

SPK1 调控人脐静脉内皮细胞 SIRT1 表达及细胞迁移的机制研究

高 瞻, 曹荟哲, 白燕青, 王 娟, 徐 倩, 曾通旭, 杨志华, 哈小琴

[摘要] 目的 探讨鞘氨醇激酶 1 (sphingosine kinase 1, SPK1) 调控沉默信息调节因子 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 表达及对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 迁移能力的机制。方法 用病毒感染复数 (MOI) = 20 的 pLKO.1-shSPK1-GFP 干扰慢病毒 (shSPK1 组) 和 pPIG-U6-Scramble-GFP 对照慢病毒 (GFP-SC 组) 感染 HUVECs 48 h 后提取细胞蛋白并用蛋白免疫印迹法检测 ERK、P38 MAPK 及 AKT 磷酸化水平。分别用 PD98059、SB203580 及 Wortmannin 处理 HUVECs 1 h, 检测 ERK、P38 MAPK 及 AKT 信号表达及 SIRT1 蛋白表达情况。取抑制剂干预后的细胞进行 Transwell 小室迁移实验, 检测细胞迁移能力。结果 shSPK1 组 ERK、P38 MAPK 及 AKT 的磷酸化水平均低于 GFP-SC 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。PD98059、SB203580 及 Wortmannin 组 ERK、P38 MAPK、AKT 磷酸化水平及 SIRT1 蛋白表达水平低于对照组, HUVECs 的迁移能力较对照组弱 ($P < 0.01$)。结论 SPK1 可以通过 ERK、P38 MAPK 及 AKT 通路调控 HUVECs SIRT1 的表达及迁移能力。

[关键词] 鞘氨醇激酶 1; 组蛋白去乙酰化酶 1; 人脐静脉内皮细胞; 细胞迁移分析; 信号调控

[中国图书资料分类号] R364.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-140X(2017)01-0006-04

[DOI] 10.3969/j.issn.2095-140X.2017.01.002

Mechanism of SIRT1 Expression and Cell Migration in HUVECs Regulated by SPK1

GAO Zhan^{1,2}, CAO Hui-zhe³, BAI Yan-qing¹, WANG Juan¹, XU Qian¹, ZENG Tong-xu¹, YANG Zhi-hua¹, HA Xiao-qin¹ (1. Department of Clinical Laboratory, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730050, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Central Hospital of Zibo, Zibo, Shandong 255000, China; 3. School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) expression and cell migration in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) regulated by sphingosine kinase 1 (SPK1). **Methods** Multiplicity of infection (MOI) equal to 20 pLKO.1-shSPK1-GFP lentivirus (shSPK1 group) and pPIG-U6-Scramble-GFP lentivirus (GFP-SC group) were used to infect HUVECs, and cell proteins were collected after 48 h, and Western Blot was used to determine phosphorylation levels of ERK, P38 MAPK and AKT. HUVECs proteins were obtained after treatment by PD98059, SB203580 and Wortmannin respectively for 1 h, and phosphorylation levels of ERK, P38 MAPK and AKT and SIRT1 expression were detected. Transwell assay was used after cells inhibition to detect the effect of inhibitors on ability of HUVECs migration. **Results** Compared with those in GFP-SC group, phosphorylation levels of ERK, P38-MAPK and AKT were significantly decreased in shSPK1 group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Phosphorylation levels of ERK, P38-MAPK and AKT and the SIRT1 protein level were decreased, and migration ability of HUVECs in PD98059, SB203580 and Wortmannin groups were less than those in control group ($P < 0.01$). **Conclusion** SPK1 can regulate SIRT1 expression and HUVECs migration ability by regulating ERK, P38-MAPK and AKT pathways.

[Key words] Sphingosine kinase 1; Silent mating type information regulation 2 homolog 1; Human umbilical vein endothelial cells; Cell migration assays; Signal transduction

[基金项目] 国家自然科学基金(81273568)

[作者单位] 730050 兰州, 兰州军区兰州总医院检验科(高瞻、曹荟哲、白燕青、王娟、徐倩、曾通旭、杨志华、哈小琴); 255000 山东 淄博, 淄博市中心医院检验科(高瞻); 730050 兰州, 兰州理工大学生命科学与工程学院(曹荟哲)

[通讯作者] 哈小琴, E-mail: haxiaoqin2013@163.com

血管生成参与肿瘤、糖尿病血管病变及缺血性脑卒中等多种疾病的病理过程。目前, 用药物或基因治疗等方法促进或抑制血管新生为血管相关性疾病的治疗提供了新方向。鞘氨醇激酶 (sphingosine kinase 1, SPK1) 是调控磷脂代谢的重要催化酶, 其可将鞘氨醇催化为 1-磷酸鞘氨醇 (sphingosine-1-

phosphate, S1P)^[1]。S1P 是机体重要的调控因子, 可显著调控内皮细胞增殖、迁移、凋亡等过程^[2-3]。此外, 调控沉默信息调节因子 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 作为 SIRT2 同源性物质, 在调控内皮细胞的功能方面也有显著作用。我们前期研究发现, SPK1 可以调控 SIRT1 的表达, 但其作用机制尚不明确, 故本文着力于研究 SPK1 调控 SIRT1 表达及细胞迁移能力的调控机制, 从而为血管相关性疾病的治疗提供实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 低糖 DMEM 培养基(美国, Gibco 公司); 胎牛血清(美国, Hyclone 公司); 蛋白定量试剂盒、超敏发光液(德国, Thermo 公司); 普通发光液(北京, 天根公司); 兔抗人 SIRT1 单克隆抗体、兔抗人 P-AKT 单克隆抗体、兔抗人 AKT 单克隆抗体、兔抗人 P-ERK 单克隆抗体、兔抗人 ERK 单克隆抗体、兔抗人 P-P38 MAPK 单克隆抗体、兔抗人 P38 MAPK 单克隆抗体、PD98059、SB203580 及 Wortmannin(美国, CST 公司); 鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体、羊抗兔二抗及羊抗鼠二抗(北京, 中杉金桥公司); Transwell 小室(美国, Corning 公司)。

1.1.2 细胞株及慢病毒: 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 及 pPIG-U6-Scramble-GFP 对照慢病毒(军事医学科学院); pLKO.1-shSPK1-GFP 干扰慢病毒为前期构建。

1.1.3 主要仪器: 洁净工作台(北京半导体设备一厂); 3110 型 CO₂ 气体培养箱(德国, Thermo 公司); 荧光显微镜及相差显微镜(日本, OLYMPUS 公司); 天能 5200 化学发光成像系统(北京, 原平皓生物技术有限公司); 蛋白垂直电泳系统(美国, Biorad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白免疫印迹(Western Blot) 检测目的蛋白表达

1.2.1.1 SPK1 表达对信号通路的影响: 取对数生长期 HUVECs 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 待细胞融合度达 70% 左右时, 用病毒感染复数(MOI) = 20 的 pLKO.1-shSPK1-GFP 干扰慢病毒(shSPK1 组) 及 pPIG-U6-Scramble-GFP 对照慢病毒(GFP-SC 组) 感染; 48 h 后用含苯甲基磺酰氟化物(PMSF) 的蛋白裂解液冰上裂解细胞, 30 min 后收集蛋白。

1.2.1.2 信号通路抑制剂对信号通路蛋白及 SIRT1 蛋白的影响: 取对数生长期 HUVECs 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板, 待细胞融合度达 90% 左右时, 分别用 20 μmol PD98059、10 μmol SB203580 及 0.5 μmol Wortmannin 处理。1 h 后用含 PMSF 的蛋白裂解液冰上裂解细胞, 30 min 后收集蛋白。

1.2.1.3 用蛋白定量试剂盒对所提取蛋白进行定量分析: 取 20 ng 蛋白在电泳仪上进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 其中分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%; 电泳条件为 80 V 电泳 30 min, 后 160 V 电泳 1 h。用电转印系统将目的条带恒流电转印到硝酸纤维素膜(PVDF) 上并用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。以 1: 1000 的浓度室温摇床标记一抗(SIRT1 及磷酸化抗体) 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 用 TBST 清洗 PVDF 3 次, 每次 10 min。后以 1: 5000 的浓度室温摇床标记二抗 40 min, 用 TBST 清洗 PVDF 3 次, 每次 10 min。发光液曝光, 于天能 5200 化学发光成像系统中成像, 并用 ScnImage 软件分析条带灰度(IA)。用 Strip 液洗去 PVDF 上的抗体, 条件为 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 且每隔 10 min 晃动 Strip 液。重新用脱脂奶粉封闭条带 2 h, 并以 1: 1000 的浓度室温摇床标记一抗(GAPDH 及非磷酸化抗体) 2 h。TBST 清洗 3 次后 1: 5000 标记二抗。发光液曝光。

1.2.2 Transwell 小室检测细胞迁移: 取对数生长期 HUVECs 以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板。待细胞融合度达 90% 左右时, 分别用 20 μmol PD98059、10 μmol SB203580 及 0.5 μmol Wortmannin 处理, 1 h 后消化细胞, 用培养基制备 1×10^5 个/100 μl 细胞悬液, 备用。于 Transwell 小室的下室中加入 600 μl 细胞培养基及 20 ng 肝细胞生长因子(HGF) 以诱导细胞迁移; 上室加入 1×10^5 个细胞, 即 100 μl 细胞悬液。将细胞培养板放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 4 h 后 PBS 清洗小室 2 次, 后用 4% 多聚甲醛固定迁移细胞 20 min, 并用结晶紫进行细胞染色 10 min。冲洗小室并擦去上室未迁移的细胞, 于光学显微镜下观察迁移结果。每组 5 个视野计算细胞迁移率。

1.3 统计学方法 应用 GraphPad Prism5 软件进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用配对 t 检验, $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 干扰 SPK1 表达对 ERK、P38 MAPK 及 AKT 磷酸化水平的影响 用 pLKO.1-shSPK1-GFP 干扰慢

病毒感染 HUVECs 后,其 ERK、P38 MAPK 及 AKT 的磷酸化水平都有较显著下调,见图 1。将 GFP-SC 组 ERK、AKT 及 P38 MAPK 的磷酸化水平设为 1, shSPK1 组分别为 0.519 ± 0.071 、 0.683 ± 0.111 和 0.471 ± 0.087 。shSPK1 组 ERK、P38 MAPK 及 AKT 的磷酸化水平均低于 GFP-SC 组,差异有统计学意义($P < 0.05$ $P < 0.01$)。

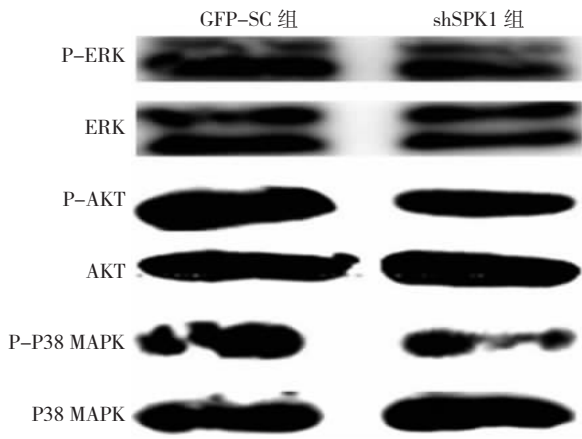


图 1 干扰 SPK1 表达对人脐静脉内皮细胞 ERK、P38 MAPK、AKT 磷酸化水平的影响

SPK1 为鞘氨醇激酶; GFP-SC 组为 pPIG-U6-Scramble-GFP 对照慢病毒组, shSPK1 为 pLKO.1-shSPK1-GFP 干扰慢病毒组

2.2 PD98059 对 HUVECs 内 ERK 和 SIRT1 蛋白表达的影响 将对照组 HUVECs 内 ERK 和 SIRT1 蛋白表达水平设为 1,用 PD98059 处理 HUVECs 后 ERK 磷酸化水平和 SIRT1 蛋白表达水平均为 55%, 差异有统计学意义($P < 0.01$ $P < 0.05$)。见图 2。

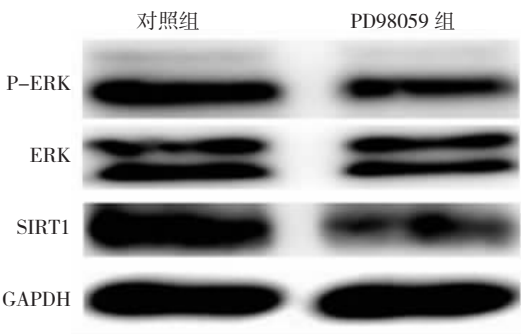


图 2 PD98059 对人脐静脉内皮细胞 ERK 磷酸化和 SIRT1 蛋白表达的影响

PD98059 为信号通路抑制剂, SIRT1 为沉默信息调节因子 1

2.3 SB203580 对 HUVECs 内 P38 MAPK 和 SIRT1 蛋白表达的影响 将对照组 P38 MAPK 磷酸化水平和 SIRT1 蛋白表达水平设为 1,用 SB203580 处理 HUVECs 后 P38 MAPK 的磷酸化水平和 SIRT1 的蛋白表达水平分别为 73% 和 81%, 差异有统计学意义($P < 0.05$ $P < 0.01$)。见图 3。

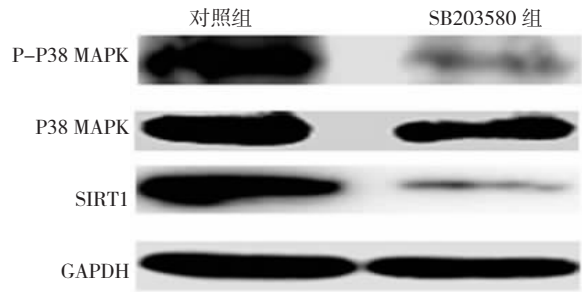


图 3 SB203580 对人脐静脉内皮细胞 P38 MAPK 磷酸化和 SIRT1 蛋白表达的影响

SB203580 为信号通路抑制剂, SIRT1 为沉默信息调节因子 1

2.4 Wortmannin 对 HUVECs 内 AKT 磷酸化水平和 SIRT1 蛋白表达水平的影响 将对照组 AKT 磷酸化水平和 SIRT1 蛋白表达水平设为 1, Wortmannin 处理 HUVECs 后 AKT 磷酸化水平和 SIRT1 的蛋白表达水平分别为 72% 和 55%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 4。

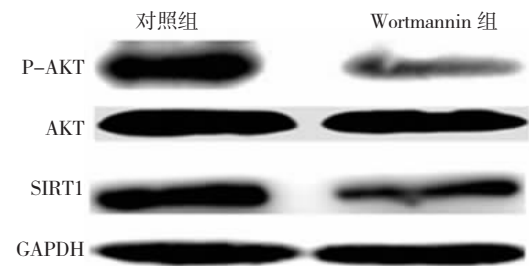


图 4 Wortmannin 对人脐静脉内皮细胞 AKT 磷酸化和 SIRT1 蛋白表达的影响

Wortmannin 为信号通路抑制剂, SIRT1 为沉默信息调节因子 1

2.5 PD98059、SB203580 及 Wortmannin 对 HUVECs 迁移率的影响 对照组 HUVECs 迁移率为 100%, 用 PD98059、SB203580 和 Wortmannin 处理后分别可以抑制 85%、95% 和 99% 的 HUVECs 迁移,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 5。

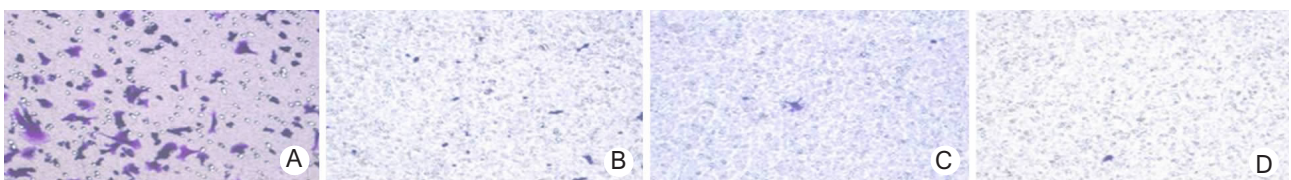


图 5 4 组人脐静脉内皮细胞迁移情况(结晶紫染色 $\times 100$) A. 对照组; B. PD98059 组; C. SB203580 组; D. Wortmannin 组

3 讨论

内皮细胞迁移是血管形成的先决条件之一。目前,多种细胞因子均可通过复杂的信号途径参与细胞迁移的调控。SPK1 是调控细胞生命活动的重要代谢酶之一,其催化产物 S1P 是脂类生物活性分子,具有细胞外第一信使及细胞内第二信使的双重作用^[4]。研究表明,S1P 可以明显诱导内皮细胞的增殖及迁移,具有较显著的促血管生成作用^[5-6]。本课题组前期研究结果显示,SPK1 本身也具有显著的促细胞增殖及迁移能力^[7]。SIRT1 是哺乳动物体内与 SIRT2 同源性最高的去乙酰化蛋白酶,其可以通过对底物的去乙酰化作用,改善内皮细胞的氧化应激、炎症反应、胰岛素抵抗及内皮细胞所处的微环境,进而改善内皮细胞的功能紊乱、阻止动脉粥样硬化的发生及发展^[8-10],其对糖尿病血管病变的保护作用也已得到广泛的认可。研究表明,SIRT1 具有显著的促增殖、促迁移能力,其对内皮细胞体外管状结构的形成也具有较显著的作用^[11-12]。有研究指出 SIRT1 在血管发生时高表达,提示 SIRT1 在调控内皮细胞方面具有广泛的作用^[13]。

由于血管生成涉及肿瘤发生、转移、创伤修复、缺血性疾病、神经生长等诸多生理病理过程,因此对血管生成具有调控作用的物质及其调控机制的研究就显得尤为重要。本课题组前期研究发现了 SPK1 可以调控内皮细胞 SIRT1 的表达^[7],为研究血管内皮细胞的功能及血管相关性疾病的治疗提供了另一个方向和靶点,但其作用机制仍不明确。通过检索文献发现,Wnt/ β -catenin、PI3K/AKT/mTOR、JNK、ERK、MAPK 等通路均可参与对细胞迁移的调控作用,因此选择了其中 3 条通路的抑制剂来完成实验^[14-16]。本研究结果显示,AKT、ERK 及 P38 MAPK 的磷酸化水平均随着 SPK1 的抑制而下调。提示 SPK1 可以影响 HUVECs 内 AKT、ERK 及 P38 MAPK 通路。本研究结果还显示,用 PD98059 抑制 ERK 通路、用 SB203580 抑制 P38 MAPK 通路及用 Wortmannin 抑制 AKT 通路均可显著下调 HUVECs 内 SIRT1 蛋白表达,且可显著抑制 HUVECs 迁移能力,提示 SPK1 对 SIRT1 蛋白表达及细胞迁移能力的调控作用可以通过 AKT、ERK 及 P38-MAPK 通路完成。

本研究对 SPK1 调控 SIRT1 表达的作用机制进行了研究,为血管相关性疾病的研究及治疗提供了新的方向,但该研究仅局限于体外实验,仍需进一步的体内实验来补充和完善。

[参考文献]

- [1] Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway to treat chronic inflammatory kidney diseases [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 114(1): 44-49.
- [2] Schwalm S, Pfeilschifter J, Huwiler A. Sphingosine kinase 1 is critically involved in nitric oxide-mediated human endothelial cell migration and tube formation [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 160(7): 1641-1651.
- [3] Heo K, Park K A, Kim Y H, et al. Sphingosine 1-phosphate induces vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(10): 685-690.
- [4] Karliner J S. Sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate in the heart: a decade of progress [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(1): 203-212.
- [5] Shin K O, Seo C H, Cho H H, et al. Ginsenoside compound K inhibits angiogenesis via regulation of sphingosine kinase-1 in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Arch Pharm Res*, 2014, 37(9): 1183-1192.
- [6] Wang H, Cai K Y, Li W, et al. Sphingosine-1-Phosphate Induces the Migration and Angiogenesis of Epcps Through the Akt Signaling Pathway via Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3/Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2015, 20(4): 597-611.
- [7] Gao Z, Wang H, Xiao F J, et al. SIRT1 mediates SPHK1/S1P-induced proliferation and migration of endothelial cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 74: 152-160.
- [8] Yang S J, Choi J M, Kim L, et al. Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD-sirtuin pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(1): 66-72.
- [9] Takizawa Y, Kosuge Y, Awaji H, et al. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), silent mating type information regulation 2 homologue 1 (SIRT1) and autophagy-related genes by repeated treatments with resveratrol in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Br J Nutr*, 2013, 110(12): 2150-2155.
- [10] Jiménez-Flores L M, López-Briones S, Macías-Cervantes M H, et al. A PPAR γ , NF- κ B and AMPK-dependent mechanism may be involved in the beneficial effects of curcumin in the diabetic db/db mice liver [J]. *Molecules*, 2014, 19(6): 8289-8302.
- [11] Kunitomo R, Jimbow K, Tanimura A, et al. SIRT1 regulates lamellipodium extension and migration of melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol*, (下转 19 页)

- [8] Okada T, Nakamura S. Role of S1P acting both inside and outside the cells [J]. *Seikagaku*, 2012, 84(2): 92-101.
- [9] Gandy K A O, Obeid L M. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: Review of sphingosine kinase inhibitors [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2013, 1831(1): 157-166.
- [10] Ma M M, Chen J L, Wang G G, et al. Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(4): 891-900.
- [11] Chong Z Z, Shang Y C, Wang S, et al. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(2): 167-178.
- [12] Oblong J E. The evolving role of the NAD⁺/nicotinamide metabolome in skin homeostasis, cellular bioenergetics, and aging [J]. *DNA repair*, 2014, 23: 59-63.
- [13] Patel S A, Velingkaar N S, Kondratov R V. Transcriptional control of antioxidant defense by the circadian clock [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(18): 2997-3006.
- [14] Chen Z, Peng I C, Cui X, et al. Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(22): 10268-10273.
- [15] Breitenstein A, Wyss C A, Spescha R D, et al. Peripheral blood monocyte Sirt1 expression is reduced in patients with coronary artery disease [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53106.
- [16] Balestrieri M L, Servillo L, Esposito A, et al. Poor glycaemic control in type 2 diabetes patients reduces endothelial progenitor cell number by influencing SIRT1 signalling via platelet-activating factor receptor activation [J]. *Diabetologia*, 2013, 56(1): 162-172.
- [17] Martin A, Tegla C A, Cudrici C D, et al. Role of SIRT1 in autoimmune demyelination and neurodegeneration [J]. *Immunol Res*, 2015, 61(3): 187-197.
- [18] Chen J, Xavier S, Moskowitz-Kassai E, et al. Cathepsin cleavage of sirtuin 1 in endothelial progenitor cells mediates stress-induced premature senescence [J]. *Am J Pathol*, 2012, 180(3): 973-983.
- [19] Lemarié C A, Shbat L, Marchesi C, et al. Mthfr deficiency induces endothelial progenitor cell senescence via uncoupling of enos and downregulation of sirt1 [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(3): H745-753.
- [20] Zhang J, Feng X, Wu J, et al. Neuroprotective effects of resveratrol on damages of mouse cortical neurons induced by beta-amyloid through activation of SIRT1/Akt1 pathway [J]. *Biofactors*, 2014, 40(2): 258-267.
- [21] Li W, Du D, Wang H, et al. Silent information regulator 1 (SIRT1) promotes the migration and proliferation of endothelial progenitor cells through the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2274-2287.
- [22] Gao Z, Wang H, Xiao F J, et al. SIRT1 mediates Sphk1/S1P-induced proliferation and migration of endothelial cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 74: 152-160.
- [23] Xu Q, Hao X, Yang Q, et al. Resveratrol prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(2): 389-394.

(收稿时间: 2016-09-05 修回时间: 2016-09-27)

(上接 9 页) 2014, 134(6): 1693-1700.

- [12] Zu Y, Liu L, Lee M Y, et al. SIRT1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary porcine aortic endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2010, 106(8): 1384-1393.
- [13] Potente M S, Dimmeler M. Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis [J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(14): 2117-2122.
- [14] Yang J, Wei D, Wang W, et al. TRAF4 enhances oral squamous cell carcinoma cell growth, invasion and migration by Wnt- β -catenin signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 11837-11846.
- [15] Tang H, Li R P, Liang P, et al. miR-125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells VIA suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 681-686.
- [16] Mondal A, Biswas R, Rhee Y H, et al. Sulforaphene promotes Bax/Bcl-2, MAPK-dependent human gastric cancer AGS cells apoptosis and inhibits migration via EGFR, p-ERK1/2 down-regulation [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2016, 35(1): 25-34.

(收稿时间: 2016-10-08 修回时间: 2016-11-10)