

# 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对兔原代巨噬细胞自体吞噬的影响及机制

翟纯刚, 季晓平, 王和峰, 程 晶, 张 运, 陈文强

(山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] PI3K/Akt/mTOR; 动脉粥样硬化; 原代巨噬细胞; 自体吞噬

[摘要] 目的 探讨抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对兔原代巨噬细胞自体吞噬中的影响。方法 分离培养纯种新西兰兔腹腔原代巨噬细胞并分为 4 组, 加入磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抑制剂雷帕霉素 (10 nmol/L) 组、蛋白激酶 B (Akt) 抑制剂曲西立滨组 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 以及空白对照组。共培养 4 h、12 h 后分别收集细胞, 运用透射电镜观察巨噬细胞自噬体的变化, 细胞免疫荧光法检测微管相关蛋白轻链 3 II (LC3 II) 分子的表达, Western blot 检测 Akt、mTOR、磷酸化 Akt (p-Akt)、磷酸化 mTOR (p-mTOR) 及自噬相关蛋白 Beclin-1 和自噬蛋白 Atg5-Atg12 连接体的表达, 单丹酰尸胺 (MDC) 染色法观察自噬溶酶体的变化。结果 与空白对照组相比, 透射电镜下 LY294002 组自噬体、自噬空泡、髓磷脂图像等自噬标记物明显减少, 雷帕霉素组、曲西立滨组明显增多; 激光共聚焦显微镜下 LY294002 组 LC3 II 表达显著减少, 雷帕霉素组、曲西立滨组表达显著增多; Western blot 结果显示 LY294002 组 Beclin-1 及 Atg5-Atg12 蛋白表达水平显著下降, p-mTOR、p-Akt 蛋白表达显著减少; 雷帕霉素组、曲西立滨组 Beclin-1 及 Atg5-Atg12 蛋白表达水平明显上调, 共培养 4 h 后 p-Akt 表达增多, 雷帕霉素组 p-mTOR 表达增多, 曲西立滨组减少; 共培养 12 h 后雷帕霉素组、曲西立滨组 p-mTOR 表达显著减少, 雷帕霉素组 p-Akt 表达显著增多, 曲西立滨组显著减少; MDC 染色显示 LY294002 组自噬溶酶体明显减少, 雷帕霉素组、曲西立滨组明显增多。结论 抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能促进兔原代巨噬细胞自体吞噬, 抑制 PI3K 能减少兔原代巨噬细胞自体吞噬, 可能是不同类型的 PI3K 分子通过其他通路起作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Roles of Selective Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway on Rabbit Primary Macrophage Autophagy and Possible Mechanism

ZHAI Chun-Gang, JI Xiao-Ping, WANG He-Feng, CHENG Jing, ZHANG Yun, and CHEN Wen-Qiang

(Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

[KEY WORDS] PI3K/Akt/mTOR; Atherosclerosis; Primary Macrophage; Autophagy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of selective inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on prompting rabbit primary macrophage autophagy. **Methods** Primary macrophages were obtained intraperitoneally from the New Zealand rabbits and then were co-cultured with the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 (10  $\mu\text{mol/L}$ ), protein kinase B (Akt) inhibitor triciribine (20  $\mu\text{mol/L}$ ), mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor rapamycin (10 nmol/L) and no drugs respectively for 12 hours. Ultrastructural changes of macrophages were examined by transmission electron microscopy. The expression level of microtubule-associated protein light chain 3 II (LC3 II) was assayed by immunofluorescence. Protein expression levels of Akt, mTOR, phosphorylation of protein kinase B (p-Akt), phosphorylation of mammalian target of rapamycin (p-mTOR) and autophagy related protein Beclin-1 and autophagy protein 5 and 12 conjugated form (Atg5-Atg12) were measured by Western blot. Mondansylcadaverine (MDC) staining was used to see autophagy lysosome changes. **Results** Compared with the control group, few autophagosomes and vacuoles were detected in group LY294002 while plenty of typical autophagosomes were detected in group rapamycin and triciribine. The

[收稿日期] 2013-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30971216)

[作者简介] 翟纯刚, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化发生发展机制的研究, E-mail 为 zhaichungang87@163.com。通讯作者陈文强, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发生发展机制的研究, E-mail 为 chenwenqiang33@sina.com。

expression levels of Beclin-1 and Atg5-Atg12 decreased significantly in group rapamcin, while increased significantly in group rapamcin and triciribine. The fluorescence microscope showed few dots of LC3 II in group LY294002 and many in group rapamcin and triciribine. The expression of p-Akt and p-mTOR increased obviously in group rapamcin while the former increased a lot and the latter decreased in group rapamcin after co-culturing of 4 hours. The expression of p-mTOR decreased significantly in the treated groups, however, p-Akt decreased significantly in group rapamcin and triciribine but increased obviously in group rapamcin after 12 hours' co-culture. There were no significant differences on the total AKT and mTOR levels among the treated groups. MDC staining showed decreased autophagic lysosomes in group LY294002 and increased autophagic lysosomes in group rapamcin and triciribine. **Conclusion** Selective inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway can promote rabbit primary macrophage autophagy while inhibition of PI3K suppress macrophage autophagy by other signaling pathway.

巨噬细胞作为体内最强大的吞噬细胞在维护机体内环境稳态方面具有十分重要的作用。除吞噬作用外,巨噬细胞还有趋化功能、分泌功能以及抗原呈递功能,因此巨噬细胞成为许多领域的研究对象。在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块病理生理进程中,巨噬细胞由于分泌基质金属蛋白酶(MMP)降解细胞外基质导致纤维帽变薄以及分泌多种细胞因子促进斑块向不稳定方向发展而受到人们重视。如何减少 As 斑块中的巨噬细胞浸润进而稳定易损斑块已成为 As 研究的热点。

自体吞噬是近年来发现的不同于凋亡和坏死的一种形式,简称自噬。自体吞噬参与了 As 的发生发展过程<sup>[1]</sup>,通过自体吞噬作用能够减少泡沫细胞的积聚和斑块中的炎症反应,起到稳定斑块的作用。如何利用巨噬细胞的自体吞噬作用稳定易损斑块具有十分重要的意义。利用 RAW264.7 细胞系的研究发现 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能够调节巨噬细胞自体吞噬<sup>[2]</sup>,然而由于细胞系的肿瘤性,是否在原代巨噬细胞中也有相同结论尚有待验证,同时,抑制 PI3K 分子是否也能促进自噬尚不明确。本研究拟采用兔原代巨噬细胞作为研究对象,分别利用 PI3K 抑制剂 LY294002、Akt 抑制剂曲西立滨、mTOR 抑制剂雷帕霉素选择性抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,以观察其对原代巨噬细胞自体吞噬的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

纯种新西兰大白兔,购自山东省农业科学院。

### 1.2 试剂和药品

药物 LY294002 (Cat: 9901)、抗体 p-mTOR (Cat: 2974)、mTOR (Cat: 2983)、Akt (Cat: 9272)、LC3 II (Cat: 3868) 购自 Cell Signaling, 抗体 p-Akt (Cat: ab23509) 购自 Abcam, 抗体 Atg5 (Cat:

ABC14) 购自 Merck Millipore, 抗体 Beclin-1 (cat: PL031353R) 购自 PL laboratories, 抗体  $\beta$ -actin 购自中杉金桥, 雷帕霉素 (Cat: 553210)、曲西立滨 (Cat: 124012) 购自 Calbiochem, MDC (Cat: D4008)、巯基乙酸盐肉汤 (thioglycollate broth, Cat: 70157) 购自 Sigma 公司, 蛋白提取试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究。

### 1.3 仪器

日本 JEM-1200 透射电子显微镜, 德国蔡司 LSM710 共聚焦显微镜, 通用电气公司 imagequant LAS 4000mini 超灵敏化学发光成像仪。

### 1.4 家兔原代巨噬细胞培养及分组

新西兰家兔麻醉后腹腔注射 200 mL (2.9 g/100 mL) 无菌巯基乙酸肉汤, 3~4 天后麻醉处死家兔, 无菌条件下开腹注入 60 mL 培养基, 按摩 5 min 后吸出, 重复 3 次。吸取的培养基离心后按  $10^6$  种入 6 孔板中, 2 h 后换液, 无菌 PBS 冲洗两遍, 贴壁细胞 95% 为巨噬细胞。随即分为 4 组, 加入 PI3K 抑制剂 LY294002 (10  $\mu$ mol/L) 组、Akt 抑制剂曲西立滨 (20  $\mu$ mol/L) 组、mTOR 抑制剂雷帕霉素 (10 nmol/L) 组共培养细胞 12 h, 第 4 组为空白对照组。

### 1.5 透射电镜观察超微结构

药物共培养巨噬细胞 12 h 后, 收取各组细胞置于 3% 戊二醛中固定、PBS 洗涤、1% 饿酸固定、梯度乙醇丙酮脱水、包埋、聚合、超薄切片、铅染后观察。

### 1.6 细胞免疫荧光标记

24 孔板细胞爬片, 各组加入相应药物共培养 12 h, PBS 洗涤, 2% 多聚甲醛固定细胞, PBS 冲洗后, 1% 的 Triton X-100 细胞透入, 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 封闭, 加入 LC3 II 后 4℃ 孵育过夜。PBS 冲洗后, 加入荧光二抗, 室温避光孵育 2 h, DAPI 染细胞核后, 防荧光淬灭剂封片, 激光共聚焦显微镜下观察。

### 1.7 单丹磺酰尸胺 (MDC) 染色

24 孔板细胞爬片, 各组加入相应药物共培养 12

h,PBS 洗涤后加入终浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  MDC,37℃、5%  $\text{CO}_2$  孵箱孵育 1 h,PBS 洗涤,2% 多聚甲醛固定细胞,PBS 冲洗后,1%的 Triton X-100 细胞透入,DAPI 染细胞核,防荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.8 Western blot 检测细胞中 mTOR、p-mTOR、Akt、p-Akt、Beclin-1 及 Atg5-Atg12 蛋白的表达

分别收集药物共培养 4 h、12 h 及空白对照组巨噬细胞,PBS 洗涤 3 次,用试剂盒提取蛋白后,采用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。6% ~ 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳,蛋白分离后 200 mA 转至硝酰膜上。室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,用相应的一抗 4℃ 孵育过夜,洗涤后换相应二抗室温孵育 2 h。洗涤后采用化学发光试剂盒用 imagequant LAS 4000 mini 超灵敏化学发光成像仪显影,使用

Photoshop 分析条带灰度值。

1.9 统计学处理

计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 17.0 软件处理,采用单因素方差分析,并进行 LSD 检验,方差不齐时运用 Dunnett's T3 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 透射电镜观察细胞自噬体

药物与兔原代巨噬细胞共培养 12 h 后,与空白对照组相比,LY294002 组自噬标记物如自噬体、自噬空泡、髓磷脂图像明显减少,而雷帕霉素组、曲西立滨组明显增多(图 1)。

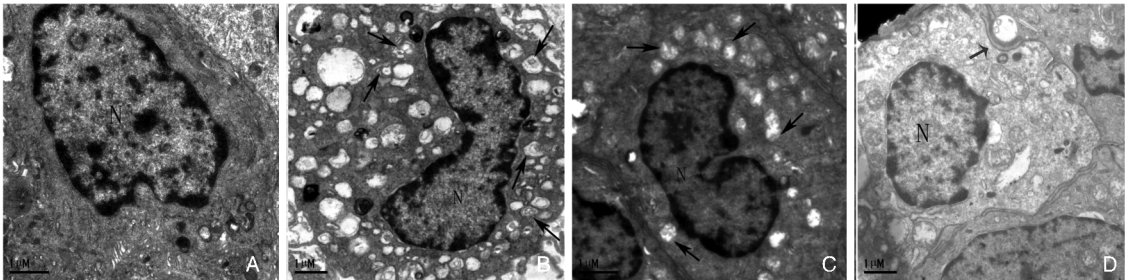


图 1. 电子显微镜观察不同处理对兔原代巨噬细胞形态学的影响 箭头所指为自噬体,蓝色箭头为细胞的吞噬作用(A、C 组  $\times 12000$ ,B、D 组  $\times 10000$ );A 为 LY294002 组,B 为雷帕霉素组,C 为曲西立滨组,D 为空白对照组。

Figure 1. Ultrastructural features of primary macrophage treated with different conditions

2.2 细胞免疫荧光标记情况

药物与兔原代巨噬细胞共培养 12 h 后,与空白对照组相比 (IOD/Area 值为  $0.265 \pm 0.089$ ),LY294002 组 LC3II 荧光亮点表达明显减少 (IOD/Area

值为  $0.031 \pm 0.018$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ );雷帕霉素组 (IOD/Area 值为  $0.620 \pm 0.152$ )、曲西立滨组 (IOD/Area 值为  $0.752 \pm 0.086$ ) 表达显著增多,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ;图 2)。

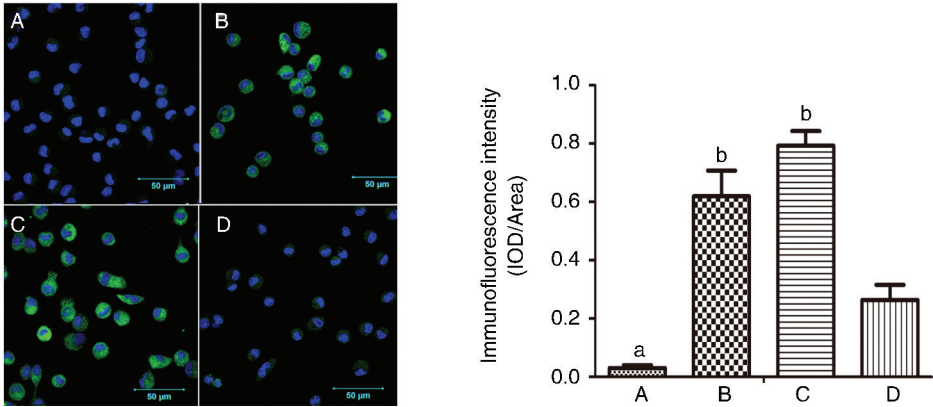


图 2. 免疫荧光检测各组 LC3 II 的含量 ( $\times 400$ ) A 为 LY294002 组,B 为雷帕霉素组,C 为曲西立滨组,D 为空白对照组。a 为  $P < 0.05$ ,b 为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较。

Figure 2 . The expression of LC3 II among different groups detected by immunofluorescence ( $\times 400$ )



2.3 自噬溶酶体的表达

与空白对照组相比 (IOD/Area 值为  $0.317 \pm 0.074$ ), LY294002 组自噬溶酶体表达显著减少 (IOD/Area 值为  $0.044 \pm 0.018$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 雷帕霉素组 (IOD/Area 值为  $0.772 \pm 0.077$ )、曲西立滨组 (IOD/Area 值为  $0.715 \pm 0.065$ ) 自噬溶酶体表达明显增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ; 图 3)。

2.4 蛋白表达情况

与空白对照组相比, LY294002 组自噬蛋白 Atg5-Atg12 连接体及 Beclin-1 表达显著减少 ( $P < 0.01$ ), 雷帕霉素、曲西立滨组表达均显著增多 ( $P < 0.01$ ,  $P <$

$0.05$ ; 图 4)。与药物共培养 4 h 后, 与空白对照组相比, LY294002 组及曲西立滨组 p-mTOR 表达明显减少 ( $P < 0.01$ ), 雷帕霉素组 p-mTOR 表达显著增多 ( $P < 0.01$ )。处理 12 h 后, 与空白对照组相比, LY294002 组、雷帕霉素组和曲西立滨组 p-mTOR 表达均显著减少 ( $P < 0.01$ ; 图 5)。处理 4 h 后, 与空白对照组相比, 雷帕霉素组、曲西立滨组 p-Akt 表达显著增多 ( $P < 0.01$ ), LY294002 组 p-Akt 表达显著减少 ( $P < 0.01$ )。处理 12 h 后, 与空白对照组相比, LY294002 组、曲西立滨组 p-Akt 表达均显著减少 ( $P < 0.01$ ), 雷帕霉素组 p-Akt 表达增多 ( $P < 0.05$ ; 图 6)。

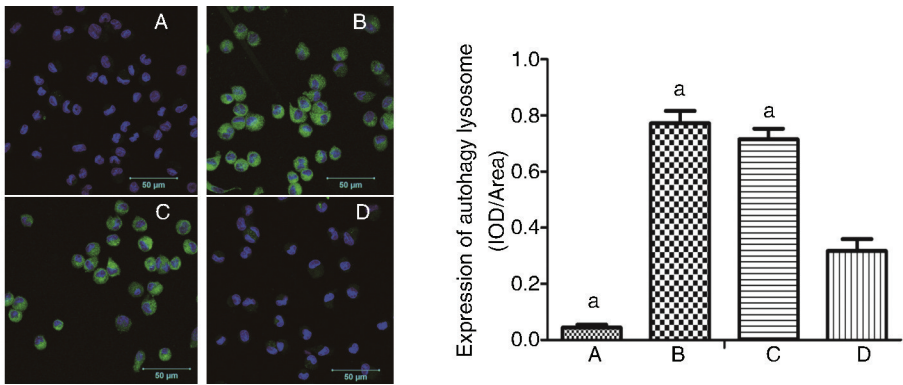


图 3. MDC 染色显示不同处理对兔原代巨噬细胞自噬溶酶体的影响 (×400) A 为 LY294002 组, B 为雷帕霉素组, C 为曲西立滨组, D 为空白对照组。a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 3. The MDC staining of lysosome among different groups detected by laser confocal microscopy (×400)

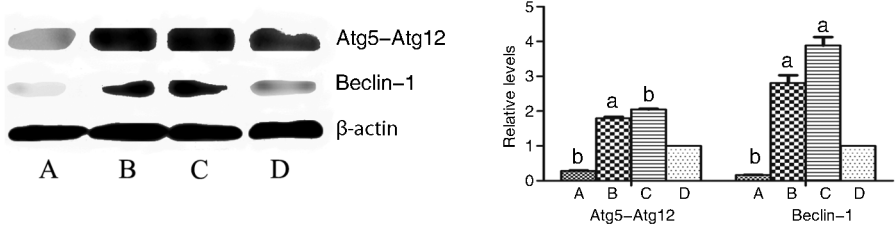


图 4. 不同处理对兔原代巨噬细胞自噬蛋白 Atg5-Atg12 连接体、Beclin-1 表达量的影响 A 为 LY294002 组, B 为雷帕霉素组, C 为曲西立滨组, D 为空白对照组。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 4. Different conditions on the expression of autophagy protein Atg5-Atg12 conjugated form and Beclin-1

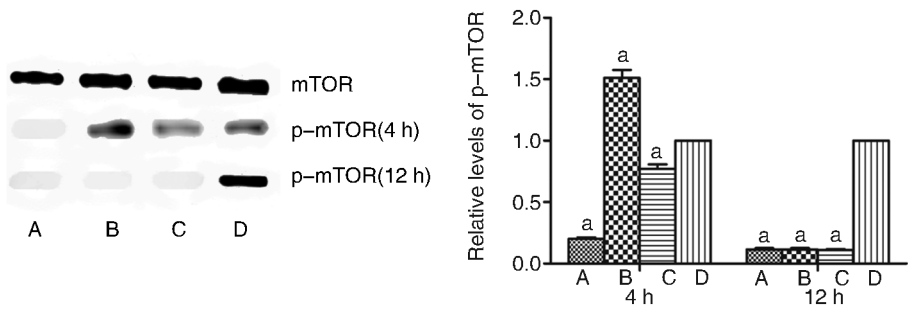


图 5. 不同药物与兔原代巨噬细胞共培养 4h、12h 对 p-mTOR 表达的影响 A 为 LY294002 组, B 为雷帕霉素组, C 为曲西立滨组, D 为空白对照组。a 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 5. Different drugs after co-culture with rabbit primaray macrophage for the expression of p-mTOR

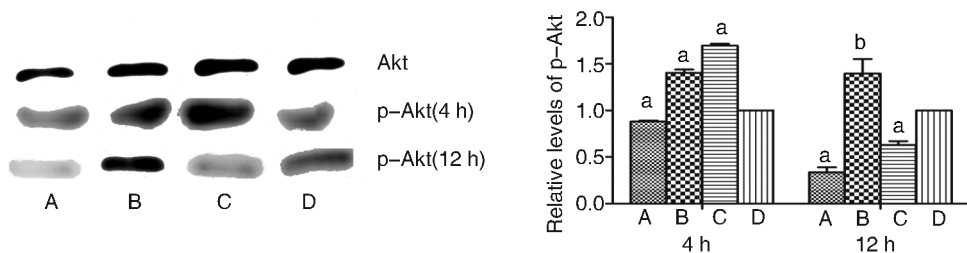


图 6. 不同药物与兔原代巨噬细胞共培养 4 h、12 h 对 p-Akt 表达的影响 A 为 LY294002 组, B 为雷帕霉素组, C 为曲西立滨组, D 为空白对照组。a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

Figure 6. Different drugs after co-culture with rabbit primary macrophage for the expression of p-Akt

### 3 讨论

巨噬细胞富集是动脉粥样硬化易损斑块的重要特征, 斑块纤维帽中侵入的巨噬细胞越多, 斑块就越脆弱, 此外, 巨噬细胞还可以分泌多种细胞因子例如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  以及细胞黏附分子 ICAM-1、VCAM-1、P-选择素、E-选择素、NF- $\kappa$ B、CD40L-CD40 等, 促进斑块向不稳定方向转化。因此选择性减少 As 斑块中的巨噬细胞浸润能够促进易损斑块稳定。

研究发现自体吞噬参与了 As 的发生发展过程, 斑块细胞存在不同程度的自噬现象, 巨噬细胞也不例外。自体吞噬是细胞中的一种补救性生命支持进程, 通过形成椭圆形的双层膜结构来隔绝一定的细胞质成分, 进而利用溶酶体组分降解这些成分<sup>[3]</sup>。已有研究表明自体吞噬在神经系统疾病以及肿瘤、心力衰竭中具有重要作用<sup>[4]</sup>。自体吞噬在生物进化中高度保守, 能够产生游离脂肪酸、氨基酸和核苷酸供细胞重新利用。自体吞噬由生物体精细调节, 研究发现 Akt/mTOR 信号通路、MAPK/Erk1/2 信号通路以及 AMPK 等信号通路都与之相关<sup>[5]</sup>, 尤其是 Akt/mTOR 信号通路起到关键的调节作用。Akt/mTOR 被认为是蛋白质合成的主要信号调节通路, 参与细胞增殖、分化迁移等的调节, 活化时可以抑制多种刺激诱发的细胞凋亡以及细胞自我吞噬, 促进细胞周期进展。活化的 mTOR 可以调节两条下游通路: 核糖体 S6 蛋白激酶 1 (S6 kinase 1, S6K1) 和真核细胞起始因子 4E 结合蛋白 1 (4E binding protein, 4EBP1)<sup>[6]</sup>。mTOR 通过磷酸化使 S6K1 活化, 进而磷酸化核糖体蛋白 S6 (p70S6) 来促进 mRNA 翻译, 同时促使核糖体与内质网的黏附而抑制内质网膜脱落形成自噬体膜; mTOR 也可以通过磷酸化抑制 4EBP1 活性, 解除其对真核细胞翻译起始因子 eIF4E 的抑制。最近研究发现利用药物依

维莫司、雷帕霉素抑制 mTOR, 通过促进肿瘤细胞的自体吞噬而抑制肿瘤的发生发展<sup>[7]</sup>, 更直接的证据来自于高脂饲养的家兔斑块中放置的依维莫司药物涂层支架, 可以看到巨噬细胞显著减少而血管平滑肌细胞不受影响<sup>[8]</sup>, 甚至口服雷帕霉素也能达到抑制斑块生长的作用<sup>[9]</sup>。

PI3K 是 Akt/mTOR 信号通路的上游分子, 可以分为两种类型, I 型 PI3K 活化时通过激活 Akt/mTOR 信号通路, 负性调节自体吞噬, III 型 PI3K 活化时激活 Beclin-1, 启动自噬进程<sup>[10]</sup>。Beclin-1 是酵母自噬基因 Atg6 的哺乳细胞同源基因, 大部分观点认为其表达增多代表自噬水平增强, 例如用 siRNA 沉默 Beclin-1 基因使得饥饿诱导的细胞自噬并没有增强<sup>[11]</sup>。而 Wang 等<sup>[12]</sup>研究发现, Beclin-1 是 Akt 的作用靶点之一, 对 Akt 抵抗的 Beclin-1 突变体能够增加自噬。由于 Beclin-1 被 Akt 磷酸化后能够增强其与波形蛋白的联系, 而清除后者能够增强自噬水平, 由此认为 Beclin-1 被 Akt 磷酸化后自噬减弱。我们的研究发现应用 PI3K 抑制剂 LY294002 后 p-Akt、p-mTOR 均有大幅下降, 说明 LY294002 可以抑制 I 型 PI3K/Akt/mTOR 通路, 然而自噬标志物是降低的, 可能的机制是 LY294002 对于 III 型 PI3K 的抑制作用更为主要, 因此更加特异的抑制剂有待开发, 对 Beclin-1 的深入研究也将更加阐明这一现象。

我们还发现应用 Akt、mTOR 特异性抑制剂曲西立滨、雷帕霉素与兔原代巨噬细胞共培养 12 h 后, p-Akt、p-mTOR 表达量下降而总 Akt、mTOR 表达量不变, 说明可以有效阻断 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 同时透射电镜、免疫荧光、Western blot 检测以及 MDC 染色结果显示自噬现象明显增强, 说明抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可以增强兔原代巨噬细胞自体吞噬。我们的实验还发现雷帕霉素、曲西立滨与兔原代巨噬细胞共培养 4 h 后 p-mTOR、p-Akt 表达增多, 共培养 12 h 后雷帕霉素组 p-Akt 表达量

进一步上升,可能的原因是受雷帕霉素抑制,雷帕霉素敏感型 mTOR 表达减少,而雷帕霉素不敏感型 mTOR 增多,后者可以引起 Akt 的磷酸化,短时间药物刺激更为明显。这与其他研究者的结论一致<sup>[13]</sup>,也反向证明抑制 Akt 可以增强自体吞噬。

自噬的检测有多种方法,电镜是公认的金标准。电镜下如果能观察到双层的自噬体、髓磷脂图像以及泛素化夹杂物则可以认为自噬发生。电镜的检测需要有经验的技师进行操作,除操作复杂外,巨噬细胞还由于其吞噬异物的特性不易与自噬空泡区分,我们的实验也观察到了巨噬细胞的吞噬过程(图 1D)。Atg5 和 Atg8(哺乳动物为 LC3)由于各参与自噬体形成过程中两大泛素系统<sup>[1]</sup>也可以作为自噬的标志。LC3 II 形成过程中导致 LC3 的构象改变,这对自噬体的形成非常必要,LC3 II/LC3-I 比值增高可以说明自噬增强。Atg5 以 Atg12-Atg5-Atg16L 复合体的形式定位到自噬小体膜上,并广泛分布于细胞质中,因此也可以作为自噬标记物<sup>[14]</sup>,我们的实验用 Atg-Atg12 连接体反映自噬形成的强弱。另一种常用的自噬标志蛋白是 Beclin-1。如上文所述,Beclin-1 表达增多可以看做自噬增强的标志。除此之外,由于自噬体最终要与溶酶体结合形成自噬溶酶体,然后溶酶体酶将自噬体内容物降解。因此通过溶酶体染色也可以反映自噬的情况。MDC 染色即是经典方法之一<sup>[15]</sup>。

总之,我们的实验初步证实了抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路能够促进兔原代巨噬细胞的自体吞噬,而抑制 PI3K 并没有取得相同结果,在现阶段缺乏更为特异的抑制剂条件下,为抑制剂的选择以及动物实验指明了思路。

#### [参考文献]

- [1] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential[J]. Circ Res, 2009, 104: 304-317.
- [2] 王和峰,翟纯刚,庞文会,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在巨噬细胞自体吞噬及动脉粥样硬化斑块不稳定中的作用机制[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(3): 390-397.
- [3] 翟纯刚,季晓平,陈文强. 自体吞噬在动脉粥样硬化斑

块中的作用[J]. 国际心脏病学杂志, 2013, 40(3): 142-144.

- [4] Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2008, 10: 216-223.
- [5] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2010, 90 (4): 1 383-435.
- [6] Fingar DC, Salama S, Tsou C, et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E[J]. Genes Dev, 2002, 16: 1 472-487.
- [7] Chen WQ, Zhong L, Zhang L, et al. Oral rapamycin attenuates inflammation and enhances stability of atherosclerotic plaques in rabbits independent of serum lipid levels[J]. Br J Pharmacol, 2009, 156: 941-951.
- [8] Verheye S, Martinet W, Kockx MM, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy [J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49: 706-715.
- [9] 邵娜,陈文强,李大庆,等. 口服雷帕霉素抑制支架内再狭窄的血管内超声的实验研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2011, 49 (6): 59-63.
- [10] Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 Cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275 (16): 992-998.
- [11] Zeng X, Overmeyer JH, Maltese WA. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking[J]. J Cell Sci, 2006, 119 (Pt 2): 259-270.
- [12] Wang RC, Wei Y, An Z, et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation[J]. Science, 2012, 338 (6 109): 956-959.
- [13] O'Reilly KE, Rojo F, She QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt[J]. Cancer Res, 2006, 66: 1 500-508.
- [14] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using Atg5-deficient mouse embryonic stem cells [J]. J Cell Biol, 2001, 152: 657-668.
- [15] Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles[J]. Eur J Cell Biol, 1995, 66: 3-14.

(此文编辑 李小玲)