

# Akt 通路在热化疗联合诱导人小细胞肺癌细胞凋亡中的作用

王琳<sup>1</sup>, 刘新奎<sup>2</sup>, 师秀琴<sup>3</sup>

## Involvement of Akt in synergistic effects of thermo-chemotherapy in human small cell lung cancer H446 cell apoptosis

Lin Wang<sup>1</sup>, Xin-Kui Liu<sup>2</sup>, Xiu-Qin Shi<sup>3</sup>

1. 郑州大学第一附属医院放疗科,  
河南 郑州 450052

2. 郑州大学第一附属医院病案管理科,  
河南 郑州 450052

3. 郑州大学第一附属医院药剂科,  
河南 郑州 450052

1. Department of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, P. R. China

2. Department of Case-Record Management, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, P. R. China

3. Pharmacy Department, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, P. R. China

通讯作者: 师秀琴

Correspondence to: Xiu-Qin Shi

Tel.: 86. 013603719609

Email: Sxq5212@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571552, 30972457); 郑州市 2006 年度科技发展计划 (攻关计划) 项目 (19-153)

Grants: National Natural Science Foundation of China (30571552, 30972457); Program of Science and Technology of Zhengzhou Municipal Government 2006 (19-153)

收稿日期: 2009-10-14

接受日期: 2009-11-19

**[Abstract]** **Background and Objective:** Akt pathway plays an important role in cell growth and apoptosis. This study was to characterize the role of Akt in the synergistic effects of thermo-chemotherapy on lung cancer cell growth and its underlying mechanisms. **Methods:** H446 cells were subjected to different thermo-chemotherapy schemes: 43°C + paclitaxel (120 µg/L) (thermo-chemotherapy group), 43°C + paclitaxel (120 µg/L) + Wortmannin (1 µmol/L, PI3K/Akt pathway inhibitor) (Wortmannin group), 43°C + paclitaxel (120 µg/L) + N-acety-L-cysteine (NAC) (30 µmol/L, reactive oxygen species, ROS inhibitor) (NAC group), and paclitaxel (120 µg/L) group. The cells without any treatment were used as the control. MTT assay was conducted to measure the cell proliferation rate. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry (FCM). ROS was detected with fluorescence. Phosphorylation of Akt and the expressions of Caspase-3 were determined by Western blot. **Results:** The cell proliferation rate was significantly lower in the thermo-chemotherapy group than in the control and the chemotherapy groups [(59.83 ± 3.36)% vs. (100.00 ± 0.00)% and (69.16 ± 2.95)%],  $P < 0.05$ . The rate of cell apoptosis was the highest in the thermo-chemotherapy group (27.59 ± 5.47)% ( $P < 0.05$ ). The ROS expression level was higher in the cells of thermo-chemotherapy group (102.14 ± 18.34) than in the other groups ( $P < 0.05$ ), which could be inhibited by NAC (28.01 ± 1.19), but not by the PI3K inhibitor Wortmannin (99.87 ± 8.35). Phosphorylation of Akt significantly decreased in the thermo-chemotherapy group (0.69 ± 0.03) ( $P < 0.05$ ), which could be blocked by Wortmannin (0.00 ± 0.00), but increased by NAC (1.05 ± 0.29) ( $P < 0.05$ ). The expression level of Caspase-3 was higher in the thermo-chemotherapy group (1.07 ± 0.08) than in other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Thermo-chemotherapy has a stronger inhibitory effect than chemotherapy alone in lung tumor cell growth, probably through induction of ROS production and subsequent inhibition of Akt pathway activation and Caspase pathway-induced cancer cell apoptosis.

**Key words:** Akt pathway, thermo-therapy, lung tumor, H446 cell, apoptosis

**【摘要】** 背景与目的: Akt 通路是细胞内一条重要的信号通路, 与细胞生长、凋亡密切相关, 本研究旨在探讨 Akt 通路在热化疗诱导人小细胞肺癌细胞凋亡中的作用, 进而探讨热疗抑制肺部肿瘤细胞增殖可能的机制。方法: 参考临床常用剂量, 采用 43°C 加热联合 120 µg/L 紫杉醇 (热化联合组)、43°C 加热联合 120 µg/L 紫杉醇并加入 1 µmol/L Akt 特异抑制剂 Wortmannin (Wortmannin 组)、43°C 加热联合 120 µg/L 紫杉醇并加入 30 µmol/L 活性氧 (reactive oxygen species,

ROS)特异抑制剂 NAC(NAC 组)、单纯使用 120  $\mu\text{g/L}$  紫杉醇(单纯化疗组)处理 H446 细胞,以未处理的 H446 细胞作为对照组,应用噻唑蓝比色法(MTT 法)检测各处理方式下细胞增殖率,流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率,荧光法检测细胞内 ROS,通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Akt 磷酸化水平和 caspase-3 的表达,采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计分析。**结果:**热化联合组细胞增殖率(59.83  $\pm$  3.36)% 低于对照组(100.00  $\pm$  0.00)% 和单纯化疗组(69.16  $\pm$  2.95)% ( $P < 0.05$ );热化联合组的细胞凋亡率最高(27.59  $\pm$  5.47)% ( $P < 0.05$ );热化联合组的 ROS 表达增高(102.14  $\pm$  18.34) ( $P < 0.05$ ),NAC 可抑制其表达(28.01  $\pm$  1.19),Wortmannin 对其无影响(99.87  $\pm$  8.35);Akt 磷酸化水平在热化联合组降低(0.69  $\pm$  0.03) ( $P < 0.05$ ),Wortmannin 可抑制其磷酸化(0.00  $\pm$  0.00),NAC 使其磷酸化水平升高(1.05  $\pm$  0.29) ( $P < 0.05$ );热化联合组的 caspase-3 表达(1.07  $\pm$  0.08)高于其他各组( $P < 0.05$ )。**结论:**热化疗联合应用可以明显抑制 H446 细胞的生长,这种抑制作用可能是通过诱导 ROS 的产生,继而抑制 Akt 通路活化,并通过 caspase 途径导致细胞凋亡。

**关键词:** Akt 通路; 热疗; 肺肿瘤; H446 细胞; 凋亡

**中图分类号:** R730.58      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-467X(2010)04-0429-05

目前,肺癌的发生率和死亡率居于世界癌症之首,是一种治愈率极低的恶性肿瘤。肿瘤热疗是一种新的肿瘤治疗方法,是继手术、放疗、化疗、生物疗法之后的第 5 种治疗肿瘤的方法<sup>[1]</sup>,能够在有效的温度范围内提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,逆转肿瘤细胞的耐药<sup>[2]</sup>,诱导细胞凋亡<sup>[3]</sup>,所以,热疗诱导肿瘤细胞凋亡和增加肿瘤细胞对化疗的敏感性越来越受到重视。但有关热化疗的理论研究相对滞后,其分子生物学机制的探讨尚不深入。

蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/Akt)通路是细胞内一条重要的信号通路,与细胞生长、凋亡等密切相关<sup>[4]</sup>,磷酸化的 Akt 直接或间接参与许多生理和病理过程。Akt 信号促进细胞生长<sup>[5]</sup>、增殖和存活,在大多数肿瘤细胞中被高度活化<sup>[6]</sup>,与肿瘤发生发展密切相关<sup>[7]</sup>。Akt 对正常细胞的生长增殖是必需的<sup>[8]</sup>。本研究将加热与临床常用的化疗药物紫杉醇(paclitaxel injection, TAX)联合应用,研究其对 H446 细胞增殖的影响及 Akt 通路在其中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂与仪器

人小细胞肺癌细胞株 NCI-H446 细胞由中科院上海生命科学院营养所馈赠;紫杉醇注射液

(paclitaxel injection, 批准文号:国药准字 H19994040),购自太极集团四川太极制药有限公司;噻唑蓝、ROS 特异抑制剂 NAC(N-acetyl-L-cysteine, N-乙酰-L-半胱氨酸)购自 Sigma 公司;Reactive Oxygen Species Testing Kit 购自上海杰美基因医药科技有限公司;鼠抗人 caspase-3 和  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司;兔抗人 Akt 抗体和鼠抗人 p-Akt(Ser473)(587F11)抗体购自美国 cell signaling 公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Akt 特异抑制剂 Wortmannin 购自美国 Alexis 公司;垂直电泳槽购自北京六一仪器厂;电转仪购自 Bio-Rad 公司;Sunrise 酶标仪购自天津开元医疗设备有限公司;恒温水浴箱购自上海精宏实验设备有限公司。

### 1.2 实验分组

取对数生长期细胞常规消化制成单细胞悬液,调整细胞密度为  $2.5 \times 10^7/\text{L}$ ,接种于 100 mL 培养瓶中,每瓶 6 mL,在 37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁,按如下方式处理细胞:单纯化疗组(加入 120  $\mu\text{g/L}$  紫杉醇,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h)、热化联合组(加入 120  $\mu\text{g/L}$  紫杉醇,43  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 40 min,37 $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h)、热化联合并加入 Akt 特异抑制剂 Wortmannin 组(加入 120  $\mu\text{g/L}$  紫杉醇及 1  $\mu\text{mol/L}$  Wortmannin,43  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 40 min,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h)、热化联合并加入 ROS 特异抑制剂 NAC 组(加入 120  $\mu\text{g/L}$  紫杉醇及 30  $\mu\text{mol/L}$  NAC,43  $^{\circ}\text{C}$  水浴加热 40 min,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h)及对照组(37  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h)。

### 1.3 噻唑蓝比色法(MTT 法)检测 H446 细胞生长的变化

取对数生长期的细胞常规消化制成单细胞悬液,调整细胞密度为  $2.5 \times 10^7/\text{L}$ ,接种于 96 孔培养板中,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ ,5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 待细胞贴壁,按 1.2 所述处理细胞(每组设 6 个复孔,独立重复 3 次),每孔加入 5 g/L MTT 液 20  $\mu\text{L}$ ,继续孵育 4 h,取出培养板,弃去 MTT 液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,微量震荡器震荡 10 min,使结晶物充分溶解,以 DMSO 调零,酶联免疫检测仪在 492 nm 波长下检测每孔的吸光度(A)值,按下列公式计算细胞生长增殖率。细胞生长增殖率 = (实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)  $\times$  100%。

### 1.4 ROS 表达变化检测

取对数生长期细胞,清理液洗涤后,离心(1 200 r/min, 5 min)收集  $1 \times 10^6$  细胞,加入染色液,37  $^{\circ}\text{C}$

孵育,加入保存液,以激发波长 490 nm, 激发波长 530 nm 进行定性定量检测。

### 1.5 Western blot 检测 Akt 磷酸化水平及 caspase-3 的表达

将各组细胞离心收集细胞,将约  $1 \times 10^6$  个细胞置于细胞裂解液(30 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 2 mg/L 抑肽酶)中,在冰水浴中反复吹打进行破碎,4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,即为细胞提取液。进行总蛋白定量,调整蛋白浓度一致后,进行 SDS-PAGE 电泳,然后转移至硝酸纤维素膜上,分别以小鼠抗人 caspase-3 抗体、兔抗人 Akt 抗体和兔抗人 p-Akt 抗体为一抗,辣根酶标记山羊抗小鼠或抗兔 IgG 为二抗,进行免疫印迹分析,ECL 显色后,应用 Gene Tool 图像分析软件进行定量分析。

### 1.6 流式细胞术(FCM)检测

将待测细胞调整浓度后接种于 50 mL 培养瓶中,培养 72 h,制成单细胞悬液,收集  $1 \times 10^6$  个细胞移入离心管中,快速加入 4 ℃ 的 70% 的冷乙醇,放置 4 ℃ 冰箱固定 12 h 以上;检测时,弃去乙醇,加入 0.5% 胃蛋白酶 1 mL (pH 值 1.5 ~ 2.0),消化 10 min;PBS 溶液冲洗 1 次,采用碘化丙锭(PI)一步插入性 DNA 定量荧光染色法,以 500 目筛网过滤,使样品成为合格的单细胞悬液,上机检测。

### 1.7 统计学处理

应用 SPSS 13.0 对数据进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行统计学分析,LSD 法进行多重比较,以  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 各处理因素对细胞生长的影响

MTT 法检测各组细胞增殖率,单纯化疗组(69.16 ± 2.95)% 和热化联合组(59.83 ± 3.36)% 与对照组(100.00 ± 0.00)% 比较,增殖率均低于对照组,且热化联合组细胞增殖率低于单纯化疗组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。Wortmannin 组(40.65 ± 0.14)% 和 NAC 组(98.65 ± 0.09)% 细胞增殖率与热化联合组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),即加热联合紫杉醇处理 H446 细胞可明显抑制其增殖,ROS 与 Akt 信号转导通路在其中起到一定作用,且这些作用均可被其相应的抑制剂所抑制。

### 2.2 各组细胞凋亡率的变化

FCM 检测各组细胞凋亡率,热化联合组细胞凋亡率增加(27.59 ± 5.47)% ,与对照组(1.29 ±

0.27)% 和单纯化疗组(19.43 ± 2.68)% 比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),Wortmannin 组细胞凋亡率增多(48.92 ± 1.87)% ,NAC 组细胞凋亡率减少(2.37 ± 0.72)% ,与热化联合组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 各组 ROS 表达变化

荧光法检测各组细胞内 ROS,对照组细胞呈现红色,说明其内无 ROS 产生,单纯化疗组细胞呈现绿色,说明有 ROS 产生,热化联合组细胞呈现亮绿色,说明细胞内 ROS 产生明显增多,加入 Wortmannin 对热化联合产生的 ROS 无影响,而加入 NAC 后,细胞呈现红色,结果见图 1。经多重比较可知,热化联合组 ROS 水平(102.14 ± 18.34)明显高于对照组(32.40 ± 1.14)和单纯化疗组(49.69 ± 7.93),差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );Wortmannin 对 ROS 没有影响(99.87 ± 8.35),与热化联合组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );NAC 可抑制 ROS 的表达(28.01 ± 1.19),与热化联合组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

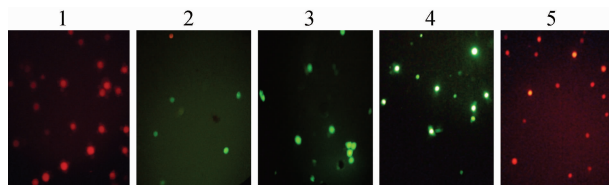


图 1 5 组 NCI-H446 细胞在不同处理条件下 ROS 的变化 ( $\times 100$ )

Figure 1 Changes of ROS under different conditions ( $\times 100$ )

1, control group (37 ℃, 0  $\mu\text{g/L}$  TAX);

2, chemotherapy group (37 ℃, 120  $\mu\text{g/L}$  TAX);

3, thermo-chemotherapy group (43 ℃, 120  $\mu\text{g/L}$  TAX);

4, Wortmannin group (43 ℃, 120  $\mu\text{g/L}$  TAX, 1  $\mu\text{mol/L}$  Wortmannin);

5, NAC group (43 ℃, 120  $\mu\text{g/L}$  TAX, 30  $\mu\text{mol/L}$  NAC).

Red cells show no ROS and the extent of the green light shows the amount of ROS.

### 2.4 各组 Akt 磷酸化水平的变化

各组不同处理因素处理细胞后,采用 Western blot 检测 Akt 磷酸化水平,结果见图 2,经多重比较可知,热化联合组的 Akt 磷酸化水平(0.69 ± 0.03) 低于对照组(1.52 ± 0.01) 及单纯化疗组(1.04 ± 0.42),两两比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );热化联合作用并加入 Akt 特异抑制剂 Wortmannin 后,Akt 的磷酸化被完全抑制(0.00 ± 0.00),加入 ROS 的特异抑制剂 NAC,Akt 磷酸化水平(1.05 ± 0.29) 高于热化联合组,与热化联合组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

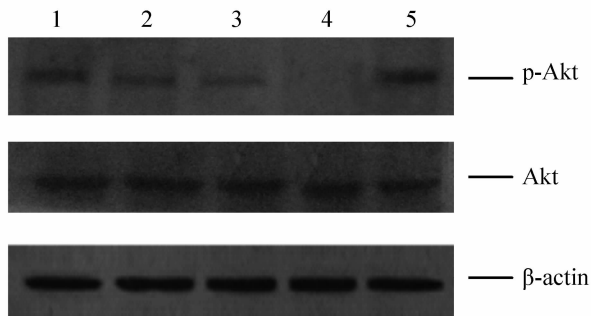


图2 5组 NCI-H446 细胞不同处理条件下 Akt 磷酸化水平

Figure 2 Phosphorylation of Akt under different conditions

- 1, control group (37°C, 0 μg/L TAX);
- 2, chemotherapy group (37°C, 120 μg/L TAX);
- 3, thermo-chemotherapy group (43°C, 120 μg/L TAX);
- 4, Wortmannin group (43°C, 120 μg/L TAX, 1 μmol/L Wortmannin);
- 5, NAC group (43°C, 120 μg/L TAX, 30 μmol/L NAC).

## 2.5 各组 caspase-3 蛋白的表达

热化联合组 caspase-3 的表达水平 ( $1.07 \pm 0.08$ ) 高于对照组 ( $0.44 \pm 0.25$ ) 和单纯化疗组 ( $0.68 \pm 0.06$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 加入 Wortmannin 后, caspase-3 表达 ( $1.09 \pm 0.11$ ) 高于热化联合组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 加入 NAC 后, caspase-3 的表达 ( $0.00 \pm 0.00$ ) 完全被抑制, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 结果见图 3。

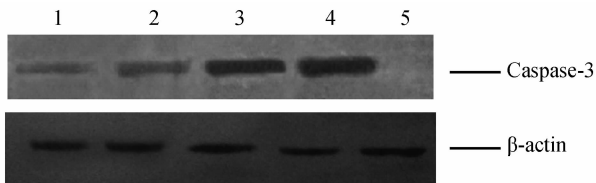


图3 5组 NCI-H446 细胞在不同处理条件下 caspase-3 的表达

Figure 3 Expression of caspase-3 under different conditions

- 1, control group (37°C, 0 μg/L TAX);
- 2, chemotherapy group (37°C, 120 μg/L TAX);
- 3, thermo-chemotherapy group (43°C, 120 μg/L TAX);
- 4, Wortmannin group (43°C, 120 μg/L TAX, 1 μmol/L Wortmannin);
- 5, NAC group (43°C, 120 μg/L TAX, 30 μmol/L NAC).

## 3 讨论

热疗是近 20 年再度兴起的肿瘤治疗新方法, 在肿瘤的综合治疗中发挥重要作用, 热疗联合化疗可以提高肿瘤治疗的疗效<sup>[9]</sup>, 被国际医药界称之为“绿色疗法”<sup>[10]</sup>, 成为肿瘤治疗的重要辅助方法之一。

20 世纪 90 年代前后, 实验研究注意到加温诱发细胞凋亡的现象。热疗使细胞内环境酸化, 促进部分化疗药物引起癌细胞凋亡, 通过提高肿瘤细胞膜的通透性, 促进化疗药物的渗透和吸收; 改变药物在体内的代谢, 增加细胞内药物的堆积; 促进化疗药物诱发细胞凋亡等机制对肿瘤化疗起增敏作用, 但热疗通过何种途径导致肿瘤细胞凋亡的发生, 还需要深入探讨。

正常情况下, 机体内 ROS 的产生和清除系统处于动态平衡状态<sup>[11]</sup>。由于种种原因, 导致 ROS 产生增多或/和机体清除 ROS 能力的下降, 机体就会出现氧化应激, 若超出抗氧化系统的消解能力时, ROS 可大量积聚, 促进  $Ca^{2+}$  内流, 上调 bax 的表达、线粒体通透性转变孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 的开放、caspase 的激活, 导致细胞凋亡。本研究中可见, 热疗促进 ROS 大量产生, 其产生的 ROS 可被 NAC 抑制, 但 Wortmannin 对其没有影响, 说明 ROS 产生是抑制 Akt 通路激活的上游事件。

磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3 kinase, PI3K) 是一种胞内磷脂酰激酶, 活化后可激活 Akt, 引起肿瘤细胞增生<sup>[12]</sup>。Akt 通路是多种信号转导途径的共同通路, 其经磷酸化过程激活之后, 便可对下游蛋白进行调节, 最终抑制细胞凋亡, 其抗细胞凋亡作用可能与抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 家族成员的活化等机制有关。Akt 活性形式的表达能阻止生长因子去除引发的凋亡, 促进细胞的生长和增殖<sup>[5]</sup>, 促进细胞侵袭和转移促进血管生成, 抵抗化疗和放疗中的细胞凋亡<sup>[13]</sup>。有研究表明<sup>[14]</sup>, 从正常细胞到不典型增生再到恶性转化, Akt 的水平逐渐增加, 而且伴随凋亡相关分子标志丢失, 提示 Akt 在肿瘤发生和发展中能够提高肿瘤生存、抑制肿瘤凋亡。Akt 做为蛋白激酶, 磷酸化后才被激活发挥生物活性, 因此, p-Akt 水平才是最终代表此蛋白激酶活性的指标。研究证实, 乳腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌和卵巢癌等多种恶性肿瘤中 Akt 有不同程度激活。本研究中可见, p-Akt 在 H446 细胞中是高表达的, 加热使 Akt 磷酸化水平下降, NAC 和 Wortmannin 可以使其进一步下降, 同时 MTT 和 FCM 结果显示, 细胞增殖率下降, 凋亡率增加, 证实热疗可以抑制 Akt 通路的激活, 热疗抑制肺肿瘤细胞增殖可能与抑制 Akt 通路活化有关。

细胞凋亡过程实质上都是通过 caspase 蛋白的次序激活而实现的。caspase 家族是细胞凋亡下游

关键酶, caspase-3 是该家族中细胞凋亡的主要效应因子, 抑制 caspase-3 的活性或拮抗其功能可能使细胞凋亡受抑, 说明 caspase-3 对细胞凋亡是必需的<sup>[15]</sup>。大多数触发细胞凋亡的因素, 最终均需要通过 caspase-3 介导的信号转导途径导致细胞凋亡<sup>[16]</sup>。caspase-3 与其它 caspases 以级联反应方式, 主要作用在细胞凋亡的执行阶段。根据组织 caspase-3 活性高低可在一定程度上反映处理因素有无诱发体内细胞凋亡。这与本研究结果一致, 热疗促进 caspase-3 的产生, 抑制 H446 细胞的增殖, 促进其发生凋亡, 而 NAC 和 Wortmannin 均可抑制 caspase-3 的表达, 使得细胞增殖率升高, 凋亡率降低, 说明热疗对 H446 细胞增殖的抑制是通过诱导 ROS 的产生, 抑制 Akt 通路的活化, 由 caspase 途径导致凋亡实现的。

综上所述, 热疗可以促进化疗药物对肿瘤细胞的抑制作用, Akt 通路在其中起到重要作用, 为阐明热疗机制奠定基础, 为肿瘤热疗的临床实践提供理论依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] 鹿红, 陈龙邦. 热疗在恶性肿瘤综合治疗中的作用 [J]. 医学研究生学报, 2004, 17(5): 458-460.
- [2] 王琳, 杨继要, 吴逸明. 热化疗对肺部肿瘤细胞生长影响的研究 [J]. 环境与职业医学, 2007, 24(2): 201-203.
- [3] Wang JH, Yao MZ, Zhang ZL, et al. HSF1 blockade-induced tumor thermotolerance abolishment is mediated by JNK-dependent Caspase-3 activation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(3): 736-745.
- [4] 崔云甫, 石林, 秦虹, 等. 茶多酚没食子儿茶素没食子酸酯抗肿瘤机制研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(3): 229-235.
- [5] 石小燕, 蔡晓军, 类建翔, 等. PI-3K/Akt 抑制剂 LY294002 对卵巢癌细胞 A2780/Taxol 多药耐药性的逆转作用 [J]. 癌症, 2007, 27(4): 343-347.
- [6] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling:

navigating downstream [J]. Cell, 2007, 129(7): 1261-1274.

- [7] 王静, 苗丽君, 吴逸明, 等. 非小细胞肺癌组织中 AKT2、Cyclin D1、MMP-9 表达及其与临床病理因素的关系 [J]. 癌症, 2006, 25(1): 69-72.
- [8] 庄乾元, 陈先国, 董自强, 等. 雷帕霉素对人前列腺癌 PC-3 细胞的作用及其机制 [J]. 癌症, 2009, 28(8): 851-855.
- [9] Patel S, Sanborn RE, Thomas CR Jr. Definitive chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer with N2 disease [J]. Thorac Surg Clin, 2008, 18(4): 393-401.
- [10] Hiraoka M, Masunaga S, Nishimura Y, et al. Regional hyperthermia combined with radiotherapy in the treatment of lung cancers [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992, 22(5): 1009-1022.
- [11] Yan W, Arai A, Aoki M, et al. ASK1 is activated by arsenic trioxide in leukemic cell through accumulation of reactive oxygen species and may play a negative role in induction of apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2007, 355(4): 1038-1044.
- [12] Foster K, Wang Y, Zhou D, et al. Dependence on PI3K/Akt signaling for malignant rhabdoid tumor cell survival [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 63(5): 783-791.
- [13] Chin Y R, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer [J]. Cell Signal, 2009, 21(2): 470-476.
- [14] Kobayashi I, Semba S, Matsuda Y, et al. Significance of Akt phosphorylation on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in human gastric carcinoma [J]. Pathobiology, 2006, 73(1): 8-17.
- [15] 郑香伟, 李印, 唐芙爱, 等. 人 canstatin 基因治疗人食管癌裸鼠移植瘤的实验研究 [J]. 癌症, 2009, 28(4): 350-355.
- [16] 胡燕荣, 刘淑清, 田余祥, 等. 白眉蝮蛇去整合素 Adinbitor 对 Akt 信号转导通路及对 SSMC7721 细胞增殖、迁移和凋亡的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(7): 662-668.