DOI:10.16016/j.1000-5404.201603118

Torin2 对人非小细胞肺癌 A549 细胞生长和迁移的影响

皮国成,肖 何,罗 佳,叶云飞,王 东,王 阁 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肿瘤中心)

[摘要] **目的** 观察 Torin2 对人非小细胞肺癌 A549 细胞生长和迁移的影响,初步探讨其作用机制。**方法** 实验分为空白对照组、阴性对照组和 Torin2 加药组,CCK-8 检测 Torin2 对各组 A549 细胞的增殖抑制率;流式细胞仪检测细胞的凋亡及周期;Transwell 检测细胞的迁移;Western blot 检测相关蛋白的表达。**结果** Torin2 对 A549 细胞的增殖具有显著抑制作用,且呈明显的剂量依赖性,IC_{50}为 214.96 nmol/L;流式细胞仪检测对照组、加药组 200 nmol/L 和 400 nmol/L 细胞凋亡率分别为(4.51±1.32)%、(9.56±2.34)%、(16.40±3.57)%;各加药组凋亡率明显高于对照组($P<0.05$),且加药组与对照组比较:G_1期细胞比例显著增多($P<0.05$),S 期显著减少($P<0.05$)。Transwell 实验结果显示加药组(200 nmol/L 和 400 nmol/L)的 A549 细胞迁移能力较对照组显著下降。Western blot 结果显示 A549 细胞经 Torin2 加药处理后,p-Akt^{473}、p-4EBP1、Cyclin D1 蛋白表达明显降低,Caspase 9 蛋白酶切片段表达显著增加。**结论** Torin2 可以抑制 A549 细胞增殖,引起细胞周期 G_1/S 期阻滞,抑制细胞迁移,促进细胞凋亡,其机制可能与 Torin2 抑制了 PI3K/Akt/mTOR 信号通路以及周期相关蛋白 Cyclin D1 的表达有关。

[关键词] Torin2;PI3K/Akt/mTOR 信号通路;人非小细胞肺癌;增殖;凋亡
[中图法分类号] R73-361; R734.2; R979.19 [文献标志码] A

Effects of Torin2 on cell proliferation and migration in human non-small lung cancer A549 cells

Pi Guocheng, Xiao He, Luo Jia, Ye Yunfei, Wang Dong, Wang Ge (Cancer Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of Torin2 on cell proliferation and migration in human non-small lung cancer A549 cells and investigate its underlying mechanism. **Methods** A549 cells were divided into blank control, negative control, and Torin2 treatment group. CCK8 assay was used to evaluate the cell proliferation. Cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry. Cell migration was examined by Transwell chamber assay. Western blotting was used to detect the expression of relevant proteins. **Results** Torin2 significantly inhibited the proliferation of A549 cells in a dose-dependent manner, and the IC_{50} was 214.96 nmol/L. Flow cytometry results showed that the apoptotic rates were (4.51±1.32)%, (9.56±2.34)%, and (16.40±3.57)%, respectively, in the control, and the 200 and 400 nmol/L Torin2 treatment cells, with the treatment groups significantly higher than the control ($P<0.05$). Compared with the control group, the percentage of the cells in G_1 phase was increased ($P<0.05$) and that in S phase was decreased significantly ($P<0.05$) in the Torin2 treatment cells. Transwell chamber assay showed that Torin2 treatment decreased the capacity of cell migration. Torin2 decreased the expression levels of Cyclin D1 and phosphorylated Akt^{473} and 4EBP1, up-regulated the expression of cleaved Caspase 9 in A549 cells. **Conclusion** Torin2 inhibits the proliferation of A549 cells, induces the cells arrested in G_1/S stage,

[通信作者] 王 阁,E-mail:wangge70@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160612.0901.004.html(2016-06-12)

enhances cell apoptosis and decreases the capacity of cell migration, which might be associated with its suppression on PI3K/Akt/mTOR signal pathway and expression of cell cycle-related protein Cyclin D1.

[**Key words**] Torin2; PI3K/Akt/mTOR signal pathway; human non-small cell lung cancer; proliferation; apoptosis

Corresponding author: Wang Ge, E-mail: wangge70@hotmail.com

肺癌是世界上最常见的一种恶性肿瘤,严重威胁着人类的生命和健康[1]。最新研究结果显示,我国肺癌的发生率和死亡率均居肿瘤首位[2]。近年来,随着生物技术的发展和相关研究的不断深入,分子靶向治疗作为一种新兴的肿瘤治疗方式已逐渐成为一个研究热点,为肺癌的治疗提供了一种有效的手段[3]。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)是 PI3K/Akt/mTOR 经典信号通路下游的一个重要激酶。它可通过形成 mTORC1/2 两种复合物(mTOR complex,mTORC)从而参与细胞生长、周期、凋亡等多种生物学活动的调节。在许多肿瘤中都存在 mTOR 信号通路的过度活化[4]。Torin2 作为一种新的二代 mTOR 抑制剂,对多种肿瘤细胞的生长和转移均有抑制作用,如甲状腺癌、肝癌、卵巢癌等[5-7],但关于 Torin2 对肺癌细胞生物学行为的影响尚不清楚。本研究旨在观察 Torin2 对人非小细胞肺癌 A549 细胞系生长和迁移的影响,并对其作用机制进行初步探讨,为 Torin2 用于治疗非小细胞肺癌提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人非小细胞肺癌 A549 细胞购自美国 ATCC 公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学公司;FITC Annexin Ⅴ凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司;细胞小室 24 孔 Millicell 购自 Millipore 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自上海碧云天公司;鼠抗人 β-actin、Cyclin D1、兔抗人 4EBP1、P-4EBP1、Akt、P-Akt^{473}、Cleaved Caspase 9 抗体均购自美国 Cell Signal Technology 公司;山羊抗鼠和山羊抗兔 IgG 购自中杉金桥公司;Torin2 购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 A549 细胞培养 A549 细胞接种于无菌培养皿中,加入适量 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清),在 37 ℃、5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中进行孵育培养。

1.2.2 CCK-8 检测 Torin2 对 A549 细胞增殖的影响 实验分空白对照组、阴性对照组和加药组,取对数生长期的 A549 细胞经胰酶消化后接种于 96 孔板中,每孔 100 μL(细胞数约 5 000 个/孔)。细胞贴壁后加药组采用倍比稀释法分别加入终浓度为 0、50、100、200、400、800 nmol/L 的 Torin2,每个浓度设 3 个复孔,每孔终体积为 200 μL。孵箱培养 48 h 后弃去 96 孔板的培养基,每孔加入 90 μL DMEM 高糖培养基和 10 μL CCK-8,再取 3 个没有接种细胞的孔加入相同量的培养基和 CCK-8 作为空白对照,放细胞培养箱孵育 2 h 后,用酶标仪于 450 nm 光波处测各孔光密度值 $D(450)$。以阴性对照组细胞存活率记 100%,按公式计算加药组细胞存活分数 = 实验组 $D(450)$ 值/对照组 $D(450)$ 值 ×100%。相同条件下实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测 Torin2 对 A549 细胞凋亡的影响 A549 细胞经胰酶消化后铺 6 孔板,每孔2 mL 培养基,细胞数约 1×10^6 个/孔。细胞贴壁后分别加入终浓度为 0、200、400 nmol/L 的 Torin2,细胞培养箱孵育 48 h 后收集细胞,依次加入 5 μL PE Annexin V 和 5 μL 7-AAD,轻轻混匀后室温避光孵育 15 min。1 h 后进行流式细胞仪检测。相同条件下实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测 Torin2 对 A549 细胞周期的影响 取对数生长期的 A549 细胞,经胰酶消化后铺 6 孔板,每孔体积 2 mL(细胞数约 2×10^6 个/孔),贴壁后分别加入终浓度为 0、200、400 nmol/L 的Torin2,处理 48 h 后经胰酶消化收集细胞,加入预冷的 75% 乙醇 4 ℃ 固定过夜,离心收集细胞,PBS 清洗,加 RNaseA(终浓度 1 μg/mL),37 ℃ 水浴消化 30 min。加 PI 至终浓度 50 μg/mL,冰浴避光染色 30 min。尼龙网过滤,流式细胞仪检测,488 nm 激发光激发检测。相同条件下实验重复 3 次。

1.2.5 Transwell 实验检测 Torin2 对 A549 细胞迁移的影响 A549 细胞经胰酶消化后铺 6 孔板,每孔 2 mL 培养基,细胞数约 1×10^6 个/孔。细胞贴壁后分别加入终浓度为 0、200、400 nmol/L 的 Torin2,细胞培养箱孵育 48 h 后收集细胞,各组细胞以 5×10^4/孔铺种于 Transwell 小室内,上层以 400 μL 无血清 DMEM 培养基孵育,下层加入 1 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基。继续培养 24 h 后取出 Transwell 小室,棉签刮除小室内面存留的细胞,用 4% 多聚甲醛固定,0.1% 结

晶紫染色。倒置显微镜下任选5个视野观察照相。相同条件下实验重复3次。

1.2.6 Western blot检测Torin2对相关蛋白表达的影响 分别收集终浓度为0、200、400 nmol/L的Torin2处理48 h的A549细胞,预冷的PBS清洗后加入RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂,冰浴20 min。离心,收集上清液,采用BCA法测定蛋白含量。各组取等量总蛋白加上样缓冲液,煮沸变性5 min,进行SDS-PAGE电泳。然后转移到硝酸纤维素膜上,10% 脱脂奶粉封闭1 h,将对应分子量条带剪下后分别用一抗β-actin、Cyclin D1、4EBP1、p-4EBP1、Akt、p-Akt^{473}、Cleaved Caspase 9在4 ℃孵育过夜后,加相应二抗孵育1 h,膜上滴加化学发光剂在暗室进行曝光显影。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用Origin 8.0软件作图,SPSS 18.0统计软件进行数据分析,组间比较采用两独立样本t检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Torin2抑制了A549细胞的增殖

Torin2(0、50、100、200、400、800 nmol/L)处理A549细胞48 h,CCK-8结果表明随着Torin2浓度增加,A549细胞的增殖活性呈现明显剂量依赖性降低(图1),采用Probit回归分析得药物半数抑制浓度IC_{50}=214.96 nmol/L。

2.2 Torin2促进了A549细胞的凋亡

A549细胞经Torin2处理后,对照组、200 nmol/L和400 nmol/L药物组的凋亡率分别为(4.51±1.32)%、(9.56±2.34)%和(16.40±3.57)%,药物作用组凋亡率均较对照组显著增高($P<0.05$,图2),提示Torin2可促进A549细胞的凋亡。

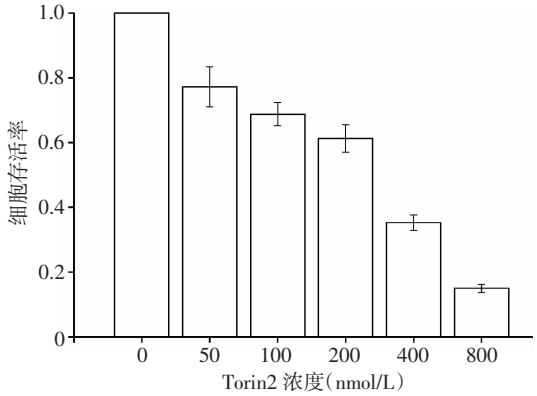


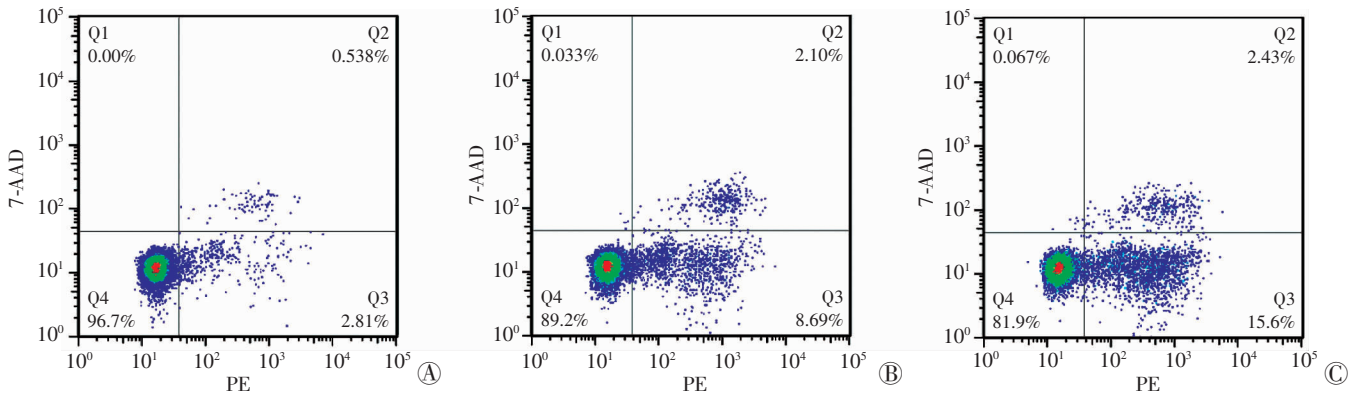
图1 不同浓度Torin2对A549细胞增殖的影响

2.3 Torin2可引起A549细胞周期G_1/S期阻滞

A549细胞经Torin2处理后,对照组、200 nmol/L和400 nmol/L药物组G_1期细胞比例分别为(58.15±1.71)%、(69.64±1.10)%和(69.27±0.70)%,S期细胞分别为(33.06±2.29)%、(20.79±1.88)%和(22.62±1.23)%,加药组与对照组细胞相比,细胞周期中G_1期细胞比例增高,S期细胞比例减少($P<0.05$,图3),表明Torin2可诱导A549细胞阻滞在G_1/S期。

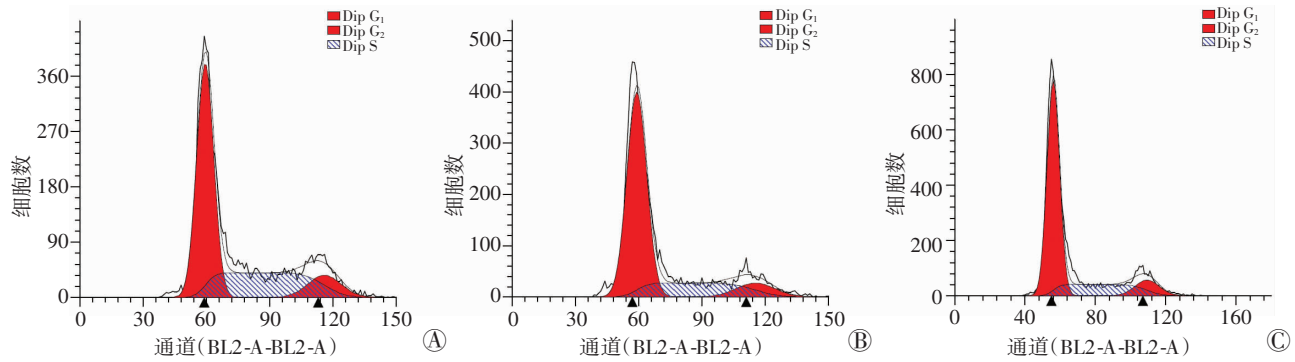
2.4 Torin2抑制了A549细胞的迁移

Transwell实验检测对照组和Torin2药物组(200 nmol/L和400 nmol/L)A549细胞的迁移能力,观察各组200倍视野下穿过的细胞个数。结果显示药物组(200 nmol/L和400 nmol/L)穿过的细胞数[分别为(107.2±18.9)、(13.4±3.0)]显著少于对照组[(190.2±14.2),$P<0.05$,图4],表明Torin2可显著抑制A549细胞的迁移能力。



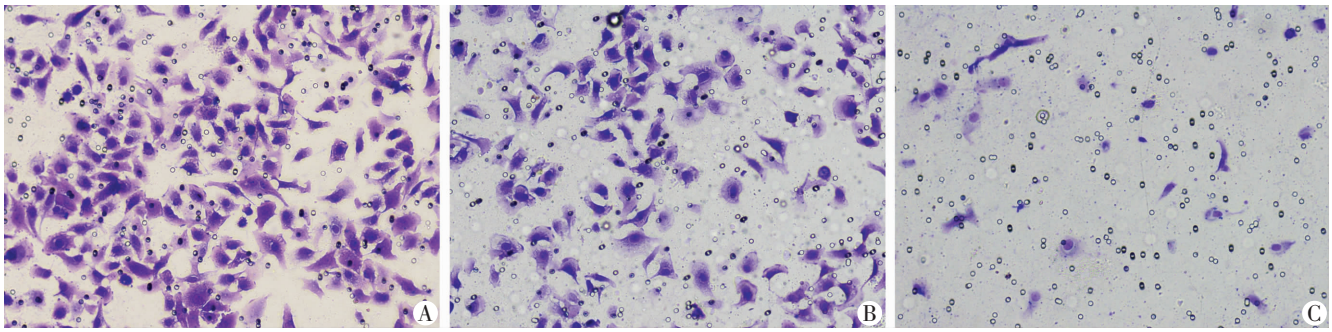
A:对照组;B:200 nmol/L药物组;C:400 nmol/L药物组

图2 流式细胞仪检测Toin2对A549细胞凋亡的影响



A:对照组;B:200 nmol/L 药物组;C:400 nmol/L 药物组

图 3 流式细胞仪检测 Toin2 对 A549 细胞周期的影响

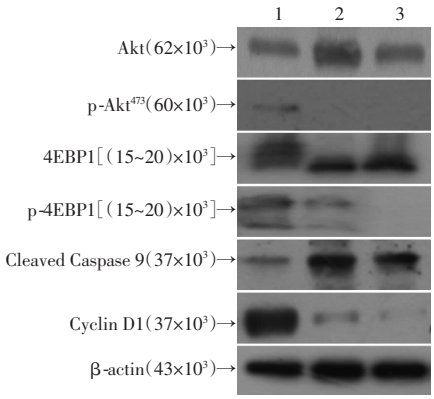


A:对照组;B:200 nmol/L 药物组;C:400 nmol/L 药物组

图 4 Transwell 实验检测 Toin2 对 A549 细胞迁移的影响 (结晶紫 ×200)

2.5 Torin2 影响了 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及相关蛋白的表达

与细胞凋亡和周期结果一致,A549 细胞经 Torin2 处理后,尽管总 Akt 和 4EBP1 的表达水平有升高,但 p-Akt^{473}、p-4EBP1 以及 Cyclin D1 蛋白表达明显降低,Cleaved Caspase 9 蛋白酶切片段表达显著增加(图 5)。由于 mTORC1 和 mTORC2 的直接作用底物分别为 p-4EBP1 和p-Akt^{473},此结果也说明了 Torin2 抑制了 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活性以及 Cyclin D1 周期蛋白的表达。



1:对照组;2:200 nmol/L 药物组;3:400 nmol/L 药物组

图 5 Western blot 检测 Torin2 对 A549 细胞相关蛋白表达的影响

3 讨论

PI3K/Akt/mTOR 信号通路是体内蛋白质合成的主要信号通路之一,广泛参与了多种生物学活性的调控,如细胞增殖、凋亡、转录、翻译、细胞周期、自噬等。PI3K/Akt/mTOR 通路异常活化是许多肿瘤重要的致瘤机制之一,包括乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌等[8-11]。因此,PI3K/Akt/mTOR 信号通路将有可能成为治疗肺癌的一个有效的靶点,其中 mTORC1 抑制剂依维莫司在肾透明细胞癌和神经内分泌肿瘤的临床治疗中已有应用[12-13]。

本实验发现 Torin2 对人非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖具有抑制作用,且有明显的剂量依赖效应。同时,Torin2 可促进 A549 细胞凋亡,使细胞周期阻滞在 G_1/S 期,并下调 p-Akt^{473}、p-4EBP1 和 Cyclin D1 周期蛋白表达,诱导凋亡蛋白 Cleaved Casepase 9 上调。持续高度活化的 mTORC1 可通过调控 4EBP1 的磷酸化,影响真核细胞翻译起始因子(elF4E)的活性,从而诱导抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达。该调控方式是 Akt/mTOR 通路过度活化的致瘤和维持肿瘤细胞生长的重要机制[14]。与该研究一致,Torin2 可诱导非小细胞肺

癌 A549 细胞凋亡并同时显著下调 P-4EBP1 水平,推测在 A549 细胞中 Torin2 通过诱导类似凋亡机制介导其抗增殖活性[15]。

另一方面,Akt 和 4EBP1 分别为 mTORC1 和 mTORC2 的直接作用底物,它们表达水平的下降间接说明了 Torin2 同时抑制了 mTORC1 和 mTORC2 这两种复合物的形成,而雷帕霉素等传统的 mTOR 抑制剂只能抑制 mTORC1 复合物,且可能会激活 mTOR/P70S6K/IRS-1 负反馈环,导致 Akt 活性增强,引起肿瘤细胞对 mTOR 抑制剂产生耐药[4]。因此,二代的 mTOR 抑制剂如 Torin2 等可能会有更好的抗肿瘤效果。

Akt 蛋白及其活性是介导肿瘤细胞增殖和存活的重要蛋白。我们在 Torin2 处理的 A549 细胞中发现 p-Akt^{473}蛋白表达水平较对照组显著降低,但总 Akt 蛋白表达却升高。事实上,抑制 Akt/mTOR 通路导致受其抑制的下游基因活化即负反馈机制的释放是肿瘤细胞对药物适应性生长的普遍现象,也是重要的耐药机制。在 HER2 扩增乳腺癌细胞系 BT474 和 PTEN 缺失的前列腺癌细胞系 LNCaP 中抑制 Akt 或 PI3KCβ 可诱导 HER3、IGF-1R、IRS1 等蛋白表达上调并再次活化 Akt[16-17]。另外,亦有上调 Akt 蛋白表达的报道[18]。卵巢癌细胞 OV2008 用雷帕霉素、Torin1 以及 PI3K/mTOR 抑制剂 BEZ235 处理后均可上调 AKT 蛋白表达,其中的机制尚待进一步探讨。本研究中 Akt 磷酸化水平持续被抑制,与 Torin2 促进凋亡一致,但 Torin2 抑制 mTOR 导致的负反馈释放机制尚需系统研究。

此外,PIK3CA 激酶区激活突变、肿瘤抑制基因 TSC2 截短突变以及 mTOR 自身激活突变等均可导致 mTOR 生长依赖性进而对 mTOR 抑制剂敏感[19-20]。在乳腺癌和黑色素瘤等其他靶向药物继发耐药的细胞模型中,对 mTOR 再次活化的抑制是重要的抗耐药机制[21-22]。但本研究只使用了一种细胞株,且没有将非小细胞肺癌特定基因或特定突变与 Torin2 敏感性进行相关研究,如 A549 细胞存在 RAS 激活突变,RAS 基因可以通过影响 PI3K、MAPK 和 STAT 这 3 条信号通路从而调控细胞的生长和增殖。另外,在 Torin2 诱导凋亡的具体机制中也没有深入探讨。尽管如此,本实验结果表明了 Torin2 对 A549 细胞增殖具有明显抑制作用,其机制可能与抑制了 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的活性以及 Cyclin D1 周期蛋白的表达密切相关,为以后开展 Torin2 的动物实验奠定了理论和实验基础,也为将来 Torin2 用于治疗非小细胞肺癌提供一定的科学依据。

参考文献:

[1] Takenaka T, Yamazaki K, Miura N, *et al*. The Prognostic Impact of Tumor Volume in Patients with Clinical Stage IA Non-small Cell Lung Cancer[J]. J Thorac Oncol, 2016, 11(7): 1074-1080. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.02.005

[2] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338

[3] Sheng M, Zhao Y, Wang F, *et al*. Targeted drugs for unselected patients with advanced non-small-cell lung cancer: a network meta-analysis[J]. J Thorac Dis, 2016, 8(1): 98-115. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.28

[4] Brotelle T, Bay J O. PI3K-AKT-mTOR pathway: Description, therapeutic development, resistance, predictive/prognostic biomarkers and therapeutic applications for cancer[J]. Bull Cancer, 2016, 103(1): 18-29. DOI: 10.1016/j.bulcan.2015.09.011

[5] Hussain A R, Al-Romaizan M, Ahmed M, *et al*. Dual Targeting of mTOR Activity with Torin2 Potentiates Anticancer Effects of Cisplatin in Epithelial Ovarian Cancer[J]. Mol Med, 2015, 21: 466-478. DOI: 10.2119/molmed.2014.00238

[6] Sadowski S M, Boufraqech M, Zhang L, *et al*. Torin2 targets dysregulated pathways in anaplastic thyroid cancer and inhibits tumor growth and metastasis[J]. Oncotarget, 2015, 6(20): 18038-18049. DOI: 10.18632/oncotarget.3833

[7] Wang C, Wang X, Su Z, *et al*. The novel mTOR inhibitor Torin-2 induces autophagy and downregulates the expression of UHRF1 to suppress hepatocarcinoma cell growth[J]. Oncol Rep, 2015, 34(4): 1708-1716. DOI: 10.3892/or.2015.4146

[8] Ye Y, Tang X, Sun Z, *et al*. Upregulated WDR26 serves as a scaffold to coordinate PI3K/AKT pathway-driven breast cancer cell growth, migration, and invasion[J]. Oncotarget, 2016, 7(14): 17854-17869. DOI: 10.18632/oncotarget.7439

[9] Cai J, Xu L, Tang H, *et al*. The role of the PTEN/PI3K/Akt pathway on prognosis in epithelial ovarian cancer: a meta-analysis[J]. Oncologist, 2014, 19(5): 528-535. DOI: 10.1634/theoncologist.2013-0333

[10] Chen J, O'Donoghue A, Deng Y F, *et al*. The effect of lycopene on the PI3K/Akt signalling pathway in prostate

cancer[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2014, 14(6): 800-805. DOI: 10.2174/1871520614666140521121317

[11] Khan K H, Yap T A, Yan L, *et al*. Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer[J]. Chin J Cancer, 2013, 32(5): 253-265. DOI: 10.5732/cjc.013.10057

[12] Rizzo M, Carteni G, Pappagallo G, *et al*. The ORCHIDEE study: gathering new evidence on the use of everolimus in clinical practice[J]. Tumori, 2014, 100(6): e290-e292. DOI: 10.1700/1778.19300

[13] Poh A. Expanding Therapy for Neuroendocrine Tumors[J]. Cancer Discov, 2016, 6(3): 221-222. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-NB2016-010

[14] Hsieh A C, Costa M, Zollo O, *et al*. Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control *via* 4EBP-eIF4E[J]. Cancer Cell, 2010, 17(3): 249-261. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.01.021

[15] Faber A C, Coffee E M, Costa C, *et al*. mTOR inhibition specifically sensitizes colorectal cancers with KRAS or BRAF mutations to BCL-2/BCL-XL inhibition by suppressing MCL-1[J]. Cancer Discov, 2014, 4(1): 42-52. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0315

[16] Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, *et al*. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity[J]. Cancer Cell, 2011, 19(1): 58-71. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.10.031

[17] Schwartz S, Wongvipat J, Trigwell C B, *et al*. Feedback suppression of PI3Kalpha signaling in PTEN-mutated tumors is relieved by selective inhibition of PI3Kbeta[J]. Cancer Cell, 2015, 27(1): 109-122. DOI: 10.1016/j.ccell.2014.11.008

[18] Muranen T, Selfors L M, Worster D T, *et al*. Inhibition of PI3K/mTOR leads to adaptive resistance in matrix-attached cancer cells[J]. Cancer Cell, 2012, 21(2): 227-239. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.12.024

[19] Wagle N, Grabiner B C, Van-Allen E M, *et al*. Activating mTOR mutations in a patient with an extraordinary response on a phase Ⅰ trial of everolimus and pazopanib[J]. Cancer Discov, 2014, 4(5): 546-553. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0353

[20] Wagle N, Grabiner B C, Van-Allen E M, *et al*. Response and acquired resistance to everolimus in anaplastic thyroid cancer[J]. N Engl J Med, 2014, 371(15): 1426-1433. DOI: 10.1056/NEJMoa1403352

[21] Elkabets M, Vora S, Juric D, *et al*. mTORC1 inhibition is required for sensitivity to PI3K p110alpha inhibitors in PIK3CA-mutant breast cancer[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(196): 196ra99. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005747

[22] Corcoran R B, Rothenberg S M, Hata A N, *et al*. TORC1 suppression predicts responsiveness to RAF and MEK inhibition in BRAF-mutant melanoma[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(196): 196ra98. DOI: 10.1126/scitranslmed.3005753

(**收稿**:2016-03-18;**修回**:2016-05-30)

(编辑 张 维)