

细胞分裂间期和分裂期 ERK 活性研究

史怀平,李 芳,江中良,胡建宏,李青旺

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**研究分裂间期和分裂期细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)活性,以期了解细胞的生理活动。**【方法】**培养 COS7、Hela-H2B 和 Cho-EGFR 细胞,用有或无诺考达唑(Nocodazole)处理后获得分裂期和分裂间期细胞;再用表皮生长因子(EGF)或 AG1478 处理,分别收集分裂期和分裂间期细胞,裂解后制备蛋白样品,SDS-PAGE 后进行免疫杂交,检查蛋白的表达情况。**【结果】**细胞经 EGF 刺激后,EGFR 在分裂间期和分裂期出现明显磷酸化。MAPK 通路下游蛋白 ERK 磷酸化水平在分裂间期显著高于分裂期($P < 0.05$)。EGF 质量浓度可影响 EGFR 的活性,但对 ERK 磷酸化并未产生明显的影响;在相同条件下,1 ng/mL EGF 处理的 ERK 磷酸化水平与其他质量浓度的 EGF 处理差异不显著($P > 0.05$)。0.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 可明显抑制 EGFR 活性,并导致 Hela-H2B 细胞的 ERK 磷酸化水平降低;而 AG1478 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,COS7 细胞的 ERK 磷酸化才明显被抑制。**【结论】**EGF 介导的 ERK 磷酸化水平在细胞分裂间期高于分裂期;抑制 EGFR 活性后可影响 ERK 磷酸化,但这种作用存在细胞差异性。

[关键词] 上皮生长因子;ERK;AG1478

[中图分类号] Q556⁺.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)05-0001-07

ERK activity in cellular interphase and mitosis

SHI Huai-ping, LI Fang, JIANG Zhong-liang, HU Jian-hong, LI Qing-wang

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** Through the investigation of ERK activity in cellular interphase and mitosis in response to EGF, the cellular physical characteristic were measured. **【Method】** COS7, Hela-H2B and Cho-EGFR cells were cultured. After cells were treated with or without nocodazole, interphase cells and mitotic cells were obtained. Then treated with or without EGF and AG1478, the cells were collected and lysated respectively. The protein expression was detected through SDS-PAGE and immunoblotting. **【Result】** After the cells were stimulated with EGF, EGFR phosphorylation in cell interphase and mitosis was increased. And it was found that ERK phosphorylation in cell interphase was higher than that in cell mitosis ($P < 0.05$). EGFR phosphorylation was affected by the dosage of EGF stimulation but ERK phosphorylation almost not. And under the same condition, ERK phosphorylation in response to 1 ng/mL EGF was not significant compared with that in response to other concentration of EGF ($P > 0.05$). EGFR activity was significantly inhibited by 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478. Next the results showed that ERK phosphorylation of Hela-H2B cells was inhibited in response to 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478. Nevertheless, only 2.5 $\mu\text{mol/L}$ was the concentration of AG1478, ERK phosphorylation in COS7 cells was significantly inhibited. **【Conclusion】** EGF-mediated ERK phosphorylation in cell interphase is higher than that in cell mitosis. Down-stream ERK phosphorylation are affected after EGFR activity is inhibited, the results of which are different in different cells.

* [收稿日期] 2010-10-14

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(2010JM3016)

[作者简介] 史怀平(1974—),男,陕西宝鸡人,讲师,主要从事动物学研究。

[通信作者] 李青旺(1956—),男,陕西米脂人,教授,主要从事转基因动物、基因工程药物、生殖调控及抗癌、降糖药物研究。

E-mail: ysulqw@126.com

Key words: EGF; ERK; AG1478

1962 年, Cohen 等^[1]从小鼠颌下腺分离出一种多肽, 命名为表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)。EGF 广泛存在于人体组织体液中, 具有促进细胞增殖分化的功能。EGF 受体(EGFR)是具有酪氨酸活性的跨膜糖蛋白, 分子质量为 170 ku, 属 ErbB 家族成员之一。ErbB 家族共有 4 个成员: ErbB1 (即 EGFR)、ErbB2 (neu, HER2)、ErbB3 (HER3)和 ErbB4 (HER4)^[2-5], 它们结构相似, 均由胞外配体结合区、单链跨膜区及高度保守的胞浆蛋白酪氨酸激酶区组成, 这种结构既具有受体的功能, 又具有将胞外信号直接转化成胞内效应的能力。EGFR 胞外域与配体结合后, 可刺激其自身发生磷酸化及转磷酸化作用, 通过胞内侧激酶反应将胞外信号传至胞内, 发挥其生理功能。由于信号蛋白功能的多样性, 活化后的信号蛋白可形成特异的多成分信号复合物, 激活多条信号途径, 其中包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径、磷酸肌醇 3 激酶(PI3K)途径和磷酸脂酶 C- γ 1 (PLC- γ 1)途径^[6-9]。

在不同的组织和细胞系中, Ras/Raf/MEK/MAPK 信号途径介导着许多细胞的功能, 如细胞增殖、分化、转化和生存^[10-12]。EGF 激活大鼠肉瘤蛋白(Ras)是通过生长因子受体结合蛋白 2 (Growth factor receptor-bound protein 2, Grb2)介导完成的。Grb2 通过 Y¹⁰⁶⁸和 Y¹⁰⁸⁶位点直接与活化的 EGFR 结合, 或者先与酪氨酸磷酸化的 Shc 结合后, 再间接地与活化的 EGFR 结合^[13-14]。在 Grb2 与 Ras 的鸟苷酸交换因子(Sos)结合后, 随之转移到质膜并激活 Ras, 启动 Ras/Raf/MEK/MAPK 信号途径^[15-16]。活化的 Ras 使 Raf (MAPKKK)易位到质膜并激活之^[17-20], 随后活化的 Raf 磷酸化 MEK (MAPKK)。MEK 是罕见的双特异性激酶, 能使苏氨酸和酪氨酸残基活化。MEK 通过活化环中 Thr-Glu-Thr 基序的磷酸化作用, 使细胞外信号调节蛋白激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)磷酸化。ERK 是丝-苏氨酸激酶, 有 50 个以上的底物, 其主要功能是调节转录因子 c-Fos 和 c-Jun 的活性^[21]。虽然 EGF 刺激的细胞信号通路已被广泛研究, 但仍有许多问题没有解决。本试验研究了分裂间期和分裂期 COS7、Hela-H2B 和 Cho-EGFR 细胞 ERK 的磷酸化情况, 旨在分析 MAPK 通路对细胞周期的影响, 为临床控制肿瘤及细胞增殖提供基础性材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 抗体和化学试剂 鼠抗 PP-ERK1/2 和 Tubulin、羊抗 P-EGFR(1086)购自 Santa Cruz Biotech 公司。硝酸纤维素膜(NC 膜)和结合第二抗体的 HRP 购自 Bio-Rad 公司。ECL 试剂购自 Pierce Chemical 公司。EGF 购自 Upstate Biotechnology 公司。Nocodazole、Blastidicin 和 AG1478 购自 Calbiochem 公司。DMEM 购自 GIBCO 公司。其他试剂除特别说明外, 均购自 Sigma 公司。

1.1.2 细胞 COS7 细胞、Hela-H2B 细胞和 Cho-EGFR 细胞, 置于体积分数 5% CO₂、37 °C 条件下培养, 所用培养液为加有青链霉素和体积分数 5% 犊牛血清的 DMEM。Hela-H2B 细胞培养时, 还需加入质量浓度为 2 ng/mL 的 Blastidicin; Cho-EGFR 细胞培养时, 还需加入质量浓度为 400 μ g/mL 的 G418。

1.2 EGF 对 ERK 磷酸化的影响

为了检测分裂期和分裂间期 COS7、Hela-H2B 和 Cho-EGFR 细胞 ERK 的磷酸化情况, 将其在有或无诺考达唑(200 ng/mL)下处理 24 h 后, 再用质量浓度 50 ng/mL 的 EGF 分别刺激 0 (即血清饥饿(SF)), 5, 15, 30, 60 和 120 min, 然后分别收集分裂期和分裂间期细胞, 加细胞裂解液, 制备蛋白样品, 备用。

取经有或无诺考达唑处理 24 h 的 COS7、Hela-H2B 细胞, 用不同质量浓度(50, 10, 5, 1 ng/mL)的 EGF 处理 15 min, 同时设未经 EGF 处理的细胞为对照, 分别收集分裂期和分裂间期细胞, 加细胞裂解液, 制备蛋白样品, 备用。

1.3 EGFR 活性受抑对 ERK 磷酸化的影响

为了了解在 EGFR 活性被抑制条件下分裂期和分裂间期细胞 ERK 的磷酸化情况, 将培养好的分裂间期 COS7 和 Hela-H2B 细胞, 首先用不同浓度(Hela-H2B: 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 μ mol/L; COS7: 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 μ mol/L)的 EGFR 活性抑制剂 AG1478 预处理 30 min, 同时设未经 AG1478 处理的细胞为对照; 再用 50 ng/mL 的 EGF 刺激 15 min, 收集细胞, 加细胞裂解液, 制备蛋白样品, 备用。将 COS7 和 Hela-H2B 细胞在有或无诺考达唑下处理 24 h; 再用 0.5 μ mol/L 的

AG1478 预处理 30 min,同时设未经 AG1478 处理的细胞为对照;最后用 50 ng/mL 的 EGF 分别刺激不同时间(COS7:0,5,15,30 min;Hela-H2B:0,5,15 min),同时设未经 EGF 处理的细胞为对照,分别收集分裂期和分裂间期细胞,加细胞裂解液,制备蛋白样品,备用。

为了能明显抑制 ERK 磷酸化,将培养好的分裂间期 COS7 细胞用不同浓度(0.5,1,2 μ mol/L)的 AG1478 预处理 30 min,同时设未经 AG1478 处理的细胞为对照;再用 50 ng/mL 的 EGF 刺激 15 min,收集细胞,加细胞裂解液,制备蛋白样品,备用。将经有或无诺考达唑处理 24 h 的 COS7 细胞用 2.5 μ mol/L 的 AG1478 预处理 30 min,同时设未经 AG1478 处理的细胞为对照;再用 50 ng/mL 的 EGF 分别刺激 0,5,15,30 min,同时设未经 EGF 处理的细胞为对照,分别收集分裂期和分裂间期细胞,加细胞裂解液,制备蛋白样品,备用。

1.4 ERK 磷酸化水平的检测

将上述制备的蛋白样品经 7.5%~10% 的 SDS-PAGE 电泳后,电转到 NC 膜上,然后在封闭液中封闭 30 min。将转有蛋白的 NC 膜分别在含有 Tubulin、PP-ERK1/2、P-EGFR(1086) 第 1 抗体的封闭液中作用过夜;洗掉未结合的第 1 抗体后,加带有 HRP 的抗羊和抗鼠的第 2 抗体作用 1 h;洗掉未结合的第 2 抗体,加 ECL 试剂作用 5 min,根据检查蛋白的含量,在暗室对 X-光片适当曝光,洗片后观察结果。

1.5 数据统计分析

所有试验至少重复 3 次。蛋白条带通过 Image J 软件进行分析,获得的数据用于评价蛋白的表达水平。数据用“平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SE)”表示,并采用 SPSS16.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 EGF 作用时间对分裂间期和分裂期细胞 ERK 磷酸化的影响

EGF 通过与 EGFR 结合使 EGFR 激活并转变为磷酸化 EGFR(P-EGFR),从而启动 MAPK 通路,导致细胞发生生物学反应。本试验发现,用 EGF 刺激 COS7、Hela-H2B 和 Cho-EGFR 细胞后,EGFR 在分裂间期和分裂期被明显磷酸化(图 1、2、3),这将影响到下游蛋白的活性。研究还发现,在 EGF 刺激下,ERK 在分裂间期明显被磷酸化,而分裂期磷酸化水平很低。统计分析结果表明,EGF 刺

激的 ERK 磷酸化水平在分裂间期明显高于分裂期(图 1、2、3, $P<0.05$);在分裂间期 ERK 磷酸化水平随 EGF 刺激细胞时间的延长基本呈下降的趋势,其中 Hela-H2B 细胞表现尤为突出(图 2);但在分裂期,ERK 磷酸化水平却随 EGF 刺激细胞时间的延长而呈逐渐上升的趋势,如 COS7 和 Cho-EGFR 细胞(图 1、3)。总之,在 EGF 刺激下,ERK 磷酸化水平在细胞分裂间期高于分裂期,分裂期 ERK 磷酸化被不同程度地抑制,且 ERK 磷酸化水平可能与 EGF 刺激细胞时间的长短有关。

2.2 EGF 质量浓度对分裂间期和分裂期细胞 ERK 磷酸化的影响

由图 4 和图 5 可知,在 COS7、Hela-H2B 细胞分裂间期和分裂期,EGFR 磷酸化水平均随 EGF 质量浓度的降低而呈下降趋势,而 ERK 磷酸化水平并未随 EGF 质量浓度的降低而下降,不同质量浓度 EGF 引起的 ERK 磷酸化水平差异不显著($P>0.05$)。这说明,当 EGF 质量浓度为 1 ng/mL 时,ERK 就能极大地发生磷酸化,细胞由此开通了 MAPK 通路。

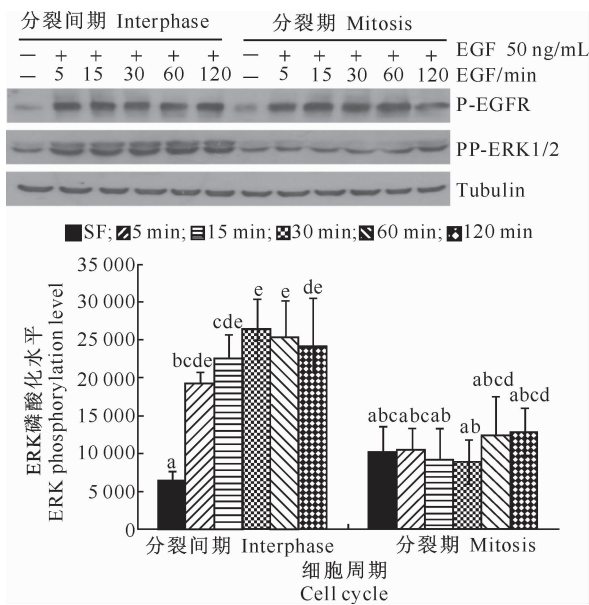


图 1 EGF 作用时间对分裂间期和分裂期 COS7 细胞 ERK 磷酸化的影响

+, 表示进行该项处理;-, 表示不进行该项处理;柱状图上标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同
Fig. 1 ERK phosphorylation in interphase and mitosis of COS7 cells in response to different EGF-treated time
+, Means treated; -, Means untreated; The values with different letter superscripts in the histograms mean significant difference ($P<0.05$). The same as below

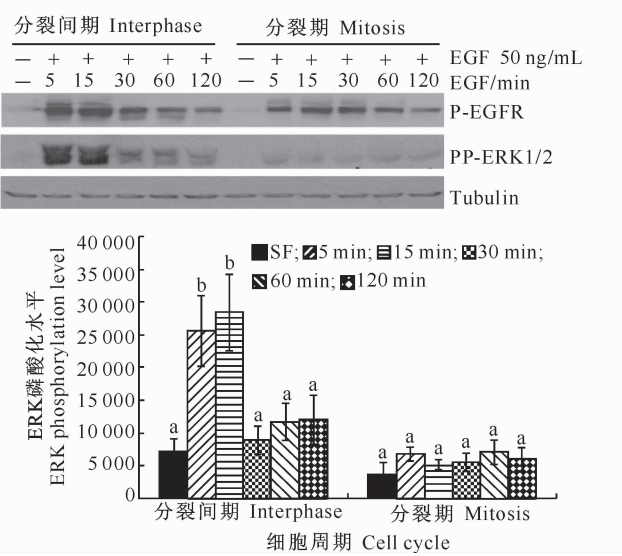


图 2 EGF 作用时间对分裂间期和分裂期 HeLa-H2B 细胞 ERK 磷酸化的影响

Fig. 2 ERK phosphorylation in interphase and mitosis of HeLa-H2B cells in response to different EGF-treated time

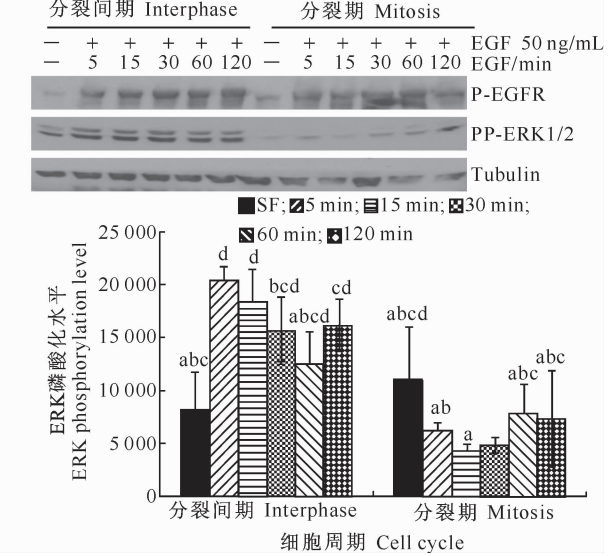


图 3 EGF 作用时间对分裂间期和分裂期 Cho-EGFR 细胞 ERK 磷酸化的影响

Fig. 3 ERK phosphorylation in interphase and mitosis of Cho-EGFR cells in response to different EGF-treated time

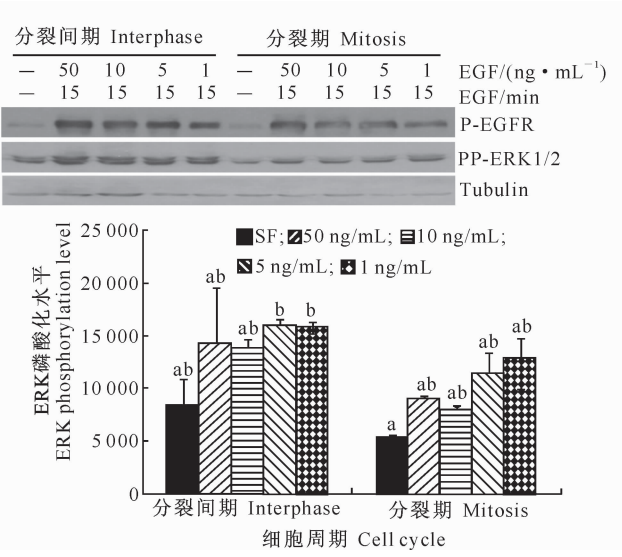


图 4 EGF 质量浓度对分裂间期和分裂期 COS7 细胞 ERK 磷酸化的影响

Fig. 4 ERK phosphorylation in interphase and mitosis of COS7 cells in response to different concentrations of EGF

2.3 EGFR 活性受抑对细胞 ERK 磷酸化的影响

由图 6 可知,当 AG1478 浓度不小于 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时,COS7 细胞 EGFR 磷酸化水平降低,与对照差异显著 ($P < 0.05$),而且 0.01 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 处理的 EGFR 磷酸化水平与其他 AG1478 处理也存在显著差异 ($P < 0.05$)。由图 7 可知,在 HeLa-H2B 细胞中,当 AG1478 浓度不小于 0.005 $\mu\text{mol/L}$ 时,EGFR 磷酸化水平降低,与对照相比差

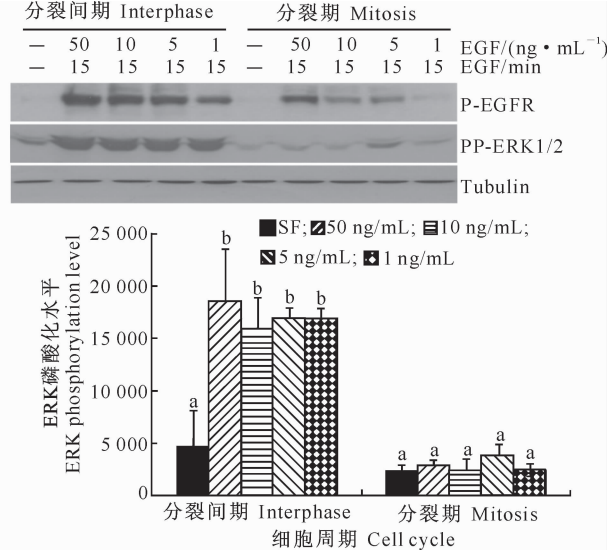


图 5 EGF 质量浓度对分裂间期和分裂期 HeLa-H2B 细胞 ERK 磷酸化的影响

Fig. 5 ERK phosphorylation in interphase and mitosis of HeLa-H2B cells in response to different concentrations of EGF 异显著 ($P < 0.05$)。说明在 AG1478 浓度不小于 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 时,EGFR 活性即被抑制。

由图 8 可知,在 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 抑制 EGFR 活性后,HeLa-H2B 细胞 ERK 磷酸化被抑制(图 8B),但是在 COS7 细胞中,分裂间期和分裂期的 ERK 磷酸化几乎未受影响(图 8A)。

由图 9 可知,当 AG1478 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,分裂期 COS7 细胞 ERK 磷酸化水平明显降低(图

9A)。在 AG1478 浓度为 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时,分裂间期和分裂期 COS7 细胞 ERK 磷酸化被明显抑制(图

9B)。

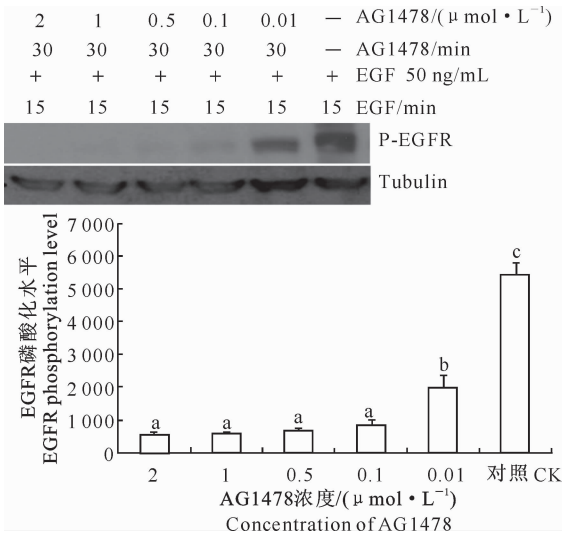


图 6 AG1478 浓度对分裂间期 COS7 细胞 EGFR 磷酸化水平的影响

Fig. 6 EGFR phosphorylation in the interphase of COS7 cells in response to different concentrations of AG1478

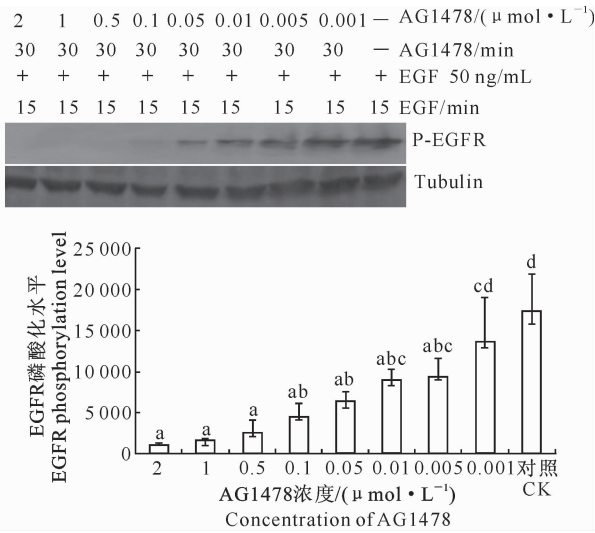


图 7 AG1478 浓度对分裂间期 HeLa-H2B 细胞 EGFR 磷酸化水平的影响

Fig. 7 EGFR phosphorylation in the interphase of HeLa-H2B cells in response to different concentrations of AG1478

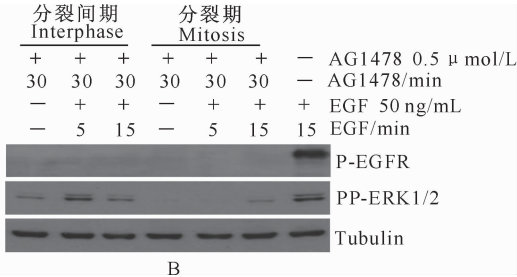
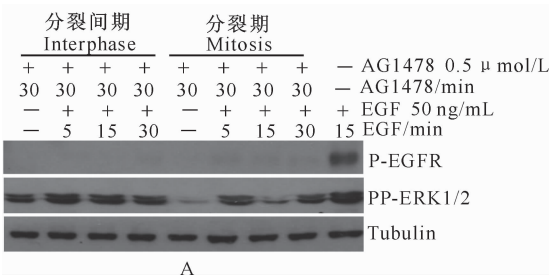


图 8 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 作用下 EGF 刺激时间对分裂间期和分裂期 COS7、HeLa-H2B 细胞 ERK 磷酸化的影响
A. COS7 细胞;B. HeLa-H2B 细胞

Fig. 8 ERK phosphorylation in the interphase and mitosis of COS7 and HeLa-H2B cells in response to 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 with different EGF-treated time
A. COS7 cells;B. HeLa-H2B cells

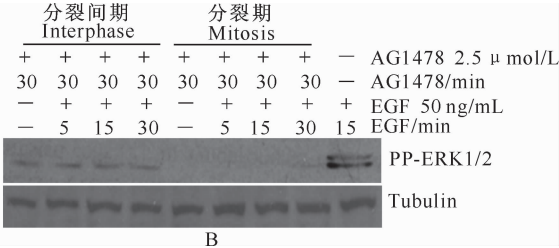
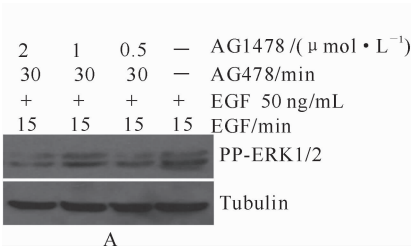


图 9 COS7 细胞中抑制 ERK 活性的 AG1478 浓度检测(A)及高浓度 AG1478 对分裂间期和分裂期 COS7 细胞 ERK 磷酸化的影响(B)

Fig. 9 The concentration of AG1478 inhibiting ERK activity in COS7 cells(A) and ERK phosphorylation in interphase and mitosis of COS7 cells in response to high-concentration AG1478(B)

3 讨 论

目前研究发现,EGF 介导的信号通路在细胞分

裂间期和分裂期存在差异。在分裂间期,MAPK 通路下游蛋白的 ERK 磷酸化在 EGF 影响下有所增强,而分裂期 EGF 并未使 ERK 磷酸化得以增强;并

且, ERK 磷酸化在分裂间期与分裂期存在显著性差异。本研究中, 在用不同浓度的 EGF 处理细胞后发现, 1 ng/mL 的 EGF 可以极大地激活 ERK 磷酸化, 其磷酸化水平与 50 ng/mL EGF 处理差异不显著 ($P > 0.05$)。在细胞被 AG1478 (0.01 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, EGFR 磷酸化显著被抑制。本研究结果还发现, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 可明显抑制 Hela-H2B 细胞 ERK 磷酸化, 而 2.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 才可使 COS7 细胞的 ERK 磷酸化水平降低。

在 EGF 介导的信号通路中, 很重要的起始阶段是 EGF 对酪氨酸蛋白激酶的激活。酪氨酸激酶是一种能将 ATP 磷酸基转移到细胞蛋白的酶, 这可使相邻下游蛋白被激活以至完成所参与的信号调控^[22]。EGF 可使 EGFR 磷酸酪氨酸残基自磷酸化, 提供胞质分子结合的位点, 将膜受体信号传递到胞质, 调节细胞活动^[23]。本试验结果表明, 经 EGF 刺激后, 分裂间期和分裂期细胞 EGFR 均发生明显的磷酸化, 这将可能启动 MAPK 通路。本研究通过检查 ERK 磷酸化水平发现, 在细胞分裂间期 ERK 磷酸化水平很高, 而在分裂期磷酸化水平极低, 2 个时期存在明显的差异。据此分析, 由于 MAPK 通路对分裂间期非常重要^[24], 因此细胞在分裂间期开放了 MAPK 通路。然而, 分裂期细胞由于失去跨膜信号, MAPK 通路极大地被阻止^[25], 进而 ERK 活性被抑制^[26], 这可能也是细胞为即将到来的细胞分裂准备必需的能量。

EGF 刺激后, 细胞会启动 MAPK 通路, 这将激活 ERK。前人研究发现, 当 EGF 为 10 ng/mL 时, 可引起 ERK 明显磷酸化^[27]。本研究发现, 用质量浓度不小于 1 ng/mL 的 EGF 处理细胞后, 均可导致 ERK 的激活, 而且各处理间的 ERK 磷酸化水平无显著差异 ($P > 0.05$)。但同时也发现, EGFR 活性随 EGF 质量浓度的降低而呈下降趋势。因此, 可作出假设, 用 1 ng/mL EGF 刺激细胞时, 激活的 EGFR 能充分使 ERK 磷酸化, 开通 MAPK 通路, 并发挥细胞效应。

蛋白抑制剂常被用来抑制信号蛋白活性, 以研究与其相关的分子的作用机理。用抑制剂抑制蛋白(如 EGFR)活性后, 可使许多癌症发生得以控制, 如鼻咽癌^[28]、胃癌^[29]、乳腺癌^[30]、平滑肌瘤^[31]等。究其原因, 主要是因为抑制剂干扰了细胞信号通路中相关信号蛋白的活性, 使细胞不能增殖^[31-32]。本研究发现, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 AG1478 可明显抑制 EGFR 的活性, 并导致 Hela-H2B 细胞的 ERK 磷酸化水平

下降, 而 COS7 细胞的 ERK 磷酸化水平受到的影响不明显。有研究表明, 抑制剂对蛋白活性的抑制效果存在剂量依赖性^[33-34]。本研究检测了影响 COS7 细胞 ERK 活性的最适 AG1478 浓度, 结果发现当 AG1478 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, ERK 活性出现较明显的下降。于是本研究用 2.5 $\mu\text{mol/L}$ AG1478 处理 COS7 细胞, 结果发现分裂期及分裂间期 ERK 磷酸化水平均极大下降。因此, 笔者认为, 抑制剂对一个信号链中的蛋白抑制存在差异, 上游蛋白活性降低后未必会导致下游蛋白活性的下降, 这预示蛋白对外界的刺激反应程度不同, 也可能处在一个复杂的信号网中。所以, 要使信号链中的重要蛋白的活性明显下降, 选择特异性抑制剂是必需的。

总之, 本研究结果证实, ERK 磷酸化在细胞分裂间期和分裂期是不同的。抑制 EGFR 活性后, ERK 磷酸化水平也将下降, 但这种作用存在细胞差异性, 其原因还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal [J]. *J Biol Chem*, 1962, 237: 1555-1562.
- [2] Kraus M H, Issing W, Miki T, et al. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family; Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 (23): 9193-9197.
- [3] Plowman G D, Culouscou J M, Whitney G S, et al. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90 (5): 1746-1750.
- [4] Yarden Y, Sliwkowski M X. Untangling the ErbB signaling network [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2 (2): 127-137.
- [5] Citi A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: Towards the system level [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7 (7): 505-516.
- [6] Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity [J]. *Cell*, 1990, 61 (2): 203-212.
- [7] Anderson D, Koch C A, Grey L, et al. Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors [J]. *Science*, 1990, 250 (4983): 979-982.
- [8] Koch C A, Anderson D, Moran M F, et al. SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins [J]. *Science*, 1991, 252 (5006): 668-674.
- [9] Pawson T. Protein modules and signaling networks [J]. *Nature*, 1995, 373 (6515): 573-580.
- [10] Nishida Y. Function of Raf/MAP kinase cascade in the regulation of cellular proliferation and differentiation [J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1996, 41: 1673-1679.
- [11] Chadee D N, Kyriakis J M. A novel role for mixed lineage ki-

- nase 3(MLK3) in B-Raf activation and Cell proliferation [J]. *Cell Cycle*,2004,3(10):1227-1229.
- [12] Zhang L,Fu Z,Binkley C,et al. Raf kinase inhibitory protein inhibits beta-cell proliferation [J]. *Surgery*, 2004, 136 (3): 708-715.
- [13] Batzer A G,Rotin D,Ureña J M,et al. Hierarchy of binding sites for Grb2 and Src on the epidermal growth factor receptor [J]. *Mol Cell Biol*,1994,14(8):5192-5201.
- [14] Sasaoka T,Langlois W J,Leitner J W,et al. The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras [J]. *J Biol Chem*,1994,269(51):32621-32625.
- [15] Downward J. The CRB2/Sem-5 adaptor protein [J]. *FEBS Lett*,1994,338(27):113-117.
- [16] Wang Z,Moran M F. Requirement for the adapter protein GRB2 in EGF receptor endocytosis [J]. *Science*,1996,272(5270):1935-1939.
- [17] Cook S J,McCormick F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf [J]. *Science*, 1993, 262 (5136): 1069-1072.
- [18] Wotton D,Ways D K,Parker P J,et al. Activity of both Raf and ras is necessary for activation of transcription of the human T cell receptor beta gene by protein kinase C,Ras plays multiple roles [J]. *J Biol Chem*,1993,268(24):17975-17982.
- [19] Williams N G,Paradis H,Agarwal S,et al. Raf-1 and p21v-ras cooperate in the activation of mitogen-activated protein kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1993,90(2):5772-5776.
- [20] Dickson B,Sprenger F,Morridon D,et al. Raf functions downstream of Ras in the sevenless signal transduction pathway [J]. *Nature*,1992,360(6404):600-603.
- [21] Marshall C J. MAP kinase kinase kinase,MAP kinase kinase and MAP kinase [J]. *Curr Opin Genet Dev*,1994,4(1):82-89.
- [22] Radha V,Nambirajan S,Swarup G. Association of Lyn tyrosine kinase with the nuclear matrix and cell-cycle-dependent changes in matrix-associated tyrosine kinase activity [J]. *Eur J Biochem*,1996,236(2):352-359.
- [23] McCubrey J A,Steelmann L S,Chappell W H,et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth,malignant transformation and drug resistance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007,1773(8):1263-1284.
- [24] Pende M,Um S H,Mieulet V,et al. S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway [J]. *Mol Cell Biol*,2004,24(8):3112-3124.
- [25] Gomez-Cambronero J. p42-MAP kinase is activated in EGF-stimulated interphase but not in metaphase-arrested Hela cells [J]. *FEBS Lett*,1999,443(2):126-130.
- [26] Harding A,Giles N,Burgess A,et al. Mechanism of mitosis-specific activation of MEK1 [J]. *J Biol Chem*,2003,278(19):16747-16754.
- [27] Hayne C,Xiang X,Luo Z. MEK inhibition and phosphorylation of serine 4 on B23 are two coincident events in mitosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2004,321(3):675-680.
- [28] Zhu X F,Liu Z C,Xie B F,et al. EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2001, 169 (1):27-32.
- [29] Li R K,Qiang O,Liao J,et al. Effects of EGFR inhibitor AG1478 in combination with celecoxib on the growth of gastric cancer cells [J]. *Journal of Sichuan University: Medical Science Edition*,2010,41(4):595-599.
- [30] Zhang Y G,Du Q,Fang W G,et al. Tyrphostin AG1478 suppresses proliferation and invasion of human breast cancer cells [J]. *Int J Oncol*,2008,3(3):595-602.
- [31] Shushan A,Rojansky N,Laufer N,et al. The AG1478 tyrosine kinase inhibitor is an effective suppressor of leiomyoma cell growth [J]. *Hum Reprod*,2004,9(9):1957-1967.
- [32] Zhou Y,Brattain M G. Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (13): 5848-5856.
- [33] Ellis A G,Doherty M M,Walker F,et al. Preclinical analysis of the analinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase [J]. *Biochem Pharmacol*,2006,71(10):1422-1434.
- [34] Shalaby A,Presneau N,Ye H,et al. The role of epidermal growth factor receptor in chordoma pathogenesis: A potential therapeutic target [J]. *J Pathol*,2011,223(3):336-346.