

mTORC1/2 抑制剂与伊马替尼联用抑制 Ph⁺ ALL 细胞株生长的作用机制^{*}

吴佳慧, 石芳芳, 龚玉萍[△], 石 睿

四川大学华西医院 血液科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 C1/2(mTORC1/2)抑制剂 PP242 与伊马替尼(IM)联用对费城染色体阳性(Ph⁺)急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞株 SUP-B15 的抗白血病作用及机理。**方法** 以 SUP-B15 细胞为研究模型,MTT 法检测 IM 与 PP242 联合处理 SUP-B15 细胞 72 h 后的半数抑制浓度(IC₅₀)及联合作用指数(CI);Western blot 法检测 PP242 处理 SUP-B15 细胞后对磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/mTOR 通路的影响,以及 IM 与 PP242 联合处理 SUP-B15 细胞后对 PI3K/Akt/mTOR 通路及凋亡相关蛋白的影响。**结果** IM 单用于 SUP-B15 细胞的 IC₅₀ 值为(1.50±0.09) μmol/L。而 IM 与 20、30、50 nmol/L PP242 联用于 SUP-B15 细胞,其 IC₅₀ 分别下降为(0.81±0.030) μmol/L、(0.36±0.140) μmol/L、(0.02±0.002) μmol/L, CI 值分别为 0.764、0.545、0.507,提示两药有较高的协同作用。PP242 单独作用于 SUP-B15 细胞后,磷酸化 Akt(p-Akt)、p-4EBP1、p-elF4E、p-ABL、p-mTOR、p-P70 等 PI3K/Akt/mTOR 通路上的关键磷酸化蛋白表达下调,且这种变化呈现浓度和时间依赖性。PP242 与 IM 联合用于 SUP-B15 细胞时,SUP-B15 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的各关键蛋白下调较 PP242 或 IM 单用时更明显,凋亡相关蛋白 Bax、cleaved Caspase-3 上调也较两药单用时更明显。**结论** PP242 与 IM 联合使用时可增强对于 PI3K/Akt/mTOR 通路的抑制,增加由 Bax、Caspase-3 所介导的凋亡作用。

【关键词】 Ph⁺ 急性淋巴细胞白血病 mTORC1/2 Akt PP242 伊马替尼

The Mechanism of Combination using mTORC1/2 Inhibitor and Imatinib to Suppress Cell Proliferation of Ph⁺ ALL Cell Line WU Jia-hui, SHI Fang-fang, GONG Yu-ping[△], SHI Rui. Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: gongyuping@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the anti-leukemia effect and mechanism of mTORC1/2 inhibitor PP242 combined with imatinib (IM) on the proliferation of Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell line SUP-B15. **Methods** SUP-B15 cell line was treated with PP242, imatinib (IM), or PP242 plus IM for 72 h, IC₅₀ values (the concentration of drug required to kill 50% of the cells) and the combination index (CI) of synergistic cytotoxicity was determined using MTT methods. The expressions of PI3K/Akt/mTOR and apoptosis associated proteins were examined by Western blot test. **Results** The IC₅₀ value of IM alone was (1.50±0.09) μmol/L, however, the IC₅₀ values were (0.81±0.030) μmol/L, (0.36±0.140) μmol/L and (0.02±0.002) μmol/L combined with 20 nmol/L, 30 nmol/L and 50 nmol/L of PP242, and the CI values were 0.764, 0.545 and 0.507, indicating two drugs had highly synergistic effect on anti-proliferation in the SUP-B15 cell line. The expressions of p-Akt, p-4EBP1, p-elF4E, p-cAbl, p-mTOR and p-P70 were down-regulated significantly in a dose-dependent and time-dependent manner after PP242 treatment. Compared with PP242 or IM alone, the down-regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and the up-regulation of the apoptosis associated proteins (bax and cleaved caspase-3) were more significant in the combination of two drugs. **Conclusion** The combination of IM and PP242 could increase the inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and apoptosis mediated by bax and caspase-3 in SUP-B15 cell line.

【Key words】 Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia mTORC1/2 Akt PP242 Imatinib

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可整合细胞内外信号,调节细胞生

长、增殖、代谢和存活。近年研究发现在血液肿瘤的发生发展过程中,mTOR 信号多处于异常激活状态^[1]。同时,在费城染色体阳性(Ph⁺)急性淋巴细胞白血病(ALL)中会表达 BCR-ABL 融合蛋白,而 BCR-ABL 会激活一系列信号通路,其中就包括促进细胞生存的信号通路——磷脂酰肌醇信号通路磷

^{*} 教育部博士点基金博导类(No. 201201811100082)、四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2013SZ00253)和四川省中医药管理局自由申请项目(No. 2014A038)资助

[△] 通信作者, E-mail: gongyuping@hotmail.com

脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/mTOR。该通路对细胞很多方面的功能都会有影响,包括蛋白合成、细胞周期、细胞生存、凋亡、血管生长以及肿瘤耐药等。PP242 是一种 ATP 竞争性的 mTOR 激酶抑制剂,其靶点为 mTORC1 与 mTORC2。本研究以人淋巴瘤白血病(Ph⁺ ALL)细胞株 SUP-B15 为研究对象,研究 PP242 单用及与伊马替尼(imatinib, IM)联合对 SUP-B15 细胞的抑制作用,以及对 PI3K/Akt/mTOR 通路和凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人 Ph⁺ ALL 细胞系 SUP-B15 购自美国 ATCC;PP242 购自 Sigma 公司,以 5 mmol/L 的浓度储存于 -20 ℃,使用时用培养基稀释到工作浓度;MTT 试剂购自碧云天生物公司;胎牛血清、IMDM 培养基购自 Hyclone 公司;鼠抗人总 Akt(t-Akt)、磷酸化 Akt(p-Akt)、t-4EBP1、p-4EBP1、t-eIF4E、p-eIF4E、t-mTOR、p-mTOR、t-P70、p-P70、p-ABL、Mcl-1、Bcl-2、Bax、Caspase-3、cleaved Caspase-3、GAPDH 单克隆抗体(一抗)及山羊抗小鼠 IgG 过氧辣根酶标记二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 细胞培养

将 SUP-B15 细胞置于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液,37 ℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 细胞培养箱内培养,3~4 d 传代一次,取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3 MTT 法检测 PP242 或 IM 单用及 PP242 与 IM 联用对 SUP-B15 细胞生长的抑制作用

取对数生长期的 SUP-B15 细胞,以每孔 5×10^4 (90 μ L)细胞悬液(细胞浓度 5×10^5 mL⁻¹),接种于 96 孔板,分别加入 10 μ L 作用终浓度为 1、10、20、30、50、100、200 nmol/L 的 PP242,或 0、2、4、6、8、10 μ mol/L 的 IM,或 5 μ L 20、30、50 nmol/L PP242 联合 5 μ L IM (浓度分别为 0、2、4、6、8、10 μ mol/L),同时设立对照孔(90 μ L 细胞悬液和 10 μ L IMDM 培养液)和空白孔(只含 100 μ L IMDM 培养液),每个浓度设 3 个复孔。37 ℃、体积分数为 5% CO₂ 条件下孵育 72 h 后,避光条件下每孔加入 5 mg/mL MTT 溶解液 10 μ L,继续孵育 4 h,再加入 SDS 三联溶解液 100 μ L,室温孵育过夜,在酶标仪上检测 570 nm 光密度值。抑制率 = $1 - (\text{实验孔}$

平均光密度值 - 空白孔平均光密度值) / (对照孔平均光密度值 - 空白孔平均光密度值),根据药物对细胞的抑制率与药物浓度对数呈正比的原理绘制生长曲线,计算出药物对细胞作用的半数抑制浓度(IC₅₀)。采用 Chou-Talalay 法(中位药效法)中的联合作用指数(combined index, CI)判断两种药物的协同性。 $CI = DA/IC_{50}(A) + DB/IC_{50}(B)$ 。A、B 代表两种不同药物,IC₅₀(A)和 IC₅₀(B)是两种药物单独使用使生长抑制率达 50% 时的药物浓度,DA 和 DB 是两药联用使生长抑制率达 50% 时两种药物的浓度。 $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 提示联合使用的两药有叠加作用, $0.8 \leq CI < 0.9$ 为低度协同作用, $0.6 \leq CI < 0.8$ 为中度协同作用, $0.4 \leq CI < 0.6$ 为高度协同作用, $0.2 \leq CI < 0.4$ 为强协同作用。

1.4 Western blot 法检测 PP242 对 SUP-B15 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路及凋亡蛋白表达的影响

取对数生长期 SUP-B15 细胞,分别加入 10、100、1 000 nmol/L PP242,1 h 后收集细胞,检测 PP242 作用的浓度依赖性;或加入 100 nmol/L PP242,分别培养 1、6、24 h 后收集细胞,检测 PP242 作用的时间依赖性;或同时加入 1 μ mol/L IM 和 100 nmol/L PP242 培养 24 h,并设 1 μ mol/L IM 和 100 nmol/L PP242 单独作用组。4 ℃预冷 PBS 冲洗 3 次,冰上加入 RIPA 裂解液裂解细胞,13 000 r/min 离心 15 min 去除细胞碎片后,使用 BCA 测定样品的蛋白浓度,每组取等量蛋白,进行 80 g/L SDS-PAGE 电泳。电泳结束后转移到 PVDF 膜上,10%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗后孵育过夜,TBST 洗涤液洗膜 3 次,每次 15 min。加入山羊抗小鼠 IgG 过氧辣根酶标记二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。用 ECL 化学发光法曝光检测。

2 结果

2.1 IM 单用以及与 PP242 联用对 SUP-B15 细胞的抑制作用

单用 IM 处理 SUP-B15 细胞时,IM 的 IC₅₀ 值为 (1.50 ± 0.09) μ mol/L;单用 PP242 处理 SUP-B15 细胞时,IC₅₀ 值为 (101.54 ± 43.97) nmol/L。IM 与 20、30、50 nmol/L PP242 联合作用于 SUP-B15 细胞,IM 的 IC₅₀ 值分别为 (0.81 ± 0.030) 、 (0.36 ± 0.140) 、 (0.02 ± 0.002) μ mol/L,CI 分别为 0.764、0.545、0.507。根据 Chou-Talalay 法,IM 与 PP242 联用有较强的协同抗白血病作用。

2.2 PP242 对 SUP-B15 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响

如图 1 所示,经不同浓度的 PP242 处理后,SUP-B15 细胞中磷酸化的 p-Akt、p-mTOR、p-4EBP1、p-P70、p-eIF4E 等蛋白表达下调,而且,

PP242 浓度越高,下调作用越明显;同样,随着作用时间延长,PP242 导致的上述信号通路蛋白磷酸化水平降低更明显,但总蛋白无明显变化(图 2)。上述结果表明 PP242 呈浓度和时间依赖性抑制 SUP-B15 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 通路。

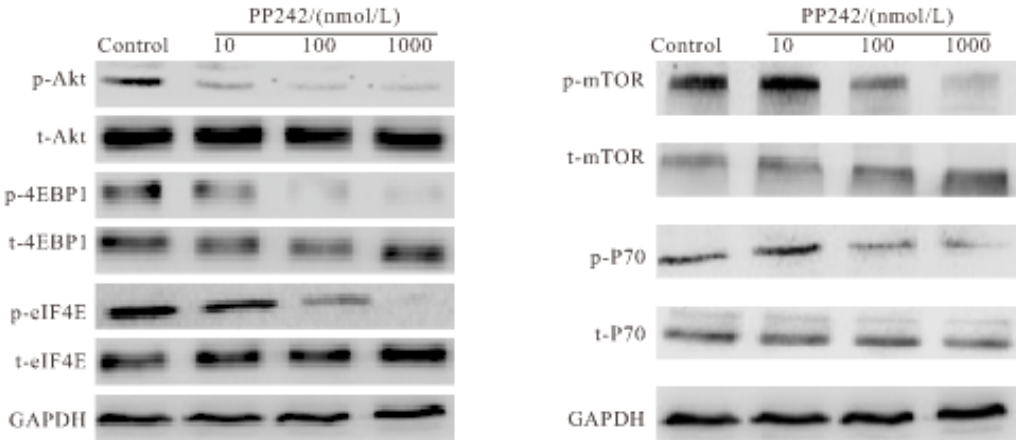


图 1 PP242 呈浓度依赖性抑制 SUP-B15 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 通路

Fig 1 PP242 suppressed the PI3K/Akt/mTOR pathway of SUP-B15 with a concentration dependent manner

p: Phosphorylated protein; t: Total protein

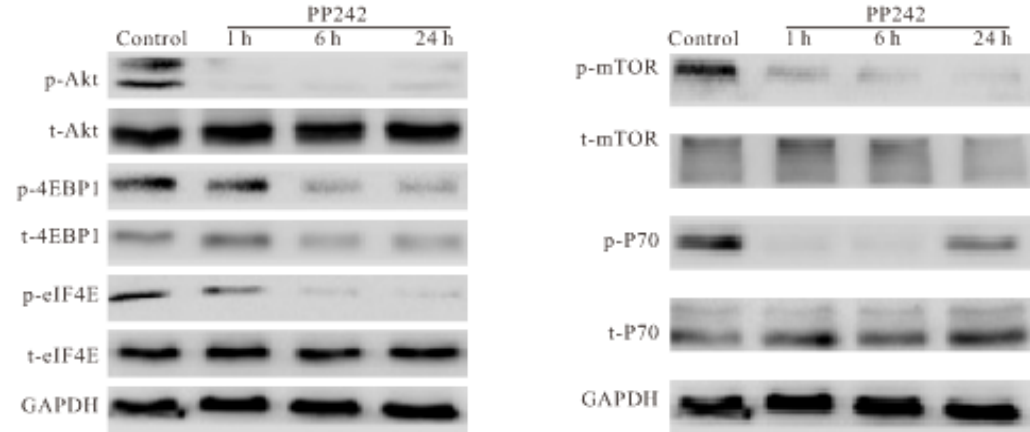


图 2 PP242 呈时间依赖性抑制 SUP-B15 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 通路

Fig 2 PP242 suppressed the PI3K/Akt/mTOR pathway of SUP-B15 with a time dependent manner

2.3 PP242 和 IM 联用对 SUP-B15 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路及凋亡相关蛋白的影响

当 PP242(100 nmol/L)与 IM(1 μ mol/L)联合作用时,PI3K/Akt/mTOR 通路中的关键蛋白 p-Akt、p-eIF4E、p-4EBP1、p-mTOR、p-P70、p-ABL、Mcl-1 出现了比 PP242 和 IM 单用时更加明显的下调,提示两药联合有更强烈的对 mTOR 通路的抑制效果(图 3)。在对凋亡相关蛋白的检测中,PP242 单用时 SUP-B15 细胞表现出抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调,但促凋亡蛋白 Bax 以及 cleaved Caspase-3 无明显改变。在 IM 单用的情况下,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达无明显改变,但 Bax、cleaved Caspase-3 出现了

上调。两药联合使用时,Bax 和 cleaved Caspase-3 表现为更显著的上调,与单用 IM 相比 Bcl-2 则明显下调(图 4)。

3 讨论

Ph 染色体是指第 22 号染色体长臂和第 9 号染色体长臂交互易位形成,其形成的 *bcr-abl* 融合基因编码的 BCR-ABL 蛋白具有高度活性的酪氨酸激酶,可以持续激活下游的一系列信号通路,刺激肿瘤细胞增殖分化或者逃避凋亡,导致 Ph⁺ 白血病的发生。Ph⁺ 白血病包括慢性粒细胞白血病和 Ph⁺ ALL,其中 Ph⁺ ALL 约占成人 ALL 的 20%~25%^[2]。

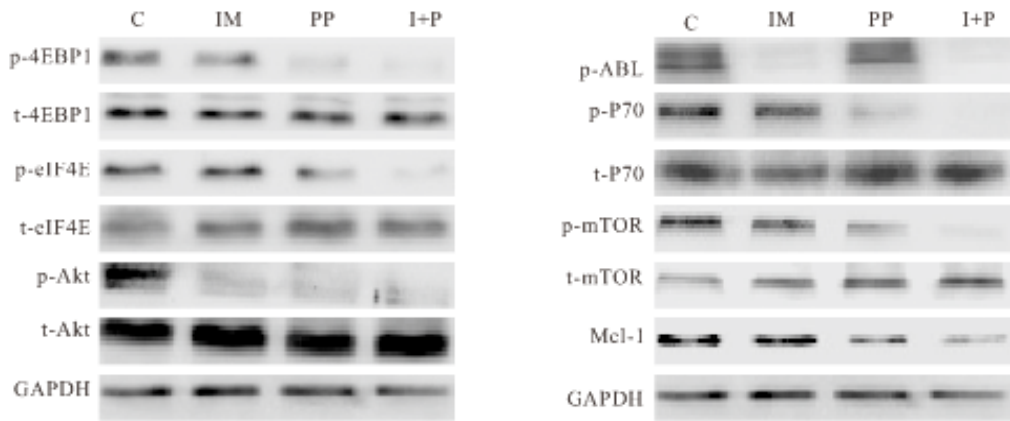


图 3 PP242 与 IM 联用对 PI3K/Akt/mTOR 通路的抑制作用

Fig 3 Suppression effect of PI3K/Akt/mTOR pathway by combination of PP242 and IM

C: Control; IM: 1 μmol/L imatinib; PP: 100 nmol/L PP242; I+P: 1 μmol/L imatinib+100 nmol/L PP242

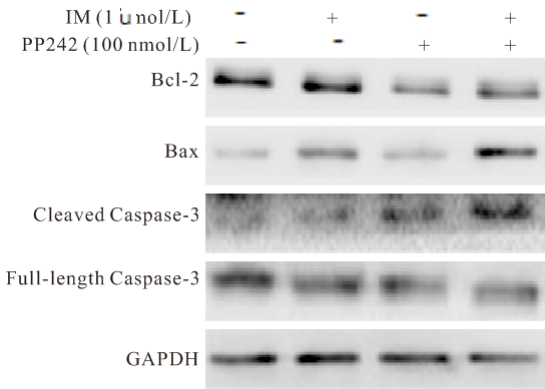


图 4 PP242 与 IM 联用对凋亡相关蛋白的影响

Fig 4 Influence of the apoptosis associated proteins by combination of PP242 and IM

PI3K/AKT/mTOR 通路在细胞的生长、分化、增殖过程中发挥了重要作用,近年研究揭示该信号通路在多种肿瘤中明显活跃,在肿瘤的发生发展中发挥了重要作用。雷帕霉素是第一个发现的 mTOR 抑制剂,在细胞内与 FKBP12 形成复合物,结合到 mTORC1 表面(非激酶位点),通过变构机制影响 mTORC1 的活性,进而干预下游蛋白质翻译^[3]。早在 2004 年,MOHI 等^[4]发现 mTOR 抑制剂雷帕霉素与 IM 联用比单用 IM 更能抑制 BCR/ABL 突变细胞的增殖活性,近期也有研究证明了 mTOR 抑制剂与酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼在其他肿瘤中的有效性^[5]。不直接与 mTORC2 结合这一特性使雷帕霉素及其衍生物(Rapalogs)用于肿瘤治疗后,通过负反馈激活 Akt 磷酸化,因而减弱了此类药物的疗效^[6]。因此,雷帕霉素的临床 I 期试验并未能找到太多证明其有效性的确切证据^[7]。第二代 mTOR 抑制剂 PP242 因其更小的相对分子质

量、更易于结合靶点的特性成为更高效的 mTOR 抑制剂,而且 PP242 可同时抑制 mTORC1 和 mTORC2,使细胞中负反馈激活 Akt 的途径被完全阻断,达到更强的肿瘤抑制作用。

本研究采用 MTT 法检测 PP242、IM 单用以及两药联用的情况下对 SUP-B15 细胞的抑制作用,观察到两药联用产生了协同效应,并且随着 PP242 浓度的增加,两药之间的协同效应得到了进一步增强。同时,本研究检测了 PP242、IM 单用和两药联用对 PI3K/Akt/mTOR 通路的影响。在 PP242 单用时,PI3K/Akt/mTOR 通路中多个关键蛋白磷酸化水平下调,包括 p-Akt、p-eIF4E、p-4EBP1、p-mTOR、p-P70、p-ABL、Mcl-1 证明 PP242 对这条 BCR/ABL 下游的主要通路有强烈的抑制作用。IM 单用对这些蛋白的磷酸化水平影响较小,而两药合用较单药进一步下调关键蛋白的磷酸化水平,效果明显。

Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,主要功能是调节细胞生长、生存以及糖代谢。Akt 激活后,可以磷酸化上百种不同的底物,包括调节细胞生长和蛋白质合成的蛋白,如 TSC1/2,也有调节细胞周期的蛋白,如 p27kip1、FOXO 转录因子家族、GSK3、Cyclin D1 和 c-Myc 等。凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 也是 Akt 重要的下游底物。Caspases 是一组天门冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,在介导细胞凋亡中起关键作用。Caspase-3 正常以酶原的形式存在于胞浆中,在凋亡的早期阶段被剪切激活,形成大、小亚基,从而进一步发挥作用。PP242 单用导致 p-Akt 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调,但并未观察到促凋亡蛋白 Bax 以及 cleaved Caspase-3 的明显上调,证明 PP242 单用时抑制了 Bcl-2 的抗

凋亡作用,但并不主要依靠 Bax 及 Caspase-3 蛋白介导的凋亡途径发挥对肿瘤细胞的抑制作用。然而,在 IM 单用的情况下,抗凋亡蛋白 Bcl-2 并未出现下调,Bax、Caspase-3 介导的凋亡途径却被激活。两药联合使用与单药相比,Bax 和 cleaved Caspase-3 都出现了更显著的上调,Bcl-2 出现了更显著的下调。这表明 IM 对凋亡途径的激活因 PP242 的合用而得到了加强,而 PP242 抑制抗凋亡的作用也因 IM 而加强。这可能是 PP242 和 IM 联合应用时通过其他途径激活了细胞凋亡或者抑制了细胞内抗凋亡的途径,例如细胞内微管受损可诱导 Bcl-2 磷酸化而失去抗凋亡活性,增加细胞凋亡,这种作用可被雷帕霉素等 mTOR 抑制剂所调节^[8]。PP242 可能如紫杉醇一样作用于细胞内微管从而间接调控细胞凋亡,或者通过 Bcl 家族中的抗凋亡蛋白 Mcl-1 对凋亡途径产生调节作用^[9]。另外,在肿瘤中,酪氨酸激酶下游信号通路中的反馈调节可能会大大降低它们对 mTOR 抑制剂的敏感性,减少对 PI3K 通路的反馈抑制,从而减弱对患者的疗效。因此,酪氨酸激酶抑制剂可增加对 mTOR 抑制剂的敏感性,这两者合用时,可能是通过抑制了 Akt 信号通路自身的负反馈调节,从而增加了对肿瘤细胞的抑制作用^[10]。

本研究中 PP242 及联合 IM 对 p-eIF4E 和 p-4EBP1 有明显的下调作用。真核细胞翻译起始因子 eIF4E 在多种肿瘤包括白血病、淋巴瘤中异常表达,通过对翻译功能的影响,干预帽依赖蛋白的表达。真核细胞翻译起始因子 F(eIF4F)是由 eIF4E(帽结合蛋白)、eIF4G(起连接结合作用的亚基)、eIF4A(依赖于 RNA 的 ATP 酶)组成的三聚体复合物。复合物形成并结合到 mRNA 5'末端的帽子结构(5'metyl-7-GTP cap)后,即募集 43S 的起始前复合物(含 Met-tRNA_i,eIFs1、1A、2、3、5),开始蛋白质的翻译和合成^[11]。此条帽依赖翻译途径调控的蛋白质主要包括抗凋亡因子、细胞周期调控子、促血管内皮细胞生长因子,以及原癌蛋白等与细胞生长、增殖、凋亡有关的重要蛋白。因此,该翻译过程的异常与肿瘤的发生有重要的关系。在所有起始因子中,由于 eIF4E 在细胞内的水平最低,它与 eIF4G 结合形成 eIF4F 起始复合物的过程成为翻译开始的限速步骤,也成为控制蛋白质翻译和表达的关键点。eIF4E 的功能主要受 mTORC1 底物 4EBP1 调控。4EBP1 为 eIF4E 抑制因子,在低磷酸化状态时与 eIF4E 紧密结合,阻止了 eIF4E 与锚定蛋白 eIF4G 结合形成 eIF4F 起始复合物,从而不能进行 mRNA

翻译。当 4EBP1 被 mTORC1 磷酸化后,其与 eIF4E 的结合力减弱,释放出 eIF4E,eIF4E 即与 eIF4G、eIF4A 形成翻译起始复合物 eIF4F,开始蛋白质的翻译过程。PI3K/Akt/mTORC1 通路通过 4EBP1/eIF4E 轴调控相关蛋白质的合成,影响肿瘤的发生、发展。本研究结果证实 PP242 可联合 IM 下调 4EBP1、eIF4E 的磷酸化水平,从而抑制蛋白质的翻译^[12-16]。

综上,本研究证实 PP242 与 IM 联用通过抗细胞增殖及抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路的磷酸化表达,对 Ph⁺ ALL 细胞株 SUP-B15 有抗白血病作用。因此我们认为,酪氨酸激酶抑制剂联合 mTORC1/2 抑制剂也许可以成为治疗 Ph⁺ ALL 更有效的新方案。

参 考 文 献

- [1] TASIAN SK, TEACHEY DT, RHEINGOLD SR. Targeting the PI3K/mTOR pathway in pediatric hematologic malignancies. *Front Oncol*,2014(4):108. doi:10.3389/fonc.2014.00108.
- [2] KHARAS MG, DEANE JA, WONG S, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase signaling is essential for ABL oncogene-mediated transformation of B-lineage cells. *Blood*,2004,103(11):4268-4275.
- [3] GUERTIN DA, SABATINI DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal*,2009,2(67):pe24. doi:10.1126/scisignal.267pe24.
- [4] MOHI MG, BOULTON C, GU TL, *et al.* Combination of rapamycin and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2004,101(9):3130-3135.
- [5] BECKER MN, WU KJ, MARLOW LA, *et al.* The combination of an mTORC1/TORC2 inhibitor with lapatinib is synergistic in bladder cancer *in vitro*. *Urol Oncol*,2014,32(3):317-326.
- [6] CYBULSKI N, HALL MN. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci*,2009,34(12):620-627.
- [7] TABERNERO J, ROJO F, CALVO E, *et al.* Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*,2008,26(10):1603-1610.
- [8] ASNAGHI L, CALASTRETTI A, BEVILACQUA A, *et al.* Bcl-2 phosphorylation and apoptosis activated by damaged microtubules require mTOR and are regulated by Akt. *Oncogene*,2004,23(34):5781-5791. (下转第 229 页)

- [5] PROVENCIO JJ. Inflammation in subarachnoid hemorrhage and delayed deterioration associated with vasospasm: a review. *Acta Neurochir Suppl*, 2013, 115: 233-238.
- [6] WANG HC, YANG TM, LIN WC, *et al.* The value of serial plasma and cerebrospinal fluid nuclear and mitochondrial deoxyribonucleic acid levels in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 2013, 118(1): 13-19.
- [7] ZHANG Q, RAOOF M, CHEN Y, *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010, 464(7285): 104-107.
- [8] MALIK AN, SHAHNI R, RODRIGUEZ-DE-LEDESMA A, *et al.* Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412(1): 1-7.
- [9] YATSUSHIGE H, CALVERT JW, CAHILL J, *et al.* Limited role of inducible nitric oxide synthase in blood-brain barrier function after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurotrauma*, 2006, 23(12): 1874-1882.
- [10] GARG AD, NOWIS D, GOLAB J, *et al.* Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1805(1): 53-71.
- [11] LAM NY, RAINER TH, WONG LK, *et al.* Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. *Resuscitation*, 2006, 68(1): 71-78.
- [12] CAVELIER L, JOHANNISSON A, GYLLENSTEN U. Analysis of mtDNA copy number and composition of single mitochondrial particles using flow cytometry and PCR. *Exp Cell Res*, 2000, 259(1): 79-85.
- [13] ZHANG Q, ITAGAKI K, HAUSER CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock*, 2010, 34(1): 55-59.
- [14] WEST AP, SHADEL GS, GHOSH S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(6): 389-402.
- [15] WALKO TD 3rd, BOLA RA, HONG JD, *et al.* Cerebrospinal fluid mitochondrial DNA: a novel DAMP in pediatric traumatic brain injury. *Shock*, 2014, 41(6): 499-503.
- [16] DHAR R, DIRINGER MN. The burden of the systemic inflammatory response predicts vasospasm and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*, 2008, 8(3): 404-412.
- [17] WEST AP, KOBLANSKY AA, GHOSH S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22: 409-437 [2016-04-10]. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.115827>.
- [18] LEE SH, LEE JG, KIM JR, *et al.* Toll-like receptor 9-mediated cytosolic phospholipase A2 activation regulates expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364(4): 996-1001.
- [19] MA CX, YIN WN, CAI BW, *et al.* Toll-like receptor4/nuclear factor-kappa b signaling detected in brain after early subarachnoid hemorrhage. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(13): 1575-1581.

(2016-09-07 收稿, 2016-11-12 修回)

编辑 汤洁

(上接第220页)

- [9] HUGLE M, FULDA S. Dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor nvp-BEZ235 synergizes with chloroquine to induce apoptosis in embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer Lett*, 2015, 360(1): 1-9.
- [10] RODRIK-OUTMEZGUINE VS, CHANDARLAPATY S, PAGANO NC, *et al.* mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov*, 2011, 1(3): 248-259.
- [11] SONENBERG N, HINNEBUSCH AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 2009, 136(4): 731-745.
- [12] CHANG F, LEE JT, NAVOLANIC PM, *et al.* Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*, 2003, 17(3): 590-603.
- [13] LIU P, CHENG H, ROBERTS TM, *et al.* Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(8): 627-644.
- [14] TASIAN SK, TEACHEY DT, RHEINGOLD SR. Targeting the PI3K/mTOR pathway in pediatric hematologic malignancies. *Front Oncol*, 2014(4): 108 [2016-03-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4490482/>. doi:10.3389/fonc.2014.00108.
- [15] CHEN YL, LAW PY, LOH HH. Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. *Curr Med Chem Anti-cancer Agents*, 2005, 5(6): 575-589.
- [16] SCHOLL S, BONDEVA T, LIU Y, *et al.* Additive effects of PI3-kinase and MAPK activities on NB4 cell granulocyte differentiation: potential role of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006, 134(8): 861-872.

(2016-09-13 收稿, 2017-01-09 修回)

编辑 余琳