

mTOR 对非激素依赖性前列腺癌的作用研究

李 刚¹, 闫若东², 穆中一¹, 黄 炎¹, 胡 滨¹

(1. 辽宁省肿瘤医院, 辽宁 沈阳 110042; 2. 盘锦市第一人民医院, 辽宁 盘锦 124000)

摘 要: [目的] 探讨 mTOR 对非激素依赖性前列腺癌裸鼠移植瘤的影响及作用机制。[方法] 背部皮下注射 LNCaP 细胞复制裸鼠前列腺癌模型, 去势同时瘤体内注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒, 记录移植瘤进入激素耐药的时间, 同时测量肿瘤组织体积及重量; RT-PCR 和 Western blot 方法分别检测肿瘤组织中 mTOR、CgA、NSE 的 mRNA 和蛋白表达情况; 采用 PI 染色和 AV/PI 染色联合流式细胞术检测肿瘤组织中细胞周期变化和细胞凋亡情况。[结果] 与对照组相比, 瘤体内注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒后, 移植瘤进入激素耐药时间有所延长, 肿瘤组织的体积和重量均显著下降 ($P < 0.05$), 细胞周期中 S 期细胞所占比例减少、凋亡细胞有所增加, 同时, CgA 和 NSE 表达下降 ($P < 0.05$)。[结论] 瘤体内注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒可抑制前列腺癌神经内分泌分化, 促进移植瘤组织凋亡、抑制细胞增殖。

关键词: 肿瘤, 非激素依赖性; 前列腺肿瘤; mTOR; 移植瘤; 神经内分泌分化

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)12-0947-07

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2013.12.B009

Study on the Effect of mTOR on Androgen-independent Prostate Cancer

LI Gang¹, YAN Ruo-dong², MU Zhong-yi¹, et al.

(1. Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110042, China; 2. Panjin First People's Hospital, Panjin 124000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of mTOR on androgen-independent prostate cancer and its mechanisms. [Methods] Subcutaneous xenotransplantation tumor model was established by injection of LNCaP cells into the back of nude mice. The nude mice was castrated and injected with mTOR shRNA lentivirus particles, then tumor volumes and weights were measured. RT-PCR and Western blot were used to detect the expressions of mTOR, CgA and NSE mRNA and proteins respectively. The effects of mTOR shRNA on the cell cycle and apoptosis of tumor cells were examined by PI and AV/PI staining combined with flow cytometry. [Results] Compared with the control group, the duration of androgen resistance in mTOR shRNA group was longer and tumor weight and volume were decreased ($P < 0.05$). The ratio of cells in S phase released and the ratio of apoptosis cells increased. Meanwhile, the expression of CgA and NSE were obviously decreased. [Conclusion] Intratumor injection with mTOR shRNA lentivirus particles could inhibit the neuroendocrine differentiation in prostate cancer, stimulate tumor cells apoptosis and inhibit proliferation.

Subject words: neoplasms, hormone-independent; prostate neoplasms; mTOR; xenotransplanted tumors; neuroendocrine differentiation

前列腺癌是男性最常见的恶性肿瘤之一, 发病率位居世界男性恶性肿瘤第 2 位^[1]。在美国, 前列腺癌已成为危害男性健康的第 1 位肿瘤, 2012 年美国大约有 241 740 例前列腺癌新发病例^[2]。随着人口的老齡化, 前列腺癌的发病率逐年增加, 我国前列腺癌发病率也呈现迅速上升的趋势^[3,4]。雄激素去势内分泌疗法是除手术之外治疗前列腺癌的有效方法之

一, 而激素阻断治疗后出现的前列腺癌雄激素非依赖性生长却极大地影响了内分泌治疗的临床疗效, 雄激素依赖性前列腺癌转变为激素非依赖性前列腺癌后, 治疗更加棘手, 患者生存期短、预后极差, 生活质量极其低下, 成为一项亟待解决的世界性难题^[5-7]。研究显示, 长期的雄激素阻断治疗可以诱导前列腺癌细胞产生神经内分泌(neuroendocrine, NE)分化, 因此推测可能是这一过程通过一种旁分泌的机制使前列腺癌细胞重新生长, 从而导致前列腺癌细胞雄激素耐药性的发生, 而神经元特异性烯醇化酶

基金项目: 辽宁省博士启动基金(20101060)

通讯作者: 胡 滨, 主任医师, 博士; 辽宁省肿瘤医院泌尿外科, 辽宁省沈阳市大东区小河沿路 44 号(110042); E-mail: hubin5566@aliyun.com

收稿日期: 2013-09-18; **修回日期:** 2013-10-21

(neuron-specific enolase, NSE) 和嗜铬粒蛋白 A (chromogranin A, CgA) 与神经内分泌分化过程密切相关, 在神经内分泌肿瘤患者血清中均有所升高, 可用于鉴别诊断、病情监测和疗效评价^[8,9]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 研究表明 mTOR 的过度活化与肿瘤的发生、发展密切相关, 是肿瘤治疗的一个重要靶点^[10]。本研究则探讨 mTOR 对非激素依赖性前列腺癌裸鼠移植瘤的影响及作用机制, 为寻找非激素依赖性前列腺癌的新的治疗靶点提供重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

LNCaP 细胞 (中国科学院上海细胞库); 裸鼠 (中国医科大学实验动物中心); 胎牛血清 (Thermo, Logan, UT); AV/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (KeyGen Biotech, 南京); 细胞周期检测试剂盒 (Beyotime Institute of Biotechnology, 海门); mTOR shRNA 慢病毒颗粒 (上海吉玛制药技术有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech, 北京); Script cDNA 第一链合成试剂盒 (Tiangen Biotech, 北京); 2×Taq PCR Master Mix (Tiangen Biotech, 北京); ECL 发光试剂盒 (Pierce Inc, Rockford, IL); mTOR 抗体、CgA 抗体、NSE 抗体 (Santa Cruz, USA)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

LNCaP 细胞株常规培养于含 10% 胎牛血清的 F12 培养基中, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 7d 用 0.05% 胰蛋白酶消化传代 1 次, 实验均选用对数生长期的细胞。

1.2.2 mTOR shRNA 慢病毒转染实验

取 mTOR shRNA 慢病毒颗粒 10 μg 与慢病毒系统包装质粒 5 μg 共转染 293T 细胞 48h 后, 收集含慢病毒颗粒的细胞上清液, 1 000 r/min 4℃离心 10 min, 收集上清液, -80℃储存备用。培养 LNCaP 细胞至 70%~80% 融合时, 换液为含 3 ml 慢病毒颗粒上清液、5 μl Polybrene (终质量浓度为 5 μg/ml)、2 ml F12 培养基的培养液中, 轻轻混匀, 置 37℃、5% CO₂ 的培养箱中, 转染 18h 后更换新鲜培养基, 将未转染对照

组记作 A 组, 阴性对照转染组为 B 组, mTOR shRNA 慢病毒颗粒转染组为 C 组。

1.2.3 动物模型建立及分组

收集 LNCaP 细胞, 调整细胞密度至 2.5×10⁷/ml, 采用 1 ml 注射器吸取 0.2 ml 细胞悬液注射于裸鼠背部皮下, 待肿瘤长至体积为 200 mm³ 时, 将 LNCaP 荷瘤裸鼠随机分成 4 组, 每组 6 只; 其中 3 组荷瘤裸鼠麻醉后, 常规消毒阴囊, 左手两手指固定睾丸, 在中隔旁阴囊上各切开一小口, 将睾丸挤出并切除, 消毒皮肤, 术后给予青霉素预防感染, 同时瘤体内注射携带无关序列的慢病毒颗粒或 mTOR shRNA 慢病毒颗粒。具体实验分组如下: a 组 (常规去势组): 常规去势; b 组 (阴性对照组): 去势同时瘤体内注射携带无关序列的慢病毒颗粒; c 组 (mTOR shRNA 组): 去势同时瘤体内注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒; d 组 (假手术组): 仅按睾丸切除术方法进行操作, 但不切除睾丸。观察记录肿瘤体积, 每 4d 测量肿瘤的长 (a)、宽 (b) 最大垂直直径 (mm), 依据公式: $V(\text{mm}^3) = 1/2 \times a \times b \times b$ 计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线; 同时记录移植肿瘤进入激素耐药的时间 (移植瘤缩小到一定程度后开始增长的时间), 36d 后处死裸鼠, 取肿瘤组织测量终体积及重量。

1.2.4 RT-PCR 检测肿瘤组织中 mTOR、CgA、NSE mRNA 的表达

TRIzol 法提取各组肿瘤组织总 RNA, 按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行反转录: 取 1 μg 总 RNA 分别加入 oligo (dT) 15 和 random 各 1 μl 以及 dNTP 2 μl, 加 ddH₂O 补足总体积至 14.5 μl, 于 70℃ 反应 5 min 后迅速于冰上冷却, 瞬时离心后加入 RNasin 0.5 μl, M-MLV 1 μl, 于 42℃ 反应 50 min, 后 95℃ 5 min 终止反应。设计 PCR 反应引物 (Table 1), PCR 反应体系为: DNA 模板 1 μl, 上、下游引物各 1 μl, 2×Taq PCR Master-mix 10 μl, ddH₂O 补足总体积至 20 μl。PCR 反应条件为: 95℃ 5 min; 95℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃ 5 min。PCR 反应结束后于 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 凝胶成像系统拍照成像, 以 β -actin 为内参进行灰度分析。

1.2.5 Western blot 检测肿瘤组织中 mTOR、CgA、NSE 的蛋白表达

采用 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法定量蛋白, 取 40 μg 蛋白加入上样缓冲液混匀, 煮沸变性后进行 SDS-PAGE。电泳结束后电转印至 PVDF 膜上,

Table 1 Oligonucleotide primer sequences for PCR

Gene	Sequence(5'-3')	Size(bp)
<i>mTOR</i>	F: CAGCAGTCAAATGCCCTTGGT	190
	R: TCAGCGAGTTCTTGCTATTCC	
<i>CgA</i>	F: CTAAGGTCCAAGAAGACGATG	191
	R: AGCAGTCATCAAGACAGCAC	
<i>NSE</i>	F: GCTGCTCCTTGGCTTACCTG	232
	R: TGACACATGGTCCCTCTCTAACAC	
<i>β-actin</i>	F: CTTAGTTGCGTTACACCTTTCTTG	156
	R: CTGTACCTTCACCGTTCCAGTTT	

5%脱脂奶粉封闭 1h,加入一抗 *mTOR* (1:100)、*CgA* (1:100)、*NSE* (1:100),4℃孵育过夜。TTBS 洗膜,加入 1:5 000 辣根过氧化物酶标记的二抗 37℃孵育 45min。洗膜后加入 ECL 发光液反应 5min,在暗室中曝光显影;曝光后剥脱抗体,加入 β -actin 内参抗体孵育,同样方法曝光显影。

1.2.6 碘化丙啶染色联合流式细胞术检测细胞周期变化

将各组肿瘤组织剪碎,PBS 反复冲洗后,消化、收集细胞,200 目筛网过滤,制备成单细胞悬液,吸弃上清,PBS 漂洗,70%乙醇 4℃固定过夜,加入碘化丙啶 (propidium iodide,PI) 染色液,37℃避光温浴

30min,然后进行流式检测,分析细胞周期变化情况。

1.2.7 细胞凋亡检测

按上述方法将各组肿瘤组织制成单细胞悬液,800r/min 离心 5min 收集细胞,吸弃上清后加入 500 μ l Binding Buffer 重悬细胞;分别加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 PI,室温避光孵育 10min,流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理

使用 SPSS16.0 软件对各组数据进行统计分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 *t* 检验对实验组及对照组间的数据进行比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *mTOR* shRNA 慢病毒颗粒干扰效率观察

将 *mTOR* shRNA 慢病毒颗粒转染至 LNCaP 细胞检验 *mTOR* shRNA 干扰效果(Figure 1),经 *mTOR* shRNA 慢病毒颗粒转染后,*mTOR* 的 mRNA 和蛋白表达水平均存在显著性下降,分别为对照组的 21.43%和 16.00%,说明 *mTOR* shRNA 慢病毒颗粒可有效沉默 *mTOR* 的表达,可用于后续实验。

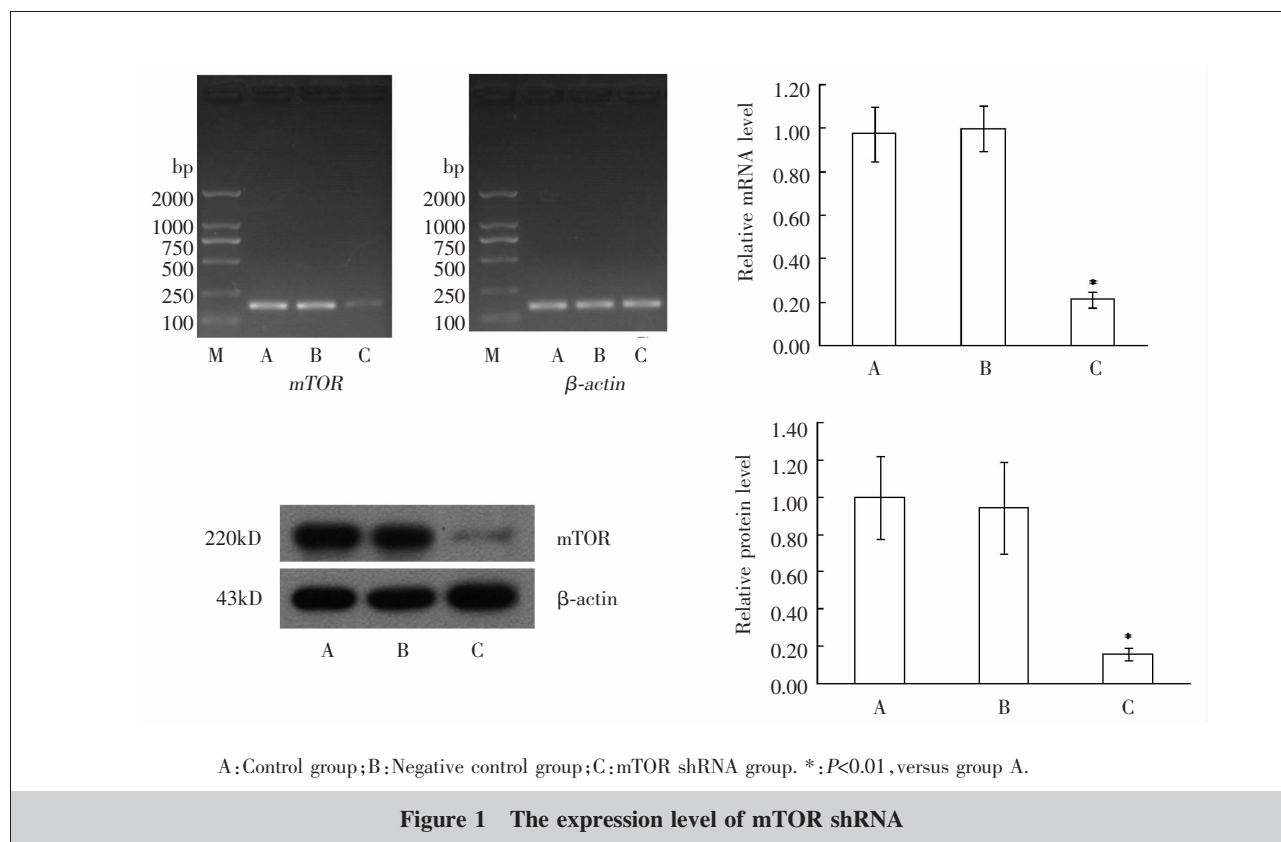


Figure 1 The expression level of *mTOR* shRNA

2.2 干扰 mTOR 表达对去势裸鼠移植瘤生长的影响

常规去势组(a组)和注射携带无关序列的慢病毒颗粒组(b组)在成瘤后第24d即去势后16d肿瘤体积达到最小,分别为 $(64.13 \pm 7.22)\text{mm}^3$ 和 $(57.19 \pm 10.34)\text{mm}^3$,且差异无统计学意义($P=0.21$),此后迅速增长;注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒组(c组)去势后肿瘤进入激素耐药时间较长,肿瘤增大较缓慢,同时,与a组相比,肿瘤的体积和重量均存在显著降低($P=0.00$);未去势组(d组)移植瘤体积随着成瘤时间延长迅速增长(Figure 2)。

2.3 干扰 mTOR 表达对去势裸鼠肿瘤组织中 mTOR、CgA、NSE 表达水平的影响

采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测肿瘤组织中 mTOR、CgA、NSE 的 mRNA 和蛋白表达水平(Figure 3、4),与对照组a组相比,mTOR shRNA 慢病毒颗粒组(c组)中 mTOR 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低,分别为对照组的 25.74%和 30.00%($P=0.00$, $P=0.01$),说明注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒的移植瘤中 mTOR 的表达受到明显抑制;同时,与a组相比,d组中 CgA、NSE 的表达水平有所下降,表明去势后前列腺癌移植瘤中确实存在神经内分泌分

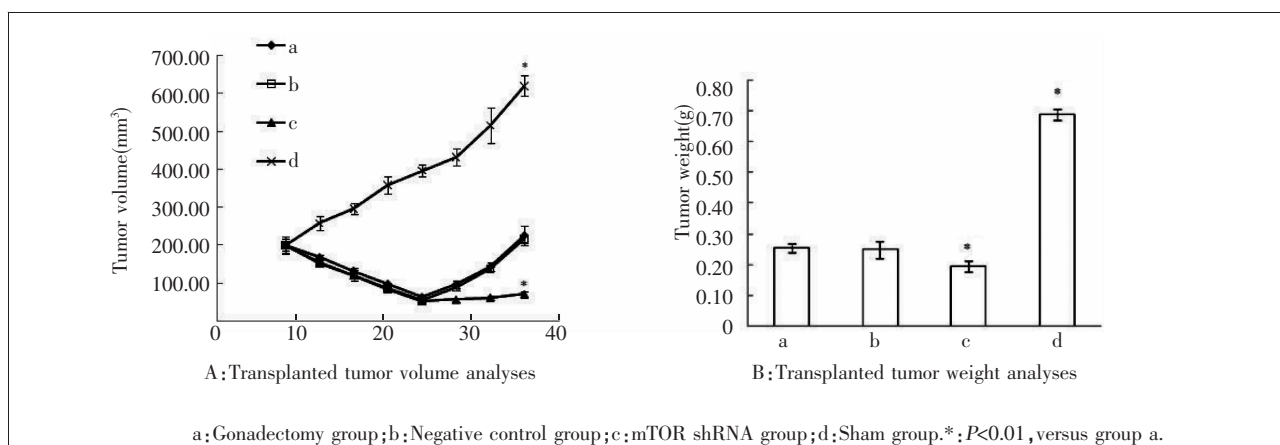


Figure 2 Inhibition of mTOR expression on the growth of transplanted tumors

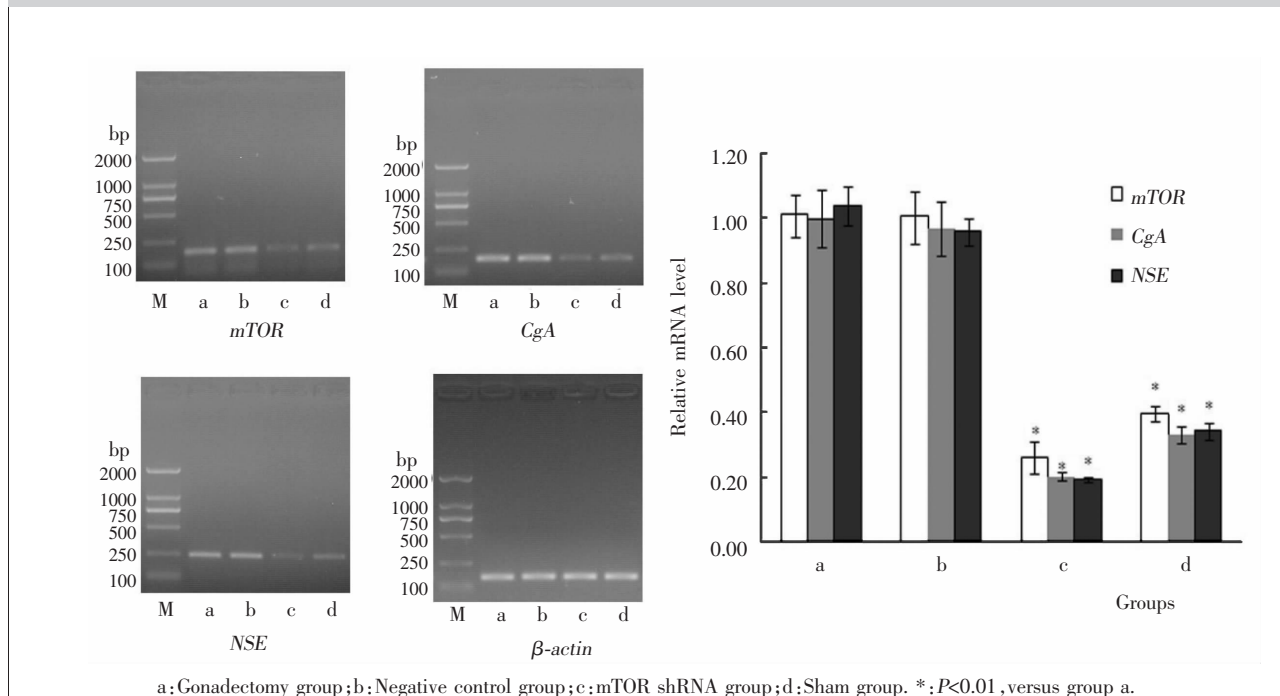


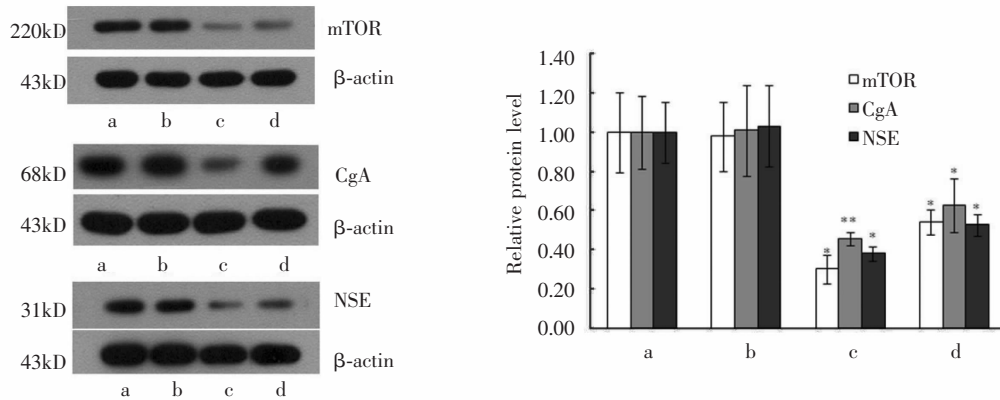
Figure 3 Inhibition of mTOR expression on the mRNA expression of mTOR, CgA and NSE

化情况,c 组中 CgA、NSE 的表达与 a 组比较也存在下降,提示转染 mTOR shRNA 慢病毒颗粒可显著抑制去势后前列腺癌的神经内分泌分化。

2.4 各组肿瘤组织中细胞周期变化

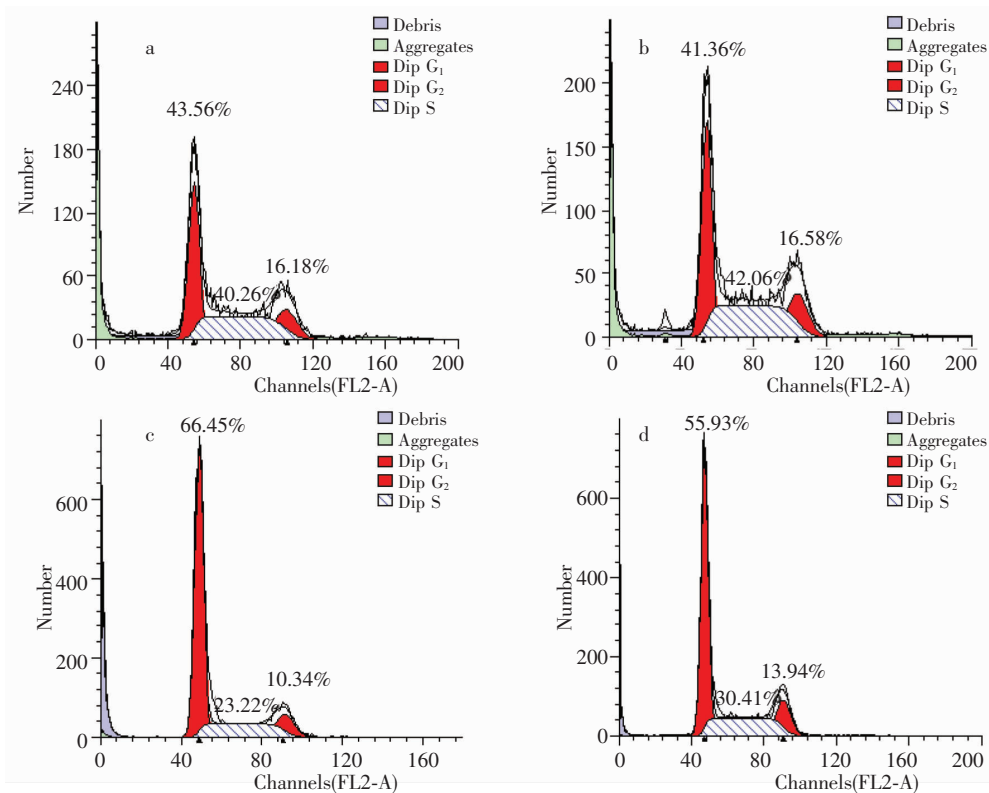
各组移植瘤组织中细胞周期变化,分析显示

(Figure 5),常规去势组(a 组)和注射携带无关序列的慢病毒颗粒组(b 组)中 S 期所占比例最大,注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒组(c 组)S 期细胞所占比例最小,说明 mTOR 低表达可对肿瘤组织中的细胞周期产生影响,降低 S 期细胞所占比例。



a:Gonadectomy group;b:Negative control group;c:mTOR shRNA group;d:Sham group. *:P<0.05,**:P<0.01,versus group a.

Figure 4 Inhibition of mTOR expression on the protein expression of mTOR,CgA and NSE



a:Gonadectomy group;b:Negative control group;c:mTOR shRNA group;d:Sham group.

Figure 5 Inhibition of mTOR expression on the cell cycle of tumor cells

2.5 各组肿瘤组织中细胞凋亡情况

采用 AV/PI 染色联合流式细胞术检测各组移植瘤组织中细胞凋亡情况,与常规去势组(a组)相比,注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒(c组)可增加肿瘤组织中凋亡细胞所占比例,说明 mTOR 低表达可促进移植瘤组织中的细胞凋亡(Figure 6)。

3 讨论

研究显示,长期的雄激素阻断治疗可以诱导前列腺癌细胞产生神经内分泌分化,从而导致前列腺癌细胞雄激素耐药性的发生^[11]。肿瘤神经内分泌分化的细胞为肿瘤组织的一种伴随成分,广泛存在于各种非内分泌组织来源的恶性肿瘤中。2003 年 WHO 对神经内分泌癌/分化的判定标准为:肿瘤组织中一种神经内分泌标志物明确阳性,且阳性细胞数>50%时诊断为神经内分泌癌,否则为伴神经内分泌分化^[12]。神经内分泌分化的肿瘤与一般的肿瘤细胞不同在于其胞浆内含有多种神经内分泌颗粒,如血清素、复合胺和嗜铬素肽类家族等,在前列腺肿瘤中已发现某些产物的受体,如 5-羟色胺-1 α 、神经肽 Y 等,提示神经内分泌化细胞可以通过自分泌和旁分泌或神经网络调控前列腺上皮细胞的生长、增殖和分泌活性物质,从而对其自身及邻近细胞发挥作用^[13]。特定的分子或激素通过相关信号途径可以诱导前列腺癌发生神经内分泌分化,进而引发雄激素耐药性的产生^[14]。Sarwar 等^[15]的研究表明,cAMP-PKA 信号途径与雄激素受体关系紧密,在前列腺癌的发生发展中起关键作用;JAK-STAT 信号途径也参与了前列腺细胞的神经内分泌分化过程^[16,17];同时,PI3K-AKT-mTOR 信号途径也是前列腺癌神经内分泌分化的重要途径之一^[18],究竟哪一条信号途径介导前列腺癌的神经内分泌分化仍有待于进一步深入探讨。

本研究将 LNCaP 细胞接种于裸鼠皮下建立前列腺癌裸鼠移植瘤模型,探讨注射 mTOR shRNA 慢

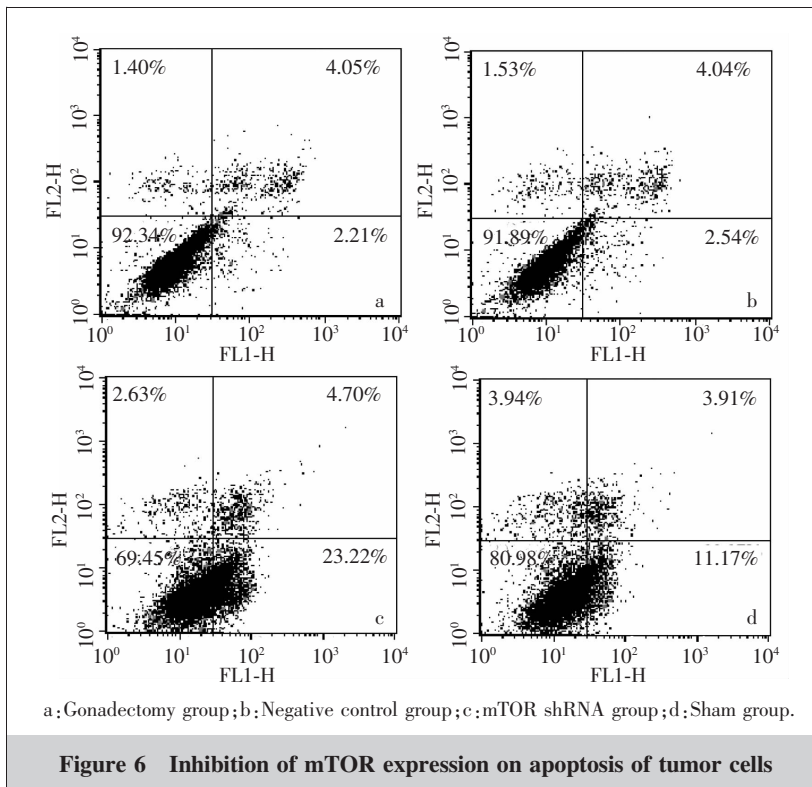


Figure 6 Inhibition of mTOR expression on apoptosis of tumor cells

病毒颗粒对去势后移植瘤的作用影响。结果表明,与未沉默 mTOR 组相比,注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒组去势后肿瘤进入激素耐药时间较长,肿瘤增大较缓慢,同时,肿瘤的体积和重量均存在明显下降,说明 mTOR 在雄激素依赖性前列腺癌转变为雄激素非依赖性前列腺癌的过程中起有重要作用。肿瘤的增长依赖于肿瘤细胞的快速增殖,同时与细胞周期和细胞凋亡进程密切相关。mTOR 是调控细胞周期转变的关键因子之一,研究表明,mTOR 抑制剂可以抑制人结直肠癌细胞株 SW480、HT29 和 HCT116 的增殖,并阻滞其细胞周期^[19];同时,应用 mTOR 抑制剂可以抑制大肠癌细胞增殖,诱导其凋亡,降低小鼠大肠癌发病率和瘤体积^[20]。本研究采用 PI 染色和 AV/PI 染色联合流式细胞仪对各组肿瘤组织中的细胞周期进行检测,发现与未转染 mTOR shRNA 组比较,注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒组 S 期细胞所占比例减少,凋亡细胞所占比例较大,说明 mTOR 可通过调控细胞周期进而调节细胞增殖,同时促进细胞凋亡,从而影响肿瘤的生长。

采用 RT-PCR 和 Western blot 方法分析肿瘤组织中 mTOR、CgA、NSE 的 mRNA 和蛋白表达水平,与未去势组相比,去势组移植瘤组织中 CgA 和 NSE

的表达显著增加,CgA 及 NSE 均为神经内分泌分化的标志物^[21],说明去势后前列腺癌中确实存在神经内分泌分化情况;与未转染 mTOR shRNA 组比较,注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒组中 CgA、NSE 的表达水平均出现明显下降,表明注射 mTOR shRNA 慢病毒颗粒可显著抑制去势后前列腺癌的神经内分泌分化。抑制 mTOR 的表达可促进前列腺癌细胞凋亡、抑制细胞增殖、阻滞细胞周期进程,同时降低神经内分泌分化水平,对前列腺癌的治疗具有十分重要的意义,其具体作用机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(4): 220–241.
- [3] Li M, Zhang SW, Ma JH, et al. A comparative study on incidence trends of prostate cancer in part of cities and counties in China [J]. *Chinese Journal of Urology*, 2009, 30(6): 568–570. [李鸣, 张思维, 马建辉, 等. 中国部分市县前列腺癌发病趋势比较研究 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2009, 30(6): 568–570.]
- [4] Xu Y, Zhang ZH. Discussing in clinical hot issues of prostatic cancer in China [J]. *Chinese Journal of Urology*, 2011, 32(9): 585–587. [徐勇, 张志宏. 我国前列腺癌的临床热点问题探讨 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2011, 32(9): 585–587.]
- [5] Macfarlane RJ, Chi KN. Research in castration-resistant prostate cancer: what does the future hold? [J]. *Curr Oncol*, 2010, Suppl 2: 80–86.
- [6] Scher HI, Halabi S, Tannock I, et al. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the prostate cancer clinical trials working group [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(7): 1148–1159.
- [7] Xu CJ, Ding XY, Wang Z. The role of sarcosine in the diagnosis and treatment for prostate cancer [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2012, 18(8): 579–583. [徐朝江, 丁雪鹰, 王卓. 肌氨酸及其在前列腺癌诊治中的作用 [J]. *肿瘤学杂志*, 2012, 18(8): 579–583.]
- [8] Zhang QY, Xu JJ, Wang YM. The expression of human neuron-specific enolase gene in human tumor cells and clinical significance [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2005, 28(7): 728–731. [张青云, 徐建军, 王雅明. 人神经元特异性烯醇化酶在肿瘤细胞系中的表达检测及意义 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28 (7): 728–731.]
- [9] Xie YQ, Chen RZ. Basic research and clinical significance of chromogranin A [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2010, 26(7): 1440–1443. [谢烨卿, 陈瑞珍. 嗜铬粒蛋白 A 的基础研究与临床意义 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26 (7): 1440–1443.]
- [10] Zheng PS, Ji J. Advance in research on the relationship between mTOR signaling pathway and tumors [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2010, 31(1): 1–8. [郑鹏生, 冀静. mTOR 信号通路 with 肿瘤的研究进展 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2010, 31(1): 1–8.]
- [11] Wu CY, Na YQ, Jorge LY, et al. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2006, 35(9): 565–567. [吴澄宇, 那彦群, Jorge LY, 等. 前列腺癌的神经内分泌分化 [J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35 (9): 565–567.]
- [12] Tavassolia FA, Devilee P. World Health Organization classification of tumours Pathology & genetics tumours of the breast and female genital organs [M]. Vol 5. Lyon: IARC Press, 2003. 32–40.
- [13] Huang J, Yao JL, di Sant' Agnese PA, et al. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2006, 66(13): 1125–1135.
- [14] da Silva HB, Amaral EP, Nolasco EL, et al. Dissecting major signaling pathways throughout the development of prostate cancer [J]. *Prostate Cancer*, 2013, 2013: 920612.
- [15] Sarwar M, Sandberg S, Abrahamsson PA, et al. Protein kinase A (PKA) pathway is functionally linked to androgen receptor (AR) in the progression of prostate cancer [J]. *Urol Oncol*, 2013. [Epub ahead of print]
- [16] Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways [J]. *Growth Factors*, 2012, 30(2): 88–106.
- [17] Harrison DA. The Jak/STAT pathway [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(3): a011205.
- [18] Morgan TM, Koreckij TD, Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(2): 237–249.
- [19] Zhang YJ, Fang JY, Sun DF, et al. Synergistic effect of rapamycin (RPM) and PD98059 on cell cycle and mTOR signal transduction in human colorectal cancer cells [J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2007, 29(12): 889–893. [张燕捷, 房静远, 孙丹凤, 等. 雷帕霉素与 PD98059 联合调控人结直肠癌细胞周期和 mTOR 信号转导通路 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2007, 29(12): 889–893.]
- [20] Zhang YJ, Tian XQ, Sun DF, et al. Combined inhibition of MEK and mTOR signaling inhibits initiation and progression of colorectal cancer [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(3): 273–285.
- [21] Shekhani MT, Jayanthi AS, Maddodi N, et al. Cancer stem cells and tumor transdifferentiation: implications for novel therapeutic strategies [J]. *Am J Stem Cell*, 2013, 2(1): 52–61.