

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.06.005

瘦素对卵巢癌细胞 SKOV3 增殖及凋亡的影响 *

姜霞^{1,2} 薛宝瑶¹ 谢婷婷¹ 徐晓博¹ 于月成^{1△}

(1 第四军医大学西京医院妇产科 陕西 西安 710032;

2 新疆生产建设兵团医院(石河子大学医学院第二附属医院)妇产科 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要 目的:探讨瘦素对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖及凋亡的影响及其作用机制。**方法:**用不同浓度的瘦素(0、50、100、200 ng/mL)处理人卵巢癌 SKOV3 细胞 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞的生长;以血清饥饿诱导细胞凋亡,同时给予瘦素刺激,Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡的变化;western blotting 分析 p21、cyclin D1、Bcl-2、Bax 蛋白的表达水平和 ERK1/2 通路的活化情况。**结果:**瘦素以剂量依赖性的方式促进人卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖,同时抑制血清饥饿诱导的细胞凋亡。瘦素处理可下调 p21 和上调 cyclin D1 的表达,抑制促凋亡分子 Bax 的表达和上调抗凋亡分子 Bcl-2 的表达。瘦素可诱导细胞中 ERK1/2 通路的活化,其抑制剂 PD98059 可明显抑制瘦素诱导的促细胞增殖和抗凋亡作用,同时伴随有 cyclin D1、Bcl-2 蛋白表达的下调和 Bax 的上调。**结论:**瘦素可能通过活化 ERK1/2 通路调节细胞有丝分裂进程,进而促进卵巢癌细胞的增殖;同时通过调节凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达抑制卵巢癌细胞的凋亡。

关键词:卵巢癌;瘦素;增殖;凋亡;ERK1/2

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)06-1019-05

Effect of Leptin on the Proliferation and Apoptosis of Ovarian Carcinoma SKOV3 Cells*

JIANG Xia^{1,2}, XUE Bao-yao¹, XIE Ting-ting¹, XU Xiao-bo¹, YU Yue-cheng^{1△}

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Obstetrics and Gynecology, Military Unit Hospital of Xinjiang (Xinjiang Second Hospital Affiliated to Shihezi University), Urumqi, Xinjiang, 830002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and the underlying molecular mechanism of leptin on the proliferation and apoptosis of ovarian carcinoma SKOV3 cells. **Methods:** After stimulation with various doses of leptin (0, 50, 100, 200 ng/mL) for 48 h, the cell proliferation rate was analyzed by MTT colorimetry. Serum deprivation was used to induce cell apoptosis in SKOV3 cells stimulated with leptin. Cell apoptosis was assessed by double staining with Annexin V and propidium iodide. The expression levels of p21, cyclin D1, Bcl-2, Bax and ERK1/2 pathway were detected by western blotting. **Results:** Leptin promoted the cell proliferation and dampened the apoptosis rates induced by serum deprivation in a dose-dependent manner. Furthermore, leptin treatment down-regulated the expression levels of p21, up-regulated the cyclin D1 expression. Moreover, an obvious down-regulation of Bax protein and up-regulation of Bcl-2 was confirmed in SKOV3 cell treated with leptin. Leptin dramatically induced the activation of ERK1/2 pathway, and blocking this pathway with its inhibitor PD98059 strikingly attenuated leptin-induced proliferation and anti-apoptosis effect in SKOV3 cell, concomitant with the decrease of cyclin D1 and Bcl-2 expression and increase of Bax expression. **Conclusion:** Leptin could promote the SKOV3 cell proliferation and inhibit the apoptosis by the activation of ERK1/2 signaling to regulate SKOV3 cell mitosis and expression levels of apoptosis-related protein.

Key words: Ovarian cancer; Leptin; Proliferation; Apoptosis; ERK1/2

Chinese Library Classification (CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)06-1019-05

前言

卵巢癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一,死亡率高居女性妇科恶性肿瘤之首,严重威胁着女性的生命和健康^[1,2]。目前,临床上多采用手术、化疗和放疗结合的综合疗法治疗卵巢癌,尽管

具有一定的临床疗效,但并不能提高晚期卵巢癌患者的 5 年生存率^[3]。近期的研究表明,肥胖与多种肿瘤的发生发展有关^[4,5]。瘦素(leptin)又名肥胖荷尔蒙,是由脂肪细胞分泌的一种激素样蛋白,在调节能量代谢、血管形成、创伤修复、免疫调节等方面具有重要作用^[6-8]。近年来,瘦素作为联系肥胖与肿瘤之间

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30872740)

作者简介:姜霞(1978-),女,本科,主治医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:+86-2989159139, E-mail:s_yanbing@126.com

△ 通讯作者:于月成(1964-),男,博士,副主任医师,主要研究方向:妇科肿瘤,电话:029-824775391, E-mail:yuechengyuxian@163.com

(收稿日期:2014-05-28 接受日期:2014-06-16)

的枢纽,已成为国内外癌症相关领域研究的热点^[9,10]。瘦素在癌症组织中呈高表达,可参与食管癌、直肠癌、胰腺癌等的病理进程^[9,11,12]。但瘦素对卵巢癌的影响及其机制目前尚不清楚。本研究旨在体外观察瘦素对卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖及凋亡的影响,同时探讨其相应的作用机制,以期为研制新型抗卵巢癌的药物奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人浆液性上皮性卵巢癌细胞株 SKOV3 购自美国 ATCC 公司(American Type Culture Collection)。

1.1.2 试剂 胎牛血清和 MTT 购自华美生物工程有限公司; ERK1/2 抑制剂 PD98059 购自 Calbiochem 公司; Annexin V-FITC / PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司; 鼠抗人 p21、Bax 和 Bcl-2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 兔抗人 ERK1/2 和 p-ERK1/2 的抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人卵巢癌 SKOV3 细胞株置于 RPMI1640 的培养基中(含 10%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 g/mL 链霉素),37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。每 1-2 天换 1 次液,2-3 天传代 1 次。采用处于对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞的增殖情况 取对数期生长的 SKOV3 细胞,经胰酶消化后制成终浓度为 5×10^4 /ml 的单细胞悬液。将细胞接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,分别加入不同浓度的瘦素(0、50、100、200 ng/mL)刺激 48 h,对照组加入等量的培养液(不含瘦素);每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L,继续孵育 4 h 后终止培养,吸弃上清,按每孔 150 μ L 加入 DMSO,震荡 10 min,酶标仪测定 570 nm 处的吸光度值(OD)。

1.2.3 Annexin V/PI 检测细胞凋亡 以不含胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养 SKOV3 细胞 24 h,构建血清饥饿诱导卵巢癌细胞凋亡模型,同时用 200 ng/mL 的瘦素处理细胞,48 h 用胰酶消化成单细胞悬液。用预冷的 PBS 洗涤 3 次,1200 rpm 离心 5 min,收集细胞;用 100 μ L 的 Buffer 重悬细胞,后加入 1 mL $1 \times$ Annexin V 结合缓冲液,离心弃上清;加入 200 μ L 结合缓冲液重悬细胞,之后加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI (5 μ g/mL)染液,轻轻混匀后避光孵育 30 min,流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blotting 分析 将对数生长期的细胞用 0.05% 胰蛋白酶进行消化,用 4℃ 预冷的 PBS 缓冲液洗涤细胞 PBS 3 次;加入 200 μ L 预冷的裂解液裂解细胞,冰上放置 20 min,4℃ 离心机 12000 rpm 离心 10 min,取上清。取 20 μ L 蛋白样品,加入 10 μ L 上样缓冲液样品煮沸处理,进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。电泳结束后采用半干转法将目的蛋白转移到硝酸纤维素膜 PVDF 上,加入 5%脱脂奶粉,室温孵育 1 h 以封闭膜上的非特异结合;TBS-T 洗涤 3 次后按照常规的方法加入抗人 p21、cyclin D1、Bcl-2、Bax、ERK1/2 和 p-ERK1/2 的一抗和 HRP 标记的二抗。TBST 洗涤 3 次后,加入 ECL 底物反应 1-3 min,暗室曝光显影。

1.3 统计学分析

所有计量资料数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行 t 检验及单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 瘦素对 SKOV3 细胞增殖的影响

MTT 法分析显示,瘦素可明显促进卵巢癌细胞的增殖,且随着瘦素剂量的不断增加,细胞的存活率逐渐升高,表明细胞的增殖能力明显增加;其中 100 ng/ml 和 200 ng/ml 的瘦素作用 48 h 时,细胞的存活率分别为对照组的 118.3%和 131.4%,差异具有统计学意义(图 1),提示瘦素可呈剂量依赖性的促进卵巢癌细胞的增殖。

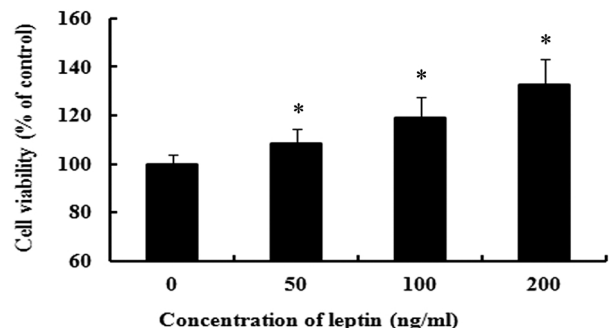


图 1 瘦素对 SKOV3 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of leptin on the proliferation of SKOV3 cells

* $P < 0.05$ versus leptin untreated group

2.2 瘦素对 SKOV3 细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 染色结果显示,与对照组相比,血清饥饿处理后 SKOV3 细胞的凋亡率明显升高 ($P < 0.05$);而瘦素处理 SKOV3 细胞 48 h 后,细胞的凋亡率明显降低($P < 0.05$)。定量分析表明,血清饥饿条件下加入 200 ng/ml 的瘦素处理后,细胞的凋亡率从 44.2%下降至 22.5%(图 2B),提示瘦素可抑制血清饥饿诱导的卵巢癌细胞的凋亡。见图 2。

2.3 瘦素对 SKOV3 细胞中 cyclin D1 和 p21 表达的影响

Western blotting 结果显示,与对照组相比,瘦素处理后的 SKOV3 细胞中细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21 的表达水平明显下降,细胞周期蛋白 cyclin D1 的表达水平明显上调(图 3A)。定量分析表明,200 ng/mL 瘦素处理 SKOV3 细胞 48 h 后,其 p21 的表达水平是对照组的 0.64 倍,而 cyclin D1 的蛋白水平是对照组的 3.42 倍(图 3B),差异均具有统计学意义($P < 0.05$),表明瘦素可促进 SKOV3 细胞 DNA 的合成。

2.4 瘦素对 SKOV3 细胞中 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

进一步分析瘦素抑制饥饿诱导的卵巢癌细胞凋亡的机制,通过 western blotting 分析发现,与对照组比较,血清饥饿诱导的 SKOV3 细胞中促凋亡分子 Bax 的表达明显增加,而抗凋亡分子 Bcl-2 的表达明显降低,而同时采用 200 ng/mL 瘦素处理 SKOV3 细胞 48 h 可使 SKOV3 细胞中 Bax 的表达明显减少,而 Bcl-2 的表达明显增加(图 4A)。定量分析表明,200 ng/mL 瘦素处理后,促凋亡蛋白 Bax 的表达水平降至对照组的 1.68 倍,而 Bcl-2 增加至对照组的 1.98 倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(图 4B)。这些结果表明瘦素可能通过调节 Bax 和 Bcl-2 的

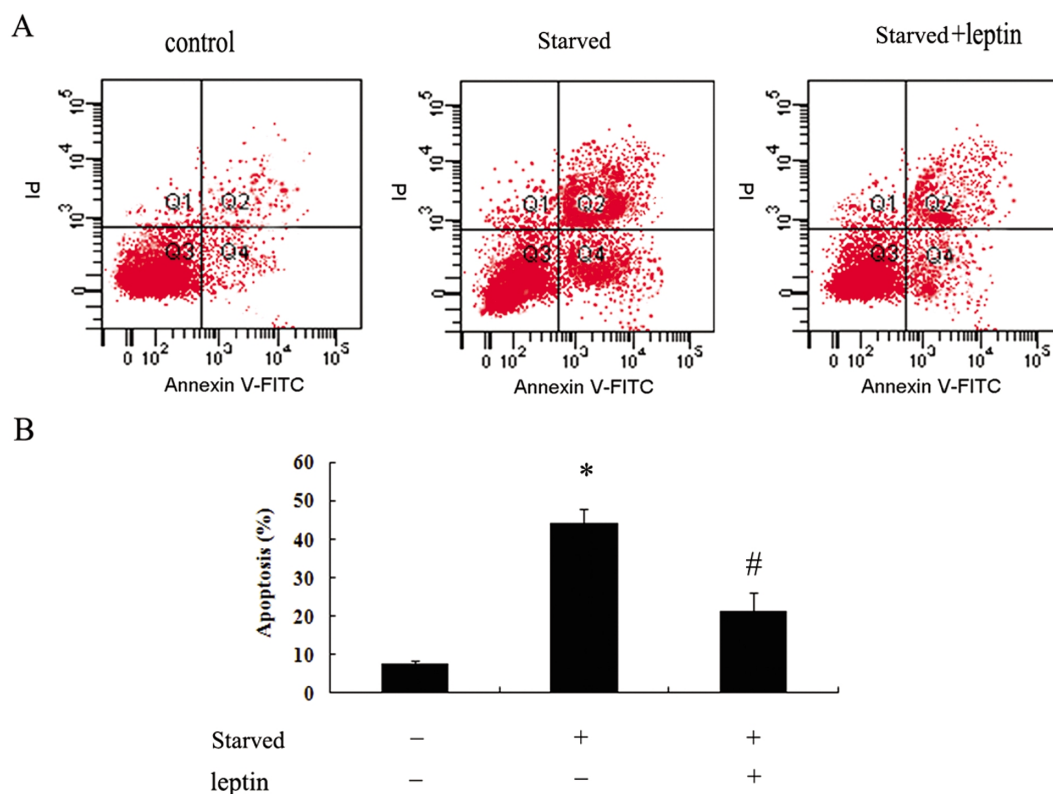


图2 瘦素对饥饿诱导的 SKOV3 细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of leptin on the apoptosis of SKOV3 cell induced by serum starvation

*P<0.05 versus control group; #P<0.05 versus starved group

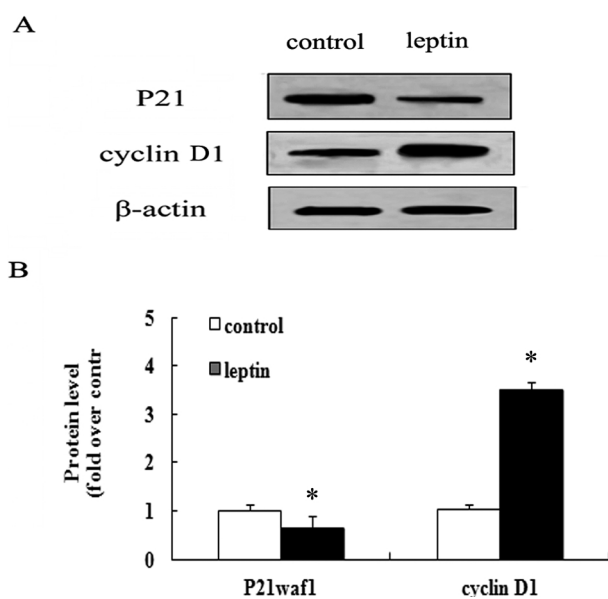


图3 瘦素对 SKOV3 细胞中 cyclin D1 和 p21 表达的影响

Fig.3 Effect of leptin on the expression of p21 and cyclin D1 in SKOV3 cells detected by western blotting

*P<0.05 versus control group

表达调控饥饿诱导的卵巢癌细胞的凋亡。

2.5 ERK1/2 在瘦素调节的 SKOV3 细胞增殖和凋亡中的作用

如图 5A 所示, 瘦素处理可诱导 SKOV3 细胞中磷酸化 ERK1/2 的表达明显增加, 表明瘦素处理可诱导卵巢癌细胞中 ERK1/2 通路的活化 (图 5A)。与对照组相比, ERK1/2 抑制剂 PD98059 处理后瘦素诱导的细胞周期蛋白 cyclin D1 和 Bcl-2

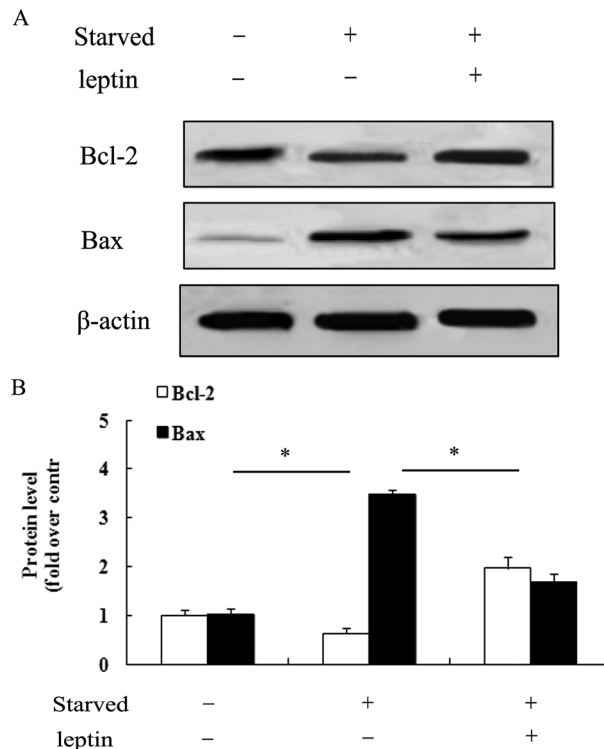


图4 瘦素对血清饥饿诱导的 SKOV3 细胞 Bax 和 Bcl-2 表达水平的影响

Fig.4 Effect of leptin on the expression levels of Bax and Bcl-2 protein in SKOV3 cells induced by serum starvation.

*P<0.05 versus control group

的表达均明显下降, 同时 Bax 的表达明显增加 (图 5B), 表明 ERK1/2 可调控细胞 DNA 的合成和凋亡相关分子的表达。进一

步 MTT 分析证实,瘦素处理后细胞的存活率明显增加,当加入 PD98059 后,瘦素诱导的细胞的存活率明显下降(图 5C) ($P<0.05$),表明瘦素可通过活化 ERK1/2 通路调节卵巢癌细胞的增殖。Annexin V/PI 染色结果显示:加入 ERK1/2 抑制剂 PD98059 后,瘦素抑制的饥饿诱导的细胞的凋亡率明显增加(图 5D) ($P<0.05$),表明瘦素可通过活化 ERK1/2 通路抑制饥饿诱导的卵巢癌细胞的凋亡。

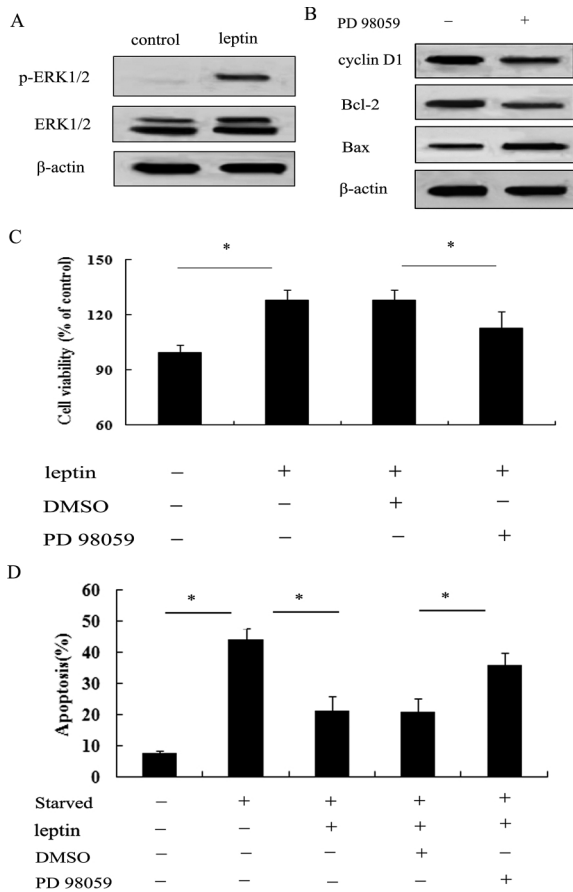


图 5 ERK1/2 在瘦素调节的 SKOV3 细胞增殖和凋亡中的作用

Fig.5 Effect of ERK1/2 on the Leptin regulated proliferation and apoptosis of SKOV3 cells 注:A. western blotting 分析瘦素对 ERK1/2 的影响;B. western blotting 分析 ERK1/2 对 cyclin D1、Bax 和 Bcl-2 表达水平的影响;C.MTT 分析 ERK1/2 对瘦素诱导的 SKOV3 细胞增殖的影响;D. MTT 分析 ERK1/2 对瘦素诱导的 SKOV3 细胞凋亡的影响。

Note: A. Effect of leptin on ERK1/2 signaling using western blotting; B.

Effect of ERK1/2 on the expression of cyclin D1, Bax, Bcl-2; C. Effect of ERK1/2 on Leptin-induced proliferation of SKOV3 cells; D. Effect of of ERK1/2 on Leptin-induced apoptosis of SKOV3 cells.

* $P<0.05$ versus control group.

3 讨论

卵巢癌是女性生殖器常见的三大恶性肿瘤之一,患者 5 年的生存率不足 30%,已成为严重威胁妇女命和健康的主要问题^[3,13]。流行病学研究显示,肥胖是多种恶性肿瘤发生的独立危险因素,而脂肪细胞分泌的脂肪因子可能是影响该进程的主要因素^[14,15]。作为重要的脂肪因子,瘦素除了具有调控食欲、能量平衡等作用外,近年来的大量研究证实其在多种肿瘤的病理进程

中具有重要作用^[9,16]。因此,探讨瘦素对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响及其作用机制,将为进一步明确其在卵巢癌发展中的作用奠定基础,同时也为进一步探讨卵巢癌新的治疗靶点提供理论依据。

本研究采用不同浓度的瘦素诱导卵巢癌细胞 SKOV3, MTT 分析结果显示瘦素以剂量依赖性的方式促进卵巢癌细胞的增殖,同时能够抑制血清饥饿诱导的细胞的凋亡,表明瘦素具有促进卵巢癌细胞增殖和抑制其凋亡的作用。大量研究证实,细胞增殖主要是通过调控细胞有丝分裂途径而实现^[17,18]。细胞周期调控蛋白是影响细胞有丝分裂的主要调控因素,其中 cyclin D1 可调控 G1/S 期的转换,是细胞增殖的主要调控分子^[19]。而 p21 作为细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1 的抑制剂,能够阻止细胞向 G2/M 期的过渡,抑制 DNA 的合成^[20]。本研究通过 western blotting 分析证实,瘦素处理可导致卵巢癌细胞中 cyclin D1 的表达明显上调,同时 p21 的蛋白表达明显下降,表明瘦素可能通过影响卵巢癌细胞的 DNA 合成进程调控卵巢癌细胞的增殖。细胞凋亡也是影响细胞生长的主要影响因素,其中促凋亡分子 Bax 和抗凋亡分子 Bcl-2 对细胞凋亡中起重要作用。瘦素处理后,血清饥饿诱导的细胞的凋亡率明显降低,表明瘦素具有抗卵巢癌细胞凋亡的作用。同时,细胞内促凋亡分子 Bax 的表达下降和抗凋亡分子 Bcl-2 的表达增加,提示瘦素可通过调控这两个凋亡相关分子的表达抑制卵巢癌细胞的凋亡。

许多肿瘤的病理进程中伴随着 ERK1/2 通路的过度激活,与癌细胞的增殖、生长、侵袭等过程密切相关,并在肿瘤的病理进程中发挥着重要作用^[21,22]。为了进一步探讨瘦素诱导卵巢癌细胞的增殖和抗凋亡的作用机制,本研究分析了 ERK1/2 信号途径,结果表明瘦素处理可激活细胞中的 ERK1/2。加入其抑制剂后,瘦素诱导的细胞中 cyclin D1 和 Bcl-2 的水平明显下降,同时 Bax 的水平增加,提示瘦素有可能通过 ERK1/2 通路调节细胞的增殖和凋亡途径。进一步 MTT 分析证实,抑制 ERK1/2 通路后,瘦素诱导的细胞的增殖能力明显下降;同时,阻断 ERK1/2 通路后,瘦素抑制的饥饿诱导的细胞的凋亡率明显增加,提示瘦素可通过 ERK1/2 通路促进细胞周期进程以及凋亡相关分子的表达,进而发挥促进卵巢癌细胞增殖和抑制其凋亡作用。

综上所述,本研究证实瘦素可促进卵巢癌细胞的增殖以及抗饥饿诱导的细胞凋亡,且此作用与 ERK1/2 通路密切相关,但瘦素活化卵巢癌细胞中 ERK1/2 通路的作用机制尚不清楚,还有待于进一步研究。本研究结果为进一步明确瘦素在卵巢癌中的作用提供了理论依据,同时为开发以其为靶标的新型抗卵巢癌药物奠定了理论基础。

参考文献(References)

- [1] Buys SS, Partridge E, Black A, et al. Effect of screening on ovarian cancer mortality[J]. JAMA, 2011, 305(22): 2295-2303
- [2] 伍宗惠,毛熙光. 卵巢癌侵袭转移相关因素的研究进展 [J]. 西南军医, 2010, 12(4): 742-744
- Wu Zong-hui, Mao Xi-guang. Research on the factors related to invasion and metastasis of ovarian cancer [J]. J Mil Surg Southwest China, 2010, 12(4): 742-744

- [3] Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5 (5): 355-366
- [4] Lee JV, Shah SA, Wellen KE. Obesity, cancer and acetyl-CoA metabolism [J]. *Drug Drug Discov Today Dis Mech*, 2013, 10(1-2): e55-e61
- [5] 刘明月, 臧福才, 唐伟. 肥胖与肿瘤 [J]. *国际肿瘤学杂志 ISTIC*, 2013, 40(7): 501-503
Liu Yue-ming, Zang Fu-cai, Tang Wei. Obesity and tumor [J]. *J Int Onc*, 2013, 40(7): 501-503
- [6] Zhou W, Guo S, Gonzalez-Perez R. Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104 (1): 128-137
- [7] Khan SN, DuRaine G, Virk SS, et al. The temporal role of leptin within fracture healing and the effect of local application of recombinant leptin on fracture healing[J]. *J Orthop Trauma*, 2013, 27 (11): 656-662
- [8] Vernooij JH, Ubags ND, Brusselle GG, et al. Leptin as regulator of pulmonary immune responses: involvement in respiratory diseases[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(4): 464-472
- [9] Kang YJ, Moon A. Roles of Leptin in Cancer Progression [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2010, 18(4): 363-374
- [10] VanSaun MN. Molecular Pathways: Adiponectin and Leptin Signaling in Cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(8): 1926-1932
- [11] Beales IL, Garcia-Morales C, Ogunwobi OO, et al. Adiponectin inhibits leptin-induced oncogenic signalling in oesophageal cancer cells by activation of PTP1B [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 150-158
- [12] Gialamas SP, Sergeantanis TN, Antonopoulos CN, et al. Circulating leptin levels and risk of colorectal cancer and adenoma: a case-control study and meta-analysis [J]. *Cancer Causes Control*, 2013, 24(12): 2129-2141
- [13] Burger RA, Brady MF, Bookman MA, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(26): 2473-2483
- [14] Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, et al. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(17): 1625-1638
- [15] Batista Jr M, Oliven M, Alcantara P, et al. Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients [J]. *Cytokine*, 2013, 61(2): 532-539
- [16] Barone I, Catalano S, Gelsomino L, et al. Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6): 1416-1427
- [17] Liu E, Kuang Y, He W, et al. Casticin Induces Human Glioma Cell Death through Apoptosis and Mitotic Arrest [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(6): 805-814
- [18] Zhao Y, Tang Q, Ni R, et al. Early mitotic inhibitor-1, an anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor, can control tumor cell proliferation in hepatocellular carcinoma: correlation with Skp2 stability and degradation of p27 (Kip1)[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(3): 365-373
- [19] Du B, Wang Z, Zhang X, et al. MicroRNA-545 Suppresses Cell Proliferation by Targeting Cyclin D1 and CDK4 in Lung Cancer Cells [J]. *PloS one*, 2014, 9(2): e88022
- [20] Yano M, Ohkoshi S, Aoki YH, et al. Hepatitis B virus X induces cell proliferation in the hepatocarcinogenesis via up-regulation of cytoplasmic p21 expression[J]. *Liver Int*, 2013, 33(8): 1218-1229
- [21] 李琛, 于良. 塞来昔布通过 ERK1/2 信号通路对肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖, 凋亡的影响 [J]. *陕西医学杂志*, 2013, 42(6): 649-666
Li Chen, Yu Liang. Effect of celecoxib on hepatoma cell SMMC-7721 proliferation, apoptosis by ERK1/2 signaling [J]. *Shaanxi Medical J*, 2013, 42(6): 649-666
- [22] Mebratu Y, Tesfagzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(8): 1168-1175