

***K-ras* 基因突变通过调节 E-cadherin/ β -catenin/p120 蛋白复合体形成和 RhoA 蛋白活性对结肠癌细胞株 Caco-2 转移的影响**

李景南¹, 李 潇^{1,2}, 钱家鸣¹, 路新卿¹, 杨 红¹

¹中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院消化内科, 北京 100730

²首都医科大学 附属北京朝阳医院急诊科, 北京 100020

通信作者: 钱家鸣 电话/传真: 010-65295019, 电子邮件: yuanjiah@gmail.com

摘要: 目的 观察 *K-ras* 基因突变通过调节 E-cadherin/ β -catenin/p120 蛋白复合体形成和 RhoA 蛋白活性对结肠癌细胞株 Caco-2 转移的影响, 探讨其促进结肠癌转移的相关机制。方法 将培养的结肠癌细胞株 Caco-2 分别给予空白质粒 phr-GFP 转染 (对照组)、*K-ras* 基因突变型质粒 phr-K-ras (Val12) 转染 (转染组)、phr-K-ras (Val12) 质粒转染 + 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径特异性抑制剂 PD98059 处理 (MAPK 抑制组) 和 phr-K-ras (Val12) 质粒转染 + 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI-3K) 途径特异性抑制剂 LY294002 处理 (PI-3K 抑制组), Transwell 细胞迁移实验检测细胞迁移率, 细胞免疫荧光检测 E-cadherin、 β -catenin 蛋白表达及其在细胞内定位, Western blot 检测细胞内 p120 蛋白的表达, 免疫沉淀检测与 E-cadherin 结合的 β -catenin 蛋白水平, Pull-down 实验检测 RhoA 蛋白活性。结果 转染组 Caco-2 细胞的迁移率为 $(19.8 \pm 5.6)\%$, 明显高于对照组的 $(14.0 \pm 4.2)\%$ ($P = 0.001$) 和 MAPK 抑制组的 $(15.8 \pm 1.2)\%$ ($P = 0.044$), 但与 PI-3K 抑制组的 $(17.5 \pm 2.8)\%$ 差异无统计学意义 ($P = 0.095$)。细胞免疫荧光检测结果显示, 转染组细胞膜上的 E-cadherin 和 β -catenin 蛋白表达减少。Western blot 检测结果显示, 转染组和 PI-3K 抑制组细胞内 p120 总蛋白表达减少。免疫沉淀检测结果显示, 转染组和 PI-3K 抑制组细胞内与 E-cadherin 结合的 β -catenin 蛋白水平下降。Pull-down 实验检测结果显示, 转染组细胞内的 RhoA 蛋白活性增加。结论 *K-ras* 基因突变可以促进结肠癌细胞株 Caco-2 的转移, 其可能是通过 MAPK 途径减少 E-cadherin/ β -catenin/p120 蛋白复合体形成, 增强 RhoA 蛋白活性来实现的。

关键词: *K-ras* 基因; 突变; E-cadherin/ β -catenin/p120 蛋白复合体; RhoA 蛋白; 结肠癌; 转移

中图分类号: R73.37 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2010)01-0046-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2010.01.012

Effects of *K-ras* Gene Mutation on Colon Cancer Cell Line Caco-2 Metastasis by Regulating E-cadherin/ β -catenin/p120 Protein Complex Formation and RhoA Protein Activity

LI Jing-nan¹, LI Xiao^{1,2}, QIAN Jia-ming¹, LU Xin-qing¹, YANG Hong¹

¹Department of Gastroenterology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

²Emergency Department, Beijing Chaoyang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China

Corresponding author: QIAN Jia-ming Tel/Fax: 010-65295019, E-mail: yuanjiah@gmail.com

ABSTRACT: Objective To explore the effects of *K-ras* gene mutation on colon cancer cell line Caco-2 metastasis by regulating E-cadherin/ β -catenin/p120 protein complex formation and RhoA protein activity. **Methods** *K-ras* wild-type colon cancer cell line Caco-2 was transiently transfected by phr-GFP vector (control

group), transfected by mutant *K-ras* gene phr-*K-ras* (Val12) vector (transfection group), transfected by mutant *K-ras* gene phr-*K-ras* (Val12) vector and treated by specific MAPK pathway inhibitor PD98059 (MAPK inhibition group), or transfected by mutant *K-ras* gene phr-*K-ras* (Val12) vector and treated by specific PI-3K pathway inhibitor LY294002 (PI-3K inhibition group), respectively. Cell migration was tested by Transwell experiment. E-cadherin and β -catenin protein expression and intracellular location were detected by cell immunofluorescence method. Intracellular p120 protein expression was detected by Western blot. β -catenin protein level which combined with E-cadherin was detected by immunoprecipitation. RhoA activity was analyzed by Pull-down assay. **Results** The Caco-2 cell migration rate was $(19.8 \pm 5.6)\%$ in transfection group, which was significantly higher than that in control group [$(14.0 \pm 4.2)\%$] ($P = 0.001$) and in MAPK inhibition group [$(15.8 \pm 1.2)\%$] ($P = 0.044$), but was not significantly different from that in PI-3K inhibition group [$(17.5 \pm 2.8)\%$] ($P = 0.095$). Immunofluorescence method showed that the E-cadherin and β -catenin stain located in the cell membrane decreased in transfection group. Western blot showed that the total intracellular p120 protein decreased in transfection group and PI-3K inhibition group. Immunoprecipitation data showed that β -catenin protein level combined with E-cadherin decreased in transfection group and PI-3K group. Pull-down test showed that RhoA protein activity was up-regulated in transfection group. **Conclusion** *K-ras* gene mutation stimulates the migration of colon cancer cell Caco-2, which may be achieved by decreasing the E-cadherin/ β -catenin/p120 protein complex formation via MAPK pathway and increasing the RhoA protein activity.

Key words: *K-ras* gene; mutation; E-cadherin/ β -catenin/p120 protein complex; RhoA protein; colon cancer; metastasis

Acta Acad Med Sin, 2010,32(1):46-50

近年来,随着人民生活方式的改变,我国结直肠癌发病率日益升高。在结直肠癌发生发展过程中,*K-ras* 基因突变是一个关键的分子事件,其主要通过丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径和磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI-3K)信号途径发挥相应作用^[1]。早期研究显示,*K-ras* 基因突变的结肠癌细胞株转移能力增强^[2],Campbell等^[3]在小鼠皮下接种*K-ras* 基因突变的结肠癌细胞株后,发现小鼠体内结肠癌远处转移率增高,转移瘤出现时间变早。临床研究亦证实,体内存在*K-ras* 基因突变的结肠癌患者预后较差^[4]。在肿瘤转移的过程中,以E-cadherin为中心的E-cadherin/ β -catenin/p120复合物及RhoA蛋白活性发挥重要作用,很多临床研究发现在结肠癌中E-cadherin和 β -catenin表达异常与肿瘤转移有关^[5],也有实验证明RhoA活性增加使细胞迁移能力增强,促进肿瘤转移的发生^[6],但具体机制均尚未明确。本研究观察了*K-ras* 基因突变通过调节E-cadherin/ β -catenin/p120蛋白复合物形成和RhoA蛋白活性对结肠癌细胞株Caco-2转移的影响,探讨了其促进结肠癌转移的相关机制。

材料和方法

材料 *K-ras* 野生型结肠癌细胞株Caco-2购自美国ATCC公司,本室保存;细胞培养基MEM/NEAA购自北京协和医学院基础医学研究所细胞中心,胎牛血清购自美国Gibco公司,细胞培养器皿均采用美国Corning公司产品;*K-ras* 突变型质粒phr-*K-ras* (Val12)和空白对照质粒phr-GFP由美国Daniel C. Chung教授惠赠,转染试剂采用美国Invitrogen公司的Lipofectamine[®] 2000;特异性抑制剂LY294002和PD98059购自美国Sigma公司;E-cadherin单克隆抗体和 β -catenin抗体购自美国BD公司,p120单克隆抗体购自美国EPITOMICS公司;RhoA活性检测试剂盒购自美国Cytoskeleton公司。

细胞培养 将Caco-2细胞置于含20%胎牛血清和2%青链霉素的MEM/NEAA培养基中常规培养,0.25%胰酶消化后,接种至不同细胞培养容器,供转染及相关实验使用。

质粒转染及分组 Caco-2细胞瞬时转染采用经典的脂质体Lipofectamine 2000方法,具体为:将Caco-2细胞培养于24孔培养板中,当细胞达到50%~

60%融合时进行转染,转染24至48h后进行相关实验。实验分为4组,对照组转染空白质粒 phr-GFP,转染组转染 *K-ras* 基因突变型质粒 phr-*K-ras* (Val12), MAPK 抑制组为转染 phr-*K-ras* (Val12) 质粒后加入 20 $\mu\text{mol/L}$ MAPK 途径特异性抑制剂 PD98059 处理 12 h, PI-3K 抑制组为 phr-*K-ras* (Val12) 质粒转染后加入 50 $\mu\text{mol/L}$ PI-3K 途径特异性抑制剂 LY294002 处理 12 h。

细胞迁移实验 采用 Transwell 细胞培养板, Caco-2 细胞消化后计数,接种数目相同的细胞至培养板,按上述方法转染质粒并分组,转染 20 h 向 Transwell 板的下槽加入含 10% FBS 培养基,4h 后胰酶消化下槽细胞并计数转移至下槽内的细胞总数。

细胞免疫荧光和 Western blot 检测 对照组和转染组 Caco-2 细胞转染 24 h 后,予 -20°C 预冷过夜的冰丙酮固定细胞后,加 100 μl 正常山羊血清, 37°C 避光封闭 30 min,分别滴加 1:500 的 E-cadherin 抗体和 β -catenin 抗体 50 μl , 37°C 避光孵育 2 h,加入罗丹明标记山羊抗小鼠 IgG, 37°C 避光孵育 30 min,加入 20 μl 含 DAPI 的封片剂封片后,荧光显微镜下观察。

使用细胞裂解液 [50 mmol/L HEPES (pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 2.5 mmol/L EGTA, 1% NP-40 和 1 mmol/L 蛋白酶抑制剂] 提取不同处理的 4 组 Caco-2 细胞总蛋白,测定蛋白浓度后将 50 μg 蛋白由 7% NuPAGE 聚丙烯胶分离并转移至 PVDF 膜, p120 抗体室温杂交 4 h,以 β -actin 作为对照,杂交后 PVDF 膜在室温和抗兔 IgG HRP 孵育 1 h, ECL 方法显影、曝光检测结合蛋白。

免疫沉淀检测 各组细胞提取总蛋白后,将 500 μg 细胞总蛋白与 3 μg E-cadherin 抗体 4°C 孵育过夜,然后加入蛋白 A/G 微粒 4°C 孵育 2 h,蛋白微粒用裂解液洗 4 次,加入 SDS-PAGE 胶的上样缓冲液,煮沸变性后,采用 Western blot 检测与 E-cadherin 结合的 β -catenin。

RhoA 活性测定 采用 Pull-down 方法,按照 RhoA 活性测定试剂盒 RHO ACTIVATION ASSAY BIOCHEM KIT 说明,采用 1:500 抗 RhoA 抗体应用 Western blot 方法检测 4 组不同处理 Caco-2 细胞的总 RhoA 和活性 RhoA 蛋白。

统计学处理 采用 SPSS 11.2 统计软件,细胞迁移率的结果均以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

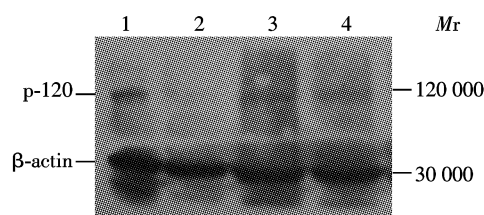
细胞迁移率检测结果 转染组 Caco-2 细胞的迁移率为 $(19.8 \pm 5.6)\%$,明显高于对照组的 $(14.0 \pm 4.2)\%$ ($P = 0.001$) 和 MAPK 抑制组的 $(15.8 \pm 1.2)\%$ ($P = 0.044$),但与 PI-3K 抑制组的 $(17.5 \pm 2.8)\%$ 差异无统计学意义 ($P = 0.095$)。

E-cadherin、 β -catenin 的表达及其在细胞内定位 细胞免疫荧光检测结果显示, E-cadherin 和 β -catenin 蛋白主要分布在细胞膜上,转染组的 E-cadherin 和 β -catenin 蛋白表达与对照组相比减少 (图 1)。

p120 蛋白表达情况 Western blot 检测结果显示,各组细胞均在相对分子质量为 120 000 处见到 1 条与 p120 相符的深浅不一的清晰条带,在 40 000 处见到 1 条与 β -actin 相符的条带,其中转染组和 PI-3K 抑制组的条带较浅 (图 2)。

与 E-cadherin 结合的 β -catenin 蛋白水平 免疫沉淀检测结果显示,各组细胞均在相对分子质量为 95 000 处见到 1 条与 β -catenin 相符的深浅不一的清晰条带,在 25 000 处见到 1 条与抗体轻链相符的条带,其中转染组和 PI-3K 抑制组的条带较浅 (图 3)。

RhoA 蛋白活性检测结果 Pull Down 法蛋白活性检测结果显示,各组细胞均在相对分子质量为 30 000 处见到 1 条与 RhoA 相符的清晰条带,每组细胞均包括总 RhoA 蛋白和活性 RhoA 蛋白 2 个条带,各组间 RhoA 总蛋白表达之间没有差别,但对照组活性 RhoA 蛋白减少 (图 4)。

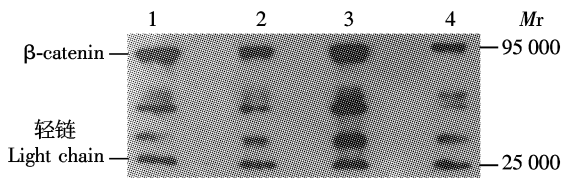


1: 对照组; 2: 转染组; 3: MAPK 抑制组; 4: PI-3K 抑制组; M_r : 相对分子质量

1: control group; 2: transfection group; 3: MAPK inhibition group; 4: PI-3K inhibition group; M_r : relative molecular mass

图 2 Western Blot 检测 Caco-2 细胞总 p120 蛋白的表达

Fig 2 Western blot detects the p120 protein expression in Caco-2 cell

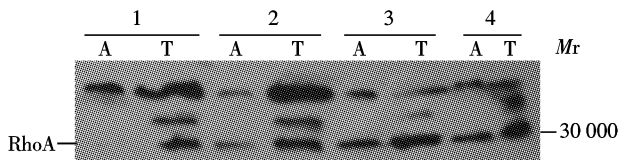


1: 对照组; 2: 转染组; 3: MAPK 抑制组; 4: PI-3K 抑制组

1: control group; 2: transfection group; 3: MAPK inhibition group; 4: PI-3K inhibition group

图 3 免疫沉淀检测 Caco-2 细胞内与 E-cadherin 结合的 β -catenin 蛋白水平

Fig 3 Immunoprecipitation detects the β -catenin protein level combined with E-cadherin in Caco-2 cell



1: 转染组; 2: 对照组; 3: PI-3K 抑制组; 4: MAPK 抑制组; A: 活性 RhoA 蛋白; T: 总 RhoA 蛋白

1: transfection group; 2: control group; 3: PI-3K inhibition group; 4: MAPK inhibition group; A: active RhoA protein; T: total RhoA protein

图 4 Pull down 法检测 Caco-2 细胞内活性 RhoA 蛋白水平

Fig 4 Pull-down assay analyzes the RhoA activity protein level in Caco-2 cell

讨 论

肿瘤细胞转移是一个复杂的过程, 主要包括细胞黏附、细胞运动和突破基底膜 3 方面, 其中细胞黏附的破坏是启动转移的重要机制。在维系细胞黏附方面, 以 E-cadherin 为中心的 E-cadherin/ β -catenin/p120 复合体发挥重要作用。这一复合体主要位于上皮细胞的细胞膜上, 是其介导同种细胞间黏附及信号传导的功能单位^[7]。同时肿瘤细胞的迁移也需要细胞运动能力的增加, 目前认为 RhoA 蛋白作为 Ras 超家族中的一员, 活性状态 RhoA-GTP 的增加与细胞运动有关^[8], 因此本研究通过观察 *K-ras* 基因转染后对结肠癌细胞株 Caco-2 黏附相关蛋白 E-cadherin、 β -catenin 和 p120 蛋白水平及其复合体形成的影响, 以及对 RhoA 活性的影响, 从细胞水平初步探讨了癌基因 *K-ras* 促进结肠癌转移的可能机制。

Smakman 等^[9] 研究显示, *K-ras* 基因可促进结肠癌转移的发生。*K-ras* 基因促进肿瘤细胞的转移是通

过多种信号途径起作用的, 主要包括 MAPK 和 PI-3K 途径, 不同文献报道各异^[3,10]。本研究结果显示, *K-ras* 基因转染后 Caco-2 细胞的迁移率明显增加, 这一作用可被 MAPK 途径特异性抑制剂 PD98059 所抑制, 而 PI-3K 途径特异性抑制剂 LY294002 的抑制作用则并不明显, 表明阻断 MAPK 和 PI-3K 两条途径均能抑制 *K-ras* 基因促进 Caco-2 细胞迁移的作用, 但以 MAPK 途径抑制剂的作用明显。

有研究显示, 结肠癌中 E-cadherin 和 β -catenin 表达异常与肿瘤转移有关, 但具体机制尚不清楚^[11-12]。Lilien 等^[13] 认为: β -catenin 的磷酸化水平决定其与 E-cadherin 的结合情况, 而 β -catenin 的磷酸化水平受多种因素影响, *K-ras* 基因可能是其中之一。本研究首先采用细胞免疫荧光方法对 Caco-2 转染癌基因 *K-ras* 后 E-cadherin 蛋白和 β -catenin 蛋白在细胞膜上的表达情况进行了检测, 结果发现 *K-ras* 转染可使细胞膜上 E-cadherin 和 β -catenin 表达明显减少; Western blot 检测结果也同样表明, *K-ras* 基因转染后 p120 蛋白表达减少; 进一步免疫沉淀则证实 *K-ras* 基因转染可减少与 E-cadherin 结合的 β -catenin 蛋白水平; 提示 *K-ras* 基因转染可影响 E-cadherin/ β -catenin/p120 复合体形成, 破坏细胞之间的紧密连接和黏附作用, 启动和促进肿瘤转移, 该作用主要是通过 MAPK 途径实现的。

本研究还采用免疫沉淀方法检测了与 E-cadherin 结合的 p120 蛋白, 但未检测出相关蛋白, 推测其原因可能为与 E-cadherin 结合的 p120 蛋白量较少, 导致常规免疫沉淀方法无法检测有关。p120 与 β -catenin 的不同之处在于, β -catenin 分布在细胞膜和胞浆, 一方面维系着细胞的紧密连接, 同时从细胞膜进入胞浆后, 作为信息传递介质可激活结肠癌变中起重要作用的 Wnt 途径, 因此在结肠癌中处于高表达状态^[14]; 而 p120 目前认为主要存在于细胞膜并与 E-cadherin 和 β -catenin 结合形成复合体, 在复合体中的蛋白量明显低于 β -catenin^[15-16]; 故本研究结果既然显示 *K-ras* 可以减少 p120 表达, 推测其也会使 E-cadherin/ β -catenin/p120 复合体上的 p120 量减少, 同样影响复合体形成。

Liao 等^[17] 研究证实, *K-ras* 基因一方面可通过影响 E-cadherin/ β -catenin/p120 复合体形成破坏细胞间的紧密连接, 另一方面也可同时促进肿瘤细胞运动能力的增加。Takami 等^[18] 研究发现在结直肠癌中, RhoA 活性的增加与肿瘤淋巴结转移有关。本研究检

测了 *K-ras* 基因转染后对 Caco-2 细胞中 RhoA 活性的影响, 结果发现其对总 RhoA 蛋白量影响不大, 但增加了 RhoA 活性蛋白的表达水平, 并且这一作用并不能被 MAPK 和 PI-3K 的特异性抑制剂所抑制, 提示 *K-ras* 基因促进结肠癌转移的另一机制与 RhoA 活性蛋白水平上调, 促进肿瘤细胞运动有关, 该作用并非通过 *K-ras* 基因经典的 MAPK 或 PI-3K 途径, 可能是通过其他信号传导途径实现的。有研究认为 *K-ras* 基因可能是通过 p120 作为中间蛋白调节 RhoA 蛋白活性^[19-20], 但其相关信号途径尚需进一步研究。

综上所述, 本研究观察了 *K-ras* 基因突变调节 E-cadherin/ β -catenin/p120 蛋白复合体形成和 RhoA 蛋白活性对结肠癌细胞株 Caco-2 转移的影响, 结果发现 *K-ras* 基因突变可促进结肠癌细胞株 Caco-2 的转移, 其可能是通过 MAPK 途径减少 E-cadherin/ β -catenin/p120 蛋白复合体形成, 增强 RhoA 蛋白活性来实现的。

(本文图 1 见插图第 3 页)

参 考 文 献

- [1] Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis [J]. *Biol Chem*, 2005, 386(3):193-205.
- [2] Bondy GP, Wilson S, Chambers AF. Experimental metastatic ability of H-ras-transformed NIH3T3 cells [J]. *Cancer Res*, 1985, 45(12 Pt 1):6005-6009.
- [3] Campbell PM, Der CJ. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2004, 14(2):105-114.
- [4] Conlin A, Smith G, Carry FA, *et al.* The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma [J]. *Gut*, 2005, 54(9):1283-1286.
- [5] Jeanes A, Cottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression [J]? *Oncogene*, 2008, 27(55):6920-6929.
- [6] Fritz G, Kaina B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006, 6(1):1-14.
- [7] Schlüter K, Gassmann P, Enns A, *et al.* Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential [J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(3):1064-1073.
- [8] Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, *et al.* Rho GTPase function in tumorigenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1796(2):91-98.
- [9] Smakman N, Borel Rinkes IH, Voest EE, *et al.* Control of colorectal metastasis formation by K-Ras [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1756(2):103-114.
- [10] Georgieva M, Krasteva M, Angelova E, *et al.* Analysis of the K-ras/B-raf/Erk signal cascade, p53 and CMAP as markers for tumor progression in colorectal cancer patients [J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(1):3-11.
- [11] Kwak JM, Min BW, Lee JH, *et al.* The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2007, 50(11):1873-1880.
- [12] Choi HN, Kim KR, Lee JH, *et al.* Serum response factor enhances liver metastasis of colorectal carcinoma via alteration of the E-cadherin/beta-catenin complex [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(1):57-63.
- [13] Lilien J, Balsamo J. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(5):459-465.
- [14] Li J, Mizukami Y, Zhang X, *et al.* Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3 [J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4):1907-1918.
- [15] Bellovin DI, Bates RC, Muzikansky A, *et al.* Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23):10938-10945.
- [16] Yanagisawa M, Anastasiadis PZ. p120 catenin is essential for mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness [J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(7):1087-1096.
- [17] Liao J, Planchon SM, Wolfman JC, *et al.* Growth factor-dependent AKT activation and cell migration requires the function of c-K (B) -Ras versus other cellular ras isoforms [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(40):29730-29738.
- [18] Takami Y, Higashi M, Kumagai S, *et al.* The activity of RhoA is correlated with lymph node metastasis in human colorectal cancer [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(2):467-473.
- [19] Yanagisawa M, Huveldt D, Kreinest P, *et al.* A p120 catenin isoform switch affects Rho activity, induces tumor cell invasion, and predicts metastatic disease [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(26):18344-18354.
- [20] Lu Q, Longo FM, Zhou H, *et al.* Signaling through Rho GTPase pathway as viable drug target [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(11):1355-1365.

(收稿日期: 2009-08-24)