

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.018

· 技术方法 ·

p70/p85 核糖体蛋白 S6 激酶 1 重组真核表达载体的构建及其在人乳腺癌 MCF-7 细胞内功能的初步鉴定

赵莉^{1,2}, 侯敬申³, 白晓春², 贾春宏²(1. 广州医科大学药学院 广州蛇毒研究所, 广东 广州 510182; 2. 南方医科大学基础医学院 细胞生物学教研室, 广东 广州 510515; 3. 广州医科大学附属第二医院 急诊外科, 广东 广州 510260)

[摘要] **目的:** 构建 p70 核糖体蛋白 S6 激酶 1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1, *p70 S6K1*) 及 *p85 S6K1* 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1, 并鉴定其在人乳腺癌 MCF-7 细胞内的表达及功能。**方法:** 以 pRK7-HA-S6K1 为模板, 采用 PCR 扩增出目的基因片段 *p70 S6K1*、*p85 S6K1*, 克隆入真核表达载体 pcDNA3.1(-)-flag 构建重组表达载体 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1, 采用 PCR、双酶切和 DNA 测序鉴定。将重组载体转染 MCF-7 细胞, 24 h 后采用 Western blotting 方法检测细胞内 p70 S6K1、p85 S6K1 蛋白的表达; 同时向转染细胞内加入 1 mmol/L H₂O₂ 处理 36 h, 观察 p70 S6K1、p85 S6K1 蛋白对 H₂O₂ 诱导的细胞死亡的影响。**结果:** 成功扩增得到 *p70 S6K1*、*p85 S6K1* 基因片段并构建重组真核表达载体 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1, 重组载体经 PCR、双酶切鉴定均出现 p70 S6K1 和 p85 S6K1 预期条带, DNA 测序结果显示其全长基因阅读框完整、正确。重组载体在 MCF-7 细胞中高效表达 flag-p70 S6K1 和 flag-p85 S6K1, 且 p85 S6K1 能增强 H₂O₂ 诱导的细胞死亡。**结论:** 成功构建重组真核表达载体 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1, 均能在 MCF-7 细胞中高效表达, 且 p85 S6K1 能够增强 H₂O₂ 诱导的细胞死亡。

[关键词] 核糖体蛋白 S6 激酶 1; 基因重组; 载体构建; 真核表达; 细胞死亡; 乳腺癌; MCF-7 细胞

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0459-05

Construction of p70 / p85 ribosomal protein S6 kinase 1 expression vectors and functional assessment in human breast cancer MCF-7 cells

Zhao Li^{1,2}, Hou Jingshen³, Bai Xiaochun², Jia Chunhong²(1. Venom Research Institute of Guangzhou, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong, China; 2. Department of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong China; 3. Department of Emergency Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the construction of eukaryotic expression vectors encoding p70/p85 ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K1) and to evaluate the function of the constructed vectors in human breast cancer MCF-7 cells. **Methods:** Fragments of *p70 S6K1* and *p85 S6K1* cDNAs with restriction endonucleases sites were amplified by PCR with pRK7-HA-S6K1 as a template and cloned into an eukaryotic expression vector with a flag tag, pcDNA3.1(-)-flag. MCF-7 cells were transfected with the constructed vectors, pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 and pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1. At 24 h after transfection, protein contents of p70 S6K1 and p85 S6K1 were assessed by Western blotting using anti-flag and anti-p70/85 S6K1 antibodies and cell death following induction with 1 mmol/L hydrogen peroxide for another 36 h was analyzed by microscopy. **Results:** Eukaryotic expression vectors pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 and pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 were successfully constructed; the full-length open reading frames were confirmed by DNA sequencing. Overex-

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(No. 81302357); 广东省自然科学基金博士启动项目(No. S2013040016493); 广东省高校优秀青年创新人才培养计划项目育苗工程[自然科学](No. 2013LYM0075)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Young Talents of China(No. 81302357), the National Natural Foundation of Guangdong Province(No. 2013040016493), and the Foundation for Distinguished Young Talents in Higher Education of Guangdong Province(No. 2013LYM0075)

[作者简介] 赵莉(1979-), 女, 山东省淄博市人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤药理方面的研究, E-mail: zhaoli790122@163.com

[通信作者] 贾春宏(Jia Chunhong, corresponding author), E-mail: sakura79719_0@126.com。

pression of S6K1 and S6K1 was detected in MCF-7 cells transfected with pcDNA3. 1(-)-flag-p70 S6K1 and pcDNA3. 1(-)-flag-p85 S6K1 respectively. Overexpression of p85 S6K1 but not p70 S6K1 enhanced MCF-7 cell death induced by 1 mmol/L hydrogen peroxide. **Conclusion:** Expression vectors pcDNA3. 1(-)-flag-p70 S6K1 and pcDNA3. 1(-)-flag-p85 S6K1 were constructed successfully. Overexpression of p85 S6K1 may enhance H₂O₂-induced breast cancer cell death. [**Key words**] ribosomal protein S6 kinase 1(S6K1); gene recombination; vector construction; eukaryotic expression; cell death; breast cancer; MCF-7 cell

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 459-463]

核糖体蛋白 S6 激酶 1(ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1)作为哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的重要下游效应物之一, 因其激活后可磷酸化 S6 核糖体蛋白, 从而调节具有 5'TOP(5'terminal oligopolypyrimidine tract)结构的 mRNA 的翻译, 在细胞生长、增殖与转化中起着重要的调控作用^[1-3]。p70 S6K1 和 p85 S6K1 是 S6K1 的两种不同亚型, 基因结构上 p85 S6K1 较 p70 S6K1 在 5'端多出一段核定位序列(编码 23 个氨基酸)^[4-5], 使得两者在 mTOR/S6K1 信号通路中功能和作用机制不尽相同^[6], 关于两者的定位也有不同结论^[7-8]。目前大量研究都围绕 mTOR-p70 S6K1 通路进行, 而少有针对 p85 S6K1 的研究, 因此 p85 S6K1 的功能和机制目前仍不甚明了。本实验拟通过将 p85 S6K1 的 5'端核定位序列设计在 5'端引物前, 而后采用 PCR 技术体外合成 p85 S6K1 基因; 再通过基因重组技术构建真核表达载体 pcDNA3. 1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3. 1(-)-flag-p85 S6K1, 并转染人乳腺癌 MCF-7 细胞验证其表达及功能, 旨在为进一步探讨 p85 S6K1 的功能和作用机制奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

大肠杆菌 TOP10、人乳腺癌细胞 MCF-7 为南方医科大学细胞生物学教研室保存, pcDNA3. 1(-)-flag-Rheb 野生型、pRK7-HA-S6K1 质粒由美国匹兹堡大学蒋羽教授惠赠。限制性内切酶 BamH I-HFTM 和 EcoR I-HFTM 购自 NEB 公司; 中量质粒纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司。T4 DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶、dNTP 和 DNA 片段纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司。LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司。鼠源抗 Flag 标签抗体购自 Sigma-Aldrich 公司, 鼠源抗人 S6K1 蛋白抗体、HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中人 S6K1 基因序列, 分别设计

p70 S6K1 和 p85 S6K1 的引物。其中 p85 S6K1 5'端设计有核定位序列, 并且突变了原 p70 S6K1 的起始密码子(ATG TTG), 使 p70 S6K1 不能表达(图 1)。p70 S6K1 的 5'端引物为 5'-atggaGGATCCatggcaggagtgttgacat-3'(BamH I-HFTM); p85 S6K1 的 5'端引物为 5'-atggaGGATCCatgaggcgacgacggagcgggacggctttaccagcgctgacttccgacacaggaagctgaggactt-ggcaggagtggttgacataga-3'(BamH I-HFTM); 3'端共有引物为 5'-agcattGAATTCcatagattcatacgcaggt-3'(EcoR I-HFTM) (大写部分为引入的限制性内切酶位点, 下划线部分为核定位序列)。



图 1 p70 S6K1、p85 S6K1 基因 5'端引物设计结构图
 Fig. 1 5' primer chart of p70 S6K1 and p85 S6K1 gene

1.3 p70 S6K1 和 p85 S6K1 片段的扩增及纯化

以 pRK7-HA-S6K1 为模板, 分别以上述引物扩增 p70 S6K1 和 p85 S6K1。p70 S6K1 PCR 反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 1 min、56 °C 1 min、72 °C 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 10 min。p85 S6K1 PCR 退火温度为 61 °C, 其余条件与 p70 S6K1 扩增相同。1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物后对 PCR 产物进行纯化。

1.4 pcDNA3. 1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3. 1(-)-flag-p85 S6K1 的构建

分别对上述 PCR 产物纯化片段和 pcDNA3. 1(-)-flag-Rheb 质粒用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收酶切后的 pcDNA3. 1(-)-flag-Rheb 的大片段(pcDNA3. 1(-)-flag)、p70 S6K1 和 p85 S6K1 基因片段。测定浓度, 将回收的载体 pcDNA3. 1(-)-flag 分别与 p70 S6K1 和 p85 S6K1 片段按照摩尔比 1:3 的比例, 在的 T4 DNA 连接酶作用下, 16 °C 连接过夜。

1.5 重组载体的扩增与鉴定

将连接产物转化 TOP 10 感受态菌,涂于含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素(Amp)的 LB 固体培养基平板上,12~16 h 后挑取单克隆接种至 5 ml 含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振摇 12~16 h。经菌液 PCR 初步验证后,抽提质粒。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切鉴定,经酶切鉴定阳性的克隆用 T7 测序引物进行测序。

1.6 重组质粒转染 MCF-7 细胞及其在胞内表达和功能的鉴定

取对数生长期 MCF-7 细胞,以 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种至 24 孔板。待细胞贴壁后,参照文献[9-10]的方法,按照 Lipofectamine™ 2000 说明书操作,以每孔 0.8 μg 质粒转染 MCF-7 细胞,24 h 后,提取蛋白进行 Western blotting 鉴定。使用鼠源抗 flag 标签抗体(1:1 000 稀释)检测带有 flag 标签的外源性 p70 S6K1、p85 S6K1 的表达,用兔抗人 S6K1 单克隆抗体(1:1 000 稀释)检测 p70 S6K1 及 p85 S6K1 细胞内总 S6K1 蛋白的表达。

取转染 24 h 后的细胞,加入终浓度为 1 mmol/L 的 H_2O_2 作用 36 h,光镜下拍照,检测细胞活力(正常活细胞贴壁后呈铺路石样,圆形细胞为死亡细胞),随机计数 10 个低倍视野下圆形细胞所占百分数即为细胞死亡率(%)。

1.7 统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析检验(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功获得构建重组载体所需基因及载体片段

琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 2A)显示,主要两个 PCR 扩增产物条带均位于 1 500 bp 位置附近,其大小分别与 1 565 bp 的 p70 S6K1 和 1 634 bp 的 p85 S6K1 基本一致,且条带较均一。*Bam*H I/*Eco*R I 双酶切后(图 2B)的 pcDNA3.1(-)-flag-Rheb 野生型质粒得到约 5 500 kb 和 548 bp 的片段(Rheb 编码区序列 CDS 大小为 548 bp);酶切后的 p70 S6K1 和 p85 S6K1 片段约为 1 500 bp。

2.2 成功构建重组载体 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1

随机挑选 3 个 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 及 5 个 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 转化细菌克隆,分别进行菌液 PCR 和双酶切初步筛选阳性克隆。琼

脂糖凝胶电泳检测结果(图 3、4)显示,阳性克隆的 PCR 产物分子量约为 1 500 bp,双酶切后出现分子量约为 5 500 bp 和 1 500 bp 的大小两片段。将酶切鉴定为阳性克隆的质粒进一步测序,结果证实为正确插入目标序列的质粒。

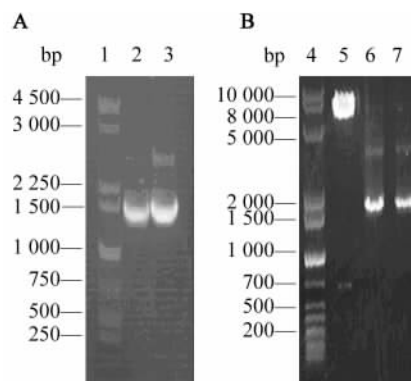


图 2 成功获得用于构建重组载体所需 p70 S6K1 和 p85 S6K1 基因及载体片段

Fig. 2 p70 S6K1, p85 S6K1 sequences and the vector fragment for construct a recombinant vector were successfully obtained

A: Amplification product of p70 S6K1 and p85 S6K1 cDNAs by PCR; B: pcDNA3.1(-)-flag-Rheb wild type plasmid, p70 S6K1 and p85 S6K1 cDNA digested by *Bam*H I/*Eco*R I. 1: 250 bp DNA ladder marker; 2: p70 S6K1; 3: p85 S6K1; 4: 1 kb plus DNA ladder; 5: Digested fragments of pcDNA3.1(-)-flag-Rheb; 6: Digested fragments of p70 S6K1 cDNA; 7: Digested fragments of p85 S6K1 cDNA

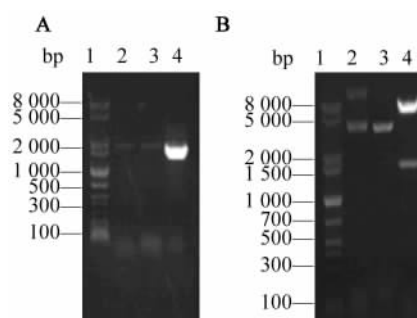


图 3 重组质粒 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 的 PCR (A)和 *Bam*H I-HF™/*Eco*R I-HF™ 双酶切 (B) 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant pcDNA3.1(-)-flag-p70S6K1 plasmids by PCR (A) and by *Bam*H I/*Eco*R I digestion (B)

A: Identification of recombinant pcDNA3.1(-)-flag-p70S6K1 plasmids by PCR. 1: 1 kb plus DNA ladder; 2-4: p70 S6K1; B: Identification of recombinant pcDNA3.1(-)-flag-p70S6K1 plasmids *Bam*H I/*Eco*R I digested. 1: 1 kb plus DNA ladder; 2-4: pcDNA3.1(-)-flag-p70S6K1

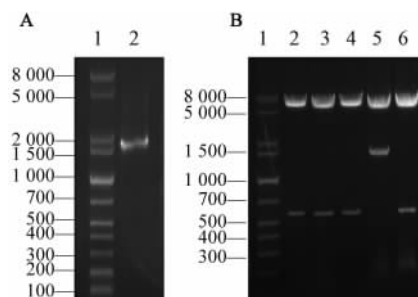


图 4 重组质粒 pcDNA3.1(-)-Flag-p85 S6K1 的 PCR (A) 和 BamHI /EcoRI 双酶切 (B) 鉴定

Fig. 4 Identification of recombinant pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 plasmids by PCR (A) and by BamHI /EcoRI digestion (B)

A: Identification of recombinant pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 plasmids by PCR. 1: 1 kb plus DNA ladder; 2: pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1; B: Identification of recombinant pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 plasmids by BamHI /EcoRI. 1: 1 kb plus DNA ladder; 2-6: pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1

2.3 重组载体在 MCF-7 细胞内成功表达 flag-p70 S6K1 和 flag-p85 S6K1

Western blotting 检测结果(图 5A)显示, 转染 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 和 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 的 MCF-7 细胞分别表达了带有 flag 标签的外源性 p70 S6K1、p85 S6K1, 且与内源性 p70 S6K1、p85 S6K1 表达蛋白在分子量上差异明显。

2.4 转染 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 促进 H₂O₂ 诱导的 MCF-7 细胞死亡

1 mmol/L H₂O₂ 能够明显诱导转染空载体的 MCF-7 细胞死亡, 而 pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 组 MCF-7 细胞与空载体组相比, 细胞死亡率没有显著差异 ($P > 0.05$), 而 pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 组细胞死亡率较空载体组显著升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

国内外均有大量报道^[2, 14-19]证实, S6K1 特别是 p70 S6K1 是 mTOR / S6K 信号通路的核心分子之一, 在食管鳞癌、宫颈癌、乳腺癌、肝癌、前列腺癌、肾癌等临床常见肿瘤的发生、发展过程中起着十分重要的作用。早在 20 世纪 90 年代初, Grove 等^[10]就提出, p70 S6K α 可分为 p70 S6K α I 和 p70 S6K α II 两种亚型, 蛋白相对分子质量分别为 (85 ~ 90) $\times 10^3$ 和 (65 ~ 70) $\times 10^3$ ^[20], 后来将两者分别称为 p85 S6K1 和 p70 S6K1, 归类于 S6K1。目前, p70 S6K1

通过 mTOR / S6K 信号通路在许多肿瘤的发生过程中的正性调节作用已基本证实, 而对 p85 S6K1 在 mTOR / S6K 通路中的功能和机制的研究相对较少, 关于其在肿瘤发生中的具体作用也鲜有报道。

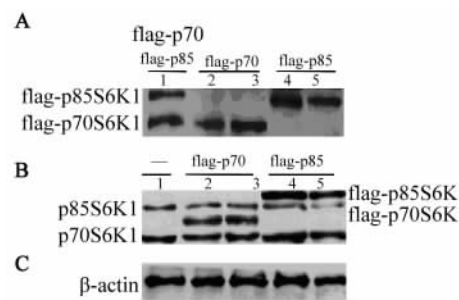


图 5 flag-p70 S6K1 和 flag-p85 S6K1 在转染重组载体的 MCF-7 细胞内的表达

Fig. 5 Identification of protein expression of flag-p70 S6K1 and flag-p85 S6K1 in MCF-7 cells transfected with recombinant vector

A: Identification of protein expression by anti-flag antibody; 1: MCF-7 cells transfected with pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 and pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 plasmids; 2-3: MCF-7 cells transfected with pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 plasmid; 4-5: MCF-7 cells transfected with pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 plasmid. B: Identification of protein expression by anti-S6K1 antibody; 1: MCF-7 cells transfected with control vector; 2-3: MCF-7 cells transfected with pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1 plasmid; 4-5: MCF-7 cells transfected with pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1 plasmids. C: Identification of protein expression by anti- β -actin antibody

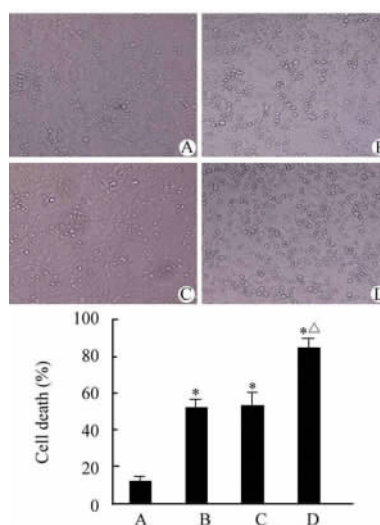


图 6 转染重组载体对 H₂O₂ 诱导 MCF-7 细胞死亡的影响 (×100)

Fig. 6 Effect of recombinant vector transfection on the MCF-7 cell death induced by H₂O₂ (×100)

A: Control; B: Vector; C: pcDNA3.1(-)-flag-p70 S6K1; D: pcDNA3.1(-)-flag-p85 S6K1
* $P < 0.05$ vs control (A), $\Delta P < 0.05$ vs vector (B)

本研究将 *p85 S6K1* 的 5'端核定位序列设计在 5'端引物前,体外合成 *p85 S6K1* 基因序列,构建真核表达载体,同时构建 *p70 S6K1* 真核表达载体作为对照,用于研究 *p85 S6K1* 的功能和作用机制。采用 PCR 合成 *p85 S6K1* 基因,凝胶电泳结果显示目的条带整齐,主带均一,证实引物设计合理,PCR 反应条件较理想;测序结果进一步说明了上述方法合成 *p85 S6K1* 基因的可行性。通过 PCR、酶切、测序鉴定重组表达载体,结果与预期结果吻合,证明构建载体成功,具体实验方案正确可行。Western blotting 检测 *p85 S6K1* 和 *p70 S6K1* 在人乳腺癌细胞 MCF-7 中的表达,结果证实构建的 *p85 S6K1* 和 *p70 S6K1* 真核表达载体能在 MCF-7 细胞中高效表达,充分说明 *p85 S6K1* 和 *p70 S6K1* 真核表达载体构建成功。在转染后,加入 1 mmol/L H_2O_2 作用 36 h,发现 *p85 S6K1* 增强了 H_2O_2 诱导的细胞死亡,而 *p70 S6K1* 并无明显的增强作用,提示 *p70 S6K1* 和 *p85 S6K1* 确实具有不同的生物学功能。

本研究成功构建的载体为进一步研究 *p85 S6K1* 的功能及其在肿瘤发生以及氧化应激过程中的具体作用机制提供最基本的质粒工具。

[参 考 文 献]

- [1] Zhang Y, Zhang J, Xu K, et al. PTEN/PI3K/mTOR/B7-H1 signaling pathway regulates cell progression and immuno-resistance in pancreatic cancer [J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60 (127): 1766-1772.
- [2] Holz MK. The role of S6K1 in ER-positive breast cancer [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(17): 3159-3165.
- [3] Lekmine F, Uddin S, Sassano A, et al. Activation of the p70 S6 kinase and phosphorylation of the 4E-BP1 repressor of mRNA translation by type I interferons [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (30): 27772-27780.
- [4] Shima H, Pende M, Chen Y, et al. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase [J]. *EMBO J*, 1998, 17 (22): 6649-6659.
- [5] Ali SM, Sabatini DM. Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 19445-19448.
- [6] Laser M, Kasi VS, Hamawaki M, et al. Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(38): 24610-24619.
- [7] Kim D, Akcakanat A, Singh G, et al. Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms [J]. *Growth Factors*, 2009, 27(1): 12-21.
- [8] Rosner M, Hengstschlager M. Nucleocytoplasmic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR [J]. *Oncogene*, 2011, 30(44): 4509-4522.
- [9] Jia CH, Li M, Liu J, et al. IKK-beta mediates hydrogen peroxide induced cell death through p85 S6K1 [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(2): 248-258.
- [10] Xu Y, Lai E, Liu J, et al. IKK interacts with rictor and regulates mTORC2 [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(11): 2239-2245.
- [11] Zhao L, Wen ZH, Jia CH, et al. Metformin induces G₁ cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2011, 294(8): 1337-1343.
- [12] Zhang Y, Xu S, Lin J, et al. mTORC1 is a target of nordihydroguaiaretic acid to prevent breast tumor growth in vitro and in vivo [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(2): 379-388.
- [13] Li M, Zhao L, Liu J, et al. Multi-mechanisms are involved in reactive oxygen species regulation of mTORC1 signaling [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(10): 1469-1476.
- [14] Huck B, Duss S, Hausser A, et al. Elevated protein kinase D3 (PKD3) expression supports proliferation of triple-negative breast cancer cells and contributes to mTORC1-S6K1 pathway activation [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(6): 3138-3147.
- [15] Xin Y, Shen XD, Cheng L, et al. Perifosine inhibits S6K1-Gli1 signaling and enhances gemcitabine-induced anti-pancreatic cancer efficiency [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 73(4): 711-719.
- [16] Zhang T, Qu S, Shi Q, et al. Evodiamine induces apoptosis and enhances TRAIL-induced apoptosis in human bladder cancer cells through mTOR/S6K1-mediated downregulation of Mcl-1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 3154-3171.
- [17] Huo HZ, Zhou ZY, Wang B, et al. Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443 (2): 406-412.
- [18] Wang Y, Zhou D, Chen S. SGK3 is an androgen-inducible kinase promoting prostate cancer cell proliferation through activation of p70 S6 kinase and up-regulation of cyclin D1 [J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(6): 935-948.
- [19] Liu J, Li M, Song B, et al. Metformin inhibits renal cell carcinoma in vitro and in vivo xenograft [J]. *Urol Oncol*, 2013, 31(2): 264-270.
- [20] Grove JR, Banerjee P, Balasubramanyam A, et al. Cloning and expression of two human p70 S6 kinase polypeptides differing only at their amino termini [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(11): 5541-5550.

[收稿日期] 2014 - 02 - 01

[修回日期] 2014 - 06 - 07

[本文编辑] 黄静怡