

生长因子受体结合蛋白2(Grb2)的生理功能

张新宇 安 输 郭晓汐 刘 莹 杨 洋 徐天瑞*

(昆明理工大学生命科学与技术学院细胞信号传导实验室, 昆明 650500)

摘要 生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor bound protein 2, Grb2)是一种在细胞中广泛表达的衔接蛋白。作为信号通路上的节点蛋白, Grb2在细胞内许多信号传导通路中起着重要调控作用。Grb2的异常表达或活化与肿瘤的发生息息相关。大量研究表明, 它可以作为抗肿瘤治疗的分子靶点, 因此Grb2抑制剂也就成了抗肿瘤药物研发的一个热点。该文对Grb2的生理功能和抑制剂研究的最新进展进行了综述。

关键词 生长因子受体结合蛋白2(Grb2); 受体酪氨酸激酶; 肿瘤治疗; 选择性抑制剂

Physiological Function of Growth Factor Receptor Bound Protein 2 (Grb2)

Zhang Xinyu, An Shu, Guo Xiaoxi, Liu Ying, Yang Yang, Xu Tianrui*

(Cell Signaling Laboratory, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) is a ubiquitously expressed adaptor that is essential for a variety of cellular signal transduction pathways and acts as critical downstream intermediary in several oncogenic signaling pathways. The overexpression or aberrant activation of Grb2 is closely related to tumorigenesis. The broad involvement of Grb2 in multisteps of the tumorigenesis makes it an excellent target for antitumor therapy, and plenty of studies have shown that Grb2 molecules can be successfully targeted for anti-metastatic therapeutics. Therefore, many Grb2 antagonists have been developed and they show strong antitumor activities. In this article, we summarized the research progress on physiological function of Grb2 and its inhibitors.

Keywords growth factor receptor bound protein 2 (Grb2); RTK; tumour therapy; selective inhibitor

生长因子受体结合蛋白2(growth factor receptor bound protein 2, Grb2), 又称Ash蛋白, 它最初是作为表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路之间的衔接蛋白被发现的^[1]。对其一级结构的研究发现, Grb2是由一个位于中间的SH2(Src homology 2)结构域和分别位于两端的SH3(Src homology 3)结构域组成。之后的研究表明, Grb2是一种在诸多细胞中广泛表达的衔接蛋白, 其通过调控受体酪氨酸激酶(receptor

tyrosine kinase, RTK)信号通路来调节众多细胞的功能^[2]。此外, Grb2作为主要信号传导分子在多个致癌信号通路中发挥关键作用。研究发现, Grb2在乳腺癌、胃癌和食管鳞状细胞癌等肿瘤组织中呈高表达状态, 并且Grb2的表达水平与肿瘤的淋巴结转移及预后密切相关^[3-4]。Grb2主要是通过其所在信号通路促进肿瘤细胞侵袭和转移来实现其在肿瘤发生中的作用。由于Grb2具有重要病理生理功能, 根据Grb2的结构特点, 设计筛选针对Grb2的特异性化合物或多肽一直是抗肿瘤研究的热点。

收稿日期: 2015-02-13 接受日期: 2015-04-13

国家自然科学基金(批准号: U1302225、81460253、81460417、81473342)和云南省高端科技人才基金(批准号: 2012HA008)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-65939327, E-mail: xtrgfq@hotmail.com

Received: February 13, 2015 Accepted: April 13, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. U1302225, 81460253, 81460417, 81473342) and High-End Technology Talents Foundation of Yunnan Province (Grant No. 2012HA008)

*Corresponding author. Tel: +86-871-65939327, E-mail: xtrgfq@hotmail.com

网络出版时间: 2015-07-06 10:23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150706.1023.001.html>

1 Grb2的结构特点

Grb2蛋白由217个氨基酸组成,其分子量约为25 kDa。Grb2蛋白结构的最大特点为其含有一个位于中央的SH2结构域和两个位于两侧的SH3结构域^[5](图1)。SH2和SH3之间由两条柔性的臂链相互连接起来。两条柔性臂链赋予Grb2更大的空间结构变化,从而使Grb2更好地在信号传导过程中发挥桥梁作用^[6]。其中,SH2结构域是最普遍的能识别磷酸酪氨酸残基的蛋白结合结构域,尽管有较多的蛋白均含有该结构域,但这个由约100个氨基酸组成的SH2在进化上高度保守,充分说明了其重要的生物学意义。SH3结构域含有约50个氨基酸,可识别

富含脯氨酸的蛋白如SOS(son of sevenless)。此外,SH3结构域富含酪氨酸磷酸化位点,这些位点对调控Grb2的功能及其所在信号通路起着重要作用。

2 Grb2在细胞内信号传导中的作用

在细胞内存在众多的信号传导通路,各种发挥不同作用的信号传导通路又常常交织在一起,组成一个庞大的细胞信号传导网络系统。研究表明,人类常见的疾病,如一些癌症、糖尿病、心脑血管等疾病的发生都与细胞信号传导的组成结构及功能异常有着密切的联系。

Grb2作为一种常见的衔接蛋白,因其结构

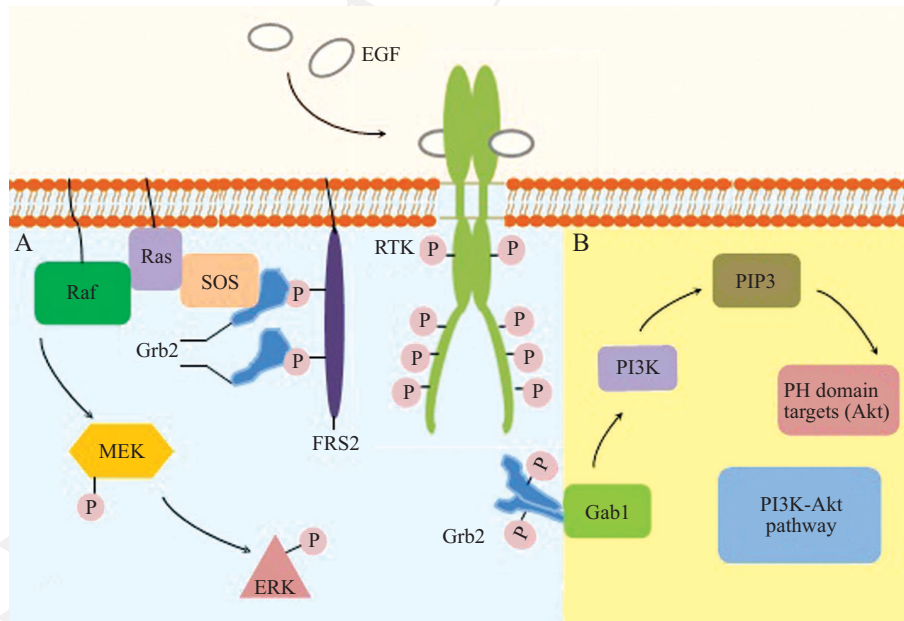


Grb2蛋白含有一个位于中央的SH2结构域和两个位于两侧的SH3结构域。上皮细胞在催乳素的刺激下,Grb2 SH3结构域上第7、37、52、160和209位的酪氨酸可以呈现高度磷酸化。

Grb2 consists of an SH2 domain flanked by N- and C-terminal SH3 domains. Tyrosines 7, 37, 52, 160 and 209 in Grb2 are highly phosphorylated after epithelial cells stimulated with prolactin.

图1 Grb2蛋白的结构模式图

Fig.1 Schematic representation of structure of Grb2 protein



A: Grb2可与SOS相结合形成复合物,并转移至细胞膜Ras蛋白附近。SOS可通过催化交换将GDP转化为GTP,结合GTP的Ras处于活化状态,可激活其底物Raf激酶,然后可逐级激活MEK、MAPK及其下游的蛋白激酶和转录因子; B: Grb2与衔接蛋白Gab1相结合参与PI3K-Akt信号通路的调控。

A: Grb2 interacts with SOS to form a complex which translocates SOS to the vicinity of its substrate Ras, allowing SOS to catalyze the exchange of GDP to GTP. Then activated Ras-GTP initiates activation of Raf kinases and the downstream kinase cascade; B: the association of Grb2 with another adaptor protein Gab1 participates in the regulation of PI3K-Akt pathway.

图2 Grb2蛋白参与的细胞信号传导过程

Fig.2 Grb2-mediated signaling pathways

特点, 可以和不同信号通路中的不同组分相互作用。Grb2可通过SH2结构域识别一些受体酪氨酸激酶如EGFR、成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)、肝细胞生长因子受体(hepatocyte growth factor receptor, HGFR)和血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor, PDGFR)以及一些非受体酪氨酸激酶。同时, Grb2还可通过其SH3结构域作用于这些激酶的底物或其所在信号通路的下游组分, 如SOS、Src同源区2蛋白质酪氨酸磷酸酶2(SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase 2, Shp2)、Gab1/2(Grb2 associated binder 1/2)等(图2)。

2.1 Grb2在RTK及非受体酪氨酸激酶信号传导中的作用

受体酪氨酸激酶(RTK)是最大的一类酶联受体, 其包括EGFR、FGFR、PDGFR及HGFR等。RTKs在没有与信号分子结合时是以单体形式存在, 并且没有活性; 一旦有信号分子与受体的细胞外结构域结合, 两个单体受体分子在膜上形成二聚体, 两个受体的细胞内结构域的尾部相互接触, 激活它们的蛋白激酶的功能, 结果使尾部的酪氨酸残基发生磷酸化。磷酸化的酪氨酸及其周围的序列包括Grb2在内的为含有SH2结构域蛋白提供了结合位点^[7-8]。

在静息状态下细胞内RTK保持着基础的酪氨酸磷酸化水平, 之前的研究认为, 因RTK基础磷酸化较少而不能产生有效的生理功能。但最近的研究结果显示, Grb2调控RTK的具体机制远比想象中复杂。该研究表明, 二聚化的Grb2可通过其C-端SH3结合到相邻两个RTK胞内C-末端脯氨酸富集区, 从而引起RTK的二聚化, 并且导致RTK激酶区酪氨酸的磷酸化, 使RTK处于基础磷酸化水平。但与二聚化Grb2形成复合物的二聚化RTK不能继续磷酸化其他部位的酪氨酸, 也就不能活化下游信号分子。所以, Grb2可以使RTK处于非活化的二聚化状态。当细胞在相关生长因子的刺激下, RTK的其他酪氨酸可继续被磷酸化, 通过静电排斥作用迫使Grb2离开二聚化的RTK, 从而解除Grb2对RTK的抑制, 引起RTK下游信号通路的激活^[9]。

Grb2的SH3结构富含酪氨酸, 但通常认为, 在表皮生长因子的刺激下这些酪氨酸并未被磷酸化。最近的研究表明, 表皮细胞在催乳素受体的刺激下, Grb2 SH3结构域上第7、37、52和209位的酪氨酸呈

现高度磷酸化。Grb2酪氨酸的高度磷酸化阻碍了其SOS的结合。Grb2可通过其N末端的SH3结构域与富含脯氨酸的属于鸟嘌呤核苷酸交换因子的SOS相结合, 形成复合物。Grb2将SOS带至细胞膜Ras蛋白附近。随着SOS转移至其底物Ras附近, SOS可通过催化交换将鸟苷二磷酸(GDP)转化为三磷酸鸟苷(GTP)^[10-11]。在有或无生长因子刺激的情况下, Grb2/SOS复合物的定位可发生一系列显著的变化, 导致下游分子的相应活化。GTP通过Ras发生水解作用, 然后激活Raf激酶等下游激酶^[12], 从而将来自外界的传导信号传输进入细胞核内, 引起相应的一系列生物学效应, 在调控细胞诸多生理和病理过程中发挥作用。

我们之前的研究结果也表明, 通过siRNA干扰Grb2的表达可显著降低EGF刺激所引起的ERK活化。进一步研究显示, 在此条件下Raf-1和B-Raf异源二聚体的形成减少, 而Raf激酶二聚化对其活性至关重要。所以Grb2可能通过影响Raf二聚体的形成来调控MAPK信号通路^[13-14]。

2.2 Grb2在其他信号传导通路中的作用

Grb2还可通过结合磷酸酶Shp2来正向调控纤维母细胞生长因子受体的信号。因Sprouty蛋白是纤维母细胞生长因子胞内信号传导的主要抑制蛋白, 而结合Grb2的Shp2可使Sprouty蛋白去磷酸化, 解除其对纤维母细胞生长因子信号的抑制, 所以Grb2对其信号传导具有正向调控作用^[15]。此外, Grb2还可以与另一种衔接蛋白Gab1相结合, 导致磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)-Akt信号通路的激活^[16], Gab1与Grb2结合后, 能与P85亚基结合从而激活PI3K。当PI3K激活后, 磷脂分子PIP3与Gab1的PH结构域能发生高亲和力的结合, 进一步增强PI3K的激活。通过这些信号通路激活的基因的表达引起了一系列细胞的基本活动, 包括细胞的增殖、生长、分化及生存。

3 Grb2在疾病发生中的调控作用

由Grb2所调控的这些信号通路对维持细胞众多的基本生理功能如增殖、生长和分化等均起着十分重要的作用, 而Grb2的异常表达或活化也促进了许多疾病特别是肿瘤的发生发展。

Grb2在肿瘤发生发展中的作用主要表现在其在所在信号通路可促进肿瘤的侵袭和转移, 如Grb2的异常表达或其所在信号通路的异常活化将减弱肿瘤

细胞间或肿瘤细胞与胞外基质间的黏附、降低胞外基质结构的稳定性、增强细胞骨架的柔性和细胞的迁移能力及促进肿瘤血管生成等^[17]。

3.1 Grb2在胃癌中的调控作用

胃癌是全世界范围内发病率最高的癌症之一。研究发现,由Grb2介导的表皮生长因子受体活化后,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路的异常激活及表达与胃癌的发生发展密切相关^[18]。mTOR是一种非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为磷脂酰肌醇激酶相关激酶蛋白质家族的成员,其在体内多条信号通路中发挥作用^[19]。研究表明,在正常胃黏膜上皮和管状腺癌组织中不会出现Grb2和mTOR的表达,而胃癌组织中Grb2和mTOR的表达均明显增强,这说明Grb2和mTOR基因在胃癌中会出现异常激活^[20]。此外,Grb2的表达与胃癌患者的年龄、肿瘤类型和高分化有关。胃癌组织中Grb2和mTOR表达呈正相关,两者的共同表达有高度的一致性,表明Grb2和mTOR是处于同一信号传导通路的上下游,它们之间的协同作用促进了胃癌的发生发展。

3.2 Grb2在膀胱癌中的调控作用

膀胱肿瘤是属于泌尿系统的较为常见的肿瘤,其中膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)是膀胱肿瘤中最为常见的一种。因其术后易复发,所以早期的诊断直接关系到患者的治疗效果和生存情况。研究表明,BTCC中的Grb2具有高表达的趋势,Grb2的表达与肿瘤组织学分级、临床分期有着重要的关系,Grb2在BTCC细胞的增殖与分化过程中发挥重要作用,BTCC的发生发展与Grb2的过表达有关^[21]。因此,可以认为Grb2能作为诊断BTCC发生的一个可靠的指标。

Watanabe等^[22]研究发现,在四种人膀胱癌细胞系(T24、KU-7、UMUC-2、UMUC-6)中,Grb2及其下游SOS蛋白表达量均较两种正常膀胱上皮细胞(HMKU-1和HMKU-2)明显增高,可以高出3~7倍,表明从正常膀胱尿道上皮细胞到膀胱癌细胞的癌变过程中Grb2扮演着重要的角色。现已证明,Grb2蛋白的过量表达可能会引起肿瘤细胞对生长因子的敏感性增强,并进一步强化人膀胱癌细胞中Ras信号通路,表明Grb2在膀胱癌发生发展中起重要的作用^[23]。

3.3 Grb2在胰腺癌中的调控作用

胰腺癌是一种恶性程度很高,诊断和治疗都很

困难的消化道恶性肿瘤。人类真核翻译延长因子1A2(homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2, EEF1A2)的过度异位表达与胰腺癌的发生有关^[24-25]。EEF1A2在胰腺癌中高表达,能促进肿瘤血管生成,使胰腺癌细胞生长增殖加速、抑制其凋亡,但是EEF1A2参与胰腺癌发生过程的具体机制尚未阐明。在EEF1A2过量表达的同时,与肿瘤密切相关的Grb2表达亦明显增加,因此推测EEF1A2能特异性地促进Grb2的转录和翻译。Panasyuk等^[26]研究证实,在体外,EEF1A2也可与Grb2相互结合。通过siRNA技术等研究证实,Grb2是EEF1A2促进胰腺癌发生过程的关键分子,EEF1A2可能通过激活Grb2介导的信号传导通路来参与胰腺癌发病,进而影响胰腺肿瘤的发生发展^[27]。

3.4 Grb2在乳腺癌中的调控作用

由原癌基因*ErbB2*(V-Erb-B2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)编码的185 kDa的细胞膜受体ErbB2也是一种RTK,其过表达或过度活化是引起乳腺癌发生发展的重要原因之一,在20%~30%乳腺癌病人体内发现ErbB2激酶活性的增加。ErbB2可通过自身的过表达或在一种神经分化因子heregulin的刺激下而被激活。过度活化的ErbB2可引起乳腺癌细胞的不断增殖。作为衔接蛋白,Grb2在heregulin所诱导的乳腺癌细胞增殖过程中发挥重要作用。Grb2的功能抑制或表达下调可抑制heregulin的刺激所引起的乳腺癌细胞增殖,但是对ERK1/2的活性并没有明显影响。进一步研究表明,Grb2主要通过激活PI3K-Akt信号通路来实现ErbB2过表达或heregulin刺激所引起的乳腺癌细胞增殖^[28]。

Grb2的过量表达可促进乳腺癌的发展。Daly等^[29]从19株乳腺癌细胞系中发现有7株细胞系的Grb2 mRNA水平呈显著性过表达,表达水平是正常乳腺上皮细胞的两倍多。Verbeek等^[30]观察了Grb2在人乳腺癌细胞及其相对应的正常组织细胞中的分布情况,表明Grb2在所有乳腺癌组织中都存在过表达情况。

3.5 Grb2在其他肿瘤中的调控作用

在慢性髓细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)中,肿瘤细胞的增殖与Grb2蛋白表达的增加呈现同步性^[31],Grb2直接或间接通过SHC(Src homologue and collagen protein)分子与Bcr-abl融合蛋白相互结合,进而激活Ras信号通路,导致造血细胞发生恶性转化。抑制Grb2-SOS复合物能

够抑制从病人体内分离出的CML细胞的增殖^[32]。阻断相关信号传导通路可以对CML的治疗有积极的作用。因此Grb2可作为针对CML治疗的有效药物靶点。

Grb2在大肠癌的远处转移灶中也有显著高表达^[33]。抑制Grb2可引起ERK和Akt蛋白的磷酸化水平明显下调。Grb2阻断后, 主要是通过降低ERK磷酸化水平(包括phospho-P44、phospho-P42)来实现肠癌细胞增殖的抑制。Grb2的抑制还能影响Akt信号传导通路, 使其下游信号传导途径被阻断, 进而使细胞发生凋亡^[34-35]。

4 Grb2的抑制剂

4.1 Grb2的结构域抑制剂

Grb2在结构上包含3个蛋白识别区域: 一个位于中央的SH2结构域和两个位于两侧的SH3结构域。随着Grb2在胞内信号传导通路, 尤其在各种癌症发生过程中的作用的研究逐渐深入, 发现Grb2的SH2和SH3结构域都可以作为药物的作用靶标来调控Grb2的功能。

由于Grb2的SH2结合域部位相对较小, 为防止含有酪氨酸磷酸化位点的蛋白发生降解或去磷酸化, 因此选择具有较高亲和力和选择性的小分子肽抑制剂是研发的主要方向^[36]。Liu等^[37]设计的Grb2 SH2结构域的抑制剂能抑制HER2/ErbB2过表达所引起的乳腺癌细胞增生, 这个化合物可阻断Grb2-SHC之间的相互作用。Soriano等^[38]研究表明, 其合成的Grb2 SH2抑制剂对肝细胞生长因子诱导的肝细胞增殖有很大的影响, 可抑制这些细胞的迁移及增殖。

Grb2的SH3结构域具有较高的稳定性, 这是因为该结构域不能发生可逆性磷酸化修饰^[39]。SH3结构域常位于聚脯氨酸螺旋构象中, 因此能够抵抗蛋白激酶, 在活细胞中具有很高的稳定性^[40]。Cussac等^[41]根据SOS中富含脯氨酸序列构建了一个二聚肽(Peptidimer-C)库, 进而筛选出与Grb2的2个SH3结构域有高亲和性的样品, 其在体外能够抑制Grb2与SOS的相互结合, 阻断Ras信号传导通路的发生, 其在体内能够抑制ER22细胞的增殖。Ye等^[42]发现, 上述二聚体与Grb2结合后具有细胞毒性, 在过表达Bcr-abl的K562细胞中, 可以下调cyclin A、Cdk2, 阻止细胞进入DNA的合成期, 阻止细胞的生长, 进而

激活caspase-3, 促使细胞发生凋亡。

4.2 Grb2的其他抑制剂

除了Grb2的结构域抑制剂之外, 现在还发现了用反义核酸方法合成的Grb2 mRNA抑制剂。Tari等^[43]合成了Grb2 mRNA的反义核酸, 并将其包裹于脂质体中形成L-Grb2。将L-Grb2转染入细胞后可抑制Bcr-abl阳性白血病细胞系的生长、分化。还有研究表明, L-Grb2也可以下调人乳腺癌细胞中Grb2的表达, 对乳腺癌细胞的生长有一定的抑制作用^[44]。

5 研究展望

Grb2蛋白作为一种衔接蛋白在细胞内的信号传导通路中扮演着十分重要的角色。Grb2蛋白不仅在信号通路的调节以及许多复杂的病理生理现象调控方面发挥重要作用, 而且在肿瘤等疾病治疗方面的作用也是不容小觑的。随着分子生物学技术的发展, 封闭Grb2可阻断细胞内相关信号通路, 抑制Grb2蛋白的表达、进而阻断细胞内下游信号传导通路的发生已经成为治疗肿瘤等相关疾病研究的新方向。选择构建出相应的小分子肽作为Grb2的SH2抑制剂是现阶段研发新型抗肿瘤药物的热门方向, 具有良好的发展前景。Grb2的SH3抑制剂研究已经得到了一定的进展, 后期的研究工作还需要长期和大量的临床试验。目前, 随着信号转导通路的基础研究在细胞与组织水平上的快速发展、各个学科之间的相互结合应用, 建立分子生物学模型和动物模型以及相应的临床研究, 研制出更有效的Grb2相关抑制剂是一种必然的趋势, 这将在抗肿瘤治疗中发挥更大的作用。以Grb2为靶点的治疗研究与传统的化疗方法相比具有毒性小且特异性强的特点, 因此, 以Grb2蛋白为靶点的治疗有更大的应用前景。

参考文献 (References)

- 1 Belov AA, Mohammadi M. Grb2, a double-edged sword of receptor tyrosine kinase signaling. *Sci Signal* 2012; 5(249): pe49.
- 2 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
- 3 Yu GZ, Chen Y, Wang JJ. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: Their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135(10): 1331-9.
- 4 Li LY, Li EM, Wu ZY, Cao HH, Shen JH, Xu XE, *et al.* Overexpression of GRB2 is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(6): 3132-40.

- 5 Sawyer TK. Src homology-2 domains: Structure, mechanisms, and drug discovery. *Biopolymer* 1998; 47(3): 243-61.
- 6 Chardin P, Cussac D, Maignan S, Ducruix A. The Grb2 adaptor. *FEBS* 1995; 369(1): 47-51.
- 7 Zhou SY, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, *et al.* SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993; 72(5): 767-78.
- 8 Farooq A, Plotnikova O, Zeng L, Zhou MM. Phosphotyrosine binding domains of Shc and insulin receptor substrate 1 recognize the NPXpY motif in a thermodynamically distinct manner. *J Biol Chem* 1999; 274(10): 6114-21.
- 9 Lin CC, Melo FA, Ghosh R, Suen KM, Stagg LJ, Kirkpatrick J, *et al.* Inhibition of basal FGF receptor signaling by dimeric Grb2. *Cell* 2012; 149(7): 1514-24.
- 10 Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, *et al.* Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 1993; 363(6424): 85-8.
- 11 Chardin P, Camonis JH, Gale NW, van Aelst L, Schlessinger J, Wiqler MH, *et al.* Human Sos1: A guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to Grb2. *Science* 1993; 260(5112): 1338-43.
- 12 Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. Raf meets Ras: Completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 1994; 19(7): 279-83.
- 13 Xu TR, Vyshemirsky V, Gormand A, von Kriesheim A, Girolami M, Baillie GS, *et al.* Inferring signaling pathway topologies from multiple perturbation measurements of specific biochemical species. *Sci Signal* 2010; 3(134): ra20.
- 14 Xu TR, Lu RF, Romano D, Pitt A, Houslay MD, Milligan G, *et al.* Eukaryotic translation initiation factor3, subunit α , regulates the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Mol Cell Biol* 2012; 32(1): 88-95.
- 15 Agazie YM, Movilla N, Ischenko I, Hayman MJ. The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3. *Oncogene* 2003; 22(44): 6909-18.
- 16 Birchmeier C, Birchmeier W, Cherardi E. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(12): 915-25.
- 17 Giubellino A, Burke TR Jr, Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12(8): 1021-33.
- 18 Gomez-Cambronero J. New concepts in phospholipase D signaling in inflammation and cancer. *Scient World J* 2010; 10: 1356-69.
- 19 Fadare O, Renshaw I, Olson SJ, Liang SX. The phosphatidylinositol 3'kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway in smooth muscle tumors of the uterus: Selected protein expression patterns and their clinicopathologic implications. *Int J Gynecol Pathol* 2011; 30(3): 244-51.
- 20 袁火忠, 黄兴伟, 谢敏明, 郭广秀. Grb2和mTOR在胃癌中的表达. *广东医学*(Yuan Huozhong, Huang Xingwei, Xie Mingming, Guo Guangxiu. The expression of Grb2 and mTOR in gastric cancer. *Guangdong Medical Journal*) 2011; 32(19): 2544-5.
- 21 李旭东, 王桂玉, 李桂岭. 生长因子受体结合蛋白2在膀胱移行细胞癌诊断中的应用价值. *中国医师进修杂志*(Li Xudong, Wang Guiyu, Li Guiling. The application value of Grb2 in diagnosing BTCC. *Chin J Postgrad Med*) 2012; 35(14): 8-11.
- 22 Watanabe T, Shinohara N, Moriya K, Sazawa A, Kobayashi Y, Oqiso Y, *et al.* Significance of the Grb2 and son of sevenless (Sos) proteins in human bladder cancer cell lines. *IUBMB Life* 2000; 49(4): 317-20.
- 23 Lucas-Fernández E, García-Palmero I, Villalobo A. Genomic organization and control of the *grb7* gene family. *Curr Genomics* 2008; 9(1): 60-8.
- 24 Anand N, Murthy S, Amann G, Wernick M, Porter LA, Cukier IH, *et al.* Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 2002; 31(3): 301-5.
- 25 Pinke DE, Lee JM. The lipid kinase P14KIII β and the eEF1A2 oncogene co-operate to disrupt three-dimensional *in vitro* acinar morphogenesis. *Exp Cell Res* 2011; 317(17): 2503-11.
- 26 Panasyuk G, Nemazany I, Filonenko V, Negrustkii B, El'skaya AV. A2 isoform of mammalian translation factor eEF1A displays increased tyrosine phosphorylation and ability to interact with different signalling molecules. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(1): 63-71.
- 27 胡端敏, 许朝, 诸琦. 生长因子受体结合蛋白2在人类真核翻译延长因子1A2促进胰腺癌发生发展中的作用. *中华消化杂志* (Hu Duanmin, Xu Chao, Zhu Qi. The effect of Grb2 in pancreatic cancer promoted by EEF1A2. *Chinese Journal of Digestion*) 2012; 32(12): 838-42.
- 28 Lim SJ, Lopez-Berestein G, Hung MC, Lupu R, Tari AM. Grb2 downregulation leads to Akt inactivation in heregulin-stimulated and ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene* 2000; 19(54): 6271-6.
- 29 Daly RJ, Binder MD, Sutherland RL. Overexpression of the Grb2 gene in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 1994; 9(9): 2723-7.
- 30 Verbeek BS, Adriaansen-Slot SS, Rijksen G, Vroom TM. Grb2 overexpression in nuclei and cytoplasm of human breast cells: A histochemical and biochemical study of normal and neoplastic mammary tissue specimens. *J Pathol* 1997; 183(2): 195-203.
- 31 Feller SM, Tuchscherer G, Voss J. High affinity molecules disrupting Grb2 protein complexes as a therapeutic strategy for chronic myelogenous leukaemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(3): 411-27.
- 32 Kardinal C, Konkol B, Lin H, Eulitz M, Schmidt EK, Estrov Z, *et al.* Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2-SoS complexes. *Blood* 2001; 98(6): 1773-81.
- 33 Yu GZ, Chen Y, Long YQ, Dong D, Mu XL, Wang JJ. New insight into the key proteins and pathways involved in the metastasis of colorectal carcinoma. *Oncol Rep* 2008; 19(5): 1191-204.
- 34 Oser M, Dovas A, Cox D, Condeelis J. Nck1 and Grb2 localization patterns can distinguish invadopodia from podosomes. *Eur J Cell Biol* 2011; 90(2/3): 181-8.
- 35 Yip SS, Crew AJ, Gee JM, Hui R, Blamey RW, Robertson JF, *et al.* Up-regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human breast cancer and correlation with Grb2 expression. *Int J Cancer* 2000; 88(3): 363-8.
- 36 Kessels HW, Ward AC, Schumacher TN. Specificity and affinity motifs for Grb2 SH2-ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(13): 8524-9.

- 37 Liu WQ, Vidal M, Olszowy C, Million E, Lenoir C, Dhotel H, *et al.* Structure-activity relationships of small phosphopeptides, inhibitors of Grb2 SH2 domain, and their prodrugs. *J Med Chem* 2004; 47(5): 1223-33.
- 38 Soriano JV, Liu N, Gao Y, Yao ZJ, Ishibashi T, Underhill C, *et al.* Inhibition of angiogenesis by growth factor receptor bound protein 2-*Src* homology 2 domain bound antagonists. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(10): 1289-90.
- 39 Nishida M, Nagata K, Hachimori Y, Horiuchi M, Oqura K, Mandiyan V, *et al.* Novel recognition mode between *Vav* and Grb2 SH3 domains. *EMBO J* 2001; 20(12): 2995-3007.
- 40 Kardinal C, Posern G, Zheng J, Knudsen BS, Moarefi I, Feller SM. Rational development of cell-penetrating high affinity SH3 domain binding peptides that selectively disrupt the signal transduction of *Crk* family adapters. *Amgen Peptide Technology Group. Ann N Y Acad Sci* 1999; 886: 289-92.
- 41 Cussac D, Vidal M, Leprince C, Liu WQ, Cornille F, Tiraboschi G, *et al.* A *Sos*-derived peptidimer blocks the *Ras* signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity. *FASEB J* 1999; 13(1): 31-8.
- 42 Ye YB, Lin JY, Chen Q, Liu F, Chen HJ, Li JY, *et al.* The cytotoxicity of a Grb2-SH3 inhibitor in *Bcr-Abl* positive K562 cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 75(11): 2080-91.
- 43 Tari AM, Gutiérrez-Puente Y, Monaco G, Stephens C, Sun T, Rosenblum M, *et al.* Liposome-incorporated Grb2 antisense oligodeoxynucleotide increases the survival of mice bearing *bcr-abl*-positive leukemia xenografts. *Int J Oncol* 2007; 31(5): 1243-50.
- 44 Tari AM, Hung MC, Li K, Lopez-Berestein G. Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in *ErbB2*, cells. *Oncogene* 1999; 18(6): 1325-32.