

miR-143-5p 对镉致肾细胞凋亡的调控作用及其机制

陈志敏,谷大为,周明,严淑,石惠,蔡云清*

(南京医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:探讨 miR-143-5p 对镉诱导 LLC-PK1 细胞凋亡的调控作用及其机制。方法:通过基因芯片技术筛选出由镉引起的差异表达 miRNAs,并用实时定量 PCR 方法验证基因芯片结果的可靠性;应用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 miR-143-5p 的模拟物和抑制剂建立 miR-143-5p 高表达和低表达的模型,并结合 qRT-PCR 技术验证转染效果;Hoechst 33258 染色和 Annexin V-PI 双染法检测细胞凋亡;生物信息学分析结合实时定量 PCR 和 Western blot 验证 miR-143-5p 靶基因的表达;Western blot 分析 miR-143-5p 对细胞凋亡相关通路的调控作用。结果:镉可增强 LLC-PK1 细胞的 miR-143-5p 表达水平($P < 0.01$);转染 miR-143-5p 模拟物或抑制剂后,与对照组(miR-NC)比较,miR-143-5p 表达明显上调或下调($P < 0.01$);miR-143-5p 的过表达可促进 LLC-PK1 细胞凋亡($P < 0.01$);miR-143-5p 在 AKT3 的 mRNA 和蛋白水平上发挥靶向调控作用;miR-143-5p 过表达能抑制 p-Akt 和 p-Bad 蛋白表达,促进 caspase-9 和 caspase-3 蛋白上调。结论:miR-143-5p 可能通过作用于靶基因 AKT3,并抑制 Akt/Bad 信号通路,促进镉诱导 LLC-PK1 细胞的凋亡。

[关键词] 镉;凋亡;miR-143-5p;Akt

[中图分类号] R155.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-490-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150410

Regulatory effects and mechanisms of miR-143-5p on cadmium-induced apoptosis in LLC-PK1 cells

Chen Zhimin, Gu Dawei, Zhou Ming, Yan Shu, Shi Hui, Cai Yunqing*

(Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To study the regulatory effects and mechanisms of miR-143-5p on cadmium-induced apoptosis in LLC-PK1 cells. **Methods:** Microarray analysis was performed to detect dysregulated expression of miRNAs caused by cadmium. Reliability of microarray analysis was validated by quantitative real-time PCR. Over-expression and low expression of miR-143-5p were simulated by its mimic and inhibitor transient transfection with Lipofectamine 2000, and the effect was verified by qRT-PCR. Hoechst 33258 staining and AnnexinV-FITC/PI method were used to detect apoptosis. Target gene of miR-143-5p was validated by bioinformatics analysis, real-time PCR and Western blot. Western blot was performed to analyze the regulatory effect of miR-143-5p on apoptosis-related pathway. **Results:** The expression of miR-143-5p was up-regulated by cadmium ($P < 0.01$). Compared with the negative control (miR-NC) group, the expression of miR-143-5p was significantly up-regulated after miR-143-5p mimic and down-regulated by inhibitor transfection ($P < 0.01$). Over-expression of miR-143-5p markedly increased LLC-PK1 cells apoptosis ($P < 0.01$). The mRNA and protein levels of AKT3 were both targeted and regulated by miR-143-5p. Over-expression of miR-143-5p reduced protein levels of p-Akt and p-Bad and increased expression of caspase-9 and caspase-3. **Conclusion:** MiR-143-5p may promote cadmium-induced apoptosis via targeting AKT3 and inhibiting Akt/Bad signal pathway in LLC-PK1 cells.

[Key words] cadmium; apoptosis; miR-143-5p; Akt

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):490-495]

镉(cadmium)作为一种广泛存在的环境和工业污染物,被美国毒物药理委员会(ATSDR)列为第6

位危害人类健康的有毒物质。镉易蓄积于多种靶器官,肾脏是镉主要的靶器官之一,镉在体内的半衰期长达10~30年,长期低剂量的镉暴露,可对人体产生远期效应的危害^[1]。大量研究表明,镉性肾损伤

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:cai2941@163.com

与镉致肾细胞凋亡有关,而镉诱导肾细胞凋亡与氧化应激介导的线粒体通路密切相关^[2-3]。近年来,研究发现 microRNAs(miRNAs)对细胞凋亡发挥重要的调控作用^[4]。研究报道,基因芯片分析暴露于镉之后的细胞,发现多种 miRNAs 表达异常^[5]。然而,miRNAs 对镉诱导肾细胞凋亡的调控作用,目前尚不清楚。本研究通过基因芯片技术筛选出在镉致肾细胞凋亡的过程中差异表达的 miRNAs,并通过转染、qRT-PCR、Western blot 等实验方法,进一步探讨 miRNAs 在镉诱导肾细胞凋亡过程中发挥的调控作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

猪肾细胞 LLC-PK1 细胞系购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。细胞培养试剂 M199 培养基购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,氯化镉购自美国 Sigma 公司。qRT-PCR 试剂 SYBR green PCR master mix 购自大连 TaKaRa 公司,miRNA 引物、U6 引物、miRNA 模拟物和抑制剂由广州锐博生物公司设计合成,mRNA 引物由上海吉凯生物公司合成,转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。Hoechst 33258 染色试剂盒购自江苏碧云天生物技术公司,Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京优博奥公司。Western blot 所用一抗和 HRP 标记的鼠抗、兔抗均购自美国 CST 公司, β -actin 购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

LLC-PK1 细胞接种于含 3%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 M199 培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养,细胞贴壁生长。待细胞生长至约 80%融合时消化传代,取状态良好的细胞用于实验。

1.2.2 基因芯片及生物信息学分析

用 20 μ mol/L 的镉处理 LLC-PK1 细胞 12 h 后,与对照组细胞同时用 TRIzol 提取总 RNA,基因芯片杂交和分析由美国 LC Sciences 公司完成。基因芯片筛选出差异常表达的 miRNAs,其差异倍数至少大于 1.5 倍。TargetScan 在线软件用于靶基因的预测,猪的 3'UTR 区域来源于 Ensembl 数据库。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

提取各处理组总 RNA,逆转录成 cDNA 后,采

用 SYBR Green 荧光染料法与 ABI7300 荧光实时定量 PCR 仪,完成目的基因的检测。miRNAs 的 PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 20 s,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,70 $^{\circ}$ C 30 s,进行 40 个循环,以 U6 作为内参;mRNA 的 PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 31 s,进行 40 个循环,以 HPRT1 为内参。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法计算目的基因的相对表达水平。

1.2.4 细胞转染

取对数生长期的 LLC-PK1 细胞接种至不含抗生素的培养基中,待细胞密度达到 30%~50%进行转染。转染步骤及用量参照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂操作说明,miRNA mimic 和 inhibitor 用量参照广州锐博产品使用说明,以随机序列作为阴性对照(negative control,NC),未转染细胞作为空白对照。转染 4 h 后更换新鲜无双抗培养基,于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 的培养箱中继续培养 24 h 或于 12 h 后加镉处理,收集细胞用于后续实验。

1.2.5 Hoechst 33258 染色

取对数生长期的 LLC-PK1 细胞接种于 6 孔培养板中,待细胞密度达 60%左右,加药或转染处理后继续培养一定时间。然后吸尽培养液,每孔加入 0.5 ml 的固定液固定 10 min 后,用预冷的 PBS 洗 2 遍,每次 3 min。每孔加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液 5 min 后,PBS 洗 2 遍,每次 3 min。之后每孔滴一滴抗荧光淬灭封片液,于荧光显微镜 450 nm 波长处观察细胞凋亡的形态学改变并拍照。

1.2.6 Annexin V-PI 双染法检测细胞凋亡

约 2 \times 10⁵ 个/ml 的细胞接种于 60 mm 的培养皿中,经转染或加药处理后收集细胞,PBS 洗细胞 2 次,1 000 g 离心 5 min,弃上清,加入 400 μ l 的 Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC,轻轻混匀,4~8 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min 后,加入 10 μ l 的 PI 避光孵育 5 min,1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 Western blot

常规收集各处理组的细胞,提取总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μ l 的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭、一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜、洗膜、二抗(1:10 000)室温孵育 1 h、洗膜、化学发光显影、定影所得 Western blot 条带,由 Photoshop 软件处理后,在 Image J 分析软件中测得各自的总灰度值,进行定量比较分析,并采用自身 β -actin 灰度值校正。

1.3 统计学方法

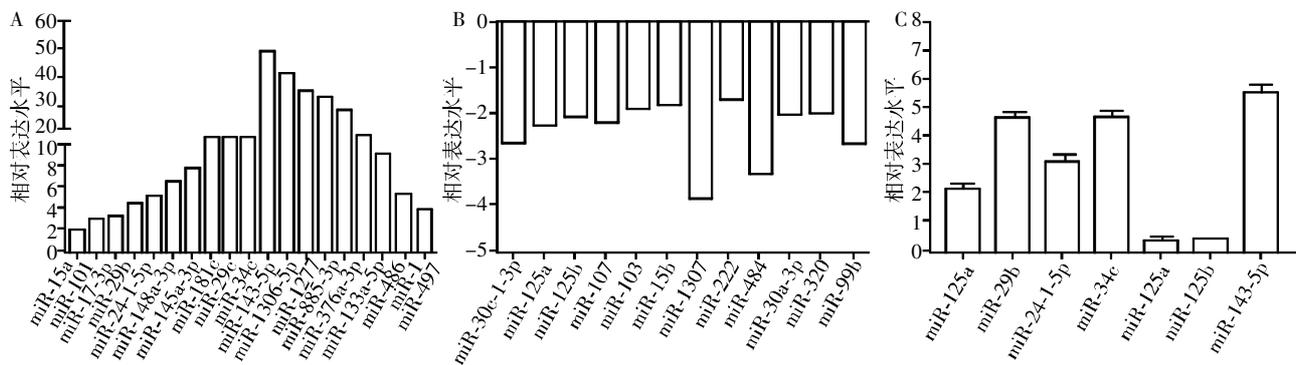
实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行作图,SPSS17.0 软件进行统计学分析。多组间指标的比较采用单因素方差分析,组间的两两比较采用 SNK 法,两样本指标的比较采用 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镉对 LLC-PK1 细胞 miRNAs 表达的影响

20 $\mu\text{mol/L}$ 的镉处理 LLC-PK1 细胞 12 h 后,应用基因芯片技术共筛选出 185 例差异表达的 miR-

NAs, 包括 160 个上调的 miRNAs 和 25 个下调的 miRNAs (部分结果见图 1A、1B)。其中,镉引起的 miR-143-5p 表达的改变最为明显,差异倍数高达 48.8 倍。根据相关文献,筛选出 7 个与凋亡可能相关的 miRNAs,用 qRT-PCR 实验验证基因芯片结果的可靠性(图 1C)。所选的 7 个 miRNAs 表达的变化趋势与基因芯片的结果一致,镉引起的 miR-143-5p 的表达上调最为明显。因此,本研究以 miR-143-5p 为代表,进一步研究其对镉致肾细胞凋亡的调控作用及其相关机制。



A: 基因芯片分析镉上调的 miRNAs 表达水平; B: 基因芯片分析镉下调的 miRNAs 表达水平; C: qRT-PCR 实验验证基因芯片结果。

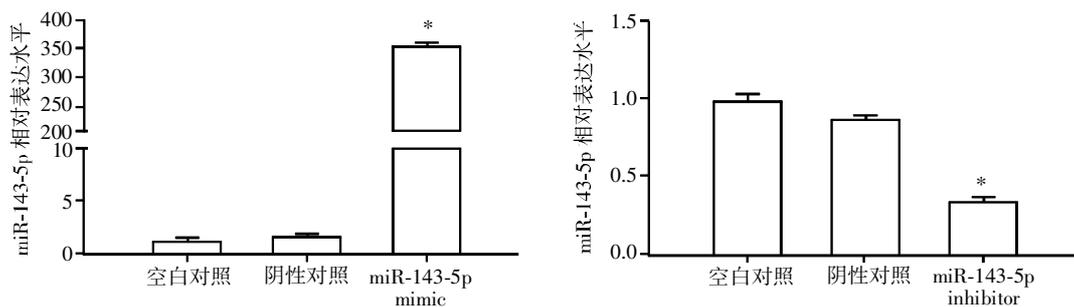
图 1 镉对 LLC-PK1 细胞 miRNAs 表达的影响

Figure 1 Effect of cadmium on the expression of miRNAs in LLC-PK1 cells

2.2 miR-143-5p 转染效果的验证

为了进一步验证 miR-143-5p 对镉诱导细胞凋亡的调控作用,通过对 LLC-PK1 细胞转染 miR-143-5p mimic (10 nmol/L) 和 inhibitor (50 nmol/L), 建立 miR-143-5p 过表达和低表达的模型。如图 2 所示,

用 qRT-PCR 实验技术检测转染后的 miR-143-5p 表达水平, 与阴性对照组比较, 转染 mimic 的 miR-143-5p 的表达明显增高 ($P < 0.01$); 转染 miR-143-5p 抑制剂组与阴性对照组比较, miR-143-5p 的表达水平明显下调 ($P < 0.01$)。结果提示模型制备成功,



与阴性对照组比较, * $P < 0.01$ 。

图 2 qRT-PCR 实验验证转染后 miR-143-5p 的表达水平

Figure 2 Validation of miR-143-5p expression after transfection by qRT-PCR

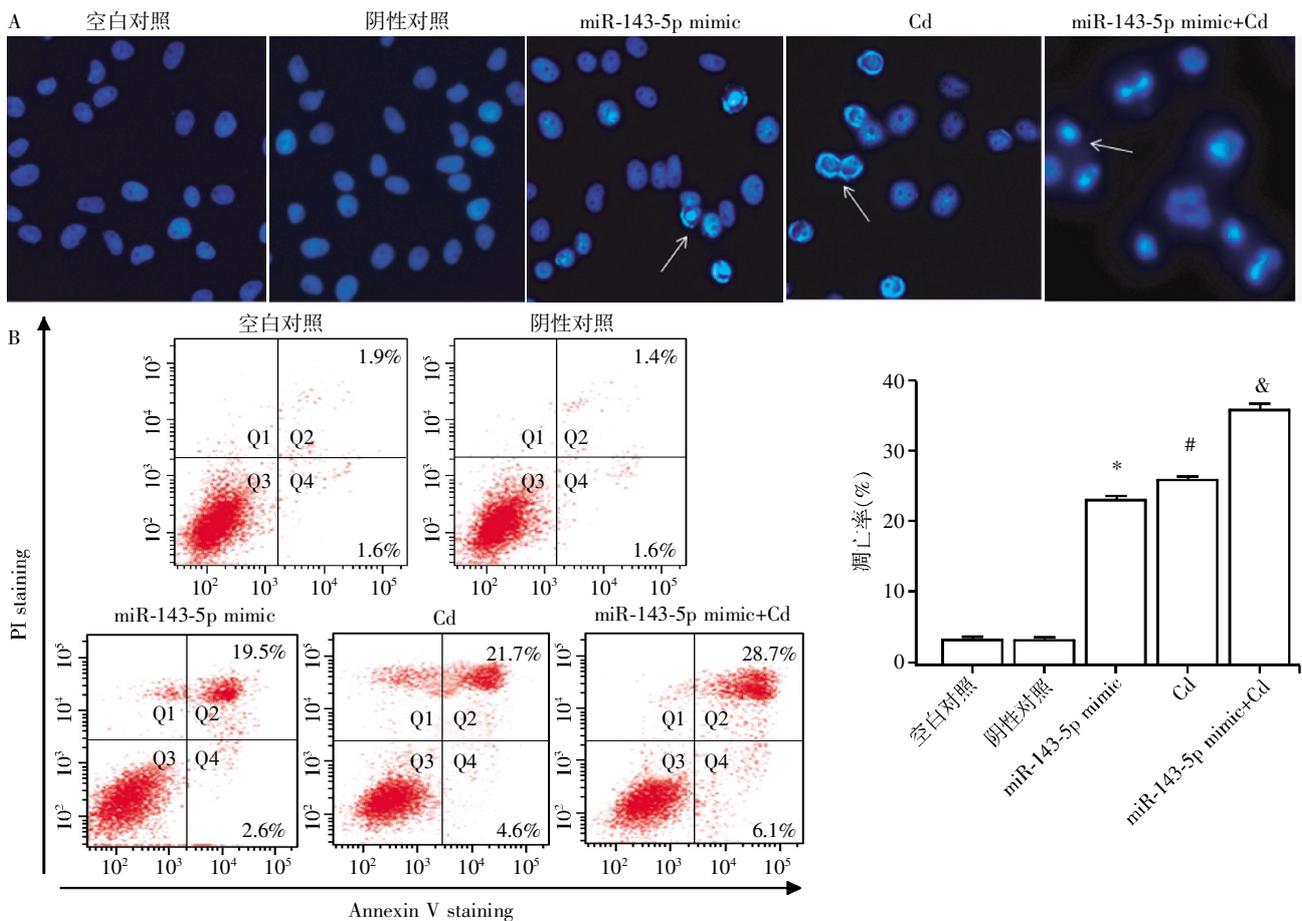
实验可采用转染的细胞进行进一步的研究。

2.3 miR-143-5p 对镉诱导 LLC-PK1 细胞凋亡的影响

通过 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡的形态学改变,结果显示(图 3A),与阴性对照组比较,转染 miR-143-5p mimic 24 h 后,细胞出现明显的凋亡形态学改变(箭头所示),与单独镉处理组的细胞凋亡形态学改变相近;而转染 miR-143-5p mimic 之后再加

镉处理 12 h,其细胞凋亡形态学的改变更加明显。

同时,用 Annexin V-PI 双染法分析细胞凋亡率的变化(图 3B)。结果显示,转染 miR-143-5p 的 mimic 后,细胞凋亡率达 22.1%,明显高于阴性对照组 ($P < 0.01$),其细胞凋亡率与单独镉处理组相近,而转染 miR-143-5p 的 mimic 联合镉处理组,与单独染镉组比较,凋亡率明显增高,达 34.8% ($P < 0.01$)。结果表明,



A: Hoechst 33258 染色结果($\times 100$); B: 流式细胞仪检测细胞凋亡率的结果。与阴性对照组比较, * $P < 0.01$; 与空白对照组比较, # $P < 0.01$; 与 Cd 组比较, & $P < 0.01$ 。

图 3 miR-143-5p 对镉诱导的 LLC-PK1 细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of miR-143-5p on cadmium-induced apoptosis in LLC-PK1 cells

miR-143-5p 可促进镉诱导的肾细胞凋亡。

2.4 miR-143-5p 靶基因的验证

靶基因预测软件预测 AKT3 可能是 miR-143-5p 的靶基因之一(图 4A)。AKT3 作为 AKT 家族三成员之一,发挥多种生物学功能,如促进细胞增殖,抑制细胞凋亡等^[6-7]。我们通过对 LLC-PK1 细胞转染 miR-143-5p 的 mimic 和 inhibitor 后,分别用 qRT-PCR 技术和 Western blot 检测 AKT3 的 mRNA 和蛋白水平。结果如图 4B、4C 所示,miR-143-5p 过表达时,AKT3 的 mRNA 和蛋白水平均明显下调 ($P < 0.01$); 而 miR-143-5p 低水平明显上调了 AKT3 的 mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.01$)。结果表明 AKT3 可能是 miR-143-5p 的直接作用靶点。

2.5 miR-143-5p 对 Akt 凋亡通路的调控作用

图 5 显示,与阴性对照组比较,转染 miR-143-5p 的 mimic 后,可下调 p-Akt/p-Bad 表达水平及上调 caspase-9、caspase-3 蛋白表达,当转染 miR-143-5p 的 mimic 再加镉处理后,与单独镉处理组比较,

其下调 p-Akt/p-Bad 表达及上调 caspase-9、caspase-3 蛋白表达水平的趋势更加明显 ($P < 0.05$)。结果表明,miR-143-5p 可能通过阻断 Akt/Bad 通路,促进镉诱导的肾细胞凋亡。

3 讨论

miRNAs 是一类广泛存在于机体内,由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子。miRNAs 参与一系列重要的生物学进程,包括细胞增殖、凋亡和分化等^[8-9]。miRNA 与其靶基因的 3' 非编码区完全或部分互补结合,诱导靶基因 mRNA 的降解或抑制靶蛋白的表达,进而对各种生理和病理过程发挥调控作用^[10]。近年来,miRNAs 对细胞凋亡的调控作用受到越来越多的关注。许多 miRNAs 被证实对细胞凋亡发挥重要的调控作用,如 let-7 家族、miR-15、miR-16 和 miR-29 等^[11-13]。Zhang 等^[14]研究发现,转染 miR-143 的模拟物 48 h 后,A549 细胞的凋亡率明显升高。Wu 等^[15]亦报道,

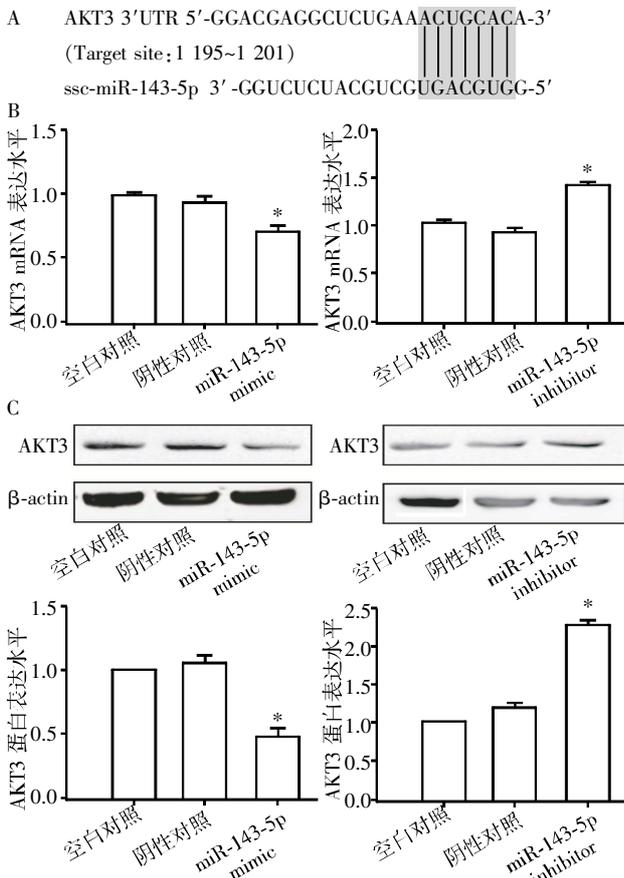
在胃癌细胞系中,miR-143 同样发挥促凋亡作用。而 miRNAs 在镉诱导细胞凋亡过程中的调控作用报道甚少,其机制尚不清楚。

在本研究中,采用基因芯片技术筛选出由镉引起的差异表达 miRNAs。与对照组比较,加镉处理的

LLC-PK1 细胞中有 185 个 miRNAs 表达异常,其中 miR-143-5p 表达差异倍数高达 48.8 倍。查阅相关文献,选择 7 个与凋亡相关的 miRNAs,用 qRT-PCR 实验进一步验证其表达差异性,结果与基因芯片分析保持一致。故本研究主要探讨 miR-143-5p 对镉致肾细胞凋亡的调控作用及其机制。

近年来的研究显示,miR-143 能够促进多种癌细胞的凋亡,如宫颈癌、胃癌、肺癌等^[14-16]。然而,miR-143 对正常细胞的调控作用尚不清楚。本研究发现,用镉处理 LLC-PK1 细胞 12 h 后,出现细胞凋亡形态学改变和凋亡率明显增加;而转染 miR-143-5p 的模拟物后,可引起 miR-143-5p 高表达,同样引起细胞凋亡形态学改变和凋亡率增加,而当转染 miR-143-5p 的模拟物后加镉处理的细胞,其凋亡形态学改变更加明显,凋亡率更高。结果表明,miR-143-5p 的高表达,可促进镉诱导的 LLC-PK1 细胞凋亡。

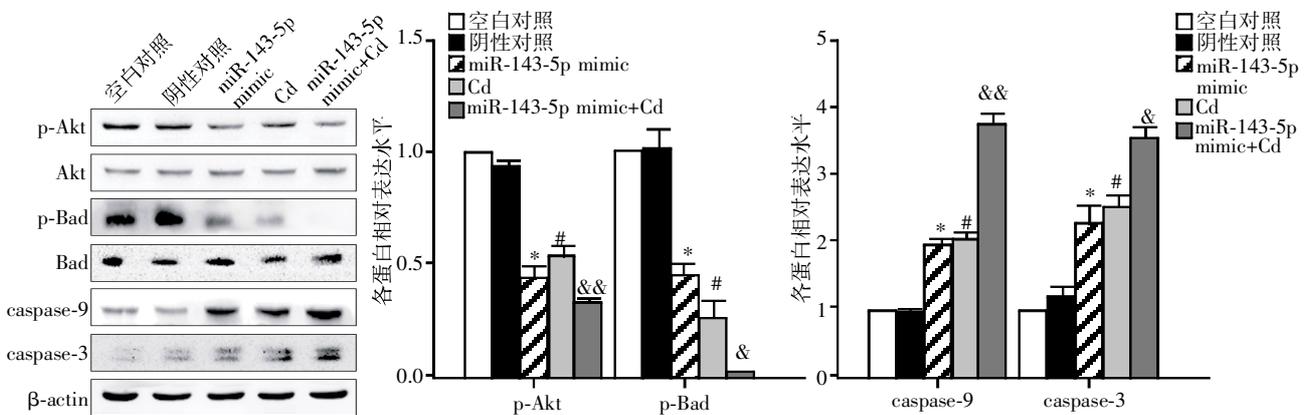
对于 miR-143 调控细胞凋亡的机制,研究认为,主要通过直接作用于凋亡相关靶基因或信号通路来实现。Liu 等^[16]研究发现,miR-143 通过直接抑制靶蛋白 Bcl-2 的表达,促进宫颈癌 Hela 细胞的凋亡。Wang 等^[17]发现,过表达的 miR-143 能够抑制 PI3K/Akt 信号通路的活性。在本研究中,通过靶基因预测及实验验证,得出 AKT3 可能是 miR-143-5p 的直接作用靶点的结论,并进一步通过 Western blot 检测凋亡信号通路相关蛋白的表达水平。结果发现,高表达的 miR-143-5p 可下调 p-Akt/p-Bad 蛋白表达水平,以及上调 caspase-9、caspase-3 蛋白表达。与单独镉处理组比较,当转染 miR-143-5p 模拟物联合加镉处理后,其下调 p-Akt/p-Bad 表达及上调 caspase-9、caspase-3 蛋白表达水平的趋势更加明显。这些结果表明 miR-143-5p 很可能是通过 Akt 信



A:AKT3 核苷酸序列 3'UTR 区与 miR-143-5p 序列互补配对;B:qRT-PCR 实验验证 AKT3 mRNA 水平的变化;C:Western blot 检测 AKT3 蛋白水平的变化。与阴性对照组比较,*P<0.01。

图 4 miR-143-5p 直接作用于靶点 AKT3

Figure 4 MiR-143-5p directly targeting AKT3 in LLC-PK1 cells



与阴性对照组比较,*P<0.01;与空白对照组比较,#P<0.01;与 Cd 组比较,*P<0.05,##P<0.01。

图 5 miR-143-5p 对 Akt/Bad 凋亡通路的调控作用

Figure 5 Regulatory effect of miR-143-5p on Akt apoptosis pathway in LLC-PK1 cells

号通路调控镉诱导的细胞凋亡过程。

正常细胞中,Akt 可以使下游 Bad 蛋白的 Ser155/Ser112 等残基发生磷酸化,磷酸化的 Bad 与 14-3-3 蛋白结合成复合物稳定存在于胞质中,当细胞受到凋亡信号刺激后,Bad 去磷酸化并与 14-3-3 蛋白解离,抑制抗凋亡蛋白 Bcl-xL 的活性,最终导致细胞凋亡^[18]。Madhunapantula 等^[19]在黑色素瘤细胞系中发现,敲除 AKT3 基因后,p-Akt 的蛋白水平下调。Li 等^[20]同样发现在黑色素瘤细胞中沉默 AKT3 基因后,p-Akt 的表达水平下降明显。所以本研究中 AKT3 是否也会抑制 p-Akt 的表达,仍需要进一步研究。

综上所述,在 LLC-PK1 细胞中,miR-143-5p 可直接作用于靶基因 AKT3,并抑制 Akt/Bad 信号通路的活性,促进镉诱导的细胞凋亡。

[参考文献]

- [1] Satarug S, Garrett SH, Sens MA, et al. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes[J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(2):182-190
- [2] Wang Y, Wu Y, Luo K, et al. The protective effects of selenium on cadmium-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondria pathway in mice kidney[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58:61-67
- [3] Zhou YJ, Zhang SP, Liu CW, et al. The protection of selenium on ROS mediated-apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK(1) cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23(2):288-294
- [4] Chen Y, Fu LL, Wen X, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(8):1177-1189
- [5] Fabbri M, Urani C, Sacco MG, et al. Whole genome analysis and microRNAs regulation in HepG2 cells exposed to cadmium[J]. *Altex*, 2012, 29(2):173-180
- [6] Wei W, He HB, Zhang WY, et al. miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4:e668
- [7] Diez H, Garrido JJ, Wandosell F. Specific roles of Akt isoforms in apoptosis and axon growth regulation in neurons [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e32715
- [8] Olivieri F, Rippo MR, Monsurro V, et al. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(4):1056-1068
- [9] Zhang Y, Hu H, Song L, et al. Epirubicin-mediated expression of miR-302b is involved in osteosarcoma apoptosis and cell cycle regulation[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 222(1):1-9
- [10] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function[J]. *Cell*, 2004, 116:281-297
- [11] Geng L, Zhu B, Dai BH, et al. A let-7/Fas double-negative feedback loop regulates human colon carcinoma cells sensitivity to Fas-related apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(3):494-499
- [12] An F, Gong B, Wang H, et al. miR-15b and miR-16 regulate TNF mediated hepatocyte apoptosis via BCL2 in acute liver failure[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(7):702-716
- [13] Hong Y, Wu J, Zhao J, et al. miR-29b and miR-29c are involved in Toll-like receptor control of glucocorticoid-Induced apoptosis in human plasmacytoid dendritic cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e69926
- [14] Zhang N, Su Y, Xu L. Targeting PKCepsilon by miR-143 regulates cell apoptosis in lung cancer[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(22):3661-3667
- [15] Wu XL, Cheng B, Li PY, et al. MicroRNA-143 suppresses gastric cancer cell growth and induces apoptosis by targeting COX-2[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(43):7758-7765
- [16] Liu L, Yu X, Guo X, et al. miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(3):753-760
- [17] Wang L, Shi ZM, Jiang CF, et al. MiR-143 acts as a tumor suppressor by targeting N-RAS and enhances temozolomide-induced apoptosis in glioma[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(14):5416-5427
- [18] Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3):229-249
- [19] Madhunapantula SV, Robertson GP. The PTEN-AKT3 signaling cascade as a therapeutic target in melanoma [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009, 22(4):400-419
- [20] Li W, Song R, Fang X, et al. SBF-1, a synthetic steroidal glycoside, inhibits melanoma growth and metastasis through blocking interaction between PDK1 and AKT3 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(2):172-181

[收稿日期] 2014-12-20