

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.04.01

• 基础研究 •

nm23-H₁ 基因转染逆转人高转移大细胞肺癌恶性表型分子机制的实验研究

李印 周清华 孙芝琳 孙泽芳 王艳萍 覃扬 朱文 陈晓禾

【摘要】 背景与目的 nm23-H₁ 是公认的肿瘤转移抑制基因。我们的前期研究结果发现 nm23-H₁ 基因可明显抑制人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 中细胞外信号调节激酶 ERK1/2 的活性。本研究旨在探讨肿瘤转移抑制基因 nm23-H₁ 及外源性 ERK1/2 通路抑制剂 U0126 对人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981 中 ERK1/2 及其细胞恶性生物学行为的影响,为阐明 nm23-H₁ 基因调控肺癌转移相关信号传导通路的分子机制提供实验依据。方法 将稳定转染 nm23-H₁ 基因的人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981-nm23-H₁、原代细胞株 L9981(nm23-H₁ 基因杂合性缺失)和转染空载体细胞株 L9981-PLXSN 培养传代,应用蛋白印迹法(Western blot)和免疫沉淀法,检测应用 U0126(40 μmol/L,处理细胞 20 min)处理后三个肺癌细胞株中总 ERK1/2 和双磷酸化 ERK1/2 表达水平的变化;应用 MTT 法及改良 Boyden 小室法分别检测三个肺癌细胞株应用 U0126 处理后细胞体外增殖活性及侵袭能力的变化。结果 L9981-nm23-H₁ 细胞株磷酸化 ERK1/2 表达水平、ERK1/2 相对活性经 U0126 处理后均显著低于 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株($P < 0.01$),而 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株间磷酸化 ERK1/2 表达水平、ERK1/2 相对活性比较均无显著性差异($P > 0.05$);三个肺癌细胞株总 ERK1/2 水平处理后比较均无明显变化,差异均无显著性($P > 0.05$);L9981-nm23-H₁ 细胞株体外增殖能力及侵袭力均显著低于 L9981 细胞株和 L9981-PLXSN 细胞株($P < 0.01$);U0126 能显著下调 L9981 细胞株体外增殖活性及侵袭能力($P < 0.01$)。结论 阻断 L9981 细胞株中 ERK1/2 的激活后可发生与转染 nm23-H₁ 基因相似的细胞生物学行为的变化,即细胞的体外增殖能力及侵袭力均显著降低,提示 nm23-H₁ 基因转染逆转人高转移大细胞肺癌恶性表型的分子机制可能与其下调 ERK1/2 信号传导通路中关键激酶 ERK1/2 的活性有关。

【关键词】 人高转移大细胞肺癌细胞株 nm23-H₁ 基因 ERK U0126 增殖 侵袭

【中图分类号】 R73-3

Experimental study on molecular mechanism of nm23-H1 gene transfection reversing the malignant phenotype of human high-metastatic large cell lung cancer cell line LI Yin, ZHOU Qinghua, SUN Zhilin, SUN Zefang, WANG Yanping, QIN Yang, ZHU Wen, CHEN Xiaohu. Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology of Sichuan Province and Department of Thoracic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

Corresponding author: ZHOU Qinghua, E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn

【Abstract】 Background and objective nm23-H1 gene is a well-known tumor metastasis suppression gene. Our previous study has found that transfection of wild type nm23-H1 gene can significantly downregulate the ERK1/2 activity of human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981. The aim of this study is to investigate the influence of nm23-H1 and exogenous ERK1/2 pathway inhibitor U0126 on the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) of human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981 and its malignant biological behaviors. **Methods** The expressive levels of total-ERK1/2, dually phosphorylated ERK1/2 and ERK1/2 relative activity of the human high-metastatic large cell lung cancer cell lines, L9981 (parent cell line with nm23-H1 gene hetero-deletion), L9981-nm23-H1 (transfected with nm23-H1 gene) and L9981-PLXSN (transfected with vector) were detected by Western blot and immunoprecipitation technique after treating with U0126 (40 μmol/L for 20 minutes). The *in vitro* proliferative and invasive abilities among the

above three lung cancer cell lines were determined by MTT and improved Boyden chamber methods. **Results** The phosphorylated ERK1/2 expression level and relative activity in L9981-nm23-H1 lung cancer cell line were remarkably lower than those in L9981 and L9981-PLXSN lung cancer cell lines after being treated with U0126 ($P < 0.01$), but there was no significant difference between L9981 and L9981-PLXSN lung cancer cell lines. No significant difference of total ERK1/2 expression level was observed among the three lung cancer cell lines ($P > 0.05$) after being treated with U0126. The *in vitro* proliferation and invasion of L9981-nm23-H1 lung cancer cell line were remarkably lower than those of L9981 and L9981-PLXSN lung cancer cell lines ($P < 0.01$), but no significant difference was found between L9981 and L9981-PLXSN lung cancer cell lines ($P > 0.05$); U0126 could significantly down-regulate the *in vitro* proliferation and invasion of L9981 lung cancer cell line ($P < 0.01$). **Conclusion** Blocking the activity of ERK1/2 in L9981 lung cancer cell line and transfecting the nm23-H1 gene into the L9981 lung cancer cell line may produce similar cell biological behavior changes, namely the significant reduction of *in vitro* proliferation and invasion of L9981 lung cancer cell line. These results indicate that the molecular mechanism which nm23-H1 gene reverses invasion and proliferation of the human high-metastatic large cell lung cancer cell line may be related to its effects of down-regulating the activity of the key kinase ERK1/2 of Ras-to-MAPK signal transduction pathway.

【Key words】 Human high-metastatic lung cancer cell line nm23-H1 gene ERK U0126 Proliferation Invasion

This work was supported by a grant from the Key Project of National Natural Science Foundation of China (to ZHOU Qinghua) (No. 30430300).

nm23-H₁ 基因作为公认的肿瘤转移抑制基因,其功能和作用机制正被深入研究,已有的研究结果证实, nm23-H₁ 基因具有酶的活性,主要包括核苷二磷酸激酶活性(NDPK)、组氨酸激酶活性和一系列其它的蛋白激酶活性^[1],推测 nm23-H₁ 的磷酸化参与细胞对信号反应的调节,直接或间接影响细胞内的信号传递,从而发挥其肿瘤转移抑制作用。我们前期工作已证实 nm23-H₁ 基因可以抑制细胞外信号调节激酶 ERK1/2 的活性,推测 nm23-H₁ 基因可能与 MAPK/ERK 细胞信号转导通路有关^[2]。本实验在此研究基础上,进一步研究利用外源性 ERK 通路特异性阻断剂阻断细胞 MAPK/ERK 通路后所发生的细胞生物学行为的变化,深入讨论 nm23-H₁ 基因对 MAPK/ERK 通路的影响,从而揭示 nm23-H₁ 基因作为肿瘤转移抑制基因发挥其作用的相关信号传导通路的分子调节机制。

1 材料和方法

1.1 实验用细胞系及其培养 L9981(缺失 nm23-H₁ 基因的原代肺癌细胞株)、L9981-nm23-H₁ (L9981 转染了 nm23-H₁ 基因后的细胞株)、L9981-PLXSN (L9981 转染了空载体后的细胞株)均为本实验室构建和筛选的人高转移大细胞肺癌细胞株^[2],用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2 主要试剂 p44/42 MAP kinase antibody kit 购自新英格兰 Bio lab 公司; MEK1/2 特异性抑制剂 U0126 购自 Promega 公司; Boyden 小室购自美国

Millipore 公司; ECM 购自 Sigma 公司; PVDF 购自美国 Millipore 公司。

1.3 细胞裂解物的制备 细胞接种于中方瓶,生长至 70%~80% 时(对数生长期),经血清饥饿 24 h 使其生长同步化,加入 40 μmol/L 的 U0126,处理细胞 20 min 后弃培养基(对照组加入等体积的溶剂 DMSO,同步处理),用冰预冷的磷酸盐缓冲液冲洗三次,加入冰预冷的细胞裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1% Triton, 2.5 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L β-glycerolphosphate, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mg/L leupeptin)和 1 μmol/L 的 PMSF,充分作用 5 min 后刮取收集细胞,超声破碎 4 次,每次 5 s, 10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清分装, -80℃ 贮存备用。Bradford 法测定细胞提取物的蛋白浓度。

1.4 Western blot 法检测磷酸化的 ERK1/2 及总 ERK1/2 表达水平 ERK1/2 存在磷酸化(有活性)与非磷酸化(无活性)两种状态,以特异性识别双磷酸化 ERK1/2(phospho-p44/42 MAPK)的抗体检测磷酸化的 ERK1/2 的量;以抗总 ERK1/2 (p44/42 MAPK-phosphorylation state independent) 抗体检测总 ERK1/2 的量为内对照。细胞裂解物于 10% 十二烷基硫酸钠 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳后,垂直电泳转移槽中转移至 PVDF 膜上, TBS 洗后室温下封闭液中封闭 1 h, TBST 洗后与抗磷酸化 ERK1/2 抗体(1:1000 稀释液)4℃ 下反应过夜, TBST 洗 3 次,加入抗兔 IgG-HRP 二抗耦联 HRP 的抗生物素抗体(1:

500) 室温下孵育 1 h, 洗膜后加 ECL 发光试剂检测阳性信号。检测完磷酸化 ERK1/2 的膜以免疫印迹清除缓冲液 (50 mmol/L DTT, 2% SDS, 62.5 mmol/L Tris-HCl) 于 50℃ 洗膜 30 min, 随后用抗总 ERK1/2 抗体重复上述步骤, 检测阳性信号作为内对照, 应用 Bio-rad 2000 凝胶图像采集系统对 X 线胶片上的条带进行灰度扫描, 以其积分光密度值 IOD 大小反应信号的相对强弱, 即相对的表达量大小。每组实验独立重复 3 次。

1.5 非放射性免疫沉淀法作 ERK1/2 活性分析 取 400 μL 细胞裂解物, 加入 15 μL 重悬的固定化 Phospho-p42/44 MAPK 单克隆抗体, 4℃ 下轻摇孵育过夜。4℃ 12 000 r/min 离心 30 s。先后用 500 μL 1 \times 裂解缓冲液和 500 μL 1 \times 激酶缓冲液各冲洗两次, 为保持酶的活性, 以上操作均在冰上进行。加入 50 μL 1 \times 激酶缓冲液和 200 $\mu\text{mol/L}$ ATP 及 2 μg Elk-1 融合蛋白, 30℃ 孵育 30 min, 加入 25 μL 3 \times SDS 样品缓冲液终止反应, 100℃ 煮 5 min, 离心 2 min 后 SDS 胶上样电泳。电泳, 转膜, 杂交及 ECL 化学发光法同上, 抗 Elk-1 抗体稀释度为 1:1000。每组独立实验重复 3 次。分析方法同上。

1.6 四唑盐比色法 (MTT) 细胞体外增殖活性 对数生长期的细胞在无血清培养基中饥饿 24 h 后以每 200 μL 5 $\times 10^3$ 个细胞的浓度接种于 96 孔板中, 在含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养基中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 弃培养基, 加入相应处理因素, 终体积为 200 μL , 每日更换培养基。标准条件下培养 72 h 后加入 MTT (5 g/L 溶于生理盐水中), 每孔 20 μL , 37℃ 培养 4 h 后弃上清, 加入 DMSO 150 μL 37℃ 避光振荡 10 min, 30 min 内上酶标仪, 选择 570 nm 测光密度值 (OD 值), OD 值表示细胞体外增殖活性大小。实验共分 5 组: L9981 组、L9981-nm23-H₁ 组、L9981-PLXSN 组、L9981 U0126 (60 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、L9981 溶剂对照组。每组设 4 个复孔。

1.7 改良 Boyden 小室法测定细胞体外侵袭能力 实验分组同上。采用改良的 Boyden 小室法, 将 2~8℃ 下过夜融化的 ECM 胶稀释后, 每个 Boyden 小室底膜上加入 90 μL 的 ECM (为使胶完全均匀铺设于小室底从而形成均匀一致的膜, 可分三次加入), 常温下紫外灯消毒 2 h。于 Boyden 小室下层小室每孔加入过滤的 NIH-3T3 无血清培养液 300 μL 及 0.2% BSA 1640 300 μL 混合液; 选择对数生长期的细胞用无血清 1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养 16 h; 弃培养基, 加入适量 0.25% 的胰蛋白酶消化后用

0.2% BSA RPMI1640 培养液充分吹打成单个细胞悬液, 计数; 于 Boyden 小室上层小室内每室分别加入 1 $\times 10^5$ 个细胞 (200 μL 细胞悬液), 同时每室分别加入不同浓度的 U0126 和 DMSO 溶液各 200 μL ; 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 20 h 后取出小室, 用棉签拭纸仔细擦掉小室内的细胞和人工基底膜, 中性福尔马林固定后, 常规 HE 染色, 100 \times 光镜下每室随机选取 5 个视野计数穿过小室底膜的细胞数, 表示细胞侵袭能力的大小。每组设 3 个复孔。

1.8 统计学处理 采用 SPSS11.0 对所得数据进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对服从正态分布的资料分别进行 *F* 或 *Q* 检验, 否则采用秩和检验; 计数资料用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 U0126 对三个人肺癌细胞株中磷酸化 ERK1/2 表达水平、总 ERK1/2 表达水平影响的比较 与 DMSO 处理组相比较, 经 U0126 处理的 L9981、L9981-PLXSN 和 L9981-nm23-H₁ 细胞株中 ERK1/2 表达水平均明显降低 ($P = 0.000$); 而总 ERK1/2 表达水平无论是 DMSO 处理还是 U0126 处理, 三个细胞株间比较均无明显变化, 差异无显著性 ($P = 0.485$) (图 1)。

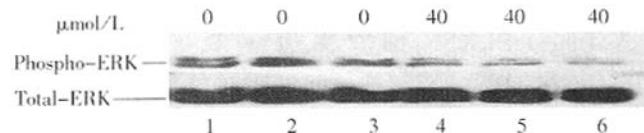


图 1 U0126 对三个人高转移大细胞肺癌细胞株中磷酸化 ERK1/2 和总 ERK1/2 表达水平的影响

Fig 1 Comparison of phospho-ERK1/2 and total-ERK1/2 expression levels in human high-metastatic large cell lung cancer cell lines treated with U0126

DMSO treated groups: 1. L9981-PLXSN; 2. L9981; 3. L9981-nm23-H₁; U0126 treated groups: 4. L9981-PLXSN; 5. L9981; 6. L9981-nm23-H₁

无论是 DMSO 处理还是 U0126 处理, L9981-nm23-H₁ 细胞株磷酸化 ERK1/2 表达水平均显著低于 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株 ($P = 0.000$), 而 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株间磷酸化 ERK1/2 表达水平比较均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 U0126 对三个人肺癌细胞株中 ERK1/2 相对活性的影响 与 DMSO 处理组相比较, 经 U0126 处理的 L9981、L9981-PLXSN 和 L9981-nm23-H₁ 细胞株中 ERK1/2 相对活性显著降低 ($P = 0.000$); 两两比

较;L9981-nm23-H₁ 细胞株 ERK1/2 相对活性均显著低于 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株($P=0.000$);而 L9981 和 L9981-pLXSN 细胞株间 ERK1/2 相对活性比较均无显著性差异($P>0.05$)(图 2)。

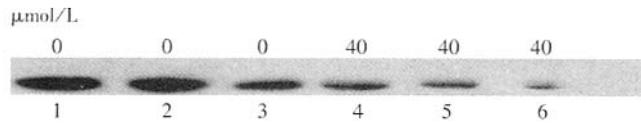


图 2 U0126 对三个人高转移大细胞肺癌细胞株中 phospho-Elk-1 表达水平的影响

Fig 2 Comparison of phospho-Elk-1 expression level in human high-metastatic large cell lung cancer cell lines treated with U0126
DMSO treated groups: 1. L9981-PLXSN; 2. L9981; 3. L9981-nm23-H₁; U0126 treated groups: 4. L9981-PLXSN; 5. L9981; 6. L9981-nm23-H₁

2.3 U0126 对三个人肺癌细胞株体外增殖活性的影响 将 U0126(60 μmol/L)和转染 nm23-H₁ 基因作为两个独立因素分别作用于人高转移大细胞肺癌原代细胞株 L9981 后,其细胞体外增殖活性均较处理前显著降低($P=0.000$)。F 检验结果显示,三个细胞株间体外增殖活性处理前或处理后比较均有非常显著性差异($P=0.000$);两两比较:L9981-nm23-H₁ 细胞株体外增殖活性处理前或处理后均显著低于 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株 ($P=0.000$),而 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株间细胞体外增殖活性处理前或处理后比较均无显著性差异($P>0.05$)(图 3)。

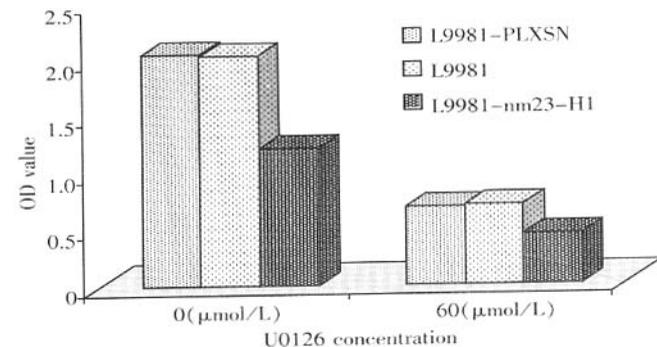


图 3 U0126 对三个人高转移大细胞肺癌细胞株细胞体外增殖活性的影响

Fig 3 Comparison of *in vitro* cell proliferatin of human high-metastatic large cell lung cancer cell lines treated with U0126

2.4 U0126 对三个人肺癌细胞株细胞体外侵袭能力的影响 与 DMSO 处理组比较,经 U0126(60 μmol/L)处理的 L9981、L9981-PLXSN 和 L9981-nm23-H₁ 细胞

株的体外侵袭能力均显著降低($P=0.000$)。两两比较:L9981-nm23-H₁ 细胞株体外侵袭能力均显著低于 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株 ($P=0.000$),而 L9981 和 L9981-PLXSN 细胞株间细胞体外侵袭能力比较无显著性差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1 U0126 对不同的人高转移大细胞肺癌细胞株体外侵袭能力的影响

Tab 1 Comparison of *in vitro* invasion in different human high-metastatic large cell lung cancer cell lines treated with U0126

Cell line	Numbers of invasive cells ($\bar{x} \pm s$)		P value
	Control (0 μmol/L)	Test (60 μmol/L)	
L9981	170.0 ± 7.28	70.6 ± 12.55	0.000
L9981-PLXSN	169.6 ± 7.16	67.0 ± 9.57	0.000
L9981-nm23-H ₁	59.8 ± 8.35	14.6 ± 5.59	0.000
P value	0.000	0.000	

3 讨论

nm23-H₁ 基因是近年来分离鉴定的一种肿瘤转移抑制基因,与人类多种肿瘤的浸润和转移有关,被认为是最有前途的肿瘤转移抑制基因。周清华等从蛋白、mRNA 和 DNA 水平,对 nm23-H₁ 基因在肺癌中的表达、突变、等位基因缺失与肺癌转移相关性等进行了全面、系统和深入的研究,证明了 nm23-H₁ 基因低表达和杂合性缺失与肺癌的高转移性和预后不良有密切关系;伴有 nm23-H₁ 基因缺失的肺癌常伴有一些肿瘤侵袭转移相关分子的表达异常,nm23-H₁ 基因可能为转移相关的上游调节基因,它对肿瘤转移潜能的抑制作用是通过下游基因实现的,转染野生型 nm23-H₁ 基因可以逆转肿瘤转移表型。周清华等^[3] 将这种 nm23-H₁ 基因参与调控下游基因、共同抑制肺癌转移表型的作用称为“肺癌转移抑制级联”。在此工作基础上,作者建立并筛选出了 nm23-H₁ 基因缺失的人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981,并利用构建的逆转录病毒表达载体 PLXSN-nm23-H₁-EGFP 筛选、建立了 L9981-nm23-H₁ 细胞株和 L9981-PLXSN 空载体细胞株。体内外实验均证实了 nm23-H₁ 基因对肺癌转移表型的逆转是通过调控其下游转移相关基因实现的,nm23-H₁ 基因是“肺癌转移抑制级联”中参与正向调控的关键基因和上游基因,转染野生型 nm23-H₁ cDNA 可以逆转肺癌细胞的转移表型^[4]。但到目前为止,nm23-H₁ 基因及其表达蛋白发挥作用的生化机制和信号传导通路远未阐明。研究结果证明^[5]:nm23-H₁ 基因具有组氨酸蛋白激酶的活性;nm23-H₁ 基因突变体——nm23-H₁^{P96S} 抑制细胞运动的能力降低,而

nm23-H₁^{S120G} 自磷酸化能力降低,两者对应的突变体重组蛋白组氨酸蛋白激酶活性均下降,nm23-H₁ 基因抑制细胞运动和侵袭的能力与其组氨酸蛋白激酶活性有关;Steeg 等的研究证实,在 293T 细胞和人乳腺癌细胞 MDA-MB-435 中,抗 nm23 的抗体与 KSR 发生了免疫共沉淀;自磷酸化的重组 nm23-H₁ 对全长 KSR 和 N 末端 KSR 产生了磷酸化作用,而对 C 末端 KSR 或 Ras-1 则未发生磷酸化作用,nm23-H₁ 基因通过其组氨酸蛋白激酶活性磷酸化 KSR 而下调了 KSR 的活性;而 KSR 为 Raf、MEK、ERK 级联反应的支架蛋白,KSR 对 MAPK 信号通路的精细调节及 MAPK 信号通路的特异性具有重要作用,对于 KSR 的研究是目前信号传导领域的热门课题^[6]。那么 nm23-H₁ 基因是否通过 KSR→ERK 信号通路发挥作用呢?

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联是真核细胞介导细胞外信号到细胞内反应的重要信号传导系统,调节机体细胞的生长、分化、分裂、死亡及细胞间功能同步化等多种过程。在人类已鉴定出 4 条 MAPK 通路细胞外信号调节激酶(ERK)通路,其中 ERK1/2 通路是 MAPK 系统经典的通路,主要传递细胞丝裂原信号,参与调节细胞周期及促进细胞增殖分化^[7]。近年来研究发现 MAPK 在细胞恶变和肿瘤浸润转移过程中起重要作用^[7,8]。

U0126 为-1,4-二氨基-2,3-氰基-1,4-双[乙氨基苯基硫代]丁二烯小分子有机化合物,可直接穿过胞膜进入胞浆发挥作用,与 MEK 非竞争结合,抑制其催化活力,阻止 ERK 的磷酸化。无论 MEK 活化状态如何,U0126 均会抑制 ERK1/2 的活化,具有较高的活性和特异性^[9,10]。迄今,有关 ERK 信号传导通路特异性抑制剂 U0126 对人肺癌细胞 MAPK 信号传导通路有何作用的研究国内外均未见报道。

本研究在前期有关 nm23-H₁ 基因研究的基础上,以 nm23-H₁ 基因缺失的人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981,转染 nm23-H₁ 基因的人高转移大细胞肺癌细胞株 L9981-nm23-H₁ 和转染空载体的细胞株 L9981-PLXSN 为研究对象,研究了 U0126 对人高转移大细胞肺癌细胞株中 ERK1/2 信号传导通路的影响,结果表明 ERK 信号传导通路特异性抑制剂抑制了人高转移大细胞肺癌细胞株中 ERK1/2 信号传导通路后,细胞可发生与转染 nm23-H₁ 基因相似的细胞生物学行为的改变——即细胞体外增殖活性和侵袭能力均显著降低,结合以往发现的转染 nm23-H₁ 基因可以明显下调 ERK1/2 信号传导通路关键激酶 ERK1/2 活性,从而抑制人高转移大细胞肺癌细胞株中 ERK1/2 信号

传导通路这一结论,推测 nm23-H₁ 基因转染逆转人高转移大细胞肺癌恶性表型的分子机制可能与其抑制 ERK1/2 信号传导通路有关。

参 考 文 献

- 1 Cho SJ, Lee NS, Jung YS, et al. Identification of structural domains affecting transactivation potential of Nm23. *Biochem Biophys Res Commun*,2001,289(3): 738-743.
- 2 Li Y, Zhou QH, Sun ZL, et al. Transfection of the tumor metastasis suppressor gene nm23-H1 can targetly suppress the activity of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) in human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981. *Chin J Lung Cancer*,2004,7(1): 8-11. [李印,周清华,孙芝琳,等. nm23-H₁ 基因对人肺癌细胞中细胞外信号调节激酶活性的影响. *中国肺癌杂志*,2004,7(1): 8-11.]
- 3 Zhou QH, Chen J, Sun ZL, et al. A study on the relationship between allelic deletion of nm23-H1 gene and metastasis of human non-small cell lung cancer. *shin J Clin thorac Cardiovasc Surg*,1998,5(3): 131-134. [周清华,陈军,孙芝琳,等. nm23-H₁ 基因缺失与人非小细胞肺癌转移相关性研究. *中国胸心血管外科临床杂志*,1998,5(3): 131-134.]
- 4 Zhou QH, Che GW, Qin Y, et al. Experimental study on nm23-H1 gene reversing phenotype of lung cancer and its molecular mechanism. *Chin J Lung Cancer*,2003,6(2): 141-143. [周清华,车国卫,覃扬,等. nm23-H₁ 基因逆转肺癌转移表型及其分子机制的实验研究. *中国肺癌杂志*,2003,6(2): 141-143.]
- 5 Salerno M, Ouatas T, Palmieri D, et al. Inhibition of signal transduction by the nm23 metastasis suppressor; possible mechanisms. *Clin Exp Metastasis*,2003,20(1): 3-10.
- 6 Morrison DK, Davis RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*,2003,19:91-118.
- 7 Mueller H, Flury N, Eppenberger-Castori S, et al. Potential prognostic value of mitogen-activated protein kinase activity for disease-free survival of primary breast cancer patients. *Int J Cancer*,2000,89(4): 384-388.
- 8 Sun QY, Lai L, Park KW, et al. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*,2001,64(3): 879-889.
- 9 Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, et al. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*,1998,273(29): 18623-18632.
- 10 Tolwinski NS, Shapiro PS, Goueli S, et al. Nuclear localization of mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK1. *J Biol Chem*,1999,274(10): 6168-6174.

(收稿:2005-12-05 修回:2006-02-21)

(本文编辑 张世雯)