

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.33.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 33-0029-06

miRNA-375 靶向磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 对宫颈癌细胞增殖和迁移的影响 *

秦海霞¹, 李少平¹, 张全华¹, 王世进¹, 吴向晖²

[1. 新乡医学院第一附属医院 妇科, 河南 卫辉 453100; 2. 河南科技大学临床医学院
(河南科技大学第一附属医院) 妇科, 河南 洛阳 471003]

摘要: **目的** 探讨 miRNA-375 靶向磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α (PIK3CA) 对宫颈癌细胞增殖和迁移的影响。**方法** 选取宫颈癌细胞系 SiHa, 分别转染 miRNA-375 模拟基因、miRNA-375 抑制剂、对照模拟基因及对照抑制剂, 采用 RT-PCR 法检测 miRNA-375 表达, Western blot 检测 PIK3CA 蛋白表达, MTT 法检测细胞增殖活性, 划痕实验检测细胞迁移能力。双荧光素酶报告基因实验验证 miRNA-375 与 PIK3CA 的靶向关系。**结果** 转染 miRNA-375 模拟基因后 miRNA-375 表达上调, PIK3CA 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 转染 miRNA-375 抑制剂后 miRNA-375 表达降低, PIK3CA 蛋白表达增强 ($P < 0.05$)。转染 miRNA-375 模拟基因后 SiHa 细胞增殖活性、迁移能力降低 ($P < 0.05$); 转染 miRNA-375 抑制剂后 SiHa 细胞增殖活性、迁移能力增强 ($P < 0.05$)。miRNA 靶基因预测软件检测结果显示, miRNA-375 能作用于 PIK3CA 3'-UTR。与转染对照模拟基因比较, 共转染 miRNA-375 模拟基因与 PIK3CA-WT 可使 SiHa 荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$)。**结论** miRNA-375 可抑制宫颈癌细胞增殖及迁移, 其机制可能与靶向调控 PIK3CA 有关。

关键词: 宫颈癌; miRNA-375; 磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α ; 增殖; 迁移

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

miRNA-375 regulates proliferation and migration of cervical cancer cells by targeting PIK3CA*

Hai-xia Qin¹, Shao-ping Li¹, Quan-hua Zhang¹, Shi-jin Wang¹, Xiang-hui Wu²

(1. Department of Gynecology, Henan key Laboratory of neural rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China; 2. Department of Gynecology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of miRNA-375 on regulating proliferation and migration of cervical cancer cells and potential mechanisms. **Methods** Cervical cancer cells line SiHa was transfected with miRNA-375 mimics, miRNA-375 inhibitors, mimics control, and vehicle control. Expressin of miRNA-375 and PIK3CA were detected by RT-PCR or Western blot. Cell proliferation and migration activity were detected by MTT and scratch test, respectively. Relationship between miRNA-375 and PIK3CA was identified by dual-luciferase report gene experiment. **Results** After transfected miRNA-375 mimics, expression level of miRNA-375 in SiHa cells was increased while PIK3CA decreased significantly ($P < 0.05$), all of which were abolished by treatment of miRNA-375 inhibitors ($P < 0.05$). miRNA-375 mimics transfection induced significant decrease of cellular proliferation and migration ability of SiHa ($P < 0.05$), which was reversed by miRNA-375 inhibitors ($P < 0.05$). The miRNA target

收稿日期: 2018-04-22

* 基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (No: 201602157)

genes prediction software test results showed that miRNA-375 might bind with PIK3CA 3'UTR, which was confirmed by the fact that co-transfection miRNA-375 mimics and PIK3CA-wt induced decreased of luciferase activity of SiHa ($P < 0.05$). **Conclusions** miRNA-375 regulates proliferation and migration of cervical cancer cells by targeting PIK3CA.

Keyword: miRNA-375; PIK3CA; Cervical cancer; Invasion

尽管根治性手术联合同步放化疗治疗早期宫颈癌(ⅡA期及以下)的治愈率达80%~95%,但中晚期及复发转移宫颈癌的局部控制率和总生存期仍不尽如人意^[1]。因此,探寻更安全、有效的宫颈癌治疗方案具有十分重要的临床意义。微小RNA(microRNA, miRNA)作为内源性非编码小分子RNA,可通过与下游一个或多个靶基因的3'-非翻译区(untranslated region, UTR)相结合,在转录水平调控基因表达,从而参与细胞分化、增殖及凋亡等病理生理过程^[2]。miRNAs参与调控恶性肿瘤发生与发展的观点得到普遍认同,其已成为肿瘤生物靶向治疗的重要靶点^[3]。miRNA-375是新发现的miRNA成员。研究证实,miRNA-375在宫颈癌发生、发展过程中发挥类似抑癌基因的作用,但其分子机制尚未完全明确^[4]。磷脂酰肌醇激酶3催化亚单位 α (PIK3CA)是公认的促癌基因,其基因突变所致的过表达可导致磷脂酰肌醇3-羟激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的催化活性增强,从而诱导细胞癌变。既往研究证实,PIK3CA在宫颈癌组织中高表达,提示PIK3CA参与宫颈癌发生、发展,而调控PIK3CA表达可能是宫颈癌靶向治疗的新思路^[5]。本研究前期采用miRNA靶基因预测发现,miRNA-375与PIK3CA存在靶向关系,miRNA-375是否可通过靶向PIK3CA调控宫颈癌细胞生物学行为尚未可知。本研究旨在探讨miRNA-375靶向PIK3CA对宫颈癌细胞增殖及迁移的影响,以期为宫颈癌的临床诊疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系SiHa购于美国ATCC,DMEM培养基、PBS、胰蛋白酶、胎牛血清购于美国Hyclone公司,MTT购自美国Sigma公司,Lipofectamine™2000脂质体转染试剂购自美国Invitrogen公司,PIK3CA单克隆抗体购自大连TaKaRa公司,双荧光素酶试剂盒购自美国Promega公司,miRNA-375模拟基因、miRNA-375抑制剂、对照模拟基因、对照抑制剂购于美国Ambion公司。

1.2 细胞分组

常规复苏SiHa细胞,用含有1%双抗+10%胎牛血清的DMEM培养液培养细胞,37℃、5%二氧化碳CO₂恒温培养。收集对数生长期的SiHa细胞并接种于6孔培养板中,2×10⁵个/孔,后细胞继续置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养24h,细胞随机分为4组,每组3孔,即对照模拟基因组、对照抑制剂组、miRNA-375模拟基因组、miRNA-375抑制剂组,各组分别转染对照模拟基因、对照抑制剂、miRNA-375模拟基因、miRNA-375抑制剂,细胞继续置于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养24h,转染结束后进行后续实验。

1.3 逆转录聚合酶链反应检测 miRNA-375 表达

收集各组细胞,采用RT-PCR法检测miRNA-375表达。依据Trizol试剂盒说明书提取细胞总RNA,逆转录总RNA至cDNA,后行RT-PCR(SYBR Green法),以U6为内参。miRNA-375逆转录引物序列:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTG GATACGAC-3';miRNA-375正向5'-TTTGTTCGTTCCGCTCGC-3',反向5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6正向5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.4 Western blot 检测 PIK3CA 蛋白表达

收集转染细胞,提取细胞蛋白,测定样品蛋白浓度,取适量样品行SDS-PAGE凝胶电泳,转至硝酸纤维素膜,将膜置于5%封闭液4℃封闭4h,后依次加入PIK3CA单克隆抗体(1:2000)、二抗(1:500)孵育,按ECL试剂盒说明书操作行电化学发光检测,增强化学发光显色系统显色。利用Gene Tools软件分析蛋白条带的灰度值,以 β -actin作为内参照,以蛋白灰度值/ β -actin的灰度值的比值表示PIK3CA蛋白的相对表达量来进行量化。

1.5 MTT 检测细胞增殖活性

收集转染细胞,将细胞置于37℃、5%CO₂恒温培养,分别于培养24、36及72h时,离心弃上清液每孔加入MTT溶液(5mg/ml)20 μ l,继续37℃、5%

CO₂ 恒温培养 4 h, 离心弃上清液, 加入 DMSO (100 μ l/每孔), 振荡至结晶物充分溶解, 采用全自动酶标仪测 450 nm 处光密度值 (OD 值)。

1.6 划痕实验检测细胞迁移能力

收集各转染细胞, 将细胞置于恒温培养箱 (37℃、5% CO₂) 中继续培养, 待细胞融合率达到 90% 左右时, 用 200 μ l 枪头垂直于 6 孔板底部做横线划痕, 之后细胞继续置于恒温培养箱 (37℃、5% CO₂) 中培养, 培养后 24 h, 于倒置光学显微镜下拍照 ($\times 100$) 观察, 利用 Image J 软件测量划痕区域宽度, 并计算细胞划痕愈合率。

1.7 双荧光素酶报告基因实验

运用生物学信息软件预测 miRNA375 的靶基因为 PIK3CA (<http://www.targetscan.org/>)。以人宫颈癌细胞基因组 DNA 为模板, 构建野生型 PIK3CA 3'-UTR (PIK3CA-WT) 质粒、突变型 PIK3CA 3'-UTR (PIK3CA-Mut)。收集对数生长期的 SiHa 细胞, 用 DMEM 培养液 (10% 胎牛血清 +1% 双抗) 将调节细胞密度至 2×10^5 个/孔, 将 PIK3CA-WT、PIK3CA-Mut 与 miRNA-375 模拟基因或对照模拟基因共转染至 SiHa, 将细胞 37℃、5% CO₂ 恒温培养 48 h; 测定细胞荧光素酶活性, 海肾质粒荧光值作为内参。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组测量数据间采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 验证 miRNA-375 对 PIK3CA 的靶向作用

生物信息学工具网站 <http://www.microRNA.org> 检测结果显示, miRNA-375 与 PIK3CA 3'-UTR 间存在结合位点 (见图 1A)。双荧光素酶报告基因检测结果显示, miRNA-375 模拟基因、PIK3CA-WT 共转染与对照模拟基因、PIK3CA-WT 共转染组比较, 差异有统计学意义 ($t = 2.985$, $P = 0.000$), miRNA-375 模拟基因与 PIK3CA-WT 共转染后细胞荧光活性低于对照模拟基因与 PIK3CA-WT 共转染组; miRNA-375 模拟基因、PIK3CA-Mut 共转染与对照模拟基因、PIK3CA-Mut 共转染组比较, 差异无统计学意义 ($t = 1.658$, $P = 0.256$), miRNA-375 模拟基因与 PIK3CA-Mut 共转

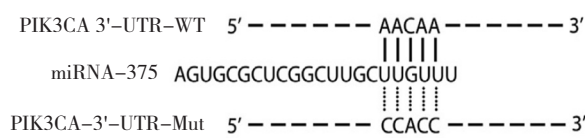
染后细胞荧光活性与对照模拟基因与 PIK3CA-Mut 共转染无差异 (见图 1B)。

2.2 转染 miRNA-375 模拟基因/miRNA-375 抑制剂对 miRNA-375 表达的影响

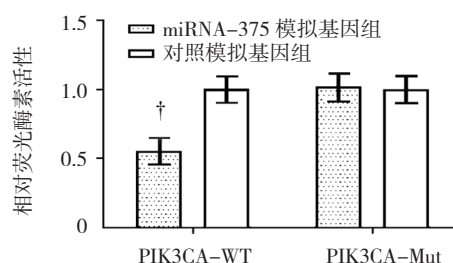
PCR 结果显示, 4 组间差异有统计学意义 ($F = 46.849$, $P = 0.000$)。其中, miRNA-375 模拟基因组和对照模拟基因组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染 miRNA-375 模拟基因后 SiHa 细胞 miRNA-375 表达高于对照模拟基因组; miRNA-375 抑制剂组和对照抑制剂组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染 miRNA-375 抑制剂后 SiHa 细胞 miRNA-375 表达低于对照抑制剂组。见图 2。

2.3 miRNA-375 对 PIK3CA 表达的影响

Western blot 结果显示, 4 组比较差异有统计学意义 ($F = 94.388$, $P = 0.000$)。其中, miRNA-375 模拟基因组和对照模拟基因组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染 miRNA-375 模拟基因后 SiHa 细胞 PIK3CA 表达高于对照模拟基因组; miRNA-375 抑制剂组和对照抑制剂组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染 miRNA-375 抑制剂后 SiHa 细胞 PIK3CA 表达低于对照抑制剂组。见图 2。



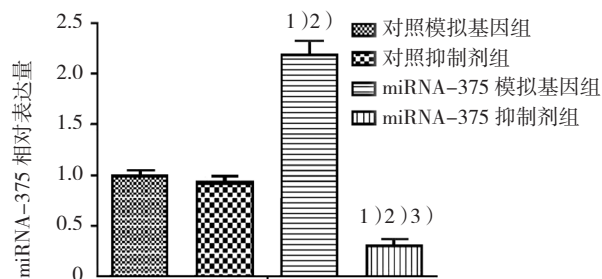
A miRNA 靶基因预测软件检测结果



B 双荧光素酶试验结果

† 与对照模拟基因组比较, $P < 0.05$

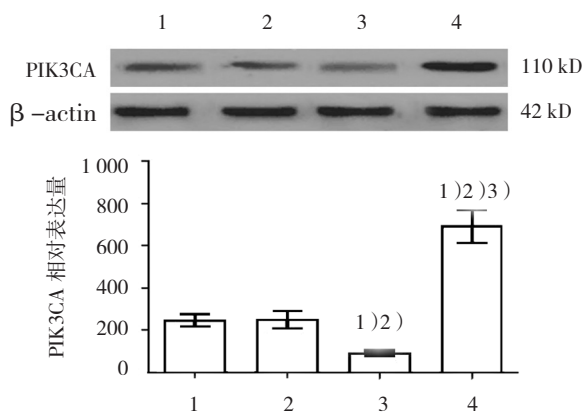
图 1 双荧光素酶报告基因实验



1) 与对照模拟基因组比较, $P < 0.05$; 2) 与对照抑制剂组比较, $P < 0.05$; 3) 与 miRNA-375 模拟基因组比较, $P < 0.05$

图 2 各组细胞 miRNA-375 相对表达量比较

0.05), 转染 miRNA-375 模拟基因后 PIK3CA 蛋白表达低于对照模拟基因组; miRNA-375 抑制剂组与对照抑制剂组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染 miRNA-375 抑制剂后 PIK3CA 蛋白表达高于对照抑制剂组。见图 3。



1: 对照模拟基因组; 2: 对照抑制剂组; 3: miRNA-375 模拟基因组; 4: miRNA-375 抑制剂组。1) 与对照模拟基因组比较, $P < 0.05$; 2) 与对照抑制剂组比较, $P < 0.05$; 3) 与 miRNA-375 模拟基因组比较, $P < 0.05$

图 3 miRNA-375 对 PIK3CA 表达的影响 (Western blot)

附表 4 组细胞的增殖活性 ($\bar{x} \pm s$)

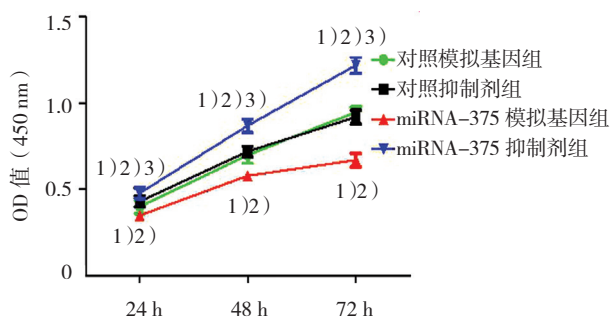
组别	24 h	48 h	72 h
对照模拟基因组	0.41 ± 0.06	0.65 ± 0.07	0.87 ± 0.05
对照抑制剂组	0.42 ± 0.04	0.66 ± 0.09	0.86 ± 0.07
miRNA-375 模拟基因组	0.33 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.65 ± 0.08
miRNA-375 抑制剂组	0.49 ± 0.09	0.83 ± 0.10	1.25 ± 0.12

2.4 miRNA-375 对 SiHa 细胞增殖的影响

分别于培养后 0、24、48 及 72 h 采用 MTT 法检测细胞增殖活性, 4 组具体 OD 值见附表。miRNA-375 模拟基因组与对照模拟基因组 24、48 及 72 h 的细胞增殖活性比较, 结果: ①不同时间点间的细胞增殖活性有差异 ($F = 38.685$, $P = 0.000$); ② miRNA-375 模拟基因组与对照模拟基因组的细胞增殖活性有差异 ($F = 72.356$, $P = 0.000$), miRNA-375 模拟基因组与对照模拟基因组比较, 细胞增殖活性比较低, 对细胞增殖活性影响较大。③ miRNA-375 模拟基因组与对照模拟基因组的细胞增殖活性变化趋势有差异 ($F = 9.865$, $P = 0.000$)。

miRNA-375 抑制剂组与对照抑制剂组 24、48 及 72 h 的细胞增殖活性比较, 结果: ①不同时间点

间的细胞增殖活性有差异 ($F = 32.105$, $P = 0.000$); ② miRNA-375 抑制剂组与对照抑制剂组的细胞增殖活性有差异 ($F = 91.283$, $P = 0.000$), miRNA-375 抑制剂组与对照抑制剂组比较, 细胞增殖活性比较高, 可增加细胞增殖活性。③ miRNA-375 抑制剂组与对照抑制剂组的细胞增殖活性变化趋势有差异 ($F = 12.359$, $P = 0.000$)。见图 4。

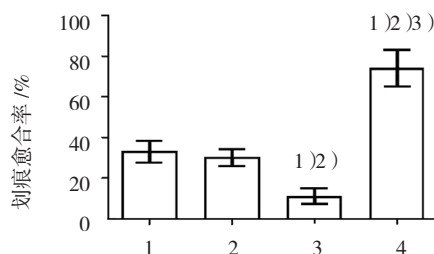
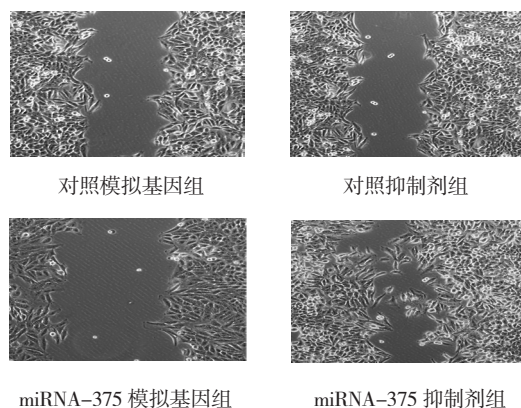


1) 与对照模拟基因组比较, $P < 0.05$; 2) 与对照抑制剂组比较, $P < 0.05$; 3) 与 miRNA-375 模拟基因组比较, $P < 0.05$

图 4 各组细胞增殖活性比较

2.5 miRNA-375 对 SiHa 细胞迁移的影响

划痕实验检测结果显示, 4 组比较差异有统计学意义 ($F = 41.459$, $P = 0.000$)。其中, miRNA-375 模拟基



1: 对照模拟基因组; 2: 对照抑制剂组; 3: miRNA-375 模拟基因组; 4: miRNA-375 抑制剂组。1) 与对照模拟基因组比较, $P < 0.05$; 2) 与对照抑制剂组比较, $P < 0.05$; 3) 与 miRNA-375 模拟基因组比较, $P < 0.05$

图 5 各组细胞迁移能力比较 ($\times 200$)

因组和对照模拟基因组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),转染 miRNA-375 模拟基因后 SiHa 细胞迁移能力低于对照模拟基因组;miRNA-375 抑制剂组 and 对照抑制剂组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),转染 miRNA-375 抑制剂后 SiHa 细胞迁移能力高于对照抑制剂组。见图 5。

3 讨论

miRNA 广泛参与基因转录水平调控,而其失衡表达所致的基因转录异常是介导肿瘤细胞增殖、迁移的重要因素,也是促使恶性恶性肿瘤发生发展的关键环节^[6]。随着分子生物学研究的不断深入,以 miRNA 靶向治疗为主的新型治疗方案为包括宫颈癌在内的恶性肿瘤临床治疗提供了新的思路^[7-8]。

miRNA-375 已被证实参与多种恶性肿瘤的发生与发展,并在其中发挥促癌或抑癌基因作用。SZCZYRBA 等^[9]研究表明,前列腺癌组织中 miRNA-375 表达高于正常前列腺组织 ($P < 0.05$),且 miRNA-375 表达高表达与患者临床病理特征存在相关性,提示 miRNA-375 可能在前列腺癌发生、发展过程中发挥促癌作用。XU 等^[10]研究发现,胃癌组织中 miRNA-375 表达低于正常胃组织 ($P < 0.05$),而过表达 miRNA-375 可有效抑制胃癌细胞侵袭和迁移,其机制与靶向 Janus 激酶 2 (JAK2) 有关,提示 miRNA-375 可通过靶向调控下游靶基因抑制胃癌进展。MAO 等^[11]研究显示,与正常组织相比较,结直肠癌组织中 miRNA-375 呈现低表达 ($P < 0.05$),转染 miRNA-375 模拟基因可使直肠癌细胞中 miRNA-375 过表达,并可通过靶向调控 KLF4 抑制结直肠癌细胞增殖,提示 miRNA-375 可能在结直肠癌中发挥抑癌作用。而本研究结果显示,转染 miRNA-375 模拟基因可使宫颈癌细胞 SiHa 中 miRNA-375 表达增加,同时使细胞增殖及迁移能力降低,反之亦然,提示 miRNA-375 在宫颈癌中发挥着抑癌作用,与 YU 等^[12]研究结论一致。

PIK3CA 定位于 3 号染色体长臂 (3q26.3),大小为 34 kb,包括 20 个外显子,其可通过编码 PI3K 的 p110 催化亚单位,促使 AKT 磷酸化,介导细胞内信号转导,破坏正常细胞分化、增殖及凋亡等过程,从而促使正常细胞癌变^[13-14]。BERTELSEN 等^[15]通过检测宫颈癌组织中磷酸化 AKT 和 PIK3CA 表达发现,磷酸化 AKT 阳性表达与 PIK3CA 复制数增加呈正相关,提示 PIK3CA 可能通过促进 AKT 磷酸化,激活 PI3K/

AKT 信号转导通路而促进宫颈癌发生与发展。上述研究提示,PIK3CA 可能是宫颈癌基因治疗中的一个重要靶点。本研究结果显示,转染 miRNA-375 模拟基因可使 SiHa 细胞中 PIK3CA 表达得到抑制,而转染 miRNA-375 抑制剂则可使 PIK3CA 表达提高。故推测,在宫颈癌中 miRNA-375 对 PIK3CA 具有负向调控作用。进一步利用基因软件预测和双荧光素酶报告基因实验证实,miRNA-375 可通过作用于 PIK3CA 3'-UTR,实现对 PIK3CA 的靶向作用。此外,本研究还观察到,转染 miRNA-375 模拟基因可抑制 PIK3CA 表达,且随着 PIK3CA 表达的降低与 SiHa 细胞增殖及迁移能力降低,提示过表达 miRNA-375 可通过靶向抑制 PIK3CA 抑制宫颈癌细胞增殖及迁移,反之亦然。故推测,miRNA-375 靶向调控其下游靶基因 PIK3CA 是其参与宫颈癌增殖及迁移的重要作用机制。

综上所述,miRNA-375 可抑制宫颈癌细胞增殖及迁移,其机制可能与靶向调控 PIK3CA 有关。

参考文献:

- [1] RONCO G, DILLNER J, ELFSTROM K M, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials[J]. The Lancet, 2014, 383(9916): 524-532.
- [2] ALLEGRA A, ALONCI A, CAMPO S, et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review)[J]. International Journal of Oncology, 2012, 41(6): 1897-1912.
- [3] SHARMA G, DUA P, AGARWAL S M. A Comprehensive review of dysregulated miRNAs involved in cervical cancer[J]. Current Genomics, 2014, 15(4): 310-323.
- [4] WANG F, LI Y, ZHOU J, et al. miRNA-375 Is Down-regulated in squamous cervical cancer and inhibits cell migration and invasion via targeting transcription factor SP1[J]. American Journal of Pathology, 2011, 179(5): 2580-2588.
- [5] MCINTYRE J B, WU J S, CRAIGHEAD P S, et al. PIK3CA mutational status and overall survival in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy[J]. Gynecologic Oncology, 2013, 128(3): 409-414.
- [6] FENG X, WANG Z, FILLMORE R, et al. MiRNA-200, a new star miRNA in human cancer[J]. Cancer Letters, 2014, 344(2): 166-173.
- [7] ERIKSEN A H M, ANDERSEN R F, PALLISGAARD N, et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for the relative quantification of microRNA in rectal cancer[J]. PLoS One, 2016, 11(3): 34-35.
- [8] ZHAO F L, DOU Y C, WANG X F, et al. Serum microRNA-195 is down-regulated in breast cancer: a potential marker for the diagnosis of breast cancer[J]. Molecular Biology Reports, 2014,

- 41(9): 5913-5922.
- [9] SZCZYRBA J, NOLTE E, WACH S, et al. Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma[J]. Molecular Cancer Research, 2011, 9(6): 791-800.
- [10] XU Y, JIN J, LIU Y, et al. Snail-regulated miRNA-375 inhibits migration and invasion of gastric cancer cells by targeting JAK2[J]. PLoS One, 2014, 9(7): 99516.
- [11] MAO Q, QUAN T, LUO B, et al. MiR-375 targets KLF4 and impacts the proliferation of colorectal carcinoma[J]. Tumor Biology, 2016, 37(1): 1-9.
- [12] YU X, ZHAO W, YANG X, et al. miR-375 Affects the proliferation, invasion, and apoptosis of HPV16-positive human cervical cancer cells by targeting IGF-1R[J]. International Journal of Gynecological Cancer, 2016, 26(5): 851-858.
- [13] ZARDAVAS D, PHILLIPS W A, LOI S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data[J]. Breast Cancer Research, 2014, 16(1): 1-10.
- [14] FOLTRAN L, DE M G, PELLA N, et al. Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer[J]. Future Oncology, 2015, 11(4): 629-640.
- [15] BERTELSEN B I, STEINE S J, SANDVEI R, et al. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation[J]. International Journal of Cancer, 2006, 118(8): 1877-1883.

(王荣兵 编辑)