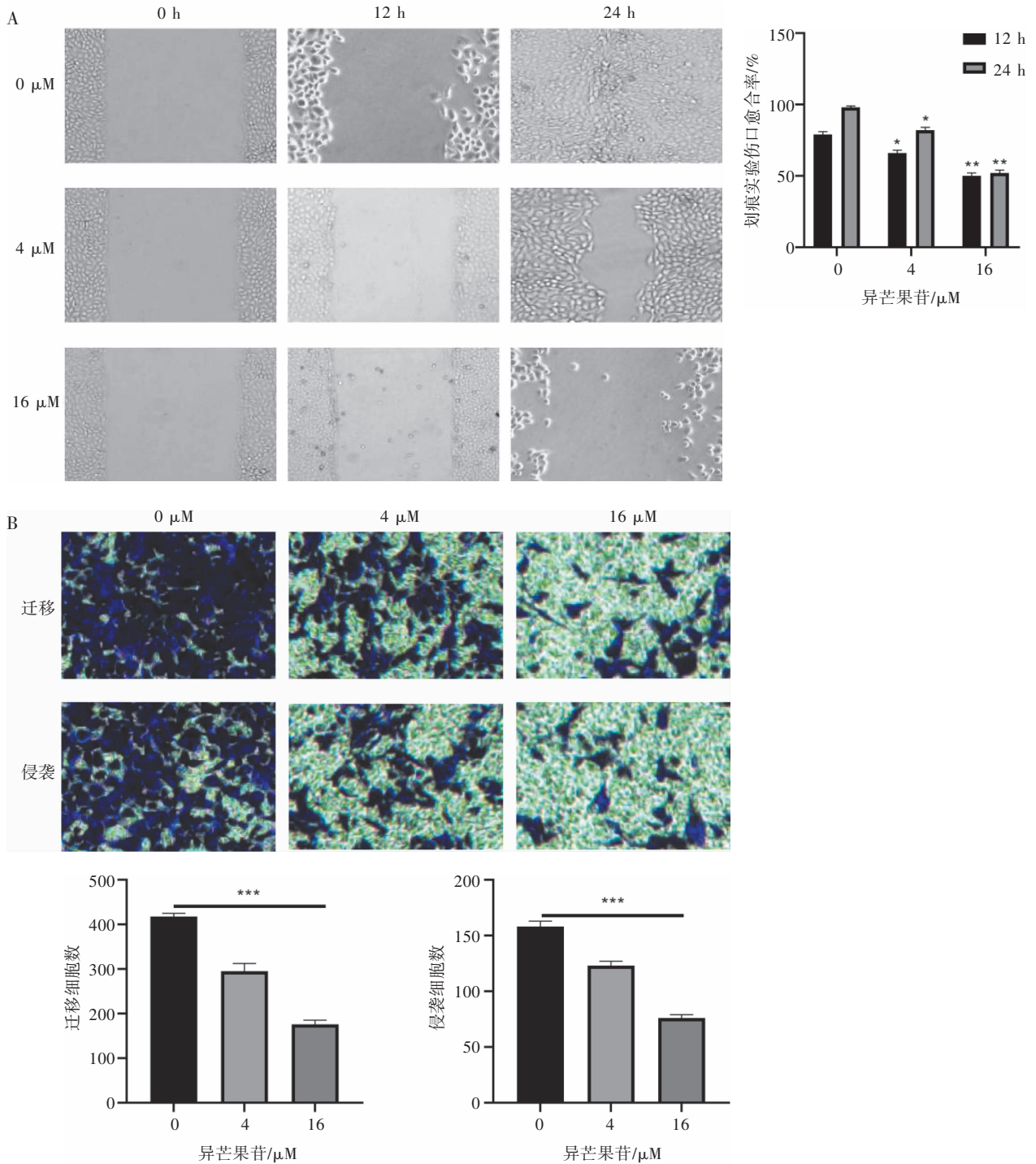


注:A1-6. 代表性图; B. 统计图

图 2 异芒果苷抑制 U251 细胞的克隆形成

2.3 异芒果苷抑制 U251 细胞的迁移和侵袭能力
 根据 Transwell 小室迁移、侵袭实验结果可知,当异芒果苷的给药浓度为 4 μM 时,就可以显著抑制 U251 细胞的纵向迁移和侵袭,16 μM 异芒果苷就可以显著抑制 50%左右的 U251 细胞的纵向迁移和侵袭;通过细胞划痕实验可知,当异芒果苷的给药浓度为 4 μM ,给

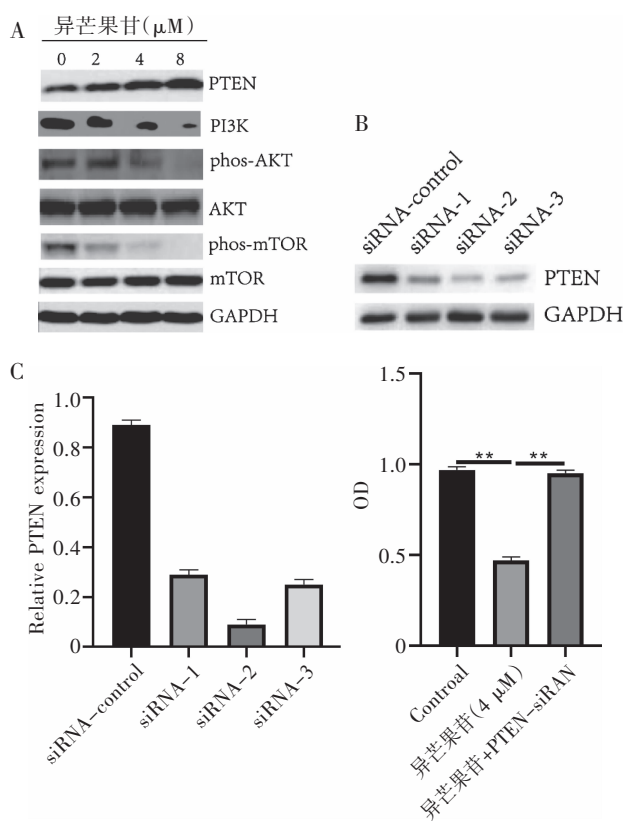
药时间为 12 h 时与未给药组比,划痕愈合率就有统计学差异($P<0.05$),随着给药浓度和时间的增加划痕愈合率显著降低,表明异芒果苷对 U251 细胞的横向迁移的抑制呈浓度和时间依赖性。由此可知异芒果苷可以抑制恶性胶质瘤 U251 细胞的纵向迁移和侵袭能力以及横向迁移能力,且呈浓度和时间依赖性(见图 3)。



注:A. 异芒果苷抑制 U251 细胞的横向迁移能力; B. 异芒果苷抑制 U251 细胞的纵向迁移和侵袭能力

图 3 异芒果苷抑制 U251 细胞的迁移和侵袭

2.4 异芒果苷通过下调 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 抑制 U251 细胞 通过 Western blot 实验,我们发现异芒果苷可以浓度依赖性的上调 PTEN 的表达,进而抑制磷酸化的 PI3K、磷酸化的 Akt 及磷酸化的 mTOR 的表达量,而不影响总 PI3K、总 Akt 及总 mTOR 的表达量(见图 4A)。我们设计了 3 对针对 PTEN 3'-UTR 区的 siRNA,发现 siRNA-2 沉默效率最好,可达 85% 以上,故选取 siRNA-3 开展后续实验(见图 4B),siRNA 沉默 PTEN 可以部分抵消异芒果苷对 U251 细胞的抑制作用(见图 4C)。故异芒果苷可以通过调控 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路对恶性胶质瘤 U251 产生抑制作用。



注:A. 异芒果苷浓度依赖性调节 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路; B. 在 HEB 细胞中 siRNA 可下调 PTEN 的表达; C. PTEN-siRNA 可以部分抵消异芒果苷对 U251 细胞的抑制作用

图 4 异芒果苷通过调控 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路抑制 U251

3 讨论

由实验结果可知异芒果苷可以抑制 U251 细胞的增殖、迁移和侵袭、单克隆形成,经过初步探索其作用机制,我们发现异芒果苷可以诱导 U251 细胞的调

亡,进而发现其可以通过调控 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路从而对恶性胶质瘤 U251 细胞产生抑制作用。并得出结论,异芒果苷可以抑制恶性胶质瘤 U251 细胞的恶性生物学行为,且作用机制与直接或间接调控 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路有关。

异芒果苷是鸢尾科植物的主要活性成分,属于 C-葡萄糖苷氧杂蒽酮类化合物^[5]。有研究表明其可以作为一种新型强效的血管内皮生长因子受体 2 激酶抑制剂来抑制乳腺癌的增殖、转移和血管生成^[6]。除此之外异芒果苷还可以靶向 HMGB1/NLRP3/NF-κB 通路来抑制炎症反应^[7]。虽然已有报道说明异芒果苷的确有抗肿瘤作用,但其的抗肿瘤谱和具体的作用机制还需进一步研究。而 PTEN 基因 (gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN),又称为 MMAC1 (mutated in multiple advanced cancer 1) 和 TEP1 (TGF-regulated and epithelial cell-enriched phosphatase)。定位于染色体 10q23.3,由 9 个外显子组成,编码由 403 个氨基酸组成的蛋白质,具有磷酸酯酶的活性^[8]。PTEN 蛋白可通过拮抗酪氨酸激酶等磷酸化酶的活性而抑制肿瘤的发生发展^[9-10]。

有研究发现,在中枢神经肿瘤特别是胶质瘤中普遍存在 PTEN 基因的突变或缺失^[8,11-12]。而 PTEN 基因的表达可通过特异性地使 IP3 的第 3 位磷酸去磷酸化而间接地抑制胰岛素诱导的磷酸肌醇-3 激酶 (PI3K) 的活性,而 PI3K 是其下游信号通路的主要二级信使,故 PI3K 的下游信号也因此诱导抑制,包括膜募集和丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt 的激活^[13]。而 PI3K、Akt 和 mTOR 信号通路,在生理和病理条件下对细胞的生长和生存至关重要,其相互间联系紧密,故在一定程度上可以视为一个单独的、特殊的通路^[14],其中 PI3K/Akt 通路是细胞应激过程中存活的关键调节因子^[15],如促进肿瘤细胞的增殖、存活、迁移/侵袭以及上皮间质转变 (EMT)、抑制凋亡、自噬和衰老等^[16],并对正常组织和肿瘤组织中的血管生成起到重要作用^[17-18]。

本实验中我们通过细胞活性实验—MTT 实验、克隆形成试验—平板克隆形成实验、迁移和侵袭试验—transwell 迁移和侵袭试验以及划痕实验证明异芒果苷可以抑制恶性胶质瘤细胞 U251 的增殖、克隆

形成、迁移和侵袭。通过 western blot 实验,我们进一步发现异芒果苷可以通过 PTEN-PI3K-Akt-mTOR 通路发挥抗肿瘤作用。虽然实验中还有一些不足之处,如异芒果苷对 PTEN 下游的其它通路的作用未进行探索,也未进一步研究异芒果苷对 PTEN 靶点是直接作用还是间接作用,即未对异芒果苷与 PTEN 的作用位点或原理进行研究,再者也未开展动物实验对异芒果苷的药效进行进一步确认。但本次实验拓展了异芒果苷的抗肿瘤谱,并提供了其抗肿瘤的一种可能的作用机制,为异芒果苷的未来临床应用或结构改造提供数据支持。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(1):7-33.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1):7-30.
- [3] GUO L P, ZHANG Z J, LI R T, et al. Influences of LncRNA SNHG20 on proliferation and apoptosis of glioma cells through regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1):253-261.
- [4] 潘莉莉. 芒果苷抑制鼻咽癌 CNE2 细胞生长及机制研究 [D]. 南宁:广西医科大学, 2013.
- [5] 黄建国, 李良, 张智渊, 等. 异芒果苷抑制人骨肉瘤 U2OS 细胞的恶性生物学行为[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(8):6.
- [6] WANG B H, SHEN J, WANG Z X, et al. Isomangiferin, a novel potent vascular endothelial growth factor receptor 2 kinase inhibitor, suppresses breast cancer growth, metastasis and angiogenesis[J]. *J Breast Cancer*, 2018, 21(1):11-20.
- [7] YUE S W, XUE N, LI H L, et al. Isomangiferin attenuates renal injury in diabetic mice via inhibiting inflammation [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13:4273-4280.
- [8] DUERR E M, DUERR E M, HAYASHI Y, et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors[J]. *Oncogene*, 1998, 16(17):2259-2264.
- [9] HODAKOSKI C, FINE B, HOPKINS B, et al. Analysis of intracellular PTEN signaling and secretion[J]. *Methods*, 2015, 78:164-171.
- [10] LI J, YEN C, LIAW D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*, 1997, 275(5308):1943-1947.
- [11] IDOATE M A, ECHEVESTE J, DIEZ-VALLE R, et al. Biological and clinical significance of the intratumour heterogeneity of PTEN protein expression and the corresponding molecular abnormalities of the PTEN gene in glioblastomas[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2014, 40(6):736-746.
- [12] NIU H T, LIU Y, WANG Y Z, et al. Columbamine-Mediated PTEN/AKT signal pathway regulates the progression of glioma [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13:489-497.
- [13] LI J, QI X, WANG X C, et al. PTEN inhibition facilitates diabetic corneal epithelial regeneration by reactivating Akt signaling pathway[J]. *Transl Vis Sci Technol*, 2020, 9(3):5.
- [14] PORTA C, PAGLINO C, MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer [J]. *Front Oncol*, 2014, 4:64.
- [15] DATTA S R, BRUNET A, GREENBERG M E. Cellular survival: a play in three Akts [J]. *Genes Dev*, 1999, 13(22):2905-2927.
- [16] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407:153-189.
- [17] 李帅帅, 孙军. PI3K/AKT/mTOR 信号传导通路在姜黄素抑制人肝癌细胞 Cox-2 表达中的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2014, 39(1):30-34.
- [18] SHU X, ZHAN P P, SUN L X, et al. BCAT1 activates PI3K/AKT/mTOR pathway and contributes to the angiogenesis and tumorigenicity of gastric cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:659260.