DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.028
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1061-04

论著

IGF-ⅠR、IGF-ⅡR反义基因对SMMC-7721肝癌细胞生物学行为的影响

刘志鹏,杨建民,陈文生,罗元辉 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究胰岛素样生长因子Ⅰ型及Ⅱ型受体(IGF-ⅠR、IGF-ⅡR)反义基因对SMMC-7721肝癌细胞生物学行为的影响。方法 应用反义技术,在已转染了IGF-ⅠR反义基因的肝癌SMMC-7721(7721-IGF-ⅠR-AS)细胞基础上,继续利用IGF-ⅡR反义基因真核表达系统,通过DOTAP脂质体介导的转染技术,将IGF-ⅡR反义基因导入该细胞,经G418及潮霉素双重筛选获得稳定表达IGF-ⅠR、IGF-ⅡR反义基因的7721-IGF-R-AS细胞。采用光镜、电镜观察形态学变化,双层软琼脂克隆形成实验、MTT细胞生长曲线实验及裸鼠皮下接种实验观察转染后细胞体外生长情况。结果 7721-IGF-R-AS细胞在光镜、电镜下的肿瘤细胞形态恶性程度减低;在软琼脂培养基中的生长能力降低($P<0.01$);在裸鼠体内的致瘤能力也降低($P<0.05$);但细胞生长曲线与对照组比较则无明显差异。结论 IGF-ⅠR、IGF-ⅡR反义基因对SMMC-7721肝癌细胞株的恶性行为有明显抑制作用。利用反义技术干预肝癌细胞生长因子受体基因表达可能给肝癌的基因治疗提供新的途径。

关键词:IGF-ⅠR;IGF-ⅡR;反义基因;肝癌
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.7 文献标识码:A

Effects of IGF-ⅠR, IGF-ⅡR antisense gene transfection on the biological behaviors of SMMC-7721 human hepatoma cells

LIU Zhi-peng, YANG Jian-min, CHEN Wen-sheng, LUO Yuan-hui (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of IGF-ⅠR, IGF-ⅡR antisense gene transfection on the biological behavior of SMMC-7721 human hepatoma cells. Methods 7721-IGF-ⅠR-AS cells (human hepatoma SMMC-7721 cells transfected with IGF-ⅠR antisense gene) were transfected with a plasmid vector expressing IGF-ⅡR cDNA in the antisense orientation by DOTAP liposome. 7721-IGF-R-AS cells were obtained by selection with G418 and hygromycin. Morphological changes of cells were observed with optic and electron microscopes. *In vitro* growth of the 7721-IGF-R-AS cells was observed with soft agar test, MTT test and with nude mice inoculation test *in vivo*. Results The following changes were found in the SMMC-7721 cells after transfected with the IGF-IR and IGF-ⅡR antisense genes: ① The degree of malignancy of the tumor cells as revealed by cell morphology was ameliorated. ② The growth capability of SMMC-7721 cells in soft agar and tumorigenicity in nude mice were significantly decreased. However, in the control group, the SMMC-7721 cells transfected with IGF-IR and IGF-ⅡR sense cDNA and SMMC-7721 cells transfected without any external genes had no such changes. But, the cell growth curves had no significant differences among these three groups. Conclution IGF-ⅠR and IGF-ⅡR antisense gene could restrain the malignant behavior of human hepatoma cell significantly, and suggest a potential route for human tumor gene therapy.

Key words: IGF-ⅠR; IGF-ⅡR; antisense gene; hepatocellular carcinoma

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一。由于其发病机制尚未明确,临床治疗相当困难。近年来随着分子生物学理论和技术的飞速发展,有关肝癌基础研究的日益深入,人们对肝癌发病分子机制的认识不断得到丰富和更新。研究发现,胰岛素样生长因子家族(IGFs)的过量表达是肿瘤生长的重要原因之一[1],IGFs反义基因转染可以抑制前列腺癌、黑色素瘤、神经胶质瘤、大肠癌、乳腺癌等肿瘤细胞的体外生长[2]。

我们在以往的研究中,已分别单独地将IGF-ⅠR或IGF-ⅡR反义基因导入了SMMC-7721肝癌细胞,研究表明IGF-ⅠR基因被阻断后,SMMC-7721肝癌细胞有瘤细胞增殖性降低的表现[3];IGF-ⅡR基因被阻断后出现IGF-ⅠR基因转录明显上调现象,但细胞生长速度则无明显变化[4]。

迄今,肝癌细胞中IGF-ⅠR、IGF-ⅡR基因同时被阻断后会发生什么生物学行为的变化尚未见报道,我们利用反义技术对此作了研究,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

SMMC-7721人肝癌细胞株由中科院上海细胞所提供,本实验室保存、传代。7721-IGF-IR-S、7721-IGF-IR-AS细胞(源细胞为SMMC-7721肝癌细胞,分别转染有IGF-IR正义或反义基因,其载体含有Hygro基因)由本实验室周平博士转染、保存。IGF-ⅡR正、反义基因表达载体(用pCMV质粒构建,含有Neo基因)由本实验室陈文生副教授提供。IGF-ⅡR cDNA探针由上海肿瘤研究所提供。DOTAP(tm)脂质体转染试剂盒、Highpure(tm)质粒提取试剂盒、Tripure(tm)核酸提取试剂盒购自Roche公司。South2North(tm) HRP-随机引物标记试剂盒购自Pierce公司。PCR试剂盒购自Shanghai Promega公司。另有:RPMI 1640细胞培养基及小牛血清(Hyclone)、PCR Maker(华美生物制品公司)、潮霉素及G418(Sigma)、琼脂糖及低熔点琼脂糖(GIBCO)。Balb/c裸鼠购自本校动物实验中心。

1.2 细胞培养

常规培养下为常规培养基:RPMI 1640加10%小牛血清和

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800063)
作者简介:刘志鹏(1971—),男,重庆市人,硕士,医师,主要从事肝癌方面的研究。电话:(023)68780561
收稿日期:2001-05-28;修回日期:2001-09-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

两种抗生素(青霉素 100 IU/ml,链霉素 100 IU/ml)。选择培养时为选择培养基:即在以上培养基基础上加入终浓度为 400 μg/ml 的新霉素或 100 μg/ml 的潮霉素。以上均培养于 37 ℃、5%CO_2、饱和湿度条件下。

1.3 基因转染

按 DOTAP(tm)脂质体转染试剂盒说明书的标准程序操作。转染后 48 h 传代,加 G418 400 μg/ml 筛选 3 周。此后抗性细胞在 G418 200 μg/ml 和潮霉素 50 μg/ml 的选择压力下进行扩大培养并冻存保种。7721-IGF-IR-S 细胞被转入 IGF-ⅡR 正义真核表达载体以后,更名为 7721-IGF-R-S 细胞;7721-IGF-IR-AS 细胞被转入 IGF-ⅡR 反义真核表达载体以后,更名为 7721-IGF-R-AS 细胞。

1.4 细胞基因组 DNA 的提取

按 Tripure(tm)试剂盒说明书操作。

1.5 PCR 实验

根据 IGF-ⅡR cDNA 序列,采用商品化的计算机软件(Primer Select 4.01 版)自行设计 1 对引物,上游引物在 3 375 bp 处,为 P1-5′TGTTCCTTCTCCAGTGGACTG3′;下游引物在 4 523 bp 处,为 P2-5′GACATAAGTCGCCATCAACGT3′。引物由上海生物工程公司合成。由于扩增的序列足够长,跨越了至少一个内含子,可以特异性地扩增外源性插入基因的片段(1 148 bp)。将以上提取的 7721-IGF-R-S 和 7721-IGF-R-AS 细胞基因组 DNA 各取 200 ng 为模板,行 PCR 反应。反应体系为:模板 DNA 5 μl,dNTP 2 μl,引物(P1+P2)15 pmol,25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 2.5 μl,10 PCR 缓冲液 2.5 μl,Taq 酶 1U(购自 Shanghai Promega),以上反应混合物加入至 0.2 ml 容积的 PCR 反应管内,用无菌去离子水加至 50 μl 的反应终体积。反应条件为:95 ℃预变性 10 min,然后 94 ℃ 50 s 60 ℃ 50 s 72 ℃ 1 min 30 个循环,72 ℃ 10 min 4 ℃保存。以 7721-IGF-IR-S 或 7721-IGF-IR-AS 细胞提取的细胞基因组 DNA 作为阴性对照模板。

1.6 PCR 产物的 Southern 吸印与杂交

按文献[5]操作。

1.7 HE 染色

将消过毒的盖玻片放入六孔板中,细胞接种在盖玻片上,24 h 后取出,10%福尔马林固定,常规 HE 染色,光镜下观察。

1.8 透射电镜检查

待三种细胞长至对数生长期后,由低浓度胰酶常规消化细胞,用弯头吸管吹打成细胞悬液,转入 5 ml 尖头玻璃离心管中,1 000 r/min 离心 5 min 后,去上清,生理盐水清洗 1 次,最后 3%戊二醛固定后送检。

1.9 MTT 细胞生长曲线

采用文献[6]方法。

1.10 双层软琼脂集落形成率实验

于 24 孔板中,下层低熔点琼脂浓度为 0.5%,上层为 0.33%,每孔上层低熔点琼脂含细胞数为 2 000 个,每种细胞共铺 5 孔。把培养板移入 CO_2 孵箱,在 37 ℃、5%CO_2 及饱和湿度环境下培养 2~3 周后倒置显微镜下计数直径大于 100 μm 或含 50 个细胞以上的克隆,并计算克隆形成率(克隆形成数/接种细胞数×100%=克隆形成率)。

1.11 裸鼠体内致瘤性研究

裸鼠共 6 只,雌雄兼有,约 4~5 周龄,饲养在 SPF(Spectic Pathogen Free)条件下,随机分为 2 组,各组裸鼠左侧大腿背部皮下接种 4×10^5 个 SMMC-7721 细胞,右侧接种同样数量的 7721-IGF-R-S 或 7721-IGF-R-AS 细胞。每隔 7 d 观察一次肿瘤形成情况及测量肿瘤大小,连续观测 6 周,并用卡尺准确测量并记录肿瘤结节大小。肿瘤体积大小=$LW^2/2$(L=长度,W=宽度)。

1.12 统计学处理

数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并采用 SPSS 专业统计程序行单因素方差分析、非配对资料 t 检验处理。

2 结果

2.1 外源性基因片段插入的 PCR 及 Southern 杂交鉴定

电泳结果 7721-IGF-R-S 和 7721-IGF-R-AS 转染细胞的基因组 DNA 均扩增出 1 148 bp 大小的特异性扩增产物条带,而对照组(7721-IGF-Ⅰ R-S 和 7721-IGF-Ⅰ R-AS 细胞)没有扩增出该条带,见图 1。将电泳凝胶转膜后与 IGF-ⅡR DNA 探针行 Southern 杂交形成明显的杂交带,说明正义 IGF-ⅡR 和反义 IGF-ⅡR 基因已成功转入 7721-IGF-Ⅰ R-S、7721-IGF-Ⅰ R-AS 细胞。



图 1 PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上的电泳结果

Fig 1 Result of PCR product in 1% gelose gel

1: PCR Maker(1543, 994, 697, 515, 377, 237 bp); 2: PCR product of 7721-IGF-R-S; 3: PCR product of 7721-IGF-R-AS; 4: PCR product of 7721-IGF-Ⅰ R-S; 5: PCR product of 7721-IGF-Ⅰ R-AS

2.2 光镜及电镜观察

2.2.1 光镜 7721-IGF-R-S 及 SMMC-7721 细胞镜下均可见细胞胞体较大,核大,核浆比例增大,常见多个核仁,尤其 7721-IGF-R-S 细胞核分裂像多见,可见多核瘤巨细胞。而 7721-IGF-R-AS 细胞则细胞核较小,核浆比例减小,核分裂像明显减少,见图 2。

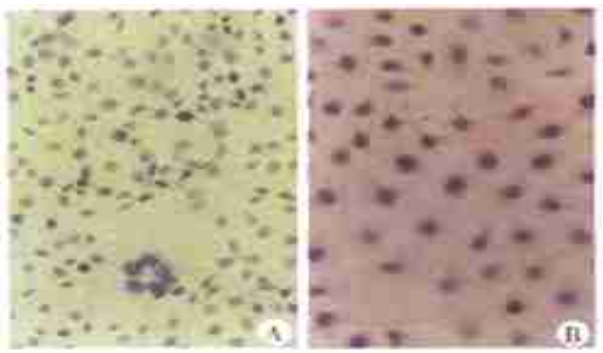


图 2 基因转染后的细胞形态 (HE×200)

A: 7721-IGF-R-S; B: 7721-IGF-R-AS

Fig 2 Cell morphology after transfection (HE×200)

A: 7721-IGF-R-S; B: 7721-IGF-R-AS

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2.2　电镜　　7721-IGF-R-S 及 SMMC-7721 细胞镜下恶性形态明显: 核浆比例增大, 核仁大且常见多个核仁。细胞微绒毛明显, 见多个瘤巨细胞。7721-IGF-R-AS 细胞则核浆比例较正常, 核仁较圆, 核膜规则, 皱褶较少, 呈圆形。线粒体肿胀、空泡明显, 提示线粒体变性, 见图 3。

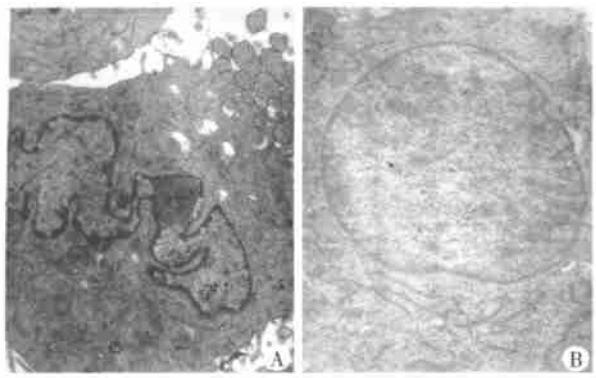


图 3　基因转染后细胞形态　(TEM× 4 000)

A: 7721-IGF-R-S; B: 7721-IGF-R-AS

Fig 3　Cell morphology after transfection　(TEM× 4 000)

A: 7721-IGF-R-S; B: 7721-IGF-R-AS

2.3　细胞转染克隆形成数

在六孔板中分别接种 7721-IGF-Ⅰ R-S、7721-IGF-Ⅰ R-AS 及 SMMC-7721 细胞, 细胞数为 1× 10^5 个/孔, 每种细胞各一孔。转染时前两种细胞质粒 DNA(sense IGF-ⅡR、antisense IGF-ⅡR)用量均为 2.5 μg, 后者不用质粒 DNA, 一次操作转染细胞, 共重复转染 3 次。经含 G418(400 μg/ml)的选择性培养基筛选 2～3 周, 各组细胞得到的阳性细胞克隆数见表 1。

表 1　各组转染细胞 G418 抗性细胞克隆形成数

Tab 1　Number of G418 resistant cell clones formed after transfection

Cell type	Plasmid DNA(μg)	No of cells	No of transfection times			
			1	2	3	($\bar{x}\pm s$)
7721-IGF-R-AS	2.5	1×10^5	20	5	15	13.0±7.5 *
7721-IGF-R-S	2.5	1×10^5	36	40	28	34.7±6.1
SMMC-7721	0	1×10^5	0	0	0	0±0.0

*: $P<0.05$ *vs* group 7721-IGF-R-S

从表 1 可以看出, IGF-Ⅰ R、ⅡR 反义基因转染后 G418 抗性细胞克隆数明显比 IGF-Ⅰ R、ⅡR 正义基因少, 提示 IGF-Ⅰ R、ⅡR 反义基因可能抑制细胞转染克隆形成。

2.4　细胞生长曲线

7721-IGF-Ⅰ R-S、7721-IGF-Ⅰ R-AS 在分别转染 IGF-ⅡR 正、反义基因后形成的 7721-IGF-R-S 和 7721-IGF-R-AS 细胞, 以及 SMMC-7721 细胞的生长曲线, 可以看出 3 种细胞生长速度无明显变化, 提示 IGF-Ⅰ R、ⅡR 反义基因可能对 SMMC-7721 细胞生长无明显影响, 见图 4。

2.5　软琼脂集落形成数

在双层软琼脂培养中, SMMC-7721 细胞生长明显较其它细胞旺盛, 一般在第 5～7 天开始形成明显簇状细胞集落, 且细胞集落较其它细胞形成的集落大, 数量多, 其软琼脂集落形成率为(10.29±0.85)%。7721-IGF-R-S 细胞生长速度较慢, 一般在 7～10 d 开始形成明显集落, 集落形成率为(8.25±1.75)%。而绝大多数 7721-IGF-R-AS 细胞不能在软琼脂内生长形成集落, 大多数细胞在两周以后死亡, 少数呈单个散在细胞, 只有极少数细胞能在第 2 周后形成较小的簇状细胞集落, 其集落形成率为(0.18±0.21)%, 见表 2, 图 5。

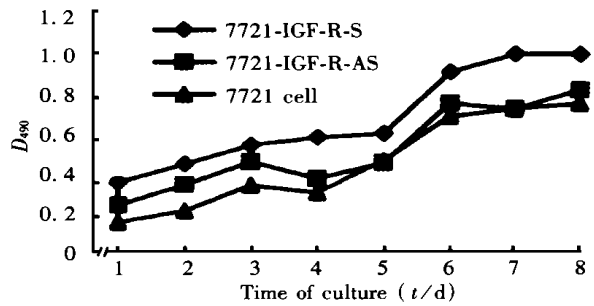


图 4　IGF-Ⅰ R、ⅡR 的正、反义基因对 SMMC-7721 细胞生长的影响

Fig 4　Effect of IGF-Ⅰ R, ⅡR antisense gene on SMMC-7721 cell growth

表 2　IGF-Ⅰ R、ⅡR 的正、反义基因对 SMMC-7721 细胞在软琼脂中集落形成的影响

Tab 2　Effect of antisense IGF-Ⅰ R, ⅡR antisense gene on SMMC-7721 cloneformation in soft agar

Cell type	No. of inoculation holes					$\bar{x}\pm s$
	1	2	3	4	5	
SMMC-7721	230	190	212	208	189	205.8±17.0 *
7721-IGF-R-S	218	17	159	140	130	165.0±34.9 *
7721-IGF-R-AS	9	7	2	0	0	3.6±4.2

cells are seeded at a concentration of 2000 cells per hole and the number of colonies are calculated after 3 weeks; *: $P<0.01$ *vs* group 7721-IGF-R-AS

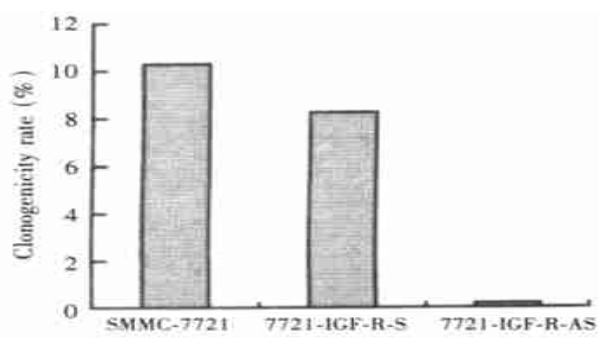


图 5　各组细胞软琼脂克隆形成率比较

Fig 5　The cloneformation rate of SMMC-7721, 7721-IGF-R-S and 7721-IGF-R-AS growing in soft agar

2.6　裸鼠体内致瘤能力

以 4× 10^5 细胞数接种裸鼠皮下后, 7721-IGF-R-S 及 SMMC-7721 细胞 16 或 17 d 即可见肿瘤出现。而 7721-IGF-R-AS 细胞肿瘤出现时间明显延长, 至 25 d 才出现肿瘤, 且肿瘤体积明显小于对照侧 SMMC-7721 和 7721-IGF-R-S 细胞接种形成的肿瘤($P<0.05$)。说明 IGF-Ⅰ R 及 IGF-ⅡR 反义基因转染 SMMC-7721 细胞后, 裸鼠体内致瘤能力受到抑制, 细胞恶性程度明显

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

降低，见表3。

表3 IGF-Ⅰ R、ⅡR正、反义基因对SMMC-7721细胞裸鼠体内致瘤性的影响

Tab 3 Effect of IGF-Ⅰ R、ⅡR sense and antisense gene on tumor inducation in nude mice

Cell type	NO. of cells (1×10^5)	Growth of tummor		
		Frequency	Days of appearance	Tumor volume(mm^3) ($\bar{x}\pm s$)
7721-IGF-R-AS	4	2/3	25	35.2±26.7 *
SMMC-7721	4	3/3	17	183.5±18.6
7721-IGF-R-S	4	3/3	16	227.7±81.2 **
SMMC-7721	4	3/3	17	220.7±30.0

*：$P<0.05$，**：$P>0.05$ *vs* group SMMC-7721(on the opposite side)

3 讨论

有研究发现IGFs刺激细胞的增殖效应主要通过IGF-Ⅰ R起作用；而另一些报道认为IGF-ⅡR在细胞生长过程中也起到一定作用，IGF-ⅡR可通过影响离子或基质的转运、增加RNA、蛋白质、糖元合成而参与细胞分裂[7]。另有研究发现，在人原发性肝癌及癌旁组织中，IGF-Ⅱ及其受体IGF-Ⅰ R和ⅡR同时过量表达，形成一个自我促进增殖的自分泌及旁分泌系统。

本次实验将IGF-Ⅰ R、ⅡR反义基因转染SMMC-7721肝癌细胞，同时抑制了IGF-Ⅰ R和IGF-ⅡR的表达，结果发现，反义基因转染组形成的G418抗性克隆数明显低于正义基因转染组；光镜、电镜表明7721-IGF-R-AS细胞的异型性等恶性变化较SMMC-7721及7721-IGF-R-S细胞有明显降低；7721-IGF-R-AS细胞在软琼脂中生长能力、在裸鼠体内致瘤性都明显降低。以上结果提示IGF-Ⅰ R、ⅡR基因是SMMC-7721人肝癌细胞株维持其恶性表型的重要基因之一，当两者受到抑制后细胞的恶性表型得到一定的抑制。

在实验中我们也发现7721-IGF-R-AS细胞生长曲线无明显变化。根据近几年文献资料，其可能机制有以下几种：①细胞的其它基因发生激活或表达代偿性增加，如胰岛素、集落刺激因子Ⅰ R(CSF－Ⅰ R)、转化生长因子β1(TGFβ1)、表皮生长因子受体(EGFR)等生长因子表达的增加，可能对抗反义基因对IGF-Ⅰ R、ⅡR的抑制效应，细胞得以生存，并使细胞生长曲线无明显变化。这说明细胞的生长并不是由某种生长因子单独控制的，可能是由这些生长因子通过协调作用来调节细胞的生长，单靠抑制一种生长因子的表达，并不能达到完全抑制肿瘤细胞生长的目的。目前，研究这些生长因子之间的相互关系已成为肿瘤研究的热点之一[8]。②胰岛素受体表达代偿性增加所致的拮抗作用。由于IGF-Ⅰ能分别与IGF-Ⅰ R、ⅡR及人胰岛素受体(HIR)结合而发挥其生物学功能，当IGF-Ⅰ R和IGF-ⅡR受到抑制时，能通过胰岛素受体继续发挥促进细胞生长的作用。③IGF-Ⅰ R和ⅡR不同程度的封闭效果有不同的生物学效应。有研究者利用R-cell制造了具有不同IGF-Ⅰ R表达量的研究细胞，以了解这些细胞的生长情况。结果显示，只有受体密度下降到一定程度(3×10^3/cell)才能完全抑制细胞的生长；如果抑制程度较低(如22×10^3/cell)则细胞仍有DNA合成和细胞分化，表现为单层细胞贴壁生长良好，而在软琼脂中细胞不能形成集落[9]。这种现象与本实验观察到的情况相一致。

本中心在以往的研究中，已分别单独地将IGF-Ⅰ R或IGF-ⅡR反义基因导入了SMMC-7721肝癌细胞，分别得到7721-IGF-Ⅰ R-AS或7721-IGF-ⅡR-AS细胞，并作了相关指标的检测。在本实验基础上，我们将7721-IGF-R-AS细胞与以上两种细胞作一比较：IGF-Ⅰ R和IGF-ⅡR反义基因联合转染可明显抑制肝癌细胞的恶性增殖，但与单独转染反义IGF-Ⅰ R基因差别不显著。说明IGFs刺激肿瘤细胞的增殖效应中，IGF-Ⅰ R所起的作用可能较IGF-ⅡR更为重要。

总之，本研究证明了反义IGF-Ⅰ R、ⅡR基因可以部分逆转SMMC-7721细胞的恶性表型。结合我们以往的研究结果，提示反义IGF-Ⅰ R基因所起的作用更为重要。这为将来开展肝癌的基因治疗提供了理论和实验依据。

（致谢：本研究中基因转染的鉴定得到第三军医大学分子遗传学教研室刘昕教授的指导和帮助，特致谢意。）

参考文献：

[1] Ly A, Francois J C, Upegui L C, *et al*. Alterations in tumorigenicity of embryonal carcinoma cells by IGF-I triple-helix induced changes in immunogenicity and apoptosis[J]. Life Sci, 2000, 68(3): 307－319.

[2] Chernicky C L, Yi L, Tan H, *et al*. Treatment of human breast cancer cells with antisense RNA to the type I insulin－like growth factor receptor inhibits cell growth, suppresses tumorigenesis, alters the metastatic potential, and prolongs survival *in vivo*[J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7(3): 384－395.

[3] 周 平，周子成，陈文生，等. 反义IGF-IR基因对肝癌细胞生长的抑制作用[J]. 第三军医大学学报，1999, 21(9): 624－626.

[4] 陈文生，刘为纹，周筱梅，等. IGF-II受体反义基因对肝癌细胞癌基因转录及生物学行为的影响[J]. 重庆医学，1997, 26(2): 79－82.

[5] J. 萨姆布鲁克，EF. 弗里奇，T. 曼尼阿蒂斯 著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京：科学出版社，1992. 889－890.

[6] 司徒镇强，吴军正，主编. 细胞培养[M]. 第2版. 西安：世界图书出版公司西安分公司，1996. 58.

[7] Quinn K A. Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines[J]. J Biol Chem, 1996, 271(19): 11 477－11 483.

[8] Yan Z, Deng X, Friedman E. Oncogenic Ki-ras confers a more aggressive colon cancer phenotype through modification of transforming growth factor-beta receptor III[J]. J Biol Chem, 2001, 276(2): 1 555－1 563.

[9] Rubin M, Hongo A, D' Ambrosic C, *et al*. The IGF-I receptor in mitogenesis and transformation of mouse embryo cells: Role of receptor[J]. Exp Cell Res, 1997, 230(1): 284－292.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net