

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.08.007

## 西罗莫司通过 MAPK 信号通路抑制人宫颈癌细胞增殖的实验研究\*

贾利刚,褚兆革,田菲,韩华,代聪伟,王蓓,张媛

(河北省人民医院妇科,石家庄 050051)

**[摘要]** **目的** 探讨雷帕霉素抑制人宫颈癌细胞 HeLa 增殖的机制。**方法** 0、10、30、100 nmol/L 的西罗莫司作用 HeLa 细胞 24、48、72 h, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期, Western blot 检测细胞中 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)蛋白、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1), p21, 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相关蛋白的表达。**结果** 与 0 nmol/L 比较, 10、30、100 nmol/L 西罗莫司能显著降低细胞活力( $P < 0.01$ ), 提高细胞凋亡率( $P < 0.01$ ), 使细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期( $P < 0.01$ ), 下调 Cyclin D1, Bcl-2, 磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK) 1/2, 磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(p-JNK) 及 p-p38 MAPK 表达( $P < 0.01$ ), 上调 Bax 及 p21 表达( $P < 0.01$ )。与西罗莫司组比较, 西罗莫司+SB203580 组、西罗莫司+SP600125、西罗莫司+PD98059 组 Cyclin D1, Bcl-2, p-ERK1/2、p-p38 MAPK 及 p-JNK 表达下调( $P < 0.01$ ), Bax 及 p21 表达上调( $P < 0.01$ )。**结论** 西罗莫司通过阻断 MAPK 信号通路抑制 HeLa 细胞增殖。

**[关键词]** 西罗莫司; 丝裂原活化蛋白激酶类; HeLa 细胞; 细胞增殖**[中图分类号]** R737.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)08-1288-04

**Experimental study of rapamycin inhibiting proliferation of human cervical cancer cells through MAPK signaling pathway\***

JIA Ligang, CHU Zhaoping, TIAN Fei, HAN Hua, DAI Congwei, WANG Bei, ZHANG Yuan  
(Department of Gynaecology, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the mechanism of rapamycin inhibiting the proliferation of human cervical cancer cells-HeLa. **Methods** HeLa cells were cultured with 0, 10, 30, 100 nmol/L dose of rapamycin for 24, 48, 72 h. Cell viability was detected by MTT assay. Apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. The expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), CyclinD1, p21 and MAPK signaling pathway related proteins were measured by Western blot. **Results** Compared with 0 nmol/L, 10, 30, 100 nmol/L rapamycin could reduce cell viability ( $P < 0.01$ ), increase apoptosis rate ( $P < 0.01$ ), and arrest cell cycle in G<sub>1</sub> phase ( $P < 0.01$ ), down-regulation the expression of Cyclin D1, Bcl-2, phosphorylation of extra-cellular signal-regulated kinase (p-ERK) 1/2, p-JNK and p-p38 MAPK ( $P < 0.01$ ), up-regulation the expression of Bax and p21 ( $P < 0.01$ ) significantly. Compared with the rapamycin group, the expression of CyclinD1, Bcl-2, p-ERK1/2, p-JNK and p-p38 MAPK was down-regulated ( $P < 0.01$ ), the expression of Bax and p21 was up-regulated in the rapamycin+SB203580, rapamycin+SP600125 and rapamycin+PD98059 group. **Conclusion** Rapamycin inhibits the proliferation of HeLa cells by blocking the MAPK signaling pathway.

**[Key words]** sirolimus; mitogen-activated protein kinases; HeLa cell; cell proliferation

宫颈癌是一种常见的妇科恶性肿瘤,虽然近年来随着宫颈细胞学筛查技术的不断提高,发病率及病死率有所降低,但患者呈年轻化趋势<sup>[1-3]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族是一类与细胞增殖、凋亡、分化、应激反应等密切相关的丝氨酸/苏氨酸激酶,主要包括细胞外信号调节激酶(ERK), p38 MAPK, c-Jun 氨基末端激酶(JNK) 3 个亚族<sup>[4-6]</sup>。研究显示 MAPK 信号通路在众多实体肿瘤中被高度激活,抑制此信号

通路的活化成为多种抗肿瘤药物的靶点之一<sup>[4-6]</sup>。西罗莫司是从复活岛上发现的一种大环内酯类抗生素,动物药理实验发现西罗莫司是一种低毒、高效、无肾毒性的新型免疫性抑制剂,被广泛地应用于肾移植中<sup>[7-8]</sup>。另外研究还显示西罗莫司能够通过抑制其靶蛋白 mTOR 表达进而调控下游基因转录,发挥对卵巢癌、乳腺癌、肝癌、肾癌、宫颈癌等肿瘤细胞的杀伤作用<sup>[9-13]</sup>,而西罗莫司是否能够通过抑制 MAPK 信号

通路进而发挥其抗肿瘤作用尚未见报道,因此本研究将旨在探讨西罗莫司能否通过 MAPK 信号通路抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖。

**1 材料与方法**

**1.1 细胞株** 宫颈癌细胞 HeLa 购自中国科学院细胞库,培养于含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

**1.2 试剂与仪器** DMEM 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;兔抗人 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、p21、ERK1/2、p-ERK1/2、JNK、p-JNK、p38 MAPK、p-p38 MAPK 及 GAPDH 多克隆抗体均购于美国 Abcam 公司;Annexin V-FITC/PI 流式双染试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,细胞周期检测试剂盒、SB203580 (ERK1/2 抑制剂)、SP600125(JNK 抑制剂)、PD98059 (p38 MAPK 抑制剂)均购于南通碧云天生物技术有限公司。ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司;MK3 酶标仪购自美国 Thermo 公司。

**1.3 细胞分组** (1)将 0、10、30、100 nmol/L 的西罗莫司作用于 HeLa 细胞,为 0、10、30、100 nmol/L 组;(2)将细胞分为正常对照组(无任何药物处理),西罗莫司组(30 nmol/L 西罗莫司),西罗莫司+SB203580 组(30 nmol/L 西罗莫司+10 μmol/L SB203580),西罗莫司+SP600125 (30 nmol/L 西罗莫司+10 μmol/L SP600125),西罗莫司+PD98059 (30 nmol/L 西罗莫司+10 μmol/L PD98059)。

**1.4 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 HeLa 细胞活力** 将 5×10<sup>3</sup> 个 HeLa 细胞接种到 6 孔板,待细胞贴壁后,按“1.3(1)”分组,并将细胞培养 24、48、72 h,加入 MTT 孵育 4 h 后再加入 150 μL 的二甲基亚砷,震荡使结晶物溶解,测定吸光度(A)。

**1.5 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡** 将 9×10<sup>3</sup> 个 HeLa 细胞接种到 6 孔板,待细胞贴壁后,按“1.3(1)”分组,并将细胞培养 48 h,收集细胞,加入结合缓冲液混匀后,继续加入 Annexin V-FITC 及 PI 并混匀,1 h 内上流式细胞仪进行细胞凋亡的检测并

分析。

**1.6 流式细胞术检测细胞周期** 将 9×10<sup>3</sup> 个 HeLa 细胞接种到 6 孔板,待细胞贴壁后,按“1.3(1)”分组,并将细胞培养 48 h,收集细胞,加入核糖核酸酶(RNase)混匀并孵育 1 h,再加入 PI 染液孵育 30 min,1 h 内上流式细胞仪进行细胞周期的检测并分析。

**1.7 Western blot** 将 9×10<sup>3</sup> 个 HeLa 细胞接种到 6 孔板,待细胞贴壁后,按“1.3(2)”分组,并将细胞培养 48 h,收集细胞并裂解得到细胞总蛋白,测定蛋白浓度。制作浓缩胶和分离胶,蛋白上样后,进行凝胶电泳,湿法转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,脱脂奶粉封闭 1 h 后,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,于凝胶成像系统中曝光。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用 *F* 检验,组间两两比较采用 *q* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 西罗莫司对 HeLa 细胞活力的影响** 0、10、30、100 nmol/L 西罗莫司作用 HeLa 细胞 24、48、72 h,西罗莫司呈时间及浓度依赖性地降低细胞活力(*P*<0.01),见表 1。

**表 1 西罗莫司对 HeLa 细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	24 h	48 h	72 h
0 nmol/L 组	0.48±0.04	0.58±0.05	0.67±0.07
10 nmol/L 组	0.44±0.04	0.42±0.05	0.40±0.04
30 nmol/L 组	0.41±0.04	0.35±0.04	0.30±0.03
100 nmol/L 组	0.38±0.03	0.32±0.03	0.13±0.01

**2.2 西罗莫司对 HeLa 细胞凋亡及细胞周期的影响** 0、10、30、100 nmol/L 西罗莫司作用 HeLa 细胞 48 h,经流式细胞术发现,与 0 nmol/L 组比较,10、30、100 nmol/L 组细胞早期凋亡率及晚期凋亡率均显著提高(均 *P*<0.05),并使细胞周期阻滞在 G<sub>1</sub> 期(均 *P*<0.01),见表 2。

**表 2 西罗莫司对 HeLa 细胞凋亡及细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

组别	细胞凋亡		细胞周期百分比		
	早期凋亡率	晚期凋亡率	G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> 期
0 nmol/L 组	2.33±0.23	3.56±0.35	44.52±4.45	30.85±3.08	24.65±2.32
10 nmol/L 组	6.45±0.65 <sup>a</sup>	7.97±0.80 <sup>a</sup>	51.36±5.14 <sup>a</sup>	26.37±2.64 <sup>a</sup>	22.27±2.04 <sup>a</sup>
30 nmol/L 组	12.38±1.24 <sup>a</sup>	12.54±1.25 <sup>a</sup>	56.30±5.63 <sup>a</sup>	23.62±2.36 <sup>a</sup>	20.08±1.80 <sup>a</sup>
100 nmol/L 组	18.27±1.83 <sup>a</sup>	19.28±1.93 <sup>a</sup>	62.57±6.25 <sup>a</sup>	20.38±2.04 <sup>a</sup>	17.05±1.49 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.01,与同时间点 0 nmol/L 组比较

**2.3 西罗莫司对 HeLa 细胞中 Bax、Bcl-2、Cyclin D1 及 p21 表达的影响** 0、10、30、100 nmol/L 的西罗莫司作用 HeLa 细胞 48 h, 与 0 nmol/L 组比较, 10、30、100 nmol/L 组细胞中 Cyclin D1、Bcl-2 相对表达水平下调( $P < 0.01$ ), Bax 及 p21 的相对表达水平上调( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 西罗莫司对 HeLa 细胞中 Bax、Bcl-2、Cyclin D1 及 p21 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bax/ GAPDH	Bcl-2/ GAPDH	Cyclin D1/ GAPDH	p21/ GAPDH
0 nmol/L 组	0.16±0.01	0.57±0.06	0.74±0.07	0.14±0.01
10 nmol/L 组	0.28±0.02 <sup>a</sup>	0.50±0.05	0.48±0.04 <sup>a</sup>	0.27±0.02 <sup>a</sup>
30 nmol/L 组	0.63±0.06 <sup>a</sup>	0.33±0.03 <sup>a</sup>	0.31±0.03 <sup>a</sup>	0.48±0.05 <sup>a</sup>
100 nmol/L 组	1.04±0.10 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.18±0.02 <sup>a</sup>	0.73±0.07 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 0 nmol/L 组比较

**2.4 西罗莫司对 HeLa 细胞中 ERK1/2、JNK 及 p38 MAPK 磷酸化水平的影响** 0、10、30、100 nmol/L 的西罗莫司作用 HeLa 细胞 48 h, 与 0 nmol/L 组比较, 10、30、100 nmol/L 组细胞中 p-ERK1/2、p-JNK 及 p-p38 MAPK 相对表达水平下调( $P < 0.01$ ), 见表 4。

**2.5 阻断 ERK1/2、JNK 及 p38 MAPK 信号通路对**

西罗莫司处理的 HeLa 细胞中 Bax、Bcl-2、Cyclin D1 及 p21 表达的影响 与西罗莫司组比较, 西罗莫司+SB203580 组、西罗莫司+SP600125、西罗莫司+PD98059 组细胞中 Bax 及 p21 相对表达水平上调( $P < 0.01$ ), Bcl-2 及 Cyclin D1 相对表达水平下调( $P < 0.01$ )。见表 5。

表 4 西罗莫司对 HeLa 细胞中 ERK1/2 及 p38 MAPK 磷酸化水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	(p-ERK1/2)/ (ERK1/2)	p-JNK/JNK	p-p38 MAPK/ p38 MAPK
0 nmol/L 组	0.97±0.09	0.89±0.09	1.08±0.10
10 nmol/L 组	0.63±0.06 <sup>a</sup>	0.58±0.06 <sup>a</sup>	0.84±0.08 <sup>a</sup>
30 nmol/L 组	0.45±0.04 <sup>a</sup>	0.43±0.04 <sup>a</sup>	0.56±0.06 <sup>a</sup>
100 nmol/L 组	0.26±0.02 <sup>a</sup>	0.27±0.03 <sup>a</sup>	0.28±0.03 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 0 nmol/L 组比较

**2.6 阻断 ERK1/2、JNK 及 p38 MAPK 信号通路对西罗莫司处理的 HeLa 细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响** 与西罗莫司组比较, 西罗莫司+SB203580 组、西罗莫司+SP600125、西罗莫司+PD98059 组细胞中 p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 MAPK 相对表达水平下调( $P < 0.01$ )。见表 6。

表 5 阻断 ERK1/2、JNK 及 p38 MAPK 信号通路对西罗莫司处理的 HeLa 细胞中 Bax、Bcl-2、Cyclin D1 及 p21 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Cyclin D1/GAPDH	p21/GAPDH
正常对照组	0.16±0.01	0.43±0.04	0.76±0.07	0.22±0.02
西罗莫司组	0.36±0.03 <sup>a</sup>	0.46±0.04 <sup>a</sup>	0.45±0.04 <sup>a</sup>	0.43±0.04 <sup>a</sup>
西罗莫司+SB203580 组	0.58±0.06 <sup>ab</sup>	0.22±0.02 <sup>ab</sup>	0.36±0.03 <sup>ab</sup>	0.69±0.07 <sup>ab</sup>
西罗莫司+SP600125 组	0.64±0.06 <sup>ab</sup>	0.30±0.03 <sup>ab</sup>	0.37±0.04 <sup>ab</sup>	0.71±0.07 <sup>ab</sup>
西罗莫司+PD98059 组	0.63±0.06 <sup>ab</sup>	0.19±0.02 <sup>ab</sup>	0.35±0.03 <sup>ab</sup>	0.68±0.07 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与西罗莫司组比较

表 6 阻断 ERK1/2、JNK 及 p38 MAPK 信号通路对西罗莫司处理的 HeLa 细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	p-ERK1/2/ ERK1/2	p-JNK/JNK	p-p38 MAPK/p38 MAPK
正常对照组	0.89±0.09	0.89±0.09	0.86±0.09
西罗莫司组	0.58±0.06 <sup>a</sup>	0.58±0.06 <sup>a</sup>	0.46±0.05 <sup>a</sup>
西罗莫司+SB203580 组	0.28±0.03 <sup>ab</sup>	0.37±0.04 <sup>ab</sup>	0.31±0.03 <sup>ab</sup>
西罗莫司+SP600125 组	0.36±0.04 <sup>ab</sup>	0.22±0.02 <sup>ab</sup>	0.58±0.06 <sup>ab</sup>
西罗莫司+PD98059 组	0.32±0.03 <sup>ab</sup>	0.36±0.04 <sup>ab</sup>	0.24±0.02 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与西罗莫司组比较

### 3 讨 论

西罗莫司是 1964 年从复活岛上发现的一种新型抗生素, 接着研究者还发现西罗莫司具有抗酵母菌感染作用, 提示西罗莫司的免疫抑制作用<sup>[7-8]</sup>。后续众多学者发现西罗莫司还具有显著的抗肿瘤作用<sup>[9-12]</sup>。

本课题组前期已经证实西罗莫司能显著抑制 HeLa 细胞侵袭、转移<sup>[13]</sup>, 但西罗莫司对 HeLa 细胞增殖的影响及相关机制尚报道较少。所以本研究首先采用 MTT 法检测不同浓度的西罗莫司对 HeLa 细胞活力的影响, 结果表明西罗莫司能显著降低 HeLa 细胞活力, 并

呈时间及浓度依赖性。接着采用流式细胞术检测西罗莫司对 HeLa 细胞凋亡及细胞周期的影响,结果表明西罗莫司能显著提高细胞凋亡率,并使细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期。

细胞的凋亡受细胞凋亡相关蛋白调控,Bcl-2 家族中的抑制凋亡蛋白 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 结合,阻断上游凋亡信号传递,促进细胞存活与生长。而促凋亡蛋白 Bax 自身还能够形成二聚体,传递上游凋亡信号,最终诱导细胞凋亡。细胞周期和细胞凋亡密不可分,细胞周期由细胞周期相关蛋白调控,与 G<sub>1</sub> 期最为密切相关的周期蛋白 Cyclin D1 与细胞周期依赖性蛋白激酶 4/6(CDK4/6)结合形成复合物,促使 Rb 磷酸化,诱导核转录因子 E2F3 进入细胞核促进增殖相关基因转录,而细胞周期蛋白抑制子 p21 通过抑制细胞周期蛋白与 CDK4/6 的结合,进而阻断细胞的恶性增殖<sup>[14-15]</sup>。已经有研究显示西罗莫司能够通过上调 Bax 及 p21 表达,下调 Bcl-2 及 Cyclin D1 表达,使细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期<sup>[9,11-12]</sup>,推测西罗莫司可能能够通过调控细胞周期相关蛋白表达使 HeLa 细胞周期发生阻滞。本研究结果正如推测所示,西罗莫司能显著下调 Bcl-2 及 Cyclin D1 表达,上调 Bax 及 p21 表达,继而使细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期,并诱导细胞凋亡。

MAPK 家族成员主要包括 ERK、JNK 及 p38 MAPK 等,此家族介导的信号通路与细胞的增殖、凋亡、分化、细胞骨架重排、细胞应激行为密切相关。其中 ERK 共有 7 个亚族,ERK1 及 ERK2 是最为重要的两个亚族,受上游信号激活后,转移到细胞核内,使下游转录因子磷酸化,同时部分蛋白留在细胞质中,共同介导细胞凋亡、增殖、细胞骨架重排等生物学行为。JNK 共有 3 个亚族,分别为 JNK1、JNK2 及 JNK3,此信号通路被激活能够激活 p38 MAPK 信号通路,共同介导细胞的增殖与应激行为。研究显示 MAPK 信号通路在宫颈癌的发生发展中被高度激活,并成为包括宫颈癌在内多种肿瘤的治疗靶点<sup>[4-6]</sup>。另外也有多个研究显示西罗莫司对 MAPK 信号通路具有显著的调控作用<sup>[16-18]</sup>。因此本研究进一步探讨西罗莫司对 HeLa 细胞中 MAPK 信号通路的影响,结果表明西罗莫司能显著的下调 p-ERK1/2、p-JNK、p-p38 MAPK 表达。

同时为了进一步证实西罗莫司确实是通过此信号通路抑制 HeLa 细胞增殖,本研究还选用 ERK1/2 抑制剂 SB203580,JNK 抑制剂 SP600125,p38 MAPK 抑制剂 PD98059 分别与西罗莫司共同作用 HeLa 细胞 48 h,采用 Western blot 检测西罗莫司联合抑制剂对 HeLa 细胞中 Bax、Bcl-2、Cyclin D1、p21、p-ERK1/2、

p-JNK 及 p-p38 MAPK 表达的影响,结果表明与西罗莫司组比较,西罗莫司联合抑制剂组(SB203580、SP600125、PD98059)能显著的下调 Bcl-2、Cyclin D1 表达,上调 Bax 及 p21 表达,并降低 ERK1/2、JNK 及 p38 MAPK 磷酸化水平,从而说明西罗莫司对 HeLa 细胞的增殖抑制作用确实是通过阻断 MAPK 信号通路实现的。

综上所述,10、30、100 nmol/L 的西罗莫司能显著的降低 HeLa 细胞活力,诱导细胞凋亡,使细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 期,下调 Bcl-2、Cyclin D1 表达,上调 Bax 及 p21 表达,此过程是通过阻断 MAPK 信号通路实现的。

## 参考文献

- [1] 杨莉,程玺. 宫颈癌分子靶向治疗的研究进展[J]. 中国癌症杂志,2015,25(1):73-80.
- [2] DE CAMPOS R P, SCHULTZ I C, MELLO P D, et al. Cervical cancer stem-like cells: systematic review and identification of reference genes for gene expression[J]. Cell Biol Int, 2018,42(2):139-152.
- [3] 张禹,杨宏英,姚宇峰,等. 微小 RNA-214 在宫颈癌中的研究进展[J]. 医学研究生学报,2017,30(1):104-107.
- [4] JIN X, MO Q, ZHANG Y, et al. The p38 MAPK inhibitor BIRB796 enhances the antitumor effects of VX680 in cervical cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2016,17(5):566-576.
- [5] MING P, CAI T, LI J, et al. A novel arylbenzofuran induces cervical cancer cell apoptosis and G<sub>1</sub>/S arrest through ERK-mediated Cdk2/cyclin-A signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016,7(27):41843-41856.
- [6] SHAO F, WANG S, LI H, et al. EM23, a natural sesquiterpene lactone, targets thioredoxin reductase to activate JNK and cell death pathways in human cervical cancer cells[J]. Oncotarget, 2016,7(6):6790-6808.
- [7] NADAL M, GIRAUDAU B, TAVERNIER E A, et al. Efficacy and safety of mammalian target of rapamycin inhibitors in vascular anomalies: a systematic review[J]. Acta Derm Venereol, 2016,96(4):448-452.
- [8] LIM W H, ERIS J, KANELLIS J, et al. A systematic review of conversion from calcineurin inhibitor to mammalian target of rapamycin inhibitors for maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2014,14(9):2106-2119.
- [9] LI J, LI X, WANG J, et al. MicroRNA-218 increases cellular sensitivity to Rapamycin via targeting Rictor in cervical cancer[J]. APMIS, 2015,123(7):562-570.
- [10] LI J, XUE L, HAO H, et al. Rapamycin provides a therapeutic option through inhibition of mTOR signaling in chronic myelogenous leukemia [J]. Oncol Rep, 2012, 27(2):461-466.

Exp,2016,25112:.

- [4] BHATTACHARYA P, THIRUPATHI M, ELSHABRAWY H A, et al. GM-CSF; an immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity[J]. *Cytokine*, 2015, 75(2): 261-271.
- [5] 罗建华, 周智广, 蒋铁建, 等. 人 GAD65 DNA 疫苗预防 NOD 鼠糖尿病的机制探讨[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(21): 1791-1795.
- [6] 裴剑浩, 周智广, 罗建华, 等. 吡格列酮对 NOD 鼠糖尿病的预防作用及机制探讨[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(5): 411-415.
- [7] PUGLIESE A. Autoreactive T cells in type 1 diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(8): 2881-2891.
- [8] GOGESCH P, SCHÜLKE S, SCHEURER S, et al. Modular MLV-VLPs co-displaying ovalbumin peptides and GM-CSF effectively induce expansion of CD11b<sup>+</sup> APC and antigen-specific T cell responses in vitro[J]. *Mol Immunol*, 2018, 101: 19-28.
- [9] MBONGUE J C, NIEVES H, TORREZ T W, et al. The role of dendritic cell maturation in the induction of Insulin-Dependent diabetes mellitus[J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 327.
- [10] RAKER V K, DOMOGALLA M P, STEINBRINK K. Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 569.
- [11] MAHNKE K, RING S, ENK A H. Antibody targeting of "Steady-State" dendritic cells induces tolerance mediated by regulatory T cells[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 63.
- [12] BOUDALY S, MORIN J, BERTHIER R, et al. Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2002, 13(1): 29-37.
- [13] GANGI E, VASU C, CHEATEM D, et al. IL-10-produ-

cing CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells play a critical role in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced suppression of experimental autoimmune thyroiditis [J]. *J Immunol*, 2005, 174(11): 7006-7013.

- [14] BHATTACHARYA P, THIRUPATHI M, ELSHABRAWY H A, et al. GM-CSF; An immune modulatory cytokine that can suppress autoimmunity[J]. *Cytokine*, 2015, 75(2): 261-271.
- [15] CURTI A, FOGLI M, RATTA M, et al. Stem cell factor and FLT3-ligand are strictly required to sustain the long-term expansion of primitive CD34<sup>+</sup> DR-dendritic cell precursors[J]. *J Immunol*, 2001, 166(2): 848-854.
- [16] VASU C, HOLTERMAN M J, PRABHAKAR B S. Modulation of dendritic cell function and cytokine production to prevent thyroid autoimmunity[J]. *Autoimmunity*, 2003, 36(6/7): 389-396.
- [17] SATO K, UTO T, FUKAYA T, et al. Regulatory dendritic cells[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 410: 47-71.
- [18] MORRIS G P, KONG Y C. Interference with CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-cell-mediated tolerance to experimental autoimmune thyroiditis by glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor monoclonal antibody[J]. *J Autoimmun*, 2006, 26(1): 24-31.
- [19] O'SULLIVAN B J, THOMAS H E, PAI S, et al. IL-1 beta breaks tolerance through expansion of CD25<sup>+</sup> effector T cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(12): 7278-7287.
- [20] SUN S C, CHANG J H, JIN J. Regulation of nuclear factor- $\kappa$ B in autoimmunity [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(6): 282-289.

(收稿日期: 2019-12-28 修回日期: 2019-02-13)

(上接第 1291 页)

- [11] WANG C, GAO D, GUO K, et al. Novel synergistic anti-tumor effects of rapamycin with bortezomib on hepatocellular carcinoma cells and orthotopic tumor model [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 166.
- [12] CHEN B, XU X, LUO J, et al. Rapamycin enhances the anti-cancer effect of dasatinib by suppressing Src/PI3K/mTOR pathway in NSCLC cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e129663.
- [13] 贾利刚, 田菲, 张媛. 雷帕霉素对宫颈癌 HeLa 细胞侵袭转移的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2016, 27(16): 2225-2228.
- [14] SOMMARIVA S, TARRICONE R, LAZZERI M A, et al. Prognostic value of the cell cycle progression score in patients with prostate cancer; a systematic review and meta-analysis[J]. *Eur Urol*, 2016, 69(1): 107-115.
- [15] CADONI G, BOCCIA S, PETRELLI L, et al. A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and

alcohol metabolism[J]. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2012, 32(1): 1-11.

- [16] XU C, WANG X, ZHU Y, et al. Rapamycin ameliorates cadmium-induced activation of MAPK pathway and neuronal apoptosis by preventing mitochondrial ROS inactivation of PP2A[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 105: 270-284.
- [17] KO J H, YOON S O, LEE H J, et al. Rapamycin regulates macrophage activation by inhibiting NLRP3 inflammasome-p38 MAPK-NF kappa B pathways in autophagy- and p62-dependent manners[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25): 40817-40831.
- [18] TATEDA S, KANNO H, OZAWA H, et al. Rapamycin suppresses microglial activation and reduces the development of neuropathic pain after spinal cord injury[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(1): 93-103.

(收稿日期: 2018-12-18 修回日期: 2019-01-25)