论著

文章编号:1000-5404(2013)16-1658-05

PAQR3 增强乳腺癌细胞 SK-BR-3 的表柔比星敏感性

黄剑波[1],罗鑫荣[1],孔令泉[2],向廷秀[1],任国胜[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:分子肿瘤及表观遗传学实验室[1],内分泌乳腺外科[2])

[摘要] **目的** 探讨 PAQR3 增强乳腺癌细胞对表柔比星的敏感性。**方法** 采用 Real-time PCR 比较 ER、PR 及 HER2 受体不同的 4 株乳腺癌细胞(MDA-MB-231、MCF7、SK-BR-3 及 T47D)的 PAQR3 表达情况。在乳腺癌细胞 SK-BR-3 中转染人源性 PAQR3 全长表达质粒,设立对照组,观察比较转染 PAQR3 细胞组与空载质粒细胞组对表柔比星的敏感性,分别计算其所对应的 IC_{50}。通过细胞凋亡检测、Western blot 探讨 PAQR3 增加表柔比星敏感性的机制。**结果** 在4 株乳腺癌细胞中,受体三阴性细胞 MDA-MB-231 的 PAQR3 表达量最高,SK-BR-3 与 MCF7 表达量相对较低;SK-BR-3 过表达 PAQR3 后,其对表柔比星的化疗敏感性显著升高,IC_{50} 显著降低[(25.33 ± 0.94) μg/mL *vs* (17.72 ± 1.11) μg/mL, $P < 0.05$];PAQR3 本身并未促使 SK-BR-3 凋亡,实验组与对照组的凋亡率差异并无统计学意义($P > 0.05$)。但在同等浓度表柔比星的作用下,PAQR3 促使 SK-BR-3 表达凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-7,从而导致表柔比星抑制率增加,对 Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bcl-xL 表达则无影响。进一步分析发现,PAQR3 可抑制乳腺癌化疗中表柔比星所致的 ERK 活化,因而促使乳腺癌细胞对表柔比星敏感。**结论** PAQR3 可提高乳腺癌细胞对表柔比星的化疗敏感性,PAQR3 表达可能与乳腺癌对表柔比星的敏感性相关。

[关键词] 乳腺癌;PAQR3;表柔比星;RAS/RAF/ERK;化疗敏感性

[中图法分类号] R73-361;R737.9;R979.14 [文献标志码] A

PAQR3 enhances chemosensitivity of breast cancer cell line SK-BR-3 to epirubicin

Huang Jianbo[1], Luo Xinrong[1], Kong Lingquan[2], Xiang Tingxiu[1], Ren Guosheng[1] ([1]Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, [2]Department of Endocrine & Breast Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether PAQR3 can enhance the chemosensitivity of breast cancer line to epirubicin, and the possibly underlying mechanisms. **Methods** The mRNA level of PAQR3 in 4 breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF7, SK-BR-3 and T47D) with different statuses of ER, PR and HER2 receptors were analyzed by real-time PCR. The plasmid pEGFP-PAQR3 encoding full-length sequence of PAQR3 was transfected into the SK-BR-3 cells, and the cells transfected with empty vector pEGFP-C1 served as control. The inhibitory ratio and IC_{50} of epirubicin on the SK-BR-3 cells were observed and compared. Flow cytometry was used to analyze the cell apoptosis, and Western blotting to detect the expression of apoptosis-related genes. **Results** Among the 4 breast cancer cell lines, MDA-MB-231 cells who were positive to the above 3 receptors expressed the highest level of PAQR3, while the SK-BR-3 and MCF7 cells got the relatively lower levels. After transfected with plasmid pEGFP-PAQR3, the SK-BR-3 cells become more sensitive to epirubicin as compared to those transfected with pEGFP-C1 ($P < 0.05$), and their IC_{50} was obvious decreased (25.33 ± 0.94 *vs* 17.72 ± 1.11 μg/mL, $P < 0.05$). PAQR3 transfection had no effect on cell apoptosis ($P > 0.05$), but when the cells were treated with the same doses of epirubicin, the expression of cleaved caspase-7 was significantly elevated in SK-BR-3 transfected with PAQR3, which contributed to the enhanced sensitivity to epirubicin. Nevertheless, no change of cleaved caspase-3, Bcl-2, and Bcl-xL was found. Furthermore, the anti-apoptotic activation of ERK by epirubicin was suppressed in SK-BR-3 transfected with PAQR3 compared with those transfected with empty vector, which explained their enhanced sensitivity to epirubicin. **Conclusion**

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31171243)

[通信作者] 任国胜,电话:(023) 89011121,E-mail:rgs726@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0902.004.html(2013-04-25)

PAQR3 enhances the chemosensitivity of breast cancer cells to epirubicin. In light of certain clinical findings, PAQR3 may be relative to the sensitivity of breast cancer to epirubicin.

[**Key words**] breast cancer; PAQR3; epirubicin; RAS/RAF/ERK; chemosensitivity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31171243). Corresponding author: Ren Guosheng, Tel: 86-23-89011121, E-mail: rgs726@163.com

乳腺癌是一种严重威胁女性健康和生命安全的恶性肿瘤,在女性恶性肿瘤中,乳腺癌新发病例数已跃居第一,死亡病例数位于第二[1]。目前,乳腺癌治疗以综合治疗模式为主,主要包括外科手术治疗与化疗,极大提高了乳腺癌患者的远期生存率。然而,研究表明多数化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时,还可激活抗细胞凋亡相关的信号通路[2],降低化疗效果。蒽环类药物是一类来源于波赛链霉菌青灰变种的化疗药物,常用的包括多柔比星及表柔比星,是乳腺癌TAC(多西紫杉醇、表阿霉素及环磷酰胺)或CEF(环磷酰胺、表柔比星及氟尿嘧啶)化疗方案的重要组成部分。一般认为,三阴性乳腺癌对其较为敏感。另一方面,蒽环类药物被认为可致p44/42 MAPK(ERK)激活,使肿瘤细胞逃避药物杀伤而得以生存。这在多种细胞中得到证实,包括大鼠心肌细胞[3]、肝癌细胞[4]及人乳腺癌细胞[5]、神经母细胞瘤细胞[6]、宫颈癌细胞[7]。Small等[5]发现在乳腺癌细胞中,蒽环类药物所致的ERK活化程度呈药物浓度、作用时间依赖性。PAQR3蛋白是一种新近发现的,存在于高尔基体上的7次跨膜蛋白,被认为具有负向调节RAS/RAF/ERK信号通路活化的作用,该效应通过将RAF蛋白锚定在高尔基体使其失去与RAS、MEK的联系而实现[8-9]。因此,本研究拟在乳腺癌细胞中明确PAQR3是否可抑制表柔比星所致的ERK活化,而提高乳腺癌对表柔比星的敏感性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒 4株乳腺癌细胞(MDA-MB-231、MCF7、SK-BR-3及T47D)均由香港中文大学陶谦教授惠赠,均在含有10%胎牛血清的RPMI1640培养液中培养,放置于37 ℃、5% CO_2 培养箱中。人源PAQR3全长表达质粒由中科院上海生命科学研究院营养科学研究所陈雁教授惠赠,其对照空载质粒pEGFP-C1由重医附一院分子肿瘤与表观遗传学实验室向廷秀研究员提供。

1.1.2 主要试剂及来源 总RNA提取试剂(Trizol)、质粒提取试剂盒、Lipofectamine™2000转染试剂购自Invitrogen公司;逆转录酶(M-MLV)、DNA聚合酶(Go-*Taq*)购自Promega公司;通用引物oligo(dT)12-18购自TaKaRa公司;Real-time PCR试剂(SYBR Premix *Ex Taq* Ⅱ)购自Applied Biosystems公司;PAQR3、内参引物由深圳华大基因公司合成;总蛋白提取试剂(RIPA)、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂均购自碧云天公司;蛋白浓度测定试剂盒购自Thermo Fisher公司;内参抗体购自Epitomics公司;ERK、p-ERK、Cleaved Caspase-7、Cleaved Caspase-3、Bcl-2及Bcl-xL抗体均购自Cell Signaling technology公司。

1.2 方法

1.2.1 总RNA及总蛋白提取 RNA提取:收集细胞,用Trizol裂解液裂解,加入氯仿、异丙醇去除杂质,最后沉淀物用DEPC水溶解,ND2000分光光度计测定RNA浓度,-80 ℃保存备用。总蛋白提取:收集细胞,加入细胞裂解液RIPA,并通过超声处理使细胞裂解完全,在12 000×*g*条件下离心15 min,轻取上清蛋白液,所有操作于冰上进行。蛋白浓度用BCA法测定,变性后于-30 ℃保存备用。

1.2.2 RT-PCR及Real-time PCR检测 根据GenBank数据库中人源PAQR3基因序列设计PAQR3引物:上游5′-TGGAATACTGGGCTGCTA-3′,下游5′-TAGGGTTAATGGAGTGCG-3′。内参GAPDH引物:上游5′-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3′,下游5′-TAGCAGGTGGCGTTTACGAAG-3′。将细胞总RNA逆转得到的cDNA进行PCR扩增。RT-PCR反应扩增条件:95 ℃预变性2 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共32个循环;72 ℃延伸3 min。2%琼脂糖凝胶电泳分析。Real-time PCR使用ABI PRISM 7500(Applied Biosystems)设备,反应扩增条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,共40个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s。最后以公式$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析产物相对表达量。

1.2.3 细胞转染及稳定株筛选 取对数生长期的细胞SK-BR-3为研究对象,转染前24 h以6×10^5/孔的密度接种于6孔板培养,使转染前的细胞融合度达到80%左右。转染在6孔板中进行,将10 μL Lipofectamine™2000与4 μg质粒均匀混于500 μL无血清的RPMI1640培养液中,静置20 min后将其覆盖于6孔板中的细胞表面,4~6 h后更换含10%胎牛血清的RPMI1640培养液继续培养。转染48 h后于倒置荧光显微镜(Leica)下观察转染效率,并加用800 μg/mL G418筛选,筛选20 d后用RT-PCR验证目的基因表达是否增强,确认稳定细胞株筛出后,G418用量减半(400 μg/mL),余条件不变继续培养。

1.2.4 蛋白免疫印迹杂交(Western blot)检测 按常规方法进行,每孔上40 μg蛋白,SDS-PAGE电泳分离,湿法转至PVDF膜,室温脱脂牛奶封闭2 h,一抗4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育1 h,增强化学发光显色,暗室胶片压片法显影,以GAPDH(35×10^3)作为比对内参。

1.2.5 不同浓度表柔比星抑制率测定 取对数生长期的MDA-MB-231及稳转细胞株(SK-BR-3-C1、SK-BR-3-PAQR3)进

行后续实验，比较同浓度表柔比星对上述3种细胞的抑制效果。表柔比星浓度依次为0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40 μg/mL。表柔比星添加6 h前，将MDA-MB-231、SK-BR-3-C1与SK-BR-3-PAQR3以每孔8×10^3个细胞的密度接种于96孔板，3种细胞均分别设置9组，每组3个复孔，每孔150 μL培养液。6 h后，1～8组统一更换含以上不同浓度表柔比星的培养液，第9组（对照组）更换不含表柔比星的新鲜培养液。培养24 h后用CCK8试剂检测各孔波长450nm处光密度值[$D(450)$]，以公式计算各实验组的表柔比星抑制率。

抑制率=[1－实验组$D(450)$/对照组$D(450)$]×100%

1.2.6 流式细胞仪Annexin PE/7-AAD双染色法检测细胞凋亡 取对数生长期的稳转细胞株（SK-BR-3-C1、SK-BR-3-PAQR3）进行后续实验，送检前24 h将其分别接种于6孔板，每孔6×10^5个细胞。用未添加EDTA的胰酶将细胞消化，同等量培养液中和，离心，PBS洗涤2～3遍，重悬，送重庆医科大学生命科学研究院检测，实验重复3次。

1.3 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件进行，2组之间比较采用t检验，多组之间比较采用方差分析。

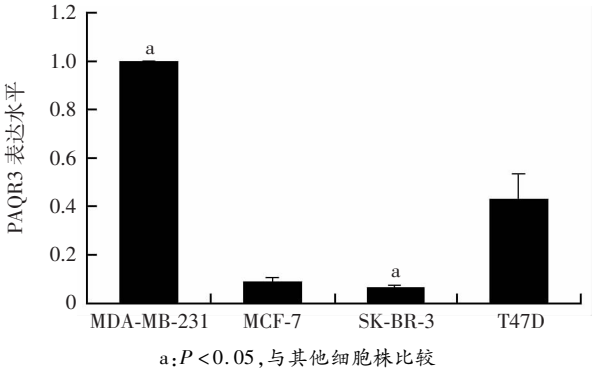
2 结果

2.1 Real-time PCR检测不同乳腺癌细胞株的PAQR3 mRNA表达

4种乳腺癌细胞株中，除MDA-MB-231的ER、PR及HER2受体为三阴性以外，其余细胞受体均不呈三阴性。Real-time PCR结果显示，MDA-MB-231的PAQR3 mRNA表达最高，MCF7与SK-BR-3表达相对较低（图1）。因三阴性乳腺癌对表柔比星相对敏感，且MDA-MB-231 PAQR3表达量高，初步提示PAQR3可能与表柔比星敏感性相关。

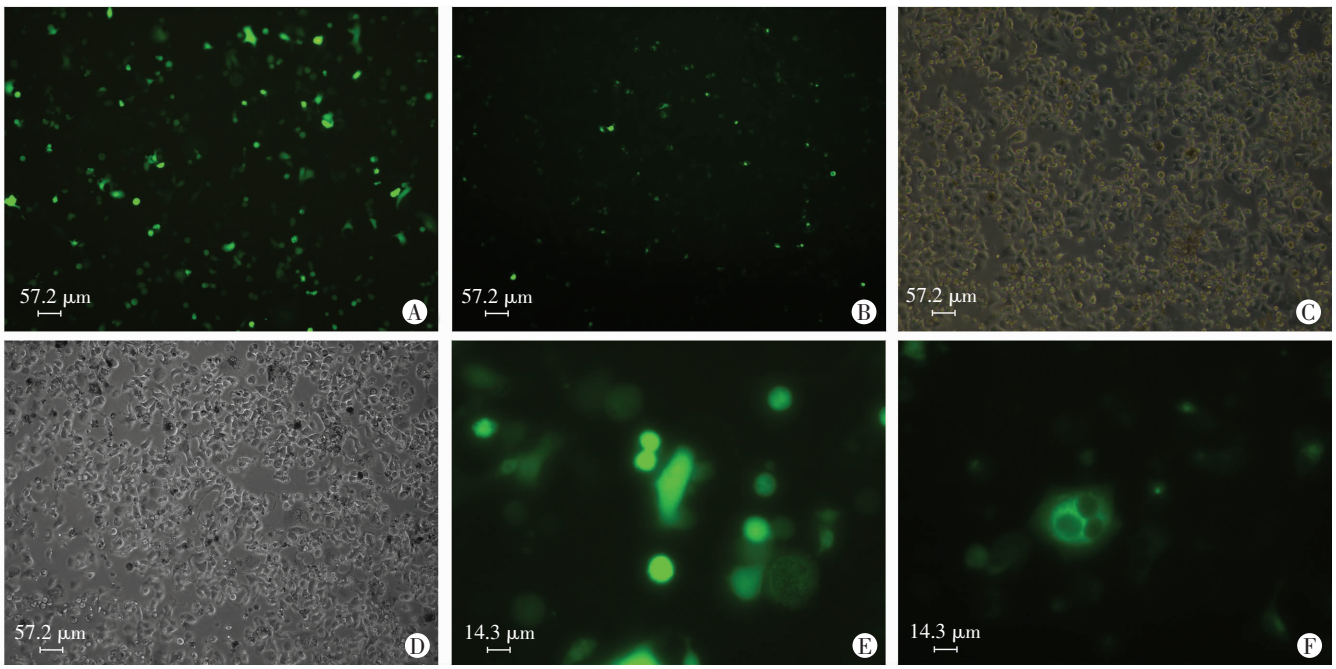
2.2 PAQR3质粒转染乳腺癌细胞SK-BR-3的效率及表达定位

采用pEGFP-C1、pEGFP-PAQR3质粒分别转染内源性PAQR3表达量较低的SK-BR-3。转染48 h后明确转染效率尚可，pEGFP-C1转染效率约为60%，PAQR3质粒转染效率约为50%。此外，2种质粒转染后细胞的绿色荧光分布位置不同，前者在细胞内呈弥漫分布，后者仅分布于细胞浆内（图2）。



a：$P<0.05$，与其他细胞株比较

图1 Real-time PCR检测4株乳腺癌细胞株PAQR3的mRNA表达水平

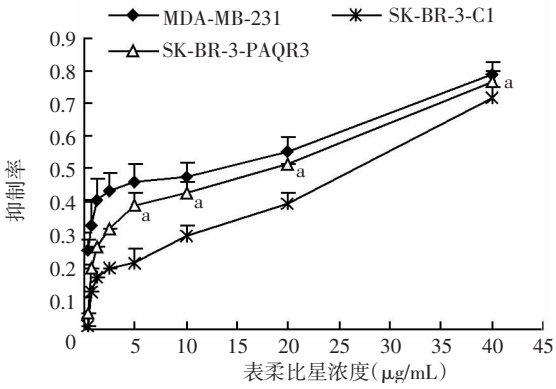


A：转染pEGFP-C1 48 h后的SK-BR-3细胞荧光观察；B：转染pEGFP-PAQR3 48 h后的SK-BR-3细胞荧光观察；C：与A相同视野下转染pEGFP-C1 48 h后的SK-BR-3细胞白光观察；D：与B相同视野下转染pEGFP-PAQR3 48 h后的SK-BR-3细胞白光观察；E：转染pEGFP-C1 48 h后的SK-BR-3细胞荧光观察；F：转染pEGFP-PAQR3 48 h后的SK-BR-3细胞荧光观察

图2 倒置荧光显微镜观察pEGFP-C1与pEGFP-PAQR3转染效率及PAQR3表达定位

2.3 表柔比星抑制 MDA-MB-231、SK-BR-3-C1、SK-BR-3-PAQR3 的效率比较

采用 0.312 5 ~ 40 μg/mL 的表柔比星处理 3 种乳腺癌细胞并比较其化疗敏感性。结果发现表柔比星对 3 种细胞的抑制效果均随药物浓度的增高而增加(图 3),其中,MDA-MB-231 对表柔比星的敏感性最高,SK-BR-3-PAQR3 次之,SK-BR-3-C1 敏感性最低,转染 PAQR3 质粒能提高非三阴性乳腺癌细胞对表柔比星的化疗敏感性,3 者对应的 IC_{50} 依次为(12.52 ± 1.01)μg/mL、(17.72 ± 1.11)μg/mL 及(25.33 ± 0.94)μg/mL,后两者差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

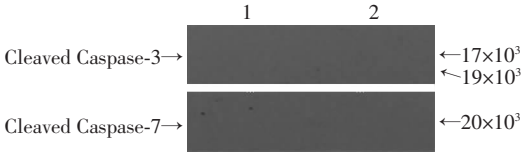


a: $P < 0.05$,与其他细胞株比较

图 3 不同浓度表柔比星对不同细胞株的抑制率比较

2.4 PAQR3 对 SK-BR-3 凋亡的影响

为进一步探讨 PAQR3 所致的表柔比星敏感性增加是否由细胞凋亡作用增强所致,在无表柔比星药物干预的条件下我们比较了 SK-BR-3-C1、SK-BR-3-PAQR3 的凋亡率。结果发现 PAQR3 并无促使乳腺癌细胞凋亡的作用(SK-BR-3-C1:15.96 ± 4.21;SK-BR-3-PAQR3:14.08 ± 2.12,$P > 0.05$)。Western blot 检测了二者凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-7 的表达情况,发现在无表柔比星干预的条件下,PAQR3 并未增加上述凋亡蛋白的表达,两种细胞的表达均为阴性(图 4)。



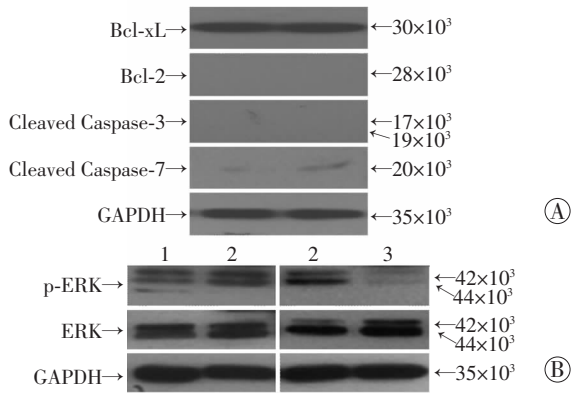
1:SK-BR-3-C1; 2:SK-BR-3-PAQR3

图 4 Western blot 检测 SK-BR-3 细胞凋亡相关蛋白的表达

2.5 PAQR3 增强 SK-BR-3 表柔比星敏感性

分别提取 30 μg/mL 表柔比星干预下的 SK-BR-3-C1 及 SK-BR-3-PAQR3 细胞的总蛋白,检测两者 Bcl-xL、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-7 的表达情况,结果显示在表柔比星药物干预下,PAQR3 明显增加了 Cleaved Caspase-7 的表达,而 Bcl-xL 表达无变化,Bcl-2、Cleaved Caspase-3 均无表达(图 5A)。这表明 PAQR3 可通过 Caspase 相关信号通路增强乳腺癌细胞对表柔比星的敏感性。

此外,为明确 PAQR3 化疗增敏作用是通过抑制表柔比星所致 ERK 活化而实现,我们首先验证了表柔比星是否导致 SK-BR-3-C1 的 ERK 活化,结果发现表柔比星(30 μg/mL)虽显著抑制SK-BR-3-C1 的生长,但却使 p-ERK 表达显著增加。然后比较了 30 μg/mL 表柔比星干预下的 SK-BR-3-C1 及 SK-BR-3-PAQR3 的 p-ERK 表达情况,发现后者 p-ERK 相对前者显著降低(图 5B)。表明 PAQR3 可抑制表柔比星所致的 ERK 活化,从而提高乳腺癌细胞对表柔比星的化疗敏感性。



A: Bcl-xL、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 及 Cleaved Caspase-7 的表达 1:SK-BR-3-C1; 2:SK-BR-3-PAQR3

B: 30 μg/mL 表柔比星干预下的 SK-BR-3-C1 及 SK-BR-3-PAQR3 细胞 p-ERK 的表达 1:SK-BR-3-C1; 2:SK-BR-3-C1 加 30 μg/mL 表柔比星处理; 3:SK-BR-3-PAQR3 加 30 μg/mL 表柔比星处理

图 5 Western blot 检测 PAQR3 增加 SK-BR-3 对表柔比星的敏感性

3 讨论

随着化疗的不断进展,包括术前新辅助化疗及术后辅助化疗,乳腺癌患者的近、远期疗效显著提高,化疗成为了乳腺癌综合治疗中不可或缺的重要组成部分。但化疗耐药给乳腺癌的治疗带来了一定困难。多年来,人们主要通过研发新化疗药物提高疗效,但肿瘤化疗耐药依然严重。因此,一些旨在改善肿瘤细胞本身易感性的方法逐渐开展,如改善肿瘤组织血供的化疗增敏剂;降低癌细胞膜流动性的化疗增敏剂;降低癌细胞内 pH 值;转导某些有增敏作用的基因等。

表柔比星其作为蒽环类药物的经典代表,是乳腺癌常用 TAC(多柔比星、环磷酰胺、多西他赛)及 CEF(环磷酰胺、表柔比星、5-氟尿嘧啶)化疗方案的组成成分,被认为是较为有效的化疗药物。RAS/RAF/ERK 通路由一组级联活化的丝/苏氨酸蛋白激酶组成,广泛存在于各种细胞中,肩负着将信号由胞膜受体向胞内转导的任务,对细胞周期和基因表达有重要调控作用[10]。在乳腺癌中,该通路持续激活[11],并被认为与

乳腺癌的增殖、转移及耐药相关[12-13]。因此,抑制乳腺癌细胞 RAS/RAF/ERK 通路活化是重要的乳腺癌治疗理念。然而部分研究发现表柔比星在治疗乳腺癌时可致 RAS/RAF/ERK 通路活化[5, 14],使表柔比星的疗效减低。表柔比星干预下 p-ERK 表达增加这一现象在本研究中也得到证实,30 μg/mL 表柔比星处理 SK-BR-3-C1 后,其 ERK 活化程度相对于对照组细胞显著增高。因此,靶向 RAS/RAF/ERK 通路干预使提高乳腺癌表柔比星疗效成为可能。

PAQR3 蛋白被认为具有负向调节 RAS/RAF/ERK 通路活化的作用,该效应主要通过将 RAF 蛋白锚定在高尔基体使其失去与 RAS、MEK 的联系而实现。因此,本研究拟通过在乳腺癌细胞中过表达 PAQR3 以抑制表柔比星所致的 ERK 活化。结果发现与对照组乳腺癌细胞相比,过表达 PAQR3 的乳腺癌细胞对表柔比星的敏感性显著提高,IC_{50}显著下降,差异均具有统计学意义($P<0.05$),提示 PAQR3 可能具有促进乳腺癌细胞凋亡的作用。但研究机制发现,PAQR3 本身并不能增加乳腺癌细胞的凋亡率,转染组与对照组乳腺癌细胞凋亡率并无显著性差异($P>0.05$),表明 PAQR3 对乳腺癌细胞的凋亡并无影响,且 Western blot 检测并未发现 PAQR3 增加乳腺癌细胞 Cleaved Caspase-7 的表达,这与以往研究结果类似[15]。但是,采用相同浓度的表柔比星干预乳腺癌细胞 SK-BR-3-C1 与 SK-BR-3-PAQR3 相同时间后,PAQR3 可以增加凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase-7 的表达。这在一定程度上提示了 PAQR3 增强乳腺癌细胞对表柔比星敏感性的原因。此外,本研究还发现在相同浓度表柔比星干预相同时间后,SK-BR-3-PAQR3 细胞的 p-ERK 表达量相对于 SK-BR-3-C1 细胞明显降低,说明 PAQR3 可以抑制表柔比星所致的 ERK 活化,从而提高乳腺癌细胞对表柔比星的化疗敏感性。最后,本研究还发现在 4 株乳腺癌细胞中,三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 PAQR3 表达水平最高,根据 PAQR3 可以提高乳腺癌细胞对表柔比星的敏感性这一发现,我们推测三阴性乳腺癌对蒽环类药物敏感的临床现象可能与此相关,但仍有待进一步明确。

总之,本研究基于在乳腺癌化疗中表柔比星常导致 ERK 活化的现象,提出 PAQR3 可提高乳腺癌细胞对表柔比星敏感性的观点,PAQR3 表达可能与乳腺癌对表柔比星的化疗敏感性相关,给乳腺癌的诊治提出了新的思路。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

[2] Orlowski R Z, Baldwin A S Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer [J]. Trends Mol Med, 2002, 8(8): 385-389.

[3] Adderley S R, Fitzgerald D J. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(8): 5038-5046.

[4] Kim S G, Sung M, Kang K W, *et al*. DA-125, a novel anthracycline derivative showing high-affinity DNA binding and topoisomerase Ⅱ inhibitory activities, exerts cytotoxicity *via* c-Jun N-terminal kinase pathway [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 47(6): 511-518.

[5] Small G W, Somasundaram S, Moore D T, *et al*. Repression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 by anthracyclines contributes to their antiapoptotic activation of p44/42-MAPK [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 307(3): 861-869.

[6] Guise S, Braguer D, Carles G, *et al*. Hyperphosphorylation of tau is mediated by ERK activation during anticancer drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells [J]. J Neurosci Res, 2001, 63(3): 257-267.

[7] Gabra N, Khayat A, Calabresi P, *et al*. Detection of elevated basic fibroblast growth factor during early hours of *in vitro* angiogenesis using a fast ELISA immunoassay[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 205(2): 1423-1430.

[8] Feng L, Xie X, Ding Q, *et al*. Spatial regulation of Raf kinase signaling by RKTG [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(36): 14348-14353.

[9] Millarte V, Farhan H. The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis[J]. Scientific World Journal, 2012: 498278.

[10] Jin H S, Liao L, Park Y, *et al*. Neddylation pathway regulates T-cell function by targeting an adaptor protein Shc and a protein kinase Erk signaling [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(2): 624-629.

[11] 王杨, 陈彬, 姜晓梅, 等. 睾酮对乳腺癌细胞中 FEN1 表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(2): 95-98.

[12] Ding Q, Huo L, Yang J Y, *et al*. Down-regulation of myeloid cell leukemia-1 through inhibiting Erk/Pin 1 pathway by sorafenib facilitates chemosensitization in breast cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(15): 6109-6117.

[13] Switzer C H, Cheng R Y, Ridnour L A, *et al*. Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(5): R125.

[14] 曹迎明, 王殊, 张嘉庆, 等. MEK 抑制剂增加乳腺癌细胞 MCF-7 对表柔比星的敏感性 [J]. 中国癌症杂志, 2008, 18(11): 839-843.

[15] Jiang Y, Xie X, Li Z, *et al*. Functional cooperation of RKTG with p53 in tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition [J]. Cancer Res, 2011, 71(8): 2959-2968.

(**收稿**:2013-01-21;**修回**:2013-03-20)

(编辑 汪勤俭)