

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.21.003

α - 硫辛酸下调 Grb2 抑制 A549 细胞增殖的研究 *

文 娅^{1,5} 李 贝² 邓雪松³ 林云涛⁴ 陆菁潇¹ 吕国庆^{2Δ}

(1 深圳市第二人民医院 转化医学研究院 广东 深圳 518035; 2 北京大学深圳医院 胃肠外科 广东 深圳 518036;

3 深圳市第二人民医院 肝胆外科 广东 深圳 518035; 4 北京大学深圳医院 口腔科 广东 深圳 518036;

5 东莞东阳光科技发展有限公司 广东 东莞 523843)

摘要 目的:探讨 α -LA 对 A549 细胞增殖的机制以及 Grb2 在其中发挥的作用。**方法:**利用 CCK-8 和流式细胞术检测 α -LA 对细胞增殖的影响;实时定量 PCR 和 Western Blot 检测细胞中 Grb2 表达的变化;利用向细胞中转染 siGrb2 及过表达 Grb2 载体检测细胞中 Grb2 表达水平差异对细胞增殖的影响。**结果:** α -LA 处理 A549 24 h 后,对照组和 α -LA 处理组中位于 G₀/G₁ 期细胞的比率由 40.60% 上升至 57.80%;而位于 S 期细胞的比率由 45.96% 下降至 39.01%;与细胞 G₁/S 期的转换相关的调节蛋白 CDK2/4/6, cyclin D3 和 E1 的表达也随之发生了相应的改变, α -LA 通过抑制细胞 G₁/S 期的转换而抑制细胞增殖。与亲本细胞相比,Grb2 在 α -LA 处理 A549 细胞中的转录和蛋白表达水平均显著降低,干扰细胞中 Grb2 表达能显著抑制 A549 增殖;而过表达 Grb2 可阻断 α -LA 诱导的细胞增殖抑制。**结论:** α -LA 具有抑制 A549 细胞增殖的作用,Grb2 是 α -LA 发挥抑细胞增殖效应的重要介导因子。

关键词: α - 硫辛酸;非小细胞肺癌;细胞增殖;Grb2

中图分类号:R-33;R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)21-4012-05

Alpha Lipoic Acid Inhibits A549 Cell Proliferation through the Repression of Grb2*

WEN Ya^{1,5}, LI Be², DENG Xue-song³, LIN Yun-tao⁴, LU Jing-xiao¹, LV Guo-qing^{2Δ}

(1 Institute of Translational Medicine, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518035, China; 2 Department of Gastrointestinal Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518036, China; 3 Department of Hepatobiliary Surgery, Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518035, China; 4 Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong, 518036, China; 5 Dongguan HEC Technology Development and Research Co., Ltd, Dongguan, Guangdong, 523843, China)

ABSTRACT Objective: To explore the roles of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) in Alpha lipoic acid inhibits cell proliferation process. **Methods:** The CCK-8 assay and flow cytometry were used to assess cell proliferation in A549 cell lines after α -LA treatment. The expression of Grb2, cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), CDK4, CDK6, Cyclin D3, Cyclin E1 was measured by western blotting. Grb2 levels were restored in α -LA-treated cells by transfection of a plasmid carrying Grb2 and were reduced in A549 cells via specific siRNA knockdown. **Results:** CCK8 assay and flow cytometry were shown that α -LA dramatically decreased A549 cell proliferation. In control cells cultured without α -LA, the cells in the G₁ and S phases were 40.60% and 45.96%, respectively. In α -LA treated group, the cells in the G₁ and S phases were 57.80% and 39.01%, respectively, at 24 h Western Blot analysis indicated that α -LA decreased the levels of CDK2/4/6, cyclin D3 and E1, events that were associated with the inhibition of the G₁/S-phase transition. The level of Grb2 was downregulating in α -LA treated cells; in contrast, Grb2 overexpression significantly prevented α -LA-induced decreases in cell growth in vitro. **Conclusion:** These findings provide the first evidence that α -LA could inhibit cell proliferation and Grb2 is involved in this process.

Key words: Alpha lipoic acid; Non-small cell lung cancer; Cell proliferation; Growth factor receptor-bound protein 2

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)21-4012-05

前言

非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)是常见的呼吸系统恶性肿瘤,也是全球癌症相关死亡的主要原因。尽

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81672813);人事部中国博士后科学基金项目(2016M602594);

深圳市科技计划 2016 年基础研究项目(JCYJ20160425105945739);深圳市 " 三名工程 "(SZSM201612051)

作者简介:文娅(1988-),硕士,研究方向:抗肿瘤化学药物筛选,E-mail: wenya_1988@126.com

Δ 通讯作者:吕国庆,硕士,主任医师,主要研究方向:消化道肿瘤的化学预防,E-mail: lgq_pkzs@163.com

(收稿日期:2018-05-28 接受日期:2018-06-24)

管分子靶向药物在肺癌的治疗中取得了长足的进步,但大部分肺癌患者在首诊时已丧失了手术治疗机会,而且绝大部份 NSCLC 患者对放化疗均不敏感,其长期生存率也并未得到明显改善^[1]。因此,基于肺癌生物学研究的基础上发现安全高效的抗癌药物具有十分重要的现实意义。近年来,抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的治疗逐渐成为国际肿瘤研究领域的热点,许多对 NSCLC 有效的中药单体及小分子化合物成为筛选肺癌药物的新靶点^[2]。研究表明, α -硫辛酸(Alpha lipoic acid, α -LA)作为天然抗氧化剂,可清除体内各种形式 ROS^[3]。近年来有报道称 α -LA 对肿瘤细胞具有抑制作用但机制不明。本研究以 NSCLC 细胞株 A549 入手,阐明 α -LA 抑制肺癌细胞增殖的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

A549 细胞购自 ATCC,使用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基,在 37℃,5% CO₂ 恒温条件下培养。

1.2 主要试剂

胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司。 α -LA 购自美国 Sigma 公司。抗体 Grb2 购自美国 Abcam 公司, β -actin 及相应二抗购自美国 Cell Signal 公司。化学发光试剂盒购自美国 Perce 公司。总 RNA 提取使用 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。mRNA 逆转录与 Real-time PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司;Grb2 引物交由生工生物公司合成;siGrb2-1 和 Grb2-2 分别购买于美国 Cell Signal 公司和上海吉玛生物制药技术公司。

1.3 细胞周期分析

1,000 rpm 离心 5 min 收集并调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL;将细胞加入到 1 mL 冰浴冷 70%乙醇中,快速轻轻吹打混匀,4℃固定 24 h。1,000 rpm 离心 5 min,弃上清,重复 3 次;每管细胞样品中加入 500 μ L 染色液(含 50 μ g/mL 溴化乙锭、100 μ g/mL RNaseA、0.2% Triton-X100)37℃避光温浴 30 min;转细胞至流式检测管,上机检测,流式细胞仪激发光波长为 488 nm,波长>560 nm 滤光片检测 PI。每份样品进样 1×10^4 个细胞,分析细胞周期中 G₀/G₁ 期、S 期以及 G₂/M 期所占的百分率。

1.4 RNA 干涉及过表达

NCBI 上查找 Grb2 Gene ID 2885,设计 siRNA 序列,交上海吉玛生物制药技术公司合成;同时构建过表达 Grb2 载体 pENTER-Grb2;转染前一天消化生长状态良好的细胞按 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,过夜培养待融合度达 70-80%;转染当天,1.5 mL EP 管加入 250 μ L 无血清培养基;加 5 μ L Lipofectamine 2000 至装有 250 μ L 无血清培养基的 1.5 mL EP 管中,轻柔混匀,室温静置 5 min,同时向另一管 250 μ L 无血清 DMEM/F12 培养基的 1.5 mL EP 管中加入 5 μ L 20 μ M siGrb2/pENTER-Grb2,轻轻混匀;将稀释的脂质体 Lipofectamine 2000 与稀释的 siGrb2 混合,轻轻混匀,室温孵育 20 min;弃 6 孔板中细胞培养液,PBS 漂洗细胞 1-2 次后重新加入 1.5 mL 无血清培养基,随后向其中加入孵育完毕的 siGrb2-脂质体 Lipofectamine 2000(500 μ L),轻轻混匀,置于正常细胞培养环境中培养 4-6 h 后换液,加入完全培养基继续培养 24-72 h 后收集沉淀细胞用于后续下游实验。

1.5 Western Blot 检测细胞中相应蛋白表达

收集处于对数生长期的细胞,冰预冷 PBS 洗涤 2 次,加入适量蛋白裂解液,提取细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量。加入相应体积的 Loading buffer 混匀,100℃水浴 5 min 变性蛋白。SDS-PAGE 电泳分离蛋白后,将蛋白电转至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h。加入一抗 β -actin 按 1:2000 稀释,Grb2 按 1:5000 稀释,4℃孵育过夜;TBST 漂洗 5 min/次,共 6 次,沥干,加入二抗,室温反应 1 h;TBST 漂洗 5 min/次,共 6 次,沥干,ECL 显色、曝光、获取图像。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件分析并采用 GraphPad 5.0 作图。实验数据均以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。qRT-PCR 中不同细胞处理组间 mRNA 表达水平的比较采用 Student's t test;P<0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 α -LA 阻滞细胞于 G₁/S 期,发挥抑制肿瘤细胞增殖的效应

本部分实验以非小细胞肺癌细胞株 A549 作为研究对象,探讨 α -LA 对细胞增殖的影响。如图 1A 所示, α -LA(2.0 mM)处理细胞后,A549 细胞增殖速度明显被抑制。图 1B 显示, α -LA 处理 A549 24 h 后,对照组和 α -LA 处理组中位于 G₀/G₁ 期细胞的比率分别为 40.60%、57.80%;而位于 S 期细胞的比率分别为 45.96%、39.01%。与对照组相比, α -LA 处理后细胞周期明显减慢,并阻滞于 G₁/S 期。

接下来我们进一步检测了 α -LA 对细胞 G₁/S 期调节蛋白的影响。如图 1C, α -LA 处理 12 h 即可检测到细胞周期依赖性蛋白激酶 CDK2、CDK2 和 CDK6 及细胞周期蛋白 Cyclin D3 及 Cyclin E1 表达下调;24 h 时下调幅度更为明显。基于上述结果,我们推测 α -LA 通过下调 CDK2、CDK2、CDK6、Cyclin D3 及 Cyclin E1 表达,阻滞细胞于 G₁/S 期,发挥抑制 A549 细胞增殖的效应。

2.2 Grb2 介导 α -LA 诱导的肿瘤细胞增殖抑制

与亲本细胞相比,Grb2 在 α -LA 处理 A549 细胞中的转录和蛋白表达水平均显著降低(图 2A)。为证实 Grb2 在 α -LA 抑制的细胞增殖过程中发挥的作用,我们在 A549 细胞中分别转染 siGrb2-1 及 siGrb2-2 24 h 后收集细胞进行增殖实验,结果表明与对照相比均有显著的统计学差异(图 2B),提示干扰细胞中 Grb2 水平能显著抑制 A549 细胞的增殖能力。另外,我们将构建的 Grb2 过表达载体(pENTER-Grb2)转染至 A549 细胞中,也发现过表达 Grb2 本身并不影响 A549 细胞增殖,但却可阻断 α -LA 诱导的细胞增殖抑制(图 2C)。上述结果提示细胞内 Grb2 的水平对细胞增殖调节非常重要,并进一步说明 α -LA 抑制肿瘤细胞增殖是通过下调 Grb2 实现的,Grb2 是 α -LA 抑制增殖效应的一个重要的介导因子。

3 讨论

自上世纪 80 年代以来,肺癌已逐渐成为全球范围内对人类健康和生命威胁最大的恶性肿瘤。2012 年美国癌症死因统计显示肺癌的死亡率在过去的 30 年内上升了 200%,居恶性肿瘤之首。在我国,随着空气污染日益严重,近年来肺癌的发病率和死亡率均呈明显上升趋势。根据官方公布最新的数据,2012

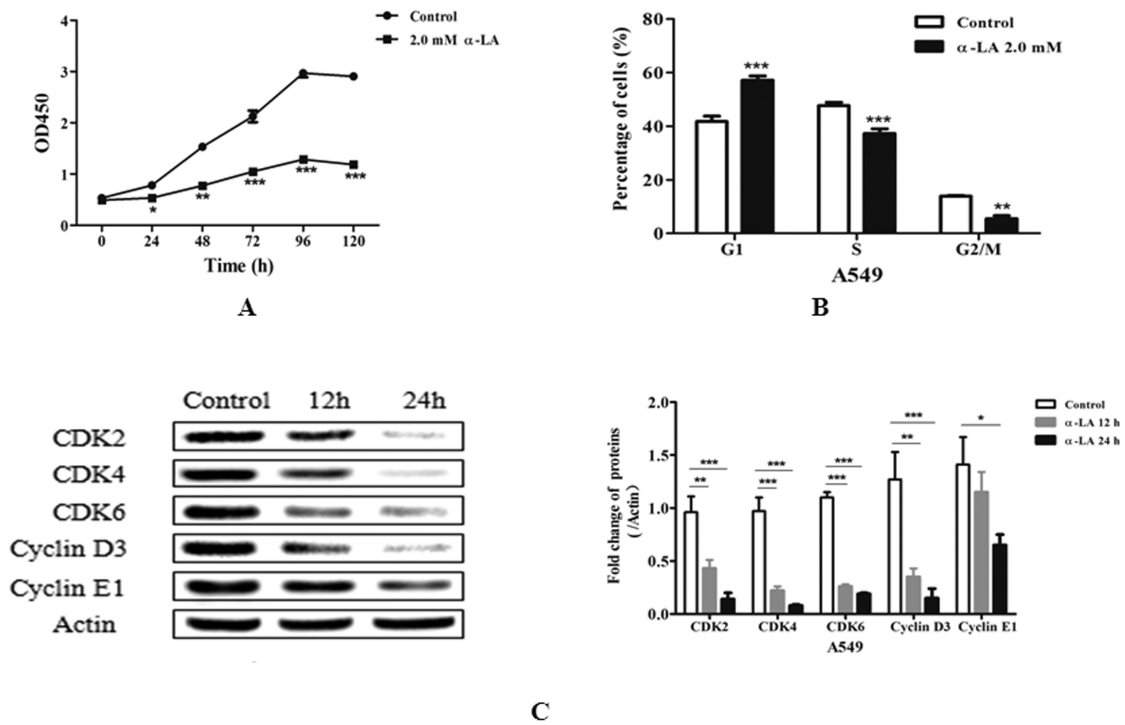


图1 α-LA 阻滞细胞于 G₁/S 期抑制细胞增殖

A.在不同时间点采用 CCK-8 法检测 α-LA 处理组与对照组细胞之间增殖的差异, **P<0.01; ***P<0.001

B.流式细胞术分析 α-LA 处理 24 h 组与对照组之间细胞周期的变化

C. α-LA 处理 (6, 12, 24h) 对细胞周期调节蛋白的表达的影响

Fig.1 α-LA reduces cell proliferation through G₁/S-phase arrest

A. Cell proliferation was measured using a CCK-8 assay at the indicated times. Significant differences as indicated by asterisks (**P<0.01; ***P<0.001).

B. The cells were cultured in either the absence or presence of α-LA for 24 h and subjected to cell cycle analysis using a flow cytometer.

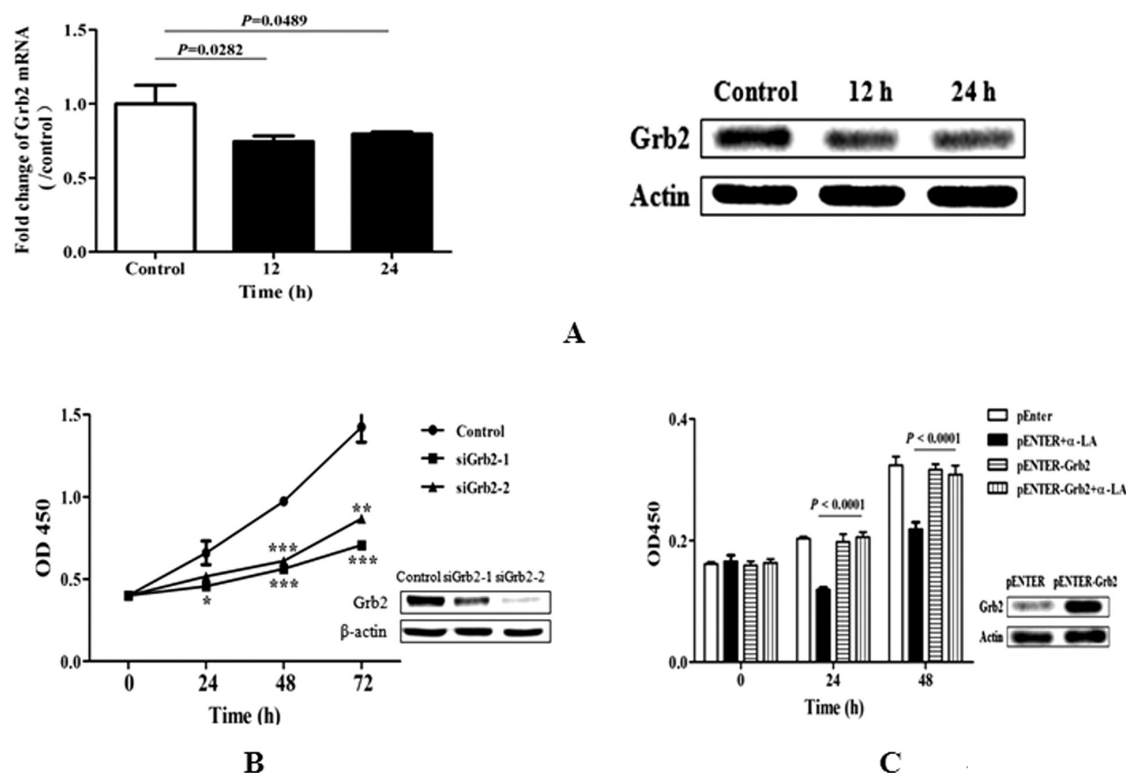
C. Expression of cell cycle regulatory proteins was assessed by western blotting in A549 cell lines after treatment with α-LA for 6, 12 and 24 h.

年全国肺癌的发病率为 52.06/10 万,死亡率为 42.05/10 万^[4]。其中约 80% 的肺癌患者为 NSCLC, 5 年生存率仅维持在 10-15%。化疗及新辅助化疗治疗仍是目前肺癌临床治疗的主要策略。以顺铂联合长春花属生物碱或依托泊苷的发现奠定了铂类在肺癌治疗中的地位,但此类化疗药物选择性差,亦可引起全身多脏器损伤。自 2002 年以来,肿瘤分子靶向治疗为肺癌的治疗打开了全新的视野,该方法采用单抗或小分子物质阻断肿瘤发病机制中特有的信号传导通路或分子,减少治疗带来的副作用,提高了安全性。目前特异性针对关键靶点(EGFR、VEGF、RXR、PDGF、COX-2 等)的药物已取得了可观的临床疗效^[5]。其中表皮生长因子受体(EGFR)阻断剂吉非替尼(易瑞沙)和酪氨酸激酶抑制剂(TKI)厄洛替尼(特罗凯)已广泛用于肺癌的临床治疗^[6]。尽管这些药物在肺癌的治疗中取得了长足的进步,但大部分肺癌患者在首诊时已丧失了手术治疗机会,而且绝大部分 NSCLC 患者对放化疗均不敏感,其长期生存率也并未得到明显改善^[1]。

近年来,研究人员逐渐认识到自由基在许多慢性疾病的发展,如衰老过程、心脏疾病和肿瘤发生发展过程中发挥着重要的作用。抗氧化剂的摄入不仅能在一定程度上延缓或阻止自由基对某一底物的氧化,阻断氧化的自由基链反应,还能从酚羟基提供氢形成稳定的终产物而阻止脂质进一步氧化。α-LA, 化学名 1,2-二硫戊环-3-戊酸,是目前发现唯一具水双溶性的天然抗氧化剂。α-LA(氧化型)能够中和失去抗氧化功能的自由

基,从线粒体电子传递链中再次获得电子,使自身得到还原(二氢硫辛酸,DHLA)。二者在体内协同作用,提高清除细胞内外任何部位自由基及抑制脂质过氧化的能力,是已知天然抗氧化剂中最强的一种^[7]。鉴于其强大的抗氧化能力,α-LA 现已在临床上广泛应用于治疗肝病^[8]、肾脏^[9]和神经疾病^[10]、糖尿病及糖尿病周围神经病变^[11]、肥胖症^[12]。除此之外,研究还发现,α-LA 作为酰基载体,存在于丙酮酸脱氢酶和二酮戊二酸脱氢酶中,参与三羧酸循环,在二酮酸氧化和脱羧过程中起到偶联酰基转移和电子转移的作用,影响糖类分解,增加细胞的能量储备^[13]。

目前,对 α-LA 抗肿瘤效应的研究还知之甚少,MasaoY 在膀胱癌的研究中发现,α-LA 调节 ERK 和 Akt 通路抑制细胞增殖、迁移、侵袭以及 β1 整合素表达^[14]。α-LA 下调 EGFR、ErbB2 和 Met 的酪氨酸磷酸化水平,抑制 HCC-827 和 PC-9 细胞从 G₁ 期向 S 期的过渡^[15]。在 HCC 研究中发现 α-LA 可下调 cyclin A,上调 p27 和 p21 水平,抑制 HepG2 细胞生长和增殖。同时增加 ROS 的生成并激活 p53;释放细胞色素 c,活化促细胞凋亡通路和抑制抑凋亡通路,从而诱导 HepG2 细胞凋亡^[16,17]。我们的研究发现 α-LA 通过抑制 A549 细胞 G₁/S 期的转换抑制肿瘤细胞增殖;与细胞 G₁/S 期的转换相关的调节分子 CDK2/4/6, cyclin D3 和 E1 的表达也随之发生了相应的改变。进一步的实验还证实 α-LA 抑 phospho-EGFR 与 phospho-ERK 水平与 Grb2 表达下调相关联,α-LA 对 Grb2 的调节作用在一定程度上抑制 EGF 诱导的 EGFR 相关通路活化^[18]。

图2 Grb2 介导 α -LA 诱导的肿瘤细胞增殖A. Grb2 在 α -LA 处理 (12, 24h) 组与对照组之间表达的差异 (左, mRNA; 右, WB)

B. 收集转染 siGrb2 24h 的 A549 细胞并转种于 96 孔板中, 在标记时间点检测细胞增殖变化 (**P<0.01; ***P<0.001) (上图); 提取 siGrb2 转染 48h 的 A549 细胞蛋白, 分析 Grb2 表达变化

C. 采用 CCK-8 法检测转染 Grb2 过表达质粒 (pENTER-Grb2) 对细胞增殖的影响

Fig.2 Grb2 mediates reductions in cell proliferation caused by α -LA.A. Grb2 levels were measured by real-time PCR (left) and western blotting (right) in A549 cell lines after treatment with α -LA for 12 and 24 h.

B. For cell proliferation assays, A549 cells were transfected with siRNA against Grb2 for 24 h and then seeded in 96-well plates for CCK-8 assays at the indicated times (upper panel). Significant differences as indicated by asterisks (**P<0.01; ***P<0.001). Cells were transfected 48 h after transfection, cells were collected to measure Grb2 protein expression.

C. After transfection with a Grb2-overexpression plasmid (pENTER-Grb2), cell proliferation was measured at the indicated times using a CCK-8 assay.

作为天然抗氧化剂中抗氧化性能最强的一类抗氧化剂, α -LA 对肿瘤细胞生长的调节作用至今仍不甚明了。课题组前期在对 α -LA 处理前后的肝癌细胞转录组及蛋白组学差异表达进行分析后发现 Grb2 在 α -LA 处理前后表达发生显著性改变^[19]。Grb2 作为在酪氨酸激酶受体信号通路中发挥重要衔接作用的蛋白, 可介导多种类型信号通路的活化^[20-22]。Grb2 由位于中央的 SH2 结构域 (与生长因子激活的生长因子受体结合) 和位于两侧的 SH3 结构域 (与 Sos 形成复合物) 组成, Grb2/Sos 复合物由于与膜结合的 GTPase 相互作用而被招募至质膜。Sos 可以催化 Ras 上面的 GDP 与 GTP 的交换, 从而活化 Ras, 进而逐级激活 Raf、MEK、MAPK 及其下游的蛋白激酶和转录因子, 将外界信号输入核内, 完成细胞增殖的信号传递, 并影响细胞的增殖与分化。生长因子受体酪氨酸激酶, 包括 EGF^[23]、PDGF^[24] 及 HGF^[25] FAK^[26] 等都含有可被 Grb2 SH2 结构域识别的磷酸化酪氨酸残基。这些通路执行一系列基本细胞活动包括细胞增生、生长、分化和生存; 维护正常胚胎发育及生命过程^[27]。现已明确 Grb2 作为主要信号传导分子在宫颈癌^[28]、胃癌^[29]、食管鳞状细胞癌^[30] 等肿瘤组织中高表达。并且 Grb2 的表达水平与肿瘤的淋巴结转移及预后密切相关^[21,30]。Grb2 的异常表达或其所

在信号通路的异常活化将减弱肿瘤细胞间或肿瘤细胞与细胞外基质间的黏附、降低细胞外基质结构的稳定性、增强细胞骨架的柔性和细胞的迁移能力, 促进肿瘤血管生成^[31]。

既然, Grb2 承载着某些膜受体信号传递, 并在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。而 α -LA 可显著下调肿瘤细胞 Grb2 表达。结合上述研究结果及文献综述, 我们提出 " α -LA 通过调控 Grb2 表达整合多条参与细胞增殖信号通路, 继而改变肿瘤细胞的生物学性状 " 这一科学观点。该过程可能是: 当细胞微环境中存在的细胞因子 (EGF) 等作为配体与酪氨酸激酶 (RTK) 的胞外受体结合后, 改变并驱动胞内域的激酶活性形成及自磷酸化, 进而招募下游信号分子完成细胞信号从膜外向膜内的转导过程^[32]。在未经 α -LA 处理时, 二聚化的 Grb2 通过其 C-端 SH2 结合到相邻两个 RTK 胞内 C-末端, 导致激酶区酪氨酸呈基础水平的磷酸化。 α -LA 引起 A549 细胞内 Grb2 表达下调, 与 RTK 结合减少, RTK 的磷酸化水平降低, 同时 Grb2 N-末端 SH3 结构功能域与鸟嘌呤核苷酸交换因子 (SOS) 结合形成的复合物减少, 继而降低 Ras 活性, 使 Raf-1 和 B-Raf 异源二聚体形成减少, 抑制下游通路的活化, 最终抑制肿瘤细胞生长、侵袭和迁移等恶性行为改变。

参 考 文 献(References)

- [1] Sawyers C. Targeted cancer therapy[J]. Nature, 2004, 432: 294-297
- [2] Jiang YQ, Xu XP, Guo QM, et al. Reversal of cisplatin resistance in non-small cell lung cancer stem cells by *Taxus chinensis* var[J]. Genet Mol Res, 2016, 15(3)
- [3] Goraca A, Huk-Kolega H, Piechota A, et al. Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential[J]. Pharmacol Rep, 2011, 63: 849-858
- [4] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66: 115-132
- [5] Cafarotti S, Lococo F, Froesh P, et al. Target Therapy in Lung Cancer [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 893: 127-136
- [6] Zhou F, Chen X, Zhou C. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR wild-type lung cancer: when there is a target, there is a targeted drug [J]. J Clin Oncol, 2015, 33: 523-524
- [7] Durand M, Mach N. Alpha lipoic acid and its antioxidant against cancer and diseases of central sensitization [J]. Nutr Hosp, 2013, 28: 1031-1038
- [8] Lyzogub VH, Altunina NV, Bondarchuk OM. Application of alpha-lipoic acid in clinical practice[J]. Lik Sprava, 2011, 7-8: 20-28
- [9] Zhang J, McCullough P. Lipoic Acid in the Prevention of Acute Kidney Injury[J]. Nephron, 2016, 134: 133-140
- [10] Moura FA, de Andrade KQ, dos Santos, et al. Lipoic Acid: its antioxidant and anti-inflammatory role and clinical applications [J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15: 458-483
- [11] Cakici N, Fakkal TM, van Neck JW, et al. Systematic review of treatments for diabetic peripheral neuropathy [J]. Diabet Med, 2016, 33: 1466-1476
- [12] Kucukgoncu S, Zhou E, Lucas KB, et al. Alpha-lipoic acid (ALA) as a supplementation for weight loss: results from a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Obes Rev, 2017, 18: 594-601
- [13] Bingham PM, Stuart SD, Zachar Z. Lipoic acid and lipoic acid analogs in cancer metabolism and chemotherapy [J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2014, 7: 837-846
- [14] Yamasaki M, Iwase M, Kawano K, et al. Alpha-Lipoic acid suppresses migration and invasion via downregulation of cell surface beta1-integrin expression in bladder cancer cells[J]. J Clin Biochem Nutr, 2014, 54: 18-25
- [15] Michikoshi H, Nakamura T, Sakai K, et al. alpha-Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Lett, 2013, 335: 472-478
- [16] Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, et al. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319: 1062-1069
- [17] Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, et al. Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells[J]. Apoptosis, 2007, 12: 113-123
- [18] Yang L, Wen Y, Lv G, et al. alpha-Lipoic acid inhibits human lung cancer cell proliferation through Grb2-mediated EGFR downregulation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 494: 325-331
- [19] Yang L, Wang X, Xu J, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis reveal α -lipoic acid regulated cell proliferation via Grb2-mediated signaling in hepatoma cancer cells [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22: 2981-2992
- [20] Xu Y, Zhang H, Lit LC, et al. The kinase LMTK3 promotes invasion in breast cancer through GRB2-mediated induction of integrin beta(1) [J]. Sci. Signal, 2014, 7: ra58
- [21] Zhang Y, Xu G, Liu G, et al. miR-411-5p inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cell via targeting GRB2 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476: 607-613
- [22] Smith MA, Licata T, Lakhani A, et al. MET-GRB2 Signaling-Associated Complexes Correlate with Oncogenic MET Signaling and Sensitivity to MET Kinase Inhibitors [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23: 7084-7096
- [23] Kozer N, Barua D, Henderson C, et al. Recruitment of the adaptor protein Grb2 to EGFR tetramers [J]. Biochemistry, 2014, 53: 2594-2604
- [24] Niba ET, Nagaya H, Kanno T, et al. Crosstalk between PI3 kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways downstream PDGF receptor[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31: 905-913
- [25] Cao HH, Cheng CY, Su T, et al. Quercetin inhibits HGF/c-Met signaling and HGF-stimulated melanoma cell migration and invasion[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 103
- [26] Nihal M, Wood GS. c-CBL regulates melanoma proliferation, migration, invasion and the FAK-SRC-GRB2 nexus [J]. Oncotarget, 2016, 7: 53869-53880
- [27] Giubellino A, Burke TR, Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer[J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12: 1021-1033
- [28] Timsah Z, Ahmed Z, Ivan C, et al. Grb2 depletion under non-stimulated conditions inhibits PTEN, promotes Akt-induced tumor formation and contributes to poor prognosis in ovarian cancer [J]. Oncogene, 2016, 35: 2186-2196
- [29] Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135: 1331-1339
- [30] Li LY, Li EM, Wu ZY, et al. Overexpression of GRB2 is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7: 3132-3140
- [31] Morlacchi P, Robertson FM, Klostergaard J, et al. Targeting SH2 domains in breast cancer[J]. Future Med Chem, 2014, 6: 1909-1926
- [32] Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer[J]. Trends Cell Biol, 2014, 24: 26-34