

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.07.003

人表皮生长因子受体显性负性突变体对胃癌细胞体外侵袭转移能力的抑制作用

廖 刚¹, 王子卫¹, 张 能¹, 董浦江²

(重庆医科大学附属第一医院 1. 胃肠外科; 2. 实验研究中心, 重庆 400016)

【摘 要】目的: 探讨人表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)显性负性突变体(Dominant negative epidermal growth factor receptor, DNEGFR)对胃癌细胞体外侵袭转移能力的影响及其分子机制。方法: 构建 pEGFPN1-DNEGFR, 转染人胃癌细胞并筛选稳定转染株, 采用 Transwell 侵袭小室模型检测人胃癌细胞体外侵袭转移能力, RT-PCR 检测细胞基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)mRNA 水平, 酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测培养液 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平。结果: 成功构建 pEGFPN1-DNEGFR, 转染并筛选出稳定转染株, 检测到人胃癌细胞体外侵袭转移能力降低, 细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 水平降低, 培养液 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平降低。结论: DNEGFR 通过抑制人胃癌细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9, 使其体外侵袭转移能力显著降低, 将为 DNEGFR 在胃癌生物治疗中的深入研究打下基础。

【关键词】表皮生长因子受体; 显性负性突变体; 胃癌; 基质金属蛋白酶

【中国图书馆分类法分类号】R735.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-04-25

Inhibitive effect of dominant negative human epidermal growth factor receptor on the invasion and metastasis of gastric cancer cells

LIAO Gang¹, WANG Ziwei¹, ZHANG Neng¹, DONG Pujiang²

(1. Department of Gastrointestinal Surgery; 2. Experimental Research Center, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of dominant negative epidermal growth factor receptor(DNEGFR) on the invasion and metastasis of human gastric cancer cells and to elucidate its molecular mechanism. Methods: The pEGFPN1-DNEGFR was constructed and human gastric cancer cells were transfected stably. The invasion and metastasis in vitro were tested by Transwell invasion cham-

作者简介: 廖 刚(1980-), 男, 住院医师, 博士,

研究方向: 胃肠道肿瘤的多学科综合治疗。

通信作者: 王子卫, 男, 教授, Email: wangziwei571@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30972872)。

(4): 271-280.

[4] Wang A C, Su Q B, Wu F X, et al. Role of TLR4 for paclitaxel chemotherapy in human epithelial ovarian cancer cells[J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(2): 157-164.

[5] Szanto A, Hellebrand E E, Bogner Z, et al. PARP-1 inhibition-induced activation of PI-3-kinase-Akt pathway promotes resistance to taxol[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77(8): 1348-1357.

[6] Pinedo H M, Giaccone G. P-glycoprotein—a marker of cancer-cell behavior[J]. N Eng J Med, 1995, 333(21): 1417-1419.

[7] Galletti E, Magnani M, Renzulli M L, et al. Paclitaxel and docetaxel resistance: molecular mechanisms and development of new generation taxanes[J]. Chem Med Chem, 2007, 2(7): 920-942.

[8] Verdier-Pinard P, Wang F, Martello L, et al. Analysis of tubulin iso-types and mutations from taxol-resistant cells by combined isoelectrofo-

cusing and mass spectrometry[J]. Biochemistry, 2003, 42(18): 5349-5357.

[9] O'Gorman D M, Cotter T G. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways[J]. Leukemia, 2001, 15(1): 21-34.

[10] Choi B H, Kim C G, Lim Y, et al. Curcumin down-regulates the multidrug-resistance mdr1b gene by inhibiting the PI3K/Akt/NF kappa B pathway[J]. Cancer Lett, 2008, 259(1): 111-118.

[11] Kelly M G, Alvero A B, Chen R, et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(7): 3859-3868.

[12] Breier A, Barancik M, Sulova Z, et al. P-glycoprotein—implications of metabolism of neoplastic cells and cancer therapy[J]. Current cancer drug targets, 2005, 5(6): 457-468.

(责任编辑: 冉明会)

ber assay. Matrix metalloproteinase-2(MMP-2) and Matrix metalloproteinase-9(MMP-9) mRNA levels of cells were detected by reversed transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). MMP-2 and MMP-9 protein levels of culture were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). **Results:** pEGFPN1-DNEGFR was constructed successfully, human gastric cancer cells was transfected stably. MMP-2 and MMP-9 mRNA levels of cells were down-regulated; MMP-2 and MMP-9 protein levels of culture were down-regulated as well. **Conclusions:** DNEGFR represses the invasion and metastasis of human gastric cancer cells by inhibiting them from secreting MMP-2 and MMP-9, which lays a solid foundation for further research of DNEGFR in gastric cancer biotherapy.

【Key words】epidermal growth factor receptor; dominant negative receptor; gastric cancer; matrix metalloproteinase

人表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)为一种相对分子质量为 170 kD 的酪氨酸蛋白激酶型受体,由胞外区、跨膜区、胞内区 3 部份构成,与其配体结合后,相互之间形成同源二聚体,也可与其它酪氨酸激酶受体形成异源二聚体,导致胞内酪氨酸激酶区的激活,最终引起一系列相关基因活化,在肿瘤侵袭转移中扮演着重要角色;EGFR 在胃癌组织中存在过表达^[1],参与胃癌的侵袭转移。缺失胞内区的 EGFR 为其显性负性突变体(Dominant negative epidermal growth factor receptor, DNEGFR),可以阻断 EGFR 信号通路,然而 DNEGFR 是否有对人胃癌细胞体外侵袭转移能力有抑制作用,以及具体分子机制目前均未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞 pEGFP-N1,美国 Clontech 公司;DH5 α ,天根生化科技(北京)有限公司;人胃癌细胞株 SGC-7901 及 NCI-N87,鼠胚胎成纤维细胞 NIH/3T3,中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂、耗材及仪器 TakaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0, Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0,宝生物工程大连有限公司。Endo-Free Plasmid Mini Kit I,美国 Omega Bio-Tek 公司。脂质体 Lipofectamine™ 2000, RPMI1640 培养基粉末,胎牛血清,Opti-MEM I reduced serum medium, G418,美国 Invitrogen 公司。LB 培养基,琼脂糖,美国 Sigma-Aldrich 公司。MMP-2 和 MMP-9 ELISA 试剂盒,美国 R&D Systems 公司。

SW-CJ 系列医用型洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司。Thermo Scientific Forma 310 系列直热式 CO₂ 培养箱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。BD BioCoat Matrigel 侵袭小室, Gel Doc XR 凝胶成像系统, Bio-rad 680 型伯乐全自动酶标仪, Bio-rad 电泳仪,美国 Bio-rad 公司。恒温培养摇床,上海联曼实业有限公司。微孔板恒温振荡器,合肥艾本森科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建及鉴定 pEGFPN1-DNEGFR 已由本文著者前期实验构建成功^[2],简要步骤如下:以 RNAiso Reagent 提取液氮罐冻存的人结肠癌组织总 RNA,以获得的总 RNA 进行逆转录反应合成第 1 链 cDNA,合成的 cDNA 即可用于 PCR 扩增;根据 GeneBank 中人 EGFR 前体 cDNA 的序列(AC-CESSION: X00588)设计合成引物,扩增的目的片段包括 EGFR 前体信号肽段、胞外区及跨膜区的 cDNA,长度为 2 004 bp,为了使扩增的目的片段与经过 *Nhe* I 和 *Cfr*42 I 酶切后的线性化 pEGFP-N1 载体发生重组反应,在扩增片段上、下游引物的末端分别引入 *Nhe* I 限制性酶切位点及保护碱基、*Cfr*42 I 限制性酶切位点及保护碱基,上游引物序列为 5'-AAAAG-CTAGCACCATGCGACCCTCCGGGAC-3',下游引物为 5'-TAATCCGCGGTACGTACCGCATGAAGAG GCCGATCCC-3', PCR 产物长度为 2 036 bp,将产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收用于定向克隆,最终通过测序鉴定证明载体构建成功。

1.2.2 细胞培养 细胞常规培养于含 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液,在 37 ℃、5% CO₂ 及相应湿度条件的 CO₂ 孵箱中培养,定期观察细胞生长情况,在对数生长期用 0.25% 的胰酶消化,进行传代培养。

1.2.3 细胞转染及稳定转染株的筛选 分别将 SGC-7901、NCI-N87 细胞接种于 96 孔板,1 000 个细胞/孔,每孔加 200 μ l 完全培养基,在 100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1 000 μ g/ml 的 G418 终浓度进行筛选,选择在 10~14 d 内使细胞全部死亡的最低 G418 浓度来进行下一步的筛选试验。筛选出的阳性克隆胰酶消化传代扩增用于后续实验, G418 采用维持浓度。

实验分为如下 6 组:(1)SGC-7901 细胞空白对照组(即 SGC-7901 细胞未转染组, US 组);(2)SGC-7901 细胞 pEGFP-N1 质粒转染组(ES 组);(3)SGC-7901 细胞 pEGFPN1-DNEGFR 质粒转染组(DS 组);(4)NCI-N87 细胞空白对照组(即 NCI-N87 细胞未转染组, UN 组);(5)NCI-N87 细胞 pEGFP-N1 质粒转染组(EN 组);(6)NCI-N87 细胞 pEGFPN1-DNEGFR 质粒转染组(DN 组)。

1.2.4 体外侵袭能力检测 人胃癌细胞体外侵袭能力检测采用 Transwell 侵袭小室模型,参考文献[3]实验方法并做少量改进。制备 NIH/3T3 细胞条件培养基,-20 ℃保存备用。取

出 BioCoat Matrigel 侵袭小室, RPMI1640 水化基膜。用胰酶分别消化收获处于对数生长期的 6 组单层胃癌细胞, 并用含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液, 浓度为 1×10^6 个/ml。取出 BioCoat Matrigel 侵袭小室, 在其上室加入 50 μ l 细胞悬液, 然后加入完全培养基 350 μ l。在下室加入 600 μ l NIH/3T3 细胞条件培养基, 放入 CO₂ 孵箱培养 24 h。取出小室, 用 37 $^{\circ}$ C 水浴预热的 PBS 冲洗, 用棉签擦去微孔膜上层的细胞。95% 乙醇固定 40 min。PBS 充分冲洗。HE 染色小室后, 小心用手术刀切下膜, 细胞面向下封片。在光学显微镜($\times 100$)计数下层细胞并采集图像, 每孔计数 5 个视野。

1.2.5 mRNA 水平检测 mRNA 水平采用 RT-PCR 检测^[4], 基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-2, MMP-9)、 β -actin 引物采用 Primer Premier 5.0 软件设计。MMP-2 引物上游引物序列为 5'-GGCCCTGTCACCT-CCTGAGAT-3', 下游引物为 GGCATCCAGGTTATCGGGGA-3', 退火温度 59 $^{\circ}$ C, 产物长度为 474 bp; MMP-9 引物上游引物序列为 5'-CGGGTGT-AGAGTCTCTCGCT-3', 下游引物为 5'-CAACATCACCTATT-GGATCC-3', 退火温度 55 $^{\circ}$ C, 产物长度为 479 bp; GAPDH 引物上游引物序列为 5'-GGAAGGTGAAGGT-CGGAGTC-3', 下游引物为 5'-GACCACCTGGTCTCAGTGT-3', 退火温度 61 $^{\circ}$ C, 产物长度为 821 bp。PCR 共扩增 30 个循环, 反应结束后, 取 5 μ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 Gel Doc XR 凝胶成像系统采集图像并分析, 目的基因 mRNA 相对表达量=目的基因电泳条带吸光度值/内参基因电泳条带吸光度值, 实验重复 3 次。

1.2.6 蛋白水平检测 培养液 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平通过酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测^[5]。6 组胃癌细胞中, 每组取 90%~95% 融合、生长状态好的一瓶, 用胰酶分别消化收获至离心管中, 并用无抗生素的完全培养基调至 5×10^4 个/ml, 反复吹打混匀。6 孔板中, 每孔加 2 ml 细胞悬液, 每组细胞设 3 个复孔, 放入 CO₂ 孵箱培养 48 h。收取培养液, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清, -20 $^{\circ}$ C 保存待用于 ELISA 测定, 同时胰酶消化细胞并计数。根据试剂盒操作说明书进行 ELISA 测定, 用 BIO-RAD 680 型伯乐全自动酶标仪测定 A 值, 选择 570 nm 波长, 并根据 A 值计算结果。

1.3 统计学分析

组间差异比较采用单因素方差分析(ANOVA), 如果差异有统计学意义则进一步采用 LSD-*t* 检验进行两两比较。所有统计学分析均应用 SPSS 17.0 软件完成, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 pEGFPN1-DNEGFR 的构建及鉴定

本研究采用定向克隆法成功构建了 pEGFPN1-DNEGFR,

部分测序报告见图 1。

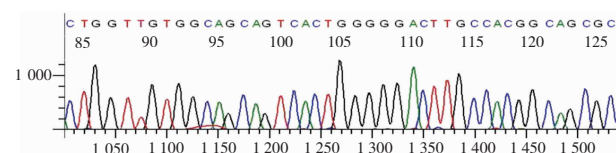


图 1 部分测序报告

Fig.1 Partial DNA sequencing results

2.2 细胞转染及稳定转染株筛选

14 d 后, 本研究确定了 SGC-7901 细胞的最佳筛选浓度为 350 μ g/ml, NCI-N87 细胞的最佳筛选浓度为 500 μ g/ml。在转染后, 采用以上最佳筛选浓度筛选稳定转染株。在筛选到第 7~8 天时, 出现大量细胞死亡, 把 G418 浓度减半维持培养(SGC-7901 细胞转染组, G418 浓度 150 μ g/ml; NCI-N87 细胞转染组, G418 浓度 250 μ g/ml)。筛选 10~14 d 后, 在荧光显微镜下可见有抗性的克隆出现, 停用 G418 培养, 待其逐渐增大。当培养到 20 d 左右时, 在荧光显微镜下观测到阳性克隆已经较大, 在阳性克隆下用记号笔做个标记。然后刮除阴性克隆, 胰酶消化阳性克隆传代扩增用于后续实验, G418 采用维持浓度(SGC-7901 细胞转染组, G418 浓度 100 μ g/ml; NCI-N87 细胞转染组, G418 浓度 200 μ g/ml)。

2.3 体外侵袭能力

体外侵袭实验表明 DNEGFR-EGFP 对细胞体外侵袭有抑制作用。对于 SGC-7901 细胞, US 组及 ES 组平均每个视野细胞数分别为 86.0 ± 5.0 、 86.3 ± 12.1 , 二者没有统计学差异; 与 US 组及 ES 组比较, DS 组则降低到 43.0 ± 6.6 (P 值均为 0.001)。对于 NCI-N87 细胞, UN 组及 EN 组平均每个视野细胞数分别为 98.0 ± 6.0 、 96.7 ± 7.6 , 二者没有统计学差异; 与 UN 组及 EN 组比较, DN 组则降低到 55.0 ± 5.0 (P 值均为 0.000)。体外侵袭实验结果见图 2、3。

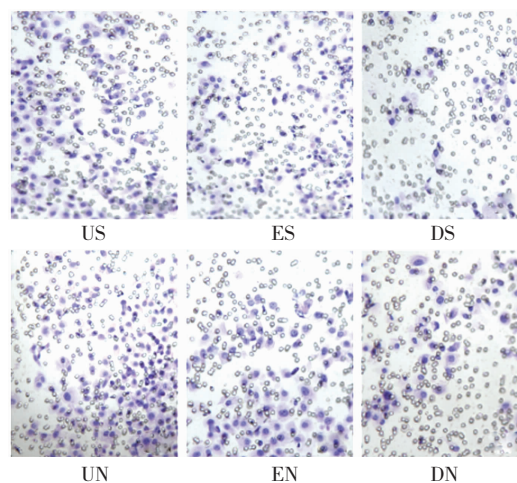


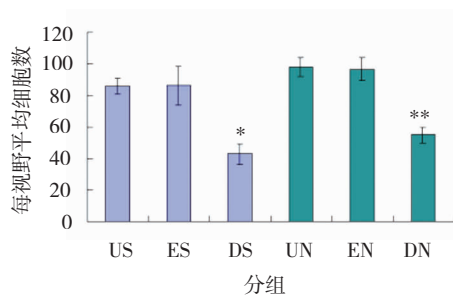
图 2 体外侵袭实验 (HE, 200 $\times$)

Fig.2 In vitro invasion assay (HE, 200 $\times$)

2.4 mRNA 水平

在 MMP-2 mRNA 水平方面, US 组及 ES 组没有统计学差异, 与 US 组及 ES 组比较, DS 组则降低 (P 值分别为 0.003、

0.001);UN 组及 EN 组没有统计学差异,与 UN 组及 EN 组比较,DN 组则降低(P 值均为 0.000)。在 MMP-9 mRNA 水平方面,US 组及 ES 组没有统计学差异,与 US 组及 ES 组比较,DS 组则降低(P 值分别为 0.004、0.001);UN 组及 EN 组没有统计学差异,与 UN 组及 EN 组比较,DN 组则降低(P 值均为 0.000)。MMP-2、MMP-9 结果见图 4。



*: 与 US 及 ES 组比较, $P < 0.05$; **: 与 UN 及 EN 组比较, $P < 0.05$

图 3 每个视野的平均细胞数

Fig.3 Average cell per field

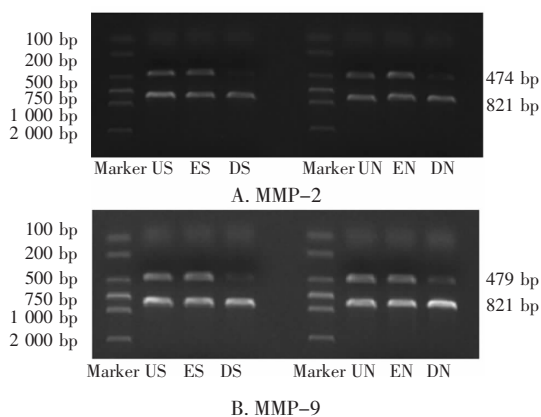


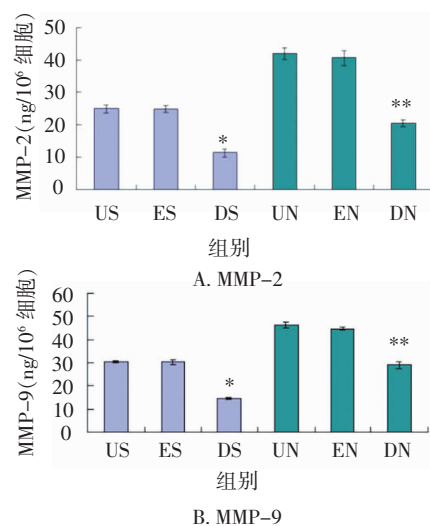
图 4 RT-PCR 结果

Fig.4 Results of RT-PCR

2.5 蛋白水平

在培养胃癌细胞 48 h 后收取的培养液中,US 组及 ES 组 MMP-2 浓度分别为 (24.9 ± 1.2) 、 (24.8 ± 1.0) ng/ 10^6 细胞,二者没有统计学差异;与 US 组及 ES 组比较,DS 组则降低到 (11.3 ± 1.2) ng/ 10^6 细胞(P 值均为 0.000)。UN 组及 EN 组 MMP-2 浓度分别为 (42.0 ± 1.7) 、 (40.6 ± 2.4) ng/ 10^6 细胞,二者没有统计学差异;与 UN 组及 EN 组比较,DN 组则降低到 (20.4 ± 1.1) ng/ 10^6 细胞(P 值均为 0.000)。MMP-2 结果见图 5A。

US 组及 ES 组 MMP-9 浓度分别为 (30.6 ± 0.6) 、 (30.5 ± 1.1) ng/ 10^6 细胞,二者没有统计学差异;与 US 组及 ES 组比较,DS 组则降低到 (14.7 ± 0.5) ng/ 10^6 细胞(P 值均为 0.000)。UN 组及 EN 组 MMP-9 浓度分别为 (46.5 ± 1.3) 、 (44.9 ± 0.6) ng/ 10^6 细胞,二者没有统计学差异;与 UN 组及 EN 组比较,DN 组则降低到 (29.2 ± 1.3) ng/ 10^6 细胞(P 值均为 0.000)。MMP-9 结果见图 5B。



*: 与 US 及 ES 组比较, $P < 0.05$; **: 与 UN 及 EN 组比较, $P < 0.05$

图 5 ELISA 结果

Fig.5 Results of ELISA

3 讨论

肿瘤细胞的侵袭转移是一个多步骤的极其复杂的过程,细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的降解是一个十分重要的步骤^[6]。而在细胞外基质的降解中,MMP 扮演着重要角色^[7]。MMP 是一组锌离子依赖性内肽酶。目前明确的人类 MMP 已有 20 余种^[7],它们各自能降解 ECM 中的一种或几种蛋白质,有些还可以降解某些非基质蛋白质。根据其结构和作用底物不同,分为 5 种亚型:胶原酶类、明胶酶类、基质溶酶类、MT-MMP、其他 MMP。

人胃癌细胞被 pEGFPN1-DNEGFR 转染后,将表达 DNEGFR-EGFP,EGFP 作用在于其便于对 DNEGFR 进行定位,对 DNEGFR 功能无影响;DNEGFR 降低内源性 EGFR Ser 1046 位点磷酸化水平,进而降低内源性 EGFR 功能,具有显性负调控作用^[8]。在本实验中,采用 pEGFPN1-DNEGFR 转染人胃癌细胞,通过表达 DNEGFR 来阻断人胃癌细胞 EGFR 信号转导通路,研究其对胃癌细胞侵袭转移能力的影响及分子机制。

Transwell 侵袭小室模型是经典的研究肿瘤细胞体外侵袭转移能力的模型,Transwell 侵袭小室实验提示,DS 及 DN 组胃癌细胞侵袭转移能力下降,表明 DNEGFR 对胃癌细胞侵袭转移能力有抑制作用。那么,DNEGFR 抑制胃癌细胞侵袭转移能力的分子机制是什么呢?MMP 参与肿瘤细胞的侵袭转移

过程^[9,10],MMP-2 和 MMP-9 属于明胶酶类亚型,是 IV 型胶原降解的关键酶,而 IV 型胶原是基底膜的成分,组织中的 MMP-2 和 MMP-9 含量与肿瘤细胞的侵袭转移密切相关^[11]。据此推论 DNEGFR 通过抑制胃癌细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 导致其侵袭转移能力降低的。为了验证推论,本研究采用 RT-PCR 检测人胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 水平,ELISA 法检测培养液中其分泌的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的含量,检测结果提示 DS 组及 DN 组人胃癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 水平降低,培养液中的其分泌的 MMP-2 和 MMP-9 蛋白含量降低,表明对 DNEGFR 抑制胃癌细胞侵袭的分子机制的推论是正确的。

肿瘤细胞恶性表型主要包括体外增殖能力、粘附及运动能力、侵袭转移能力、血管形成能力、软琼脂克隆形成能力、体内成瘤能力,其中侵袭转移能力是尤为重要的恶性表型。目前许多开发中的针对肿瘤侵袭转移能力的靶向治疗药物,比如:Batimastat (BB-94)、Marimastat (BB-2516)、BAY 12-9566、Prinomastat 等,均为 MMP 抑制剂,可见抑制 MMP 功能已经成为肿瘤生物治疗的重要方向,同样认为阻断 MMP 合成的信号通路也将会成为重要方向。DNEGFR 通过抑制人胃癌细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9,达到了抑制胃癌细胞体外侵袭转移能力的效果,是通过阻断 MMP 合成的信号通路达到效果的,将会为胃癌生物治疗研究提供新思路。

综上所述,本研究证明 DNEGFR 通过抑制人胃癌细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9,使其体外侵袭转移能力显著降低,将为 DNEGFR 在胃癌生物治疗中的深入研究打下基础。然而本研究基于 Transwell 侵袭小室模型,在体内 DNEGFR 是否也有同样效果,有待采用裸鼠体内肺转移模型或者淋巴转移模型行进一步研究验证。另外,DNEGFR 对人胃癌细胞侵袭转移能力的降低作用,除了 MMP-2 和 MMP-9 参与外,是否还有其他 MMP 的参与,以及 DNEGFR 抑制人胃癌细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 的具体信号通路,都还有待我们的进一步研究来明确。

参 考 文 献

- [1] Mimori K, Nagahara H, Sudo T, et al. The epidermal growth factor receptor gene sequence is highly conserved in primary gastric cancers [J]. *J Surg Oncol*, 2006, 93(1): 44-46.
- [2] 廖刚, 王子卫, 赵林, 等. 人 EGFR 显性负性突变体真核表达载体的构建、蛋白表达及亚细胞结构定位 [J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(21): 2266-2270.
- [3] Liao G, Wang Z W, Zhao L, et al. Construction of the eukaryotic vector carrying human dominant negative epidermal growth factor receptor, its expression and sub-cellular localization in COS-7 cells [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2009, 30(21): 2266-2270.
- [4] Tsao A S, He D, Saigal B, et al. Inhibition of c-Src expression and activation in malignant pleural mesothelioma tissues leads to apoptosis, cell cycle arrest, and decreased migration and invasion [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(7): 1962-1972.
- [5] Halatsch M E, Gehrke E E, Vougioukas V I, et al. Inverse correlation of epidermal growth factor receptor messenger RNA induction and suppression of anchorage-independent growth by OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in glioblastoma multiforme cell lines [J]. *J Neurosurg*, 2004, 100(3): 523-533.
- [6] Ahmad A, Wang Z, Kong D, et al. FoxM1 down-regulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extra-cellular matrix degrading factors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 122(2): 337-346.
- [7] Itoh Y, Nagase H. Matrix metalloproteinases in cancer [J]. *Essays Biochem*, 2002, 38: 21-36.
- [8] Freije J M, Balbín M, Pendás A M, et al. Matrix metalloproteinases and tumor progression [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 532: 91-107.
- [9] 廖刚, 王子卫, 赵林, 等. 人 EGFR 显性负性突变体负调控内源性 EGFR 功能的机制分析 [J]. *生命科学研究*, 2010, 14(3): 203-207, 239.
- [10] Liao G, Wang Z W, Zhao L, et al. Analysis of the mechanism underlying the inhibitory effect of human dominant negative epidermal growth factor receptor on endogenous epidermal growth factor receptor function [J]. *Life Science Research*, 2010, 14(3): 203-207, 239.
- [11] John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis [J]. *Pathol Oncol Res*, 2001, 7(1): 14-23.
- [12] Curran S, Murray G I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis [J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(13 Spec No): 1621-1630.
- [13] Cawston T E, Wilson A J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2006, 20(5): 983-1002.

(责任编辑: 关蕴良)