

同时稳定抑制 X 连锁凋亡抑制蛋白和生存素表达 对胰腺癌细胞上皮-间质转化及侵袭性的影响

宰红艳¹, 易小平², 李宜雄¹, 江春³, 吕新生¹

(中南大学湘雅医院 1. 普外科; 2. 放射科; 3. 妇产科, 长沙 410008)

[摘要]目的: 探讨同时抑制 X 连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)和生存素(survivin)后, 对胰腺癌 Panc-1 细胞上皮-间质转化(EMT)及侵袭性的影响, 并初步探讨其机制。方法: 在前期实验构建的胰腺癌 Panc-1-XS 细胞(XIAP 和 survivin 同时稳定抑制)中, 运用 Transwell 小室实验及划痕实验分别检测细胞侵袭和迁移能力; 半定量 Western 印迹分别检测钙黏蛋白-E(E-cadherin, 上皮标志物)、锌指转录因子(Slug)蛋白(间质标志物)及第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶——张力蛋白基因(PTEN)和磷酸化蛋白激酶 B(P-Akt)蛋白的表达情况。结果: Panc-1-XS 细胞侵袭和迁移能力显著下降, 同时伴随 E-cadherin 蛋白表达显著上调及 Slug 蛋白显著下调, 即出现间质-上皮转化(MET); PTEN 蛋白表达上调、P-Akt 蛋白表达下调。结论: 同时抑制 XIAP 和 survivin 表达, 能部分逆转胰腺癌 Panc-1 细胞 EMT 表型, 显著减弱其侵袭和迁移能力; 此调控过程可能通过 PTEN/PI3K/Akt 途径实现。

[关键词] 胰腺癌; 凋亡抑制蛋白; 上皮-间质转化; 侵袭性; PTEN/PI3K/Akt

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.09.004

Simultaneous inhibition of XIAP and survivin expression on EMT and invasion of human pancreatic cancer cells

ZAI Hongyan¹, YI Xiaoping², LI Yixiong¹, JIANG Chun³, LÜ Xinsheng¹

(1. Department of General Surgery; 2. Department of Radiology;
3. Department of Obstetrics and Gynecology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the simultaneous inhibition of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and survivin expression on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of pancreatic cancer cells Panc-1, and its mechanism.

Methods: On the established human pancreatic cancer cells Panc-1-XS, the expression of XIAP and survivin was inhibited simultaneously. Cell invasion and migration were detected by Transwell chamber experiments and scratch test, and the expression of epithelial marker E-cadherin, mesenchymal markers Slug, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) and P-Akt protein was determined by Western blot.

Results: Cell invasion and migration of Panc-1-XS cells decreased significantly, accompanied by significantly upregulated protein expression of E-cadherin, and significantly declined protein

收稿日期 (Date of reception): 2012-07-30

作者简介 (Biography): 宰红艳, 博士, 主治医师, 主要从事胆胰外科的研究。

通信作者 (Corresponding author): 易小平, Email: doctoryixiaoping@hotmail.com

基金项目 (Foundation items): 湖南省自然科学基金 (08JJ3042); 中南大学自由探索计划 (2011QNZT153)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of Human Province (08JJ3042) and the Freedom Exploration Program of Central South University (2011QNZT153).

expression of the Slug, indicating increased mesenchymal-epithelial conversion (MET); and increased protein expression of PTEN, and declined protein expression of P-Akt.

Conclusion: Simultaneously inhibiting the expression of XIAP and survivin can partially reverse EMT phenotype of pancreatic cancer Panc-1 cells, which then significantly reduces the cell invasion and migration of Panc-1 cell lines. This process may be regulated by PTEN/PI3K/Akt signaling pathway.

KEY WORDS

pancreatic cancer; inhibitor of apoptosis proteins (IAPs); epithelial-mesenchymal transition (EMT); invasive; PTEN/PI3K/Akt

高侵袭和迁移能力是胰腺癌的重要生物学特征,是导致胰腺癌局部侵犯及远处转移的重要原因之一,也是其治疗失败的最主要原因。肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤、多机制互相协调的复杂过程^[1]。在整个转移过程中,侵袭和迁移能力增高是胰腺癌细胞的始动环节,并贯穿于肿瘤侵袭和转移的全过程。上皮细胞可能获得间质细胞表型,此过程称为上皮细胞间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)。近年来的研究^[2-5]已证实:EMT在介导胰腺癌侵袭、迁移能力及吉西他滨(Gem)耐药机制中均发挥重要作用。笔者前期实验已证实:在胰腺癌细胞系中同时抑制X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)和生存素(survivin)的表达,能显著增强Gem化疗敏感性^[6]。鉴于EMT可能在胰腺癌耐药机制中发挥作用,本实验在前期研究结果的基础上,进一步检测同时抑制XIAP和survivin表达,是否可能同时伴随胰腺癌细胞EMT表型和侵袭和迁移能力的变化,并对其机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

本课题组前期实验^[6]已经构建成功XIAP和survivin表达同时稳定抑制的胰腺癌细胞株Panc-1-XS(对照组Panc1-XncSnc为稳定感染无义对照shRNA慢病毒的Panc-1细胞),由中南大学医学遗传学国家重点实验室保存;DMEM培养基、胎牛血清(FBS)购自美国Invitrogen公司;鼠抗人E-cadherin, Slug和PTEN一抗及兔抗人P-Akt(Ser 473)一抗均购自美国Santa Cruz公司;鼠抗人 β -actin一抗购自美国Sigma公司;相应兔抗鼠二抗、鼠抗兔二抗均自美国Jackson公司;matrigel胶及Transwell小室均购自美国B&D公司。

1.2 方法

1.2.1 半定量Western印迹蛋白检测

运用细胞裂解液裂解适量细胞,总蛋白浓度使用BCA蛋白定量试剂盒检测。取待检蛋白20 μ g,用12%或15%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,恒压(120 V \times 90 min),然后室温封闭60 min。E-cadherin/Slug/PTEN/P-Akt一抗(1:1000稀释)作用1 h后,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;相应二抗(1:3000稀释)孵育1 h; β -actin一抗(1:10 000稀释)作用1 h后,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗(1:10 000稀释)孵育1 h。按说明加ECL显色液,反应3 min后入暗室常规曝光显影。

1.2.2 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力

Matrigel胶置于4 $^{\circ}$ C溶化后,用无血清的DMEM培养液稀释混匀,以75 μ L/孔铺于Transwell小室的上室滤膜,37 $^{\circ}$ C孵育30 min,成胶后备用;浓度为 5×10^5 个/mL的待测单细胞悬液以200 μ L/孔加入Transwell小室上室内,下室加入含10% FBS的DMEM培养基600 μ L/孔,每组设3个复孔;37 $^{\circ}$ C,5% CO₂下孵育24 h,取出上室,棉签拭去残留的matrigel胶,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后用4%多聚甲醛固定,新鲜蒸馏水再洗涤2 min;24孔板中加入0.1%结晶紫500 μ L,将小室置于其中,使膜浸没在培养基中,37 $^{\circ}$ C 30 min, PBS清洗后显微镜下随机选取4个视野,照相,计数。

1.2.3 细胞划痕实验

用铅笔于6孔板背面做标记线,取对数期生长的待测细胞接种于6孔板中;待细胞生长至95%融合时,以Tip头垂直于标记线在6孔板内轻轻划痕, PBS冲洗3次,每次2 min,加入无血清的DMEM培养基培养48 h后拍照,观察划痕愈合情况。

1.3 统计学处理

数据采用SPSS15.0统计软件进行分析。计量资料使用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间比较采用ANOVA法(单因素方差法),方差齐性时采用

SNK-q 检验, 方差不齐时采用 Dunnett' C 检验。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 同时抑制 XIAP 和 survivin 表达显著减弱 Panc-1 细胞的侵袭和迁移能力

Transwell 小室实验结果表明: 与原始 Panc-1 细胞及对照组 Panc-1-XncSnc 相比, Panc-1-XS 组侵袭性细胞数目显著减少 ($P<0.05$; 表 1, 图 1); Panc-1 组与 Panc-1-XncSnc 组无显著差别 ($P>0.05$)。划痕实验证实

Panc-1-XS 组的划痕愈合能力显著减弱 (图 2)。

2.2 同时抑制 XIAP 和 survivin 表达部分逆转 Panc-1 细胞的 EMT 表型

半定量 Western 印迹检测 Panc-1-XS 细胞 EMT 表型标志物的结果表明: 与原始 Panc-1 细胞及对照组 Panc-1-XncSnc 相比, Panc-1-XS 组的上皮标志物 E-cadherin 蛋白显著上调, 而间质标志物 Slug 蛋白显著下调 ($P<0.05$); Panc-1 组与 Panc-1-XncSnc 组无显著差别 ($P>0.05$; 表 1, 图 3)。

表 1 各组侵袭细胞数及 EMT 标志蛋白, PTEN 和 P-Akt 蛋白密度相对定量 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

Table 1 Number of invasive cells, relative quantification of protein density of EMT marker proteins, PTEN, and p-Akt in each group ($n=3, \bar{x}\pm s$)

组别	侵袭细胞数	上皮 / 间质蛋白密度相对定量 (与 β -actin 相比)			
		E-cadherin	Slug	PTEN	P-Akt
Panc-1	589.0 \pm 20.2	0.42 \pm 0.04	0.20 \pm 0.04	0.13 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04
Panc-1-XncSnc	603.3 \pm 14.2	0.45 \pm 0.06	0.21 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	0.26 \pm 0.04
Panc-1-XS	433.7 \pm 32.5	0.87 \pm 0.08	0.08 \pm 0.03	0.27 \pm 0.04	0.07 \pm 0.02

与 Panc-1 组及 Panc-1-XncSnc 组相比, $P<0.05$ 。

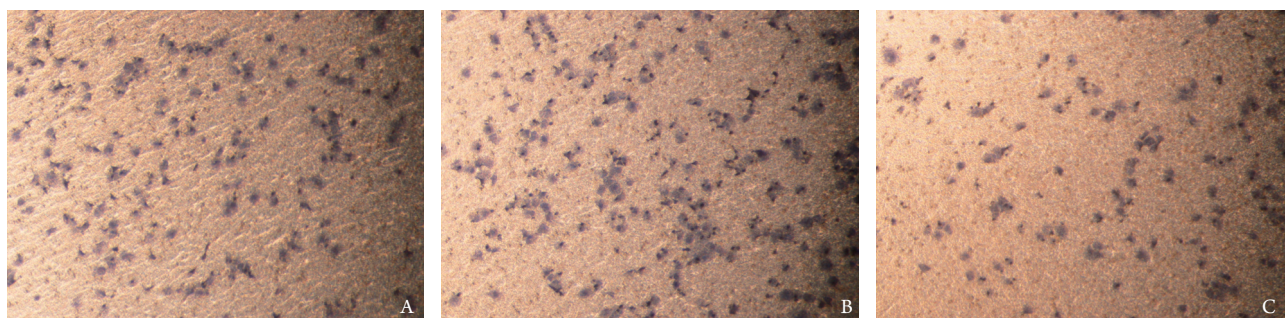


图 1 Transwell 小室检测同时抑制 XIAP 和 survivin 蛋白表达后 Panc-1 细胞侵袭性的变化。A: Panc-1 组; B: Panc-1-XncSnc 组; C: Panc-1-XS 组。

Figure 1 Effect of XIAP and survivin inhibited simultaneously on cell invasion of Panc-1 cells detected by Transwell chamber test. A: Group of Panc-1; B: Group of Panc-1-XncSnc; C: Group of Panc-1-XS.

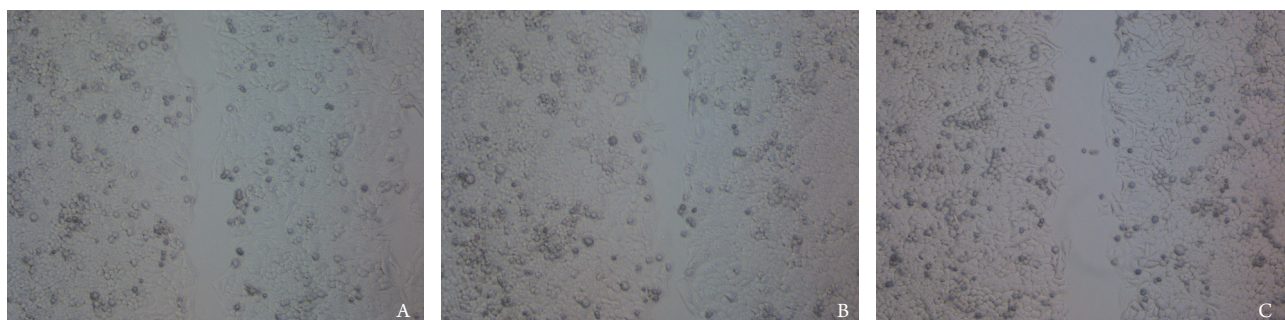


图 2 划痕实验检测同时抑制 XIAP 和 survivin 蛋白表达后对 Panc-1 细胞迁移能力的影响。A: Panc-1 组; B: Panc-1-XncSnc 组; C: Panc-1-XS 组。

Figure 2 Effect of XIAP and survivin inhibited simultaneously on cell migration of Panc-1 cells detected by Scratch test. A: Group of Panc-1; B: Group of Panc-1-XncSnc; C: Group of Panc-1-XS.

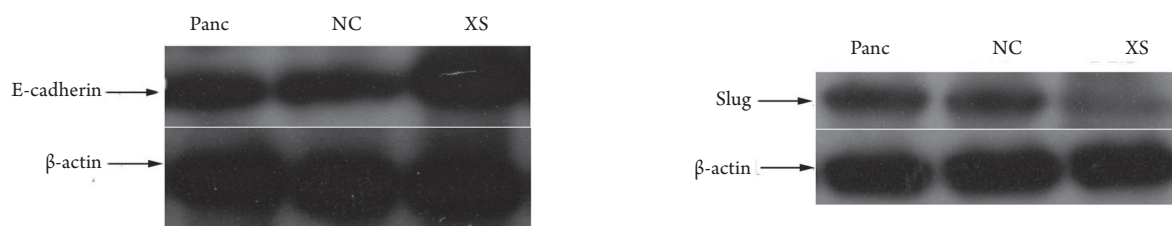


图3 同时抑制 XIAP 和 survivin 蛋白表达后对 Panc-1 细胞 EMT 表型的影响。Panc: 原始 Panc-1 细胞; NC: Panc-1-XncSnc; XS: Panc-1-XS。

Figure 3 Effect of XIAP and survivin inhibited simultaneously on EMT phenotype of Panc-1 cells. Panc: Panc-1 cells; NC: Panc-1-XncSnc cells; XS: Panc-1-XS cells.

2.3 同时抑制 XIAP 和 survivin 表达显著上调 PTEN 表达、下调 P-Akt 蛋白表达

半定量 Western 印迹检测结果显示: 与原始 Panc-1 细胞及对照组 Panc-1-XncSnc 相比, Panc-1-XS 组细胞中 PTEN 蛋白显著上调, 而 P-Akt 蛋白显著下调 ($P < 0.05$); Panc-1 组与 Panc-1-XncSnc 组之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 1, 图 4)。

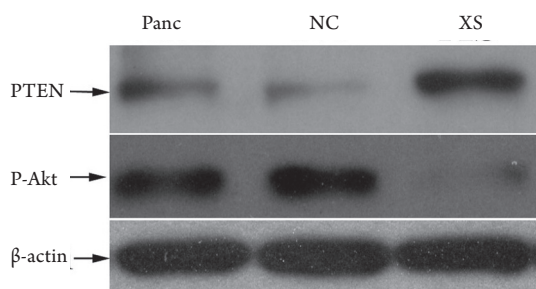


图4 同时抑制 XIAP 和 survivin 蛋白表达后对 Panc-1 细胞 PTEN 和 P-Akt 表达的影响。Panc: 原始 Panc-1 细胞; NC: Panc-1-XncSnc; XS: Panc-1-XS。

Figure 4 Effect of XIAP and survivin inhibited simultaneously on expression of PTEN and P-Akt of Panc-1 cells. Panc: Panc-1 cells; NC: Panc-1-XncSnc cells; XS: Panc-1-XS cells.

3 讨论

EMT 是指细胞发生分子转换, 失去上皮特性而获得间质特性的过程, 并从而获得较强的侵袭和移动能力, 显著增加转移能力。通常从特征性分子的变化判断细胞是否发生 EMT, 即上皮细胞标志 E-cadherin 蛋白表达的减少和间质细胞标志如 Slug, Snail 等蛋白的表达增加^[7]。

近年来, 关注于 EMT 与疾病间联系的研究越来越多; 而多项研究^[2-3]表明: 具有 EMT 表型的胰腺癌细胞常为耐药细胞, EMT 表型与胰腺癌耐药性密切相关。对传统化疗药物(如 Gem, 氟尿嘧

啶和顺铂 / cisplatin) 治疗敏感的多种胰腺癌细胞系中, 上皮细胞标志 cadherin 1 高表达, 而间质细胞标志锌指 E- 盒结合同源异形盒 -1(ZEB1) 低表达; 与之相反, 其他表达 EMT 表型的细胞系 (cadherin 1 低表达, ZEB1 高表达), 则对化疗药物显著耐药^[4]。研究^[5]亦提示: 具有 EMT 特征的胰腺癌细胞对 Gem 耐药。因此, EMT 已经被认为是胰腺癌耐药的重要潜在机制之一。Arumugam 等^[4]在体外实验研究证实: 在胰腺癌化疗抵抗的细胞中, E-cadherin 与其转录抑制物 ZEB1 呈负相关, 与 Gem 化疗抵抗互相关联。沉默 ZEB1 能通过上调 E-cadherin 及上皮细胞标志基因 MAL2 和 EVA1, 部分恢复细胞化疗敏感性。Shan 等^[3]发现对 Gem 选择性耐药的胰腺癌细胞, 已经获得了 EMT 表型 (cadherin 1 下调、vimentin 上调), 并同时伴随细胞迁移和侵袭能力增加; 下调 Notch 信号能导致相应胰腺癌细胞 EMT 表型的部分反转, 即出现间质 - 上皮转换 (mesenchymal-epithelial transition, MET), 而这种反向转变涉及到 vimentin, ZEB1, 锌指蛋白如 Snail 1 和 Snail 2, NF- κ B 表达的下调。Shah 等^[3]报道: 胰腺癌 Gem 抵抗细胞的外形为索状, 失去细胞 / 细胞黏附, 并出现伪足; 其 vimentin 表达增加, E-cadherin 下降, β -catenin 核转运增加和 c-Met 酪氨酸激酶活化 (EMT 表型)。Wang 等^[2]发现: Notch-2 与其配体 Jagged-1 在具有 EMT 特征的 Gem 抵抗细胞中活化增加; 在这些细胞中运用 siRNA 转染技术抑制 Notch-2 和它的配体 Jagged-1, 能导致 EMT 表型的部分逆转 (即伴随 MET 进程)。

EMT 表型的胰腺癌细胞与胰腺癌干细胞 (CSCs) 具有很多相似的特征; CSCs 同样可能经历了 EMT; 对 Gem 耐药, 并经历了 EMT 表型改变的胰腺癌细胞具有 CSCs 特征。最新研究^[8-11]表明: 胰腺癌 CSCs 或“干细胞样耐药细胞 (具 EMT 表型)”高表达凋亡抑制蛋白 XIAP 和 survivin, 且多种药物如白藜芦醇 (resveratrol) 等均能通过抑制 CSCs 中 XIAP 或 survivin 表达诱导细胞凋亡, 并同

时伴有 EMT 表型部分逆转, 即 MET。

因此, 鉴于 EMT 和凋亡抑制蛋白 (XIAP 和 survivin) 与胰腺癌耐药性之间的密切关系, 笔者推测, 在胰腺癌细胞中同时抑制 XIAP 和 survivin 表达, 除了通过靶向凋亡通路逆转细胞凋亡抵抗之外, 还可能同时伴有肿瘤细胞 EMT 表型的逆转, 介导细胞化疗敏感性增加及侵袭能力的减弱。在前期研究^[6]的基础上, 本研究发现: 同时抑制 Panc-1 细胞中 XIAP 和 survivin 的表达后, 能显著增强细胞 Gem 化疗敏感性, 并伴随细胞 EMT 表型的部分逆转。笔者认为, 这种治疗导致的细胞 EMT 表型的部分逆转, 可能是 Panc-1 细胞 Gem 化疗敏感性增加的机制之一; 并且该 MET 进程同时介导 Panc-1-XS 细胞侵袭和迁移能力的下降。

然而, 迄今为止, EMT 与癌症进展或耐药的分子机制尚未完全阐明, 目前关于 XIAP 和 survivin 等凋亡抑制蛋白 (IAPs) 与胰腺癌 EMT 的相关性研究目前尚未见报道。近来研究^[2-4, 12-13]表明: 许多分子通路包括 Notch 和 NF- κ B 等, 均在介导细胞 EMT 进程中发挥重要作用。PTEN/PI3K/Akt 通过调节 Akt 癌基因活化, 诱导其定位于细胞膜^[14], 活化其下游大量的关键细胞进程, 调控包括葡萄糖代谢、细胞增殖、凋亡、转录和细胞迁移等多种细胞功能^[15]。胰腺癌中发现有 PTEN/PI3K/Akt 信号通路异常 (PTEN 表达下调或缺失, PI3K/Akt 信号活化), 并在肿瘤的发生、发展过程及 Gem 耐药机制中均发挥重要作用^[16-20]。最近已经有研究^[21-22]表明: PI3K/Akt 信号通路参与了 BMP-2 介导的细胞 EMT 进程和细胞侵袭能力增强的过程。

笔者进一步检测发现: 伴随 XIAP 和 survivin 表达抑制的同时, Panc-1-XS 细胞中出现了 PTEN 蛋白的上调和 P-Akt 蛋白的显著下调。Park 等^[21]报道在胃癌和结肠癌细胞中 PI3K/Akt 信号通路在 BMP-2 介导的细胞 EMT 和侵袭能力增强机制中发挥重要作用。Chen 等^[22]对 BMP-2 的研究也发现: 在胰腺癌 Panc-1 细胞中, BMP-2 能通过激活 PI3K/Akt 信号通路, 介导细胞 EMT 及侵袭、转移能力增强; 而运用 PI3K 抑制剂 LY294002 能阻断这一进程。因此, 笔者推测, 在胰腺癌细胞中 (至少在 Panc-1 细胞中), 同时抑制 XIAP 和 survivin 的表达, 可能通过上调 PTEN 蛋白的表达, 从而下调 P-Akt 蛋白的表达, 最终介导胰腺癌细胞 EMT 表型的部分逆转, 导致胰腺癌侵袭性和转移性下降并部分介导 Gem 化疗敏感性的增加。

结合前期研究^[6]及本研究结果, 笔者认为: 同时稳定抑制 Panc-1 细胞中 XIAP 和 survivin 的表达, 可能通过 PTEN/PI3K/Akt 途径, 部分逆转其 EMT

表型, 从而部分介导胰腺癌细胞化疗表型的逆转, 并同时显著降低细胞侵袭和迁移能力。然而, 本研究仅仅是对现象进行了检测和初步分析, 下一步更深入的机制探讨有待继续。

参考文献

1. Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. Cancer invasion and metastasis: changing views[J]. *J Pathol*, 2008, 214(3):283-293.
2. Wang Z, Li Y, Kong D, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(6): 2400-2407.
3. Shah AN, Summy JM, Zhang J, et al. Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells[J]. *Ann Surg Oncol*, 2007, 14(12): 3629-3637.
4. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(14): 5820-5828.
5. Li Y, VandenBoom TG 2nd, Kong D, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(16): 6704-6712.
6. 宰红艳, 江春, 易小平, 等. shRNA 稳定抑制 XIAP 和 survivin 表达对胰腺癌细胞生物学特征的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(3): 304-311.
ZAI Hongyan, JIANG Chun, YI Xiaoping, et al. Influence of stable inhibition of XIAP and survivin expression on biological characteristics of pancreatic cancer cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2012, 21(3): 304-311.
7. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(2): 293-299.
8. Srivastava RK, Tang SN, Zhu W, et al. Sulforaphane synergizes with quercetin to inhibit self-renewal capacity of pancreatic cancer stem cells[J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011, 3: 515-528.
9. Tang SN, Fu J, Nall D, et al. Inhibition of sonic hedgehog pathway and pluripotency maintaining factors regulate human pancreatic cancer stem cell characteristics[J]. *Int J Cancer*, 2011, 131(1): 30-40.
10. Shankar S, Nall D, Tang SN, et al. Resveratrol inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics in human and KrasG12D transgenic mice by inhibiting pluripotency maintaining factors and epithelial-mesenchymal transition[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16530.
11. Du Z, Qin R, Wei C, et al. Pancreatic cancer cells resistant to

- chemoradiotherapy rich in "stem-cell-like" tumor cells[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(3): 741-750.
12. Min C, Eddy SF, Sherr DH, et al. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(3): 733-744.
 13. Sahlgren C, Gustafsson MV, Jin S, et al. Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(17): 6392-6397.
 14. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, et al. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(3): 187-198.
 15. Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 667-676.
 16. Liao SS, Jazag A, Whang EE. HMGA1 is a determinant of cellular invasiveness and in vivo metastatic potential in pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11613-11622.
 17. Ng SSW, Tsao MS, Chow S, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5451-5455.
 18. Sourbier C, Lindner V, Lang H, et al. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(10): 5130-5142.
 19. Andersson R, Aho U, Nilsson BI, et al. Gemcitabine chemoresistance in pancreatic cancer: molecular mechanisms and potential solutions[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44(7): 782-786.
 20. Kim MP, Gallick GE. Gemcitabine resistance in pancreatic cancer: picking the key players[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(5): 1284-1285.
 21. Park Y, Kang MH, Seo HY, et al. Bone morphogenetic protein-2 levels are elevated in the patients with gastric cancer and correlate with disease progression[J]. *Med Oncol*, 2010, 27(4): 1192-1199.
 22. Chen X, Liao J, Lu Y, et al. Activation of the PI3K/Akt pathway mediates bone morphogenetic protein 2-induced invasion of pancreatic cancer cells Panc-1[J]. *Pathol Oncol Res*, 2011, 17(2): 257-261.

(本文编辑 彭敏宁)