论著

文章编号:1000-5404(2013)15-1552-06

沉默整合素连接激酶基因抑制 TCA8113 舌癌细胞生长和侵袭

幸 宇[1,2],邓世雄[1],陈俊霞[2] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:法医生物信息学研究室[1],细胞生物学及遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心[2])

[摘要] **目的** 研究沉默整合素连接激酶(integrin-linked kinase,ILK)基因表达,对人舌鳞癌细胞生长、侵袭和转移能力的影响。**方法** 通过用ILK mRNA的特异性siRNA表达载体和无同源性的对照载体,在脂质体介导下稳定转染人舌鳞癌TCA8113细胞,分为TCA8113组、TCA8113 vector组和TCA8113 siILK组,通过筛选鉴定后,用MTT法、划痕试验和Transwell法分别检测细胞生长、迁移和侵袭能力,用Western blot分析细胞中ILK、p-Akt、p-GSK3β及Snail等的表达。**结果** 沉默ILK基因表达显著抑制了细胞的生长、迁移和侵袭能力,接种的第48、72、96、120小时,TCA8113 siILK组的抑制率分别为17%、29%、25%、42%,迁移能力较TCA8113组和TCA8113 vector组分别下降67%和66%,侵袭能力则较两个对照组下降了67%和68%,p-Akt、p-GSK3β及Snail的表达较TCA8113组和TCA8113 vector组分别降低了45%和53%,57%和61%,74%和73%。**结论** 抑制ILK基因的表达可通过Akt/GSK3β/Snail途径,显著抑制人舌鳞癌TCA8113细胞的生长、迁移和侵袭潜能,可作为治疗人舌鳞癌的靶蛋白。

[关键词] 整合素连接激酶;人舌鳞癌细胞;肿瘤生长;转移;侵袭
[中图法分类号] R394.3;R73-37;R739.86 [文献标志码] A

Silencing integrin-linked kinase inhibits growth and metastasis in human tongue cancer TCA8113 cells

Xing Yu[1,2], Deng Shixiong[1], Chen Junxia[2] ([1]Laboratory of Forensic Medicine and Biomedical Information, [2]Department of Cell Biology and Genetics, Center of Molecular Medicine and Cancer Research, Collage of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of silencing integrin-linked kinase (ILK) on the proliferation, migration and invasion of human tongue squamous cancer TCA8113 cells. **Methods** ILK siRNA expression plasmid and a non-homologous vector (negative control) were transferred into TCA8113 cells, respectively. Then the transfected cells were screened and identified. MTT assay, wound healing experiment and transwell assay were employed to measure cell proliferation, migration and invasion. The expression of p-Akt, p-GSK3β and Snail was detected by Western blotting. **Results** Inhibition of ILK expression obviously suppressed TCA8113 cell proliferation, migration and invasion, as well as down-regulated the expression of p-Akt, p-GSK3β and Snail. The inhibitory rates at 48, 72, 96 and 120 h were 17%, 29%, 25% and 42% in TCA8113 siILK group, respectively. The migration capacity was decreased by 67% and 66% compared with the other two control groups. The invasion capacity was decreased by 67% and 68% compared with the other two control groups. The expression of p-Akt, p-GSK3β and Snail was decreased by 45% and 53%, 57% and 61%, 74% and 73%, compared with the other two control groups, respectively. **Conclusion** Silencing ILK inhibits the proliferation, migration and invasion of TCA8113 cells through Akt/GSK3β/Snail-dependent pathway. ILK can be a therapeutic target protein for tongue cancer.

[**Key words**] integrin-linked kinase; human tongue squamous cancer cells; tumor growth; migration; invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172424) and the Project of College of Basic Medical Sciences of Chongqing Medical University (0800280016). Corresponding author: Chen Junxia, E-mail: chjunxia@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172424);重庆医科大学基础医学院院办课题(0800280016)
[通信作者] 陈俊霞,E-mail:chjunxia@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130619.1518.009.html(2013-06-19)

整合素连接激酶(integrin-linked kinase,ILK)位于粘着斑,是一种相对分子质量为5.9×10^4的细胞内信号蛋白。其结构在进化上相当保守,参与介导整合素与细胞外基质(extracellular matrix,ECM)相互作用,调控某些基本的生理过程,比如细胞存活、生长、细胞周期、粘附、增殖、侵袭和转移等。近年发现ILK的表达和活性在多种人类恶性肿瘤(如基底细胞癌、恶性胸膜间皮瘤)中都有升高[1-2],而抑制ILK的活性,对包括消化道癌症、乳腺癌和膀胱癌等癌细胞的生长、迁移、侵袭和血管生成均产生抑制作用[3-4]。

口腔(含咽部)肿瘤是一种严重的致死性疾病,高居全球癌症发病率的第6位,其中尤以舌癌最为常见,且与头颈部其他肿瘤相比,近年来舌癌的发生率呈升高趋势,预防及早期诊断情况差、预后差、易转移,5年生存率仅50%左右。1983年,何荣根等[5]建立的TCA8113是一种在早期即具有恶性形态的舌鳞状细胞癌,染色体66条,群体倍增时间为38.8 h,分裂指数高峰值可达61.0‰。目前对ILK在舌癌的生长、侵袭和转移中是否起到重要作用及其机制仍未完全明确。本研究通过RNA干扰技术在转录后水平特异高效地发挥基因沉默效果,下调TCA8113细胞ILK表达,观察其对信号转导分子p-Akt、Akt、p-GSK3β、GSK3α/β及Snail的表达,对细胞形态学、生长、侵袭及转移能力的影响,并探讨其机制,以期提供治疗的新思路和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及细胞 ILK siRNA表达质粒为本实验室构建及保存。TCA8113人舌鳞癌细胞购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.2 试剂 鼠抗人ILK单克隆抗体购自Santa Cruz公司,胎牛血清购自Hyclone公司,RPMI1640培养基及G418购自Gibco-BRL公司,脂质体Lipofectamine 2000试剂购自Invitrogen公司,兔抗人p-Akt、Akt、p-GSK3β、GSK3α/β及Snail抗体购自Bioworld公司,兔抗人β-actin抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,HRP标记的羊抗兔IgG和羊抗鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司,MTT试剂购自上海生博医学生物工程科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、转染和筛选 TCA8113细胞用含5%胎牛血清的RPMI1640培养基,在37 ℃,5% CO_2饱和湿度孵育箱中常规培养,待细胞汇合度达70%以上时传代。将对数生长期细胞按2×10^5/孔接种至6孔板,当细胞达70% ~80%汇合度,用脂质体Lipofectamine 2000将ILK siRNA表达质粒及阴性对照质粒分别转染细胞,并设未转染细胞对照,转染48 h后,荧光显微镜观察报告基因EGFP发出的绿色荧光。以G418进行筛选,前2周浓度为0.3 mg/mL,然后浓度减半培养6周,获得稳定表达细胞株,命名分别为TCA8113组(正常TCA8113细胞)、TCA8113 vector组(转染阴性对照质粒的TCA8113细胞)、TCA8113 siILK组(转染干扰质粒的TCA8113细胞)。

1.2.2 Western blot检测ILK蛋白质的表达 提取各组细胞的总蛋白,PAGE胶上样40 μg/孔,10% SDS-PAGE凝胶电泳1 h,常规湿法转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,ILK鼠单抗(1∶300稀释)4 ℃孵育过夜,HRP标记的羊抗鼠二抗(1∶1 000稀释)37 ℃孵育2 h,ECL化学发光显色,Bio-Rad凝胶成像仪观察照相,QuantityOne图像分析。

1.2.3 细胞免疫荧光检查ILK、p-Akt和p-GSK3β表达 取细胞爬片,待细胞达80% ~90%汇合度时,80%冰丙酮固定10 min,3% BSA的PBS在37 ℃孵育30 min,分别以ILK抗体(1∶50稀释)、p-Akt(S473)抗体和p-GSK3β(S9)抗体(1∶300稀释)4 ℃孵育过夜,PBS清洗3次,TRITC包被的羊抗鼠二抗(1∶100稀释,针对ILK)及羊抗兔二抗(1∶100稀释,针对p-Akt和p-GSK3β)在37 ℃避光孵育1 h,PBS清洗3次,每次5 min,50%甘油封片。使用Olympus多功能显微镜观察并拍照,SPOT 3.5软件分析结果。

1.2.4 细胞形态学观察 取细胞爬片,甲醇固定20 min,常规HE染色。使用NIKON TE2000-U倒置显微镜和Olympus多功能显微镜分别观察活细胞及HE染色细胞并拍照。

1.2.5 细胞迁移测定 使用划痕试验。将细胞接种到6孔板,当细胞达到95%汇合度时,以消毒的10 μL枪头划痕(0.5 mm),立即更换无血清培养基培养48 h。于划痕后0、48 h分别在相差显微镜下拍照,观察伤口愈合程度,每组细胞随机选取5处划痕位置测量宽度。

细胞相对迁移能力=0 h时划痕距离-48 h时划痕距离

1.2.6 细胞侵袭能力测定 使用Transwell法。Transwell小室基底膜(孔径8 μm)上室面以50 μL基质胶包被,4 ℃风干过夜,使用前1 h室温水化。用含0.1% BSA的无血清培养基稀释细胞至2×10^6/mL,接种100 μL至上室中,下室中加入800 μL含10% FBS的培养基常规培养24 h,甲醇固定,0.1%结晶紫染色。Olympus多功能显微镜下随机选取9个视野观察,取细胞数平均值。

1.2.7 细胞周期和凋亡检测 使用流式细胞术。收集1.2.1中各组细胞,制备细胞悬液,70%乙醇4 ℃固定24 h,加入RNA酶(50 μg/mL),37 ℃孵育1 h,碘化丙啶溶液(100 μg/mL)染色30 min,流式细胞仪检测细胞周期的分布;凋亡检测用细胞无需固定。实验重复3次。

1.2.8 细胞增殖活力的检测 使用MTT法。取对数生长期的1.2.1中各组细胞,制备单细胞悬液,以2×10^3/孔接种于96孔培养板,每组设8个复孔,同时设不加细胞只加培养基的空白对照孔,常规培养;分别于培养24、48、72、96、120 h后,加MTT溶液20 μL/孔并继续培养4 h,然后移去培养基,加150 μL DMSO/孔,酶联免疫检测仪检测490 nm波长下各孔吸光度值[$D(490)$]。以时间为横坐标,$D(490)$值为纵坐标,绘制细胞生长曲线。

1.2.9 Western blot检测Akt、p-Akt、GSK3α/β、p-GSK3β及Snail蛋白质的表达 方法同1.2.2。一抗为p-Akt、Akt、p-GSK3β、GSK3α/β及Snail兔多抗(1∶500稀释),二抗为HRP标记的羊抗兔IgG(1∶1 000稀释)。

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 11.5统计软件,组间比较行方差分析。

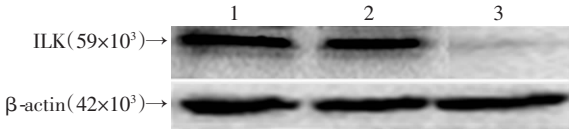
2 结果

2.1 转染后 EGFP 表达

荧光显微镜下转染组细胞均可见绿色荧光,转染效率达60%以上,未转染的细胞无荧光信号,见图1。

2.2 细胞 ILK 蛋白的表达水平

TCA8113 siILK 组 ILK 蛋白的表达水平较 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组显著降低,差异具有统计学意义($F=257.752$,$P<0.01$);而2个对照组间表达水平相近,差异无统计学意义($F=3.569$,$P>0.05$),见图2。

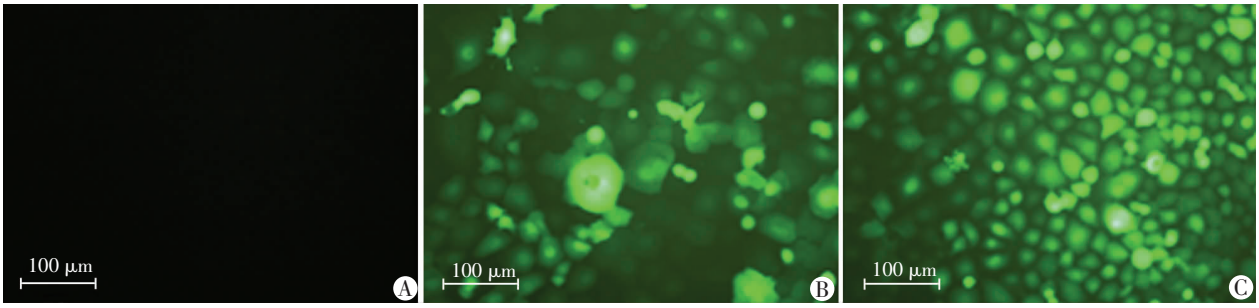


1:TCA8113 组;2:TCA8113 vector 组;3:TCA8113 siILK 组

图2 Western blot 检测各组细胞中 ILK 蛋白的表达

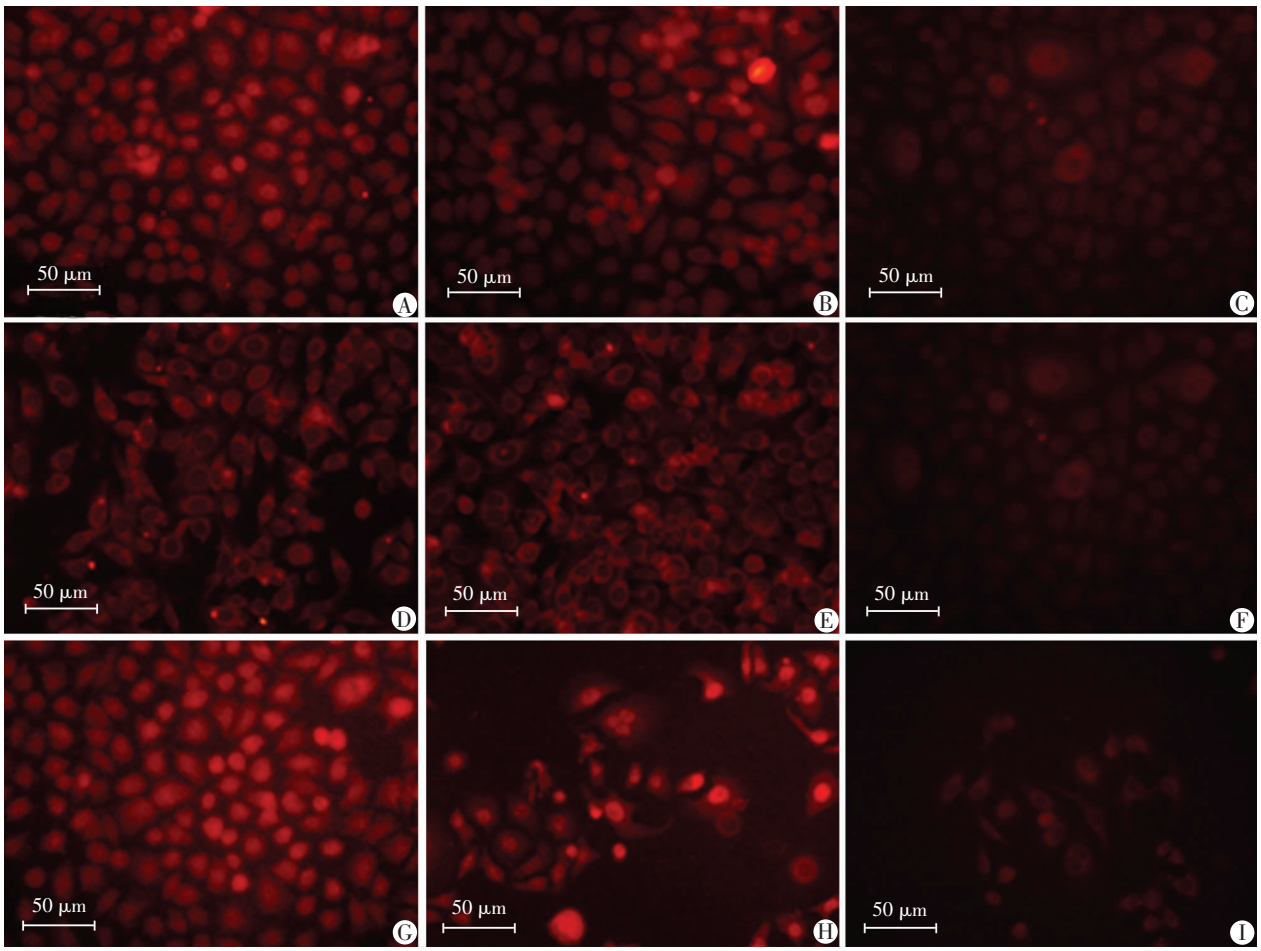
2.3 细胞免疫荧光分析

与 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组相比,TCA8113 siILK 组 ILK、p-Akt 和 p-GSK3β 在细胞质中的荧光信号明显减弱,提示沉默 ILK 基因后,ILK、p-Akt 和 p-GSK3β 含量下降,见图3。



A: TCA8113 组;B: TCA8113 vector 组;C: TCA8113 siILK 组

图1 荧光显微镜观察转染 48 h 后各组细胞的形态变化



A、D、G: TCA8113 组的 ILK、p-Akt 和 p-GSK3β 表达;B、E、H: TCA8113 vector 组的 ILK、p-Akt 和 p-GSK3β 表达;C、F、I: TCA8113 siILK 组的 ILK、p-Akt 和 p-GSK3β 表达

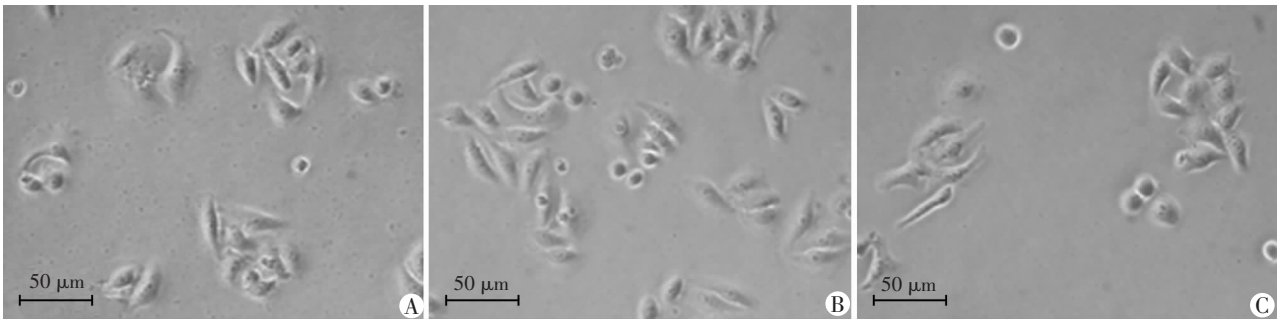
图3 免疫荧光检测各组细胞中 ILK、p-Akt 和 p-GSK3β 的表达

2.4 细胞形态学观察

HE 染色显示 TCA8113 siILK 组与 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组相比，大部分细胞的上皮形态特征更为明显，细胞核较小，分裂象减少，胞浆嗜碱性较弱，表明其恶性程度较低。与之相反，TCA8113 组和 TCA8113 vector 组的部分细胞的间叶组织特征更为明显，恶性程度也较高。活细胞的观察结果（图 4）与 HE 染色表现（图 5）相类似。

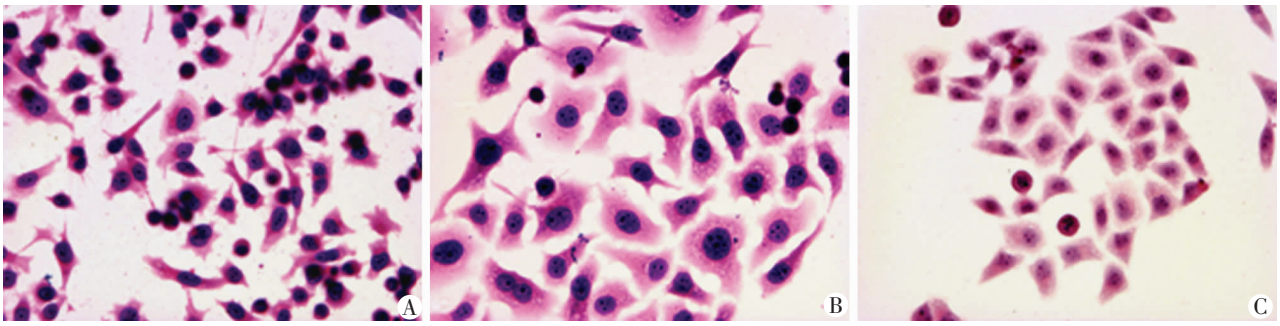
2.5 细胞迁移能力的变化

TCA8113 组和 TCA8113 vector 组在 24 h 内迁移距离分别为（122.48 ± 21.66）μm 和（121.37 ± 12.98）μm，TCA8113 siILK 组则为（41.93 ± 5.74）μm，显著小于 2 个对照组（$F = 17.329$，$P < 0.05$），较 2 个对照组分别下降 66.8% 和 65.5%，表明迁移能力下降。见图 6。



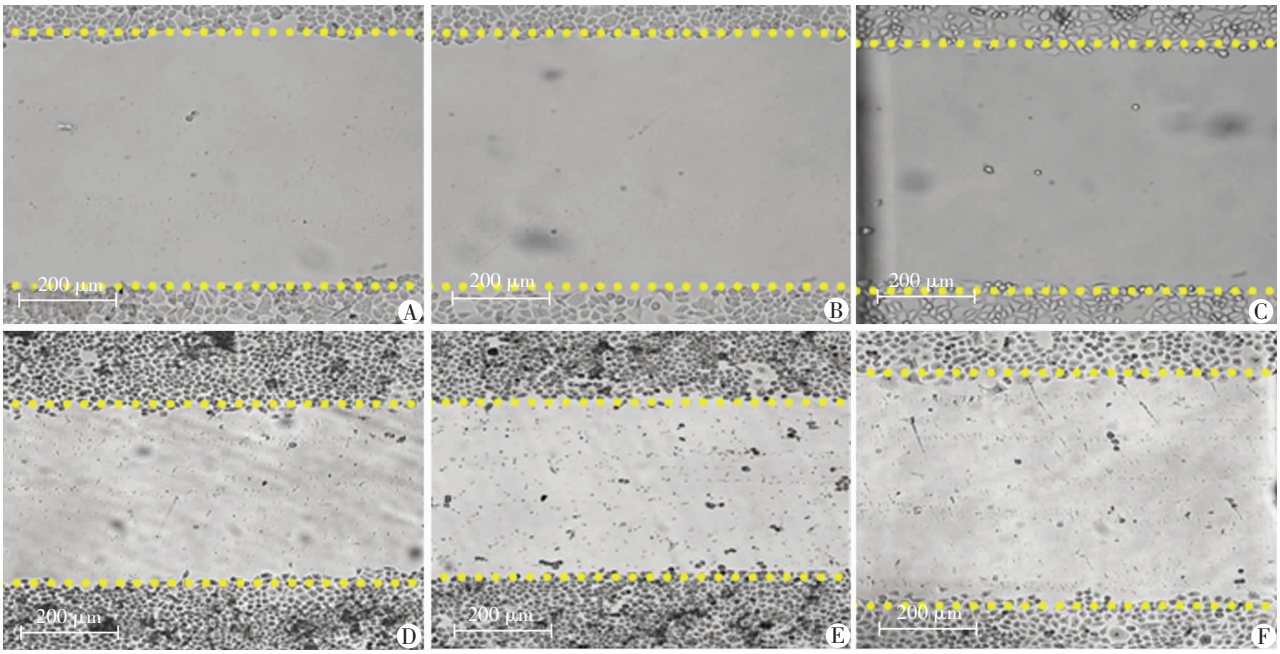
A：TCA8113 组；B：TCA8113 vector 组；C：TCA8113 siILK 组

图 4　倒置显微镜下观察各组活细胞形态变化



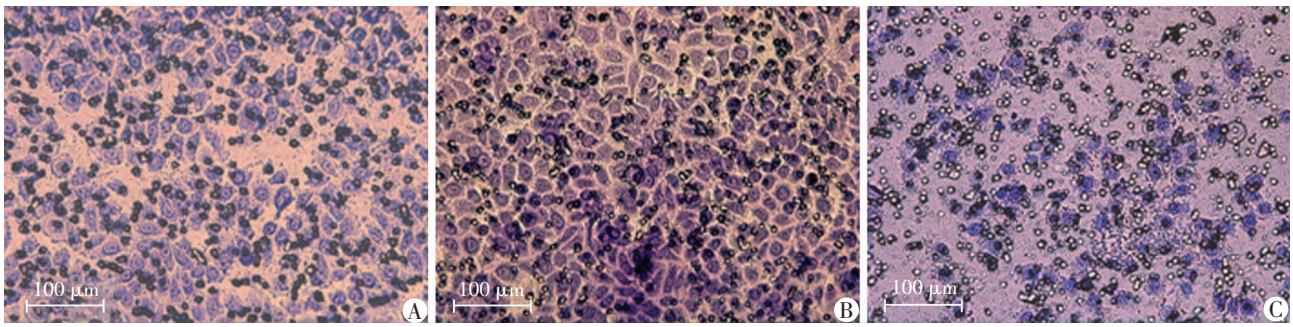
A：TCA8113 组；B：TCA8113 vector 组；C：TCA8113 siILK 组

图 5　HE 染色观察各组细胞形态学变化　（×400）



A：TCA8113 组 0 h；B：TCA8113 vector 组 0 h；C：TCA8113 siILK 组 0 h；D：TCA8113 组 48 h；E：TCA8113 vector 组 48 h；F：TCA8113 siILK 组 48 h

图 6　划痕试验检测各组细胞的迁移能力　（相差显微镜）



A:TCA8113 组;B:TCA8113 vector 组;C:TCA8113 siILK 组

图7 Transwell 试验检测各组细胞的侵袭能力 (显微镜)

2.6 细胞侵袭能力的变化

TCA8113 组和 TCA8113 vector 组在 24 h 的侵袭细胞数分别为(459 ± 41)、(476 ± 23),TCA8113 siILK 组则为(153 ± 56),分别为 2 个对照组的 33% 和 32%,侵袭能力显著降低(F = 23.639, P < 0.05),较 2 个对照组下降了 67% 和 68%(图 7),这与迁移实验结果一致,提示沉默 ILK 基因后会降低细胞侵袭能力。

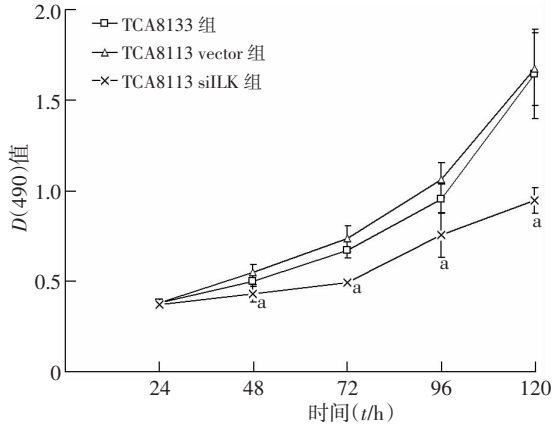
2.7 细胞周期和细胞凋亡检测

TCA8113 siILK 组与 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组相比,G_2/M 期细胞比例分别增加了(4.21 ± 0.03)倍和(3.65 ± 0.08)倍,G_0/G_1 期减少了(53.69 ± 1.19)% 和(55.41% ± 1.71)%,差异有统计学意义(F = 582.128, P < 0.01)。表明沉默 ILK 基因的表达可通过阻滞 G_2-M 期和抑制 G_0-G_1 期,抑制 TCA8113 细胞增殖。

TCA8113 siILK 组与 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组相比,凋亡细胞比例没有明显变化,各组间无显著差异(F = 1.544, P > 0.05)。表明沉默 ILK 基因的表达对 TCA8113 细胞的凋亡没有明显的影响。

2.8 细胞增殖能力的变化

TCA8113 siILK 组细胞的 D(490)值于接种后第 2 天开始显著低于 TCA8113 vector 组和 TCA8113 细胞组(P < 0.05),接种第 48、72、96、120 小时,TCA8113 siILK 组的抑制率分别为 17%、29%、25%、42%,而 TCA8113 vector 组和 TCA8113 组无明显差异(P > 0.05,图 8)。证明沉默 ILK 基因的表达可显著降低 TCA8113 细胞的增殖活力。

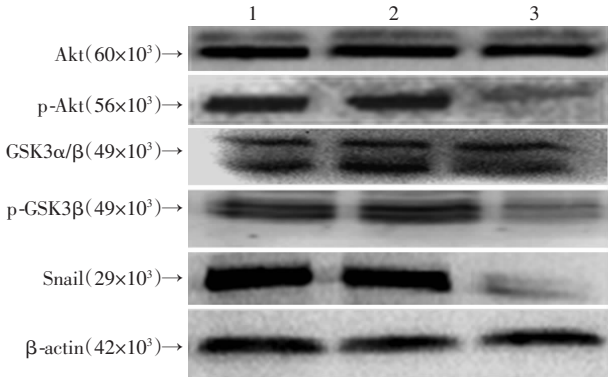


a:P < 0.05,与 TCA8113 组及 TCA8113 vector 组比较

图8 MTT 法检测各组细胞生长增殖能力

2.9 沉默 ILK 对 Akt、p-Akt、GSK3α/β、p-GSK3β 及 Snail 蛋白表达的影响

TCA8113 siILK 组 p-Akt、p-GSK3β 和 Snail 蛋白的表达与 TCA8113 组和 TCA8113 vector 组相比,分别降低了 45% 和 53%,57% 和 61%,74% 和 73%,差异有统计学意义(F = 378.581, P < 0.05);Akt 和 GSK3α/β 的表达在各组间水平相似,差异无统计学意义(F = 2.694, P > 0.05,图 9)。表明沉默 ILK 基因可降低 p-Akt、p-GSK3β 和 Snail 的表达,与细胞免疫荧光检测结果一致。



1:TCA8113 组;2:TCA8113 vector 组;3:TCA8113 siILK 组

图9 Western blot 检测各组细胞中的 Akt、p-Akt、GSK3α/β、p-GSK3β 及 Snail 蛋白表达

3 讨论

ECM 粘附对许多重要的细胞内过程的调控起着重要作用。在 ECM 粘附中广泛表达的 ILK,通过与细胞质内整合素的 β1 和 β3 亚基相互作用,将 ECM 与肌动蛋白骨架联系,同时通过其丝氨酸/苏氨酸激酶活性介导细胞内外的信号传导,连接 ECM 与细胞内组分。ILK 信号通路十分复杂,整合素及其他可溶介质(如生长因子和趋化因子)通过磷酸肌醇-3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)依赖的方式激活 ILK 的激酶活性,ILK 激活后,对其下游的各种负责调控细胞功能的效应器进行控制。如 I 型胶原蛋白在 ECM 中的表达可通过 ILK/GSK3β 依赖的 Bim 表达途径,诱发人肾小球系膜细胞的凋亡[6],而 ILK 在人头颈部鳞癌中表达升高,使用 ILK 抑制剂抑制 ILK 活性可抑制

肿瘤细胞的生长并诱发凋亡[7]。前期研究[8]发现了沉默ILK能抑制膀胱癌细胞的生长并诱导凋亡,但有报道[9]ILK对细胞功能的调控机制存在细胞特异性并可能存在种属特异性,故ILK对口腔颌面部的肿瘤的生长、侵袭和转移的调控作用及其生理学机制仍有待进一步研究阐明。本研究使用siRNA技术,高效地沉默了ILK的表达,发现抑制ILK表达可有效地抑制舌癌细胞的生长能力,并影响其细胞周期,但是却没有导致明显的凋亡发生,提示抑制ILK的表达是通过对舌癌细胞周期的调控而不是通过诱导凋亡来抑制其生长能力。此结果与我们的前期[10]发现并不完全一致,提示ILK对细胞功能的调控在某些方面(比如对凋亡的调控)可能存在细胞特异性,在舌癌细胞中可能存在其他机制和信号通路发挥抗凋亡作用,我们将在下一步的研究中对ILK对细胞周期和凋亡的信号通路和调控机制进行探索。

ILK分别通过对其下游底物分子Akt和GSK3β的Ser473和Ser9位点的磷酸化使之失活[11-12]。GSK3β通过对Snail的Ser246位点的磷酸化调控其降解,而ILK和Akt都可磷酸化GSK3β使其失活,从而抑制Snail的磷酸化[13],即ILK的过表达可以上调Snail的表达。本研究发现ILK表达被沉默后,p-Akt和p-GSK3β表达水平明显下降,但Akt和GSK3α/β的表达水平没有明显改变,提示Akt和GSK3β的磷酸化被抑制。同时,Snail表达水平也相应下降,提示抑制ILK表达阻断了Akt/GSK3β/Snail途径,从而下调了Snail的表达。

Snail是一种锌指转录因子,其家族包括Snail1(Snail)、Snail2(Slug)、ZEB1、SIP1、E12/FA7等。文献[14]报道人类永生乳腺上皮细胞Snail表达升高可抑制E-钙黏蛋白(E-cadherin)并同时上调N-钙黏蛋白(N-cadherin)的表达削弱细胞间的连接;另一方面,Snail可以促进基质金属蛋白酶的表达,降解基质以促进细胞侵袭,还可以抑制EPLIN等细胞骨架成分的表达从而造成细胞骨架的重建[15],故Snail可提高细胞的迁移和侵袭能力,并影响细胞的形态。本课题组前期研究发现沉默ILK可降低膀胱癌细胞中MMP2和MMP9的表达,并造成细胞骨架的重建,与文献报道一致。本研究发现沉默ILK表达后,Snail表达受到抑制,舌癌细胞的形态学发生改变,细胞的上皮特征更为显著,同时生长能力、迁移和侵袭能力也显著下降,提示沉默ILK通过阻断Akt/GSK3β/Snail途径,进而可能影响E-cadherin和基质金属蛋白酶等的表达机制,调控前述细胞功能和生理过程,本课题组将进一步检测前述指标以证实这一假设,以期更深入地明确ILK的调控机制。

综上所述,本研究发现抑制舌癌TCA8113细胞的ILK表达后,Akt/GSK3β/Snail途径受到抑制,进而抑制细胞的生长,改变细胞周期分布,并抑制了细胞的迁移和侵袭能力,进一步提示了ILK在舌癌生长侵袭和转移中的作用机制,为将ILK作为一种新的抗肿瘤治疗的靶基因提供了实验依据。

参考文献:

[1] Papanikolaou S, Bravou V, Gyftopoulos K, *et al*. ILK expression in human basal cell carcinoma correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and tumour invasion[J]. Histopathology, 2010, 56(6): 799-809.

[2] Watzka S B, Posch F, Pass H I, *et al*. Detection of integrin-linked kinase in the serum of patients with malignant pleural mesothelioma[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 142(2): 384-389.

[3] Kalra J, Warburton C, Fang K, *et al*. QLT0267, a small molecule inhibitor targeting integrin-linked kinase (ILK), and docetaxel can combine to produce synergistic interactions linked to enhanced cytotoxicity, reductions in P-AKT levels, altered F-actin architecture and improved treatment outcomes in an orthotopic breast cancer model[J]. Breast Cancer Res, 2009, 11(3): R25.

[4] Wang M, Li C, Nie H, *et al*. Down-regulated miR-625 suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by targeting ILK[J]. FEBS Lett, 2012, 586(16): 2382-2388.

[5] 何荣根, 徐秀祺, 周晓健, 等. 人舌鳞状细胞癌Tca8113细胞系的建立及其生物学特性[J]. 肿瘤, 1983, 3(3): 97-100.

[6] Del N M, Luengo A, Olmos G, *et al*. Balance between apoptosis or survival induced by changes in extracellular-matrix composition in human mesangial cells: a key role for ILK-NFkappaB pathway[J]. Apoptosis, 2012, 17(12): 1261-1274.

[7] Younes M N, Yigitbasi O G, Yazici Y D, *et al*. Effects of the integrin-linked kinase inhibitor QLT0267 on squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2007, 133(1): 15-23.

[8] Gao J, Zhu J, Li H Y, *et al*. Small interfering RNA targeting integrin-linked kinase inhibited the growth and induced apoptosis in human bladder cancer cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(9): 1294-1304.

[9] Sakai T, Li S, Docheva D, *et al*. Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation[J]. Genes Dev, 2003, 17(7): 926-940.

[10] 朱军, 高娟, 李红彦, 等. 特异性ILK-siRNA对膀胱癌EJ细胞侵袭和迁移的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(4): 360-364.

[11] McDonald P C, Oloumi A, Mills J, *et al*. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival[J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1618-1624.

[12] Koul D, Shen R, Bergh S, *et al*. Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(11): 1681-1688.

[13] Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, *et al*. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3beta/snail signalling pathway[J]. Br J Cancer, 2012, 106(6): 1196-1204.

[14] Mani S A, Guo W, Liao M J, *et al*. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. Cell, 2008, 133(4): 704-715.

[15] Fendrich V, Waldmann J, Feldmann G, *et al*. Unique expression pattern of the EMT markers Snail, Twist and E-cadherin in benign and malignant parathyroid neoplasia[J]. Eur J Endocrinol, 2009, 160(4): 695-703.

(**收稿**:2013-03-27;**修回**:2013-04-16)

(编辑 汪勤俭)