

FGF8b 调控前列腺癌细胞上皮间质转化的分子机制

范本祎, 王桂林, 齐范, 李卓, 刘怀政

(中南大学湘雅医院泌尿外科, 长沙 410008)

[摘要] **目的:** 探讨成纤维细胞生长因子 8b (fibroblast growth factor 8b, FGF8b) 促进前列腺癌 DU145 细胞上皮间质转化的分子机制。**方法:** 先选取 3 组细胞, 分别为空白对照组 (DU145 细胞)、阴性对照组 [DU145 细胞转染空白质粒 (简称 pcDNA3.1/DU145)] 和实验组 [DU145 细胞转染 FGF8b (简称 FGF8b/DU145)]。采用 Western 印迹检测细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 通路活性, 然后将 FGF8b/DU145 细胞及 DU145 细胞在 PD98059 (ERK 激酶抑制剂) 作用下分为 4 组: A 组为 2% 胎牛血清 (FBS) 处理的 FGF8b/DU145 细胞; B 组为 2% FBS+PD98059 (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 FGF8b/DU145 细胞; C 组为 2%FBS 处理的 DU145 细胞; D 组为 2% FBS+PD98059 (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 DU145 细胞, 培养观察细胞形态学的变化, 最后 Western 印迹和 Transwell 小室检测各组细胞上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关标志物的变化以及细胞的迁移能力改变。**结果:** 实验组 ERK1/2 活性明显高于空白对照组和阴性对照组。给予 PD98059 后, B 组与未给予 PD98059 组的 A 组相比, 上皮细胞标志物上皮钙黏素蛋白表达量明显上调 ($P<0.05$); 间质标志物波形蛋白表达量明显下调 ($P<0.05$)。细胞迁移试验结果提示: 在给予 PD98059 后, B 组 FGF8b/DU145 细胞的迁移能力与 A 组相比明显减弱。**结论:** FGF8b 调控前列腺癌细胞 DU145 发生上皮-间质转化, 可能由 ERK 激酶通路介导, MAPK 激酶 1 作为该信号通路的关键因子之一, 可能是干预前列腺侵袭转移的有效靶点。

[关键词] 前列腺癌; 成纤维细胞生长因子-8; 上皮-间质转化; 侵袭转移

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.07.002

Molecular mechanism of FGF8b regulation of epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells

FAN Benyi, WANG Guilin, QI Fan, LI Zhuo, LIU Huaizheng

(Department of Urology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: To explore the molecular mechanism of fibroblast growth factor 8b (FGF8b) in promoting epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer DU145 cells.

Methods: Cells were selected in three groups as follows: a block control group (DU145 cells), a negative control group [DU145 cells transfected with empty plasmid (pcDNA3.1/DU145)], and an experimental group [DU145 cells transfected with FGF8b (FGF8b/DU145)]. The activity of extracellular regulated protein kinases1/2 (ERK1/2) pathway was detected by western-blot in the three groups. The FGF8b-DU145 cells and DU145 cells were cultured with PD98059 (an ERK kinase inhibitor) to observe microscopically the morphology changes within the cells. The

收稿日期 (Date of reception): 2012-03-31

作者简介 (Biography): 范本祎, 博士, 副教授, 主要从事小儿泌尿及泌尿系肿瘤的研究。

通信作者 (Corresponding author): 王桂林, Email: xiecn929@qq.com

基金项目 (Foundation item): 湖南省科技厅资助课题 (2010SK3094)。This work was supported by Science and Technology Planning Project of Hunan Province, P.R. China (2010SK3094).

experimental samples were also divided into four groups: FGF8b/DU145 cells cultured with 2% FBS (Group A); FGF8b/DU145 cells cultured with 2% FBS+PD98059(50 $\mu\text{mol/L}$)(Group B); DU145 cells cultured with 2% FBS (Group C); DU145 cells cultured with FBS+PD98059 (50 $\mu\text{mol/L}$) (Group D). The expression of epithelial- mesenchymal transition (EMT) markers (E-cadherin, vimentin) were detected by western-blot analysis and the cell's mobility were detected by the Transwell chamber.

Results: The activity of ERK1/2 in the experimental group was significantly higher than that in the other two control groups; when ERK kinase inhibitor PD98059 was added to FGF8b/DU145 cells, the expression of epithelial marker E-cadherin protein was significantly increased in group B compared with that in the group A ($P<0.05$). The expression of mesenchymal marker vimentin protein was significantly reduced in group B compared with that in group A ($P<0.05$). The cell migration assay suggested that cell migration was markedly decreased in group B ($P<0.05$) compared with that in group A.

Conclusion: EMT in prostate cancer induced by FGF8b can be mediated by ERK kinase pathway, in which mitogen-activated/extraceluer signal regulated kinase 1(MEK1) may be a key factor. MEK1 could be an effective target in regulating the invasion and migration of prostate cancer.

KEY WORDS

prostate cancer; fibroblast growth factor-8; epithelial-mesenchymal transition; invasion and metastasis

前列腺癌是常见的男性生殖系统恶性肿瘤之一, 人类成纤维细胞生长因子-8b (fibroblast growth factor 8b, FGF8b) 蛋白 (26 kD) 由 233 个氨基酸组成, 属于成纤维细胞生长因子家族成员。FGF8b 信号在早期胚胎发育过程中普遍表达, 且主要发生在上皮细胞向间质转化的过程中, 但在器官形成中它也参与了间质上皮转型。FGF8b 可促进前列腺癌 DU145 细胞发生上皮-间质转化, 并增强其侵袭和迁移能力, 但该过程的分子机制尚不清楚。细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 激酶通路是参与上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的分子通路之一^[1], 为了明确 ERK 激酶通路在 DU145 细胞发生上皮-间质转化过程中的作用, 本文先采用 Western 印迹检测比较各组细胞 ERK1/2 通路活性的差异, 然后用 PD98059(ERK 激酶抑制剂) 阻断 ERK 激酶通路, Western 印迹检测各组细胞上皮标志物上皮钙黏素 (E-cadherin) 和间质标志物波形蛋白 (vimentin) 表达变化以及其迁移能力的变化, 从而进一步了解该过程的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

稳定表达 FGF8b 的 DU145 细胞和普通的

DU145 细胞。其中稳定表达 FGF8b 的 DU145 细胞来源于经 pcDNA3.1-FGF8b 真核表达质粒利用脂质体介导转染技术转染的 DU145 细胞株。

1.2 主要试剂

PD98059(ERK 激酶抑制剂) 购于美国 Promega 公司。山羊抗人 E-cadherin 多克隆抗体、山羊抗人 vimentin 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司。兔抗人磷酸化 ERK1(T202/Y204)+ 磷酸化 ERK2(T185/Y187) 多克隆抗体 IgG 购自美国 R&D 公司。

1.3 各组细胞 ERK1/2 通路活性的检测

空白对照组为 DU145 细胞; 阴性对照组为 DU145 细胞转染空白质粒 (简称 pcDNA3.1/DU145); 实验组为 DU145 细胞转染 FGF8b (简称 FGF8b/DU145), 每组 10 个样本。

Western 印迹检测各组细胞 ERK1/2 信号通路活性 (磷酸化 ERK1/2 蛋白水平) 的差异, 具体方法如下: 将含有目标蛋白的样品在 4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 r/min 条件下离心 5 min。点样, 用 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。通过电转移的方法将蛋白质转印至硝酸纤维素膜的表面, 然后将膜表面的蛋白质再用抗原抗体反应进行特异性检测。将转

印好的硝酸纤维素膜用含 10% 脱脂奶粉的三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (Tris buffered saline, TBS) 作为封闭剂封闭 30~60 min。膜浸没加入按比例稀释一抗的封闭剂中, 于脱色摇床中摇 1 h, 让稀释的抗体与膜结合。用 TBS 缓冲液洗膜 4 次, 每次 10 min。将辣根过氧化物酶标记的二抗加入封闭剂, 使膜浸没其中于脱色摇床中摇 1 h。用 TBS 缓冲液洗膜 4 次。最后用化学发光剂显色。凝胶成像分析系统上观察、照相, 并测量灰度值, 计算蛋白表达水平相对值。计算方法: 蛋白表达相对值 = 目的蛋白灰度值 / 内参蛋白灰度值。

1.4 PD98059 干预对各组细胞的影响

1.4.1 分组

FGF8b/DU145 和 DU145 细胞在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的完全培养基 DMEM 的培养瓶中培养。待细胞贴壁良好、生长稳定后, 换用含 2% FBS 的培养基培养 1 d, 每株细胞分为对照组和 PD98059 处理组, 共 4 组细胞: A 组为 2% FBS 处理的 FGF8b/DU145 细胞; B 组为 2% FBS+PD98059(50 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 FGF8b/DU145 细胞; C 组为 2% FBS 处理的 DU145 细胞; D 组为 2% FBS +PD98059(50 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 DU145 细胞。

1.4.2 结果观察

细胞株按以上分组处理, 连续培养 2 d, 每天用含 10% FBS 的培养基更换新培养基, 并在显微镜下观察细胞形态的变化并摄像 ($\times 200$)。Western 印迹检测 PD98059 对各组细胞 ERK1/2 信号通路活性 (磷酸化 ERK1/2 蛋白水平) 及 E-cadherin 和 vimentin 蛋白表达的影响, 利用细胞迁移实验 (Transwell 法) 检测 PD98059 对各组细胞迁移能力的影响, 具体操作如下: 将 transwell 小室滤膜下方涂 10 ng/mL 纤维连接蛋白 50 μL 风干, 小室外加入含 10 $\mu\text{g/mL}$ 纤维连接蛋白 1% 小牛血清 RPMI1640 培养液 800 μL ; 在小室内分别加入各组实验细胞, 细胞数为 1×10^5 , 培养液为含 10 g/L 牛血清白蛋白和体积分数为 1% 小牛血清的 RPMI1640 培养液, 每组重复 3 个样本; 细胞常规培养 6 h, 取出 Transwell 小室, PBS 浸洗, 10% 甲醛固定, HE 染色; 湿棉签擦去微孔膜上层的细胞, 在倒置显微镜下放大 200 倍计数每视野移至微孔膜下层的细胞。每个样本计数 10 个视野。

1.5 统计学处理

SPSS 13.0 对数据进行统计分析。结果用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组内两两比较采用 t 检验或方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组细胞 ERK1/2 信号通路活性 (磷酸化 ERK1/2 蛋白水平) 的差异

实验中使用的 p-ERK1/2 抗体即为针对上述两种磷酸化蛋白的抗体, 通过 Western 印迹技术检测细胞内磷酸化 ERK1/2 的水平。Western 印迹结果表明 (图 1): 空白对照组和阴性对照组均显示有较弱的条带; 而实验组显示明显的蛋白印迹。这说明实验组内磷酸化 ERK1/2 的水平明显高于空白对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$), 实验组 ERK1/2 通路的活性最明显。FGF8b 是一种强有力的有丝分裂原, 可以激活 ERK1/2 细胞信号通路。FGF8b 的高表达激活了 DU145 细胞的 ERK1/2 信号通路活性。

2.2 PD98059 抑制 DU145 细胞发生与 EMT 一致的形态学改变

2% FBS 不加干预的培养环境下, 实验组细胞生长良好, 每天细胞形态无明显变化 (图 2); 加入 MAPKK 抑制剂 PD98059 后细胞间隙变窄, 成团生长 (图 3), 而加入 PD98059 培养的空白对照组细胞形态学无明显变化。

2.3 PD98059 抑制 ERK1/2 通路的活性

加入 PD98059 (终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$), 48 h 后收集细胞提取总蛋白进行 Western 印迹分析, 结果表明: 加入 PD98059 后, B 组的 p-ERK1/2 的表达明显低于 A 组 (图 4), 这表明 PD98059 阻断了 FGF8b 对 ERK1/2 通路的活化。

2.4 PD98059 上调 FGF8b/DU145 细胞 E-cadherin 表达并下调 vimentin 蛋白表达

经过 PD98059 干预处理后 FGF8b/DU145 组细胞间隙变窄, 联系紧密。Western 印迹如图 5 所示: 给予 PD98059 后, B 组上皮标志物 E-cadherin 表达明显上调, 与 A 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B 组间质标志物 vimentin 在给予 PD98059 后, 与 A 组相比表达显著下调 ($P < 0.05$)。而 DU145 细胞组加入 PD98059 后, C 组和 D 组的 E-cadherin 和 vimentin 蛋白表达均没有明显的变化。

2.5 PD98059 抑制 FGF8b/DU145 细胞迁移

经过前面的研究已经证实 PD98059 处理后 FGF8b/DU145 细胞间隙变窄, 联系紧密, 且 EMT 标志物也有明显的改变, 细胞迁移实验表明 PD98059 处理 48 h 后, B 组在 Transwell 小室中 FGF8b/DU145 迁移的细胞数明显减少, 与 A 组相比差异有统计学意

义 ($P < 0.05$; 图 6, 7), 同时 PD98059 处理的 D 组较 C 组细胞迁移能力也有减弱, 但差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 ERK 激酶 PD98059 抑制了 FGF8b/DU145 细胞的迁移能力。

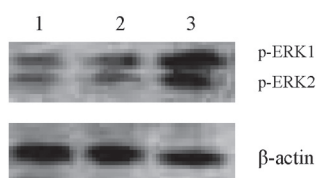


图 1 Western 印迹分析 p-ERK1/2 蛋白水平。 1: 普通的 DU145 细胞株; 2: DU145 细胞转染空白质粒细胞株 (pcDNA3.1/DU145); 3: DU145 细胞转染 FGF8b 细胞株 (FGF8b/DU145)。

Figure 1 p-ERK1/2 protein levels analyzed by Western blot. 1: Normal DU145 cell lines; 2: DU145 cell lines transfected with empty plasmid (pcDNA3.1/DU145); 3: DU145 cells lines transfected with FGF8b (FGF8b/DU145).

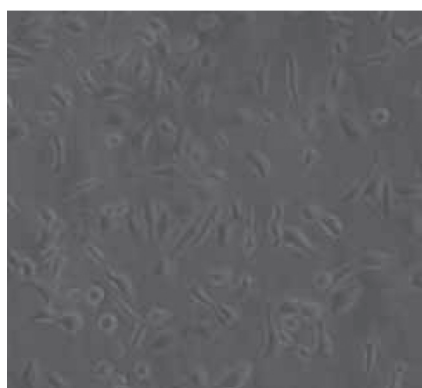


图 2 FGF8b/DU145 细胞株在 2%FBS 生长环境下的形态。
Figure 2 FGF8b/DU145 cell lines in the 2% FBS.

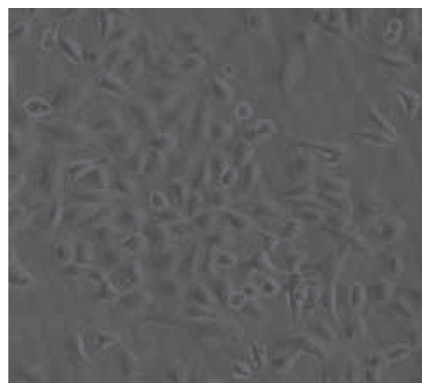


图 3 FGF8b/DU145 细胞株在加入 PD98059 (50 μmol/L) 下的形态。
Figure 3 FGF8b/DU145 cell lines in the PD98059 (50 μmol/L).

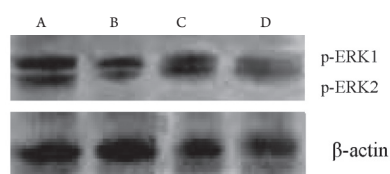


图 4 Western 印迹检测 p-ERK1/2 蛋白水平。 A: 2% FBS 处理的 FGF8b/DU145 细胞株; B: 2% FBS+PD98059(50 μmol/L) 处理的 FGF8b/DU145 细胞株; C: 2% FBS 处理的 DU145 细胞株; D: 2% FBS+PD98059(50 μmol/L) 处理的 DU145 细胞株。

Figure 4 p-ERK1/2 protein levels analyzed by Western blot. A: FGF8b/DU145 cell lines processed with 2% FBS; B: FGF8b/DU145 cell lines processed with 2% FBS+PD98059(50 μmol/L); C: DU145 cell lines processed with 2% FBS; D: DU145 cell lines processed with 2% FBS+PD98059 (50 μmol/L).

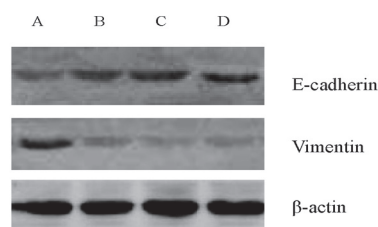


图 5 Western 印迹检测 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白在各组的表达。 A: 2% FBS 处理的 FGF8b/DU145 细胞; B: 2% FBS+PD98059(50 μmol/L) 处理的 FGF8b/DU145 细胞; C: 2% FBS 处理的 DU145 细胞; D: 2% FBS+PD98059(50 μmol/L) 处理的 DU145 细胞。

Figure 5 E-cadherin and vimentin protein levels analyzed by Western blot. A: FGF8b/DU145 cell lines processed with 2% FBS; B: FGF8b/DU145 cell lines processed with 2% FBS+PD98059 (50 μmol/L); C: DU145 cell lines processed with 2% FBS; D: DU145 cell lines processed with 2% FBS+PD98059 (50 μmol/L).

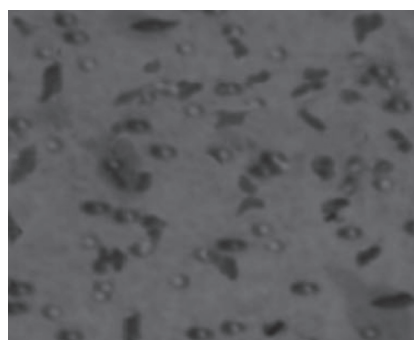


图 6 FGF8b/DU145 细胞株在 2%FBS 生长环境下的迁徙细胞。
Figure 6 Migratory cells of FGF8b/DU145 in the 2% FBS.

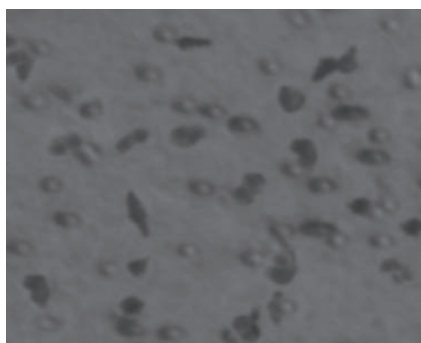


图7 FGF8b/DU145 细胞株在加入 PD98059(50 $\mu\text{mol/L}$) 下的迁徙细胞。

Figure 7 Migratory cells of FGF8b/DU145 in the PD98059 (50 $\mu\text{mol/L}$).

3 讨论

实验研究表明不同外界诱导因素诱导发生的、不同程度的 EMT 是由精确的细胞内外信号转导机制调控, 细胞外信号通过与细胞表面特异性受体结合而将信号传入细胞内, 通过胞内不同信号转导途径, 活化不同的核内转录因子, 最终调节转录基因的表达^[2]。目前发现介导 EMT 与肿瘤侵袭转移有关的信号转导通路主要有转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 和磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等, 不同通路的启动因素和受体各不相同, 但下游某些信号通路之间存在交叉对话^[3-4]。

MAPK 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。经典的 MAPK 级联由 MAPK 激酶激酶 (MAPK kinase kinase, MAPKKK)、MAPK 激酶 (MAPK kinase, MAPKK) 和 MAPK 组成。参与 EMT 的主要有两条 MAPK 信号通路。第一条是 Ras/Raf/MAPK 信号通路, 这是研究最充分的 MAPK 信号通路。转染 Ras 可以诱导膀胱 NBT-II 肿瘤细胞发生 EMT, 促进了细胞离散^[5]。在鼠乳腺上皮细胞中 Ras 和 TGF- β 通路协调作用, 可以诱导 EMT, 其中 Ras/Raf/MAPK 通路参与细胞的侵袭转移有关, 而与细胞离散无关^[6]。第二条是 p38MAPK 信号通路。TGF- β 诱导 EMT 时, 需要 p38MAPK 信号通路参与^[7]。

PD98059 是一种常用的 MAPKK 抑制剂, 可以通透细胞, 选择性抑制 MAPKK, 从而抑制 MAPKK 的磷酸化和激活。它通过与非活性形式的 MAPKK 结合抑制 MAPKK 的激活与磷酸化^[8], 因而具有阻断 ERK 通路的作用。一些细胞外刺激可经 G 蛋白受体、

生长因子受体和酪氨酸蛋白激酶受体激活 ERK, 经过核转位, 促进某些基因的转录与表达, 与细胞的增殖密切相关^[9]。ERK 包括 ERK1 和 ERK2, 活化的 Raf 可使 MAPKK 磷酸化并激活, 随后经过双磷酸化使 ERK1/2 激活。ERK1/2 活化后可显著增强 c-fos 和 c-jun 基因表达, 进一步作用于 DNA 转录因子启动细胞增殖、转化和分化。ERK1/2 信号传导通路可参与基质金属蛋白酶 (MMPs) 表达的调节, MMPs 能降解基底膜, 其活性与大肠癌的转移浸润密切相关, 持续的 MAPKK 激活可以诱导肠上皮细胞的 EMT, 促进肿瘤的侵袭转移^[10], MAPKK-ERK1/2 的失活可恢复发生转分化的犬肾细胞的上皮细胞表型^[11]。研究显示: ERK1/2 在乳腺癌^[12-13]、肺癌^[14]、前列腺癌^[15-16]及肾癌^[17]等多种恶性肿瘤组织与细胞系中呈异常表达或活性增强, 提示 ERK1/2 通路调控异常与恶性肿瘤的发生发展密切相关。ERK1/2 与多种细胞的迁移密切相关, 其抑制剂 PD98059 可通过结合去磷酸化的未活化的 MAPKK 的 ATP 位点来抑制 Raf 效应, 从而特异性阻断 ERK1/2 上游分子 MAPKK 对 ERK1/2 的磷酸化活化, 能抑制和基质蛋白 (如纤连蛋白和胶原) 相关的细胞迁移, 抑制生长因子的细胞迁移, 从而抑制细胞迁移, 是体外研究 ERK1/2 通路在细胞中作用的理想阻断剂, 运用反义核酸和 ERK1/2 显性负性突变体均可抑制细胞迁移^[18]。

FGF8b 是一种强有力的有丝分裂原, 可以激活 ERK1/2 细胞信号通路。本研究发现: 稳定表达 FGF8b 的 DU145 细胞内磷酸化 ERK1/2 的水平明显高于对照组, 表明 FGF8b 的高表达激活了 DU145 细胞的 ERK1/2 信号通路活性。给予 ERK 激酶抑制剂 PD98059 后, 细胞间隙变窄, 细胞成团生长。通过 Western 印迹技术对 E-cadherin 和 vimentin 蛋白表达量进行分析, 发现给予 PD98059 组与对照组相比 E-cadherin 和 vimentin 蛋白表达均有显著差异 ($P < 0.05$), 而给予 PD98059 的 DU145 细胞对照组对上述表型标志物的蛋白表达水平变化却不明显。这提示在 FGF8b 诱导 DU145 细胞发生 EMT 的过程中, PD98059 是关键信号分子, 此外, 细胞迁移试验结果也提示: 在给予 PD98059 后 FGF8b/DU145 细胞的迁移能力与对照组相比明显减弱, 虽然给予 PD98059 后 DU145 细胞的迁移能力也有改变, 但差异没有明显的统计学意义, 这进一步说明 PD98059 通过抑制 ERK 激酶信号转导通路阻断 FGF8b 信号通路, 可能使肿瘤细胞发生上皮间质表型逆转, 从而抑制肿瘤的侵袭和转移。

参考文献

1. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2005,6(5):322-327.
2. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12):1776-1784.
3. Das S, Becker BN, Hoffmann FM, et al. Complete reversal of epithelial to mesenchymal transition requires inhibition of both ZEB expression and the Rho pathway[J]. *BMC Cell Biol*, 2009, 21(10):94.
4. Kang MH, Kang HN, Kim JL, et al. Inhibition of PI3 kinase/Akt pathway is required for BMP2-induced EMT and invasion[J]. *Oncol Reports*, 2009, 22(3): 525-534.
5. Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1602(2):114-130.
6. Irby RB, Yeatman TJ. Increased Src activity disrupts cadherin/catenin-mediated homotypic adhesion in human colon cancer and transformed rodent cells[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9):2669-2674.
7. Edme N, Downward J, Thiery JP, et al. Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115(Pt 12): 2591-2601.
8. Sengupta TK, Talbot ES, Scherle PA, et al. Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stats activation mediated by mitogen-activated protein kinase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(19): 11107-11112.
9. Andresen BT, Rizzo MA, Shome K, et al. The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade[J]. *FEBS Lett*, 2002, 531(1): 65-68.
10. Lemieux E, Bergeron S, Durand V, et al. Constitutively active MEK1 is sufficient to induce epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal epithelial cells and to promote tumor invasion and metastasis[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(7): 1575-1586.
11. Schramek H, Feifel E, Marschitz I, et al. Loss of active restores epithelial phenotype and morphogenesis in transdifferentiated MDCK cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 285(3): C652-C661.
12. Wang J, Kuitase I, Lee AV, et al. Sustained c-Jun-NH₂-kinase activity promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion, and survival of breast cancer cells by regulating extracellular signal-regulated kinase activation[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(2): 266-277.
13. Horn G, Gaziel A, Wreschner DH, et al. ERK and PI3K regulate different aspects of the epithelial to mesenchymal transition of mammary tumor cells induced by truncated MUC1[J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(8): 1490-1504.
14. Chou TY, Chen WC, Lee AC, et al. Clusterin silencing in human lung adenocarcinoma cells induces a mesenchymal-to-epithelial transition through modulating the ERK/Slug pathway[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(5):704-711.
15. Kinkade CW, Castillo-Martin M, Puzio-Kuter A, et al. Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9):3051-3064.
16. Zhang ZS, Duan L, Du XL, et al. The proliferative effect of estradiol on human prostate stromal cells is mediated through activation of ERK[J]. *Prostate*, 2008, 68(5):508-516.
17. Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, et al. Leptin promotes growth and invasive capacities of renal cancer cells via ERK dependent pathway[J]. *J Urol*, 2005, 173(4):98.
18. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, et al. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase[J]. *J Cell Biol*, 1997, 137(2): 481-492.

(本文编辑 傅希文)