

替莫唑胺对胶质瘤细胞 U251 凋亡的影响

李鹤松¹, 叶 艳²

1. 天津市人民医院 神经外科, 天津 300121

2. 天津医科大学代谢病医院 激素与发育重点实验室, 天津 300070

摘要: **目的** 探究替莫唑胺对胶质瘤细胞 U251 凋亡的影响及其作用机制。**方法** 40、80、120 $\mu\text{mol/L}$ 替莫唑胺培养 U251 细胞系 48 h, 观察形态变化, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 caspase 3 表达, 用 caspase 3 试剂盒检测 caspase 3 的活性, 蛋白免疫印迹 (Western blotting) 法检测热休克蛋白 90 (HSP90)、p-HSP90、丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 和 p-AKT 表达。**结果** 替莫唑胺 80、120 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞数目减少, 细胞核体积明显缩小, 染色质固缩。替莫唑胺 80、120 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率、caspase 3 的表达水平和活性明显高于对照组, p-HSP90、p-AKT 的表达水平明显低于对照组 ($P < 0.05$), 呈剂量相关性。**结论** 替莫唑胺能够促进胶质瘤细胞 U251 凋亡, 可能是通过抑制 HSP90 和 AKT 表达来实现的。

关键词: 替莫唑胺; U251 细胞; 凋亡; 热休克蛋白 90; 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2018)04 - 0723 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.04.002

Influence of temozolomide on apoptosis of glioma cell line U251

LI He-song¹, YE Yan²

1. Department of Neurosurgery, the Union Medicine Center of Tianjin, Tianjin 300121, China

2. The Key Laboratory of Hormone and Development of the Metabolic Disease, Metabolic Disease Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To explore the influence of temozolomide on apoptosis of glioma cell line U251 and study its mechanisms. **Methods** U251 cell line were treated with 40, 80, and 120 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide for 48 h. Morphological changes were observed, and apoptosis rate was detected by flow cytometry. Caspase 3 expression was detected by using real-time quantitative PCR (qRT-PCR) method, and the activity of caspase 3 was tested by using caspase 3 Kit. HSP90, p-HSP90, AKT and p-AKT expressions were detected by Western blotting method. **Results** The number of cells decreased in 80 and 120 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide groups, and nucleus size decreased significantly, and chromatin contracted. The apoptosis rate and expression levels and activities of caspase 3 in 80 and 120 $\mu\text{mol/L}$ temozolomide groups were significantly higher than those in the control group, but P-HSP90 and p-AKT expression levels were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$), and were in a dose manner. **Conclusion** Temozolomide can promote the apoptosis of glioma cell line U251, and it may be achieved by inhibiting the expression of HSP90 and AKT.

Key words: temozolomide; U251 cell; apoptosis; HSP90; Akt

胶质瘤是常见的中枢神经系统原发性肿瘤,也是颅内发病率和致死率最高的恶性肿瘤,约占颅内肿瘤的 40%,中国脑胶质瘤患者每年的死亡人数高达 3 万^[1]。脑胶质瘤的临床症状主要表现为头痛、呕吐和神经功能缺失等,给患者带来巨大痛苦。临床常用的治疗胶质瘤的方法主要有放疗、化疗和手术,然而胶质瘤生长迅速,呈浸润性生长,手术治

疗难以切除癌变组织^[2],而且目前已有的放疗和化疗药物毒副作用大,容易产生耐药性。因此,采用安全有效的新型化疗药物治疗胶质瘤已经成为研究的热点问题。替莫唑胺是一种新型的烷化剂,被广泛应用于黑色素瘤、脑垂体瘤和颅内转移瘤的治疗中^[3-5]。替莫唑胺对胶质瘤细胞 U251 凋亡及其相关作用机制方面的研究尚未见报道。本研究旨在利

收稿日期: 2017-09-21

作者简介: 李鹤松 (1975—),男,河北献县人,主治医师,本科,研究方向为神经外科脑出血脑肿瘤。

Tel: 13820014127 E-mail: 2908576901@qq.com

用人胶质瘤细胞系 U251, 阐明替莫唑胺对胶质瘤细胞 U251 凋亡的影响及其潜在的分子机制, 为胶质瘤靶向药物替莫唑胺的开发和临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

替莫唑胺胶囊(规格 50 mg/粒, 批号 20150324) 购自江苏天士力帝益药业有限公司。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒均购自天根生化科技有限公司; TaqDNA 聚合酶购自 NEB 公司; caspase 3 试剂盒购自艾博抗(上海)贸易有限公司; 鼠抗人 HSP90、p-HSP90、AKT 和 p-AKT 多克隆抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司; 引物序列由苏州金唯智生物科技有限公司合成。人胶质瘤细胞 U251 购自中国科学院上海细胞库。

BD-FAC Scan 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 3K15 超低温离心机购自德国 Sigma 公司; SW-CJ-2FD 双人净化工作台购自苏州苏净仪器自控设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和分组 将 U251 细胞解冻复苏, 制成细胞悬浮液, 按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 DMEM 培养基中(10%胎牛血清, 100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素), 置于 37°C 、5% CO_2 的潮湿培养箱中培养 5 d。全量更换 DMEM 培养基, 调整细胞数目为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 24 孔细胞培养板(100 μL /孔), 将细胞分成 4 组, 每组 6 孔, 分别加入替莫唑胺使其终浓度分别为 40、80、120 $\mu\text{mol/L}$, 以未用替莫唑胺处理的作为对照组。培养 48 h。

1.2.2 U251 细胞形态 细胞培养结束后置于倒置显微镜下观察, 拍照, 记录各组细胞形态和数目的变化情况。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞培养结束后, 用预冷的 PBS 洗涤细胞, 加入 2 mL 胰蛋白酶消化细胞 2~3 min, 加入 75%乙醇于 4°C 下 24 h, 固定细胞, 固定结束后用 PBS 漂洗细胞, 置于超低温离心机离心, 弃去上清, 此过程重复 2~3 次; 加入 10 μL RNA 酶在 37°C 下孵育 30 min, 用 10 μL PI 进行染色, 然后在黑暗中 4°C 孵育 30 min。使用 BD-FAC Scan 流式细胞仪进行数据采集和分析。使用 ModFit LT 软件计算细胞凋亡率。

1.2.4 caspase 3 mRNA 表达情况检测 离心收集各组 U251 细胞, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,

用反转录试剂盒将 RNA 反转呈 cDNA。然后根据 NCBI 上提交 caspase 3 的 cDNA 序列设计引物, caspase 3: 上游引物 F1: 5'-GGAAGCGAATCAATG GACTC-3', 下游引物 R1: 5'-CTCAGAAGCACACA AACAAA-3'; GAPDH: 上游引物 F: 5'-CGTTGGC TTCCCAGAACATCAT-3', 下游引物 R: 5'-CATCGG ACACATTGGGGGTAG-3', 以 GAPDH 为内参, 进行 qRT-PCR。PCR 的反应体系为: $5 \times$ 缓冲液 10 μL , TaqDNA 聚合酶 1 μL , 上游引物 F 2 μL , 下游引物 R 2 μL , 10 mmol/L dNTP mix 1 μL , cDNA 1 μL , ddH₂O 33 μL ; PCR 的反应条件为: 预变性: 95°C 5 min, 变性: 95°C 30 s, 延伸: 63°C 15 s (caspase 3, GAPDH), 40 个循环, 延伸时读取吸光度 (*A*) 值。采用最大二阶导数法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 对数据进行统计, 计算 caspase 3 mRNA 的相对表达量。

1.2.5 凋亡蛋白 caspase 3 活性的检测 用 caspase 3 试剂盒检测各组细胞培养物中 caspase 3 的活性, 操作步骤严格按照试剂盒说明书进行, 待反应结束后用酶标仪在 405 nm 处测定其 *A* 值 (A_{405})。

1.2.6 HSP90、p-HSP90、AKT、p-AKT 蛋白表达情况 培养 48 h 后收集细胞, 加入胰蛋白酶进行消化处理, 然后加入 0.5 mL 细胞裂解液提取细胞总蛋白。以 GAPDH 为内参, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 每孔上样体积 20 μL , 电泳结束后, 半干转膜仪转膜 50 min, 分别滴加鼠抗人 HSP90、p-HSP90、AKT、p-AKT 多克隆抗体, 置于 4°C 下过夜, 滴加二抗 37°C 放置 1 h。加入 ECL 发光剂进行显影, 利用自动凝胶成像系统采集图像, 采用 Gel-Pro analyzer4 软件对 SDS-PAGE 电泳图目的条带进行扫描, 分析 HSP90、p-HSP90、AKT、p-AKT 的表达水平。

1.3 统计学分析

本研究所有数据利用统计学软件 SPSS 20.0 进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 U251 细胞形态变化

对照组 U251 细胞数目较多, 形态多样, 染色质均匀分布。替莫唑胺 40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞数目略微减少, 细胞形态无明显变化; 替莫唑胺 80、120 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞数目减少, 细胞核体积缩小, 染色质固缩; 且随着替莫唑胺剂量的增加, U251 细胞形态变化越明显。结果见图 1。

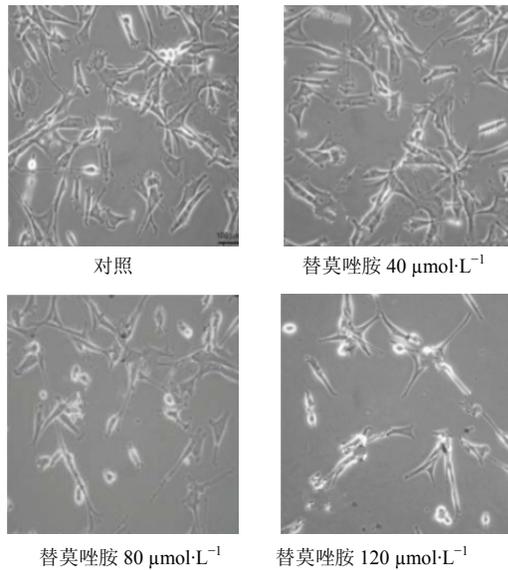


图1 替莫唑胺对U251细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of temozolomide on morphology of U251 cells

2.2 细胞凋亡情况

替莫唑胺 40 μmol/mL 组细胞凋亡率与对照组比较, 差异无统计学意义; 替莫唑胺 80、120 μmol/mL 组细胞凋亡率明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着替莫唑胺剂量的增加, U251 细胞的凋亡率增加, 呈现剂量相关性, 结果见图 2、表 1。

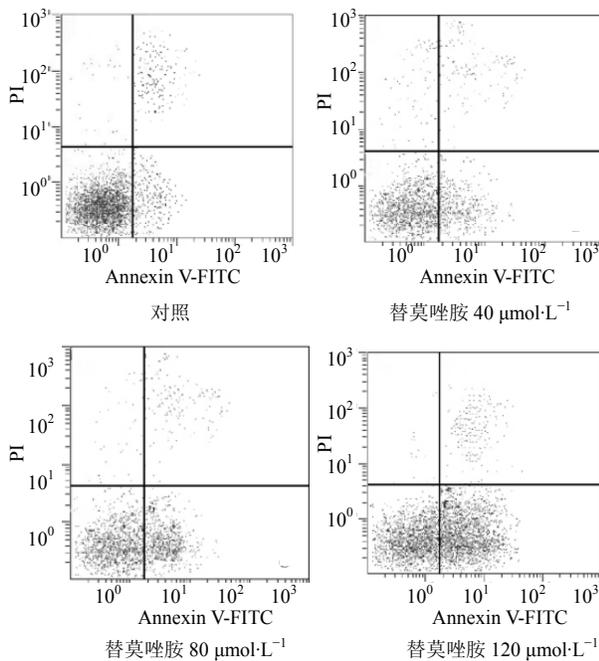


图2 流式检测替莫唑胺对U251细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of flow cytometry on the apoptosis of U251 cells by temozolomide

表1 不同剂量替莫唑胺对U251细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of various dosages of temozolomide on apoptosis rate of U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞凋亡率/%
对照	—	19.24 ± 4.27
替莫唑胺	40	21.13 ± 4.09
	80	39.76 ± 5.77*
	120	68.24 ± 6.38*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.3 替莫唑胺对U251细胞caspase 3表达水平的影响

替莫唑胺 40 μmol/mL 组 caspase 3 mRNA、蛋白表达水平与对照组比较, 差异均无统计学意义; 替莫唑胺 80、120 μmol/mL 组 caspase 3 mRNA、蛋白表达水平明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着替莫唑胺剂量的增加, caspase 3 mRNA 和蛋白表达均明显提高, 呈现剂量相关性, 结果见表 2。

表2 替莫唑胺对U251细胞caspase 3表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of temozolomide on expression of caspase 3 in U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	caspase 3 mRNA	caspase 3 蛋白
对照	—	0.39 ± 0.07	0.44 ± 0.11
替莫唑胺	40	0.42 ± 0.11	0.49 ± 0.13
	80	0.70 ± 0.15*	0.66 ± 0.12*
	120	0.92 ± 0.14*	0.85 ± 0.17*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.4 Western blotting 检测 HSP90、p-HSP90、AKT、p-AKT 蛋白表达情况

替莫唑胺 40 μmol/mL 组 p-HSP90、p-AKT 蛋白的表达水平与对照组比较, 差异无统计学意义; 替莫唑胺 80、120 μmol/mL 组 p-HSP90、p-AKT 蛋白的表达水平明显低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着替莫唑胺剂量的增加, p-HSP90、p-AKT 蛋白的表达水平显著降低, 呈现剂量相关性; 替莫唑胺各剂量组组 HSP90、AKT 蛋白的表达水平与对照组比较, 差异均无统计学意义, 结果见图 3、表 3。

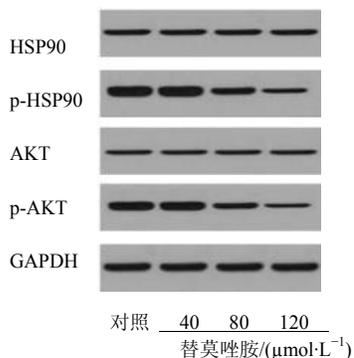


图 3 HSP90、p-HSP90、AKT 和 p-AKT 蛋白表达情况
Fig. 3 Expressions of HSP90, p-HSP90, AKT, and p-AKT protein

表 3 替莫唑胺对 U251 细胞 HSP90 和 AKT 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of temozolomide on expression of HSP90 and AKT in U251 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1})$	HSP90 表达	p-HSP90 表达	AKT 表达	p-AKT 表达
对照	—	0.78 ± 0.11	1.37 ± 0.19	0.67 ± 0.13	1.24 ± 0.23
替莫唑胺	40	0.81 ± 0.13	1.32 ± 0.21	0.69 ± 0.11	1.19 ± 0.18
	80	0.83 ± 0.10	$1.03 \pm 0.11^*$	0.68 ± 0.12	$0.89 \pm 0.14^*$
	120	0.77 ± 0.14	$0.81 \pm 0.13^*$	0.67 ± 0.11	$0.60 \pm 0.12^*$

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

长和增殖,当替莫唑胺终浓度达到 400 $\mu\text{mol/L}$ 时其抑制作用最强;另有研究发现,当胶质瘤细胞凋亡时,细胞形态和细胞体积会发生变化^[10],本研究结果表明,替莫唑胺 80、120 $\mu\text{mol/mL}$ 组细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),且随着替莫唑胺剂量的增加,U251 细胞的凋亡率增加,呈现剂量相关性;且替莫唑胺能够使胶质瘤 U251 细胞数目减少,细胞核体积缩小,染色质固缩,与前人的研究一致。

半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cysteiny l aspartate specific proteinase 3, caspase 3) 在细胞凋亡过程中起重要作用,当 caspase 3 被激活时能特异性切割 DNA,使染色质凝聚、核酸酶激活,进而诱导细胞凋亡^[11]。陈侠等^[12]研究表明,替莫唑胺能够抑制脑胶质瘤细胞 U87-MG 的增殖和侵袭,并通过上调 caspase 3 的活性进而诱导胶质瘤细胞凋亡;常顺等^[13]研究表明,替莫唑胺能够上调大鼠 C6 胶质瘤细胞中 caspase 3、caspase 9 的表达水平,进而诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡;唐智等^[14]研究表明,替莫唑胺能够体外上调胶质瘤细胞 U251 中 caspase 3 的表达水平,进而促进细胞凋亡;本研究结果表明,胶质瘤细胞 U251 经替莫唑胺处理后,胶质瘤细胞

3 讨论

替莫唑胺是一种口服抗肿瘤烷化剂,能够通过血脑屏障直达病灶,具有突出的抗肿瘤作用。研究表明,替莫唑胺在生理 pH 值条件下转变为活性化合物 5-(3-甲基三氮烯-1-基)咪唑-4-甲酰胺(MTIC),它能够使细胞内 DNA 鸟嘌呤第 6 位氧原子甲基化,进而抑制肿瘤细胞生长、增殖,诱导癌细胞凋亡^[6-7]。郭珊珊等^[8]的研究表明,替莫唑胺能够体外抑制脑胶质瘤 LN229 增殖,并诱导细胞凋亡,且其促凋亡作用与药物浓度和作用时间呈正相关。程全等^[9]研究表明,替莫唑胺可以抑制胶质瘤细胞 U251 的生

中 caspase 3 表达水平和活性升高,且随着替莫唑胺剂量的增加, caspase 3 表达水平和活性均显著提高 ($P < 0.05$),呈剂量相关性。进一步证实替莫唑胺能够诱导胶质瘤细胞 U251 的凋亡。

热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 作为分子伴侣,能够与底物蛋白活性部位结合,维持生物体和细胞的正常功能^[15]。HSP90 是其家族中的一员,与胶质瘤的生长、增殖和凋亡密切相关^[16],丁鹏等^[17]研究表明,下调胶质瘤细胞 T98G 中 HSP90 蛋白的表达水平,可以抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭,并促进胶质瘤细胞凋亡; Milanović 等^[18]研究表明,下调胶质瘤细胞 U251 中 HSP90 的磷酸化水平,可以降低胶质瘤的恶变级别。HSP90 能够促进 200 多种蛋白成熟,其中也包括丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (serine threonine kinase, AKT),因此, HSP90 成为信号通路中研究的关键蛋白^[19]。AKT 能够参与多种信号通路,如 PI3K/AKT、PKB/AKT 等,其中 AKT 是通路中的关键蛋白, HSP90 能够与 AKT 结合,促进 AKT 分子磷酸化,进而调控细胞生长、转移、增殖以及凋亡。Gong 等^[20]研究表明,海兔素通过抑制 HSP90/AKT 信号通路中相关蛋白 (HSP90、p-AKT) 的表达水平,进而诱导胶质瘤细胞 GL26

凋亡; Choi 等^[21]研究表明,替莫唑胺能够下调恶性胶质瘤 U251、T98G 信号通路中 AKT、HSP90 蛋白的表达水平,进而促进恶性胶质瘤 U251、T98G 凋亡。以上研究均提示 Hsp90 和 AKT 信号分子在肿瘤的发生发展中起重要作用,本研究表明,替莫唑胺能够抑制 HSP90 和 AKT 蛋白的磷酸化,并促进胶质瘤细胞的凋亡,且随着替莫唑胺剂量的增加,胶质瘤细胞 U251 凋亡水平显著升高 ($P < 0.05$),呈剂量相关性。推测替莫唑胺促进胶质瘤细胞 U251 凋亡的机制可能是通过抑制 HSP90 和 AKT 的表达来实现的。

综上所述,替莫唑胺能够促进胶质瘤细胞 U251 凋亡,推测这一作用可能是通过抑制 HSP90 和 AKT 的表达来实现的,因此本研究为探究胶质瘤细胞凋亡机制和开发靶向治疗药物提供了参考。

参考文献

[1] Sundararajan V, Bohensky M A, Moore G, *et al.* Mapping the patterns of care, the receipt of palliative care and the site of death for patients with malignant glioma [J]. *J Neurooncol*, 2014, 116(1): 119-126.

[2] Claus E B, Walsh K M, Wiencke J K, *et al.* Survival and low-grade glioma: the emergence of genetic information [J]. *Neurosurg Focus*, 2015, 38(1): E6.

[3] 崔传亮, 盛锡楠, 连 斌, 等. 阿帕替尼联合替莫唑胺治疗常规治疗失败的晚期黑色素瘤的疗效分析 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2017, 22(6): 548-552.

[4] 吴志峰, 王守森. 替莫唑胺在治疗难治性垂体瘤及垂体癌的研究现状 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2015, 14(3): 280-282.

[5] 王嘉嘉, 梁军潮, 伍犹梁, 等. 伽玛刀联合替莫唑胺治疗脑转移瘤的假性进展 1 例 [J]. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2015(6): 279-280.

[6] Fukai J, Koizumi F, Nakao N. Enhanced anti-tumor effect of zoledronic acid combined with temozolomide against human malignant glioma cell expressing O6-methylguanine DNA methyltransferase [J]. *PLoS one*, 2014, 9(8): e104538.

[7] Kagawa Y, Matsumoto S, Kamioka Y, *et al.* Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion *in vivo* [J]. *PLoS one*, 2013, 8(12): e83629.

[8] 郭珊珊, 朱仲玲, 徐 辉, 等. 替莫唑胺酯对脑胶质瘤的作用及其机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 13(13): 1271-1275.

[9] 程 全. 替莫唑胺通过调控 miR-223/PAX6 抑制胶质瘤细胞增殖的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2014.

[10] 齐 玲, 徐俊杰, 赵东海, 等. 西兰花多肽组分 II 诱导神经胶质瘤细胞凋亡的作用及其机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(9): 1584-1589.

[11] Yang Y J, Qi S N, Shi R Y, *et al.* Induction of apoptotic DNA fragmentation mediated by mitochondrial pathway with caspase-3-dependent BID cleavage in human gastric cancer cells by a new nitroxyl spin-labeled derivative of podophyllotoxin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 131-138.

[12] 陈 侠, 赖满香, 唐省三, 等. 木犀草素联合替莫唑胺治疗脑胶质瘤及其机制的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(2): 63-66.

[13] 常 顺, 刘永军, 周 虎, 等. 替莫唑胺抑制大鼠 C6 胶质瘤增殖及对 P53、caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2016, 31(11): 1276-1277.

[14] 唐 智, 何正文, 蔡 峰, 等. 全反式维甲酸联合替莫唑胺对胶质瘤 U251 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(29): 5614-5618.

[15] 陈美霓, 许静洪, 赵菊梅, 等. 热休克蛋白 90 与肿瘤的研究进展 [J]. *延安大学学报: 医学科学版*, 2015, 13(2): 62-64.

[16] 汪 翔, 杜爱能, 张 策, 等. 热休克蛋白在胶质瘤中的研究进展 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(8): 1426-1429.

[17] 丁 鹏. 姜黄素靶向调控 HSP90 及对胶质瘤细胞增殖和侵袭作用的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.

[18] Milanović D, Firat E, Grosu A L, *et al.* Increased radiosensitivity and radiothermosensitivity of human pancreatic MIA PaCa-2 and U251 glioblastoma cell lines treated with the novel Hsp90 inhibitor NVP-HSP990 [J]. *Radiat Oncol*, 2013, 8(1): 42.

[19] Horibe T, Torisawa A, Kohno M, *et al.* Molecular mechanism of cytotoxicity induced by Hsp90-targeted Antp-TPR hybrid peptide in glioblastoma cells [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11(1): 1-11.

[20] Gong A J, Gong L L, Yao W C, *et al.* Aplysin induces apoptosis in glioma cells through HSP90/AKT pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(5): 639-644.

[21] Choi E J, Cho B J, Lee D J, *et al.* Enhanced cytotoxic effect of radiation and temozolomide in malignant glioma cells: targeting PI3K-AKT-mTOR signaling, HSP90 and histone deacetylases [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1): 1-12.