

论著·实验研究

Pim1 在体外培养大脑皮层神经元氧糖剥夺/复氧损伤中的表达及作用

刘俊燕¹ 王克焯¹ 黄凌依² 万彬¹ 赵国英¹ 赵凤艳³

(1. 滨州医学院附属医院新生儿科, 山东 滨州 256600;

2. 四川大学口腔医学院, 四川 成都 610041;

3. 四川大学华西第二医院儿科 / 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨原代培养大脑皮层神经元缺氧缺血损伤后 Pim1 的表达及其对细胞凋亡的作用。

方法 取新生 1 日龄 C57BL/6 小鼠的大脑皮层神经元进行原代培养, 培养第 8 天更换无糖无血清 DMEM 培养基, 于 1% O₂ 条件下培养 3 h 后, 换为正常条件下培养, 即氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 处理, 以模拟体内神经元缺氧缺血状态。分别于 OGD/R 后 0、6、12、24 h 收集细胞, 同时设立神经元正常培养组。原代培养神经元中分别转染 Pim1 过表达质粒或空质粒, 然后分别进行正常培养或 OGD/R 处理, 分别命名为 Pim1 组、对照组、OGD/R 组和 OGD/R+Pim1 组; 采用 Real-time PCR 检测 Pim1 mRNA 的表达, 采用 Western blot 检测 Pim1 蛋白和凋亡相关蛋白活化的半胱氨酸蛋白酶 (CC3) 的表达。采用 TUNEL 法检测细胞凋亡。**结果** Real-time PCR 和 Western blot 结果显示, 与正常组相比, OGD/R 后神经元中 Pim1 mRNA 及其蛋白表达均显著降低, 且均从 OGD/R 后 0 h 开始下降, 12 h 最低, 24 h 回升但仍维持在较低水平 ($P < 0.05$)。Pim1 过表达转染使神经元中 Pim1 蛋白水平增加。Pim1+OGD/R 组 CC3 表达水平明显低于 OGD/R 组, Pim1+OGD/R 组细胞凋亡率也较 OGD/R 组显著减少 ($P < 0.01$)。**结论** 缺氧缺血损伤引起体外培养神经元中 Pim1 表达下降。过表达的 Pim1 可以抑制 OGD/R 诱导的神经元凋亡。

[中国当代儿科杂志, 2020, 22(5): 512-518]

[关键词] 脑损伤; 细胞凋亡; 缺氧缺血; Pim1; 神经元

Expression and role of Pim1 in cultured cortical neurons with oxygen-glucose deprivation/reoxygen injury

LIU Jun-Yan, WANG Ke-Xuan, HUANG Ling-Yi, WAN Bin, ZHAO Guo-Ying, ZHAO Feng-Yan. Department of Neonatology, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou, Shandong 256600, China (Zhao F-Y, Email: zhaofengyan621@163.com)

Abstract: Objective To study the expression and effect of Pim1 in primary cortical neurons after hypoxic-ischemic injury. **Methods** Cortical neurons were isolated from 1-day-old C57BL/6 mice and cultured in neurobasal medium. On the 8th day of neuron culture, cells were subjected to oxygen-glucose deprivation/reoxygen (OGD/R) treatment to mimic *in vivo* hypoxic injury of neurons. Briefly, medium were changed to DMEM medium, and cells were cultured in 1% O₂ for 3 hours and then changed back to normal medium and conditions. Cells were collected at 0 hour, 6 hours, 12 hours and 24 hours after OGD/R. Primary neurons were transfected with Pim1 overexpression plasmid or mock plasmid, and then were exposed to normal conditions or OGD/R treatment. They were named as Pim1 group, control group, OGD/R group and OGD/R+Pim1 group respectively. Real-time PCR was used to detect Pim1 mRNA expression. Western blot was used to detect the protein expression of Pim1 and apoptotic related protein cleaved caspase 3 (CC3). TUNEL staining was used to detect cell apoptosis. **Results** Real-time PCR and Western blot results showed that Pim1 mRNA and protein were significantly decreased in neurons after OGD/R. They began to decrease at 0 hour after OGD/R, reached to the lowest at 12 hours after OGD/R, and remained at a lower level at 24 hours after OGD/R

[收稿日期] 2019-11-12; [接受日期] 2020-04-23

[基金项目] 国家自然科学基金 (81971429); 四川大学大学生创新训练计划基金 (C2019104355)。

[作者简介] 刘俊燕, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 赵凤艳, 女, 副研究员。Email: zhaofengyan621@163.com。

($P < 0.01$). Overexpression of Pim1 significantly upregulated the protein level of Pim1. Under OGD/R conditions, the CC3 expression and the apoptosis rate in cells of the Pim1 group were significantly lower than in un-transfected cells ($P < 0.01$). **Conclusions** Hypoxic-ischemic injury may decrease Pim1 expression in neurons. Overexpressed Pim1 may inhibit apoptosis induced by OGD/R. [Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(5): 512-518]

Key words: Brain injury; Apoptosis; Hypoxia ischemia; Pim1; Neuron

新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxia ischemia encephalopathy, HIE) 是引起新生儿死亡和慢性神经系统损伤的主要原因之一^[1]。在围产期医学发展日新月异的今天, 部分重度 HIE 患儿仍会遗留永久性后遗症, 如脑瘫、智力障碍等, 严重影响患儿健康及生活质量^[2]。目前, 亚低温疗法是临床上缓解 HIE 症状的主要治疗措施, 但狭窄的治疗时间窗限制了其在临床上的应用^[3-4]。因此, 阐明新生儿 HIE 的发病机制, 探索新的治疗方法, 意义重大。

细胞凋亡是缺氧缺血脑损伤中神经细胞死亡的主要方式之一, 但其确切机制尚不完全清楚。Pim1 激酶是由原癌基因 Pim1 编码的一种丝氨酸苏氨酸激酶, 在细胞凋亡过程中发挥着非常重要的作用^[5]。目前, 针对 Pim1 的研究主要集中在肿瘤领域^[6-8]。在多种肿瘤细胞中发现, 靶向 Pim1 的 siRNA 分子或小分子抑制剂, 可以抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 并减慢肿瘤移植小鼠中肿瘤的生长速度^[9-12]。近年来研究发现, 除肿瘤组织外, Pim1 在心肌缺血损伤中具有抑制细胞凋亡的作用。过表达 Pim1 能抑制缺氧合并氧化应激损伤诱导的心肌细胞凋亡^[13]。Pim1 基因修饰的心脏干细胞对心肌缺血损伤具有更强的修复保护作用^[14-15]。这些研究结果表明, Pim1 在组织缺血损伤中发挥着重要作用。据此, 我们推测 Pim1 可能在缺氧缺血脑损伤引起的神经细胞凋亡中也发挥重要作用。目前, 关于 Pim1 与缺氧缺血脑损伤的研究, 尚未见报道。

本研究拟利用体外培养神经元进行氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygen, OGD/R) 处理, 建立缺氧缺血脑损伤的细胞模型, 利用 Pim1 过表达质粒转染上调 Pim1 的表达, 初步探讨 Pim1 在缺氧缺血脑损伤细胞凋亡中的作用。半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 是细胞凋亡信号通路的下游关键蛋白^[16]。细胞凋亡信号可导致 caspase-3 裂解和活化, 活化型 caspase-3 (cleaved caspase-3, CC3) 水平直接反映细胞凋亡程度。本研究将采用

Western blot 法检测 CC3 蛋白表达和 TUNEL 检测细胞凋亡两种方法评价细胞凋亡情况。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

取新生 1 日龄 C57BL/6 小鼠进行原代神经元分离培养。即将脑组织浸泡在预冷的解剖液中, 取大脑皮层在显微镜下去除脑膜, 将脑组织充分剪碎后, 用 0.125% 胰酶 37℃ 消化 5 min, 用新生牛血清终止消化, 离心后收集细胞沉淀, 加神经元培养基 (Neurobasal+B27) 吹散、计数接种, 置于细胞培养箱 (37℃、5% CO₂) 中进行培养。

1.2 主要试剂与仪器

C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。PVT1 过表达质粒由本实验室构建储存。兔抗小鼠 Pim1 抗体及 CC3 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 小鼠抗 GAPDH 抗体 (Abcam 公司, 英国); TRIzol (Invitrogen 公司, 美国); TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (Promega 公司, 美国); 水平电泳系统、转印系统、化学发光凝胶成像系统及 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.3 氧糖剥夺复氧模型建立

神经元培养第 8 天, 参照参考文献^[17]建立氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 模型。即弃去正常培养基, PBS 洗 2 次, 加无糖无血清的 DMEM 培养基, 将细胞置于培养箱中 (37℃、1% O₂、5% CO₂) 进行 OGD 处理; 3 h 后取出细胞, 弃去 DMEM 培养基, 换为正常培养基, 放回培养箱 (37℃、5% CO₂) 中进行培养, 即开始复氧, 此刻为 OGD/R 0 h。于复氧后不同时间点收集细胞进行相应检测。

1.4 细胞转染

神经元接种于 6 孔板中, 于培养第 5 天, 采用 lipofectamine 2000 进行 Pim1 过表达质粒转染 (Pim1 组)。同时设立空质粒转染对照组 (对照组)。细胞转染参考说明书进行。采用 250 μL 体系, 质粒 DNA 2.5 μg, lipofectamine 2000 5 μL。分别在

对照组和 Pim1 组处理基础上, 转染 72 h 后分别进行 OGD/R 处理 (OGD/R 组、OGD/R+Pim1 组), OGD/R 24 h 收集样品, 检测凋亡情况。每组 3 个复孔, 实验独立重复 3 次。

1.5 Real-time PCR

TRIzol 法提取细胞总 RNA。利用 HiScript III RT SuperMix (南京诺唯赞生物科技有限公司) 合成第一链 cDNA, 稀释 5 倍后备用。引物的设计与合成由上海生工生物工程股份有限公司完成。Pim1 上游引物: 5'-GTCGTCCTCCGACTCGCC-3', 下游引物: 5'-GGGAGTTGATCTTGGACAGGAG-3', 片段长度 185 bp; GAPDH 上游引物: 5'-GGACC-TCATGGCCTACATGG-3', 下游引物: 5'-TAGGGCC-TCTCTTGCTCAGT-3', 片段长度 85 bp。利用 SYBR Green 法进行定量 PCR 检测。反应体系为 20 μ L, 其中 2 \times PCR 缓冲液 10 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, cDNA 产物 2 μ L, ddH₂O 6 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 然后 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。实验独立重复 3 次。

1.6 Western blot

收集细胞, 加蛋白裂解液 RIPA 在冰上裂解细胞 30 min, 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min。取上清, 利用 BCA 法进行蛋白浓度测定。经 SDS-PAGE 电泳、转膜和 BSA 封闭后, 加一抗 (Pim1 抗体 1:500, CC3 抗体 1:200, GAPDH 抗体 1:3000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜后, 加相应二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。TBST 洗膜, 利用化学发光凝胶成像系统进行成像和数据收集。用 Gelpro 软件分析条带灰度值。实验独立重复 3 次。

1.7 TUNEL 染色

细胞经多聚甲醛固定后, 用 0.3% Triton、4 $^{\circ}$ C 处理 5 min。PBS 洗 3 次后, 加 TUNEL 反应液, 37 $^{\circ}$ C 避光作用 1 h。PBS 荡洗后进行 DAPI 染色、封片, 在荧光显微镜下进行观察和图像采集。采用 Image-Pro 计数细胞, 计算凋亡指数 (凋亡细胞数 / 总细胞数 \times 100%)。实验独立重复 3 次。

1.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析和

作图。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Pim1 在 OGD/R 神经元中的表达变化

分别收集正常培养 (正常组) 和 OGD/R 后 0、6、12、24 h 的神经元, 利用 Real-time PCR 法检测 Pim1 mRNA 的表达。结果显示, OGD/R 后神经元中 Pim1 mRNA 表达均较正常组明显下降 ($P < 0.01$)。与正常组相比, Pim1 mRNA 于 OGD/R 后 0、6、12 h 一直持续降低 ($P < 0.05$), OGD/R 后 24 h Pim1 mRNA 表达水平开始回升, 但较正常组仍处于较低水平 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 1。

利用 Western blot 法检测小鼠神经元中 Pim1 蛋白的表达。结果显示, OGD/R 后神经元中 Pim1 蛋白表达均较正常组明显下降 ($P < 0.01$)。与正常组相比, Pim1 蛋白于 OGD/R 后 0、6、12 h 一直持续降低 ($P < 0.05$), OGD/R 后 24 h Pim1 蛋白表达水平开始回升, 但较正常组仍处于较低水平 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 1。

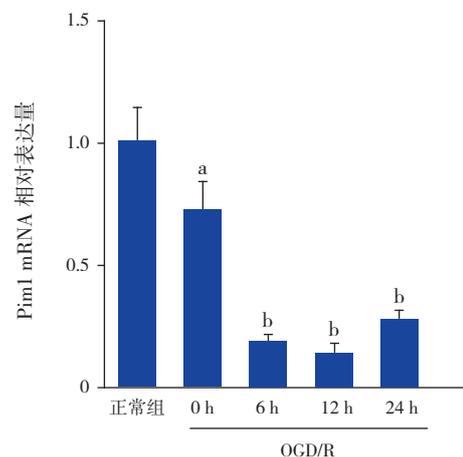


图 1 OGD/R 对小鼠神经元中 Pim1 mRNA 表达的影响 ($n=3$) a 示与正常组比较, $P < 0.05$; b 示与正常组比较, $P < 0.01$ 。

表1 OGD/R对神经元中Pim1 mRNA和蛋白表达的影响
($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Pim1 mRNA	Pim1 蛋白
正常组	1.006 ± 0.114	1.000 ± 0.057
OGD/R 0 h	0.722 ± 0.100 ^a	0.690 ± 0.103 ^a
OGD/R 6 h	0.188 ± 0.025 ^b	0.259 ± 0.006 ^b
OGD/R 12 h	0.138 ± 0.036 ^b	0.132 ± 0.011 ^b
OGD/R 24 h	0.278 ± 0.033 ^b	0.177 ± 0.007 ^b
<i>F</i> 值	55.52	101.3
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与对照组比较, $P<0.01$ 。

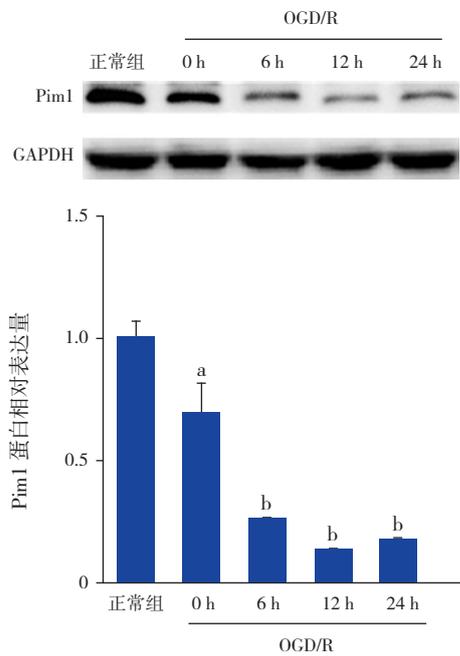


图2 OGD/R对小鼠神经元中Pim1蛋白表达的影响
上图为蛋白表达电泳图; 下图为蛋白表达统计图 ($n=3$)。a 示与正常组比较, $P<0.05$; b 示与正常组比较, $P<0.01$ 。

2.2 Pim1过表达质粒转染后神经元中Pim1蛋白表达变化

正常培养条件下, Pim1组Pim1蛋白表达量较对照组约增加2倍 ($P<0.01$), 表明Pim1质粒转染成功。OGD/R+Pim1组神经元中Pim1蛋白相

对表达量高于对照组 ($P<0.01$), 表明OGD/R条件下, 转染Pim1过表达质粒也能使Pim1蛋白明显增加, 提示采用过表达质粒上调神经元中Pim1水平的方法可行。见图3, 表2。

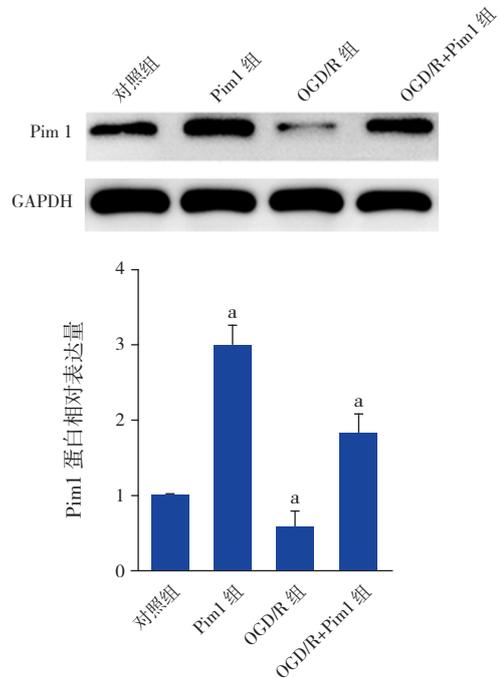


图3 Pim1过表达质粒转染后神经元中Pim1的蛋白表达
上图为蛋白表达电泳图; 下图为蛋白表达统计图 ($n=3$)。a 示与对照组比较, $P<0.01$ 。

表2 Pim1过表达质粒转染对神经元中Pim1蛋白、CC3蛋白和细胞凋亡率的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Pim1 蛋白	CC3 蛋白	细胞凋亡率 (%)
对照组	0.999 ± 0.022	1.000 ± 0.001	0.59 ± 0.22
Pim1组	2.988 ± 0.225 ^a	1.146 ± 0.107	0.50 ± 0.25
OGD/R组	0.566 ± 0.180 ^a	2.612 ± 0.257 ^a	54.78 ± 9.80 ^a
OGD/R+Pim1组	1.824 ± 0.208 ^a	1.364 ± 0.053 ^b	23.20 ± 5.20 ^b
<i>F</i> 值	71.55	30.43	190.1
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较, $P<0.01$; b 示与OGD/R组比较, $P<0.01$ 。

2.3 过表达 Pim1 后 CC3 蛋白表达变化

对照组和 Pim1 组 CC3 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 提示正常培养条件下, 上调 Pim1 水平并不影响 caspase-3 的活化。与对照组相比, OGD/R 组神经元中 CC3 表达水平显著增加 ($P<0.01$), 提示 OGD/R 导致细胞凋亡增加。与 OGD/R 组相比, OGD/R+Pim1 组 CC3 表达水平明显降低 ($P<0.01$), 表明 Pim1 可抑制 caspase-3 的活化, 进而抑制细胞凋亡发生。见图 4, 表 2。

2.4 过表达 Pim1 后细胞凋亡情况

采用 TUNEL 染色法进行细胞凋亡的形态学检测, 绿色为凋亡细胞。结果显示, 对照组和 Pim1 组都几乎没有凋亡细胞。与对照组相比, OGD/R 组凋亡细胞数明显增多 ($P<0.01$), 表明 OGD/R 导致细胞凋亡增多。与 OGD/R 组相比, OGD/R+Pim1 组凋亡细胞数明显减少 ($P<0.01$), 提示 Pim1 可以明显抑制 OGD/R 诱导的细胞凋亡。见图 5~6, 表 2。

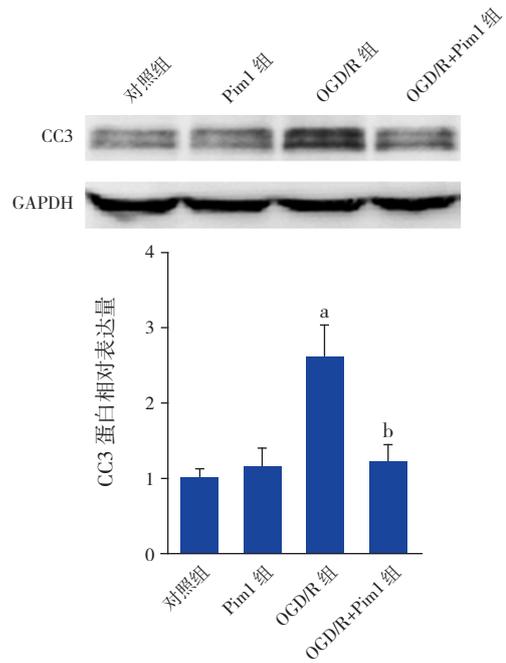


图 4 过表达 Pim1 对 CC3 蛋白表达的影响 上图为蛋白表达电泳图; 下图为蛋白表达统计图 ($n=3$), a 示与对照组相比, $P<0.01$; b 示与 OGD/R 组相比, $P<0.01$ 。

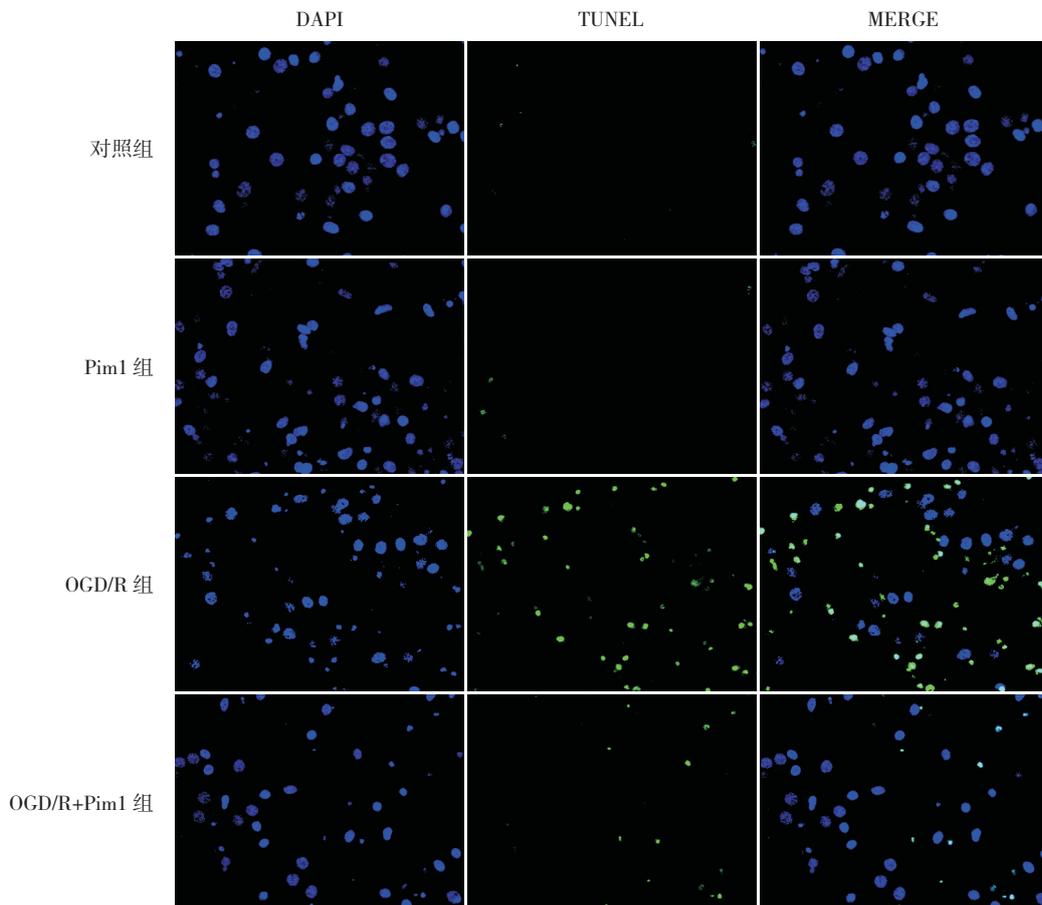


图 5 过表达 Pim1 对细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, $\times 20$) 对照组和 Pim1 组都几乎没有凋亡细胞。与对照组相比, OGD/R 组凋亡细胞数明显增多。与 OGD/R 组相比, OGD/R+Pim1 组凋亡细胞数明显减少。绿色为凋亡细胞。

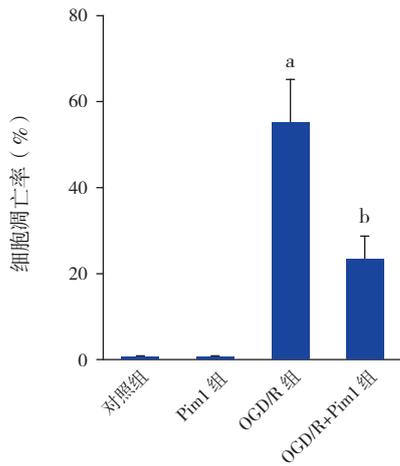


图6 各组细胞凋亡率比较 ($n=3$) a 示与对照组相比, $P<0.01$; b 示与 OGD/R 组相比, $P<0.01$ 。

3 讨论

细胞凋亡是缺氧缺血脑损伤导致细胞死亡的主要形式。设法阻断细胞凋亡,已成为科学家们探索逆转缺氧缺血脑损伤的重要手段^[18-20]。细胞凋亡受一系列基因和信号通路的调控,但其确切机制尚未阐明。本研究在体外培养大脑皮层神经元 OGD/R 模型中,发现 Pim1 参与调控 OGD/R 诱导的神经元凋亡。过表达 Pim1 可以抑制 OGD/R 诱导的神经元凋亡。

Caspase 家族在细胞凋亡中起着关键作用^[21]。而 caspase-3 是执行凋亡的关键蛋白酶,是多条凋亡信号通路的汇聚点。正常情况下, caspase-3 以无活性的酶原形式存在^[22],当凋亡信号出现时, caspase-3 被裂解而被活化,即形成 CC3。CC3 通过酶解切割其底物,如凋亡抑制物 Bcl-2, DNA 修复相关分子 PARP 等,以及细胞外基质及骨架蛋白,使这些底物失活,引起细胞功能和形态发生变化,最终导致细胞走向凋亡。CC3 的表达与细胞凋亡程度呈正相关。CC3 已成为检测细胞凋亡的经典指标。因此,本研究除了采用 TUNEL 法从形态学角度检测细胞凋亡外,还利用 Western blot 检测 CC3 的表达,从蛋白水平评价细胞凋亡的变化。

Pim1 在细胞凋亡、增殖、分化及细胞周期调控等多种细胞生物学过程中具有重要作用^[23]。因其在肿瘤组织中高度表达而广受关注^[24]。抑制 Pim1 会引起缺氧的肿瘤细胞死亡^[25],而过表达 Pim1 则能抑制肿瘤细胞凋亡,促进细胞存活^[26]。

这些研究结果说明 Pim1 有利于肿瘤细胞适应缺氧环境, Pim1 是细胞适应缺氧环境的关键分子。过表达 Pim1 能抑制缺氧诱导的心肌细胞凋亡^[13],说明 Pim1 在非肿瘤组织缺氧损伤中也具有重要作用。研究发现, Pim1 在神经元中大量表达,且参与神经病理性疼痛和阿尔兹海默病的发生发展,抑制 Pim1 可以缓解痛觉过敏和空间记忆缺陷损害^[6,13],提示 Pim1 在中枢神经系统疾病过程中起重要作用。然而, Pim1 在缺氧缺血脑损伤神经细胞凋亡中的作用尚不清楚。

本研究中检测了 OGD/R 对神经元中 Pim1 表达的影响,发现 OGD/R 后 Pim1 表达明显下降,于 OGD/R 0 h 开始下降, OGD/R 12 h 最低, OGD/R 24 h 开始回升但仍处于较低水平。而有研究发现心肌细胞缺氧合并氧化应激损伤后, Pim1 表达增加,损伤后 3 h 即明显增加, 6~12 h 后逐渐降低^[13]。推测这一研究结果的差异可能是由于细胞类型不同,所受刺激强度不同导致的。本课题组既往研究发现,无论是在新生鼠缺氧缺血脑损伤模型,还是在神经元 OGD/R 损伤模型中,缺氧缺血导致的细胞凋亡均于损伤后 4 h 细胞凋亡开始增加, 24 h 达高峰^[27-28]。OGD/R 后神经元中 Pim1 的表达变化与细胞凋亡的变化呈相反趋势。因此,推测 Pim1 可能参与调控缺氧缺血诱导的细胞凋亡。既往研究和本课题组前期研究均发现,缺氧缺血脑损伤后 24 h 细胞凋亡最严重。本研究初步探讨 Pim1 对缺氧缺血脑损伤细胞凋亡的作用,比较 OGD/R 24 h, Pim1 组与对照组细胞凋亡情况。为初步探讨 Pim1 对缺氧缺血诱导的神经元凋亡的作用,本研究选择在缺氧缺血后细胞凋亡最明显的时间点 OGD/R 24 h,检测过表达 Pim1 对神经元凋亡的影响。结果显示,过表达 Pim1 后 TUNEL 阳性细胞数和 CC3 表达均显著降低,表明过表达的 Pim1 可以抑制 OGD/R 诱导的神经元凋亡。提示 Pim1 在神经元缺氧缺血损伤中发挥神经保护作用。这与 Pim1 在心肌细胞缺氧合并氧化应激损伤中的研究结果一致,过表达 Pim1 可以促进心肌细胞自噬,抑制细胞凋亡^[13]。本研究结果提示 Pim1 在神经细胞缺氧损伤中也具有保护作用,靶向 Pim1 的干预措施可能为探寻新生儿 HIE 治疗新方法提供思路。

本研究在 HIE 的体外模型中初步探讨了 Pim1

在缺氧缺血脑损伤中的作用, 没有涉及作用机制的研究。Pim1 的神经保护机制是通过什么基因和信号通路发挥作用有待进一步研究探索。

[参 考 文 献]

- [1] Nabetani M, Shintaku H, Hamazaki T. Future perspectives of cell therapy for neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Pediatr Res*, 2018, 83(1-2): 356-363.
- [2] Yıldız EP, Ekici B, Tatlı B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment[J]. *Expert Rev Neurother*, 2017, 17(5): 449-459.
- [3] Hou Y, Qiao Y, Xiong M, et al. Hypothermia-rewarming: a double-edged sword?[J]. *Med Hypotheses*, 2019, 133: 109387.
- [4] Zhao W, Qiu R, Li P, et al. PIM1: a promising target in patients with triple-negative breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(8): 142.
- [5] Zhang M, Liu T, Sun H, et al. Pim1 supports human colorectal cancer growth during glucose deprivation by enhancing the Warburg effect[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(5): 1468-1479.
- [6] Zou Y, Cao Y, Liu Y, et al. The role of dorsal root ganglia PIM1 in peripheral nerve injury-induced neuropathic pain[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 709: 134375.
- [7] Zhao B, Liu L, Mao J, et al. PIM1 mediates epithelial-mesenchymal transition by targeting Smads and c-Myc in the nucleus and potentiates clear-cell renal-cell carcinoma oncogenesis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 307.
- [8] Gao X, Liu X, Lu Y, et al. PIM1 is responsible for IL-6-induced breast cancer cell EMT and stemness via c-myc activation[J]. *Breast Cancer*, 2019, 26(5): 663-671.
- [9] Remy J, Linder B, Weirauch U, et al. Inhibition of PIM1 blocks the autophagic flux to sensitize glioblastoma cells to ABT-737-induced apoptosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(2): 175-789.
- [10] Kuang X, Xiong J, Wang W, et al. PIM inhibitor SMI-4a induces cell apoptosis in B-cell acute lymphocytic leukemia cells via the HO-1-mediated JAK2/STAT3 pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 219: 248-256.
- [11] Herzog S, Fink MA, Weitmann K, et al. Pim1 kinase is upregulated in glioblastoma multiforme and mediates tumor cell survival[J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(2): 223-242.
- [12] Weirauch U, Beckmann N, Thomas M, et al. Functional role and therapeutic potential of the pim-1 kinase in colon carcinoma[J]. *Neoplasia*, 2013, 15(7): 783-794.
- [13] Zhang HH, Wang XT, Sun YH, et al. Pim1 overexpression prevents apoptosis in cardiomyocytes after exposure to hypoxia and oxidative stress via upregulating cell autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6): 2138-2150.
- [14] Liu N, Wang BJ, Broughton KM, et al. PIM1-mimicircle as a therapeutic treatment for myocardial infarction[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173963.
- [15] Kulandavelu S, Karantalis V, Fritsch J, et al. Pim1 kinase overexpression enhances ckit⁺ cardiac stem Ccell cardiac repair following myocardial infarction in swine[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(22): 2454-2464.
- [16] Crowley LC, Waterhouse NJ. Detecting cleaved caspase-3 in apoptotic cells by flow cytometry[J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, 2016(11). DOI: 10.1101/pdb.prot087312.
- [17] Zheng Z, Zhang L, Qu Y, et al. Mesenchymal stem cells protect against hypoxia-ischemia brain damage by enhancing autophagy through brain derived neurotrophic factor/mammalian target of rapamycin signaling pathway[J]. *Stem Cells*, 2018, 36(7): 1109-1121.
- [18] 张怡, 靳晓飞, 周晓红, 等. 黄芪甲苷调控自噬抑制缺氧缺糖/复氧复糖 HT22 细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 4: 519-524.
- [19] 周玉, 莫国梁, 赵婧, 等. 人脐血间充质干细胞移植对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的神经保护 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 13: 2035-2041.
- [20] 陈璐, 舒斯云, 吴政彦, 等. G-CSF 通过上调 mTOR/p70S6K 信号通路抑制新生大鼠 HIBD 后神经细胞凋亡 [J]. *中华神经医学杂志*, 2018, 17(5): 450-456.
- [21] 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展 [J]. *浙江医学*, 2018, 40(18): 2083-2091.
- [22] 赵瑞杰, 李引乾, 王会, 等. Caspase 家族与细胞凋亡 [J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(17): 73-78.
- [23] Cao L, Wang F, Li S, et al. PIM1 kinase promotes cell proliferation, metastasis and tumor growth of lung adenocarcinoma by potentiating the c-MET signaling pathway[J]. *Cancer Lett*, 2019, 444: 116-126.
- [24] Zhang X, Song M, Kundu JK, et al. PIM kinase as an executional target in cancer[J]. *J Cancer Prev*, 2018, 23(3): 109-116.
- [25] Warfel NA, Sainz AG, Song JH, et al. PIM kinase inhibitors kill hypoxic tumor cells by reducing Nrf2 signaling and increasing reactive oxygen species[J]. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15(7): 1637-1647.
- [26] Xiang X, Yuan D, Liu Y, et al. PIM1 overexpression in T-cell lymphomas protects tumor cells from apoptosis and confers doxorubicin resistance by upregulating c-myc expression[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(8): 800-806.
- [27] Zhao F, Qu Y, Xiong T, et al. The neuroprotective role of TERT via an antiapoptotic mechanism in neonatal rats after hypoxia-ischemia brain injury[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 515(1): 39-43.
- [28] Li J, Qu Y, Chen D, et al. The neuroprotective role and mechanisms of TERT in neurons with oxygen-glucose deprivation[J]. *Neuroscience*, 2013, 252: 346-358.

(本文编辑: 万静)