

围产医学

DOI: 10.11699/cyxb20131012

GRB7 基因在早孕小鼠子宫内膜中的表达

汤 军, 李 荣, 耿艳清, 周永江, 陈雪梅, 何俊琳, 刘学庆
(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究生长因子结合受体 7(growth factor receptor bound 7, GRB7)在早孕小鼠子宫内膜中的表达规律,探讨其在胚胎着床过程中的作用。**方法:**分别应用实时荧光定量 PCR、免疫组化和 Western blot 方法检测未妊娠及妊娠早期 d1~7 小鼠子宫内膜 GRB7 基因及蛋白的表达;孕 3 d 下午 8 点子宫角注射 GRB7 反义寡核苷酸,孕 7 d 观察胚胎着床数较正常组有无变化。**结果:**实时荧光定量 PCR 测得未妊娠(d0)和妊娠早期(d1~7)小鼠子宫内膜组织均有 GRB7 mRNA 表达,并在孕 5 d 达到峰值;免疫组化及 Western blot 分析显示 GRB7 蛋白在子宫内膜的表达规律与实时荧光定量 PCR 基本一致,孕 1 d 到孕 4 d, GRB7 蛋白主要表达部位为腔上皮、腺上皮,基质细胞少量表达,孕 5 d、孕 6 d, GRB7 蛋白表达较之前增强,并且在基质细胞开始明显表达,孕 5 d 最强;孕 6 d 着床点 GRB7 蛋白高表达于初级蜕膜区,着床旁 GRB7 蛋白高表达于基质细胞;子宫角注射 GRB7 反义寡核苷酸后胚胎着床数较正常组明显减少。**结论:**GRB7 在早孕小鼠子宫内膜中呈动态表达,提示它参与了胚胎着床的发育过程。

【关键词】生长因子结合受体 7;子宫内膜;胚胎着床

【中国图书分类法分类号】R714.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-08

Expression of growth factor receptor bound 7 in the endometrium of early pregnant mouse

TANG Jun, LI Rong, GENG Yanqing, ZHOU Yongjiang, CHEN Xuemei, HE Junlin, LIU Xueqing

(Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the role of growth factor receptor bound 7 (GRB7) during embryo implantation through detecting its expression pattern in the mouse endometrium. **Methods:** Expression of GRB7 mRNA and protein in the non-pregnant and pregnant mouse endometrium from d1 to d7 was examined by qRT-PCR, immunohistochemistry and Western blot. GRB7 antisense oligonucleotide was injected at 8 pm on pregnancy d3 and embryo implantation number on pregnancy d7 was examined. **Results:** GRB7 mRNA expressed in uterine endometrium of the non-pregnant and pregnant mouse from d1 to d7 and reached the highest level on pregnant d5 based on the results of qRT-PCR. Immunohistochemistry and Western blot showed that the expression pattern of GRB7 in mouse endometrium was the same with that detected by qRT-PCR. Moreover, from pregnant d1 to d4, GRB7 was mainly expressed in epithelium and glandular cells and was lowly expressed in stromal cells; on d5 and d6, GRB7 was more intense in epithelium and glandular cells and was obviously expressed in stromal cells, especially on d5. On d6, GRB7 was expressed strongly in primary decidual zones at implantation sites and stromal cells at inter-implantation sites, respectively. After horn injecting GRB7 antisense oligonucleotides, the number of embryo implantation was obviously decreased when compared with that in control group. **Conclusions:** Differential expression of GRB7 in pregnant mouse endometrium suggests that GRB7 may involve in the process of embryo implantation.

【Key words】 growth factor receptor bound 7; endometrium; embryo implantation

胚胎着床过程中,母体子宫内膜所发生的一系列精细和复杂的变化是胚胎成功着床的关键之一,其过程涉及细胞的增殖、凋亡、黏附、免疫应答等复

杂的变化,是否能成功着床与这一系列变化密切相关^[1]。

近年来有研究表明,在胚胎着床前至着床窗期,子宫内膜组织细胞的移行对于胚胎正常着床具有重要意义。Gentilini 等^[2]报导内源性大麻素通过大麻素受体 1 激活 PI3K 和 ERK1/2 通路系统调控子宫内膜间质细胞的迁移。Grewal 等^[3]发现人类胚胎植

作者介绍:汤 军, Email: 82429245@qq.com,

研究方向:胚胎着床的分子机制。

通信作者:刘学庆, Email: a68733172@online.cq.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31271545)。

人需要 Rac1 依赖型子宫内膜间质细胞的迁移。已知研究生长因子结合受体 7 (growth factor receptor bound 7, GRB7) 是重要的移行因子, 是生长因子受体结合蛋白家族成员之一。GRB7 蛋白含有 535 个氨基酸残基, 广泛参与各种信号转导通路, 如表皮生长因子信号通路、胰岛素信号转导通路、成纤维细胞生长因子受体信号通路等^[4-6]。在 GRB7 蛋白中, 一共 3 个主要功能区, 富含脯氨酸的氨基末端、GM 中间区、SH2 结构域的羧基末端, 中间区与秀丽线虫的有丝分裂原诱导基因-10 (mitogen inducible gene-10, MIG-10) 蛋白有着高度同源性^[7], 而 MIG-10 蛋白已经被证实是在胚胎移动中发挥作用^[8]。然而 GRB7 在小鼠生殖周期及妊娠过程中的表达情况国内外仍无文献报道, 本研究通过实时荧光定量 PCR、免疫组织化学、Western blot, 子宫角注射 GRB7 反义寡核苷酸观察胚胎着床, 初步探讨 GRB7 在小鼠胚胎着床过程中的作用, 为进一步探讨胚胎着床机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 动物 实验采用清洁级昆明种系小鼠, 6~8 周龄, 体重 25~30 g, 由重庆医科大学实验动物中心提供 [合格证号: SCXK(渝)2007-0001]。未孕小鼠记为 d0, 正常雄鼠与雌鼠按 1:2 合笼, 次晨观察到雌鼠阴栓者记为孕 d1, 依此类推。将小鼠随机分为 8 组 (d0~7), 每组 16 只。脱颈处死, 其中每组任选 8 只无菌条件下取小鼠子宫内总 RNA 和总蛋白备用 (d5~7 去除胚胎组织), 另 8 只无菌条件下取小鼠子宫立即放入 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 连续切片, 取厚 4 μm 的切片, 经 56 $^{\circ}\text{C}$ 干烤 1 d 备用。

1.1.2 试剂 兔抗 GRB7 多克隆抗体 (Santa 公司); 免疫组化试剂盒及化学显色试剂盒 (北京中杉公司); Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (TakaRa 公司); β -actin 及二抗 (中杉金桥); 引物由上海英骏公司设计和合成。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 制备 按照 Trizol 试剂说明书提取小鼠子宫内总 RNA, 并用紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度及纯度, 取部分总 RNA 作琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。以提取到的 RNA 为模板, 按 TaKaRa 公司试剂盒提供的说明书, 进行反转录反应, 获得 cDNA。反应体系共 20 μl , 条件如下: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min (反转录), 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s (灭活反转录酶)。反应完毕, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 依照 TaKaRa 公司试剂说明书, 25 μl 反应体系, 两步法反应: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min (变性); 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,

58 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 40 个循环。每个待测样本设 3 个平行管。采用 β -actin 作为内参, 进行归一化 (引物序列见表 1)。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

基因	序列
GRB7 正向引物	5'-CAGCCATTCATCGCACCC-3'
GRB7 反向引物	5'-TCTCCCGGACCAGGAACAC-3'
β -actin 正向引物	5'-CCTGAGGCTCTTTCCAGCC-3'
β -actin 反向引物	5'-TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3'

1.2.3 免疫组织化学检测 常规石蜡包埋子宫内, 行内纵切, 厚度 4 μm , 经梯度乙醇脱水, 一抗 GRB7 工作浓度 1:50, 具体操作按说明书要求进行。每组以正常兔 IgG 替代一抗做阴性对照。光镜下观察, 细胞质棕黄色着色处为阳性。每组动物取 10 张切片, 每张切片 3 个视野。

1.2.4 蛋白提取及 Western blot 所取组织称量后放入研钵内研磨, 加入组织裂解液提取蛋白, 取一部分样品 Bradford 法粗测定蛋白浓度。取蛋白样品 50 μg , 进行电泳分离, 转入硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗过夜, 二抗孵育 1.5 h 后化学显色法成像。

1.2.5 对妊娠小鼠胚胎着床的影响实验 反义寡核苷酸-脂质体复合物的制备: 根据小鼠 GRB7 全基因 cDNA 序列设计反义寡核苷酸, 序列为 5'-AGGATCGTGGACGACGAGT-3', 经 NCBI BLAST 在基因库检索验证反义寡核苷酸序列仅与 GRB7 mRNA 互补。所有核苷酸全硫代修饰。反义寡核苷酸 81 μg 加 50 μl 生理盐水稀释 (A 液), 脂质体 Lipofectamine™ 2000 6 μl 加生理盐水 50 μl 稀释 (B 液), A、B 液混匀后室温放置 30 min 备用。将 20 只妊娠 3 d 小鼠随机分两组: 对照组 (10 只), 双侧子宫角均注射生理盐水; 处理组 (10 只), 左侧子宫角注射生理盐水做对照, 右侧子宫角注射反义寡核苷酸。以上各组小鼠于妊娠 3 d 晚上 8 点子宫角分别缓慢注入 A、B 混合液 8 μl 或生理盐水 8 μl , 具体步骤按 Illera 等^[9]方法进行。待小鼠妊娠 7 d 剖腹取出子宫, 肉眼观察并统计胚泡着床数。

1.3 统计学方法

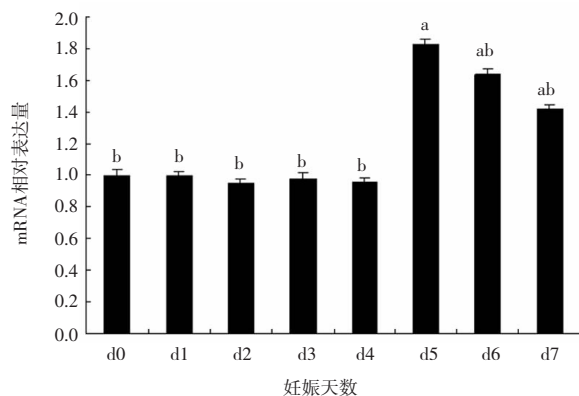
用 SPSS 15.0 统计软件进行数据分析。实验重复 3 次, 实时荧光定量 PCR 结果分析, 每组 GRB7 基因 mRNA 拷贝数与 β -actin 基因 mRNA 拷贝数之比作为实验结果, Western blot 用 Quantity One 软件进行平均吸光度值分析, 以 β -actin 作为内参。数据采用单因素方差分析, 多组间的两两比较采用 LSD-*t* 法, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。胚胎着床数采用 *t* 检验, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 结果

实时荧光定量 PCR 检测发现 GRB7 mRNA 在未妊娠 (d0) 以及妊娠早期 (d1~7) 小鼠子宫内总 RNA 中均有表达, 且组间表达有差异 ($F=3.271$, $P=0.042$)。与 d0 组相比较, 妊娠

d1~4 组 mRNA 水平无显著改变 [P 值分别为 0.736(d1)、0.819(d2)、0.718(d3)、0.620(d4)], d5、d6、d7 组 GRB7 蛋白水平显著高于 d0 组 [P 值分别为 0.021(d5)、0.039(d6)、0.042(d7)]。GRB7 mRNA 在妊娠 d5 达到最高峰, 与其余各组比较差异具有统计学意义 [P 值分别为 0.021(d0)、0.024(d1)、0.019(d2)、0.023(d3)、0.022(d4)、0.038(d6)、0.031(d7)] (图 1)。



a: 与 d0 比较差异有统计学意义, $P < 0.05$

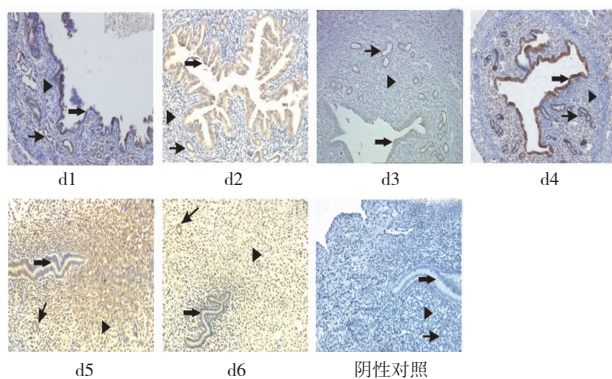
b: 与 d5 比较差异有统计学意义, $P < 0.05$

图 1 各组 GRB7 mRNA/β-actin mRNA 比值平均数柱形图 (d0~7)

Fig.1 Column diagram of mean value of GRB7 mRNA/β-actin mRNA of d0~7

2.2 免疫组化结果

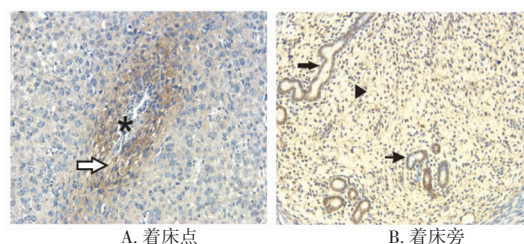
免疫组织化学结果表明, d1~4 组 GRB7 蛋白主要表达于腔上皮 (图 2) 和腺上皮 (图 2) 的细胞质中, 低表达于基质细胞中 (图 2), d5、d6 随着子宫内膜组织增生、间质细胞增殖程度改变, GRB7 蛋白表达增强, 并且在基质细胞开始明显表达, d5 最强 (图 2)。孕 6 d 着床点 GRB7 蛋白高表达于初级蜕膜区 (图 3A)。孕 6 d 着床旁 GRB7 蛋白高表达于基质细胞 (图 3B)。



黑色粗箭头所示为腔上皮, 黑色细箭头所示为腺上皮, 黑色三角所示为基质细胞, 棕色表示阳性结果

图 2 GRB7 蛋白在早孕 d1~6 小鼠子宫的表达 (200 ×)

Fig.2 Expression of GRB7 protein in the mouse uterus during pregnancy d1~6 (200 ×)



A. 着床点

B. 着床旁

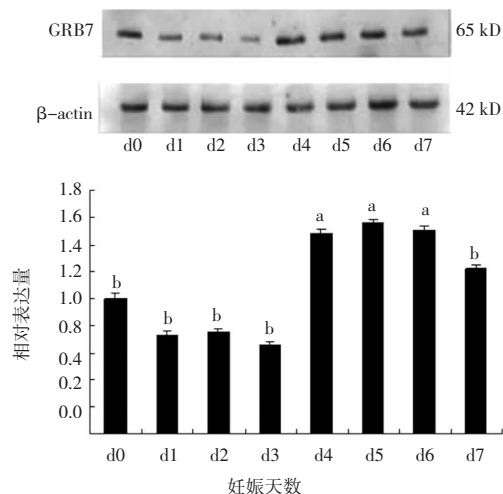
白色粗箭头所示为初级蜕膜区, 星号所示为胚胎, 黑色粗箭头所示为腔上皮, 黑色细箭头所示为腺上皮, 黑色三角所示为基质细胞, 棕色表示阳性结果

图 3 GRB7 蛋白在孕 d6 着床点和着床旁小鼠子宫的表达 (200 ×)

Fig.3 Expression of GRB7 protein in the implantation sites and inter-implantation sites on pregnancy d6 (200 ×)

2.3 Western blot 结果

Western blot 检测发现 GRB7 蛋白在未妊娠 (d0) 以及妊娠早期 (d1~7) 小鼠子宫内膜组织中均有表达, 且组间表达有差异 ($F=2.721$, $P=0.007$)。与 d0 组相比较, 妊娠 d1~3 组和 d7 组 GRB7 蛋白水平无明显改变 [P 值分别为 0.863(d1)、0.849(d2)、0.778(d3)、0.740(d7)]。d4、d5、d6 组与 d0 相比 GRB7 蛋白表达差异具有统计学意义 [P 值分别为 0.034(d4)、0.031(d5)、0.033(d6)]。与 d5 相比, GRB7 蛋白在 d4、d6 表达差异无统计学意义 [P 值分别为 0.982(d4)、0.989(d6)] (图 4)。



a: 与 d0 比较差异有统计学意义, $P < 0.05$;

b: 与 d5 比较差异有统计学意义, $P < 0.05$

图 4 Western blot 检测未孕及早孕 d1~7 小鼠子宫内膜 GRB7 的表达

Fig.4 Western blot analysis of GRB7 protein expression in the endometrium of non-pregnant and early pregnant mouse during pregnancy d1~7

2.4 子宫角注射 GRB7 反义寡核苷酸后胚胎着床数的变化

子宫角注射结果 (图 5、图 6) 显示, 对照组 A 左右侧子宫胚胎着床数分别为 (6.3 ± 1.2) 个和 (6.2 ± 0.9) 个 (图 5A), 处理组 B 左右侧子宫胚胎着床数分别为 (6.1 ± 1.0) 个和 $(2.9 \pm$

1.4)个(图5B);处理组B右侧注射GRB7反义寡核苷酸组子宫植入胚胎数明显低于左侧注射生理盐水($P=0.000$),而对照组注射生理盐水两侧子宫胚胎着床数无明显差异($P=0.843$)。

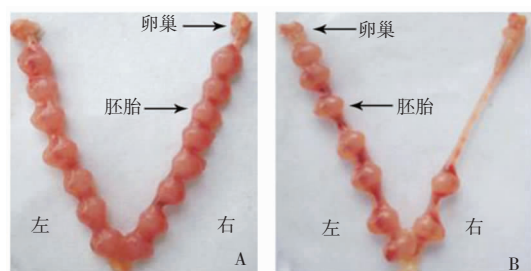
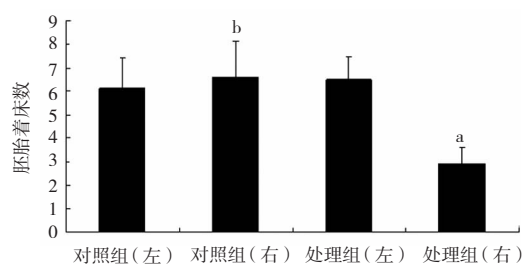


图5 注射GRB7反义寡核苷酸后胚胎着床数的变化

Fig.5 Effects of antisense GRB7 oligodeoxynucleotide on the number of implantation



a: 与处理组(左)比较差异有统计学意义, $P<0.05$;

b: 与对照组(左)比较差异无统计学意义, $P>0.05$

图6 注射GRB7反义寡核苷酸后胚胎着床数的变化及其与对照组的比较

Fig.6 Effects of antisense GRB7 oligodeoxynucleotide on the number of implantation and comparison between control group and treatment group

3 讨论

胚胎着床是哺乳动物受孕过程中的重要环节,胚胎着床需要胚胎与子宫内膜两方面的相互作用。这一过程有一定的时间和空间要求,一方面要求胚胎活化具备植入能力;另一方面要求子宫内膜正处于“着床窗”,需对胚胎具有暂时的、特殊的生理接受状态(即子宫内膜容受性)。活化的囊胚在这种接受状态下与子宫内膜进行分子对话、信号转导,进而定位、黏附、植入^[10]。子宫内膜的上皮细胞在胚胎植入时相当于一个上皮屏障,当胚胎黏附时,子宫内膜腺上皮下方的基质细胞增殖分化成为蜕膜细胞,并最终扩展到整个子宫,从而支持胚胎的发育^[11]。现有大量肿瘤研究表明,GRB7过表达促进肿瘤细胞移行和侵袭^[5],从而促进肿瘤发生发展,而胚胎的植入与肿瘤细胞的侵入、迁移等方面非常相似。

本研究结果显示,GRB7在小鼠孕d5、d6子宫内膜中高表达;d1~4组GRB7蛋白主要表达部位为腔上皮、腺上皮细胞质中,基质细胞少量表达,随着子宫内膜组织增生、间质细胞增殖程度改变,d5、d6组GRB7蛋白在基质细胞开始明显表达。早孕小鼠d1~4里胚胎识别、黏附及植入子宫内膜,胚胎实际完成植入仅需2h左右,而在这之前的4d,胚胎和子宫内膜只与子宫内膜上皮细胞直接接触。胚胎作为半同种异体抗原组织,却未受到母体的排斥而存活,这依赖于母体子宫微环境对胚胎的保护,植入胚胎的周围可由蜕膜细胞创建一个短暂的渗透屏障保护胚胎^[12]。现已知黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)在促进胚胎侵袭中发挥着重要作用,其在早期孕大鼠同紧密连接蛋白ZO-1(zonula occludens-1)一起在腔上皮呈动态表达^[13],而GRB7是FAK重要的绑定蛋白,d6着床点GRB7高表达在初级蜕膜区,腔上皮低表达,推测GRB7同FAK与紧密连接蛋白一起影响着床点腔上皮的低表达,利于胚胎的侵入,而在初级蜕膜化区高表达,利于防止胚胎的过度侵袭,使胚胎着床能顺利进行。

已知磷酸化的FAK可与GRB7的SH2区域结合,FAK作为整合素介导的信号转导途径中的关键分子,表达主要在细胞质,在细胞间及细胞与细胞外基质黏附中起着重要作用,同细胞生存、周期调控、增殖、凋亡、迁移及血管生成等密切相关。GRB7可介导黏着斑激酶调控细胞迁移,与肿瘤转移有一定的关系^[14],在很多肿瘤组织,尤其是容易侵袭的肿瘤组织,如乳腺癌、胰腺癌和食管癌等,GRB7蛋白呈高表达状态^[15-16]。GRB7能介导FAK和EphB1受体的信号通路,调节细胞迁移,促进肿瘤发展^[17]。Shen等^[18]发现FAK处理的细胞内,GRB7与PI3K结合而参与后者介导的信号传导,Tanaka等^[19]发现,在外周淋巴结转移的18例N1期胰腺癌细胞中加入非磷酸化肽段抑制GRB7和FAK的结合时,癌细胞在纤黏蛋白中的转移能力明显下降,在体外实验中也证实了GRB7可以抑制癌细胞的迁移和转移能力,但不影响癌细胞的增殖。已有研究报道,在整个胚胎发育过程中都有FAK表达,缺失了FAK基因的小鼠在早期胚胎时便可致死^[20],推测GRB7可能通过FAK信号通路在胚胎着床中起一定作用。同时通过子宫角注射GRB7的反义寡核苷酸,其作用途径可能是外源性的GRB7反义寡核苷酸渗入基因组特异区域阻断基因转录,与mRNA的蛋白质合成起始区结

合形成双链抑制 GRB7 正常翻译,起到抑制内源性的 GRB7 的作用^[21]。结果显示胚胎着床率较正常组明显降低,其可能作用为抑制 GRB7 后细胞的增殖和移行能力受到抑制,进而影响胚胎着床。研究表明 GRB7 在子宫内膜细胞的规律性表达所调控的细胞生长、增殖和移行可能是胚胎正常着床的分子机制之一,GRB7 在子宫内膜细胞分化、蜕膜化和维持妊娠方面起一定作用。

综上所述,GRB7 在早孕小鼠子宫内膜的规律性表达对于胚胎正常着床具有重要意义。随着对 GRB7 深入的研究,仍然还有一些问题有待进一步探索,如 GRB7 信号通路对子宫内膜细胞增殖、迁移和分化的精细调控机制是什么?通过何种途径与影响胚胎着床的一些重要调节因子之间发生怎样的相互作用?因而有关 GRB7 在人类生殖过程的研究是一值得关注的领域,它将有有助于了解人类正常生殖过程机制,为人类生育的调控、生殖方面疾病的诊断和治疗提供新的思路和方法。

参 考 文 献

- [1] Lawson R A, Parr R A, Cahill L P. Evidence for maternal control of blastocyst growth after asynchronous transfer of embryos to the uterus of the ewe[J]. *J Reprod Fertil*, 1983, 67(2): 477-483.
- [2] Gentilini D, Besana A, Vigano P, et al. Endocannabinoid system regulates migration of endometrial stromal cells via cannabinoid receptor 1 through the activation of PI3K and ERK1/2 pathways[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(8): 2588-2593.
- [3] Grewal S, Carver J G, Ridley A J, et al. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(42): 16189-16194.
- [4] Tsai N P, Ho P C, Wei L N. Regulation of stress granule dynamics by Grb7 and FAK signalling pathway[J]. *EMBO J*, 2008, 27(5): 715-726.
- [5] Ramsey B, Bai T, Hanlon Newell A, et al. GRB7 protein over-expression and clinical outcome in breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 127(3): 659-669.
- [6] Daly R J, Sanderson G M, Janes P W, et al. Cloning and characterization of GRB14, a novel member of the GRB7 gene family[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(21): 12502-12510.
- [7] Manser J, Roonprapunt C, Margolis B. C. elegans cell migration gene mig-10 shares similarities with a family of SH2 domain proteins and acts cell nonautonomously in excretory canal development[J]. *Dev Biol*, 1997, 184(1): 150-164.
- [8] Manser J, Wood W B. Mutations affecting embryonic cell migrations in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Dev Genet*, 1990, 11(1): 49-64.
- [9] Illera M J, Cullinan E, Gui Y, et al. Blockade of the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin adversely affects implantation in the mouse[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(5): 1285-1290.
- [10] Mohamed O A, Jonnaert M, Labelle-Dumais C, et al. Uterine Wnt/ β -catenin signaling is required for implantation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(24): 8579-8584.
- [11] Correia-da-Silva G, Bell S C, Pringle J H, et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. *Placenta*, 2004, 25(6): 538-547.
- [12] Wang X, Matsumoto H, Zhao X, et al. Embryonic signals direct the formation of tight junctional permeability barrier in the decidualizing stroma during embryo implantation[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt1): 53-62.
- [13] Kaneko Y, Lecce L, Day M L, et al. Focal adhesion kinase localizes to sites of cell-to-cell contact in vivo and increases apically in rat uterine luminal epithelium and the blastocyst at the time of implantation[J]. *J Morphol*, 2012, 273(6): 639-650.
- [14] Han D C, Guan J L. Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(34): 24425-24430.
- [15] Luzy J P, Chen H, Gril B, et al. Development of binding assays for the SH2 domain of Grb7 and Grb2 using fluorescence polarization[J]. *J Biomol Screen*, 2008, 13(2): 112-119.
- [16] Lucas-Fernandez E, Garcia-Palmero I, Villalobo A. Genomic organization and control of the grb7 gene family[J]. *Curr Genomics*, 2008, 9(1): 60-68.
- [17] Shen T L, Guan J L. Grb7 in intracellular signaling and its role in cell regulation[J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 192-200.
- [18] Shen T L, Han D C, Guan J L. Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 29069-29077.
- [19] Tanaka S, Pero S C, Taguchi K, et al. Specific peptide ligand for Grb7 signal transduction protein and pancreatic cancer metastasis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(7): 491-498.
- [20] Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice[J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 539-544.
- [21] Yuan J X, Xiao L J, Lu C L, et al. Increased expression of heat shock protein 105 in rat uterus of early pregnancy and its significance in embryo implantation[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009, 7: 23.

(责任编辑:关蕴良)