

红花多糖通过阻断 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞凋亡的机制研究

刘楠, 朱琳, 李纳, 张晓坚

郑州大学第一附属医院药学部, 河南 郑州 450000

摘要:目的 研究红花多糖通过阻断 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞凋亡的作用及其作用机制。方法 将 MDA-MB-435 细胞分为对照组和红花多糖 0.5、1.0 mg/mL 组。MTT 法及流式检测仪分别检测不同质量浓度红花多糖对 MDA-MB-435 细胞生长及凋亡的影响; RT-PCR 及 Western blotting 法分别检测不同质量浓度红花多糖对 MDA-MB-435 细胞 PI3K、Akt、mTOR mRNA 和蛋白表达的影响。结果 与对照组比较, 红花多糖 0.5 mg/mL 组 MDA-MB-435 细胞抑制率为 $(21.52 \pm 2.43)\%$, 红花多糖 1.0 mg/mL 组细胞抑制率为 $(27.73 \pm 3.75)\%$, 显著高于红花多糖 0.5 mg/mL 组 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 红花多糖能够显著提高 MDA-MB-435 细胞凋亡率 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。RT-PCR 及 Western blotting 实验结果显示, 与对照组比较, 红花多糖能够使 MDA-MB-435 细胞中 PI3K、Akt、mTOR mRNA 和蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 红花多糖能有效抑制 MDA-MB-435 细胞的生长, 促进其凋亡, 作用可能是通过对 PI3K/Akt/mTOR 通路的阻断实现的。

关键词: 红花多糖; 人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞; 增殖; 凋亡; PI3K/Akt/mTOR 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)18-4374-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.023

Mechanism research of safflower polysaccharide inducing apoptosis of human breast cancer MDA-MB-435 cells by interrupting PI3K/Akt/mTOR Pathway

LIU Nan, ZHU Lin, LI Na, ZHANG Xiao-jian

Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of safflower polysaccharide on apoptosis of human breast cancer MDA-MB-435 cells by blocking PI3K/Akt/mTOR pathway and explore its mechanism. **Methods** MDA-MB-435 cells were divided into control group and safflower polysaccharide 0.5 and 1.0 mg/mL groups. MTT assay and flow cytometry were used to detect the effects of different concentrations of safflower polysaccharide on the growth inhibition and apoptosis of MDA-MB-435 cells. RT-PCR and Western blotting were used to detect the effect of different concentrations of safflower polysaccharides on the mRNA and protein expression of PI3K, Akt, and mTOR in MDA-MB-435 cells. **Results** Compared with the control group, the inhibition rate of MDA-MB-435 cells in safflower polysaccharide 1.0 mg/mL group was $(27.73 \pm 3.75)\%$, which was significantly higher than that $[(21.52 \pm 2.43)\%]$ in safflower polysaccharide 0.5 mg/mL group ($P < 0.05$). Compared with the control group, safflower polysaccharide could significantly increase the apoptosis rate of MDA-MB-435 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). The results of RT-PCR and Western blotting showed that, compared with the control group, safflower polysaccharide significantly decreased the mRNA and protein expression of PI3K, Akt, and mTOR in MDA-MB-435 cells ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Safflower polysaccharide can effectively inhibit the growth of MDA-MB-435 cells and promote their apoptosis, which may be achieved by blocking the PI3K/Akt/mTOR pathway.

Key words: safflower polysaccharide; human breast cancer MDA-MB-435 cell; proliferation; apoptosis; PI3K/Akt/mTOR pathway

乳腺癌是女性人群中发病率最高的恶性肿瘤之一^[1], 在女性中每年新增长的癌症疾病中排名第一, 其死亡率仅次于肺癌^[2]。随着生活环境和习惯的改

变, 乳腺癌在我国女性人群中发病率逐年上升^[3]。目前临床治疗乳腺癌主要以手术切除为主, 但创伤较大, 且易复发转移, 预后较差, 放化疗及靶向治

收稿日期: 2018-02-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31570357); 河南省高等学校重点科研项目计划 (15A350016)

作者简介: 刘楠, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为免疫药理。Tel: (0371)66913047 E-mail: ln_snow@163.com

*通信作者 张晓坚, 男, 学士, 主任药师, 研究方向为临床药理。Tel: (0371)66913047 E-mail: 530693421@qq.com

疗等虽能提高局部控制效果,但长时间治疗毒副作用较大,费用较高,对患者造成了极大的心理和经济负担^[4-5],因此,寻找一种安全有效的辅助治疗手段,降低复发转移率、减少毒副作用是目前乳腺癌临床治疗的当务之急。

红花 *Carthamus tinctorius* L. 是一种重要的传统中药材,红花多糖为其活性成分之一,红花多糖为杂多糖,其基本组成为葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖,由 β 键连接,用通式 $(C_6H_{10}O_5)_n$ 表示^[6],具有多种药理作用,且安全性高、毒副作用小^[7]。有研究证实,红花多糖与化疗药物联用有增强疗效、降低毒副作用的功能^[8],同时,体外研究证实,红花多糖能通过调控细胞凋亡和细胞周期而实现对胃癌、肝癌等恶性肿瘤的抑制^[3,9]。但其对乳腺癌的作用少有深入报道。PI3K/Akt/mTOR 通路是乳腺癌细胞内重要的信号转导通路,其信号分子的异常导致自身功能的突变,引起信号转导途径异常,从而影响细胞的增殖、凋亡、转移和侵袭^[10]。因此,本实验研究红花多糖能否通过作用于 PI3K/Akt/mTOR 通路对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞的凋亡产生影响,旨在为乳腺癌的治疗寻找新的治疗靶点以及更有效安全的治疗药物。

1 材料

1.1 细胞株

MDA-MB-435 细胞 3 代购自上海奥陆生物科技有限公司。

1.2 药材与试剂

红花药材来自郑州大学第一附属医院中药房(批号 20171123),经郑州大学第一附属医院中药研究室王祥瑞教授鉴定为菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花。

含双抗的 RPMI 1640 培养基(美国 Thermo Fisher 公司);胎牛血清(美国 Genial 公司);TUNEL 细胞凋亡试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);RT-PCR 逆转录试剂盒[宝日医生物技术(北京)有限公司];Trizol、PI3K 抗体(上海生工生物工程股份有限公司);PI3K、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、蛋白激酶 B(Akt)引物由上海生工工程有限公司合成;mTOR、Akt、GAPDH 抗体(Cell Signaling Technology 公司);四甲基偶氮唑蓝[MTT,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司];Annexin V/PI 凋亡试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);正丁醇、双氧水、无水乙醇、丙酮、

无水乙醚,三氯甲烷、正丁醇、苯酚(上海赛弗生物科技有限公司,分析纯)。

1.3 仪器

恒温培养箱(国营创新医疗器械厂);Olympus BX5 显微镜(日本 Olympus 株式会社);低温离心机(北京兴联商贸有限公司);高压蒸汽灭菌锅(上海巴玖实业有限公司);DYC-p32 型电泳槽(北京市六一仪器厂);紫外-荧光酶标仪、Gallios 流式细胞仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 红花多糖的提取

将干燥后的红花于沸水中反复煎煮,滤过,将液体浓缩,用乙醇对多糖沉淀后离心,沉淀溶于去离子水后用乙醇反复沉淀,将洗涤后的沉淀烘干得到粗制红花多糖,将其溶于蒸馏水冷冻,室温缓慢解冻后离心去杂质,上清液用 Sevage 法除去其中游离蛋白质,用 H_2O_2 洗涤脱色,用无水乙醇、丙酮、无水乙醚洗涤脱脂,将洗涤后的产物干燥,即得淡黄色的纯净红花多糖结晶。采用硫酸-苯酚法,运用分光光度计于 488 nm 处测得红花多糖质量分数为 91.20%。将其溶于 RPMI 1640 培养液中,配制质量浓度为 10 mg/mL 的红花多糖溶液,用 0.2 μ m 微孔滤过滤器滤过除菌, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存备用^[11-13]。

2.2 细胞培养

将 MDA-MB-435 细胞株复苏重悬后,接种于含 10%青霉素、链霉素双抗和 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养并进行传代。

2.3 分组及给药

取 2~3 次传代后对数生长期细胞,用 0.25%胰蛋白酶进行消化制成单细胞悬液,离心去上清液,细胞重悬溶于 RPMI 1640 培养基中,将重悬后的细胞接种于 96 孔板中,每孔内含细胞为 5×10^3 个/ $180\text{ }\mu\text{L}$,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 环境中培养 24 h。实验分为对照组和红花多糖 0.5、1.0 mg/mL 组。将提前配制好的 10 mg/mL 的红花多糖溶液分别稀释至 0.5、1.0 mg/mL,分别加入到 96 孔板中,每个质量浓度设 6 个复孔,将 96 孔板置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h。

2.4 MTT 法检测红花多糖对 MDA-MB-435 细胞生长的影响

按“2.3”项下方法处理细胞,另设空白对照组(只加培养液)。培养 48 h 后,胰蛋白酶消化重悬,

向每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μ L, 孵育 4 h, 离心后弃去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μ L, 微孔振荡器震荡 10 min, 在紫外-荧光酶标仪 490 nm 波长下测定各孔的吸光度 (A) 值, 重复测量 3 次, 根据公式计算 MDA-MB-435 细胞在不同质量浓度红花多糖作用下的生长抑制率。

$$\text{生长抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 流式细胞仪检测红花多糖对 MDA-MB-435 细胞凋亡的影响

按“2.3”项下方法处理细胞, 培养 48 h 后, 胰蛋白酶消化重悬, 转移至离心管, 调整每管细胞数约为 1×10^6 个, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 按照凋亡试剂盒说明书上相关步骤, 向细胞中加入 Annexin V 10 μ L, 避光孵育 10 min, 预冷 PBS 洗涤 2 次后, 向每管中加入 PI 溶液 4 μ L, 立刻上流式细胞仪, 检测细胞凋亡率。

2.6 RT-PCR 方法检测红花多糖对 MDA-MB-435 细胞内 PI3K、Akt、mTOR 基因表达的影响

Trizol 提取细胞中总 RNA, 进行逆转录反应。取 2 μ L RNA 进行 PCR 扩增, 以 GAPDH 为内参。PI3K 内参引物序列: 上游 5'-GTATGAACAGAAG-GCCCTAATA-3', 下游 5'-TTGCAGTTCCAACC-AT-3'; PI3K: 上游 5'-GCACTTTACCCTTTCTGCT-A-3', 下游 5'-GTCCAACACTACGCACTGACC-3'。Akt 内参引物序列: 上游 ACTAGCGATTAGCGA-TACGACTA-3'; 下游 ACGCAATAGCGATCGAGC-TAGCT-3'; Akt: 上游 5'-ACGCTATATCGGGCTACG-CTGAT-3', 下游 5'-ATCGATGCGCGTGATCGATG-CCG-3'; mTOR 内参引物序列: 上游 5'-ATGCG-CTAGCTTCGAACCATCGA-3', 下游 5'-CTAGCT-TCGATCGATCGGTAC-3'; mTOR: 上游 5'-AAA-CGTAGCTAGCTTGGCTAGCT-3', 下游 5'-TTTG-CTATGCGCTTAGGCATAGC-3'。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min。取 5 μ L PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外线投射仪下观察电泳条带, 分析目的基因和内参基因的条带灰度值。

2.7 Western blotting 法检测红花多糖对 MDA-MB-435 细胞内 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达的影响

RIPA 裂解液将细胞裂解 1 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 提取蛋白, 用 10% 的分离胶溶液、5% 的浓缩胶溶液灌注, 每孔 50 μ g 蛋白进行

SDS-PAGE 电泳条件分离, 80 V 条件下转膜 2 h。将蛋白再转移至 NC 膜, 丽春红 S 溶液进行染色, 拍照, TBST 洗涤脱色。5% 脱脂奶粉的 TBST 中封闭 2 h, TBST 洗涤 8 min \times 4 次; 一抗 (1:1 000) 于 4 $^{\circ}$ C 低速摇动孵育过夜; 二抗 (1:4 000) 于 37 $^{\circ}$ C 低速摇动孵育 45 min。TBST 洗涤 NC 膜, ECL 显色。将胶片扫描后用 Bandscan 5.0 软件进行蛋白灰度分析。

2.8 统计分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计前首先对各个检测指标进行正态性检验和方差齐性检验, 方差齐时, 多组间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。

3 结果

3.1 红花多糖对 MDA-MB-435 细胞生长的影响

MTT 实验结果显示, 与对照组比较, 红花多糖 0.5 mg/mL 组细胞生长抑制率为 (21.52 \pm 2.43) %, 红花多糖 1.0 mg/mL 组细胞生长抑制率为 (27.73 \pm 3.75) %, 显著高于红花多糖 0.5 mg/mL 组 ($P < 0.05$)。

3.2 红花多糖对 MDA-MB-435 细胞凋亡的影响

对照组细胞凋亡率为 (1.18 \pm 0.23) %, 红花多糖 0.5 mg/mL 组细胞凋亡率为 (6.27 \pm 1.26) %, 显著高于对照组 ($P < 0.01$); 红花多糖 1.0 mg/mL 组细胞凋亡率为 (13.50 \pm 1.68) %, 显著高于红花多糖 0.5 mg/mL 组 ($P < 0.01$), 见图 1。

3.3 红花多糖对 MDA-MB-435 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关基因表达水平的影响

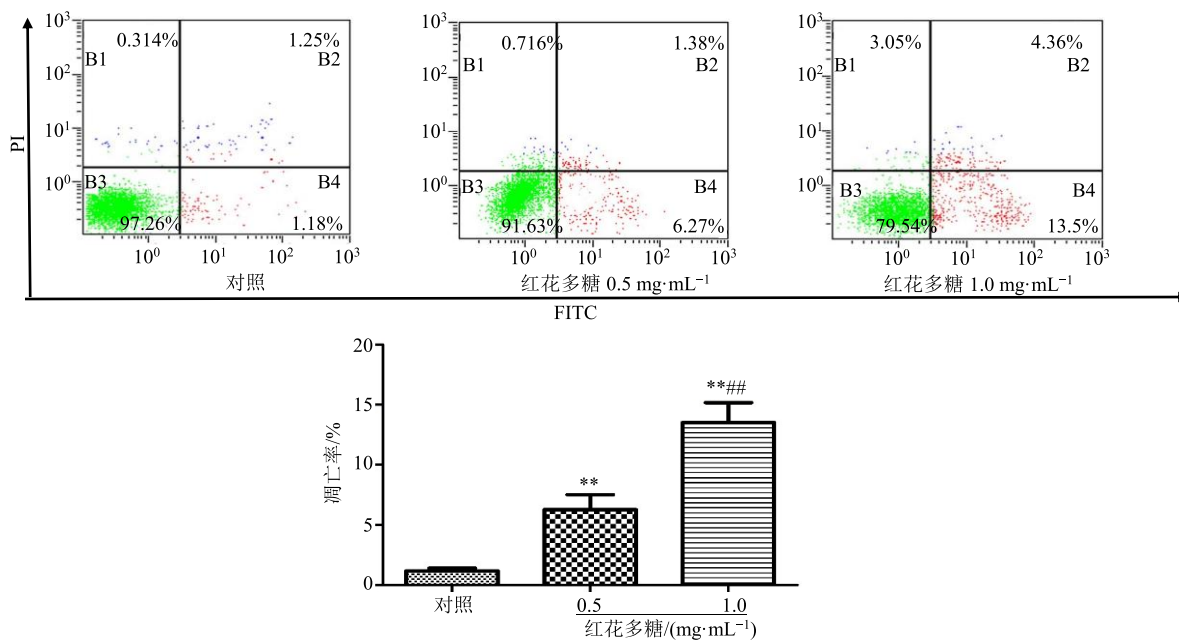
与对照组比较, 红花多糖组细胞 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 红花多糖 1.0 mg/mL 组细胞各基因表达水平较 0.5 mg/mL 组降低更明显 ($P < 0.05$), 见图 2。

3.4 红花多糖对 MDA-MB-435 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达水平的影响

与对照组比较, 红花多糖组细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 红花多糖 1.0 mg/mL 组细胞各蛋白表达水平较 0.5 mg/mL 组降低更明显 ($P < 0.05$), 见图 3。

4 讨论

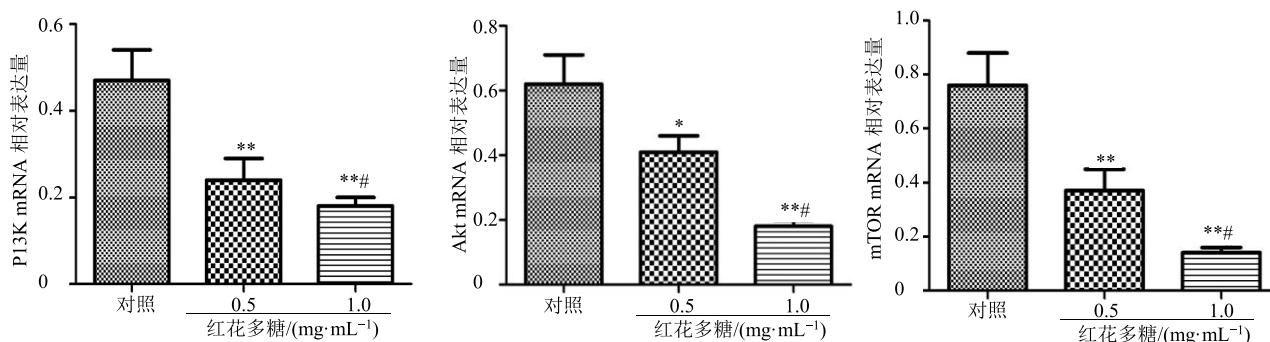
细胞凋亡是机体为维护自身内环境平衡而自动引发的细胞程序性死亡, 癌症的快速发展就是因为癌细胞的过度增殖及细胞凋亡通路被阻断^[14-15]。因此, 肿瘤细胞凋亡在癌症治疗过程中的重要性越来越



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与红花多糖 0.5 mg·mL⁻¹ 组比较: ### $P < 0.01$
 ** $P < 0.01$ vs control group; ### $P < 0.01$ vs safflower polysaccharide 0.5 mg·mL⁻¹ group

图 1 红花多糖对 MDA-MB-435 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of safflower polysaccharide on apoptosis of human breast cancer MDA-MB-435 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与红花多糖 0.5 mg·mL⁻¹ 组比较: # $P < 0.05$, 图 3 同
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs safflower polysaccharide 0.5 mg·mL⁻¹ group, same as Fig. 3

图 2 红花多糖对 MDA-MB-435 细胞 PI3K、Akt、mTOR mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of safflower polysaccharide on expression of PI3K, Akt, and mTOR mRNA in human breast cancer MDA-MB-435 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

越突出, 相关研究也越来越多, 目前已发现有多条信号通路与肿瘤细胞的凋亡和增殖密切相关^[16], 其中, 由 Akt、mTOR 核心组件构成的并由起始分子 PI3K 激活的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路是癌症中极为重要的生存信号通路, 该通路的激活能引起肿瘤细胞蛋白合成增加, 参与调节细胞增殖、迁移、凋亡等过程, 是癌症发生最主要的调控信号通路之一^[14-15]。PI3K/Akt/mTOR 通路已被证实与乳腺癌

的发生、转移、恶化等过程密切相关^[16-17], 有研究表明, PI3K/Akt 联合抑制剂和 mTOR 抑制剂均能有效抑制三阴性乳腺癌细胞的发展^[18], 可见 PI3K/Akt/mTOR 通路与乳腺癌的发生机制密切相关。

前期研究结果表明, 红花多糖能通过调控 Bcl-2/Bax 的表达而促进乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡^[19], 提示红花多糖对乳腺癌细胞的凋亡具有一定的作用。因此, 本实验通过 MTT 法和流式细胞法

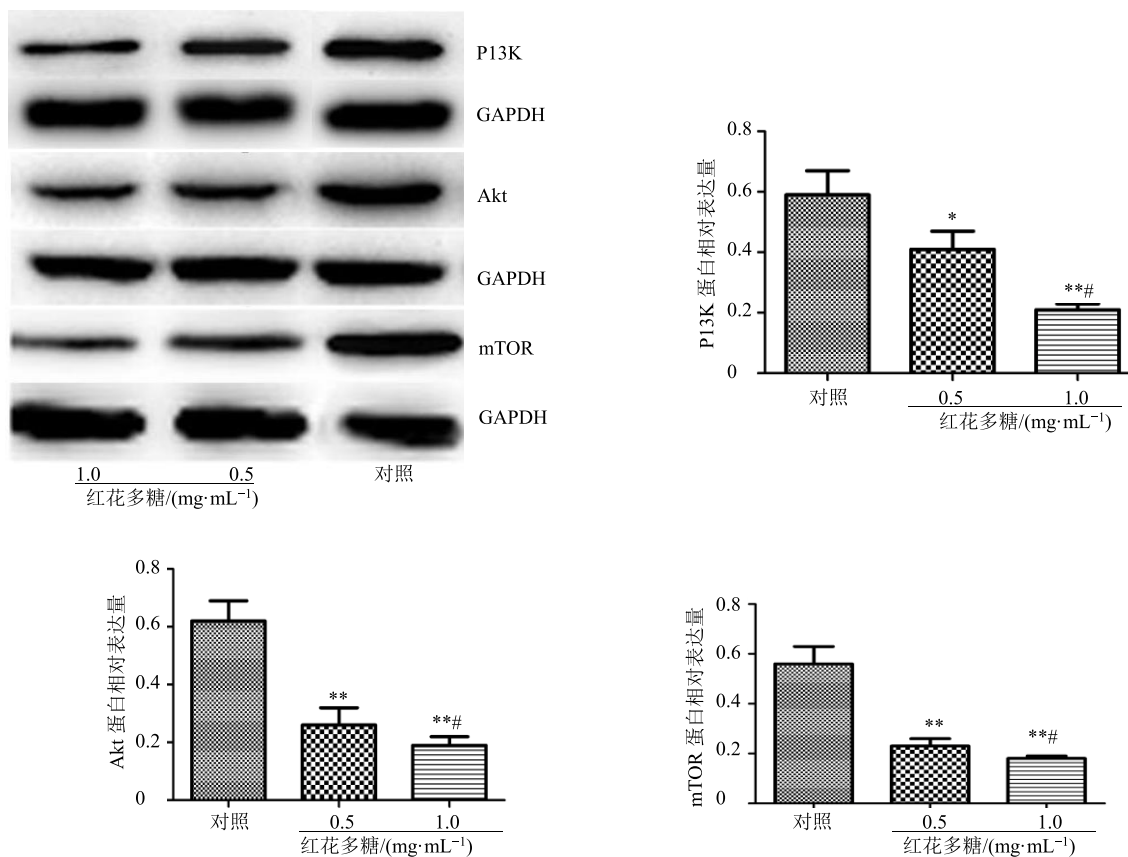


图 3 红花多糖对 MDA-MB-435 细胞 PI3K、Akt、mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of safflower polysaccharide on protein expression of PI3K, Akt, and mTOR in human breast cancer MDA-MB-435 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

验证红花多糖对 MDA-MB-435 细胞的抑制作用，并探讨红花多糖能否通过其他机制对 MDA-MB-435 细胞的凋亡进行调控，旨在为乳腺癌的治疗寻找新的药物和靶点。MTT 结果显示，与对照组比较，红花多糖对 MDA-MB-435 细胞的生长有一定的抑制作用，且红花多糖 1.0 mg/mL 组细胞生长抑制率高于红花多糖 0.5 mg/mL 组 ($P < 0.05$)，提示红花多糖能抑制 MDA-MB-435 细胞的生长，且呈剂量依赖性。流式细胞法检测细胞凋亡结果显示，与对照组比较，红花多糖能够促进 MDA-MB-435 凋亡，而红花多糖 1.0 mg/mL 组细胞凋亡率明显高于红花多糖 0.5 mg/mL 组 ($P < 0.01$)。表明红花多糖能促进 MDA-MB-435 细胞凋亡，且呈剂量依赖性。

PI3K/Akt/mTOR 通路中 PI3K 的激活促使 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1 (PDK1) 与 Akt 结合，进而磷酸化 Akt 蛋白位点使 Akt 活化，而磷酸化的 Akt 可进一步激活磷酸化下游分子蛋白 mTOR，随后作用于底

物 eIF4E 结合蛋白 1 等，进而影响蛋白质的合成和肿瘤的发生^[14-15]。为进一步探讨红花多糖对 MDA-MB-435 细胞凋亡的作用是否与 PI3K/Akt/ mTOR 通路有关，本研究分别从蛋白和基因水平检测了红花多糖对该通路中 3 种分子的影响，结果显示，红花多糖对 MDA-MB-435 细胞中 PI3K 基因及蛋白的表达均能产生显著的抑制作用，且对该通路下游分子 Akt、mTOR 基因和蛋白的表达均有抑制作用，推测该抑制作用可能是由于 PI3K 的下调而引发的负调控效应，也可能是红花多糖对 Akt、mTOR 的表达直接产生了抑制作用，需要进一步验证。结果表明，红花多糖对 PI3K/Akt/mTOR 通路存在一定的抑制作用，进而推测红花多糖对 MDA-MB-435 细胞凋亡的促进和生长的抑制作用可能是通过对该通路的抑制而实现的。

综上所述，红花多糖能有效抑制 MDA-MB-435 细胞的生长，促进其凋亡，该作用可能是通过对 PI3K/Akt/mTOR 通路的抑制实现的。

参考文献

- [1] 中国抗癌协会乳腺癌专业委员会. 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范 (2017 年版) [J]. 中国癌症杂志, 2017, 27(9): 695-759.
- [2] Chou J, Wang B, Zheng T, *et al.* MALAT1 induced migration and invasion of human breast cancer cells by competitively binding miR-1 with cdc42 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(1): 262-269.
- [3] Meng X G, Yue S W. Dexamethasone disrupts cytoskeleton organization and migration of T47D Human breast cancer cells by modulating the Akt/mTOR/RhoA pathway [J]. *Asian Pac J Cancer Preven*, 2014, 15(23): 10245-50.
- [4] 张飞艳, 宋丽华. 乳腺癌患者的心理状况及其心理干预 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2017, 24(3): 212-216.
- [5] Massihnia D, Galvano A, Fanale D, *et al.* Triple negative breast cancer: Shedding light onto the role of pi3k/akt/mTOR pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 60712-60722.
- [6] 任爱农, 邹义芳, 陆颖, 等. 红花多糖的分离纯化及单糖组成分析 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1190-1196.
- [7] 孙阳, 杨婧, 张琪琪, 等. 红花多糖对肝癌细胞增殖阻滞的机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 156-159.
- [8] 杨婧, 戚基萍, 王锐, 等. 红花多糖对人宫颈癌 Hela 细胞增殖和 VEGF 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 111-114.
- [9] 王立, 潘海鸥, 钱海峰, 等. 栀子中京尼平苷及藏红花素的神经保护作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2564-2571.
- [10] 陈明, 王举涛, 吴珍妮, 等. 半枝莲总黄酮通过 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导肿瘤细胞自噬的体内实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1358-1364.
- [11] 杨婧, 张帅, 王冬梅, 等. 超微粉碎联合超声法提取红花中多糖工艺研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2014, 30(3): 354-356.
- [12] 张晓莉, 李玉婷, 王亚贤, 等. 红花多糖的提取与含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 19-21.
- [13] 马新博, 宫汝飞. 红花多糖提取工艺及抑癌药理作用研究进展 [J]. 重庆医学, 2014, 43(3): 364-366.
- [14] 蔡鹏涛, 吴志强, 郭会, 等. 中药抑制非小细胞肺癌 PI3K/Akt/mTOR 信号通路克服 EGFR-TKIs 获得性耐药研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1849-1852.
- [15] 张志鑫, 李彦杰, 秦合伟, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控巨噬细胞自噬探讨黄芪甲苷抗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3575-3581.
- [16] Mohan C D, Srinivasa V, Rangappa S, *et al.* Trisubstituted-imidazoles induce apoptosis in human breast cancer cells by targeting the oncogenic PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153155.
- [17] Pande M, Bondy M L, Do K A, *et al.* Association between germline single nucleotide polymorphisms in the PI3K-AKT-mTOR pathway, obesity, and breast cancer disease-free survival [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 147(2): 381-387.
- [18] 张星星, 李泽庚. 芪玉三龙汤对荷瘤小鼠肿瘤组织 PI3K/Akt/mTOR 通路分子表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5358-5361.
- [19] 唐杰. 乳腺癌中细胞凋亡控制基因 Bcl-2、Bax 和 p53 的表达与分化关系的探讨 [D]. 大连: 大连医科大学, 2010.