

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 02. 008

NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 在乳腺癌细胞中信号途径的异同

张育军¹,周 波²,谢 菲²

Differences of Signaling Pathway of NSP-1, NSP-2 and NSP-3 in Breast Cancer Cells

ZHANG Yu-jun¹,ZHOU Bo²,XIE Fei²

1. The Central Lab, People's Hospital of Peking University, Beijing 100044,China,2. Department of Breast

Abstract:Objective To elucidate the mechanism of antiestrogen resistance of NSP-2 and its signal pathway in breast cancer cells, we compared NSP-2 with the highly related homologs, NSP-1 and NSP-3 about signaling. **Methods** ICI 182,780 resistance was detected by cell counting with a hemocytometer; western blot was used to detect Phospho-AKT, Phospho-JNK, Phospho-ERK and Phospho-p38. The activation of cyclin D1 promoter and transcriptional activity of TCF/LEF was performed by Luciferase promoter assay. **Results** We found that among NSP family members, only NSP-2 can active the cyclinD1 promoter and induce anti-estrogen resistance. Any overexpression of the three NSP family members activated similarly phosphor-Akt in MCF-7 cells. None of them activated Phospho-JNK, Phospho-ERK and Phospho-p38. Over-expression of NSP-2 but not NSP-1 or NSP3 led to activation of the TCF/LEF signaling pathway. **Conclusion** Over-expression of NSP-2 over-expression to activates TCF/LEF-mediated

收稿日期:2009-02-07;修回日期:2009-07-16
作者单位:1. 100044 北京大学人民医院中心实验室,2. 乳腺外科
作者简介:张育军(1973-),女,博士,助理研究员,主要从事乳腺癌内分泌耐药研究

织中均有 CD 基因表达,但体内转染法 CD 基因表达活性低于体外转染法 ($P < 0.05, t = 2.758$)。Western blot 检测肿瘤组织中 CD 基因蛋白同样发现体内转染法 CD 基因蛋白表达低于体外转染法。结果提示,体外转染法建立裸鼠转基因结肠瘤肝转移动物模型目的基因,操作简单,转染率高,更能稳定、持续的表达,且易于控制,转染后对细胞的致瘤性无明显影响,可为研究结肠瘤肝转移基因治疗提供更为合理、有效的转基因结肠瘤肝转移动物模型。

参考文献:

[1] Jemal A,Tiwari RC,Murray T, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2004,54(1):8-29.
[2] Otchy D,Hyman NH,Simman C, et al. Practice parameters for colon cancer[J]. Dis Colon Rectum,2004,47(8):1269-1284.
[3] 黎成金,马庆久,涂小煌,等. 组织特异性 CD/5-FC 系统对大肠癌的原位基因治疗[J]. 肿瘤防治研究,2005,32(4):206-208.
[4] 黎成金,马庆久,赖大年,等. CD/5-FC 系统对结肠癌细胞的杀伤作用[J]. 世界华人消化杂志,2003,11(5):535-539.
[5] 黎成金,王羊,王烈,等. 热化疗对结肠癌 LoVo 细胞胞嘧啶脱氨酶基因表达的影响[J]. 中华实验外科杂志,2008,25(5):606-608.
[6] Tachimori A, Yamada N, Amano R, et al. Combination therapy of S-1 with selective cyclooxygenase-2 inhibitor for liver

metastasis of colorectal carcinoma[J]. Anticancer Res,2008,28(2):629-638.
[7] Hamada K, Monnai M, Kawai K, et al. Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD/Shi-scid IL2Rgammanull (NOG) mice[J]. Int J Oncol,2008,32(1):153-159.
[8] Nakamura H,Mullen JT,Chandrasekhar S, et al. Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil[J]. Cancer Res,2001,61(14):5447-5452.
[9] Li ZY, Ni S, Yang X, et al. Xenograft models for liver metastasis; Relationship between tumor morphology and adenovirus vector transduction[J]. Mol Ther,2004,9(5):650-657.
[10] Ishizu K, Sunose N, Yamazaki K, et al. Development and characterization of a model of liver metastasis using human colon cancer HCT-116 cells[J]. Biol Pharm Bull,2007,30(9):1779-1783.
[11] Lupu CM, Eisenbach C, Lupu AD, et al. Adenoviral B7-H3 therapy induces tumor specific immune responses and reduces secondary metastasis in a murine model of colon cancer[J]. Oncol Rep,2007,18(3):745-748.
[12] Hiraoka K, Kimura T, Logg CR, et al. Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model[J]. Cancer Res,2007,67(11):5345-5353.

[编辑:贺 文;校对:黄国玲]

transcription which may account for the similar unique capacity to induce cyclin D1 promoter activation and anti-estrogen resistance.

Key words:Breast cancer; Antiestrogen resistance; NSP family members; Signaling pathway

摘要:目的 通过比较 NSP-2 与其同源异构体 NSP-1 和 NSP-3 在乳腺癌细胞中诱导抗雌激素耐药和信号途径的异同,揭示 NSP-2 诱导乳腺癌抗雌激素耐药的分子机制。方法 利用细胞计数器计数细胞来检测乳腺癌的 ICI 182,780 耐药性;以 Western blot 检测 Phospho-AKT、Phospho-JNK、Phospho-ERK 和 Phospho-p38 的表达;以荧光素酶活性实验检测 cyclin D1 启动子活性和 TCF/LEF 的转录活性。结果 与同源异构体 NSP-1 和 NSP-3 相比,只有 NSP-2 能激活 cyclin D1 启动子,诱导乳腺癌细胞的抗雌激素耐药。NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 都能激活磷酸化 Akt,NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 都不能激活磷酸化形式的 JNK、ERK 和 p38。只有 NSP-2 能诱导乳腺癌细胞 TCF/LEF 的转录活性。结论 NSP-2 可能通过激活乳腺癌细胞中 TCF/LEF 的转录活性,来发挥其诱导 cyclin D1 启动子活性和抗雌激素耐药。关键词:乳腺癌;抗雌激素抗性;NSP 家族成员;信号通路
中图分类号:R737.9 文献标识码:A
文章编号:1000-8578(2010)02-0153-05

0 引言

非类固醇类抗雌激素药对雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性的乳腺癌有很好的疗效,然而,大约一半 ER 阳性的病人会出现对抗雌激素药的耐药性^[1]。目前,关于耐药性产生的机制仍不明确。Dorssers 等^[2]用逆转录病毒插入突变技术发现,过度表达 BCAR3(breast cancer antiestrogen resistance 3, 乳腺癌抗雌激素耐药基因 3)在体外可将他莫昔芬敏感的乳腺癌细胞转化为他莫昔芬耐药性细胞。Cai 等^[3]研究发现 BCAR3 通过激活乳腺癌细胞 Cyclin D1 启动子活性,来诱导他莫昔芬耐药。

BCAR3 基因属于 NSP(Novel SH2-containing Protein,含有 SH2 结构域的蛋白)家族成员,NSP 家族包含 NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 三个成员,BCAR3 基因又称为 NSP-2 基因,该基因存在于胞质中,为连接蛋白^[4-6]。NSP 家族成员的 N 末端都含有 SH2 结构域,而 C 末端的氨基酸序列和 Ras GTP 酶家族的 GDP 交换因子同源,并且 NSP 家族成员的 C 末端都和 P130CAS 的 C 末端的 SH3 结构域结合,形成蛋白复合体。Cai 等^[7]研究发现 NSP2/BCAR3 过度表达能激活 Rho 家族的 GTP 酶 Rac 和 Cdc42,导致细胞形态改变。Sakakibara 等^[5]报道过度表达 NSP3 通过和 p130Cas 结合成复合体来激活 Rap1。

BCAR3 诱导乳腺癌内分泌治疗耐药的信号转导通路尚不清楚,本文利用 Western blot 和荧光素酶活性实验等检测方法,通过比较 NSP-1、NSP-2/BCAR3 和 NSP-3 在乳腺癌细胞中的对 AKT、MAPK、和 β -catenin 信号转导通路中的作用,探讨 BCAR3 诱导乳腺癌内分泌治疗耐药的分子机制,为揭示乳腺癌内分泌治疗耐药的机制提供坚实的研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

乳腺癌细胞系 MCF-7 在含 10% 血清的 DMEM 中培养,培养液中含有 L-谷氨酰胺和青霉素/链霉素。质粒 pcDNA1、pcDNA1-HA-BCAR3、pcDNA1-HA-NSP1 和 pcDNA1-HA-NSP3 由 Adam Lerner 博士提供(The dept of Haematology and oncology, Boston Medical Center);兔抗 Akt、抗磷酸化 Ser473 Akt、抗磷酸化 Thr202/Tyr204 Erk、抗磷酸化 Thr183/Tyr185 JNK 和抗磷酸化 Thr180/Tyr182 p38 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司;鼠抗 HA 单克隆抗体和 β -actin 购自美国 Santa Cruz 公司;鼠抗 tubulin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司。人兔抗 NSP-1 和 NSP-3 多克隆抗体由 Adam Lerner 博士 (Dept of Medicine, Boston University School of Medicine) 提供。人兔抗 NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 多克隆抗体购自 Abcam 公司,TCF/LEF-1 报告基因质粒 pTOP-FLASH 和对照质粒 pFOP-FLASH 由 David Seldin 博士提供 (Dept of Medicine, Boston University School of Medicine);cyclin D1 报告基因质粒 pGL1745CD1LUC 由 Richard G. Pestell 博士提供 (Division of Endocrinology, Metabolism, and Molecular Medicine, Northwestern University Medical School)。

1.2 实验方法

1.2.1 Western blot 乳腺癌细胞在 60 mm 培养皿中培养,吸净培养液,用 PBS 漂洗。加入 500 μ l 预冷的 NP40 蛋白质裂解液 (1% NP40、150 mM NaCl、50 mM Tris (pH 7.4)、1 mM EGTA、1 mM NaVO4 和蛋白酶抑制剂)。14 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,蛋白定量后,将上清液分为两份,一份为 20 μ g 蛋白质加入等体积的 2 $\times$ SDS sample buffer,混匀后于 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min,做为总细胞裂解液进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,一抗过夜,二抗孵育 1 h,ECL 发光,Western blot 检测目的蛋白的表达。

1.2.2 建立稳定转染 BCAR3/NSP-2 乳腺癌细胞

系 新鲜传代的 MCF-7 细胞系接种于 6 孔板中,待细胞达到 50%~70% 汇合时,将 100 μ l 无血清 DMEM 培养液和 4 μ l FuGene 6 混匀,在室温保持 5 min,然后加入 1 μ g 质粒 DNA,充分混匀,室温放置 30~45 min,将转染试剂及 DNA 混合物加入细胞培养液中,37 $^{\circ}$ C 培养,直至 48 h 后,细胞 1:10 传代入 10 cm 的培养皿中,24 h 后,加入 0.5 g/L 抗生素 G418 筛选,2 天后增加到 1 g/L,每 3 天补充一次 G418。在 2~3 星期后,挑选阳性克隆,转移到 24 孔板。在含 1 g/L 抗生素 G418 的选择培养液中扩增培养,Western blot 验证转染,建立稳定转染 NSP-1 或 BCAR3/NSP-2 或 NSP-3 的乳腺癌细胞系,分别命名为 MCF-NSP-1、MCF-NSP-2 和 MCF-NSP-3,以及转染对照空质粒 pcDNA1,建立对照细胞系 MCF-CT。

1.2.3 ICI 182,780 耐受试验 将乳腺癌细胞系 MCF-NSP-1、MCF-NSP-2、MCF-NSP-3 和 MCF-CT 分别接种于 6 孔板中,每孔 5×10^4 细胞。37 $^{\circ}$ C 培养,24 h 后,每孔加入含有或无 100 nM ICI 182,780 的新鲜培养液,分别设三个平行孔,每 2 天换液一次,在 6 天处理后,消化细胞,1/10 的细胞(约 10^4 个)被转移到含有新鲜培养液的 6 孔板中,在含有或无 100 nM ICI 182,780 的新鲜培养液中培养,每 2 天换液一次。在 6~7 天后,当 80%~90% 汇合时,细胞被消化,并且用标准的细胞计数器计数细胞。

1.2.4 荧光素酶活性实验 为检测 cyclin D1 启动子活性,将 MCF-7 细胞接种于 24 孔板中,每孔 1.5×10^4 个细胞,设立 3 个平行孔,接种后 24 h,大约 50%~60% 汇合,用 cyclin D1 启动子质粒 1745CD1luc 在脂质体的作用下,分别转染 MCF-NSP-1、MCF-NSP-2、MCF-NSP-3 和 MCF-CT 细胞;为检测 DNA 结合蛋白 TCF/LEF-1 的转录活性,将 MCF7 细胞接种于 24 孔板中,每孔 1.5×10^4 个细胞,设立 3 个平行孔;接种后 24 h,用质粒 pTOP-FLASH 或 pFOP FLASH,分别转染 MCF-NSP-1、MCF-NSP-2、MCF-NSP-3 和 MCF-CT 细胞。48 h 后,收集全细胞裂解液,用紫外分光光度计进行蛋白质定量,具体步骤按照用 Promega 公司的双荧光素酶活性测定试剂盒说明书进行,用 TD-20/20 型 Luminometer 荧光素酶检测仪检

测细胞内的荧光素酶活性,以荧光素酶活性的高低作为启动子活性大小的指标。

1.3 统计学方法

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析处理,采用 ANOVA 对多样本均数进行方差分析和多重比较。

2 结果

2.1 Western blot 验证建立稳定表达的细胞系

1 μ g 质粒 pcDNA1 或 pcDNA1-HA-BCAR3 或 pcDNA1-HA-NSP1 或 pcDNA1-HA-NSP3,分别转染乳腺癌细胞系 MCF-7,直至 48 h 后,细胞 1:10 传代入 10 cm 的培养皿中,24 h 后加入 0.5 g/L 抗生素 G418 筛选,在 2~3 星期后,挑选阳性克隆,转移到 24 孔板。在含 1 g/L 抗生素 G418 的选择培养液中扩增培养,Western blot 验证转染成功,实验中发现,NSP-1 和 NSP-3 较易筛选出阳性克隆,约为 1:10,NSP-2/BCAR3 较难筛选克隆,约为 1:30;Western blot 验证成功建立了稳定表达的乳腺癌细胞 MCF-NSP-1、MCF-NSP-2 和 MCF-NSP-3,见图 1。

2.2 ICI 182,780 耐受试验

乳腺癌上皮细胞 MCF-7 为 ICI 182,780(雌激素受体完全拮抗剂)敏感的细胞系,ICI 182,780 能够抑制 MCF-7 的增殖和生长。我们用质粒 pcDNA1-HA-BCAR3 pcDNA1-HA-NSP-1、pcDNA1-HA-NSP-3 和 pcDNA1-HA,转染到乳腺癌上皮样细胞系 MCF-7 中,建立了稳定表达的乳腺癌细胞系 MCF- NSP-1、MCF- NSP-2 和 MCF-NSP-3 和对照细胞系 MCF-CT,和对照细胞相比,转染 NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 对乳腺癌细胞的增殖没有影响。和没有含 100 nM ICI 182,780 的培养液作用的乳腺癌细胞相比,ICI 182,780 能明显抑制 MCF-NSP-1、MCF-NSP-3 和 MCF-CT 的增殖对 MCF-NSP-2 却没有抑制作用。MCF-CT 在 100 nM ICI 182,780 作用下没有增殖,而稳定表达 NSP-2 乳腺癌细胞系在 100 nM ICI 182,780 作用下继续增殖,表现对 ICI 182,780 耐受($P<0.05$)。而和 MCF-CT 相比,高表达 NSP-1 和 NSP-3 的乳腺癌细胞在 100 nM ICI 182,780 作用下没有增殖,没有对 ICI

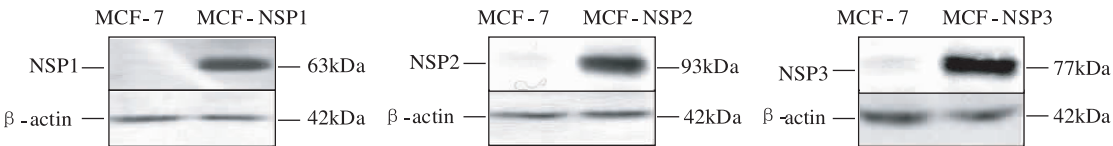


图 1 Western Blot 检测 NSP1、NSP2 和 NSP3 的表达
Figure 1 The expression of NSP1,NSP2 and NSP3

182,780 耐受($P<0.05$),以上实验重复三次,见图 2。

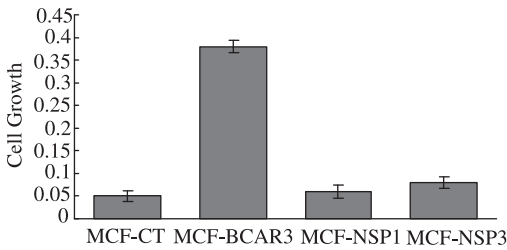


图 2 ICI 182,780 耐受试验
Figure 2 ICI 182,780 resistance assay

2.3 cyclin D1 启动子活性

为检测 NSP-1, NSP-2 和 NSP-3 诱导乳腺癌细胞系中 cyclin D1 启动子活性,用 cyclin D1 启动子质粒 1745 CD1luc 在脂质体的作用下,分别转染 MCF-NSP-1、MCF-NSP-2、MCF-NSP-3 和 MCF-CT 细胞。以上实验重复三次。结果显示与对照空载体相比,过度表达 NSP-2 能上调 cyclin D1 启动子活性 $[4.1 \pm 0.3]$ 倍,而 NSP-1 和 NSP-3 没有这种作用($P<0.01$),见图 3。

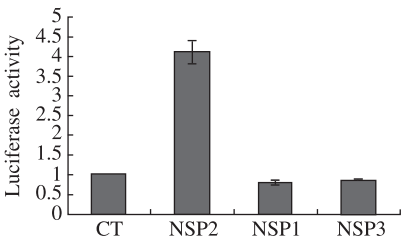


图 3 Cyclin D1 启动子活性
Figure 3 Luciferase activity of Cyclin D1 promoter

2.4 NSP 家族成员激活 Akt 信号通路

为检测是否只有 NSP-2 激活 AKT 信号通路,我们用 pcDNA1-HA-BCAR3、pcDNA1-HA-NSP-1、pcDNA1-HA-NSP-3 和 pcDNA1-HA 分别瞬时转染 MCF-7 细胞,Western blot 检测 473 丝氨酸磷酸化的 Akt,结果表明,和对照质粒相比,NSP-1, BCAR3/NSP-2 和 NSP-3 均能诱导 Akt 丝氨酸磷酸化,见图 4。

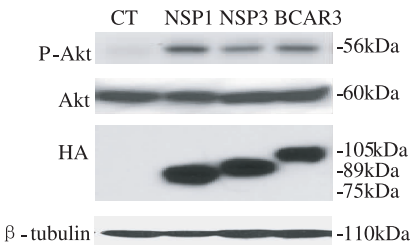


图 4 NSP 家族成员诱导 Akt 磷酸化
Figure 4 The expression Phospho-Akt induced by NSP family members

2.5 NSP 家族成员不能激活 MAPK 信号通路

为对比 NSP 家族成员激活 MAPK 信号通路的能力,以 10 nM Anisomycin 刺激乳腺癌细胞为阳性对照,我们用磷酸化的抗体研究瞬时转染 NSP-1, NSP-2 和 NSP-3 的 MCF-7 细胞中 ERK, JNK 和 p38 的活性,结果表明,和对照质粒相比,NSP-1, NSP-2 和 NSP-3 均不能诱导 ERK, JNK 和 p38 磷酸化,见图 5。

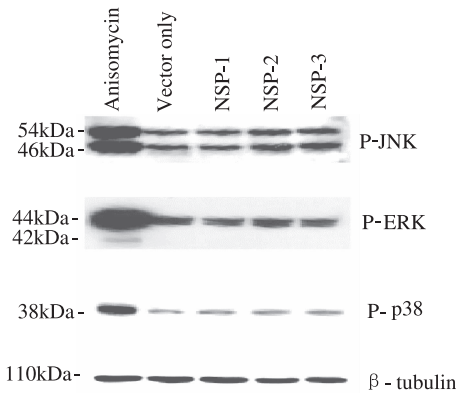


图 5 NSP 家族成员对 MAPK 信号通路的作用
Figure 5 The induction of MAPK signaling by NSP family members

2.6 NSP 家族成员对 Tcf/LEF-1 信号通路的作用

有研究表明,高水平的 β -catenin 在胞质内积聚并向细胞核转移,与转录 Tcf/LEF-1 家族成员结合,激活 Tcf/LEF-1 下游的靶基因表达,导致靶基因包括 cyclin D1 和 D-Myc 等的激活。为了检测 NSP2 过度表达是否激活 Tcf/LEF 信号通路。我们利用含 Tcf/LEF 结合位点的 pTOP-FLASH 和对照质粒 pFOP-FLASH 分别转染 MCF- NSP-1, MCF- NSP-2 和 MCF-NSP-3 和 MCF-CT,和对照空载体相比,NSP2 上调 Tcf/LEF 基因启动子转录活化 (5.1 ± 0.2) 倍。而 NSP-1 和 NSP-3 不能激活 TOP/FOP 的荧光素酶活性,以上结果提示只有 NSP-2 能激活 Tcf/LEF 信号通路($P<0.05$)。以上实验重复三次,见图 6。

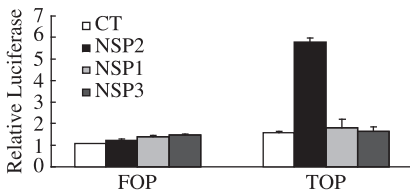


图 6 Tcf/LEF 基因启动子转录活性
Figure 6 Luciferase activity of Tcf/LEF promoter

3 讨论

本研究通过 NSP-1, NSP-2 和 NSP-3 在乳腺癌

细胞中的信号转导通路,以期对乳腺癌内分泌治疗耐药的分子机制有所揭示。Dorssers 等^[2]在筛选乳腺癌抗雌激素耐药基因时,发现了 BCAR1、BCAR2 和 BCAR3 三个耐药基因,没有筛选出 NSP-1 和 NSP-3。NSP-1 主要在胚胎和胰腺组织中表达,可能参与表皮生长因子受体和整合素受体的信号转导通路,而 NSP-3 主要表达于脾、淋巴结和胸腺组织中,可能参与 EphB2 受体信号转导通路^[5]。本研究发现 NSP 三个家族成员中只有 NSP-2 能诱导乳腺癌细胞产生抗雌激素耐药,并激活 cyclin D1 启动子,NSP-1 和 NSP-3 没有上述作用。cyclin D1 在雌激素促乳腺癌细胞增殖中发挥重要作用,他莫昔芬能够阻断 cyclin D1 的表达,Cai 等^[7]利用 TcF/LEF 结合位点突变的 cyclin D1 启动子质粒和 BCAR3 质粒共转染乳腺癌细胞,发现 BCAR3 不能激活该质粒的启动子活性。

临床研究发现 P-AKT 阳性的乳腺癌患者对内分泌治疗的效果较 P-AKT 阴性者差,AKT 的激活可以导致乳腺癌患者对多种类型的内分泌治疗药物耐药^[8]。Felekis 等^[9]发现 BCAR3 首先激活 AKT 信号通路,进而激活 Rac。本研究发现 NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 均能激活磷酸化形式的 AKT。以上结果说明激活 AKT 可能不是抗雌激素耐药产生的主要原因。促细胞分裂原活化激酶(MAP kinase)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,由于不同的细胞外刺激或介导细胞表面至细胞核的信号转导而被激活,由 JNK、P38 和 ERK 亚家族成员组成,参与细胞增殖、凋亡、肿瘤形成和细胞分化等过程^[10]。本研究发现 NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 在乳腺癌细胞中均不能激活 JNK、P38 和 ERK 信号通路。

β -连接素(β -catenin)是 Wnt 通路中重要的信号传递子,其在胞质内的稳定、积累及进核是 Wnt 信号传递的重要步骤。通过 β -catenin 与 T 细胞因子(T cell factor / lymphoid enhancer factor, TCF/LEF)的结合,在核内共同调控靶基因如 c-myc, c-jun, Fra, cyclin D1 等的表达,从而完成 Wnt 信号的传递^[11]。TCF/LEF 是一类具有双向调节功能的转录因子,它与 Groucho 结合抑制基因转录,而与 β -catenin 结合则促进基因转录^[12]。 β -catenin 信号通路能通过刺激 Wnt 信号通路来调节 cyclin D1 启动子,由于 TcF/LEF 结合位点突变,NSP-2 不能介导 cyclin D1 活性。

为检测是否 NSP-2 过度表达能激活 TCF/LEF 信号通路,我们用一对 Top 和 Fop 对照质粒,只有 Top 质粒包含有功能的 TCF/LEF 结合位点,用 Top 或 Fop 质粒和 NSP-2 质粒共转染乳腺癌细胞,

NSP-2 能导致 4.3 倍 Top/Fop 萤光素酶活性比率,而 NSP-1 或 NSP-3 不能改变 Top/Fop 萤光素酶活性。以上结果提示只有 NSP-2 激活 TCF/LEF 的转录活性。与 NSP-1 和 NSP-3 相比,只有 NSP-2 能诱导乳腺癌细胞抗雌激素药的耐药性和诱导 cyclin D1 启动子活性。NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 均能激活磷酸化 Akt,NSP-1、NSP-2 和 NSP-3 均不能激活磷酸化形式的 JNK, ERK 和 p38。

NSP-2 可能通过激活乳腺癌细胞中 TcF/LEF 的转录活性,激活 cyclin D1 启动子,诱导乳腺癌细胞产生对抗雌激素药的耐药性。

参考文献:

- [1] Clarke R, Skaar TC, Bouker KB, et al. Molecular and pharmacological aspects of antiestrogen resistance[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2001,76(1-5):71-84.
- [2] Dorssers LCJ, Van der Flier S, Brinkman A, et al. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms [J]. Drugs,2001,61(12):1721-1733.
- [3] Cai D, Iyer A, Felekis K, et al. AND-34/BCAR3, a GDP exchange factor whose over-expression confers antiestrogen resistance, activates Rac1, Pak1 and the cyclin D1 promoter[J]. Cancer Res, 2003, 63(20):6802-6808.
- [4] Lu Y, Brush J, Stewart TA. NSP1 defines a novel family of adaptor proteins linking integrin and tyrosine kinase receptors to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase signaling pathway[J]. J Biol Chem, 1999, 274(15): 10047-10052.
- [5] Sakakibara A, Hattori S, Nakamura S. A novel hematopoietic adaptor protein, Chat-H, positively regulates T cell receptor-mediated interleukin-2 production by Jurkat cells[J]. J Biol Chem,2003, 278(8):6012-6017.
- [6] Van Agthoven T, van Agthoven TL, Dekker A, et al. Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells[J]. EMBO J,1998, 17(10):2799-2808.
- [7] Cai D, Felekis KN, Near RI, et al. The GDP exchange factor AND-34 is expressed in B cells, associates with HEF1, and activates Cdc42[J]. J Immunol,2003, 170(2):969-978.
- [8] Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, et al. Activation of PI3K/AKT signaling and hormone resistance in breast cancer [J]. Breast Cancer ,2006 ,13 (2) :137-144.
- [9] Felekis KN, Narsimhan RP, Near R, et al. AND-34 activates phosphatidylinositol 3-kinase and induces anti-estrogen resistance in a SH2 and GDP exchange factor-like domain-dependent manner[J]. Mol Cancer Res,2005, 3(1):32-41.
- [10] Simon MA. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals[J]. Cell,2000, 103(1):13-15.
- [11] Prasad CP, Gupta SD, Rath G, et al. Wnt signaling pathway in invasive ductal carcinoma of the breast: relationship between beta-catenin, dishevelled and cyclin D1 expression[J]. Oncology,2007,73(1-2):112-117.
- [12] Ravindranath A, O'Connell A, Johnston PG. The role of LEF/TCF factors in neoplastic transformation[J]. Curr Mol Med, 2008,8(1):38-50.

[编辑:周永红;校对:黄园玲]