

哇巴因抑制结直肠癌多药耐药细胞增殖及侵袭力的研究*

张贵海^① 张先平^② 文坤明^③ 胡敏^① 王轶^① 藏春宝^① 李少林^①

摘要 目的:探讨结直肠癌耐药细胞增殖及侵袭力与 Na^+, K^+ -ATP酶活性及其 β_1 亚单位和P糖蛋白(P-gp)表达的关系,及哇巴因增加化疗敏感性的可能机制。**方法:**以人结直肠癌亲本细胞(SW480)和耐奥沙利铂细胞(SW480/OxR)为研究对象,采用MTS法、Transwell小室、生化酶学、实时定量PCR(Real time quantitative, RT-PCR)及流式细胞技术等方法比较SW480细胞与SW480/OxR细胞的增殖及侵袭力、 Na^+, K^+ -ATP酶活性及其 β_1 亚单位和P-gp表达的差异,观察哇巴因对SW480/OxR细胞上述指标的影响。**结果:**与SW480细胞比较,SW480/OxR细胞增殖活力无明显变化($P>0.05$),而细胞侵袭力却显著增加, Na^+, K^+ -ATP酶活性下降, β_1 亚单位表达下调,P-gp表达上调(P 均 <0.01);哇巴因能显著抑制SW480/OxR细胞增殖活力,减弱其侵袭力,下调SW480/OxR细胞P-gp蛋白表达,上调SW480/OxR细胞 β_1 亚单位蛋白表达,增加SW480/OxR细胞 Na^+, K^+ -ATP酶活性(P 均 <0.01)。**结论:** Na^+, K^+ -ATP酶活性下降可能源于 β_1 亚单位表达下调,并参与结直肠癌的耐药;哇巴因能部分逆转结直肠癌耐药细胞MDR,可能与增加 Na^+, K^+ -ATP酶活性及下调P-gp表达有关。

关键词 结直肠癌 腺苷三磷酸酶 P-糖蛋白 化疗抵抗 哇巴因

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.05.004

Mechanism of Inhibitory Effect of Ouabain on the Proliferation and Invasion of Human Colorectal Cancer Multidrug-Resistant Cells

Guihai ZHANG¹, Xianping ZHANG², Kunming WEN³, Min HU¹, Yi WANG¹, Chunbao ZANG¹, Shaolin LI¹

Correspondence to: Shaolin LI, E-mail: lishaolin@cqmu.edu.cn

¹Department of Radiation Medicine, Chongqing Medical University School of Basic Medicine, Chongqing 400016, China

²Section of Histology and Embryology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

³Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30970843)

Abstract Objective: This work aimed to explore the effects of Na^+/K^+ -ATPase activity and the expression of its β_1 -subunit and P-glycoprotein (P-gp) on the proliferation and invasion of human colorectal cancer parental cells (SW480) and oxaliplatin-resistant cells (SW480/OxR). The molecular mechanisms of ouabain for reversing the multidrug resistance (MDR) of human colorectal cancer oxaliplatin-resistant cells were also examined. **Methods:** SW480 and SW480/OxR cells derived from the same patient were treated with or without ouabain at the physiological concentration of 1 nM. The SW480 and SW480/OxR cell proliferation capacity was assessed by the MTS assay. The invasion capacity was determined using a Transwell chamber. The Na^+/K^+ -ATPase activity was measured by biochemical and enzymological techniques. The expression of the β_1 -subunit and P-gp of Na^+/K^+ -ATPase was determined by real-time quantitative PCR, Western blotting, and flow cytometry. **Results:** The capacity of invasion significantly increased in the SW480/OxR cells compared with the SW480 cells ($P < 0.01$). There was no difference between the SW480 and SW480/OxR cell proliferation capacities ($P > 0.05$). The Na^+/K^+ -ATPase activity significantly decreased in SW480/OxR cells compared with SW480 cells ($P < 0.01$). The expression of the Na^+/K^+ -ATPase β_1 -subunit in mRNA and protein levels was lower in SW480/OxR cells than in SW480 cells ($P < 0.01$). However, the expression of P-gp in mRNA and protein levels was higher in SW480/OxR cells than in SW480 cells ($P < 0.01$). Interestingly, ouabain at the physiological concentration of 1 nM significantly enhanced the activity of Na^+/K^+ -ATPase in SW480/OxR cells ($P < 0.05$). The expression of the β_1 -subunit was also upregulated and that of P-gp was downregulated at the protein level, thereby inducing a decrease in the capacity of SW480/OxR cell growth inhibition and invasion. Nevertheless, after ouabain treatment for 48 h, the Na^+/K^+ -ATPase activity and β_1 -subunit protein expression level in SW480/OxR cells were still lower than those in SW480 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** Decreased Na^+/K^+ -ATPase activity can be attributed to the downregulation of Na^+/K^+ -ATPase β_1 -subunit expression and may cause the MDR of human colorectal cancer cells. Ouabain could partly reverse the MDR of such cells,

作者单位:①重庆医科大学基础医学院放射医学教研室(重庆市400016);②遵义医学院组胚教研室;③重庆医科大学附属第一医院胃肠外科

*本文课题受国家自然科学基金(编号:30970843)资助

通信作者:李少林 lishaolin@cqmu.edu.cn

which can be attributed to increased Na^+/K^+ -ATPase activity and P-gp expression downregulation.

Keywords Colorectal cancer; Na^+/K^+ -ATPase; P-glycoprotein; Multidrug resistance of chemotherapy; Ouabain

多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是恶性肿瘤治疗失败的主要原因之一。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是由MDR1基因编码的存在于细胞膜上的一种能量依赖性药排出性膜泵,其表达水平与耐药程度呈正相关。 Na^+/K^+ -ATP酶是广泛存在于上皮细胞膜上的一种跨膜蛋白,由 α 、 β 和 γ 亚基组成。 β 亚基是一个调节亚基,起着调整和稳定 α 亚基的作用,为全酶的正确构象和活性所必需^[1],包括 β_1 、 β_2 和 β_3 亚基。 β_1 亚基在多数组织均有表达,作为细胞黏附分子,参与细胞间紧密连接形成、维持上皮细胞原有极性^[2-3],与癌上皮组织分化程度密切相关^[4],具有抑制肿瘤转移的功能^[5]。 Na^+/K^+ -ATP酶 β_1 亚单位在多种上皮肿瘤细胞中表达下调,有助于肿瘤细胞的侵袭与转移^[6-7]。异常的 Na^+/K^+ -ATP酶活性及亚单位表达虽伴随肿瘤的发生,是否参与肿瘤的耐药尚未阐明。 Na^+/K^+ -ATP酶作为强心甙类固醇(cardiotonic steroids, CS)的受体,包括哇巴因(ouabain)。哇巴因与 Na^+/K^+ -ATP酶结合触发多种信号级联反应以细胞特异的方式调节细胞增殖、分化和迁移等一系列生命过程^[8-9]。哇巴因能否逆转肿瘤的MDR而增加化疗敏感性尚有待明确。本研究通过比较结直肠癌亲本细胞、耐药细胞 Na^+/K^+ -ATP酶活性及 β_1 亚单位和P-gp表达的差异,探讨 Na^+/K^+ -ATP酶活性及 β_1 亚单位表达对结直肠癌耐药细胞增殖及侵袭力的影响,及 Na^+/K^+ -ATP酶抑制剂哇巴因逆转MDR的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

人结肠癌细胞SW480购自中国科学院上海细胞库。Leibovitz's L-15培养基购自北京迈晨科技公司;胎牛血清(FBS)购自以色列Bioind公司;哇巴因、5-氟尿嘧啶(5-FU)及奥沙利铂(Oxa)购自美国Sigma公司;MTS购自美国Promega公司;Transwell小室(8 μm 孔径)购自美国Millipore公司;Matrigel购自美国BD公司; Na^+/K^+ -ATP酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所;细胞RNA提取与纯化试剂盒购自北京天根公司;逆转录试剂盒及荧光定量PCR试剂盒购自大连宝生物公司;细胞蛋白提取试剂盒、蛋白定量试剂盒及化学发光增强剂购自美国Pierce公司;兔抗人 Na^+/K^+ -ATP酶 β_1 多克隆抗体购自美国Epitomics公司;小鼠抗人 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠抗体及抗兔抗体购自美国Jackson公司;山羊抗小鼠、抗兔FITC标记抗体购自

北京正四柏公司。

1.2 细胞培养及建立耐药细胞株

人结肠癌细胞株SW480细胞培养,用含2 mM L-谷氨酰胺、10% FBS的Leibovitz's L-15培养液,在37 $^{\circ}\text{C}$ 、100%湿度及无 CO_2 环境中培养。通过逐渐递加L-15培养液中奥沙利铂的浓度直至临床血浆浓度(2 $\mu\text{mol/L}$)建立慢性抵抗奥沙利铂细胞株(SW480/OxR)^[10],细胞融合达80%以上行传代培养。

1.3 方法

1.3.1 实验分组 本实验分为SW480组、SW480/OxR组和哇巴因干预组(SW480和SW480/OxR)分别加入含1 nM哇巴因的培养液。

1.3.2 细胞增殖活力检测 采用MTS法检测细胞增殖能力,将SW480、SW480/OxR细胞均按 1×10^4 个/孔,接种于96孔培养板(100 μL /孔)中,待细胞70%~80%融合时,分别加入含哇巴因(1 nM)、奥沙利铂(2 $\mu\text{mol/L}$)和5-氟尿嘧啶(2 $\mu\text{g/L}$)的培养液继续培养72 h,以无细胞的空白对照孔调零(仅含培养液和MTT),以不含哇巴因或5-FU或Oxa的SW480、SW480/OxR细胞孔板为对照组,每组设5个复孔。在规定时间内每孔加入MTS 10 μL 继续培养4 h,酶标仪上检测OD₄₉₀的吸光度,以吸光度值反映细胞增殖能力及鉴定SW480/OxR细胞。

1.3.3 细胞侵袭力检测 用基质胶1:3的稀释液包被Transwell小室滤膜上表面,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温育1 h,L-15水化小室滤膜。将经哇巴因或无治疗的两种细胞200 μL ($5 \times 10^5/\text{mL}$)的细胞悬液加入小室上层,600 μL 含10%FBS的L-15培养液加入下室,置入24孔培养板在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养48 h,去除滤膜上表面未穿入细胞,2%多聚甲醛固定30 min,吉姆萨染色20 min,200倍显微镜下观察并拍照,随机选择5个视野计数,取平均值。实验至少重复3次。

1.3.4 细胞 Na^+/K^+ -ATP酶活性测定^[11] 用酶学比色法测定 Na^+/K^+ -ATP酶活性,以每毫克总蛋白(mg protein)中ATP酶每小时分解ATP产生磷的量表示($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)。

1.3.5 荧光定量PCR检测细胞 Na^+/K^+ -ATP酶亚单位及P-糖蛋白表达 细胞总RNA提取及逆转录均严格按照试剂盒说明书操作。采用SYBYGreen染料法进行实时定量PCR反应,运用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法确定 Na^+/K^+ -ATPase亚单位及P-糖蛋白表达相对水平,Ct值为每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时的循环数, ΔCt 为Ct(目的基因)-Ct(内参基因)。反应条件

为:95℃预变性30 s;然后为95℃ 5 s,58℃ 30 s,39个循环;最后进行熔解曲线的检测。至少设立3个复孔,重复3次。引物由大连宝生物设计并合成(表1)。

表1 荧光实时定量PCR引物序列

Table 1 Primer sequence used in real-time quantitative PCR

基因名称	引物序列
Na ⁺ , K ⁺ -ATP酶β ₁ -亚单位	上游 5'-ACCTAAGCCTCCCAAGAATGAG-3'
	下游 5'-GCCAGTCCAAAATACTAAAC-3'
P-糖蛋白	上游 5'-GAGGCCAACATACATGCCTTC-3'
	下游 5'-GTCTAACAAGGGCAGCAGCTAT-3'
β-actin	上游 5'-CCACGAACTACCTTCAACTCC-3'
	下游 5'-GTGATCTCCTTCTGCATACTGT-3'

1.3.6 P-糖蛋白及Na⁺, K⁺-ATP酶β₁亚单位蛋白表达检测 采用蛋白免疫印迹法检测Na⁺, K⁺-ATP酶β₁亚单位表达水平。样品(30 μg)经10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜,5%脱脂奶粉封闭1 h, Na⁺, K⁺-ATP酶β₁亚单位(1:2 000)及β-肌动蛋白(1:5 000)抗体孵育4℃过夜,洗膜,HRP标记的相应二抗(1:5 000)室温孵育1 h,洗膜,ECL发光。采用Quantity-One软件对条带的光密度值进行半定量分析,β₁亚单位表达的相对量为目的条带的光密度值/β-肌动蛋白条带的光密度值表示,β-肌动蛋白为内参照。P-糖蛋白表达采用流式细胞分析。收集经哇巴因或未干预的细胞,2%多聚甲醛固定30 min,用含0.5%牛血清蛋白PBS室温封闭1 h,将2×10⁵个细胞悬于100 μL PBS中,加入P-糖蛋白2 μL 4℃过夜,用1 mL PBS洗涤2次以去除残留一抗,用100 μL PBS重悬细胞,加入FITC标记的流式二抗2 μL室温避光孵育20 min, PBS洗涤后用100 μL PBS重悬细胞,流式细胞仪检测。

1.4 统计学方法

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,全部资料的整理、分析均用SPSS 17.0统计软件进行。SW480与SW480/OxR组间及SW480/OxR细胞哇巴因干预前后的比较均采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

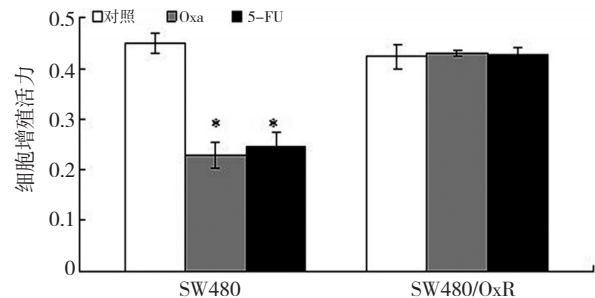
2.1 结直肠癌耐药细胞株的鉴定

MTS比色法检测结果显示,SW480/OxR细胞增殖能力与SW480细胞无明显差异(图1)($P > 0.05$)。临床血浆浓度的奥沙利铂和5-氟尿嘧啶均能显著抑制SW480的增殖(P 均 < 0.01),而对SW480/OxR细胞的增殖却无影响(图1)($P > 0.05$)。QRT-PCR结果显示,SW480/OxR细胞P-gp mRNA表达水平(1.68 ± 0.17)较SW480显著增加(0.41 ± 0.06)($P < 0.01$)。流式细胞检测结果发现,SW480/OxR细胞含P-gp⁺细胞数量明显高于SW480细胞(图2)($P < 0.01$)。上述结果

提示,SW480/OxR细胞对5-氟尿嘧啶耐药。

2.2 结直肠癌耐药细胞Na⁺, K⁺-ATP酶活性及β₁亚单位表达

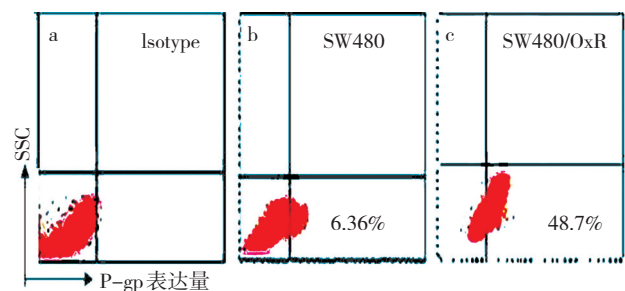
生化酶学检测结果发现,SW480/OxR细胞Na⁺, K⁺-ATP酶活性[(4.52 ± 0.54) μmol · h⁻¹ · mg⁻¹]明显低于SW480细胞的Na⁺, K⁺-ATP酶活性[(6.75 ± 0.28) μmol · h⁻¹ · mg⁻¹]($P < 0.01$)。QRT-PCR结果显示,与SW480细胞Na⁺, K⁺-ATP酶β₁亚单位mRNA表达水平(1.17 ± 0.06)比较,SW480/OxR细胞Na⁺, K⁺-ATP酶β₁亚单位mRNA表达量(0.76 ± 0.09)显著下调($P < 0.01$),且蛋白表达与mRNA表达变化一致(图3),提示Na⁺, K⁺-ATP酶活性下降可能伴随结肠癌细胞耐药性的产生。



*与SW480对照组比较, $P < 0.01$

图1 化疗药物对结直肠癌细胞增殖能力的影响

Figure 1 Effects of oxaliplatin and 5-fluorouracil on the proliferation of SW480 and SW480/OxR cells at 48 h



SSC:侧散射;a:同型对照,b:SW480细胞,c:SW480/OxR细胞

图2 结直肠癌细胞P糖蛋白表达散点图

Figure 2 Scatter diagram of the cells that expressed P-gp in SW480 and SW480/OxR cells

2.3 哇巴因对结直肠癌耐药细胞增殖及P-gp表达的影响

上述结果提示,SW480/OxR细胞对临床血浆浓度的奥沙利铂及5-氟尿嘧啶均耐药。本研究进一步观察生理浓度哇巴因及联合上述化疗药物对SW480/OxR细胞48 h增殖的影响。结果发现,哇巴因联合奥沙利铂或5-氟尿嘧啶均能显著抑制SW480/OxR细胞的增殖(P 均 < 0.01),抑制率分别为52.4%及50%,提示外源性生理浓度哇巴因能增加耐药细胞的化疗敏

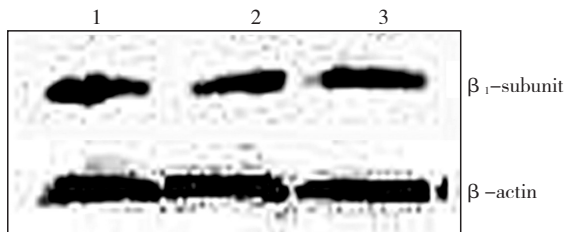
感性。另图2和图4显示,哇巴因能显著减少SW480/OxR细胞P-gp⁺细胞的数量($P<0.01$),提示哇巴因增加SW480/OxR细胞化疗敏感性可能与下调P-gp表达有关。

2.4 哇巴因对结直肠癌耐药细胞侵袭力的影响

与SW480细胞比较,SW480/OxR细胞在48h穿透Matrigel的能力[(113.20±7.56)个·视野⁻¹]明显高于SW480细胞[(88.20±6.76)个·视野⁻¹]($P<0.01$),提示SW480/OxR细胞较SW480细胞具有高转移潜能。生理浓度的哇巴因能显著削弱SW480/OxR细胞的侵袭力[(55.00±4.12)个·视野⁻¹]($P<0.001$)。

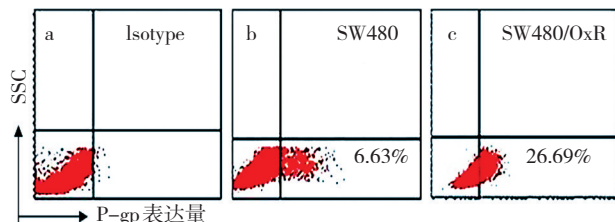
2.5 哇巴因对结直肠癌耐药细胞Na⁺,K⁺-ATP酶活性及β₁亚单位表达的影响

上述结果显示SW480细胞与SW480/OxR细胞增殖无明显差异。因此,本研究仅观察1nM的哇巴因对SW480/OxR细胞48h Na⁺,K⁺-ATP酶活性及β₁亚单位表达的作用。由图5和图3可见,1nM的哇巴因能显著增加SW480/OxR细胞48h Na⁺,K⁺-ATP酶活性,上调β₁亚单位蛋白表达,但其水平仍低于SW480细胞,进一步证实了Na⁺,K⁺-ATP酶活性下降可能伴随结肠癌细胞耐药。



1:SW480细胞;2:SW480/OxR细胞;3:SW480/OxR细胞+哇巴因
图3 结直肠癌细胞及哇巴因干预耐药细胞后Na⁺,K⁺-ATP酶β₁亚单位表达

Figure 3 Protein-level expression of the Na⁺/K⁺-ATPase β₁-subunit in SW480 and SW480/OxR cells with or without ouabain treatment



SSC:侧散射;a:同型对照;b:SW480细胞;c:SW480/OxR细胞

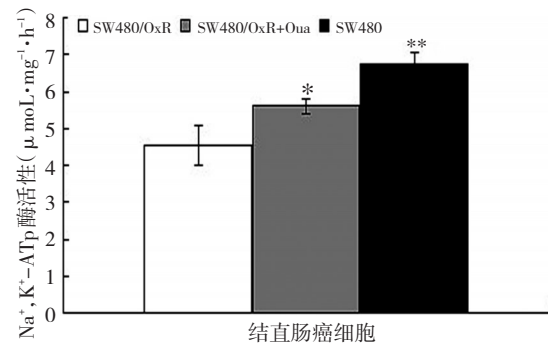
图4 哇巴因对结直肠癌细胞P糖蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of ouabain on the expression of P-gp in SW480 and SW480/OxR cells

3 讨论

MDR是恶性肿瘤化疗的主要障碍,包括肿瘤细胞对抗癌药物的天然不敏感即原发耐药,及在化疗

过程中由抗癌药诱导或其他因素激活而产生即获得性耐药。肿瘤通过高表达ABC药物转运蛋白,提高药物转运体的活性而将药物泵出是MDR发生的主要机制^[12]。P-gp是ABC超家族一员,由MDR1基因编码的存在于细胞膜上的一种分子量为170 kD的膜糖蛋白,是一种能量依赖性药排出性膜泵,在体内、体外均对抗癌药物产生抗药性^[12]。在临床上P-gp已经作为多种实体恶性肿瘤的耐药预测和预后评估的重要指标。因此,如何下调P-gp表达及降低其功能对逆转肿瘤MDR起着重要作用。



*与SW480/OxR比较, $P<0.05$;**与SW480比较, $P<0.05$

图5 哇巴因对SW480/OxR细胞Na⁺,K⁺-ATP酶活性作用

Figure 5 Na⁺/K⁺-ATPase activity of SW480/OxR cells treated with ouabain

Dallas等^[13]研究发现,对奥沙利铂抵抗的结直肠癌细胞(HT29)也对5-氟尿嘧啶产生交叉抵抗,且耐药细胞的生长能力较亲本细胞减弱,但侵袭力却增强。本研究结果显示,对奥沙利铂耐药的SW480/OxR细胞增殖对临床血浆浓度的5-氟尿嘧啶也耐药,且SW480/OxR细胞增殖能力与结直肠癌亲本细胞(SW480)无明显差异,而其侵袭力较SW480细胞显著增加,在侵袭力方面与Dallas等^[13]报道一致。本研究同时发现,SW480/OxR细胞P-gp表达较SW480细胞显著上调,提示SW480/OxR细胞对临床血浆浓度的奥沙利铂和5-氟尿嘧啶抵抗可能部分与P-gp表达上调有关。有研究表明,对奥沙利铂慢性抵抗的结直肠癌细胞富有肿瘤干细胞表型,增强肿瘤细胞的致瘤性,还参与上皮间质转化过程^[13],有助于肿瘤转移。Rajasekaran等^[4]研究发现,Na⁺,K⁺-ATP酶β₁亚单位是β₁转化生长因子介导的癌上皮间质转化的治疗靶点。本研究也显示MDR不仅涉及肿瘤细胞的增殖,还与肿瘤侵袭力有关,这可能也是化疗失败的主要原因。

目前认为,Na⁺,K⁺-ATP酶活性下降及过表达的亚单位伴随肿瘤的发生,并成为肿瘤治疗的重要靶点。Na⁺,K⁺-ATP酶β₁亚单位在多种癌组织中表达同

样下调^[6-7]。 β_1 亚单位作为细胞黏附分子,除参与细胞间紧密连接及上皮细胞原有极性维持外^[2-3],还具有抑制肿瘤转移的功能^[5]。 β 亚基是 Na^+ , K^+ -ATP酶的一个调节亚基,在维持全酶的结构和活性方面起着重要作用。本研究发现,SW480/OxR细胞 Na^+ , K^+ -ATP酶活性较SW480细胞明显下降,且伴随 β_1 亚单位表达下调,提示 Na^+ , K^+ -ATP酶活性下降可能参与结直肠癌对奥沙利铂及5-氟尿嘧啶的抵抗性产生。 Na^+ , K^+ -ATP酶活性下降可能部分源于 β_1 亚单位表达下调。结合上述结果,SW480/OxR细胞侵袭力增强可能与 β_1 亚单位表达下调有关。

哇巴因与 Na^+ , K^+ -ATP酶结合触发多种信号级联反应以细胞特异的方式调节细胞增殖、分化和迁移等一系列生命过程^[8-9]。本研究发现,1 nM的哇巴因能增强敏化对奥沙利铂和5-氟尿嘧啶抵抗的结直肠癌细胞增殖及侵袭力的抑制作用,并伴随 Na^+ , K^+ -ATP酶活性增加及 β_1 亚单位表达上调,但其水平仍低于SW480细胞,进一步证实 Na^+ , K^+ -ATP酶活性下降及 β_1 亚单位表达下调伴随结直肠癌细胞耐药的发生。本研究同时发现,哇巴因还能下调奥沙利铂抵抗的结直肠癌细胞P-gp表达水平,以减少细胞内细胞毒药物排出,增加细胞内细胞毒药物的浓度,达到细胞增殖及侵袭的抑制作用,提示哇巴因能部分逆转结直肠癌耐药细胞MDR。

综上所述, Na^+ , K^+ -ATP酶活性下降及 β_1 亚单位表达下调伴随结直肠癌MDR发生;生理浓度哇巴因能上调结直肠癌耐药细胞 Na^+ , K^+ -ATP酶 β_1 亚单位表达,下调结直肠癌细胞P-gp表达,增加 Na^+ , K^+ -ATP酶活性,以部分逆转结直肠癌耐药细胞MDR。

参考文献

- Geering K. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPase[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2001, 33(5): 425-438.
- Kitamura N, Ikekita M, Sato T, et al. Mouse Na^+/K^+ -ATPase β_1 -subunit has a K^+ -dependent cell adhesion activity for β -GlcNAc-terminating glycans[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(8): 2796-2801.
- Shoshani L, Contreras RG, Roldan ML, et al. The polarized expression of Na^+ , K^+ -ATPase in epithelia depends on the association between β -subunits located in neighboring cells[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(3): 1071-1081.
- Rajasekaran SA, Huynh TP, Wolle DG, et al. Na^+ , K^+ -ATPase Subunits as Markers for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer and Fibrosis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(6): 1515-1524.
- Inge LJ, Rajasekaran SA, Yoshimoto K, et al. Evidence for a potential tumor suppressor role for the Na^+ , K^+ -ATPase β_1 -subunit[J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(4): 459-467.
- Espineda C, Seligson DB, Ball Jr. JW, et al. Analysis of the Na^+ , K^+ -ATPase α - and β -subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays[J]. *Cancer*, 2003, 97(8): 1859-1868.
- Espineda C, Chang JH, Twis J, et al. Repression of Na^+ , K^+ -ATPase β_1 -subunit by the transcription factor Snail in carcinoma[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(2): 1364-1373.
- Aperia A. New roles for an old enzyme: Na^+ , K^+ -ATPase emerges as an interesting drug target[J]. *J Intern Med*, 2007, 261(1): 44-52.
- Liu J, Tian J, Haas M, et al. Ouabain interaction with cardiac Na^+/K^+ -ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na^+ and Ca^{2+} concentrations[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 27838-27844.
- Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic Oxaliplatin Resistance Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cell Lines[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(14): 4147-4153.
- 张贵海,商黔惠,姜黔峰,等.血管紧张素 II 对正常和高血压大鼠主动脉平滑肌细胞腺苷三磷酸酶的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(4): 260-264.
- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporter in health and disease[J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71: 537-592.
- Dallas NA, Ling X, Fan F, et al. Chemoresistant Colorectal Cancer Cells, the Cancer Stem Cell Phenotype, and Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibition[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(5): 1951-1957.

(2011-12-27 收稿)

(2012-02-09 修回)

(邢颖校对)