

## 基于PI3K/Akt信号通路探讨乌梅丸含药血清对胰腺癌细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响

王熙<sup>1,2</sup>, 张莹雯<sup>1,3\*</sup>

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430061;

2. 武汉市中医医院, 武汉 430014; 3. 武汉大学中南医院, 武汉 430071)

**[摘要]** 目的:观察乌梅丸含药血清对人胰腺癌SW1990细胞增殖、侵袭、迁移和凋亡的影响,同时探讨其可能的作用机制。方法:制备乌梅丸含药血清,体外培养胰腺癌细胞株SW1990,采用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法筛选乌梅丸含药血清最佳作用时间用于后续实验;将SW1990细胞分为空白组和乌梅丸低、中、高组(含药血清2%、4%、8%),利用平板克隆实验、细胞划痕实验和细胞侵袭实验分别检测其克隆形成、迁移和侵袭能力;流式细胞术检测乌梅丸含药血清对胰腺癌SW1990细胞凋亡的影响;通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测SW1990细胞中凋亡相关蛋白,Bcl-2, Bcl-2相关X蛋白(Bax),细胞色素C(Cyt C),活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、cleaved Caspase-9,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路中PI3K,磷酸化(p)-PI3K, Akt,磷酸化(p)-Akt蛋白表达水平。结果:与空白组比较,作用72 h,乌梅丸低、中、高组吸光度A显著降低( $P<0.01$ ),与乌梅丸低组比较,乌梅丸中、高组A均显著降低( $P<0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组A显著降低( $P<0.01$ ),说明乌梅丸作用72 h可呈剂量依赖性抑制SW1990细胞增殖能力,药物最佳作用时间为72 h;与空白组比较,乌梅丸低、中、高组SW1990细胞侵袭能力显著减弱( $P<0.01$ ),且呈浓度依赖性;与空白组比较,乌梅丸低、中、高组细胞克隆形成能力、迁移能力均有下降( $P<0.05, P<0.01$ ),且呈浓度依赖性;与空白组比较,乌梅丸低、中、高组细胞的总凋亡率显著升高( $P<0.01$ ),乌梅丸诱导凋亡作用随给药剂量增加而增强;与空白组比较,乌梅丸低、中、高组Bcl-2蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, Cyt C, Bax蛋白表达升高( $P<0.05, P<0.01$ ),且呈现出一定的量效关系;与空白组比较,乌梅丸低、中、高组p-PI3K, p-Akt蛋白表达均有减少( $P<0.05, P<0.01$ ),且随着剂量的增加,蛋白表达逐渐降低, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt明显降低( $P<0.05, P<0.01$ ),且随着剂量的增加,比值逐渐降低。结论:乌梅丸能明显抑制胰腺癌SW1990细胞的恶性生物学行为,诱导细胞凋亡,其机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路,下调PI3K/Akt通路中的蛋白磷酸化水平有关。

**[关键词]** 乌梅丸含药血清;胰腺癌;增殖;侵袭;转移;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0034-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220529

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211228.0930.001.html>

**[网络出版日期]** 2021-12-28 14:38

### Effect of Wumeiwan-medicated Serum on Proliferation, Invasion, Migration, Apoptosis of Pancreatic Cancer Cells Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

WANG Xi<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying-wen<sup>1,3\*</sup>

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China; 2. Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430014, China; 3. Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**[Abstract] Objective:** To observe the effects of Wumeiwan-medicated serum on the proliferation,

**[收稿日期]** 2021-11-13

**[基金项目]** 湖北省卫健委中医科研项目(ZY2019M072);武汉市卫健委面上重点科研项目(WZ21A09);武汉市卫健委中青年医学骨干人才培养工程(武卫通[2020]55号)

**[第一作者]** 王熙,在读博士,主治医师,从事中西医结合防治恶性肿瘤研究,E-mail:5330992@qq.com

**[通信作者]** \*张莹雯,博士,博士生导师,主任医师,从事中西医结合防治肿瘤研究,E-mail:hhao3838@sina.com

invasion, migration, and apoptosis of human pancreatic cancer SW1990 cells and explore the underlying mechanism. **Method:** The Wumeiwan-medicated serum was prepared and the pancreatic cancer SW1990 cell line was cultured *in vitro*. The optimal time of Wumeiwan-medicated serum was selected for subsequent experiments by cell counting kit-8 (CCK-8). SW1990 cells were divided into a control group and low- (2%), medium- (4%), and high-dose (8%) Wumeiwan-medicated serum groups. The colony-forming, migration, and invasion abilities were detected by clonogenic assay, wound healing assay, and transwell migration assay. Flow cytometry was used to detect the effect of Wumeiwan-medicated serum on the apoptosis of pancreatic cancer SW1990 cells. Western blot was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins, such as B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cytochrome C (Cyt C), cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3 (cleaved Caspase-3), cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-9 (cleaved Caspase-9), as well as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (Akt), and phosphorylated Akt (p-Akt) in PI3K/Akt pathway in SW1990 cells. **Result:** Compared with blank group, Wumeiwan groups showed decreased absorbance (*A*) 72 h after drug intervention ( $P < 0.01$ ). Compared with the low-dose group, the medium- and high-dose groups showed decreased *A* ( $P < 0.01$ ). Compared with the medium-dose group, the high-dose group showed decreased *A* ( $P < 0.01$ ). It indicates that Wumeiwan can inhibit SW1990 cell proliferation in a dose-dependent manner after 72 h, and the optimal action time is 72 h. Compared with the blank group, the Wumeiwan groups showed weakened invasion of SW1990 cells ( $P < 0.01$ ), reduced colony-forming and migration abilities ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in a dose-dependent manner, and increased total apoptosis rates ( $P < 0.01$ ). The inducing effect of Wumeiwan on apoptosis increased with the increase in dosage. Compared with the blank group, the Wumeiwan groups showed decreased protein expression of Bcl-2 ( $P < 0.01$ ), increased protein expression of cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-9, Cyt C, and Bax ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in a certain dose-effect relationship, reduced protein expression of p-PI3K and p-Akt ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) with the increase in dosage, and declining p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) with the increase in dosage. **Conclusion:** Wumeiwan-medicated serum can significantly inhibit the malignant biological behaviors of pancreatic cancer SW1990 cells and induce apoptosis. The mechanism may be related to the inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway and down-regulation of protein phosphorylation level in the PI3K/Akt signaling pathway.

**[Keywords]** Wumeiwan-medicated serum; pancreatic cancer; proliferation; invasion; metastasis; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway

胰腺癌是临床常见的消化道肿瘤之一,由于其缺乏早期特异性症状,进展迅速,手术切除率低,因此5年生存率极低<sup>[1]</sup>。尽管近年来对于胰腺癌的化疗、免疫治疗、靶向治疗方面均有一定进展,但其预后仍然较差<sup>[2]</sup>。因此,如何提高临床治疗胰腺癌的疗效,延缓病情发展,延长胰腺癌患者的生存期,改善其生活质量有着重大意义。中医药能明显改善胰腺癌的生存期,通过调控相关通路介导的基因,抑制胰腺癌细胞增殖分化可能是其重要机制<sup>[3]</sup>。胰腺癌常见的首发症状包括上腹疼痛、饱胀不适,纳差、乏力、腹泻等均符合中医厥阴病主证,经方乌梅丸出自《伤寒论》厥阴病篇,为厥阴病的主方,方中乌梅酸温安蛔,涩肠止痢,为君药。蜀椒、细辛性味辛温,辛可伏蛔,温能祛寒并用,共为臣药。附子、干姜、桂枝温脏祛寒,人参、当归补气养血,黄

连、黄柏清热燥湿共为佐药。全方共奏缓肝调中,清上温下之功。研究表明乌梅丸能明显减轻胰腺癌患者疼痛症状,改善中医证候评分,提高生活质量<sup>[4]</sup>,其组方中的有效成分鞣质、山柰酚、肉桂醛等均具有抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>,笔者前期研究亦证明乌梅丸含药血清能抑制胰腺癌 SW1990 细胞增殖,抑制肿瘤细胞糖酵解<sup>[6]</sup>,但其机制并未完全阐明。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路能显著促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力、抑制细胞凋亡<sup>[7]</sup>,网络药理学研究发现该通路有可能是乌梅丸对胰腺肿瘤的抗癌作用的两个主要通路之一<sup>[8]</sup>。综合以上研究,乌梅丸治疗胰腺癌的潜在机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。基于此,本实验将通过体外实验观察乌梅丸含药血清对胰腺癌细胞恶性生物学行为的影响,并探讨其机制是否与 PI3K/

Akt信号通路有关。

## 1 材料

**1.1 动物和细胞** 健康SD大鼠16只,雄性,SPF级,体质量180~200 g,购于三峡大学,合格证号SCXK(鄂)2017-0012。本实验获得武汉市中医院伦理委员会通过,伦理审批号武中医伦DW2019-001。人胰腺癌细胞SW1990购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,目录号为TCHu201,由武汉大学中南医院医学科学研究中心常规培养及传代,已传至6代。

**1.2 试剂及药物** RPMI 1640培养基、胰蛋白酶(武汉Procell公司,批号分别为PM150110, PB180225),胎牛血清(上海Excell Bio公司,批号FSP500),青霉素-链霉素(美国Gibco公司,批号15070-063),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、Annexin V/7-氨基放线菌素D(7-AAD)荧光双染细胞凋亡试剂盒(武汉Elabscience公司,批号分别为E-CK-A362、E-CK-A218),matrigel基底膜胶(美国Corning公司,批号356234),结晶紫(上海Biosharp公司,批号70120050),蛋白裂解液RIPA Lysis Buffer、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B、P0010),胞浆核蛋白提取试剂盒(南京凯基生物有限公司,批号KGP150),兔多抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(杭州贤至生物有限公司,批号AB-P-R001),兔多抗蛋白B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),兔多抗磷酸化(p)-Akt(美国Affinity公司,批号分别为AF6139、AF0016),兔多抗Bcl-2相关X蛋白(Bax)、小鼠单抗活化的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3)、小鼠单抗活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-9(cleaved Caspase-9)、兔多抗细胞色素C(Cyt C)、兔多抗Akt(武汉三鹰生物有限公司,批号分别为50599-2-Ig、66470-2-Ig、66169-1-Ig、10993-1-AP、10176-2-AP),兔单抗PI3K(美国CST公司,批号4257),兔多抗磷酸化(p)-PI3K(美国Abcam公司,批号ab182651),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗、HRP标记羊抗小鼠二抗(武汉博士德公司,批号分别为BA1054、BA1051),ECL底物液(北京普利莱,批号P1050)。乌梅丸(云南腾药制药股份有限公司,国药准字Z53020389,批号20201243,规格3 g/丸)成人用量为18 g·d<sup>-1</sup>,成人体质量按60 kg计算,大鼠灌胃剂量等效约为人体10倍<sup>[9]</sup>,因此换算为小鼠每天灌胃剂量为3 g·kg<sup>-1</sup>。

**1.3 仪器** 5702R型低速离心机(德国Eppendorf

公司),MCO-15AC型CO<sub>2</sub>恒温培养箱(日本Sanyo公司),ECLIPSE Ts2型倒置显微镜(日本Nikon公司),SW-CJ-1FD型超净工作台(苏州集团安泰空气技术有限公司),Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo公司),Transwell小室(美国Corning公司);FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司),DYY-7C型电泳仪、DYCZ-40型电转仪(北京六一仪器厂),GelDocXR型凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清的制备** 饲养条件:笼中饲养,明暗环境各12 h,室温20~25 °C,相对湿度50%~60%。随机数字法将其分为2组,即含药血清组和空白组,每组8只,含药血清组按照3 g·kg<sup>-1</sup>给药,药物以生理盐水稀释后按10 mL·kg<sup>-1</sup>每日给大鼠灌胃,空白组灌胃等体积生理盐水。每日分早、晚2次给药,间隔时间为8 h,连续灌胃给药3 d。于第4天强制禁食不禁水15 h,各组大鼠灌胃全天剂量1 h,以10%水合氯醛3.3 mL·kg<sup>-1</sup>腹腔注射麻醉,于腹主动脉采血。室温下静置2 h,于离心机4 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(离心半径5.96 cm,下同),分离并收集各组血清,即含药血清与空白血清。同组血清分别合并混匀后,在56 °C水浴条件下灭活30 min。在超净台无菌条件,进行0.22 μm无菌微孔滤膜过滤,置于-20 °C冰箱保存备用。

**2.2 细胞培养** SW1990细胞培养于含10%胎牛血清,1%青链霉素的RPMI 1640培养液中,置于含5%CO<sub>2</sub>,37 °C细胞培养箱中培养,每2~3 d换液1次。细胞单层贴壁生长,至70%~80%融合时胰蛋白酶消化传代。取对数生长期细胞用于后续实验。

**2.3 分组及给药** 乌梅丸低组(2%乌梅丸含药血清+8%空白血清+RPMI 1640培养基)、乌梅丸中组(4%乌梅丸含药血清+6%空白血清+RPMI 1640培养基)、乌梅丸高组(8%乌梅丸含药血清+2%空白血清+RPMI 1640培养基)、空白组(10%空白血清+RPMI 1640培养基)。将SW1990细胞在无血清培养基中培养2 h,再使用各组药液处理。

**2.4 CCK-8法检测细胞增殖** 取对数生长期的SW1990胰腺癌细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2遍,胰酶消化后计数,调整细胞密度为5×10<sup>3</sup>个/孔,每孔100 μL接种于96孔板,37 °C,5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h后弃上清。按2.3项下分组方法处理,同时设置仅有培养液无肿瘤细胞溶剂组,每组3个复孔,培养24、48、72 h终止培养,培养至所需时间

后,每孔加入CCK-8试剂10 μL,37 °C培养3 h,应用酶标仪于450 nm波长处检测各孔吸光度 $A$ ,计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率= $(A_{\text{空白血清}} - A_{\text{含药血清}}) / (A_{\text{空白血清}} - A_{\text{溶剂}}) \times 100\%$ 。

**2.5 Transwell 法检测细胞侵袭能力** 胰酶消化后计数,用无血清RPMI 1640培养基重悬细胞,调整细胞密度为 $3 \times 10^5$ 个/mL,向预先用matrigel胶包被的Transwell上室中缓慢均匀滴入细胞悬液200 μL,贴壁后按2.3项分组方法处理各组细胞,下室加入含10%胎牛血清RPMI 1640培养基600 μL,使得液面浸没上室下缘,培养72 h。取出上室,用PBS清洗上室,并用棉签刮除matrigel胶,使用4%多聚甲醛固定,用0.5%结晶紫染色,室温中放20 min, PBS清洗,用干净的棉球将上室一侧的未迁移的细胞擦干净,显微镜下拍照,每孔随机选取3个视野,细胞计数,比较各组细胞侵袭能力,细胞侵袭率=给药组侵袭细胞数/空白组侵袭细胞数 $\times 100\%$ 。

**2.6 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力** 将SW1990细胞制备细胞悬液,按200个/孔接种于6孔板按,按2.3项分组方法分别处理各组细胞,常规培养72 h后弃去原培养基,PBS清洗后加入10%胎牛血清(FBS)培养基,置于37 °C,5%CO<sub>2</sub>的培养箱中继续培养2~3周。当出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃上清,用PBS浸洗2次,经4%中性甲醇固定,0.5%结晶紫染色后,PBS洗去染料,在室温下干燥。倒置显微镜观察超过50个细胞的细胞克隆。独立重复实验3次。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ ,克隆抑制率=(空白组克隆形成率-给药组克隆形成率)/空白组克隆形成率 $\times 100\%$ 。

**2.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力** 用马克笔在6孔板背后划出对称横线,取处于对数生长期状态良好的SW1990细胞,以 $5 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板,37 °C,5%CO<sub>2</sub>饱和湿度条件培养过夜,待细胞长至90%左右,在每孔板中间用1 mL枪头划痕,保证枪头垂直于背后横线进行划痕,使各孔的细胞划痕宽度基本一致,PBS漂洗3次去除细胞碎片。根据2.3项分组,在各组孔板加入相应药液处理,置于37 °C,5%CO<sub>2</sub>继续培养,间隔72 h观察细胞迁移情况,选取0、72 h进行拍照记录。用Image J图形软件测量划痕距离,每孔随机取3个位点,根据划痕宽度判断细胞的生长运动能力。细胞划痕愈合率=(0 h划痕宽度-72 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times 100\%$ 。

**2.8 应用Annexin V-APC/7-AAD凋亡试剂盒检测细胞凋亡** 按2.3项分组方法处理各组SW1990细

胞72 h,按凋亡试剂盒说明书操作,用不含EDTA的胰酶消化细胞,收集细胞沉淀,重悬细胞,先后加入7AAD染料5 μL和Annexin V-APC染料1 μL,孵育,上机检测存活、早期凋亡、晚期凋亡和死亡细胞百分比。独立实验重复3次。

**2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达水平** 将SW1990细胞分别使用2.3项分组的药液处理72 h,收集各组细胞,加入RIPA蛋白裂解液100 μL于各组中。冰浴20 min,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,提取细胞蛋白,取上层清液,定量其蛋白浓度。依据定量结果使用缓冲液调整蛋白浓度,95 °C加热5 min使蛋白变性。分离各蛋白,通过湿转法将分离的蛋白转移致PVDF膜上,按滤膜面积加入含5%脱脂奶粉的tris缓冲液封闭,密封4 °C过夜。将过夜后的膜用PBS洗膜15 min,3次,加入Bax(1:5 000),Caspase-3、Cyt C、Akt(1:2 000),GAPDH、Bcl-2、Caspase-9、PI3K、p-PI3K、p-Akt(1:1 000),4 °C过夜孵育。弃一抗液,洗膜15 min,加入相应的HRP标记二抗,25 °C摇动孵育1 h。洗膜15 min,3次后,再加入ECL发光液显影,X光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影,冲洗胶片。晾干胶片,扫描胶片,用BandScan分析胶片灰度值。本实验以GAPDH条带作为内参。通过测量各蛋白条带与内参蛋白条带的灰度比来反映各蛋白质的相对表达水平。独立重复实验3次。

**2.10 统计学方法** 采用SPSS 24.0软件处理数据,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较,当数据满足正态分布及各组方差齐时,使用单因素方差分析,不满足正态分布或方差齐性时,应用多个独立样本比较的秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 乌梅丸含药血清对SW1990细胞增殖的影响

干预SW1990细胞24 h,与空白组比较,乌梅丸高组 $A$ 明显降低( $P < 0.05$ );干预48、72 h,与空白组比较,乌梅丸低、中、高组 $A$ 明显降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),干预72 h,与乌梅丸低组比较,乌梅丸中、高组 $A$ 均显著降低( $P < 0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组 $A$ 显著降低( $P < 0.01$ ),说明干预72 h后 $A$ 呈浓度依赖性降低,乌梅丸抑制细胞增殖作用随含药血清浓度增加逐渐增强,因此后续实验选取72 h作为干预时间。见表1。

**3.2 乌梅丸含药血清对SW1990细胞侵袭能力的影响** 与空白组比较,乌梅丸低、中、高组侵袭数减少( $P < 0.01$ ),与乌梅丸低组比较,乌梅丸中、高组侵

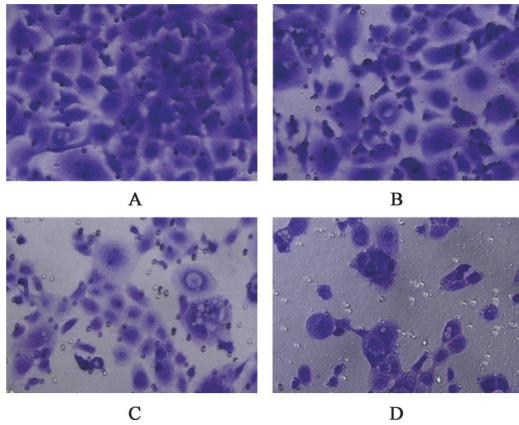
表1 乌梅丸含药血清对SW1990细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=11$ )

Table 1 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on proliferation of SW1990 cells ( $\bar{x}\pm s, n=11$ )

组别	体积分数/%	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白组		0.66±0.18	-	0.94±0.41	-	1.24±0.65	-
乌梅丸低组	2	0.63±0.36	7.13±5.17	0.86±0.28 <sup>1)</sup>	9.73±3.70	1.10±0.46 <sup>2)</sup>	12.57±4.56
乌梅丸中组	4	0.60±0.20	11.53±6.31	0.80±0.40 <sup>2)</sup>	17.87±6.04	0.96±0.39 <sup>2,3)</sup>	25.53±8.75
乌梅丸高组	8	0.54±0.34 <sup>1,3)</sup>	23.93±6.96	0.70±0.29 <sup>2,3,4)</sup>	29.50±6.01	0.84±0.37 <sup>2,3,4)</sup>	36.43±6.35

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与乌梅丸低组比较<sup>3)</sup> $P<0.01$ ;与乌梅丸中组比较<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表2-表3同)

侵袭数均减少( $P<0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组侵袭数显著减少( $P<0.01$ ),说明随着乌梅丸剂量的增加,细胞侵袭能力逐渐减弱。见图1和表2。



注:A.空白组;B-D.乌梅丸低、中、高组(图2-图6同)

图1 乌梅丸含药血清对SW1990细胞侵袭能力的影响(结晶紫,×200)

Fig. 1 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on invasion of SW1990 cell (crystal violet, × 200)

**3.3 乌梅丸含药血清对SW1990细胞克隆形成能力的影响** 与空白组比较,乌梅丸低、中、高组克隆形成数均明显减少( $P<0.05, P<0.01$ ),与乌梅丸低组比较,乌梅丸中、高组克隆形成数均显著减少( $P<0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组克隆形成数显著减少( $P<0.01$ ),说明随着乌梅丸剂量的增加,细

胞集落形成能力逐渐减弱。见图2和表2。

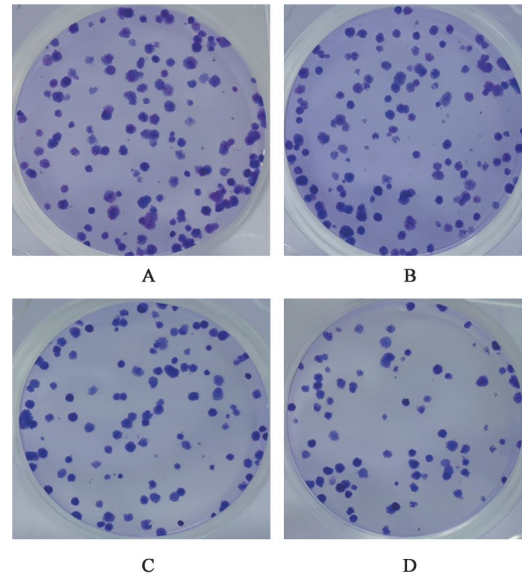


图2 乌梅丸含药血清对SW1990细胞克隆形成能力的影响(结晶紫)

Fig. 2 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on clone formation of SW1990 cell (crystal violet)

**3.4 乌梅丸含药血清对SW1990细胞迁移能力的影响** 与空白组比较,乌梅丸低、中、高组迁移距离均减小( $P<0.05, P<0.01$ ),与乌梅丸低组比较,乌梅丸中、高组划痕距离均减小( $P<0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组划痕距离减小( $P<0.01$ ),说明随着乌梅丸剂量增加,细胞迁移能力减弱。见图3和表2。

表2 乌梅丸含药血清对SW1990细胞侵袭、克隆形成及迁移能力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on invasion, clone formation and migration of SW1990 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	侵袭细胞数/个	侵袭率/%	克隆形成数/个	克隆形成率/%	划痕距离/mm	划痕愈合率/%
空白组		94.00±3.61	-	142.00±9.17	-	0.43±0.21	-
乌梅丸低组	2	84.33±3.51 <sup>2)</sup>	89.71±1.18	126.33±3.06 <sup>1)</sup>	63.67±1.53	0.38±0.09 <sup>1)</sup>	41.11±2.89
乌梅丸中组	4	72.00±3.46 <sup>2,3)</sup>	76.60±2.55	102.67±7.57 <sup>2,3)</sup>	51.33±3.79	0.31±0.10 <sup>2,3)</sup>	33.28±1.93
乌梅丸高组	8	53.67±2.68 <sup>2,3,4)</sup>	57.10±1.13	69.33±4.51 <sup>2,3,4)</sup>	35.00±2.00	0.17±0.24 <sup>2,3,4)</sup>	19.37±2.52

**3.5 乌梅丸含药血清对SW1990细胞凋亡的影响** 与空白组比较,处理72 h,乌梅丸低、中、高组细胞

的总凋亡率显著升高( $P<0.01$ );与乌梅丸低组比较,乌梅丸中、高组总凋亡率均显著升高( $P<0.01$ );与乌

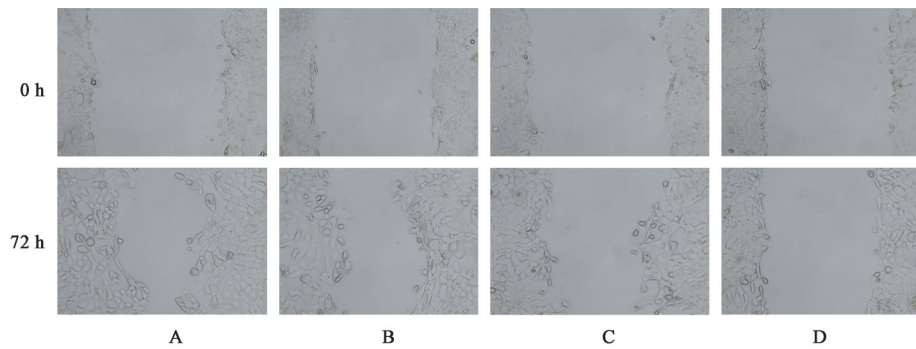


图3 乌梅丸含药血清对SW1990细胞迁移能力的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 3 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on migration of SW1990 cell (inverted microscope, × 100)

梅丸中组比较,乌梅丸高组总凋亡率显著升高( $P < 0.01$ ),说明随着乌梅丸剂量增加,其诱导细胞凋亡的作用逐渐增强。见表3。

表3 乌梅丸含药血清对SW1990细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on apoptosis rate of SW1990 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

组别	体积分数/%	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
空白组		2.51±1.31	3.09±0.65	5.60±1.01
乌梅丸低组	2	4.05±1.92	7.29±1.25 <sup>2)</sup>	11.34±2.04 <sup>2)</sup>
乌梅丸中组	4	9.76±2.07 <sup>2,3)</sup>	7.14±0.90 <sup>2)</sup>	16.90±1.73 <sup>2,3)</sup>
乌梅丸高组	8	13.39±0.41 <sup>2,3)</sup>	12.89±0.60 <sup>2,3,4)</sup>	26.27±0.73 <sup>2,3,4)</sup>

3.6 乌梅丸含药血清对SW1990细胞对凋亡相关蛋白表达的影响 分处理SW1990细胞72h,与空白组比较,乌梅丸低、中、高组抑凋亡蛋白Bcl-2表达均显著降低( $P < 0.01$ ),与乌梅丸低组比较,乌梅丸中、高组Bcl-2蛋白表达均降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组Bcl-2蛋白表达降低( $P < 0.01$ );与空白组比较,乌梅丸低、中、高组促凋亡蛋白cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Cyt C、Bax表达均升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),与乌梅丸低组比

表4 乌梅丸含药血清对凋亡相关蛋白相对表达量的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on relative expression of apoptosis related proteins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	Bax /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH	cleaved Caspase-9 /GAPDH	cleaved Caspase-3 /GAPDH	Cyt C /GAPDH
空白组		0.34±0.38	0.78±0.50	0.05±0.01	0.06±0.14	0.22±0.60
乌梅丸低组	2	0.45±0.16 <sup>2)</sup>	0.60±0.16 <sup>2)</sup>	0.10±0.01 <sup>1)</sup>	0.13±0.27 <sup>2)</sup>	0.36±0.41 <sup>2)</sup>
乌梅丸中组	4	0.60±0.07 <sup>2,4)</sup>	0.51±0.35 <sup>2,3)</sup>	0.17±0.15 <sup>2,4)</sup>	0.23±0.11 <sup>2,4)</sup>	0.53±0.38 <sup>2,4)</sup>
乌梅丸高组	8	0.70±0.33 <sup>2,4,5)</sup>	0.34±0.15 <sup>2,4,5)</sup>	0.36±0.27 <sup>2,4,5)</sup>	0.36±0.11 <sup>2,4,5)</sup>	0.75±0.50 <sup>2,4,5)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05, ^2)P < 0.01$ ;与乌梅丸低组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05, ^4)P < 0.01$ ;与乌梅丸中组比较<sup>5)</sup> $P < 0.01$ (表5同)

3.7 乌梅丸含药血清对SW1990细胞PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,各含药血清组p-PI3K蛋白表达均降低( $P < 0.01$ ),与乌梅

丸中组比较,乌梅丸中、高组cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Cyt C、Bax表达均升高( $P < 0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Cyt C、Bax表达均显著升高( $P < 0.01$ ),说明乌梅丸作用72hSW1990细胞抑凋亡相关蛋白表达呈浓度依赖性递减,而促凋亡相关蛋白表达呈浓度依赖性递增。见图4和表4。

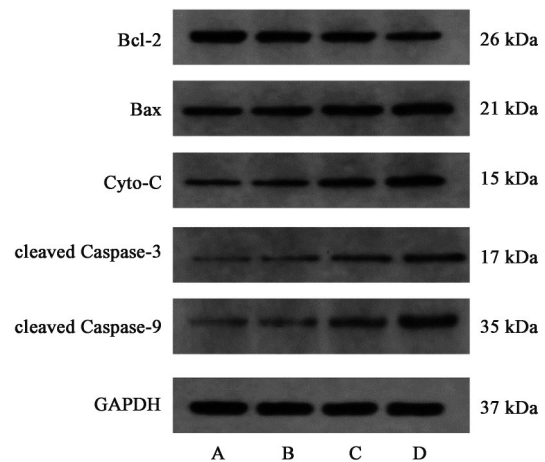


图4 乌梅丸含药血清处理SW1990细胞72h凋亡相关蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of apoptosis related proteins in SW1990 cells treated with Wumeiwan drug-containing serum for 72 h

丸低组比较,乌梅丸中、高组p-PI3K蛋白表达均降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),与乌梅丸中组比较,乌梅丸高组p-PI3K蛋白表达降低( $P < 0.01$ );与空白组比较,

乌梅丸低、中、高组 p-Akt 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 与乌梅丸低组比较, 乌梅丸中、高组 p-Akt 蛋白表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 与乌梅丸中组比较, 乌梅丸高组 p-Akt 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与空白组比较, 乌梅丸低、中、高组 p-PI3K/PI3K 显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 与乌梅丸低组比较, 乌梅丸中、高组 p-PI3K/PI3K 均显著降低 ( $P <$

0.05,  $P < 0.01$ ), 与乌梅丸中组比较, 乌梅丸高组 p-PI3K/PI3K 显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与空白组比较, p-Akt/Akt 均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 与乌梅丸低组比较, 乌梅丸中、高组 p-Akt/Akt 均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 与乌梅丸中组比较, 乌梅丸高组 p-Akt/Akt 显著降低 ( $P < 0.01$ )。表明乌梅丸可呈浓度依赖性下调 p-PI3K、p-Akt 水平。见表 5 和图 5。

表 5 乌梅丸含药血清对 SW1990 细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of Wumeiwan drug-containing serum on expression of PI3K / Akt pathway related proteins in SW1990 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	体积分数/%	PI3K/GAPDH	p-PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
空白组		0.67±0.38	0.55±0.46	0.72±0.13	0.48±0.28	0.83±0.11	0.67±0.47
乌梅丸低组	2	0.67±0.51	0.43±0.39 <sup>2)</sup>	0.73±0.71	0.41±0.24 <sup>1)</sup>	0.65±0.25 <sup>1)</sup>	0.57±0.28 <sup>2)</sup>
乌梅丸中组	4	0.66±0.76	0.36±0.30 <sup>2,3)</sup>	0.72±0.46	0.26±0.45 <sup>2,4)</sup>	0.55±0.11 <sup>2,3)</sup>	0.36±0.43 <sup>2,4)</sup>
乌梅丸高组	8	0.63±0.47	0.18±0.39 <sup>2,4,5)</sup>	0.72±0.26	0.11±0.18 <sup>2,4,5)</sup>	0.29±0.94 <sup>2,4,5)</sup>	0.15±0.21 <sup>2,4,5)</sup>

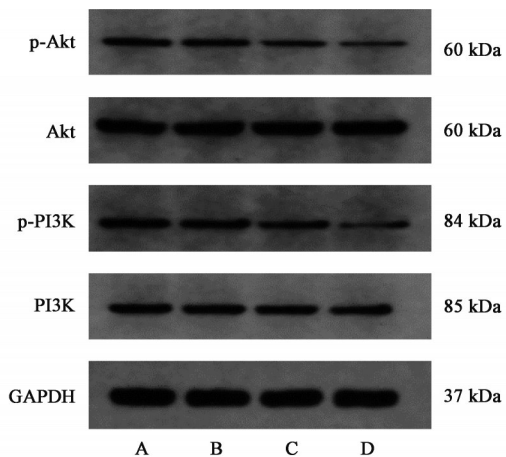


图 5 乌梅丸含药血清处理 SW1990 细胞 72h 后 PI3K/Akt 通路相关蛋白电泳

Fig. 5 Electrophoresis of PI3K/Akt pathway related proteins in SW1990 cells treated with Wumeiwan drug-containing serum for 72 hours

#### 4 讨论

中药复方是建立在中药君臣佐使配伍原则基础上的组方,具有多层次、多靶点、多环节的综合调控优势,可通过抑制肿瘤细胞增殖,调控细胞周期,诱导细胞凋亡、自噬,抑制肿瘤转移等多种途径发挥抗肿瘤作用,能明显改善肿瘤患者生活质量,延长肿瘤患者生存期<sup>[10]</sup>。但由于中药复方化学成分复杂,受干扰因素多等原因,导致针对其研究进展缓慢,国际认可程度较低。血清药理学克服了中药直接进行体外实验的不利因素,使反应体系更接近于体内环境,客观地模拟了药物与机体的相互作用过程,体现药物与机体相互作用的真实过程,可更深入地揭示药物作用机制,使结果具有真实性和科

学性,近年来在中药抗肿瘤研究领域广泛应用,取得了很大的进展<sup>[11]</sup>。

乌梅丸为《伤寒论》厥阴病篇的主方,主治寒热错杂,上热下寒证,原书中主“蛔厥”,又“主久利”,因此后世方剂学将其归为驱虫类方,然而清代伤寒名家柯琴提出:“乌梅丸为厥阴病之主方,非只为蛔厥专剂矣。”有医家依据“主久利”条文将乌梅丸应用于治疗溃疡性结肠炎、放射性结肠炎、免疫相关性肠炎等肠道炎症性疾病<sup>[12-14]</sup>,近年来在肿瘤领域的诸多探索研究也同样引人关注。体内实验研究发现,乌梅丸可通过抑制凋亡相关的多个蛋白、逆转上皮间质化控制肿瘤的生长与转移,降低恶病质介导因素的细胞因子从而改善肿瘤恶病质,并且在临床应用上也能发挥减毒增效、调节免疫、改善临床症状的作用<sup>[15]</sup>。现代药理研究证实,乌梅丸中的主要活性成分槲皮素、芝麻素、山柰酚等均具有抗肿瘤活性<sup>[16]</sup>。从开阖枢角度来看厥阴主阖,主阴气消潜阳气升复<sup>[17]</sup>,厥阴为病则阴之消潜收敛不足可致阴成形太过,故而生长失序形成“死肌”“恶肉”之物,脏腑阳气升发不足,痰瘀毒等病理产物内生,阳化气不足与阴成形太过相互影响,进一步加剧恶性肿瘤生长。乌梅丸则突出地体现了调理厥阴“阖机”的寓意,通过主药乌梅味酸而主阖,配黄连、黄柏以收纳阴气,干姜、细辛、当归、附子、川椒、桂枝辛温大热使阳气升复,共助厥阴阳复阴阖,从整体上恢复厥阴阖机。也有学者根据内经“厥阴之上,风气主之”理论及肿瘤转移“内风”学说,推断恶性肿瘤侵袭转移的相关病机为厥阴风动挟痰瘀毒流窜<sup>[18]</sup>。

胰腺癌最主要恶性生物学特性就是易发生侵袭和转移,因此临床上发生血液及淋巴转移较早<sup>[19]</sup>,寻找其具体的分子机制,制定有效的治疗策略有可能改善现有的治疗效果。本研究采用CCK-8法验证了乌梅丸含药血清对胰腺癌细胞增殖的抑制作用,结果表明胰腺癌SW1900细胞经乌梅丸含药血清干预72 h,可呈浓度依赖性抑制肿瘤细胞的活力,故后续实验均选取72 h作为实验的标准。细胞克隆实验、细胞划痕实验、Transwell实验表明,与空白组比较,随着乌梅丸含药血清浓度增加,细胞增殖、迁移、侵袭能力逐渐降低,并呈现一定的剂量依赖性,提示乌梅丸含药血清可呈剂量依赖性抑制胰腺癌细胞恶性生物学行为。

细胞凋亡,也被称作细胞程序性死亡,是细胞因受到某些特定信号通路刺激,而发生的一系列生理应答反应<sup>[20]</sup>。凋亡主要分为内源性和外源性两大途径,内源性途径也叫线粒体通路,主要由Bcl-2家族通过调节线粒体外膜的通透性实现。Bcl-2家族包含促凋亡蛋白及抗凋亡蛋白两大类,Bax属于抗凋亡蛋白,Bcl-2则为促凋亡蛋白,二者处于动态平衡中,如抗凋亡蛋白增多,则容易抑制细胞凋亡,反之亦然<sup>[21]</sup>。Bcl-2的关键结构跨膜锚定区(TM),可将Bcl-2锚定在线粒体外膜上,阻止Cyt C从线粒体中释放和防止Caspase-3的激活从而发挥抗凋亡作用<sup>[22]</sup>,而Bax蛋白可促进线粒体释放Cyt C,诱导细胞凋亡。本研究采用Annexin V-APC/7-AAD双染法,对乌梅丸含药血清诱导胰腺癌SW1900细胞凋亡进行了定量检测,结果显示乌梅丸含药血清干预SW1900细胞后,可明显诱导其凋亡,并且凋亡率随浓度增加而增加。进一步采用Western blot检测凋亡相关蛋白发现,Caspase家族中的启动者Caspase-3及执行者Caspase-9,Cyt C,Bax蛋白表达随乌梅丸含药血清浓度增加而逐渐升高,Bcl-2蛋白表达随乌梅丸含药血清浓度增加而逐渐减少,推测乌梅丸含药血清可能是通过上调Bax/Bcl-2,促进线粒体释放Cyt C,激活Caspase-9,Caspase-9激活Caspase-3促使Caspase级联反应暴发,最终导致内源性细胞凋亡。

细胞信号通路是细胞对信号进行接收、整合后做出反应,能够调节基因的表达。PI3K/Akt信号通路由有磷酸化磷脂酰肌醇3羟基的脂类激酶活性的PI3K及下游Akt组成。PI3K是由p110和p85亚基组成的异源二聚体,可被各种生长因子受体和癌基因启动,通过磷酸化Akt磷酸化位点Ser473和

Thr308从而调控下游的Akt蛋白<sup>[23]</sup>。PI3K/Akt信号通路能显著促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力<sup>[24]</sup>,研究证实抑制PI3K/Akt途径的磷酸化,可降低三阴性乳腺癌细胞的迁移能力<sup>[25]</sup>。PI3K/Akt信号通路也是调控肿瘤生长和凋亡的关键通路,与胰腺癌的发生发展密切相关<sup>[26]</sup>,尤其是通过一系列磷酸化作用激活对细胞凋亡的负调控作用: Akt磷酸化其S136位点灭活促凋亡蛋白Bax并阻止其结合抗凋亡蛋白Bcl-2<sup>[27]</sup>;活化的Akt可以减少线粒体释放Cyt C进而起到抗凋亡作用<sup>[28]</sup>;Akt磷酸化其S196位点抑制Caspase-9的催化活性<sup>[29]</sup>,从而调控Caspase家族抑制肿瘤细胞的凋亡<sup>[30]</sup>。本研究以PI3K/Akt信号通路为切入点,选择通路中的关键蛋白PI3K、Akt,探索乌梅丸能否抑制PI3K、Akt的磷酸化水平,抑制胰腺癌SW1900细胞增殖、侵袭及迁移,诱导细胞凋亡。采用Western blot检测PI3K、Akt蛋白的表达及其磷酸化水平,结果提示,经乌梅丸含药血清处理后,SW1900细胞PI3K、Akt的磷酸化水平下降,随着浓度的增加逐渐明显。

综上所述,乌梅丸能明显抑制胰腺癌SW1900细胞的恶性生物学行为,促进其凋亡,并且这种抑制作用呈现出一定的量效关系,其机制可能是通过抑制PI3K/Akt信号通路,下调PI3K/Akt通路中的PI3K、Akt蛋白磷酸化水平实现的。该发现为经方乌梅丸在拮抗胰腺癌的进展方面奠定了实验基础,在下一步研究中课题组将围绕PI3K/Akt通路及乌梅丸的组方规律、量效关系等作更全面及深层次的研究,并将设计相应的体内实验进一步佐证,为中药复方经方在肿瘤治疗领域提供更多的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] SINGHI A D, KOAY E J, CHARI S T, et al. Early detection of pancreatic cancer: opportunities and challenges [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156 (7): 2024-2040.
- [2] 黄俊翔,辛培源,杨振宇,等. 中晚期胰腺癌药物治疗研究进展[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2021, 33 (8): 502-507.
- [3] 刘鲁明. 中西医结合治疗胰腺癌的机遇与挑战[J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(1): 18-20.
- [4] 秦阳. 乌梅丸加减治疗胰腺癌(寒热错杂证)的临床研究[D]. 长春:长春中医药大学, 2019.
- [5] 刘宇飞,安甜,余红,等. 乌梅丸治疗乳腺癌肺转移的药理机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(9):

- 193-201.
- [6] 王熙,张莹雯. 乌梅丸含药血清对胰腺癌细胞增殖及糖酵解的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(9): 1601-1605.
- [7] SOLBERG N T, WAALER J, LUND K, et al. Tankyrase inhibition enhances the antiproliferative effect of PI3K and EGFR inhibition, mutually affecting beta-CATENIN and Akt signaling in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(3): 543-553.
- [8] WAN Y, XU L, LIU Z, et al. Utilising network pharmacology to explore the underlying mechanism of Wumei pill in treating pancreatic neoplasms[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 158.
- [9] 王宁生,雷燕,刘平. 关于血清药理学的若干思考[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(5): 263.
- [10] 朱元章,张贵彪,朱国福. 中药复方抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 227-234.
- [11] 林慧,梅全喜. 单味中药及其复方制剂抗肿瘤血清药理学研究进展[J]. 中国药房, 2016, 27(4): 550-552.
- [12] 沈洋,侯丽,田劭丹,等. 乌梅丸治疗肿瘤免疫疗法相关肠炎探析[J]. 现代中医临床, 2020, 27(6): 64-68.
- [13] 马清林,臧凯宏,孙敏,等. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 甘肃中医药大学学报, 2019, 36(6): 79-83.
- [14] 张辉,吴昊,田纪凤,等. 乌梅丸联合四君子汤治疗放射性肠炎30例(脾胃气虚型)的临床观察[J]. 天津中医药, 2019, 36(11): 1076-1078.
- [15] 金虹,庞雪莹,刘小外,等. 乌梅丸治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 实用临床医药杂志, 2021, 25(8): 129-132.
- [16] 刘宇飞,安甜,余红,等. 乌梅丸治疗乳腺癌肺转移的药理机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 193-201.
- [17] 刘力红,陈治恒. 论开合枢机理在《伤寒论》中的运用[J]. 广西中医药, 1992, 15(1): 29-31.
- [18] 杨海燕,王萍. 试论厥阴风动挟痰瘀毒流窜是肿瘤转移的相关病机[J]. 中医临床研究, 2014, 6(26): 52-53.
- [19] 李飞,谢立群. 胰腺癌侵袭和转移相关调控因子研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(5): 400-403.
- [20] DUENSING T D, WATSON S R. Assessment of apoptosis (programmed cell death) by flow cytometry [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, 2018(1): 38-40
- [21] SIDDIQUI W A, AHAD A, AHSAN H. The mystery of Bcl2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(3): 289-317.
- [22] CHEN Q, RAY S, HUSSEIN M A, et al. Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-family proteins in apoptosis of multiple myeloma[J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(7): 1209-1214.
- [23] KHAN M A, JAIN V K, RIZWANULLAH M, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in triple-negative breast cancer: a review on drug discovery and future challenges[J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(11): 2181-2191.
- [24] SOLBERG N T, WAALER J, LUND K, et al. Tankyrase inhibition enhances the antiproliferative effect of PI3K and EGFR inhibition, mutually affecting beta-catenin and Akt signaling in colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(3): 543-553.
- [25] ZHAO H M, ZHANG B, LI Y, et al. Effect of gefitinib on the migration of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231 cells [J]. *Chin J Oncol*, 2012, 34(2): 84-88.
- [26] WANG S, LEI Y, CAI Z, et al. Girdin regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells via the PI3K/Akt signalling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(2): 599-608.
- [27] ZHANG R, HAO J, WU Q, et al. Dehydrocostus lactone inhibits cell proliferation and induces apoptosis by PI3K/Akt/Bad and ERS signalling pathway in human laryngeal carcinoma [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(11): 6028-6042.
- [28] KUMAR D, HALDAR S, GORAIN M, et al. Epoxyazadiradione suppresses breast tumor growth through mitochondrial depolarization and Caspase-dependent apoptosis by targeting PI3K/Akt pathway [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 52.
- [29] SANGAWA A, SHINTANI M, YAMAO N, et al. Phosphorylation status of Akt and caspase-9 in gastric and colorectal carcinomas[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 3312-3317.
- [30] XU Z, HAN X, OU D, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587.

[责任编辑 张丰丰]