

PI3K/Akt/NF- κ B通路调控ABCB1/P-gp介导的人结肠癌细胞多药耐药的研究

隋华¹ 付晓伶¹ 潘树芳² 石晓兰² 靳宝辉¹ 朱惠蓉¹ 任建琳³ 李琦^{1*}

1. 上海中医药大学附属曙光医院肿瘤科, 上海 201203;

2. 上海中医药大学附属普陀医院肿瘤科, 上海 200062;

3. 上海市中医医院肿瘤科, 上海 200071

[摘要] 背景与目的: 肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR)基因的表达是目前化疗失败的主要原因, 磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K)信号通路参与肿瘤多药耐药的发生, 但PI3K信号通路与多药耐药的机制尚不明确。本研究旨在探讨PI3K/Akt信号通路及其下游靶点对ATP结合蛋白亚家族1抗体(ATP-binding cassette sub-family B member 1, ABCB1)基因编码的P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)介导的人结肠癌耐奥沙利铂细胞株HCT-116/L-OHP细胞多药耐药性的调控作用。**方法:** 将PI3K特异性抑制剂LY294002 (20 μ mol/L)处理人结肠癌HCT-116/L-OHP细胞2 h后, 用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)检测细胞对奥沙利铂的敏感性; 蛋白质印迹法(Western blot)检测相关耐药蛋白P-gp、肺耐药蛋白(lung resistance-related protein, LRP)、多药耐药相关蛋白-2(multidrug resistance-related-2, MRP-2)以及PI3K/Akt信号通路下游蛋白Akt、p-Akt、I κ B、p-I κ B的表达变化; CHIP-PCR法检测核转录因子 κ B(NF- κ B)对ABCB1基因启动子的影响。**结果:** 阻断PI3K/Akt信号通路激活后, 奥沙利铂对HCT-116/L-OHP细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)由(157.48 \pm 16.73) μ g/mL降至(53.68 \pm 3.18) μ g/mL, 逆转指数为2.93 (P <0.01)。HCT-116/L-OHP细胞的p-Akt、p-I κ B和P-gp的表达水平明显下降(P <0.01), Akt、I κ B、LRP和MRP-2表达变化不明显。NF- κ B能够与ABCB1基因启动子区域结合。**结论:** 阻断PI3K/AKT信号通路可增强人结肠癌HCT-116/L-OHP耐药细胞的药物敏感性, 抑制p-Akt和p-I κ B的磷酸化表达水平, 逆转P-gp介导的肠癌多药耐药。

[关键词] 结肠癌; 多药耐药; P-糖蛋白; 磷脂酰肌醇-3-激酶; 核转录因子 κ B

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.02.005

中图分类号: R735.3+5 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)02-0106-06

PI3K/Akt/NF- κ B regulate ABCB1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in colon carcinoma cells SUI Hua¹, FU Xiao-ling¹, PAN Shu-fang², SHI Xiao-lan², JIN Bao-hui¹, ZHU Hui-rong¹, REN Jian-lin³, LI Qi¹ (1. Department of Medical Oncology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Medical Oncology, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 3. Department of Oncology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China)

Correspondence to: LI Qi E-mail: lzwf@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** Multidrug resistance (MDR) is the dominating obstacle to the chemotherapy. There is strong evidence that the phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) signaling pathway is involved in MDR phenotype, however, the mechanism of MDR occurrence is still unknown. This study tended to investigate the regulating effect of PI3K/Akt signaling pathway and its downstream target genes in P-glycoprotein (P-gp) (ABCB1 gene encoding)-mediated MDR in human colon carcinoma HCT-116/L-OHP cells. **Methods:** Pretreatment with PI3K

基金项目: 国家自然科学基金(No: 81373862、81202812); 上海市科委资助项目(No: 13140902500); 上海市教委资助项目(No: 2011JW57、12ZZ118); 上海市卫生局科研项目(No: 20114Y013、2010019); 上海市中医药事业发展三年行动计划(No: ZYSNXD-CC-YJXY-JS20)。

通信作者: 李琦 E-mail: lzwf@hotmail.com

selective inhibitor LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h, the sensitivity of L-OHP was evaluated by the CCK-8 (cell counting kit-8) assay in HCT-116/L-OHP cells, and the expressions of P-gp, LRP, MRP-2, Akt, p-Akt, I κ B and p-I κ B were evaluated by Western blot. The activity of ABCB1 promoter was evaluated by chromatin immunoprecipitation analysis (CHIP). **Results:** After inhibiting the activity of PI3K/Akt signaling pathway, the IC₅₀ value of L-OHP decreased from (157.48 \pm 16.73) $\mu\text{g/mL}$ to (53.68 \pm 3.18) $\mu\text{g/mL}$ in HCT-116/L-OHP cells, and the reversal index was 2.93 (P <0.01). The expressions of P-gp, p-Akt and p-I κ B were down-regulation compared with the control group (P <0.01), but the expressions of LRP, MRP-2, Akt and I κ B didn't change significantly. CHIP result has confirmed that NF- κ B protein could bind to the region of ABCB1 gene promoter in HCT116/L-OHP cells. **Conclusion:** Blocking of PI3K/Akt/NF- κ B signal pathway could increase the drug sensitivity to MDR cells, inhibit the phosphorylation of p-Akt and p-I κ B, and reversing ABCB1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in colon carcinoma cells.

[**Key words**] Colon carcinoma; Multidrug-resistance; P-glycoprotein; Phosphoinositide 3-kinases (PI3K); Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B (NF- κ B)

肿瘤细胞的多药耐药(multidrug resistance, MDR)基因的表达是肿瘤化疗失败的最常见而又最难解决的问题之一^[1], 因其机制复杂, 目前尚未得到有效解决。肿瘤细胞产生耐药性与多种因素有关, 其中最主要的原因是ATP结合膜转运蛋白家族过表达诱发的细胞外排作用加强, 细胞内药物浓度降低, 从而引起肿瘤细胞对化疗药物的敏感性降低^[2]。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K)信号通路参与肿瘤多药耐药的发生。近年来研究发现, PI3K/Akt信号转导通路在细胞增殖、分化、肿瘤的血管形成和转移等方面起着重要的作用^[3-5]。有研究表明, PI3K/Akt信号转导通路的激活参与肿瘤多药耐药的发生、发展^[6], 但是具体的调控机制尚不明确。本实验选用人结肠癌奥沙利铂耐药细胞株HCT-116/L-OHP及其敏感株HCT-116细胞, 给予PI3K信号通路特异性的抑制剂(LY29400)干预, 观察细胞的药物敏感性、相关耐药蛋白P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、LRP、MRP-2以及PI3K/Akt信号通路上下游基因的表达变化, 探讨PI3K/Akt信号转导通路对人结肠癌多药耐药细胞生物功能和耐药性的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂

人结肠癌细胞株HCT-116及人结肠癌耐奥

沙利铂细胞株HCT-116/L-OHP购自上海博谷生物科技有限公司。细胞计数试剂盒8-(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒购自上海同仁化工有限公司; PI3K/Akt信号通路特异性的抑制剂LY294002购于美国Serologlcais公司; 奥沙利铂50 mg(批号: H20000337)购于江苏恒瑞医药股份有限公司。总RNA抽提试剂RNAiso Reagent、定量PCR试剂购于日本TaKaRa公司; *GAPDH*和*ABCB1*基因上下游引物和探针由生物工程(上海)有限公司设计并合成。蛋白质抽提试剂盒(Sangon S-415)、BCA蛋白质定量试剂购自上海博谷生物科技有限公司; SDS-PAGE电泳试剂购自上海博彩生物技术有限公司; 兔抗人P-gp、LRP、MRP-2、Akt、p-Akt、I κ B、p-I κ B单克隆抗体购自美国CST公司。

1.1.2 仪器

Mastercycler ep银质梯度PCR仪、Biophotometer生物分光光度计、5804R高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司; CKX41/U-RFLT50荧光倒置显微镜购自日本OLYMPUS公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HCT-116/L-OHP及HCT-116细胞于含10%小牛血清的RPMI-1640培养液(含青霉素、链霉素各100 U/mL)中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂体积分数为5%、饱和湿度培养箱中常规培养。HCT-116/L-OHP细胞的奥沙利铂维持浓度为10 $\mu\text{g/mL}$, 实验在停用奥沙利铂培养2周后取处于对数生长期的细

胞进行。

1.2.2 用CCK-8检测细胞增殖情况

按照HCT-116细胞株敏感组, HCT-116/L-OHP细胞株耐药组, HCT-116/L-OHP+LY294002(20 μ mol/L, 2 h)分组, 将各组调整至 1×10^5 /mL, 以每孔100 μ L接种于96孔细胞培养板中, 在37 $^{\circ}$ C、CO₂体积分数为5%、饱和湿度培养箱中常规培养, 待细胞贴壁后3~5 h后, 除对照组外各自加入含不同浓度化疗药物的培养基100 μ L, 每组设4个复孔。培养48 h后每孔加10% CCK-8的培养基, 培养箱内继续培养1.5 h后, 于酶标仪检测450 nm波长处吸光度(A值)。计算细胞的生长抑制率、耐药指数(resistance factor, RF)和逆转指数(resistance index, RI)。计算公式: 生长抑制率 $= (1 - A_{\text{实验组平均值}} / A_{\text{对照组平均值}}) \times 100\%$; RF=某种药物针对抗药性细胞的IC₅₀/某种药物针对敏感性细胞的IC₅₀; RI=不加逆转剂时某种药物针对抗药性细胞的IC₅₀/加入逆转剂后某种药物针对抗药性细胞的IC₅₀。实验重复3次。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测P-gp、LRP、MRP-2、Akt、p-Akt、I κ B、p-I κ B蛋白的表达

收集处于对数生长期细胞约 2×10^6 个/组, 用预冷PBS洗涤2次, 吸弃PBS, 加入预冷的蛋白裂解液在冰上裂解0.5 h, 14 000 \times g离心15 min, 吸弃上清液; BCA分析试剂测定蛋白质浓度。50 μ g总蛋白质在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳中电泳, PVDF膜转膜, 5%脱脂奶粉封闭非特异性抗体, 然后分别加入各种抗体, 按1:1 000封闭, 4 $^{\circ}$ C过夜。次日用TBS/T洗膜3次, 再加入HRP标记的二级抗体, 置室温温育膜1 h, ECL显色。GAPDH作内参对照, 分析灰度值进行计算灰度系数比。

1.2.4 染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)RT-PCR

按照EZ-ChIP试剂盒步骤, 直接在细胞培养液中加入适量37%甲醛, 致其终浓度为1%, 37 $^{\circ}$ C温育10 min, 进行交联。用预冷的含1 mmol/L PMSF的PBS洗涤细胞, 收集细胞至浓度为 1×10^6 个。4 $^{\circ}$ C、3 000 \times g离心5 min去上清

液, 收集细胞后加入SDS裂解液重悬。超声破碎DNA后, 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g离心5 min, 取出20 μ L样品作为阳性对照(Input)用于后续检测。其余近2 mL样品加入70 μ L Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA, 于4 $^{\circ}$ C缓慢摆动混匀30 min。于4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g条件下离心1 min, 将上清液转移至新的2 mL离心管中, 加入适量p65(NF- κ B)、IgG单克隆抗体(阴性对照)4 $^{\circ}$ C缓慢摆动混匀过夜。加入60 μ L Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA, 于4 $^{\circ}$ C缓慢摆动混匀60 min, 以沉淀一抗识别的蛋白或相应复合物。于4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g条件下离心1 min, 吸尽上清液后依次用如下溶液对沉淀进行洗涤, 每次用1 mL的洗涤液5 $^{\circ}$ C缓慢摆动洗涤3~5 min, 随后于4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g条件下离心1 min, 弃上清液。所获得的沉淀即可用于PCR扩增目的基因序列。

RT-PCR: 沉淀加入250 μ L洗脱缓冲液, Vortex混匀, 室温摆动洗脱3~5 min, 1 000 \times g离心1 min, 取上清液, 同样步骤再次洗脱取上清液, 2次上清液混合共计约500 μ L。500 μ L上清液中加入20 μ L 5 mol/L NaCl溶液, 阳性对照的20 μ L样品加入1 μ L NaCl溶液, 混匀。65 $^{\circ}$ C加热4 h去除蛋白和基因组DNA之间的交联。PCR验证ChIP: 提纯的DNA进行PCR分析, 模板分别为无DNA对照、阴性抗体免疫共沉淀的DNA、阳性对照DNA(InputDNA)、阳性抗体免疫共沉淀的DNA。引物为针对ABC1基因启动子的引物对(引物序列为顺义链: 5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3'; 反义链: 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3')。PCR产物大小为379 bp。热循环条件: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 65 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 共30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。反应结束后各取10 μ L PCR产物在2%琼脂糖凝胶上电泳。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件包处理数据。各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两独立样本均数比较, 采用独立样本 *t* 检验, 多样本均数比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用SNK-*q*检验(Student-Newman-Keuls法), 求出组间差异。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人结肠癌HCT-116/L-OHP细胞对化疗药物敏感性的影响

奥沙利铂对HCT-116细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为 $(19.84 \pm 1.42) \mu g/mL$, 奥沙利铂对HCT-116/L-OHP细胞的 IC_{50} 为 $(157.48 \pm 16.73) \mu g/mL$, 耐药指数为7.94, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。HCT-116/L-OHP细胞加入PI3K抑制剂LY294002($20 \mu mol/L$)2 h后, 奥沙利铂对其的 IC_{50} 降至 $(53.68 \pm 3.18) \mu g/mL$, 逆转指数为2.93, 与未加LY294002组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图1)。提示抑制PI3K/Akt信号通路的激活可以增强人结肠癌HCT-116/L-OHP细胞对奥沙利铂的敏感性。

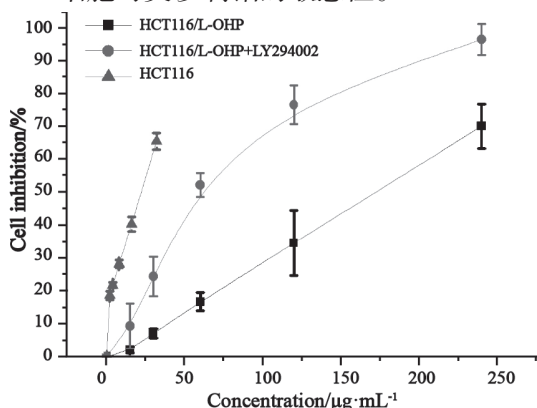


图1 LY294002对HCT-116/L-OHP细胞生存率的影响

Fig. 1 Effect of LY294002 on cell survival in HCT-116/L-OHP cells

2.2 人结肠癌HCT-116/L-OHP细胞对相关耐药蛋白P-gp、MRP-2、LRP表达的影响

Western blot检测结果显示, 人结肠癌HCT-116/L-OHP耐药细胞的P-gp、LRP、MRP-2蛋白相对表达量均明显高于敏感细胞HCT-116($P < 0.01$)。将LY294002作用HCT-116/L-OHP后, P-gp的表达降低明显($P < 0.01$), 但是LRP、MRP-2的表达差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。

2.3 LY294002对人结肠癌HCT-116/L-OHP细胞Akt、p-Akt、I κ B、p-I κ B表达的影响

与敏感细胞HCT-116相比, 人结肠癌耐

药细胞HCT-116/L-OHP的p-Akt(Thr307)、p-Akt(Ser473)以及p-I κ B蛋白的相对表达量均明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。但是Akt和I κ B蛋白的相对表达量差异无统计学意义($P > 0.05$), 提示PI3K/Akt/NF- κ B信号通路在肠癌耐药细胞中处于激活状态。当HCT-116/L-OHP细胞加入LY294002后, p-Akt(Ser473)和p-I κ B蛋白的表达下调, 与HCT-116/L-OHP细胞相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。但是p-Akt(Thr307)没有受到LY294002的影响, 与未加入LY294002的耐药细胞相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示阻断PI3K/Akt信号通路后可降低HCT-116/L-OHP耐药细胞p-Akt(Ser473)和p-I κ B蛋白的表达, 抑制p-Akt(Ser473)的磷酸化可以阻断p-Akt/p-I κ B的信号传递(图3)。

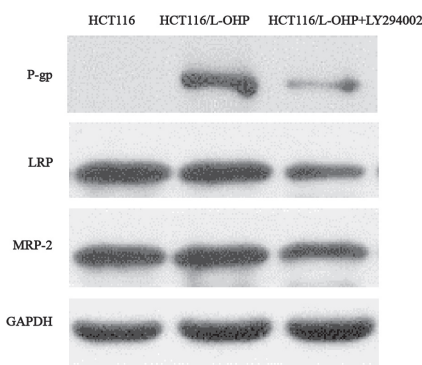


图2 LY294002对人结肠癌HCT-116/L-OHP细胞P-gp、MRP-2、LRP表达的影响

Fig. 2 Effect of LY294002 on P-gp, MRP-2, LRP expression in HCT-116/L-OHP cells

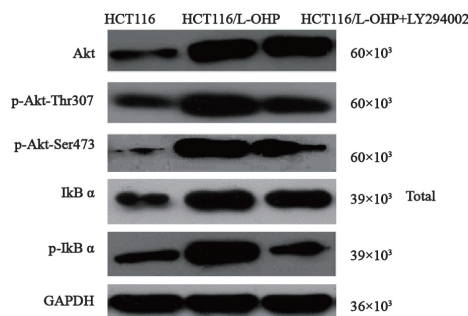


图3 LY294002对HCT116/L-OHP细胞内PI3K/Akt/NF- κ B信号通路的影响

Fig. 3 Effect of LY294002 on PI3K/Akt/NF- κ B signal pathway in HCT-116/L-OHP cells

2.4 NF- κ B对ATP结合蛋白亚家族1抗体(ATP-binding cassette sub-family B member 1, ABCBI)基因启动子的影响

CHIP—PCR结果分析显示, 空白对照无扩增产物条带; 阴性IgG抗体(阴性对照)沉淀所得DNA的扩增产物少, 电泳条带最弱; 用未经抗体沉淀的Input DNA(阳性对照)扩增的产物电泳条带最强; 用NF- κ B抗体沉淀所得DNA作为模板扩增出了ABCBI基因的条带, 提示NF- κ B能够与ABCBI基因在启动子区域相结合, 启动ABCBI基因的转录程序(图4)。

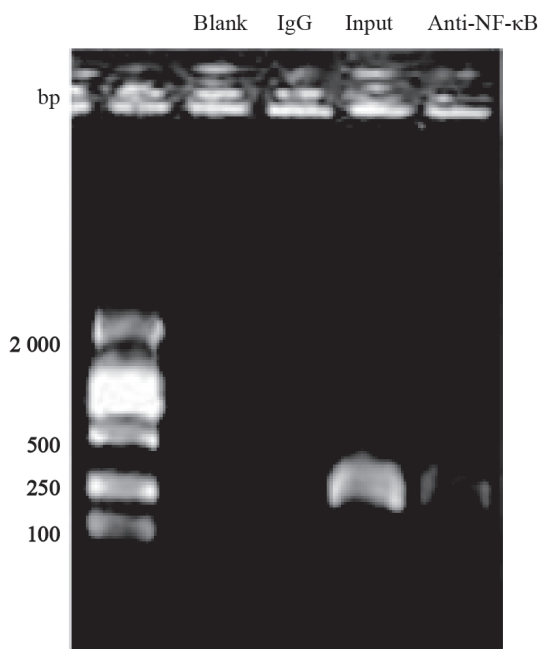


图4 NF- κ B对ABCBI基因启动子的影响

Fig. 4 Effect of NF- κ B on ABCBI promoter

Blank: PCR results with no cDNA; IgG: Mouse monoclonal IgG; Input: cDNA from cell lysates without RIP procedure; Anti-NF- κ B: PCR results with NF- κ B antibody.

3 讨 论

大量临床研究证实, 大肠癌的多药耐药与ATP结合膜转运蛋白家族中的P-gp、MRP和LRP的过表达相关^[7-8]。P-gp是相对分子质量为 170×10^3 的跨膜糖蛋白, 由ABCBI基因编码, 具有12个跨膜区和2个细胞内ATP连结点^[9]。当肿瘤细胞长期接触抗癌药物时, ABCBI基因被诱导扩增, P-gp被大量表达, 其ATP结合点上连接的ATP水解后释放的能量能将抗癌药物转

移到细胞外, 使细胞内蓄积药物减少, 降低作用靶点部位的药物浓度, 导致化学治疗的效果下降乃至消失。本课题组前期研究发现, P-gp的过表达与结肠癌HCT8/V细胞的多药耐药相关^[10], 但是具体机制尚不明确。

近年来的研究表明, PI3K/Akt信号途径与肿瘤的多药耐药密切相关^[11]。在PI3K信号转导途径中, 当上游信号途径刺激细胞膜表面时, 导致酪氨酸激酶自磷酸化或磷酸化其他底物后, 可在细胞膜内表面产生PI3K结合位点, PI3K激活下游的Akt。活化的Akt可以通过磷酸化其473位的丝氨酸位点(Ser473)或者第307位苏氨酸位点(Thr307), 进而激活或抑制其下游靶蛋白从而介导细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和细胞周期的调控。Jiao等^[12]研究发现化疗药物能通过激活PI3K显著提高磷酸化的Akt水平, 最终导致乳腺癌细胞对化疗药物耐药; 进一步研究证实, 阻断PI3K/Akt信号转导通路可导致P-gp蛋白表达下调, 从而逆转多药耐药。此外, Abdul等^[13]发现在耐药的结肠腺癌细胞HT29RDB中, PI3K-Akt信号途径的阻滞剂LY294002与多柔比星联合使用能够在MRP1介导的耐药机制中发挥治疗作用, 可使细胞内多柔比星药物浓度增加3倍以上。但是, PI3K/Akt信号通路的激活是如何改变ABCBI基因的表达以及影响程度, 目前都尚未明确。

作为PI3K/Akt信号通路下游的核转录因子, NF- κ B是一种广泛存在于真核细胞内的基因多向性转录因子, 可以激活多种细胞进程的基因转录, 包括炎症反应、细胞增殖、分化及凋亡等^[14]。典型的NF- κ B以p50-p65异源二聚体组成, 在大多数细胞的静息状态下, NF- κ B与其抑制分子I κ B- α 结合存在于细胞质中^[15]。当细胞受到外界信号(如脂多糖、特异的细胞因子)刺激时, PI3K/Akt信号通路上的Akt蛋白发生磷酸化, 引起一系列连锁的酶促反应, 促使下游I κ B- α 发生磷酸化而与NF- κ B解离, NF- κ B激活而移位进入细胞核内, 与DNA上相应位点结合来发挥生物学效应。已有研究在鼠肝癌细

胞中发现, NF- κ B可以直接与ABCB1b启动子区-205至+42之间的序列(5'-GGGGAATTCC-3')结合, 激活ABCB1b基因的转录、扩增, 诱发P-gp的过度表达^[16]。

本研究显示, 应用PI3K/Akt信号通路特异性抑制剂LY294002后, 奥沙利铂对HCT-116/L-OHP细胞的IC₅₀由(157.48±16.73) μ g/mL降至(53.68±3.18) μ g/mL, 说明阻断PI3K/Akt信号通路能降低细胞的耐药性, 使HCT-116/L-OHP细胞的抑制率增高。进一步研究发现, LY294002可以降低HCT-116/L-OHP细胞P-gp的表达, 提示PI3K/Akt信号通路可能是通过诱导P-gp的过表达, 从而引起肠癌耐药的发生。Western blot检测结果显示, LY294002主要是通过抑制HCT-116/L-OHP耐药细胞p-Akt(Ser473)和p-I κ B磷酸化的发生, 提示相对于HCT-116敏感细胞, HCT-116/L-OHP耐药细胞中存在PI3K/p-Akt/p-I κ B信号途径的异常活化。ChIP-PCR检测结果显示, NF- κ B能够与ABCB1基因在启动子区域相结合, 启动ABCB1基因的转录, 引起P-gp的过表达。

综上所述, PI3K信号通路通过激活人结肠癌HCT-116/L-OHP细胞的p-Akt/p-I κ B信号途径, 促使NF- κ B与ABCB1基因在启动子区域相结合, 启动ABCB1基因的转录, 引起P-gp的过表达。PI3K信号通路的抑制剂LY294002可能是通过阻断该途径, 从而增强耐药细胞对化疗药物的敏感性, 逆转肠癌多药耐药。

[参 考 文 献]

- [1] SUI H, ZHOU S, WANG Y, et al. COX-2 contributes to P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via phosphorylation of c-Jun at Ser63/73 in colorectal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(5): 667-675.
- [2] YU M, OCANA A, TANNOCK I F. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2013, 32(1-2): 211-227.
- [3] FANG Y, XUE J L, SHEN Q, et al. miR-7 Inhibits tumor growth and metastasis by targeting the PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2012, 55(6): 1852-1862.
- [4] GUO H, GAO M, LU Y, et al. Coordinate phosphorylation of multiple residues on single AKT1 and AKT2 molecules [J]. *Oncogene*, 2013. doi: 10.1038/onc.2013.301.
- [5] 郭崇勇, 柯卫锋, 宋科瑛, 等. PI3K/AKT通路参与调控乳腺癌多药耐药和侵袭转移的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(25): 4809-4812.
- [6] SUI H, FAN Z Z, LI Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells [J]. *J Int Med Res*, 2012, 40: 426-435.
- [7] FIGUEIREDO L L, PINTAO M C, OLIVEIRA L C, et al. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2008, 74(3): 163-168.
- [8] 潘树芳, 隋华, 李琦, 等. microRNAs调控消化系统肿瘤多药耐药的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(19): 1834-1840.
- [9] WARD A B, SZEWCZYK P, GRIMARD V, et al. Structures of P-glycoprotein reveal its conformational flexibility and an epitope on the nucleotide-binding domain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(33): 13386-13391.
- [10] 隋华, 周利红, 刘宣, 等. COX-2介导MDR1/P-gp调控人结肠癌细胞多药耐药的研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(4): 241-246.
- [11] 张晔, 刘云鹏. PI3K/Akt信号转导通路与肿瘤多药耐药研究进展 [J]. *中华临床医师杂志*, 2011, 5(2): 446-449.
- [12] JIAO M, NAN K J. Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1 α pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(2): 461-468.
- [13] ABDUL R, SERRA V, GYORFFY B, et al. The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1 [J]. *Oncogene*, 2006, 25(12): 1743-1752.
- [14] 刘海楠, 陈雷, 高彦宏. NF- κ B国外最新研究进展 [J]. *临床合理用药杂志*, 2011, 4(4): 159-160.
- [15] CHATURVEDI M M, SUNG B, YADAV V R, et al. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all' [J]. *Oncogene*, 2011, 30(14): 1615-1630.
- [16] TAKADA Y, KOBAYASHI Y, AGGARWAL B B. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF- κ B activation by inhibiting I κ B α kinase activation, thereby suppressing NF- κ B-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 17203-17212.

(收稿日期: 2013-10-30 修回日期: 2014-01-21)