

程序性细胞死亡 6 对促进卵巢癌细胞增殖和转移作用的效应分子研究

徐海燕¹, 泮晓丹¹, 应莉莎^{1,2}, 吴军舟^{1,2}, 张平^{1,2}, 苏丹^{1,2}

(1. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022; 2. 浙江省肿瘤研究所, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] *PDCD6* 是一种程序性细胞死亡基因。近年来, 已有不少研究证明 *PDCD6* 在一定程度上可以促进卵巢癌细胞的增殖和迁移。然而, 它的确切分子机制还有待进一步验证。[方法] 利用慢病毒 shRNA 敲除 HO-8910PM 的 *PDCD6* 水平, 以空载体作为阴性对照。提取两组细胞的总 RNA, 用于 Allumila 基因芯片分析, 每组实验重复 2 次, 并用荧光定量 PCR 验证表达有差异的基因。[结果] 基因芯片结果表明, *PDCD6* 敲除后共有 133 个基因表达有显著差异。其中, 101 个基因表达下调, 32 个基因表达上调。基因功能分析显示它们分别与细胞凋亡、增殖、周期、迁移和血管生成等有关。信号通路富集度显示 MAPK 信号通路激活, 主要激活的基因有 *FGFR*、*MAP2K1/MEK1*、*MAP2K2/MEK2*、*MYC*、*FOS*。RT-PCR 验证结果显示, *PDCD6* 敲除后 *CCND1*、*MYC*、*ANGPTL4*、*BMP2*、*CXCL16* 基因 mRNA 的表达比对照组明显下调, 与基因芯片的结果相同。[结论] *PDCD6* 可能通过上调 *CCND1*、*MYC*、*ANGPT4*、*BMP2* 和 *CXCL16* 基因, 激活 MAPK 信号通路, 从而促进卵巢癌细胞的增殖和转移。

关键词: *PDCD6*; 卵巢肿瘤; 增殖; 转移; MAPK 信号通路

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2015)02-0113-10

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.02.B009

Effector Molecules of PDCD6 Promote the Proliferation and Metastasis in Ovarian Cancer Cell

XU Hai-yan¹, PAN Xiao-dan¹, YING Li-sha^{1,2}, et al.

(1. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2. Zhejiang Cancer Institute, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] *PDCD6* is the abbreviation of programmed cell death 6. In recent studies it has been shown that *PDCD6* can promote the proliferation and migration of ovarian cancer cells in a certain extent. However, its exact further molecular mechanism needs further research. [Methods] According to the previous experimental results, HO-8910PM cells treated with pGC-SIL-GFP-shRNA-*PDCD6* virus solution (MOI2) for 72h as the experimental group, and HO-8910PM cells treated with pGC-SIL-GFP-shRNA-mock virus solution (MOI2) as the control group. Then, total RNA of HO-8910PM cells was extracted, amplified cRNA marked biotin, which allomixis with Illumina chip to scan, and analyzed by Illumina bead studio application software and DAVID database. Experiment was repeated twice. Several significant different expression genes were screened which related to tumor cells proliferation, apoptosis and migration, and verified by RT-PCR. [Results] Gene chip suggested that there was a clear difference in 133 genes (diffscore less than -13 or greater than 13), in detail, expression of 101 genes downregulated and expression of 32 genes upregulated. Gene function analysis revealed they correlated with apoptosis, proliferation, cycle, migration, angiogenesis and so on. Signaling pathway enrichment analysis showed that the classic MAP kinase pathway (ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase) had been activated. The main activated genes included *FGFR*, *MAP2K1/MEK1*, *MAP2K2/MEK2*, *MYC* and *FOS*. RT-PCR results showed that the mRNA expressions of *CCND1*, *MYC*, *ANGPTL4*, *BMP2* and *CXCL16* were significantly lower than those in control group, which the result was similar as the chip's. [Conclusion] *PDCD6* might promote ovarian cancer cell proliferation and metastasis by upregulating the *CCND1*, *MYC*, *ANGPT4*, *BMP2* and *CXCL16* gene expression through the MAPK signaling pathway.

Subject words: *PDCD6*; ovarian neoplasms; proliferation; metastasis; MAPK signal pathway

卵巢癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一,

发病率仅次于宫颈癌和宫体癌, 列居第 3 位, 但死亡率却占妇科肿瘤的首位^[1]。随着医疗技术的不断发展, 卵巢癌的治疗方案也有了很大的改进, 如卵巢癌根治术、紫杉醇和铂类的联合化疗等^[2]。尽管这些治

基金项目: 国家自然科学基金项目(81101986); 浙江省自然科学基金项目(Y2111317)

通讯作者: 苏丹, 研究员, 博士; 浙江省肿瘤医院, 浙江省肿瘤研究所, 浙江省杭州市拱墅区半山桥广济路 38 号(310022); E-mail: sudan@zjcc.org.cn

收稿日期: 2014-10-29; **修回日期:** 2015-01-11

疗可以提高患者短期的生活质量,但死亡率仍高居不下^[3],患者5年生存率仅为35%^[4]。

卵巢癌的死亡多数由于复发和转移。近年来,随着分子生物学技术的快速发展,很多学者对卵巢癌的发病机制进行了广泛的研究,肿瘤细胞获得间充质表型(EMT)的过程是其能够转移的分子基础,之后能够不断增殖不仅取决于肿瘤细胞表观遗传学的改变,也取决于它与周围微环境的相互作用。肿瘤细胞的转移、增殖、凋亡、分化是多阶段、多基因参与的过程,包括癌基因的激活以及抑癌基因的失活^[5-7]。其相关基因的调节都涉及复杂的机制和多条信号通路。所以筛选相关基因仍是我们探索肿瘤发病分子机制的首要任务。

本课题组在前期研究中成功构建了2株卵巢癌细胞株,分别为人卵巢癌细胞系HO-8910和高转移人卵巢癌细胞系HO-8910PM^[8,9]。通过蛋白表达谱技术分析发现,其中有17个基因表达差异显著,程序性细胞死亡蛋白PDCD6差异最显著。课题组又通过构建PDCD6 RNAi慢病毒载体,对高表达PDCD6的HO-8910PM细胞进行PDCD6基因沉默,发现PDCD6在一定程度上能促进卵巢癌细胞的增殖和迁移^[4]。临床随访资料还提示PDCD6中高表达患者中位无疾病进展生存时间明显少于PDCD6低表达患者,复发风险增加,是卵巢癌患者复发的独立预后预测因子^[4]。然而,这种表型的分子机制并不清楚。因此,我们使用了Illumina Bead Array来筛选PDCD6作用的效应基因以及相关的信息传导通路,从分子水平深入阐述PDCD6在卵巢癌中所扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 细胞株

高转移卵巢癌细胞株HO-8910PM(浙江省肿瘤医院)。

1.2 主要仪器设备

杂交箱(Illumina公司)、杂交舱(Hybex公司)、

S-200 纯化柱(Illumina公司)、真空浓缩仪(Scanvac公司)、杂交盖玻片(Illumina公司)、芯片扫描仪(Illumina公司)、蛋白核酸微量检测仪(NanoDrop公司)、冻干机FD5-4B(SIM西盟公司)、7500 荧光定量PCR仪(ABI公司)、S1000 梯度PCR仪(Bio-Rad公司)、低温冰箱(三洋)、低温高速离心机HER-AEOS1.0 R(德国贺力氏公司)、低速台式自动平衡离心机LDZ5-2型(雷勃尔公司)、空气恒温振荡器(博珍公司)、电热恒温干燥箱(亿能公司)、电热恒温水槽DKB-8A(精宏公司)。

1.3 主要试剂

Illumina Bead Array、Illumina® TotalPrep RNA 扩增试剂盒、Illumina 人全基因组表达谱芯片杂交试剂盒、TRIzol 裂解液、异丙醇、氯仿、75%乙醇(RNase-free)、无水乙醇、Milli-Q 水(RNase-free)、总RNA提取试剂盒(RNeasy Mini Kit, Qiagen)、逆转录试剂盒(SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen)、PCR 试剂盒(Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with Rox, Invitrogen)。

1.4 PCR 引物序列(Table 1)

Table 1 Sequence of primers

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
PDCD6	TGACCAGTTCCACGACATCCTCAT	TGGCTCTTTCCATGTTGTGCTGC
CCND1	TGGAGGTCTGCGAGGAACA	GCAGGCGGCTCTTTTTCAC
MYC	CCTGGTGCTCCATGAGGAGA	CTCCAGCAGAAGGTGATCCAGA
ANGPTL4	TCCGCAGGGACAAGAAGCTG	GGCCGTTGAGGTTGGAATG
BMP2	GGAACGGACATTCGGTCCT	GGAAGCAGCAACGCTAGAAG
CD44	GAGCAAACACAACCTCTGGTCCTA	GACTGCAATGCAAACTGCAAGAA
TGM2	CCCAGCAGGGCTTTATCTACCA	GCAGATGTCTAGGATCCCATCTTCA
CXCL16	TGGCCATCATCTTCATCCTCA	CAGGTATTAGAGTCAGGTGCCACAG

1.5 实验方法

1.5.1 细胞培养

HO-8910 和 HO-8910PM 细胞在含 10% 太牛血清的 RPMI-1640 培养基内,5%CO₂、37℃恒温培养箱中常规培养,将生长状态良好、70%~80%密度的细胞进行传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.5.2 细胞收集及总 RNA 提取

HO-8910PM 细胞在 1640 培养液中贴壁生长,当融合度为 30%~50%时分别用 pGCSIL-GFP-shRNA-PDCD6 和 pGCSIL-GFP-shRNA-mock 病毒液(MOI2)感染 HO-8910PM 细胞,72h 后去除 1640 培

养液。每瓶细胞加 2ml TRIzol, 转移到 RNase-free 的试管中, 用一次性注射器进行反复抽打直至形成清亮不粘稠的液体。将清亮不粘稠的液体转移至 15ml 离心管中, 于 4℃、12 000g 离心 10min。小心吸取上清液转入新的 15ml 离心管, 在 15℃~30℃放置 5min。加入氯仿, 盖紧离心管盖, 用力震荡离心管, 在 15℃~30℃放置 3min。4℃、12 000g 离心 15min。小心地取出离心管, 吸取上清至另一 15ml 离心管。向上清加入异丙醇, 轻轻颠倒离心管充分混匀液体, 在 15℃~30℃放置 10min。4℃、12 000g 离心 10min。弃去上清, 缓慢地沿管壁加入 75%乙醇 5ml, 轻轻颠倒洗涤离心管管壁, 小心弃去乙醇。再加入 75%乙醇 10ml, 在涡旋器上短暂涡旋; 于 4℃、8 000g 离心 10min。小心弃上清, 短暂离心, 用移液枪吸去所有上清, 在超净工作台中干燥沉淀 5min。加入 RNase-free 的 Milli-Q 水完全溶解 RNA 沉淀后, -80℃保存。

1.5.3 探针标记(以下在冰浴中进行)

于一已灭菌的 1.5ml Eppendorf 管内依次加入以下试剂(反应终体积为 50μl, 以下试剂均为 RNase-free): ddH₂O 23μl, 逆转录引物 5μl, 总 RNA 50~100μg, 振荡混匀, 置于 70℃水浴 10min。取出后, 迅速置于冰上。分别加入以下试剂: 逆转录酶缓冲液 10μl, DTT 5μl, dNTPs 4μl。而后在暗室中加入以下试剂: 逆转录酶 2μl, Cy5-dCTP 或 Cy3-dCTP 3μl。用手指弹打管壁以混匀样品, 手浴 2min。将 Eppendorf 管置于 42℃水浴 2h。依次在 Eppendorf 管中加入标记试剂 I 4μl, 65℃水浴 10min 后加入标记试剂 II 4μl。混匀, 合并对照组和实验组。避光, 真空抽干至 50μl 左右。使用 DNA 纯化柱(或乙醇沉淀)纯化 DNA。将柱体在漩涡混合器上剧烈振荡摇匀, 悬浮内溶的树脂。将柱顶端的小帽旋松四分之一圈, 掰断柱下端的密封头。将柱置于一个 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 以 3 000rpm 离心 1min 将柱置于另一个新的 1.5ml Eppendorf 管中, 去掉顶端的帽, 将样品慢慢加到树脂上表面的中间, 注意不要搅动柱体。以 3 000rpm 离心 2min, 经纯化的样品流出, 被收集在支持用的 Eppendorf 管中。加入标记试剂 III 8μl, 真空抽干。

1.5.4 预杂交

配制预杂交液: 杂交试剂 1 加入到 Eppendorf 管中, 振荡混匀后, 加入杂交试剂 2 混匀。将配制好的预杂交液放入 95℃水浴锅内变性 2min, 将待预杂

交的玻片放入 95℃水浴锅内变性 30s, 玻片取出后即放入无水乙醇中 30s, 晾干。将已变性的预杂交液加到玻片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42℃预杂交 5~6h。

1.5.5 杂交及洗片

在抽干的探针管中加 6.5μl 杂交试剂 I, 充分混匀, 使探针溶解。再加入 6.5μl 杂交试剂 II, 混匀备用。将预杂交的玻片取出, 用 ddH₂O 冲洗。将探针置于 95℃水浴中变性 2min; 玻片置于 95℃水浴中变性 30s, 玻片取出浸无水乙醇 30s, 探针取出后迅速置于冰上。将标记好的 cDNA 杂交体系置于芯片上, 置于杂交舱 58℃杂交箱内杂交过夜(14~20h)。室温孵育过夜, 高温洗涤(58℃E1BC 洗液洗涤杂交后芯片 1h), 干燥。

1.5.6 扫描数据读取

用 Illumina iscan 扫描仪对芯片进行数据读取扫描, 选取合适的扫描速度, 软件自动分析各个微珠的信号强度输出为对应数值。通过位于芯片不同地方约 20~30 个重复微珠上面的相同地址序列解码综合得到各个基因的探针的信号强度。去除坏点及灰尘、微气泡等干扰的信号微珠点。

1.5.7 生物信息学分析

所有数据用 Illumina beadstudio application 分析软件进行分析。本实验选择的归一化方法为平均法, 通过芯片图像分析软件对芯片灰度扫描图进行分析, 可以得到芯片上每个基因点的原始信号值, 即所有有效重复点的前景信号值减去背景信号值的平均信号值(Avg_Signal), 得出 P 值和差异分数(Diff-score)。Diffscore 是由 P 值转换而来的, 提供一个方向性。P 值是由实验组和对照组的平均信号差异所产生。具体计算公式如下: $\text{Diffscore} = 10 \times \text{sgn}(\mu_{\text{ref}} - \mu_{\text{cond}}) \times \log_{10}(p)$ 。当 P 值为 0.05, Diffscore=±13; P 值为 0.01, Diffscore=±20; P 值为 0.001, Diffscore=±30。实验组与对照组其中任何一组为有效基因($P < 0.05$), 且实验组样本 Diffscore 小于 -13 或大于 13 即为差异基因。

将差异基因提交到 DAVID 数据库 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), 对差异基因进行功能分类和通路研究。

1.5.8 RT-PCR 验证

抽提总 RNA(方法参见 1.5.2), 配置逆转录反应体系(按试剂盒说明操作), 反应条件: 37℃ 15min, 85℃ 5s。实时荧光定量 PCR 扩增按试剂盒说明操作

进行, 反应条件: 95℃ 2min, 95℃ 30s, 57℃ 40s (40个循环)。

1.5.9 统计学处理

实验组和对照组的数据用均数±标准差表示, 均数之间的差异用 *t* 检验。以磷酸甘油醛脱氢酶 (*GAPDH*) 为内参对照, 基因的相对含量分别按照公式 $[1-2^{(-\Delta\Delta C_t)}] \times 100\%$ 计算。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义, SPSS16.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 PDCD6 效应分子和信号通路的筛选

以 siRNA-PDCD6 转染 HO-8910PM 细胞株作为实验组, 空载体转染株作为对照组, 感染 72h 后 Allumila 芯片结果显示, 在 2 次实验中具有重复性变化趋势的基因共有 133 个, Diffscore 小于 -13 或大于 13。其中, 101 个基因随着 *PDCD6* 表达受干扰而下调, 32 个基因表达上调。16 个基因差异最具有显著性 (Diffscore 小于 -30 或大于 30, P 值为 0.001), 它们是 *ANGPTL4* (血管生成素相关蛋白 4)、*IER3* (早反应基因 3)、*CCND1* (周期素 D1)、*PDCD6*、*CNIH* (cornichon 类似分子)、*BMP2* (骨形态发生蛋白 2)、*TGM2* (组织转谷氨酰胺酶 2C 多肽)、*SAA1* (血清淀粉样蛋白 A1)、*TRIM31* (含三联基元 31)、*MYC* (c-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog)、*CD44* (吞噬细胞膜糖蛋白)、*CXCL16* (趋化因子配体 16)、*C3orf34* (chromosome 3 open reading frame 34, 染色体 3 开放阅读框 34/CEP19)、*CAT* (催化酶)、*TNFRSF12A* (肿瘤坏死因子配体超家族成员 12A)、*METTL21A* (甲基化转移酶样 21A)、*ENO2* (烯醇酶 2) (Table 2)。

基因功能分析显示在 133 个差异基因中, 有 15 个基因与细胞增殖、细胞周期和凋亡相关, 分别为 *WNT5A* (wingless-type MMTV integration site family, member 5A, 无翼型 MMTV 整合位点家族 5A)、*E2F3* (E2F transcription factor 3, E2F 转录因子 3)、*BMP2*、*FGFR3* (成纤维细胞生长因子受体 3)、*MAP2K1* (mitogen-activated protein kinase kinase 1 促分裂素原活化蛋白激酶激酶 1, MEK1)、*PSA* (前列腺特异抗原)、*MAP2K2* (mitogen-activated protein kinase kinase 2 促分裂素原活化蛋白激酶激酶 2/MEK2)、*FOS*、*LAMB3*

(层粘连蛋白, beta 3)、*CCND1*、*CDKN1A* (周期素依赖性蛋白激酶抑制因子 1A/p21)、*HIF1A* (缺氧诱导因子 1α)、*TGFA* (转化生长因子 α)、*CRK* (结合物蛋白)、*MYC*, 除了 *CDKN1A* (P21) 基因表达上调外, 其他基因均随 *PDCD6* 的干扰而下调。有 12 个基因与细胞迁移相关, 它们分别为 *CD24*、*CD44*、*CXCL16*、*CTGF* (结缔组织生长因子)、*GPX1* (谷胱甘肽过氧化物酶 1)、*HIF1A*、*ITGA5* (整合素 α5)、*SCARB1* (B 类清道夫受体 I)、*SAA1*、*SDCBP* (黏结蛋白聚糖)、*TNFRSF12A*、*BMP2*; 有 12 个基因与血管生成相关, 分别为 *ANGPTL4*、*CD44*、*HIF1A*、*TGM2*、*TNFRSF12A*、*CDH5* (cadherin 5, type 2, vascular endothelium, 血管内皮钙黏蛋白 5/CD144)、*CTGF*、*GPX1*、*HMOX1* (血红素氧化酶 1)、*PLCD3* (phospholipase C, delta 1, 磷酸肌醇磷脂酶 C-delta-1)、*POFUT1* (蛋白 O 岩藻糖转移酶 1)、*TGFA*。

信号通路富集度分析显示, MAPK (丝裂酶原活化蛋白激酶) 信号通路显著富集, 主要涉及经典的 MAP 激酶通路 (ERK1/2, 细胞外信号调节激酶), 提示 *PDCD6* 与 MAPK 信号通路关系密切。主要激活的基因有: *FGFR*、*MAP2K1/MEK1*、*MAP2K2/MEK2*、*MYC*、*FOS* (Figure 1)。

2.2 差异基因的 RT-PCR 验证

为了进一步验证芯片的结果, 我们选择了表达差异非常显著, 而且与肿瘤增殖、转移关系比较明确的基因进行 RT-PCR, 具体基因如下: *PDCD6*、*CCND1*、*MYC*、*ANGPTL4*、*BMP2*、*CXCL16*、*CD44* 和 *TGM2*, *GAPDH* 为管家基因。

PDCD6 表达干扰 72h 后, RT-PCR 结果显示实验组 *PDCD6*、*CCND1*、*MYC*、*ANGPTL4*、*BMP2*、*CXCL16* 基因 mRNA 的表达比对照组明显下调, 下调的倍数分别为 0.42、0.80、0.81、0.45、0.52 和 0.63, 与基因芯片的结果相同; *CD44* mRNA 的表达在 *PDCD6* 干扰前后基本一致, 与芯片结果不一致; *TGM2* 基因 mRNA 的表达相比对照组却明显上调, 表达指数倍数是对照组的 1.94 倍, 与芯片结果相反 (Figure 2)。

3 讨论

我们的结果显示干扰 *PDCD6* 后有 133 个基因表达随之改变, 而且 *PDCD6* 与 MAPK 信号通路相

Table 2 The differentially expressed genes compared with control group after PDCD6 silenced in HO-8910PM

Serial number	Gene	Average signal value		Differences scores (Experiment group/Control group)
		Experiment group	Control group	
NM_139314.1	<i>ANGPTL4</i>	1034.462	246.3375	-111.4391
NM_052815.1	<i>IER3</i>	1426.125	480.125	-103.8709
NM_053056.1	<i>CCND1</i>	2570.02	845.5538	-80.08738
NM_013232.2	<i>PDCD6</i>	6089.99	2840.414	-65.38726
NM_005776.2	<i>CNIH</i>	1642.149	675.2861	-55.47298
NM_001200.1	<i>BMP2</i>	2417.639	1118.493	-54.03774
NM_004613.2	<i>TGM2</i>	1570.589	760.3033	-50.75299
NM_199161.1	<i>SAA1</i>	578.8144	223.2638	-49.94543
NM_007028.3	<i>TRIM31</i>	279.3001	34.11269	-46.33543
NM_002467.3	<i>MYC/CA125</i>	1453.051	844.9333	-40.76341
NM_001001390.1	<i>CD44</i>	1710.771	945.7335	-40.67012
NM_022059.1	<i>CXCL16</i>	1673.474	927.6967	-40.62125
NM_032898.2	<i>C3orf34</i>	1378.46	772.7425	-35.36158
NM_001752.2	<i>CAT</i>	1208.205	666.8956	-32.74743
NM_016639.1	<i>TNFRSF12A</i>	549.7074	267.1208	-31.55627
NM_145280.3	<i>METTL21A</i>	1317.675	744.7003	-30.14152
NM_005628.1	<i>SLC1A5</i>	520.6897	248.1757	-29.65014
NM_000499.2	<i>CYP1A1</i>	281.1758	82.82457	-28.11267
NM_080388.1	<i>S100A16</i>	899.0504	535.6234	-27.05424
NM_013230.2	<i>CD24</i>	325.7531	135.1721	-26.60909
NM_024334.1	<i>TMEM43</i>	1393.907	851.6302	-25.61006
NM_032164.2	<i>ZNF394</i>	881.1885	494.9174	-25.27573
NM_133373.2	<i>PLCD3</i>	648.6524	330.405	-24.53148
NM_001024809.2	<i>RARA</i>	1050.448	616.4756	-24.28714
XR_037953.1	<i>KRT18P17</i>	996.4095	609.7003	-24.18359
NM_080876.2	<i>DUSP19</i>	969.0093	612.3988	-23.75255
NM_018092.3	<i>NETO2</i>	573.2176	323.1963	-23.30955
NM_004036.2	<i>ADCY3</i>	2076.012	1298.872	-23.05353
NM_001003796.1	<i>NHP2L1</i>	1202.616	790.0913	-23.03301
XM_001726959.1	<i>KRT18P13</i>	9934.081	6395.995	-22.94428
NM_014033.2	<i>METTL7A</i>	762.6922	453.1979	-22.85102
NM_018319.3	<i>TDP1</i>	475.701	255.7177	-22.2489
NM_022170.1	<i>EIF4H</i>	2599.503	1752	-22.1551
NM_001001414.1	<i>NCCRP1</i>	252.5643	104.7152	-21.69776
NR_002196.1	<i>H19</i>	13574.31	8029.214	-21.58005
NM_021991.1	<i>JUP</i>	3167.009	1982.252	-21.41373
NM_001251.1	<i>CD68</i>	1033.236	670.0057	-20.01693
NM_017582.5	<i>UBE2Q1</i>	419.0345	229.0511	-19.87095
NM_016533.4	<i>NINJ2</i>	1025.171	684.3736	-19.80651
NM_000228.2	<i>LAMB3</i>	450.9892	267.0638	-19.79486
NM_001001561.1	<i>GGA1</i>	12967.59	9338.218	-19.72621
NM_004454.1	<i>ETV5</i>	112.4884	-8.64805	-19.62802
NM_024640.3	<i>YRDC</i>	957.3332	564.6428	-19.56876
NM_001901.1	<i>CTGF</i>	263.5352	113.5575	-19.358
NM_001531.1	<i>MRI</i>	464.5917	269.8267	-18.92911
NM_003201.1	<i>TFAM</i>	2314.47	1573.655	-18.86117

关。在 133 个差异表达基因中,15 个表达差异非常显著,包括 *ANGPTL4*、*IER3*、*CCND1*、*CNIH*、*BMP2*、*TGM2*、*MYC*、*SAA1*、*TRIM31*、*CD44*、*CXCL16*、*C3orf34*、*CAT*、*TNFRSF12A* 和 *METTL21A*,它们随着 *PDCD6* 表达下调而下调,而 *ENO2* 基因则随着 *PDCD6* 表达上调而上调。在这些基因中有 2 个与细胞周期和增殖密切相关(*CCND1*、*MYC*),有 7 个与细胞血管生成相关、迁移和侵袭相关(*ANGPTL4*、*TGM2*、*CD44*、*CXCL16*、*SAA1*、*TNFRSF12A* 和 *BMP2*),其中 *CCND1*、*MYC*、*ANGPTL4*、*BMP2* 和 *CXCL16* 在后期的 RT-PCR 实验中得到了证实。

周期蛋白(Cyclin)是一类呈细胞周期特异性或时相性表达、累积与分解的蛋白质,它与周期素依赖性激酶(CDK)共同影响细胞周期的运行。CyclinD 是 G₁/S 检测点调控的周期蛋白,有 3 个家族成员 D1、D2 和 D3,分别由 *CCND1*、*CCND2* 和 *CCND3* 基因编码,与 CDK4 或 CDK6 相互作用在细胞周期转化中扮演着非常重要的角色。当生长因子刺激时,通过瀑布式的信号传导途径,激活相应的转录因子,CyclinD 的表达大量增加,与 CDK4/CDK6 形成复合物,促使细胞迅速通过 G₁/S 检测点,细胞周期进展加快^[10,11]。我们的结果显示,在 *PDCD6* 高表达的卵巢癌细胞株,MAPK 信号通路激活,FGFR、MAP2K1/MEK1、MAP2K2/MEK2、MYC、FOS 相继被激活,转录增加,CCND1/CyclinD 表达大量增加,同时细胞周期依赖性蛋白激酶抑制物,如 P21 转录下调,CDK4/CDK6 激活,CyclinD-CDK4/CDK6 复合物形成。这部分

Table 2 The differentially expressed genes compared with control group after *PDCD6* silenced in HO-8910PM (Continued)

Serial number	Gene	Average signal value		Differences scores (Experiment group/Control group)
		Experiment group	Control group	
NM_001795.2	<i>CDH5</i>	235.9467	98.19299	-18.85672
NM_016823.2	<i>CRK</i>	1102.115	746.7683	-18.77768
NR_031742.1	<i>MIR1978</i>	2930.943	2037.721	-18.51421
NM_015352.1	<i>POFUT1</i>	2454.745	1687.256	-18.27818
NM_017906.2	<i>PAK1IP1</i>	1092.484	708.3932	-18.21371
NM_016183.2	<i>MRT04</i>	652.0524	427.4853	-18.18259
NM_201397.1	<i>GPX1</i>	10251.96	7045.499	-18.13597
NM_022451.9	<i>NOC3L</i>	734.1854	471.8804	-17.72087
NR_002808.1	<i>C14orf85</i>	1755.77	1231.928	-17.68495
NM_024662.1	<i>NAT10</i>	1301.785	915.5983	-17.573
NM_005505.3	<i>SCARB1</i>	1801.221	1210.087	-17.34048
NM_130442.1	<i>ELMO1</i>	177.9995	53.09619	-17.31528
NM_001949.2	<i>E2F3</i>	1421.321	987.0049	-17.30713
NM_000142.2	<i>FGFR3</i>	946.9206	631.4112	-17.29679
NM_152361.1	<i>EID2B</i>	1145.808	789.6635	-17.28925
NM_018093.1	<i>WDR74</i>	861.2834	583.8714	-17.23746
NM_015934.3	<i>NOP58</i>	1544.343	1066.659	-17.0145
NM_001530.2	<i>HIF1A</i>	767.7274	475.0567	-16.99824
NM_032993.1	<i>NOLA1</i>	298.7109	145.425	-16.96316
NM_030662.2	<i>MAP2K2(MEK2)</i>	514.541	291.498	-16.95387
NM_178812.2	<i>MTDH</i>	624.8364	398.4724	-16.90845
NM_015938.2	<i>NMD3</i>	486.3738	275.8356	-16.7964
NM_006415.2	<i>SPTLC1</i>	1296.416	916.6986	-16.7416
NM_016065.3	<i>MRPS16</i>	1325.138	961.5605	-16.50473
NM_016391.4	<i>NOPI6</i>	936.7244	666.9417	-16.27755
NM_002755.2	<i>MAP2K1(MEK1)</i>	1452.319	1022.209	-16.18122
NM_004105.2	<i>EFEMP1</i>	680.299	454.912	-16.02818
NM_019080.1	<i>NDFIP2</i>	1981.838	1368.33	-15.87723
NM_078467.1	<i>CDKN1A</i>	6135.865	4547.488	-15.80691
NM_002455.2	<i>MTX1</i>	490.143	295.7341	-15.57279
NM_002133.1	<i>HMOX1</i>	1289.221	886.0775	-15.18813
NM_018622.5	<i>PARL</i>	804.7455	542.9575	-15.16901
NM_017755.4	<i>NSUN2</i>	4217.715	3075.563	-15.04739
NM_002467.3	<i>MYC</i>	2460.043	1799.757	-14.69337
NM_015938.2	<i>NMD3</i>	1037.121	723.0273	-14.66267
NM_138793.2	<i>CANT1</i>	403.0837	241.9855	-14.64081
NM_003236.1	<i>TGFA</i>	112.5479	9.824286	-14.59914
NM_001760.2	<i>CCND3</i>	4975.393	3652.892	-14.55421
NM_005252.2	<i>FOS</i>	151.6271	45.51	-14.42676
NM_006412.3	<i>AGPAT2</i>	373.2307	229.7987	-14.28004
NM_021101.3	<i>CLDN1</i>	78.49556	-17.16948	-14.23807
NM_020170.3	<i>NCLN</i>	1282.119	939.0483	-14.21722
NM_003952.2	<i>RPS6KB2</i>	349.7201	213.3605	-14.18786
NM_000698.2	<i>ALOX5</i>	431.6496	275.0006	-14.13664
NM_001031727.1	<i>MRII</i>	233.5494	116.8361	-14.06759
NM_033363.1	<i>MRPS12</i>	1077.905	778.1889	-14.04266

的结果支持了我们第一部分细胞实验的结果, *PDCD6* 促进细胞增殖, *PDCD6* 干扰后细胞被阻滞在 G₂/M 期的分子机制与 *MYC* 和 *CCND1* 的转录水平密切相关。

ANGPTL4、*BMP2* 和 *CXCL16* 是 *PDCD6* 干扰后表达差异非常显著的, 与肿瘤转移密切相关的基因。其中 *ANGPTL4* 是差异表达最明显的基因。*ANGPTL4* 最初被称为肝纤维蛋白原/血管生成素相关蛋白(HFARP)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 血管生成相关基因(PGAR)或禁食诱导脂肪因子(FIAF)。它是一种结构上属于血管生成素家族的分泌性糖蛋白^[12], 在乏氧和核激素受体过氧化物酶体增殖物激活的情况下表达增加^[13]。关于 *ANGPTL4* 的功能, 研究得最多的是其在调节血糖、血脂代谢中的作用^[14,15]。但近年来许多研究表明, *ANGPTL4* 不仅仅参与糖、脂的代谢, 参与上皮细胞分化^[16], 通过与整合素 beta1 结合, 激活 FAK-Src-PAK1 信号通路, 促进细胞的迁移^[17,18], 而且还在肿瘤细胞增殖和转移的过程中扮演着重要的角色^[19]。最新的文献表明 *ANGPTL4* 通过整合素信号通路破坏血管连接处的完整性, 改变血管内皮通透性, 促进转移。*ANGPTL4* 直接与整合素 $\alpha 5\beta 1$ (integrin $\alpha 5\beta 1$) 结合, 激活 integrin $\alpha 5\beta 1$ 介导的 Rac1/PAK 信号通路, 削弱了细胞—细胞间的连接。同时, 与分簇的 VE-钙黏素 (VE-cadherin) 和水闸蛋白 5 (claudin-5) 相互作用, 导致内皮的破坏^[20]。在乏氧的情况下, 前列素 E2(PGE2)可诱导 *ANGPTL4* 在结直肠癌细胞株中表达。

Table 2 The differentially expressed genes compared with control group after *PDCD6* silenced in HO-8910PM (Continued)

Serial number	Gene	Average signal value		Differences scores (Experiment group/Control group)
		Experiment group	Control group	
NM_020378.2	<i>NAT14</i>	253.219	134.7518	-14.02529
NM_005966.3	<i>NAB1</i>	348.4958	206.1084	-14.00626
NM_006000.1	<i>TUBA4A</i>	1519.526	1060.276	-13.76638
NM_018098.4	<i>ECT2</i>	1424.359	1047.321	-13.55901
NM_004358.3	<i>CDC25B</i>	1759.552	1320.669	-13.36943
NM_203290.1	<i>POLR1C</i>	1015.402	702.6943	-13.23518
NR_003611.2	<i>BMS1P5</i>	1259.915	936.5598	-13.21685
NM_002205.2	<i>ITGA5</i>	446.1422	282.7255	-13.16303
NM_001030050.1	<i>KLK3(PSA)</i>	184.7478	77.19366	-13.02986
NM_000051.3	<i>ATM</i>	284.2875	439.7166	13.16368
NM_176096.1	<i>CDK5RAP3</i>	1184.258	1616.323	13.35052
NM_012106.3	<i>ARL2BP</i>	660.4995	922.68	13.35531
NM_002490.3	<i>NDUFA6</i>	814.9462	1131.835	13.69845
NM_024690.2	<i>MUC16</i>	396.5278	596.8228	13.80687
NM_005807.2	<i>TPR</i>	92.53539	205.3106	14.03376
NM_005563.3	<i>STMN1</i>	222.4103	357.314	14.46625
NM_145693.1	<i>LPIN1</i>	1252.389	1738.38	14.50595
NM_078626.1	<i>CDKN2C(p21)</i>	666.869	983.4192	14.82733
NM_006818.3	<i>MLLT11</i>	710.1282	1021.754	15.08341
NM_144576.2	<i>COQ10A</i>	638.3331	951.1089	15.2458
NM_014730.2	<i>MLEC</i>	550.0742	867.1986	15.4052
NM_181873.1	<i>MTMR11</i>	98.60215	231.5288	16.03511
NM_001814.2	<i>CTSC</i>	544.6109	869.5532	16.04046
NM_152740.2	<i>HIBADH</i>	1399.755	2067.9	16.11439
NM_198055.1	<i>MZF1</i>	298.1538	486.5716	16.17406
NM_001018109.1	<i>PIR</i>	2356.404	3331.708	16.27855
NM_001007067.1	<i>SDCBP</i>	2340.879	3309.626	17.42471
NM_031311.2	<i>CPVL</i>	585.2661	934.596	17.43979
NM_005385.3	<i>NKTR</i>	636.686	979.3745	17.87951
NM_014232.1	<i>VAMP2</i>	51.81608	189.3681	17.9827
NM_138341.1	<i>TMEM116</i>	245.9933	456.013	18.52908
NM_030809.1	<i>CSRNP2</i>	152.9785	312.8694	19.0856
NM_004176.3	<i>SREBF1</i>	197.0446	376.0373	20.45245
NM_013402.3	<i>FADS1</i>	1797.695	2758.296	21.0128
NM_203488.1	<i>ACYPI</i>	1228.652	1914.46	21.16004
NM_002436.2	<i>MPP1</i>	144.2018	319.523	22.82377
NM_032953.2	<i>MLXIPL</i>	477.5006	790.4216	23.19202
NM_138288.2	<i>C14orf147</i>	1218.069	2068.229	23.38519
NM_002048.1	<i>GAS1</i>	1727.255	3126.372	25.18811
NM_006113.4	<i>VAV3</i>	517.2714	897.0502	28.6244
NM_001975.2	<i>ENO2</i>	314.267	613.3861	30.44629

ANGPTL4 通过 MAP 激酶和 Src 信号通路诱导 STAT1 蛋白表达和激活,从而促进细胞的增殖^[19]。在肝细胞癌研究中,HIF-1 α 直接上调 ANGPTL4 表达。

病进展的分子标志物^[33]。

CXCL16 是近年发现的一种新的趋化因子,属于 CXC 趋化因子家族,同时也是一种膜结合蛋白,

ANGPTL4 增加了人脐静脉内皮细胞血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)的表达,激活 VCAM-1/整合素 β 1 轴,促进了肝癌细胞跨内皮迁移和肝内、远处肺转移。此外,肝细胞癌患者血清 ANGPTL4 明显高于健康人,而且其表达与患者转移和预后密切相关^[21]。同时,ANGPTL4 也是食管癌淋巴结转移,静脉侵犯生物学过程中的重要因子,是独立的预后因素^[22],是鉴别原发性和转移性肾透明细胞癌(ccRCC)分子标志物^[23]。

BMP-2 是转化生长因子 β 超家族成员之一,具有诱导未分化的间充质干细胞向成软骨细胞和成骨细胞定向分化与增殖的能力。同时 BMP-2 也表现出调节各种细胞因子的生长、分化和趋药性的作用,包括间充质细胞、上皮细胞、造血细胞和神经细胞^[24,25]。近年的研究表明,BMP-2 在许多恶性肿瘤细胞中均有表达,在不同恶性肿瘤的发生、发展和转移中起到了重要的作用^[26,27]。BMP-2 通过 MAPK/Runx2/Snail 信号通路增加了肺癌细胞上皮间质转化(EMT)、迁移和侵袭^[28],通过磷脂酰肌醇 3 激酶和蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路促进胃癌细胞^[29]、前列腺癌细胞^[30]的运动和侵袭能力^[31]。用 BMP-2 处理胃癌细胞可增加磷酸化 AKT 和 ERK 以及 NF- κ B 的核转位与激活。封闭 PI3K/Akt 和 ERK 信号通路则可抑制 BMP-2 诱导的细胞运动和侵袭^[32]。而且,血清 BMP-2 的表达与胃癌浸润的深度、淋巴结侵犯的个数成正相关,是胃癌疾

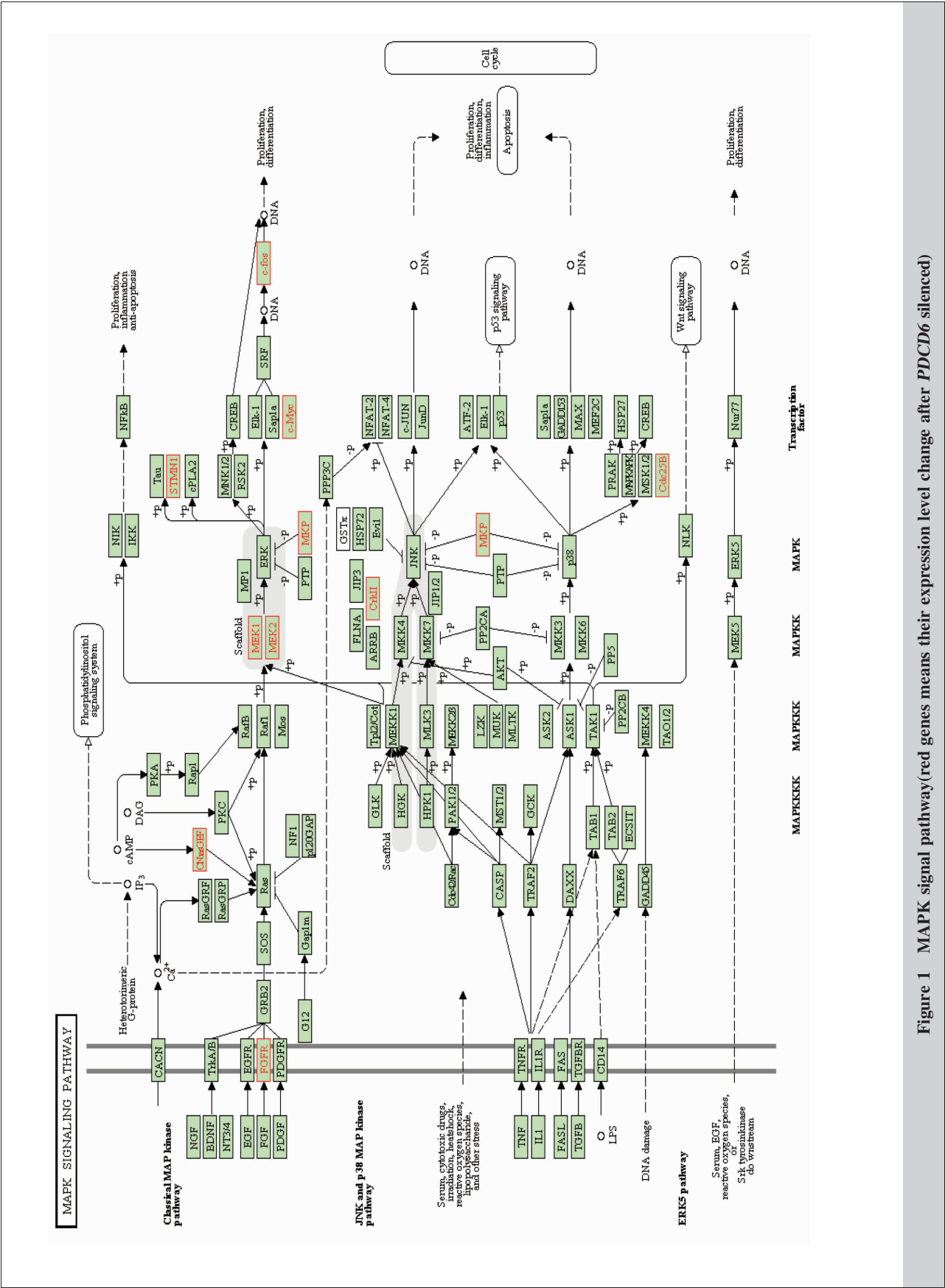
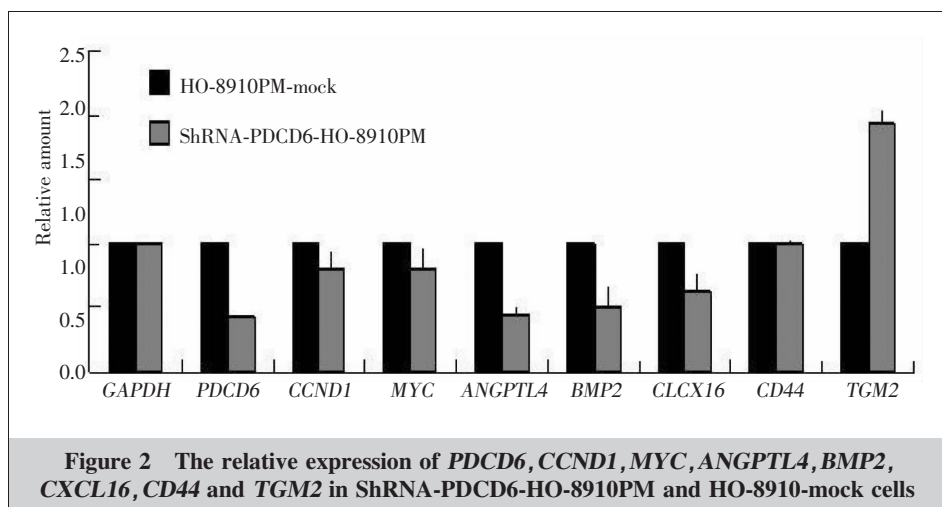


Figure 1 MAPK signal pathway(red genes means their expression level change after PDCD6 silenced)



是 CXC 型趋化因子受体 6(CXCR6)的配体。CXCL16 通过 CXCR6 介导免疫细胞向病变组织趋化,影响疾病转归,甚至参与肿瘤细胞增殖或血管生成^[34,35]。CXCL16 在多种组织和细胞上均有表达,包括激活的内皮细胞^[36]和直肠癌中的肿瘤相关巨噬细胞^[37]。CXCL16/CXCR6 轴在前列腺癌转移中扮演着关键作用,CXCR6 可以调节促血管生成因子 IL-8 或血管内皮生长因子的表达;CXCL16 则可以诱导 Akt、p70S6K 和真核起始因子 4E 结合蛋白 1,包括 mTOR 信号通路的激活,促进前列腺癌细胞的生长和侵袭^[38]。术前可溶性 CXCL16 是预测结直肠癌肝转移的分子标志物^[39]。

前期的研究非常详尽地阐述了上述基因促进肿瘤(包括卵巢癌)转移的分子机制。尽管 *PDCD6* 与这些基因的相关性还未见报道,但本研究的结果提示 *ANGPTL4*、*BMP2*、*TGM2*、*CD44* 和 *CXCL16* 可能是 *PDCD6* 下游的效应分子。*PDCD6* 促进卵巢癌转移、*PDCD6* 高表达患者复发时间短可能是 *PDCD6* 与这些基因相互作用的结果。在今后的研究中,我们将分别构建 *ANGPTL4*、*BMP-2*、*TGM2*、*CD44* 和 *CXCL16* 过表达载体,转染至 *PDCD6* 沉默的卵巢癌细胞株 HO-8910PM,观察细胞的表型是否恢复,同时检测 MAPK 通路中关键蛋白磷酸化的状态,深入研究 *PDCD6* 调节这些基因表达的分子机制。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] du Bois A, Quinn M, Thigpen T, et al. 2004 consensus

statements on the management of ovarian cancer; final document of the 3rd International Gynecologic Cancer Intergroup Ovarian Cancer Consensus Conference (GCIg OCCC 2004) [J]. Ann Oncol, 2005, 16 (Suppl 8): viii7-viii12.

- [3] Kuhlmann JD, Schwarzenbach H, Wimberger P, et al. LOH at 6q and 10q in fractionated circulating DNA of ovarian cancer patients is predictive for tumor cell spread and overall

survival[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 325.

- [4] Su D, Xu H, Feng J, et al. PDCD6 is an independent predictor of progression free survival in epithelial ovarian cancer[J]. J Transl Med, 2012, 10: 31.
- [5] Pukrop T, Klemm F, Hagemann Th, et al. Wnt5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(14): 5454-5459.
- [6] Du J, Xu R, Hu Z, et al. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1α expression in MCF-7 breast cancer cells[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25213.
- [7] Kato MA, Finley DJ, Lubitz CC, et al. Selenium decreases thyroid cancer cell growth by increasing expression of GADD153 and GADD34[J]. Nutr Cancer, 2010, 62(1): 66-73.
- [8] Xu SH, Mou HZ, Qian LJ, et al. Establishment and characterization of a model of highly metastasizing human ovarian cancer transplanted into subcutis of the nude mice [J]. J Exp Clin Cancer Res, 1995, 14(1): 387-394.
- [9] Xu SH, Qian LJ, Mou HZ, et al. Establishment of a highly metastatic human ovarian cancer cell line (HO-8910PM) and its characterization[J]. J Exp Clin Cancer Res, 1999, 18(2): 233-239.
- [10] Poon R, Jiang W, Toyoshima H, et al. Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage [J]. J Biol Chem, 1996, 271(22): 13283-13291.
- [11] Dupont J, Karas M, LeRoith D. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP/WAF is a positive regulator of insulin-like growth factor I-induced cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278(39): 37256-37264.
- [12] Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(14): 5343-5349.
- [13] Belanger AJ, Lu H, Date T, et al. Hypoxia up-regulates

- expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma angiopoietin-related gene (PGAR) in cardiomyocytes: role of hypoxia inducible factor 1alpha [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(7): 765-774.
- [14] Xu A, Lam MC, Chan KW, et al. Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(17): 6086-6091.
- [15] Li C. Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4 [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2006, 17(2): 152-156.
- [16] Pal M, Tan MJ, Huang RL, et al. Angiopoietin-like 4 regulates epidermal differentiation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25377.
- [17] Goh YY, Pal M, Chong HC, et al. Angiopoietin-like 4 interacts with integrins beta1 and beta5 to modulate keratinocyte migration [J]. *Am J Pathol*, 2010, 177(6): 2791-2803.
- [18] Goh YY, Pal M, Chong HC, et al. Angiopoietin-like 4 interacts with matrix proteins to modulate wound healing [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(43): 32999-33009.
- [19] Kim SH, Park YY, Kim SW, et al. ANGPTL4 induction by prostaglandin E2 under hypoxic conditions promotes colorectal cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(22): 7010-7020.
- [20] Huang RL, Teo Z, Chong HC, et al. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters [J]. *Blood*, 2011, 118(14): 3990-4002.
- [21] Li H, Ge C, Zhao F, et al. HIF-1alpha-activated ANGPTL4 contributes to tumor metastasis via VCAM-1/integrin beta1 signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 910-919.
- [22] Shibata K, Nakayama T, Hirakawa H, et al. Clinicopathological significance of angiopoietin-like protein 4 expression in oesophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Clin Pathol*, 2010, 63(12): 1054-1058.
- [23] Verine J, Lehmann-Che J, Soliman H, et al. Determination of angptl4 mRNA as a diagnostic marker of primary and metastatic clear cell renal-cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e10421.
- [24] Arnold SF, Tims E, McGrath BE. Identification of bone morphogenetic proteins and their receptors in human breast cancer cell lines: importance of BMP2 [J]. *Cytokine*, 1999, 11(12): 1031-1037.
- [25] Moreau JE, Anderson K, Mauney JR, et al. Tissue-engineered bone serves as a target for metastasis of human breast cancer in a mouse model [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(21): 10304-10308.
- [26] Fong YC, Li TM, Wu CM, et al. BMP-2 increases migration of human chondrosarcoma cells via PI3K/Akt pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 217(3): 846-855.
- [27] Jin Y, Tipoe GL, Liong EC, et al. Overexpression of BMP-2/4, -5 and BMPR-1A associated with malignancy of oral epithelium [J]. *Oral Oncol*, 2001, 37(3): 225-233.
- [28] Hsu YL, Huang MS, Yang CJ, et al. Lung tumor-associated osteoblast-derived bone morphogenetic protein-2 increased epithelial-to-mesenchymal transition of cancer by Runx2/Snail signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(43): 37335-37346.
- [29] Kang MH, Kim JS, Seo JE, et al. BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2011, 316(1): 24-37.
- [30] Graham TR, Agrawal KC, Abdel-Mageed AB. Independent and cooperative roles of tumor necrosis factor-alpha, nuclear factor-kappaB, and bone morphogenetic protein-2 in regulation of metastasis and osteomimicry of prostate cancer cells and differentiation and mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cells [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(1): 103-111.
- [31] Graham TR, Otero-Marrah VA, Chung LW, et al. PI3K/Akt-dependent transcriptional regulation and activation of BMP-2-Smad signaling by NF-kappaB in metastatic prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2009, 69(2): 168-180.
- [32] Kang MH, Oh SC, Lee HJ, et al. Metastatic function of BMP-2 in gastric cancer cells; the role of PI3K/AKT, MAPK, the NF-kappaB pathway, and MMP-9 expression [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 317(12): 1746-1762.
- [33] 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.
- [34] Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, et al. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 77(5): 777-786.
- [35] Darash-Yahana M, Gillespie J, Hewitt S, et al. The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammation-associated cancers [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6695.
- [36] Volin MV, Woods JM, Amin MA, et al. Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis [J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(4): 1521-1530.
- [37] Wagsater D, Dimberg J. Expression of chemokine receptor CXCR6 in human colorectal adenocarcinomas [J]. *Anti-cancer Res*, 2004, 24(6): 3711-3714.
- [38] Wang J, Lu Y, Wang J, et al. CXCR6 induces prostate cancer progression by the AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10367-10376.
- [39] Matsushita K, Toiyama Y, Tanaka K, et al. Soluble CXCL16 in preoperative serum is a novel prognostic marker and predicts recurrence of liver metastases in colorectal cancer patients [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19 (Suppl 3): S518-S527.