

研究论文

rhddADAM15抑制肝癌细胞Bel-7402增殖的作用研究

侯颖 储敏 王晓敏 陈蕴 金坚*

(江南大学药学院, 药物设计与分子药理实验室, 无锡 214122)

摘要 ADAM15属于跨膜蛋白ADAM家族中的一员, 在乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌等多种实体瘤中均发现其表达量提高。ADAM15在降解细胞外基质、介导细胞的黏附、细胞间信号转导及在肿瘤发展进程中起到重要作用。因其去整合素区域含有RGD序列, ADAM15可与多种整合素相互作用。在前期工作中, 实验组利用大肠杆菌表达系统表达了重组人ADAM15去整合素区域蛋白, 记作rhddADAM15。该研究将进一步针对rhddADAM15抑制肝癌细胞Bel-7402增殖的机理进行分析及探讨。SRB法显示, rhddADAM15可抑制Bel-7402细胞增殖并呈剂量依赖性, IC_{50} 为1.14 $\mu\text{mol/L}$; 利用DAPI核染发现, rhddADAM15可显著诱导Bel-7402细胞凋亡; 流式细胞仪分析发现, rhddADAM15浓度为6 $\mu\text{mol/L}$ 时, (87.44 \pm 7.25)%的细胞发生凋亡; PI单染分析细胞周期表明, rhddADAM15作用后, 部分Bel-7402细胞周期被阻滞于S期及G₂/M期, 并呈剂量依赖性, 4 $\mu\text{mol/L}$ rhddADAM15处理后G₀/G₁期含量下降约14%; Western blot分析显示, rhddADAM15可下调Bel-7402细胞周期蛋白CDC2的表达, 抑制CDC2-Tyr¹⁵的去磷酸化, 引起G₂/M期的阻滞。

关键词 ADAM15; 去整合素; 凋亡; CDC2

Effect and Mechanism of rhddADAM15 on the Proliferation of Bel-7402 Cells

Hou Ying, Chu Min, Wang Xiaomin, Chen Yun, Jin Jian*

(Lab of Drug Design and Molecular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract ADAM15, a member of transmembrane proteins ADAMs, is over-expressed in many solid tumors such as breast, colorectal and ovarian cancer, playing important roles in the degradation of extracellular matrix, cell adhesion, intracellular signal transduction and pathological changes in tumors. Because of the RGD motif in its disintegrin domain, ADAM15 is considered to interact with integrins multifariously. We have established the recombinant human disintegrin domain of ADAM15 (rhddADAM15) by *E.coli* in our previous research. This study aimed at assessing the effect and mechanism of rhddADAM15 on the proliferation of Bel-7402 cells. rhddADAM15 inhibited the proliferation of Bel-7402 with an IC_{50} of 1.14 $\mu\text{mol/L}$ by SRB assay. Bel-7402 cells had apoptotic morphological nucleus changes using DAPI staining, and (87.44 \pm 7.25)% of Bel-7402 cells showed apoptotic features when treated with 6 $\mu\text{mol/L}$ rhddADAM15 analyzed by PI staining. Moreover, partial S and G₂/M arrests were observed on Bel-7402 cells. When treated with rhddADAM15 at the concentration of 4 $\mu\text{mol/L}$, the G₀/G₁ phase of Bel-7402 cells reduced by 14%. The level of CDC2 was down-regulated and the phosphorylation of CDC-Tyr¹⁵ was increased which aroused the G₂/M arrest.

Key words ADAM15; disintegrin; apoptosis; CDC2

收稿日期: 2013-12-18

接受日期: 2014-02-14

*通讯作者。Tel/Fax: 0510-85918219, Email: jinjian31@126.com

Received: December 18, 2013 Accepted: February 14, 2014

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918219, Email: jinjian31@126.com

网络出版时间: 2014-04-01 14:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.04.0421.html>

去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^[1], 自1990年发现第一个家族成员以来^[2], 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、黏附及信号转导等生物功能^[3]。在病理学中, ADAM家族蛋白亦参与了炎症和肿瘤的发生发展。

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^[4-5]。另外, 因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, 因此有希望作为临床肿瘤诊断的标志物及药物设计的靶点。

本实验室利用大肠杆菌表达了重组人ADAM15的去整合素区域蛋白^[6], 记做rhddADAM15(recombinant human disintegrin domain of ADAM15), 并对乳腺癌、黑色素瘤、胃癌、肝癌等8株实体瘤细胞的体外增殖及迁移进行评价, 发现rhddADAM15可抑制这些肿瘤细胞的增殖及迁移, 说明其具有广谱的抗肿瘤细胞增殖活性。肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 目前我国发病人数约占全球的半数以上, 致死率极高, 严重危害病人的健康和生命。因此, 我们选取了对rhddADAM15最为敏感的肝癌细胞Bel-7402作为进一步研究的细胞模型, 初步探索rhddADAM15抑制肿瘤细胞增殖的机理。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与主要试剂

Bel-7402细胞株购自中国科学院上海细胞库; RPMI-1640基础培养基、小牛血清及青霉素-链霉素购自Gibco公司; 含EDTA的胰蛋白酶购自碧云天生物技术有限公司。培养Bel-7402细胞所用的培养基为含10%小牛血清的RPMI-1640培养基, 培养条件为37℃、5% CO₂的培养箱。

rhddADAM15由江南大学药物设计与分子药理实验室制备^[6]; 磺酰罗丹明B(SRB)购自Sigma公司; 碘

化吡啶(PI)购自碧云天生物技术有限公司; 细胞周期试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司; 鼠源抗CDC-2单抗、兔源抗CDC2(Tyr¹⁵)磷酸化单抗均购自Cell signaling公司; 鼠源抗β-Actin单抗、羊抗鼠和羊抗兔IgG-HRP标记二抗购自碧云天生物技术有限公司; 96孔板购自Corning公司; 玻底培养皿购自Nest公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SRB法检测rhddADAM15对Bel-7402细胞的增殖影响 细胞生长至汇合度为80%~90%后, 将细胞消化计数, 用含10%小牛血清的培养基稀释至(6~8)×10⁷/L, 每孔100 μL铺于96孔板。培养24 h后, 移去培养基, 将含有不同浓度的rhddADAM15的细胞培养液加至96孔板。设置培养基作为阴性对照, 空白孔为空白对照, rhddADAM15组每个浓度设置3个复孔。继续培养24 h后, 弃去培养基, 每孔加入100 μL的10% TCA溶液, 置于4℃固定40~60 min后, 弃去固定液, 用含1%醋酸的超纯水洗板2次, 在空气中干燥后每孔加入100 μL的0.4% SRB溶液, 于37℃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。计算公式为: 增殖抑制率(%)=(阴性对照吸光值-加药组吸光值)/(阴性对照吸光值-空白对照吸光值)×100%, 绘制细胞在不同浓度下的增殖抑制曲线, 计算IC₅₀。

1.2.2 PI单染法检测rhddADAM15对Bel-7402凋亡坏死的诱导 细胞生长至汇合度为80%~90%后, 消化计数并铺于6孔板, 每孔(3~4)×10⁵。培养24 h后弃去培养基, 加入含终浓度分别为0, 2, 4, 6 μmol/L rhddADAM15的新鲜培养基继续培养24 h, 收集各个孔的悬浮及贴壁的所有细胞, 用PBS洗涤2次并重悬, 调整细胞浓度为(1~3)×10⁵/mL, 加入PI使其终浓度为10 μg/mL, 置于4℃避光染色20 min后流式细胞仪检测, 利用FlowJo 7.6软件进行数据分析。以上步骤离心速度均为800~1 000 r/min, 6孔板内培养液体积为2 mL。

1.2.3 DAPI染色法检测rhddADAM15作用后Bel-7402细胞核变化 细胞生长至汇合度为80%~90%后, 消化计数, 以(2~4)×10⁴/孔接种于玻底24孔板, 加培养基至1 mL, 置于培养箱中培养过夜。当细胞长至聚合度为40%~60%时, 加入适当浓度的rhddADAM15, 继续培养24 h, 弃去培养液, 用PBS轻轻洗涤2次后, 加

入500 μL 预冷的70%乙醇于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定2 h, 弃去固定液, PBS轻轻洗涤2次, 加入终浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DAPI于37 $^{\circ}\text{C}$ 染色10 min, 用荧光显微镜观察染色结果。

1.2.4 PI单染法检测rhddADAM15对Bel-7402细胞周期的影响 细胞生长至汇合度为80%~90%后, 消化计数并铺于6孔板, 每孔 $(3\sim4)\times 10^5$ 。培养24 h后弃培养基, 加入含终浓度分别为0, 1, 2, 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ rhddADAM15的新鲜培养基继续培养24 h, 弃上清, PBS洗涤、胰蛋白酶消化后收集细胞, 再用PBS洗涤2次, 用70%的冷的乙醇固定2 h至过夜, 离心洗去固定液, 经PBS清洗后收集细胞, 加入50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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。利用Modfit进行数据分析。以上步骤离心速度均为800~1 000 r/min, 6孔板内培养液体积为2 mL。

1.2.5 免疫印迹实验 细胞生长至汇合度为80%~90%后, 消化计数后铺于6孔板, 每孔 $(3\sim4)\times 10^5$ 。培养24 h后弃去培养基, 加入含终浓度分别为0, 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ rhddADAM15的新鲜培养基后继续培养6 h, 弃上清, 胰蛋白酶消化后收集细胞, 再用PBS洗涤2次, 收集细胞。经RIPA裂解液裂解后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V、1 h进行转膜。转膜结束后, 用含5%脱脂奶粉的TBST溶液(0.3% Tris、0.8% NaCl、0.1% Tween-20, pH7.4)封闭1 h, 鼠源抗CDC2单克隆抗体、兔源CDC2(Tyr¹⁵)磷酸化单克隆抗体及鼠源抗 β -actin单克隆抗体均稀释1 000倍, 于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h或者4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 回收各个一抗, 用TBST洗涤NC膜3~4次, 每次10 min, 加入HRP标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗(均稀释1 000倍), 于室温孵育1~2 h。TBST洗涤3~4次, 利用ECL化学发光显色。显色后拍照, 利用Image J软件对各个条带进行灰度及条带面积扫描, 计算CDC2及CDC2(Tyr¹⁵)磷酸化抗体所杂交出来的条带灰度与面积的乘积与相应的 β -Actin的条带的比值。

1.2.6 数据处理方法 数据以均值 \pm 标准差的方式表示, 每组数据均通过3次独立实验后统计获得。统计学差异用Student *t*检验确定, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 rhddADAM15抑制肝癌细胞Bel-7402的增殖

rhddADAM15可抑制肝癌细胞Bel-7402的增殖

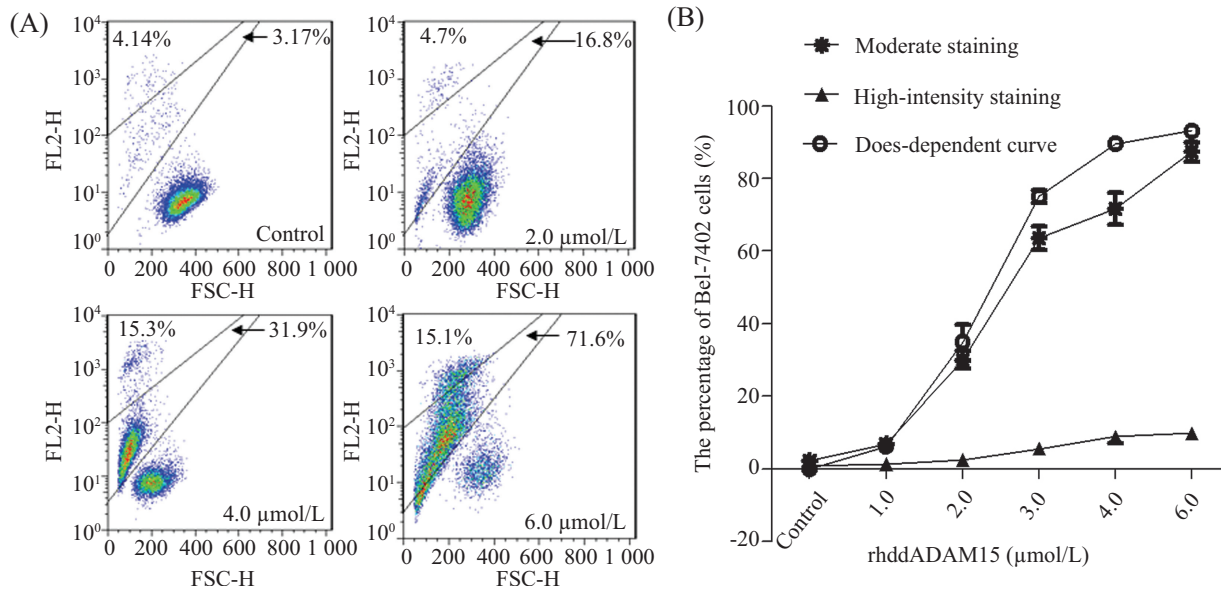
并在低于6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时呈剂量依赖关系, 利用SRB法测得rhddADAM15抑制Bel-7402增殖的量效曲线如图1B所示, 图中control为阴性对照, 即不加rhddADAM15组, 经计算 IC_{50} 为1.14 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (图1B中dose-dependent curve)。收集不同浓度rhddADAM15作用后的全部细胞进行PI染色, 结果显示, rhddADAM15作用后, 部分细胞的前散射光(forward scatter, FSC)变小, PI染色的荧光强度(FL2-H)提高, 表明细胞固缩变小, 细胞膜通透性改变使其对核染料PI的摄取能力提高(图1A)。这一特性往往被认为是凋亡细胞的特点之一。在图1A中从上到下, Bel-7402细胞可以分为三群, 分别为PI高染、PI中染及PI低染。正常细胞为PI低染, 中晚期凋亡为中染, 凋亡末期细胞膜结构被破坏, PI摄取能力最强为高染。图1B中统计结果显示, 随着rhddADAM15的作用浓度增加, PI高染及中染的细胞都增加, 即说明Bel-7402细胞的凋亡率增加。当rhddADAM15浓度达到6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, $(87.44\pm 7.25)\%$ 的细胞发生凋亡。

2.2 rhddADAM15诱导肝癌细胞Bel-7402凋亡的核染色

rhddADAM15作用于Bel-7402细胞24 h后, 利用DAPI染色, 对细胞核的形态变化进行观察, 结果如图2所示。未经rhddADAM15处理的对照组细胞(图2A), 细胞核均一完整, 呈椭圆形, 对DAPI的摄取不强, 呈弱蓝色; 与对照组相比, 加药组的细胞体积缩小, 细胞核固缩、碎裂, 可被DAPI深染, 荧光强度远高于对照组的细胞核, 部分细胞核形态呈花瓣状, 为细胞凋亡的典型形态改变。每组随机选取三个视野, 对凋亡细胞占总细胞率的统计结果如图2D所示, 随着rhddADAM15浓度升高, Bel-7402的凋亡率上升, 当rhddADAM15浓度为6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 凋亡诱导率为 $(75.04\pm 8.00)\%$ 。

2.3 rhddADAM15对Bel-7402细胞周期的影响

PI单染法分析细胞周期结果显示, 经rhddADAM15处理后(图3B~图3D), Bel-7402细胞 G_0/G_1 期含量下降, S/G_2 期含量上升, 且成剂量依赖性。经4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ rhddADAM15处理后, 与阴性对照组相比, G_0/G_1 期含量下降 $(13.78\pm 5.38)\%$, S期上升 $(6.46\pm 5.36)\%$, G_2 期上升 $(7.36\pm 3.18)\%$ 。此外, 如图3C和图3D所示, 随着rhddADAM15剂量的升高, 在 G_0/G_1 峰前出现了亚 G_1 峰。亚 G_1 峰的出现也说明了rhddADAM15可诱导Bel-7402细胞的凋亡。

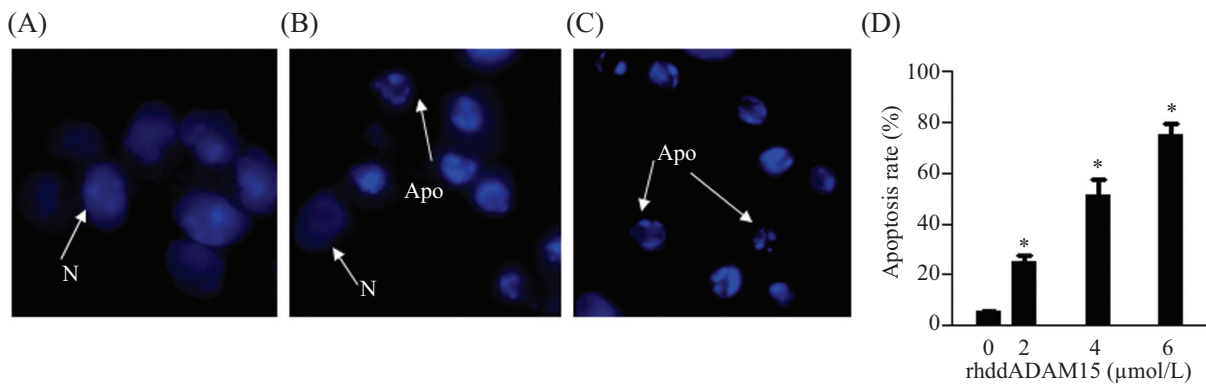


A: 不同浓度rhddADAM15作用后Bel-7402细胞的PI染色流式分析结果; B: rhddADAM15作用后Bel-7402细胞的PI染色各个象限的统计结果及rhddADAM15抑制Bel-7402细胞增殖的SRB法测定结果($n=3$)。

A: Bel-7402 cells were treated with different concentrations of rhddADAM15 and analyzed by PI staining; B: the statistical results of the three quadrants of PI staining and the does-dependent curve of rhddADAM15 inhibiting the proliferation of Bel-7402 detected by SRB assay ($n=3$).

图1 rhddADAM15抑制肝癌细胞Bel-7402的增殖

Fig.1 rhddADAM15 inhibited the proliferation of liver cancer cells Bel-7402



A: 对照组细胞核形态; B、C: 4 μmol/L的rhddADAM15处理24 h后Bel-7402细胞核形态。“N”为正常细胞核, “Apo”为具有凋亡形态的细胞核。图中放大倍数为1 000倍; D: 各组中凋亡细胞率的统计结果。 $n=3$, $*P<0.05$, 与对照组(0 μmol/L group)比较。

A: control group; B,C: Bel-7402 treated by 4 μmol/L of rhddADAM15 for 24 h. “N” represented the normal cells and “Apo” represented the apoptotic cells. The magnification of the images was 1 000; D: statistics of apoptotic cells in each group. $n=3$, $*P<0.05$ vs control group (0 μmol/L group).

图2 DAPI染色鉴定rhddADAM15对Bel-7402细胞凋亡的诱导

Fig.2 Evaluation of rhddADAM15-induced apoptosis of Bel-7402 cells by DAPI staining

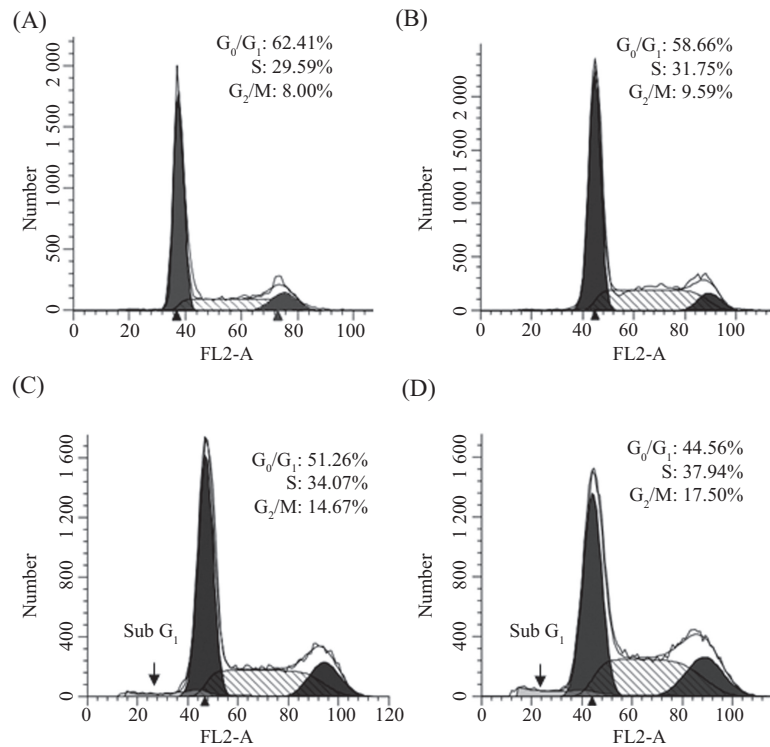
2.4 rhddADAM15对Bel-7402细胞周期蛋白CDC2的影响

rhddADAM15可引起Bel-7402细胞S期及G₂/M期的部分抑制, 细胞分裂调控蛋白2(cell division control 2, CDC2)是G₂/M检验点调节的关键因子。利用Western blot检测rhddADAM15作用后CDC2的表达量及其Tyr¹⁵位磷酸化的变化, 结果如图4所示: 经rhddADAM15处理后, 1~2 h CDC2蛋白的总含量较阴性

对照有所上升, 4 h含量下降; CDC2-Tyr¹⁵位磷酸化程度在2 h后开始增强, 而CDC2的Tyr¹⁵位去磷酸化是细胞进入M期的必要条件, 提示rhddADAM15对周期的阻滞与CDC2含量及Tyr¹⁵位的磷酸化改变有关。

3 讨论

去整合素是一类含有RGD或KGD序列的小分子蛋白质, 分子量一般在4~10 kDa, 可竞争性与整合

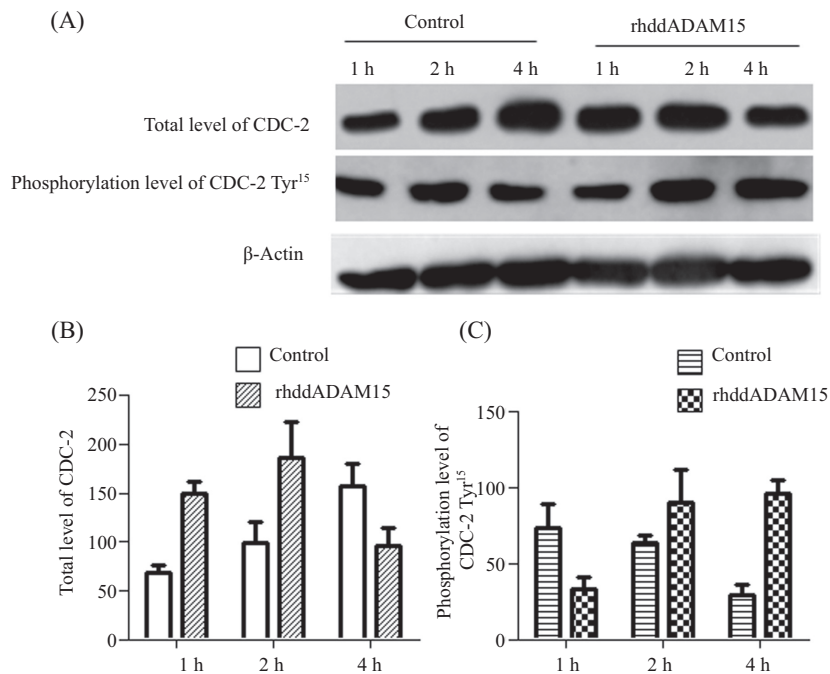


A: 对照组细胞周期; B~D: 分别经1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ rhddADAM15处理后的Bel-7402细胞周期。

A: the DNA cycle analysis of control group; B~D: the DNA cycle analysis of Bel-7402 treated by different concentrations of rhddADAM15 (B: 1 $\mu\text{mol/L}$; C: 2 $\mu\text{mol/L}$; D: 4 $\mu\text{mol/L}$).

图3 流式细胞仪分析Bel-7402细胞周期变化

Fig.3 Assessment of the DNA cycle of Bel-7402 cells by flow cytometry



A: rhddADAM15作用于Bel-7402细胞后不同时间对CDC2蛋白表达水平及其Tyr¹⁵酪氨酸磷酸化程度的影响; B: rhddADAM15作用于Bel-7402细胞后不同时间对CDC2蛋白表达水平的量化统计结果; C: hddADAM15作用于Bel-7402细胞后不同时间对CDC2的Tyr¹⁵酪氨酸磷酸化程度影响的量化统计结果。

A: the level of the total CDC2 and phosphorylated Tyr¹⁵ in Bel-7402 cells when treated with rhddADAM15 incubated in different time; B: statistics results of level of the total CDC2; C: statistics results of level of phosphorylated Tyr¹⁵.

图4 rhddADAM15对CDC2蛋白表达量及Tyr¹⁵位磷酸化的影响

Fig.4 The changes of CDC2 and phosphorylated CDC2 in Bel-7402 cells when treated with rhddADAM15

素结合, 干扰由整合素介导的信号转导通路^[7]。研究报道表明, 目前已分离纯化的多种去整合素都检测出一定的抗肿瘤活性。本实验室研究的重组人ADAM15去整合素区域(rhddADAM15), 由于其含有RGD序列, 被认为是ADAM15的典型功能区域^[4,8]。已有报道指出, rhddADAM15对肿瘤的增殖、迁移和侵袭都有抑制作用。

我们之前的研究发现, rhddADAM15对多种肿瘤细胞的增殖均有较强的抑制作用。本文研究表明, rhddADAM15作用于人肝癌Bel-7402细胞后可诱导其凋亡, 将部分细胞阻滞在S、G₂/M期, 从而延缓细胞分裂的速度, 抑制细胞的增殖。

在细胞周期转换过程中, CDC(cell division cycle)基因表达的产物具有细胞周期依赖性或直接参与细胞周期的调控。CDC2是唯一一个在G₁~S、G₂~M期两个调控点起作用的基因。CDC2/cyclinB复合物是G₂/M检验点调节的关键因子, 很多相关基因蛋白通过直接或间接影响CDC2/cyclinB1活性或者定位, 来参与G₂/M检验点的调控作用^[9]。在肿瘤细胞中, CDC2通常过表达使细胞周期紊乱, 造成恶性增殖。CDC2在胃癌、结肠癌及肝癌中都有显著的高表达, 而下调CDC2的表达可以引起G₂/M期的阻滞, 抑制肿瘤细胞的增殖^[10-11]。CDC2通过Tyr¹⁵和Thr¹⁴位点去磷酸化、Thr¹⁶¹磷酸化^[12], 才能使细胞顺利进入M期进行有丝分裂。我们发现, rhddADAM15作用4 h后, CDC2表达量下降, 其Tyr¹⁵的相对磷酸化程度并未像对照组一样降低, 反而有明显升高。Tyr¹⁵的去磷酸化是细胞进入M期的重要条件, 虽然目前仍不清楚rhddADAM15通过哪条通路引起Tyr¹⁵的去磷酸障碍, 但本研究对于rhddADAM15对Bel-7402细胞周期的抑制研究提供了基础与方向。

rhddADAM15含有可与整合素结合的RGD序列, 被认为是其发挥作用的关键因素^[4], 对于在肿瘤进程中, rhddADAM15与整合素之间具体的相互作用, 目前仍没有确切定论。近期, Beck等^[13]发现, ADAM15是整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的天然配体, 可以减弱 $\alpha_v\beta_3$ 介导的卵巢癌细胞的黏附和运动; 而Lu等^[14]发现, rhddADAM-15可通过依赖整合素 β_1 而非依赖 $\alpha_v\beta_3$ 的方式来抑制气管平滑肌细胞的迁移。因此, rhddADAM15可能在不同的环境中、对于不同的细胞通过不同的作用方式来发挥功能。本研究揭示了rhddADAM15阻滞肝癌细胞周期的作用机理, 为其进一

步的应用提供了研究基础。

参考文献 (References)

- Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, *et al.* The ADAMs family of proteases: New biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics* 2011; 8(1): 9.
- Blobel CP, Myles DG, Primakoff P, White JM. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence. *J Cell Biol* 1990; 111(1): 69-78.
- Pelisek J, Pongratz J, Deutsch L, Reeps C, Stadlbauer T, Eckstein HH. Expression and cellular localization of metalloproteases ADAMs in high graded carotid artery lesions. *Scand J Clin Lab Invest* 2012; 72(8): 648-56.
- Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir LM, Thomaidis A, Opolon P, Connault E, *et al.* Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res* 2004; 64(6): 2062-9.
- Moss ML, Bartsch JW. Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members. *Biochemistry* 2004; 43(23): 7227-35.
- Wu J, Lei J, Zhang L, Hua H, Jin J. Improving production and bioactivity of recombinant human disintegrin domain of ADAM15 (rhADAM15) in *Escherichia coli*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2008; 48(8): 1067-74.
- Temming K, Schiffelers RM, Molema G, Kok RJ. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resist Updat* 2005; 8(6): 381-402.
- Kratzschmar J, Lum L, Blobel CP. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem* 1996; 271(9): 4593-6.
- Liu X, Sun C, Jin X, Li P, Ye F, Zhao T, *et al.* Genistein enhances the radiosensitivity of breast cancer cells via G₂/M cell cycle arrest and apoptosis. *Molecules* 2013; 18(11): 13200-17.
- Li KK, Ng IO, Fan ST, Albrecht JH, Yamashita K, Poon RY. Activation of cyclin-dependent kinases CDC2 and CDK2 in hepatocellular carcinoma. *Liver* 2002; 22(3): 259-68.
- Yasui W, Ayhan A, Kitadai Y, Nishimura K, Yokozaki H, Ito H, *et al.* Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *Int J Cancer* 1993; 53(1): 36-41.
- Mitra J, Enders GH. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene* 2004; 23(19): 3361-7.
- Beck V, Herold H, Bengel A, Luber B, Hutzler P, Tschesche H, *et al.* ADAM15 decreases integrin alphavbeta3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(3): 590-603.
- Lu D, Xie S, Sukkar MB, Lu X, Scully MF, Chung KF. Inhibition of airway smooth muscle adhesion and migration by the disintegrin domain of ADAM-15. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37(4): 494-500.