

## 探索·发现

# 人siALK2重组腺病毒的构建及其对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231增殖、迁移和侵袭的影响

费 嫦 王 林 孙笑笑 刘月红 万绍恒 王 维 陈莹莹 王 婷 张 彦\*

(重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆400016)

**摘要** 用前期设计并合成好的重组腺病毒质粒pAdsiALK2, 经Pac I酶切后转染至HEK293细胞进行包装, 制备重组腺病毒, 扩增后进行病毒滴度测定, 以重组腺病毒siALK2(AdsiALK2)感染MDA-MB-231细胞, 以含RFP的腺病毒作为感染对照, 并设空白对照组。通过RT-PCR验证MDA-MB-231细胞中ALK2表达显著下降; MTT法、平板集落形成试验、细胞划痕试验及Transwell侵袭试验证实MDA-MB-231/siALK2组相比MDA-MB-231/RFP组细胞的增殖活力、集落形成率及划痕愈合率均显著降低( $P < 0.05$ ), 穿膜细胞数也明显减少( $P < 0.05$ ), 而MDA-MB-231/RFP组与空白对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。该研究表明, 下调ALK2表达后可以在体外抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的增殖、迁移与侵袭。

**关键词** siALK2; 重组腺病毒; 乳腺肿瘤; 细胞增殖; 细胞运动; 肿瘤浸润

## Construction of Recombinant Adenovirus Vector Expressing Human siALK2 and Effect of siALK2 on Proliferation, Migration and Invasion Abilities of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

Fei Chang, Wang Lin, Sun Xiaoxiao, Liu Yuehong, Wan Shaoheng, Wang Wei, Chen Yingying, Wang Ting, Zhang Yan\*  
(Key Laboratory of LabLaboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** The recombinant adenovirus plasmid pAdsiALK2 was digested with Pac I and transfected to HEK293 packaging cells. The recombinant adenovirus was amplified and identified, MDA-MB-231 cells were infected with adenovirus siALK2 and RFP respectively. RT-PCR demonstrated that ALK2 expression was remarkably decreased in MDA-MB-231/siALK2 cells. The proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231/siALK2 cells were estimated by MTT assay, colony-forming assay, wounding healing assay and transwell assay showed that the proliferation activity, colony formation rate, wound healing rate and count of cells crossing the matrix barrier were significantly reduced in MDA-MB-231/siALK2 group than those in MDA-MB-231/RFP group ( $P < 0.05$ ), ALK2 expression was remarkably decreased in MDA-MB-231/siALK2 cells. But no significant difference was observed between MDA-MB-231/RFP and blank control groups ( $P > 0.05$ ). These results demonstrated that down-regulating ALK2 expression

收稿日期: 2013-03-24 接受日期: 2013-05-14

国家自然科学基金(批准号: 81172017)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485688, E-mail: zy2753@hotmail.com

Received: March 24, 2013 Accepted: May 14, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172017)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485688, E-mail: zy2753@hotmail.com

网络出版时间: 2013-07-18 15:59

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130718.1559.001.html>

can inhibit the proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells *in vitro*.

**Key words** *siALK2*; recombinant adenovirus; breast tumor; cell proliferation; cell motility; tumor invasion

活化素受体样激酶2(activin receptor-like kinase 2, *ALK2*)属于转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族受体成员之一, 是膜蛋白受体<sup>[1]</sup>。在肿瘤细胞中, *ALK2*表达广泛, 其与相应配体结合后, 调控细胞的某些生物学行为, 如*ALK2*通过与BMP-9结合可促进卵巢癌细胞的增殖<sup>[2]</sup>、*ALK2*可结合骨形成蛋白7(bone morphogenetic protein 7, BMP7)抑制人黑素瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[3]</sup>。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 发病率占各种恶性肿瘤的7%~10%, 严重影响女性的身心健康甚至危及生命<sup>[4]</sup>。我们的前期研究发现, *ALK2*在乳腺癌恶性细胞株MDA-MB-231中存在高表达。*ALK2*最初是因为能与ActRII或者ActRIIB协同结合活化素蛋白而被发现的, 后来证实也是BMP家族的I型受体。间充质干细胞中, *ALK2*对于BMP9诱导的成骨信号通路是必需的<sup>[5]</sup>。另外, 体外实验证明, 外源性BMP9可有效抑制MDA-MB-231细胞的增殖、迁移和侵袭能力<sup>[6]</sup>。目前已有报道表明, 采用AdDN-*ALK2*腺病毒感染细胞后发现其能显著降低MDA-MB-231细胞的增殖, 迁移和侵袭能力<sup>[7]</sup>。为此, 我们运用基因沉默(RNA干扰是下调目的基因表达最常用的也是最经典的方法, 其特异性较高)进一步验证并且阐明乳腺癌细胞中高度表达的*ALK2*参与了乳腺癌的生长和转移。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象, 是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。这种现象发生在转录后水平, 又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)。双链RNA经酶切后会形成很多小片段, 称为siRNA, 这些小片段一旦与信使RNA(mRNA)中的同源序列互补结合, 会导致mRNA失去功能, 即不能翻译产生蛋白质, 也就是使基因“沉默”。相较真核质粒载体而言, 重组腺病毒有着感染效率高, 并可以作为基因治疗载体使用的优点, 因此, 本实验拟构建并制备重组腺病毒AdsiALK2, 并探讨通过RNA干扰下调*ALK2*后对人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖、迁移及侵袭能力的影响, 从受体水平探讨乳腺癌的发

病机制, 从而为更好地预防和治疗乳腺癌奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞及质粒 HEK293和重组腺病毒质粒pAdsiALK2细胞由重庆医科大学医学检验医学院分子医学实验室提供; 高转移性人乳腺癌细胞系MDA-MB-231购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; RFP腺病毒(AdRFP)由美国芝加哥大学医学中心分子肿瘤研究室何通川教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 试验中所用引物、PCR和DNA连接试剂盒购自大连宝生物技术有限公司; 限制性内切酶*Pme* I和*Pac* I购自New England Biolab公司; DNA纯化试剂盒购自Omega公司; 脂质体转染试剂盒、Trizol试剂购自Invitrogen公司; L-15培养基和胎牛血清购自Gibco公司; 高糖型DMEM培养液购自Hyclone公司; MTT试剂购自So-larbio公司; 基质胶ECM(Gel from Eng-elbreth-Holm-Swarm murine sarcoma)购自Sigma公司; Millicell小室购自Millipore公司。

### 1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒(AdsiALK2)的包装、扩增 课题前期设计并合成干扰人*ALK2*的双链DNA序列, 亚克隆至穿梭质粒Pses-Hus质粒中获得Pses-Hus-siALK2质粒, 将构建重组穿梭质粒Pses-Hus-siALK2, 经酶切、测序及电泳鉴定后, 再经*Pme* I酶切线性化后电转化BJ5183菌株, 该菌株含有超螺旋的骨架质粒(AdEasier细胞), 获得重组腺病毒质粒pAdsiALK2, 本实验将鉴定正确的重组腺病毒质粒*Pac* I酶切, 乙醇沉淀后, 由脂质体Lipofectamine 2000介导转染HEK293细胞, 操作按试剂盒说明书进行。于37 °C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养箱中培养, 由于穿梭质粒Pses-hus本身表达红色荧光蛋白(RFP), 在荧光显微镜下观察RFP的表达情况, 当80%以上细胞变圆、少数细胞脱落漂浮后收获病毒, 进行逐轮扩增<sup>[5]</sup>。

1.2.2 重组腺病毒感染MDA-MB-231细胞、*ALK2*基因表达的鉴定 分别用重组腺病毒AdsiALK2、AdRFP感染MDA-MB-231细胞36 h, 确认MDA-MB-231/siALK2

组与MDA-MB-231/RFP组荧光表达量一致后,提取各组细胞RNA,逆转录合成cDNA。以合成的cDNA为模板进行PCR反应。*ALK2*上游引物: 5'-AGG ATT ACA AGC CAC CG-3',下游引物: 5'-TAC CAG CAT TCT TTC ATT AG-3',产物长度163 bp。内参*GAPDH*上游引物: 5'-CAG CGA CAC CCA CTC CTC-3',下游引物: 5'-TGA GGT CCA CCA CCC TGT-3',产物长度120 bp。反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 52 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s,共25个循环;最后72 °C延伸10 min。取PCR产物5 μL进行1%琼脂糖凝胶电泳鉴定,置于GEL EQ凝胶成像仪上成像,用Quantity One软件进行结果分析,以*ALK2*条带灰度值/内参照条带灰度值的比值表示*ALK2* mRNA的相对表达量。实验重复3次。

**1.2.3 细胞增殖活力的检测** 取对数生长期的MDA-MB-231细胞,以 $(1\sim3)\times 10^4$ /mL的密度接种于96孔板中,每孔100 μL,设3个处理组:空白对照、AdRFP处理组和Adsi*ALK2*处理组,每组3排平行孔,每排设7个复孔。于37 °C、无CO<sub>2</sub>条件下常规培养;待细胞贴壁后,分别感染两种腺病毒。8~12 h后换液,换液后1, 2, 3, 4, 5, 7 d,分别弃去各孔培养液,更换为100 μL无血清、无双抗的RPMI-1640培养液,并加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),继续培养4 h;吸弃孔内培养液,每孔加入DMSO溶液150 μL,摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解,酶标仪检测各孔492 nm的*D*值。

**1.2.4 细胞集落形成能力的检测** MDA-MB-231细胞感染腺病毒36 h后,收集各组细胞,接种于10 cm<sup>2</sup>培养皿中,200个细胞/培养皿培养10~14 d,当培养皿中出现肉眼可见的集落时,终止培养,PBS洗涤2次,3 mL甲醇固定15 min;弃去固定液,瑞吉氏染色计数。每组细胞设3个平行样本。

**1.2.5 细胞迁移能力的检测** 将MDA-MB-231细胞接种于6孔板中,5×10<sup>4</sup>/孔,待细胞汇合度达80%时,分别加入两种腺病毒,并设空白对照组,感染8 h后换液,36 h后观察细胞荧光表达情况。吸尽培养基后划痕,PBS洗涤2次,加入含10%胎牛血清的L-15培养基继续培养,分别于培养0, 24, 36 h时,在同一观察点处照相观察划痕愈合情况。

**1.2.6 细胞侵袭能力的检测** 将ECM基质胶按1:7的比例用无血清L-15培养液稀释后,取32 μL均匀涂布在Transwell小室底部膜上室面,紫外线照射过夜;

感染腺病毒36 h后,收集各组细胞,PBS洗涤2次,用无血清培养液重悬;将400 μL细胞悬液( $2\times 10^5$ /mL)加入上室,600 μL含20%胎牛血清的L-15培养基加入下室,每组设3个复孔,于37 °C、不含CO<sub>2</sub>的条件下培养24 h;取出上室,用湿棉签擦去膜上面未穿过膜的细胞,自然风干后用无水乙醇固定,HE染色。显微镜下照相,低倍镜下随机选取5个视野计数。以穿膜细胞数代表细胞的体外侵袭能力。

**1.2.7 统计学分析** 应用SPSS19.0软件处理数据,所有数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用student's *t*检验进行统计学分析,以*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组腺病毒(Adsi*ALK2*)的包装、扩增

荧光显微镜下观察可见,转染HEK293细胞后4, 5, 6 d,分别约有10%、30%和70%的细胞有红色荧光出现,7 d后可见满天星样红色荧光(图1),14 d后病毒扩增细胞变圆,可见病毒空斑形成。收集病毒液,反复感染HEK293细胞获得大量病毒,经测定,最终病毒滴度为 $1\times 10^{11}$  IU/mL。

### 2.2 MDA-MB-231细胞中*siALK2*基因的转录水平的检测

MDA-MB-231细胞中*ALK2*基因的RT-PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分析,结果显示:*ALK2*基因在MDA-MB-231细胞中有内源性表达,感染Adsi*ALK2*后能显著抑制MDA-MB-231细胞中*ALK2*表达(图2)。MDA-MB-231/*siALK2*组、MDA-MB-231/RFP组和MDA-MB-231组的*ALK2*和*GAPDH*灰度比值分别为(0.372±0.081)、(0.367±0.075)和(0.102±0.063),MDA-MB-231/*siALK2*组*ALK2*的表达显著降低。

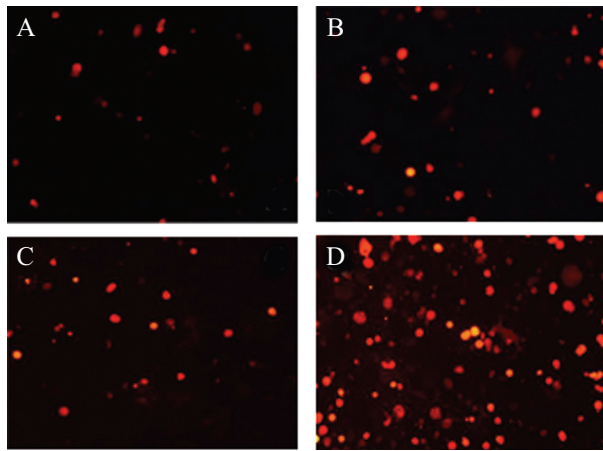
### 2.3 *siALK2*对MDA-MB-231细胞增殖活力的影响

MTT结果显示,腺病毒感染后第5 d,MDA-MB-231/*siALK2*组(0.433 3±0.138 1)与MDA-MB-231/RFP组(0.778 7±0.048 3)相比,细胞增殖率明显降低(*t*=1.899, *P*<0.05);而空白对照组(0.845 0±0.026 8)与MDA-MB-231/RFP组相比,差异无统计学意义(*t*=2.078, *P*>0.05)(图3)。

### 2.4 *siALK2*对MDA-MB-231细胞集落形成率的影响

腺病毒感染14 d后,对照组MDA-MB-231的细胞集落形成未受影响,MDA-MB-231/RFP组其克隆形成数稍减少;而MDA-MB-231/*siALK2*组与

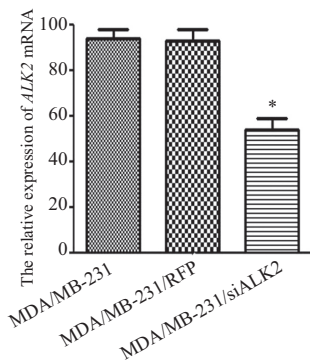
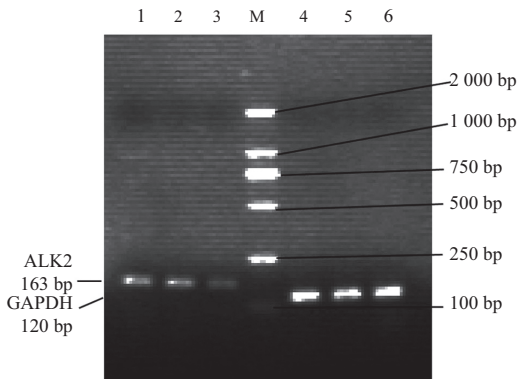




A: 转染4 d; B: 转染5 d; C: 转染6 d; D: 转染7 d.  
A: transfection 4 d; B: transfection 5 d; C: transfection 6 d; D: transfection 7 d.

图1 重组腺病毒AdsiALK2转染HEK293细胞的  
荧光显微镜观察(100×)

Fig.1 Fluorescent microscopy of HEK293 cells  
transfected with AdsiALK2(100×)



M: DNA marker DL2000; 1: MDAMB-231; 2: MDAMB-231/RFP; 3: MDAMB-231/siALK2; 4: MDAMB-231内参; 5: MDAMB-231/RFP内参; 6: MDAMB-231/siALK2内参。

M: DNA marker DL2000; 1: MDAMB-231; 2: MDAMB-231/RFP; 3: MDAMB-231/siALK2; 4: MDAMB-231 GAPDH; 5: MDAMB-231/RFP GAPDH; 6: MDAMB-231/siALK2 GAPDH.

图2 RT-PCR各组细胞中ALK2 mRNA的表达

Fig.2 The expression of ALK2 mRNA in different groups  
detected by RT-PCR

MDA-MB-231/RFP组相比较, 能明显抑制MDA-MB-231细胞集落形成, 细胞增殖速度减慢。按下式计算集落形成率: 集落形成率(%)=集落数/接种细胞数×100%。MDA-MB-231/siALK2组细胞集落形成率(25.7%±2.7%)显著低于MDA-MB-231/RFP组(71.6%±3.0%), 且差异有统计学意义( $t=25.461, P<0.05$ ); 而空白对照组(74.9%±3.4%)与MDA-MB-231/RFP组相比, 差异无统计学意义( $t=1.611, P>0.05$ )(图4)。

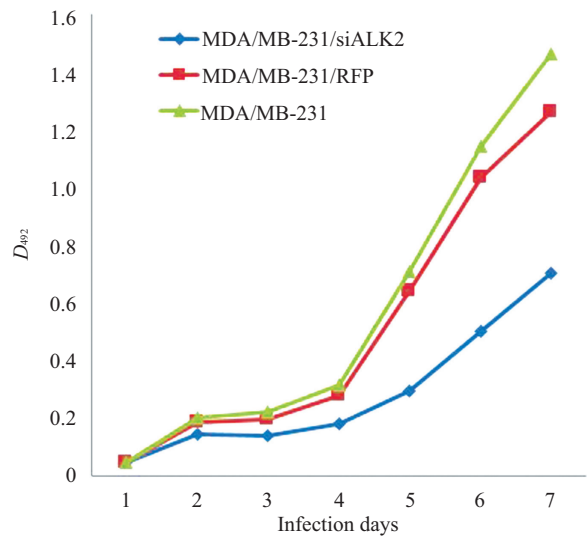
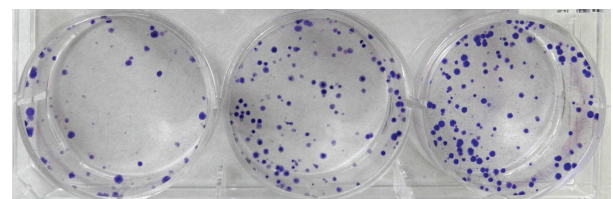
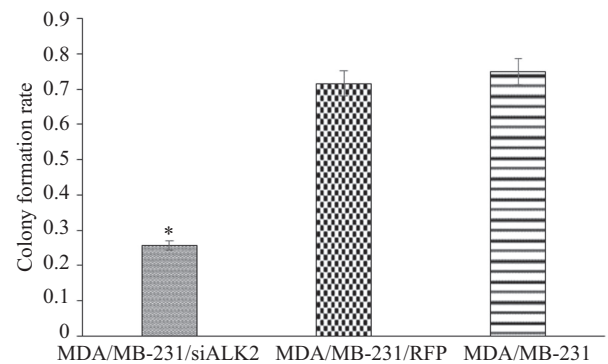


图3 各处理组细胞的增殖活力

Fig.3 Proliferation activities of cells in various groups



MDA/MB-231/siALK2 MDA/MB-231/RFP MDA/MB-231



\* $P<0.05$ .

图4 各处理组细胞的平板集落形成试验

Fig.4 Colony formation in various cell groups

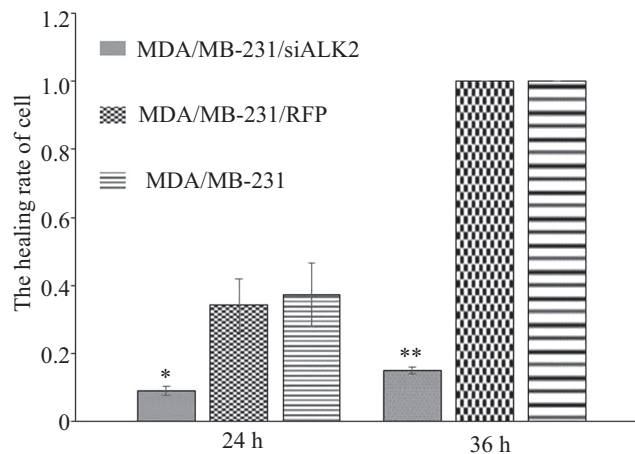
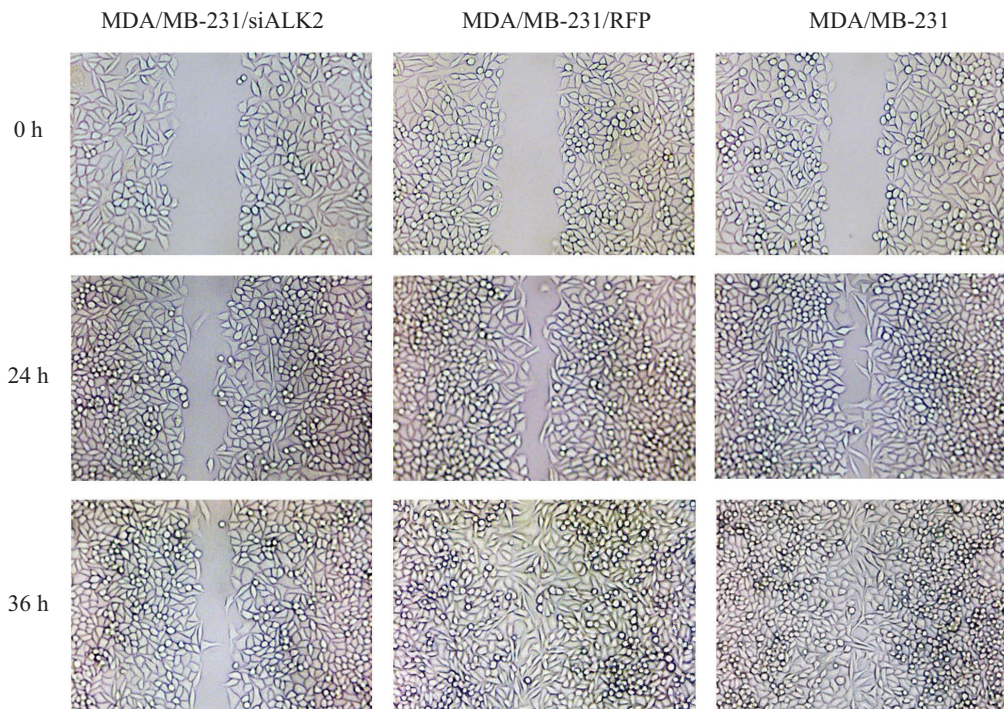
## 2.5 *siALK2*对MDA-MB-231细胞迁移能力的影响

划痕24 h和36 h后, 对照组MDA-MB-231组细胞划痕有逐渐愈合的趋势, MDA-MB-231/RFP组细胞划痕愈合趋势与对照组相似, MDA-MB-231/*siALK2*组细胞划痕愈合趋势明显降低。细胞的迁移能力降低。按下式计算平均划痕愈合率: 划痕愈合率(%)=(0 h划痕宽度-24 h/36 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times$ 100%。MDA-MB-231/*siALK2*组细胞的划痕愈合率(9.0% $\pm$ 1.3%)和(15.5% $\pm$ 0.1%)均明显低于MDA-MB-231/RFP组(34.2% $\pm$ 7.8%)和(100.0% $\pm$ 0.0%), 且差异有统计学意义( $t$ 值分别为20.126和202.915,  $P$ 值均小

于0.05); 而空白对照组(37.2% $\pm$ 9.3%)和(100.0% $\pm$ 0.0%)与MDA-MB-231/RFP组相比, 差异无统计学意义(24 h  $t$ 值为0.546,  $P>0.05$ )(图5)。

## 2.6 *siALK2*对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响

腺病毒感染36 h后, MDA-MB-231/RFP组穿膜细胞数略少于对照组, MDA-MB-231/*siALK2*组穿膜细胞明显少于MDA-MB-231/RFP组。细胞侵袭能力降低。MDA-MB-231/*siALK2*组穿膜细胞数(52.000 $\pm$ 4.967)显著少于MDA-MB-231/RFP组(197.625 $\pm$ 16.707), 且差异有统计学意义( $t=23.635$ ,  $P<0.05$ ); 而对照组(200.750 $\pm$ 13.874)与MDA-MB-231/RFP组相比, 差异无



\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

图5 各组细胞的迁移能力(100 $\times$ )

Fig.5 Migration motilities of cells in various groups (100 $\times$ )



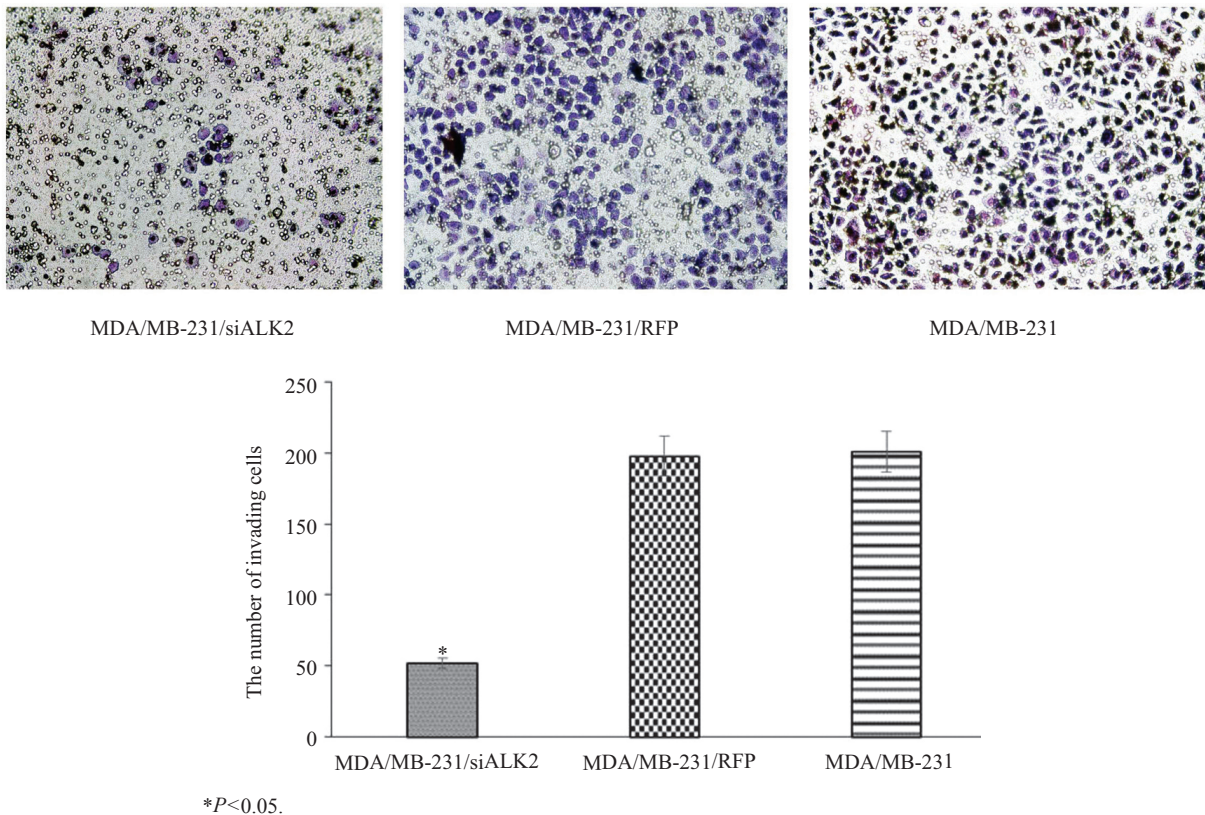


图6 各组细胞的穿膜细胞数(100×)

Fig.6 Transwell invasion assay on cells in various groups(100×)

统计学意义( $t=0.533$ ,  $P>0.05$ )(图6)。

### 3 讨论

*ALK2*即ACVR1(activin receptor type 1), 属于转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族受体成员之一, 是膜蛋白受体。TGF- $\beta$ 受体分为I型与II型两类, 在人体组织中广泛存在, 功能众多, 已明确11种亚型, 其中TGF- $\beta$  II型受体属于组成激活型。磷酸化的II型和I型受体形成复合物, 进而激活细胞内的一系列转录调控反应。TGF- $\beta$ 受体均为激酶样跨膜蛋白, 结构高度相似, 由胞外配体结合结构域、跨膜结构域和胞内激酶活性结构域三部分组成<sup>[8]</sup>。其中, 胞外和跨膜部分主要起结合固定作用, 胞内部分是决定配体能否顺利激活下游转录因子的关键结构, *ALK2*作为TGF- $\beta$ 超家族的I型受体, 与配体结合后, 激活下游的SMAD信号通路, 调控某些靶基因的转录<sup>[9]</sup>, *ALK2*对于BMP9诱导的成骨信号通路是必需的<sup>[5]</sup>; *ALK3*与配体BMP2结合后, 可促进乳腺癌细胞的迁移<sup>[10]</sup>。由此可见, 受体、相应配体及下游底物等水平的调节形成了对信号转导的多方位调

控, 从而使下游信号反应在不同细胞呈多样性。

近年来, 受体学说在临床上得到广泛应用。它已成为科学技术的前沿阵地之一。受体研究是从分子水平来阐明激素、递质、药物、抗体的作用机制及生理和病理过程。“受体病”就是一个应运而生的新概念。受体病是由于受体的数量和质量发生了异常改变而引起的一种病理状态。

本研究发现, *ALK2*在乳腺癌MDA-MB-231细胞中内源性表达, 采用AdsiRNA技术下调细胞中*ALK2*表达后, MDA-MB-231细胞的增殖、迁移及侵袭能力均减弱, 说明*ALK2*是乳腺癌生长、转移的重要影响因子, 并且可作为抑制乳腺癌转移的一个潜在靶点。目前研究发现, *ALK2*多数是作为BMPs的受体, 主要通过经典BMP/SMAD信号传导通路(BMPs-BMPRs-Smads-细胞核内基因转录-相应蛋白质的产生)参与肿瘤生长、迁移及侵袭, 提示*ALK2*可以作为乳腺癌治疗的一个新的靶点, 但*ALK2*是否在其他肿瘤中有相似的效应、以及在乳腺癌中si*ALK2*抑制细胞增殖、迁移及侵袭等的具体分子机制以及*ALK2*干扰后降低了TGF- $\beta$ 超家族中哪一种成员的作用尚

不清楚,有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Boesen CC, Radaev S, Motyka SA, Patamawenu A, Sun PD. The 1.1 A crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain. *Structure* 2002; 10(7): 913-9.
- 2 Herrera B, Van Dinther M, Ten Dijke P, Inman GJ. Autocrine bone morphogenetic protein-9 signals through activin receptor-like kinase kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Res* 2009; 69(24): 9254-62.
- 3 Na YR, Seok SH, Kim DJ, Han JH, Kim TH, Jung H, *et al.* Bone morphogenetic protein 7 induces mesenchymal-to-epithelial transition in melanoma cells, leading to inhibition of metastasis. *Cancer Sci* 2009; 100(11): 2218-25.
- 4 Phipps AI, Buist DS, Malone KE, Barlow WE, Porter PL, Kerlikowske K, *et al.* Reproductive history and risk of three breast cancer subtypes defined by three biomarkers. *Cancer Causes Control* 2011; 22(3): 399-405.
- 5 Luo J, Tang M, Huang J, He B, Gao J, Chen L, *et al.* TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* 2010; 285(38): 29588-98.
- 6 王科, 冯红蕾, 孙笑笑, 罗进勇, 张彦. 骨形态发生蛋白9抑制人乳腺癌MDA-MB-231体外侵袭和迁移. *基础医学与临床* (Wang Ke, Feng Honglei, Sun Xiaoxiao, Luo Jinyong, Zhang Yan. BMP9 inhibits invasion and migration of human MDA-MB-231 cells *in vitro*. *Basic & Clinical Medicine*) 2011; 31(4): 360-5.
- 7 孙笑笑, 王科, 冯红蕾, 罗进勇, 王虹, 张彦. DN-ALK2对人乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖、迁移和侵袭能力的影响. *中国生物制品学杂志* (Sun Xiaoxiao, Wang Ke, Feng Honglei, Luo Jinyong, Wang Hong, Zhang Yan. Effect of DN-ALK2 on proliferation, migration and invasion abilities of human breast cancer MDA-MB-231 cells. *Chinese Journal of Biologicals*) 2011; 24(17): 1285-9.
- 8 Yoshikawa H, Nakase T, Myoui A, Ueda T. Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *J Orthop Sci* 2004; 9(3): 334-40.
- 9 Katsuno Y, Hanyu A, Kanda H, Ishikawa Y, Akiyama F, Iwase T, *et al.* Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene* 2008; 27(49): 6322-33.
- 10 Kang MH, Kim JS, Seoc JE, Seo JE, Oh SC, Yoo YA. BMP2 accelerates the motility and invasiveness of gastric cancer cells via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway. *Exp Cell Res* 2010; 316(1): 24-37.