

# 内质网应激通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导多形性胶质母细胞瘤干细胞凋亡的机制

张保豫, 侯博, 何海勇, 李文胜, 梁朝峰, 叶卓鹏, 郭英  
(中山大学附属第三医院神经外科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探索内质网应激(ER stress)通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导多形性胶质母细胞瘤干细胞(GSC)凋亡的机制。【方法】临床获取多形性胶质母细胞瘤组织标本,剪碎、胰酶消化、过滤、去除红细胞后,培养 GSC;免疫荧光技术检测 GSC 抗原 CD133、GFAP、Nestin、A2B5 的表达;caspase3/7 细胞凋亡检测试剂盒检测衣霉素(Tun)和毒胡萝卜素(Thap)对 GSC 的凋亡作用及 MTS 法检测细胞增殖活性;同时 Western blot 分析凋亡蛋白 caspase3, ER stress 标志蛋白 C/EBP 同源蛋白(CHOP)及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路标志蛋白 AKT、mTOR 表达水平;使用 siRNA 沉默 CHOP 基因后,检测上述蛋白表达水平变化。【结果】1 周后肿瘤干细胞球形成,并可以表达 CD133、GFAP、Nestin、A2B5 等 GSC 抗原。ER stress 激活后,可诱导 GSC 凋亡及降低细胞增殖活性,CHOP 表达上调而 p-mTOR、p-AKT(Ser473)、p-AKT(Thr308)表达下调;相反,沉默 CHOP 基因后,ER stress 被抑制,上述效应减弱。【结论】ER stress 可能通过负性调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导 GSC 凋亡。

**关键词:**多形性胶质母细胞瘤;肿瘤干细胞;内质网应激;凋亡

**中图分类号:**R363 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2016)02-0183-07

## Endoplasmic Reticulum Stress Induces Glioblastoma Multiforme Stem Cells Apoptosis Via Inhibiting PI3K/AKT/mTOR Pathway

ZHANG Bao-yu, HOU Bo, HE Hai-yong, LI Wen-sheng, LIANG Chao-feng, YE Zhuo-peng, GUO Yin  
(Department of Neurosurgery, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)  
Corresponding to: GUO Yin, E-mail: gzguoying@hotmail.com

**Abstract:**【Objective】To explore the mechanism of endoplasmic reticulum stress (ER stress) inducing glioblastoma stem cells (GSC) apoptosis via inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway.【Methods】Tumor samples were obtained from glioblastoma multiforme (GBM) patients after surgically resected specimens. Samples were washed, chopped, trypsinized, and filtered. The red cells were removed. The cells were cultured with tumour sphere medium (TSM) in vitro. GSC markers CD133, GFAP, Nestin and A2B5 were observed by immune-microscopy. After treating GSC (with/without transfecting with CHOP siRNA) by tunicamycin and thapsigargin, apoptosis induction was assessed by caspase 3/7 apoptosis assay; the percentage of cell viability was measured by MTS. The expression of caspase-3, C/EBP homologous protein (CHOP), p-mTOR, p-AKT (Ser473) and p-AKT (Thr308) were examined by Western blot.【Results】The GSC spheres were formed in 7 days and the GSC markers CD133, GFAP, Nestin, and A2B5 were expressed. After activating ER stress, GSC cell death and apoptosis were induced significantly by up-regulating caspase-3, CHOP and down-regulating p-mTOR, p-AKT (Ser473 and p-AKT (Thr308). However, transfecting with CHOP siRNA, the effects were attenuated.【Conclusion】ER stress might induce GSC apoptosis via inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway.

**Key words:** glioblastoma multiforme; tumor stem cells; ER stress; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(2): 183-189]

收稿日期:2015-12-04

基金项目:广东省自然科学基金(2014A030313189;2014A030310408),广东省科技计划项目(2014A020211013),中山大学青年教师培养项目(20120171110083)

作者简介:张保豫,博士研究生,研究方向:胶质瘤治疗,E-mail: zhangbaoyu0719@163.com;郭英,通信作者,教授,博士生导师,E-mail: gzguoying@hotmail.com

多形性胶质母细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM, WHO IV 级)是中枢神经系统发病率高且恶性程度高的肿瘤<sup>[1]</sup>。近些年,大量研究表明在 GBM 肿瘤组织中存在一小部分被称为 GBM 肿瘤干细胞(GBM stem cells, GSC)的亚细胞群,具有高度自我更新、增殖、分化以及抵抗放疗、传统化疗的能力,被认为是导致肿瘤易于复发侵袭的主要原因<sup>[2-4]</sup>。同时,动物实验证实,去除肿瘤干细胞可以有效阻止肿瘤发展<sup>[5]</sup>;因此,靶向诱导 GSC 凋亡成为治疗 GBM 新的研究热点<sup>[6]</sup>。PI3K/AKT/mTOR 信号通路在细胞生长、增殖、分化及凋亡中发挥重要作用,该通路的异常被认为与 GBM 密切相关<sup>[7-8]</sup>。研究发现,PI3K 在 GSC 中活性异常增高,是维持肿瘤干细胞自我更新的重要调节分子<sup>[9]</sup>。目前,通过抑制该信号通路的药物,如 NVP-BEZ235 已经应用到临床试验中。内质网(endoplasmic reticulum, ER)是蛋白质合成和翻译的重要场所。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ER stress)在诱导肿瘤细胞凋亡中起到重要作用<sup>[10]</sup>;研究证实,多种抗肿瘤药物可以通过 ER stress 上调标志蛋白 C/EBP 同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)表达诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[11-12]</sup>。Gargiulo 第一次揭示了 ER stress 可以有效的抑制 GSC 的发展,但其机理并不十分清楚<sup>[13]</sup>。本研究从 GBM 肿瘤组织中分离、培养 GSC;通过药物激活 ER stress 后,研究其是否可以调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导 GSC 凋亡。

## 1 材料与方法

### 1.1 GSC 分离与培养

GBM 肿瘤组织来源于中山大学附属第三医院神经外科手术标本。术后病理确诊为 GBM(WHO IV 级)。肿瘤组织按照 Singh 等方法处理<sup>[14]</sup>侵泡在含氧人工脑脊液中,置于冰上送入实验室;无菌状态下充分剪碎(体积小于 1 mm<sup>3</sup>),去除血管及结缔组织;胰酶消化后,过滤并重悬于不含血清神经干细胞培养基(TSM)中,该培养基包括 DMEM/F12(1:1, Sigma)、EGF(20 ng/mL; Sigma)、bFGF(20 ng/mL; Invitrogen)、leukemia inhibitory factor(10 ng/mL; Invitrogen);使用 Lympholyte-M 移除红细胞,最终以 3 × 10<sup>6</sup> 接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,3 d 后第一次更换培

养基,以后每 3-4 d 更换培养基。

### 1.2 GSC 免疫双标法鉴定

细胞接种于多聚赖氨酸(Poly-D-lysine)包被的培养皿中,培养箱中过夜待细胞贴壁。24 h 后移去培养基,40 g/L 多聚甲醛 0.5 mL/孔室温下 30 min 固定细胞,PBS 0.5 mL/孔洗涤细胞 4 次,5% BSA/0.6% Triton 0.5 mL/孔封闭,室温下孵育 1 h;4 °C 冷藏室孵育 CD133(1:1000, Santa cruz)、GFAP(1:500, Cell Signaling)、Nestin(1:20, Cell Signaling)、A2B5(1:50, Cell Signaling)一抗过夜。PBS 0.5 mL/孔洗细胞 4 次,避光并根据一抗分别孵育山羊抗兔(红色, Cell Signaling, 1:200),山羊抗鼠(绿色, Cell Signaling, 1:200)荧光二抗,37 °C 下 30 min;再次 PBS 0.5 mL/孔洗细胞 4 次后,每孔加入 1 滴 prolong anti-fade with DAPI(Lifetechnologies),盖上盖玻片后,锡箔纸包裹避光,室温放置 30 min;免疫荧光显微镜下(Lifetechnologies)观察。

### 1.3 药物凋亡实验

细胞接种于上述包被培养皿中,过夜后将药物衣霉素(tunicamycin, Tun, sigma-aldrich)和毒胡萝卜素(thapsigargin, Thap, Tocris)加入细胞后,最终浓度为 0.5 μmol/L;24 h 后,加入 caspase3/7 细胞凋亡检测试剂盒(AAT Bioquest),免疫荧光镜下观察 caspase3/7 活性变化,并计算出细胞凋亡率(凋亡细胞/细胞总数×100%),进一步检测凋亡。

### 1.4 细胞增殖活性测定

细胞以 5 × 10<sup>5</sup>/mL 浓度 100 μL/孔接种于 96 孔板,24 h 分别将 0.5、1、2 μmol/L 终浓度 Tun 和 Thap 药物 200 μL/孔加入细胞,孵育 72 h,加入 MTS(MTS; 培养基=1:5, Lifetechnologies)100 μL/孔孵育 1、2、4 h 后,分光光度仪测量并计算细胞增殖活性。

### 1.5 CHOP siRNA 转染实验

取对数生长期细胞,离心后重悬于不含抗生素的干细胞培养基中,以 1.5 × 10<sup>5</sup>/孔接种于 6 孔板中,待覆盖小于 70%后,按照说明书使用 Lipofectamine2000(Lifetechnologies),将 CHOP siRNA(溶于无菌水中配成 20 μmol/L, Life technologies)5 μL 溶于 250 μL OPTI-MEM(sigma-aldrich)培养基中,轻微震荡,配置成 A 液;然后将 2.5 μL Lipofectamine2000 及 10 μL The BLOCK-iT™ Fluorescent Oligo(转染对照, Lifetechnologies) 分别溶于 250 μL OPTI-MEM

中,轻微震荡,配置成B液;再将A液加入B液中充分震荡混均,室温下静置20 min,配成C液;与此同时,将前述接种于6孔板的细胞,更换新鲜培养基1.5 mL,再将混合后的C液加入6孔板中,轻微震荡混均后37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜。第二日在免疫荧光显微镜下检测转染情况,并以5×10<sup>5</sup>/mL浓度100 μL/孔接种于96孔板备药物试验用。

### 1.6 Western blot 检测蛋白表达

细胞以1.5×10<sup>6</sup>/孔接种于6孔板中,培养24 h;加入0.5 μmol/L Tun 和 Thap 后继续培养24 h,裂解并提取蛋白,BCA(Thermo)法测量蛋白浓度,并加入考马斯亮蓝染色法稀释至1 μg/μL。将20 μL蛋白上样,分别使用6%、8%、12%胶进行电泳,电泳后转膜于硝酸纤维素膜。TBST洗膜后,5%脱脂牛奶封闭,在4℃温度下孵育一抗抗CHOP(Cell Signaling,1:750)、caspase-3(Cell Signaling,1:1 500)、p-mTOR(Cell Signaling,1:3 000)、抗mTOR(Cell Signaling,1:1 000)、抗AKT(Cell Signaling,1:18 000)、抗p-AKT(Cell Signaling,Ser473,1:4 000)、抗p-AKT(Cell Signaling,Thr308,1:4 000)及α-Tubulin(Cell Signaling,1:100 000)过夜。TBST再次洗膜后,室温下孵育二抗抗兔、抗鼠(Cell Signaling,1:5 000)1 h后,化学发光显影液染色、显影。

### 1.7 统计学方法

应用Quantity One分析Western Blot数据。实验数据均以均数±标准差(mean±SD)形式表示,每次实验均在相同条件下重复3次以上。用SPSS 19.0软件进行分析,各组蛋白表达的灰度均值采用单因素方差分析,各组进一步与对照组比较采用Dunnett-*t*检验;转染前后药物IC<sub>50</sub>和转染前后细胞凋亡率的比较均采用*t*检验;检验水准α=0.05。

## 2 结果

### 2.1 GSC 的分离和培养

肿瘤标本经过上述处理后,在无血清培养基中培养,3 d后贴壁肿瘤细胞逐渐消失,干细胞球逐渐形成,7 d后干细胞球逐渐融合变大(图1),每周可传代一次,细胞可传代多达43代,仍生长良好。

### 2.2 GSC 的鉴定

免疫双标法进行GSC标志抗原检测,如图2免疫荧光显微镜下发现所培养肿瘤干细胞可以表达抗原CD133+、GFAP+、Nestin+、A2B5+等,进一步验证GSC。

### 2.3 ER stress 激活对 GSC 凋亡作用和 caspase-3 表达变化

Tun 和 Thap 0.5 μmol/L 作用于 GSC 24 h 后, Caspase3/7 细胞凋亡检测试剂盒检测 caspase3/7 活性,并计算出 Tun 和 Thap 作用后细胞凋亡率分别为 21.7%±0.7%,30.5%±2.0%(表1)。Western blot 验证 caspase3 激活,caspase-3 是执行凋亡的关键因子,它的激活进一步证实上述药物诱导 GSC 的凋亡(图3,*P*<0.001)。

表1 CHOP siRNA 转染 GSC 前后细胞凋亡率变化

Table 1 The apoptosis ration of drugs on GSC and GSC transfected with CHOP siRNA

	DMSO	Tun	Thap
GSC	1.6 ± 0.1	21.7 ± 0.7	30.5 ± 2.0
GSC+CHOP siRNA	2.1 ± 0.2	10.3 ± 0.3	11.4 ± 0.3
<i>t</i>	2.2	15.8	9.51
<i>P</i>	0.1	<0.0001	<0.001

### 2.4 ER stress 激活对 GSC 细胞增殖活性的影响

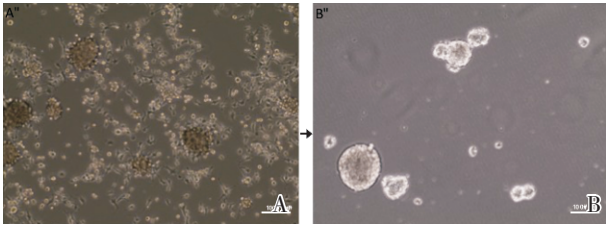
显微镜下观察,Tun 和 Thap 0.5 μmol/L 作用 GSC,24 h 及 48 h 细胞形态上发生皱缩、崩裂,细胞数量明显减少(图4A);MTS 法检测随着浓度增加药物可以明显抑制细胞的增殖活性(图4B)。

### 2.5 ER stress 激活对 GSC 中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路关键蛋白的影响

Tun 和 Thap 0.5 μmol/L 作用 GSC 24 h 后,Western Blot 分析发现 ER stress 介导凋亡关键蛋白 CHOP 表达明显增加(图3,*P*<0.001),而 PI3K/AKT/mTOR 信号通路关键蛋白 p-mTOR、p-AKT(Ser473)、p-AKT(Thr308)等表达下降(图5,*P*<0.05)。

### 2.6 CHOP siRNA 沉默 CHOP 基因后 GSC 细胞增殖活性、凋亡及 PI3K/AKT/mTOR 信号通路关键蛋白的变化

CHOP siRNA 转染 GSC 沉默 CHOP 基因后,对比未转染组,细胞增殖活性下降程度降低(图6A),药物 IC<sub>50</sub> 较前明显增加(表2,*P*<0.001);



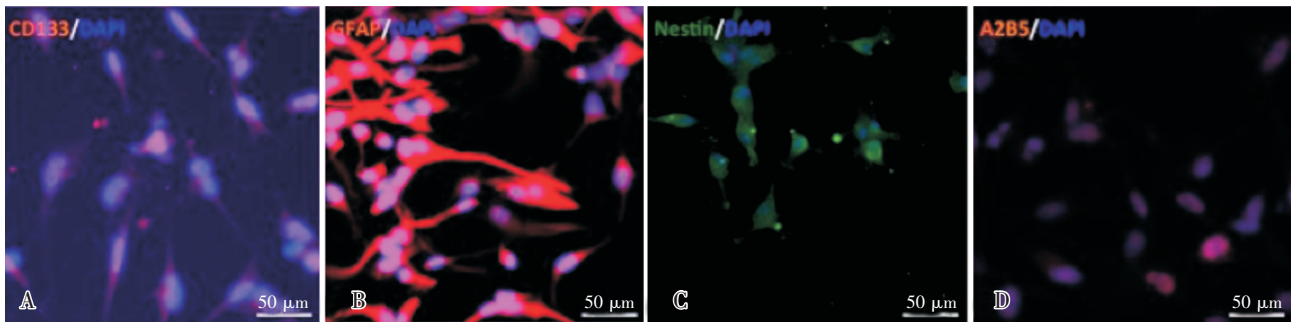
A: 3 days in TSM; B: 7 days in TSM

图 1 在培养基中肿瘤细胞生长变化

Fig.1 Tumor cells growth in TSM

表 2 CHOP siRNA 转染 GSC 前后药物 IC<sub>50</sub> 变化  
Table 2 The IC<sub>50</sub> of drugs on GSC and GSC transfected with CHOP siRNA

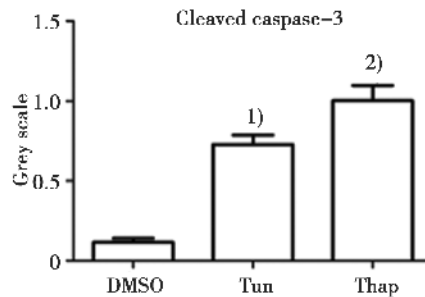
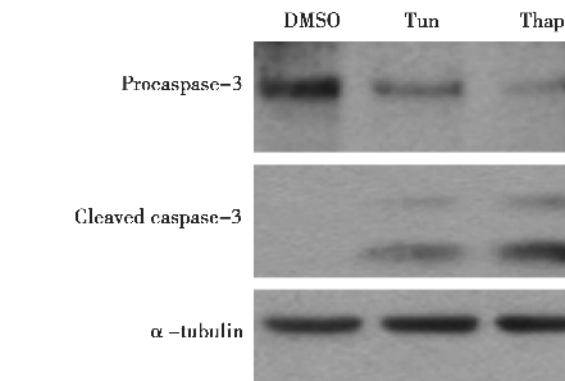
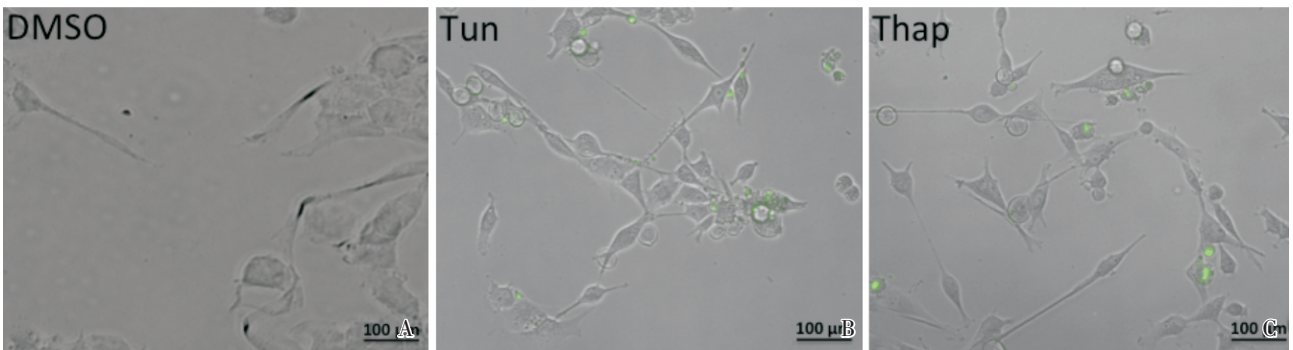
	Tun	Thap
GSC	0.8 ± 0.3	1.6 ± 1.7
GSC+CHOP siRNA	2.3 ± 0.2	2.6 ± 0.3
<i>t</i>	15.79	6.90
<i>P</i>	< 0.0001	< 0.001



A: CD133+; B: GFAP+; C: Nestin+; D: A2B5+.

图 2 GSC 标志抗原表达情况

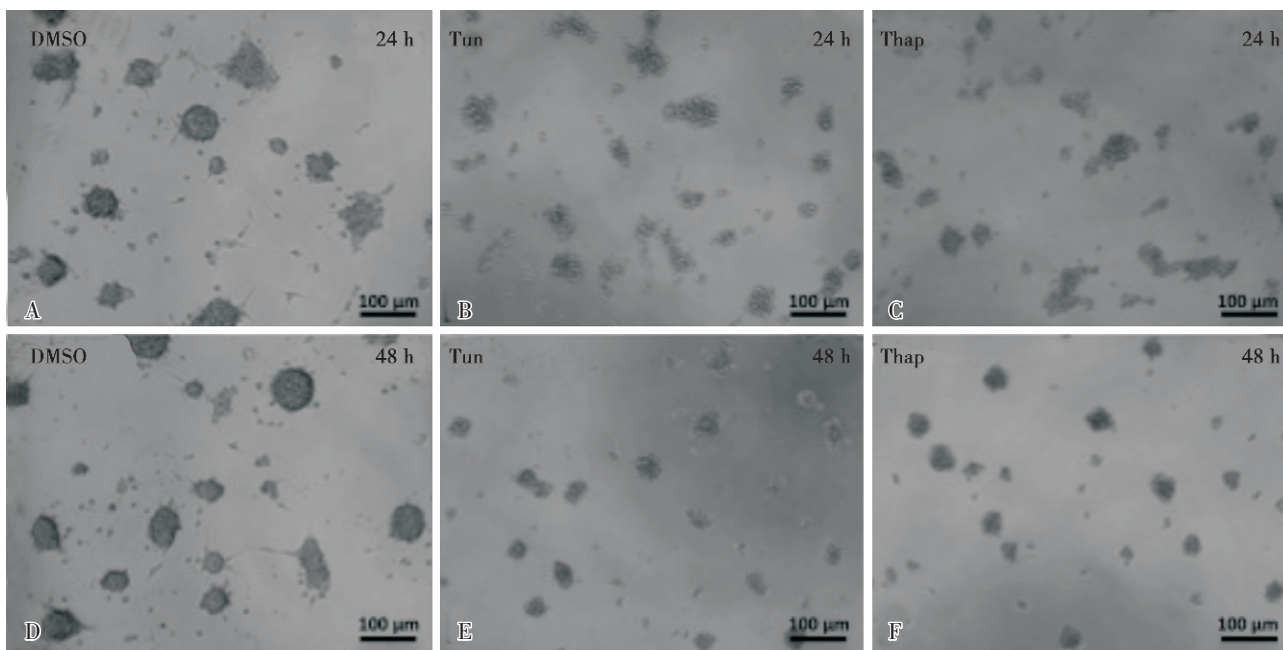
Fig.2 Expression of GSC markers



$n \geq 3$ ,  $F = 140.2$ ; 1)  $q = 11.30$ ,  $P < 0.001$  vs DMSO; 2)  $q = 16.35$ ,  $P < 0.001$  vs DMSO. DMSO: control. A: GSC were treated with DMSO as control group; B: GSC were treated with 0.5  $\mu\text{mol/L}$  Tun 24 h; C: GSC were treated with 0.5  $\mu\text{mol/L}$  Thap 24 h; D: Expression of caspase-3 was detected by western blot.

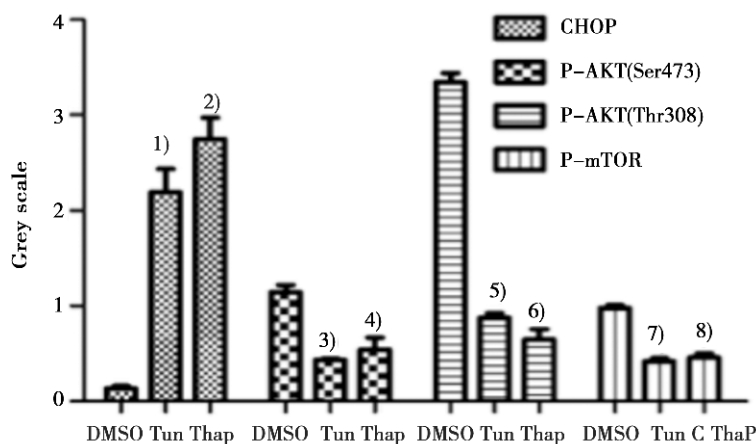
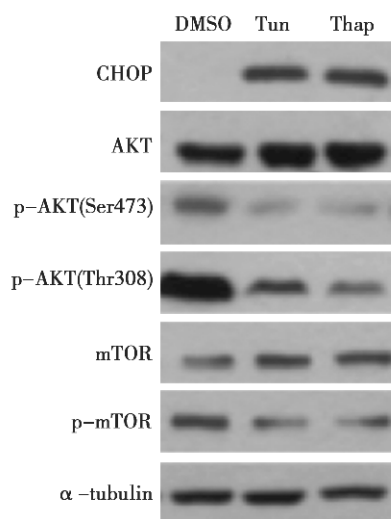
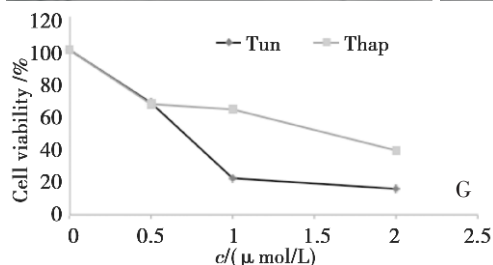
图 3 细胞凋亡实验

Fig.3 Apoptosis assay



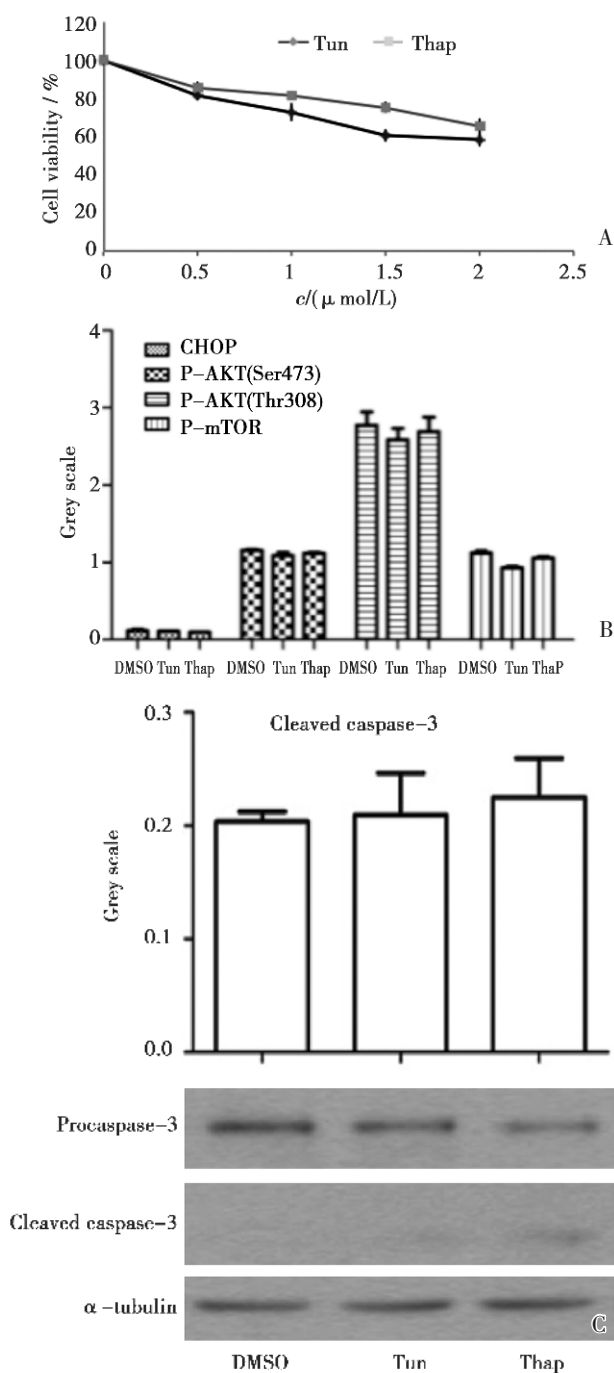
A, D: Control group; B, E: GSC were treated with 0.5 μmol/L Tun 24 h and 48 h; C, F: GSC were treated with 0.5 μmol/L Thap 24 h and 48 h; G: Cell viability was measured by MTS assay

图 4 药物对细胞形态学和增殖活性变化  
Fig.4 Morphology changes and cell viability



CHOP:  $n \geq 3$ ,  $F = 51.98$ , 1)  $q = 7.618$ ,  $P < 0.05$  vs DMSO; 2)  $q = 9.678$ ,  $P < 0.05$  vs DMSO; p-AKT (Ser473):  $n \geq 3$ ,  $F = 82.67$ , 3)  $q = 11.10$ ,  $P < 0.05$  vs DMSO; 4)  $q = 11.17$ ,  $P < 0.05$  vs DMSO; p-AKT (Thr308):  $n \geq 3$ ,  $F = 154.5$ , 5)  $q = 27.89$ ,  $P < 0.0001$  vs DMSO; 6)  $q = 29.26$ ,  $P < 0.0001$  vs DMSO; p-mTOR:  $n \geq 3$ ,  $F = 76.09$ , 7)  $q = 11.03$ ,  $P < 0.05$  vs DMSO; 8)  $q = 10.30$ ,  $P < 0.05$  vs DMSO. DMSO: control.

图 5 Tun 和 Thap 0.5 μmol/L 作用 GSC 24 h 后, ER stress 和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路关键蛋白表达情况  
Fig.5 Expression changes of ER stress and PI3K/AKT/mTOR pathway critical protein on GSC after treated with 0.5 μmol/L Tun and Thap for 24 h



After GSC transfected with CHOP siRNA 24h; A: Cell viability was measured by MTS assay; B: The critical proteins expression of ER stress and PI3K/AKT/mTOR pathway. C: Expression of caspase-3

图 6 GSC 转染 CHOP siRNA 24 h 后细胞活性及 PI3K/AKT/mTOR 通路关键蛋白和 caspase-3 表达变化

CHOP 蛋白表达下降 (图 6B), caspase-3 表达下调 (图 6C); 然而, p-mTOR、p-AKT(Ser473)、p-AKT(Thr308) 等蛋白表达未受影响 (图 6B); 同时, 细胞凋亡率分别下降至  $10.3\% \pm 0.3\%$  和  $11.4\% \pm 0.3\%$

(表 1,  $P < 0.001$ ), 进一步验证细胞凋亡受到抑制。

### 3 讨论

大量研究表明, GSC 在 GBM 中起到重要作用: ①GSC 可以自我更新、增殖、分化为 GBM 肿瘤细胞; ②GSC 有助于 GBM 对放疗和化疗的抵抗性; ③GSC 可以刺激 GBM 中肿瘤血管的生存, 有助于 GBM 的侵袭<sup>[6,15]</sup>。在本文研究中, 我们成功分离培养出肿瘤干细胞; 免疫荧光技术证实其可以表达 GSC 抗原, 如 CD133+、GFAP+、Nestin+、A2B5+ 等; 同时, 发现 GSC 在无血清培养基中快速增殖, 符合 GSC 能够自我更新、增殖的特点; 也提示 GSC 可能具有适应各种环境的能力, 引起 GBM 复发、侵袭以及抵抗传统放化疗。所以, 靶向 GSC 的治疗可能成为治疗 GBM 的重要研究方向。

CHOP 是 ER stress 介导细胞凋亡的特异性蛋白<sup>[16]</sup>。使用 Tun 和 Thap 处理 GSC 激活 ER stress 后, 观察到细胞形态发生皱缩、崩裂, 细胞活性随着药物浓度增加而下降, 凋亡率增加; 同时, CHOP 的表达明显上调, 提示 ER stress 被激活; 细胞凋亡检测药物诱导 GSC 发生凋亡。因此, 推测 ER stress 激活可能介导 GSC 的凋亡过程。

日本科学家 Sunayama 研究发现 PI3K/AKT/mTOR 信号通路与 GSC 在 GBM 中肿瘤的形成和自我更新密切相关, 并推断靶向 GSC 中的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可以有效治疗 GBM<sup>[17]</sup>; 然而, Qin 等<sup>[18]</sup>的研究发现 ER stress 可以负性调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路。因此我们推断在 GSC 中 ER stress 是否存在负性调节该信号通路以抑制细胞增殖活性和诱导细胞凋亡, 从而为靶向治疗 GSC 提供更加有效方式。在本实验中, 当 ER stress 激活, PI3K/AKT/mTOR 信号通路中关键蛋白 AKT、mTOR 表达受到抑制, 而 caspase-3 的表达却明显上调; 这些结果提示, 在 GSC 中 ER stress 激活后可能通过负性调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来实现诱导 GSC 的凋亡。

为进一步验证上述的推断, 我们使用 CHOP siRNA 沉默 CHOP 基因, 发现 CHOP 表达受到抑制, 此时 AKT、mTOR 的表达与对照组比较无明显变化, caspase-3 的表达较前下调, 细胞活性未较前明显下降, 凋亡率减少, ER stress 诱导 GSC 凋亡效应也被部分抑制。这也进一步提示 ER stress 可

能通过部分抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路实现诱导肿瘤干细胞凋亡。

总之,本文的研究一方面成功的从 GBM 组织中分离、培养出 GSC;另一方面发现在 GSC 中,激活 ER stress 可以明显诱导 GSC 凋亡,这种效应可能与部分负性调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关。最终希望为靶向诱导 GSC 凋亡以及治疗 GBM 提供一个新的研究方向。

#### 参考文献:

- [1] LOUIS D N, OHGAKI H, WIESTLER O D, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 97-109.
- [2] 沈冬,仇志坤,陈银生,等. 干扰素- $\alpha/\beta$  体外增敏替莫唑胺对 MGMT 阳性胶质瘤干细胞作用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2012(03): 368-372.  
SHEN D, QIU Z S, CHEN Y S, et al. Interferon- $\alpha/\beta$  enhance temozolomide activity against MGMT-positive glioma stem cells in vitro [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2012, 33(3): 368-372.
- [3] BAO S, WU Q, LI Z, et al. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6043-6048.
- [4] LI Z, BAO S, WU Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(6): 501-513.
- [5] CHEN J, LI Y, YU T S, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy [J]. *Nature*, 2012, 488(7412): 522-526.
- [6] HUANG Z, CHENG L, GURYANOVA OA, et al. Cancer stem cells in glioblastoma--molecular signaling and therapeutic targeting [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(7): 638-655.
- [7] STROBELE S, SCHNEIDER M, SCHNEELE L, et al. A potential role for the inhibition of PI3K signaling in glioblastoma therapy [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e131670.
- [8] 丘雅维,杨惠玲. PI3K 通路及其抑制剂抗肿瘤的研究进展[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2009(S1): 223-226.  
QIU Y W, YANG H L. PI3K signal pathway and its inhibitors in antitumor therapy: A review [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2009, 30(3): 223-226.
- [9] BLEAU A M, HAMBARDZUMYAN D, OZAWA T, et al. PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(3): 226-235.
- [10] WANG W A, GROENENDYK J, MICHALAK M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(10): 2143-2149.
- [11] YAMAGUCHI H, WANG H G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(44): 45495-45502.
- [12] GAUDETTE B T, IWAKOSHI N N, BOISE L H. Bcl-xL protein protects from C/EBP homologous protein (CHOP)-dependent apoptosis during plasma cell differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(34): 23629-23640.
- [13] GARGIULO G, CESARONI M, SERRESI M, et al. In vivo RNAi screen for BMI1 targets identifies TGF- $\beta$ /BMP-ER stress pathways as key regulators of neural- and malignant glioma-stem cell homeostasis [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(5): 660-676.
- [14] SINGH S K, HAWKINS C, CLARKE I D, et al. Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396-401.
- [15] LATHIA J D, MACK S C, MULKEARNS-HUBERT E E, et al. Cancer stem cells in glioblastoma [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(12): 1203-1217.
- [16] OYADOMARI S, MORI M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 381-389.
- [17] SUNAYAMA J, MATSUDA K, SATO A, et al. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(11): 1930-1939.
- [18] QIN L, WANG Z, TAO L, et al. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy [J]. *Autophagy*, 2010, 6(2): 239-247.

(编辑 孙慧兰)