

片仔癀对肺癌细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用及其机制研究

胡彦辉, 崔庆丽, 马东阳, 耿良*

郑州大学附属肿瘤医院, 河南省肿瘤医院 中西医结合科, 河南 郑州 450000

摘要: 目的 研究片仔癀对肺癌 A549 细胞增殖、迁移、侵袭的抑制作用及其机制。方法 以人肺癌 A549 细胞作为体外实验对象, 分别用不同质量浓度的片仔癀处理, MTT 检测细胞增殖变化, Transwell 小室测定细胞侵袭和迁移变化, Western blotting 检测细胞中侵袭、迁移蛋白 MMP-9、MMP-2 和上皮细胞-间充质转化 (EMT) 蛋白 E-cadherin、vimentin 及 Akt 信号通路蛋白 Akt 磷酸化水平。用 Akt 信号通路激活剂和片仔癀处理肺癌细胞, 检测激活 Akt 信号通路对片仔癀抗肺癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用。结果 100 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀对肺癌细胞增殖能力没有影响 ($P>0.05$), 200 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀处理可以明显降低肺癌细胞增殖能力 ($P<0.05$)。100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀处理后的肺癌细胞侵袭和迁移能力均降低, 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平下降, E-cadherin 蛋白水平升高, vimentin 蛋白水平降低, 同时细胞中 Akt 磷酸化水平也下降 ($P<0.05$)。Akt 信号通路激活剂处理可以明显减弱片仔癀对肺癌细胞增殖、侵袭、迁移的抑制作用 ($P<0.05$)。结论 片仔癀具有降低肺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力, 作用机制与抑制 Akt 信号通路的激活有关。

关键词: 片仔癀; 肺癌; Akt 信号通路; 侵袭; 迁移

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5527-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.021

Inhibitory effect and mechanism of Pien Tze Huang on proliferation, migration, and invasion of lung cancer cells

HU Yan-hui, CUI Qing-li, MA Dong-yang, GENG Liang

Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Henan Tumor Hospital, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of Pien Tze Huang on proliferation, migration, and invasion of lung cancer cells and explore its mechanism. **Methods** Human lung cancer cell A549 was used as the experimental object *in vitro*, and the cells were treated with different concentrations of Pien Tze Huang. MTT was used to detect cell proliferation, and the changes of cell invasion and migration were measured by Transwell assay. Western blot was used to detect the phosphorylation of invasive migration proteins MMP-9, MMP-2 and EMT proteins E-cadherin, vimentin and Akt signaling pathway proteins. Lung cancer cells were treated with Akt signaling pathway activator and tablets to detect the effect of activating Akt signaling pathway on the proliferation, invasion, and migration of lung cancer cells. **Results** Pien Tze Huang (100 $\mu\text{g/mL}$ tablets) had no effect on the proliferation of lung cancer cells, the proliferative ability of lung cancer cells could be significantly reduced by 200 $\mu\text{g/mL}$ Pien Tze Huang. The invasion and migration ability of lung cancer cells treated with 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$ tablets were decreased, the protein expressions of MMP-2 and MMP-9 in cells were decreased, the level of E-cadherin protein in cells was increased, the level of vimentin protein was decreased, at the same time, the phosphorylation level of Akt was decreased. Akt signaling pathway activator treatment could significantly reduce the inhibitory effect of Pien Tze Huang on proliferation, invasion and migration of lung cancer cells ($P<0.05$). **Conclusion** Pien Tze Huang decreased the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells, the mechanism is related to the inhibition of the activation of Akt signaling pathway.

Key words: Pien Tze Huang; lung cancer; Akt signaling pathway; invasion; migration

随着工业化加速发展和环境污染等因素的影响, 肺癌已经成为严重威胁人类生命健康的常见恶性肿瘤, 目前对于肺癌的治疗以手术切除、放射治疗和化疗为主, 但是由于这些治疗手段具有一定的

收稿日期: 2019-04-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473638); 2017 年度河南省医学科技攻关计划项目 (201702257)

作者简介: 胡彦辉 (1983—), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为中西医结合防治恶性肿瘤。E-mail: youmang983501@163.com

*通信作者 耿良 E-mail: zuoya3209540@163.com

局限性和不良反应,寻找新的有效药物对于肺癌的治疗具有重要意义^[1-2]。片仔癀是我国传统名贵中药,其含有三七、牛黄、麝香等多种中药成分,有消肿、止痛、清热解毒等功效,可用于治疗肝炎、结肠炎等炎症疾病^[3]。近年来的研究表明,片仔癀还具有抗肿瘤功效,其可以在体内抗血管内皮细胞迁移,抑制血管形成,对于骨肉瘤、大肠癌等肿瘤具有抗生长和转移的作用^[4-5]。有报道显示,片仔癀处理后的肿瘤细胞中 Akt 磷酸化水平降低,而 Akt 信号通路激活是肿瘤发生和转移的促进因子^[6-7]。目前对于片仔癀对肺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响尚不清楚。本实验以人肺癌细胞 A549 为模型,研究片仔癀对其增殖、迁移和侵袭的抑制作用和相关机制,为片仔癀治疗肺癌的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺癌 A549 细胞购自北纳生物细胞资源中心;片仔癀(规格 3 g/粒,批号 1801008)购自漳州片仔癀药业股份有限公司;p-Akt 抗体、E-cadherin 抗体、Akt 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;MMP-9 抗体和 MMP-2 抗体购自美国 Abcam 公司;vimentin 抗体购自美国 BioVision 公司;Akt 信号通路激活剂 IGF-1 购自美国 Sigma 公司。

1.2 MTT 法测定肺癌细胞增殖

A549 细胞接种到 96 孔细胞培养板内,每孔中加入 100 μ L 的细胞悬浮液(约含有 2 000 个细胞),培养过夜后,将孔内的培养液吸弃,添加含有片仔癀(超纯水溶解)终质量浓度为 0、100、200、400、800、1 600 μ g/mL 的细胞培养液,放在培养箱中继续培养 24 h,取出培养板,在每个孔内加入 10 μ L 的 MTT 溶液,置于孵育箱内培养 4 h,将孔内的上清吸弃,再分别添加 100 μ L 的 DMSO,孵育 10 min 后,于 490 nm 检测吸光度(A_{490})值。

1.3 Transwell 小室测定肺癌细胞迁移和侵袭

分别在 Transwell 小室的上室内加入用不含血清的细胞培养液悬浮的细胞 200 μ L(同时在细胞培养液中分别添加 0、100、200 μ g/mL 的片仔癀),依次在下室中加入 500 μ L 含 10%胎牛血清的细胞培养液,放在培养箱内继续培养 24 h,取出培养板,添加磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,放在 4%多聚甲醛中浸泡 30 min,置于结晶紫溶液中染色,置于显微镜下计数穿膜细胞数量即为细胞迁移数目,随机选取 5 个视野,取均值。在细胞侵袭实验前 2 h 用基

质胶把小室湿化,后续步骤同迁移实验。

1.4 Western blotting 检测肺癌细胞中 E-cadherin、MMP-2、vimentin、MMP-9 蛋白及 Akt 磷酸化水平

A549 细胞经过 0、100、200 μ g/mL 的片仔癀处理培养 24 h 后,用添加 PMSF 的 RIPA 蛋白裂解溶液提取蛋白,经过 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定浓度后,进行蛋白电泳。电泳前将蛋白样品加入到上样缓冲液中煮沸变性,每孔内设置上样量为 40 μ g。SDS-PAGE 凝胶电泳采用 10%分离胶、5%浓缩胶配制,首先用 90 V 的电压电泳,观察染料进入到分离胶与浓缩胶的交汇处时,换成 120 V 的电压继续电泳,染料进入到玻璃板的底部以后,停止电泳。裁剪 PVDF 膜至合适大小,设置 200 mA 电流转膜,转膜时间设置为 50 min。电转移后,把 PVDF 膜放在 5%牛血清白蛋白封闭液中,在室温中孵育 1 h;再将 PVDF 膜放在封闭液稀释的一抗反应液中,置于 4 $^{\circ}$ C 反应过夜;取出 PVDF 膜,放在封闭液稀释的二抗反应液中,置于室温孵育 1 h,经 Labwork 分析各蛋白条带灰度值大小,以 GAPDH 为内参,分析 E-cadherin、vimentin、MMP-2、MMP-9 蛋白表达变化,同时分析 p-Akt/Akt 值大小。

1.5 Akt 信号通路激活剂对片仔癀调控肺癌细胞增殖、侵袭、迁移的影响

A549 细胞用 100 μ g/mL 的片仔癀和 100 ng/mL 的 Akt 信号通路激活剂 IGF-1 联合处理,为片仔癀+IGF-1 组,经过 100 μ g/mL 的片仔癀和 0 ng/mL 的 Akt 信号通路激活剂 IGF-1 处理后的肺癌细胞为片仔癀组,细胞培养 24 h 后,按照 MTT、Transwell 小室、Western blotting 方法检测细胞增殖、迁移、侵袭和 E-cadherin、MMP-2、vimentin、MMP-9 蛋白及 Akt 磷酸化水平,步骤均同上。

1.6 统计分析

实验数据用 SPSS 21.0 软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,E-cadherin、MMP-2、vimentin、MMP-9 蛋白及 Akt 磷酸化水平变化数据间比较经 t 检验,多组差异比较用单因素方差分析,组间比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 片仔癀对肺癌细胞增殖的影响

100 μ g/mL 的片仔癀处理后肺癌细胞增殖能力没有明显变化,200、400、800、1 600 μ g/mL 的片仔癀处理后肺癌细胞增殖能力明显降低,见表 1。为了消除细胞增殖对迁移和侵袭的影响,分别选用

表 1 片仔癀对 A549 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 1 Effect of Pien Tze Huang on proliferation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A_{490}
对照	—	0.65 ± 0.08
片仔癀	100	0.59 ± 0.07
	200	$0.46 \pm 0.02^*$
	400	$0.34 \pm 0.03^*$
	800	$0.21 \pm 0.02^*$
	1 600	$0.16 \pm 0.02^*$

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下同* $P < 0.05$ vs control group, same as below表 2 片仔癀对 A549 细胞迁移、侵袭数目和 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 2 Effect of Pien Tze Huang on migration and invasion of A549 cells and protein expression of MMP-2 and MMP-9 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	迁移数目	侵袭数目	MMP-2	MMP-9
对照	—	169.35 ± 13.51	135.24 ± 10.89	0.56 ± 0.07	0.86 ± 0.09
片仔癀	100	$124.61 \pm 10.42^*$	$103.69 \pm 8.53^*$	$0.40 \pm 0.04^*$	$0.66 \pm 0.07^*$
	200	$97.32 \pm 10.83^*$	$80.21 \pm 6.37^*$	$0.27 \pm 0.03^*$	$0.34 \pm 0.04^*$

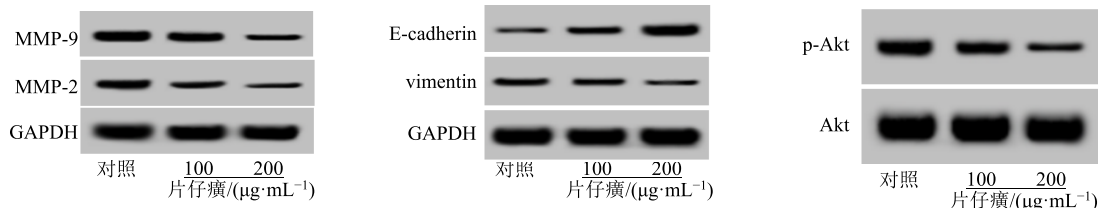


图 1 片仔癀对 A549 细胞中 MMP-2、MMP-9、E-cadherin、vimentin、Akt 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of Pien Tze Huang on protein expression of MMP-2, MMP-9, E-cadherin, vimentin, and Akt in A549 cells

vimentin 蛋白水平降低, 结果见表 3 和图 1。片仔癀能够在体外抑制肺癌细胞上皮细胞-间充质转化 (EMT)。

2.4 片仔癀对肺癌细胞中 Akt 信号通路激活水平的影响

100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀处理后肺癌细胞中 Akt 磷酸化水平降低, 结果见表 3 和图 1。片仔癀能够在体外抑制肺癌细胞中 Akt 信号通路激活。

2.5 Akt 信号通路激活剂 IGF-1 逆转片仔癀抗肺癌细胞增殖、侵袭和迁移作用

肺癌细胞经过 100 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀和 100

100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀处理 A549 细胞进行后续实验。

2.2 片仔癀对肺癌细胞迁移和侵袭的影响

100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀处理后肺癌细胞迁移和侵袭数目均降低, 同时细胞中迁移和侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 表达水平也下降, 结果见表 2 和图 1。片仔癀能够在体外抑制肺癌细胞迁移和侵袭。

2.3 片仔癀对肺癌细胞 E-cadherin、vimentin 蛋白表达的影响

100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的片仔癀处理后肺癌细胞中上皮标志物 E-cadherin 蛋白水平升高, 间质标志物

ng/mL 的 Akt 信号通路激活剂 IGF-1 共同处理后, 肺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力升高, MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平也升高, E-cadherin 蛋白水平降低, vimentin 蛋白水平升高, Akt 磷酸化水平也升高, 结果见表 4 和图 2。Akt 信号通路激活剂 IGF-1 可以减弱片仔癀抗肺癌细胞增殖、侵袭、迁移和 EMT 作用。

3 讨论

片仔癀拥有超过 450 多年的药用历史, 是我国传统的中成药, 由多种天然药材组成, 是国家重点保护的重要制剂^[8-9]。临床药理学表明, 片仔癀具有

表 3 片仔癀对 A549 细胞中 E-cadherin、vimentin、p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Effect of Pien Tze Huang on protein expression of E-cadherin, vimentin, and p-Akt in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	E-cadherin	vimentin	p-Akt/Akt
对照	—	0.27 ± 0.06	0.40 ± 0.05	0.52 ± 0.06
片仔癀	100	$0.41 \pm 0.04^*$	$0.30 \pm 0.03^*$	$0.41 \pm 0.03^*$
	200	$0.69 \pm 0.07^*$	$0.24 \pm 0.01^*$	$0.24 \pm 0.04^*$

表 4 Akt 信号通路激活剂 IGF-1 和片仔癀处理后 A549 细胞增殖、侵袭、迁移和相关蛋白表达水平变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 4 Changes of proliferation, migration, and invasion, and expression of related protein of A549 cells treated with IGF-1 and Pien Tze Huang ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	p-Akt/Akt	E-cadherin	vimentin	MMP-2	MMP-9	侵袭数目	迁移数目	A490
片仔癀	0.35±0.06	0.42±0.05	0.31±0.02	0.34±0.04	0.62±0.07	105.64±10.34	118.37±11.05	0.54±0.06
片仔癀+IGF-1	0.63±0.07 [#]	0.32±0.03 [#]	0.52±0.04 [#]	0.43±0.03 [#]	0.76±0.05 [#]	137.31±9.53 [#]	156.29±13.56 [#]	0.67±0.05 [#]

与片仔癀组比较: [#] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs Pien Tze Huang group

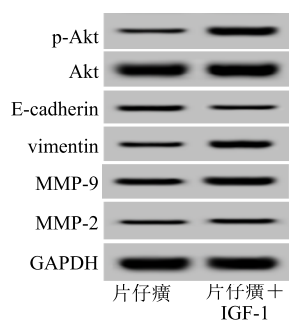


图 2 Akt 信号通路激活剂 IGF-1 和片仔癀处理后 A549 细胞中相关蛋白表达水平

Fig. 2 Expression of related protein of A549 cells treated with IGF-1 and Pien Tze Huang

保护脑组织和抗肝炎、胆囊炎、肝损伤等作用, 对于结肠癌等肿瘤也具有抵抗作用^[10]。目前对于片仔癀抗肿瘤作用的研究表明, 片仔癀处理可以在体外抑制舌鳞癌、骨肉瘤、卵巢癌等肿瘤细胞的生长, 对于肿瘤细胞的侵袭和迁移也具有抑制作用^[6,11-12]。本实验在肺癌细胞中证实了片仔癀具有抵抗肺癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用, 说明片仔癀在肺癌细胞中的作用与在其他肿瘤中的研究报道结果一致, 均提示片仔癀具有抗肿瘤功效。

肿瘤细胞 EMT 是一种发生于肿瘤转移之前的病理现象, 表现为上皮细胞特性逐渐消失, 并逐渐出现间质细胞特征, 发生 EMT 的肿瘤细胞更容易发生迁移和侵袭^[13-14]。E-cadherin 和 vimentin 是细胞 EMT 的标志蛋白, E-cadherin 是上皮细胞标志蛋白, vimentin 是间质细胞标志蛋白, E-cadherin 水平下降和 vimentin 水平升高是细胞发生 EMT 的重要特征^[15-16]。肿瘤转移除了与细胞 EMT 有关之外, 还与细胞降解外基质有关, 肿瘤细胞合成的基质金属蛋白酶是目前发现的细胞外基质降解的关键, MMP-2 和 MMP-9 是基质金属蛋白酶家族的成员, 其二者表达水平升高是肿瘤转移能力增强的标志^[17]。片仔癀能够降低骨肉瘤细胞中 MMP-9 等表达水平, 对于大

肠癌细胞 EMT 具有抑制作用^[12,18]。本实验结果表明, 片仔癀处理后的肺癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平降低, E-cadherin 蛋白水平升高并且 vimentin 蛋白水平下降, 说明片仔癀可以抑制肺癌细胞 EMT 和合成 MMP-9 及 MMP-2, 这提示片仔癀具有抗肺癌细胞转移潜能的作用, 与细胞侵袭和迁移检测结果一致。

目前对于片仔癀抗肿瘤具体调控机制尚不明确, 在骨肉瘤中的研究表明, 片仔癀可以下调骨肉瘤细胞中 Akt 信号通路的激活水平, 从而影响骨肉瘤细胞的生长和耐药等特性^[19]。Akt 是存在于人体组织中的信号调节通路, 不仅参与人体内正常信号转导, 还与人类的疾病发生有关^[20]。在肿瘤中的研究报道已经证实, Akt 信号通路在肿瘤中过度激活可以促进肿瘤的转移和进展, 而靶向抑制 Akt 信号通路的激活可能是肿瘤治疗的靶点^[21]。正常情况下的 Akt 不具备调节功能, 其只有被活化后形成 p-Akt 才可以促进 Akt 信号激活^[22]。本实验发现, 片仔癀可以降低肺癌细胞中 Akt 信号通路的激活水平, 并且激活 Akt 信号通路可以减弱片仔癀的抗肺癌细胞作用, 说明片仔癀可以通过下调 Akt 信号通路的激活水平发挥抑制肺癌细胞增殖、侵袭和迁移作用。

综上, 片仔癀可以在体外发挥抗肺癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用, 片仔癀可能是肺癌治疗的有效药物, 抑制 Akt 信号通路激活水平是片仔癀调控肺癌细胞增殖和转移潜能的作用机制之一, 以后会在多株肺癌细胞及体内进行验证。目前对于片仔癀的抗肿瘤作用机制仍不明确, 还需要在今后的实验中进行具体探讨。

参考文献

- [1] Charlotte R, Zhang N, Ellie C, *et al.* Development of a companion diagnostic PD-L1 immunohistochemistry assay for pembrolizumab therapy in non-small-cell lung cancer [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2016, 24(6): 392-397.

- [2] Ruizmartinez M, Navarro A, Marrades R M, *et al.* YKT6 expression, exosome release, and survival in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51515-51524.
- [3] 黄秋妹, 许文, 沙玫, 等. 片仔癀的药理及临床研究进展 [J]. 海峡药学, 2017, 29(5): 60-64.
- [4] 张俐, 于波, 林建华. 中药片仔癀胶囊对骨肉瘤 U-2OS 细胞诱导凋亡的作用 [J]. 中国骨伤, 2009, 22(4): 265-268.
- [5] 齐飞. 基于 Notch 通路探讨片仔癀对大肠癌干细胞增殖、凋亡、分化的影响及作用机制 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [6] 何凡, 巫慧妮, 成建定, 等. 片仔癀对人卵巢癌 OVCAR-3 细胞增殖、凋亡及周期的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(3): 401-404.
- [7] Li C, Lyu J, Meng Q H. MiR-93 Promotes tumorigenesis and metastasis of non-small cell lung cancer cells by activating the PI3K/Akt pathway via inhibition of LKB1/PTEN/CDKN1A [J]. *J Cancer*, 2017, 8(5): 870-879.
- [8] 张立海, 慈慧, 管涛. 片仔癀的合理应用研究 [J]. 首都食品与医药, 2016, 23(18): 84-85.
- [9] 张燕, 王琪鸿, 牛素生, 等. 片仔癀与阿霉素联用对骨肉瘤耐药细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 705-708.
- [10] 林明和, 朱德增. 片仔癀联合化疗治疗毒热瘀结型晚期结肠癌临床研究 [J]. 福建中医药, 2012, 43(1): 8-9.
- [11] 张忠提, 王丹, 王振华. 片仔癀对舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞生物学行为的抑制作用 [J]. 中国医科大学学报, 2017, 46(10): 899-902.
- [12] 关君一, 张俐. 片仔癀对骨肉瘤 U-2OS 细胞 MMP-9 表达的影响 [J]. 福建中医药, 2011, 42(6): 48-50.
- [13] 梁冰, 刘灿, 王峰. miRNA-138 在 TGF- β 1 诱导的乳腺癌上皮间质转化发生中的作用 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2017, 52(6): 753-757.
- [14] Yu C C, Chen P N, Peng C Y, *et al.* Suppression of miR-204 enables oral squamous cell carcinomas to promote cancer stemness, EMT traits, and lymph node metastasis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 20180-20192.
- [15] Wang L, Zhao Z, Feng W, *et al.* Long non-coding RNA TUG1 promotes colorectal cancer metastasis via EMT pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51713-51719.
- [16] Imani S, Wei C, Cheng J, *et al.* MicroRNA-34a targets epithelial to mesenchymal transition-inducing transcription factors (EMT-TFs) and inhibits breast cancer cell migration and invasion [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 21362-21379.
- [17] 罗真真, 张震, 乔亚敏, 等. 萝卜硫素对结直肠癌 SW620 细胞增殖、凋亡及迁移的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2017, 52(3): 281-284.
- [18] 陈宏伟. 基于 HIF-1 信号通路探讨片仔癀对缺氧诱导大肠癌上皮间质转化的作用机制 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2015.
- [19] 林海英, 刘俊宁, 陈炳艺, 等. 片仔癀通过 PI3K/Akt 信号通路诱导人骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡 [J]. 云南中医学院学报, 2015, 38(5): 7-11.
- [20] Bugide S, Gonugunta V K, Penugurti V, *et al.* HPIIP promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance in ovarian cancer cells through PI3K/AKT pathway activation [J]. *Cell Oncol*, 2017, 40(2): 1-12.
- [21] Dai Y, Jin S, Li X, *et al.* The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1354-1368.
- [22] Li Y, Guo G, Song J, *et al.* B7-H3 promotes the migration and invasion of human bladder cancer cells via the PI3K/Akt/STAT3 signaling pathway [J]. *J Cancer*, 2017, 8(5): 816-824.