

*Lumican*基因过表达对肺腺癌细胞A549转移的影响及机制探讨

周 坤¹ 王 耕¹ 潘俊峰¹ 葛明建^{2*}

(¹湖北医药学院附属太和医院内分泌血管外科, 十堰 442000; ²重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

摘要 基膜聚糖(Lumican)广泛分布于人体各组织, 并在多种恶性肿瘤组织中异常表达, 在肿瘤的迁移、黏附和转移灶的形成等过程中起重要作用。该研究首先构建稳定过表达*Lumican*基因的细胞株, 采用Transwell小室、黏附、血管形成及动物实验检测各组细胞侵袭、迁移, 同、异种细胞间黏附及血管形成能力, 研究其对肺腺癌细胞A549转移能力的影响; 并通过Western blot检测RhoC、p-Akt、MMP-2、VEGF蛋白的表达, 探讨其可能机制。结果发现, 与空载体组和(或)对照组比较, 实验组细胞侵袭、迁移能力增强($P<0.05$), 同种细胞间黏附力减弱($P<0.05$)、异种细胞间黏附力增强($P<0.05$), 血管形成能力及裸鼠皮下瘤血管密度增加($P<0.05$), RhoC、p-Akt、MMP-2、VEGF蛋白表达均明显增加($P<0.05$), 以上各参数比较对照组与空载体组之间均没有明显差异($P>0.05$)。该研究表明, *Lumican*基因在肺腺癌细胞A549中过表达能促进细胞的转移, 其机理可能与RhoC蛋白表达增高有关。

关键词 Lumican; 肺腺癌; 转移; RhoC

Effect and Mechanism of *Lumican* Gene Overexpression on Metastasis of Lung Adenocarcinoma Cell A549

Zhou Kun¹, Wang Geng¹, Pan Junfeng¹, Ge Mingjian^{2*}

(¹Department of Endocrine and Vascular Surgery, Affiliated Taihe Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

²Department of Thoracocardiac surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Lumican which widely distributed in human tissues and abnormally expressed in a variety of malignant tissues played an important role in tumor migration, adhesion and metastasis formation process. Firstly, the stable overexpression of *Lumican* in lung adenocarcinoma cell line A549 was established in the study. Furthermore, transwell chambers assay, adhesion, angiogenesis and animal experiments were used to detect the ability of invasion, migration, angiogenesis, homogeneous and heterogeneous cells intercellular adhesion among each group, and to investigate the effect of the metastasis on A549. Finally, Western blot was used to detect the expression of RhoC, p-Akt, MMP-2 and VEGF proteins in order to illustrate the possible mechanism. Compared with the control group and (or) the empty vector group, the results showed that the experimental group cells invasion and migration ability were enhanced ($P<0.05$) and

收稿日期: 2013-04-01 接受日期: 2013-06-25

国家自然科学基金(批准号: 30972961)资助的课题

*通讯作者. Tel: 023-89011131, E-mail: mingjian_ge@hotmail.com

Received: April 1, 2013 Accepted: June 25, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30972961)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89011131, E-mail: mingjian_ge@hotmail.com

网络出版时间: 2013-08-29 09:47 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130829.0947.004.html>

homogeneous cells intercellular adhesion were decreased. Meanwhile, heterogeneous cells intercellular adhesion was increased ($P<0.05$); Angiogenesis capacity and the vascular density which was got from nude mice subcutaneous tumor were increased ($P<0.05$); The expression of RhoC, p-Akt, MMP-2 and VEGF were significantly rised ($P<0.05$) and there were no differences between the control group and empty vector group ($P>0.05$). The study indicated that the overexpression of *Lumican* gene could promote the metastasis of lung adenocarcinoma cell A549 *in vitro*, and its mechanism might be related to the increased expression of the RhoC protein.

Key words Lumican; lung adenocarcinoma; metastasis; RhoC

富含亮氨酸低分子蛋白聚糖(the small leucine-rich proteoglycan, SLRP)为细胞外基质蛋白多糖的一个亚型,是目前公认的参与多种细胞间活动的信号分子。*Lumican*基因定位于染色体12q21.3-q22区,由3个外显子和2个内含子组成,全长6.9 Kb,其编码的蛋白由338个氨基酸组成,是SLRP家族中重要的成员之一,最早在牛角膜基质中被发现,近来发现其不仅表达于椎间盘、皮肤、肺、肝脏、骨骼肌等多种组织中,而且在乳腺癌、结肠癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤中表达异常,并在肿瘤的发生、侵袭、迁移中起重要作用,但其中的机制尚不清楚^[1-2]。Radwanska等^[3]发现,过表达*Lumican*基因可以通过上调凝溶胶蛋白和重组丝状肌动蛋白而促进结肠癌细胞的侵袭、迁移能力,并发现其发挥的作用与组织特异性及定位有关;Yoshioka等^[4]发现,*Lumican*基因在肺癌细胞中有表达,并且其表达水平可能与肿瘤的发展有关,有望成为肺癌的治疗靶点。然而,*Lumican*基因对肺癌细胞转移的影响尚未见报道。本研究旨在建立稳定过表达*Lumican*基因的肺腺癌A549细胞株,观察其转移的变化,探讨*Lumican*基因对A549细胞转移的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 人肺腺癌细胞株A549(中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(重医大附一院神经病学重点实验室);携带人*Lumican*基因的重组慢病毒A549细胞株和空载体慢病毒A549细胞株均由上海生博医学生物工程有限公司提供(FQ-PCR、Western blot法检测*Lumican* mRNA和蛋白的表达结果:前者分别是后者的970.72倍和934.37倍)(货号S2053-B);BALB/c裸鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司)。

1.1.2 主要试剂 Matrigel基质胶(BD公司);山羊抗人RhoC多克隆抗体、兔抗人p-Akt、MMP-2、VEGF多克隆抗体(Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的小鼠抗山羊及抗兔IgG(Sigma公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 细胞用含10%胎牛血清(美国Gibco公司)的RPMI-1640培养基(美国Gibco公司)置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

1.2.2 裸鼠饲养 裸鼠(雌性,4~6周龄,18±2 g)4只,委托第三军医大学第一附属医院动物实验室SPF级饲养。

1.2.3 实验分组 本实验设3组:实验组(携带目的基因的重组慢病毒A549细胞组)、空载体组(携带空载体慢病毒A549细胞组)及对照组(A549细胞组)。

1.2.4 Transwell小室检测细胞侵袭及迁移力 侵袭实验:将Matrigel胶用无血清培养基(1:3)稀释后取40 μL铺在上室,紫外线照射过夜,实验前水化基底膜,取3组细胞2×10⁵/400 μL加入上室,下室加10%胎牛血清培养液600 μL,常规培养24 h,棉签擦去上室内细胞,4%多聚甲醛固定,瑞氏染色、切膜、封片、摄像,计数5个视野平均穿膜细胞数。迁移实验:上室内不铺胶,18 h终止实验,余操作同前,实验重复3次。

1.2.5 黏附实验 取对数生长期A549、HUVEC细胞,消化、计数,制成2×10⁵/mL细胞悬液,取A549细胞(100 μL/孔)接种于96孔板内除第1, 7, 12列的A-D排孔内,取同量HUVEC细胞接种于96孔板内上述各列的E-H排孔内,培养过夜;次日调整空载体组、实验组细胞浓度为3×10⁵/mL,空载体组细胞(100 μL/孔)加至96孔板第3至7列A-H孔内,实验组细胞加入第8至12列A-H孔内,每隔30 min吸出3、8列,4、9列,5、10列,6、11列所有孔上清液;120 min后离心,吸出2, 7, 12列所有孔内上清液;均用PBS液洗2次,加100 μL/孔无血清培养基;除D、E排外的所有孔内加

MTT(10 μ L/孔), 4 h后去上清液加DMSO(150 μ L/孔), 即在570 nm波长处比色; 计算同(异)种黏附率=[同(异)种各时间段 D 值-同(异)种空白组 D 值]/空载体组或实验组 D 值, 并随机在荧光显微镜下各取5个(200 $\times$)视野观察记录D、E排各孔荧光细胞数。

1.2.6 血管形成与血管拟态实验 将Matrigel胶用无血清培养基稀释(1:9)后种于96孔板(40 μ L/孔、各组3个平行孔), 取HUVEC细胞及上述3组细胞, 制成 2×10^4 /mL细胞悬液, 均取100 μ L细胞加入96孔板, HUVEC细胞内分别加入备好的上述三组细胞上清液(均为培养三天) 100 μ L; 三组细胞内再加100 μ L无血清培养基。血管形成培养3天, 血管拟态培养5天, 摄像并随机选取5处视野(100 $\times$)记录管腔形成数(以细胞连接呈C形即算一个管腔)。

1.2.7 A549皮下荷瘤 取对数生长期实验组及空载体组细胞, 调整细胞浓度 5×10^7 /mL, 取100 μ L细胞悬液接种4只裸鼠背部左、右侧皮下。1个月处死裸鼠, 剥离瘤体行HE染色、摄像, 随机记录5个视野(200 $\times$)下血管数。

1.2.8 Western blot检测RhoC、p-Akt、MMP-2及VEGF蛋白表达 分别收集3组对数生长期的细胞, 加RIPA裂解液, 冰浴下超声破碎15 s, 低温离心, 上清冷冻干燥24 h, 含蛋白酶抑制剂PBS 150 μ L稀释蛋白沉淀, 考马斯亮蓝法定量, 取相同含量的总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳, 然后电转、封闭, 4 $^{\circ}$ C过夜, 一抗(RhoC、p-Akt、MMP-2、VEGF和 β -actin, 工作浓度: 前四者均为1:200, β -actin为1:2 000), 辣根过氧化物酶标记的二抗(工作浓度1:2 500), 洗膜、孵育、暗盒内曝光、显影、定影, 使用凝胶扫描分析软件系统(LabworksTM Analysis Software, USA)测定目的蛋白和 β -actin条带的光密度值, 二者比值即为目的表达水平, 实验重复4次。

1.3 统计学分析

应用SPSS 19.0 for Windows统计学软件, 两组之间的比较采用 t 检验, 用Spearman等级相关进行相关性分析, 多组之间比较采用方差分析。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Transwell小室检测细胞侵袭、迁移力

在侵袭、迁移实验中, 实验组穿膜细胞数明显多于对照组和空载体组($P<0.05$), 而对照组与空载体组间无统计学差异($P>0.05$, 表1、图1和图2)。

2.3 黏附实验

在同种细胞黏附试验中, 荧光显微镜下显示带荧光细胞数: 实验组为(14.80 $\pm$ 1.48)、空载体组为(34.20 $\pm$ 1.30); 而异种细胞间: 实验组为(69.40 $\pm$ 1.16)、空载体组为(44.60 $\pm$ 1.67)。并且发现各时段细胞间黏附率: 与空载体组相比, 实验组细胞同种细胞间黏附率减弱($P<0.05$), 异种间黏附率增强($P<0.05$, 表2、图3和图4)。

2.4 血管形成与血管拟态实验

实验组血管形成数和血管拟态数均明显多于对照组和空载体组($P<0.05$), 而实验组与空载体组间无统计学差异($P>0.05$, 表3、图5和图6)。

2.5 A549皮下荷瘤观察体内血管拟态的形成

皮下接种空载体组及实验组细胞成瘤率达100%。记录两组瘤体内血管拟态数分别为空载体组(2.40 $\pm$ 1.14), 实验组(11.20 $\pm$ 1.92)($P<0.05$, 图7)。

2.6 Western blot检测RhoC、p-Akt、MMP-2及VEGF蛋白表达

Western blot结果显示, 这四种蛋白表达量实验组均高于其余两组($P<0.05$), 且这四种蛋白两两之间显著正相关($P<0.05$), 对照组和空载体组无明显差异($P>0.05$, 表4、图8)。

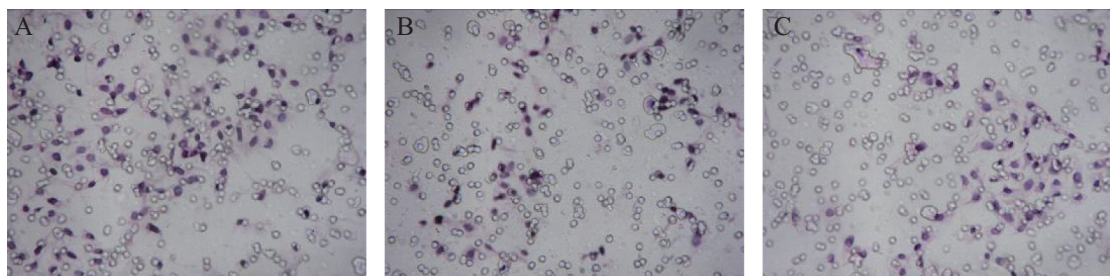
表1 三组细胞侵袭、迁移力测定

Table 1 Three groups of cell invasion and migration determination

组别 Groups	侵袭实验($\bar{x}\pm s$) The invasion test ($\bar{x}\pm s$)	迁移实验($\bar{x}\pm s$) The migration test ($\bar{x}\pm s$)
The control group	53.67 $\pm$ 4.51	49.33 $\pm$ 8.33
The empty vector group	58.33 $\pm$ 3.21 ^a	42.67 $\pm$ 5.86 ^a
The experimental group	123.33 $\pm$ 4.04 ^b	97.67 $\pm$ 6.51 ^b

^a $P>0.05$, 空载体组与对照组无明显差异; ^b $P<0.05$, 实验组与其余两组之间有统计学差异。

^a $P>0.05$, there were no statistical differences between the empty vector group and the control group; ^b $P<0.05$, there were statistical differences among the experimental group and the other two groups.

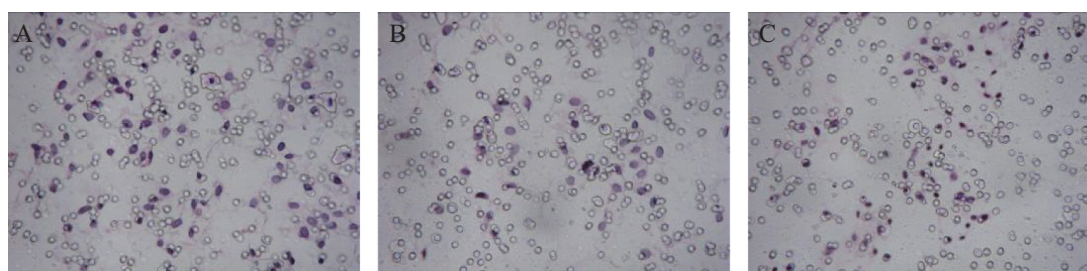


A: 实验组; B: 空载体组; C: 对照组。

A: the experimental group; B: the empty vector group; C: the control group.

图1 三组细胞侵袭力比较(200×)

Fig.1 Comparison of the invasion force in the three groups of cells (200×)



A: 实验组; B: 空载体组; C: 对照组。

A: the experimental group; B: the empty vector group; C: the control group.

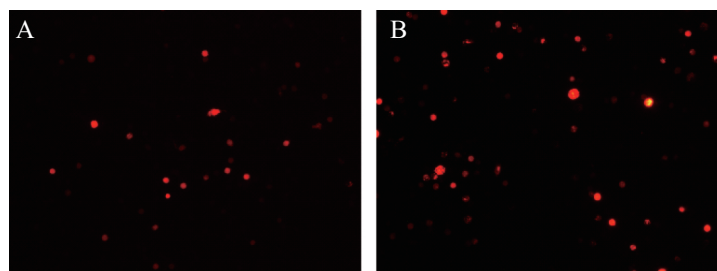
图2 三组细胞迁移力比较(200×)

Fig.2 Comparison of the migration force in the three groups of cells (200×)

表2 同种及异种细胞间黏附率的比较

Table 2 Comparison of the homogeneous and heterogeneous cells intercellular adhesion

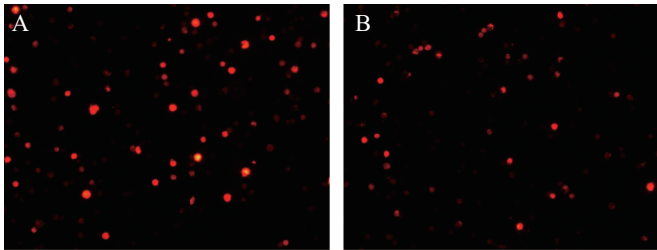
组别 Groups		黏附率 Adhesion rate			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Homogeneous	The empty vector group	0.048 9±0.077	0.093 2±0.360	0.144 6±0.074	0.163 6±0.082
	The experimental group	0.025 0±0.127 ^a	0.046 4±0.088 ^a	0.072 3±0.104 ^a	0.090 7±0.152 ^a
Heterogeneous	The empty vector group	0.345 4±0.091	0.402 3±0.150	0.431 2±0.794	0.438 4±0.214
	The experimental group	0.389 5±0.154 ^a	0.527 7±0.126 ^a	0.749 9±0.016 ^a	0.854 2±0.034 ^a

^a $P < 0.05$, 实验组与空载体组之间有统计学差异。^a $P > 0.05$, there were statistical differences between the experimental group and the empty vector group.

A: 实验组; B: 空载体组。

A: the experimental group; B: the empty vector group.

图3 *Lumican*基因对同种细胞间黏附力的影响(200×, 1 h)Fig.3 The effect of *Lumican* gene on the homogeneous cells intercellular adhesion (200×, 1 h)



A: 实验组; B: 空载体组。
A: the experimental group; B: the empty vector group.

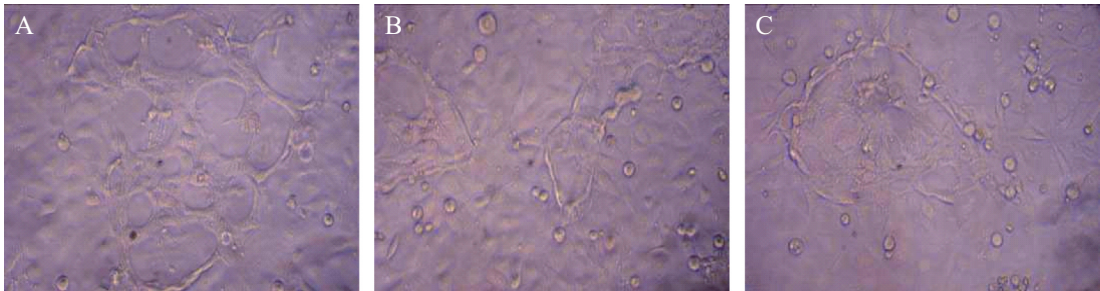
图4 *Lumican*基因对异种细胞间黏附力的影响(200×, 1 h)

Fig.4 The effect of *Lumican* gene on the heterogeneous cells intercellular adhesion (200×, 1 h)

表3 各组间血管形成与血管拟态比较
Table 3 Comparision of the angiogenesis and vascular mimicry among each group

组别 Groups	血管形成 Angiogenesis	血管拟态 Vascular mimicry
The control group	4.67±1.53	7.33±1.15
The empty vector group	4.33±0.58 ^a	7.67±1.53 ^a
The experimental group	15.33±1.53 ^b	21.67±2.52 ^b

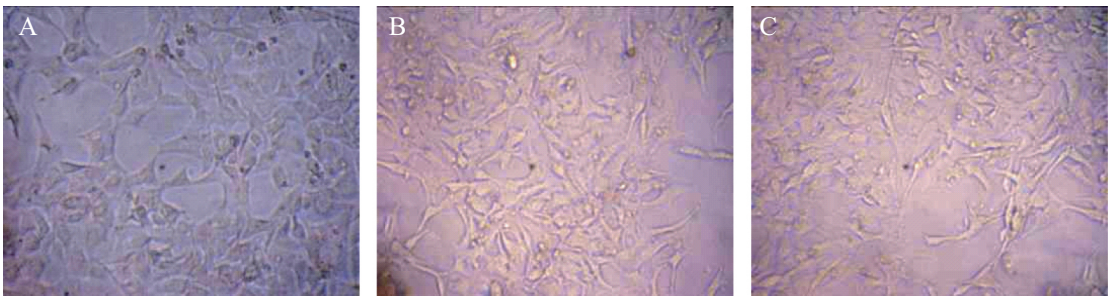
^a*P*>0.05, 空载体组与对照组无明显差异; ^b*P*<0.05, 实验组与其余两组之间有统计学差异。
^a*P*>0.05, there were no statistical differences between the empty vector group and the control group; ^b*P*<0.05, there were statistical differences among the experimental group and the other two groups.



A: 实验组; B: 空载体组; C: 对照组。
A: the experimental group; B: the empty vector group; C: the control group.

图5 三组细胞血管形成图(100×)

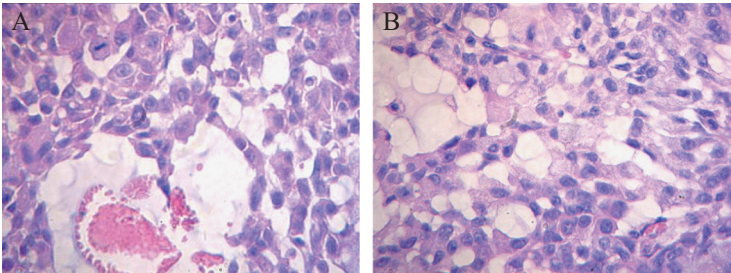
Fig.5 The angiogenesis of three groups (100×)



A: 实验组; B: 空载体组; C: 对照组。
A: the experimental group; B: the empty vector group; C: the control group.

图6 三组细胞血管拟态图(100×)

Fig.6 The vascular mimicry of three groups (100×)



A: 实验组; B: 空载体组。
A: the experimental group; B: the empty vector group.

图7 裸鼠皮下瘤HE染色比较(200×)

Fig.7 The HE staining of the nude mouse subcutaneous tumor (200×)

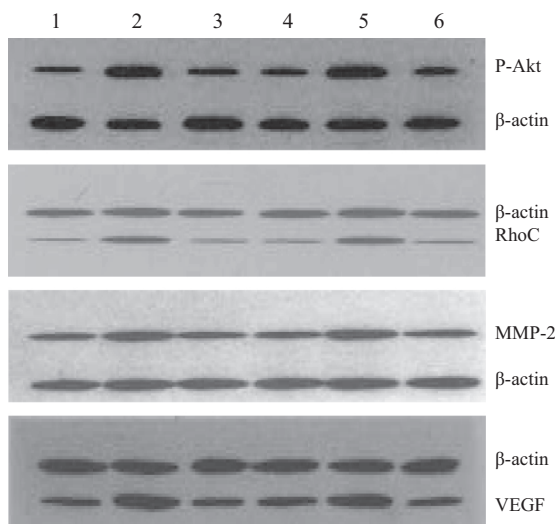
表4 四种蛋白在各组间表达的比较

Table 4 Comparison of the protein expression among each group

蛋白质 Proteins	对照组 The control group	空载体组 The empty vector group	实验组 The experimental group	相关系数(r) Relativity index (r)
RhoC	0.201 8±0.034 2	0.262 0±0.023 9 ^a	0.717 8±0.015 9 ^b	0.728
p-Akt	0.489 7±0.116 3	0.500 1±0.013 3 ^a	1.144 0±0.082 3 ^b	0.847
MMP-2	0.587 1±0.054 4	0.559 3±0.033 5 ^a	0.987 0±0.051 8 ^b	0.997
VEGF	0.506 5±0.022 5	0.511 4±0.244 5 ^a	1.035 9±0.034 3 ^b	

^a $P>0.05$, 空载体组与对照组无明显差异; ^b $P<0.05$, 实验组与其余两组之间有统计学差异。

^a $P>0.05$, there were no statistical differences between the empty vector group and the control group; ^b $P<0.05$, there were statistical differences among the experimental group and the other two groups.



1,4: 对照组; 2,5: 实验组; 3,6: 空载体组。

1,4: the control group; 2,5: the experimental group; 3,6: the empty vector group.

图8 Western blot法检测四种蛋白在各组的表达

Fig.8 The expression of proteins among each group by Western blot

3 讨论

SLRP家族由细胞外基质的胶原纤维组成, 除在组织水化和胶原纤维形成方面发挥细胞外基质的作用外, 还在肿瘤生长、黏附和迁移等方面发挥重要作用^[1]。Lumican基因位于人12号染色体远端, 是SLRP家族中的重要成员之一^[5], 越来越多的资料显示其可能在肺癌的发生、发展中起到重要作用^[4]。这与我们前期对人非小细胞肺癌淋巴转移的分子指纹鉴定研究结果^[6]相符。

目前, 国内外对Lumican基因的研究认为其在大部分肿瘤间质中的表达高于肿瘤细胞, 并作为细胞外基质中一种重要的细胞间信号分子参与众多细胞生物学过程, 主要通过影响细胞外基质的形成或抑癌基因的表达而对肿瘤的发生和发展起负向调节作用^[7-8]; 但也有发现其在部分肿瘤中高表达, 与肿瘤的生长与

侵袭成正相关, 其具体机制仍存在争议。Ishiwata等^[9]发现, 胰腺癌组织中Lumican过表达与肿瘤不良分期、后腹膜及十二指肠侵犯等因素成正相关; 宋洪江等^[10]应用组织芯片技术检测Lumican基因在大肠癌中的表达率显著高于癌旁正常黏膜, 且其表达强度与大肠癌浸润程度成正相关, 与患者生存率成明显负相关; Matsuda等^[11]通过免疫组化法在对肺腺癌组织病理切片的研究中发现, Lumican基因在肺癌细胞中表达低于间质细胞中的表达, 且Lumican基因在肺癌细胞中表达的增高与胸膜侵袭和肿瘤的大小呈正相关。以上均提示Lumican基因在肿瘤转移中的作用可能存在细胞特异性, 值得进一步探讨。为此, 我们在前期实验的基础上进一步研究Lumican基因过表达对人肺腺癌细胞A549体内转移的影响, 并初步探讨其可能机理。

肿瘤转移表现为细胞脱落、细胞迁移、降解细胞外基质、新生血管形成等级联反应, 而肿瘤血管拟态是近年来提出的一种新的肿瘤血管生成模式, 其在肿瘤生长、侵袭、转移中的作用越来越受到重视。本实验以携带人Lumican基因的重组慢病毒感染人肺腺癌细胞A549细胞, 用Puromycin筛选法建立稳定细胞株, 通过Transwell小室、黏附实验、血管形成及动物实验检测Lumican基因对A549细胞转移的影响。结果显示, 与空载体组和(或)对照组比较, 实验组细胞侵袭、迁移能力增加; 同种细胞间黏附力减弱, 而异种细胞间黏附力增强, 这提示实验组肿瘤细胞之间更容易相互脱落且更易与异种组织黏附而形成远处转移灶; 血管形成及血管拟态能力增强, 皮下瘤血管拟态增加。以上各结果数据表明, Lumican基因能促进人肺腺癌A549细胞的细胞脱落能力、细胞迁移力及肿瘤新生血管的能力, 最终增强其肿瘤转移能力。此结论与我们前期研究及Matsuda等^[11]的研究结果相符。

RhoC基因是Rho基因家族重要一员, 具有GTP酶

活性, 其与肿瘤的侵袭、迁移及转移表型的获得密切相关, 被认为是肿瘤转移的分子开关。其在肺癌组织中的表达水平与肺癌TNM分期及淋巴结转移密切相关, 越来越多的资料表明RhoC在肺癌的转移过程中起关键性作用^[12-13]。p-Akt是功能状态下的Akt蛋白, 是PI3K/Akt信号通路中关键的信号分子, 可激活Wnt通路, 促进肿瘤细胞增殖及转移。有研究表明, 其在非小细胞肺癌中持续活化, 且表达量增高^[14]。VEGF是目前发现的最重要的血管刺激因子, 众多研究表明其在肺癌中的表达明显高于正常组织, 并对肺癌的侵袭与迁移起着关键性作用。MMP-2是肿瘤细胞分泌的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)中降解IV型胶原最主要的酶。有资料显示其在肿瘤的血管化、肿瘤细胞的浸润和转移灶的形成过程中均起重要作用, 其表达率与肺癌TNM分期及转移密切相关^[15]。多项研究表明, RhoC基因过表达可以提高血管生成因子(VEGF)的水平, 依次激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷脂酶C(PLC)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)等信号转导途径, 进而使MMP-2的前体物质(pro-MMP-2)转换成MMP-2, 还明显上调激活状态的MMP-2, 而MMP-2可以促使肿瘤血管拟态的形成, 促进肿瘤的转移^[16-17]。同时, 现代观点认为, 在促进肿瘤的转移过程中VEGF与MMP-2之间存在着相互协同、相互促进的内在关系。这些与本实验中实验组的Western blot检测四种蛋白的表达均增加且呈正相关的结果相符。由此推测, RhoC可能通过提高VEGF的表达水平, 进而依次激活MAPK、PLC、PI3K/Akt等信号转导途径, 最终使MMP-2表达增加, 而MMP-2又可促进VEGF的表达, 四者协同参与人肺腺癌A549细胞的转移。因此, Lumican基因过表达引起RhoC、p-Akt、MMP-2及VEGF蛋白表达的增加可能是肺腺癌细胞A549转移的重要机制, 但是Lumican基因通过什么途径引起RhoC蛋白的增加还需进一步深入研究。

参考文献 (References)

- Moseley R, Stewart JE, Stephens P, Waddington RJ, Thomas DW. Extra cellular matrix metabolites as potential biomarkers of disease activity in wound fluid lessons learned from other inflammatory diseases. *Br J Dermatol* 2004; 150(3): 401-13.
- Nikitovic D, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. Lumican, a small leucine-rich proteoglycan. *IUBMB Life* 2008; 60(12): 818-23.
- Radwanska A, Litwin M, Nowak D, Baczynska D, Wegrowski Y, Maquart FX, *et al.* Overexpression of lumican affects the migration of human colon cancer cells through up-regulation of gelsolin and filamentous actin reorganization. *Exp Cell Res* 2012; 318(18): 2312-23.
- Yoshioka N, Inoue H, Nakanishi K, Oka K, Yutsudo M, Yamashita A, *et al.* Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: Lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras. *J Virol* 2000; 74(2): 1008-13.
- Chakravarti S, Stallings RL, SundarRaj N, Cornuet PK, Hassell JR. Primary structure of human lumican (keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21.3-q22. *Genomics* 1995; 27(3): 481-8.
- 葛明建, 王 梅, 吴庆琛, 秦治明, 陈 力, 李良彬. 肺腺癌患者淋巴转移的分子指纹鉴定. 癌症(Ge Mingjian, Wang Mei, Wu Qingchen, Qin Zhiming, Chen Li, Li Liangbin. Gene expression signature for lymphatic metastasis of human lung adenocarcinoma. *Chinese Journal of Cancer*) 2009; 28(3): 262-7.
- Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Proteoglycans in health and disease: Novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J* 2010; 277(19): 3904-23.
- Nikitovic D, Berdiaki A, Zafiroopoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, *et al.* Lumican expression is positively correlated with the differentiation and negatively with the growth of human osteosarcoma cells. *FEBS J* 2008; 275(2): 350-61.
- Ishiwata T, Cho K, Kawahara K, Yamamoto T, Fujiwara Y, Uchida E, *et al.* Role of lumican in cancer cells and adjacent stromal tissues in human pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2007; 18(3): 537-43.
- 宋洪江, 蓝秀文, 魏玉哲, 佟丹丹, 金银姬, 董新舒. Lumican基因在大肠癌中的表达及其预后的关系. 国际遗传学杂志(Song Hongjiang, Lan Xiuwen, Wei Yuzhe, Tong Dandan, Jin Yinji, Dong Xinshu. Lumican expression and its relationship with biological behavior and prognosis in colorectal cancer. *International Journal of Genetics*) 2010; 33(5): 268-71.
- Matsuda Y, Yamamoto T, Kudo M, Kawahara K, Kawamoto M, Nakajima Y, *et al.* Expression and roles of lumican in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2008; 33(6): 1177-85.
- Pan Q, Bao LW, Teknos TN, Merajver SD. Targeted disruption of protein kinase Cepsilon reduces cell invasion and motility through inactivation of RhoA and RhoC GTPases in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66(19): 9379-84.
- Liu D, Xu Y, Guan Z, Duan H, Wang E, Han Y. Expression of RhoC and its regulators RhoGDIbeta RhoGDIgamma and their clinical importance in lung squamous cell cancer and adenocarcinoma. *Chin J Lung Cancer* 2008; 11(4): 538-41.
- Lee SH, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee KY, Kim SH, *et al.* Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated AKT; An immunohistochemical study. *APMIS* 2002; 110(7/8): 587-92.
- 赵仲升, 张 梅, 茹国庆. MMP-2和MMP-9在非小细胞肺癌中的表达及预后意义. 中国肺癌杂志(Zhao zhongsheng, Zhang Mei, Ru Guoqing, Expression of MMP-2 and MMP-9 in non-small-cell lung cancer and their prognostic value. *Chinese Journal of Lung Cancer*) 2000; 3(2): 107-10.
- Kong SY, Park JW, Lee JA, Park JE, Park KW, Hong EK, *et al.* Association between vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and survival in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology* 2007; 46(2): 446-55.
- Wang W, Yang LY, Huang GW, Lu WQ, Yang ZL, Yang JQ, *et al.* Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis. *Br J Cancer* 2004; 90(12): 2349-55.