

阿法替尼联合 Mithramycin A 对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡及基因表达的影响

黄子凌,黄兰珊,沈思乔,冯振博*

(广西医科大学第一附属医院病理科,广西 南宁 530021)

[摘要] 目的:观察阿法替尼(afatinib)联合 Mithramycin A(MIT)对人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的作用以及相关因子表达的影响。方法:将 afatinib 与 MIT 单独或联合作用于肝癌 HepG2 细胞,采用 MTT 法测定药物对细胞生长的抑制率,并运用倒置显微镜观察药物作用后细胞形态学变化;以流式细胞技术测定药物对细胞周期和凋亡的影响;以实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)定量测定细胞内表皮生长因子受体(EGFR)、Sp1、Sp3 以及增殖、凋亡相关因子 Cyclin-D1、Cyclin-E2、Bcl-2、Caspase3、Caspase9 和 p53 的表达变化。结果:afatinib 与 MIT 均能有效抑制肝癌 HepG2 细胞的生长,并且呈现时间依赖性,两药联合作用能明显增加抑制率($P < 0.05$);联合用药 48 h 后,可诱导 HepG2 细胞产生 G_0/G_1 期阻滞并诱发凋亡,抑制作用及凋亡率均较单药组增高($P < 0.05$);另外,给药 72 h 后,单药组均出现不同程度的 Cyclin-D1、Cyclin-E2、Bcl-2 mRNA 表达量下降,并伴有 Caspase3 基因上调。单用 afatinib 组同时出现 Caspase9 和 p53 的表达上调,MIT 组检测到 EGFR、Sp1 和 Sp3 的同步减少,联合用药组以上改变较单药组明显($P < 0.05$)。结论:afatinib 联合 MIT 能有效抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、促进凋亡,这可能与药物作用后 Cyclin-D1、Cyclin-E2、Bcl-2 下调以及 Caspase3、Caspase9 和 p53 的表达上调相关。此项研究可能为以 EGFR 为中心的肝癌联合治疗提供新方向。

[关键词] 肝细胞癌;HepG2 细胞;阿法替尼;Mithramycin A;表皮生长因子受体;Sp1

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-638-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150508

The influence on cell proliferation and apoptosis of combined afatinib with Mithramycin A in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Huang Ziling, Huang Lanshan, Shen Siqiao, Feng Zhenbo*

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect on proliferation and apoptosis after treatment with afatinib and Mithramycin A (MIT) in hepatocellular carcinoma cell line HepG2, and detect the aberrant expression of related factors. **Methods:** HepG2 cells were treated by afatinib, MIT, and combination of two. MTT and flow cytometry (FCM) were used to observe cell viability and apoptosis. EGFR, Sp1, Sp3 and genes, which were related to proliferation and apoptosis like Cyclin-D1, Cyclin-E2, Bcl-2, Caspase3, Caspase9 and p53, were analyzed by qRT-PCR. **Results:** With the administration time increasing, the inhibition rate of HepG2 cells apparently raised, while the group treated by afatinib and MIT exhibited dramatic ascending ($P < 0.05$). In addition, FCM also confirmed that Combination of afatinib and MIT arrested HepG2 cells in G_0/G_1 phase, and the highest apoptosis rate appeared in combined group ($P < 0.05$). The level of Cyclin-D1, Cyclin-E2 and Bcl-2 in HepG2 cells incubated with both afatinib and MIT were obviously down-regulated, while Caspase3 up-regulated. Besides, afatinib enhanced expression of Caspase9 and p53, while MIT down-regulated the level of EGFR ($P < 0.05$). **Conclusion:** Afatinib combined with MIT significantly suppressed proliferation and induced apoptosis in HepG2 cells by inhibiting of Cyclin-D1, Cyclin-E2 and Bcl-2 coupled with increase of Caspase3, Caspase9 and p53. Moreover, our results probably provide a novel EGFR-centered strategy for future combined targeting therapy in HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma; HepG2 cell line; afatinib; Mithramycin A; EGFR; Sp1

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 638-643]

[基金项目] 广西科技攻关基金资助(1298003-2-5, 10124001A-1);广西研究生教育创新计划资助(YCSZ2014099)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guanghu1963@126.com

肝癌是世界常见恶性肿瘤之一,治疗上以手术为主,非手术患者以经导管肝动脉化疗栓塞术(TACE)应用广泛,但预后仍较差,综合性个体化治疗方案将成为未来发展趋势。化疗作为其中一项重要手段,在肿瘤治疗中不可或缺,但一直未取得突破,多种药物联合化疗将成为探索肝癌靶向治疗的新方向^[1-3]。表皮生长因子受体(EGFR)基因突变与多种肿瘤发展密切相关,也是近年来靶向治疗的研究热点。在肝癌中 EGFR 过量和突变都会参与肿瘤形成^[4-7]。美国 FDA 推荐的 EGFR 突变基因靶向药物包括阿法替尼(afatinib)等酪氨酸激酶抑制剂类抗癌药,但此类药物抗肝癌的效果并不显著。近期有研究表明,afatinib 等仅作用于肝癌细胞中的 EGFR,忽略了更为重要的肝巨噬细胞中 EGFR 的影响^[8-10]。故联合多种手段增强 EGFR 抑制剂的作用,是提高肝癌对 afatinib 等抗癌药敏感性的重要突破口。目前研究发现,机体内核转录因子 Sp1 参与肝脏疾病中多种基因的转录调控^[11-14]。其中,Sp1 能有效增强 EGFR 的转录活性。同时本课题组前期研究提示,与 Sp1 结构相似的 Sp 家族成员 Sp3,在肝癌中也会通过影响 EGFR 参与肿瘤形成^[15-18]。若能对 EGFR 产生最大程度的抑制,可能提高以 EGFR 为靶点的肝癌对化疗的敏感性。本研究拟探索联合 afatinib 及 Sp1 特异性抑制剂 Mithramycin A (MIT)后,对肝癌细胞株 HepG2 增殖与凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌 HepG2 细胞株(中国科学院上海细胞库);afatinib (BIBW2992,Boehringer-Ingelheim,德国);MIT (Sigma 公司,美国);DMEM(高糖)培养液、胰蛋白酶和胎牛血清(Wisent 公司,南京);青链霉素(索莱宝公司,北京);RNA 提取试剂盒(Axygen 公司,美国);cDNA 逆转录试剂盒(Thermo Scientific 公司,美国);FastStart 480 SYBR Green Master (ROX, Roche 公司,瑞士);RNase-Free Water (碧云天公司,上海);荧光定量 PCR 引物(Invitrogen 公司,上海);四甲基偶氮唑盐(MTT,Sigma 公司,美国);流式细胞术检测细胞周期试剂盒、Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(凯基生物公司,南京);流式细胞仪(Accuri C6,BD 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2 培养于含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,于 37℃、含 5% CO₂ 恒温孵

育箱培养。

1.2.2 MTT 法分析细胞生长抑制率

将对数生长期细胞接种于 96 孔板,1×10⁴ 个/孔,单药组分别给予不同浓度 afatinib 和 MIT,设置浓度梯度为 50、100、200、400 和 800 nmol/L,相应的对照组给予 DMSO,每组细胞均设 5 个复孔;分别于处理 72 h 后加入 20 μL MTT 溶液;孵育箱培养 4 h 后,小心吸去培养液,每孔加入 150 μL DMSO;酶标仪检测 570 nm 处吸光度(A)值,根据 5 个浓度的吸光度(A)值,用 GraphPad Prism 5.0 软件分别计算两药 72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)。将两药计算所得 72 h 的 IC₅₀ 值作为 afatinib 单药组(A 组)、MIT 单药组(M 组)和 afatinib+MIT 联合用药组(A+M 组)固定给药浓度,设置相应 DMSO 对照组。对以上各组细胞在培养 24、48、72、96 h 后按上述检测方法处理,酶标仪读取 570 nm 处吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率。抑制率计算公式如下:

细胞生长抑制率(%)=[(1-(实验组 A 值-调零孔 A 值))/(对照组 A 组-调零孔 A 值)]×100%

1.2.3 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

细胞周期检测:6 组细胞经胰酶消化后每管收集约 1×10⁶ 个细胞;经预冷的 PBS 洗 3 次,离心后去上清;加入 100 μL RNase,于 37℃水浴 30 min;再每管加入 500 μL PI 染液,混匀置室温避光孵育 30 min;流式细胞仪上机检测。凋亡检测:每管收集约 1×10⁶ 个细胞;经预冷的 PBS 洗 3 次后离心去上清,加入 500 μL Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 的 PI,室温避光反应 15 min,流式细胞仪上机检测。

1.2.4 qRT-PCR

将 6 组细胞分别提取总 RNA 并逆转录为 cDNA,以 β-actin 为内参,对增殖、凋亡相关因子 Cyclin-D1、Cyclin-E2、Bcl-2、Caspase3、Caspase9 和 p53 进行 qRT-PCR。引物序列如表 1 所示。结果采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,数据用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,用 LSD 法进行两两比较。*P* ≤ 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 形态学观察

倒置显微镜观察单药组(afatinib 组和 MIT 组)

表1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primers of qRT-PCR

| 基因名称 | 引物序列(5'→3') |
|-----------|---|
| β-actin | F: GCACCACACCTTCTACAATGAGC R: GGATAGCACAGCCTGGATAGCAAC |
| EGFR | F: CGAGGGCAAATACAGCTT R: AAATTCACCAATACCTATT |
| Sp1 | F: TCCAGACCATTAACCTCAGTGC R: TGTATTCCATCACCACCAGCC |
| Sp3 | F: GCTTGCACCTGTCCCAACTGTA R: CTCCAGAATGCCAACGCAGA |
| Cyclin-D1 | F: GGGCCACTTGCATGTTCGT R: CAGGTTCCACTTGAGCTTGTTCAC |
| Cyclin-E2 | F: TGGGAACCTTGTCTGTAACAATCA R: CACAAGGCAGCAGCAGTCAGTA |
| Bcl-2 | F: AGTTCGGTGGGGTCATGTGTGC R: CTTCAGAGACAGCCAGGAGAAATC |
| Caspase3 | F: AAGCGAATCAATGGACTC R: TTCCTGACTTCATATTTCAA |
| Caspase9 | F: GGCTGTCTACGGCACAGATGGA R: CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG |
| p53 | F: GAGGGATGTTTGGGAGATGTAA R: CCCTGGTTAGTACGGTGAAGTG |

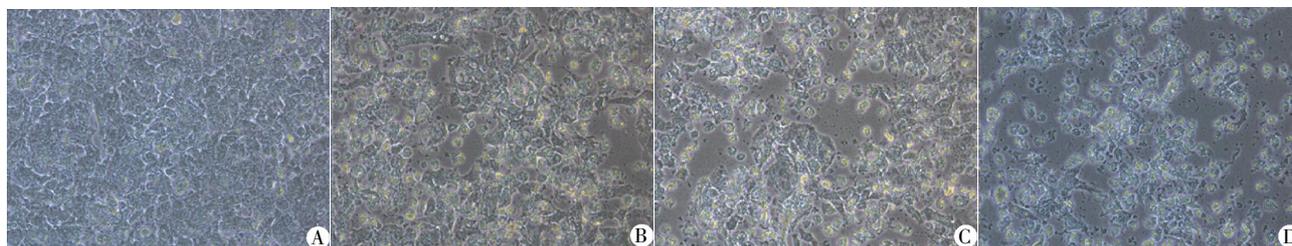
以及联合用药组 (afatinib+ MIT 组)HepG2 细胞的形态学改变(图 1)。镜下见给药 48 h 后,与 DMSO 对照组相比,给药组细胞生长状态均明显变差,细胞变圆、脱落,细胞碎片增多,与周围失去连接。联合用药组细胞状态明显较单药组差。

2.2 afatinib 联合 MIT 对 HepG2 细胞生长的抑制作用

afatinib 和 MIT 单独与联合用药均能抑制 HepG2 细胞生长,afatinib 和 MIT 在单独给药 72 h 后 IC₅₀ 分别为 400.3 nmol/L 和 201.8 nmol/L,以此浓度作为两药后续实验固定给药浓度。MTT 法显示随着时间的增加,单药组(400.3 nmol/L afatinib 组和 201.8 nmol/L MIT 组,A 组和 M 组)和联合用药组(400.3 nmol/L afatinib+ 201.8 nmol/L MIT 组,A+M 组)HepG2 细胞株的生长抑制作用均增大,且用药 48 h 开始,各时间点(48、72、96 h)联合用药组抑制作用较单药组显著增加($P < 0.001$,图 2)。

2.3 afatinib 联合 MIT 对 HepG2 细胞周期及凋亡的影响

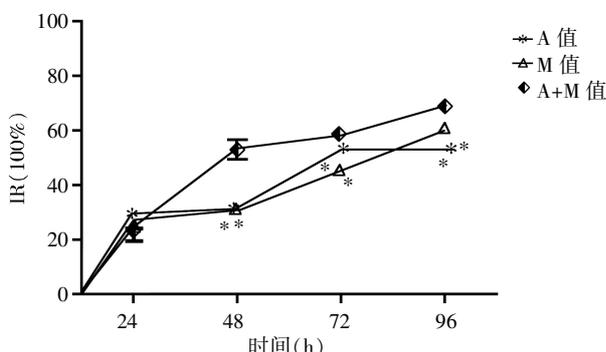
afatinib (400.3 nmol/L) 与 MIT (201.8 nmol/L)



A: DMSO 组; B: A 组; C: M 组; D: A+M 组。

图 1 给药 48 h 后细胞形态学改变(×200)

Figure 1 Morphologic changes of HepG2 cells after treatment with drugs for 48 h(×200)



与 A+M 组比较, * $P < 0.001$ 。

图 2 不同药物对 HepG2 细胞生长的影响

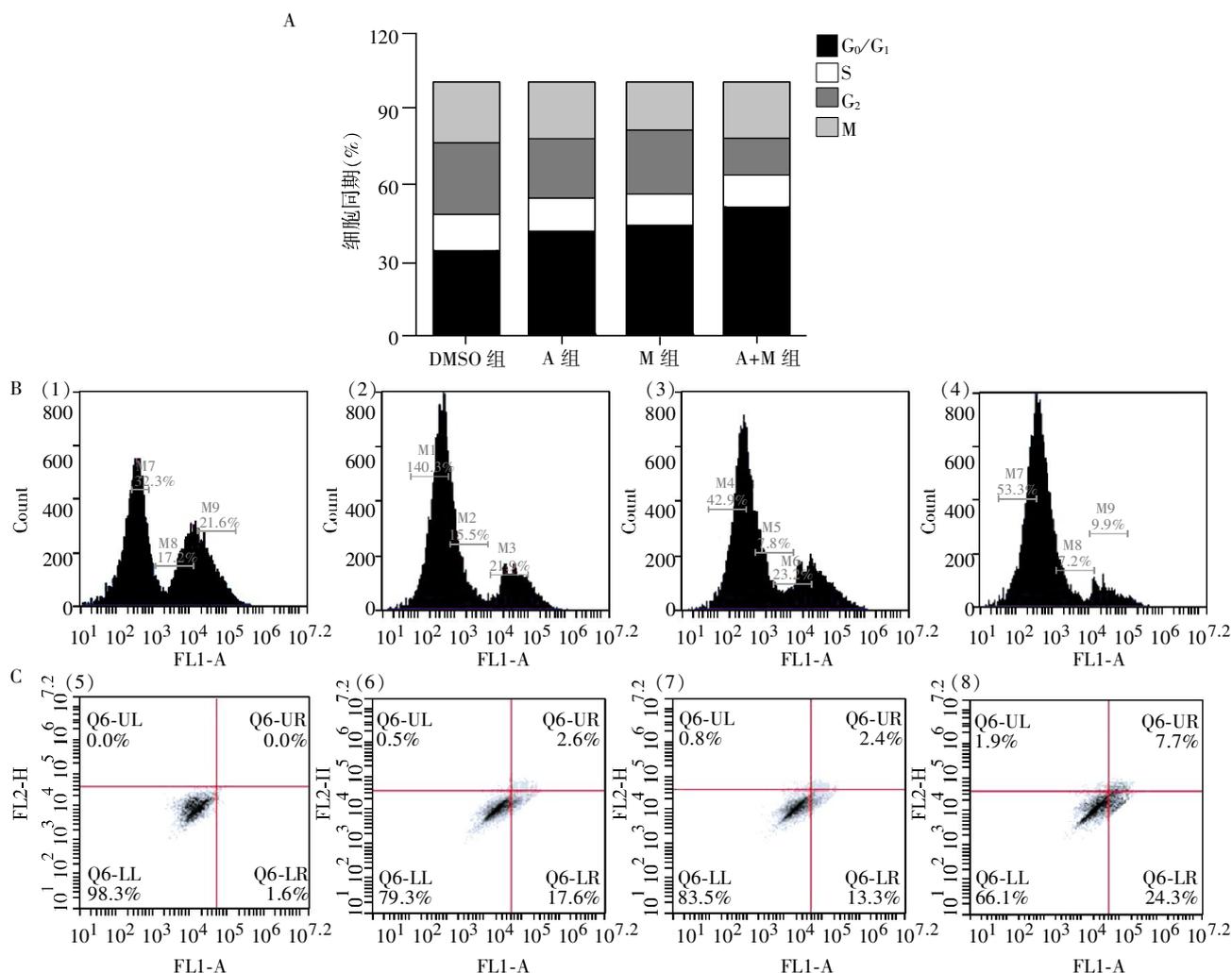
Figure 2 The effect of treatment with different drugs on HepG2 cells proliferation

在给药 48 h 后,单药组(A 组和 M 组)以及联合用药组(A+M 组)细胞均出现 G₀/G₁ 期阻滞,各组均较对照组明显增加,其中 A+M 组较单药组变化更

为明显($P < 0.05$,图 3A、B 和表 2)。同时,HepG2 细胞凋亡率也显著增加,A 组 18.26%、M 组 16.20% 均明显高于相应对照组 1.60%。联合用药 A+M 组凋亡率高达 26.35%,明显高于单药组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3C 和表 3)。

2.4 afatinib 联合 MIT 对 HepG2 细胞 EGFR、Sp1、Sp3 及增殖凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

结果显示 MIT 除了明显下调 Sp1 和 Sp3 的表达,还同时减少 EGFR 含量,而 afatinib 并不对 Sp1 和 Sp3 产生影响(图 4A)。afatinib 与 MIT 均显著下调周期相关因子 Cyclin-D1 和 Cyclin-E2 的表达,联合用药对 Cyclin-E2 下调的作用更为明显(图 4B)。此外,在凋亡相关基因的检测中,afatinib 和 MIT 显著下调 Bcl-2、上调 Caspase3 基因,而 afatinib 还同时上调 Caspase9 和 p53,联合给药后,Caspase9 和



A:不同药物对细胞周期时相分布的影响;B:不同药物对细胞周期的影响(流式结果图);C:不同药物对凋亡的影响(流式结果图)。1~4: DMSO组、A组、M组、A+M组周期图;5~8: DMSO组、A组、M组、A+M组凋亡图。

图 3 不同药物对细胞周期时相分布和凋亡的影响

Figure 3 Influence on distribution of cell cycle phase and apoptosis after incubation with normal medium (DMSO) or different drugs for HepG2 cells

表 2 不同药物处理后的细胞周期时相分布和细胞凋亡率

Table 2 Distribution of cell cycle phase and apoptosis rate after incubation with normal medium (DMSO) or different drugs for HepG2 cells (% , $\bar{x} \pm s$)

| 分组 | G ₀ /G ₁ 期 | S期 | G ₂ 期 | M期 | 凋亡率 |
|----------|----------------------------------|--------------|----------------------------|--------------|----------------------------|
| DMSO 对照组 | 33.29 ± 1.16 | 13.30 ± 1.33 | 30.97 ± 2.30 | 22.44 ± 3.00 | 1.60 ± 0.17 |
| A 值 | 41.14 ± 4.26 ^{*#} | 12.86 ± 3.68 | 24.03 ± 3.90 ^{*#} | 21.98 ± 2.69 | 18.26 ± 0.81 ^{**} |
| M 值 | 43.47 ± 3054 ^{*#} | 12.59 ± 5.26 | 25.66 ± 8.89 [#] | 18.29 ± 4.46 | 16.20 ± 1.52 ^{**} |
| A+M 值 | 50.62 ± 2.75 [*] | 12.40 ± 5.02 | 15.45 ± 3.88 [*] | 21.54 ± 5.84 | 26.35 ± 3.86 ^{**} |

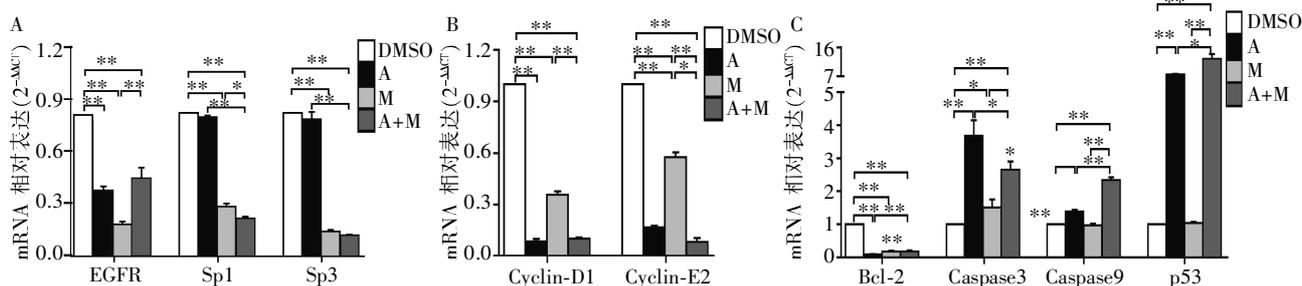
与 DMSO 对照组比较, * $P < 0.05$; 与 A+M 组比较, [#] $P < 0.05$ 。

p53 的上调更加显著(图 4C)。

3 讨论

目前,原发性肝癌的术后复发、预后差等问题仍旧是综合性个体化治疗要攻克的难题。化疗作为综合性治疗手段之一,在肝癌治疗中占据重要地

位,但其成效相对其他肿瘤较差^[1-3]。故探寻新靶标、多药物联合化疗是肝癌靶向治疗研究的重点。EGFR 突变基因参与肝癌的形成,然而临床对抗肝癌时发现其抑制剂如 afatinib 等效果令人失望。有新研究提出此类药物的问题在于忽略了非肿瘤细胞中 EGFR 的影响,肿瘤细胞中 EGFR 的过量表达



A: MIT同时导致EGFR和Sp1、Sp3的表达下调,afatinib不影响Sp1和Sp3表达;B: 3组给药组周期相关因子Cyclin-D1和Cyclin-E2表达下调;C: 单药组凋亡相关因子Bcl-2下调、Caspase3上调,伴有afatinib组Caspase9和p53上调,联合用药较单药组变化明显。两组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.001。

图4 qRT-PCR检测增殖和凋亡相关因子在不同给药组HepG2细胞中的表达

Figure 4 The change of mRNA expression for factors related to proliferation and apoptosis in HepG2 cells treated with different drugs

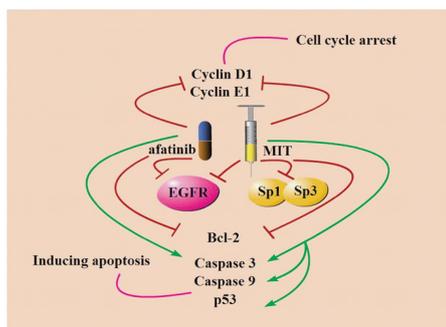


图5 afatinib联合MIT作用模式图

Figure 5 A model proposing the possible mechanism of afatinib and MIT

和突变并不是其参与肝癌形成的唯一方式^[9]。由此可见,联合其他手段多方位加强对突变型EGFR的抑制,是增加肝癌对afatinib等药物敏感性的突破口。

本研究观察到联合转录因子Sp1抑制剂MIT后,能够有效提高afatinib对肝癌HepG2细胞生长的抑制作用,更大程度地阻滞细胞于G₀/G₁期,并诱导细胞凋亡。可见,afatinib联合MIT后能增强单独给药对HepG2细胞的影响。同时,在抑制增殖、诱导凋亡的过程中引发相关基因表达的改变,可能的机制见药物作用模式图(图5)。由图所示,afatinib与MIT均可通过下调Cyclin-D1和Cyclin-E2使细胞阻滞在G₀/G₁期,并且下调Bcl-2、上调Caspase3含量影响细胞凋亡。同时,afatinib还能通过上调Caspase9和p53参与诱导细胞凋亡。此外,MIT能下调EGFR的表达,可能以此协助增强afatinib的作用。有文献报道Sp1参与EGFR基因的转录调控,本课题组前期还发现,Sp家族中与Sp1结构功能相似的Sp3,也对肝癌中EGFR的表达有调控作用^[15]。由此可见,由于转录因子Sp1、Sp3对EGFR存在调控,当MIT抑制Sp1和Sp3后,两者下游调控的

EGFR也相应减少,此环节与afatinib作用类似。故两药联合运用后,可对HepG2产生较为一致的抑制效应。

现有研究认为EGFR存在于许多细胞类型中,它的过量和(或)突变是造成各种肿瘤生长和增殖的原因,故一直是多种治疗策略的关键点。如何最大程度地提高靶向药物的作用,一直是综合治疗研究发展的方向^[7,19-20]。本研究发现转录因子Sp1抑制剂MIT可能通过改变EGFR的含量而参与增强afatinib对肝癌细胞HepG2促进增殖、诱导凋亡的作用,这为EGFR抑制剂的联合用药提供一条新思路。MIT是否可以同时改变参与肝癌形成的非肿瘤细胞中过量EGFR的表达,以及更为细致的联合作用机制等问题有待下一步更深入的研究,合理联合肝癌中多靶点的治疗以及改良EGFR的靶向治疗,均具有良好的开发前景。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90
 [2] Imai N, Ishigami M, Ishizu Y, et al. Transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: A review of techniques[J]. World J Hepatol, 2014, 6(12): 844-850
 [3] EASL-EORTC clinical practice guidelines: Management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2012, 56(4): 908-943
 [4] Huang P, Xu X, Wang L, et al. The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(2): 218-230
 [5] Ezzoukhy Z, Louandre C, Trecherel E, et al. EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib[J]. Int J Cancer, 2012, 131(12): 2961-2969

- [6] Berasain C,Ujue Latasa M,Urtasun R,et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)crosstalks in liver cancer [J]. *Cancers*(Basel),2011,3(2):2444-2461
- [7] Berasain C,Avila MA. The EGFR signalling system in the liver;From hepatoprotection to hepatocarcinogenesis [J]. *J Gastroenterol*,2014,49(1): 9-23
- [8] Yoshiya S,Fujimoto Y,Bekki Y,et al. Impact of epidermal growth factor single-nucleotide polymorphism on recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy in patients with chronic hepatitis C virus infection [J]. *Cancer Sci*,2014,105(6):646-650
- [9] Lanaya H,Natarajan A,Komposch K,et al. EGFR has a tumour-promoting role in liver macrophages during hepatocellular carcinoma formation [J]. *Nat Cell Biol*,2014,16(10):972-981
- [10] Fuchs BC,Hoshida Y,Fujii T,et al. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*,2014,59(4):1577-1590
- [11] Yin P,Zhao C,Li Z,et al. Sp1 is involved in regulation of cystathionine gamma-lyase gene expression and biological function by PI3K/Akt pathway in human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Cell Signal*,2012,24(6):1229-1240
- [12] Kitadai Y,Yasui W,Yokozaki H,et al. The level of a transcription factor Sp1 is correlated with the expression of EGF receptor in human gastric carcinomas [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1992,189(3):1342-1348
- [13] Li L,Davie JR. The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology [J]. *Ann Anat*,2010,192(5):275-283
- [14] Sankpal UT,Maliakal P,Bose D,et al. Expression of specificity protein transcription factors in pancreatic cancer and their association in prognosis and therapy [J]. *Curr Med Chem*,2012,19(22):3779-3786
- [15] 黄兰姗,李海荣,陈 罡,等. Sp3 表达下调后肝癌细胞株 HepG2 基因表达谱的变化 [J]. *世界华人消化杂志*,2014,18(11):1495-1503
- [16] 黄兰姗,黄子凌,冯振博,等. Sp3 对 β -catenin 基因转录调控作用初探 [J]. *中国病理生理杂志*,2014,30(11):2066-2070
- [17] 莫伟嘉,李 佳,陆会平,等. Sp3 与 VEGF 在肝细胞癌中的表达及相关性 [J]. *世界华人消化杂志*,2012,20(32):3101-3106
- [18] 陆会平,李 佳,莫伟嘉,等. RNAi 沉默 Sp3 基因对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 [J]. *世界华人消化杂志*,2012,20(27):2595-2600
- [19] Melosky B. Review of EGFR TKIs in metastatic NSCLC, including ongoing trials [J]. *Front Oncol*,2014,4:244
- [20] Cheng X,Chen H. Tumor heterogeneity and resistance to EGFR-targeted therapy in advanced nonsmall cell lung cancer:challenges and perspectives [J]. *Onco Targets Ther*,2014,7:1689-1704

[收稿日期] 2015-01-13

(上接第 630 页)

- [10] Jin N,Cho SN,Raso MG,et al. Mig-6 is required for appropriate lung development and to ensure normal adult lung homeostasis [J]. *Development*,2009,136(19):3347-3356
- [11] Anastasi S,Baietti MF,Frosi Y,et al. The evolutionarily conserved EBR module of RALT/MIG6 mediates suppression of the EGFR catalytic activity [J]. *Oncogene*,2007,26(57):7833-7846
- [12] Yoon YK,Kim HP,Song SH,et al. Down-regulation of mitogen-inducible gene 6,a negative regulator of EGFR, enhances resistance to MEK inhibition in KRAS mutant cancer cells [J]. *Cancer Lett*,2012,316(1):77-84
- [13] Chang X,Izumchenko E,Solis LM,et al. The relative expression of Mig6 and EGFR is associated with resistance to EGFR kinase inhibitors [J]. *PLoS One*,2013,8(7):e68966
- [14] Fiorini M,Ballaro C,Sala G,et al. Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors,is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control [J]. *Oncogene*,2002,21(42):6530-6539
- [15] Hopkins S,Linderoth E,Hantschel O,et al. Mig6 is a sensor of EGF receptor inactivation that directly activates c-Abl to induce apoptosis during epithelial homeostasis [J]. *Dev Cell*,2012,23(3):547-559
- [16] Li Z,Qu L,Zhong H,et al. Low expression of Mig-6 is associated with poor survival outcome in NSCLC and inhibits cell apoptosis via ERK-mediated upregulation of Bcl-2 [J]. *Oncol Rep*,2014,31(4):1707-1714
- [17] Ying H,Zheng H,Scott K,et al. Mig-6 controls EGFR trafficking and suppresses gliomagenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2010,107(15):6912-6917

[收稿日期] 2015-01-29