

PI3K p55 γ N末端氨基酸过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响

李 琄, 郭红艳, 吴 琦, 张 梅, 高 涵, 孙晓杰

李琄, 郭红艳, 吴琦, 张梅, 高涵, 孙晓杰, 齐齐哈尔医学院生物化学教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161006
李琄, 2003年广西医科大学硕士, 主要从事分子生物学研究。
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. ZA2006-04
黑龙江省教育厅基金资助项目, No. 11531431
作者贡献分布: 本课题由孙晓杰设计; 研究过程由李琄与郭红艳等操作完成; 数据采集、分析由李琄、吴琦、张梅及高涵完成; 本论文写作由李琄与郭红艳完成, 孙晓杰进行批评性审阅。
通讯作者: 孙晓杰, 教授, 161006, 黑龙江省齐齐哈尔市建华区卜奎大街333号, 齐齐哈尔医学院生物化学教研室。
sunxj97@yahoo.com.cn
电话: 0452-2663151
收稿日期: 2009-10-11 修回日期: 2009-11-09
接受日期: 2009-11-16 在线出版日期: 2009-11-28

Overexpression of the N-terminal 24-amino acid domain of p55 γ regulatory subunit of PI3K inhibits the migration of human gastric carcinoma MGC803 cells

Shen Li, Hong-Yan Guo, Qi Wu, Mei Zhang, Han Gao, Xiao-Jie Sun

Shen Li, Hong-Yan Guo, Qi Wu, Mei Zhang, Han Gao, Xiao-Jie Sun, Department of Biochemistry, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province of China, No. ZA2006-04; and the Foundation of Heilongjiang Educational Committee, No. 11531431

Correspondence to: Professor Xiao-Jie Sun, Department of Biochemistry, Qiqihar Medical University, 333 Bokui North Street, Jianhua District, Qiqihar 161006, Heilongjiang Province, China. sunxj97@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-11 Revised: 2009-11-09

Accepted: 2009-11-16 Published online: 2009-11-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of overexpression of the N-terminal 24-amino acid domain of p55 γ regulatory subunit (N24p55 γ) of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) on the migration of human gastric carcinoma MGC803 cells.

METHODS: MGC803/GFP-N24 and MGC803/GFP cell lines stably expressing N24p55 γ -GFP

fusion protein (GFP-N24) and GFP protein alone were generated by transfection of MGC803 cells with pEGFPN24 plasmid and control plasmid pEGFPC1, respectively. The impact of GFP-N24 overexpression on cell motility and migration was detected by wound healing assay and Transwell migration assay. The expression and secretion of tumor metastasis-related protein matrix metalloproteinase-9 (MMP9) were determined by gelatin zymography. The effect of GFP-N24 overexpression on the activity of the PI3K-Akt signaling pathway was analyzed by Western blot.

RESULTS: The MGC803/GFP-N24 cell line steadily expressing the GFP-N24 fusion protein and the MGC803/GFP cell line steadily expressing GFP were successfully established. The results of wound healing assay and Transwell migration assay showed that the *in vitro* migration of MGC803/GFP-N24 cells was restricted ($t = 0.003$, $P < 0.01$). GFP-N24 overexpression inhibited the activity of PI3K-Akt signaling pathway by decreasing the expression of phospho-Akt in MGC803 cells. However, GFP-N24 overexpression did not alter the expression and secretion of MMP9 protein.

CONCLUSION: Ectopic expression of N24p55 γ inhibits cell migration *in vitro* by suppressing the activity of the PI3K-Akt signaling pathway in MGC803 cells. The N24p55 γ peptide can potentially be used to treat gastric carcinoma.

Key Words: Phosphoinositide 3-kinase; p55 γ ; Gastric carcinoma cells; Migration

Li S, Guo HY, Wu Q, Zhang M, Gao H, Sun XJ. Overexpression of the N-terminal 24-amino acid domain of p55 γ regulatory subunit of PI3K inhibits the migration of human gastric carcinoma MGC803 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(33): 3381-3386

摘要

目的: 观察p55 γ N末端24个氨基酸的过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响。

背景资料
PI3K参与细胞增殖、分化、凋亡和迁移等功能的调节。p55 γ 是近年来新发现的PI3K调节亚基, 其N末端序列能与Rb蛋白结合调节细胞周期的进程。p55 γ N末端的过表达能抑制胃癌细胞的生长增殖, 本文进一步研究其对胃癌细胞运动迁移能力的影响。

同行评议者
周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

研究前沿

PI3K-Akt信号通路与肿瘤的发生发展均相关,他已经成为当前抗肿瘤药物研发领域的热点。在中国,胃癌死亡率仍居恶性肿瘤死亡率第1位,但现阶段应用于临床的胃癌分子靶向治疗药物仍有许多局限性,因此亟待研发更多高效的靶向治疗药物。

方法: 通过脂质体介导用pEGFPN24和空载体pEGFPC1质粒进行基因转染,建立稳定表达融合蛋白GFP-N24和GFP的细胞系;通过细胞划痕实验和迁移实验观察GFP-N24的过表达对细胞运动迁移的影响;明胶酶谱实验观察其对肿瘤转移相关基因MMP9表达和分泌的影响;免疫印迹实验检测GFP-N24的过表达对PI3K-Akt信号通路活性的影响。

结果: 建立了稳定表达融合蛋白GFP-N24的MGC803/GFP-N24细胞系和表达GFP的MGC803/GFP细胞系。细胞划痕实验和细胞迁移实验发现表达GFP-N24的MGC803细胞运动迁移能力下降($t = 0.003$, $P < 0.01$)。GFP-N24通过减少磷酸化Akt的表达而抑制PI3K-Akt信号的活性,但其对MMP9的表达和分泌没有影响。

结论: PI3K p55 γ N末端24个氨基酸通过抑制PI3K-Akt信号通路的活性而抑制胃癌MGC803细胞的迁移,其在胃癌的治疗上可能具有潜在的应用前景。

关键词: 磷脂酰肌醇3-激酶; p55 γ ; 胃癌细胞; 迁移

李坤, 郭红艳, 吴琦, 张梅, 高涵, 孙晓杰. PI3K p55 γ N末端氨基酸过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(33): 3381-3386
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3381.asp>

0 引言

胃癌在全球常见恶性肿瘤中居第4位,而42%的病例发生在中国。据WHO最新统计,至2005年胃癌仍是居中国癌症死亡率首位的恶性肿瘤^[1]。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)参与细胞内多种信号转导机制,调节细胞的增殖、分化、迁移、凋亡以及胰岛素刺激的葡萄糖转运等。PI3K活性的异常与多种人类肿瘤的发生相关,近年来大量文献报道PI3K和其下游分子Akt所组成的信号通路(PI3K-Akt信号通路)与肿瘤侵袭转移的主要事件如肿瘤细胞的迁移黏附、肿瘤血管生成以及细胞外基质的降解等相关。作为PI3K的调节亚基, p55 γ 以其独特的N末端与视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)蛋白相互作用,调节细胞周期的进程^[2-3]。前期研究发现, p55 γ 参与生长因子介导的细胞迁移过程,其N末端24个氨基酸(N-terminal 24 amino acid, N24)的过表达在体内和体外均能抑制胃癌细胞的生长,表现为细胞生长速度减慢、细胞周期阻滞、克隆形成能力以及在裸鼠中的成瘤能力

降低等^[4-5]。在此基础上,我们进一步研究N24的过表达对胃癌MGC803细胞迁移的影响,并初步探讨其作用的分子机制,为开发以PI3K信号通路为靶点的抗肿瘤药物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究所用细胞MGC803为胃低分化黏液腺癌细胞系,由中国医学科学院肿瘤医院所提供。细胞用含100 g/L小牛血清的RPMI 1640培养液在50 mL/L CO₂、37℃条件下培养。本实验所使用的空载体质粒pEGFPC1和重组质粒pEGFPN24由美国霍普金斯大学医学院夏献民博士惠赠,该质粒转染真核细胞后分别表达绿色荧光蛋白GFP和融合蛋白GFP-N24。RPMI 1640和Pestained protein marker为Gibco BRL公司产品, GFP多克隆抗体购自BD公司, pAkt(473Ser)多克隆抗体为Cell signaling公司产品, β -actin mAb、Fibronectin和Collagen为Sigma公司产品,细胞培养瓶、Transwell培养板为Costar公司产品, Wortmannin购自生物晶美公司,为Upstate公司产品,结晶紫和Gelatin为鼎国生物技术公司产品。

1.2 方法

1.2.1 基因转染: 采用Lipofectamine进行基因转染,具体操作按说明书进行。生长良好的细胞于转染前1 d接种到培养板中,经16-18 h后,细胞总面积达到60%-70%时用pEGFPN24重组质粒和空载体质粒pEGFPC1各3 μ g进行基因转染。用含G418的选择性培养基筛选抗性克隆(浓度前3 d为600 mg/L,以后为400 mg/L),建立稳定表达融合蛋白GFP-N24的803/GFP-N24多克隆pooled细胞系和表达GFP的803/GFP空载体多克隆pooled细胞系,通过Western blot方法鉴定融合蛋白GFP-N24的表达。稳定转染的细胞系用含200 mg/L G418的培养液扩大培养用于实验。

1.2.2 免疫印迹: 收集生长状态良好的细胞,用含PMSF的PBS洗2遍。加入蛋白裂解液RIPA (50 mmol/L Tris pH7.5, 1.0 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 1 g/L SDS, 10 g/L TritonX-100, 10 g/L去氧胆酸钠),冰浴30 min。4℃12000 r/min离心10 min,取上清,采用Bradford法进行蛋白定量后进行SDS-PAGE及转膜。50 g/L脱脂奶粉室温封闭2 h;加一抗4℃过夜(GFP和pAkt为1:1000, β -actin为1:5000);TTBS漂洗3次后加二抗,室温孵育45 min;TTBS漂洗3次后进行ECL显色,显影于X光片上,用Umax2100XL扫描及Quantity

One图像分析系统测定吸光度值(A值).

1.2.3 细胞划痕实验: 将生长状态良好的细胞按每孔 1×10^5 种植于6孔培养板上, 细胞长至60%-70%汇合, 形成单细胞层. 对照组细胞先用200 nmol/L的Wortmannin处理30 min再种植于6孔培养板上. 分别观察MGC803、MGC803+WT、MGC803/GFP、MGC803/GFP-N24 4组细胞0、24和48 h的增殖速度. 同时用塑料加样器在另外4组单层细胞上划过, 形成一个创伤口. 继续培养48 h, 在0、24和48 h分别观察伤口愈合情况^[6].

1.2.4 细胞迁移实验: 细胞培养至良好状态, 常规胰酶消化. 计数 1×10^5 细胞, 加入Transwell迁移小杯, 对照组细胞先用200 nmol/L的Wortmannin处理30 min后再加入迁移小杯. 将迁移小杯放入含RPMI 1640的24孔板中, 于37℃、50 mL/L CO₂条件下培养8 h. 取出迁移小杯, 以PBS轻轻冲洗后, 用棉花棒轻轻擦去杯底膜上层的细胞. 950 mL/L乙醇固定细胞10 min, 2 g/L结晶紫染色20 min, PBS冲洗, 10 g/L SDS 200 μ L于37℃溶解1 h后, 酶标仪测A₆₂₀值, 结果进行统计学分析^[7].

1.2.5 明胶酶谱实验: 在6孔板中接种相同数量的各组转染细胞, 进行无血清培养, 48 h后收集上清. 按Fridman *et al*^[8]方法, 在分离胶的配制中, 加10 g/L明胶使之终浓度为1 g/L, 100 g/L非还原性SDS-PAGE电泳, 进行基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)酶谱实验. 样品不经加热变性, 与非还原性上样缓冲液混合上样. 电泳结束后, 取下胶, 蒸馏水漂洗后, 于25 g/L TritonX-100中室温轻摇2 h. 蒸馏水漂洗后, 将胶放入明胶酶缓冲液中, 置于37℃摇床缓慢摇动5-12 h. 2.5 g/L考马斯亮蓝R250染色4 h, 脱色液中脱色, 直至出现负染带.

统计学处理 实验数据均以mean \pm SD表示, 使用SPSS13.0 for Windows软件包进行t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 N24p55 γ 在MGC803细胞中的表达 由于pEGFP-C1载体表达绿色荧光蛋白GFP, 用抗GFP的抗体通过Western blot方法对稳定转染的多克隆pooled细胞中外源基因的表达进行了检测. 结果发现N24p55 γ 能够在MGC803细胞中得到表达, 但融合蛋白GFP-N24的表达量低于空载体中GFP的表达量(图1).

2.2 细胞划痕实验 在无血清培养的条件下观察

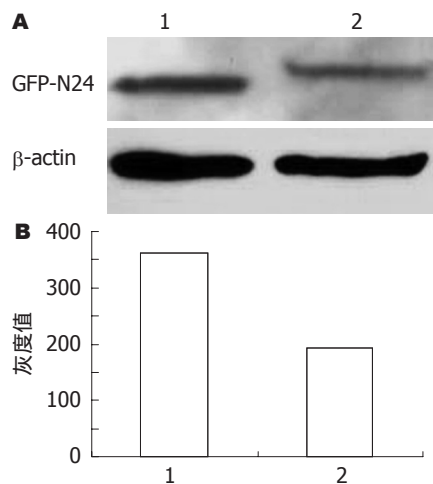


图1 转染细胞中N24p55 γ 的表达. A: 免疫印迹方法鉴定N24p55 γ 在MGC803细胞中的表达; B: N24p55 γ 在MGC803细胞中的表达灰度值水平, 经 β -actin校正; 1: 803/GFP细胞; 2: 803/GFP-N24细胞.

细胞的运动迁移, 结果各组细胞的生长速度都很缓慢, 细胞不发生迁移, 伤口在0、24和48 h没有明显变化, 各组细胞之间没有明显差异. 而给细胞添加血清后细胞发生迁移(图2), 但MGC803/GFP-N24组细胞迁移速度缓慢, 在划痕24 h后创伤口变化与0 h差异不大, 但此时对照MGC803/GFP细胞和亲本细胞伤口则已有部分愈合, 其迁移速度明显大于MGC803/GFP-N24组. 在划痕后48 h, 亲本细胞和对照组细胞伤口已经基本愈合, 但MGC803/GFP-N24组细胞伤口尚未愈合. 可见GFP-N24的表达抑制了MGC803细胞的运动迁移, 但其抑制作用低于PI3K抑制剂Wortmannin.

2.3 细胞迁移实验 Transwell细胞迁移实验显示, 亲本细胞和对照空载体组细胞有大量细胞穿过, 而MGC803/GFP-N24组穿过膜的细胞明显减少, 经PI3K抑制剂Wortmannin处理后的亲本细胞于镜下仅见少量的细胞穿过, 经检测MGC803、MGC803+WT、MGC803/GFP以及MGC803/GFP-N24细胞的A₆₂₀值分别为 0.466 ± 0.041 、 0.217 ± 0.053 、 0.471 ± 0.033 、 0.270 ± 0.046 , MGC803/GFP-N24组与空载体相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $t = 0.003$, 图3).

2.4 N24p55 γ 对磷酸化Akt表达的影响 由于p55 γ 与催化亚基p110结合后能表现PI3K的活性, 进而通过磷酸化作用激活其下游靶蛋白PKB(Akt), 导致PI3K-Akt信号通路的活化, 进而调节细胞的增殖、分化和迁移. 因此在没有其他因素的影响下, 可以用细胞中磷酸化Akt(pAkt)的表达水平代表PI3K-Akt信号通路的活性^[9]. 实验中收

创新盘点
本文通过基因转染方法研究了N24p55 γ 的过表达对胃癌MGC803细胞运动迁移的影响, 初步探讨了其作用的分子机制, 为开发以PI3K信号通路为靶点的抗肿瘤药物奠定基础.

应用要点

本研究发现N24p55 γ 的过表达通过抑制PI3K-Akt信号通路的活性,从而抑制胃癌MGC803细胞的迁移,在胃癌的靶向治疗方面具有潜在的应用前景.

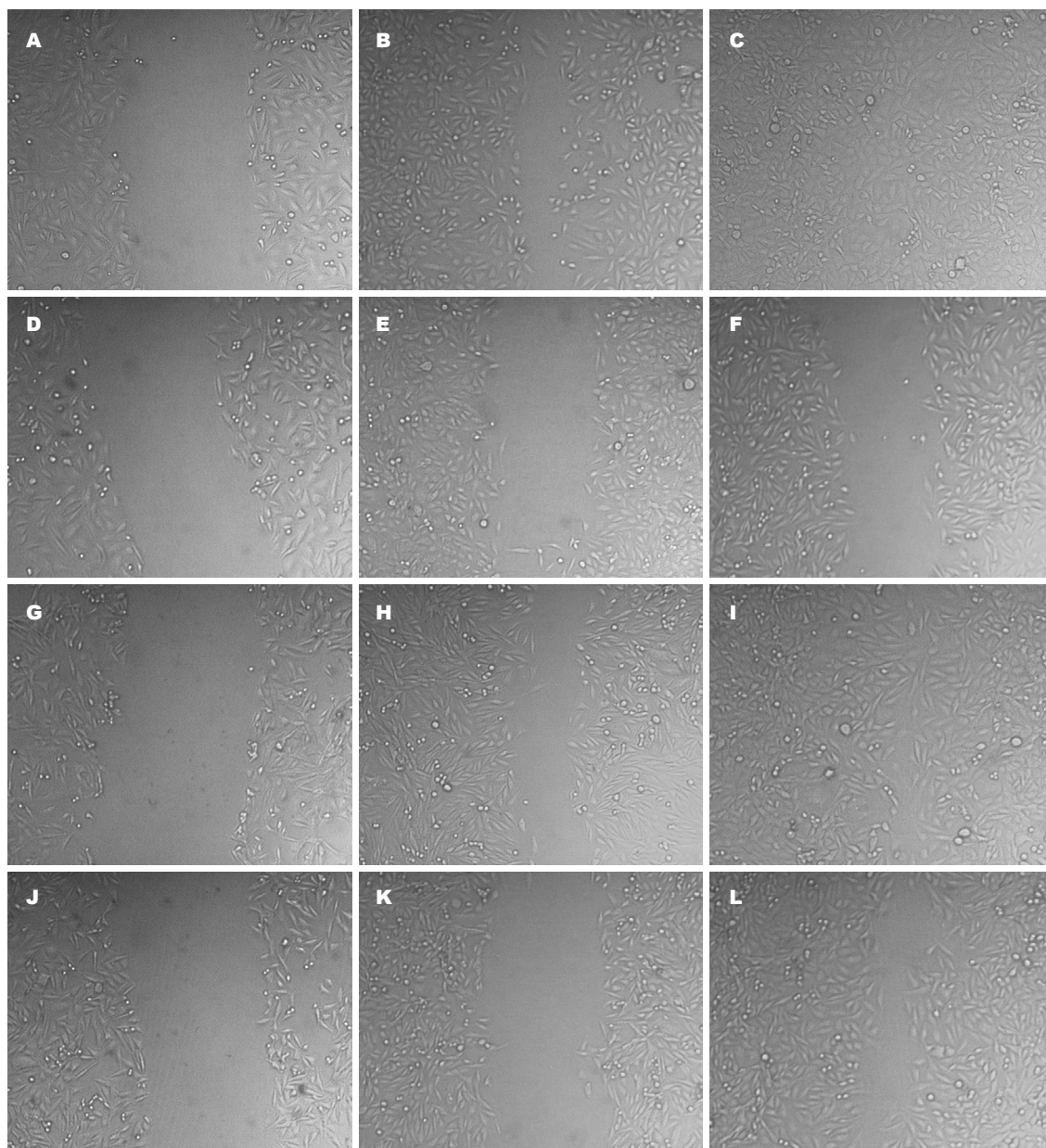


图2 N24p55 γ 的过表达对MGC803细胞迁移的影响. A-C: MGC803; D-F: MGC803+WT; G-I: MGC803/GFP; J-L: MGC803/GFP-N24; A, D, G, J: 0 h; B, E, H, K: 24 h; C, F, I, L: 48 h.

集对数生长期的各组转染细胞,分别提取细胞总蛋白,通过免疫印迹方法检测细胞中总pAkt的表达.结果与对照空载体细胞相比,MGC803/GFP-N24细胞中,pAkt的表达量明显减少(图4),表明融合蛋白GFP-N24的过表达对PI3K信号通路下游蛋白激酶PKB(Akt)的活化具有抑制作用.

2.5 N24p55 γ 对基质金属蛋白酶9表达的影响

肿瘤侵袭转移的潜能与肿瘤组织产生MMP的能力存在密切的正相关性.明胶酶谱实验结果显示:在各组细胞上清中均检测到相对分子质量为82 kDa的活化型MMP9,3组细胞在表达量上没有明显差异,但未检测到92kDa的酶原型MMP9(图5).表明融合蛋白GFP-N24的表达没有影响细胞中

MMP9的表达和分泌.

3 讨论

p55 γ 是Pons *et al*^[10]于1995年通过筛选鼠cDNA表达文库分离得到的新的PI3K调节亚基.在结构上p55 γ 与调节亚基P85 α 和P85 β 在C末端70%同源,能与催化亚基P110结合表现PI3K的活性,不同之处是其N末端缺乏SH3、BCR以及富脯氨酸基序等蛋白结合结构域,但却含有具有潜在磷酸化位点Tyr-22的YXXM基序.关于p55 γ 在细胞中的功能目前尚不完全清楚.

本研究建立了稳定表达N24p55 γ 的MGC803细胞系,此24个氨基酸序列为MDRD

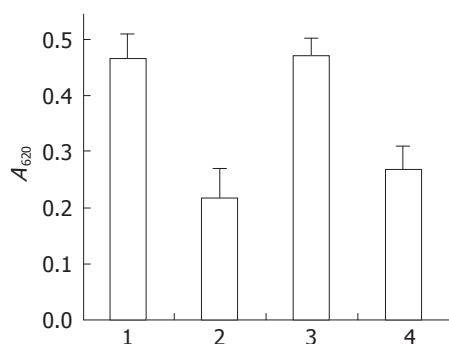


图 3 N24p55 γ 过表达对细胞迁移的影响. 1: MGC803; 2: MGC803+WT; 3: MGC803/GFP; 4: MGC803/GFP-N24.

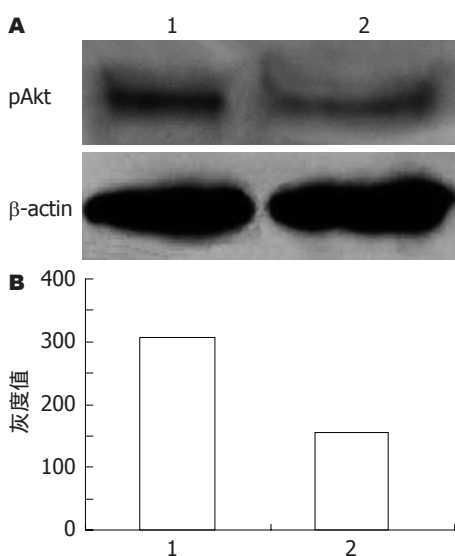


图 4 N24p55 γ 的过表达对PI3K-Akt信号通路活性的影响. A: 免疫印迹方法观察N24p55 γ 基因转染对MGC803细胞pAkt表达的影响; B: N24p55 γ 基因转染对MGC803细胞pAkt表达灰度值水平, 经 β -actin校正; 1: MGC803/GFP细胞; 2: MGC803/GFP-N24细胞.

DADWREVMMPYSTELIFYIE. 我们发现N24的过表达能抑制MGC803细胞的运动迁移能力. 大量文献报道在肿瘤侵袭转移过程中常伴随着PI3K-Akt信号通路的组成性活化^[11]. 作为PI3K的下游靶分子, Akt通过PDK1的磷酸化作用而被激活, 活化的Akt通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白如Bad、caspase9、NF- κ B、GSK-3、FKHR、P21Cip1和P27 Kip1等, 调节细胞的存活、生长、分化、血管形成和迁移等功能. 本研究发现转染N24p55 γ 的细胞中pAkt的表达量明显减少, 推测GFP-N24通过下调细胞中pAkt的表达而抑制PI3K-Akt信号通路的活性, 这不仅使由Akt活化所导致的细胞增殖受阻, 而且在某种程度上也可能对PI3K-Akt信号通路所参与的肿瘤的侵袭和转移行为有所抑制. MMP是肿瘤侵袭转移过程中细胞外基质重建或降

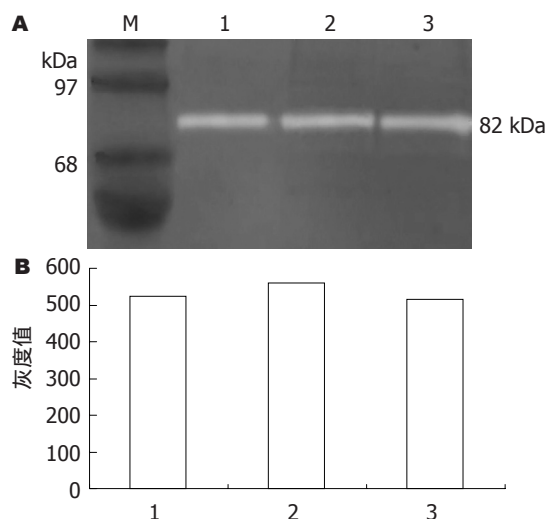


图 5 N24p55 γ 的过表达对肿瘤转移相关基因MMP9表达的影响. A: 明胶酶谱实验检测N24p55 γ 基因转染对MGC803细胞MMP9表达的影响; B: N24p55 γ 基因转染对MMP9表达的灰度值水平; M: Marker; 1: MGC803细胞; 2: MGC803/GFP细胞; 3: MGC803/GFP-N24细胞.

解、去除细胞迁移屏障的关键酶, 肿瘤侵袭转移的潜能与肿瘤组织产生MMP的能力呈正相关性, 而MMP9与多种人类肿瘤的侵袭和转移都相关^[12-13], 但本研究中GFP-N24的过表达并没有影响细胞中MMP9的表达. 上述结果表明, 抑制PI3K-Akt信号通路关键分子pAkt的表达可能是N24p55 γ 抑制MGC803细胞运动迁移的主要机制.

据报道^[14], 正常情况下细胞中内源性p55 γ 的蛋白表达量却极低, 几乎检测不到, 而本实验中在MGC803细胞中亦未检测出内源性p55 γ 的蛋白表达, 所以本实验可以忽略胃癌MGC803细胞野生型PI3K p55 γ 调节亚基的微量mRNA对实验结果的影响. 另外, 本实验融合蛋白GFP-N24的表达量虽然不高, 但细胞划痕实验和迁移实验结果良好, 我们经过数次努力未将表达量提高, 这将是我们将来努力的方向, 相信高表达量的载体将会带来更好的抑制细胞迁移能力.

目前PI3K-Akt信号通路已成为抗肿瘤药物研究领域的热点^[15-16], 在肝癌^[17]、乳腺癌^[18]、肾脏肿瘤^[19]的靶向治疗中都有较深入的研究. 胃癌分子靶向治疗已经成为优于手术、放疗、化疗三大传统治疗方案的新趋势, 具有高分子特异性、高选择性、高效性、低副作用的优点^[20]. 而且现阶段应用于临床的20多类靶向药物具有耐药时间不够长、种类少、造价高等缺点, 临床上急需更多高效的靶向治疗药. 用于抑制该信号通路的策略包括发展和应用小分子抑制剂、

名词解释
显性负效应(DN): 抑癌基因突变的拷贝在另一野生型拷贝存在并表达的情况下, 仍可使细胞出现恶性表型和癌变, 并使野生型拷贝功能失活, 这种作用称为显性负效应.

同行评价

本研究通过观察PI3K调节亚基N24p55 γ 对胃癌MGC803细胞迁移的影响,以探讨其作用机制,有一定的科学性和参考价值。

反义核酸、RNA干扰以及显性负效应蛋白的表达等。Xia *et al*^[2]发现N24p55 γ 抑制内源性p55 γ 的表达,因此认为其具有显性负效应的作用。本研究发现N24p55 γ 通过抑制PI3K-Akt信号通路的活性抑制胃癌细胞的迁移,Wortmannin作为PI3K的抑制剂虽然能有效抑制PI3K的活性,但因其细胞毒作用较大因此一直用于实验研究未能进入临床,本研究中GFP-N24对细胞迁移的抑制作用虽然低于Wortmannin,但因其来源于细胞对人体没有毒性,而且提高质粒表达量应该会增加疗效,提示其在胃癌的治疗上具有潜在的应用前景。

4 参考文献

- 1 WHO. The Impact of Cancer. Emerg Infect Dis serial online, 2007-11-11, cited 2009-10-11; 1(1): 24 screens. Available from: URL: http://www.who.int/ncd_surveillance/infobase/web/InfoBasPolicyMaker/reports/ReporterFullView.aspx?id=5
- 2 Xia X, Cheng A, Akinmade D, Hamburger AW. The N-terminal 24 amino acids of the p55 gamma regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase binds Rb and induces cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 1717-1725
- 3 Hu J, Liu S, Wang J, Luo X, Gao X, Xia X, Feng Y, Tao D, Wang G, Li X, Zhao J, Ding H, Reed E, Li QQ, Gong J. Overexpression of the N-terminal end of the p55gamma regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase blocks cell cycle progression in gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 2005; 26: 1321-1327
- 4 孙晓杰, 赵玫, 袁兴华, 余权, 郑利民, 方明镜, 黄常志. PI3Kp55PIK调节亚单位N末端抑制胃癌细胞株MGC803生长及其机制. *癌症* 2006; 25: 264-268
- 5 孙晓杰, 赵玫, 袁兴华, 余权, 黄常志. 磷酸酯肌醇3激酶p55 γ 调节亚单位对胃癌细胞系MGC803细胞迁移的影响. *中华医学杂志* 2006; 86: 3269-3271
- 6 Trifonova R, Small D, Kacer D, Kovalenko D, Kolev V, Mandinova A, Soldi R, Liaw L, Prudovsky I, Maciag T. The non-transmembrane form of Delta1, but not of Jagged1, induces normal migratory behavior accompanied by fibroblast growth factor receptor 1-dependent transformation. *J Biol Chem* 2004; 279: 13285-13288
- 7 Diehl D, Hoeflich A, Wolf E, Lahm H. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 inhibits colony formation of colorectal cancer cells by IGF-independent mechanisms. *Cancer Res* 2004; 64: 1600-1603
- 8 Fridman R, Fuerst TR, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Kraus S, Komarek D, Liotta LA, Berman ML, Stetler-Stevenson WG. Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. *J Biol Chem* 1992; 267: 15398-15405
- 9 Choi YA, Lim HK, Kim JR, Lee CH, Kim YJ, Kang SS, Baek SH. Group IB secretory phospholipase A2 promotes matrix metalloproteinase-2-mediated cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 36579-36585
- 10 Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG Jr, Sun XJ, White MF. The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 4453-4465
- 11 Mukherji A, Janbandhu VC, Kumar V. HBx protein modulates PI3K/Akt pathway to overcome genotoxic stress-induced destabilization of cyclin D1 and arrest of cell cycle. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46: 37-44
- 12 Qin L, Liao L, Redmond A, Young L, Yuan Y, Chen H, O'Malley BW, Xu J. The AIB1 oncogene promotes breast cancer metastasis by activation of PEA3-mediated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 expression. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 5937-5950
- 13 Martin MD, Carter KJ, Jean-Philippe SR, Chang M, Mobashery S, Thiolloy S, Lynch CC, Matrisian LM, Fingleton B. Effect of ablation or inhibition of stromal matrix metalloproteinase-9 on lung metastasis in a breast cancer model is dependent on genetic background. *Cancer Res* 2008; 68: 6251-6259
- 14 Xia X, Serrero G. Multiple forms of p55PIK, a regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase, are generated by alternative initiation of translation. *Biochem J* 1999; 341 (Pt 3): 831-837
- 15 Garcia-Echeverria C, Sellers WR. Drug discovery approaches targeting the PI3K/Akt pathway in cancer. *Oncogene* 2008; 27: 5511-5526
- 16 Nagl F, Schönhof K, Seidler B, Mages J, Allescher HD, Schmid RM, Schneider G, Saur D. Retinoic acid-induced nNOS expression depends on a novel PI3K/Akt/DAX1 pathway in human TGW-nu-I neuroblastoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; 297: C1146-C1156
- 17 Park SJ, Sohn HY, Yoon J, Park SI. Down-regulation of FoxO-dependent c-FLIP expression mediates TRAIL-induced apoptosis in activated hepatic stellate cells. *Cell Signal* 2009; 21: 1495-1503
- 18 Chen Y, Guggisberg N, Jorda M, Gonzalez-Angulo A, Hennessy B, Mills GB, Tan CK, Slingerland JM. Combined Src and aromatase inhibition impairs human breast cancer growth in vivo and bypass pathways are activated in AZD0530-resistant tumors. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 3396-3405
- 19 Lee DH, Szczepanski MJ, Lee YJ. Magnolol induces apoptosis via inhibiting the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway in human prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2009; 106: 1113-1122
- 20 Mahalingam D, Mita A, Sankhala K, Swords R, Kelly K, Giles F, Mita MM. Targeting sarcomas: novel biological agents and future perspectives. *Curr Drug Targets* 2009; 10: 937-949

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕