

## 人 PI3KCG 慢病毒载体的构建及其在乳大鼠原代心肌细胞中的表达和初步功能检测

张 辉<sup>1</sup>, 李妍妍<sup>2\*</sup>, 卢新政<sup>1\*</sup>, 周建丽<sup>3</sup>, 夏 薇<sup>3</sup>, 李建民<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院心脏科,<sup>2</sup>老年科, 江苏 南京 210029;<sup>3</sup>南京医科大学医药动物实验基地, 江苏 南京 210029;)

**[摘要]** 目的:构建含有人磷脂酰肌醇 3-激酶 p110 $\gamma$ (phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit gamma, PI3KCG)基因的慢病毒载体,鉴定其在乳大鼠原代心肌细胞中的表达并作初步功能检测。方法:利用同源重组的方法构建含 PI3KCG 基因慢病毒载体质粒,测序鉴定后采用脂质体转染法同慢病毒系统三质粒共转染 293T 细胞,转染后 24 h 和 48 h 荧光显微镜下观察阳性对照组中的绿色荧光蛋白的表达,同时 PCR 法鉴定重组 PI3KCG 慢病毒质粒转染 293T 细胞成功,收集 72 h 病毒上清。培养乳大鼠原代心肌细胞,分为对照组,缺氧/复氧组,空载体阳性对照组,PI3KCG 实验组,PI3KCG+Ly294002 组 5 组,将含 PI3KCG 慢病毒载体的病毒液转染心肌细胞,检测各组的细胞培养上清中的乳酸脱氢酶浓度,观察预转染 PI3KCG 基因对心肌细胞缺氧/复氧过程中的保护作用。结果:成功构建含有 PI3KCG 基因的慢病毒载体质粒,并在 293T 细胞中成功表达。与缺氧/复氧组比较,PI3KCG 组心肌细胞培养液中乳酸脱氢酶水平明显降低( $P < 0.01$ );心肌细胞的存活率、搏动频率明显升高( $P < 0.01$ )。结论:PI3KCG 慢病毒载体有望成为探讨 PI3K/AKT 信号通路激活在防止心肌细胞缺血再灌注损伤的有效工具。

**[关键词]** 慢病毒载体;磷脂酰肌醇 3-激酶;心肌细胞;缺氧/复氧

**[中图分类号]** Q782

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)01-011-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130103

## Construction of recombinant lentiviral vector of PI3KCG, identification of its expression in neonatal rat cardiomyocytes and preliminary function test

Zhang Hui<sup>1</sup>, Li Yanyan<sup>2\*</sup>, Lu Xinzheng<sup>1\*</sup>, Zhou Jianli<sup>3</sup>, Xia Wei<sup>3</sup>, Li Jianmin<sup>3</sup>,

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, <sup>2</sup>Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Center of Experimental Animal, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct lentiviral expression vector contained phosphatidylinositol 3-kinase p110 gamma (PI3KCG), and identify its expression in neonatal rat cardiomyocytes and detect its preliminary function. **Methods:** The PI3KCG lentiviral vector plasmid (PLV-PI3KCG) was constructed by homologous recombination method. The three plasmids of PLV-PI3KCG and of lentivirus system were co-transfected into human embryonic kidney 293T cells by using lipofectamine. The expression of green fluorescent protein (GFP) in the control group was examined by using fluorescent microscope at 24 h and 48 h after transfection. Recombinant PLV-PI3KCG plasmid was successfully identified in 293T cells detected by polymerase chain reaction (PCR). The viral supernatant was collected with 72 h after transfection. The ischemia/reoxygenation (I/R) injury model of neonatal rat myocardial cells was established. Myocardial cells isolated from SD neonatal rats were random division into five groups after being cultured for 3d: the normal control group, the I/R group, the null vector positive control group, the PI3KCG transfection preconditioning group and the PI3KCG transfection+Ly294002 group. Various techniques were adopted to detect the products of cells and cellular: the cardiomyocytes beat frequency, the levels of myocardial cells viability rate and the levels of lactate dehydrogenase (LDH). **Results:** The PLV-PI3KCG plasmid was constructed and expressed in the 293T cells successfully. Compared with the I/R group, the myocardial cells viability

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81100073, 30770890)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lyynjmu123@126.com; xzlu@njmu.edu.cn.

and cardiomyocytes beat frequency of the PI3KCG transfection preconditioning group were significantly increased ( $P < 0.01$ , respectively), and released LDH were significantly decreased ( $P < 0.01$ , respectively). **Conclusion:** PLV-PI3KCG plasmid was expected to become an available vector to investigate PI3K/Akt pathway in the cardiocytes ischemia reperfusion injury process.

[Key words] lentiviral vector; phosphatidylinositol 3-kinase; cardiomyocytes; ischemia/reoxygenation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 011-015]

心肌细胞凋亡参与多种心脏疾病如急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)、缺血/再灌注损伤、心脏异体移植和心力衰竭等的发生,研究心肌细胞凋亡的机制、探求抑制心肌细胞凋亡的途径,成为该领域的研究焦点<sup>[1]</sup>。研究表明,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路作为细胞内重要的信号转导通路之一,对调控细胞周期进程、细胞分化和存活具有重要作用<sup>[2-3]</sup>。但 PI3K/AKT 信号通路激活对防止心肌细胞缺血再灌注损伤的机制尚不清楚。本研究利用三质粒慢病毒包装技术,构建和鉴定含有人磷脂酰肌醇 3-激酶 p110 $\gamma$  (phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic subunit gamma, PI3KCG) 基因的慢病毒载体,并转染心肌细胞进行缺氧复氧干预研究,对 PI3KCG 慢病毒载体的功能行初步检测,为后续在体研究 PI3KCG 基因在 AMI 中的保护作用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司),胰蛋白酶、Gelatin (美国 Sigma 公司),PI3K 激酶抑制剂 ly294002(美国 Promega 公司),GATAWAY LR Clonase™ II enzyme Kit Cat (11791-020)、DNA 凝胶回收试剂盒、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和高保真 DNA 聚合酶(大连宝生物公司);PCR 所用的试剂(美国 Promega 公司)。细胞培养基 DMEM、胎牛血清(FBS)(美国 Hyclone 公司)。乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(南京建成生物有限公司)。引物由美国 Inventrogen 公司合成。其余化学试剂均为分析纯。

pEntry-PI3KCG 质粒(美国 Inventrogen 公司)。pLenti6-V5 Dest 质粒、包装包膜质粒 pLP1、pLP2、VSVG 和 293T 细胞株(美国 Addgene 公司),由南京医科大学医药动物实验基地实验室保存。

出生 1~3 d 的纯种、健康 SD 大鼠(SPF 级)由江苏省动物中心提供,雌雄不限。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 pLenti6/V5-PI3KCG 慢病毒载体构建

采用 LR 体外同源重组技术将 PI3KCG 基因表达框克隆至慢病毒表达载体 pLenti6/v5 Dest 中。在冰上解冻,与 LR Clonase™ II 酶混合 2 min。在 1.5 ml 离心管中,依次加入 pEntry-PI3KCG 质粒(150 ng) 1  $\mu$ l、pLenti6-V5 Dest 质粒 (150 ng/ $\mu$ l)1  $\mu$ l、TE buffer (pH8.0) 8  $\mu$ l 在室温混匀,然后加入 2  $\mu$ l LR Clonase™ II 酶混合物,振荡混合后,室温孵育 1 h。加 1  $\mu$ l 蛋白酶 K 溶液,37 $^{\circ}$ C 10 min 后终止反应。取上述反应液 2  $\mu$ l 转化 100  $\mu$ l 感受态大肠杆菌 XL-BLUE,冰上吸附 30 min,42 $^{\circ}$ C 热激 50 s,冰上快速冷却 2 min,加 1 ml LB,37 $^{\circ}$ C 180 r/min 振荡 1 h,6 000 r/min 离心 3 min,弃上清,加 200  $\mu$ l LB 培养基混匀,取 100  $\mu$ l 涂布于含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板。37 $^{\circ}$ C 培养过夜,第 2 天取 10 个克隆,转接至 3 ml 含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液,250 r/min 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。

#### 1.2.2 菌落 PCR 法鉴定阳性克隆及阳性克隆双向验证测序

抽提重组慢病毒基因组 DNA,应用目的基因 PI3KCG 引物进行 PCR 反应,对慢病毒进行鉴定。上下游引物顺序分别为 PI3KCG-F1 和 PI3KCG-R1 以及 PI3KCG-F2 和 PI3KCG-R2。反应体系共 20  $\mu$ l,分别为 10 $\times$ Buffer ( $Mg^{2+}$ ) 2  $\mu$ l、 $Mg^{2+}$ (25 mmol/L) 2  $\mu$ l、dNTP 0.4  $\mu$ l、上、下游引物(5  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l、Taq 酶(5 U/ $\mu$ l) 0.1  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 12.5  $\mu$ l、模板 1  $\mu$ l。PCR 扩增条件 94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7min。阳性克隆用 CMV-F 与 V5 双向验证测序。用于测序的上下游引物分别为 CMV-F 和 V5 reverse(表 1)。

#### 1.2.3 重组 PI3KCG 慢病毒载体的鉴定

抽提重组慢病毒基因组 DNA,应用目的基因 PI3KCG 引物进行 PCR 反应,对慢病毒进行鉴定。上下游引物顺序分别为 PI3KCG-F2、V5 reverse 以及 PI3KCG-F2 和 PI3KCG-R2(表 1)。反应体系共 20  $\mu$ l,分别为 10 $\times$  Buffer( $Mg^{2+}$ )2  $\mu$ l、 $Mg^{2+}$ (25 mmol/L) 1.5  $\mu$ l、

dNTP 0.3  $\mu\text{l}$ 、上、下游引物(5  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{l}$ 、*Taq* 酶(5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.1  $\mu\text{l}$ 、ddH<sub>2</sub>O 13.1  $\mu\text{l}$ 、模板 1  $\mu\text{l}$ 。PCR 扩增条件 94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s、55℃退火 30 s、72℃延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳并测序。

表 1 PCR 引物列表

Table 1 The sequence table of PCR primers

| 引物名称       | 引物序列(5'→3')                |
|------------|----------------------------|
| PI3KCG-F1  | CATCCCATCGAGTTTCGTG        |
| PI3KCG-R1  | CAGTTG TTGGCAATCTTCTTCC    |
| PI3KCG-F2  | AACCTATTTTCATATTGACTTCCGGG |
| PI3KCG-R2  | AATTAAGTGCACAG TCCATCCTT   |
| CMV-F      | CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG      |
| V5 reverse | ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT      |

#### 1.2.4 重组 PI3KCG 慢病毒在 293T 细胞中的包装、鉴定

转染前 24 h 用 Gelatin 平铺直径 10 cm 培养皿,取生长良好的 293T 细胞接种于培养皿,待细胞覆盖率达 80%~90% 时利用脂质体进行转染。PI3KCG 慢病毒载体和含有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的空载体均进行转染,以空载体作为阳性对照组观察转染效率。在 2 个离心管中加入 OPTI-MEM(不含血清和双抗的 DMEM 培养基),将 DNA(转移质粒 pLenti6/v5-PI3KCG 质粒,包装包膜质粒 pLP1、pLP2、VSVG)加入其中 1 个离心管,另一管中加入 Lipofectamine 2000,混匀,作用 5 min。将 2 个 EP 管中的液体混匀,室温作用 20 min 后即可加入到 1 个 10 cm 培养皿中,摇匀,2~4 h 后再摇匀 1 次。收集 24~48 h 的病毒液,用 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,取 5  $\mu\text{l}$ ,煮沸 5 min,PCR 扩增并测序来鉴定目的基因表达,其余病毒液保存于-80℃低温冰箱中备用。PCR 上下游引物、操作过程同上。

#### 1.2.5 重组 PI3KCG 慢病毒载体的初步功能鉴定

心肌细胞的分离培养方法<sup>[4]</sup>:取出生 1~3 d 的 SD 大鼠,酒精擦洗消毒开胸取出心脏,立即放入 4℃磷酸盐缓冲液(PBS)中,反复冲洗 5~6 次除去瘀血,加入 0.1%胰蛋白酶溶液反复消化心肌组织,差速贴壁法分离细胞,将细胞悬液的细胞浓度调成  $5 \times 10^5$  个/ml,接种于 24 孔培养板中,含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基,置 CO<sub>2</sub> 培养箱(5%CO<sub>2</sub>、37℃)中培养,第 3 天随机分组进行实验。

建立心肌细胞缺氧/复氧损伤模型:对培养 3 d 的单层心肌细胞,更换经缺氧处理的低糖 DMEM,细胞置于无菌密闭的 5%CO<sub>2</sub> 和 95%N<sub>2</sub> 的无氧袋中,保

持 37℃,孵育 3 h。模拟复氧:将心肌细胞自无氧袋中取出,培养液换成高糖 DMEM 培养液,放在 21% O<sub>2</sub> 与 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内,保持 37℃,常规培养 2 h。

实验分 5 组:①正常对照组;②缺氧/复氧组;③空载体阳性对照组;④PI3KCG 实验组;⑤PI3KCG+Ly294002 组。每组重复 6 次,实验用培养第 3 天的原代心肌细胞。

心肌细胞存活率<sup>[5]</sup>:将各组心肌细胞按照  $5 \times 10^5$  个/ml 密度接种于 96 孔细胞培养板,每组 6 个孔,每孔 200  $\mu\text{l}$ 。经上述实验分组及缺氧/复氧处理后,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu\text{l}$ ,37℃继续孵育 4h,去上清。每孔加入二甲基亚砷(DMSO)100  $\mu\text{l}$ ,振荡 10 min,使结晶物完全溶解。采用酶标仪,490 nm 波长来检测各孔吸光度值。细胞存活率(%)=(实验组吸光度值-空白对照吸光度值)/(对照组吸光度值-空白对照吸光度值)×100%。空白对照与实验孔同样处理,不加细胞只加培养液。

LDH 活性测定:取各组细胞培养上清 200  $\mu\text{l}$ ,美国 Beckman 生化自动分析仪检测 LDH 活性。

#### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析,计量资料均用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计数资料以百分率表示。两组计量资料间比较采用 *t* 检验,两组计数资料间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

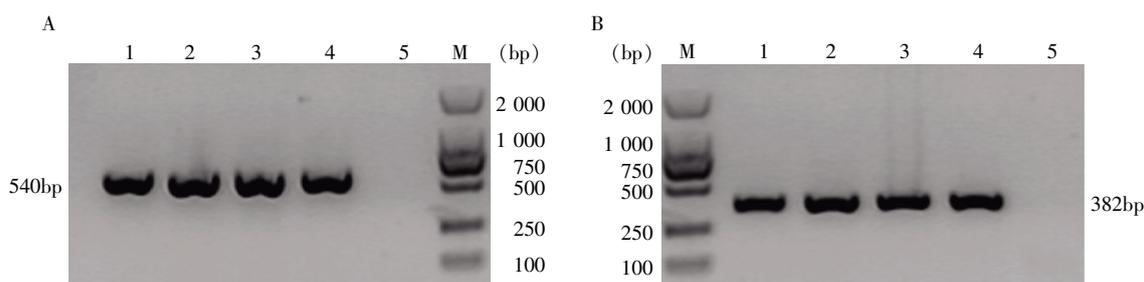
## 2 结 果

#### 2.1 质粒的构建和 PCR 鉴定

阳性克隆的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,在 540 bp 和 382 bp 处见到清晰目的条带。条带大小与预期相符,测序结果与已知 PI3KCG 序列完全一致,表明重组质粒构建成功(图 1)。

#### 2.2 重组慢病毒载体的包装、鉴定

用脂质体转染法将转移质粒和包装包膜质粒共转染 293T 细胞,转染 24 h 后荧光显微镜下可观察到阳性对照组的 GFP 蛋白的表达,转染 48 h 后,GFP 荧光强度进一步增强,72 h 后在每一视野下,GFP 蛋白表达的阳性包装率达 100%,提示 PI3KCG 慢病毒包装成功。经 PCR 鉴定证实重组慢病毒基因组中含有 PI3KCG 基因,后经测序检测证明为 PI3KCG 基因序列,提示重组慢病毒质粒在 293T 细胞转染成功。收集病毒液,继续感染 293T 细胞,经多轮扩增后测定重组慢病毒质粒,进行系列稀释检测病毒滴度达  $1 \times 10^6$  IU/ml。



A: 阳性克隆采用 PI3KCG-F2/V5 引物进行 PCR 扩增的结果。1~4: PCR 扩增的产物(540 bp); 5: 以 H<sub>2</sub>O 作为空白对照; M: DNA Marker。B: 阳性克隆采用 PI3KCG-F2/R2 引物进行 PCR 扩增的结果。1~4: PCR 扩增的产物(382 bp); 5: 以 H<sub>2</sub>O 作为空白对照; M: DNA Marker。

图 1 阳性克隆采用 PI3KCG-F2/V5 引物和 PI3KCG-F2/R2 引物进行 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 1 The PCR amplification agarose gel electrophoretogram of positive clone by using PI3KCG-F2/V5 primers and PI3KCG-F2/R2 primers

### 2.3 重组 PI3KCG 慢病毒载体转染的心肌细胞在缺氧/复氧干预试验中的形态变化

显微镜下可见传代细胞未贴壁呈圆形, 贴壁后逐渐呈梭形、多角形生长, 细胞大小均匀, 生长迅速, 单个细胞自行蠕动, 当生长成片后可见岛屿状搏动。经过缺氧/复氧干预后, 心肌细胞的存活率、搏动频率较正常对照组明显减低 ( $P < 0.01$ )。与缺氧/复氧组相比, PI3KCG 实验组的存活率、搏动频率明显升高 ( $P <$

0.01, 表 2)。

### 2.4 重组 PI3KCG 慢病毒载体转染的心肌细胞在缺氧/复氧干预试验中的 LDH 含量比较

与正常对照组比较, 缺氧/复氧组培养上清中 LDH 水平明显增加 ( $P < 0.01$ )。与缺氧/复氧组比较, PI3KCG 实验组心肌细胞培养上清中 LDH 水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); 空载体阳性对照组和 PI3KCG+Ly294002 组的 LDH 水平无明显改变 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

表 2 各组心肌细胞搏动频率、存活率、培养上清 LDH 含量的比较

Table 2 Comparison results of cardiomyocytes beat frequency, survival rate and supernatant LDH content between the five groups ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 组别                | 搏动频率(次/min)           | 存活率(%)                  | LDH 活性(U/L)              |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| 正常对照组             | 80.5±6.2              | 98.67±3.76              | 79.50±7.10               |
| 缺氧/复氧组            | 40.4±7.7*             | 39.60±8.30*             | 155.66±12.40*            |
| 空载体阳性对照组          | 41.3±7.9              | 39.80±8.20              | 150.78±10.32             |
| PI3KCG 实验组        | 70.4±6.5 <sup>△</sup> | 83.40±7.50 <sup>△</sup> | 100.20±7.23 <sup>△</sup> |
| PI3KCG+Ly294002 组 | 40.8±7.8              | 40.90±7.60              | 153.68±11.45             |

与正常对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与缺氧/复氧组比较, <sup>△</sup> $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

本实验成功构建了含有人 PI3KCG 的重组慢病毒载体 pLenti6/V5-PI3KCG, 并且完成了 pLenti6/V5-PI3KCG 载体的慢病毒包装。人 PI3KCG 基因位于 7q22.3, 长达约 3.3 kb。因为 PI3KCG 基因较大, 构建到慢病毒载体时, 为避免影响 PI3KCG 蛋白的表达效率, 酶切去除了重组 pLenti6/V5-PI3KCG 载体上的 GFP 基因, 因此在转染重组的 pLenti6/V5-PI3KCG 载体的宿主细胞里, 没有 GFP 蛋白的表达, 只能通过观察转染空载体的细胞里的 GFP 表达, 从而了解转染效率, 通过 PCR 鉴定转染是否成功。本实验的重组 pLenti6/V5-PI3KCG 载体, 带有 V5 抗性标记, 在以后的筛选试验中可以应用 blasticidin

试剂来进行靶细胞的单克隆筛选。同时, 本实验在构建慢病毒载体时未进行传统的反复酶切和连接, 而是采用了 gateway 同源重组技术, 简单高效地完成了 pLenti6/V5-PI3KCG 载体的构建<sup>[6]</sup>。

当前有多种基因转染的方法, 如物理法、化学法、逆转录病毒及腺病毒载体转基因法等。物理法和化学法的转染效率低; 逆转录病毒载体容纳外源性基因的能力差, 而且只能感染分裂期细胞; 腺病毒载体难以实现长时间的稳定表达。而慢病毒载体, 以人免疫缺陷病毒-1 为基础构建, 具有转移基因片段的容量较大, 可实现目的基因的稳定表达、可感染非分裂细胞、转染所需的病毒滴度可高达  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  IU/ml、宿主免疫反应小等优点, 从而克服了逆转录病毒载体和腺病毒载体的不足。

AMI 采用溶栓和腔内成形术治疗,常发生心肌缺血再灌注损伤,尤其是发生心肌细胞凋亡和坏死,导致AMI病情加重,抑制心肌细胞凋亡成为治疗AMI和充血性心力衰竭后遗症的主要手段<sup>[7]</sup>。PI3K/AKT是细胞内重要的信号转导通路,活化的AKT通过磷酸化作用进一步激活或抑制其下游靶蛋白,进而发挥调节细胞的增殖、分化、葡萄糖代谢以及迁移等作用<sup>[8-13]</sup>。急性缺血预处理,AKT磷酸化水平升高,而PI3K抑制剂(如Wortmannin和Ly294002)可使梗死面积扩大,阻滞缺血后心功能的改善及降低AKT磷酸化水平<sup>[14]</sup>。缺乏PI3KCG不益于缺血再灌注中心脏功能的恢复、增加细胞死亡的数目且减弱腺苷的保护作用<sup>[15]</sup>。Matsui等<sup>[16]</sup>研究发现,用腺病毒将有活性的PI3K或AKT基因转导至心肌细胞,能够减少缺氧诱导的心肌细胞凋亡。

本研究结果显示,与正常对照组比较,缺氧/复氧组心肌细胞存活率明显降低、LDH的释放量明显增加( $P < 0.01$ ),表明成功建立了心肌细胞的缺氧/复氧损伤模型。在初步功能检测实验中发现,PI3KCG重组慢病毒载体转染心肌细胞后,心肌细胞的搏动频率、存活率明显高于单纯的缺氧/复氧组,LDH的释放量明显低于缺氧/复氧组,因此,PI3KCG基因对心肌细胞缺氧/复氧损伤具有明显的保护作用。而加入PI3KCG的抑制剂Ly294002后,就明显抑制了这一保护作用。本实验再次证实,PI3KCG基因通过活化PI3K/AKT这一信号通路发挥对心肌细胞的保护作用。本研究的实验结果为后续的在体研究PI3KCG基因在AMI中的作用奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] Pu J, Yuan A, Shan P, et al. Cardiomyocyte-expressed farnesoid-X-receptor is a novel apoptosis mediator and contributes to myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. *Eur Heart J*, 2012. [Epub ahead of print]
- [2] Gill C, Mestral R, Samali A. Losing heart; the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target? [J]. *FASEB J*, 2002, 16(2):135–146
- [3] Sunkomat JN, Gaballa MA. Stem cell therapy in ischemic heart disease [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2003, 21(4):327–342
- [4] Spector DL, Goldam RD, Leinwand LA. *Cells: a Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 129
- [5] Gomez LA, Alekseev AE, Aleksandrova LA, et al. Use of the MTT assay in adult ventricular cardiomyocytes to assess viability: effects of adenosine and potassium on cellular survival [J]. *J Mol Cell Cardio*, 1997, 29 (4): 1255–1266
- [6] 阙文忠, 陈君敏. 利用 Gateway 技术构建重组腺病毒 pAd-NK4 [J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(4): 467–472
- [7] Paul A, Binsalamah ZM, Khan AA, et al. A nanobiohybrid complex of recombinant baculovirus and Tat/DNA nanoparticles for delivery of Ang-1 transgene in myocardial infarction therapy [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (32): 8304–8318
- [8] Wallin JJ, Guan J, Prior WW, et al. GDC-0941, a novel class I selective PI3K inhibitor, enhances the efficacy of docetaxel in human breast cancer models by increasing cell death *in vitro* and *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(14): 3901–3911
- [9] Wallin JJ, Edgar KA, Guan J, et al. GDC-0980 is a novel class I PI3K/mTOR kinase inhibitor with robust activity in cancer models driven by the PI3K pathway [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(12): 2426–2436
- [10] Salphati L, Wong H, Belvin M, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of tumor growth inhibition and biomarker modulation by the novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor GDC-0941 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(9): 1436–1442
- [11] O'Brien C, Wallin JJ, Sampath D, et al. Predictive biomarkers of sensitivity to the phosphatidylinositol 3' kinase inhibitor GDC-0941 in breast cancer preclinical models [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(14): 3670–3683
- [12] Edgar KA, Wallin JJ, Berry M, et al. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors exert distinct effects in solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(3): 1164–1172
- [13] Cheng G, Chunlei W, Pei W, et al. Simvastatin activates Akt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  signal and inhibits caspase-3 activation after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 52(1-2): 77–83
- [14] Arab S, Konstantinov IE, Boscarino C, et al. Early gene expression profiles during intraoperative myocardial ischemia-reperfusion in cardiac surgery [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 134(1): 74–81
- [15] Murphy E, Tong H, Steenbergen C. Preconditioning: is the Akt- $\beta$  in the PI3K pathway? [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(9): 1021–1025
- [16] Matsui T, Li L, Del Monte F, et al. Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3' kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes *in vitro* [J]. *Circulation*, 1999, 100 (23): 2373–2379