

丹皮酚对肝癌 MHCC97-H 细胞 PTEN、AKT 表达的影响*

张春虎 胡随瑜 曹美群 林 源 李云辉

(中南大学湘雅医院中西医结合研究所 湖南长沙 410008)

摘要 目的: 探讨丹皮酚 (Paeonol, Pae) 在体外对人肝癌 MHCC97-H 细胞 PTEN、AKT 表达的影响。**方法:** 体外培养人肝癌 MHCC97-H 细胞, MTT 法检测丹皮酚对 MHCC97-H 细胞的增殖抑制作用, RT-PCR 法检测 PTEN、Akt1、Akt2 mRNA 表达, Western Blot 法检测 PTEN、p-AKT 蛋白的表达。**结果:** 丹皮酚呈时间剂量依赖性抑制人肝癌 MHCC97-H 细胞的增殖; 肝癌 MHCC97-H 细胞低表达 PTEN, 高表达 AKT, 丹皮酚能显著上调 MHCC97-H 细胞 PTEN 表达, 下调 AKT 表达。**结论:** 丹皮酚可上调抑癌基因 PTEN 的表达, 下调致癌基因 AKT 的表达, 抑制 MHCC97-H 细胞的增殖。

关键词: 丹皮酚; 人肝癌细胞; PTEN; AKT

中图分类号: R282, R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2007)08-1134-04

Effects of Paeonol on the Expression of PTEN and AKT in Human MHCC97-H cells*

ZHANG Chun-hu, HU Sui-yu, CAO Mei-qun, LIN Yuan, LI Yun-hui

(Institute of Combined Traditional Chinese and Western Medicine, XiangYa Hospital, Central South University, Changsha Hunan 410008 China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether paeonol could change the phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN) and AKT expression of homohepatoma carcinoma cell line in vitro. **Methods:** Homohepatoma carcinoma cell line MHCC97-H was cultured in vitro, proliferation inhibitory effect was detected by MTT assay; PTEN, Akt1, Akt2 mRNA were measured quantitatively by RT-PCR, Expression of PTEN, p-AKT protein were measured by Western blot. **Results:** Paeonol could inhibit the proliferation of MHCC97-H cells, with dose and time-dependent effects; PTEN expression in low and AKT in high level in MHCC97-H cells, in which, paeonol significantly up-regulated the expression of PTEN and down-regulated AKT. **Conclusion:** Paeonol could inhibit proliferation and up-regulated the expression of PTEN and down-regulated AKT in homohepatoma carcinoma cell line MHCC97-H in vitro.

Key words: Paeonol; Homohepatoma carcinoma cell; PTEN; AKT

Chinese Library Classification (CLC): R282, R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2007)08-1134-04

前言

丹皮酚 (paeonol, Pae) 是中药牡丹皮 (芍药科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的根皮) 的主要有效成分, 属黄酮类化合物。早期研究发现丹皮酚具有抗菌、消炎、抗动脉粥样硬化、增强细胞免疫等多种药理学活性^[1]。最近有文献报道丹皮酚在体内外都具有抗肿瘤作用^[2,3], 而其机制尚不明确。本实验初步探讨丹皮酚在体外对人肝癌高转移性细胞 MHCC97-H 的增殖抑制作用及抑癌基因 PTEN 及其下游分子 AKT 表达的影响, 为丹皮酚的抗肿瘤作用提供新的实验及理论依据。

1 材料和方法

1.1 药品、主要试剂及仪器

Pae 购自宁波天真制药有限公司 (10mg/2ml, 国药准字: H33020043)。细胞培养基 RPMI1640 (GIBCO BRL 公司); 新生牛血清 (杭州四季青生物材料研究所); MTT (美国 Sigma 公司) 用 pH 为 7.4 的 1× PBS 溶解 (5g/L), 0.22μm 过滤除菌, 棕色

小瓶中 4℃ 冰箱保存 (两周内有效); 二甲基亚砜 (DMSO)、羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、胰蛋白酶 (美国 Sigma 公司); Trizol (Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit), Taq 酶、dNTP (美国 MBI 公司); PTEN、Akt1、Akt2 引物及 β-action 委托上海 Sangon 合成。PTEN 多克隆抗体 (Cayman)、p-AKT (Thr308) 多克隆抗体 (美国 Cell signaling 公司); HRP 兔抗鼠二抗 (Santa Cruz); 其他试剂均为进口或国产分析纯。仪器: CO₂ 恒温培养箱 (日本 SANYO 公司); YJ-1450 型医学净化工作台; 苏州净化公司; 倒置显微镜 (日本 OLYMPUS 产品); 酶标仪 (美国 BIO-TEK 公司); 凝胶成像分析仪 (Stratagene 美国公司); PCR 仪 (美国 Tech 公司); Sigma-16K 低温冷冻高速离心机 (德国 WTW 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人肝癌 MHCC97-H 细胞培养于 RPMI1640 培养液中 (加入新生牛血清成体积分数为 0.05, 青霉素、链霉素 105U/L, HEPES 2.38g/L-1 的细胞培养液), 用体积分数为 0.075 的碳酸氢钠调节 pH 为 7.2~7.4, 置入体积分数为 0.05 的 CO₂,

* 基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (06JJ20050)

作者简介: 张春虎, (1977-), 男, 中南大学湘雅医院博士研究生。研究方向: 中药抗肿瘤的临床与基础研究。

Email: chzysm@126.com。

通讯作者: 林源, (1968-), 女, 主治医师, 研究方向: 肿瘤的中西医结合防治研究。Email: lyxysm@126.com。

(收稿日期 2007-03-23 接受日期: 2007-04-15)

37℃、饱和湿度下的培养箱中培养,24h 换液,48h 时用 2.50g/L 胰蛋白酶消化传代 1 次,细胞呈单层贴壁生长。实验均取对数生长期的细胞。

1.2.2 MTT 法检测药物效应 消化、收集对数生长期细胞,并调整浓度为 $5 \times 10^7/L$ 的单细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 0.2mL,24h 后分别加入不同浓度的 Pae (RPMI1640 培养液配制)。每组设 5 个复孔,置培养箱中培养 24, 48, 72, 96h,终止前每孔加入 20 μ L MTT 液,继续培养 4h,上机前吸弃培养液,每孔加 150 μ L DMSO,水平摇床摇动 10min,在酶标仪(570nm 波长)上测量吸光度值,计算细胞生长抑制率。计算方法:抑制率(%)=(1-实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值)× 100%。并计算 Pae 处理 MHCC97-H 72h 时的 IC₅₀ 值。

表 1 RT-PCR 引物序列及其扩增条件

Table 1 Primer and amplification condition of RT-PCR

Index	Primer	Length (bp)	Condition
PTEN	sense:5'-GGACGAAGTGGTGAATGATATG-3'	671	pre-denaturation 94℃ 5min;94℃ 50s,58.6℃ 40s,72℃ 50s.30 cycles.amplification 72℃ 10min
	antisense:5'-TCTACTGTTTTGTGAAGTACAGC-3'		
Akt1	sense:5'-ATGACGACGTGGCTATTGTCAAT-3'	330	pre-denaturation 94℃ 5min;94℃ 50s,58.4℃ 40s,72℃ 40s.30 cycles.amplification 72℃ 10min
	antisense:5'-GAGGCCGTCAGCCACAGTCTGGATG-3'		
Akt2	sense:5'-ATGAATGAGGTGTCTGTCATCAAAGAAGGC-3'	315	pre-denaturation 94℃ 5min;94℃ 50s,61.2℃ 40s,72℃ 40s.30 cycles.amplification 72℃ 10min
	antisense:5'-TGCTTGAGGCTGTTGGCGACC-3'		
β -actin	sense:5'-CATCCTGCCTCTGCACCT-3'	499	Conditon same as the corresponding target land
	antisense:5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'		

1.2.4 Western blot 法检测 PTEN, p-AKT 蛋白表达 消化、收集对数生长期细胞,并调整浓度为 $5 \times 10^7/L$ 的单细胞悬液,接种于 6 孔培养板中,每孔 3mL,24h 后加入 19.48mg/L Pae 培养液,处理 0, 18, 36h,每个时间点设 5 个平行对照孔。温的 1× PBS 洗 2 次,沥干,每孔加入 RIPA Lysis Buffer (海门碧云天) 200 μ L,使裂解液充分接触细胞,细胞充分裂解后 12,000g 离心 5min,取上清置一新的 Ep 管。BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)测定蛋白浓度;调整各组蛋白浓度为 1,000 μ g/ml。每组细胞各取 10 μ g 蛋白样品加入 5× loading buffer (5 μ L),沸水煮 5min,10,000g 离心 10 min,取上清,冰上冷却后进行 SDS-PAGE (8%分离胶,5%浓缩胶)。SDS-PAGE 结束 40V 电转移 60min。将蛋白质条带转移到 PVDF 膜上,洗去转膜液,吸去洗涤液,加入 Western 封闭液室温封闭 60min。一抗孵育 (PTEN 1:200; p-AKT 1:1000),4℃ 静置过夜。0.05%PBST 洗 3 次,每次 10min,再加 1:1000 的稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(兔抗小鼠 IgG),室温轻摇一小时。0.05% PBST 洗 3 次,每次 10 min,最后将膜与 ECL 室温孵育 10min,曝光 X 线片,显影定影。

1.3 统计学处理

计量资料用均数± 标准差($\bar{x} \pm s$),采用 SPSS14.0 统计软件进行单因素方差分析,相关分析采用 Pearson 直线相关分析。P<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 MTT 法药物效应实验

Pae 在 2.60~166.18mg/L 对 MHCC97-H 细胞的增殖均有抑制作用,且呈时间、浓度依赖。以浓度的对数与抑制率进行 Pearson 直线相关分析(72h 时,r=0.995,P<0.001)。计算 72h 的

1.2.3 RT-PCR 法检测 PTEN,Akt1,Akt2mRNA 的表达 细胞培养:取对数生长期细胞,以 19.48mg/L Pae 培养液(72h 时 IC50 浓度)处理细胞 0, 12, 24, 36h。取各时间点细胞(6× 10⁶ 瓶,每个时间点 5 瓶),Trizol 提取总 RNA,测 OD 值。RNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 2.0,琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性。用 5 μ g 总 RNA 按 RevertAidFirst Strand cDNA Synthesis Kit 说明操作合成第一链 cDNA,再用合成的 cDNA 进行 PCR。PTEN、Akt1、Akt2^[4]、 β -actin 引物序列及扩增条件(表 1)。电泳和定量:取 PCR 产物 5 μ L 于 1.2%琼脂糖凝胶中电泳,采用凝胶成像分析系统分别测定各组 PTEN、Akt1、Akt2/ β -actin 的光密度比值表示 PTEN、Akt1、Akt2mRNA 的相对表达。

IC50 值为 19.48mg/L,后面实验即以 19.48mg/L 为浓度参数。结果(表 2 与图 1)。

2.2 PTEN 和 AKT 表达水平检测结果

2.2.1 PTEN,Akt1,Akt2mRNA 表达检测 RT-PCR 显示,空白对照组细胞的 PTENmRNA 表达较弱, Akt1,Akt2mRNA 表达较强。经 19.48mg/L Pae 处理 12,24,36h 的细胞 PTENmRNA 表达逐渐增强,而 Akt1、Akt2mRNA 表达逐渐减弱(表 3 与图 2)。将 PTENmRNA 与 Akt1、Akt2mRNA 表达水平进行 Pearson 直线相关分析显示二者呈显著负相关。(PTENmRNA 与 Akt1mRNA: r=-0.955, P<0.001;PTENmRNA 与 Akt2mRNA: r=-0.916, P<0.001)。

2.2.2 PTEN,p-AKT 蛋白表达检测 Pae 可增强 MHCC97-H 细胞 PTEN 蛋白表达,降低 p-AKT 蛋白表达,并随处理时间的延长此种变化有增强的趋势结果(表 4 与图 3)。统计分析显示,Pae 处理 18h 时差异即有显著性(P<0.05 或 P<0.01)。将 PTEN、p-AKT 蛋白表达作 Pearson 直线相关分析,结果显示呈显著负相关:PTEN 与 p-AKT r = -0.823, P<0.001。

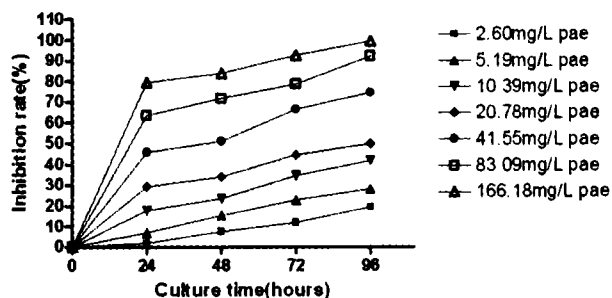


图 1 MTT 法检测丹皮酚对 MHCC97-H 细胞生长抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of paeonol on the growth of MHCC97-H cells assessed by MTT assay

表 2 Pae 对 MHCC97-H 细胞的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$, 抑制率%)

Table 2 Antiproliferation effect of Pae on MHCC97-H cells

Pae mg/L	24h		48hA		72hAB		96hABC	
	A value	%	A value	%	A value	%	A value	%
Control	0.861 ± 0.013	—	1.182 ± 0.055	—	1.403 ± 0.051	—	1.728 ± 0.047	—
2.60	0.845 ± 0.020	1.858	1.093 ± 0.085 ^a	7.530	1.237 ± 0.033 ^a	11.832	1.391 ± 0.035 ^a	19.502
5.19	0.801 ± 0.008 ^{ab}	6.970	1.000 ± 0.013 ^{ab}	15.398	1.081 ± 0.050 ^{ab}	22.951	1.240 ± 0.062 ^{ab}	28.241
10.39	0.707 ± 0.011 ^{abc}	17.886	0.901 ± 0.011 ^{abc}	23.773	0.916 ± 0.010 ^{abc}	34.711	1.044 ± 0.046 ^{abc}	41.898
20.78	0.608 ± 0.008 ^{abcd}	29.384	0.778 ± 0.027 ^{abcd}	34.179	0.775 ± 0.028 ^{abcd}	44.761	0.865 ± 0.022 ^{abcd}	49.942
41.55	0.465 ± 0.005 ^{abcde}	45.993	0.579 ± 0.010 ^{abcde}	51.015	0.470 ± 0.016 ^{abcde}	66.500	0.439 ± 0.014 ^{abcde}	74.595
83.09	0.314 ± 0.013 ^{abcdf}	63.531	0.333 ± 0.011 ^{abcdf}	71.827	0.299 ± 0.017 ^{abcdf}	78.689	0.135 ± 0.014 ^{abcdf}	92.188
166.18	0.176 ± 0.006 ^{abcdfg}	79.559	0.190 ± 0.012 ^{abcdfg}	83.926	0.103 ± 0.008 ^{abcdfg}	92.659	0.010 ± 0.002 ^{abcdfg}	99.479

a: P<0.05,与对照组比较 b: P<0.05,与 2.60mg/L 处理组比较 c: P<0.05,与 5.19mg/L 处理组比较
d: P<0.05,与 10.39mg/L 处理组比较 e: P<0.05,与 20.78mg/L 处理组比较 f: P<0.05,与 41.55mg/L
处理组比较 g: P<0.05,与 83.09mg/L 处理组比较

A: P<0.01,与第 24h 处理组比较 B: P<0.01,与第 48h 处理组比较 C: P<0.01,与第 72h 处理组比较

表 3 Pae 处理 MHCC97-H 细胞不同时间对 PTNE, Akt1, Akt2 mRNA 的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 The Effects of Pae on PTEN, Akt1, Akt2 mRNA Expression in MHCC97-H in different time($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time(h)	PTENmRNA/ β -action	Akt1 mRNA/ β -action	Akt2 mRNA/ β -action
	mRNA Ratio	mRNA Ratio	mRNA Ratio
Control(0)	0.579 ± 0.023	1.003 ± 0.024	0.977 ± 0.031
12	0.772 ± 0.029 ^a	0.933 ± 0.015 ^a	0.745 ± 0.024 ^a
24	0.957 ± 0.023 ^{ab}	0.773 ± 0.040 ^{ab}	0.677 ± 0.027 ^{ab}
36	1.288 ± 0.028 ^{abc}	0.630 ± 0.016 ^{abc}	0.612 ± 0.013 ^{abc}

a: P<0.01,与对照组比较 b: P<0.01,与 12h 处理组比较 c: P<0.01,与 24h 处理组比较

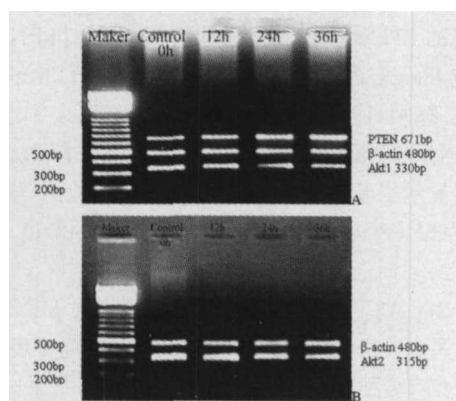


图 2 PTEN 和 Akt mRNA 凝胶电泳图 A: PTEN, Akt1; B: Akt2
Figure 2 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of PTEN, Akt1, Akt2 mRNA A: PTEN, Akt1; B: Akt2

表 4 Pae 处理 MHCC97-H 细胞不同时间对 PTNE, p-AKT 蛋白表达的影响(平均光密度, $\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 The Effects of Pae on PTEN, p-AKT protein Expression in MHCC97-H in different time($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time(h)	PTEN	p-AKT
Control(0)	105.672 ± 5.151	154.104 ± 4.676
18	113.338 ± 3.869 ^a	138.392 ± 4.355 ^a
36	130.280 ± 4.135 ^b	129.449 ± 4.324 ^b

a: P<0.01,与对照组比较 b: P<0.05,与 18h 处理组比较

3 讨论

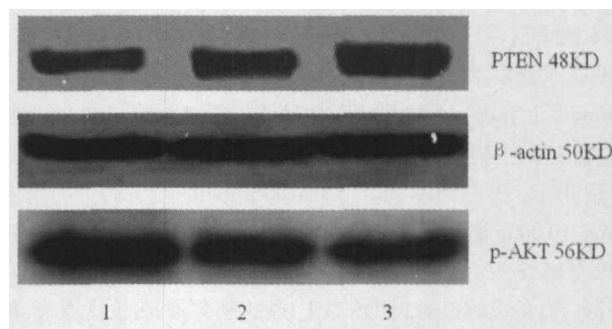


图 3 MHCC97-H 细胞各组 PTEN, p-AKT 蛋白表达的 Western-blot 分析

Figure 3 PTEN, p-AKT protein expression in MHCC97-H cells detected by Western blot

Lane1: MHCC97-H cells before treatment;

Lanes 2 and 3: MHCC97-H cells treated with paeonol for 18, 36h.

原发性肝癌是我国最常见、最具有危害性的恶性肿瘤之一,死亡率占肿瘤死亡率的第 2 位^[5]。我国是原发性肝癌的高发地区,肝癌发病人数约占全球的 55%。肝癌的发生、发展是多因素、多阶段、多基因相互作用的结果。PTEN 基因定位于人类 10q23 染色体上,是一个编码蛋白酪氨酸磷酸酶的抑癌基因,研究表明原发性肝癌细胞中存在高比例的 PTEN 基因表达下调,体外转染实验显示将抑癌基因 PTEN 转入肝癌细胞后可使肝癌细胞生长受到明显抑制,均提示 PTEN 与原发性肝癌的发生发展有密切关系^[6]。

牡丹皮(芍药科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的根皮)

为传统中药,其功能清热凉血,活血散瘀。丹皮酚是牡丹皮的主要有效成分,是一种小分子酚类化合物,属于黄酮类。现代药理研究证明丹皮酚具有广泛的药理活性,最新的研究显示,丹皮酚亦具有广泛的抗肿瘤作用,已被证实对人红白血病细胞系 K562、人大肠癌细胞系 HT-29 及人肝癌 BEL-7404 等多种肿瘤均有抑制作用,并可诱导 BEL-7404 细胞凋亡^[27]。

PTEN 可通过对 ptdIns-3,4,5-p3(PIP3)及 ptdIns-3,4,-p2 特异地使 PIP3 脱 3' 磷酸,抑制 PI3K/Akt 信号转导途径而发挥肿瘤抑制作用。PI3K/Akt 信号转导途径被抑制,使细胞中 Akt 磷酸化水平明显下调,进而上调细胞生长周期的关键激酶抑制因子 P27kIp1,干扰细胞生长信号,使细胞阻滞于 G1 期,并增加细胞对凋亡的敏感性^[9]。活化的 ATK(p-AKT)是很好的细胞存活因子,而 PTEN 的作用是使 PIP2 和 PIP3 去磷酸化,拮抗 PIP3/AKT/PKB 信号传导通路,阻断细胞增殖,引起细胞凋亡和失巢凋亡(anoikis)^[9]。目前发现至少存在 3 种 AKT 家族成员: Akt1、Akt2、Akt3。在其家族中 Akt1、Akt2 的过度表达与肿瘤的形成关系更为密切^[9],故我们在 RT-PCR 部分选择了 Akt1、Akt2 作为研究指标。AKT 激活是其发挥促细胞生存、增殖功能的重要前提,而 Ser473 或 / 和 Thr308 位点的磷酸化是 AKT 激活的必要条件。多种生长因子主要通过 PI3K/AKT 信号转导通路而发挥作用。PI3K 激活后可产生 PI-3、4P2 及 PI-3、4、5P3,这些脂质产物与 AKT 的 PH 区结合,不仅导致 AKT 发生从胞浆到质膜的转位,还可促使其构象发生改变,从而得以 Ser473 和 Thr308 位点磷酸化激活^[10]。AKT 的激活尚需要磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶(phosphoinositide-dependent protein kinase, PDK)参与, PDK-21 只能使 Thr308 位点磷酸化,而对 Ser473 位点无直接作用,(故我们选用了 Thr308 位点磷酸化的 AKT、p-AKT(Thr308)抗体)。

本实验中发现, Pae 可呈剂量、时间依赖性的抑制 MHCC97-H 细胞的增殖,高剂量(166.18 mg/L)培养 96h 时抑制率达 99%以上,表明 Pae 在体外对 MHCC97-H 细胞具有良好的增殖抑制作用。实验结果显示, MHCC97-H 细胞 PTEN 有弱的表达,而 AKT 则有强表达。经 Pae 处理不同时间, PTEN 表达增强,而 AKT 表达降低,二者呈显著负相关。我们推测 Pae 上调 PTEN 的表达,下调 AKT 的表达可能是其抑制 MHCC97-H 细胞增殖的机制之一。而 Pae 是通过何种途径上调 PTEN, 下调 AKT 后又作用于哪个靶分子则有待于进一步研究。

4 结论

丹皮酚可呈剂量、时间依赖性抑制 MHCC97-H 细胞的增

殖,并可上调抑癌基因 PTEN 的表达,下调致癌基因 AKT 的表达。

参考文献(References)

- [1] ZHANG LINGHUA, SHANG PEIGEN, HUANG YI, et al. Pharmacology and clinical research progress of Paeonol [J]. Chinese Journal of Integrative Traditional and Western Medicine, 1996, 16(3): 187-189 (in Chinese)
- [2] LIU CHANGQING, TAN SHIYUN, JI CHUNHYAN, et al. The effects of paeonol on inhibiting the proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and its molecule mechanism[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2005, 21(10): 1251-1254(in Chinese)
- [3] LI GANGQIN, TAN SHIYUN, LIU CHANGQING, et al. The correlation of Fas/FasL, bcl-2, caspase-8 in paeonol inducing colorectal cancer cell line HT-29 apoptosis and molecule mechanism [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2006, 15 (2): 194-196 (in Chinese)
- [4] ZHU ZHITONG, JIA JING Z, LU RONG, et al. Expression of PTEN, p27,p21 and AKT mRNA and protein in human Bel-7402 hepatocarcinoma cells in transplanted tumors of nude mice treated with the treptide tyrososervative (YSV) [J]. Int J Cancer, 2006,118 (6): 1539-1544
- [5] MASAKI KAIBORI M.D., TAKAMICHI SAITO, YOICHI MATSUI M.D., et al. A review of the prognostic factors in patients with recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma[J]. The American Journal of Surgery, 2007,193(4):431-437
- [6] WAN XW, JIANG M, CAO HF, et al. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2003,129(2):100-106
- [7] ZHANG CHUNHU, HU SUIYU, LI YUNHUI, et al. Anti-tumor effect and mechanism of Paeonol on the hepatocellular carcinoma cell line Bel-7404[J]. Journal of Central South University(Med Sci), 2006,31 (5):682-686(in Chinese)
- [8] JAMES A. MCCUBERY, LINDA S. STEELMAN, STEVEN L. ABRAMS, et al. Roles of the Raf/ MEK/ ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance[J]. Adv Enzyme Regul, 2006, 46:249-279
- [9] ANNE BRUNET, AZAD BONNI, MICHAEL J, et al. AKT promotes cell survival by Phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor[J]. Cell, 1999,96(6): 857-868
- [10] SANDEEP ROBERT DATTA, ANNE BRUNET, MICHAEL E. GREENBERG. Cellular survival: a paly in three Akts [J]. Genes Dev, 1999,13: 2905-2027