

研究论文

*p85a*基因对小鼠大脑皮层投射神经元迁移的影响

陈林华[#] 曹华腾[#] 涂晓萌 王 教 李 雪*

(温州医科大学附属眼视光医院, 温州 325027)

摘要 Pi3k/Akt信号通路是近年来发现的参与细胞增殖、调控的重要通路, Pi3k激活可介导多种细胞功能, Pi3k由p85a和p110构成。该研究通过干扰*p85a*基因的表达, 探讨其在小鼠大脑皮层投射神经元迁移中的作用。首先, 构建*p85a*基因的对照质粒(scramble)、siRNA质粒(sip85a-1、sip85a-2)和过表达质粒(OEp85a); 接着转染N2a细胞, 48 h后, 用定量PCR方法检测*p85a*基因mRNA的表达情况。随后, 将sip85a-1、sip85a-2、OEp85a质粒分别转入小鼠大脑, 4 d后, 借助免疫荧光方法检测皮层神经元的迁移情况。定量PCR结果显示: 与对照相比, 转染sip85a-1、sip85a-2均能显著降低N2a细胞中*p85a*基因的mRNA表达, 抑制效率约为40%($P<0.05$); 而转染OEp85a质粒后, 能显著增加*p85a*基因mRNA的表达, 约为对照组的12倍($P<0.01$)。胚胎电转结果中, 各区EGFP阳性神经元数目定量分析显示, sip85a-1、sip85a-2、OEp85a质粒均能显著抑制神经元的迁移($P<0.05$)。大脑发育阶段中, *p85a*基因在适当范围内, 对平衡神经元迁移过程中起着重要作用。

关键词 皮层投射神经元; 迁移; Pi3k; *p85a*; 定量PCR

Research on *p85a* Gene in Radial Migration of Cortical Projection Neurons of the Mouse Cortex

Chen Linhua[#], Cao Huateng[#], Tu Xiaomeng, Wang Jiao, Li Xue*

(Ophthalmology and Eye Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract In recent years, Pi3k/Akt signaling pathway has been found vitally in cell multiplication and regulation. Activation of Pi3k can modulate a variety of cellular functions. Pi3k consists of p85a and p110. In this study, we aimed to determine whether *p85a* regulates the early migration of cortical projection neurons in mice by interruption the expression of *p85a*. First, we designed a scrambled shRNA plasmid as a control, two short hairpin RNAs (sip85a-1, sip85a-2) construct against *p85a* and an overexpression plasmid (OEp85a); Constructs were tested by transiently transfecting N2a cells. We detected the *p85a* mRNA level by Real-time PCR analysis. Then, we used two effective shRNAs to determine whether *p85a* was involved in the migration of cortical neurons. Real-time PCR analysis showed that *p85a* mRNA level decreased significantly after transfection with the plasmids express-

收稿日期: 2014-03-11 接受日期: 2014-05-12

温州市科技计划(批准号: Y20130254)和浙江省自然科学基金(批准号: LQ14C090005)资助项目

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-88067934, E-mail: lixue007@hotmail.com

Received: March 11, 2014 Accepted: May 12, 2014

This work was supported by the Wenzhou Science and Technology plans (Grant No.Y20130254) and Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LQ14C090005)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-577-88067934, E-mail: lixue007@hotmail.com

网络出版时间: 2014-07-25 17:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0071.html>

ing sip85a-1 (40%) and sip85a-2 (40%) compared to control ($P<0.05$). Conversely, *p85a* mRNA level increased significantly after transfection with OE*p85a* ($P<0.01$). In order to quantify in utero electroporation results, we also counted EGFP-positive cells in different bins. The results showed that all of sip85a-1, sip85a-2 and OE*p85a* could impair radial migration significantly ($P<0.05$). These observations indicate that balance of *p85a* has vital functions in regulating migration of cortical neurons during brain development.

Key words cortical projection neurons; migration; Pi3k; *p85a*; Real-time PCR

磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidy lino-sitol-3 kinase, Pi3k)是细胞内重要的信号转导分子, 是膜受体信号向细胞内转导的重要途径, 由调节亚基p85a和催化亚基p110构成。Pi3k激活可使膜磷酸肌醇磷酸化, 催化肌醇环上3位羟基生成3,4-二磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol-3,4-biphosphate, PI-(3,4)P₂]及3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PI-(3,4,5)P₃], 它们均可作为第二信使在细胞中传递信号, 介导Pi3k的多种细胞功能。这些产物可通过与Akt的PH区结合来激活Akt。Pi3k/Akt信号转导通路是近年来发现的一条参与细胞增生调控的重要信号通路^[1], 广泛存在于多种神经元中, 除具有调节神经元迁移、增殖、分化、代谢、抗细胞凋亡等细胞生物学作用外, 还参与了神经系统的发育、保护、学习和记忆等多种生理功能^[2]。本研究利用*p85a*基因构建的质粒作用于小鼠大脑神经元, 观察其对神经元迁移的影响, 探讨Pi3k/Akt信号途径在皮层投射神经元迁移中的作用, 为探索神经系统发病机制、研发治疗药物等提供重要依据^[3]。

1 材料与方法

1.1 实验对象

清洁级美国癌症研究所(institute of cancer research, ICR)小鼠, 来自并繁殖于温州医科大学动物学实验室; 小鼠脑神经瘤细胞(mouse neuroblastoma N2a cells)培养于温州医科大学眼视光实验室。

1.2 实验材料

Superscript III Firststrand Kit、Real-time PCR试剂均购自美国Life technologies公司; RNeasy Mini Kit、PCR Purification Kit、Plasmid Mini Kit、GEL Purification Kit购自德国QIAGEN公司; DNA Marker购自大连宝生物公司; T4 DNA Lignase、*Hind* III、*Bgl* II、*Eco*R I、*Not* I购自NEB公司。实验所需主要仪器为莱卡公司的Microm切片机、蔡司公司的Imager A2荧光显微镜和美国Life Technologies公司的

Vill7型荧光实时定量PCR仪。

1.3 *p85a*质粒的构建

1.3.1 RNA干扰siRNA质粒(sip85a-1、sip85a-2)寡核苷酸引物设计 构建si质粒, 设计si靶序列(表1), 由上海英维捷基公司合成引物序列, 加入30 μL TE溶解引物; 95 °C 5 min, 然后每3 min降5 °C, 缓慢降温至20 °C, 最后稀释引物浓度为25 ng/μL。

1.3.2 siRNA质粒(sc、sip85a-1、sip85a-2)的构建 用*Hind* III、*Bgl* II将pSUPER质粒于37 °C双酶切过夜后, 电泳检测酶切产物大小, 并用GEL Purification Kit割胶纯化回收质粒后加T4 DNA连接酶, 16 °C 16 h, 将质粒和sc、si引物连接, 连接产物电转至大肠杆菌中, 加1mL SOC液体, 取20 μL电转产物加入至LB培养板上, 均匀涂板, 37 °C过夜, 用无菌的牙签挑菌, 置于10 mL含有Amp的LB培养液中, 300 r/min, 37 °C摇菌过夜, 最后用Plasmid Mini Kit提取质粒。

1.3.3 过表达(OE*p85a*)质粒的构建 设计过表达引物序列(表1), 进行PCR反应, 扩增目的片段后, 用GEL Purification Kit割胶回收目的片段, 并测序鉴定; 用*Eco*R I、*Not* I将目的片段pCAGEN质粒于37 °C下双酶切过夜。电泳检测酶切产物大小, 并用GEL Purification Kit割胶纯化回收载体; 16 °C下T4 DNA连接酶16 h, 将质粒和目的片段连接; 连接产物电转至大肠杆菌中, 加1 mL SOC液体; 取20 μL电转产物加入至LB培养板上, 均匀涂板, 37 °C过夜; 用无

表1 siRNA及过表达*p85a*质粒引物序列
Table 1 The primer sequences of plasmids with siRNA and OE*p85a*

样品	序列(5'→3')
Sample	Sequence (5'→3')
sc	gca aac tcc gtc tgc aca tta
sip85a-1	gct cta ccc agt gtc caa ata
sip85a-2	gca caa tga ctc cct caa tgt
OE <i>p85a</i> L	atg cat gca cga att cgt gcg ggc cgt ata g
OE <i>p85a</i> R	atg cat gca tgc ggc cgc tcc gag gct gcg tgt c

菌的牙签挑菌,置于10 mL含有Amp的LB培养液中,300 r/min, 37 °C摇菌过夜,最后用Plasmid Mini Kit提取质粒。

1.3.4 挽救实验中sip85a+OEp85a质粒的制备 各取10 μ L sip85a质粒和10 μ L OEp85a质粒,配成混合液,用于后续的挽救实验所需。

1.4 Real-time PCR方法检测N2a细胞p85a基因的表达情况

将sip85a-1、sip85a-2、OEp85a质粒,转染至6孔板中培养N2a细胞上,作为3组实验组;scramble作为对照组。转染后的N2a细胞(3组实验组+对照组)培养48 h后,收集细胞,用RLT试剂裂解细胞,RNeasy Mini Kit提取细胞RNA,用Superscript III Firststrand Kit合成cDNA后,用SYBR Green荧光标记方法进行Real-time PCR检测4组的p85a基因表达,以 β -actin为内参基因(引物序列 β -actinL: cta caa tga gct gcg tgt gg, β -actinR: acc aga ggc ata cag gga ca),p85a为目标基因(引物序列p85aL: cat gta cac cac ggt ttg ga, p85aR: tgc cac agt tta tat ctg tct tgg)。Real-time PCR反应体系为25 μ L,包括12.5 μ L 2 $\times$ SYBR Green mix, 1.25 μ L 20 $\times$ Primer, 1.5 μ L cDNA, 9.75 μ L ddH₂O。反应程序为:50 °C预热2 min;然后95 °C预变性10 min, 95 °C变性15 s, 60 °C退火延伸60 s,体系均反应40个循环。

1.5 小鼠胚胎大脑内电转质粒

在胚胎E15.5时麻醉孕鼠,腹面朝上,固定于平板上,用酒精消毒小鼠腹部。切开腹部并暴露子宫角,将制备的质粒(sip85a-1、sip85a-2、OEp85a、sip85a+OEp85a质粒为4组实验组,sc为对照组)经由玻璃管吹入侧脑室,再将胎鼠头部置于两电极间,进行电击穿孔导入DNA(电转参数:电压40 V,脉冲时间50 ms,频数5次,间隔950 ms)。电击3~4次后将子宫放回腹腔中,缝合腹肌和皮肤,置于热台上待小鼠苏醒。

1.6 免疫荧光检测神经元迁移情况

经胚胎电转载入sc、sip85a-1、sip85a-2、OEp85a、sip85a+OEp85a质粒的小鼠存活4 d后,用颈椎脱臼法处死小鼠,取其大脑皮层组织做免疫荧光,步骤如下:4 °C下用4% PFA固定过夜后,再用30%蔗糖于4 °C至沉底;OCT包埋,液氮冰冻后,-23 °C下25 μ m冰冻切片;加入带绿色荧光GFP抗体,PBS洗片;再中性树脂封片,最后观察神经元的迁移并拍照保存。

1.7 统计学方法

统计学分析采用SPSS 16.0软件包,Real-time PCR数据结果中:基因 Δ Ct值=目标基因($C_{t\text{test}}$)-内参基因($C_{t\text{control}}$),实验数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示相对倍数关系;神经元计数中以百分比表示,因为神经元细胞符合正态分布,结果以mean $\pm$ S.D.表示。统计结果采用t检测, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒构建的验证结果

sc和sip85a的质粒送至上海英潍捷基公司经H1 Promoter测序,结果与设计引物序列完全一致。OEp85a样品PCR产物大小约1 650 bp,包含p85a的完整编码区,p85a质粒经pCAG-F Promoter测序后经NCBI blastn比对,结果与p85a基因mRNA编码区序列一致(图1)。

2.2 N2a细胞转染质粒后收集的RNA电泳结果

N2a细胞经sc、sip85a-1、sip85a-2、OEp85a转染48 h后,用RNeasy Mini Kit提取细胞RNA后,取5 μ L RNA样品,进行RNA电泳检测。结果如图2所示,4个样品的原始RNA条带完整,未降解,均有28S和18S条带,可用于后续实验。

2.3 定量PCR检测小鼠胚胎电转后p85a基因的表达情况

将对照质粒(sc)、sip85a-1、sip85a-2、OEp85a质粒转染N2a细胞,培养48 h后,收集细胞提取

Mus musculus phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha) (Pik3r1), transcript variant 1, mRNA
Sequence ID: ref|NM_001024955.2| Length: 5839 Number of Matches: 1

Range 1: 241 to 300		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
111 bits(60)	4e-23	60/60(100%)	0/60(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GTGCGGGCCGTATAGGTTTAAATGAATTCACAGACACCATTAACAAAGAAAGCCGGACT 60				
Sbjct 241	GTGCGGGCCGTATAGGTTTAAATGAATTCACAGACACCATTAACAAAGAAAGCCGGACT 300				

图1 p85a基因blastn结果图

Fig.1 The result of blastn for p85a

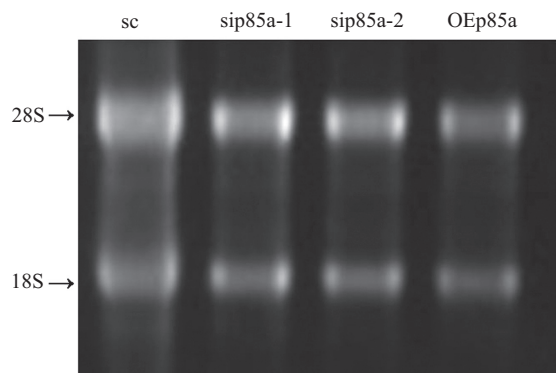


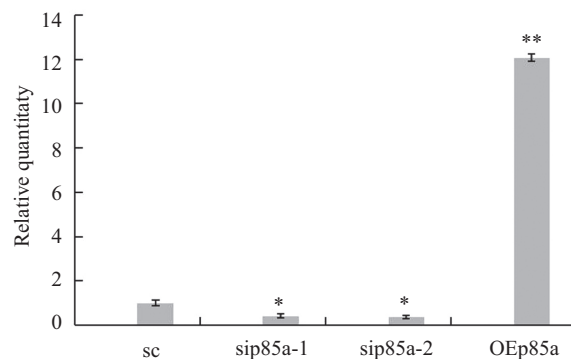
图2 N2a细胞RNA电泳图

Fig.2 RNA electropherogram of N2a cells

mRNA, 用 *Gapdh* 基因作为内参, 检测 *p85a* 基因的 mRNA 表达情况(图3)。结果显示, 与对照 *sc* 相比, 转染干扰质粒 *sip85a-1* 和 *sip85a-2* 后, *p85a* 基因的 mRNA 水平明显降低, 约为对照组的 0.4 倍, 统计学分析表明, 该差异有显著性 ($P < 0.05$); 而转染过表达 (*OEp85a*) 质粒后, *p85a* 基因的 mRNA 表达明显升高, 为对照组的 12 倍, 统计学分析表明, 该差异具有显著性 ($P < 0.01$)。综上, 我们认为构建的 4 个质粒均符合我们所需要求, 可用于后续实验。

2.4 胚胎电转后大脑皮层组织神经元迁移情况

经胚胎电转载入 *sc*、*sip85a-1*、*sip85a-2*、*OEp85a* 质粒的小鼠, 免疫荧光后拍照。结果如图5所示, 为了定量分析 *p85a* 的作用, 我们将 E17.5 小鼠大脑皮层分区, 依次为 CP、IZ、VZ/SVZ 区, 对转染细胞在皮层中分布进行统计分析。结果表明, 在转染 *sc* 的脑片中, 约有 60% 的细胞迁移到 CP 区, 约 19% 的转染细胞位于 IZ 区, 而约 21% 的细胞处于 SVZ/VZ; 与 *sc* 样品比较, 转染 *sip85a* 的脑片中, 滞留在 IZ 区的比例明显增加(其中 *sip85a-1* 为 30.0%, *sip85a-2* 为 33.2%), 迁移至



采用 *t* 检验, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 实验组和 *sc* 组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with sample of *sc* alone (Student's *t* test).

图3 *p85a* 基因的定量 PCR 结果图Fig.3 The results of *p85a* gene by quantitative PCR

CP 的比例明显减少(其中 *sip85a-1* 为 47.6%, *sip85a-2* 为 43.2%), 然而 SVZ/VZ 区的细胞数目并未表现明显差异(其中 *sip85a-1* 为 22.5%, *sip85a-2* 为 23.6%)。这暗示我们: 在胚胎发育早期抑制 *p85a* 基因的表达可能会影响神经元的正常迁移。那么, 当 *p85a* 基因表达异常增加, 是否会具有同样的抑制作用? 为了验证这一想法, 我们将转染过表达质粒 *OEp85a* 的脑片进行分析, 结果表明: 与 *sc* 组比较, 过表达 *p85a* 基因后, 迁移同样发生异常, CP 区的神经元明显减少, 约为 18.8%, 而滞留在 IZ (*OEp85a* 为 38.9%) 和 SVZ/VZ 区的细胞明显增多 (*OEp85a* 为 42.3%) ($P < 0.05$)。这说明, 当过表达 *p85a* 基因后, 同样会影响神经元的正常迁移。综上, 在大脑发育阶段中, *p85a* 基因在适当范围内, 对平衡神经元迁移过程中起着重要作用(图4、图5和表2)。

2.5 挽救实验中大脑皮层神经元迁移情况

为了排除 RNAi 干扰可能存在非特异性的问题, 我们将 *sip85a*+*OEp85a* 混合的质粒载入小鼠胚胎, 免

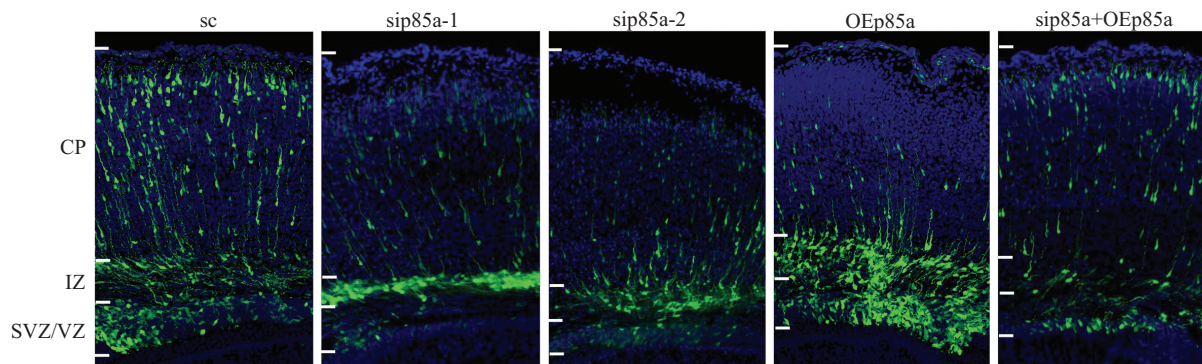


图4 小鼠大脑皮层组织神经元迁移情况图(20×)

Fig.4 The radial migration of cortical projection neurons in the mouse cerebral cortex (20×)

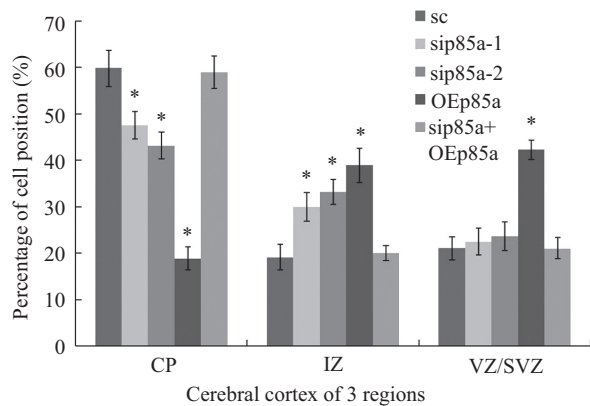
表2 不同区域的细胞计数情况

Table 2 The cell counts of different cortex regions in five experiment groups

区域 Regions	不同组别 Different group				
	sc	sip85a-1	sip85a-2	OEp85a	sip85a+OEp85a
CP	59.9±3.9	47.6±3.0 ^β	43.2±2.9 ^β	18.8±2.5 ^a	59.0±3.5
IZ	19.1±2.8	30.0±3.1 ^β	33.2±2.7 ^β	38.9±3.7 ^a	20.0±1.6
VZ/SVZ	21.0±2.5	22.5±2.9	23.6±2.1	42.3±2.1 ^a	21.0±2.3

采用 t 检验, 实验组和sc组比较, ^a $P<0.01$, ^β $P<0.05$ 。

^a $P<0.01$, ^β $P<0.05$ compared with sample of sc alone (Student's t test).



* $P<0.05$, 与sc组比较。

* $P<0.05$ compared with sc group.

图5 5组小鼠大脑不同区域的细胞分布图

Fig.5 The cell counts of different mouse cortex regions in five experimental groups

疫荧光观察神经元的挽救情况。结果如图4和图5所示, 与sc样品比较, 载入sip85a+OEp85a混合质粒的神经元迁移恢复正常。sip85a质粒特异性地抑制p85a表达, 而OEp85a可以过表达p85a基因, 两种质粒混合后p85a表达恢复至正常水平, 故神经元迁移恢复正常。同样, 该实验也证实了之前干扰p85a基因表达后结果的特异性。

3 讨论

Pi3k家族成员属于原癌基因, 是肌醇与磷酸酰肌醇(PI)的重要激酶, PI在脑细胞膜中含量较为丰富, 达磷脂总量的10%。生长因子、细胞因子、激素、缺氧等细胞外信号刺激可激活Pi3k。Pi3k的激活主要通过两种方式: 一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用, 引起二聚体构象改变而被激活; 另一种是通过大鼠肉瘤(rat sarcoma, Ras)蛋白和p110直接结合导致其活化^[4]。Pi3k激活可催化底物PI发生磷酸化, 催化的产物PI(3,4,5)P3作为第二信使, 在细胞中将信号传入细胞内; PI(3,4,5)

P3也是Akt(又名蛋白激酶B, protein kinase B, PKB)转位于胞膜并被活化所必需的^[5-6], 活化的Akt通过磷酸化多种酶、激酶、转录因子等下游因子, 介导Pi3k的多种功能, 调节细胞的功能^[7]。近年来发现的Pi3k/Akt转导通路在细胞增生、调控、迁移、凋亡等过程中起着重要的作用^[8]。

Pi3k/Akt通路可在很大范围内对神经元凋亡进行调节, 对于神经细胞的存活有着特殊的重要性。营养因子促进神经元存活的作用不仅通过细胞胞体内Pi3k/Akt通路, 还可通过神经细胞轴突远端与另一个神经细胞树突的相互作用, 使轴突远端Pi3k/Akt对另一个细胞的存活产生影响^[9]。Akt的底物包括去活化的前凋亡调节蛋白和活化的抗凋亡蛋白。Pi3k/Akt通路不仅通过转录来调节细胞的生存和死亡, 也直接参与调节细胞凋亡。

Iijima等^[10]通过研究, 发现Pi3k基因抑制神经元细胞迁移。细胞迁移是复杂的生物学过程, 是细胞生长过程必需环节, 涉及一系列生化反应。迁移可通过细胞内信号调节骨架蛋白重组, 在细胞靠近内皮一端形成伪足; 细胞通过伪足延展或缩短与周围组织脱离, 而后循着信号所指引的方向向靶器官移动^[11]。虽然神经元迁移的分子机制在很大程度上至今未知, 但是细胞外配体和胞内细胞骨架等已经被证实参与神经元迁移^[12]。在大脑皮层结构的形成过程中, 神经元产生、正确迁移及随后的成熟过程是至关重要的决定性因素。研究表明, 当大脑皮层发育过程中发生时空模式的细微变化, 将导致神经环路紊乱及活动异常^[13-14], 引发一系列发育性神经系统疾病, 例如智力低下、阅读障碍、室周异位症、无脑回、癫痫、自闭症和精神分裂症等^[15-17]。Aberg等^[18]提出, Pi3k在发育中的中枢神经系统和成年脑不同区域的表达水平不同, 但未提及Pi3k的不同表达对神经元细胞迁移的影响。

Pi3k由调节亚基p85a和催化亚基p110构成, *p85a*基因在神经发育过程中起了什么作用、对神经元的迁移有什么影响等问题, 至今尚不清楚。通过本实验室前期对Pi3k的一些发现, 我们对Pi3k在神经元迁移中的作用进行了深入研究。我们主要针对的是Pi3k的亚基——*p85a*基因, 用构建的siRNA干扰和过表达质粒, 转染N2a细胞, 检测其抑制或过表达效率; 并通过在体实验, 进一步探索Pi3k在神经元迁移中的作用。结果提示, 干扰*p85a*基因的表达, 将导致神经元迁移障碍; 而过表达质粒同样抑制神经元的迁移。综上所述, 平衡*p85a*基因的表达水平在神经元迁移过程中起着重要作用。

因此, 本实验利用小鼠动物模型, 研究*p85a*基因在小鼠大脑皮层神经元迁移、分化中的影响作用, 不仅有助于我们深入探索Pi3k/Akt信号转导通路及其在神经发育中的作用机制, 明确*p85a*通过Pi3k/Akt信号通路对小鼠胚胎大脑神经元形态发生变化, 导致神经元迁移受影响, 为详述影响大脑发育调控网络打下理论基础。另外, 对理解脑血管疾病、神经变性疾病、脱髓鞘疾病、运动障碍性疾病、癫痫和肌肉疾病等的发病机理也具有重要意义, 同时也可作为寻找新的治疗手段、探索新的诊断方法(如生物学标记、基因诊断)提供部分理论依据。

参考文献 (References)

- 1 于文贞, 黎晓新, 周国宏, 何培英. PI3K抑制剂对体外培养的眼底血管内皮细胞的作用. 眼科研究(Yu Wenzhen, Li Xiaoxin, Zhou Guohong, He Peiying. Effects of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor on cultured retinal and choroidal vascular endothelial cells *in vitro*. Chinese Ophthalmic Research) 2007; 25(2): 117-20.
- 2 王爽, 谢鹏, 赵裕光, 贾延劫, 牟君, 王运良. PI3K/AKT信号途径在大鼠脑源性神经干细胞中的作用. 江西医学院学报(Wang Shuang, Xie Peng, Zhao Yuguang, Jia Yanjie, Mu Jun, Wang Yunliang. A role for the phosphatidylinositol 3-kinase PI3K/Akt signaling pathway in rat brain-derived neural stem cells. Acta Academiae Medicinae Jiangxi) 2005; 45(5): 1-4.
- 3 舒怡, 张洪, 章军建. PI3K/Akt信号通路在神经系统疾病中的研究进展. 医学综述(Shu Yi, Zhong Hong, Zhang Junjian. Research progress of PI3K/Akt signal pathway in neurological diseases. Medical Recapitulate) 2011; 17(18): 2732-6.
- 4 Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. Apoptosis 2004; 9(6): 667-76.
- 5 Edwards LA, Thiessen B, Dragowska WH, Daynard T, Bally MB, Dedhar S. Inhibition of ILK in PTEN-mutant human glioblastomas inhibits PKB/Akt activation, induces apoptosis, and delays tumor growth. Oncogene 2005; 24(22): 3596-605.
- 6 Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. J Cell Mol Med 2005; 9(1): 59-71.
- 7 Thomas G, Hall MN. TOR signaling and control of cell growth. Curr Opin Cell Biol 1997; 9(6): 782-7.
- 8 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 2002; 296(5573): 1655-7.
- 9 Downward J. Signal transduction: Regulating S6 kinase. Nature 1994; 371(6496): 378-9.
- 10 Iijima M, Huang YE, Devreotes P. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. Dev Cell 2002; 3(4): 469-78.
- 11 Ohta Y, Hartwig JH, Stossel TP. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. Nat Cell Biol 2006; 8(8): 803-14.
- 12 Konno D, Yoshimura S, Hori K, Maruoka H, Sobue K. Involvement of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Rac1 and Cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons. J Biol Chem 2005; 280(6): 5082-8.
- 13 Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: Update 2012. Brain 2012; 135(Pt 5): 1348-69.
- 14 Bielas S, Higginbotham H, Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG. Cortical neuronal migration mutants suggest separate but intersecting pathways. Annu Rev Cell Dev Biol 2004; 20: 593-618.
- 15 Gressens P. Neuronal migration disorders. J Child Neurol 2005; 20(12): 969-71.
- 16 de Wit MC, Lequin MH, de Coe IF, Brussee E, Halley DJ, van de Graaf R, *et al*. Cortical brain malformations: Effect of clinical, neuroradiological, and modern genetic classification. Arch Neurol 2008; 65(3): 358-66.
- 17 Tinuper P, D'Orsi G, Bisulli F, Zaniboni A, Piraccini A, Bernardi B, *et al*. Malformation of cortical development in adult patients. Epileptic Disord 2003; 5(Suppl 2): S85-90.
- 18 Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection regeneration and functional plasticity in the adult brain. ScientificWorldJournal 2006; 6: 53-80.