

血浆游离 mtDNA 及脑组织 TLR-9/MAPK 的表达在蛛网膜下腔出血中的意义^{*}

刘进平^{1,2}, 夏 勇^{1,2}, 李 进², 游 潮^{2△}

1. 四川省医学科学院·四川省人民医院 神经外科(成都 610072); 2. 四川大学华西医院 神经外科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨蛛网膜下腔出血(SAH)模型大鼠血浆中游离线粒体 DNA(mtDNA)的水平及脑组织中 Toll 样受体-9/丝裂原蛋白激酶(TLR-9/MAPK)的表达及意义。**方法** 将 40 只大鼠随机分为 SAH 组和假手术(Sham)组,每组 20 只。SAH 组采用血管内穿刺法建立 SD 大鼠 SAH 动物模型,Sham 组仅穿刺但不造成蛛网膜下腔出血。模型建立成功 24 h 后,采用荧光定量实时 PCR 检测大鼠外周血中血浆游离 mtDNA 的表达量;采用逆转录 PCR(RT-PCR)和免疫组化法分别检测大鼠脑组织中 TLR-9、P38 MAPK 的表达。**结果** SAH 组大鼠在建模 24 h 后血浆中游离 mtDNA 表达量高于 Sham 组($P<0.05$);RT-PCR 及免疫组化检测均显示脑组织中 TLR9、P38 MAPK 表达较 Sham 组增多($P<0.05$)。**结论** 血浆游离 mtDNA 与脑组织中 TLR-9/MAPK 的表达存在协同升高的现象,mtDNA 可能通过 TLR-9/MAPK 通路介导脑组织局部及全身性炎症反应的发生。

【关键词】 蛛网膜下腔出血 早期脑损伤 线粒体 DNA Toll 样受体 9 丝裂原蛋白激酶

Plasma Free mtDNA and Expression of TLR-9/MAPK in Brain Tissues of Rats with Subarachnoid Hemorrhage LIU Jin-ping^{1,2}, XIA Yong^{1,2}, LI Jin², YOU Chao^{2△}. 1. Department of Neurosurgery, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 2. Department of Neurosurgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: youchao_hx@163.com

【Abstract】 Objective To determine the plasma level of mitochondrial DNA (mtDNA) and the expression of Toll like receptor-9/mitogen-activated protein kinase (TLR-9/MAPK) in the brain tissues of rats with subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** Sprague-Dawley rats were used to establish SAH models with a modified method of endovascular perforation. Twenty four hours after the establishment of the models, the plasma level of mtDNA in the rats was detected by real-time PCR; the expressions of TLR-9 and P38 MAPK in the brain tissues were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and immunohistochemical staining. Differences between the SAH ($n=20$) and sham-surgical ($n=20$) groups were compared. **Results** Rats in the SAH group had higher levels of plasma mtDNA and expressions of TLR-9 and P38 MAPK in brain tissues than those in the sham-surgical group ($P<0.05$). **Conclusion** Plasma free mtDNA and expressions of TLR-9/MAPK increase simultaneously in rats with SAH. mtDNA may induce system and local inflammation reactions in brain.

【Key words】 Subarachnoid hemorrhage (SAH) Early brain injury (EBI) Mitochondrial DNA (mtDNA) Toll like receptor-9 (TLR-9) Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

早期脑损伤(early brain injury, EBI)是指蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)发生 24 h 内对脑组织造成的一系列病理性损伤,是自发性 SAH 重要的病理生理机制^[1-3]。炎症反应是 EBI 的重要组成部分,可能是患者血管痉挛、糖代谢异常、急性肺损伤、电解质紊乱、体温调节功能障碍等一系列病理变化的基础^[4-5]。已有文献^[6]证实 SAH 患者发病后血浆和脑脊液中游离线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)的水平均升高,且

脑脊液中 mtDNA 的升高水平与预后相关。mtDNA 可以通过与 Toll 样受体-9 (Toll like receptor, TLR-9)结合激发机体的固有免疫反应,激活丝裂原蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、核因子- κ B(NF- κ B)等炎症反应的信号通路,导致促炎因子的大量释放^[7]。因此,我们推测 SAH 早期的炎症反应可能与 mtDNA 释放入血引起的急性免疫炎症反应有关。本实验通过血管内穿刺法建立 SD 大鼠 SAH 动物模型,检测血浆中的游离 mtDNA 含量、脑组织中 TLR-9 和 P38 MAPK 的表达情况,探讨 mtDNA、TLR-9/MAPK 信号通路在 SAH 早期脑损伤中的相关作用机制。

^{*} 四川省卫计委科技支撑计划(No. 140083)资助

△ 通信作者, E-mail: youchao_hx@163.com

1 材料与方法

1.1 研究对象

体质量 250~300 g 健康成年雄性 SD 大鼠 40 只。购自成都达硕实验动物有限公司,饲养于四川大学实验动物中心,采用架式笼养,饲养温度(20±2)℃,湿度 45%~55%,实验 SD 大鼠均可正常饮食,术前禁食禁水 6 h。

1.2 实验分组

将 40 只 SD 大鼠随机分为 SAH 组及假手术(Sham)组,各 20 只,实验过程中如有大鼠出现死亡则在 24 h 内递补。

1.3 SAH 动物模型的建立

SAH 组大鼠:①常规消毒手术器械及穿刺尼龙线;②10%的水合氯醛按体质量 0.35 mL/100 g 给予腹腔注射麻醉;③麻醉成功后,颈部备皮,取仰卧位,胶布固定四肢于显微操作台上。电热毯保温,维持体温于(37.5±0.5)℃;④75%酒精消毒颈手术区域,沿颈部正中中线剪开皮肤,逐层解剖,于右侧胸锁乳突肌稍上方钝性分离肌肉,显微镊仔细分离血管鞘膜,分离迷走神经,暴露右侧颈总动脉;⑤沿颈总动脉向上暴露颈内动脉和颈外动脉的分叉部。进一步充分暴露颈外动脉远端,用丝线双重结扎颈外动脉。于两根结扎线之间离断颈外动脉,保留近心端的结扎线,以备牵引之用;⑥血管夹临时夹闭颈总动脉及颈内动脉远心端,镊子牵引颈外动脉断端使之与颈内动脉呈一条直线;⑦于颈外动脉侧壁剪一小口,经小口向远心端插入直径 0.26 mm 的单股尼龙线,并向上推送入颈内动脉,直至进入深度距血管分叉部约 2.2 cm 处,感觉到突破感,停留数秒后拔除穿刺线,结扎颈外动脉松开颈内动脉近心端血管夹,恢复颈内动脉血供;⑧75%酒精消毒切口后,全层缝合皮肤。术毕。电热毯保温,至麻醉复苏后转至鼠笼中。开颅取脑时根据观察脑底部是否有蛛网膜下腔出血判定建模是否成功。Sham 组:步骤⑦当穿刺深度距血管分叉部 1.5 cm 时退出穿刺线,余操作步骤同前述。

1.4 标本制备

模型建立成功 24 h 后,采用 10%水合氯醛腹腔注射深度麻醉大鼠,迅速抽取大鼠心腔内血液 5 mL 注入 EDTA 抗凝采血管中,立即颠倒混匀。高速离心分离血浆后,-80℃冻存,用于血浆游离 mtDNA 检测。然后开颅完整取出大鼠脑组织,迅速放液氮罐中保存,用于 mRNA 检测。大鼠深度麻醉后经左

心室灌注生理盐水和体积分数为 4%多聚甲醛,取出脑组织后迅速放于 10%福尔马林固定液中,用于蛋白检测。

1.5 荧光定量实时 PCR(qRT-PCR)检测血浆游离 mtDNA

血浆标本解冻后按照天根生化科技(北京)有限公司微量样品基因组提取试剂盒(DP316)说明书中血浆游离 DNA 提取方法提取 DNA。实时荧光定量 PCR 按照 Promega 公司 GoTaq[®] qPCR Master Mix(A6001)操作说明书中 ABI PRISM[®] 7500 Fast Real-Time PCR System 部分进行操作。引物序列:mtDNA 上游 5'-CCCAACACAGGCGTGCTT-3',下游 5'-ACCGCGGCCGTTTAACTT-3';内参 GAPDH 上游 5'-ACCGCGGCCGTTTAACTT-3',下游 5'-CCTAGTCCCAGGGCTTTGATT-3'^[8]。以 GAPDH 作为内参,通过 7500 Software v2.3 分析软件得出 mtDNA 及内参 GAPDH 的 Ct 值,血浆游离 mtDNA 相对含量=2^{-ΔΔCt}。均检测 3 个复孔,采用取平均值的方式进行结果分析。

1.6 逆转录(RT)-PCR 检测 TLR-9、P38 MAPK mRNA 在大鼠脑组织中的表达

根据 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明提取大鼠脑组织总 RNA,逆转录成 cDNA。半定量 RT-PCR 检测脑组织中 TLR-9、P38 MAPK mRNA 的表达。引物设计根据 NCBI 的 GenBank 中提供的 Rattus norvegicus toll-like receptor 9 (TLR-9) mRNA 序列(NM_198131.1)、Rattus norvegicus mitogen activated protein kinase 1 (MAPK1) mRNA 序列(NM_053842.1)、Rattus norvegicus actin, beta (Actb) mRNA 序列(NCBI Reference Sequence: NM_031144.3)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。经过验证,引物序列:TLR-9 mRNA 上游 5'-CCCAACACAGGCGTGCTTTAAGGAAA-3',下游 5'-AACTTTAGTCACTGGGCAGGCAATGC-3',扩增片段长度为 281 bp;P38 MAPK mRNA 上游 5'-ATGAATGGCTAAACGAGG-3',下游 5'-TCCATAGGGTCTTCTCGT-3',扩增片段长度为 218 bp;内参 β-actin mRNA 上游 5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCC-3',下游 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'。使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件(Applied Biosystems 公司)分析 PCR 各检测样本的 CT 值。均检测 3 个复孔,采用取平均值的方式进行结果分析。

1.7 免疫组织化学检测 TLR-9、P38 MAPK 在大鼠脑组织中的表达

取左侧颞叶底面的脑组织切片。根据 ABCam 公司兔抗大鼠通用型免疫组化检测试剂盒说明书操作，一抗滴度 1：200，以 PBS 代替一抗作为阴性对照。采用 SP 法，DAB 显色。TLR-9、P38MAPK 阳性细胞为细胞浆着色，呈棕黄色或棕黑色。使用 Olympus DP25 全自动显微照相装置采集图像。每张切片先于 100 倍镜下观察全部组织，再根据组织大小及表达情况选取 10 个视野，400 倍镜下采集图像。采用美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的平均光密度。

1.8 统计学方法

各组数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 计算。两组间比较时光采用 Leven’s 检验判断两总体方差是否齐；若两组间方差齐，采用双尾 Student *t* 检验；若两组间方差不齐，则采用双尾 Mann-Whitney *U* 检验。率的比较采用 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血浆游离 mtDNA 表达量

通过实时荧光定量 PCR 的方法检测出 SAH 组大鼠血浆游离 mtDNA 相对表达量为 2.40 ±

0.37，Sham 组为 1.16 ± 0.15，SAH 组大鼠血浆游离 mtDNA 表达量高于 Sham 组，差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。

2.2 TLR-9、P38 MAPK mRNA 在大鼠脑组织中的表达量

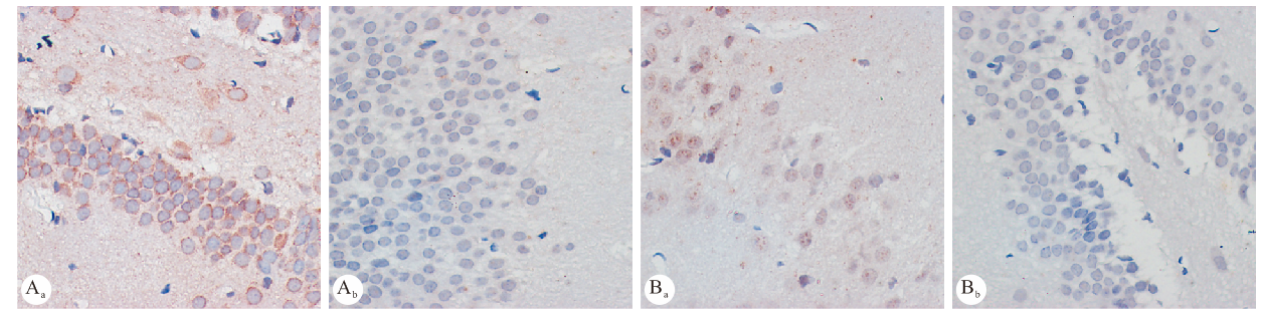
SAH 组大鼠脑组织中 TLR-9 mRNA 相对表达量为 2.92 ± 0.25，Sham 组为 1.12 ± 0.12；SAH 组大鼠脑组织中 P38 MAPK mRNA 相对表达量为 2.92 ± 0.25，Sham 组为 1.12 ± 0.12，SAH 组大鼠脑组织中 TLR-9 及 P38 MAPK mRNA 表达量均高于 Sham 组，差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。

2.3 TLR-9、P38 MAPK 蛋白在大鼠脑组织中的表达

见附表，附图。SAH 组大鼠颞叶脑组织中 TLR-9 及 P38 MAPK 广泛分布于神经元胞浆中。SAH 组大鼠 TLR-9、P38 MAPK 含量均较 Sham 组增高，差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。

附表 大鼠脑组织中 TLR-9、P38 MAPK 的蛋白表达
Table Protein expressions of TLR-9 and P38 MAPK in brain tissues of rats

Group	<i>n</i>	TLR-9	P38 MAPK
Sham	20	0.195 3 ± 0.008 7	0.223 7 ± 0.007 6
SAH	20	0.231 6 ± 0.010 0	0.242 6 ± 0.013 1
<i>P</i>		<0.01	<0.01



附图 TLR-9 (A)、P38 MAPK (B)在 SAH 组(a)及 Sham 组(b)中表达情况。SP × 400
Fig Proein expressions of TLR-9 (A) and P38 MAPK (B) in rats with SAH (a) and sham-surgical procedure (b). SP × 400

3 讨论

SAH 后的早期脑损伤所涉及的病理过程极为复杂，其中炎症反应发挥着重要的作用。有学者甚至认为，炎症伴随着 SAH 后的全过程，是脑水肿、血管痉挛等病理变化的基础之一^[3]。人类 SAH 后血管痉挛一般发生于 72 h 以后，而 SAH 实验大鼠发生血管痉挛的时间约为 48 h，故一般认为 SAH 后 24 h 的大鼠模型，可以反映 SAH 后早期脑损伤

的主要病理机制^[9]。SAH 发生后，固有免疫反应迅速被激活。最新研究证实，在非感染免疫中，内源性的损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 是创伤等导致的全身性炎症反应的主要机制。线粒体 DNA 由于和细菌 DNA 高度同源，是重要的 DAMPs 分子，可以诱导固有免疫反应，导致炎症反应的发生^[7]。因此，我们对血浆游离 mtDNA 及其下游信号传导通路进行了检测分析。

建模 24 h 后,本实验发现 SAH 组大鼠血浆中游离 mtDNA 的含量高于 Sham 组 ($P < 0.01$)。血浆中的游离 DNA,尤其是 mtDNA 含量增高的现象已经在创伤(包括颅脑外伤)、卒中、心肌梗塞、恶性肿瘤等多种疾病中报道,并且其增高的程度与患者的预后相关^[10-11]。与基因组 DNA 相比,每个细胞有多个 mtDNA 的拷贝,哺乳动物的细胞中可多达数千个^[12]。循环中 mtDNA 通过其特异性识别受体 TLR-9 而激活人多形核中性粒细胞等炎症反应细胞并促进炎症细胞因子的释放^[13]。由于线粒体广泛存在于轴突、神经末梢、树突内,因此一旦神经细胞损伤,线粒体的成分即释放到细胞外环境中^[14]。报道证实,儿童脑外伤患者血浆中的 mtDNA 在伤后第一天就明显升高,而且是预后不良的预测指标^[15]。由此,我们推测 SAH 后,一方面,血液中的白细胞直接进入脑脊液,被分解破坏;另一方面脑组织因缺血、损伤等导致细胞坏死、凋亡,均可导致细胞崩解,使 mtDNA 释放到细胞外环境,二者均可直接引起脑组织局部促炎因子的释放和中性粒细胞的聚集导致炎症反应的发生。此外,mtDNA 也可能随脑脊液的循环进入血液,或通过被破坏的血脑屏障而进入血液循环导致全身性炎症反应综合征(SIRS)的发生。文献报道,SAH 后 SIRS 的发生率高达 50% 以上,SIRS 的发生是预后不良的独立危险因素^[16]。由于大鼠脑脊液标本的取材困难,因此我们在实验中仅检测了血浆中游离 mtDNA 的水平。但是,已有文献报道 SAH 患者脑脊液中游离 mtDNA 的含量明显增加^[6],因此我们认为 mtDNA 可能通过其下游通路广泛参与全身性的炎症反应。研究表明 SAH 后,肺泡和间质内也可见大量中性粒细胞聚集,这可能是神经源性肺水肿的发病机制之一^[4]。

Toll 样受体是固有免疫模式识别的主要受体,可以识别不同来源的病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern,PAMP)激活天然免疫反应;Toll 样受体家族则是一大类 I 型跨膜蛋白受体。每一种 TLR 均可识别其特异性配体,TLR-9 识别非甲基化的富含磷酸胞苷酰(cytidylyl phosphate guanine, CpG)片段的细菌 DNA(mtDNA 与其高度同源)^[17]。TLR-9 与非甲基化的 CpG DNA 结合后通过依赖 MyD88 的信号传导通路可分别引起 NF- κ B 途径和 MAPK 途径的激活,从而导致促炎细胞因子如白介素及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等的大量释放、白细胞的聚集,引起天

然免疫系统的活化及炎症反应的发生^[18]。本实验发现,SAH 组大鼠脑组织中 TLR-9 mRNA 和蛋白的表达均明显增高。

Toll 样受体家族中多个成员参与 SAH 后炎症反应的信号传递,我们在前期实验中已经证实了 TLR-4 和 NF- κ B 参与了炎症反应的病理过程^[19]。但是对于该通路激活的机制,至今尚未明确。因此,我们考虑 MAPK 和 NF- κ B 同样作为 TLR 下游的信号分子,MAPK 途径可能也参与了这一病理过程。MAPK 是一种细胞内的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是重要的第二信使。它可将细胞外的刺激信号向细胞内传递,从而广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡等过程。P38 为 MAPK 的一个亚型,为细胞应激反应蛋白激酶,可对不同类型的应激反应产生应答。我们在实验中发现 SAH 后 24 h,即出现了 P38 MAPK 表达的明显上调,而且与血浆中游离 mtDNA 以及 TLR-9 协同升高。因此,我们推测血浆及脑脊液中的游离 mtDNA 可能是导致 TLR-9 被激活的主要病理因素,后者通过上调 MAPK 信号通路,诱导炎症细胞的趋化和促炎细胞因子的释放,导致炎症反应的发生和发展。

综合本研究可以做出如下推论:SAH 发生后脑组织细胞损伤导致 mtDNA 的大量释放,一方面通过直接激活 TLR-9/P38 MAPK 通路导致脑组织局部炎症反应的发生;另一方面进入血浆中的游离 mtDNA 可能通过活化肺等其他组织中该通路(本实验同期进行的另一实验已证实大鼠肺组织中 TLR-9/P38 MAPK 表达明显升高,数据未发表)导致全身性的炎症反应。由于炎症反应是 SAH 后早期脑损伤病理机制的重要环节。抑制该通路可能为减轻早期脑损伤提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] CAHILL J, CALVERT JW, ZHANG JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cerebr Blood Flow Met*, 2006, 26(11): 1341-1353.
- [2] MACDONALD RL, PLUTA RM, ZHANG JH. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nat Clin Pract Neuro*, 2007, 3(5): 256-263.
- [3] DUMONT AS, DUMONT RJ, CHOW MM, *et al*. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. *Neurosurgery*, 2003, 53(1): 123-133.
- [4] MCGIRT MJ, MAVROPOULOS JC, MCGIRT LY, *et al*. Leukocytosis as an independent risk factor for cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*, 2003, 98(6): 1222-1226.

- [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 Let*, 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