

文章编号 1006-8147(2015)01-0009-05

论 著

## 氯化锂调控人肺腺癌 A549 细胞增殖及侵袭转移的体外研究

林高阳, 徐 克

(天津医科大学总医院肺部肿瘤外科, 天津市肺癌研究所, 天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室, 天津 300052)

**摘要** 目的:探讨氯化锂对人肺腺癌 A549 细胞增殖和侵袭转移能力的影响及其调控机制。方法:应用 MTT 法、平板克隆形成实验评价细胞生长活力和增殖的生物学特征变化;划痕实验、Transwell 小室细胞体外侵袭实验检测肿瘤细胞迁移、侵袭能力;Western-blotting 法检测肿瘤细胞 GSK-3 $\beta$ 、P-GSK-3 $\beta$  和  $\beta$ -catenin 的表达水平变化。结果:MTT 法显示细胞增殖能力随氯化锂浓度的增加受到明显抑制,具有浓度依赖性变化。同时,随着检测时间的延长,在低浓度药物作用下(<10 mmol/L)细胞出现增殖增强现象,可能存在药物时间耐受;平板克隆形成实验显示细胞增殖受到不同浓度氯化锂的抑制,增殖能力的变化亦具有氯化锂浓度依赖性;划痕实验、Transwell 实验证实:氯化锂处理细胞后,细胞迁移、侵袭能力下降;Western-blotting 法显示:氯化锂处理肺腺癌 A549 细胞后,GSK-3 $\beta$  总蛋白表达下降、P-GSK-3 $\beta$  表达增加, $\beta$ -catenin 总蛋白表达增多。结论:高浓度的氯化锂能够抑制肺腺癌 A549 细胞的增殖和侵袭迁移,氯化锂抑制肺腺癌 A549 细胞增殖和侵袭迁移可能是通过 GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 信号通路实现的。

**关键词** 肺腺癌;氯化锂;迁移侵袭;GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 通路

**中图分类号** R734.2

**文献标志码** A

### Investigation of the effect of lithium chloride on proliferation and metastasis potential of human lung adenocarcinoma A549 cells *in vitro*

LIN Gao-yang, XU Ke

(Department of Lung Cancer Surgery, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin 300052, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the mechanism of lithium chloride impact on proliferation and invasion abilities of human lung cancer cell A549. **Methods:** Cell growth and proliferation were determined by MTT method and colony proliferation assay. Migration and invasion abilities of human lung cancer cell A549 were detected by wound scratch assay and Transwell assay. The expression of GSK-3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ), P-GSK-3 $\beta$  (Phosphorylation-GSK-3 $\beta$ ) and  $\beta$ -catenin of human lung cancer cell A549 were detected by western-blotting. **Results:** The proliferation of A549 was significantly decreased after treated with lithium chloride indicating a lithium chloride concentration-dependent manner. Meanwhile, with the extension of the detection time, enhanced cell proliferation phenomenon was observed at low concentrations (<10 mmol/L), indicating a time-tolerance of the drug. The proliferation of A549 could also be inhibited by lithium chloride with a dose-dependent manner. The migration and invasion capabilities of A549 decreased after treated with lithium chloride. And It was also found that the expression of GSK-3 $\beta$  was decreased while the expression of P-GSK-3 $\beta$  and  $\beta$ -catenin were increased after lithium chloride treatment. **Conclusion:** High concentration of lithium chloride could inhibit the proliferation and invasion of A549, and this may be achieved by GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Key words** lung adenocarcinoma; lithium chloride; metastasis/invasion; GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathway

肺癌占全球恶性肿瘤发病率的 12.7%, 死亡率的 18.2%, 均高居首位<sup>[1]</sup>。肺癌分为非小细胞肺癌和

小细胞肺癌, 非小细胞肺癌是最常见类型, 目前约占全部肺癌患者的 80%, 其中肺腺癌占 50%, 5 年生存率约为 15%。肺癌转移是肺癌的恶性标志和特征, 也是肺癌病人治疗失败和死亡的主要原因, 约 80%~90% 的肺癌病人死于转移<sup>[2]</sup>。目前尚无有效抑制肺癌转移的药物。锂是一种经美国 FDA (Food and Drug Administration) 批准首选用于治疗双相情感障碍性疾病的药物, 并已被安全用于临床数十

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (81372519, 30873035); 教育部留学回国人员科研启动基金, 教育部博士点基金 (20131202110005); 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目 (14JCZD-JC33800, 10JCZDJC20800); 天津市高等学校科技发展基金计划重点项目 (ZD200714)

作者简介 林高阳 (1988-), 男, 硕士在读, 研究方向: 肺癌的侵袭转移; 通信作者: 徐克, E-mail: ke\_xu@hotmail.com。

年<sup>[3]</sup>。研究显示,精神障碍性病人中接受锂治疗的患者比未接受锂治疗者患癌风险明显降低,患癌风险和锂剂量间表现出一个显著的反比关系<sup>[4]</sup>,锂可抑制多种肿瘤细胞的增殖分化<sup>[5]</sup>,被认为是一种有效的抗癌剂,亦可作为放化疗的辅助<sup>[6-7]</sup>。锂( $\text{Li}^+$ )对人体具有广泛的生物学活性,涉及胚胎发育、免疫调节、细胞增殖和分化等。近来,其抗癌作用日益受到研究者的关注。GSK-3 $\beta$ (Glycogen synthase kinase-3 $\beta$ )是锂作用的最常见的细胞内靶点之一<sup>[8]</sup>,如通过锂抑制 GSK-3 $\beta$  使前列腺癌和肝癌对 TRAIL 诱导的细胞凋亡更加敏感<sup>[9-10]</sup>。最近研究发现 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的异常激活与多种人类恶性肿瘤的发生、发展密切相关,然而氯化锂靶向抑制 GSK-3 $\beta$ ,调控肺腺癌 A549 细胞增殖及侵袭迁移能力的研究尚罕见报道。本文就氯化锂作用肺腺癌 A549 细胞进行初步的功能研究,以期发现调控肺癌增殖及侵袭迁移的信号通路,为氯化锂治疗肺癌增殖及侵袭迁移奠定初步的研究基础及探究方向。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞系和细胞培养** 人肺腺癌细胞系 A549 购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA), A549 细胞从液氮中取出复苏后用含有 10%胎牛血清(Gibco 公司),1%丙酮酸钠,1%谷氨酰胺,1%非必需氨基酸的 RPMI-1640(Gibco 公司)培养基在 37℃、5%CO<sub>2</sub>湿度的孵箱中孵育培养。

**1.2 细胞分化增殖能力测定** 取对数生长期的肺腺癌 A549 细胞株,按  $1 \times 10^4$  个/孔细胞,培养液补足至 200  $\mu\text{L}$ /孔,将细胞悬液接种至 96 孔培养板孵育培养,细胞贴壁后用含有不同浓度的氯化锂培养液置换 96 孔板中的培养液每孔 200  $\mu\text{L}$ ,并保证实验组终浓度分别达到 0、5、10、25、50、80 mmol/L,每个浓度分别设空白对照,每实验组均设 4 个复孔。继续 37℃、5%CO<sub>2</sub>湿度下孵育培养 24、48、72、96 h 后加入 MTT(噻唑蓝)溶液(5 mg/mL 用 PBS 配制,PH=7.4)20  $\mu\text{L}$ /孔继续孵箱内孵育培养 4 h,吸弃板孔内细胞培养液,每孔加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 终止培养,避光平摇震荡 10~15 min,使甲瓚结晶物充分溶解。用酶联免疫监测仪测定 490 nm 波长处吸光度(A)值,按下列公式计算细胞分化增殖活性:细胞分化增殖抑制率=(1-A<sub>490 值</sub>/对照组 A<sub>490 值</sub>) $\times 100\%$ ,以氯化锂设置浓度为横坐标,细胞分化增殖抑制率为纵坐标做折线图,实验重复 3 次。

**1.3 平板克隆形成实验** 肺腺癌 A549 细胞 2 000 个/孔接种于 6 孔板中,用含有 10%胎牛血清、1%丙

酮酸钠、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸的 RPMI-1640 培养基配制不同终浓度(0、5、10、25、50、80 mmol/L)的含氯化锂培养液在 37℃、5%CO<sub>2</sub>湿度的孵箱中孵育培养 120 h,弃去培养液,PBS 洗涤 2 遍,500  $\mu\text{L}$ /孔甲醇固定 15 min,弃固定液加入 500  $\mu\text{L}$  结晶紫染色液室温染色 30 min,吸弃染色液 PBS 冲洗 3 遍室温干燥,倒置荧光显微镜下拍照计数细胞数,计算克隆形成率=(克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ ,以氯化锂处理浓度为横坐标、克隆形成率为纵坐标作柱状图。

**1.4 划痕实验检测细胞迁移能力** 对数生长期肺腺癌 A549 接种于 6 孔板中,使次日细胞贴壁后融合密度达 60%左右,用含有 10%胎牛血清、1%丙酮酸钠、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸的 RPMI-1640 培养基配制不同终浓度(0、5、10、25、50、80 mmol/L)的含氯化锂培养液在 37℃、5%CO<sub>2</sub>湿度的孵箱中孵育培养 24 h,细胞贴壁后,用 1 mL 无菌 Tip 枪头在 6 孔板中划出一道清晰创痕,弃去培养液 PBS 轻轻冲洗,换入新培养液于倒置荧光显微镜(Nikon, Tokyo, Japan)4 倍下选取同一位置分别于划痕后 0、24、48、72、96、120 h 拍照,比较创痕变化检测细胞迁移能力。

**1.5 Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力** 对数生长期肺腺癌 A549 接种于 6 孔板中,细胞贴壁后配制含有不同浓度的氯化锂培养液处理细胞,继续培养 24 h,无血清 RPMI-1640 以 5:1 比例稀释 Matrigel 基质胶,100  $\mu\text{L}$ /孔铺入小室内室底部,37℃孵箱内放置 30 min~2 h,50  $\mu\text{L}$  无血清 RPMI-1640 培养液水化基质胶,吸弃用氯化锂处理后 6 孔板中培养液,PBS 清洗胰酶消化收集细胞沉淀,用无血清 RPMI-1640 培养液重悬使其成单细胞悬液,细胞计数以  $2 \times 10^4$  个/孔,200  $\mu\text{L}$  加入小室内室,外室内加入 700  $\mu\text{L}$  含 10%胎牛血清、1%丙酮酸钠、1%谷氨酰胺、1%非必需氨基酸的 RPMI-1640 培养液,继续培养 48 h 吸弃培养液,PBS 清洗外室,无菌棉签擦拭内室基质胶和细胞,甲醇固定小室基底膜 15 min,结晶紫染色 30 min,PBS 清洗室温干燥,倒置荧光显微镜下照相,选取 5 个视野计数计算不同浓度氯化锂处理后细胞侵袭的平均数,以氯化锂处理浓度为横坐标、细胞数为纵坐标作柱状图。

**1.6 Western-blotting 免疫印迹技术检测蛋白表达变化** 不同浓度氯化锂处理后的肺腺癌 A549 细胞于 48 h 收集细胞总蛋白,蛋白样品与 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液按 4:1 比例混合,煮沸变性 5~10 min。电泳时样品的加样量为每孔 20  $\mu\text{L}$ ,彩虹预染 Marker

加样量各为 5  $\mu$ L, 浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 10%, 在 Tris-glycine-SDS 电泳缓冲液中以 120 V 电泳 1 h; 电泳完毕后用湿转方法将分离的蛋白条带转移到 NC 膜; 载有蛋白质条带的膜在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST-buffer 中室温封闭 1 h, 然后加入含有 5% BSA-buffer 稀释一抗[抗 GSK-3 $\beta$  1:5 000、抗 P-GSK-3 $\beta$  (phosphorylation-GSK-3 $\beta$ ) 1:1 500、抗  $\beta$ -catenin 1:400,  $\beta$ -actin 作为对照 1:5 000], 4  $^{\circ}$ C 下振荡孵育过夜, TBST-buffer 洗涤后 (15 min/次共 3 次), 加入含 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联抗体反应液 (相应蛋白的 II 抗、5% 脱脂奶粉稀释), 室温中振荡孵育 1 h。洗涤后在膜上加 ECL 化学发光显示液, 室温作用 1 min 后于暗盒中曝光柯达胶片。图片扫描结果应用 Photoshop 作图软件处理。

## 2 结果

2.1 MTT 检测氯化锂处理 A549 细胞后细胞活力的变化 氯化锂处理 A549 细胞 24、48、72、96 h 后, MTT 检测细胞活力显示, A549 细胞活力受到显著抑制, 且具有氯化锂浓度依赖性变化和时间依赖性变化(图 1, 表 1)。随着氯化锂浓度增高, 细胞成活

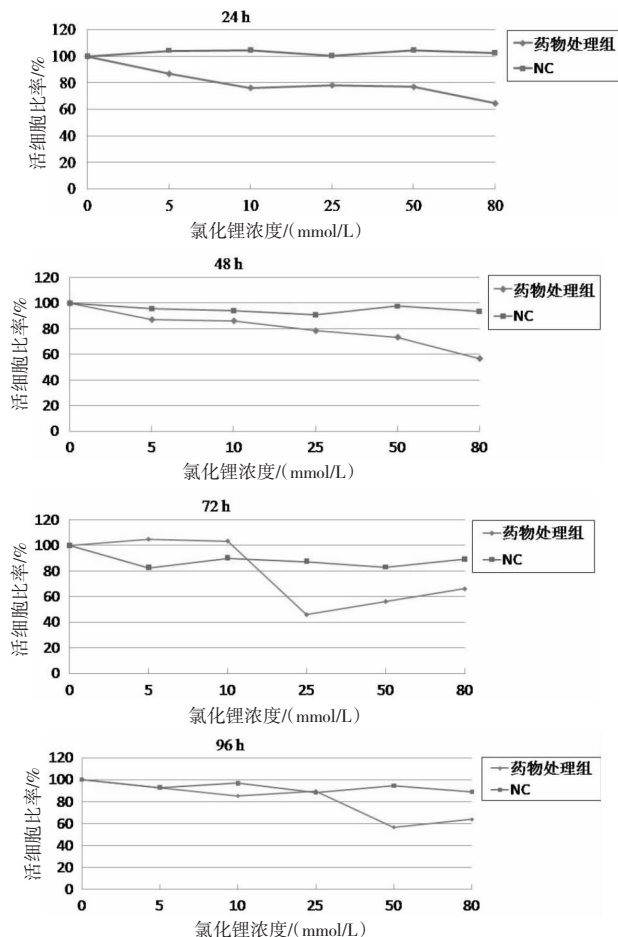


图 1 MTT 检测氯化锂处理 A549 后不同时间细胞增殖能力变化

Fig 1 The cell proliferation ability of A549 determined by MTT assay after 24, 48, 72, 96 h lithium chloride treatment

表 1 时间和浓度变量条件下, 氯化锂处理 A549 细胞后吸光度值的变化( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The absorbance value of A549 cells after variable conditions (time and concentration) of lithium chloride treatment ( $\bar{x} \pm s$ )

氯化锂浓度	24 h	48 h	72 h	96 h
0 mmol/L	1.382±0.222	1.222±0.059	1.187±0.130	1.296±0.110
5 mmol/L	1.316±0.316*	1.134±0.053*	1.245±0.091	1.203±0.127*
10 mmol/L	1.156±0.071*	1.113±0.019*	1.228±0.121	1.106±0.089*
25 mmol/L	1.186±0.059*	1.021±0.029*	0.545±0.434*	1.162±0.469*
50 mmol/L	1.167±0.113*	0.956±0.091*	0.667±0.234*	0.737±0.208*
80 mmol/L	0.979±0.104*	0.740±0.049*	0.784±0.139*	0.829±0.058*

\* 同一时间点下与 0 mmol/L 组比较,  $P < 0.05$

率下降, 对细胞抑制程度加强, 但是在 72 h 低浓度氯化锂 (<10 mmol/L) 出现了促进增殖的变化。

2.2 平板克隆形成实验分析氯化锂处理 A549 细胞后增殖能力的变化 氯化锂处理 A549 细胞 120 h 后, 集落形成实验检测细胞增殖能力显示, 随着氯化锂浓度逐渐增加, 肺腺癌 A549 细胞增殖形态学和数量受到显著抑制(图 2、3)。

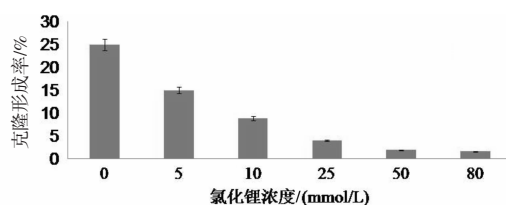


图 2 平板克隆形成实验检测氯化锂处理 A549 细胞后 120 h 克隆形成率的变化

Fig 2 Cloning efficiency of A549 determined by colony proliferation assay after 120 h lithium chloride treatment

2.3 划痕实验检测氯化锂处理肺腺癌 A549 后细胞迁移能力的变化 氯化锂处理 A549 细胞后, 划痕实验检测细胞迁移能力显示, 随着氯化锂浓度增加, 处理时间延长, 肺腺癌 A549 细胞迁移能力减弱, 创痕宽度与氯化锂浓度之间存在正相关性, 创痕宽度与氯化锂处理时间之间存在负相关性(图 4)。

2.4 Transwell 小室实验检测氯化锂处理 A549 细胞后侵袭能力的变化 运用 Transwell 小室实验检测氯化锂处理肺腺癌 A549 细胞后 48 h, 肿瘤细胞的侵袭转移能力, 结果见图 5、6, 氯化锂处理肺腺癌 A549 细胞后, 肿瘤细胞的侵袭和迁移状态受到明显抑制, 显微镜下细胞计数穿过 Transwell 小室的细胞数明显降低, 侵袭能力受到明显抑制。

2.5 Western-blotting 免疫印迹技术检测氯化锂处理细胞后蛋白水平变化 Western-blotting 免疫印迹技术检测显示: 氯化锂处理肺腺癌 A549 细胞后, GSK-3 $\beta$  总蛋白表达下降、P-GSK-3 $\beta$  表达增加,  $\beta$ -catenin 总蛋白表达增多(图 7)。



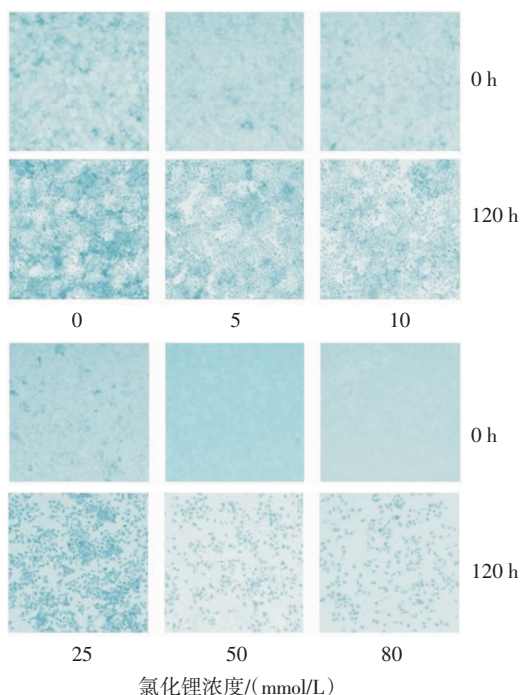


图 3 平板克隆形成实验检测氯化锂处理 A549 后 120 h 细胞形态学的变化

Fig 3 Morphology of A549 determined by colony proliferation assay after 120 h lithium chloride treatment

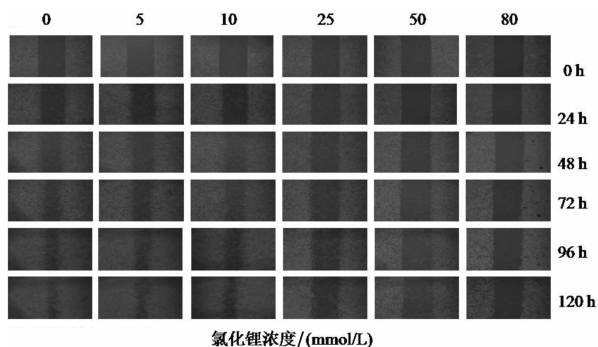


图 4 划痕实验检测氯化锂处理 A549 后细胞迁移能力的变化

Fig 4 Migration capability of A549 demonstrated by wound scratch assay after lithium chloride treatment

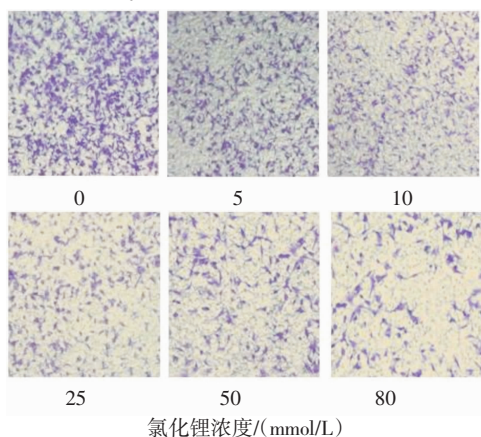
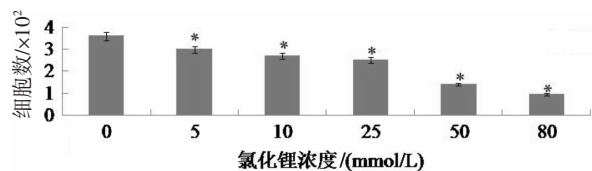


图 5 Transwell 小室实验检测氯化锂处理 A549 后 48 h 细胞侵袭和迁移状态的变化( $\times 100$ )

Fig 5 Invasion and migration status of A549 demonstrated by Transwell assay after 48 h lithium chloride treatment( $\times 100$ )



细胞数:在图 5 中,相同时间点不同浓度氯化锂处理下,100X 视野下选取 5 个视野计数 A549 细胞穿过 Matrigel 基质胶的平均数;

\* 同一时间点下与 0 mmol/L 组比,  $P < 0.05$

图 6 Transwell 小室实验检测氯化锂处理 A549 后 48 h 细胞迁移侵袭能力的变化

Fig 6 Migration and invasion capabilities of A549 demonstrated by Transwell assay after 48 h lithium chloride treatment

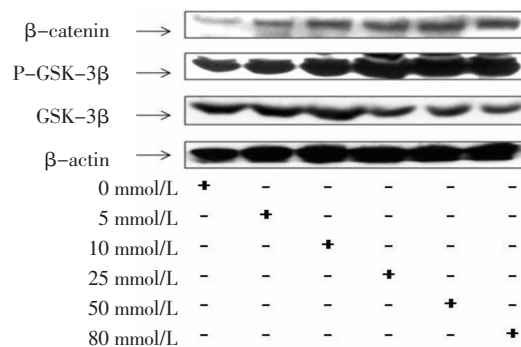


图 7 蛋白免疫印迹技术检测氯化锂处理细胞后 48 h 蛋白水平的变化

Fig 7 The expression of GSK-3 $\beta$ /β-catenin pathway relative proteins detected by western blotting after 48 h lithium chloride treatment

### 3 讨论

目前肺癌的主要治疗方法是外科手术治疗、放疗、化疗和生物治疗等。肺癌的治愈率仅为 15%~17%左右。外科手术治疗非小细胞肺癌的 5 年生存率为 30%~40%, 然而绝大多数患者就诊时都已处于中晚期, 错过了手术治疗的机会。放疗为一种局部治疗, 其疗效是有限的, 治疗肺癌的 5 年生存率低于 5%, 同时亦有剂量限制性、毒性问题。化疗可用于几乎全部肺癌患者, 因此抗肿瘤药物治疗成为中晚期肺癌患者的主要治疗手段。肺癌的侵袭转移是导致患者临床治疗失败的重要原因。转移倾向是一系列的生物学过程, 是指能使肿瘤细胞从起源部位到达远处局部并形成新的转移灶生长的运动。它包括以下几个步骤: 侵袭周围组织, 侵入淋巴微脉管系统和血液系统, 进而转移至远处组织的微管系统继续生长, 溢出血管到达远处组织的微环境内生长, 最终适应这些组织的促进细胞增殖的异质微环境, 进而最终形成继发肿瘤<sup>[1]</sup>。然而, 目前肺癌细胞转移的机制仍然知之甚少, 肺癌的转移是一个多步骤、多阶段、多因素和多基因调控的复杂过程, 因此控制肺癌的侵袭和转移是改善肺癌患者预后, 提高

患者生存率和生活质量的最重要的措施。

WNT 信号通路是胚胎形成和发育过程中的关键因子,与多种肿瘤的发生有着密切的关系,是肿瘤学和再生医学中药物基因组学研究的热点。近年来,WNT 信号通路和肿瘤的关系已引起人们的关注,针对 WNT 信号通路不同基因靶点的高特异性基因药物已被研发,肿瘤的分子诊断也相继出现。目前,以 WNT 信号通路为靶点的肿瘤基因治疗主要包括细胞膜水平、胞内通路成员蛋白水平、 $\beta$ -catenin 水平和核内 TCF/LEF- $\beta$ -catenin 复合体水平。糖原合成酶激酶-3(GSK-3)是普遍存在于真核生物的一种多功能丝氨酸/苏氨酸激酶,包括 GSK-3 $\alpha$  和 GSK-3 $\beta$ ,但目前对两个亚型之间是否有不同作用研究较少。目前认为 GSK-3 $\beta$  参与并调控 WNT/ $\beta$ -catenin 信号传导通路,是 WNT/ $\beta$ -catenin 信号通路的关键酶,它能够有效的促进 APC 蛋白、轴蛋白和  $\beta$ -catenin 的磷酸化,最终使  $\beta$ -catenin 泛素化而降解。Hiroyuki 等<sup>[12]</sup>研究发现:GSK-3 $\beta$  参与非经典的 WNT5a 信号通路,WNT5a 可以引起多种肿瘤细胞的迁移,GSK-3 $\beta$  可以通过调节 ROR<sub>2</sub> 受体的水平影响 WNT5a 诱导的细胞迁移。Zhan 等<sup>[13]</sup>研究表明氯化锂是 GSK-3 $\beta$  的高度选择性抑制剂。Gould 等<sup>[14]</sup>研究发现,氯化锂可以通过抑制 GSK-3 $\beta$  从而缓解肿瘤化疗所引起的白细胞缺乏,同时又通过临床试验证实氯化锂不会促进或影响肿瘤发生发展,但未对氯化锂对肿瘤的治疗作用做进一步阐释。Beurel 等<sup>[15]</sup>研究发现,在肝癌细胞中,氯化锂可以引起 GSK-3 $\beta$  的磷酸化失活,进而影响细胞膜上 CD95 的表达,并抑制依托泊苷、喜树碱等化疗药物所引起的细胞凋亡。但氯化锂对未经化疗肿瘤细胞的作用未见研究报道,尤其是对肺癌尚未见报道。在本实验研究中我们进一步验证氯化锂靶向抑制 GSK-3 $\beta$  的表达,使 P-GSK-3 $\beta$  水平增加功能降低,可能通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,抑制肺癌细胞的增殖和侵袭转移。

本研究初步探究了氯化锂在不同浓度下对肺腺癌 A549 细胞增殖作用的影响,初步得出氯化锂对肺癌细胞增殖有一定的浓度依赖相关性,在低浓度(<10 mmol/L)时可见氯化锂对肺癌 A549 细胞增殖作用的强化,可能是由于低剂量下随时间的延长药物毒性作用弱化,细胞出现低剂量药物耐受所致;较高浓度时不仅表现出了对肺癌细胞的增殖抑制同时也表现出了对肺癌细胞的凋亡诱导。通过划痕和小室实验进一步研究了氯化锂对肺癌 A549 细胞侵袭转移的功能学表现,实验研究证实氯化锂在

一定浓度剂量下促进增殖及抑制肿瘤细胞迁移侵袭的作用。依据文献报道,氯化锂作为高度特异的 GSK-3 $\beta$  抑制剂及 WNT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 信号通路在肿瘤研究中作用功能,通过 Western-blotting 法检测了氯化锂处理肺癌细胞后相关蛋白的变化,进一步揭示了氯化锂对肺腺癌 A549 细胞增殖和侵袭迁移的体外抑制作用的机制,初步探究了其在浓度依赖性条件变化下,不同时间点上发挥抑制增殖、侵袭转移作用的分子生物学行为,为进一步研究氯化锂究竟能否成为将来临床用于治疗肺癌的药物使用奠定了强有力的理论基础,也为进一步解答其在较高浓度时发挥抑制肿瘤增殖、侵袭迁移,促进肿瘤细胞凋亡以及对肿瘤细胞生长周期的影响指出了方向。肺癌侵袭转移的分子机制究竟有多复杂?氯化锂调控作用所经的信号通路究竟是什么?氯化锂作用肺癌细胞后所表现出来的一系列生物学行为如何做出生物信息学解释还有待更加深入地研究。

#### 参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69
- [2] Nguyen D X, Massague J. Genetic determinants of cancer metastasis [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(5): 341
- [3] D'souza R, Rajji T K, Mulsant B H. Use of lithium in the treatment of bipolar disorder in late-life[J]. Curr Psychiatry Rep, 2011, 13(6): 488
- [4] Filyak Y, Filyak O, Stoika R. Transforming growth factor beta -1 enhances cytotoxic effect of doxorubicin in human lung adenocarcinoma cells of A549 line[J]. Cell Biol Int, 2007, 31(8): 851
- [5] Lan Y, Liu X, Zhang R, et al. Lithium enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung carcinoma A549 cells[J]. Biometals, 2013, 26(2): 241
- [6] Hager E D, Dziambor H, Höhmann D, et al. Effects of lithium on thrombopoiesis in patients with low platelet cell counts following chemotherapy or radiotherapy[J]. Biol Trace Elem Res, 2001, 83(2): 139
- [7] Hager E D, Dziambor H, Winkler P, et al. Effects of lithium carbonate on hematopoietic cells in patients with persistent neutropenia following chemotherapy or radiotherapy[J]. J Trace Elem Med Biol, 2002, 16(2): 91
- [8] Gupta A, Schulze T G, Nagarajan V, et al. Interaction networks of Lithium and valproate molecular targets reveal a striking enrichment of apoptosis functional clusters and neurotrophin signaling [J]. Pharmacogenomics J, 2012, 12(4): 328
- [9] Beurel E, Blivet-Van Eggelpoël M J, Kornprobst M, et al. Glycogen synthase kinase -3 inhibitors augment TRAIL -induced apoptotic death in human hepatoma cells[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77(1): 54
- [10] Liao X, Zhang L, Thrasher J B, et al. Glycogen synthase kinase-3be-

(下转第 21 页)

模式,认为是多种遗传因素和环境因素共同作用的结果。本次研究对一早期还未出现肾脏功能性改变,但免疫组化证实有 TGF- $\beta$ 、TGF- $\beta$ R1 和 Smad3 高表达的 DN 患者的全外显子进行测序,结合基因功能学分析发现基因 FUT6 的终止突变,免疫组化证实在该患者的肾活检标本中 FUT6 的表达下降。但目前尚缺乏直接证据表明 FUT6 终止突变与早期出现的 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的激活有直接的联系,需要进一步分子生物学实验对其致病的具体机制进行研究。另外候选致病基因还需进行相关病例疾病验证和种系突变检测,以明确其在该疾病中的发生率。

#### 参考文献:

- [1] Kikkawa R, Koya D, Haneda M. Progression of diabetic nephropathy [J]. *AJKD*, 2003, 41(3 Suppl 1): S19
- [2] Arar N H, Freedman B I, Adler S G, et al. Heritability of the severity of diabetic retinopathy: The FIND-Eye study[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(9): 3839
- [3] Wong T Y, Klein R, Islam A, et al. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States[J]. *Am J Ophthalmol*, 2006, 141(3): 446
- [4] Ng S B, Turner E H, Robertson P D, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes[J]. *Nature*, 2009, 461(7261): 272
- [5] Walsh T, Shahin H, Elkan-Miller T, et al. Whole exome sequencing and homozygosity mapping identify mutation in the cell polarity protein GPSM2 as the cause of nonsyndromic hearing loss DFNB2 [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 87(1): 90
- [6] Tervaert T W, Mooyaart A L, Amann K. Pathologic classification of diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(4): 556
- [7] Sherwood A L, Upchurch D, Stroud M R, et al. A highly conserved His -His motif present in alpha1 -->3/4fucosyltransferases is required for optimal activity and functions in acceptor binding[J]. *Glycobiology*, 2002, 12(10): 599
- [8] Holgersson J, Lofling J. Glycosyltransferases involved in type 1 chain and Lewis antigen biosynthesis exhibit glycan and core chain specificity[J]. *Glycobiology*, 2006, 16(7): 584
- [9] Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive Oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(7): 934
- [10] Mollicone R, Reguigne I, Fletcher A, et al. Molecular basis for plasma alpha(1, 3)-fucosyltransferase gene deficiency(FUT6)[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(17): 12662
- [11] Wang X, Inoue S, Gu J, et al. Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice[J]. *PNAS*, 2005, 102(44): 15791
- [12] Kim Y W, Park J, Lee H J, et al. TGF-beta sensitivity is determined by N-linked glycosylation of the type II TGF-beta receptor[J]. *Biochem J*, 2012, 445(3): 403
- [13] Hirakawa M, Takimoto R, Tamura F, et al. Fucosylated TGF-beta receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal Cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(1): 156
- [14] Ge S A, Costa R S, Ravinal R C, et al. Mast cells, TGF-beta1 and alpha-SMA expression in IgA nephropathy[J]. *Dis Markers*, 2008, 24(3): 181
- [15] Yu L, Hebert M C, Zhang Y. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses[J]. *EMBO*, 2002, 21(14): 3749
- [16] Zhao C G, He X J, Lu B, et al. Increased expression of collagens, transforming growth factor-beta 1, and -beta 3 in gluteal muscle contracture[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2010, 11: 15

(2014-08-20 收稿)

.....

#### (上接第 13 页)

- ta suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(11): 1215
- [11] Mego M, Mani S A, Cristofanilli M. Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(12): 693
- [12] Yamamoto H, Yoo S K, Nishita M, et al. Wnt5a modulates glycogen synthase kinase 3 to induce phosphorylation of receptor tyrosine kinase Ror2[J]. *Genes Cells*, 2007, 12(11): 1215
- [13] Zhan G F, Phiel C J, Spece L, et al. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3(GSK-3)[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 33067
- [14] Gould T D, Gray N A, Manji H K. Effects of a glycogen synthase kinase-3 inhibitor, Lithium, in adenomatous polyposis coli mutant mice[J]. *Pharmacol Res*, 2003, 48(1): 49
- [15] Beurel E, Kornprobst M, Blivet-Van Eggelpoël M J, et al. GSK-3beta inhibition by Lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 300(2): 354

(2014-08-28 收稿)