

# 重组人 ADAM15 去整合素区域蛋白抑制 HeLa 细胞的增殖及迁移

侯颖, 储敏, 蔡燕飞, 杜芳芳, 王晓敏, 陈蕴, 金坚\*

(江南大学药学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:** 观察重组人 ADAM15 去整合素区域蛋白(记做 rhddADAM15)干预 HeLa 细胞在体内外的增殖及迁移效应,初步鉴定了其作用的相关通路,为研究其作用机制提供基础。利用 SRB 法及划痕法测得 rhddADAM15 对 HeLa 体外的增殖及迁移均有明显的抑制作用,IC<sub>50</sub> 分别为 2.44、1.60 μmol/L, 当其浓度低于 8 μmol/L 时, 细胞增殖及迁移抑制率与蛋白质浓度呈剂量依赖关系;利用瞬时转染法在 HeLa 细胞内过表达 rhddADAM15,致使 HeLa 细胞的迁移能力下降,细胞周期出现 S 期阻滞, 阻滞率约为 5%;SRB 法表明,MAPK 通路激动剂 EGF 可以逆转 rhddADAM 抑制 HeLa 细胞增殖的效应;利用斑马鱼肿瘤移植模型,观察得到 rhddADAM15 对斑马鱼体内 HeLa 细胞生长及转移均有明显的抑制作用。以上结果表明,rhddADAM15 可抑制 HeLa 细胞体内外的增殖及迁移,这种抑制作用与 MAPK 信号通路密切相关,作用靶点在细胞外及细胞内均有分布。

**关键词:** ADAM15;去整合素;增殖;迁移;MAPK;斑马鱼

**中图分类号:** Q71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)11—1142—06

## Recombinant Human Disintegrin Domain of ADAM15 Inhibits the Proliferation and Migration of HeLa Cells

HOU Ying, CHU Min, CAI Yanfei, DU Fangfang, WANG Xiaomin, CHEN Yun, JIN Jian\*

(School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** The anti-proliferation and anti-migration activities of recombinant human disintegrin domain of ADAM15 (rhddADAM15) were evaluated *in vitro* and *in vivo* and the related pathway was determined in this study. rhddADAM15 inhibited the proliferation and migration of human cervical cancer HeLa cells with the IC<sub>50</sub> of 2.44 and 1.60 μmol/L respectively evaluated by SRB assay and wound healing assay. Over-expression of disintegrin domain of ADAM15 in HeLa cells by transient transfection induced the migration inhibition and partial S phase arrest. In addition, the

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30772586)。

作者简介: 侯颖(1986—),女,江苏徐州人,发酵工程博士研究生,主要从事生物制药及重组药物蛋白药理方面的研究。

E-mail: hy186506@163.com

\* 通信作者: 金坚(1960—),男,浙江东阳人,医学博士,教授,博士研究生导师,主要从事药物设计与分子药理学方面的研究。

E-mail: jinjian31@126.com

inhibition effect of proliferation of HeLa cells aroused by rhddADAM15 was reversed by EGF, which is the agonist of MAPK signal pathways. Moreover, rhddADAM15 inhibited the growth and metastasis of HeLa cells xenograft in zebrafish. All the results showed that rhddADAM15 inhibited the proliferation and migration of HeLa cells by MAPK signal pathway and the target may exist both on the cell surface and in the cytoplasm.

**Keywords:** ADAM15, disintegrin, proliferation, migration, MAPK, zebrafish

整合素金属蛋白酶家族蛋白 (a disintegrin and metalloproteinase, ADAM), 也被称为 MDC (Metalloproteinase/Disintegrin/Cysteine-rich), 是一类锚定于细胞膜表面的跨膜蛋白家族<sup>[1]</sup>, 自 1990 年发现第一个家族成员以来<sup>[2]</sup>, 迄今为止共有 23 种 ADAM 家族蛋白在人类基因中被发现。ADAM 家族蛋白参与蛋白水解、生长因子和细胞因子的释放、细胞外基质降解、细胞的融合、迁移、粘附及信号转导等生物功能<sup>[3]</sup>。在病理学中, ADAM 家族蛋白亦参与了炎症和肿瘤的发生和发展。ADAM 家族蛋白中, ADAM15 被发现与多种肿瘤的发生和发展密切相关, 在多种实体瘤发生时, 如胃癌、肝癌、前列腺癌等, ADAM15 的表达都会上调<sup>[4-5]</sup>。另外, 由于 ADAM15 的去整合素区域含有整合素结合位点 RGD (arginine-glycine-aspartate, 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸) 序列, 具有典型的药物分子靶点结构特征, 因此有望作为临床肿瘤诊断的标志物及药物设计的靶点。

人 ADAM15 去整合素区域蛋白由 91 个氨基酸残基构成, 相对分子质量为 9 805, 作者所在实验室成功利用大肠杆菌表达系统表达并分离纯化出重组人 ADAM15 去整合素区域蛋白, 记为 rhddADAM15 (recombinant human disintegrin domain of ADAM15)<sup>[6]</sup>。作者以人宫颈癌细胞 HeLa 为模型, 检测了 rhddADAM15 对 HeLa 增殖及迁移的影响, 并初步确定了 rhddADAM15 作用机理及其相关的信号通路, 为进一步研究其对肿瘤的作用机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

rhddADAM15: 由作者所在实验室制备; 人宫颈癌细胞 HeLa: 购自上海中科院细胞库; 培养细胞所用 RPMI-1640 基础培养基、小牛血清、青霉素、链霉

素: 购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶: 购自碧云天公司; 脂质体 Lipo2000: 购于 Invitrogen 公司; 细胞实验用各种孔板: 购自 Corning 公司; SRB: 购自 Sigma 公司; 表皮生长因子 (EGF) 及 U0125: 购自 Cell signaling 公司; CM-Dil: 购自 Invitrogen 公司; 兔源抗 rhddADAM15 的一抗: 由作者所在实验室制作保存; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗: 购自碧云天公司; 细胞周期试剂盒: 购自南京凯基生物。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞采用含 10% 小牛血清的 1640 培养基, 添加  $1 \times 10^5$  U/L 的青霉素和 100 mg/L 链霉素, 置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。当细胞生长至所需要密度时用胰蛋白酶消化处理, 收集细胞, 计数并根据需要重悬成所需浓度。

**1.2.2 SRB 法测细胞增殖** 将细胞消化后计数, 用含 10% 小牛血清的培养基稀释至  $(0.6 \sim 0.8) \times 10^8$  个/L, 每孔 100 μL 铺于 96 孔板, 培养 24 h 后, 吸除培养基, 将含有不同浓度的 rhddADAM15、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 通路的激动剂表皮生长因子 (EGF) 及 MAPK 通路中细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 抑制剂 U0125 的细胞培养液分别加入至 96 孔板。各个药物的各个浓度设置至少 3 个副孔, 同时设置不加任何药物的孔为阴性对照及不铺细胞只加培养液的孔为空白对照孔。继续培养 24 h 后, 弃去各孔培养基, 加入 100 μL 的 10% TCA 溶液固定 40 min 后, 弃去 TCA 溶液, 超纯水洗板 2 次, 在空气中干燥后每孔加入 100 μL 的 0.4% SRB 溶液, 于 37 °C 孵育 30 min, 弃去 SRB 溶液, 用 1% 醋酸溶液清洗至无色后甩干, 每孔加入 100 μL 的 10 mmol/L Tris 溶液, 10 min 后利用酶标仪在 570 nm 处检测其吸光值。

增殖抑制率 =  $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{加药组}}) \div (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$  (1)

**1.2.3 划痕法测细胞迁移** 将细胞消化后计数,用10%牛血清的培养基稀释至  $(0.6\sim 0.8)\times 10^8$  个/L,每孔100  $\mu\text{L}$ ,均匀铺于96孔板。待细胞生长至铺满孔底80%~90%时,用枪头在孔底均匀笔直的划出约1 mm细痕,PBS轻轻洗2~3次,洗去划掉的细胞,加入含有不同浓度的 rhddADAM15 的细胞培养液,在0、24 h时分别定点拍照,观察并记录细胞迁移情况。迁移计算公式为式(2)、(3):

$$\text{细胞迁移率 MR} = (S_{0\text{h}} - S_{24\text{h}}) \div S_{0\text{h}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{迁移抑制率} = \text{MR}_{\text{对照}} - \text{MR}_{\text{加药}} \quad (3)$$

**1.2.4 PI单染法测细胞周期** 处于对数期的待检测细胞消化后铺于6孔板,每孔  $(3\sim 4)\times 10^5$  个,生长24 h后加入终浓度分别为0、1.5、4  $\mu\text{mol/L}$  的 rhddADAM15 继续培养24 h,弃去上清液,PBS洗涤、胰蛋白酶消化后收集细胞,再用PBS洗涤两遍后,70%的冷乙醇固定2 h至过夜,洗去固定液,经PBS清洗后收集细胞,加入50  $\mu\text{g/mL}$  的 RNAase,于37  $^{\circ}\text{C}$  孵育30 min后,加入PI置于4  $^{\circ}\text{C}$  避光染色,0.5 h后上机检测。数据利用 Modfit 软件进行分析。

**1.2.5 人ADAM15去整合素区域在HeLa细胞内的表达质粒构建** 以作者所在实验室保存的质粒 pGEX-4T-1/ddADAM15 作为模板,利用以下引物克隆人ADAM15去整合素区域:上游引物,5'-CCGCTCGAGCGGGCCACCATGGCTGCTTTCTGC-3',下游引物5'-TAAAGCGGCCGCAAATTTACTCGCCATCCCCT-3'。将PCR产物纯化后,利用 *XhoI* 及 *NotI* 酶切,连于 pCI-neo 载体。构建好的 pCI-neo/ddADAM15 质粒经测序验证正确后,利用 Lipo2000 转入 HeLa 细胞内,转染后的细胞株记做 HeLa/AD。转染4、6 h后,收集细胞并裂解收取蛋白质,利用抗 rhddADAM15 的一抗进行 Western blot 实验,分析细胞内人ADAM15去整合素区域蛋白质的表达水平。

**1.2.6 斑马鱼体内的肿瘤细胞移植模型** 本实验与杭州环特生物技术有限公司合作开展,所用斑马鱼为野生型斑马鱼,由环特生物技术有限公司培养提供。本实验用鱼为斑马鱼幼鱼。斑马鱼的繁殖以自然成对交配的方式进行。阳性对照为巴马司他,阴性对照为PBS溶液。

1) 肿瘤细胞移植:HeLa 生长至聚合度为90%以上后,弃去培养液,用PBS洗涤2~3遍,加入1 mL质量浓度为5  $\mu\text{g/mL}$  荧光素 CM-Dil 溶液,将培

养瓶置于4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱。15 min后弃去CM-Dil溶液,用PBS洗涤2~3遍,消化收集标记好的细胞,置于冰上待用。将受精48 h的斑马鱼置于0.4%三卡因甲磺酸进行麻醉后,利用显微注射仪将约800个标记好的 HeLa 细胞注入斑马鱼卵黄囊,以此作为肿瘤细胞在斑马鱼体内的移植模型。

2) rhddADAM15 给药:HeLa 细胞移植到斑马鱼体内24 h后,在荧光显微镜下挑选肿瘤细胞生长良好,即荧光强度较亮的斑马鱼,将不同量的 rhddADAM15、PBS(阴性对照)及巴马司他(阳性对照,450 ng/鱼)显微注射到斑马鱼体内,每组至少10条。继续饲养48 h后,将斑马鱼麻醉固定后拍照,利用尼康NIS-Elements D 3.10高级图像处理软件进行图像分析。荧光强度(S)表示细胞的增殖程度,面积(A)表示细胞的迁移程度。rhddADAM15对斑马鱼体内肿瘤细胞的增殖抑制率及迁移抑制率计算公式为式(4)~(5)。

$$\text{增殖抑制率} = (1 - S_{\text{rhddADAM15}} \div S_{\text{control}}) \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{迁移抑制率} = (1 - A_{\text{rhddADAM15}} \div A_{\text{control}}) \times 100\% \quad (5)$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 rhddADAM15 抑制 HeLa 细胞增殖及迁移

SRB 检测法显示 rhddADAM15 对 HeLa 细胞增殖有明显抑制,抑制率随着 rhddADAM15 浓度的升高而增大,在0~8  $\mu\text{mol/L}$  内呈剂量依赖性,见图1。数据分析得,rhddADAM15 抑制 HeLa 细胞增殖的  $\text{IC}_{50}$  为2.44  $\mu\text{mol/L}$ 。利用划痕法显示 rhddADAM15 对 HeLa 细胞的迁移能力也有明显抑制,且呈剂量依赖性,计算得 rhddADAM15 抑制 HeLa 细胞迁移的  $\text{IC}_{50}$  为1.60  $\mu\text{mol/L}$ 。

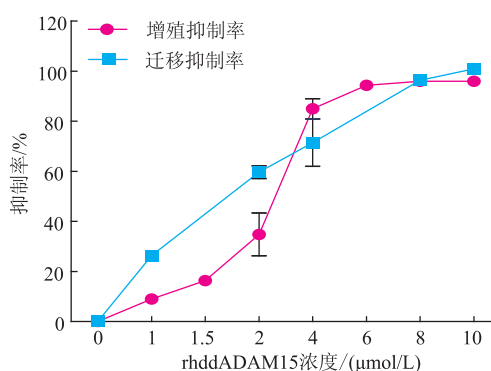


图1 rhddADAM15 抑制 HeLa 细胞增殖及迁移

Fig. 1 rhddADAM15 inhibited the proliferation and migration of HeLa cells

### 2.2 ADAM15 去整合素区域蛋白过表达抑制 HeLa 细胞的迁移及细胞周期

转染 4、6 h 后,利用 Western blot 分析 HeLa/AD 细胞内 ADAM15 去整合素区域蛋白质的表达水平,结果见图 2。转染 4 h 后,ADAM15 去整合素区域蛋白已有表达,6 h 后表达水平较高。因此我们选择转染后 6 h 作为检测时间点,检测 HeLa 细胞周期及迁移能力的变化。

如表 1 所示,与正常 HeLa 细胞相比,HeLa/AD 的迁移抑制率为  $18.27\% \pm 2.15\%$ ,而  $4 \mu\text{mol/L}$  rhddADAM15 作用于 HeLa 细胞后,HeLa 细胞的迁移抑制率为  $96.37\% \pm 2.35\%$ ,抑制率远远大于 HeLa/AD;rhddADAM15 处理后,HeLa 细胞的 S 期含量上升约 4%,G2/M 期含量下降约 3.1%,G0/G1 期下降约 1%;与 rhddADAM15 处理后的 HeLa 细胞相似,

和野生型 HeLa 细胞相比,HeLa/AD 细胞也具有 S 期的部分阻滞,阻滞率约为 5%,G2/M 期含量下降约 3%。转染空质粒的对照组 S 期含量下降,G2/M 期略微升高,证明转染试剂对细胞周期也有一定影响。

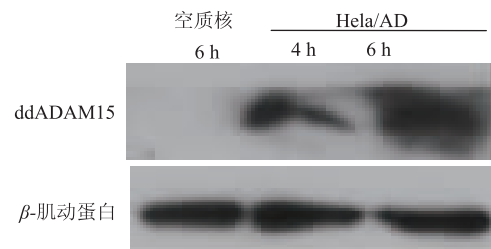


图 2 ADAM15 去整合素区域蛋白在 HeLa 细胞内的表达  
Fig. 2 Expression of the disintegrin domain of ADAM15 in HeLa cells

表 1 HeLa/AD 及 HeLa 细胞经过 rhddADAM15 处理后的细胞周期及迁移能力变化

Table 1 Cell cycle arrest and migration inhibition of HeLa/AD or HeLa cells treated with rhddADAM15

组别	(G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> )/%	S/%	(G <sub>2</sub> /M)/%	迁移抑制率/%
对照组	56.82±1.76	35.44±1.53	7.74±0.45	0
空质粒组	60.02±1.40**	31.54±0.78**	8.44±0.62**	10.61±0.71**
HeLa/AD	54.66±3.78*	40.45±0.85*	4.89±1.62**	18.27±2.15*
rhddADAM15(4.0 μmol/L)	55.91±1.71	39.47±1.41*	4.6±0.54**	96.37±2.35**

注: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs control.

### 2.3 相关通路抑制剂及激动剂对 HeLa 细胞的增殖影响

rhddADAM15 抑制 HeLa 细胞的增殖,阻滞其细胞周期,为了研究 rhddADAM15 抑制 HeLa 细胞增殖作用相关的通路,考察了 MAPK 通路激动剂 EGF 及 ERK1/2 通路抑制剂 U0125 对 rhddADAM15 处理后 HeLa 细胞增殖的影响。实验中所用 rhddADAM15 的浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$ ,EGF 浓度为  $0.8 \text{ nmol/L}$ ,U0125 浓度为  $10 \text{ nmol/L}$ ,结果见图 3。rhddADAM15 可抑制 HeLa 细胞的增殖(柱 1),EGF 可促进 HeLa 细胞的增殖并可逆转 rhddADAM15 引起的细胞增殖抑制(柱 2,3),在 EGF 的作用下,rhddADAM15 对 HeLa 细胞增殖并没有抑制效果,只是减弱 EGF 对 HeLa 细胞增殖的促进作用(柱 3);U0125 同样也能抑制 HeLa 细胞的增殖(柱 4),rhddADAM15 与 U0125 联用会使 HeLa 的增殖抑制增强(柱 5);EGF 可以逆转 U0125 及 U0125 与 rhddADAM15 联用引起的增殖抑制作用(柱 6、7),

即 EGF 存在下,U0125 及 U0125 与 rhddADAM15 联用并不能引起 HeLa 细胞的增殖抑制,HeLa 细胞仍会有一定程度的增殖促进。

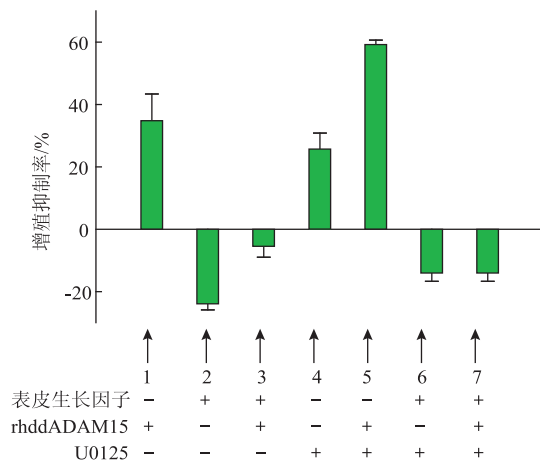


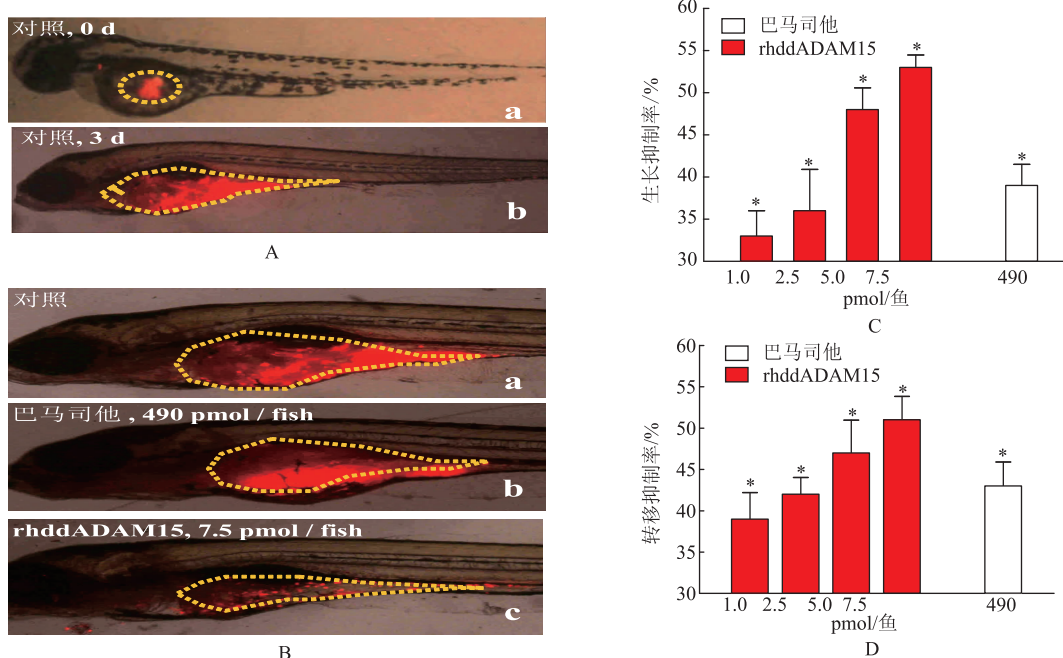
图 3 rhddADAM15,EGF, 及 U0125 对 HeLa 细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of rhddADAM15,EGF,and U0125 on the proliferation of HeLa cells

### 2.4 rhddADAM15 对斑马鱼体内 HeLa 细胞生长及转移的影响

HeLa 细胞移植于斑马鱼体内后,可以正常生长,如图 4A 所示,移植 3 d 以后,HeLa 细胞在斑马鱼体内增殖并转移,表现为红色荧光范围变广。经过阳性对照巴马司他及 rhddADAM15 处理后,斑马鱼体内 HeLa 细胞的荧光面积减小,亮度变暗(图 4B)。统计结果显示,rhddADAM15 作用后斑马鱼体

内 HeLa 细胞的荧光强度及荧光面积减弱呈剂量依赖性,在 rhddADAM15 最大非致死剂量,即 7.5 pmol/鱼的剂量下,rhddADAM15 对 HeLa 细胞在斑马鱼体内增殖的抑制率为  $53\% \pm 1.49\%$ ,转移抑制率为  $51\% \pm 2.83\%$ ;在巴马司他最大非致死剂量,即 490 pmol/鱼的剂量下,巴马司他对 HeLa 细胞在斑马鱼体内生长的抑制率为  $39\% \pm 2.51\%$ ,转移抑制率为  $43\% \pm 2.90\%$ 。



A, HeLa 细胞移植到斑马鱼体内后的初始位置及荧光强度;b, HeLa 细胞移植到斑马鱼体内生长 3 d 后的图片,细胞有显地迁移及增殖迹象;B, a, 注射 PBS 作为阴性对照;b, 注射巴马司他作为阳性对照;c, 移植肿瘤细胞后的斑马鱼注射 7.5 pmol/鱼的 rhddADAM15;C, 注射药物 24 h 后各组荧光强度的统计结果;D, 注射药物 24 h 后各组荧光面积的统计结果( $n=10, *p<0.05$ )。

图 4 rhddADAM15 抑制斑马鱼体内 HeLa 细胞的生长及转移

Fig. 4 Inhibitory effect of rhddADAM15 on the proliferation and metastasis of HeLa cells in zebrafish xenografts

## 3 结语

整合素作为存在于细胞表面的重要黏附分子,可介导细胞与细胞及细胞与基质的黏附,对细胞基因表达与调控、细胞增殖、分化与凋亡,在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用<sup>[7-8]</sup>。去整合素可以通过竞争性抑制阻断整合素与细胞外基质的相互作用,干扰由整合素介导的信号转导通路<sup>[9]</sup>。

已有的研究发现,rhddADAM15 对多种肿瘤细胞的增殖均有较强的抑制作用,有较为广谱的抗癌性<sup>[4,10]</sup>。在本研究中,rhddADAM15 可以显著抑制人宫颈癌 Hela 细胞在体外及斑马鱼体内的增殖及转

移,抑制效果呈剂量依赖性;rhddADAM15 处理后,HeLa 细胞 S 期阻滞率约 4%;而通过瞬时转染使 ADAM15 去整合素区域蛋白在 HeLa 细胞内过表达,得到 HeLa/AD 细胞,其迁移能力较野生型 HeLa 细胞有微弱的下降,S 期阻滞率约为 5%。以上实验证明,rhddADAM15 作为外源蛋白及细胞内表达的内源蛋白,均可抑制细胞的迁移及诱导 S 期阻滞,虽然抑制及诱导强度不同,仍可说明 rhddADAM15 在细胞内及细胞表面均有其作用靶点。

rhddADAM15 发挥功能的一个重要活性位点为其可与整合素相互作用的 RGD 序列<sup>[4]</sup>。细胞的生存与增殖,都需要与细胞外基质的相互作用,整合素

是细胞表面受体的主要家族,对细胞和细胞外基质的粘附起介导作用。整合素参与了一系列的信号通路,调节细胞质蛋白激酶,生长因子受体和离子通道的活性,调控细胞内的肌动蛋白细胞骨架的组织。整合素还可以调节细胞周期,控制细胞存活、增殖、退出细胞周期或者细胞分化<sup>[8]</sup>。Chong等发现,ADAM15激活Src/Erk途径,来调整内皮细胞的通透性及中性粒细胞的迁移<sup>[11]</sup>。MAPK信号通路在调节细胞增殖、分化、凋亡以及迁移方面发挥重要作

用,并与炎症、肿瘤等多种疾病的发生密切相关<sup>[12]</sup>。本研究表明,EGF可以逆转rhddADAM15及rhddADAM15与ERK抑制剂U0125引起的HeLa细胞增殖抑制,表明rhddADAM15对HeLa细胞增殖的抑制与MAPK通路密切相关。虽然对于rhddADAM15的具体作用靶点及机制仍不清楚,但是本研究为进一步探究rhddADAM15参与的激酶级联激活过程提供了研究方向,为rhddADAM15的成药性提供了研究基础。

## 参考文献:

- [1] Wolfsberg T G, Primakoff P, Myles D G, et al. ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain; multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions[J]. **J Cell Biol**, 1995, 131(2):275-278.
- [2] Blobel C P, Myles D G, Primakoff P, et al. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence[J]. **J Cell Biol**, 1990, 111(1):69-78.
- [3] Seals D F and Courtneidge S A. The ADAMs family of metalloproteases; multidomain proteins with multiple functions [J]. **Genes Dev**, 2003, 17(1):7-30.
- [4] Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir L M, et al. Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin[J]. **Cancer Res**, 2004, 64(6):2062-2069.
- [5] Moss M L, Bartsch J W. Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members [J]. **Biochemistry**, 2004, 43 (23):7227-7235.
- [6] Wu J, Lei J, Zhang L, et al. Improving production and bioactivity of recombinant human disintegrin domain of ADAM15 (rhADAM15) in *Escherichia coli*[J]. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, 2008, 48(8):1067-1074.
- [7] Anastassiou G, Duensing S, Steinhoff G, et al. In vivo distribution of integrins in renal cell carcinoma; integrin-phenotype alteration in different degrees of tumor differentiation and VLA-2 involvement in tumor metastasis [J]. **Cancer Biother**, 1995, 10(4):287-292.
- [8] Giancotti F G and Ruoslahti E. Integrin signaling[J]. **Science**, 1999, 285(5430):1028-1032.
- [9] Temming K, Schiffelers R M, Molema G, et al. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature[J]. **Drug Resist Updat**, 2005, 8(6):381-402.
- [10] Hou Y, Chu M, Du F F, et al. Recombinant disintegrin domain of ADAM15 inhibits the proliferation and migration of Bel-7402 cells[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 2013, 435(4):640-645.
- [11] Sun C, Wu M H, Guo M, et al. ADAM15 regulates endothelial permeability and neutrophil migration via Src/ERK1/2 signalling[J]. **Cardiovasc Res**, 2010, 87(2):348-355.
- [12] 陈建勇,王聪,王娟,等. MAPK信号通路研究进展[J]. **中国医药科学**, 2011(8):32-34.  
CHEN Jianyong, WANG Cong, WANG Juan, et al. The progress of MAPK signaling pathway [J]. **China Medicine and Pharmacy**, 2011(8):32-34. (in Chinese)