

SDF-1 α 对胶质瘤细胞 U87 过氧化氢损伤的保护作用 *

徐 艳 许余玲 王 军 程 洁 肖 杭[△]

(南京医科大学公共卫生学院神经毒理实验室 江苏 南京 210029)

摘要 目的 探讨基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α)对过氧化氢(H₂O₂)损伤人脑胶质瘤细胞 U87 的保护作用及机制。方法 :双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)检测胶质瘤细胞 U87 自分泌 SDF-1 α ;细胞增殖实验研究外源 SDF-1 α 对 U87 细胞增殖的影响;SDF-1 α 作用 U87 12 小时后 0.7 mM H₂O₂处理 6 小时,流式细胞术检测细胞凋亡率;蛋白质免疫印记实验(western blot)检测 SDF-1 α 对 U87 细胞中蛋白激酶 B(Akt)和细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)磷酸化的影响。结果 :胶质瘤细胞 U87 自身几乎不分泌 SDF-1 α 24 小时内外源性 SDF-1 α 对 U87 细胞增殖无明显影响 ;H₂O₂损伤后 ,SDF-1 α 预处理组细胞存活率高于对照组 ,凋亡率和死亡率低于对照组 ,差异具有统计学意义 ;Western blot 显示 SDF-1 α 处理能够诱导 U87 细胞 Akt 和 ERK1/2 的快速磷酸化。结论 SDF-1 α 能够提高 H₂O₂损伤的 U87 细胞存活率 ,降低凋亡率和死亡率 ,其机制可能与磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-Akt 和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)-ERK1/2 通路的激活有关。

关键词 基质细胞衍生因子 1 ;U87 ;Akt ;ERK1/2

中图分类号 :R739.4 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)12-2266-03

Protective Effect of SDF-1 α on Human Glioma Cell Line U87 Injured by Hydrogen Peroxide (H₂O₂) and Its Mechanism*

XU Yan, XU Yu-ling, WANG Jun, CHENG Jie, XIAO Hang[△]

(The Ministry of Education Key Lab of Modern Toxicology of Nanjing Medical University, 210029, Nanjing, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect and mechanism of stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α) on human glioma cell line U87 injured by hydrogen peroxide (H₂O₂). **Methods:** Enzyme-linked Immunosorbent Assay was used to detect the SDF-1 α produced by U87 cells. MTT Assay was performed to evaluate the effect of proliferation on cells induced by human recombinant SDF-1 α . Then cells were divided into three groups: control group, H₂O₂ (0.7 mM) treated group, SDF-1 α +H₂O₂ treated group (100 ng/ml and 0.7 mM respectively). Apoptotic cells were measured by flow cytometry. Western Blot was used to detect the expression of phosphorylated protein kinase B (pAkt) and phosphorylated extracellular signal regulating kinase (pERK1/2). **Results:** The human glioma cells treated by H₂O₂ exhibited apoptosis in the presence of SDF-1 compared with the cells treated with H₂O₂ alone. 100ng/ml SDF-1 α treatment could lead to Akt and ERK activation in U87. **Conclusion:** SDF-1 α could protect U87 cells from H₂O₂-induced apoptosis, the mechanism may be related to the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) -Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) -ERK1/2 signalling pathway.

Key words: Stromal cell derived factor-1; U87; Akt; ERK1/2

Chinese Library Classification: R739.4 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)12-2266-03

前言

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的肿瘤,约占成人颅内肿瘤的 45%~60%。胶质母细胞瘤是其中恶性程度最高的胶质瘤,在颅内呈浸润性生长,与正常脑组织没有明显的界限。当前临床治疗主要针对瘤体本身的治疗,但术后易复发,病死率较高^[1]。研究表明,肿瘤生存的微环境对肿瘤的生成起到重要作用,但其机制仍不明确。趋化因子及其受体的相互作用在肿瘤研究中逐渐成为一个热点^[2-3]。其中,趋化因子受体 CXCR4 与其配体基质细胞衍生因子 CXCL12(SDF-1)的相互作用与多种恶性肿瘤的发生和转移密切相关。研究发现,CXCR4 表达水平

与神经胶质瘤恶性程度及发生发展相关,CXCR4 和 SDF-1 常出现共定位现象^[4-6],提示 SDF-1/CXCR4 功能轴在胶质瘤有比较重要的作用,但其具体机制仍不十分清楚。本实验以神经胶质母细胞瘤细胞株 U87 为研究对象,建立 H₂O₂ 诱发损伤的细胞模型,研究 SDF-1 α 对胶质瘤细胞 U87 的保护作用。同时从影响肿瘤信号转导通路的重要信号蛋白 Akt 和 ERK 入手,探讨 SDF-1/CXCR4 对胶质瘤发生发展的影响及可能的作用机制,为今后可能的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

* 基金项目 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CX09B_264Z) 国家自然科学基金资助项目(编号 81072329)

作者 徐艳(1984-)女 硕士研究生 主要研究方向 趋化因子与肿瘤 E-mail: xuyan920@163.com

[△]通讯作者 肖杭 电话 025-86862956 E-mail: hxiao@njmu.edu.cn

(收稿日期 2011-02-08 接受日期 2011-03-03)

人脑胶质瘤细胞 U87 由本实验室保存。高糖 DMEM 培养基和胎牛血清购自 Hyclone, SDF-1 α ELISA 检测试剂盒和重组人细胞因子 SDF-1 α 购自美国 R&D 公司, 细胞计数试剂盒 CCK-8 购自 Dojindo, Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物, pAkt、pERK1/2 单克隆兔抗购自 Cell Signaling Technology, 山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗、BCA 蛋白定量试剂盒购自杭州碧云天, ECL 化学发光试剂盒购自 Thermo Bio-Rad 垂直电泳系统和半干转印系统。其他化学试剂均为国产试剂。

1.2 细胞培养及 ELISA 检测

人胶质瘤细胞 U87 加入 10 %胎牛血清、100 IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的高糖 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5 % CO $_2$ 、饱和湿度培养箱中培养, 隔日换液。细胞进入对数生长期后, 换 0.5 %血清培养基培养过夜。为检测 U87 细胞是否自分泌 SDF-1 α 及其含量, 收集 24 小时正常细胞培养上清, 1500 rpm 离心 5 min, ELISA 试剂盒检测上清中 SDF-1 α 的含量, 实验步骤按照试剂盒说明书操作。

1.3 细胞增殖实验

细胞进入对数生长期后, 以 5000 / 孔接种于 96 孔板, 0.5 %血清培养, 实验分为 5 个剂量组: 0、1、10、100、1000 ng/ml SDF-1 α 处理 U87 细胞, 并分别于 12、24、48 小时检测各处理组的细胞增殖情况。细胞增殖结果以细胞计数试剂盒 CCK-8 检测。各时间点每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 室温孵育 2 小时, 于多功能酶标仪 450 nm 处测吸光度值。以各时间点的对照组做标化处理。

1.4 流式细胞术检测凋亡率

以一定浓度 H $_2$ O $_2$ 诱导细胞损伤, 实验分为 3 组: 对照组、H $_2$ O $_2$ 组 (0.7 mM)、SDF-1 α 预处理 +H $_2$ O $_2$ 组 (100 ng/ml, 0.7 mM)。SDF-1 α +H $_2$ O $_2$ 组于损伤前 12 h 以 100 ng/ml SDF-1 α 与细胞共孵, 12 h 后与 H $_2$ O $_2$ 组共同以 7 $\times$ 10 $^{-4}$ mol/L H $_2$ O $_2$ 诱导细胞损伤。0.25 %胰酶消化处理细胞, 1000 rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟, 反复洗涤 3 次, 制备单细胞悬液并悬浮于 200 μ l 缓冲液中, 加入 10 μ l Annexin V-FITC 染料轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟, 加入 300 μ l 缓冲液以及 5 μ l PI 染料, 利用 BD FACS Calibur 细胞分选系统收集 10000 个细胞进行荧光分析。

1.5 western blot 检测蛋白表达

细胞接种于 6 孔板, 实验分为 5 组: 各组加入 100 ng/ml SDF-1 α 后, 分别于 0、10、20、40、60 min 收获细胞, RIPA 裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂)裂解, 提取细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度, 蛋白上样量为 40 μ g。95 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 经 5 %浓缩胶和 12 %分离胶电泳后, 0.2 mA 1 h 半干转印至 PVDF 膜上, 5 %脱脂奶粉室温封闭 2 h, 1:500 兔抗 pAkt、pERK1/2、1:500 小鼠抗 β -Actin 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗涤 10 min $\times$ 3 次, 1:1000 山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 10 min $\times$ 5 次。ECL 化学发光法显色, 经凝胶成像系统采集图像, 用软件 Gelpro 32 进行灰度分析处理, 以 β -Actin 为内参进行蛋白半定量分析。

1.6 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分

析, 组间比较采用 One-way ANOVA 及 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U87 分泌 SDF-1 α 的检测

SDF-1 α ELISA 试剂盒检测显示(数据未提供), 低于试剂盒检测下限 30 ng/L, 正常 U87 细胞不分泌或分泌极低量 SDF-1 α 。前期对 SDF-1 α 的研究发现, 在 U87 细胞中, SDF-1 α 存在 mRNA 水平的表达。提示虽然 U87 表达 SDF-1 α mRNA, 但缺乏自身主动分泌细胞因子 SDF-1 α 的功能, 也排除了实验中自分泌 SDF-1 对细胞功能的影响。

2.2 SDF-1 α 对细胞增殖的影响

以不加 SDF-1 α 组为实验对照组, 结果显示, 在血清维持浓度 0.5 %的条件下, 24 小时内, 1、10、100、1000 ng/ml SDF-1 α 对 U87 细胞均无明显的促增殖作用。48 小时时, 100 ng/ml SDF-1 α 能够促进细胞增殖, 而正常浓度血清培养能够显著促进细胞增殖(图 1, * $P < 0.05$ # $P < 0.01$)。

2.3 SDF-1 α 对细胞凋亡的影响

对照组细胞存活率为 93.64 %, 细胞状态良好。H $_2$ O $_2$ 处理 6 小时后, 细胞存活率为 42.77 %。SDF-1 α 预孵可减轻 H $_2$ O $_2$ 引起

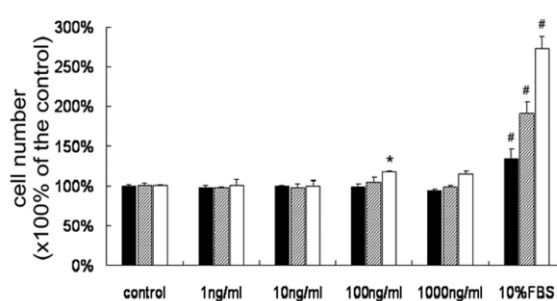


图 1 SDF-1 α 对细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect on cell proliferation of SDF-1 α

的细胞损伤, 细胞凋亡率和死亡率显著降低(表 1)。

2.4 SDF-1 α 诱导 U87 细胞内 Akt 和 ERK1/2 磷酸化

western blot 结果显示, 正常 U87 细胞 Akt 和 ERK 磷酸化水平较低, 100 ng/ml SDF-1 α 能够快速激活 pAkt 和 pERK1/2 通路。经灰度扫描分析, 在检测时间内, pERK1 和 pERK2 表达随着时间延长逐渐增高, pAkt 在 40 min 时表达最高(图 2)。

3 讨论

趋化因子 SDF-1 首次克隆于骨髓基质细胞系, 是未成熟及成熟造血细胞的趋化剂, 能够调节造血干细胞的归巢及祖细胞的增殖^[7,8]。近年来 SDF-1/CXCR4 在肿瘤中的功能备受关注。研究显示, 趋化因子受体 CXCR4 在神经胶质瘤、乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤中高度表达^[9,10,11]。SDF-1 能够促进多种肿瘤的增殖, 增强其浸润及转移能力。本研究发现, 胶质瘤细胞 U87 表达 CXCR4, SDF-1 虽存在 mRNA 水平的表达, 但细胞培养上清中含量极低。采用外源性 SDF-1 处理体外培养的胶质瘤细胞 U87, 未观测到显著的促增殖效应, 而在预实验中, SDF-1 能够明显促进人胚胎肾细胞 HEK293 的增殖, 提示可能在不同细胞类型或因体内体外原因, SDF-1 促增殖效应不尽相同。Kenig

表 1 不同处理情况下 U87 存活、凋亡和死亡情况($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Results of survival, apoptosis and mortality at different treatments in U87

Group	Sample size	Survival rate (%)	Apoptosis rate(%)	Mortality rate(%)
Control group	5	93.64± 2.94	1.71± 0.08	3.29± 0.13
H ₂ O ₂ treated group	5	42.77± 3.48*	14.76± 1.95*	37.32± 2.63*
SDF-1α + H ₂ O ₂ treated group	5	62.21± 4.47#	6.81± 0.23#	30.88± 1.29#

Note : * P<0.05 compared with control group # P<0.05 compared with H₂O₂ treated group.

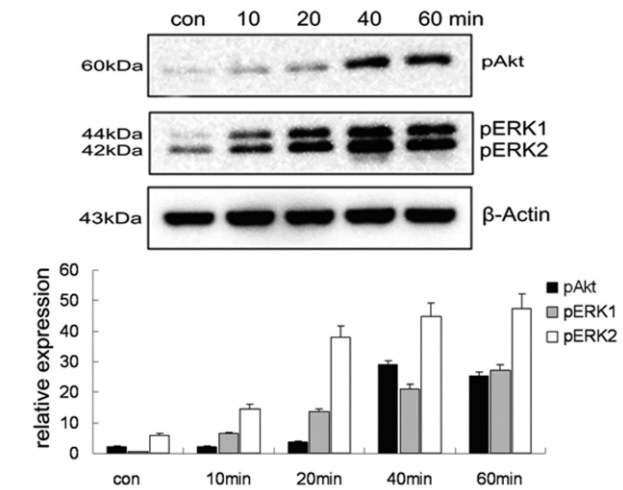


图 2 SDF-1α 对 U87 细胞 pAkt 和 pERK1/2 表达的影响
Fig. 2 Expression of pAkt and pERK1/2 in U87 cell induced by SDF-1α

S 等人研究也发现胶质瘤细胞本身几乎不分泌 SDF-1，但是血管内皮及其他组织分泌的 SDF-1 能够介导肿瘤的血管生成及转移，提示肿瘤微环境在肿瘤发生发展过程中的重要作用^[12]。

本研究结果显示，采用外源性的人重组 SDF-1 预处理细胞 U87 12h，能够明显降低 H₂O₂ 引起的细胞损伤，提高细胞存活率。Singh S 研究发现 SDF-1 能够减轻化疗药物对胰腺癌细胞的损伤，利用 CXCR4 拮抗剂 AMD3100 可阻断 SDF-1 的作用^[13]。因此，SDF-1/CXCR4 在肿瘤中进展的生物学作用可能是一个潜在的治疗靶点。08 年底，美国 FDA 批准商品名为 plerixafor 注射液 (AMD3100) 上市，与粒细胞集落刺激因子联合应用于非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤的自体移植^[14]。但有关 Mozobil 长期安全性和有效性的研究正在进行中，这也为其他类型癌症的治疗开辟新的研究道路。

为探讨 SDF-1/CXCR4 的促存活机制，本研究对 PI3K-Akt 和 MAPK 这两条重要的信号转导途径进行研究。ERK 是 MAPK 家族的重要成员，pAkt 和 pERK 分别是 Akt 和 ERK 的活化形式，是细胞重要的生存信号，Akt 和 ERK 激活后可磷酸化凋亡 Bcl-2 家族成员 BAD，从而阻止凋亡发生^[15,16]。pERK 在多种肿瘤与细胞系中表达异常，表明其表达水平与肿瘤发生发展密切相关^[17,18]。Meier F 和 Paraiso KH 等人研究发现，共同抑制 Akt 和 MAPK 信号转导途径能够显著抑制黑色素瘤细胞的生长，促进凋亡^[19,20]。本研究发现，在正常 U87 细胞中，Akt 和 ERK1/2 蛋白磷酸化水平较低，而 SDF-1 处理可快速磷酸化 Akt 和 ERK1/2，且在观测时间内呈现时间依赖性激活增强，提示 SDF-1 发挥抗凋亡作用可能与生存相关信号通路 PI3K-Akt 和 MAPK-ERK1/2 的激活有关，进而在对抗过氧化氢诱导损伤

中发挥一定作用。在肿瘤微环境中，游离 SDF-1 可能通过与肿瘤细胞的相互作用，激活下游信号转导，发挥促进肿瘤存活、生长或浸润转移等作用。

将 SDF-1-CXCR4 信号通路作为胶质瘤微环境治疗的靶点，阻断其下游信号转导，并且联合放疗和化疗，将会为胶质瘤的治疗开辟新的途径。在胶质瘤模型中，一些相关的基因治疗研究已初显成功，但是在二期以及三期临床试验中并未得到预期的结果^[7]，这也预示肿瘤发生发展是多基因协同或交互作用而成，针对多通路多基因为靶点的小分子药物的研究可能会是今后肿瘤药物开发的新方向。

参考文献(References)

[1] Iwami K, Natsume A, Wakabayashi T. Gene therapy for high-grade glioma[J]. Neurol Med Chir, 2010, 50(9): 727-736

[2] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4 [J]. Semin Cancer Biol, 2004, 14 (3): 171-179

[3] Wang JM, Deng X, Gong W, et al. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis[J]. J Immunol Methods, 1998, 220(1-2): 1-17

[4] Zhou Y, Larsen PH, Hao C, et al. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival [J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49481-49487

[5] Bajetto A, Barbieri F, Dorcarrato A, et al. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration [J]. Neurochem Int, 2006, 49(5): 423-432

[6] Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, et al. The WHO classification of tumors of the nervous system [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2002, 61(3): 215-229

[7] Li M, Ransohoff RM. The roles of chemokine CXCL12 in embryonic and brain tumor angiogenesis [J]. Semin Cancer Biol, 2009, 19(2): 111-115

[8] Chu CY, Cha ST, Lin WC, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12)-enhanced angiogenesis of human basal cell carcinoma cells involves ERK1/2-NF-kappaB/interleukin-6 pathway [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(2): 205-213

[9] 霍胜军, 汤恢焕, 魏伟. CXCL12 及受体 CXCR4 在胆管癌中的表达及其临床意义[J]. 现代生物医学进展. 2008, 8(4): 658-660

Huo Sheng-jun, Tang Hui-huan, Wei Wei. Expressions of Chemokine CXCL12 and Its Receptor CXCR4 in Human Cholangiocarcinoma and Their Clinical Significance [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008, 8(4): 658-660

(下转第 2272 页)

- [3] Den Brinker M, Joosten KF, Visser TJ, et al. Euthyroid sick syndrome in meningococcal sepsis: the impact of peripheral thyroid hormone metabolism and binding proteins [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(10):5613-5620
- [4] Powner DJ, Boccalandro C, Alp MS, et al. Endocrine failure after traumatic brain injury in adults [J]. *Neurocrit Care*, 2006, 5(1):61-70
- [5] Iltumur k, Gonul Olmez, Zuhail Ariturk, et al. Clinical investigation : thyroid function test abnormalities in cardiac arrest associated with acute coronary syndrome [J]. *Crit Care*, 2005, 9(4):R416-424
- [6] Mancini A, Corbo GM, Gaballo A, et al. Relationships between plasma CoQ10 levels and thyroid hormones in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Biofactors*, 2005, 25(1-4):201-204
- [7] Shanoudy H, Soliman A, Moe S, et al. Early manifestation of "sick euthyroid" syndrome in patients with compensated chronic heart failure [J]. *J Card Fail*, 2001, 7(2):146
- [8] Premachandra BN, Kabir MA, Willimes IK. Low T3 syndrome in psychiatric depression. [J] *Endocrinol Invest*, 2006, 29(6):568-572
- [9] Hennemann G, Krenning EP. The kinetics of thyroid hormone transporters and their role in non-thyroidal illness and starvation [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2007, 21(2):323-338
- [10] 邵琦, 任颖, 魏盟, 等。合并低 T3 综合症对急性心肌梗死患者预后的影响 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2008, 128(12):1564-1567
SHAO Qi REN Ying, et al. Effect of low T3 syndrome on outcome of acute myocardial infarction [J]. *Journal Of Shanghai Jiaotong University (MEDICAL SCIENCE)*, 2008, 128(12):1564-67
- [11] 全军民, 任颖, 田恒力, 等。创伤性脑外伤患者急性期垂体功能异常临床分析 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2009, 129(3):334-337
Quan junmin, Ren ying, Tian hengli, et al. Clinical analysis of pituitary dysfunction in acute phase of traumatic brain injury [J]. *Journal Of Shanghai Jiaotong University (MEDICAL SCIENCE)*, 2009, 129(3):334-337
- [12] Katharina Plikat, Julia L, Roland B, et al. Frequency and outcome of patients with nonthyroidal illness syndrome in a medical intensive care unit [J]. *Metabolism*, 2007, 56(2):239-244
- [13] Tognini S, Marchini F, Dardano A, et al. Non-thyroidal illness syndrome and short-term survival in a hospitalised older population [J]. *Age Ageing*, 2010, 39(1):46-50
- [14] Chinga-Alayo E, Villena J, Evans AT. Thyroid hormone levels improve the prediction of mortality among patients admitted to the intensive care unit [J]. *Int Care Med*, 2005, 31:1356-1361
- [15] Huang SA, Bianco AC. Reawakened interest in type III iodothyronine deiodinase in critical illness and injury [J]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4(3):148-155
- [16] Hamdy A Abo-Zenah, Sabry A Shueb et al. Relating circulating thyroid hormone concentrations to serum interleukins-6 and -10 in association with non-thyroidal illnesses including chronic renal insufficiency [J]. *BMC Endocrine Disorders*, 2008, 22(8):1
- [17] Adler SM, Wartofsky L. The Nonthyroidal Illness Syndrome [J]. *J Endocrinol Metab Clin North AM*, 2007, 36(3):657-672
- [18] Gangemi EN, Garino F, Berchialla P, et al. Low triiodothyronine serum levels as a predictor of poor prognosis in burn patients [J]. *Burns*, 2008, 34(6):817-824
- [19] Scoscia E, Baglioni S, Eslami A. Low triiodothyronine (T3) state: a predictor of outcome in respiratory failure? Results of a clinical pilot study [J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(5):557-560
- [20] Forestier E, Vinzio S, Sapin R, et al. Increased reverse triiodothyronine is associated with shorter survival in independently-living elderly: the Alsanut study [J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 160(2):207-214
- [21] L. Mebis, G. van den Berghe. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in critical illness. [J] *The Netherlands Journal of Medicine*, 2009, 67(10):332-340

(上接第 2268 页)

- [10] Yasuoka H, Kodama R, Irokawa M, et al. CXCR4 expression in papillary thyroid carcinoma: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8:274
- [11] Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion [J]. *Lab Invest*, 2006, 86(12):1221-1232
- [12] Kenig S, Alonso MB, Mueller MM, et al. Glioblastoma and endothelial cells cross-talk, mediated by SDF-1, enhances tumour invasion and endothelial proliferation by increasing expression of cathepsins B, S, and MMP-9 [J]. *Cancer Lett*, 2009, 289(1):53-61
- [13] Singh S, Srivastava SK, Bhardwaj A, et al. CXCL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(11):1671-1679
- [14] Azab AK, Runnel JM, Pitsillides C, et al. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy [J]. *Blood*, 2009, 113(18):4341-4351
- [15] Datta SR, Dudek H, Tao X, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. *Cell*, 1997, 91(2):231-241
- [16] Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ. Oncogenic B-RafV600E inhibits apoptosis and promotes ERK-dependent inactivation of Bad and Bim [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(32):22128-22135
- [17] Uzgar AR, Kaplan PJ, Greenberg NM. Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer [J]. *Prostate*, 2003, 55(2):128-139
- [18] Schmitz KJ, Wohlschlaeger J, Alakus H, et al. Activation of extracellular regulated kinases (ERK1/2) but not AKT predicts poor prognosis in colorectal carcinoma and is associated with k-ras mutations [J]. *Virchows Arch*, 2007, 450(2):151-159
- [19] Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, et al. Combined targeting of MAPK and AKT signaling pathways is a promising strategy for melanoma treatment [J]. *Br J Dermatol*, 2007, 156(6):1204-1213