

siRNA 沉默 *MEKK3* 基因促进 TRAIL 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡

刘寿贵¹, 刘磊¹, 周晓健², 郭善禹^{1*} (1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 普外科, 上海 200011; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院 口腔颌面外科, 上海市口腔学重点实验室, 上海 200011)

[摘要] 目的: 研究抑制促分裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶-激酶 3 (mitogen-activated protein/extracellular signal regulated kinase-kinase 3, *MEKK3*) 基因表达促进 TRAIL 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的作用, 寻找乳腺癌临床治疗新策略。方法: 应用 MTT 法检测人 TRAIL 对 MCF-7 细胞生长的抑制作用。合成 *MEKK3*-siRNA, 应用脂质体介导 *MEKK3*-siRNA 转染入人乳腺癌细胞 MCF-7, 以 RT-PCR 和 Western blotting 法检测 MCF-7 细胞 *MEKK3* mRNA 和蛋白的表达。应用 MTT 法和流式细胞术检测 *MEKK3*-siRNA 与 TRAIL 联合处理后 MCF-7 细胞的增殖和凋亡。结果: TRAIL 具有抑制 MCF-7 细胞增殖作用, 但其抑制作用较弱。*MEKK3*-siRNA 转染后能有效而稳定地抑制 MCF-7 细胞中 *MEKK3* mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.01$)。TRAIL 与 *MEKK3*-siRNA 联合处理 MCF-7 细胞较 TRAIL 单独处理更明显地抑制细胞增殖活力 ($P < 0.05$), 更明显地增加细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。结论: siRNA 沉默 *MEKK3* 基因能显著促进 TRAIL 对乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用, 为探讨乳腺癌治疗新方案提供了实验依据。

[关键词] 乳腺癌细胞; TRAIL; siRNA; 促分裂原活化蛋白/细胞外信号调节激酶-激酶 3 (*MEKK3*); 凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0552-05

MEKK3-targeted siRNA combined with TRAIL induces apoptosis of breast cancer cell line MCF-7

LIU Shou-gui¹, LIU Lei¹, ZHOU Xiao-jian², GUO Shan-yu¹ (1. Department of General Surgery, Ninth People's Hospital of Shanghai, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Ninth People's Hospital of Shanghai, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the promoting effect of silencing mitogen-activated protein/ERK kinase kinase 3 (*MEKK3*) gene on TRAIL-induced apoptosis of breast cancer MCF-7 cells, so as to search for a novel clinical treatment strategy for breast cancer. **Methods:** TRAIL was used to treat MCF-7 cells and the growth inhibition of MCF-7 cells was determined by a methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Chemically synthesized small interfering RNA (siRNA) targeting *MEKK3* was transfected into MCF-7 cells using DharmaFECT Transfection reagent, and the expression of *MEKK3* mRNA and protein was detected by RT-PCR and Western blotting. The proliferation and apoptosis of MCF-7 cells were analyzed by MTT and flow cytometry (FCM) after treatment with *MEKK3*-siRNA combined with TRAIL. **Results:** TRAIL inhibited the proliferation of MCF-7 cells, but the inhibitory effect was weak. Transfection with *MEKK3*-siRNA effectively and stably inhibited the expression of *MEKK3* mRNA and protein expression ($P < 0.01$). Combination of TRAIL and *MEKK3*-siRNA more severely inhibited the proliferation of MCF-7 cells compared with TRAIL alone ($P < 0.05$); besides, the combination also increased the apoptosis rate of MCF-7 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Silencing of *MEKK3* gene with siRNA can greatly promote TRAIL-induced apoptosis of breast cancer cells MCF-7, which lays an experimental foundation for new treatment method of breast cancer.

[Key words] breast cancer cell; TRAIL; siRNA; mitogen-activated protein/extracellular signal regulated kinase-kinase 3 (*MEKK3*); apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 552-556]

[基金项目] 上海交通大学科技发展基金资助项目(No.05xj21022)。Supported by the Science Development Program of Shanghai Jiaotong University(No.05xj21022)

[作者简介] 刘寿贵(1982-),男,福建省宁德市人,硕士研究生,主要从事乳腺癌基础和临床的研究, E-mail: liushougui1@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: guoshyu@sina.com

肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)^[1], 又称 Apo- II Ligand, 作为一种新的凋亡诱导配体, 自发现以来就一直倍受关注。TRAIL 能特异性诱导肿瘤细胞凋亡而对正常组织细胞无明显毒性作用^[2-3]。但是有相当一部分肿瘤具有抵抗 TRAIL 的细胞毒性作用, 包括乳腺癌等实体肿瘤, 其机制尚未明确。目前 TRAIL 联合用药已成为临床肿瘤治疗的一种新策略。本研究应用 siRNA 沉默促分裂原活化蛋白/细胞外信号调节激酶-激酶 3 (mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-kinase 3, MEKK3) 基因, 联合 TRAIL 诱导乳腺癌 MCF-7 细胞发生凋亡, 两者联合应用可提高 MCF-7 细胞对 TRAIL 致凋亡的敏感性, 研究结果为寻找潜在的乳腺癌联合治疗方案提供了实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株和主要试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7 由上海交通大学医学院附属仁济医院普外科惠赠。SMARTpool MEKK3-siRNAs (产品号 M-003301-02-0005) 与脂质体 DharmaFECT Transfection Reagent 购于 Dharmacon 公司。鼠抗人 MEKK3 单克隆抗体购于 BD 公司, 鼠抗人 Actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。100 bp DNA marker、cDNA 合成及 PCR 扩增试剂购于 Takara 公司; 人 TRAIL/Apo- II Ligand 购于 peprotech 公司; Annexin V-FITC/PI 双标记细胞凋亡检测试剂盒购自 BD 公司。 β -actin 与 MEKK3 cDNA 引物均由上海生工技术公司合成。

1.2 人乳腺癌 MCF-7 细胞的培养和转染

MCF-7 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。由 Dharmacon 公司设计合成 MEKK3-siRNA, 其序列为: (1) 5'-GAUAGAAGCUCAAGCAUGAUU-3'; (2) 5'-AAACUCAGCUUUAUGACAAUU-3'; (3) 5'-CCAAGCAGGUCCAAUUUGAUU-3'; (4) 5'-GCAAACGCCUGCAGACGAUUU-3'。据该公司产品数据及查阅文献, 其干扰具有特异性和惟一性^[4]。转染前 24 h 前接种细胞至 6 孔板和 96 孔板(6 孔板接种细胞 3.3 × 10⁵ 个/孔, 96 孔板接种 1 × 10⁴ 个/孔)。24 h 后吸弃上清液, 6 孔板加入 2 ml 转染混合物(1.6 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 + 100 μ l 的 2 μ mol/L 的 siRNA + 4 μ l 脂质体 + 296 μ l 无抗生素 RPMI 1640); 阴性对照孔中加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。96 孔板加

入 100 μ l 转染混合物(80 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 + 5 μ l 的 2 μ mol/L 的 siRNA + 0.25 μ l 脂质体 + 14.75 μ l 无抗生素 RPMI 1640); 阴性对照孔中加入 100 μ l 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。继续放入 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。6 孔板细胞用于 mRNA、蛋白、细胞凋亡检测, 96 孔板细胞用于 MTT 法实验。

1.3 MTT 法检测 TRAIL 对 MCF-7 细胞增殖的影响

MCF-7 细胞(1 × 10⁵/孔)接种 96 孔板培养, 次日用含不同浓度 TRAIL 处理(100 ~ 1 000 ng/ml), 同时设置阴性对照组。培养 12 h 后加入 MTT, 37 °C 培养 4 h 后, 弃上清, 加入 200 μ l DMSO 终止反应。用酶标仪在 490 nm 测定光密度(D)定量反应产物。所有样本设 3 个复孔。

1.4 RT-PCR 检测 MCF-7 细胞 MEKK3 基因的表达

转染后 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中, 实验分 2 组: 实验组(MEKK3-siRNA)、空白对照组, 每组实验重复 3 次。接种 MCF-7 细胞于 6 孔板中(3.3 × 10⁵ 个/孔), 转染 MEKK3-siRNA 后, 分别于 24、48、72 h 后用 trizol 试剂提取总 RNA, 用 RT-PCR 试剂盒进行逆转录反应。PCR 反应 MEKK3 引物序列: 下游 5'-AGTCTCGGAGGATGTTGG-3', 上游 5'-TTGAAGGCT-TACGGTGCT-3', 扩增产物片段为 133 bp; β -actin 引物序列: 5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3' 和 5'-CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC-3', 扩增产物片段为 592 bp。以上两种引物反应条件均为: 98 °C 5 min, 95 °C 变性 30 s, 54.6 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共进行 38 个循环。取 5 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 紫外照相观察分析, 以 MEKK3 与 β -actin 条带灰度比值半定量 MEKK3 mRNA 的表达水平。

1.5 Western blotting 法检测 MCF-7 细胞 MEKK3 蛋白的表达

接种 MCF-7 细胞于 6 孔板中(3.3 × 10⁵ 个/孔), 转染 MEKK3-siRNA 后, 分别于转染后 24、48、72、96 h, 提取转染细胞的总蛋白, 以 BCA 检测定量, 以等量总蛋白于 10% SDS-PAGE 电泳后, 300 mA 1.5 h 电转移至硝酸纤维素膜, 再以 5% 脱脂奶封闭 1 h。鼠抗人单克隆抗体 MEKK3(1:500)杂交 12 h, 洗膜后与辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG(1:1 000)结合。ECL 显色, 暗室曝光显影。蛋白的相对表达量取 MEKK3 与 β -actin 的灰度比。

1.6 MTT 法检测 TRAIL 与 MEKK3-siRNA 联合作用对 MCF-7 细胞增殖的影响

实验分为 TRAIL 组、siRNA 组、TRAIL + siRNA

组和阴性对照组, 每组设 3 个平行孔。接种 MCF-7 细胞于 96 孔板中(1×10^4 个/孔), 次日 siRNA 组和 TRAIL + siRNA 组转染 MEKK3-siRNA , 24 h 后应用含 700 ng/ml TRAIL 的培养液更换 TRAIL 组和 TRAIL + siRNA 组培养液, 分别于 24、48、72、96 h 时间点 MTT 法测细胞增殖活力, 并绘制细胞增殖曲线。

1.7 Annexin V/PI 双染法检测 TRAIL 与 MEKK3-siRNA 联合作用对 MCF-7 细胞凋亡的影响

接种 MCF-7 细胞于 6 孔板(3.3×10^5 个/孔), 实验分组及处理方法同方法 1.6, 48 h 后胰酶消化收集 4 组细胞, 离心($800 \times g, 5 \text{ min}$), 弃上清, PBS 洗涤, 离心($800 \times g, 5 \text{ min}$), 弃上清, 分别用 100 μl 结合缓冲液重悬细胞, 加 Annexin V-FITC 5 μl 、PI 5 μl , 室温避光孵育 30 min, 加 400 μl 结合缓冲液后上流式细胞仪检测。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。MTT 检测结果采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK 方法。RT-PCR 及 Western blotting 结果通过条带灰度比值对检测目的物进行相对定量, 采用 *t* 检验进行统计学分析。流式细胞仪检测结果采用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 TRAIL 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

TRAIL 在 100 ~ 700 ng/ml 处理 MCF-7 细胞 24 h, TRAIL 对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用逐渐增加; TRAIL 质量浓度为 700、800、900、1 000 ng/ml 各组较对照组明显抑制 MCF-7 细胞增殖($P < 0.01$), 而大于 700 ng/ml 的各组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。故采用 700 ng/ml TRAIL 为诱导 MCF-7 细胞凋亡适宜质量浓度(图 1)。

2.2 MEKK3-siRNA 对 MCF-7 细胞 MEKK3 mRNA 和蛋白表达的抑制作用

RT-PCR 和 Western blotting 结果均显示, MCF-7 细胞中 MEKK3 表达水平较高。应用 MEKK3-siRNA 转染 MCF-7 细胞后, RT-PCR 检测转染 24 h 后 MCF-7 细胞 MEKK3 mRNA 表达量与对照组相比出现明显抑制($P < 0.01$), 48 h 后 siRNA 对 MCF-7 细胞 MEKK3 mRNA 抑制作用逐渐减弱(图 2)。Western blotting 结果显示, 转染 24 h 后 MCF-7 细胞 MEKK3 蛋白表达量出现明显减低, 而转染 48 h 后 MEKK3 蛋白表达水平降低最明显($P < 0.01$), 72 h 后蛋白水平有所上升(图 3)。由此说明 MEKK3-siRNA 通

过 RNA 干扰有效抑制 MCF-7 细胞 MEKK3 mRNA 和蛋白表达, 其作用效果与转染时间相关。

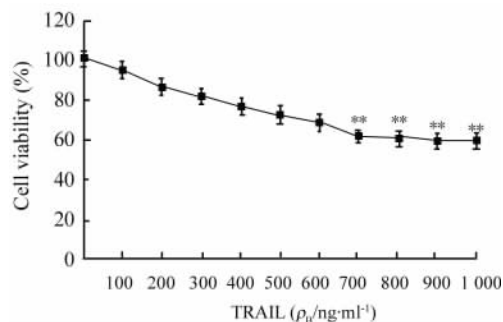


图 1 不同质量浓度 TRAIL 对 MCF-7 细胞增殖的影响

Fig. 1 Concentration - response curve of MCF-7 cells to TRAIL

** $P < 0.01$ vs 0 ng/ml

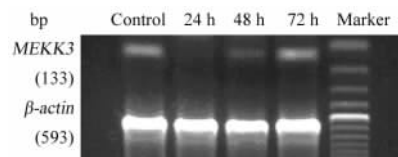


图 2 RT-PCR 分析 MEKK3-siRNA 对 MCF-7 细胞 MEKK3 mRNA 表达的抑制作用

Fig. 2 Expression of MEKK3 mRNA in MCF-7 cells after MEKK3-siRNA transfection as detected by RT-PCR

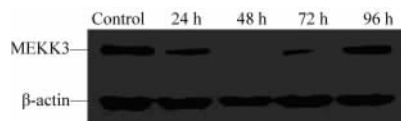


图 3 Western blotting 检测 MEKK3-siRNA 对 MCF-7 细胞 MEKK3 蛋白表达的抑制作用

Fig. 3 Expression of MEKK3 protein in MCF-7 cells after MEKK3-siRNA transfection as detected by Western blotting

2.3 TRAIL 与 MEKK3-siRNA 联合作用对 MCF-7 细胞增殖的影响

实验中, TRAIL 组、siRNA 组和 TRAIL + siRNA 组的 MCF-7 细胞增殖均受到抑制, TRAIL 与 MEKK3-siRNA 联合作用抑制 MCF-7 增殖作用更加显著, 与单用 TRAIL 或 MEKK3-siRNA 相比均有统计学意义($P < 0.05$, 图 4)。

2.4 TRAIL 与 MEKK3-siRNA 联合应用对 MCF-7 细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 双染法标记细胞用流式细胞仪检

测凋亡率,图 5 中的百分数为凋亡率,凋亡率 = 早期凋亡率 + 晚期凋亡率。结果显示:TRAIL 组 MCF-7 细胞凋亡率为(7.53 ± 0.76)%,MEKK3-siRNA 组 MCF-7 细胞凋亡率为(4.38 ± 0.49)%,TRAIL + MEKK3-siRNA 联合作用后 MCF-7 细胞凋亡率为(25.6 ± 2.87)%,空白对照组为(2.36 ± 0.52)%。联合作用组与 TRAIL 组、MEKK3-siRNA 组和空白对照组相比较,均有统计学意义($P < 0.01$)。

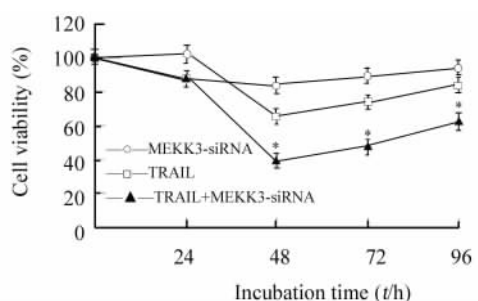


图 4 TRAIL 与 MEKK3-siRNA 联合作用对 MCF-7 细胞增殖的影响

Fig. 4 Growth curves of MCF-7 cells after combination treatment with TRAIL and MEKK3-siRNA

* $P < 0.05$ vs TRAIL or MEKK3-siRNA

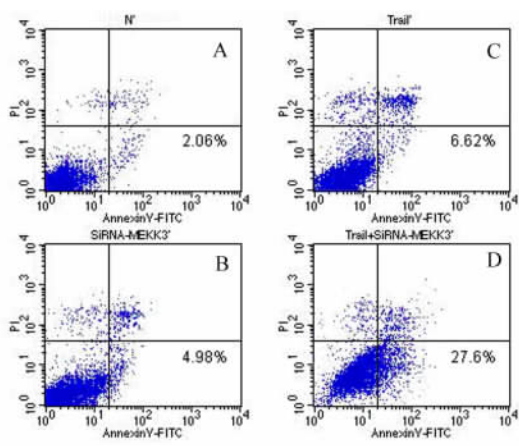


图 5 流式细胞术检测各组 MCF-7 细胞的凋亡情况

Fig. 5 Apoptosis rate of MCF-7 cells analyzed in various groups by flow cytometry

A: Control group cells; B: MEKK3-siRNA group cells;

C: TRAIL group cells; D: TRAIL + MEKK3-siRNA group cells

3 讨论

TRAIL 为 TNF 超家族的新成员。人 TRAIL 基因定位于染色体 3q26,长约 20 kb,编码一种相对分子质量为 32 500 的 II 型跨膜蛋白,该蛋白由 281 个氨基酸残基组成。TRAIL 与肿瘤细胞表面高表达的

DR4 或 DR5 受体结合后,导致死亡受体发生三聚体化,进而形成死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),激活 caspase-8,后者启动细胞内凋亡信号通路,引发细胞凋亡^[5]。

大量的体内实验研究表明,重组 TRAIL 具有明显抑制实体肿瘤的形成和生长,而对正常组织细胞却无明显毒性作用^[6]。不同的细胞模型对 TRAIL 的敏感性不同,其机制可能是与细胞表面表达的死亡受体的多少相关。但越来越多的研究表明,包括乳腺癌在内的多种肿瘤细胞对 TRAIL 诱导凋亡存在不同程度的耐受性。越来越多的研究证明细胞对 TRAIL 的抵抗机制可能发生于细胞内部。许多细胞内的抗凋亡信号分子可阻止凋亡信号转导,从而使细胞存活。本研究首先应用 TRAIL 处理 MCF-7 细胞,应用 MTT 及流式细胞仪检测表明,MCF-7 对 TRAIL 相对不敏感,其结果与以往的研究^[7-8]相一致。

MAPK 家族是细胞存活和增殖过程中的重要通路,MAPK 级联系统主要有 3 种成分参与细胞对各种细胞外信号的调节作用,包括 ERK、SAPK/JNK 和 P38-MAPK 途径,这些途径在调节细胞存活和抗药性方面的发挥重要作用^[9-11]。MEKK 是 MAPK 家族中这些级联反应的上游调节成分。Samanta 等^[12]通过高表达 MEKK3 使肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的凋亡敏感性明显减弱,虽然高表达 MEKK3 的肿瘤细胞对 TRAIL 抵抗机制尚未阐明,但是可能机制是高表达的 MEKK3 使 NF- κ B 的活性增强。研究证明 MEKK3 在转录因子 NF- κ B 的激活方面发挥着重要作用^[13]。NF- κ B 信号通路的激活进而促进细胞存活和抗凋亡蛋白表达增强,如 Bcl-2 和 xIAP,从而逃逸 TRAIL 诱导的凋亡作用^[14]。应用 IL-1 和 TNF 处理敲除 MEKK3 基因的鼠胚胎成纤维细胞,基因缺陷的鼠胚胎成纤维细胞对 TNF 的细胞毒性作用敏感性比野生型高^[15]。因此 MEKK3 可能发挥着细胞保护性作用,抑制 MEKK3 表达的细胞对细胞因子诱导的毒性作用的敏感性将增强。而 MEKK3 在正常组织中处于无表达或低表达水平。本研究实验过程中收集 3 例乳腺癌患者的正常乳腺组织,以 RT-PCR 测定 MEKK3 mRNA 表达,凝胶电泳结果均无明显条带。本实验通过将乳腺癌 MCF-7 细胞转染 siRNA 抑制 MEKK3 基因表达,可明显抑制 MCF-7 细胞 MEKK3 基因暂时性表达。实验中先应用 MEKK3-siRNA 对 MCF-7 细胞进行预处理,再应用 TRAIL 处理细胞,测定细胞生长曲线发现,联合作用对 MCF-7 的生长明显地抑制作用,比单独应用

TRAIL 明显地增强 ($P < 0.05$)。通过流式细胞技术测定联合用药对 MCF-7 的凋亡诱导作用, 发现联合用药组细胞凋亡率为 25.6%, 而 TRAIL 组细胞凋亡率为 7.53%, 两者间具有明显的统计意义 ($P < 0.01$)。

乳腺癌 MCF-7 细胞对 TRAIL 耐药可能是由于激活了细胞内的抗凋亡信号通路, 而下调 MEKK3 蛋白表达促进 TRAIL 的诱导凋亡作用, 可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路活性, 进而抑制抗凋亡基因的表达促进细胞凋亡。目前研究发现 NF- κ B 信号通路在相当一部分不同类型的肿瘤中处于持续激活状态^[16], 而在绝大多数正常细胞中处于静息状态。Samanta 等^[12]发现乳腺癌和卵巢癌细胞 NF- κ B 信号通路的高活性与细胞 MEKK3 蛋白水平存在明显关联, 高表达 MEKK3 蛋白导致 NF- κ B 活性增强, 提示着 MEKK3 在 NF- κ B 信号通路的激活状态发挥重要的调节作用。本研究表明, MEKK3 对 MCF-7 细胞的发挥保护作用, 抑制 MEKK3 基因使 MCF-7 对 TRAIL 的凋亡敏感性明显增强, 而这种下调 MEKK3 蛋白表达促进 MCF-7 凋亡作用, 是否是通过抑制 NF- κ B 信号通路, 尚需进一步研究。

总之, TRAIL 与 MEKK3-siRNA 在诱导 MCF-7 细胞凋亡上具有明显的协同作用, 其机制可能是通过抑制 MEKK3 mRNA 及蛋白表达而起作用。克服肿瘤细胞对 TRAIL 的耐药机制是一种具有潜在价值的治疗方案, 可能有助于将 TRAIL 应用于乳腺癌的临床治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Kendrick JE, Estes JM, Straughn JM Jr, *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its therapeutic potential in breast and gynecologic cancers[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 106(3): 614-621.
- [2] Wang P, Song JH, Song DK, *et al.* Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis[J]. *Cell Signal*, 2006, 18(9): 1528-1535.
- [3] Song JH, Wang CX, Song DK, *et al.* Interferon gamma induces neurite outgrowth by up-regulation of p35 neuron-specific cyclin-dependent kinase 5 activator via activation of ERK1/2 pathway [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12896-12901.
- [4] Padda R, Wamsley-Davis A, Gustin MC, *et al.* MEKK3-mediated signaling to p38 kinase and TonE in hypertonicity stressed kidney cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 291(4): F874-881.
- [5] Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, *et al.* TRAIL signalling: decisions between life and death[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(7-8): 1462-1475.
- [6] Krut FA. TRAIL and cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(1): 14-25.
- [7] Lee YJ, Froelich CJ, Fujita N, *et al.* Reconstitution of caspase-3 confers low glucose-enhanced tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cytotoxicity and Akt cleavage[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6): 1894-1900.
- [8] Zhang J, Liu N, Zhang J, *et al.* PKCdelta protects human breast tumor MCF-7 cells against tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 96(3): 522-532.
- [9] Brozovic A, Fritz G, Christmann M, *et al.* Long-term activation of SAPK/JNK, p38 kinase and fas-L expression by cisplatin is attenuated in human carcinoma cells that acquired drug resistance [J]. *Int J Cancer*, 2004, 112(6): 974-985.
- [10] Kamaraju AK, Roberts AB. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(2): 1024-1036.
- [11] Wang X, Li N, Liu B, *et al.* A novel human phosphatidylethanolamine-binding protein resists tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathway activation and phosphatidylethanolamine externalization[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(44): 45855-45864.
- [12] Samanta AK, Huang HJ, Bast RC Jr, *et al.* Overexpression of MEKK3 confers resistance to apoptosis through activation of NFkappaB[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 7576-7583.
- [13] Di Y, Li S, Wang L, *et al.* Homeostatic interactions between MEKK3 and TAK1 involved in NF-kappaB signaling[J]. *Cell Signal*, 2008, 20(4): 705-713.
- [14] Cortés Sempere M, Rodríguez Fanjul V, Sánchez Pérez I, *et al.* The role of the NFkappaB signalling pathway in cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2008, 10(3): 143-147.
- [15] Yang J, Lin Y, Guo Z, *et al.* The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(7): 620-624.
- [16] Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22(4): 395-403.

[收稿日期] 2008 - 08 - 23

[修回日期] 2008 - 10 - 10

[本文编辑] 王莹