

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.004

文章编号: 1005-8982(2019)11-0019-06

水通道蛋白3介导过氧化氢转运对宫颈癌 HeLa细胞增殖、迁移的作用研究*

袁芳¹, 史永华²

(1. 新疆医科大学基础医学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学基础医学院
病理教研室, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 探讨水通道蛋白3(AQP3)介导肿瘤微环境中过氧化氢(H₂O₂)转运对宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移的作用。**方法** 应用宫颈癌HeLa细胞,构建AQP3 shRNA慢病毒稳定转染宫颈癌细胞系,通过克隆形成、CCK-8、细胞平板克隆形成、Western blotting等比较H₂O₂处理前后细胞表型的差异。**结果** 成功构建AQP3-464-shRNA慢病毒稳定转染HeLa细胞系,AQP3 shRNA抑制肿瘤微环境中H₂O₂转运,抑制宫颈癌HeLa细胞增殖、迁移,AQP3 shRNA抑制肿瘤微环境中H₂O₂转运调控下游信号蛋白激酶B(PKB)。**结论** AQP3介导宫颈癌HeLa细胞中H₂O₂跨膜转运,激发细胞内依赖第二信使H₂O₂的下游信号PKB,促进HeLa细胞的增殖、迁移。

关键词: 宫颈肿瘤;过氧化氢;水通道蛋白3;细胞增殖;迁移

中图分类号: R737.33

文献标识码: A

Inhibitory effect of aquaporin-3 on proliferation and migration of cervical carcinoma HeLa cells*

Fang Yuan¹, Yong-hua Shi²

(1. Basic Medical College of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China;

2. Department of Pathology, Basic Medical College of Xinjiang Medical University,
Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To investigate the role of aquaporin 3 (AQP3) in proliferation and migration of cervical cancer HeLa cells. **Methods** Construction of AQP3 shRNA overexpression in cervical cancer HeLa lines via lentivirus. CCK-8, cell clone formation and Western blotting were performed for phenotype conformation. **Results** AQP3-464-shRNA overexpression in HeLa cell line via lentivirus was successfully constructed. AQP3 shRNA inhibited hydrogen peroxide transportation in tumor microenvironment. Inhibition of proliferation and migration of cervical cancer HeLa cells was achieved through AQP3 shRNA. Treatment of AQP3 shRNA inhibited AKT activation. **Conclusions** AQP3 promotes the proliferation and migration of HeLa cells through transportation of H₂O₂ and downstream AKT signaling pathway.

Keywords: cervical carcinoma; H₂O₂; AQP3; cell proliferation; migration

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一^[1]。宫颈癌患者一个重要的临床病理特点是常合并长期

慢性宫颈炎并伴随组织水肿。水肿是病变组织水代谢紊乱的外在表现,而其内在原因可能与水通道蛋

收稿日期: 2018-12-10

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81660427)

[通信作者] 史永华, E-mail: z5826711@126.com

白 (Aquaporins, AQP) 功能异常关系密切。AQP 是一组跨细胞质膜由渗透压驱动选择性转运水分子的小而完整的糖蛋白, 广泛存在于活细胞内, 主要参与各种涉及水代谢与转运的生理病理过程^[2]。研究表明, AQP 广泛参与恶性肿瘤的生长、转移等过程^[3-4]。

在慢性炎症向癌症的转化过程中, 缺氧、持续性炎症等应激性微环境引起组织水肿, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 尤其过氧化氢 H_2O_2 不断产生。新近研究报道, AQP 的某些亚型不仅能够跨膜转运水分子, 还可以转运 H_2O_2 ^[5]。目前有关应激性微环境中 H_2O_2 的异常与 AQP 在恶性肿瘤特别是宫颈癌发生、进展中的作用文献报道极少, 其具体的分子机制更是鲜有报道。本研究初步探讨 AQP3 和肿瘤微环境中 H_2O_2 的关系及其对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、迁移的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

HeLa 细胞 (本实验室保存), pLVshRNA-EGFP (2A) Puro-shRNA 干扰双标 RNAi 慢病毒载体 (VL3103, 北京 Inovogen 公司), 慢病毒包装系统 (12260, 12259, 美国 Addgene 公司), 质粒抽提试剂盒 (D6915, 美国 Omega Bio-Tek 公司), AQP3 一抗 (ab125219, 英国 Abcam 公司), ROS 检测试剂盒 (含绿色荧光探针 DCFH-DA 和高纯度 H_2O_2 , E004, 南京建成生物工程所), cDNA 逆转录试剂盒 (K1622, 美国 Fermentas 公司)。

1.2 细胞培养

宫颈癌 HeLa (人子宫颈腺癌细胞, HPV18 阳性) 培养于 DMEM 培养基, 添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青 / 链霉素 (10 万 u/L), 于 37℃、5% 二氧化碳 CO_2 培养箱培养。

1.3 AQP3 shRNA 稳定转染 HeLa 细胞系的构建

1.3.1 构建 pLVshRNA-EGFP(2A) Puro-shRNA-AQP3 重组质粒 根据 GenBank 中 AQP3 基因 mRNA 序列 (NM_004925), 设计 3 对 siRNA 片段: AQP3-homo-464 (正向 5'-GGGCGUUAUUAUGAUGCAATT-3', 反向 5'-UGCAUCAUAAUACAGCCCTT-3'), AQP3-homo-198 (正向 5'-CCCUCAUCCUGGUGAUGUUTT-3', 反向 5'-ACAUCACCAGGAUGAGGGTT-3'), AQP3-homo-612 (正向 5'-CCCUUAUCGUGUGUGUCUTT-3', 反向 5'-AGCACACACACGAUAAGGGTT-3')。用 Lipofectamine™ 2000 分别转染 3 组 siRNA 到 293T 细胞中, 培养 24 h

后做实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测筛选干扰效应明显的干扰片段。选择 pLV shRNA-EGFP(2A) Puro-shRNA 双标干扰载体, 设计 2 对 shRNA: shRNA-464 (正向 5'-GATCCGGCTGTATTATGATGCAATCAAGA GTTGCATCATAATACAGCCCTTTTTTG-3', 反向 5'-AATTCAAAAAAGGGCTGTATTATGATGCAACTCTTGATTG CATCATAATACAGCCCG-3') 和 shRNA-612 (正向 5'-GATCCCGCTTATCGTGTGTGTGCTTCAAGAGACACAC ACACGATAAGGGTTTTTTG-3', 反向 5'-AATTCAAAAA AACCTTATCGTGTGTGTGCTCTTGAAGCACACAC ACGATAAGGGG-3'), 退火片段与酶切后的载体进行连接并转化 JM109 感受态细胞, 挑单克隆摇菌及 PCR 鉴定菌液, 选取阳性菌液测序并经 BLAST 比对证实。

1.3.2 慢病毒包装及生物学滴度测定 接种 293T 细胞于 6 cm 培养皿中, 1×10^5 个 / ml。用脂质体转染法将慢病毒包装质粒和目的质粒转染到 293T 细胞中。收集转染 48 h 培养上清液, 离心、过滤, 进行滴度测定, 测定结果滴度较高, 可以进行转染。病毒置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。

1.3.3 慢病毒感染细胞及嘌呤霉素筛选稳转细胞系 接种 HeLa 细胞于 6 孔板, 5×10^5 个 / 孔, 按复感染指数 (multiplicity of infection, MOI) = 10 加入慢病毒。400 ng/ml 嘌呤霉素筛选稳转细胞株, Western blotting 检测。

1.4 H_2O_2 诱导前后宫颈癌 HeLa 细胞内 ROS 水平检测

取对数生长期的宫颈癌细胞, 胰酶消化, 以 5×10^5 个 / ml 接种于 6 孔板, 2 ml / 孔, 37℃、5% CO_2 培养箱中培养细胞至汇合 70.0%~80.0%, 100 μ mol/L H_2O_2 的完全培养基作用 6 h, 更换 10 μ mol/L DCFH-DA 37℃ 孵育 30 min, 消化、收集细胞, 激光共聚焦检测细胞内代表 ROS (主要为 H_2O_2) 水平的绿色荧光强度。

1.5 细胞增殖实验

CCK-8 法检测实验组 (HeLa-AQP3-464 shRNA) 和对照组 [HeLa、HeLa (-)] 宫颈癌 HeLa 细胞增殖情况。选择对数期细胞, 胰酶消化并计数, 应用 96 孔板, 2 000 个 / 孔、培养液 200 μ l / 孔, 每组设 5 个复孔, 24 h 后每孔分别加入 0、5、10、20 及 50 μ mol/L H_2O_2 , 继续培养 24 h 后加入 CCK-8 10 μ l / 孔, 加入无血清培养基 90 μ l / 孔, 37℃ 孵育 2.5 h, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (A) 值。

1.6 细胞损伤愈合实验

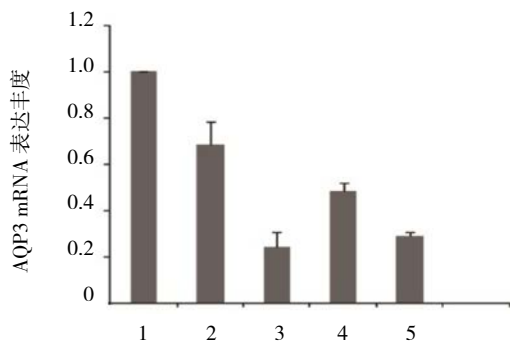
不同组细胞分别以 1×10^6 个/孔接种在 6 孔板中, 24 h 后细胞培养至单层汇合状态时用含 1% FBS 的 DMEM 培养液进行细胞同步化 24 h。用 $10 \mu\text{l}$ 无菌移液头尖端于培养板垂直方向轻轻划过细胞层, 形成宽度为 $300 \sim 500 \mu\text{m}$ 的无细胞划痕区。PBS 洗 3 次, 加入含 10% FBS 的完全培养基、 H_2O_2 $10 \mu\text{mol/L}$ 继续培养, 分别于 0 和 24 h 倒置显微镜下照相, 设 3 个重复。

1.7 Western blotting 检测

细胞接种于 6 孔板 24 h 后, 100 ng/ml 表皮生长因子 (EGF) 刺激 10 min 后用 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用实验组和对照组细胞各 20 min, 收集细胞沉淀, 加入细胞裂解液, $10\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 取上清液 $30 \mu\text{l}$, 加入 $4 \times$ loading buffer $10 \mu\text{l}$, 95°C 加热 10 min 使蛋白质变性, $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 1 min, 取上清液。利用 BCA 试剂盒测定样品蛋白含量。取测定样品, 每孔上样量为 $20 \mu\text{g}$, 8% SDS-PAGE 电泳分离: 浓缩胶电泳 80 V 30 min, 分离电泳 120 V 70 min, 然后电压 80 V 下转至 PVDF 膜。封闭液封闭 1 h, 加蛋白激酶 B (PKB)、磷酸化蛋白激酶 B (p-PKB) 一抗, 4°C 过夜, PBST 洗 3 次, 10 min/次; 加二抗, 室温孵育 1 h, PBST 洗 3 次, 10 min/次。用 ECL 底物完成化学发光检测, 显影、定影后采用扫描仪扫描, 数据传输到 Gel Proanalyzer 软件中完成灰度分析定量。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较行 Student's *t* 检验或单因素方差分析 (Dunnett's 多重比较检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



1: HeLa; 2: HeLa (-); 3: HeLa 464; 4: HeLa 198; 5: HeLa 612

A

2 结果

2.1 成功构建并鉴定重组质粒 pLV shRNA-EGFP (2A) Puro-shRNA-AQP3 稳定转染 HeLa 细胞系

设计的 3 对干扰片段经 qRT-PCR 检测筛选出 AQP3 mRNA 表达相对较低的片段 464 和 612 (见图 1A); 选择 pLVshRNA-EGFP (2A) Puro-shRNA 双标干扰载体, 设计 AQP3-464-shRNA 和 AQP3-612-shRNA, 连接转化后, 细菌的阳性克隆经扩大培养, 抽提质粒, 酶切鉴定, 证实构建的干扰质粒 AQP3-464-shRNA 和 AQP3-612-shRNA 正确 (见图 1B), 并经测序比对证实。选择干扰质粒 AQP3-464-shRNA 病毒液稳定转染 HeLa 细胞, 经 Western blotting 分析验证, HeLa、HeLa (-)、HeLa-AQP3-464 shRNA 细胞中 AQP3/GAPDH 的相对表达分别为 (1.00 ± 0.02) 、 (1.04 ± 0.04) 和 (0.63 ± 0.08) , 重组质粒稳定转染 HeLa 细胞后在蛋白水平抑制 AQP3 的表达 (见图 2A、B)。

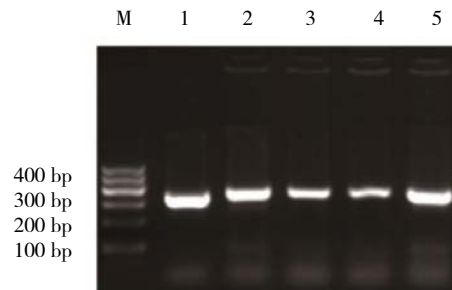
2.2 AQP3 shRNA 抑制 HeLa 细胞中 H_2O_2 的跨膜转运

激光共聚焦结果显示, 与 HeLa、HeLa (-) 比较, HeLa-AQP3-464-shRNA 细胞内代表 ROS (主要为 H_2O_2) 水平的绿色荧光变弱, AQP3 shRNA 抑制 H_2O_2 的跨膜转运。见图 3。

2.3 AQP3 shRNA 介导肿瘤微环境中 H_2O_2 转运抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖

结果表明, 低浓度 H_2O_2 ($10 \mu\text{mol/L}$) 促进 HeLa 细胞增殖, AQP3 shRNA 抑制肿瘤微环境中 H_2O_2 转运从而抑制 HeLa 细胞增殖, $20 \mu\text{mol/L}$ 以上高浓度 H_2O_2 则显示出细胞毒性, 诱导细胞凋亡。见图 4A。

细胞平板克隆实验显示, 低浓度 H_2O_2 (5 或

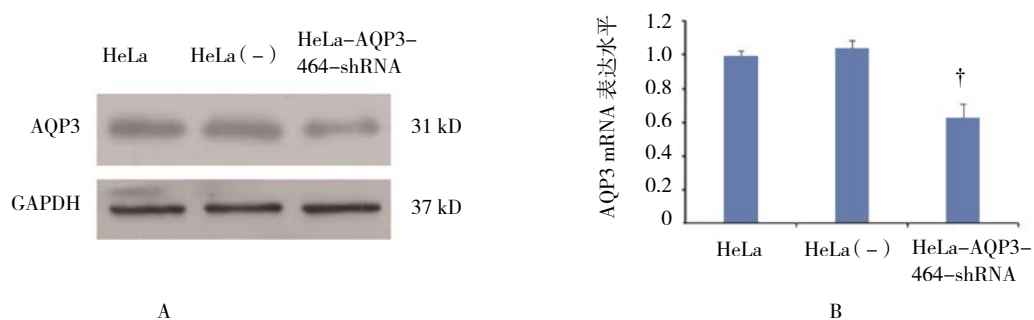


M: PCR 标尺; 1: 空质粒 PCR 扩增产物; 2、3: pLVshRNA-EGFP (2A) Puro-shRNA-AQP3-464 质粒 PCR 扩增产物; 4、5: pLV shRNA-EGFP (2A) Puro-shRNA-AQP3-612 质粒 PCR 扩增产物

B

A: 3 对干扰片段 qRT-PCR 检测结果; B: 空质粒 PCR 扩增产物

图 1 重组质粒 pLV shRNA-EGFP (2A) Puro-shRNA-AQP3 的构建



A: AQP3-464 shRNA 病毒液稳定转染 HeLa 细胞经 Western blotting 验证; B: Western blotting 检测的灰度扫描结果。† 与 HeLa、HeLa (-) 比较, $P < 0.05$

图 2 重组质粒 pLV shRNA-EGFP (2A) Puro-shRNA-AQP3 的鉴定

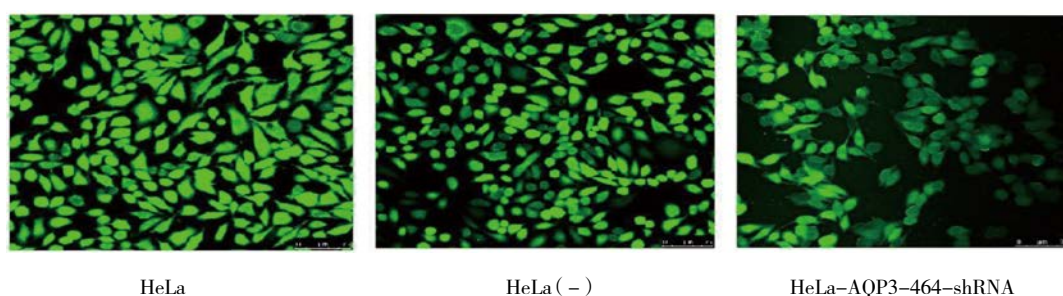


图 3 H_2O_2 处理后不同组别 HeLa 细胞内的 H_2O_2 变化 (激光共聚焦 $\times 200$)

10 $\mu\text{mol/L}$) 分别加入不同组细胞培养 10 d, 至出现肉眼可见的克隆时终止培养。与 HeLa、HeLa (-) 比较, HeLa-AQP3-464-shRNA 组细胞克隆形成减少 (见图 4B), 该实验进一步证实 CCK-8 结果。

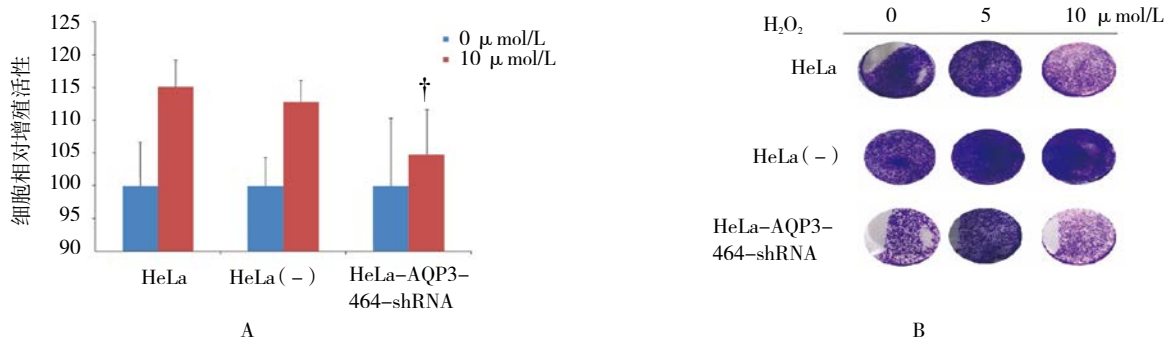
2.4 AQP3 shRNA 介导肿瘤微环境中 H_2O_2 转运抑制宫颈癌 HeLa 细胞迁移

10 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于 HeLa、HeLa (-)、HeLa-AQP3-464-shRNA 细胞 24 h 后, 其平均愈合速度分别为 (296.91 \pm 88.86)、(309.02 \pm 11.25) 和 (223.46 \pm 12.94) μm 。HeLa-AQP3-464-shRNA 与 HeLa、HeLa (-) 比较, 差异有统计学意义 ($F = 86.300, P = 0.000$)。

见图 5、6。

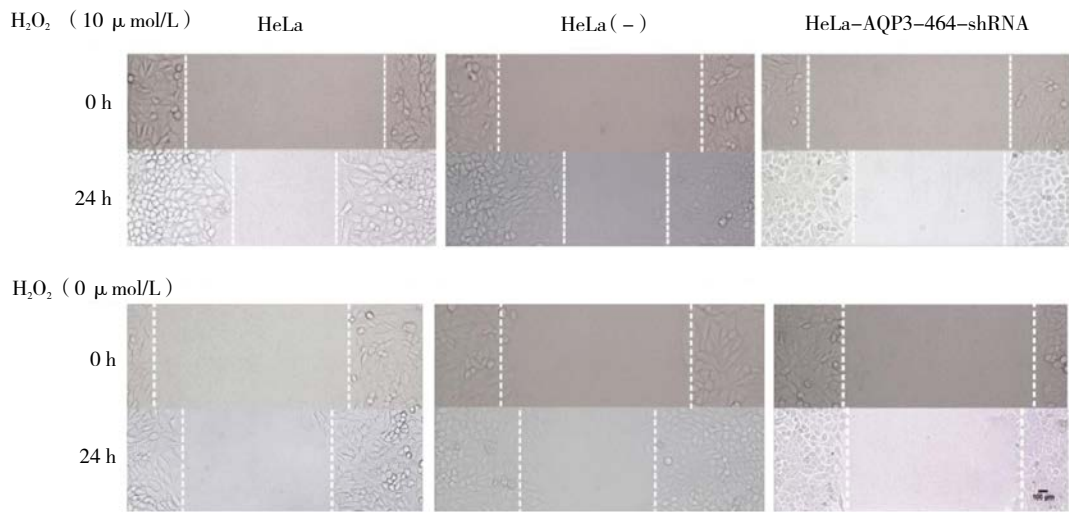
2.5 AQP3 shRNA 介导肿瘤微环境中 H_2O_2 转运抑制下游信号 PKB 的激活

在 H_2O_2 分别为 0 和 200 μmol 时, HeLa 组 p-PKB 的相对表达为 (0.20 \pm 0.087)、(0.58 \pm 0.041), HeLa (-) 组 p-PKB 的相对表达为 (0.390 \pm 0.055)、(0.430 \pm 0.068), HeLa-AQP3-shRNA 组 p-PKB 的相对表达为 (0.480 \pm 0.067)、(0.790 \pm 0.043)。在 200 μmol H_2O_2 作用后各组内的 p-PKB 变化均差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 HeLa-AQP3-shRNA 组与 HeLa 组比较, p-PKB 变化幅度小 ($F = 634.900, P = 0.000$)。见图 7、8。



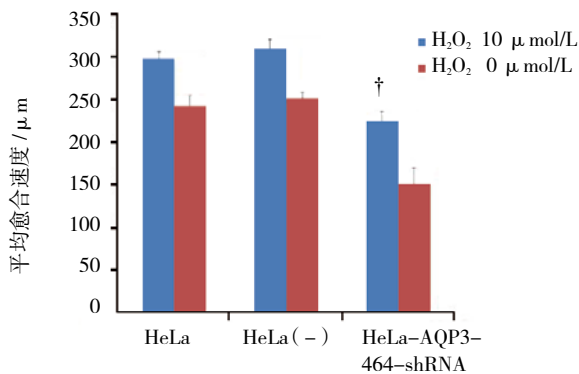
A: CCK-8 实验, † 与 10 $\mu\text{mol/L}$ $H_2O_2, P < 0.05$; B: 细胞平板克隆实验

图 4 AQP3-shRNA 介导 H_2O_2 转运抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖



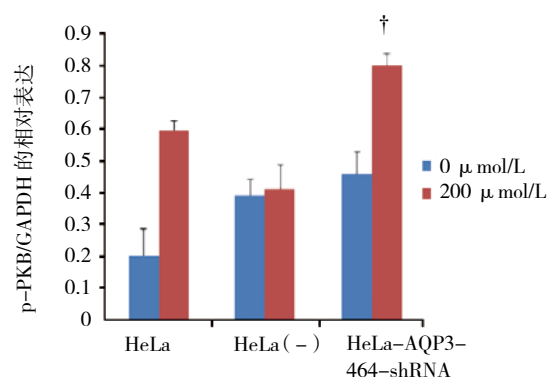
3 组细胞不同时间点的无细胞区宽度 (×100)

图 5 10 μmol/L H₂O₂ 处理后不同组别 HeLa 细胞的迁移



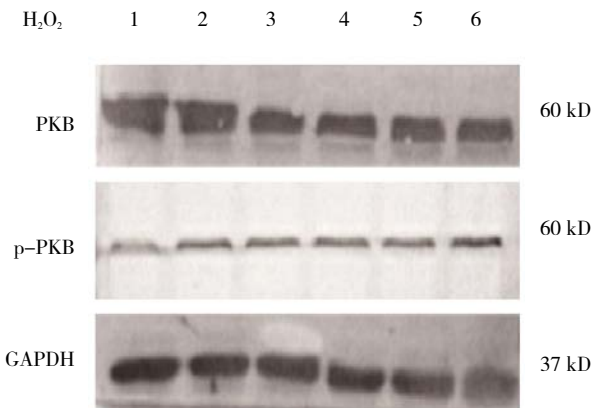
† 与 HeLa 和 HeLa (-) 组相应浓度比较, $P < 0.05$

图 6 10 μmol/L H₂O₂ 处理后不同组别 HeLa 细胞的平均愈合速度 ($\bar{x} \pm s$)



† 与 HeLa 组相应浓度比较, $P < 0.05$

图 8 AQP3 介导 H₂O₂ 转运抑制 PKB 激活的灰度扫描量化结果 ($\bar{x} \pm s$)



1: 0 μmol/L HeLa; 2: 200 μmol/L HeLa; 3: 0 μmol/L HeLa(-); 4: 200 μmol/L HeLa(-); 5: 0 μmol/L HeLa-AQP3-464-shRNA; 6: 200 μmol/L HeLa-AQP3-464-shRNA

图 7 AQP3 介导 H₂O₂ 转运抑制 PKB 的激活

3 讨论

本研究成功构建慢病毒介导的 AQP3 shRNA 稳转 HeLa 细胞株, 并经测序比对证实, 重组质粒稳定转染 HeLa 细胞后在蛋白水平抑制 AQP3 的表达。还发现, 抑制 HeLa 细胞中 AQP3 的表达可减少细胞内 ROS (主要为 H₂O₂) 水平, 提示 AQP3 可跨膜转运 H₂O₂。笔者进一步研究 AQP3 跨膜转运 H₂O₂ 对 HeLa 细胞相关表型如增殖、迁移的作用。CCK-8 和细胞平板克隆实验结果表明, 低浓度的 H₂O₂ 可促进 HeLa 细胞的增殖, 抑制 AQP3 的表达则抑制 HeLa 细胞增殖; 损伤愈合实验结果也提示, 低浓度的 H₂O₂ 可促进 HeLa 细胞的迁移, 抑制 AQP3 的表达则抑制 HeLa 细胞迁移。以上实验结果提示, AQP3 介导肿瘤微环境中 H₂O₂ 转运

促进宫颈癌 HeLa 细胞的迁移、增殖,抑制 AQP3 的表达则减弱肿瘤微环境中 H_2O_2 跨膜转运入细胞内,从而抑制宫颈癌 HeLa 细胞的迁移、增殖。目前认为 H_2O_2 不再是细胞代谢过程中的有毒副产品,而是信号转导过程中重要的第二信使,主要通过氧化关键含硫蛋白的敏感位点、调控相关信号从而参与多种生理病理过程^[6-7],而癌细胞中持续上调的 H_2O_2 依赖信号调控凋亡、增殖、血管生成、转移、能量代谢等与癌症发生、进展相关的诸多重要过程^[8-9]。文献报道,AQP3、AQP8 介导 H_2O_2 跨膜转运加速鼠 T 细胞的迁移,促进肿瘤细胞的能量合成代谢和细胞增殖^[10-11],抑制 AQP8 表达则可抑制 H_2O_2 跨膜转运及下游靶蛋白的酪氨酸磷酸化^[12]。但高浓度 H_2O_2 也可诱导细胞周期停滞或细胞凋亡^[6]。本研究结果与上述文献报道相符。由于 H_2O_2 的这种双重效应,肿瘤细胞上调抗氧化系统如超氧化物歧化酶等以降低细胞内 H_2O_2 浓度,形成适当的 H_2O_2 浓度梯度从而选择性、局灶性启动 H_2O_2 信号事件^[13]。临床上宫颈癌常合并长期慢性宫颈炎并伴随组织水肿。笔者推测,在慢性宫颈炎向宫颈癌的转化过程中,缺氧、持续性炎症等局部微环境引起组织水肿,水肿的长期存在加重缺氧,ROS 尤其 H_2O_2 不断产生,局部微环境代谢异常,触发 AQPs 将 H_2O_2 不断转运入细胞内,进一步加重缺氧,导致局部组织修复信号过多,诱使局部细胞过度增殖,甚至癌变。

文献报道,PKB 信号通路参与多种恶性肿瘤包括宫颈癌的发生、进展^[14-15]。本研究 Western blotting 实验结果表明,EGF 刺激 10 min 后用 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用于 HeLa 细胞 20 min,激发 PKB 磷酸化,抑制 AQP3 的表达则减弱 PKB 磷酸化。本研究结果提示 AQP3 能跨膜转运肿瘤微环境中的 H_2O_2 ,激发细胞内依赖第二信使 H_2O_2 的下游信号 PKB,从而促进 HeLa 细胞的增殖、迁移。有文献报道^[5],AQP3 介导 H_2O_2 吸收激活人结肠癌 HT29 细胞内信号 PKB,与笔者的结果相似。

综上所述,AQP3 介导宫颈癌 HeLa 细胞中 H_2O_2 跨膜转运,激发细胞内依赖第二信使 H_2O_2 的下游信号 PKB,促进宫颈癌 HeLa 细胞的增殖、迁移。本研究结果尚需在更多的肿瘤细胞系和癌组织中得到证实。

参 考 文 献:

[1] VINEIS P, WILD C P. Global cancer patterns: causes and prevention[J]. *Lancet*, 2014, 383(9916): 549-557.

- [2] TANI K, FUJIYOSHI Y. Water channel structures analysed by electron crystallography[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(5): 1605-1613.
- [3] CHEN R, SHI Y, AMIDUO R, et al. Expression and prognostic value of aquaporin 1, 3 in cervical carcinoma in women of Uygur ethnicity from Xinjiang, China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e98576.
- [4] ESTEVA-FONT C, JIN B J, VERKMAN A S. Aquaporin-1 gene deletion reduces breast tumor growth and lung metastasis in tumor-producing MMTV-PyVT mice[J]. *FASEB J*, 2014, 28(3): 1446-1453.
- [5] MILLER E W, DICKINSON B C, CHANG C J. Aquaporin 3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(36): 15681-15686.
- [6] LENNICKE C, RAHN J, LICHTENFELS R, et al. Hydrogen peroxide production, fate and role in redox signaling of tumor cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2015, 13: 39.
- [7] KWON J, LEE S R, YANG K S, et al. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(47): 16419-16424.
- [8] CASTALDO S A, FREITAS J R, CONCHINHA N V, et al. The tumorigenic roles of the cellular REDOX regulatory systems[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 8413032.
- [9] YU M O, PARK K J, PARK D H, et al. Reactive oxygen species production has a critical role in hypoxia-induced Stat3 activation and angiogenesis in human glioblastoma[J]. *J Neurooncol*, 2015, 125(1): 55-63.
- [10] HARA-CHIKUMA M, CHIKUMA S, SUGIYAMA Y, et al. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake[J]. *J Exp Med*, 2012, 209(10): 1743-1752.
- [11] VIECELI DALLA SEGA F, ZAMBONIN L, FIORENTINI D, et al. Specific aquaporins facilitate nox-produced hydrogen peroxide transport through plasma membrane in leukaemia cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(4): 806-814.
- [12] BERTOLOTI M, BESTETTI S, GARCÍA-MANTEIGA J M, et al. Tyrosine kinase signal modulation: a matter of H_2O_2 membrane permeability[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(13): 1447-1451.
- [13] UM H D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species[J]. *Oncotarget*, 2015, 7(5): 5193-5203.
- [14] CAI Q, LIN J, ZHANG L, et al. Chloroform fraction of serratalae chinensis S. Moore suppresses proliferation and induces apoptosis via the phosphatidylinositide 3-kinase/Akt pathway in human gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8871-8877.
- [15] LU R, YANG Z, XU G, et al. miR-338 modulates proliferation and autophagy by PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in cervical cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 633-644.

(王荣兵 编辑)