

[文章编号] 1000-4718(2009)12-2371-05

PAR-2激动剂对肝癌细胞增殖及 Ca²⁺水平的影响

郑艳敏¹, 谢立群^{1△}, 赵军艳¹, 李轩¹, 陈小义², 陈莉², 周静¹, 李飞¹(武警医学院¹附属医院消化内科, ²细胞生物学教研室, 天津 300162)

[摘要] 目的: 研究 PAR-2 激动剂对人肝癌 HepG2 细胞增殖及细胞内 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_c) 的影响。方法: 培养人肝癌细胞 HepG2 分别利用 PAR-2 激动剂 SLIGKV-NH₂ 及反 PAR-2 激动肽 VKGILS-NH₂ 干预肝癌细胞生长, 用 Fura-2 荧光法测定肝癌细胞内 [Ca²⁺]_c, 用 MTT 法检测对肝癌细胞增殖能力的影响, 流式细胞术 (FCM) 检测细胞周期改变情况, RT-PCR 法检测 cyclinD₁ mRNA 表达变化。结果: 50 μmol/L SLIGKV-NH₂ 刺激 HepG2 细胞后, [Ca²⁺]_c 迅速短暂升高 ($P < 0.01$); G₀/G₁ 期比例明显降低, S 期和 G₂/M 期细胞比例和细胞增殖指数 (PI) 明显提高 ($P < 0.01$); cyclinD₁ mRNA 的表达显著增加 ($P < 0.01$)。SLIGKV-NH₂ 在 1-50 μmol/L 时可以促进 HepG2 细胞增殖, 呈剂量依赖性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。而 VKGILS-NH₂ 组与对照组相比差异无显著 ($P > 0.05$)。结论: PAR-2 激动剂在体外能通过激活 PAR-2 诱导 HepG2 细胞内 [Ca²⁺]_c 升高, 上调 cyclinD₁ mRNA 的表达, 加速 HepG2 细胞周期进程, 促进 DNA 合成, 促进肝癌细胞增殖。

[关键词] 蛋白酶激活受体-2 HepG2 细胞; 细胞增殖; 钙**[中图分类号]** R735**[文献标识码]** A

Effects of PAR-2 agonist peptide on proliferation and cytosolic calcium level in hepatoma cells

ZHENG Yan-min¹, XIE Li-qun¹, ZHAO Jun-yan¹, LI Xuan¹, CHEN Xiao-yi², CHEN Li², ZHOU Jing¹, LI Fei¹*(¹Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital, ²Department of Cell Biology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China. E-mail: xieliqun66@hotmail.com)*

[ABSTRACT] **AM:** To investigate the effects of PAR-2 agonist peptide on the proliferation and cytosolic calcium concentration ([Ca²⁺]_c) in human hepatoma cells HepG2. **METHODS** Human hepatoma cell line HepG2 was cultured. The cells were treated with PAR-2 agonist peptide SLIGKV-NH₂ and the reverse PAR-2 agonist peptide VKGILS-NH₂, respectively. The [Ca²⁺]_c of hepatoma cells were measured by microfluorimetric techniques based on calcium indicator fura-2/AM. The influences on proliferation of hepatoma cells were determined by MTT method. The changes of cell cycle were evaluated by flow cytometry, and the changes of cyclin D₁ mRNA expression were detected by RT-PCR. **RESULTS** After treated with 50 μmol/L SLIGKV-NH₂, a rapid rise of [Ca²⁺]_c in HepG2 cells was induced ($P < 0.01$), percent S phase, G₂/M phase and proliferation index (PI) of HepG2 cells were elevated ($P < 0.01$), and cyclin D₁ mRNA expression was significantly upregulated ($P < 0.01$). The proliferation rates of HepG2 cells treated with 1-50 μmol/L SLIGKV-NH₂ were significantly increased, and the effect was in a dose-dependent manner ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). No statistical significance of the difference between VKGILS-NH₂ and control group was observed ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** PAR-2 agonist peptide induces the rise of [Ca²⁺]_c in HepG2 cells, upregulates the expression of cyclin D₁ mRNA, accelerates the progress of cell cycle, promotes the synthesis of DNA and the proliferation of hepatoma cells via activating PAR-2 *in vitro*.

[KEY WORDS] Protease activated receptor-2 HepG2 cells; Cell proliferation; Calcium

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国常见高发且恶性程度较高的肿瘤之一, 其发病隐匿, 转移早, 预后差, 严重威胁人们的身体健康。

因此, 深入研究 HCC 发生、发展、转移和复发的分子机制及积极探索有效的治疗措施具有重要意义。蛋白酶激活受体-2 (protease-activated receptor 2,

[收稿日期] 2009-03-09

[修回日期] 2009-07-31

△ 通讯作者 E-mail: xieliqun66@hotmail.com

PAR-2)是近年来发现的一种新的 7次跨膜 G蛋白偶联受体超家族成员,可被胰蛋白酶、类胰蛋白酶、TF/VIIa(组织因子/活化的凝血因子 VII)复合物、活化的凝血因子 X(Xa)等激活。PAR-2裂解产生的新 N端充当“栓系配体”并激活 PAR-2本身^[1]。人工合成的 PAR-2激动剂,如序列为 SLGKV-NH₂的小分子多肽,可直接结合到受体第 2个域,模拟胰蛋白酶的作用而激活 PAR-2^[2,3]。近来研究表明,结肠癌组织中 PAR-2的表达高于正常组织,提示 PAR-2可能与结肠肿瘤的生物学特性关系密切^[4]。关于 PAR-2对 HCC细胞增殖及 [Ca²⁺]_i的影响,目前国内外尚未见报道。本研究通过体外培养人肝癌细胞株 HepG2,初步探讨了人工合成的 PAR-2激动剂 SLGKV-NH₂对肝癌细胞增殖及 [Ca²⁺]_i的影响。

材 料 和 方 法

1 材料

人肝癌细胞株 HepG2由中国科学院上海细胞生物研究所提供。细胞培养用 H-DMEM 培养基、胰蛋白酶购于 Gibco。优质胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购于中国医学科学院血液学研究所。纯度为 98% PAR-2激动剂(SLGKV-NH₂)和反 PAR-2激动肽(VKGLS-NH₂)购于美联(西安)生物科技有限公司。Fura-2/AM、二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购于 Sigma。Trizol试剂购于 Invitrogen。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购于大连宝生物工程有限公司。CyclinD₁引物序列由大连宝生物工程有限公司合成。

2 细胞培养及分组

细胞培养选用含有 12% 新生牛血清的 H-DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵育箱中培养。待细胞长满培养瓶底部 70% - 80%时消化传代,取对数生长期细胞用于实验。四甲基偶氮唑蓝(MTT)实验检测时,设空白组、对照组、SLGKV-NH₂组(浓度分别为 1、5、25、50 μmol/L)、VKGLS-NH₂(浓度为 50 μmol/L)。Fura-2荧光法、流式细胞术、RT-PCR 实验检测时设对照组、SLGKV-NH₂组(50 μmol/L)和 VKGLS-NH₂组(50 μmol/L)。

3 Fura-2 荧光法检测肝癌细胞内 [Ca²⁺]_i。

将细胞以 1×10⁶个接种于培养瓶中,培养 24 h后更换为无血清 H-DMEM 培养基培养 24 h,收集细胞,调整细胞密度为 1×10⁹ - 1×10¹⁰ cells/L,加入 Fura-2/AM(终浓度为 5 μmol/L),37℃恒温避光振荡 30 min,离心弃上清后将细胞重新悬浮于 Hanks

液中,使终浓度为 2×10⁹ cells/L,分别于加药前及加药后 2 min、3 min、4 min 采用日立 M-850型荧光分光光度计进行 [Ca²⁺]_i的荧光测定,激发波长为 340 nm、380 nm,发射波长为 510 nm。分别加入终浓度为 0.1% Triton X-100和 5 mmol/L EGTA 后测最大和最小荧光强度值。根据下列公式计算出 [Ca²⁺]_i: [Ca²⁺]_i(nmol/L) = Kd (F_D/F_S) (R - R_{min}) / (R_{max} - R)。式中 Kd为 Fura-2与 Ca²⁺反应的解离常数,37℃的生理条件下 Kd= 224 nmol/L; F_D和 F_S为零 Ca²⁺和 Ca²⁺饱和时 380 nm 激发光产生的荧光强度; R为实验观察到的荧光比值 (F_{340 nm} / F_{380 nm}), R_{max}和 R_{min}分别为最大和最小的荧光比值。在计算 [Ca²⁺]_i之前减去在没有负载 Fura-2的细胞中测到的自发荧光。以上实验重复 6次,以 6次实验结果的均值做统计学分析。

4 MTT检测细胞增殖

将 5×10⁷ cells/L细胞悬液接种于 96孔酶标板中,培养 24 h后更换为无血清 H-DMEM 培养基培养 24 h,然后施加不同处理因素刺激细胞,空白组只加培养基,对照组不加处理因素,每组细胞设 8个复孔,继续培养。24 h后,每孔加入 20 μL MTT(5 g/L溶于 PBS),置于 5% CO₂、饱和湿度的 37℃培养箱中继续培养 4 h,1 500 r/min离心 10 min,用力甩去培养液,加入 DMSO 150 μL/well。平板振荡仪振荡 10 min,使结晶充分溶解。在全自动酶标仪(Bio-Rad 550型)上测定吸光度值,测定波长为 490 nm,以空白孔调零。以不同处理因素为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制柱状图。

5 流式细胞术检测细胞周期改变

将 8×10⁷ cells/L细胞悬液接种于培养瓶中,培养 24 h后更换为无血清 H-DMEM 培养基 24 h,然后施加不同处理因素刺激细胞,继续培养 24 h后收集细胞,2 000 r/min离心 10 min,70%冷乙醇固定。测定时离心去除乙醇, PBS漂洗 2次,调整为 1 mL,加入 RNA酶消化,37℃水浴 30 min,制冷到 4℃,加入碘化丙啶(propidium iodide, PI),300目滤网过滤后用流式细胞仪及 Multicycle软件分析细胞周期,计算增殖指数(PI)值: PI = (S + G₂M) / (G₀G₁ + S + G₂M) × 100%。采用美国 BD公司生产的 Beckman coulter型流式细胞仪,激发光源为 2 mW 氩离子激发器,激发波长为 488 nm。以上实验重复 4次,以 4次实验结果的均值做统计学分析。

6 RT-PCR法检测 cyclinD₁ mRNA 表达变化

取对数生长期的细胞,以 8×10⁷ cells/L的密度接种于培养瓶中,培养 24 h后更换为无血清 H-DMEM 培养基 24 h,加药培养 24 h后,采用 Trizol

试剂从 HepG2 细胞中提取总 RNA 并逆转录成 cDNA。以紫外分光光度计测 RNA 的含量和纯度 (RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度比值为 1.8-2.0 之间)。以 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性 (28 S 和 18 S RNA 条带比值 ≥ 2.0)。应用 Omiga2.0 软件设计 PAR-2 基因的引物序列以及 PCR 扩增产物长度。CyclinD₁: 正义链 5'-CTGTCGCTG-GAGCCCGTGAAAAG-3', 反义链 5'-GAAGTT-GTTGGGGCTCCTCAGGTT-3' (PCR 产物长 405 bp)。以 β -actin 作为内参照, 正义链 5'-TGTTT-GAGACCTCAACACCC-3', 反义链 5'-AGCACT-GTGTGGCGTACAG-3' (PCR 产物长 540 bp)。用 PCR 仪 (Applied Biosystems) 进行基因扩增。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 1 min, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环扩增; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果用凝胶自动成像 2000 系统扫描, 取其积分值作为量化指标, 以特异性基因条带与 β -actin 基因条带的密度比值表示不同样本间的相对量。以上实验重复 3 次, 以 3 次实验结果

的均值做统计学分析。

7 统计学处理

用 SPSS 11.5 统计软件分析, 数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本均数的比较采用 *t* 检验, 多组均数比较用单因素方差分析加 *LSD-t* 检验。

结 果

1 SLIGKV-NH₂ 对 HepG2 [Ca²⁺]_c 的影响

50 μ mol/L SLIGKV-NH₂ 刺激 HepG2 细胞 2 min 时 [Ca²⁺]_c 迅速升高 ($P < 0.01$), 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 随后在 2 min 内逐渐下降, 最后降到基线水平, 而 50 μ mol/L VKG ILS-NH₂ 对 HepG2 细胞 [Ca²⁺]_c 的影响不明显 ($P > 0.05$), 与对照组相比差异无显著 ($P > 0.05$), 见表 1。

2 SLIGKV-NH₂ 对 HepG2 细胞增殖的作用

MTT 结果显示, SLIGKV-NH₂ 在 1-50 μ mol/L 时能促进肝癌细胞增殖, 呈浓度依赖性 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。而 50 μ mol/L VKG ILS-NH₂ 对细胞增殖能力的影响不明显, 与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$), 见图 1。

表 1 SLIGKV-NH₂ 及 VKG ILS-NH₂ 对 HepG2 细胞内 [Ca²⁺]_c 的影响

Tab 1 The effects of SLIGKV-NH₂ and VKG ILS-NH₂ on [Ca²⁺]_c in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	[Ca ²⁺] _c			
	0 min	2 min	3 min	4 min
Control	119.83 \pm 15.77	120.23 \pm 13.00	117.13 \pm 15.19	117.97 \pm 16.27
50 μ mol/L SLIGKV	118.92 \pm 13.46	270.13 \pm 13.43**##	181.37 \pm 16.15##	120.97 \pm 13.01##
50 μ mol/L VKG ILS	121.76 \pm 10.11	123.45 \pm 12.03	120.38 \pm 14.97	121.31 \pm 11.58

** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.01$ vs 0 min

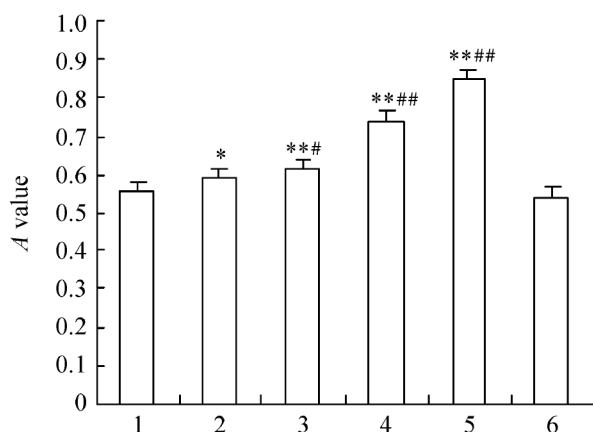


Fig 1 Effects of SLIGKV-NH₂ and VKG ILS-NH₂ on proliferation of HepG2 cells: 1: control; 2 SLIGKV 1 μ mol/L; 3 SLIGKV 5 μ mol/L; 4 SLIGKV 25 μ mol/L; 5 SLIGKV 50 μ mol/L; 6 VKG ILS 50 μ mol/L. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.01$ vs the SLIGKV 1 μ mol/L group

图 1 SLIGKV-NH₂ 及 VKG ILS-NH₂ 对 HepG2 细胞增殖的影响

3 细胞周期变化

50 μ mol/L SLIGKV-NH₂ 或 50 μ mol/L VKG ILS-NH₂ 刺激 HepG2 细胞 24 h 后, 对其细胞周期分析发现 (表 2), SLIGKV-NH₂ 组 G₀/G₁ 期细胞的百分比降低, 而 S 期、G₂M 期细胞百分比 (S%) 和细胞增殖指数 (PI) 明显增加, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.01$), 而 50 μ mol/L VKG ILS-NH₂ 组与对照组相比差异无显著 ($P > 0.05$), 提示经 SLIGKV-NH₂ 作用后, HepG2 细胞大量进入 S 期和 G₂M 期, 增殖活跃。

4 RT-PCR 法检测 cyclinD₁ mRNA 的表达变化

50 μ mol/L SLIGKV-NH₂ 处理细胞后, cyclinD₁ mRNA 表达量为 0.690 \pm 0.040 (以 β -actin 为内参照的相对灰度); 对照组 cyclinD₁ mRNA 表达量为 0.514 \pm 0.020 二者相比差异显著 ($n = 3$, $P < 0.01$)。而 50 μ mol/L VKG ILS-NH₂ 组 cyclinD₁ mRNA 表达量为 0.526 \pm 0.050 与对照组相比差异无显著 ($n = 3$, $P > 0.05$), 见图 2。

表 2 SLIGKV-NH₂ 及 VKGILS-NH₂ 对 HepG2 细胞周期的影响

Tab 2 The effects of SLIGKV-NH₂ and VKGILS-NH₂ on cell cycle in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

Group	Cell cycle (%)			PI
	G ₀ /G ₁	G ₂ M	S	
Control	79.12 ± 0.67	9.54 ± 0.34	11.34 ± 0.55	20.88 ± 0.67
50 μmol/L SLIGKV	57.85 ± 0.46*	13.20 ± 0.15**	28.95 ± 0.54*	42.15 ± 0.46*
50 μmol/L VKGILS	79.27 ± 0.85	9.51 ± 0.47	11.23 ± 0.54	20.73 ± 0.85

** P < 0.01 vs control

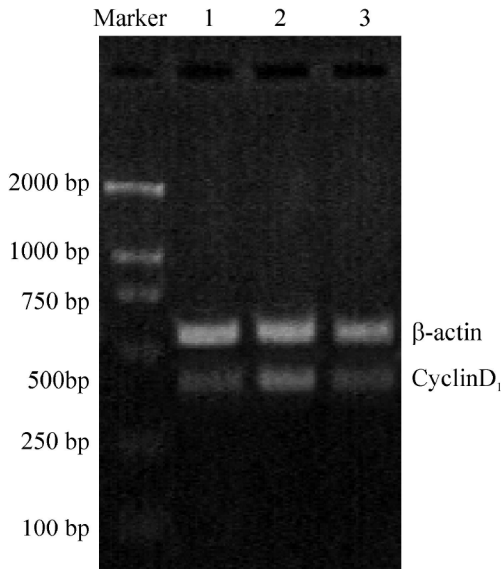


Fig 2 Effects of SLIGKV-NH₂ and VKGILS-NH₂ on cyclin D₁ mRNA expression of HepG2 cells. Lane 1: control; Lane 2: SLIGKV 50 μmol/L; Lane 3: VKGILS 50 μmol/L.

图 2 SLIGKV-NH₂ 和 VKGILS-NH₂ 对 HepG2 细胞 cyclinD₁ mRNA 表达的影响

讨 论

蛋白酶激活受体 (PARs) 是近来发现的 1 种新的 G 蛋白偶联受体家族, 广泛分布于哺乳动物体内多种组织和器官, 目前已先后发现有 PAR-1、PAR-2、PAR-3、PAR-4 4 种亚型, 其中 PAR-1、PAR-3 和 PAR-4 都是凝血酶受体, PAR-2 是胰酶受体。PAR-2 可被胰蛋白酶、类胰蛋白酶、TF/VIIa (组织因子/活化的凝血因子 VII) 复合物、活化的凝血因子 X (Xa) 等激活, 通过水解其 N-末端并产生新的 N-端, 后者再与受体本身第 2 个亚区的细胞外区结合使其不可逆地激活, 引起相应的细胞内信号转导过程^[5]。此外, 人工合成的含 5-6 个氨基酸的小分子多肽, 如 SLIGKV-NH₂, 可直接结合到受体第 2 个亚区, 模拟胰蛋白酶的作用激活 PAR-2。目前关于 PAR-2 与消化系统肿瘤的相关研究仅限于胃肠道肿瘤组织和细胞^[6-7], 关于 PAR-2 对 HCC 细胞增殖及 [Ca²⁺]_i 的影响, 目前国内外尚未见报道。

Ca²⁺ 作为细胞内重要的第二信使, 在体内参与肝癌细胞分化、增殖等多种生理过程的调节。本研究发现, SLIGKV-NH₂ 可引起 HepG2 [Ca²⁺]_i 迅速短暂升高, 随后逐渐下降至基线水平, 表明 PAR-2 激动剂通过激活 PAR-2 引起 HepG2 细胞 [Ca²⁺]_i 的增加。Uhl 等^[8] 研究表明, PAR-2 激活诱导的 [Ca²⁺]_i 增加是由磷脂酶 C (PLC) 和肌醇 1,4,5-三磷酸 (IP₃) 介导的。由此我们推测, PAR-2 激动剂与 HepG2 细胞膜上的 PAR-2 受体结合后, 可能通过活化 PLC, 水解磷脂酰肌醇二磷酸 (PIP₂), 产生 IP₃ 和二酰基甘油 (DAG), DAG 可直接激活蛋白激酶 C (PKC), IP₃ 与肌浆网、内质网上的 IP₃ 受体结合, 使 Ca²⁺ 通道开放, 钙库贮存的 Ca²⁺ 迅速释放, 使肝癌细胞内 [Ca²⁺]_i 增加, DAG 与 Ca²⁺ 激活 PKC。PKC 升高后可能通过 Ras-MAPK 通路和 NF-κB 通路影响肝癌细胞周期进程, 促进细胞分裂和增殖。HepG2 细胞内 [Ca²⁺]_i 从升高到逐渐恢复正常的原因可能是随着作用时间的增加, 内质网、肌浆网上的 Ca²⁺ 泵激活, 主动地将胞浆中的游离 Ca²⁺ 贮存到肌浆网、内质网的 Ca²⁺ 池中, 使 [Ca²⁺]_i 达到平衡, 恢复到基线水平。

本研究观察 SLIGKV-NH₂ 对 HepG2 细胞作用的量效关系, 结果发现不同浓度 SLIGKV-NH₂ (1-50 μmol/L) 均可促进肝癌细胞增殖, 且呈剂量依赖性, 提示 PAR-2 激活可能与 HCC 的增殖和侵袭相关。而反 PAR-2 激动肽 VKGILS-NH₂ 对肝癌细胞增殖无促进作用。由于 VKGILS-NH₂ 的分子量和氨基酸组成与 SLIGKV-NH₂ 完全相同, 只是氨基酸顺序不同, 在相同实验条件下无诱导肝癌细胞增殖的作用, 进一步证实了 SLIGKV-NH₂ 作用的特异性和可靠性。

细胞周期从 G₁ 期到 M 期存在多个调控点, 其中 G₁/S 调控点 (restriction point, R 点) 控制细胞从静止状态 (G₁ 期) 进入 DNA 合成期 (S 期), G₂/M 调控点是决定细胞一分为二的控制点。细胞一旦超过 R 点, 细胞周期的行进便处于不可逆状态, 可引起细胞

的异常增殖,加速肿瘤的恶性进展。CyclinD₁是调控细胞周期 G₁期向 S期转换的重要蛋白,加速细胞周期进程,促进增殖^[9]。CyclinD₁蛋白与细胞周期素依赖激酶 (cdk4、cdk6)结合后,形成二元复合物,使 Rb蛋白磷酸化。Rb一旦磷酸化,调控的转录激活因子 E2F等游离出来并进入核内,激活细胞进入 S期,开始 DNA的合成,使细胞由 G₁期到 S期从而进入增殖状态^[10-11]。CyclinD₁过表达使 cdk对 Rb的调节失常,解除 Rb介导的细胞停滞,使其细胞抑制效应失活;此外,过度表达的 cyclinD₁能直接与 Rb结合,通过磷酸化 Rb导致细胞生长失控和肿瘤发生^[12]。本实验结果显示:在 SLICKV-NH₂的诱导下,更多的 G₁期 HepG2细胞加速进入 S期和 G₂期, cyclinD₁ mRNA的表达显著增加,提示 PAR-2激动剂激活 PAR-2后可通过上调 cyclinD₁的表达加速肝癌细胞周期进程,促进肝癌细胞 DNA合成,提高肝癌细胞增殖活性,促进肝癌细胞增殖。

总之,我们的研究表明: PAR-2激活后能通过 Ca²⁺途径加速 HepG2细胞周期进程,促进 HepG2细胞增殖,提示 PAR-2可能在 HCC增殖和侵袭转移中发挥重要作用。我们后期的研究将进一步明确 PAR-2介导肝癌细胞增殖的分子机制、PAR-2对肝癌细胞侵袭转移的影响及其在肝癌细胞生物学方面的其它作用,为相应抗 HCC药物的开发及 HCC的治疗提供了一定的实验依据及理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] Al-Ani B, Hansen K, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptor-2: key role of an amino-terminal dipeptide residues of the tethered ligand for receptor activation [J]. *Mol Pharmacol* 2004, 65(1): 149-156
- [2] 郑艳敏, 赵军艳, 海欧, 等. 蛋白酶激活受体-2与组织因子和肿瘤的关系 [J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(5): 371-374
- [3] Kikland JG, Cottrell GS, Bunnett NW, et al. Agonists of protease-activated receptors 1 and 2 stimulate electrolyte secretion from mouse gallbladder [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 293(1): G335-G346
- [4] 钟朝辉, 焦岗军, 杨桑, 等. 蛋白酶激活受体-2在人类结直肠癌中表达的研究 [J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(1): 25-28
- [5] Uusitalo-Jarvinen H, Kurokawa T, Mueller BM, et al. Role of protease-activated receptor 1 and 2 signaling in hypoxia-induced angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27(6): 1456-1462
- [6] Caruso R, Pallone F, Fina D, et al. Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation [J]. *Am J Pathol* 2006, 169(1): 268-278
- [7] Damouli D, Gratio V, Devaud H, et al. Protease-activated receptor 2 in colon cancer [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 20927-20934
- [8] Ubl JJ, Grishina ZV, Sukhomlin TK, et al. Human bronchial epithelial cells express PAR-2 with different sensitivity to thrombin [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 282(6): L1339-L1348
- [9] 叶丽平, 温有锋, 聂海祺, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对卵巢癌 CAOV3细胞 cyclinD1及 GADD153表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(10): 1882-1885
- [10] Zebedee Z, Hara E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence [J]. *Oncogene* 2001, 20(58): 8317-8325
- [11] 任桂杰, 刘志方, 丁磊, 等. 9-顺-维甲酸对肺腺癌细胞 cyclinD1、cdk4转录的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(3): 359-362
- [12] DeGregori J. The Rb network [J]. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt16): 3411-3413