

PKB与SMAD3 相互作用调节前列腺癌细胞株 PC-3 对TGF- β 的敏感性

李 伟 辛殿祺 郭应禄*

(北京大学第一医院泌尿外科, 北京大学泌尿外科研究所, 北京 100034. *联系人, E-mail: ylg_01@sina.com)

摘要 前列腺癌对 TGF- β 诱导的生长抑制不敏感, 而 PI3K-PKB 信号通路在大多数前列腺癌中高度活化. 通过生长抑制实验和荧光素酶报告基因系统发现, PI3K-PKB 信号通路抑制前列腺癌细胞 PC-3 对 TGF- β 诱导的生长抑制和细胞周期停滞的反应; PI3K-PKB 信号通路抑制 TGF- β 诱导的基因转录. 免疫共沉淀结果显示, PKB 与 Smad3 之间存在蛋白质相互作用, 两者之间的相互作用是通过 Smad3 的 MH2 和 Linker 结构域介导的; TGF- β 减弱 PKB 与 Smad3 的结合, 胰岛素(模拟 PKB 活化)增强两者的结合; PKB 与 Smad3 的结合是 PKB 激酶活性依赖的, 丧失激酶活性的 PKB 不能与 Smad3 相互作用. 结果表明, 前列腺肿瘤丧失对 TGF- β 的敏感性与 PI3K-PKB 信号通路的过度活化明显相关. PI3K-PKB 信号通路通过 PKB 与 Smad3 的结合抑制 TGF- β 诱导的生长抑制和基因转录.

关键词 蛋白激酶 B 转化生长因子 β 蛋白质相互作用 前列腺癌

转化生长因子 β (TGF- β)是有多种生物学行为的自分泌、旁分泌生长因子. 它拥有一个巨大的超家族, 其参与许多基础生物学行为包括细胞迁移、细胞生长与凋亡、细胞黏附、细胞分化、肿瘤的浸润与转移、上皮间质转化以及免疫调节等^[1]. 随着对 TGF- β 研究的逐步深入, 人们发现, TGF- β 的多能性并不是因为它激活了许多不同的信号通路, 而是因为对同一信号通路有不同的“解读”方式, 即细胞信号通路网络对 TGF- β 信号通路的调节决定了 TGF- β 功能的多样性^[2].

PI3K-PKB 信号通路与前列腺癌的发生、发展、治疗、预后都有密切的关系^[3]. 多数前列腺癌细胞株 TGF- β 诱导的生长抑制和凋亡不敏感^[4], 推测 PI3K-PKB 信号通路可以调节前列腺癌细胞对 TGF- β 信号通路的敏感性. 有研究报道, 在肝癌细胞 Hep3B 中, PI3K-PKB 信号通路可以抑制 TGF- β 诱导的 caspase3 的激活^[5]. 在正常大鼠前列腺上皮细胞中, IGF 通过 PI3K-PKB 信号通路抑制了 Smad3 的转录活性^[6].

由于前列腺癌中 PI3K-PKB 信号通路的高度活化和对 TGF- β 的不敏感, 我们猜想 PI3K-PKB 信号通路可以调节前列腺癌细胞对 TGF- β 信号通路的敏感性, 并通过实验证明前列腺癌细胞中 PI3K-PKB 信号通路可以抑制 TGF- β 信号通路的活化并调节细胞对 TGF- β 的敏感性, 这种作用可能是通过 PKB 和

Smad3 的蛋白质相互作用调节的.

1 材料与方法

() 细胞与试剂. 人前列腺癌细胞 PC-3 及人胚胎肾细胞株 293T 由本所保存. 重组人 TGF- β (R 和 D Systems)、胰岛素(Sigma)、抗-HA 抗体、抗-Myc 抗体、抗-EGFP 抗体、辣根过氧化物酶标记二抗(Sigma)、DMEM/F-12 (Hyclone)、胎牛血清 (Invitrogen)、LY294002 (Sigma)、MTT(Sigma)、两步法逆转录试剂盒、荧光素酶检测试剂盒为 Promega 公司产品. 其余试剂购置 Sigma 公司.

() 表达质粒. HA-Smad2, Myc-Smad3, HA-smad4, HA-PKB (WT), HA-PKB (AA), 组成性活化(constitutive active) PKB (Myr-PKB), PTEN (WT), PTEN (GE), PTEN (CS), 4 个 Smad3 突变体 (Myc-MH1, Myc-MH1 + Linker, Myc-MH2, Myc-MH2+Linker), CAGA 荧光素酶报告基因质粒, pCMV-Renilla 均由清华大学生物系陈晔光教授提供. Smad2, Smad3 及 Smad4 全长 cDNA 通过高保真 Taq 酶扩增出全长, 并克隆到 pEGFP-C3 空载体中, 得到真核表达质粒 EGFP-Smad2/Smad3/Smad4, 经过测序和蛋白印迹, 荧光确定所有构建质粒均表达.

() 细胞增殖实验. 采用 MTT 法进行. PC-3 细胞在 10% 胎牛血清的完全培养液 DMEM/F12 中传代, 以适宜浓度接种到 24 孔板中, 18 h 后转到含 0.2% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中. 血清饥饿 18 h 后加

入 TGF- β (2.5 ng/mL)和/或 LY294002 (10~20 μ mol/L) (图 1). 继续培养 72 h, 收获细胞前 4 h 转到无血清培养基, 加入 MTT 储液 10 μ L 孵育 4 h. 去除培养基, 缓冲液洗涤 1 次, 加入 DMSO, 室温震荡孵育 20 min, 酶标仪 570 nm 检测各孔吸光值. 每一浓度做 5 个复孔, 计算平均值并绘制曲线.

() 细胞周期检测. PC-3 细胞血清饥饿 18 h 后加入 TGF- β (2.5 ng/mL)和/或 LY294002 (10 μ mol/L)刺激 48 h, 收集漂浮和贴壁的所有细胞, 1000 r/min 离心 10 min, 细胞沉淀用 1 \times PBS 洗 1 次, 1000 r/min 离心 10 min, 加 70% 冷乙醇, 分散成单细胞悬液 4 固定. 1000 r/min 离心 10 min, 70% 乙醇重悬细胞于 -20 保存, 检测前 30 min 加入碘化丙啶(PI)使终浓度为 100 μ g/mL, 混匀后置于 4 孵育 30 min, 在流式细胞仪上检测细胞增殖周期的变化.

() 荧光素酶报告基因分析. CAGA, CMV-Renilla 是一对报告基因系统的质粒. CAGA 是在荧光素酶编码基因的启动子区插入了 12 个 Smad3 特异性的 DNA 结合序列的报告基因, CMV-Renilla 用于降低背景, 减少误差. 0.5 μ g CAGA, 50 ng CMV-Renilla 与各种野生型(WT)、突变型(mutant)质粒共同转染到 PC-3 细胞中(磷酸钙转染方法), 12 h 后换液, 经各种试剂处理或不处理 18~24 h, 加入细胞裂解液, 后按照荧光素酶报告基因试剂盒指南操作.

() RNA 提取和 RT-PCR. PC-3 细胞血清饥饿 18 h 后加入 TGF- β (2.5 ng/mL)刺激 2 h, 细胞用 TRIzol RNA 提取试剂(GIBCO)提取总 RNA, 经过 DNA 酶消化去除 DNA 后检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 比值, 比值在 1.85~2.0 间的用于下一步 RT-PCR. 取 2 μ g 的 RNA

采用二步法 RT-PCR 试剂盒(Promega), 以 Oligo dT 为引物, 合成 cDNA 第一链, 以基因特异性引物进行 PCR, 以 GAPDH 为内参照. 反应条件如下: 95 , 3 min; 95 , 30 s, 不同温度(55 ~60)退火 30 s, 72 , 30 s, 25~30 个循环; 72 延伸 10 min. 在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行扩增. 产物以含溴化乙锭(EB)的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

() 蛋白印迹和免疫共沉淀. 293T 细胞以 20% 的密度传代到培养皿中, 24 h 后用磷酸钙方法进行转染, 转染完 10 h 后换培养液, 48 h 后用细胞裂解液回收细胞, 4 混匀 10 min, 4 12000 r/min 离心, 上清液加入上样缓冲液后 100 煮沸 5 min, 然后电泳转膜. 免疫共沉淀则在离心后的上清液中加入抗体 4 混匀 3 h, 然后加入蛋白 A 珠 4 混匀 10 h, 经过 4 次用 TNE 溶液洗涤后加入上样缓冲液后 100 煮沸 5 min 然后上样, 电泳, 转膜.

2 结果

2.1 抑制 PI3K-PKB 信号通路可以增强 TGF- β 抑制增殖的作用

由于 PC-3 细胞中 PTEN 基因(可以负性调节 PI3K-PKB 信号通路活性)不表达^[7], PI3K-PKB 信号通路在 PC-3 细胞中高度活化. 用 LY294002 抑制 PI3K-PKB 信号通路, 观察其对 TGF- β 抗增殖作用的调节. TGF- β 1 (2.5 ng/mL) 可以轻微抑制 PC-3 细胞的增殖, LY294002 (10 μ mol/L) 可以明显抑制细胞增殖, 两者有协同抑制增殖的作用(图 1(a)). 虽然 LY294002 (20 μ mol/L) 同样可以明显抑制细胞增殖, 但是与 TGF- β 1(2.5 ng/mL) 没有协同作用(图 1(b)). 流式细胞

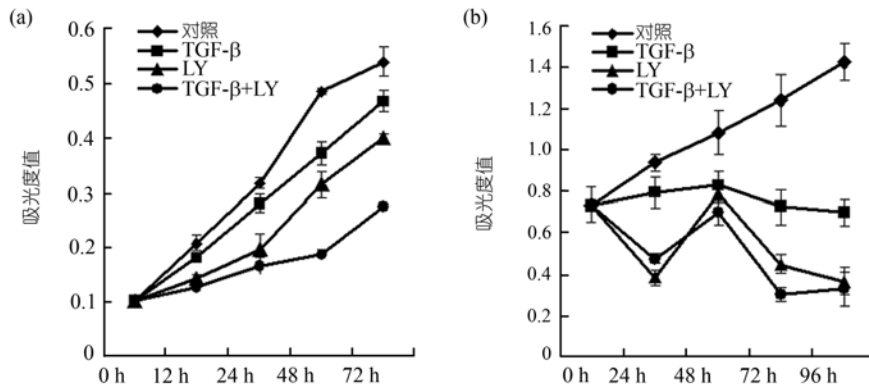


图 1 抑制 PI3K-PKB 信号通路增强 TGF- β 诱导生长抑制的功能
TGF- β , 2.5 ng/mL; LY294002, 10 μ mol/L(a), 20 μ mol/L(b)

术结果显示, TGF- β 1 (2.5 ng/mL) 可以将 G1 期的细胞从 51.35% 增加到 77.69%, LY294002 (10 μ mol/L) 可以将 G1 期的细胞从 51.35% 增加到 84.39%, LY294002 (10 μ mol/L) 和 TGF- β 1 (2.5 ng/mL) 同时作用可以将 G1 期的细胞从 51.35% 增加到 95.89% (图 2).

2.2 PI3K-PKB 信号通路可以抑制 TGF- β 诱导的基因转录

用 TGF- β 可诱导的、Smad3 依赖的报告基因 CAGA 系统, 通过报告基因的活性间接了解细胞对 TGF- β 的敏感性. 如图 3(a) 所示, 在 PC-3 细胞中 CAGA 报告基因对 TGF- β 刺激有反应而且呈剂量依赖关系. 由于 PC-3 细胞中 PTEN 基因 (可以负性调节 PI3K-PKB 信号通路活性) 不表达^[2], PI3K-PKB 信号通路在 PC-3 细胞中高度活化. 据推测, 用 LY294002 (PKB 通路特异性抑制剂) 抑制 PI3K-PKB 信号通路活性后可以增强 TGF- β 信号通路的活性. 结果表明, 单独用 LY294002 (10 μ mol/L) 对 CAGA 活性无明显影响, 但是与单独用 TGF- β (2.5 ng/mL) 比较, LY294002 与 TGF- β 联合应用可以明显增强 CAGA 的活性

(图 3(b)). 与此相反, 尽管 PC-3 细胞中 PI3K-PKB 信号通路高度活化^[2], 胰岛素 (模拟 PI3K-PKB 信号通路活化) 可以进一步抑制 CAGA 荧光素酶报告基因活性 (图 3(c)).

在 PC-3 细胞中重新瞬时表达 PTEN, 结果发现野生型的 PTEN 可以增强 TGF- β 诱导的 CAGA 荧光素酶报告基因活性并可以部分逆转胰岛素对 CAGA 活性的抑制作用, 突变型的 PTEN 对 TGF- β 诱导的 CAGA 活性无明显影响且不能逆转胰岛素对 CAGA 活性的抑制作用 (图 4(a)). 通过瞬时转染增强 PC-3 内 PKB 的表达来活化 PI3K-PKB 信号通路, 发现转染野生型 PKB 和组成活化型 PKB 可以明显抑制 TGF- β 诱导的 CAGA 活性, 且野生型 PKB 对 CAGA 活性的抑制程度与胰岛素类似, 而组成活化型 PKB 对 CAGA 活性的抑制程度还要强于胰岛素; 胰岛素 (模拟 PI3K-PKB 信号通路活化) 不能进一步增强 PKB 抑制 TGF- β 诱导 CAGA 活性的作用. 激酶失活型 PKB 可以略微增强 CAGA 报告基因活性, 并且可以逆转胰岛素对 CAGA 报告基因活性的抑制作用 (图 4(b)).

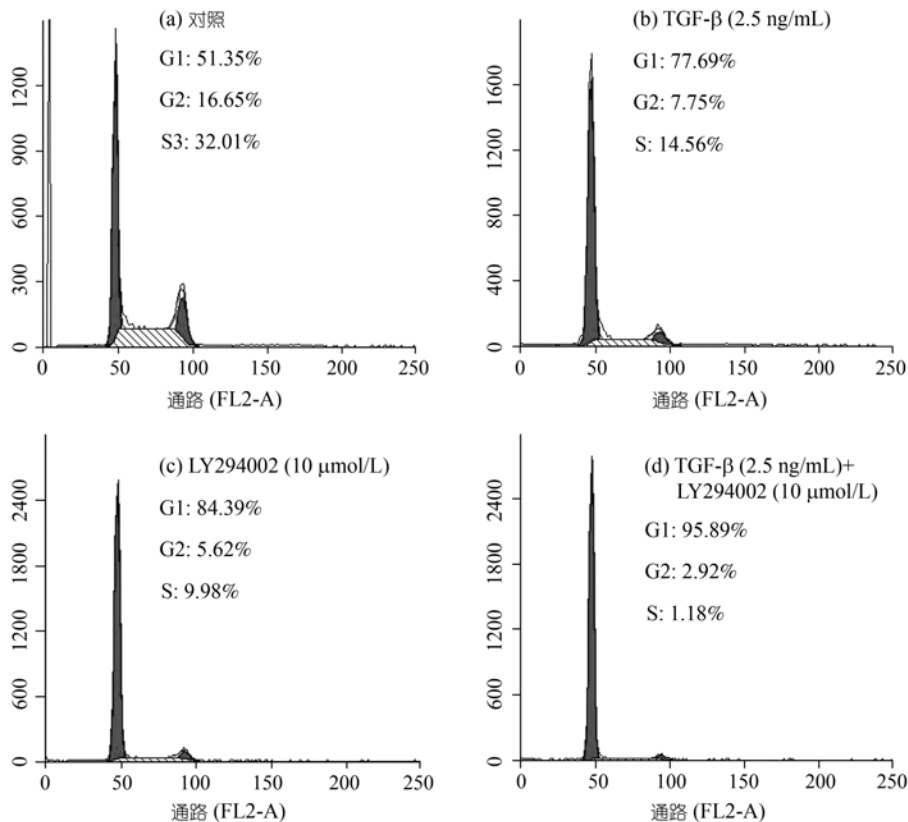


图 2 抑制 PI3K-PKB 信号通路增强 TGF- β 诱导细胞周期停滞于 G1 的功能

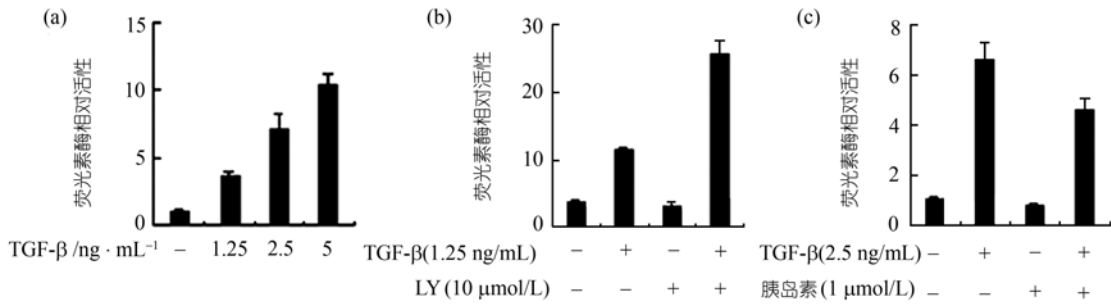


图 3 PI3K-PKB 信号通路抑制 TGF-β 通路信号诱导的基因转录
(a) PC-3 保持对 TGF-β 的响应; (b) LY294002 增强 TGF-β 信号; (c) 胰岛素抑制 TGF-β 信号

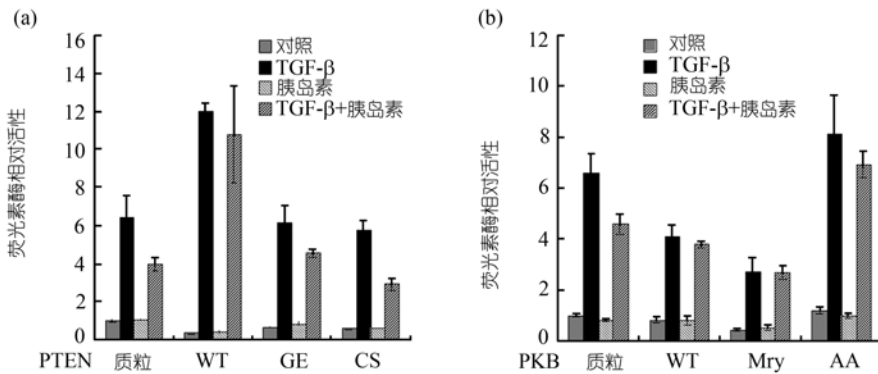


图 4 PTEN 逆转胰岛素对 TGF-β 信号的抑制作用
多种 PTEN 表达载体(a)和 PKB 表达载体(b)与 CAGA 报告基因共转染到 PC-3 细胞中, 胰岛素(1 μmol/L)和 TGF-β(2.5 ng/mL)于收获细胞前 18 h 加入到培养基中

2.3 PI3K-PKB 信号通路不调节 TGF-β 通路信号分子的表达

为了探讨 PI3K-PKB 信号通路调节细胞对 TGF-β 敏感性的机制, 用 RT-PCR 检测了 TGF-β 信号通路诸信号分子的表达. 激活和抑制 PI3K-PKB 信号通路都不能调节 Smad2, Smad3, Smad4, TβR 及 TβR 的表达(图 5). 虽然 TGF-β 刺激可以上调 TGF-β 信号通路抑制性分子 Smad7, SnoN 及 TGIF 的表达, 但是用胰岛素激活 PKB 通路不能上调它们的表达, 用 LY294002 抑制 PKB 通路也不能下调它们的表达(图 5).

2.4 PKB 可与 Smad3 发生蛋白质相互作用

已有研究报道, PKB 与 Smad3 的相互结合可以调节 TGF-β 信号 [8,9]. 我们通过免疫共沉淀实验也发现, PKB 可以特异性的与 Smad3 发生蛋白质相互作用, 而不与 Smad2 和 Smad4 结合(图 6(a)). 同样, Smad3 也可以与 PKB 发生蛋白质相互作用(图 6(b)), 利用表达不同功能域的 Smad3 进行免疫共沉淀发现 Smad3

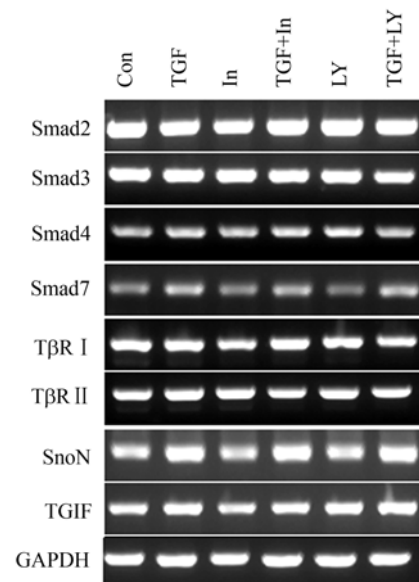


图 5 PI3K-PKB 信号通路不调节 TGF-β 通路信号分子的表达
Con, 对照组; TGF, TGF-β 处理组(TGF-β, 2.5 ng/mL); In, 胰岛素处理组(1 μmol/L); LY, LY294002 处理组(10 μmol/L)

是通过它的 MH2 和 Linker 区与 PKB 发生相互作用的(图 6(c)).

Smad3 与 Smad4 的结合对 TGF- β 信号的传递起着重要的作用^[10]. 免疫共沉淀结果显示, Smad3 既可以与 Smad4 结合也可以与 PKB 发生相互作用(图 6(d)). 由于 293T 细胞对 TGF- β 刺激不敏感, 我们通过瞬时转染组成性活化 TGF- β 的型受体(T β R - GGD)来模拟 TGF- β 刺激, 发现随着 T β R - GGD 转染剂量的

增大, Smad3 和 PKB 的相互作用减弱(图 6(d)), 而胰岛素在并不明显调节 Smad3 与 Smad4 结合的前提下可以略微增加 Smad3 和 PKB 的相互作用(图 6(e)). 由于胰岛素激活 PKB 需要磷酸化 PKB 分子 308 和 473 位氨基酸, 且这两个位点的磷酸化对 PKB 的激酶活性有重要调节作用^[11], 我们进一步观察这两个位点的磷酸化对 Smad3 和 PKB 的结合有无影响. 实验表明, P K B 与 S m a d 3 的 作 用 是 P K B 激 酶

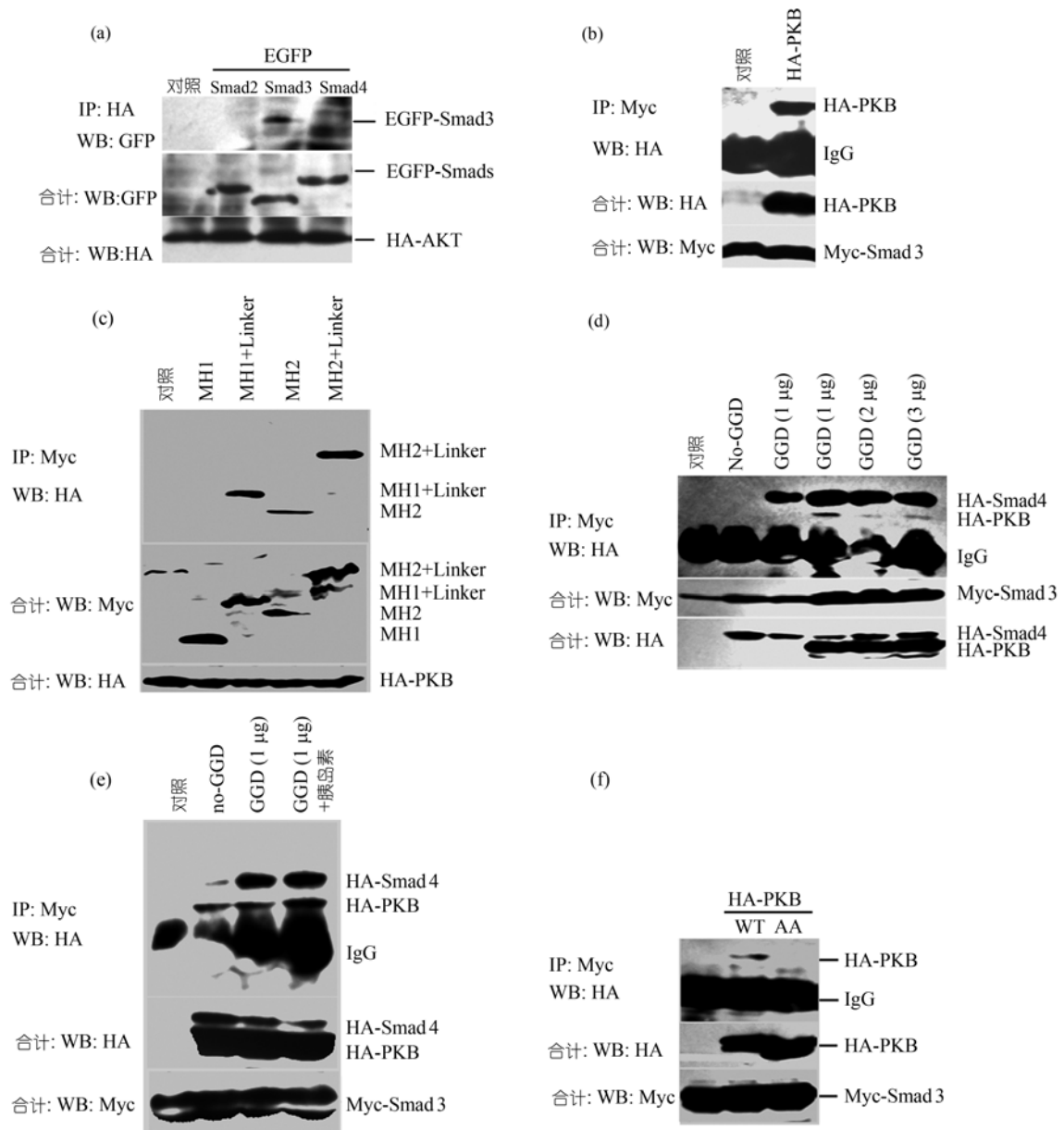


图 6 Smad3 与 PKB 相互作用

IP, 免疫共沉淀; WB, 免疫印迹. (a) PKB 特异性与 Smad3 结合; (b) Smad3 与 PKB 结合; (c) Smad3 的 Linker 和 MH2 结构域介导了与 PKB 的结合; (d) TGF- β 信号抑制 Smad3 与 PKB 的结合; (e) 胰岛素增强 Smad3 与 PKB 的结合; (f) PKB 的磷酸化促进其与 Smad3 的结合

活性依赖的, 因为野生型的PKB可以与Smad3相结合而激酶失活型的PKB不能与Smad3相结合(图6(f)).

3 讨论

TGF- β 是体内主要的负性生长因子, 大多数肿瘤细胞通过各种各样的途径逃避TGF- β 诱导的生长抑制和凋亡, 最常见的方式就是TGF- β 信号通路信号分子的突变、缺失、下调表达^[4,12]. 荧光素酶报告基因系统显示PC-3细胞对TGF- β 刺激有反应, 而且呈剂量依赖性关系, 虽然与对TGF- β 敏感性的细胞Hep3B相比有差距. RT-PCR的结果表明, PC-3细胞的TGF- β 信号通路是完整的, 至少没有信号分子的突变和缺失. 这与van der Poel^[13]的报道在PC-3细胞中TGF- β 可以活化pGL3-SBE报告基因的结论是一致的.

调节TGF- β 信号通路抑制性蛋白的表达也可以影响细胞对TGF- β 敏感性. Smad7, SnoN, TGIF是TGF- β 信号通路的负性调节分子. EGF可以促进三者的表达, 抑制TGF- β 信号^[14-16]. 实验结果显示, TGF- β 可以上调这3种基因的表达, 这可能是细胞的自反馈机制; 但是用胰岛素激活PI3K-PKB信号通路或LY294002抑制PI3K-PKB信号通路均不能影响这3种基因的表达, 表明PI3K-PKB信号通路不能调节这3种基因的表达, 说明PI3K-PKB信号通路并不是通过上调TGF- β 信号通路负性调节因子来调节TGF- β 信号的.

调节细胞对TGF- β 敏感性的另一主要方式就是其他信号通路对TGF- β 信号通路的调节. TGF- β 通路可以受很多其他信号通路的调节, 包括丝裂原活化蛋白激酶通路(MAPK通路)、钙调蛋白激酶通路(CamK)、蛋白激酶C(PKC)通路等^[17]. 最近研究表明, 在前列腺肿瘤细胞中雷帕霉素(mTOR的抑制剂, mTOR是PKB的底物)可以激活Smad活性^[18], 这间接表明PI3K-PKB信号通路与TGF- β 信号通路存在相互关系. 本研究表明, PI3K-PKB信号通路对TGF- β 诱导的生长抑制和细胞周期停滞起着抑制作用(图1和2). PI3K-PKB信号通路可以抑制TGF- β 诱导的基因转录(图3和4). LY294002 (20 μ mol/L)与TGF- β 无协同作用可能是因为PI3K-PKB信号通路是细胞的主要存活通路, 明显抑制该通路活性可以直接导致细胞死亡(图1(b)).

研究报道, PKB可与Smad3竞争性结合Smad3, 抑制Smad3的入核, 减弱Smad3的转录能力, 导致Smad3作为TGF- β 信号通路主要信号传递分子的能

力减弱^[8,9]. 本研究结果也表明, 作为Smad3既可以与Smad4结合也可以与PKB发生相互作用; TGF- β 信号通路活化促进两者解离; 胰岛素增强两者结合; 而PKB的活化更可以促进两者的结合(图6). 由于前列腺癌中PI3K-PKB信号通路高度活化, PKB的活性和含量都高于正常组织, 于是更多的Smad3与PKB结合, 较少的Smad3与Smad4结合, TGF- β 信号因为主要信号传递分子缺乏而受到抑制. 这可能就是PC-3细胞对TGF- β 不敏感的机制之一.

Smad3是TGF- β 信号通路中的主要信号传递分子, 它可以与许多蛋白质发生相互作用介导TGF- β 信号通路与其他信号通路的“crosstalk”. 最近的研究表明, PTEN和mTOR(PKB的底物)也可以与Smad3结合^[19,20]. 而在前列腺中, 雄激素受体可以与Smad3发生相互作用, 抑制TGF- β 诱导的基因转录; Smad3也可以抑制雄激素诱导的基因转录, 这些作用是TGF- β 和雄激素依赖性的并且可能参与了前列腺癌向雄激素非依赖的转化^[21-23]. 进一步证明PKB与TGF- β 具有“crosstalk”需要在PC-3细胞中进行. 我们已经构建了EGFP/RFP-Smads系列荧光融合蛋白, 准备利用荧光共振能量转移实验证明Smad3和PKB在PC-3中也可以结合.

信号通路是一个及其精细、复杂的网络系统, 每条信号通路的激活都可以激活其他信号通路, 同时又受其他信号通路的调节和抑制^[2]. 我们发现, 细胞中的PKB与Smad3处于动态平衡中, 正常情况下, Smad3主要与Smad4结合, 传递TGF- β 信号. 当PKB通路激活时, PKB与Smad3的亲和力增强, 更多Smad3与PKB结合, 减弱了Smad3与Smad4的结合, TGF- β 信号的传递受到抑制. 前列腺癌发生时, PI3K-PKB信号通路活化, 打破了平衡. 更多的Smad3与PKB结合, TGF- β 信号因为主要信号传递分子缺乏而受到抑制. 这可能就是大多数前列腺癌对TGF- β 诱导的生长抑制和凋亡不敏感的原因.

致谢 感谢清华大学生物系分子细胞实验室陈晔光教授及全体同学在实验材料和实验操作中提供的指导及便利.

参 考 文 献

- 1 Massague J. TGFbeta signaling: Receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*, 1996, 85(7): 947—950[DOI]
- 2 Siegel P M, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(11): 807—821[DOI]

- 3 Kreisberg J I, Malik S N, Prihoda T J, et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5232—5236[DOI]
- 4 Bello-DeOcampo D, Tindall D J. TGF-beta/Smad signaling in prostate cancer. *Curr Drug Targets*, 2003, 4(3): 197—207[DOI]
- 5 Chen R H, Su Y H, Chuang R L, et al. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene*, 1998, 17(15): 1959—1968[DOI]
- 6 Song K, Cornelius S C, Reiss M, et al. Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor-beta by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent suppression of the activation of Smad3 but not Smad2. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38342—38351[DOI]
- 7 Vlietstra R J, van Alewijk D C, Hermans K G, et al. Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res*, 1998, 58(13): 2720—2723
- 8 Remy I, Montmarquette A, Michnick S W. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(4): 358—365[DOI]
- 9 Conery A R, Cao Y, Thompson E A, et al. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(4): 366—372[DOI]
- 10 Wu R Y, Zhang Y, Feng X H, et al. Heteromeric and homomeric interactions correlate with signaling activity and functional cooperativity of Smad3 and Smad4/DPC4. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(5): 2521—2528
- 11 Coffey P J, Jin J, Woodgett J R. Protein kinase B (c-Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J*, 1998, 335(Pt 1): 1—13
- 12 Teicher B A. Malignant cells, directors of the malignant process: Role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Rev*, 2001, 20(1-2): 133—143[DOI]
- 13 van der Poel H G. Mammalian target of rapamycin and 3-phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibition enhances growth inhibition of transforming growth factor-beta1 in prostate cancer cells. *J Urol*, 2004, 172(4 Pt 1): 1333—1337[DOI]
- 14 Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor antagonizes the profibrotic action of TGF-beta1 in mesangial cells by stabilizing Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(6): 1402—1412[DOI]
- 15 Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction. *Am J Pathol* 2003, 163(2): 621—632
- 16 Afrakhte M, Moren A, Jossan S, et al. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF-beta family members. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249(2): 505—511[DOI]
- 17 Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003, 425(6958): 577—584[DOI]
- 18 van der Poel H G, Hanrahan C, Zhong H, et al. Rapamycin induces Smad activity in prostate cancer cell lines. *Urol Res*, 2003, 30(6): 380—386
- 19 Hjelmeland A B, Hjelmeland M D, Shi Q, et al. Loss of phosphatase and tensin homologue increases transforming growth factor {beta}-mediated invasion with enhanced SMAD3 transcriptional activity. *Cancer Res*, 2005, 65(24): 11276—11281[DOI]
- 20 Song K, Wang H, Krebs T L, et al. Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation. *Embo J*, 2006, 25(1): 58—69[DOI]
- 21 Kang H Y, Lin H K, Hu Y C, et al. From transforming growth factor-beta signaling to androgen action: Identification of Smad3 as an androgen receptor coregulator in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(6): 3018—3023[DOI]
- 22 Hayes S A, Zarnegar M, Sharma M, et al. SMAD3 represses androgen receptor-mediated transcription. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 2112—2118
- 23 Chipuk J E, Cornelius S C, Pultz N J, et al. The androgen receptor represses transforming growth factor-beta signaling through interaction with Smad3. *J Biol Chem*, 2002, 277(2): 1240—1248[DOI]

(2005-12-23 收稿, 2006-04-05 接受)