

· 基础研究 ·

GW5074 抑制高剂量小范围放射线诱导的肺泡上皮细胞间质转化

李三科¹, 洪振宇¹, 苗战会¹, 霍晓庆², 王颖拓², 路平^{1*}

¹新乡医学院第一附属医院肿瘤科, ²放疗科, 河南 新乡 453100

[摘要] 目的: 评估 C-Raf 抑制剂 GW5074 对高剂量小范围放射线诱导的肺泡上皮细胞间质转化的影响。方法: 观察 GW5074 处理对高剂量放射线引起的细胞形态学改变; 细胞经 GW5074 处理或转染 sh-Twist1 后, 通过 Western blot 检测 C-Raf、p-C-Raf、Twist1、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和 E-钙黏蛋白(E-cadherin)的表达量。应用高剂量小范围放射线照射小鼠后, 通过对损伤组织的 HE 染色及免疫荧光染色观察上皮间质转化现象。结果: 在细胞实验中, GW5074 可有效减轻高剂量放射线引起的细胞形态学变化。高剂量放射线可使 C-Raf 蛋白激活, 且在照射后 48 h 的作用最强。照射前应用 GW5074 和 sh-Twist1 预处理, 能使 Twist1 和 α -SMA 的表达量减少而 E-cadherin 的表达量增加, sh-Twist1 组 p-C-Raf 的表达量与照射组无明显差异。在动物实验中, GW5074 可有效减轻放射线造成肺损伤的程度, 明显减少 α -SMA 并增强 E-cadherin 的表达。结论: GW5074 可能通过抑制 C-Raf/Twist1 信号通路有效减轻高剂量小范围放射线诱导的肺泡上皮细胞间质转化。

[关键词] GW5074; C-Raf/Twist1; 高剂量小范围; 小鼠肺泡上皮细胞; 上皮-间质转化

[中图分类号] R815.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)11-1555-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20191101

GW5074 inhibits alveolar epithelial cell mesenchymal transition caused by high-dose small-volume radiation

Li Sanke¹, Hong Zhenyu¹, Miao Zhanhui¹, Huo Xiaoqing², Wang Yingtuo², Lu Ping^{1*}

¹Department of Oncology, ²Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100, China

[Abstract] **Objective:** To assess the effect of GW5074 on the alveolar epithelial cell mesenchymal transition caused by high-dose small-volume radiation. **Methods:** In cell experiments, the morphological changes of cells before and after GW5074 treatment were observed. The expressions of C-Raf, p-C-Raf, Twist1, α -SMA and E-cadherin were detected by Western blot. After high-dose small-volume irradiation on mouse, the epithelial to mesenchymal transition of the injured tissues was observed by means of HE staining and immunofluorescence staining. **Results:** GW5074 alleviated effectively the morphological changes caused by high-dose irradiation. High-dose irradiation may activate C-Raf protein with the strongest effect at 48 hours after the irradiation. Pre-treatment by GW5074 and sh-Twist1 before irradiation can reduce the expressions of both Twist1 and α -SMA while increasing the expression of E-cadherin. The expression of p-C-Raf in the sh-Twist1 group was not significantly different from that in the irradiated group. **Conclusion:** By inhibiting the C-Raf/Twist1 signal path, GW5074 may effectively attenuate the alveolar epithelial cell mesenchymal transition caused by high-dose small-volume irradiation.

[Key words] GW5074; C-Raf/Twist1; high dose small volume; mouse alveolar epithelial cell; epithelial-to-mesenchymal transition

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(11): 1555-1560, 1566]

[基金项目] 河南省放射性损伤转化医学国际联合实验(豫科外[2017]21号); 河南省高层次人才国际化培养资助计划(豫外专[2018]10号); 新乡医学院高峰高原学科建设工程项目(2017)27号)

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

肺癌是发病率和死亡率增长最快,对人群健康威胁最大的恶性肿瘤之一。60%的患者单独或在联合手术、化疗的同时接受放射治疗,放疗已是肺癌的成功治疗模式之一。立体定向消融放疗(stereotactic body radiotherapy, SBRT)作为一种新兴的放疗模式^[1],是近年来放疗所取得的一个突破性进展。与传统的常规分割放射治疗(低剂量大范围)不同的是,SBRT对正常组织的损伤形式是高剂量小范围(high dose small volume, HDSV)损伤。SBRT因其剂量分布锐利,有效地减少了治疗次数,逐渐成为替代手术治疗的热门治疗手段。虽然SBRT有其自身优势,但它对肿瘤周围正常组织也会有损伤作用,其常见并发症是放射性肺损伤^[2],包括放射性肺炎和肺纤维化,严重影响患者的生活质量。

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)即上皮细胞表型转变为间质细胞表型的过程^[3],EMT在特发性肺纤维化和实验性纤维化中已见报道^[4]。另有研究发现HDSV放射线作用下肺血管内皮细胞向间质细胞的转变早于肺泡表皮细胞向间质细胞的转变,且它们最终都会导致肺纤维化的发生^[5]。E-钙黏蛋白(E-cadherin)是一种上皮标志物,主要参与细胞间相互作用并保持细胞结构完整性^[6]。 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)是一种间质标志物,受肌成纤维细胞的激活并释放出来,并赋予其强烈的收缩特性^[7]。Twist1是一种高度保守的碱性螺旋-环-螺旋转录因子家族的重要成员,近来很多研究表明它在EMT中发挥了关键的调控作用^[8]。

C-Raf是由648个氨基酸残基组成的具有内源性丝苏氨酸蛋白激酶活性的蛋白质,在细胞增殖分化的信号转导系统中起着枢纽作用,至今已有许多关于C-Raf与肝纤维化的研究^[9],但其在放射性肺损伤中的研究却少见报道。GW5074作为一种有效、特异性的C-Raf抑制剂,在小脑颗粒神经元细胞^[10]、人骨髓白血病细胞^[11]中均可通过抑制C-Raf的活性而发挥相应的作用。本研究采用高剂量放射线作用下的小鼠肺泡上皮细胞MLE-12和HDSV照射后的C3H/HeJCr小鼠作为研究对象,探讨GW5074在HDSV放射线诱导的肺泡上皮细胞EMT中的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠肺泡上皮细胞MLE-12购自美国ATCC细胞库。C3H/HeJCr小鼠由韩国延世大学医学院实验

动物中心惠赠。GW5074(美国MCE公司)。兔抗小鼠单克隆抗体C-Raf、p-C-Raf、E-cadherin、GAPDH和E-cadherin偶联抗体(美国Cell Signaling公司),兔抗小鼠多克隆抗体 α -SMA和Twist1(英国Abcam公司)。Western blot二抗HRP标记山羊抗兔(上海尤维宁公司), α -SMA荧光二抗(美国EARTHx公司)。sh-Twist1由上海吉玛公司合成,其序列为:正义链5'-CCTGAGCAACAGCGAGGAA-3';反义链5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。小动物辐照仪X-RAD 320购自美国PXi公司。

1.2 方法

1.2.1 形态学分析

为了解GW5074对高剂量放射线引起MLE-12细胞形态学改变的影响,培养细胞生长至60%,用GW5074(10 μ mol/L)处理细胞2 h,然后以8 Gy的X射线照射细胞,照射后放置72 h,在显微镜下拍照。

1.2.2 Western blot 实验

用8 Gy的X射线照射MLE-12细胞,分别提取照射后6、12、24、48、72 h的细胞,并设立空白对照组,加入RIPA裂解液裂解细胞,BCA法测蛋白浓度。采用SDS-PAGE凝胶电泳,电泳结束后转至PVDF膜,5%BSA室温封闭1 h,加入C-Raf抗体(1:1 000)、p-C-Raf抗体(1:1 000)、GAPDH抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST漂洗3次每次10 min。漂洗结束后加入相应二抗,室温孵育1 h。加入超敏化学发光液发光,在化学发光仪上扫描并保存图像。

在照射前分别用GW5074和sh-Twist1处理MLE-12细胞,并分为以下4组:空白组、照射组、GW5074+照射组、sh-Twist1+照射组。另外,GW5074和sh-Twist1各自设立对照组测其抑制率。然后加入p-C-Raf抗体(1:1 000)、Twist1抗体(2.5 μ g/mL)、 α -SMA抗体(1 μ g/mL)、E-cadherin抗体(1:1 000)、GAPDH抗体(1:1 000)。4 $^{\circ}$ C孵育过夜,加入相应二抗,在化学发光仪上成像并处理图像。

1.2.3 HE 染色

取15只8周龄的雄性小鼠,随机分为空白对照组、照射组、GW5074+照射组,每组5只,用氯胺酮(100 mg/mL)将小鼠麻醉后,将GW5074(2 mg/kg)注射至小鼠腹腔,其他各组注射等量的PBS(每3 d注射1次直至小鼠被处死)。然后使用X-RAD 320辐照器将75 Gy的X射线(照射直径为3 mm)照射至小鼠右肺。照射后6周将小鼠处死,制备肺组织石蜡切片。然后依次用4%的多聚甲醛固定、常规脱蜡水化,苏木精染色,盐酸酒精分化,流水冲洗返蓝,伊红

复染,脱水透明,中性树胶封片,显微镜下拍照。

1.2.4 免疫荧光染色

取上述3组石蜡切片,常规脱蜡水化,柠檬酸抗原修复,放凉至室温,0.5% Triton X-100 破膜,5% BSA 封闭, α -SMA 一抗(1:100)4℃孵育过夜。分别将带有绿色荧光标记的 E-cadherin 抗体(1:100)和红色荧光标记的 α -SMA 二抗(1:400)混匀后滴加在组织切片上,室温孵育1 h,再用 DAPI 染核(蓝色)10 min。最后用甘油封片,在蔡司荧光显微镜下拍照。激光扫描参数保持一致,采集的图像包括红、绿、蓝3个通道,及时合成图片。

1.3 统计学方法

应用 SPSS21.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GW5074 可减轻高剂量放射线引起的细胞形态学变化

未经处理的 MLE-12 细胞显示出鹅卵石上皮细胞形态并能清楚地观察到细胞间的接触(图 1A)。经放射线照射的细胞表现为纺锤形间质细胞形态

且细胞间的接触丢失(图 1B)。GW5074 单独处理不改变细胞的上皮样结构(图 1C)。而在照射前用 GW5074 预处理有效地保护了上皮细胞免受照射引起的形态学变化(图 1D)。

2.2 高剂量放射线可促进 MLE-12 细胞内的 C-Raf 磷酸化

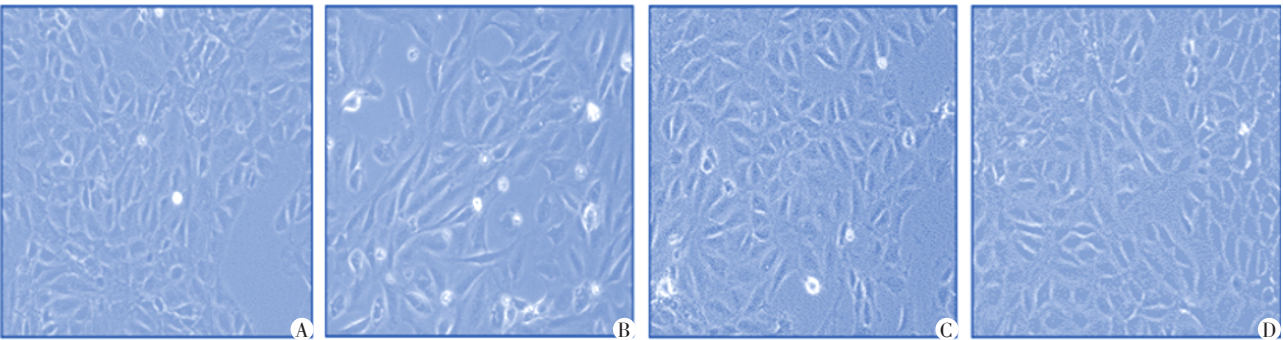
高剂量放射线照射后可以使 MLE-12 细胞内的 C-Raf 蛋白磷酸化,与对照组相比,p-C-Raf 的表达量在照射后 6 h 和 12 h 无统计学差异($P > 0.05$),而在照射后 24 h、48 h 和 72 h 均明显增加($P < 0.05$,图 2),并且在 48 h 增加最为显著,而照射后不同时间点 C-Raf 表达量的差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。因此后续所有细胞实验时间点均采用照射后 48 h。

2.3 GW5074 可显著抑制 C-Raf 的磷酸化

通过 Western blot 检测 GW5074 对高剂量放射线照射后 C-Raf 磷酸化的作用,并排除其溶剂 DMSO 的干扰作用。与照射组和 DMSO+照射组相比, GW5074+照射组 p-C-Raf 的表达量明显减少($P < 0.05$,图 3),而照射组与 DMSO+照射组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 sh-Twist1 可明显抑制 Twist1 的表达

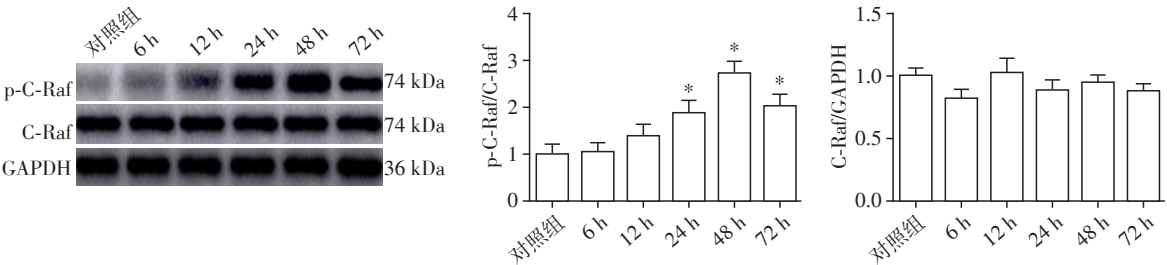
通过 Western blot 检测 sh-Twist1 及其空载病毒(NC)对高剂量放射线作用后 Twist1 表达量的影响。



A:空白对照组;B:照射组;C:GW5074组;D:GW5074+照射组。

图1 高剂量放射线照射后MLE-12细胞形态学的变化($\times 200$)

Figure 1 Morphological changes of MLE-12 cell after high-dose radiation exposure($\times 200$)



与对照组比较,* $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 高剂量放射线照射后不同时间点p-C-Raf和C-Raf表达量的变化

Figure 2 Changes of p-C-Raf and C-Raf levels at different time points after high-dose radiation exposure

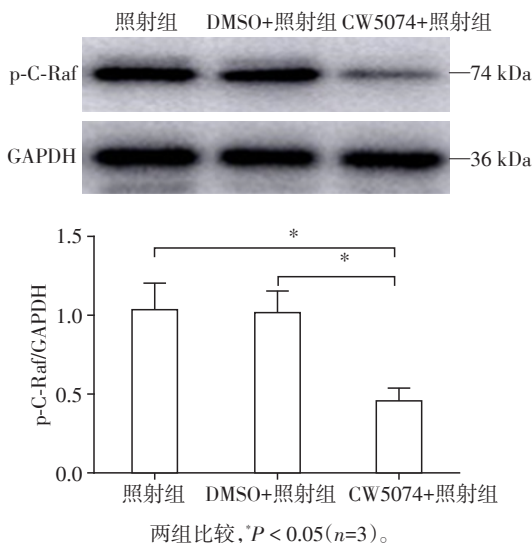


图3 GW5074对C-Raf磷酸化的影响
Figure 3 Effect of GW5074 on C-Raf phosphorylation

与照射组和NC+照射组相比,sh-Twist1+照射组Twist1的表达量明显减少($P < 0.05$,图4),而照射组与NC+照射组Twist1表达量的变化无统计学差异($P > 0.05$)。2.5 高剂量放射线通过激活C-Raf/Twist1信号通路使MLE-12细胞发生EMT

与空白对照组相比,照射组p-C-Raf、Twist1及 α -SMA的表达量均明显增加,而E-cadherin的表达量明显减少($P < 0.05$,图5)。与照射组相比,GW5074+照射组、sh-Twist1+照射组Twist1和 α -SMA的表达量均明显减少,而E-cadherin的表达量均明显增加($P < 0.05$,图5)。GW5074+照射组p-C-Raf的表达量明显低于照射组($P < 0.05$,图5),而sh-Twist1+照射组与照射组相比无统计学差异($P > 0.05$)。这提示高剂量放射线通过激活C-Raf/Twist1信号通路使MLE-12细胞发生EMT,而GW5074可以通过抑制C-Raf/Twist1信号通路来减轻高剂量放射线诱导的上皮间质转化。

2.6 GW5074可显著减轻HDSV放射线所导致的肺损伤

前文已经在MLE-12细胞中证实了GW5074可显著抑制高剂量放射线诱导的EMT,为了进一步在动物实验中研究它对HDSV放射线引起肺损伤的影响,我们又做了HE染色,结果显示在照射前用GW5074预处理的小鼠肺损伤程度较单纯照射组明显减小($P < 0.05$,图6)。

2.7 GW5074可显著减轻HDSV放射线引起的小鼠肺泡上皮细胞间质转化

正常小鼠肺组织中E-cadherin以较高水平表

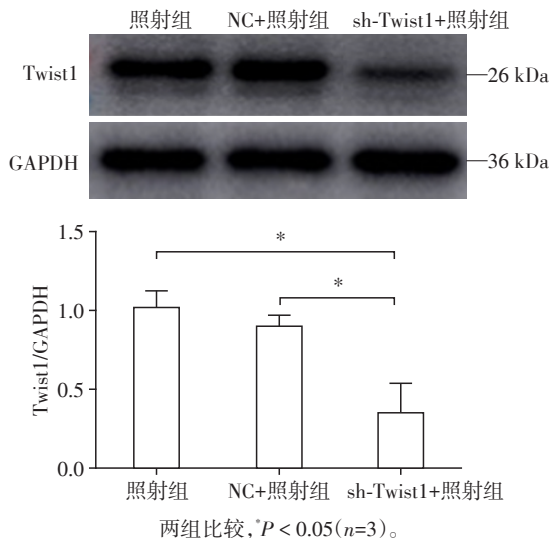


图4 sh-Twist1转染细胞后Twist1表达量的变化
Figure 4 Changes of Twist1 level after sh-Twist1 transfection

达, α -SMA仅以较低的水平表达。照射前用GW5074处理较单独照射组明显减少了 α -SMA并增强了E-cadherin的表达($P < 0.05$,图7)。

3 讨论

放疗在肺癌治疗中占有重要地位,但由于放疗损伤引起的并发症如放射性肺炎和肺纤维化严重影响患者的生活质量,因此放疗引起的肺损伤一直是肿瘤放疗学者关注和研究的课题。尽管医疗需求紧迫,但临床上缺乏有效的方法减轻放射性肺损伤,所有接受放疗的肺癌患者都或多或少承受着放疗不良反应所带来的苦楚,因此寻找有效的放射线保护剂迫在眉睫。

放射性肺纤维化在肺部照射后6~12个月发生,其特征在于细胞外基质沉积以及肌成纤维细胞增殖。EMT被广泛认为是肺纤维化中肌成纤维细胞增多的主要诱因之一,然而关于高剂量小范围放射线诱导的肺泡上皮细胞EMT机制的研究甚少。EMT是细胞由低侵袭和转移能力的上皮细胞表型转变为高侵袭和转移能力的间质细胞表型的过程。本研究发现高剂量放射线作用后的MLE-12细胞中也会发生这种现象。未经照射的细胞在培养皿中贴壁生长,镜下可见细胞呈鹅卵石的上皮样形态,并且可以清楚看到细胞间的接触。而放射线照射后的细胞大多呈悬浮状态,表明细胞已经凋亡或死亡,且细胞形态转变为纺锤体的间质细胞形态。

Raf蛋白激酶家族包括A-Raf、B-Raf和C-Raf,涉

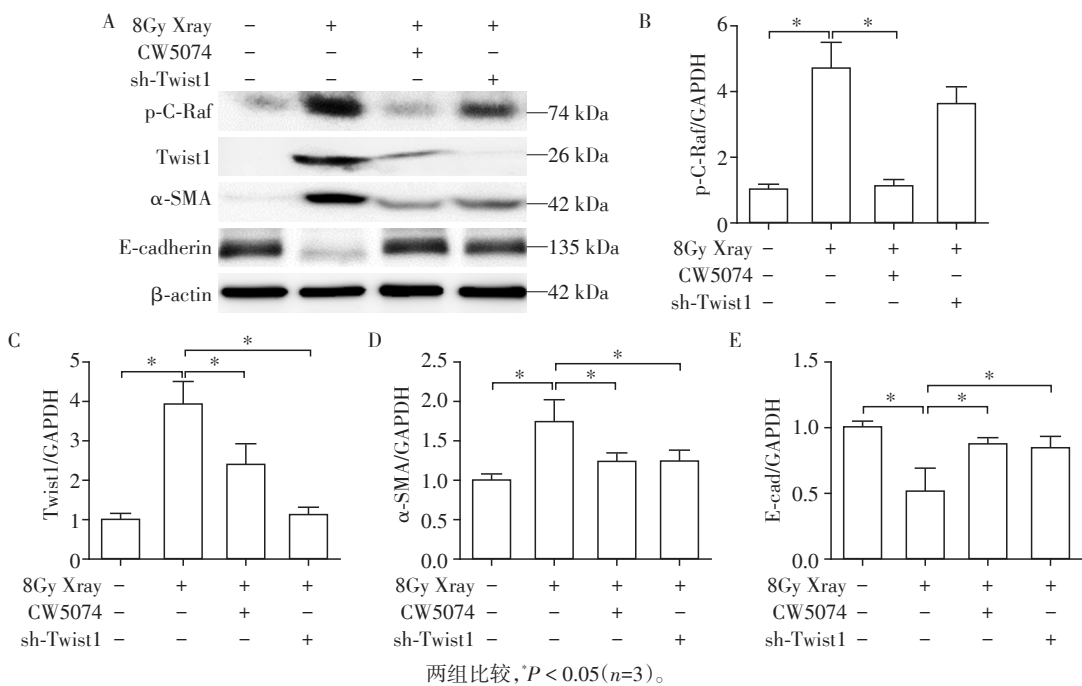


图5 Western blot检测GW5074和sh-Twist1作用MLE-12细胞后p-C-Raf、Twist1、α-SMA、E-cadherin的表达情况
Figure 5 Expressions of p-C-Raf, Twist1, α-SMA, E-cadherin in MLE-12 cells treated by GW5074 and sh-Twist1 were analyzed by Western blot

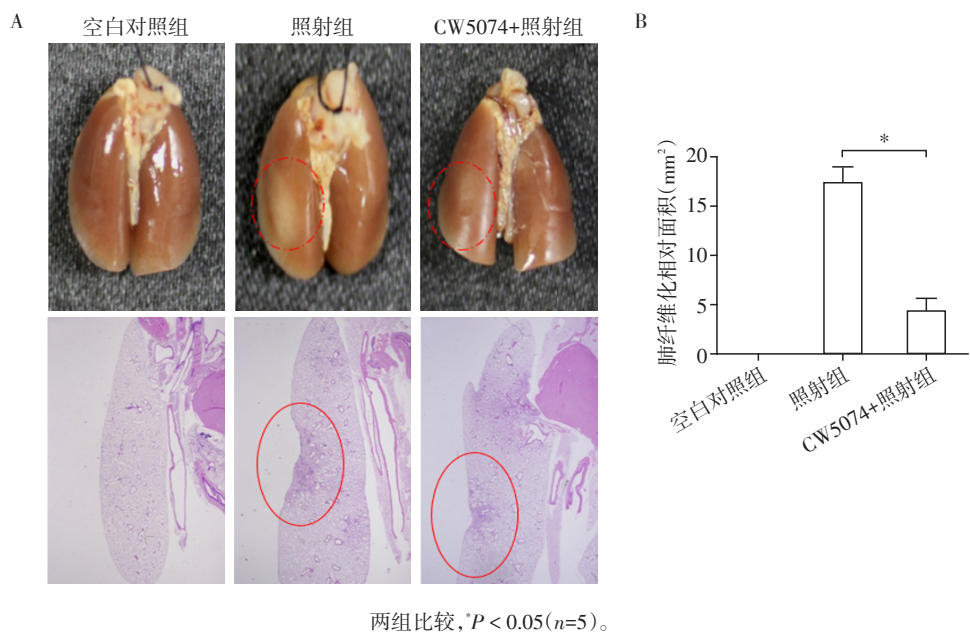
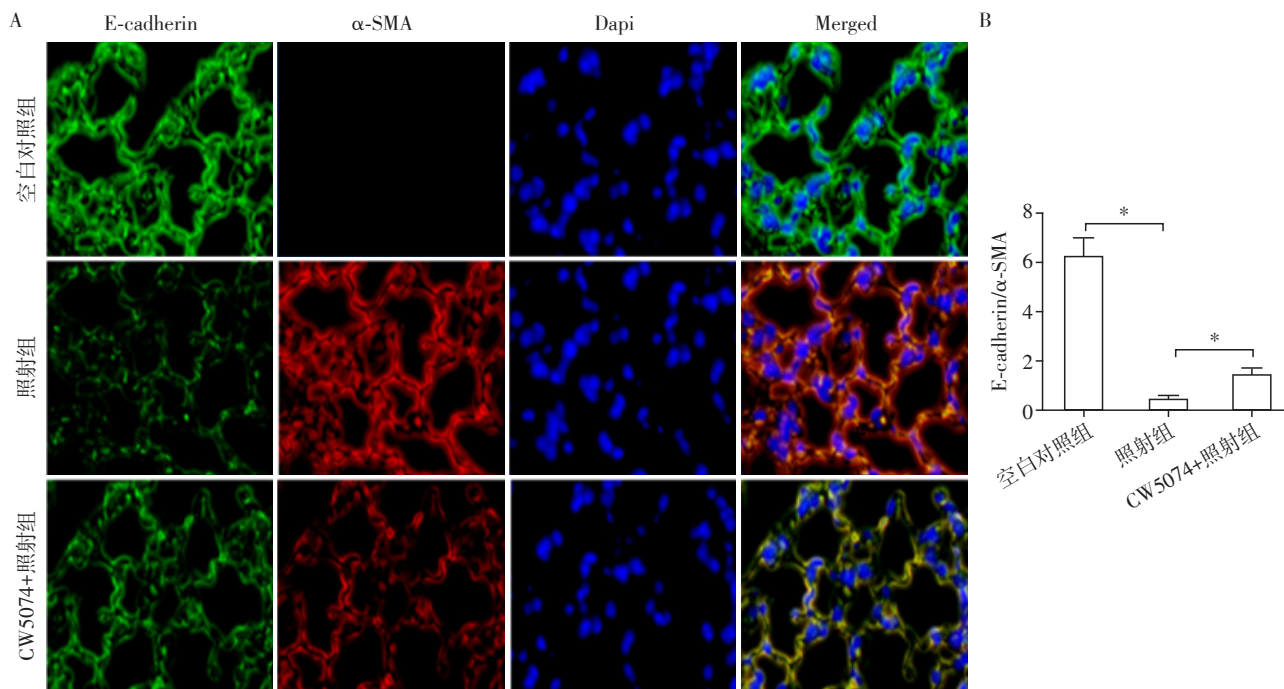


图6 HDSV放射线(75 Gy X-ray)作用后小鼠肺组织的肉眼和组织病理变化(HE, ×12.5)
Figure 6 Gross and histopathological changes of mouse lung tissue irradiated by HDSV radiation(HE, ×12.5)

及细胞增殖、分化和凋亡过程的调节^[12]。目前关于A-Raf和B-Raf的研究较多,但是关于C-Raf的功能和作用的研究相对较少,且从未在放射性损伤机制中被提及过。本研究发现在高剂量放射线作用后的MLE-12细胞中,C-Raf蛋白会被明显激活,且在照射后48 h的作用最为显著。与此同时,上皮细胞

标志物E-cadherin的表达量明显减少而间质细胞标志物α-SMA的表达量明显增加。这说明C-Raf的激活与高剂量放射线所诱导的肺泡上皮细胞间质转化密切相关。
Twist1是一种新近发现的凋亡抑制蛋白,已有很多研究证明其异常表达能够导致E-cadherin介导



两组比较, $P < 0.05 (n=5)$ 。

图7 免疫荧光染色分析HDSV放射线(75 Gy Xray)作用后上皮和间质细胞标志物的表达情况($\times 200$)

Figure 7 Immunofluorescence staining for expressions of epithelial and mesenchymal cell markers irradiated by HDSV radiation($\times 200$)

的细胞间接接触丧失,间质细胞标志物增多,进而促进细胞发生转移^[7]。然而关于Twist1与高剂量小范围放射线诱导的EMT的关系却鲜为人知。本研究发现高剂量放射线作用后的MLE-12细胞中, Twist1的表达量也明显增加,并与C-Raf的激活呈正相关,同时也伴有E-cadherin的表达量减少而 α -SMA的表达量增加。这说明Twist1在高剂量放射线所诱导的肺泡上皮细胞间质转化中也发挥了关键的调控作用。

由此可见,C-Raf和Twist1在高剂量放射线所诱导的肺泡上皮细胞间质转化中各自扮演了重要的角色,但是关于C-Raf/Twist1信号通路在高剂量小范围放射线所诱导的肺泡上皮细胞间质转化的研究至今未见报道。通过本研究发现,在照射前应用GW5074预处理MLE-12细胞,不仅可以明显减轻上皮细胞向间质细胞转化的形态学改变,而且能促进E-cadherin的表达,使p-C-Raf、Twist1以及 α -SMA的表达明显受抑制。照射前应用沉默Twist1的shRNA转染细胞,也能使 α -SMA的表达减少和E-cadherin的表达增加,但p-C-Raf的表达量与照射组相比却无显著差异。由此可见C-Raf蛋白被激活后可能通过调控Twist1,进而调节下游靶基因的转录,最终促进小鼠肺泡上皮细胞发生间质转化。据此,我们推测

GW5074可通过抑制C-Raf/Twist1信号通路有效减轻高剂量放射线诱导的肺泡上皮细胞间质转化。另外,在应用小动物放射仪给予小鼠高剂量小范围放射线后,通过对肺损伤组织的HE染色及免疫荧光染色,发现GW5074不仅可以有效减轻放射线所造成肺损伤的程度,还能有效抑制小鼠肺泡上皮细胞向间质细胞的转化。通过体内外实验充分证明了GW5074在HDSV放射线所诱导的EMT中发挥了十分重要的作用。

通过本研究,我们推测C-Raf/Twist1信号通路可以作为临床上防治放射性肺损伤的新型研究靶点, GW5074或许可以作为一种放射线保护剂来减轻放疗患者的肺部并发症。但是由于样本是细胞和小鼠,本研究存在一定的片面性,有待把样本扩展到人群,进一步挖掘C-Raf在HDSV放射性肺损伤中的其他作用及机制,这项研究或许可以给接受放射治疗的肺癌患者带来新的希望。

[参考文献]

- [1] Cao C, Huang J, Rimner A, et al. Stereotactic body radiation therapy: focusing on the short game[J]. J Clin Oncol, 2018, 36(23): 2455-2456
- [2] Richeldi L, Baldi F, Pasciuto G, et al. Current and future

(下转第1566页)

- contraction, and Ca^{2+} oscillations in asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 142(1):207-218
- [19] Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(13):1211-1221
- [20] Chapoval SP, David CS. Identification of antigenic epitopes on human allergens: studies with HLA transgenic mice[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111(2):245-250
- [21] Zoltowska Nilsson AM, Lei Y, Adner M, et al. Mast cell-dependent IL-33/ST2 signaling is protective against the development of airway hyperresponsiveness in a house dust mite mouse model of asthma[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(3):L484-L492
- [22] Himes BE, Hunninghake GM, Baurley JW, et al. Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene[J]. *Am J Hum Genet*, 2009, 84(5):581-593
- [23] Tulah AS, Holloway JW, Sayers I. Defining the contribution of SNPs identified in asthma GWAS to clinical variables in asthmatic children[J]. *BMC Med Genet*, 2013, 14:100
- [24] Mehats C, Jin SL, Wahlstrom J, et al. PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction[J]. *FASEB J*, 2003, 17(13):1831-1841
- [25] Lin AH, Shang Y, Mitzner W, et al. Aberrant DNA methylation of phosphodiesterase [corrected] 4D Alters Airway Smooth Muscle Cell Phenotypes[J]. *Am J Respir Cell Mol Biology*, 2016, 54(2):241-249
- [26] Nieuwenhuis MA, Vonk JM, Himes BE, et al. PTTG1P and MAML3, novel genomewide association study genes for severity of hyperresponsiveness in adult asthma[J]. *Allergy*, 2017, 72(5):792-801
- [27] Hu A, Diener BL, Josephson MB, et al. Constitutively active signaling by the G protein betagamma-subunit mediates intrinsically increased phosphodiesterase-4 activity in human asthmatic airway smooth muscle cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0118712
- [收稿日期] 2019-02-17

(上接第1560页)

- idiopathic pulmonary fibrosis therapy[J]. *Am J Med Sci*, 2019, 357(5):370-373
- [3] 罗振国, 朱国琴, 许海尘, 等. 胃泌素通过 JAK2/STAT3 信号通路调控胃癌细胞上皮间质转化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(12):1557-1561
- [4] 韩 姣, 曾凡军, 陈世雄. 上皮间质转化相关信号通路在肺纤维化发生发展中的作用[J]. *山东医药*, 2015, 55(17):101-103
- [5] Choi SH, Hong ZY, Nam JK, et al. A hypoxia-induced vascular endothelial-to-mesenchymal transition in development of radiation-induced pulmonary fibrosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(16):3716-3726
- [6] 刘伊扬, 钱 健, 徐爱民, 等. 长链非编码 RNA BX357664 对肾透明细胞癌细胞上皮间质转化过程的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(1):25-30
- [7] Li Z, Liu X, Wang B, et al. Pirfenidone suppresses MAPK signaling pathway to reverse epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis: pirfenidone inhibits renal EMT via MAPK pathway[J]. *Nephrology*, 2017, 22(8):589-597
- [8] Meng J, Chen S, Han JX, et al. Twist1 regulates vimentin through *cul2* circular RNA to promote EMT in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(15):4150-4162
- [9] Huang Q, Liang C, Wei L, et al. Raf kinase inhibitory protein exacerbates hepatic fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1-2):49-61
- [10] Burgess S, Echeverria V. Raf inhibitors as therapeutic agents against neurodegenerative diseases[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(1):120-127
- [11] Jensen HA, Bunaciu RP, Varner JD. GW5074 and PP2 kinase inhibitors implicate nontraditional c-Raf and Lyn function as drivers of retinoic acid-induced maturation[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(8):1666-1675
- [12] Lavoie H, Therrien M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(5):281-298
- [收稿日期] 2019-02-11