

前列腺癌细胞株 PC-3 经 Doc 处理后 p-c-jun 和 AR 的表达变化

吴 静¹⁾, 董 彪²⁾, 方克伟²⁾

(1) 昆明医科大学生物化学教研室, 云南昆明 655008; 2) 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨多西紫杉醇的细胞毒性化疗反应的分子机制. **方法** 对体外的免疫印迹、荧光素酶和细胞生存率进行分析, 研究 PC-3 细胞暴露在多西紫杉醇后 p-c-jun 的过表达与 AR 的相互作用. **结果** 多西紫杉醇治疗 PC-3 细胞最敏感, 细胞对多烯紫杉醇的敏感性与 p-c-jun 水平呈负相关. 转染 c-jun 基因转染到 PC-3 细胞降低了多烯紫杉醇的敏感性, 而转染 c-jun 和 AR 基因则可以恢复到中等程度敏感性. p-c-jun 与 AR 蛋白水平之间没有发现直接相关性. 对多烯紫杉醇的治疗反应, 体内模型的结果与体外研究结果是一致的. **结论** p-c-jun 可能是多西紫杉醇对前列腺癌治疗的分子机制之一.

[关键词] 雄激素受体 (AR); p-c-jun; 多西紫杉醇; CRPC; PC-3

[中图分类号] R737.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 11-0026-03

Expression of p-c-jun and AR in Prostate Cancer Cell Line PC-3 Cells Treated with Doc

WU Jing¹⁾, DONG Biao²⁾, FANG Ke-wei²⁾

(1) Dept. of Biochemistry, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Dept. of Urinary Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of Docetaxel in treatment of PCa by detecting the expression of androgen receptor (AR) and p-jun in PC-3 cells treated with Docetaxel. **Methods** The effect of c-Jun overexpression and its interaction with AR upon PC-3 cells exposure to Docetaxel were studied in vitro by immunoblotting, luciferase and viability assays and in vivo using xenograft mice model. Furthermore, the expression of c-jun and p-c-jun in xenograft mice tissues was investigated by immunohistochemistry. **Results** PC-3 cells are most sensitive to docetaxel treatment. The sensitivity of PC-3 cells to docetaxel was negatively correlated with the phosphorylation level of c-jun. Transfection with c-Jun gene into PC-3 cells decreased the sensitivity to docetaxel treatment whereas cotransfection of c-jun and AR restored the sensitivity to a moderate degree. No direct correlation was found between the level of p-c-Jun and AR. The response to docetaxel treatment in vivo model was comparable to the in vitro results. **Conclusion** The phosphorylation level of c-Jun might be one of the mechanisms of docetaxel in treatment of prostate cancer.

[Key words] AR; p-c-jun; Docetaxel; CRPC; PC-3

前列腺癌 (prostate carcinoma, PCa) 是男性常见恶性肿瘤. 在西方国家中, 前列腺癌死亡率居男性恶性肿瘤的第二位^[1], 近年来, 我国男性前列

腺癌发病率呈明显上升趋势^[2]. 前列腺癌的发展经历了雄激素依赖且受雄激素刺激阶段, 雄激素非依赖但受雄激素刺激阶段, 雄激素非依赖且雄激

[基金项目] 云南省卫生厅资助课题 (2010NS053)

[作者简介] 吴静 (1976~), 女, 云南昆明市人, 医学硕士, 讲师, 主要从事泌尿系疾病的分子生物学研究工作.

[通讯作者] 方克伟. E-mail: fkw_waley@126.com

素不敏感阶段及雄激素非依赖且受雄激素抑制阶段等复杂过程. 因此, 研究雄激素受体在前列腺癌中的表达是近年的热点问题^[9]. 围绕前列腺癌的基因组、基因转录和蛋白代谢的研究, 可能提供集预测、治疗和预后于一体的“分子信号”^[4]. 本研究基于上述认识, 以 pc-3 细胞株为对象, 研究其经多西紫杉醇处理后 p-c-jun 的变化及与 AR 的相互关系, 以探讨多西紫杉醇对前列腺癌的治疗分子机制.

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

非雄激素依赖的细胞株 PC-3 购自 American Tissue Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA). 细胞保存在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青霉素 - 链霉素 RPMI 培养液中 (Life Technologies, Paisley, UK), 放置在含 95% 空气和 5% CO₂ 的湿润环境中. 根据使用说明, 用脂质体 2000 (GIBCO/BRL) 进行转染. 抗 -AR 抗体 (PG-21) 购买自 Upstate 生物技术有限公司 (Lake Placid, NY), Ki67 和 PSA 均购自 Dako (Glostrup, Denmark A/S). 辣根过氧化物酶标记的抗兔和抗鼠抗体均购买自 Sigma 化工有限公司 (St. Louis, MO, USA). 除非另有说明, 所有免疫印迹 (Western blot) 试剂均购自 Invitrogen 公司 (Carlsbad, CA, USA), 化学发光 (ECL) 试剂盒购自 Amersham (Arlington Heights, IL, USA).

1.2 细胞裂解和免疫印迹法

细胞进行裂解和免疫印迹都根据标准方法进行. 简单来说, 细胞裂解于细胞裂解液中 (50 mM Tris-HCL, 20mM EDTA, 1% 诺乃洗涤剂 P-40, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1mM Na₃VO₄, 1mM NaF, 1mM 苯甲基磺酰氟). 多烯紫杉醇 (Doc) (Taxotere[®], Sanifi-Avantis 公司) 溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 后使用, 对照组的处理采用同等剂量的 DMSO. 治疗后的总蛋白含量采用生物放射分析 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 方法测定. 电泳时, 30 μg 全细胞裂解液首先用 4-12% SDS-PAG 分离, 然后转移到硝酸纤维素膜上 (Hybond ECL, Amersham, Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). 放置于含 5% 无脂肪的 Tris 缓冲液 (含 0.2% Tween 20) (TBST) 中、室温下 1 h, 从而封闭非特异性结合的蛋白质. 然后该膜以适当的第一抗体 (1:1000 稀释) 结合. 随后该膜与过氧化物酶偶联的抗兔或抗鼠抗体 (1:5000) 孵育. 这些蛋白

质使用 ECL 检测系统显影. 为了确保膜上物质的均一, 经洗涤或再利用的膜用 β-肌动蛋白或底物来验证. 所有样本独立进行至少 3 次实验, 所取的结果是独立进行的实验结果相一致者. Western-blot 的密度分析是用 Quality one-4.6.2 (Bio-Rad, Hercules, Calif, USA) 完成的.

1.3 细胞活性测定

细胞存活率用台盼蓝来确定. 细胞接种在 24 孔板中, 24 h 后, 细胞经 5 nM 的 Doc 处理 24 和 48 h. 等量细胞悬浮液和 0.4% 台盼蓝与磷酸盐缓冲液混合, 用细胞计数版来计数活的细胞数量并除外台盼蓝染色的细胞.

1.4 细胞转染和荧光素酶分析

转染前 24 h 细胞株 (3×10^5 cells/cm²) 接种到含 10% 热灭活胎牛血清 RPMI 的 12 孔培养板中 (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). 脂质体 2000 用于瞬时转染, 作为 AR 活性指示的 400ng 的 ARE 和 PSA、作为 c-jun 活性指示的 AP-1-luc 以及 200 ng 的基本载体 pGL3 (Promega, Stockholm, Sweden). 用 5 ng pRL-SV40 Renilla 载体 (Promega, Stockholm, Sweden) 或 1ng 的 β-半乳糖苷酶载体 pCH110 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 作为转染对照. 孵育 24 h 后, 培养液改为没有酚红的含 5% 葡聚糖包裹活性炭热灭活胎牛血清的 RPMI 培养液, 没有或有 Doc (5 nM)、双氢睾酮 (DHT) (10 nM) 或 100 nM 的 12-O-十四烷酰佛波-13 醋酸酯 (TPA) (作为 p-c-jun 的化学诱导剂) 的条件下, 继续培养 24 h, 收获细胞并裂解, 细胞裂解液使用双荧光素酶试剂盒 (Promega 公司) 测定荧光素酶的活性.

1.5 体内实验

五周大的雄性无胸腺 NMRI 裸鼠购自丹麦的 Taconic, 饲养在没有特定病原体的、条件良好的、规范的实验室. 前列腺肿瘤细胞株 PC-3 制备好用于皮下 (SC) 注射. 该细胞用 PBS 洗涤, 胰酶消化后收集, 再悬浮、放置在冰上直至注射. 用血细胞计数仪计数细胞, 得到大约的细胞数: 100 μL PBS 中悬浮的细胞为 2×10^6 , 以此细胞悬浮液样品在小鼠的两翼注入 (每一个细胞株注射 6 个肿瘤). 肿瘤形成、发展后, 实验动物分为 Doc 治疗组和常规组. Doc (Taxotere[®]) 行腹腔注射 (i.p.). 所有的动物按 10 mg/kg 体重给以 Doc, 每次治疗量配制于 100 μL 注射用水, 每星期注射 4 次. 最后一次治疗 3 d 后处死动物. 第 1 天注射时老鼠的平均体重为 (30 ± 2) g.

1.6 免疫组织化学和定量

取下的异种移植肿瘤标本用 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋。4 μm 厚的切片，经晒干、脱蜡、复水、微波处理 10 min 使其在高 pH 条件下修复目标抗原 (DAKOG, Glostrup, Denmark)。然后用 Techmate 500 自动免疫组织化学染色机 (DAKO) 进行染色，抗体有 c-jun, p-c-jun 和 AR。DAB (3, 3'-二氨基联苯胺) 用作发色底物、苏木精用于复染。用奥林巴斯 AX70 显微镜放大 20 倍来观察标本。用随机半定量计分的方法来评价染色的强弱，分 3 个类别记分：没有染色 (0 分)，弱染色但一些或所有细胞均可见染色 (1 分)，中度染色 (2 分) 或强染色 (3 分)。每个肿瘤至少有两个部分得到观察、计分，并代表了所分析组织 70% 的区域。

1.7 统计学处理

所得结果至少来自 3 个实验，用均数 \pm 标准 ($\bar{x} \pm s$) 差表示。统计意义用 Student's *t*-tests 来确定， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Doc 治疗后 p-c-jun 的表达及细胞的生存率

结果表明 Doc (5 nM) 处理 2 h 后就可以诱导 p-c-jun 的表达，8 h 达到高峰。如图 1 所示，p-c-jun 表达持续至 24 h 实验终止时。p-c-jun 在 PC-3 细胞系表达较低 (见图 1)。实验发现 p-c-jun 蛋白的表达水平与细胞生存密切相关，同时进行免疫荧光分析证实 (见图 1B)。PC-3 细胞是对 Doc 最敏感的细胞，细胞的成活率仅为 10% (图 1A)。细胞的成活率也得到了相差显微镜的确认。转染了 c-jun 基因到 PC-3 细胞后，该细胞对多烯紫杉醇的敏感性下降，细胞存活率上升为 40%。共转染 c-jun 和 AR 基因，PC-3 细胞对多烯紫杉醇中度敏感，细胞存活率为 30%，延长暴露在 Doc 中的时间至 15 d，p-c-jun 维持在一个比较高的水平。

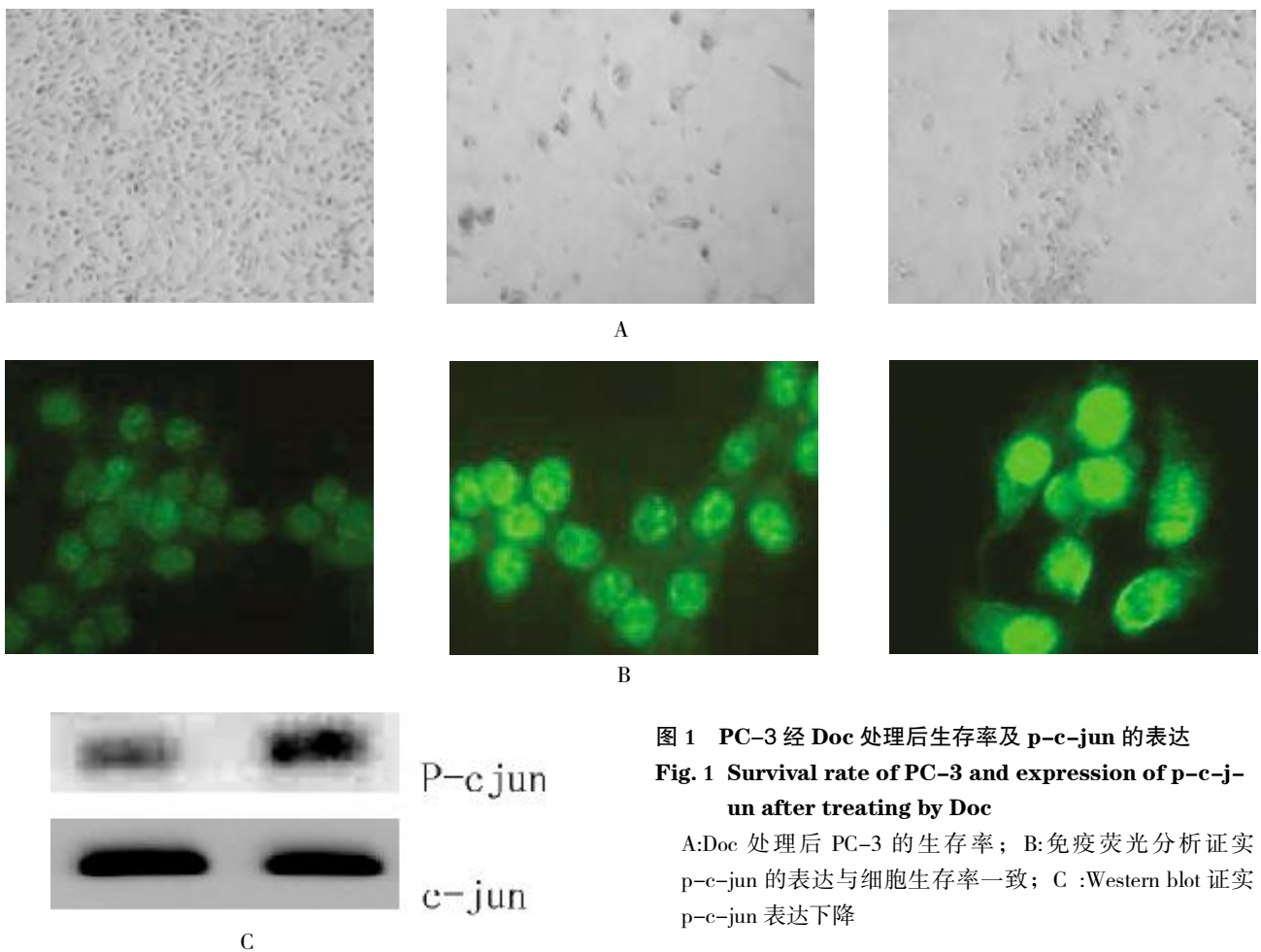


图 1 PC-3 经 Doc 处理后生存率及 p-c-jun 的表达

Fig. 1 Survival rate of PC-3 and expression of p-c-jun after treating by Doc

A: Doc 处理后 PC-3 的生存率; B: 免疫荧光分析证实 p-c-jun 的表达与细胞生存率一致; C: Western blot 证实 p-c-jun 表达下降

2.2 体内模型中肿瘤大小与 p-c-jun 表达的关系

为了评价 PC-3 前列腺癌细胞系对 Doc 的治疗反应, 我们进行了异种肿瘤移植的研究. 肿瘤大小是用每周注射 Doc 的剂量来衡量. Doc 导致了 PC-3 细胞肿瘤体积的明显缩小 (见图 2).

笔者进一步检测了用 Doc 治疗的动物标本中 p-c-jun 的表达与对照组织进行比较. 大约 30% 的细胞的 p-c-jun 强阳性, 对照肿瘤组织中 p-c-jun 的表达更强、细胞更多, 约 80% (见图 3). 值得注意的是染色强阳性常常在进行细胞分裂的的肿瘤样本中发现.

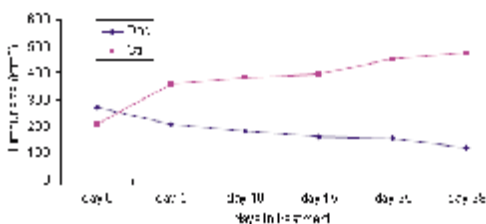


图 2 大鼠 PC-3 肿瘤模型经 Doc 治疗后肿瘤体积明显缩小

Fig. 2 Tumor size decreased obviously after treating the rats by Doc

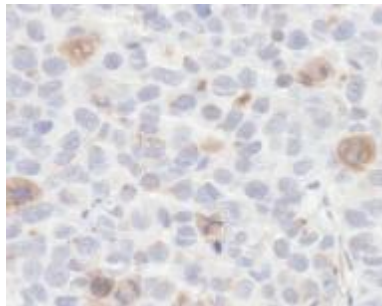


图 3 肿瘤组织细胞中 p-c-jun 的表达

Fig. 3 Expression of p-c-jun in PC-3 tumor cells (immunohistochemistry)

3 讨论

对进展性、转移性前列腺癌, 激素治疗是雄激素依赖性患者的最初选择, 可使大部分患者的前列腺肿瘤细胞凋亡并使与细胞特异性关的 PSA 降低. 然而, 激素治疗失败后前列腺癌迅速恶化, 其主要原因是 CRPC 的雄激素非依赖性生长^[5]. 然而越来越多来自于体外和体内研究的证据表明, 前列腺癌在这个阶段的生长和生存仍然依赖于 AR^[6]. 目前认为, 前列腺内残留的雄激素是 CRPC 细胞不断增长的必不可少的因素, AR 仍然是治疗 CRPC

的主要靶标^[6].

紫杉醇是一种存在于紫杉烷类植物树皮和枝叶中的二萜烯类物质, 因其阻碍肿瘤细胞微管活性, 在 G2/M 期阻碍纺锤体的形成而抑制癌细胞的生长. 多西紫杉醇是紫杉烷类药物的家庭成员, 这类药物通过抑制微管活性导致细胞死亡^[7]. 最近的研究显示 Doc 能够减轻 CRPC 患者的症状、延长生存期^[8]. 现在认为多烯紫杉醇 (以下简称 Doc) 是治疗 CRPC 的标准方案^[9], 但它诱导肿瘤消退的机制以及谁将会从中受益并不清楚. 目前认为可能是多种机制的结果: (1) 紫杉烷类与已知 β -微管蛋白结合, 导致微管网络的稳定, 使细胞周期停滞致在 G2-M 期; (2) 紫杉烷类改变依赖于微管稳定的基因表达^[10]. 因此, Doc 有可能通过诱导基因的过程来诱导细胞凋亡, 比如 Doc 可以直接诱发或调控基因表达, 从而触发细胞凋亡过程. 雄激素受体 (AR) 是通过调节基因的表达, 特别是可能参与细胞凋亡通路的基因的调控来干扰 Doc 的作用^[11].

本研究探讨了 AR 与 p-c-jun 在 Doc 治疗后的变化, 旨在探讨 Doc 治疗前列腺癌的分子机制. 如同其他核受体一样, AR 也干扰 AP-1 的作用^[12]. 而原癌基因 c-Jun 是复杂的 AP-1 的重要组成部分之一, 原癌基因 c-Fos 是 c-Jun 最知名的二聚体, 现已证明 c-Jun 暴露于 Doc 后可以促使其磷酸化. 而且, 磷酸化 c-Jun 在人类癌症中常常为过度表达, 并与前列腺癌和乳腺癌的侵入性能有关^[13]. 然而, 细胞暴露于 Doc 后 c-jun 活化的作用、与配体激活的可能相互作用、与 AR 的相互激活等命运只是一个复杂的网络的一部分, 具体作用机制还有待明确. 对 77 名出现前列腺癌复发的患者研究其雄激素受体基因增殖是否可以作为雄激素抑制治疗有效的评价因子时, 证实作为一种二线治疗手段的雄激素抑制治疗, 出现雄激素受体基因增殖可以作为治疗有效的标志^[14], 并发现死亡组的患者在治疗前的病理标本中均未发现有 AR 基因获得现象. 在未检测到 AR 基因获得的 11 例存活组患者中, 有 6 例患者随访时间在 5 a 以内. 因而认为, 前列腺癌患者在治疗前出现 AR 基因获得提示预后良好^[15].

本研究表明, 在表达 AR 的 PC 细胞中, 对 Doc 的敏感性较低, 而 PC-3 细胞 AR 较低, 对 Doc 较敏感. 同时发现高水平的转录因子 p-c-jun 与化疗反应负相关. 其他研究小组的研究也表明, 其它转录因子如 FOXO-1 可以干预 AR 活性, 从而影响对 Doc 的治疗反应^[11]. 本实验结果表明,

p-c-jun 是这个复杂网络的一部分,提示它可能干预 AR 与 c-jun 的转录活动,从而影响 Doc 的治疗反应.本研究的荧光素酶的结果表明 AR 与转录因子 c-jun 的磷酸化直接相关.这种相互作用的确切机制尚未完全理解.此外,研究表明,异种移植瘤的组织中,Doc 诱导大多数有丝分裂相的细胞表达、积累 p-c-jun.因此,这种药物能够剥夺肿瘤细胞 G2/M 期的分裂、进而诱导细胞凋亡,可能是一个该治疗机理的关键因素,为获得 Doc 在体内治疗的更佳疗效,这需要加以考虑.

本研究结果表明, c-Jun 的激活在 Doc 治疗反应中对表达 AR 的细胞起诱导保护性反应的作用.尽管在前列腺癌细胞中 c-jun 的活动没有通过 JNK 途径,却有研究证实,顺铂诱导激活 JNK、c-Jun 通路促进人脑胶质瘤细胞的存活,而 5-FU 和其他抗癌药物也诱导通过细胞 JNK/SAPK 的活化来促使细胞凋亡.这些差异突显出目前理解 JNK/c-Jun 通路在对细胞毒性反应和控制细胞凋亡反应的细胞分子作用的复杂性^[6]. c-Jun 通路在细胞对化疗反应的明显对立之处可能反映在特定细胞培养模型体系中.

目前的研究结果扩展了以前的 Krause 等^[7]、Ouyang 等^[8]的研究结果,他们认为 Jun 阳性的肿瘤细胞增加了生化复发风险,高水平的 p-c-jun 而不是 c-jun,与激素抵抗后显著缩短生存期直接相关,磷酸化 c-jun 在 PC 细胞细胞周期进程和细胞增殖中有重要作用.目前的研究结果使人们进一步洞察到这一转录因子的生物作用是 CRPC 患者肿瘤进展的不利因素.由于 c-jun 的激活是必需 DNA 结合 AP-1 的二聚体,核表达是人类前列腺癌 AP-1 途径激活的一个指示性征象.

总之,本研究建立了一个保护作用的 AR 和转录因子的目标 c-jun 在 Doc 治疗 PC 细胞中的作用,通过抑制 c-jun 的功能可以更有效地治疗 PC 细胞.其它研究也认为临床上若要全面阻断雄激素作用,除要阻断 AR 的信号外,还需抑制其旁路蛋白的激酶活性,对更好的治疗 PCa 有重要的参考意义.

[参考文献]

[1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 7(57):43-46.
 [2] 叶定伟, 朱耀. 中国前列腺癌的发病趋势[J]. *中国临床肿瘤学教育专刊*, 2007:616-620.
 [3] 周智恩, 李汉忠, 严维刚. 雄激素受体蛋白表达及其基

因获得/缺失与前列腺癌预后的相关性[J]. *基础医学与临床*, 2010, 30(8):857-861.

- [4] LOPERGOLO A, ZAFFARONI N. Biomolecular markers of outcome prediction in prostate cancer [J]. *Cancer*, 2009, 115(13 Suppl):3 058-3 067.
 [5] CHEN C D, WELSBIE D S, TRAN C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy [J]. *Nat Med*, 2004, 10(1):33-39.
 [6] CHENG J, WU Y, MOHLER J L, et al. The transcriptomics of de novo androgen biosynthesis in prostate cancer cells following androgen reduction [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(12):1 033-1 042.
 [7] ROWINSKY E K, CAZENAVE L A, DONEHOWER RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(15):1 247-1 259.
 [8] PETRYLAK D P, TANGEN C M, HUSSAIN M H, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(15):1 513-1 520.
 [9] SHAPIRO D, TAREEN B. Current and emerging treatments in the management of castration-resistant prostate cancer [J]. *Curr Drug Targets*, 2012 12(7):951-964.
 [10] CHOY H. Taxanes in combined modality therapy for solid tumors [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001, 37(3):237-247.
 [11] GAN L, CHEN S, WANG Y, et al. Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(21):8 386-8 394.
 [12] CHEN S Y, CAI C, FISHER C J, et al. c-Jun enhancement of androgen receptor transactivation is associated with prostate cancer cell proliferation [J]. *Oncogene*, 2006, 25(54):7 212-7 223.
 [13] LEUGEL M M, GREIJER A E, BOS R, et al. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(6):668-674
 [14] PALMBERG C, KOIVISTO P, KAKKOLA L, et al. Androgen receptor gene amplification at primary progression predicts response to combined androgen blockade as second line therapy for advanced prostate cancer [J]. *J Urol*, 2000, 164(6):1 992-1 995.
 [15] 周智恩, 李汉忠, 严维刚. 雄激素受体蛋白表达及其基因获得/缺失与前列腺癌预后的相关性[J]. *基础医学与临床*, 2010, 30(8):857-861.
 [16] POTAPOVA O, BASU S, MERCOLA D, et al. Protective role for c-Jun in the cellular response to DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(30):28 546-2 853.
 [17] KRAUSE D, LYONS A, FENNELLY C, et al. Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from

- apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor can be suppressed by dicumarol [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (22): 19 244 - 1 952.
- [18] OUYANG X, WALTER J J, AL-AHMADIE H, et al. Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer [J]. *Cancer Research*, 2008, 68(7): 2 132 - 2 144.
- [19] 王新敏, 王勤章, 章乐, 等. 雄激素受体与 P21 活化激酶 6 在前列腺癌组织中的表达及意义 [J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2010, 28(1): 79 - 82. (2012 - 09 - 05 收稿)

(上接第 18 页)

- apoptotic pathway [J]. *Oncogene*, 1997, 15 (3): 285 - 290
- [8] PAYNE J, SHIBASAKI F, MEROELA M. Spina bifida occulta in homozygous patch mouse embryos [J]. *Dev Dyn*, 1997, 209(1): 105 - 116.
- [9] GERMAN J. Embryonic stress hyperesis of teratogenesis [J]. *Amer J Med*, 1984, 76: 293.
- [10] 张静, 高英茂. 血小板源性生长因子受体与高温致神经管畸形发生关系的研究 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2004, 13(1): 22 - 23.
- [11] BATINAGA M. Death by dozens of cuts [J]. *Science*, 1998, 280(5 360): 32 - 34.
- [12] LA CASSE E C, BAIRD S, KORNELUK R G, et al. The inhibitors of apoptosis (LAPs) and their emerging role in cancer [J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3 247 - 3 259.
- [13] KENNEDY T E, SERAFINI T, TESSIER-LAVIGNE M, et al. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural Axons in the embryonic spinal cord [J]. *cell*, 1994, 78(3): 425 - 435.
- [14] BRESE K, BLAND K, WANG K H, et al. Slit proteins bind robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance [J]. *Glia*, 2003, 42(2): 130 - 138. (2012 - 09 - 14 收稿)