

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.017

TP53 基因沉默介导 PI3K/PTEN/AKT 信号通路对肾透明细胞癌侵袭转移的调控机制

刘晓丽, 庞文帅, 黄朝康, 朱磊[△]

(河北医科大学附属邢台市人民医院病理科, 河北 邢台 054001)

摘要:目的 探讨肿瘤蛋白 p53 基因(TP53)沉默介导 PI3K/PTEN/AKT 信号通路对肾透明细胞癌侵袭转移的调控机制。方法 取 60 例肾透明细胞癌组织标本,免疫组化分析 TP53 蛋白在肾透明细胞癌组织中的表达;取人肾透明细胞癌细胞株 RLC-310 进行细胞培养;细胞转染表达载体分为空白组(A组)、阴性对照组(B组)、shTP53 组(C组)、PTEN 抑制剂 bpv 组(D组)、phen + shTP53 组(E组)。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western Blot 检测各组细胞 TP53、同源性磷酸酶-张力蛋白(PTEN)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、AKT 的 mRNA 和蛋白表达水平;CCK-8 法检测各组细胞增殖能力;划痕愈合试验检测各组细胞的迁移能力;Transwell 侵袭试验检测各组细胞的侵袭能力。结果 TP53 蛋白在肾透明细胞癌组织中高表达($P < 0.05$);与 A 组和 B 组相比, C 组的 TP53、PI3K、AKT mRNA 和蛋白表达水平显著下降, PTEN mRNA 和蛋白表达水平均显著上升, 且细胞增殖能力、迁移率、侵袭率均显著下降($P < 0.05$); D 组 TP53、PI3K、AKT mRNA 和蛋白表达水平显著上升, PTEN mRNA 和蛋白表达水平显著下降, 且细胞增殖能力、迁移率、侵袭率均显著上升($P < 0.05$);同时, E 组 TP53 下降($P < 0.05$), 而其他指标与 A 组和 B 组相当($P > 0.05$)。结论 沉默 TP53 基因抑制 PI3K/PTEN/AKT 信号通路, 从而抑制肾透明细胞癌细胞浸润转移功能, 并可逆转 phen 诱导的肾透明细胞癌细胞浸润转移。

关键词: TP53 基因沉默; PI3K/PTEN/AKT 信号通路; 肾透明细胞癌; 侵袭转移

中图分类号 R965; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)05-0070-05

第一作者: 刘晓丽, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为临床病理学, (电子信箱) 78552869@qq.com。

[△]通信作者: 朱磊, 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为泌尿系肿瘤疾病的诊治, (电子信箱) zll21@163.com。

- 2018, 264(10): 80-83.
- [5] CHENG G, CHEN JJ, WANG Q, et al. Promoting osteogenic differentiation in preosteoblasts and reducing tibial fracture healing time using functional nanofibers[J]. Nano Research, 2017, 11(7): 1-20.
- [6] GRAEF JL, RENDINA - RUEDY E, CROCKETT EK, et al. Select polyphenolic fractions from dried plum enhance osteoblast activity through BMP-2 signaling[J]. J Nutr Biochem, 2017, 55: 59-67.
- [7] 邢晓旭, 刘钟杰, 韩博. 麦角甾苷及松果菊苷对体外培养大鼠成骨细胞 BMP2 基因表达的影响[J]. 动物医学进展, 2011, 32(8): 45-48.
- [8] 王斌, 邓高鹏, 侯平. 骨肽与复方骨肽治疗中老年四肢骨折的临床效果观察[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(13): 3764-3765.
- [9] BICHE SU, DAS A, MASCARENHAS - PEREIRA MBL, et al. Alkaline Phosphatase: An Appraisal of its Critical Role in C-Limited Deep-Sea Sediments of Central Indian Basin[J]. Geomicrobiology Journal, 2017, 34(3): 274-288.
- [10] 曾高峰, 宗少晖, 邹斌, 等. 黄精多糖对小鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化中 ALP 和 BGP 表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(7): 779-783.
- [11] TAKAHASHI S, KATANUMA H, ABE K, et al. Identification of alkaline phosphatase genes for utilizing a flame retardant, tris(2-chloroethyl) phosphate, in *Sphingobium* sp. strain TCM1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(5): 2153-2162.
- [12] FUSARO M, GALLIENI M, AGHI A, et al. Cigarette smoking is associated with decreased Bone Gla-protein(BGP) levels in hemodialysis patients[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2018, 16(6): 603-609.
- [13] DONG M, JIAO G, LIU H, et al. Biological Silicon Stimulates Collagen Type 1 and Osteocalcin Synthesis in Human Osteoblast-Like Cells Through the BMP-2/Smad/RUNX2 Signaling Pathway[J]. Biological Trace Element Research, 2016, 173(2): 306-315.
- [14] KARNER C M, LEE, SEUNG - YON, LONG, FANXIN. Bmp Induces Osteoblast Differentiation through both Smad4 and mTORC1 Signaling[J]. Molecular & Cellular Biology, 2017, 37(4): e00253-16.
- [15] LIMA IMT, IVINA R, BRITO RR, et al. BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development[J]. Cell & Tissue Research, 2012, 348(1): 225-238.
- [16] 谢艳芳. 脉冲电磁场通过初级纤毛和 BMP/BMPRII/Smad1/5/8 信号途径促进骨形成的研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2016.
- [17] XU J, LI Z, HOU Y, et al. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. American Journal of Translational Research, 2016, 7(12): 2527-2535.
- [18] LU C, GAO S, XU G. Geraniin inhibits TNF- α -induced impairments of osteogenesis through NF- κ B and p38 MAPK signalling pathways in bone marrow stem cells[J]. BMJ, 2017, 2(2): 47-52.

(收稿日期: 2019-07-27)

Regulation Mechanism of TP53 Gene Silencing Mediating PI3K/PTEN/AKT Signaling Pathway on Invasion and Metastasis of Renal Clear Cell Carcinoma

LIU Xiaoli, PANG Wenshuai, HUANG Chaokang, ZHU Lei

(Department of Pathology, Xingtai People's Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Xingtai, Hebei, China 054001)

Abstract: Objective To explore the regulation mechanism of tumor protein p53 (TP53) gene silencing mediating PI3K/PTEN/AKT signaling pathway on invasion and metastasis of renal clear cell carcinoma. **Methods** A total of 60 cases of renal clear cell carcinoma was collected, and immunohistochemistry was used to analyze the expression of TP53 protein. Human renal clear cell carcinoma cell line RLC-310 was cultured and transfected into five groups: Blank group (group A), negative control (NC, transfection of short hairpin RNA NC) group (group B), shTP53 group (group C), PTEN inhibitor bpv (phen) group (group D) and phen + shTP53 group (group E). The expression levels of TP53, phosphatase and tensin homolog (PTEN), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) and AKT were detected by Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot; the proliferation ability of cells was detected by CCK-8 method; the migration ability of cells in each group was detected by scratch healing test; and the invasion ability of cells in each group was detected by Transwell invasion test. **Results** Clinical experiment showed that TP53 protein was highly expressed in renal clear cell carcinoma ($P < 0.05$). Cell experiment showed that compared with group A and group B, the levels of TP53, PI3K and AKT mRNA and protein expression in group C were significantly down-regulated, and the levels of PTEN mRNA and protein expression were significantly up-regulated, and cell proliferation, migration and invasion were significantly down-regulated ($P < 0.05$); the levels of TP53, PI3K and AKT mRNA and protein expression in group D were significantly up-regulated, while the levels of PTEN mRNA and protein expression were significantly down-regulated, and the cell proliferation, migration and invasion were significantly up-regulated ($P < 0.05$); meanwhile, TP53 was down-regulated in group E ($P < 0.05$), but there was no significant difference in other indicators compared with group A and group B ($P > 0.05$). **Conclusion** TP53 gene silencing inhibits PI3K/PTEN/AKT signaling pathway, thus inhibits the infiltration and metastasis of renal clear cell carcinoma cells, and reverses PHEN-induced infiltration and metastasis of renal clear cell carcinoma cells.

Key words: TP53 gene silencing; PI3K/PTEN/AKT signaling pathway; renal clear cell carcinoma; invasion and metastasis

肾癌是一类多基因相关肿瘤,发病机制复杂^[1]。研究发现,细胞内环境紊乱(细胞内信号转导途径不平衡)为主的机体内环境失衡被认为是肿瘤发展的重要因素^[2]。同源性磷酸酶-张力蛋白(PTEN)为常见抑癌基因,PI3K/PTEN/AKT信号通路处于肿瘤细胞生长调节的中心环节,该通路的活化可抑制外源性刺激对肿瘤细胞凋亡的诱发作用,进而促进细胞的生存能力和增殖转移,在肿瘤进程中发挥重要作用^[3]。PI3K/PTEN/AKT信号通路关联基因之一肿瘤蛋白p53基因(TP53)为常见促癌基因,参与众多肿瘤发病^[4]。本研究中探讨了TP53基因沉默介导PI3K/PTEN/AKT信号通路对肾透明细胞癌侵袭转移的调控机制,为临床肾透明细胞癌的治疗提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂:DMEM培养基(美国Gibco公司);Lipofectamine® 2000转染试剂、Trizol试剂盒均购自美国Invitrogen公司;表达载体构建(北京信诺金达生物科技有限公司);免疫组化和Western Blot抗体(英国Abcam公司);DAB显色底物、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、RIPA裂解液、CCK-8试剂、ECL发光液均购自上海碧云天生物技术有限公司;PCR扩增仪、ABI7500型定量PCR仪均购自美国赛默飞世尔科技公司;PCR引物合成(南京金斯瑞生物科技有限公司);BCA定量试剂盒(南京森贝

伽生物科技有限公司)。

细胞:人肾透明细胞癌细胞株RLC-310(中国科学院上海细胞研究所);人正常肾脏上皮细胞(江苏齐民生物科技有限公司)。

患者纳入标准:经病理组织学或细胞学确诊,或有典型临床特征确诊为肾透明细胞癌;年龄32~76岁;术前未接受放化疗或其他抗肿瘤治疗。

患者排除标准:患有其他原发性恶性肿瘤且对本研究产生影响;临床资料不完整;不配合研究。

标本:选取我院2016年至2018年收治的手术患者60例,其中男36例,女24例;年龄32~76岁,平均(56.63 ± 7.44)岁,术后病理检查均确诊为肾透明细胞癌。选取患者的肿瘤组织及癌旁组织,各组织标本采集后均置含RNA保存液的冻存管中,并立即置-80℃冻存,备用。标本采集已得到患者本人及其家属同意。

1.2 方法

细胞培养与细胞转染分组:取人肾透明细胞癌细胞株RLC-310,用含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM培养基,于37℃及5%CO₂恒温培养箱内常规培养。细胞生长至70%~80%融合度时用0.25%胰酶消化,进行传代。RLC-310细胞转染分组为空白组(细胞不转染,A组)、阴性对照组[细胞转染短发夹RNA(shRNA),B组]、shTP53组(细胞转染TP53 shRNA,C组)、PTEN抑制剂bpv组[细胞转染

空载体, PI3K/PTEN/AKT 信号通路激活剂(phen)处理细胞, D 组]、phen + shTP53 组(细胞转染 TP53 shRNA, 并用 phen 处理细胞, E 组)。细胞培养用 6 孔板, 以 1×10^6 个细胞/孔铺板, 使用不含血清的 DMEM 新鲜培养基, 在细胞密度约占培养板 80% 时, 使用 Lipofectamine® 2000 转染试剂将表达载体加入到培养基中进行转染, 转染 24 h 后加入 phen 处理细胞, 作用 24 h 后更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM 2 mL, 继续于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中培养 72 h。将各组 RLC-310 细胞接种于 24 孔板内, 加入 DMEM 新鲜培养基至各组细胞中, 并置 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 48 h。

免疫组化检测: 取出组织标本, 用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μ m 连续切片。切片在 60 ℃ 恒温箱中烤片 1 h, 常规二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水; 3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶; 微波抗原修复; 10% 山羊血清封闭; 加兔抗人 TP53 一抗; 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白(IgG)。DAB 显色后, 苏木素复染, 用中性树脂固定封片。以 PBS 代替一抗作阴性对照。在高倍镜下选取 5 个视野计数细胞并拍照, 着色为棕黄色为阳性表达, 根据阳性细胞占全部细胞的比例计算 TP53 的阳性细胞率。

实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测: 采用 Trizol 试剂盒提取各组 RLC-310 细胞的总 RNA, 取 5 μ L RNA 样品, 用无 RNA 酶超纯水稀释 20 倍, 读取其在紫外分光光度计 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度, 测定 RNA 浓度和纯度。用 PCR 扩增仪进行逆转录反应合成 cDNA 模版, 应用 ABI7500 型定量 PCR 仪进行实时定量 RT-PCR 试验。采用相对定量法计算, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示各目的基因的相对表达量, 每个试验均重复 3 次, 取平均值。

Western Blot 检测: 将各组 RLC-310 细胞加入 100 μ L RIPA 裂解液裂解, 预冷 PBS 洗 3 遍, 将细胞刮下, 移至 1.5 mL 离心管中使细胞充分裂解, 14 000 g 离心 10 min, 取上清液置 -20 ℃ 保存。试验时再将样品取出, 用 BCA 定量试剂盒进行定量, 后加入上样缓冲液, 95 ℃ 煮 10 min 后, 上样 30 μ g, 在 100 V 电压下电泳 90 min, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后采用湿转方法将蛋白转膜, 用 5% BSA 室温下封闭 1 h 后孵育一抗, 4 ℃ 过夜。其中一抗为 TP53、PTEN、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、AKT、GAPDH。一抗孵育完毕后, 用 1 $\times$ TBST 溶液室温下摇床摇动洗膜, 每次 5 min, 洗 3 次, 加一抗相应的二抗山羊抗兔 IgG-HRP 温育后放入 ECL 发光液显色。利用 Quantity One 软件进行蛋白条带灰度分析。

CCK-8 法检测: 取各组 RLC-310 细胞进行常规消化, 用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基重悬细胞并计

数, 以 5.0×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔。置培养箱分别培养 24, 48, 72, 96 h 后, 吸去培养基, PBS 冲洗, 加入 100 μ L 无血清培养基和 10 μ L CCK-8 液体, 37 ℃ 孵育 30 min 后, 用酶标仪于 490 nm 波长处读取吸光度, 取重复试验的平均值, 绘制生长曲线。

创口愈合试验: 各组细胞转染 48 h 后, 接种至 24 孔板中, 待细胞生长至密度为 80% ~ 90% 时进行转染, 转染 6 h 后更换新的培养基, 在 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 培养至细胞长满培养板, 使用枪头垂直于细胞培养板划痕, 然后使用 PBS 溶液冲洗细胞 3 次, 在 0, 24, 48 h 拍照并测量划痕宽度。计算创口愈合率。

Transwell 侵袭试验: 收集各组转染细胞重新悬浮于无血清培养基中, 取细胞悬液接种于 Transwell 的上室, 每孔 15 μ L, 37 ℃ 包被 1 h。在小室下层孔中加入 750 μ L 含 15% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 将 Transwell 小室置入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 48 h, 用棉棒擦去嵌室底部内表面未穿透的细胞及 Matrigel 胶, 4% 甲醛固定, 结晶紫染色。在显微镜下计数 5 个单独视野的穿膜细胞数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 两组间及多组间均数比较行 t 检验及单因素方差分析; 计数资料以率(%)表示, 行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

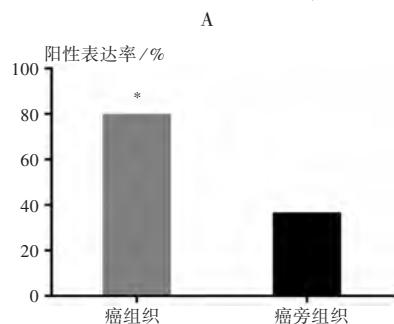
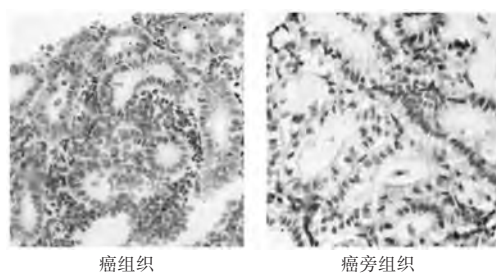
2 结果

2.1 TP53 蛋白阳性表达检测结果

各组组织切片中 TP53 蛋白表达呈阳性, 染色为棕黄色, 详见图 1 A。与癌旁组织组相比, 癌组织组的 TP53 蛋白阳性表达率显著增加[36.67% (22/60) vs. 80.00% (48/60), $P < 0.05$], 详见图 1 B。

2.2 细胞 mRNA 和蛋白表达水平

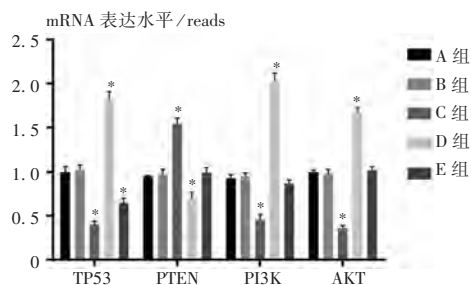
qRT-PCR 检测结果发现, 与人正常肾脏上皮细胞相比, RLC-310 细胞的 TP53 的 mRNA 表达水平显著增加, 组间比较, 差异有统计学意义[(0.98 $\pm$ 0.04) vs. (1.64 $\pm$ 0.07), $P < 0.05$]。细胞转染分组后, qRT-PCR 和 Western Blot 检测各组细胞 TP53, PTEN, PI3K, AKT 基因的 mRNA 和蛋白表达水平见图 2 和图 3。可见, 与 A 组相比, B 组的 TP53, PTEN, PI3K, AKT mRNA 和蛋白表达水平均无显著变化($P > 0.05$); C 组的 TP53, PI3K, AKT mRNA 和蛋白表达水平显著下降, PTEN mRNA 和蛋白表达水平均显



注:与癌旁组织相比,* $P < 0.05$ 。

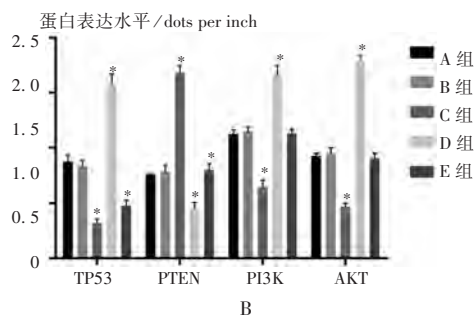
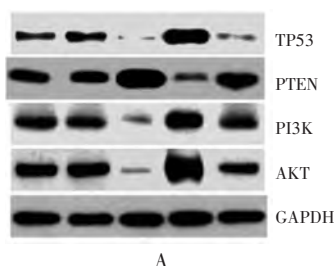
A. 免疫组化染色图($\times 200$) B. TP53 蛋白阳性表达率

图1 TP53 蛋白阳性表达检测结果



注:与A组相比,* $P < 0.05$ 。下图同。

图2 各组细胞 qRT-PCR 检测结果



A. 各蛋白电泳条带图 B. 各组细胞蛋白表达水平

图3 各组细胞 Western Blot 检测结果

著上升($P < 0.05$);D组 TP53,PI3K, AKT mRNA 和蛋白表达水平均显著上升,PTEN mRNA 和蛋白表达水平

均显著下降($P < 0.05$);E组的 PTEN,PI3K,AKT mRNA 和蛋白表达水平均无显著变化($P > 0.05$),TP53 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降($P < 0.05$)。

2.3 细胞转染后增殖能力

各组 RLC-310 细胞的增殖能力见图4。可见,与A组相比,B组和E组的增殖能力均无显著变化($P > 0.05$),C组的增殖能力显著降低($P < 0.05$),D组的增殖能力显著升高($P < 0.05$)。

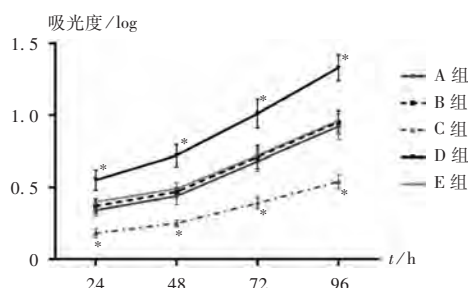
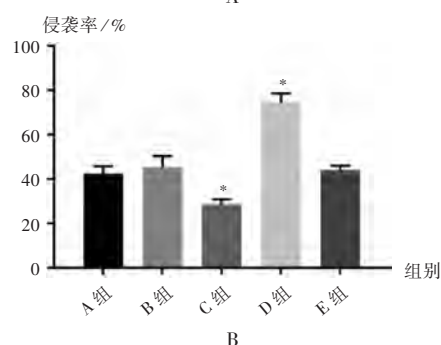
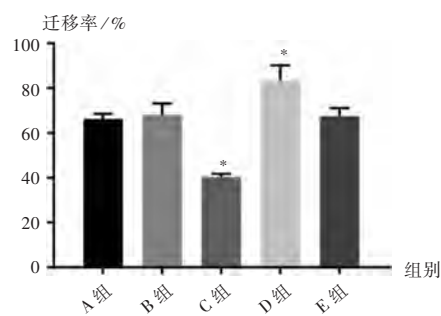


图4 各组细胞增殖能力比较(490 nm)

2.4 细胞转染后迁移和侵袭能力

各组 RLC-310 细胞通过划痕愈合试验和 Transwell 试验分别检测其迁移和侵袭能力,通过测量各组细胞划痕宽度变化来计算迁移率,并通过侵袭细胞数计算侵袭率,结果见图5。可见,与A组相比,B组和E组的迁移率和侵袭率均无显著变化($P > 0.05$),C组的迁移率和侵袭率显著降低($P < 0.05$),D组的迁移率和侵袭率显著升高($P < 0.05$)。



A. 各组细胞迁移率 B. 各组细胞侵袭率

图5 各组细胞迁移能力和侵袭能力比较

3 讨论

肾透明细胞癌属肾实质癌常见类别,起病隐匿,是

来源于肾小管上皮细胞的腺癌^[5]。作为常见泌尿系统恶性肿瘤,肾癌的发病率和死亡率均较高,且呈逐年上升趋势^[6]。肾癌常见治疗手段为手术治疗,根治性肾切除多用于早期局限性肾癌,但尚有部分肾癌患者因远处转移而无法接受手术治疗,生存率极低,预后较差^[7]。同时,晚期肾癌及转移性肾癌患者均具有较强耐药性^[8]。随着对肾癌分子机制认识的深入,有研究发现传统肿瘤疗法缺乏特异性,并伴有明显毒副作用^[9],已不能满足当代肿瘤治疗的需求。近年来,信号转导途径中的某些关键分子已成为分子靶向治疗的研究热点。该治疗基于肿瘤分子生物学,以肿瘤特异性分子作为靶点,应用分子制剂,确认可供治疗干预的分子靶点(促癌基因、抑癌基因、信号转导通路等)。

诸多信号转导途径中,PI3K/PTEN/AKT信号通路是目前研究较成熟的通路,其活化可促进细胞生长转移^[10]。PTEN是该通路的主要因子之一,可抑制PI3K的功能并对抗AKT的活化,在多类肿瘤如脑胶质瘤中等均存在缺失或突变^[11-12]。同时,PI3K的关键功能在于介导组织细胞凋亡,活化的PI3K可激活细胞信号转导,并与AKT蛋白相互作用,转位至细胞核或细胞浆,进而调控细胞活性,并抑制细胞凋亡^[13]。本研究结果显示,TP53蛋白在肾透明细胞癌中呈阳性表达,且与癌旁组织组相比,癌组织组的TP53蛋白阳性表达率显著增加,提示TP53异常高表达可能与肾透明细胞癌的发病有关,该推测在细胞试验中亦得到证实,RLC-310细胞的TP53的mRNA表达率显著高于正常人肾脏上皮细胞中的水平。另外,推测该蛋白可能通过促进细胞增殖诱发该肿瘤的发生。若可抑制TP53表达或干扰其目标信号转导通路,可为该肿瘤的早期诊断和治疗提供新思路。

qRT-PCR和免疫印迹法检测各组细胞TP53,PTEN,PI3K,AKT基因的mRNA和蛋白表达水平的结果显示,抑制TP53基因表达可抑制PI3K/PTEN/AKT信号通路的激活,诱发抑癌基因PTEN活性,而phen处理可导致该信号通路的激活,并抑制PTEN活性;沉默TP53基因可逆转phen诱导的PI3K/PTEN/AKT信号通路的激活,有助于抑制该肿瘤的发生、发展。上述结果经各组细胞转染后增殖能力、迁移能力和侵袭能力比较,验证了沉默TP53基因表达在抑制phen诱导的肾透明细胞癌细胞浸润转移中的作用。

综上所述,TP53在肾透明细胞癌中高表达,可通过抑制该基因的表达来发挥肿瘤抑制作用,TP53基因可作为肾透明细胞癌诊疗的指标。沉默TP53基因抑制PI3K/PTEN/AKT信号通路,从而抑制肾透明细胞癌细

胞浸润转移功能,并可逆转phen诱导的肾透明细胞癌细胞浸润转移,对肾透明细胞癌的诊治作用显著。

参考文献:

- [1] 冯润林,王 燕. Xp11.2易位/TFE3基因融合相关性肾癌临床病理分析[J]. 东南国防医药,2018,20(6):42-46.
- [2] SHIELDS S, CONROY E, O'GRADY T, et al. BAG3 promotes tumour cell proliferation by regulating EGFR signal transduction pathways in triple negative breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(21):15673.
- [3] YANG Y, GUO JX, SHAO ZQ. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: An experimental study[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2017, 10(1):87-91.
- [4] SOUSSI T, WIMAN KG. TP53: an oncogene in disguise[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2015, 22(8):1239.
- [5] DELAHUNT B, BETHWAITE PB, THORNTON A. Prognostic significance of microscopic vascularity for clear cell renal cell carcinoma[J]. *Br J Urol*, 2015, 80(3):401-404.
- [6] WEI C, YANG X, JUNHUA XI, et al. High expression of pituitary tumor-transforming gene-1 predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Mol Clin Oncol*, 2015, 3(2):387-391.
- [7] HEINZELMANN J, UNREIN A, WICKMANN U, et al. MicroRNAs with prognostic potential for metastasis in clear cell renal cell carcinoma: a comparison of primary tumors and distant metastases[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2014, 21(3):1046-1054.
- [8] LAGUNA MP. Re: A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: final overall survival results and safety update[J]. *Journal of Urology*, 2013, 190(6):2017-2018.
- [9] 蔡维敏,陈婷婷,魏 英,等. 肾癌术后患者5-氟尿嘧啶血药浓度与肾功能及毒副作用的相关性研究[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(23):2858-2861.
- [10] LIM HJ, CROWE P, YANG JL. Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer[J]. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 2015, 141(4):671-689.
- [11] 刘金戈,许建平,王亚丽,等. 人脑胶质瘤中PRDX-1、EGFR、PI3K、PTEN的表达及相关性[J]. *诊断病理学杂志*, 2014, 21(3):165-168.
- [12] LI N, MIAO Y, SHAN Y, et al. MiR-106b and miR-93 regulate cell progression by suppression of PTEN via PI3K/Akt pathway in breast cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(5):e2796.
- [13] NAGAPPAN A, LEE WS, YUN JW, et al. Tetraarsenic hexoxide induces G2/M arrest, apoptosis, and autophagy via PI3K/Akt suppression and p38 MAPK activation in SW620 human colon cancer cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0174591.

(收稿日期:2019-09-02)