

肿瘤研究专题

通过 PI3K/AKT 途径调节胶质母细胞瘤 CD47 表达
对肿瘤侵袭性的影响刘学键¹, 武霞², 李玉花²

(1. 山东省立第三医院 两腺血管瘤科, 山东 济南, 250031;

2. 山东省临沂市第三人民医院 肿瘤科, 山东 临沂, 276023)

摘要:目的 探讨通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(AKT)通路调节胶质母细胞瘤 CD47 表达对肿瘤侵袭性的影响。方法 选取手术切除并经病理证实的 30 例胶质母细胞瘤脑组织标本以及 10 个正常脑组织对照标本。分析低表达及高表达的 CD47 对胶质母细胞瘤侵袭性的影响。结果 CD47 在胶质母细胞瘤细胞中高表达, CD47 低表达显著抑制了肿瘤侵袭性,而 CD47 的高表达则显著促进肿瘤侵袭性。CD47 通过激活 PI3K/AKT 途径而显著增强胶质母细胞瘤的侵袭性($P < 0.05$)。结论 CD47 在胶质母细胞瘤细胞中高表达, CD47 通过激活 PI3K/AKT 途径而增强胶质母细胞瘤的侵袭性。

关键词: 胶质母细胞瘤; CD47; 肿瘤侵袭性; 磷脂酰肌醇 3-激酶; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶

中图分类号: R 739.41 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2020)07-056-06 DOI: 10.7619/jcmp.202007017

Influence of CD47 expression regulated by PI3K/AKT
pathway on the tumor invasiveness of glioblastomaLIU Xuejian¹, WU Xia², LI Yuhua²

(1. Department of Biglandulous Hemartoma, Shandong Provincial Third Hospital, Ji'nan, Shandong, 250031;

2. Department of Oncology, The Third People's Hospital of Linyi City, Linyi, Shandong, 276023)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of CD47 expression regulated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein serine threonine kinase (AKT) pathway on the tumor invasiveness of glioblastoma. **Methods** Thirty samples of glioblastoma brain tissue confirmed by pathology were collected, and 10 normal samples of brain tissues were collected as controls. Effect of low and high expressions of CD47 on the invasiveness of glioblastoma were analyzed. **Results** CD47 was highly expressed in glioblastoma cells, and low expression of CD47 could significantly inhibit the tumor invasiveness, and high expression of CD47 could significantly promote the tumor invasiveness. CD47 was able to significantly enhance invasiveness of glioblastoma by activating the PI3K/AKT pathway ($P < 0.05$). **Conclusion** CD47 is highly expressed in glioblastoma cells, and CD47 can significantly enhance invasiveness of glioblastoma by activating the PI3K/AKT pathway.

KEY WORDS: glioblastoma; CD47; tumor invasiveness; phosphatidylinositol 3-kinase; protein serine threonine kinase

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤之一,约占大脑海肿瘤的 80%^[1]。胶质母细胞瘤具有侵袭性,其治疗较为困难,易复发,中位生存时间为 8~10 个月^[2-3]。CD47 作为正常组织中广泛表达的跨膜糖蛋白,与巨噬细胞的信号调节蛋白 α (SIRP α) 相互作用,调节正常细胞的“自噬/凋亡”信号^[4]。CD47 的表达可促进多种肿瘤

的侵袭性,如胃癌^[5]、白血病^[6]、乳腺癌^[7]、宫颈癌^[8]和黑色素瘤^[9]等,表明 CD47 可作为治疗多种癌症的靶点^[10-11],但有关 CD47 在胶质母细胞瘤中的表达及侵袭的研究很少。研究^[12-13]表明,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(AKT)通路是抑制细胞凋亡和调节肿瘤细胞侵袭的重要通路。本研究探讨通过激活 PI3K/AKT

途径调节胶质母细胞瘤 CD47 表达对肿瘤侵袭性的影响,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取接受手术切除并经病理证实的脑胶质母细胞瘤患者 30 例,获取其胶质母细胞瘤脑组织标本,另收集 10 个正常脑组织标本为对照组。根据世界卫生组织(WHO)分类标准确定胶质母细胞瘤的组织学分型,并经 2 位具有副主任医师及以上职称的病理科医师确定每个样本,样本存放于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏。纳入标准:①手术前未进行放疗、化疗及辅助治疗者;②未合并其他肿瘤者;③血红蛋白 $\geq 110\text{ g/L}$ 者;④无严重的心肺功能不全、肝疾病、肾疾病或功能障碍者。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及耗材:胶质母细胞瘤细胞 U251、T98G 和 U87 以及正常星形胶质细胞 HEB 购自中国科学院生物物理研究所(中国北京);DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司(美国);添加 FBS(10%)以及链霉素和青霉素(100 U/mL)(Gibco, 中国上海),在 10% 培养皿中于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下应用于细胞培养。渥曼青霉素购自 Invitrogen 公司,抗 PI3K 和磷酸化 PI3K(P-PI3K)、抗 AKT 和磷酸化 AKT(P-AKT)抗体购自 Abcam 公司。

1.2.2 CD47 表达载体构建及转染:以 pOTB7-CD47 质粒为模板,PCR 扩增 CD47 片段,用 XhoI 和 HindIII 分别将 PCR 产物 CD47 及目的载体 pcDNA3.1-3xFlag 进行双酶切。将酶切回收后的 CD47 基因片段和 pcDNA3.1-3xFlag 载体片段进行连接。将过夜连接的混合液直接转化 DH5 α 感受态细胞,进行重组质粒的扩增与提取。将 CD47 过表达的质粒 pcDNA3.1-3xFlag-CD47 和空载 Vector 转染至细胞密度为 60%~70% 的脑胶质瘤细胞中,利用转染试剂,按照说明书进行转染,在转染前使用磷酸盐缓冲液洗涤细胞,72 h 后提取蛋白验证转染效率并进行后续实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(RT-PCR):采用 TRIzol 试剂(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)提取总核糖核酸。为了量化 CD47 转录,借助转基因生物技术(TransStart Top Green)进行基因组 DNA(gDNA)去除和互补 DNA(cDNA)合成超螺旋生成 cDNA。应用于 GAPDH 以及 CD47 的

寡核苷酸引物如下:GAPDH:5'-GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC-3'(有义)和 5'-TGG TGA AGA CGC CAG TGGA-3'(反义);CD47:5'-AGA TCC GGT GGT ATG GAT GAGA-3'(有义)和 5'-GTC ACA ATT AAA CCA AGG CCA GTAG-3'(反义)。每个程序一式三份进行。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳及熔解曲线鉴定 qRT-PCR 产物,并用公式(ΔCt)进行定量分析。 $\Delta\text{Ct} = \text{目的基因 Ct} - \text{内参基因 Ct}$ 。CD47 cDNA 循环阈值(Ct)根据 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法^[12]对 GAPDH 进行归一化。

1.2.4 Western Blot 分析:将 6 孔板应用于细胞培养,直至在不含血清的 100 U/mL 双抗(青霉素/链霉素)的 DMEM 培养基中汇合达到 80%。取出培养基,用 PBS 洗涤细胞 2 次。M-PER 哺乳动物蛋白质提取试剂(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)加入细胞中,随后从平板上刮下细胞,并在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 14 000 g 离心 10 min,然后在添加有 MTT(50 mmol/L)的 Laemmli 标本缓冲液的帮助下,将上清液加热 5 min。经过裂解和加热的等量蛋白质(30 $\mu\text{g}/\text{孔}$)在聚丙烯酰胺凝胶的帮助下进行电泳(10%;BioRad, 中国上海)。将分离的蛋白质移至 PVDF 膜(GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA),然后于室温环境下在脱脂乳(5%;BioRad)的帮助下封闭 1 h。在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的情况下,在第一抗体的帮助下,膜进行过夜孵育。按照指示进行浓度的测定,然后用辣根过氧化物酶结合的膜孵育第二抗体在室温下持续 1 h,最后使用增强的化学发光试剂盒(GE Healthcare)检测蛋白质。

1.2.5 侵袭实验:预先加入基底膜(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)的 Transwell 小室(24 孔插入物,8 μm 孔径, Millipore, Billerica, MA, USA)用于侵袭实验,在转染后 24 h,用丝裂霉素 C(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理细胞 2 h。将细胞进行胰蛋白酶处理,并在不含血清的培养基中以每室 1×10^5 个细胞的密度种植于上面的室中。下面的室里装满了含有 FBS(15%)的 DMEM-F12 培养基,可作为化学诱导剂。孵化持续了 48 h,随后位于室上部表面的细胞消除,位于下室的入侵细胞用甲醇和结晶紫染色并进行固定。应用光学显微镜评估 5 个随机视野中的细胞数量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 进行数据处理,计量资料以

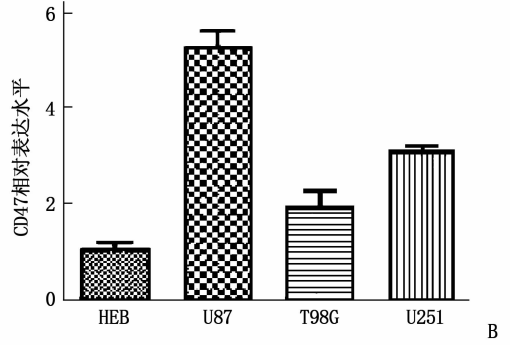
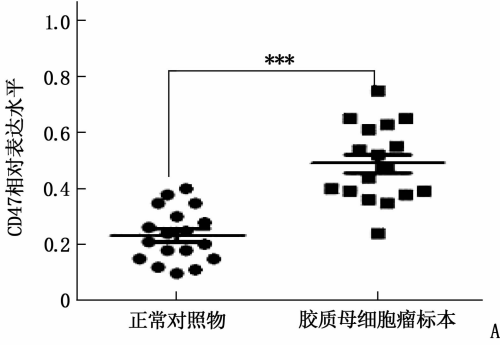
均数 ± 标准差表示,比较采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胶质母细胞瘤中 CD47 的表达

通过 qRT-PCR 技术评价 CD47 在 30 个胶质

母细胞瘤标本以及 10 个正常对照标本中的表达,结果显示 CD47 存在于大多数胶质母细胞瘤组织中,见图 1A。与正常星形胶质细胞 HEB 相比,U251、T98G 以及 U87 细胞不仅促进转录,而且促进 CD47 的翻译,其中胶质母细胞瘤细胞 U87 中的 CD47 表达最显著($P < 0.05$),见图 1B。



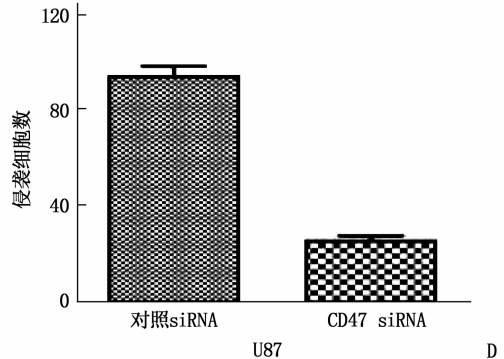
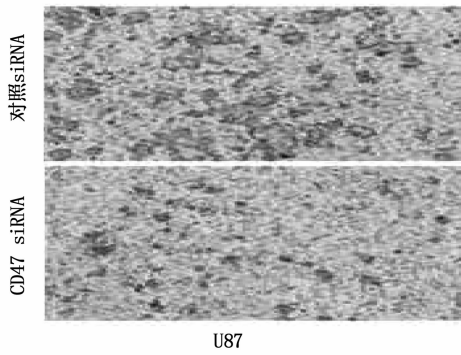
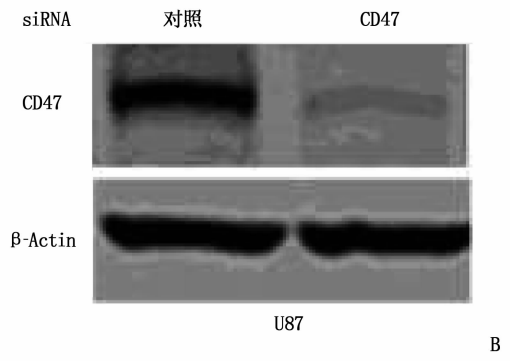
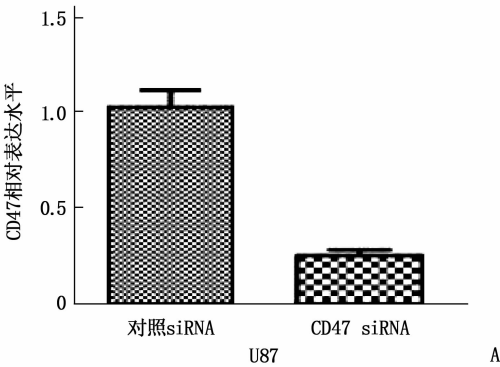
A: CD47 在胶质母细胞瘤标本及正常对照标本中的表达; B: CD47 在 U251、T98G、U87 及正常星形胶质细胞 HEB 中的表达比较。

图 1 胶质母细胞瘤中的 CD47 表达

2.2 低表达及过表达的 CD47 对胶质母细胞瘤细胞侵袭性的影响

2.2.1 低表达 CD47 对胶质母细胞瘤侵袭性的影响: 将 CD47 和对照 siRNA 分别转染入 U87 细

胞,通过对 CD47 的 siRNA (CD47-siRNA) 进行干扰,阻止 CD47 细胞转录和翻译,敲除 U87 细胞的 CD47。与对照 siRNA 相比,敲除 CD47 显著抑制 U87 的侵袭($P < 0.05$),见图 2。



A: 转染后 24 h 应用 RT-PCR 评估 CD47 转录; B: 转染后 24 h 的 CD47 翻译; C: 侵袭实验测定的特征图像; D: 对照 siRNA 与 CD47 siRNA 侵袭性。

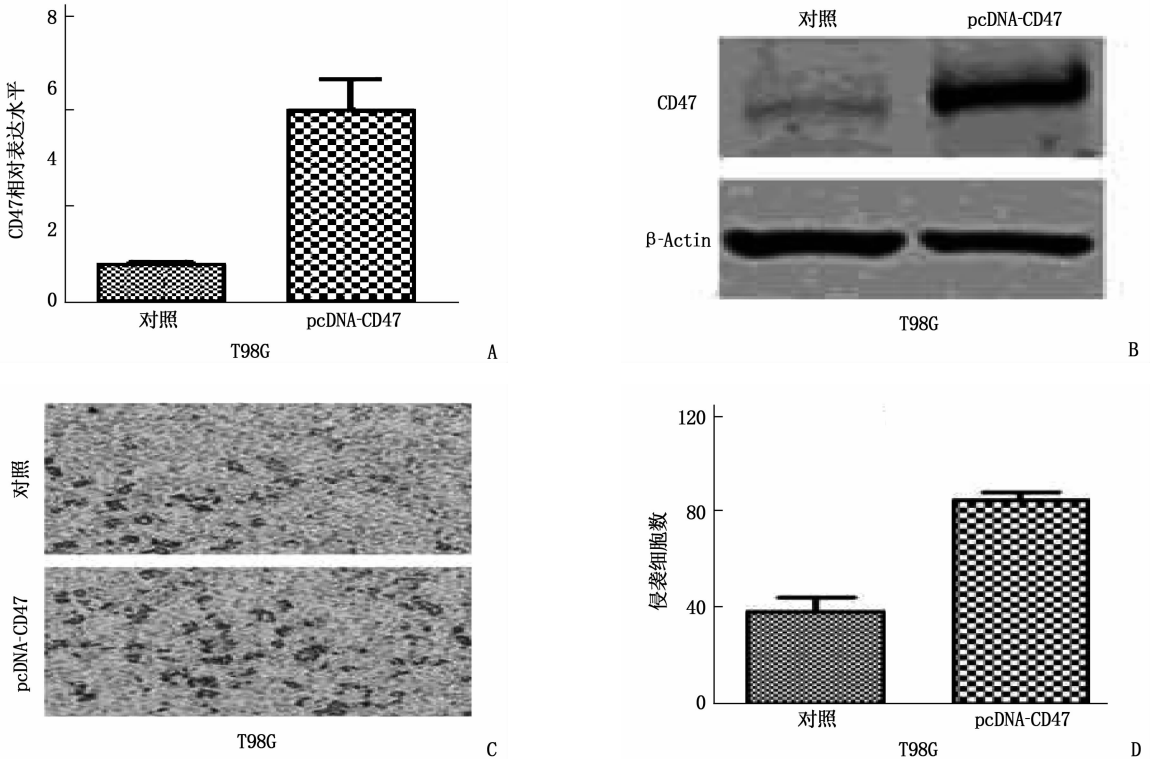
图 2 低表达 CD47 对胶质母细胞瘤细胞侵袭性的影响

2.2.2 过表达 CD47 对胶质母细胞瘤细胞侵袭

的影响: 应用 pcDNA3.1-3xFlag-CD47 质粒转染

T98G 细胞,然后用 Western Blott 和 qRT-PCR 确认 T98G 细胞中过量的 CD47 表达。与对照组相

比,过表达 CD47 显著增强了 T98G 细胞的侵袭性 ($P < 0.05$)。见图 3。



A: 转染后 24 h 应用 RT-PCR 评估 CD47 转录; B: 转染后 24 h 的 CD47 翻译; C: 侵袭实验测定的特征图像; D: 对照组与 pcDNA-CD47 的侵袭性。

图 3 过表达 CD47 对胶质母细胞瘤细胞侵袭性的影响

2.3 PI3K/AKT 信号通路调节胶质母细胞瘤

CD47 对肿瘤侵袭性的影响

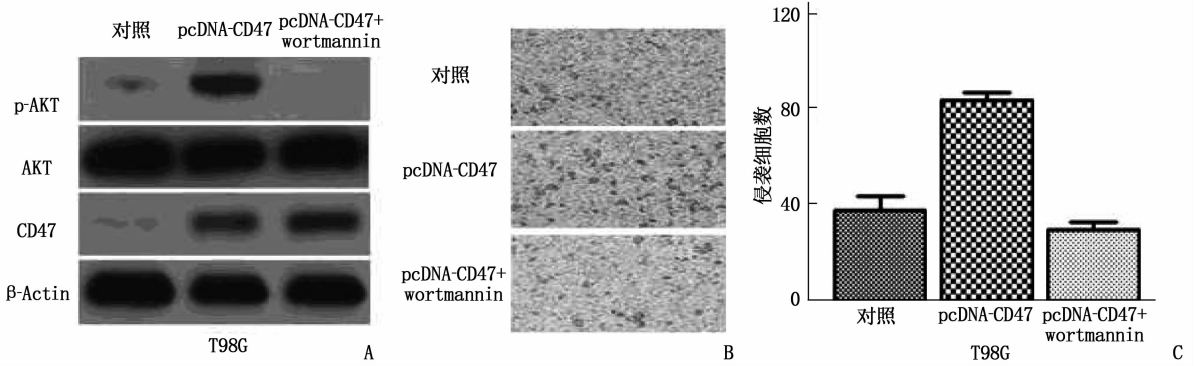
将对照质粒 (对照组) 和 pcDNA3.1-3xFlag-CD47 质粒转染到 T98G 细胞中,随后进行渥曼青霉素 (PI3K 抑制剂) 处理 (即 pcDNA-CD47 + wortmannin 组) 和不进行渥曼青霉素处理 (即 pcDNA-CD47 组)。结果显示,CD47 过表达后 AKT 磷酸化有显著促进作用,应用渥曼青霉素抑制 AKT 磷酸化。通过侵袭测定证明,渥曼青霉素显著减轻了 CD47 在 T98G 细胞方面引发的侵袭性 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

CD47 是免疫球蛋白超家族的一员,广泛表达于多种正常组织细胞表面,发挥调节细胞运动、神经轴突发育和免疫调节等多种生理功能。CD47 分子在大部分组织来源的肿瘤细胞中均表达上调,因此 CD47 可能与肿瘤逃脱免疫监视有关^[8]。研究^[14-17]表明,CD47 可作为各种癌症的预测因子。Baccelli I 等^[4]研究证明,具有 EPCam⁺

CD47⁺ MET^{+/-} 表型的乳腺导管癌患者具有更低的总体存活率,循环血液中具有 CD47 高表达的乳腺癌患者易复发和转移^[18]。在结直肠癌病例中,CD47 上调与远处转移有关。CD47 单抗通过阻断肿瘤细胞表面的 CD47 与巨噬细胞表面的 SIRPα 结合,发挥抗肿瘤作用。研究^[19]表明,阻断 CD47-SIRPα 信号通路能显著抑制黑色素瘤的生长以及肺转移。CD47 信号通路的阻断抑制了癌症的发展和转移,证明了 CD47 对各种恶性肿瘤的治疗有效性^[20-21]。

在中枢神经系统中,培养的神经细胞中 CD47 的过表达改善了突触的产生和分支,与 CD47 结合的 SIRPα 增强了培养的神经细胞中脊柱和丝状体的生成^[22-23]。此外,CD47 与血小板反应素-1 (TSP-1) 相结合,调节细胞内的信号通路活化,控制细胞存活、生长、运动和线粒体发生等生理活动,同时也调节血管中平滑肌细胞的迁移和生长^[24]。多家研究机构迅速开发出多种以 CD47 为靶点的单克隆抗体药物,并在多种组织来源的肿瘤细胞移植动物模型实验中取得了良好的治疗



A: 采用 Western Blot 评估转染后 24 h 的特定蛋白质的表达; B: 侵袭测定的特征图像; C: 3 组侵袭性比较。

图 4 CD47 通过 PI3K/AKT 信号通路引发胶质母细胞瘤的侵袭

效果,如在急性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤小鼠模型中,CD47 单抗治疗后,可以明显缩小甚至清除荷瘤小鼠体内的肿瘤细胞,达到完全治愈的效果^[25]。在实体肿瘤中,CD47 单抗亦具有良好的治疗效果,如乳腺癌、卵巢癌、膀胱癌、肝癌等多种肿瘤的体外实验研究中,CD47 单抗均可显著抑制肿瘤的生长和转移,并且延长生存期^[26-27]。脑胶质瘤是最常见的颅内肿瘤,近年来发生率逐年递增,老年人群尤为明显。脑胶质瘤患者预后较差,易复发,病死率高,主要原因是胶质母细胞瘤的侵袭性使其具有易复发性和顽固性^[2-3]。

本研究通过 CD47 在胶质母细胞瘤组织细胞中的表达与在正常脑标本和星形胶质细胞中的表达相比较,发现 CD47 在胶质母细胞瘤细胞中高表达并且在 U87 中 CD47 的表达最明显。通过对 CD47 的 siRNA(CD47-siRNA)干扰,阻止 CD47 细胞转录和翻译,敲除 U87 细胞的 CD47,发现 CD47 的敲低显著抑制 U87 的侵袭。本研究用 pcDNA3.1-3xFlag-CD47 质粒转染 T98G 细胞,然后用 Western Blot 和 qRT-PCR 确认 T98G 细胞中过量的 CD47 表达,通过比较发现过量的 CD47 表达显著促进了 T98G 细胞的侵袭性。

本研究创新性地发现 CD47 通过激活 PI3K/AKT 途径增强胶质母细胞瘤的侵袭性。作者将对照质粒和 pcDNA3.1-3xFlag-CD47 质粒转染到 T98G 细胞中,随后进行渥曼青霉素差别处理(分为处理与不处理),结果显示 CD47 过表达后对 AKT 磷酸化有显著促进作用,渥曼青霉素显著减轻了 CD47 在 T98G 细胞方面引发的侵袭性。这些数据表明 CD47 的表达水平通过激活 PI3K/AKT 信号通路增强胶质母细胞瘤的侵袭性。PI3K/AKT

是细胞内信号转导通路中最主要的信号通路之一,在调节细胞生长、运动、存活、增殖、蛋白质合成、自噬、转录及血管生成等方面有重要意义^[28],该途径包括 3 个主要的驱动分子:PI3K 激酶(PI3K)、丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)^[29]。对于星形细胞瘤而言,PI3K/AKT 途径通过调节葡萄糖转运蛋白 Glut1 定位于细胞表面,并通过激活己糖激酶引起糖酵解,己糖激酶作为糖酵解中的酶使 AKT 的 IP3 受体的磷酸化,抑制了 U87 细胞的凋亡^[30]。AKT 还针对胶质瘤中的 mTOR 调节各种细胞反应。mTOR 是一种非典型的丝氨酸,主要参与调节细胞生长、生存及运动等过程^[31]。

总之,本研究结果表明,CD47 在胶质母细胞瘤细胞中高表达,CD47 通过激活 PI3K/AKT 信号通路增强胶质母细胞瘤的侵袭性,CD47 是胶质母细胞瘤的重要预测指标和治疗靶点。

参考文献

- [1] Munshi A. Central nervous system tumors: Spotlight on India[J]. South Asian J Cancer, 2016, 5(3): 146-147.
- [2] Xu Y M, Yuan J, Zhang Z H, et al. Syndecan-1 expression in human glioma is correlated with advanced tumor progression and poor prognosis[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(9): 8979-8985.
- [3] Miller T E, Liao B B, Wallace L C, et al. Transcription elongation factors represent in vivo cancer dependencies in glioblastoma[J]. Nature, 2017, 547(7663): 355-359.
- [4] Baccelli I, Stenzinger A, Vogel V, et al. Co-expression of MET and CD47 is a novel prognosticator for survival of luminal breast cancer patients[J]. Oncotarget, 2014, 5(18): 8147-8160.
- [5] Sun K, Ye L, Liu X P, et al. Expression of CRT and CD47 in Gastric Carcinoma and Their Significance[J]. Cancer Res Prev Treat, 2019, 46(1): 45-49.

- [6] Chao M P, Alizadeh A A, Tang C, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(4): 1374 - 1384.
- [7] Zhang H M, Lu H Q, Xiang L S, et al. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(45): E6215 - E6223.
- [8] Parida S, Pal I, Parekh A, et al. GW627368X inhibits proliferation and induces apoptosis in cervical cancer by interfering with EP4/EGFR interactive signaling[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2154 - e2159.
- [9] Lee T K, Cheung V C, Lu P, et al. Blockade of CD47-mediated cathepsin S/protease-activated receptor 2 signaling provides a therapeutic target for hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 60(1): 179 - 191.
- [10] Zhao H, Wang J X, Kong X D, et al. CD47 promotes tumor invasion and metastasis in non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29719 - 29723.
- [11] Lo J, Lau E Y, So F T, et al. Anti-CD47 antibody suppresses tumour growth and augments the effect of chemotherapy treatment in hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Int*, 2016, 36(5): 737 - 745.
- [12] Song X S, Shi B, Huang K X, et al. MiR-133a inhibits cervical cancer growth by targeting EGFR[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(3): 1573 - 1580.
- [13] Prasad S B, Yadav S S, Das M, et al. PI3K/AKT pathway-mediated regulation of p27(Kip1) is associated with cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2015, 38(3): 215 - 225.
- [14] Chao M P, Tang C, Pachynski R K, et al. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy[J]. *Blood*, 2011, 118(18): 4890 - 4901.
- [15] Zhao X W, van Beek E M, Schornagel K, et al. CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(45): 18342 - 18347.
- [16] Cioffi M, Trabulo S, Hidalgo M, et al. Inhibition of CD47 effectively targets pancreatic cancer stem cells via dual mechanisms[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(10): 2325 - 2337.
- [17] Xiao Z Y, Chung H, Banan B, et al. Antibody mediated therapy targeting CD47 inhibits tumor progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2015, 360(2): 302 - 309.
- [18] Baccelli I, Stenzinger A, Vogel V, et al. Co-expression of MET and CD47 is a novel prognosticator for survival of luminal breast cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(18): 8147 - 8160.
- [19] Wang Y H, Xu Z H, Guo S T, et al. Intravenous delivery of siRNA targeting CD47 effectively inhibits melanoma tumor growth and lung metastasis[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(10): 1919 - 1929.
- [20] Ju B H, Huang Y T, Tian J, et al. In vitro application of anti-CD47 monoclonal antibody for targeted therapy of ovarian cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2013, 40(8): 440 - 443.
- [21] Xu J F, Pan X H, Zhang S J, et al. CD47 blockade inhibits tumor progression human osteosarcoma in xenograft models[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23662 - 23670.
- [22] Murata T, Ohnishi H, Okazawa H, et al. CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(48): 12397 - 12407.
- [23] Soto-Pantoja D R, Miller T W, Pendrak M L, et al. CD47 deficiency confers cell and tissue radioprotection by activation of autophagy[J]. *Autophagy*, 2012, 8(11): 1628 - 1642.
- [24] Chao M P, Tang C, Pachynski R K, et al. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy[J]. *Blood*, 2011, 118(18): 4890 - 4901.
- [25] Chao M P, Weissman I L, Majeti R. The CD47-SIRP α pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications[J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(2): 225 - 232.
- [26] Horrigan S K, Reproducibility Project: Cancer Biology. Replication Study: The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is a therapeutic target for human solid tumors[J]. *Elife*, 2017, 6: e18173 - e18183.
- [27] Pan Y, Volkmer J P, Mach K E, et al. Endoscopic molecular imaging of human bladder cancer using a CD47 antibody[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(260): 148 - 159.
- [28] Ma Y J, Lu C, Li C F, et al. Overexpression of HSPA12B protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via a PI3K/Akt-dependent mechanism[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(1): 57 - 66.
- [29] Dong H Q, Zhang X, Dai X N, et al. Lithium ameliorates lipopolysaccharide-induced microglial activation via inhibition of toll-like receptor 4 expression by activating the PI3K/Akt/FoxO1 pathway[J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 140 - 148.
- [30] Li X H, Huang J, Yuan D M, et al. HSPA12B regulates SSeCKS-mediated astrocyte inflammatory activation in neuroinflammation[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 339(2): 310 - 319.
- [31] Cheaib B, Auguste A, Leary A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges[J]. *Chin J Cancer*, 2015, 34(1): 4 - 16.