四川大学学报（医学版）
J Sichuan Univ（Med Sci Edi） 2015；46(4)：548－553

MKK6 过表达调控 SIRT1 影响食管癌细胞肿瘤行为学的体外研究

杨晓龙，胡开锋，刘明佳，任朋亮，陈利弘，刘　戟△

四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室（成都 610041）

【摘要】 目的 向食管癌 Eca109 细胞中转染 pcDNA3.1(＋)/myc-His A-丝裂原活化蛋白激酶 6(*MKK6*)重组过表达载体，观察过表达 MKK6 影响沉默信息转录调控因子(SIRT1)表达后肿瘤细胞增殖、凋亡以及侵袭力发生的变化，探讨 p38-MAPK-SIRT1 调节轴的存在性及其对 Eca109 细胞各项肿瘤行为学造成的影响。**方法** 根据 GenBank 中 *MKK6* 基因的 mRNA 序列设计引物，构建 *MKK6* 过表达载体；将 Eca109 细胞分空载体转染组、*MKK6* 过表达载体转染组、*MKK6*-*SIRT1* ShRNA 共转染组和 *MKK6*-RES(白藜芦醇)组，相应处理后，采用 Western blot 测定各组 Eca109 细胞的 SIRT1 及 MKK6 表达水平，MTT 法检测各组 Eca109 细胞的增殖活力，Transwell 法观察各组 Eca109 细胞的侵袭力，流式细胞术检测各组 Eca109 细胞的凋亡情况。**结果** 测序结果表明成功构建 *MKK6* 过表达载体；转染 *MKK6* 过表达载体可降低 Eca109 细胞的内源性 SIRT1 表达，减弱 Eca109 细胞的增殖活力，促其凋亡，同时可使 Eca109 细胞的侵袭力增强，以上各项改变均与 SIRT1 的表达水平有关。**结论** Eca109 细胞内可能存在 p38-MAPK-SIRT1 调节轴，MKK6 及其下游因子对 SIRT1 可能具有反馈调节作用，可引起 Eca109 细胞各项肿瘤行为学的变化。

【关键词】 MKK6　SIRT1　Eca109 细胞　细胞活力　细胞侵袭力　细胞凋亡　反馈调节轴

Study of Mechanism of Esophageal Cancer Development through *MKK6* Over-expression Regulated SIRT1 Expression Level

YANG Xiao-long, *HU Kai-feng*, *LIU Ming-jia*, *REN Peng-liang*, *CHEN Li-hong*, *LIU Ji*△. *Department of Biochemistry and Molecular Biology*, *West China School of Preclinical and Forensic Medicine*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: liuji6103@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the influence of silent information regulator of transcription 1 (SIRT1) level by regulation of *MKK6* over-expression in esophageal cancer cell Eca109, and then to explore the relationship between p38-MAPK-*SIRT1* axis and progressing of esophageal cancer. **Methods** *MKK6* over-expression vector was successfully constructed firstly. Then the divided Eca109 cells were treated according to four groups: empty vector group, *MKK6* over-xpression group(*MKK6* group), *MKK6*-*SIRT1* ShRNA group, *MKK6*-RES group. The expression of *MKK6* and endogenous *SIRT1* were tested by Western blot; cell proliferation capability was detected by MTT method; cell invasion force was observed by transwell method; and cell apoptosis was detected with flow cytometry. **Results** pcDNA3.1(＋)/myc-His A-*MKK6* over-expression vector was constructed successfully and proved by sequencing. *MKK6*'s over-expressing could reduce the expression of endogenous *SIRT1*. The viability of Eca109 cells was decreased. The increasing of invasion and apoptosis was observed. **Conclusion** There might be the p38-MAPK-*SIRT1* regulation axis in Eca109 cells and affecting on a series of physiological characteristics of Eca109 cells.

【Key words】 MKK6　SIRT1　Eca109　Cell activity　Cell invasion force　Cell apoptosis　Feedback regulation axis

食管癌是一种消化系统的常见恶性肿瘤，其发病率高，预后差，给国民经济和人民健康带来巨大危害，故深入探讨其发生、发展与转移的确切分子机制，具有重大意义。p38-MAPK 通路是细胞内重要的信号通路，其异常表达与肿瘤的发生、发展与转移有密切联系[1,2]。沉默信息转录调控因子(SIRT1)是依赖 NAD^+ 的组蛋白去乙酰酶，广泛分布于细胞内外，在细胞增殖、凋亡、衰老、炎症反应、新陈代谢等诸多生理过程中起重要调控作用，可影响肿瘤发生、发展、转移及各种肿瘤行为学[3,4]。有研究[5,6]提示细胞中存在 p38-SIRT1 调节轴，p38-MAPK 信号通路与 SIRT1 表达之间存在反馈调节关系。作为 p38 的上游激活因子，丝裂原活化蛋白激酶 6(MKK6)在食管癌中起到的作用鲜见报导，因此，我

△ 通讯作者，E-mail：liuji6103@scu.edu.cn

们在食管癌 Eca109 细胞中过表达 MKK6，观察其对 SIRT1 表达水平及对肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭力改变的影响，探讨 p38-MAPK-SIRT1 调节轴的存在性，期待为食管癌的防治提供新的思路。

1　材料和方法

1.1　材料

真核表达载体 pcDNA3.1(+)/myc-His A，pMD-19T 载体(TaKaRa)；*SIRT*1 ShRNA(上海吉玛公司)；*E. coli* BMTOP10 感受态细胞(北京博迈德生物公司)；食管癌细胞株 Eca109 由本学院免疫学教研室提供。RT Mu-MLV 逆转录酶(RNase H)试剂盒(MBI Fermentas，CAN)；TRIzol (Sigma，USA)；连接酶 *T*4 DNA Ligase，限制性内切酶 *Hin*d Ⅲ、*Xba* Ⅰ(MBI Fermentas，CAN)；质粒小量抽提试剂盒(OMEGA)；琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒(北京博迈德生物)；r*Taq*，1 kb DNA Marker、DL2000 DNA Marker (TaKaRa)；RPMI1640 液体培养基，胰蛋白酶(HyClone，USA)；标准胎牛血清(天津灏洋)；Lipofectamine™ 2000(Invitrogen，USA)；*SIRT*1 激活剂白藜芦醇(RES，Sigma，USA)；RIPA 细胞裂解液，ECL 发光底物显色液，预染的蛋白质 Marker(碧云天生物技术公司)；兔抗人 MKK6 多克隆抗体，兔抗人 SIRT1 多克隆抗体(Cell Signaling Technology，USA)；鼠抗人 β-actin 单克隆抗体(北京中杉金桥生物科技有限公司)；MTT(Sigma)；其他试剂均为国产(分析纯)。

1.2　实验方法

1.2.1　MKK6 过表达载体的构建　根据 GenBank 中 *MKK*6 的 mRNA 已知序列，找到开放阅读框并利用 Primer-5 软件设计引物。将设计好的引物在人类基因数据库中进行 BLAST 比较，确保其与其他基因无同源性。引物序列：F，5′-GCGATGGAACTTCGACTTTG-3′，R，5′-ACAGGTCCACATGGTCTTCC-3′，送上海生工合成。

培养 Eca109 细胞，提取总 RNA，并以其为模板 RT-PCR 扩增出 *MKK*6 目的片段，将片段连接到经 *Hin*d Ⅲ、*Xba* Ⅰ双酶切线性化后的过渡 T 载体[7,8]。测序完全正确的 T-*MKK*6 重组质粒经扩增，提取，酶切后连接到线性化后的真核表达载体 pcDNA3.1(+)/myc-His A(相同双酶切位点 *Hin*d Ⅲ、*Xba* Ⅰ)。重组质粒经双酶切鉴定，筛选阳性克隆后送华大基因测序，即得到 MKK6 过表达载体 pcDNA3.1(+)/myc-His A-*MKK*6。

1.2.2　过表达 MKK6 对 Eca109 细胞 SIRT1 表达水平及各项肿瘤行为学的影响

1.2.2.1　细胞分组　待 Eca109 细胞贴壁生长于含 10%FBS 的 DMEM 培养基后放置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中。当 Eca109 细胞融合度达到 70%～90%时，用 0.25%胰酶消化传代，2 mL PBS 清洗细胞 2 次。转染前 1 d，传代接种于 6 孔板中，用不含抗生素的 RPIM1640 培养基培养 24 h。将细胞分为 4 组〔空载体转染组，*MKK*6 过表达载体转染组(转染 pcDNA3.1(+)/myc-His A-*MKK*6)，*MKK*6-*SIRT*1 ShRNA 共转染组(转染 pcDNA3.1(+)/myc-His A-*MKK*6 和 *SIRT*1 ShRNA)，*MKK*6-RES 组(加入 *MKK*6 过表达载体同时加入 0.5 μmol/L RES)〕，利用脂质体 lipofecatmine2000 将 *MKK*6 过表达载体及相关共转染物同时共转入对应组 Eca109 细胞，置于 CO_2 培养箱 6 h 后换完全培养基继续培养。

1.2.2.2　Western blot 检测 MKK6 及 SIRT1 蛋白表达水平　待各组 Eca109 细胞生长至融合度达 70%～90%后于冰上提取蛋白，采用 Western blot 检测 MKK6 及 SIRT1 蛋白表达水平(以 β-actin 为对照)，分离胶浓度 150 g/L，浓缩胶浓度 50 g/L，65 V电泳 1 h，待蛋白进入分离胶，100 V 电泳 2 h。电泳后半干法转至 PVDF 膜，加 1∶1 000 稀释的兔抗人 MKK6 多克隆抗体及兔抗人 SIRT1 多克隆抗体 4 ℃过夜，再向 PVDF 膜加入 1∶10 000 稀释的辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗，37 ℃孵育 1 h。PVDF 漂洗后滴加 1 mL ECL 发光底物显色液(500 μL A 液+500 μL B 液)，凝胶成像仪下曝光拍照，扫描灰度值，以各条带与 β-actin 条带灰度值比值为蛋白相对表达量。

1.2.2.3　MTT 实验检测细胞增殖　于 96 孔板中接种 Eca109 细胞(5×10^3/孔，各组设 3 复孔)，于含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基中培养。另设空白对照组(含培养基和正常 Eca109 细胞)，37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养 24 h。每孔加入 MTT 溶液 20 μL，37 ℃继续培养 4 h 后弃去培养基，每孔加入 150 μL DMSO，震荡 10 min 后于酶标仪下检测 490 nm 波长处光密度(OD_{490})值。

1.2.2.4　Transwell 实验检测细胞侵袭力　6 孔板接种饥饿处理 12 h 后的 Eca109 细胞(5×10^5/孔)，待细胞融合度达到 80%～90%时按 1.2.2.1 方法分 4 组进行实验。转染 24 h 后取 400 μL 液化的 Matrigel，

加入 1 200 μL 冷无血清培养基充分混匀,每个 Transwell 小室内加入混合液 25 μL,37 ℃孵育 30 min。取 100 μL 细胞悬液与 200 μL 上层培养基混合均匀后加入 Transwell 小室。24 孔板下室加入下层培养基 700 μL,下层培养液和小室间无气泡培养细胞 24 h。取出小室倒掉原有培养液,PBS、ddH_2O 各洗 2 次。10%甲醇固定下室细胞 30 s,0.1%结晶紫摇床上染色 20 min。将染色后 Transwell 小室置于载玻片上,显微镜下随机选取 5 个适宜视野,取各视野平均细胞计数并进行统计分析。

1.2.2.5 流式细胞术测定细胞凋亡 按 1.2.2.1 方法分为 4 组进行实验,胰酶消化后每孔收集 1×10^6 个细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃培养液。PBS 洗 2 次,向 300 μL 预冷后的 PBS 重悬细胞中加入700 μL 4 ℃预冷无水乙醇混匀,4 ℃过夜固定。取过夜细胞悬液 800 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 洗 2 次,加入 200 μL RNase 溶液重悬细胞,37 ℃恒温放置 30 min 后加入 0.3 mL PI 染色液,避光染色20 min。于流式细胞仪上氩离子激发荧光 488 nm 下检测细胞凋亡率并进行统计分析。

1.3 统计学方法

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本 t 检验,$a=0.05$。

2 结果

2.1 *MKK6* 过表达载体转染后 Eca109 细胞中 MKK6 表达水平变化

克隆经酶切及测序鉴定结果证实重组质粒 pcDNA3.1(+)/c-myc His A-*MKK6* 构建成功。

各组 Eca109 细胞经转染后细胞内 MKK6 转录和翻译水平变化见图 1。结果显示,与其他组相比,转染 MKK6 过表达载体的 Eca109 细胞 MKK6 的表达水平升高($P<0.05$)。

2.2 Western blot 检测 MKK6 对 SIRT1 表达的影响

结果如图 2 所示,*MKK6* 过表达载体转染组 SIRT1 表达量低于空载体转染组($P<0.05$);与 *MKK6* 过表达载体转染组相比,*MKK6*-*SIRT1* ShRNA 共转染组 SIRT1 蛋白表达降低($P<0.05$);*MKK6*-RES 组 SIRT1 蛋白表达接近空载体转染组。

2.3 MKK6 过表达对 Eca109 细胞增殖活性影响

结果见图3。各处理组Eca109细胞增殖活性

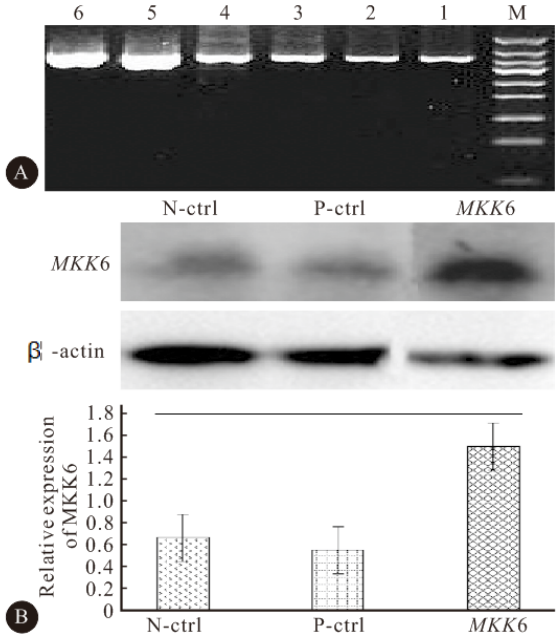

图 1 重组 pcDNA3.1(+)/c-myc His A-*MKK6* 载体转染 Eca109 细胞后 *MKK6* RT-PCR(A)及 Western blot 结果(B)

Fig 1 RT-PCR and Western blot results of pcDNA3.1(+)/c-myc His A-*MKK6* transfected Eca109 cell

1, 2, N-Ctrl: *MKK6*-*SIRT1* ShRNA group; 3, 4, P-Ctrl: *MKK6*-RES group; 5, 6, *MKK6*: *MKK6* over-expression group; M: Marker

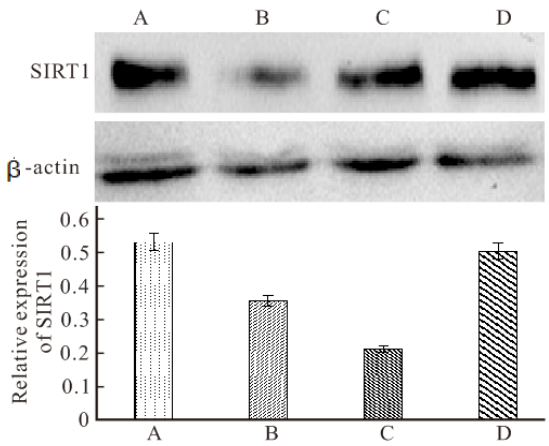

图 2 不同处理对 SIRT1 蛋白表达水平的影响

Fig 2 The effect of *MKK6* to SIRT1 protein expression after different treatments

A: Empty vetor group; B: *MKK6* over-expression group; C: *MKK6*-*SIRT1* shRNA group; D: *MKK6*-RES group

呈现如下趋势:*MKK6*-RES 组>空载体转染组>*MKK6* 过表达载体染组>*MKK6*-*SIRT1* ShRNA 共转染组,其中 *MKK6*-RES 组和 *MKK6* 过表达载体转染组与其它 2 组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 MKK6 过表达对 Eca109 细胞侵袭力的影响

通过 Transwell 实验结果我们发现,各组细胞侵袭力之间差异有统计学意义($P<0.05$),如图4

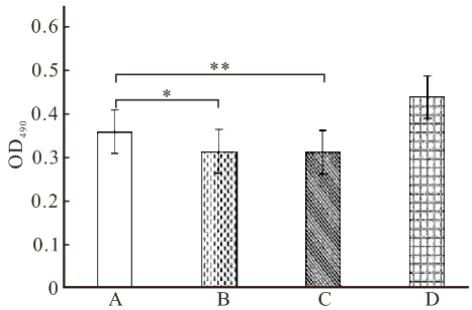

图 3　MTT 实验测定不同处理方式对 Eca109 细胞增殖活性的影响

Fig 3　Effect of different treatmtents on Eca109 cellular viability determined by MTT assay

A：Empty vector group；B：*MKK*6 over-expression group；C：*MKK*6-*SIRT*1 shRNA group；D：*MKK*6-*RES* group. * $P<0.05$，* * $P<0.01$

所示，*MKK*6-RES 组（401.4±2.5/视野）＞*MKK*6 过表达载体转染组（385.0±2.5/视野）＞*MKK*6-*SIRT*1 ShRNA 共转染组（52.0±2.4/视野）＞空载体转染组（37.7±2.3/视野）；其中空载体转染组、*MKK*6-*SIRT*1 shRNA 组与 *MKK*6 过表达载体组、*MKK*6-RES 组间差异有统计学意义（$P<0.01$）。

2.5　MKK6 过表达对 Eca109 细胞凋亡的影响

结果如图 5 所示，Eca109 细胞的凋亡率呈现 *MKK*6-*SIRT*1 ShRNA 共转染组（21.8%）＞*MKK*6 过表达载体转染组（16.1%）＞*MKK*6-RES 组（13.7%）＞空载体转染组（13.3%）。

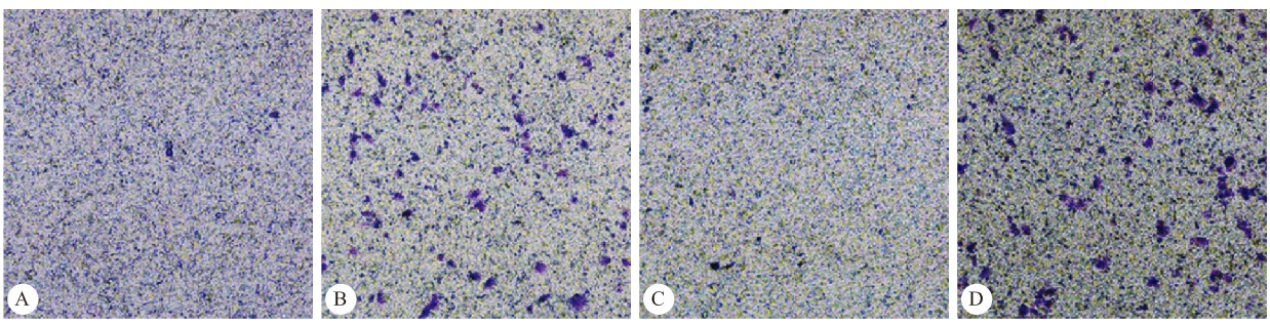

图 4　不同处理方式对 Eca109 细胞侵袭力的影响。×100

Fig 4　Effect of different treatment on Eca109 cellular invasion. ×100

A：Empty vector group；B：*MKK*6 over-expression group；C：*MKK*6-*SIRT*1 ShRNA group；D：*MKK*6-RES group

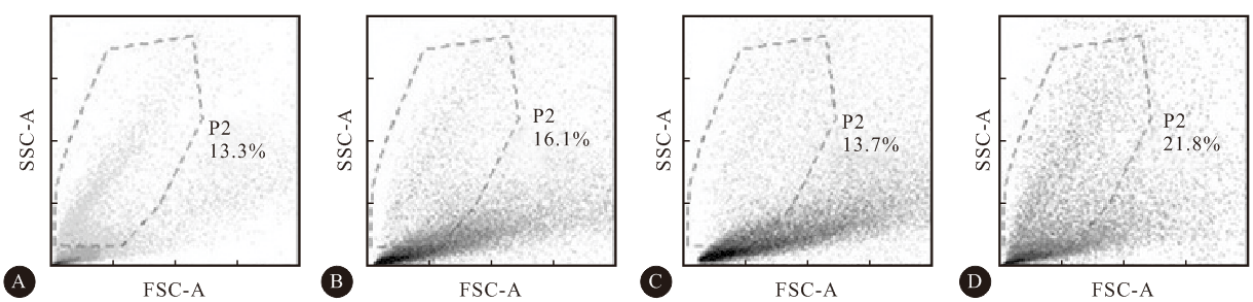

图 5　4 个处理组 Eca109 细胞凋亡情况

Fig 5　Effect of different treatments on Eca109 cellular apoptosis

A：Empty vector group；B：*MKK*6 over-expression group；C：*MKK*6-RES group；D：*MKK*6-*SIRT*1 ShRNA group

3　讨论

信号转导通路参与细胞各项生理进程，与肿瘤的发生、发展密切相关。p38-MAPK 通路是一条保守的应激信号转导通路，在肿瘤增殖、凋亡、侵袭等众多生物学进程中均发挥重要作用。该信号转导途径在神经元细胞中最早被发现具有诱发凋亡的作用。随后科研工作者们又在胃癌、卵巢癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞中取得了一系列相关进展[9,10]。本实验拟采用分子生物学手段增强外源性 MKK6 表达，从而激活 p38-MAPK 通路，深入探索 p38-MAPK 通路在食管癌发生、发展及转移中可能存在的作用机制。

本研究结果显示，MKK6 在食管癌细胞 Eca109 中的持续激活能够减弱其增殖活力，而这种作用受制于细胞内 SIRT1 的表达水平。当我们用 SIRT1

的激活剂(0.5 μmol/L RES)增强 SIRT1 表达后 Eca109 细胞增殖活力加强,相反,增强 MKK6 表达的同时,抑制 SIRT1 表达,细胞增殖能力会进一步被减弱。MKK6 在 Eca109 细胞的过表达能够显著促进细胞发生侵袭转移,而这种促进迁移的作会受到 SIRT1 表达的干扰,当 SIRT1 表达被共转染进一步抑制时 Eca109 细胞的迁移能力变化不大,但当 RES 刺激使 SIRT1 表达增强时 Eca109 细胞的迁移能力则明显下降,基本回复原有水平。MKK6 的持续激活可以促进 Eca109 细胞的凋亡,并且这种作用受内源性 SIRT1 表达的显著影响:抑制 SIRT1 表达可增强 MKK6 过表达对食管癌 Eca109 细胞的促凋亡作用,激活 SIRT1 表达可能逆转 p38-MAPK 信号通路激活所导致的对 Eca109 细胞凋亡的促进作用。

以往有研究结果表明:侵袭转移是肿瘤致命的主要原因[11,12],也是肿瘤防治的最大挑战,目前对恶性肿瘤转移复发的具体机制仍不甚清楚,推测可能与多种转录因子及细胞受体活性有关,而食管癌中 p38-MAPK 通路活化对肿瘤细胞侵袭力的影响还有待研究确证。本实验结果初步显示 MKK6 过表达可减弱 Eca109 细胞的活力,促进 Eca109 细胞的凋亡及发生侵袭转移。通常来说随着癌症的进展,肿瘤细胞增殖显著增强,其细胞活力一般与侵袭力变化呈同向变化,但需要注意的是,所谓细胞活力是指细胞群体中活细胞占全部细胞的百分比。细胞侵袭力是指瘤细胞向局部侵犯或远处转移的能力,而细胞凋亡率是指细胞群体中发生凋亡的细胞占全部细胞群体的比例。细胞活力、侵袭力和凋亡率这三者并不是同一个概念,理论及临床实践中三者都可出现变化趋势不同步的情况。本研究结果也证实了此点,即 p38-MAPK 通路活化导致食管癌发展过程中可能发生肿瘤细胞增殖显著下降,凋亡率明显增高,但其侵袭转移能力却增强的现象,具体机制尚有待研究,推测可能与肿瘤细胞在体内外环境应激条件下的"自身调整"有关。故 MKK6 过表达对 Eca109 细胞侵袭力的具体作用机制仍有待进一步研究。

表观遗传学调控网络联系了 DNA、RNA、组蛋白、染色质重构等多水平调控,既往基础研究大多集中在食管肿瘤抑癌基因的甲基化水平上,涉及组蛋白乙酰化的研究相对较少,组蛋白表观遗传学修饰在肿瘤尤其是食管癌研究领域或将成为新的方向和热点[13]。近年 Eads 等[14]发现表观遗传学的异常改变在食管癌的发生过程中起重要作用,研究提示人体内可能存在 p38-MAPK-SIRT1 反馈调节轴系统。故我们可探讨食管癌发病机制中是否存在这样的反馈调节轴系统对其发生机制研究有重要意义。

SIRT1 属于 Sirtuin 家族中组蛋白Ⅲ类去乙酰化酶,是酵母沉默信号调节因子 2(silencing information regulator 2,sir2)在人体中的类似物。Sirtuin 蛋白广泛分布于细胞内外,对诸多正常的生理学过程起到调节作用。本实验通过控制 SIRT1 的表达,探索其对 p38-MAPK 通路的影响。结果显示:SIRT1 的表达抑制能够降低 Eca109 细胞的活力,对各组细胞凋亡率的检测结果也呈现上述趋势,而 MKK6 在 Eca109 细胞的过表达能够显著促进该细胞的侵袭力,该作用通过对 SIRT1 表达的抑制明显增强,证明食管肿瘤细胞中同样也存在 p38-MAPK-SIRT1 反馈调节轴。

本研究的重要发现为:MKK6 能显著降低内源性 SIRT1 的表达水平,MKK6 在食管癌中的作用是通过调节 SIRT1 的表达水平而实现。进一步提示了 p38-MAPK 通路在肿瘤发展中的重要作用,从另一个层面证明了食管癌发展过程中 p38-MAPK-SIRT1 调节轴的存在,为研究信号转导通路及表观遗传学修饰在癌症进展中所起到的作用提供了新的思路,但其具体作用机制还需要做进一步的研究。

参 考 文 献

1 Haper SJ, LoGrasso P. Signaling for survival and death in neurons: the role of stress activated kinase, JNK and p381. Cell Signal,2001;13(5):299-310.

2 Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Biochim Biophys Acta,2007;1773(8):1358- 1375.

3 Zeng L, Chen R, Liang F, *et al*. Silent information regulator, Sirtuin1 and agerelated diseases. Geriatr Gerontol Int,2009;9(1):7- 15.

4 Kaeberlein M, McVey M, Guarente L, *et al*. The SIRT2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. Genes Dev,1999;13(19):2570-2580.

5 Hong E, Lee S, Kim J, *et al*. Ionizing radiation induces cellular senescence of articular chondrocytes via negative regulation of SIRT1 by p38 kinase. J Biol Chem,2010;285(2):1283-1295.

6 Marampon F, Gravina GL, Scarsella L, *et al*. Angiotensin-converting-enzyme inhibition counteracts angiotensin Ⅱ-mediated endothelial cell dysfunction by modulating the p38/SirT1 axis. J Hypertens,2013;31(10):1972-1983.

7 Ohsugi T, Kumasaka T, Urano T, *et al*. Construction of a full-length human T cell leukemia virus type 1 genome form MT-2 cells containing multiple defective proviruses using overlapping polymerase chain reaction. Anal Biochem, 2004; 3(92): 281-288.

8 Kawata Y, Yano S, Kojima H, *et al*. Construction of a genomic DNA library by TA cloning. Biotechniques, 1998; 24(4): 564-565.

9 Morrazzani M, de Carvalbo DD, Kovacic H. Monolayer versus aggregate balance in survival process for EGF-induced apoptosis in A431 carcinoma cells: implication of ROS-p38-MAPK-integrin alpha2 betal pathway. Int J Cancer, 2004; 110(6): 788-799.

10 Ting Z, Yong Z, Jia Z, *et al*. β-Elemene inhibits proliferation of human glioblastoma cells and causes cell-cycle G0/G1 arrest via mutually compensatory activation of MKK3 and MKK6. Int J Oncol, 2011; 38(2): 419-426.

11 Ren HB, Li ZS, Xu GM, *et al*. Dynamic changes of mitogen-activated protein kinase signal transduction in rats with severe acute pancreatitis. Chin J Dig Dis, 2004; 5(3): 123-125.

12 Gills JJ, Castillo SS, Zhang C, *et al*. Phosphatidylinositol ether lipid analogues that inhibit AKT also independently activate the stress kinase, p38alpha through MKK3/6-independent and dependent mechanisms. J Biol Chem, 2007; 282(37): 27020-27029.

13 Tachimori Y, Nagai Y, Kanamori N, *et al*. Pattern of lymph node metastases of esophageal squamous cell carcinoma based on the anatomical lymphatic drainage system. Dis Esophagus, 2011; 24(1): 33-38.

14 Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, *et al*. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. Cancer Res, 2001; 61(8): 3410- 3418.

(2015－04－27 收稿，2015－05－28 修回)

编辑　汤　洁

本　刊　征　稿　启　事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊，曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届国家期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖，2014 中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE)，《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS, BA)，《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS, CA)，荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM)，中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)，中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc)，中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)，中国学术期刊网全文数据库(CNKI)，中国学术期刊(光盘版)，万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流，促进医药卫生事业的发展，凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约)，均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿，编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用，刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址：http://scdx.cnjournals.com

地址：四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码：610041

电话/传真：(028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部