BCOR 突变通过 PI_3K/Akt/mTOR 通路介导 MDS 细胞生物学行为改变的机制研究

陈佳楠 金嘉诚 徐凡环 郭 娟 刘 宏 陶 英 常春康 李 晓 吴凌云

摘 要 目的 探讨 BCOR(BCL6 co-repressor)基因突变介导骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)细胞生物学行为的分子机制。**方法** 通过构建 $BCOR^{P483L}$ 过表达慢病毒以及空载体病毒,转染 K562 细胞,采用集落形成实验检测 BCOR 突变对细胞克隆形成能力的影响,流式细胞术检测细胞凋亡、细胞周期,Western blot 法和实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)方法检测细胞焦亡和 PI_3K/Akt/mTOR 通路分子水平,采用转录组测序技术(RNA-sequencing, RNA-Seq)检测分析 $BCOR^{P483L}$ 突变对下游靶基因表达的影响。**结果** $BCOR^{P483L}$ 突变显著地抑制细胞克隆形成能力,促进细胞凋亡,并导致细胞周期阻滞和细胞焦亡水平增加。RNA-Seq 分析发现,$BCOR^{P483L}$ 突变后 K562 内与细胞凋亡、G_2M 周期检查点、慢性髓系白血病、细胞衰老、细胞内炎性反应相关的基因以及原癌基因 MYC 目标基因表达上调。Western blot 法实验进一步证实,$BCOR^{P483L}$ 突变细胞的 PI_3K/Akt/mTOR 通路明显受到抑制。**结论** BCOR 突变导致细胞 PI_3K/Akt/mTOR 通路受到抑制,进而导致细胞凋亡增加、增殖受抑。BCOR 突变能通过上调细胞衰老相关基因以及原癌基因 MYC 目标基因表达,提高细胞内炎性反应水平,从而促进 MDS 疾病进展。

关键词 BCOR 突变 骨髓增生异常综合征 细胞凋亡 细胞焦亡

中图分类号 R733 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2024.04.014

BCOR Mutation Induces the Change of Cell Biological Behaviors in Myelodysplastic Syndromes via PI_3K/Akt/mTOR Pathway. *CHEN Jianan, JIN Jiacheng, XU Fanhuan, et al. Department of Hematology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200233, China*

Abstract Objective To explore the molecular mechanism of BCL6 co-repressor (BCOR) gene mutation in mediating the cell biological behaviors of myelodysplastic syndromes (MDS). **Methods** K562 cells were transfected with $BCOR^{P483L}$ expression lentivirus and empty vector virus, respectively. Colony formation test was used to detect the effect of $BCOR^{P483L}$ mutation on the clonogenic formation ability of cells. The cell apoptosis and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were used to detect the levels of pyroptosis and PI_3K/Akt/mTOR pathway. And RNA-Sequencing (RNA-Seq) was used to detect the effect of $BCOR^{P483L}$ mutation on the expressions of downstream target genes. **Results** $BCOR^{P483L}$ mutation significantly inhibited the colony formation ability of cells, promoted cell apoptosis, blocked the cell cycle, and increased pyroptosis. RNA-Seq analysis showed that the genes related to cell apoptosis, G_2M cycle checkpoint, chronic myeloid leukemia, cell senescence, intracellular inflammatory response, and the target genes of oncogene MYC were up-regulated in the K562 cells after $BCOR^{P483L}$ mutation. Western blot experiment further confirmed that $BCOR^{P483L}$ mutation significantly inhibited the PI_3K/Akt/mTOR pathway in the K562 cells. **Conclusion** $BCOR^{P483L}$ mutation promotes cell apoptosis and inhibits cell proliferation via the inhibition of PI_3K/Akt/mTOR pathway. And $BCOR^{P483L}$ mutation can up-regulate the cell-senescence-related genes, oncogene MYC target genes, and increases the level of the intracellular inflammatory response, thus promoting the development of MDS.

Key words BCOR mutation; Myelodysplastic syndrome; Cell apoptosis; Cell pyroptosis

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndromes, MDS)是一组起源于造血干/祖细胞的恶性克隆性疾病,其典型特征为骨髓造血细胞发育异常,向急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)转化的风险较高[1],到目前为止 MDS 发病机制尚未完全阐明。随着二代测序技术的广泛开展,发现80% ~ 90% MDS 患者存在基因突变。笔者和其他多个中心的前期研究均发现 MDS 和 AML 中存在 BCOR(BCL6

基金项目:上海市自然科学基金资助项目(22ZR1447700)

作者单位:200233 上海交通大学医学院附属上海市第六人民医院血液科

通信作者:吴凌云,电子信箱:lincy2032@163.com

co-repressor)突变[2~5]。BCOR 编码的转录调节因子是 BCL6 的相互作用辅阻遏子,也是非典型多梳抑制复合物 1.1(polycomb repressive complex 1.1, PRC1.1)的一个重要组成部分,参与组蛋白 H2A 第 119 位赖氨酸单泛素修饰(H2AK119ub1),从而调节基因转录,发挥多种细胞功能[6~8]。

研究证实,BCOR 突变促进血液系统肿瘤转化及疾病进展,具有预测预后价值[9~11]。笔者前期临床研究发现,在核型正常的 MDS 患者中,BCOR 突变频率为 8.7%,明显高于核型异常的 MDS 患者(4.2%, $P=0.04$)。且进一步的分析发现,相对无突变的患者,携带 BCOR 突变的 MDS 患者的原始骨髓细胞比例较高,且存在更高的白血病转化风险[2]。然而,BCOR 突变促进 MDS 进展的具体分子机制尚未阐明。笔者前期在 MDS 患者中发现了 BCOR 基因 4 号外显子的 p.P483L 热点突变[2]。因此本研究通过体外构建 $BCOR^{P483L}$ 突变细胞以及多种实验方法进一步研究 $BCOR^{P483L}$ 突变对 MDS 细胞生物学功能影响,探索可能的分子机制。

材料与方法

1. 实验细胞培养及病毒转染:K562 细胞于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素双抗溶液的 IMDM 培养基中培养,并置于 37℃、5% CO_2、100% 湿度培养箱中培养。根据 BCOR 序列(基因库编号:NM_001123385)设计靶序列,合成 P483L-突变-BCOR 序列,构建重组慢病毒载体(由上海吉凯基因医学科技股份有限公司构建)。将对数生长期的细胞随机分为两组,即 $BCOR^{P483L}$ 突变组和阴性对照组,分别加入 $BCOR^{P483L}$ 突变病毒和对照空载体慢病毒。病毒转染 72h 后用嘌呤霉素进行筛选,分别获得 $BCOR^{P483L}$ 突变组细胞和阴性对照组细胞,将未转染的 K562 细胞作为空白对照组。

2. 实验试剂:MethoCult 甲基纤维素半固体培养基购自加拿大干细胞技术有限公司。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、细胞周期和凋亡分析试剂盒、RIPA 裂解缓冲液、BCA 蛋白质分析试剂盒以及 ECL 化学发光试剂盒均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。BCOR 抗体,NLRP3 抗体,PI_3K 抗体,Akt 抗体,p-Akt 抗体,P-mTOR 抗体,mTOR 抗体均购自美国 ABCAM 公司,GAPDH 抗体购自美国 Affinity 抗体公司,IL-18 抗体,IL-1β 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。抗鼠二抗以及引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,抗兔二抗购自美国 CST 公司。预制凝胶购自上海天能生命科学有限公司。RT-qPCR 相关试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。BigDye Terminator 购自美国 Applied Biosystems 公司。EDTA 购自国药集团化学试剂有限公司。

3. Sanger 测序:下载目的位点序列,合成 P483L-突变-BCOR 序列,设计特异性位点扩增引物,进行位点扩增。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,割取大小对等的目的条带,纯化回收。构建 Sanger 测序反应体系:总体系 5μl,测序引物 1μl,纯化后 PCR 产物 3μl,BigDye Mix kit 1μl。使用以下反应程序:94℃ 60s,进行 28 个循环:95℃ 20s,50℃ 10s,60℃ 4min,最后 4℃ 30min。产物经纯化后使用 3730xl 测序仪进行测序,并用 DNA Sequencing analysis 软件分析测序结果。

4. 集落形成实验:分别取对数生长期的 3 组细胞,使用含 2% FBS 的 IMDM 将细胞稀释到 5000 细胞/毫升的浓度,使每个 35mm 培养皿中的接种细胞数为 500 个。将 0.4ml 细胞悬液加入预分装了 4ml MethoCult™ 培养基的试管中,充分混合后将 1.1ml 含有细胞的 MethoCult™ 培养基混合物分装到 3 个 35mm 培养皿中。轻轻倾斜、旋转培养皿,使培养基均匀分布在培养皿中。将培养皿放入外培养皿中,并在其中加入约 3ml 无菌水。14~16 天后进行集落计数。

5. 细胞凋亡检测:Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。取空白对照组、阴性对照组以及突变组细胞,1200r/min 离心(离心半径:15cm),加入 5μl 膜联蛋白 V-FITC(Annexin V-FITC)和 10μl 碘化丙啶(PI)染色液,轻轻混匀。室温避光孵育 10~20min 后采用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

6. 细胞周期检测:用细胞周期和凋亡分析试剂盒分析细胞周期分布。取空白对照组、阴性对照组以及突变组细胞,1000×g 离心 5min,用冰冷的 PBS 清洗后离心,去上清。在细胞内加入 70% 的乙醇,在 4℃ 冰箱内固定至少 12h,用含有 RNase A 和 PI 的染色溶液重新悬浮,37℃ 避光孵育 30min 后使用流式细胞仪检测分析。使用 ModFit 版本 4.0.5 计算处于不同细胞周期的细胞比例。实验重复 3 次。

7. 转录组测序技术:由上海美吉生物医药科技有限公司完成。收集 $BCOR^{P483L}$ 突变细胞和阴性对照细胞,提取总 RNA。使用 TruSeq-™ RNA 样品制备试剂盒制备 RNA-Seq 转录组文库。使用 Illumina

HiSeq X ten/NovaSeq 6000 测序仪对双端 RNA－Seq 测序文库进行测序。根据每百万阅读转录本方法计算每个转录本的表达水平，以识别两组之间的差异。此外，还对差异表达基因进行针对 KEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）通路和 GO（Gene Ontology）的功能富集分析。

8. Western blot 法：用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞样品 30min，使用 BCA 蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度。样品在 95℃下变性 10min 后，使用 Biofuraw™ 预制凝胶分离 30μg 蛋白质样品。使用 eBlot™ L1 转膜机将蛋白质样品转移到 PVDF 膜上。将膜置于一抗内在 4℃摇床上孵育过夜，再加入二抗于常温孵育 1h，最后用 ECL 化学发光试剂显示蛋白条带。

9. RT－qPCR 检测：提取细胞的总 RNA，反转录合成 cDNA。在 QuantStudio7 Flex 上进行 RT－qPCR。每孔（20μl 反应体积）包含 2μl cDNA 模板、2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10μl、0.8μl 引物和 9.2μl ddH_2O。使用以下热循环程序：95℃ 30s，进行 40 个循环：95℃ 10s，60℃ 30s，最终延伸 95℃ 15s，60℃ 60s，95℃ 15s。引物序列如表 1 所示。选择 GAPDH 为内参，用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法检测基因的相对表达水平。实验重复 3 次。

表 1　引物序列

基因名	引物序列（5′→3′）
NLRP3	上游引物：GATCTTCGCTGCGATCAACAG 下游引物：CGTGCATTATCTGAACCCCAC
GSDMD	上游引物：GTGTGTCAACCTGTCTATCAAGG 下游引物：CATGGCATCGTAGAAGTGGAAG
CASPASE 1	上游引物：TTTCCGCAAGGTTCGATTTTCA 下游引物：GGCATCTGCGCTCTACCATC
CASPASE 4	上游引物：CAAGAGAAGCAACGTATGGCA 下游引物：AGGCAGATGGTCAAACTCTGTA
GAPDH	上游引物：TGTGTCCGTCGTGGATCTGA 下游引物：CCTGCTTCACCACCTTCTTGA

10. 统计学方法：应用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组样本均值比较采用 t 检验，3 组及以上样本均值比较采用单因素方差分析（*ANOVA*）来衡量差异的显著性，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1. 检测慢病毒转染后 K562 3 组细胞内 BCOR 蛋白表达和 $BCOR^{P483L}$ 突变：Western blot 法检测结果显示，突变组内 BCOR 蛋白表达较阴性对照组和空白对照组明显增高（图 1A）。Sanger 测序确认突变组内携带 $BCOR^{P483L}$ 突变（图 1B）。

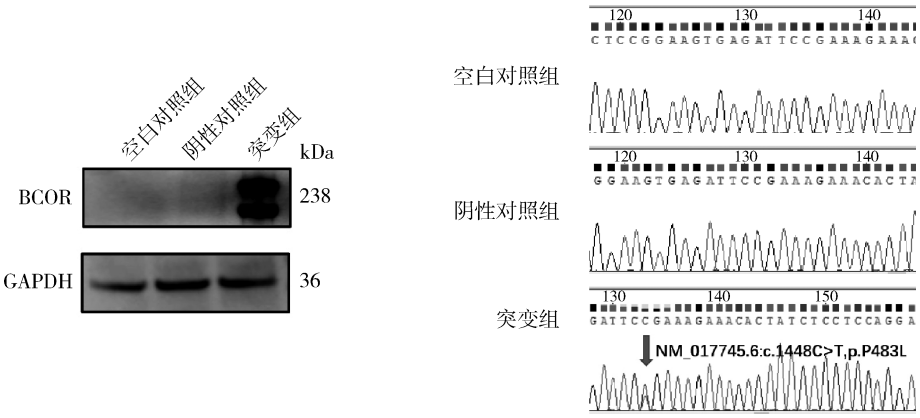

图 1　检测慢病毒转染后 K562 3 组细胞内 BCOR 蛋白表达和 $BCOR^{P483L}$ 突变

A. Western blot 法检测 3 组内 BCOR 蛋白表达水平；B. Sanger 测序确认突变组内存在 $BCOR^{P483L}$ 突变

2. $BCOR^{P483L}$ 突变对细胞克隆形成能力的影响：集落形成实验结果显示，14～16 天后，$BCOR^{P483L}$ 突变组的集落数明显少于阴性对照组和空白对照组（$P=0.0019$），表明 $BCOR^{P483L}$ 突变可抑制 K562 细胞的克隆形成能力（图 2）。

3. $BCOR^{P483L}$ 突变对细胞凋亡的影响：凋亡实验结果显示，与阴性对照组和空白对照组比较，$BCOR^{P483L}$ 突变组早期凋亡细胞数上升（$P=0.0285$），晚期凋亡细胞数明显上升（$P=0.0008$）。表明 $BCOR^{P483L}$ 突变能促进 K562 细胞凋亡（图 3）。

4. $BCOR^{P483L}$ 突变对细胞周期的影响：周期实验结果显示，与阴性对照组和空白对照组比较，$BCOR^{P483L}$ 突变组 G_0/G_1 期细胞数明显增加（$P<0.0001$），S 期和 G_2 期细胞数明显下降（P 分别为 <0.0001、0.0058）。表明 $BCOR^{P483L}$ 突变导致 K562 细胞 G_0/G_1 期周期阻滞（图 4）。

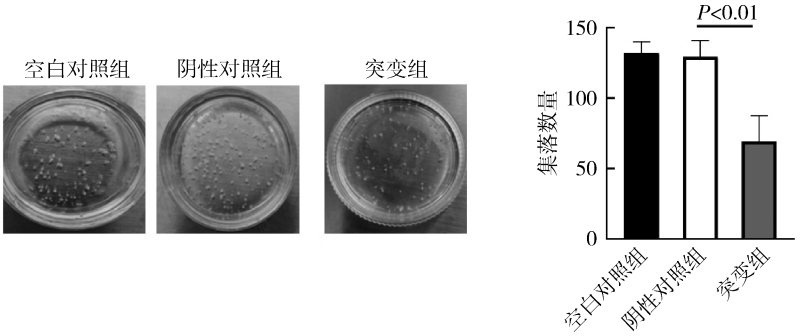

图 2　BCOR^{P483L} 突变对细胞克隆形成能力的影响

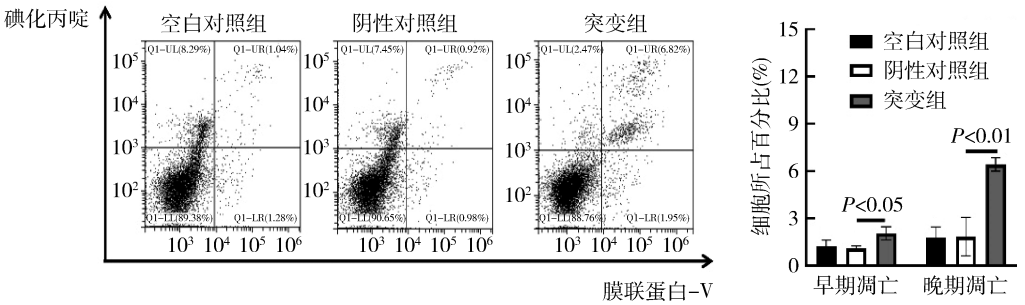

图 3　BCOR^{P483L} 突变对细胞凋亡的影响

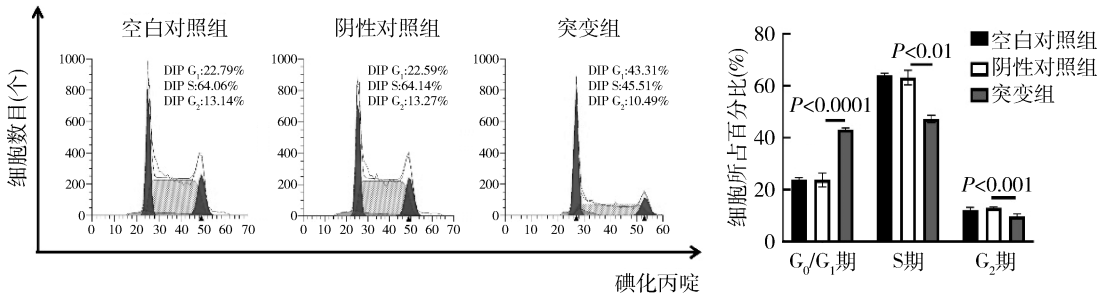

图 4　BCOR^{P483L} 突变对细胞周期的影响

5. BCOR^{P483L} 突变对细胞焦亡的影响：Western blot 法检测各组中 NLRP3、IL－1β、IL－18 蛋白表达发现，与阴性对照组和空白对照组比较，BCOR^{P483L} 突变组内 NLRP3、IL－1β、IL－18 蛋白表达均明显上升（图 5A）。通过 RT－qPCR 实验检测各组中 NLRP3、GSDMD、CASPASE1、CASPASE4 的 mRNA 表达发现，与阴性对照组和空白对照组比较，BCOR^{P483L} 突变组内 NLRP3、GSDMD、CASPASE1、CASPASE4mRNA 表达均明显上升（图 5B），表明 BCOR^{P483L} 突变提升 K562 细胞焦亡水平。

6. RNA－Seq 分析 BCOR^{P483L} 突变细胞基因表达变化：对 BCOR^{P483L} 突变组（$n=3$）和阴性对照细胞（$n=3$）进行基因表达谱分析。筛选差异表达基因的标准为 $|FC|>2$，且 $P<0.05$。对这些基因进行基因集富集分析，选择 C2：KEGG pathways 和 C5：GO 进行分析。显著富集的 GO 包括细胞凋亡（MAP04210），NES = －1.11，nominal $P=0.114$；细胞周期（MAP04110），NES = 1.41，nominal $P=0$；细胞衰老（MAP04218），NES = 1.17，$P=0.029$，慢性髓系白血病（MAP05220），NES = 1.288，nominal $P=0.02$（图 6A）。显著富集的 KEGG 通路包括 HALLMARK_细胞凋亡，NES = －1.36，$P=0.0065$；HALLMARK_G_2M 检查点，NES = 1.82，$P=0$；HALLMARK_炎性反应，NES = －1.22，$P=0.05$；HALLMARK_MYC 目标基因，NES = 2.069，$P=0$；HALLMARK_NF－κB/TNFA 信号，NES = －1.508，$P=0$（图 6B）。数据分析显示，BCOR^{P483L} 突变 K562 细胞内与慢性髓系白血病、细胞衰老、细胞内炎性反应相关的基因以及原癌基因 MYC 目标基因上调。

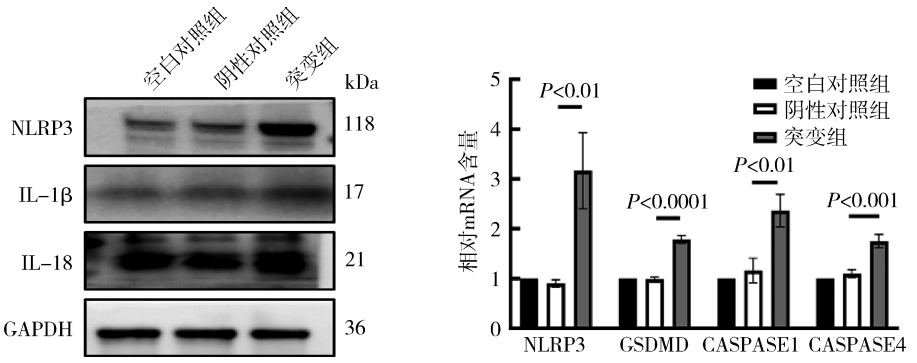

图 5　BCOR^{P483L} 突变对细胞焦亡的影响

A. Western blot 法检测 NLRP3、IL－1β、IL－18 蛋白表达；B. RT－qPCR 实验检测 NLRP3、GSDMD、CASPASE1、CASPASE4 的 mRNA 表达

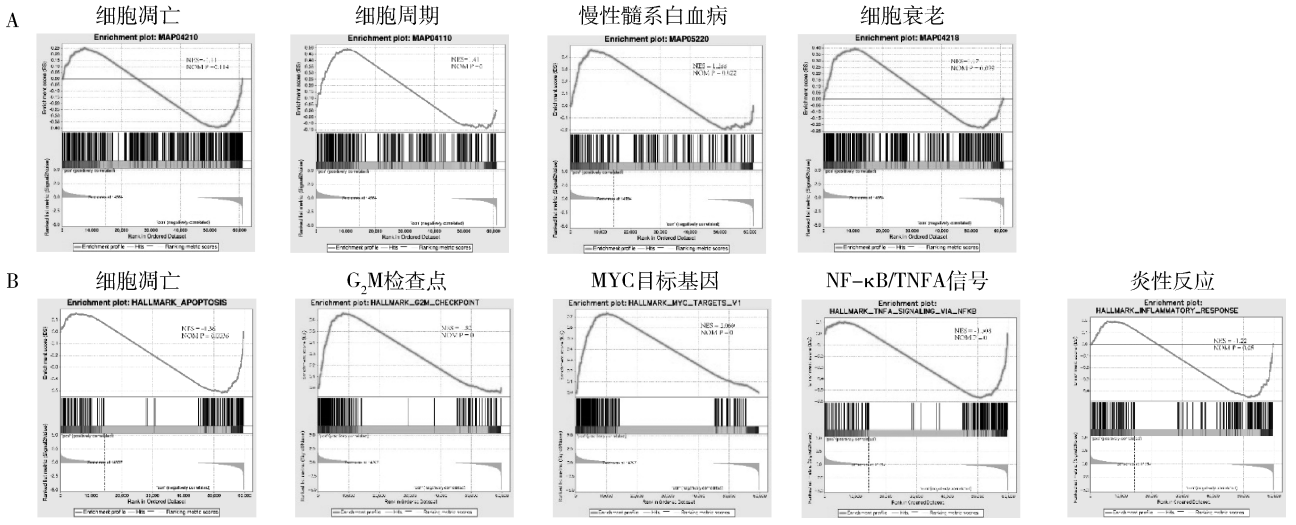

图 6　RNA 测序分析 BCOR^{P483L} 突变 K562 细胞基因表达变化

A. 显著富集的 GO 通路；B. 显著富集的 KEGG 通路

7. Western blot 法检测 3 组 PI_3K、p－Akt、Akt、mTOR、p－mTOR 蛋白的表达：与阴性对照细胞和空白对照细胞比较，BCOR^{P483L} 突变组内 PI_3K、p－Akt、Akt、mTOR、p－mTOR 蛋白表达均明显下降（图 7）。

讨　论

MDS 是一组以病态造血、无效造血为特征的恶性克隆性造血干/祖细胞疾病，克隆性增殖与细胞过度凋亡、焦亡异常共存。MDS 肿瘤细胞新陈代谢往往丧失正常调控状态[12,13]。PI_3K/Akt/mTOR 通路能通过多种机制参与调节细胞代谢[14,15]。研究显示在多种人类恶性肿瘤中存在 PI_3K/Akt/mTOR 信号通路上调，其可能机制是癌基因激活突变、癌基因扩增、受体酪氨酸激酶上游激活或抑癌基因失活等[16~19]。PI_3K/Akt/mTOR 通路是调控造血细胞增殖、发育的重要通路，与细胞增殖、分化、生存、细胞周期、自噬等密切相关。该通路在高危 MDS 患者和 60% 的 AML

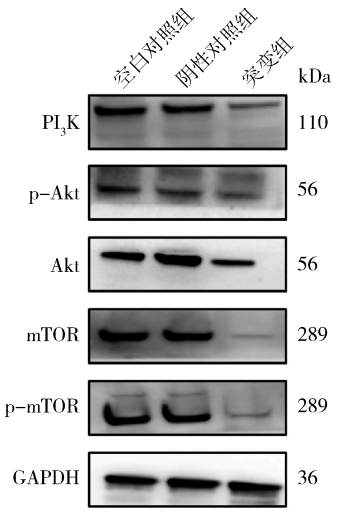

图 7　Western blot 法检测 3 组 PI_3K、p－Akt、Akt、mTOR、p－mTOR 蛋白的表达

与阴性对照组以及空白对照组比较，BCOR^{P483L} 突变明显抑制 K562 细胞内 PI_3K 表达和 Akt、mTOR 蛋白及其磷酸化水平

患者中被结构性激活，且与疾病预后不良相关[17,18,20]。本研究发现 $BCOR^{P483L}$ 突变明显抑制 K562 细胞系克隆形成能力，促进细胞凋亡和周期阻滞。进一步通过 RNA－Seq 研究以及 Western blot 法检测发现，$BCOR^{P483L}$ 突变抑制 PI_3K/Akt/mTOR 通路的表达，促进促凋亡基因和 G_2M 检查点相关基因的转录，导致增殖抑制和凋亡增加，G_1 到 S 期周期阻滞。

RNA－Seq 结果显示，$BCOR^{P483L}$ 突变导致白血病、细胞衰老、细胞内炎性反应相关基因、原癌基因 MYC 目标基因以及 NF－κB/TNFA 信号在 K562 细胞内富集。通过 Western blot 法和 RT－qPCR 实验证实 $BCOR^{P483L}$ 突变细胞内焦亡水平上升，细胞微环境中促炎性细胞因子如 IL－18、IL－1β、TNF－α 释放增加。目前的研究已经证实，慢性炎症通过促进细胞突变、克隆演变、破坏免疫监视等作用促进多种癌症的发生[21]。由炎症和先天免疫失调引起的慢性非感染性炎症是 MDS 发病机制之一。NLRP3 炎性小体激活是 MDS 关键驱动因素之一，与 MDS 无效造血有关。也有研究者提出，炎症通路的激活，如干扰素相关信号，可能是导致 MDS 髓系发育不良形成的潜在机制。因此 BCOR 突变通过促进炎性反应等方式，促进 MDS 疾病进展，导致预后不良。

综上所述，$BCOR^{P483L}$ 突变通过下调 PI_3K/Akt/mTOR 通路直接促进细胞凋亡和周期阻滞，降低细胞克隆形成能力，但是能通过上调白血病、细胞衰老相关以及原癌基因 MYC 目标基因，提高细胞内炎性反应，从而促进 MDS 的发展，造成不良预后。

利益冲突声明：所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

1 Cazzola M. Myelodysplastic syndromes[J]. N Engl J Med, 2020, 383(14): 1358－1374

2 Li X, Xu F, Zhang Z, *et al*. Dynamics of epigenetic regulator gene BCOR mutation and response predictive value for hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndrome[J]. Clinical Epigenetics, 2021, 13(1): 169

3 Gill H, Leung AY, Kwong YL. Molecular and cellular mechanisms of myelodysplastic syndrome: implications on targeted therapy[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4): 440

4 Nazha A, Zarzour A, Al－Issa K, *et al*. The complexity of interpreting genomic data in patients with acute myeloid leukemia[J]. Blood Cancer J, 2016, 6(12): e510

5 Metzeler KH, Herold T, Rothenberg－Thurley M, *et al*. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2016, 128(5): 686－698

6 Huynh KD, Fischle W, Verdin E, *et al*. BCoR, a novel corepressor involved in BCL－6 repression[J]. Genes Dev, 2000, 14(14): 1810－1823

7 Kutscher LM, Okonechnikov K, Batora NV, *et al*. Functional loss of a noncanonical BCOR－PRC1. 1 complex accelerates SHH－driven medulloblastoma formation[J]. Genes Dev, 2020, 34(17－18): 1161－1176

8 Wang Z, Gearhart MD, Lee YW, *et al*. A Non－canonical BCOR－PRC1. 1 complex represses differentiation programs in human ESCs[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(2): 235－251, e239

9 Tara S, Isshiki Y, Nakajima－Takagi Y, *et al*. Bcor insufficiency promotes initiation and progression of myelodysplastic syndrome[J]. Blood, 2018, 132(23): 2470－2483

10 Kelly MJ, So J, Rogers AJ, *et al*. Bcor loss perturbs myeloid differentiation and promotes leukaemogenesis[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1347

11 Palomo L, Meggendorfer M, Hutter S, *et al*. Molecular landscape and clonal architecture of adult myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms[J]. Blood, 2020, 136(16): 1851－1862

12 Nepstad I, Hatfield KJ, Grønningsæter IS, *et al*. The PI_3K－Akt－mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) Cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 2907

13 Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. Cell, 2017, 169(2): 361－371

14 Ward PS, Thompson CB. Signaling in control of cell growth and metabolism[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(7): a006783

15 Braccini L, Ciraolo E, Martini M, *et al*. PI_3K keeps the balance between metabolism and cancer[J]. Adv Biol Regul, 2012, 52(3): 389－405

16 Szwed A, Kim E, Jacinto E. Regulation and metabolic functions of mTORC1 and mTORC2[J]. Physiol Rev, 2021, 101(3): 1371－1426

17 Nepstad I, Hatfield KJ, Tvedt THA, *et al*. Clonal heterogeneity reflected by PI_3K－AKT－mTOR signaling in human acute myeloid leukemia cells and its association with adverse prognosis[J]. Cancers, 2018, 10(9): 332

18 Nepstad I, Hatfield KJ, Grønningsæter IS, *et al*. Effects of insulin and pathway inhibitors on the PI_3K－Akt－mTOR phosphorylation profile in acute myeloid leukemia cells[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2019, 4(1): 20

19 Yu L, Wei J, Liu P. Attacking the PI_3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 69－94

20 Kornblau SM, Tibes R, Qiu YH, *et al*. Functional proteomic profiling of AML predicts response and survival[J]. Blood, 2009, 113(1): 154－164

21 Zhao H, Wu L, Yan G, *et al*. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2021, 6(1): 263

（收稿日期：2023－03－02）
（修回日期：2023－03－27）