

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.09.003

# 纤维连接蛋白—paxillin 通路对人胃癌细胞系 AGS 体外侵袭力的影响

李丹<sup>1</sup>, 丁健<sup>2</sup>, 吴文飞<sup>3</sup>, 于皆平<sup>4</sup>, 王小众<sup>1</sup>

## Effect of Fibronectin-paxillin Pathway on Invasiveness of Human Gastric Cancer Cellline AGS

LI Dan<sup>1</sup>, DING Jian<sup>2</sup>, WU Wen-fei<sup>3</sup>, YU Jie-ping<sup>4</sup>, WANG Xiao-zhong<sup>1</sup>

1. Department of Gastroenterology and Hepatology, The Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2. Department of Gastroenterology and Hepatology, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University; 3. The First Department of Surgery, The Second Hospital of Nanping; 4. Department of Gastroenterology and Hepatology, Renmin Hospital of Wuhan University

**Abstract: Objective** To investigate the interaction of fibronectin and paxillin in human gastric cancer cell, AGS, and reversal effects of paxillin siRNA on invasiveness of AGS cell induced by fibronectin.

**Methods** A gastric cancer cell line, AGS, was stimulated by fibronectin with gradient concentrations (0, 10, 100, 1 000nmol/L). The phosphorylation expression of paxillin tyrosine 118( tyr-118), was detected by immunoprecipitation and Western blot. The invasiveness of AGS cells was measured by the modified Boyden chamber assay. siRNA targeting paxillin was transfected into AGS cells, effect of paxillin silencing on phosphorylation of paxillin ( tyr-118) and invasiveness of AGS cells stimulated by fibronectin were detected respectively. **Results** The AGS cell showed a dose-dependence on fibronectin in phosphorylation of paxillin tyr-118 and its invasiveness. Invasiveness and phosphorylation of paxillin tyr-118 in AGS reached their climax when the concentration of fibronectin reached 100nmol/L, whereas the expression of paxillin remained unchanged after stimulated by fibronectin( $P > 0.05$ ). siRNA targeting paxillin suppressed phosphorylation of paxillin tyr-118 and the invasiveness of AGS cells significantly, decreased compared with the controls( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Fibronectin promotes paxillin tyr-118 phosphorylation and invasiveness of AGS cells. Paxillin silenced by RNA interference inhibits the cell invasiveness stimulated by fibronectin. Paxillin is a key factor in the fibronectin-stimulated cell invasiveness of AGS cells.

**Key words:** Paxillin; Fibronectin; Tyrosine phosphorylation; Invasiveness; Gastric cancer

**摘要:目的** 研究纤维连接蛋白激活 paxillin 后对人胃癌细胞侵袭力的影响,探讨抑制 paxillin 影响胃癌细胞侵袭力的机制。**方法** 以递增浓度的纤维连接蛋白刺激人胃癌细胞株 AGS,以免沉淀和蛋白质印迹法检测胃癌细胞内 paxillin 第 118 位酪氨酸( tyr-118)磷酸化的变化,同时以改良 Boyden 小室法检测细胞侵袭力变化。设计合成 paxillin siRNA 并进行效果比较,观察 siRNA 抑制纤维连接蛋白促胃癌细胞内 paxillin tyr-118 磷酸化及细胞侵袭力的改变。**结果** 纤维连接蛋白能促进 AGS 细胞 paxillin tyr-118 磷酸化的增强和胃癌细胞侵袭力( $P < 0.05$ ),并在一定范围内具有剂量依赖性。siRNA 干预后,胃癌细胞内 paxillin tyr-118 磷酸化及细胞侵袭力均有显著降低( $P < 0.05$ )。

**结论** 纤维连接蛋白可有效增强胃癌细胞的侵袭力, paxillin tyr-118 磷酸化在此过程中起关键作用,使用 paxillin siRNA 可以抑制纤维连接蛋白促人胃癌细胞侵袭的作用。

**关键词:** paxillin; 纤维连接蛋白; 酪氨酸磷酸化; 侵袭力; 胃癌

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** A  
**文章编号:** 1000-8578(2010)09-0984-05

收稿日期:2009-05-18;修回日期:2010-04-10

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(2009-CXB-14);福建省卫生厅创新课题资助项目(2006J01148)

作者单位:1. 350001 福州,福建医科大学附属协和医院消化内科;2. 福建医科大学附属第一医院消化内科;3. 南平市第二医院外一科;4. 武汉大学人民医院消化内科

作者简介:李丹(1976-),女,博士,副主任医师,主要从事消化系统肿瘤防治研究

## 0 引言

paxillin 是整合素信号通路的关键信号分子,属于含有多种结构域的接头蛋白,在细胞黏附和迁移过程中发挥重要作用,是肿瘤细胞生长和侵袭的关键分子之一<sup>[1]</sup>。其促肿瘤侵袭的作用与细胞外基质大分子之间的因果关系是目前肿瘤研究的一个热点。纤维连接蛋白(fibronectin, FN)是细胞外基质的主要成分,可作为一种黏性分子与细胞表面整合素结合,参与细胞黏附、移行、分化以及肿瘤细胞侵袭和转移等生理和病理过程<sup>[2-3]</sup>。本实验应用免疫沉淀、蛋白质电泳、基因沉默以及改良 Boyden 小室等技术,检测纤维连接蛋白和 paxillin 酪氨酸磷酸化与胃癌细胞浸润和侵袭的关系,探讨其中机制,进行量化分析,并使用 paxillin siRNA 抑制纤维连接蛋白的作用,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

AGS 细胞株购自中国上海典型培养物保藏中心;RPMI1640 和小牛血清购自 Gibco 公司;纤维连接蛋白购自 Sigma 公司;Millicell chamber 购自 Millipore 公司;人工基质胶购自 Becton-dickinson 公司;鼠抗人 paxillin 单克隆抗体、兔抗人 paxillin 磷酸化位点抗体( tyr-118)购自 BioLegend 公司;protein G 是 Sigma 公司产品;Oligofectamine 试剂购自 Invitrogen 公司;电化学发光法检测试剂盒(含有山羊抗兔二抗)购自武汉博士德公司;paxillin siRNA 自行设计由上海生工生物公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 AGS 细胞以 RPMI1640 加 10% 的小牛血清培养液,置于 37℃、100% 湿度和 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。

#### 1.2.2 递增浓度纤维连接蛋白对 paxillin tyr-118 磷酸化影响的检测

(1) 免疫沉淀:细胞无血清培养过夜后,分别将含有纤维连接蛋白终浓度为 0, 10, 100, 1 000 nmol/L 的培养液加入到 4 组细胞中培养 5 min,将细胞培养皿置于冰上,吸出培养液并加入 1 ml 用冰预冷过的 RIPA 缓冲液溶解细胞,加入 PBS,使用 400 g/min 离心 10 min,弃上清液,重复 1 次。加入细胞裂解液重悬细胞。冰上孵育 30 min,并间断性地混匀。4℃,10 000 g/min 离心 15 min。小心收集上清液样品,加入 10 μg 鼠抗人 paxillin 单克隆抗体。4℃ 孵育 1h。加入 50 μl 预洗的 Protein G bead slurry。于 4℃ 旋转混匀孵育 1h。4℃,10 000 g/min 离心 30 s。移除上清液后用细胞裂解液洗涤微珠 5 次,

弃去上清液后加入 50 μl 的电泳示踪缓冲剂。旋涡混匀后加热至 90℃ 10 min。10 000 g/min 离心 5 min,收集上清液,用于 SDS-PAGE 电泳。

(2) 蛋白质电泳:上清液蛋白定量后,各组取等量蛋白,10% 的 SDS-PAGE 电泳,电泳后经电转印方法将蛋白转印到硝酸纤维素膜上,取下硝酸纤维素膜,加入 5 ml 封闭液(1% 脱脂奶粉溶于 TBST 中),室温振荡 1 h,TBST 洗 1 次,每次 5 min,封闭洗涤后,加入兔抗 paxillin tyr-118 抗体,室温振荡 1h,TBST 洗 3 次,以电化学发光法试剂盒(包含羊抗兔二抗)进行检测,观察细胞 paxillin tyr-118 磷酸化情况。

1.2.3 递增浓度纤维连接蛋白对 AGS 细胞侵袭力影响的检测 使用改良的 Boyden 小室法,用人工基质胶覆盖 Millicell Chamber 滤膜上的微孔。向小室内加入 1×10<sup>5</sup> 个细胞。每组 5 个小室,分别加入含有纤维连接蛋白 0、10、100、1 000 nmol/L 的培养液,置于 24 孔板上,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 12 h。将下室面的细胞刮下,涂片,使用常规 HE 染色计数细胞个数,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。

1.2.4 siRNA 对 AGS 细胞 paxillin tyr-118 磷酸化影响的检测 根据 RNAi 引物设计原则,选取人 paxillin cDNA(GenBank 登录号:NM-002859)中的特异性核苷酸片段为靶标,用 Ambion 公司提供的免费软件,设计两对核苷酸序列,它们的序列分别为: siRNA1: 5'-CUCGUCUAUGCCCCGCAACt-3', siRNA2: 5'-AUCUCCUGGUAUGUGUG-GUtt-3, 根据 Oligofectamine 试剂的说明书,以上述两组不同的 siRNA 转染 AGS 细胞,同时以同等条件将 Ambion 公司提供的 Silencer™ 阴性对照 siRNA 转染 AGS 作为阴性对照。将转染后的细胞置于 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中,继续培养 48h,从而建立 4 个细胞组分别命名为:AGS 组、转 siRNA1 组、转 siRNA2 组、转染 Silencer™ siRNA 组。将上述 4 组细胞裂解,使用免疫沉淀和蛋白质电泳如步骤 1.2.2,观察 siRNA 对 paxillin tyr-118 磷酸化的影响。

1.2.5 paxillin siRNA 对纤维连接蛋白促 paxillin tyr-118 磷酸化以及胃癌细胞侵袭力影响的检测 转 siRNA1 组细胞、转染 Silencer™ 阴性对照 siRNA 组细胞及 AGS 组细胞持续培养 36h 后,将含有纤维连接蛋白 100 nmol/L 的培养液加入到 3 组细胞中培养 5 min,吸出培养液,裂解细胞,使用免疫沉淀和蛋白质电泳如步骤 2,观察 paxillin siRNA 抑制纤维连接蛋白促 paxillin tyr-118 磷酸化的作用。同时,向 Boyden 小室内加入上述 3 组各 1×10<sup>5</sup> 个细胞,每组 5 个小室,加入含有纤维连接蛋白

100 nmol/L 的培养液,其余同步骤 1. 2. 3,使用改良的 Boyden 小室法观察 paxillin siRNA 抑制纤维连接蛋白促胃癌细胞侵袭力的作用。

### 1.3 统计学方法

使用图像分析软件 Image-Pro Plus 对蛋白质电泳图像进行分析,3 次实验结果取平均值,为方便直观比较,将蛋白质表达的最大值定义为 100%,其他数据与最大值的比率定义为表达量。所有数据使用方差分析和成组 *t* 检验,统计软件为 SPSS 10.0,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 递增浓度纤维连接蛋白对 paxillin tyr-118 磷酸化的影响

将 paxillin tyr-118 磷酸化最强点定义为 100%,其他磷酸化水平与最强点比值作为其磷酸化表达相对值,以下同。纤维连接蛋白浓度分别为 0、10、100 和 1 000 nmol/L 时, paxillin tyr-118 磷酸化相对值分别为 22. 20%、49. 33%、95. 53% 和 100. 00%。从 0 nmol/L 增至 100 nmol/L 时,tyr-118 磷酸化增加的幅度两两相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。当纤维连接蛋白作用浓度由 100 nmol/L 增加至 1000 nmol/L 时,tyr-118 磷酸化处在一个平台期,两者比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 递增浓度纤维连接蛋白对 AGS 细胞侵袭力的影响

在未接受纤维连接蛋白刺激之前,AGS 细胞侵袭力很低,在接受 10 nmol/L 的纤维连接蛋白刺激之后,随即出现 Boyden 小室下室面细胞数明显增多 ( $P < 0.05$ ),100 nmol/L 的纤维连接蛋白刺激后,下室面细胞数增多的更加明显 ( $P < 0.05$ )。在纤维连接蛋白的浓度由 100 nmol/L 增加到 1 000 nmol/L 时,下室面细胞数增强不再呈上升趋势 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

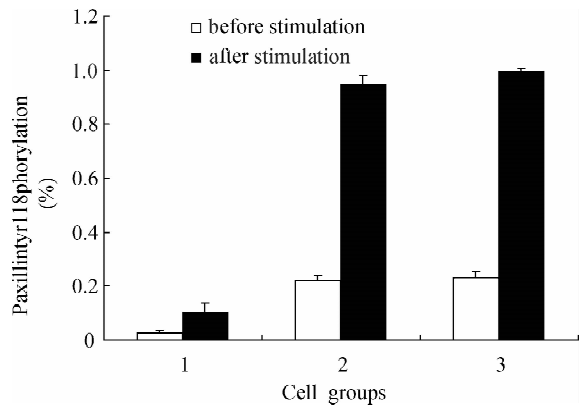
### 2.3 siRNA 对 paxillin tyr-118 磷酸化的影响

转 siRNA1 组、转 siRNA2 组细胞中 paxillin tyr-118 磷酸化程度较转染 Silencer<sup>TM</sup> siRNA 细胞组和 AGS 细胞组明显降低(12. 39%和 30. 26% vs. 94. 50% 和 100%,  $P < 0.05$ );但转 siRNA1 组 tyr-118 磷酸化程度明显低于转 siRNA2 组,两者比较差异有统计学意义(12. 39% vs. 30. 26%,  $P < 0.05$ ),转染 Silencer<sup>TM</sup> siRNA 细胞组和 AGS 细胞组比较差异无统计学意义(94. 50% vs. 100%,  $P > 0.05$ ),提示 siRNA1 干扰效

果较好,将用于下一步的实验。

### 2.4 paxillin siRNA 对纤维连接蛋白促 paxillin tyr-118 磷酸化以及胃癌细胞侵袭力的影响

接受刺激前,转染 siRNA1 AGS 细胞组 paxillin tyr-118 磷酸化较转染 Silencer<sup>TM</sup> siRNA 细胞组和空白对照 AGS 细胞组为弱(3. 42% vs. 21. 31%、24. 96%,  $P < 0.05$ ),后两组表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。接受 100 nmol/L 纤维连接蛋白刺激后,各组细胞 paxillin tyr-118 磷酸化表达都有所增加,但是增加幅度明显不同,转 siRNA1 组较转染 Silencer<sup>TM</sup> siRNA 组和 AGS 细胞组 tyr-118 磷酸化程度明显降低(24. 12% vs. 69. 85%、74. 71%,  $P < 0.05$ ),而后两组表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见图 1。



1: cells transfected with siRNA1; 2: cells transfected with Silencer<sup>TM</sup> siRNA; 3: AGS  
图 1 纤维连接蛋白对 siRNA 转染的 AGS 细胞 paxillin tyr-118 磷酸化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Figure 1 Effect of fibronectin on paxillin tyr-118 phosphorylation in AGS cells transfected with siRNA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

未接受纤维连接蛋白刺激时,转 siRNA1 组细胞、转染 Silencer<sup>TM</sup> siRNA 组细胞及 AGS 细胞侵袭力无差别。在接受 100 nmol/L 纤维连接蛋白作用后,各组细胞穿过 Boyden 小室数量上升明显,表现为侵袭力增强,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。但即使在纤维连接蛋白刺激的情况下,转 siRNA1 组因已对 paxillin tyr-118 磷酸化的表达进行阻断,细胞侵袭力的上升不如其他几组显著,较 AGS 组、转染 Silencer<sup>TM</sup> siRNA 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),而 AGS 组与转染 Silencer<sup>TM</sup> siRNA 组侵袭力间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 1 改良 Boyden 小室法检测递增浓度纤维连接蛋白对 AGS 细胞侵袭力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of fibronectin with increased concentration of AGS cells invasiveness by modified Boyden chamber assay ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fibronectin(nmol/L)	0	10	100	1000
Cells on lower bottom of Boyden chamber	10.0000 ± 3.3912	17.2000 ± 6.6858	32.6000 ± 10.6542	37.2000 ± 9.3621

表 2 纤维连接蛋白对 siRNA 转染的 AGS 细胞侵袭力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of fibronectin on invasiveness of AGS cells transfected with siRNA ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Cell groups	Cells transfected siRNA1	Cells transfected Silencer™ siRNA	AGS
Before stimulation of fibronectin with 100nmol/L	7. 4000 ± 3. 2094	7. 2000 ± 4. 0249	10. 0000 ± 3. 3912
After stimulation of fibronectin with 100nmol/L	15. 0000 ± 6. 1237	29. 8000 ± 10. 2078	32. 6000 ± 10. 6542

### 3 讨论

胃癌是发病率最高的消化道恶性肿瘤之一,死亡率居我国恶性肿瘤首位<sup>[4]</sup>,同胃癌预后相关的主要指标包括肿瘤的浸润程度和转移范围<sup>[6]</sup>。肿瘤的侵袭和转移是肿瘤发生和演进过程中最危险的阶段,因此检测肿瘤侵袭相关信号分子的活化形式对于了解肿瘤侵袭和转移、估计病情预后具有重要意义。

paxillin 是一种与细胞侵袭和转移密切相关的信号分子<sup>[1,6-9]</sup>。主要定位于黏着斑,其氨基端有识别蛋白质的结构域,通过这些结构域同多种蛋白质结合发挥生物学效应。表皮生长因子、胰岛素样生长因子、神经生长因子及肝细胞生长因子等许多通过跨膜受体传递信号的分子均能触发 paxillin 的酪氨酸磷酸化<sup>[10]</sup>,因此 paxillin 被认为是信号转导的一个汇聚点。paxillin 作为一种酪氨酸激酶的底物,具有一个备受关注的酪氨酸位点—tyr-118。此位点的磷酸化,可以显著促进细胞运动<sup>[11-12]</sup>。Chen 等<sup>[13]</sup>报道 paxillin 是乳腺肿瘤激酶 Brk 的结合蛋白及底物,Brk 同 paxillin 结合后,磷酸化其 tyr-118 位点,从而促进细胞迁移及浸润;Petit 等<sup>[14]</sup>观察发现膀胱癌细胞的黏附及伸展均同 paxillin 酪氨酸磷酸化有关,tyr-118 突变将有效抑制细胞运动。然而,部分研究报道了不同结果,体外研究表明 siRNA 阻断 FAK 及 paxillin 信号转导通路可致 HeLa 细胞的运动增强<sup>[7]</sup>。这些结果的差异可能同实验中细胞或组织的不同类型,应用的细胞迁移基质差异及实验设计有关,但具体机制还有待进一步阐明。研究纤维连接蛋白 - paxillin - 胃癌侵袭力的关系既可了解纤维连接蛋白增强胃癌细胞侵袭力的机制,又是对现有 paxillin 研究资料的补充。

纤维连接蛋白是一种存在于细胞外基质的大分子糖蛋白,通过和细胞表面的整合素结合发挥生物学作用<sup>[15-17]</sup>。介导多种肿瘤细胞的生物学功能。Hegele A 等<sup>[18-19]</sup>发现纤维连接蛋白可作为膀胱移行细胞癌的肿瘤标志物;肾细胞癌患者血浆中的纤维连接蛋白值明显增高,可作为病情评估指标。此外,纤维连接蛋白同膀胱、卵巢癌及神经胶质瘤的发病

机制亦相关<sup>[20-21]</sup>。我们以往的研究也证实纤维连接蛋白可以促进结肠癌细胞侵袭<sup>[22]</sup>。如果能够了解纤维连接蛋白与肿瘤细胞侵袭和增殖的关系,阐明胃癌细胞与细胞外基质大分子接触后发生的不同于正常细胞的变化,将有助于解释胃癌特殊的生物学行为。

本实验结果首次证实胃癌细胞侵袭力和 paxillin tyr-118 磷酸化表达量对纤维连接蛋白的刺激存在剂量依赖性,纤维连接蛋白可以有效的引起细胞侵袭力和 paxillin tyr-118 磷酸化的增加,三者之间呈现正相关趋势,提示它们之间可能存在因果关系。但是,当纤维连接蛋白的浓度达到 100nmol/L 以上时,paxillin tyr-118 磷酸化的程度和细胞侵袭力均不再有明显增加,其原因可能有二:一是当纤维连接蛋白的浓度达到 100nmol/L 时,纤维连接蛋白受体达到了饱和,过多的纤维连接蛋白不能继续和它们的受体相互结合,从而不能继续增加作用的强度;另外一种可能是在高浓度纤维连接蛋白的作用下,paxillin 磷酸化出现达到了最高峰,当几乎所用的 paxillin 分子都发生了酪氨酸磷酸化后,paxillin 分子就不能再对更强的刺激发生反应。

为了进一步阐明纤维连接蛋白 - paxillin - 细胞侵袭力三者之间的因果关系,说明 paxillin tyr-118 磷酸化水平的提高是此过程中不可缺少的环节,而不仅仅是一个伴随现象。此实验使用 RNA 干扰技术封闭胃癌细胞 paxillin tyr-118 磷酸化,观察到在 paxillin tyr-118 磷酸化表达降低的情况下,使用同等浓度的纤维连接蛋白刺激后,siRNA 干扰组细胞侵袭力明显降低,这有力证明了 paxillin 是引起细胞侵袭力发生变化的关键上游信号分子之一。本实验设计的 siRNA 导入细胞后,paxillin 的蛋白水平表达量有显著下降,但仍有部分表达,原因可能是:一方面同 siRNA 本身的序列设计和封闭效率有关,另一方面则可能同 paxillin 本身有三个亚型有关<sup>[23]</sup>,本实验设计的 siRNA 可能只抑制了其中一个未知亚型,但尽管如此,已对细胞的侵袭力产生了明显影响。此研究的结果也为靶向 paxillin 的治疗打下了基础。

总之,本研究证明了细胞外基质大分子—纤维连接蛋白可引起胃癌细胞侵袭力的增加,并在一定范围内具有剂量依赖性;并且阻断 paxillin tyr-118 磷酸化可以降低胃癌细胞体外侵袭力,说明该作用可能通过纤维连接蛋白—paxillin 信号转导通路实现。该研究进一步证明了纤维连接蛋白受体激活到肿瘤细胞生物功能变化之间的信号转导过程,并为使用靶向 paxillin 的 RNA 干扰技术抑制胃癌细胞侵袭和转移提供了实验依据。

#### 参考文献:

- [1] Schaller MD. FAK and paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration? [J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(2):157-159.
- [2] Armstrong PB, Armstrong MT. Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1470(2):9-20.
- [3] Cary LA, Chang JF, Guan JL. Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn[J]. *J Cell Sci*, 1996, 109(pt7):1787-1794.
- [4] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2):74-108.
- [5] Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJ. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment[J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(2): 31-36.
- [6] Wu CW, Hsieh MC, Lo SS, et al. Relation of number of positive lymph nodes to the prognosis of patients with primary gastric adenocarcinoma[J]. *Gut*, 1996, 38(6):525-527.
- [7] Vadlamudi R, Adam L, Tseng B, et al. Transcriptional up-regulation of paxillin expression by heregulin in human breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(12):2843-2846.
- [8] Yano H, Mazaki Y, Kurokawa K, et al. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion[J]. *J Cell Biol*, 2004, 166(2):283-295.
- [9] Scibelli A, d'Angelo D, Pelagalli A, et al. Expression levels of the focal adhesion-associated proteins paxillin and p130CAS in canine and feline mammary tumors[J]. *Vet Res*, 2003, 34(2): 193-202.
- [10] Kilian O, Dahse R, Alt V, et al. mRNA expression and protein distribution of fibronectin splice variants and high-molecular weight tenascin-C in different phases of human fracture healing[J]. *Calcif Tissue Int*, 2008, 83(2):101-111.
- [11] Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein[J]. *Oncogene*, 2001, 20(44):6459-6472.
- [12] Schaller MD, Schaefer EM. Multiple stimuli induce tyrosine phosphorylation of the Crk-binding sites of paxillin[J]. *Biochem J*, 2001, 360(pt1):57-66.
- [13] Chen HY, Shen CH, Tsai YT, et al. Brk activates rac1 and promotes cell migration and invasion by phosphorylating paxillin[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(24): 10558-10572.
- [14] Petit V, Boyer B, Lentz D, et al. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells[J]. *J Cell Biol*, 2000, 148(5):957-970.
- [15] Kountouras J, Boura P, Kouklakis G. Locoregional immunotherapy in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 2002, 49(46): 1109-1112.
- [16] Jee SW, Wang S, Kapila YL. Specific pro-apoptotic fibronectin fragments modulate proteinase expression in periodontal ligament cells[J]. *J Periodontol*, 2004, 75(4): 523-530.
- [17] Velasco-Velázquez MA, Salinas-Jazmin N, Mendoza-Patiño N, et al. Reduced paxillin expression contributes to the anti-metastatic effect of 4-hydroxycoumarin on B16-F10 melanoma cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2008, 8:8.
- [18] Hegele A, Heidenreich A, Kropf J, et al. Plasma levels of cellular fibronectin in patients with localized and metastatic renal cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2004, 25(3):111-116.
- [19] Hegele A, Heidenreich A, Varga Z, et al. Cellular fibronectin in patients with transitional cell carcinoma of the bladder[J]. *Urol Res*, 2003, 30(6):363-366.
- [20] Zand L, Qiang F, Roskelley CD, et al. Differential effects of cellular fibronectin and plasma fibronectin on ovarian cancer cell adhesion, migration, and invasion[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2003, 39(3-4):178-182.
- [21] Yang W, Asakura S, Sakai T, et al. Two-step spreading mode of human glioma cells on fibrin monomer: interaction of alpha(v)beta3 with the substratum followed by interaction of alpha5beta1 with endogenous cellular fibronectin secreted in the extracellular matrix[J]. *Thromb Res*, 1999, 93(6):279-290.
- [22] Ding J, Li D, Wang X, et al. Fibronectin promotes invasiveness and focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation of human colon cancer cell [J]. *Hepatogastroenterology*, 2008, 55(88):2072-2076.
- [23] Mazaki Y, Hashimoto S, Sabe H. Monocyte cells and cancer cells express novel paxillin isoforms with different binding properties to focal adhesion proteins[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(11):7437-7444.

[编辑:杨 卉;校对:刘红武]