

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.02.011

· 临床研究 ·

胰腺癌组织高表达血小板反应蛋白2的预后意义及其对癌细胞增殖和迁移的影响

杨柳, 罗黔(泸州市人民医院 肝胆外科, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:** 探索血小板反应蛋白2(thrombospondin 2, THBS2)表达对胰腺癌患者的预后意义及对胰腺癌 ASPC-1 细胞增殖和迁移的影响, 并探讨可能的分子机制。 **方法:** 利用数据库分析 THBS2 在胰腺癌组织中的表达情况及其对患者整体生存率的影响。 Wb 实验检测 THBS2 在胰腺癌 ASPC-1 细胞中的表达, RNA 干扰技术敲低 ASPC-1 细胞中 THBS2 的表达后, 采用 MTT 实验以及 Transwell 实验检测敲低 THBS2 对于细胞增殖和迁移能力的影响; Wb 技术检测对 ASPC-1 细胞中 MMP、E-钙黏蛋白、AKT 以及 PI3K 蛋白表达的影响。 **结果:** THBS2 在胰腺癌组织中的表达显著高于正常胰腺组织中的表达 ($P < 0.01$), 且 THBS2 的高表达会导致胰腺癌患者整体生存率的下降。 THBS2 在 ASPC-1 细胞中表达上调, 干扰 THBS2 的表达后 ASPC-1 细胞的增殖 ($P < 0.01$) 和迁移能力 ($P < 0.01$) 均显著下降, 细胞内 AKT 以及 PI3K 的表达显著下调 ($P < 0.01$)。 **结论:** THBS2 在胰腺癌组织和细胞中高表达, 且与患者的预后情况呈负相关, 其机制可能是通过调控 AKT/PI3K 信号通路而调节 ASPC-1 细胞的增殖和迁移。

[关键词] 胰腺癌; ASPC-1 细胞; 血小板反应蛋白2; 增殖和迁移; AKT/PI3K 信号通路

[中图分类号] R730.5; R735 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)02-0206-07

Prognostic significance of high expression of thrombospondin 2 in pancreatic cancer and its effect on proliferation and migration of cancer cells

YANG Liu, LUO Qian (Department of Hepatobiliary Surgery, Luzhou People's Hospital, Luzhou 646000, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the prognostic significance of thrombospondin 2 (THBS2) expression and its effects on the proliferation and migration of pancreatic cancer ASPC-1 cells for patients with pancreatic cancer, and to investigate its possible molecular mechanism. **Methods:** The expression of THBS2 in pancreatic cancer tissues and its effects on overall survival rate in patients were analyzed by online database. THBS2 expression in pancreatic cancer ASPC-1 cells was detected by Western Blotting; RNA interference was used to knockdown the expression of THBS2 in ASPC-1 cells, and then the effects of THBS2 knockdown on cell proliferation and migration were detected by MTT and Transwell assays, while its effects on protein expression levels (MMP, E-cadherin, AKT and PI3K) were detected by Wb. **Results:** Expression of THBS2 in pancreatic cancer tissues was significantly higher than that in normal pancreatic tissues ($P < 0.01$), and the high expression of THBS2 could lead to the decrease of overall survival rate in pancreatic cancer patients. The expression of THBS2 in pancreatic cancer cell lines was significantly up-regulated; however, after interference on the expression of THBS2, the proliferation ($P < 0.01$) and migration ability ($P < 0.01$) of ASPC-1 cells were significantly decreased, and the expression of AKT and PI3K in cells was significantly down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** THBS2 is highly expressed in pancreatic cancer tissues and cells, and is negatively correlated with the prognosis of patients. The mechanism is possibly related with the proliferation and migration of ASPC-1 cells that regulated by AKT/PI3K signaling pathway.

[Key words] pancreatic cancer; ASPC-1 cell; thrombospondin 2(THBS2); proliferation and migration; AKT/PI3K pathway

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(2): 206-212. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.02.011]

胰腺癌作为一种常见的恶性消化系统肿瘤,患者平均生存期仅为3~6个月,5年生存率不足5%^[1-4]。目前已知基因突变、遗传、饮食以及环境等因素会导致胰腺癌的发生^[5-6],但具体发生及发展的分子机制有待进一步探索。血小板反应蛋白2(thrombospondin 2, THBS2/TSP2)是血小板反应蛋白家族的一员^[7]。早期研究^[8-10]表明,THBS2基因与冠状动脉粥样硬化、肝脏疾病以及慢性肾病密切相关。在结直

肠癌以及肺癌中,THBS2基因的表达显著上调,并且导致结直肠癌患者的预后变差^[11-13]。其作为TWIST2的一个下游基因,能够促进子宫颈癌的转移^[14]。THBS2在胃癌中的作用存在一定的争议,有报道称TH-

[作者简介] 杨柳(1981-),男,本科,主治医师,主要从事肝胆脾疾病的研究,E-mail:499533316@qq.com

[通信作者] 罗黔(LUO Qian, corresponding author),本科,副主任医师,主要从事肝胆脾疾病的研究,E-mail:291119555@qq.com

BS2基因在胃癌中表达上调,且会导致细胞的迁移能力增强^[15-17],但也有研究显示THBS2基因在胃癌组织中表达下调^[18]。目前THBS2在胰腺癌中的表达以及作用尚不清楚,本研究在数据库分析的基础上,探讨THBS2基因对胰腺癌细胞增殖、迁移能力的影响及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人正常胰腺导管上皮细胞HPDE以及人胰腺癌细胞系HPAC、ASPC-1、PANC-1均购自美国ATCC细胞库,1640 RPMI 以及 DMEM 基础培养基、胰蛋白酶、小牛血清均购自Invitrogen公司,RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂、蛋白浓度测定试剂盒、GAPDH抗体均购自碧云天公司,THBS2抗体、MMP2抗体、MMP7抗体、E-Cadherin抗体、AKT抗体以及PI3K抗体均购自Abcam公司,WB二抗购自Thermo Fisher公司,干扰引物购自上海生工,PLKO.1载体质粒及慢病毒包装质粒购自Thermo Fisher公司。

1.2 数据库分析THBS2在胰腺癌组织中的表达及其对预后的影响

本研究前期使用Oncomine(网址<https://www.oncomine.org>)数据库对THBS2在胰腺癌中的表达进行分析。后使用R2基因组分析和可视化平台(网址:<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi?&species=hs>)对于THBS2基因表达对胰腺癌患者整体生存率的影响进行分析。

1.3 THBS2干扰质粒构建

取PLKO.1载体质粒4 000 ng, Age I 以及 BamH I 双酶切后,进行切胶回收。取THBS2基因的上游干扰引物和下游干扰引物各5 μ l,加水40 μ l,混匀后放入盛有沸水的烧杯中,待其自然降至常温后,吸取5 μ l退火后引物,加入0.5 μ l酶切载体,使用T4连接酶体系16 $^{\circ}$ C连接过夜后,大肠杆菌转化挑取单克隆测序。对测序结果进行序列对比,选取测序完全匹配的单克隆,扩大培养提取THBS2干扰质粒。

1.4 慢病毒制备

实验分为3组:NC组,shTHBS2-1#组及shTHBS2-2#组,实验组分别取构建好的干扰质粒shTHBS2-1#或shTHBS2-2#以及慢病毒包装质粒各300 ng,NC组加入空载体,之后加入0.2 ml的OPTI培养基中混匀。取脂质体2000 3 μ l,加入到0.2 ml的OPTI培养基中,轻柔混匀,静置5 min后,与含有质粒的OPTI培养基相互混匀,静置20 min,与消化成悬的293FT细胞混匀,加入六孔板中。培养6~8 h,移除培养基,换温浴的293FT细胞培养基。48 h后,吸取培

养基,3 000 r/min离心5 min,吸取上清分装到1.5ml离心管中,冻存到-80 $^{\circ}$ C冰箱,备用。

1.5 慢病毒感染细胞

取生长良好的人胰腺癌ASPC-1细胞,胰酶消化均匀分盘,保证每盘细胞密度在30%左右。待细胞贴壁后,慢病毒与培养基1:1混合,加入培养皿中。24 h后,移除培养基,再次感染。进行两次感染后,换含有嘌呤霉素的培养基对细胞进行筛选。筛选后的阳性细胞即可扩大培养,用于后期实验。qPCR以及Wb检测干扰效率。

1.6 MTT实验检测干扰THBS2表达对ASPC-1细胞增殖能力的影响

分别收集各组(NC组,shTHBS2-1#组及shTHBS2-2#组)细胞,制备成单细胞悬液,接种于96孔板内,每孔1 000个细胞,每组细胞设置3个重复。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养24 h,每孔加入20 μ l浓度为5 mg/ml的MTT溶液。37 $^{\circ}$ C培养2 h,吸除培养基,每孔加入200 μ l DMSO溶剂,振荡10 min使结晶物完全溶解后,使用酶标仪测量各组在560 nm波长条件下光密度(D)值,每间隔一天测量一次,以D值大小表征细胞增殖水平,绘制成生长曲线。

1.7 Transwell实验检测干扰THBS2表达对ASPC-1细胞迁移能力的影响

取各组细胞,经胰酶消化离心沉淀后,悬于新鲜的培养基中,使用血球计数板进行计数,每个小室中加入 3×10^4 个细胞,小室内加入含1%血清的培养基,下层加入含10%血清的培养基,并保持上下液面在同一高度。37 $^{\circ}$ C培养箱培养16 h后,取出小室,移除上层及下层培养基,擦除小室内细胞,PBS清洗一次。置入4%多聚甲醛溶液中固定20 min,PBS清洗两次,置于结晶紫溶液中染色30 min,PBS清洗干净后,显微镜下观察并拍照,计数穿膜细胞。

1.8 Wb实验检测干扰THBS2表达对ASPC-1细胞中部分蛋白表达的影响

胰酶消化各组细胞,离心沉淀移除上清,并使用PBS重新成悬清洗,离心沉淀细胞。向细胞沉淀中加入适量的含有1%的蛋白酶体抑制剂的RIPA裂解液,冰上裂解30 min,离心吸取上清。使用蛋白浓度测定试剂盒,测定各组蛋白浓度。每组上样40 ng,使用10% SDS-PAGE分离蛋白,将蛋白转印到PVDF膜上,将PVDF膜置于含有5%脱脂牛奶的TBST中室温封闭1 h。TBST清洗3次,加入稀释后的一抗,4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日使用TBST溶液清洗3次后,室温孵育对应种属的二抗1 h。TBST溶液清洗3次,利用成像仪采集图像。以GAPDH蛋白表达量作为内参,根据曝光所得图片灰度值计算各组蛋白相对表达量。

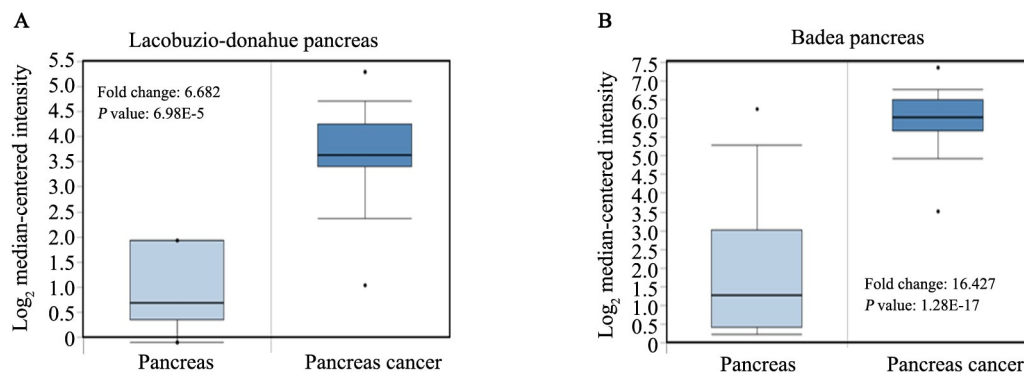
1.9 统计学处理

采用 Graphpad Prism5 软件对数据进行统计分析。所有实验均重复 3 次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 THBS2 在胰腺癌组织中高表达且对预后有不良影响

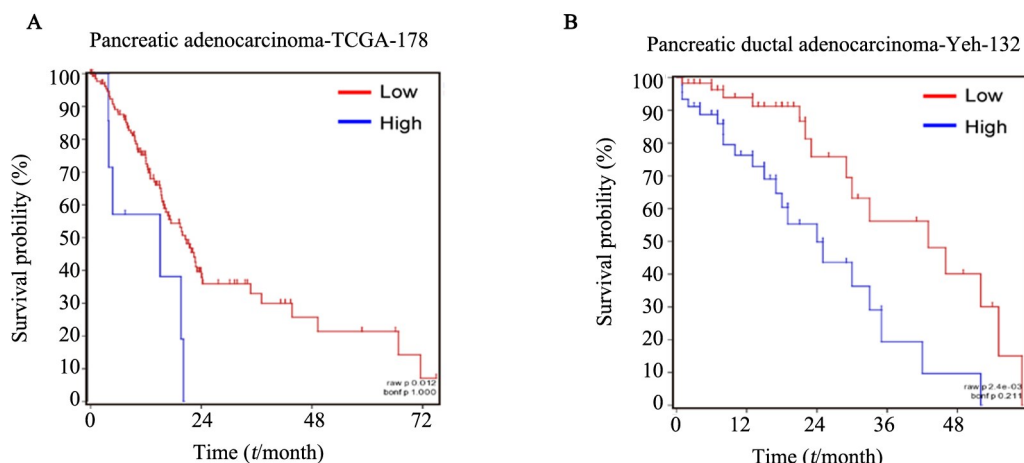
通过分析 Oncomine 数据库中 Lacobuzio-Donahue 和 Badaea 芯片数据发现, 相对于正常胰腺组织而言, THBS2 在胰腺癌组织中的表达量显著上调, 分别达到正常组织的 6.682 倍以及 16.427 倍 (均 $P < 0.01$, 图 1)。同时, 通过分析 R2 子数据库 Yeh-132 以及 TCGA-178 发现, 相对于低表达 THBS2 的胰腺癌患者而言, 高表达 THBS2 的胰腺癌患者, 同一时期的整体生存率相对较低 (图 2)。



A: THBS2 expression in Lacobuzio-Donahue pancreas; B: THBS2 expression in Badaea pancreas

图 1 THBS2 在胰腺癌组织中表达量上调

Fig.1 Expression of THBS2 was up-regulated in pancreas cancer tissue



A: Survival curve for pancreatic cancer patients in Pancreatic adenocarcinoma - TCGA - 178 database;

B: Survival curve for pancreatic cancer patients in Pancreatic ductal adenocarcinoma - Yeh - 132 database

图 2 THBS2 的表达与患者生存率负相关

Fig.2 THBS2 expression was negatively correlated with pancreatic patient survival rate

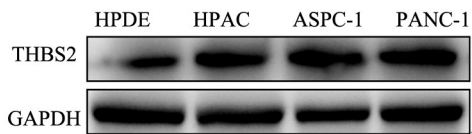
2.2 THBS2 在胰腺癌细胞系中呈高表达

Wb 检测结果 (图 3) 显示, 在 3 种胰腺癌细胞系 HPAC、ASPC-1 及 PANC-1 中, THBS2 表达均显著高于; 而在正常胰腺导管上皮细胞 HPDE (4.50 ± 0.23 、 4.79 ± 0.30 、 5.28 ± 0.18 vs 1.09 ± 0.09 , $P < 0.01$)。选取 THBS2 表达水平最高的 ASPC-1 细胞进行后续实验。

2.3 敲低 THBS2 能显著抑制 ASPC-1 细胞的增殖

在高表达 THBS2 的胰腺癌细胞系 ASPC-1 中使用 RNA 干扰技术, 敲低 THBS2 的表达。通过荧光定量 PCR 以及 WB 检测敲低效率, 结果表明所构建的两个 THBS2 敲低载体能够显著敲低 THBS2 的表达 (图 4)。通过测定 MTT 生长曲线发现, 感染第 5 天时, shTHBS2-1# 和 shTHBS2-2# 组细胞的增殖水平显著低于对照组, 说明敲低 THBS2 能够显著抑制

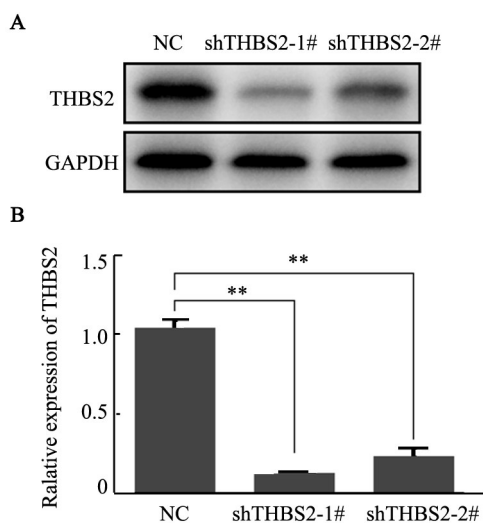
ASPC-1细胞的增殖(图5)。



The bands of proteins in Western blotting image

图3 THBS2在胰腺癌细胞系中表达量上调

Fig.3 THBS2 was up-regulated in pancreas cancer cell lines



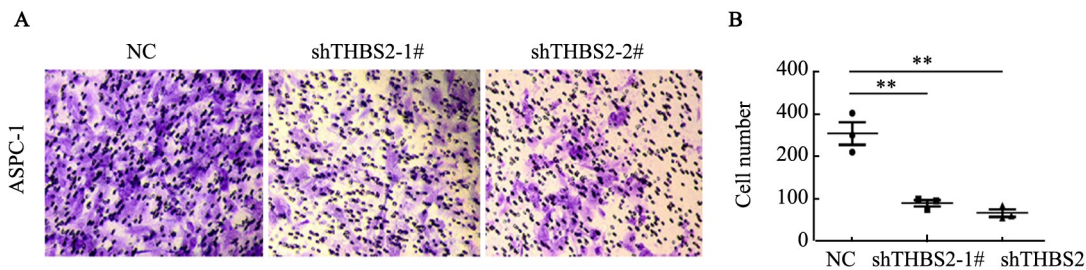
** $P < 0.01$

A: The bands of proteins in Wb image;

B: Statistical histograms of proteins

图4 THBS2干扰载体能够在ASPC-1细胞中下调THBS2的表达

Fig.4 Expression of THBS2 was down-regulated in ASPC-1 cells by THBS2 intervention vectors



** $P < 0.01$

A: Transwell cell image($\times 400$); B: Statistical histograms of cell number

图6 敲低THBS2能够抑制ASPC-1细胞的迁移能力

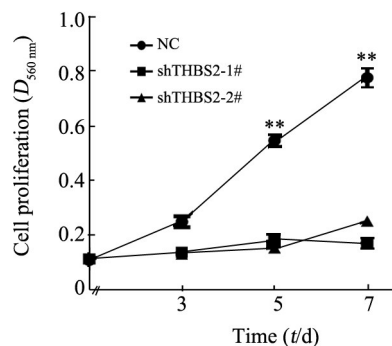
Fig.6 Knockdown of THBS2 inhibited migration of ASPC-1 cells

2.6 敲低THBS2抑制AKT信号通路相关蛋白的表达

由于AKT信号通路在细胞增殖以及迁移方面发挥着十分重要的作用。在敲低THBS2的表达之后,通过WB检测了AKT信号通路的相关蛋白AKT以及

2.4 敲低THBS2能够显著抑制ASPC-1细胞的迁移

Transwell迁移实验检测结果(图6)表明,培养16 h后,shTHBS2-1#组合shTHBS2-2#组的穿膜细胞数明显低于对照组[(89.67 \pm 10.49)、(66.33 \pm 12.66)vs (254 \pm 37.67)个,均 $P < 0.01$],说明敲低THBS2能够有效地抑制ASPC-1细胞的迁移能力。



** $P < 0.01$ vs shTHBS2-1# or shTHBS2-2# group

图5 敲低THBS2能够抑制ASPC-1细胞的增殖

Fig.5 Knockdown of THBS2 inhibited the proliferation of ASPC-1 cells

2.5 敲低THBS2能够下调ASPC-1细胞迁移相关蛋白的表达

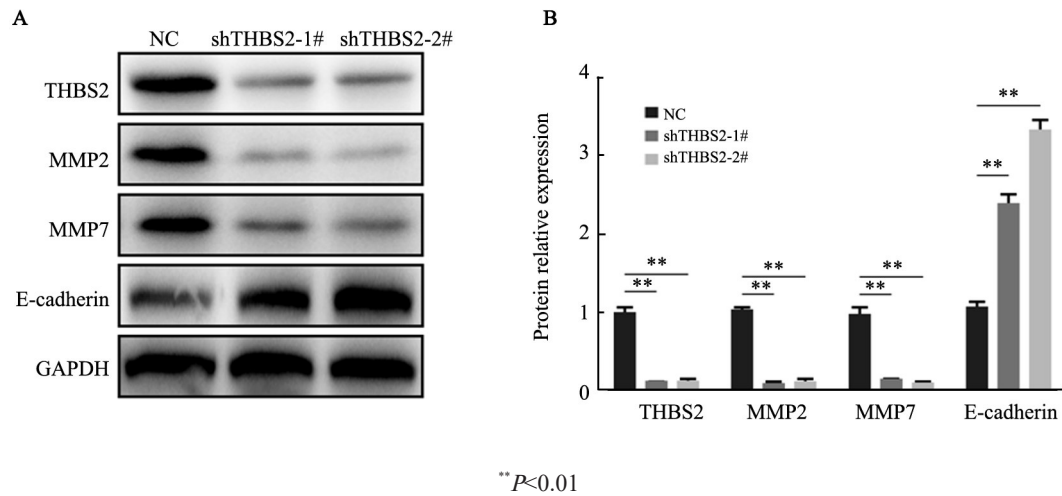
采用Wb技术检测与迁移相关的蛋白MMP2、MMP7以及E-cadherin的表达。结果表明,在敲低THBS2的表达后,MMP2以及MMP7蛋白的表达显著下调,E-Cadherin的表达显著上调(图7)。

PI3K的表达。结果(图8)表明,敲低THBS2会显著下调AKT以及PI3K的表达。以上实验结果表明THBS2可能通过调控AKT信号通路,从而调控ASPC-1的生物学行为。

3 讨论

肿瘤的特异性标志蛋白在其诊断和治疗过程中起着十分重要的作用。临床上,不仅可以通过标志蛋白表达情况评估患者的预后情况,还能针对其制定相应的治疗手段,以达到最佳的治疗效果。近年

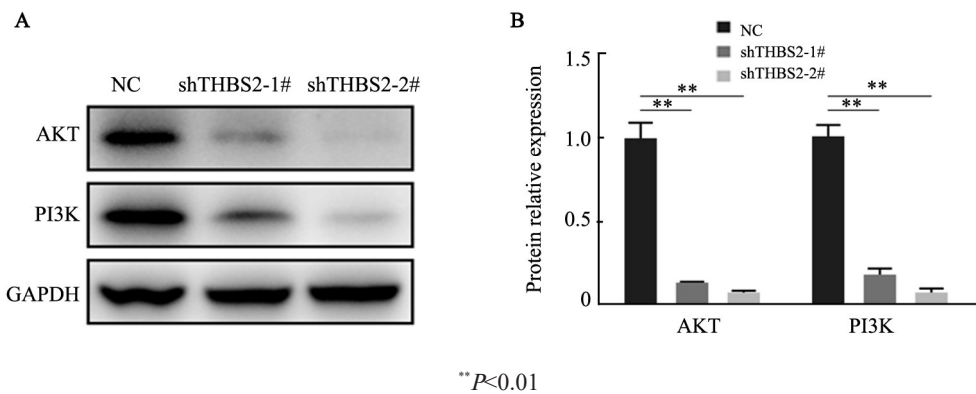
的多项研究^[11-14]发现,THBS2基因在包括结直肠癌、肺癌以及宫颈癌中高表达,并会导致病人的预后情况变差。虽然在胃癌中存在一些争议性的研究^[15-18],但THBS2基因仍有望成为多种肿瘤的标志物之一。THBS2在多种肿瘤中发挥着重要的调控作用,但其在胰腺癌中的作用有待探究。



A: The bands of proteins in Wb image; B: Statistical histograms of proteins

图7 敲低 THBS2 能够下调 MMPs 同时上调 E-钙黏蛋白的表达

Fig.7 Knockdown of THBS2 could down-regulate MMPs and up-regulate E-cadherin



A: The bands of proteins in Wb image; B: Statistical histograms of proteins

图8 敲低 THBS2 能够抑制 AKT 以及 PI3K 的表达

Fig.8 Knockdown of THBS2 inhibited the expression of AKT and PI3K

本研究首先通过 Oncomine 以及 R2 数据库分析发现,THBS2在胰腺癌组织中的表达远远高于其在正常胰腺组织中的表达,且其表达量与病人的整体生存率呈负相关关系。WB分析发现 THBS2在胰腺癌细胞系中的表达远远高于其在正常胰腺导管上皮细胞中的表达。敲低 THBS2 的表达,会显著会使细胞增殖能力以及迁移能力显著降低,以上实验表明 THBS2 可能是胰腺癌发生发展相关的一个癌基因。

肿瘤细胞的迁移能力主要受到 MMP 蛋白家族

以及钙黏蛋白的调节。其中 MMP 蛋白即基质金属蛋白酶家族,能够分解细胞外基质并且参与信号的传导,其主要参与细胞的迁移和侵袭,在多种肿瘤细胞中的表达均显著上调^[19-21]。钙黏蛋白表达的缺失,会导致肿瘤细胞的粘附能力下降,进而转移扩散到周围组织^[22-23]。本研究发现,在干扰 THBS2 后, MMP2 以及 MMP9 蛋白的表达量显著下调,而 E-钙黏蛋白的表达量则明显上调。

AKT/PI3K 信号通路参与细胞的多种生理活动。其可通过调控细胞周期蛋白以及细胞周期蛋白依耐

性激酶的表达,从而调控细胞的增殖^[24-26]。同时其能通过抑制P53的表达,从而抑制细胞凋亡^[27-28]。不仅如此,AKT/PI3K信号通路还能通过调控MMP蛋白以及钙黏蛋白的表达从而调控细胞的迁移能力^[29-31]。进一步的研究发现,THBS2的下调会导致AKT/PI3K信号通路相关蛋白AKT以及PI3K的下调,从而调节细胞的增殖以及迁移等多项生理活动。但其具体的调节过程以及方式仍待进一步探索。

本研究从生物信息数据库中临床数据分析着手,发现THBS2基因在胰腺癌中可能发挥着癌基因的功能。进一步通过实验研究发现其主要参与AKT/PI3K信号通过的调控,从而影响胰腺癌细胞的增殖以及迁移能力,为胰腺癌的靶向治疗提供了一定的理论参考。

[参 考 文 献]

- [1] VERDAGUER H, ARROYO A, MACARULLA T. New horizons in the treatment of metastatic pancreatic cancer: a review of the key biology features and the most recent advances to treat metastatic pancreatic cancer[J]. *Target Oncol*, 2018, 13(6): 691-704. DOI: 10.1007/s11523-018-0609-7.
- [2] HACKERT T, BUCHLER M W. Pancreatic cancer: advances in treatment, results and limitations[J]. *Dig Dis*, 2013, 31(1): 51-56. DOI: 10.1159/000347178.
- [3] SCHOBERT M, JAVED M A, BEYER G, et al. New advances in the treatment of metastatic pancreatic cancer[J]. *Digestion*, 2015, 92(3): 175-184. DOI: 10.1097/CCO.0b013e3283473610.
- [4] GORAL V. Pancreatic cancer: pathogenesis and diagnosis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(14): 5619-5624. DOI: 10.7314/apjcp.2015.16.14.5619.
- [5] LIN Q J, YANG F, JIN C, et al. Current status and progress of pancreatic cancer in China[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26): 7988-8003. DOI: 10.3748/wjg.v21.i26.7988.
- [6] SCLAFANI F, IYER R, CUNNINGHAM D, et al. Management of metastatic pancreatic cancer: current treatment options and potential new therapeutic targets[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 95(3): 318-336. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.03.008.
- [7] HIROSE Y, CHIBA K, KARASUGI T, et al. A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(5): 1122-1129. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.03.013.
- [8] WANG Y, FU W Q, XIE F, et al. Common polymorphisms in ITGA2, PON1 and THBS2 are associated with coronary atherosclerosis in a candidate gene association study of the Chinese Han population[J]. *J Hum Genet*, 2010, 55(8): 490-494. DOI: 10.1038/jhg.2010.53.
- [9] OGURI M, KATO K, YOKOI K, et al. Association of polymorphisms of THBS2 and HSPA8 with hypertension in Japanese individuals with chronic kidney disease[J]. *Mol Med Rep*, 2009, 2(2): 205-211. DOI: 10.3892/mmr_00000085
- [10] TSAI E A, GILBERT M A, GROCHOWSKI C M, et al. THBS2 Is a candidate modifier of liver disease severity in alagille syndrome [J]. *Cell Mol Gastroenter*, 2016, 2(5): 663-675. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2016.05.013.
- [11] FEI W Q, CHEN L, CHEN J X, et al. RBP4 and THBS2 are serum biomarkers for diagnosis of colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(54): 92254-92264. DOI: 10.18632/oncotarget.21173.
- [12] WANG X, ZHANG L, LI H, et al. THBS2 is a potential prognostic biomarker in colorectal cancer[J]. *Sci Rep-Uk*, 2016, 6: 33366. DOI: 10.1038/srep33366.
- [13] WENG T Y, WANG C Y, HUNG Y H, et al. Differential expression pattern of THBS1 and THBS2 in lung cancer: clinical outcome and a systematic-analysis of microarray databases[J/OL]. *Plos One*, 2016, 11(8) : e0161007[2018-09-01]. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0161007>. DOI: 10.1371/journal.pone.0161007.
- [14] WANG W, WEI W F, ZHOU C F, et al. Microma-221-3p, a Twist2 target, promotes cervical cancer metastasis by directly targeting THBS2[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(12): 3220[2018-09-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5870596/>. doi: 10.1038/s41419-017-0077-5.
- [15] AO R, GUAN L, WANG Y, et al. Silencing of COL1A2, COL6A3, and THBS2 inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis through the PI3k-Akt signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6): 4420-4434. DOI: 10.1002/jcb.26524.
- [16] ZHUO C J, LI X B, ZHUANG H Q, et al. Elevated THBS2, COL1A2, and SPP1 expression levels as predictors of gastric cancer prognosis[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1316-1324. DOI: 10.1159/000453184.
- [17] LIN X D, HU D, CHEN G, et al. Associations of THBS2 and THBS4 polymorphisms to gastric cancer in a Southeast Chinese population[J]. *Cancer Genet-Ny*, 2016, 209(5): 215-222. DOI: 10.1016/j.cancergen.2016.04.003.
- [18] SUN R C, WU J F, CHEN Y Y, et al. Down regulation of Thrombospondin2 predicts poor prognosis in patients with gastric cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 225[2018-09-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4189190/>. DOI: 10.1186/1476-4598-13-225.
- [19] ZHU D J, YE M, ZHANG W, et al. E6/E7 oncoproteins of high risk HPV-16 upregulate MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 and promote the migration of cervical cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 4981-4989.
- [20] YOUSEF E M, TAHIR M R, ST-PIERRE Y, et al. MMP-9 expression varies according to molecular subtypes of breast cancer[J]. *Bmc Cancer*, 2014, 14. DOI: 10.1186/1471-2407-14-609.
- [21] CASTRO-CASTRO A, MARCHESIN V, MONTEIRO P, et al. Cellular and molecular mechanisms of MT1-MMP-dependent cancer cell invasion[J]. *Annu Rev Cell Dev Bi*, 2016, 32: 555-576. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125227.
- [22] CANEL M, SERRELS A, FRAME M C, et al. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(2): 393-401. DOI: 10.1242/jcs.100115.
- [23] REPETTO O, DE PAOLI P, DE RE V, et al. Levels of soluble E-cadherin in breast, gastric, and colorectal cancers[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 408047[2018-09-02]. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/408047/>. DOI: 10.1155/2014/408047.

- [24] CALVO N, MARTIN M J, BOLAND A R, et al. Involvement of ERK1/2, p38 MAPK, and PI3K/Akt signaling pathways in the regulation of cell cycle progression by PTHrP in colon adenocarcinoma cells[J]. *Biochem Cell Biol*, 2014, 92(4): 305-315. DOI: 10.1139/bcb-2013-0106.
- [25] FU J, TIAN C C, XING M T, et al. KU004 induces G1 cell cycle arrest in human breast cancer SKBR-3 cells by modulating PI3K/Akt pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2014, 68(5): 625-630. DOI: 10.1016/j.biopha.2014.05.006.
- [26] ZOU W J, YANG S, ZHANG T, et al. Hypoxia enhances glucocorticoid-induced apoptosis and cell cycle arrest via the PI3K/Akt signaling pathway in osteoblastic cells[J]. *J Bone Miner Metab*, 2015, 33(6): 615-624. DOI: 10.1007/s00774-014-0627-1.
- [27] ABRAHAM A G, O'NEILL E. PI3K/Akt-mediated regulation of p53 in cancer[J]. *Biochem Soc T*, 2014, 42(4): 798-803. DOI: 10.1042/BST20140070.
- [28] PELLEGRINO R, CALVISI D F, NEUMANN O, et al. EEF1A2 inactivates p53 by way of PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of MDM4 in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 1886-1899. DOI: 10.1002/hep.26954.
- [29] BARBER A G, CASTILLO-MARTIN M, BONAL D M, et al. PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and desmoglein 2 in aggressive prostate cancer[J]. *Cancer Med-Uk*, 2015, 4(8): 1258-1271. DOI: 10.1002/cam4.463.
- [30] ZHANG J N, SHEMEZIS J R, MCQUINN E R, et al. AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development[J]. *Neural Dev*, 2013, 8. DOI: 10.1186/1749-8104-8-7.
- [31] BROUXHON S M, KYRKANIDES S, TENG X, et al. Soluble E-cadherin: a critical oncogene modulating receptor tyrosine kinases, MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling[J]. *Oncogene*, 2014, 33(2): 225-235. DOI: 10.1038/onc.2012.563.

[收稿日期] 2018-09-10

[修回日期] 2019-02-16

[本文编辑] 黄静怡