

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00613

PTEN 抑制胚胎原肠胚形成期 EMT 的过程

李艳¹, 王晓钰¹, 王丽京², 徐涛², 卢晓晔¹, 蔡冬青¹, 耿建国², 杨雪松¹

1. 暨南大学再生医学教育部重点实验室, 医学院组织与胚胎学系, 广州 510632;
2. 广东药学院血管生物学实验室, 广州 510224

摘要: *PTEN*(Phosphatase and tensin homolog)是一种重要的抑癌基因, 具有非常广泛的生物学活性, 例如在细胞的生长发育、迁移、凋亡和信号传导等均发挥重要作用。*PTEN* 基因表达始于在胚胎早期的上胚层, 而后主要出现在神经外胚层和胚胎中胚层结构, 表明 *PTEN* 可能参与胚胎早期发育过程的细胞迁移、增殖和分化。文章主要应用在体改变早期胚胎 *PTEN* 的表达水平来观察其对上胚层至中胚层细胞转换—EMT (Epithelial-mesenchymal transition)的作用。首先, 原位杂交结果提示, 内源性 *PTEN* 表达在原条以及之后的中胚层细胞结构如体节等。在体 *PTEN* 转染实验, 体外培养至 HH3 期的鸡胚胎, 转染 Wt *PTEN*-GFP 或移植 Wt *PTEN*-GFP 原条组织至未转染的同时期的宿主胚胎相同部位后, 观察到 *PTEN* 转染细胞大都由上胚层迁移至原条并滞留于原条, 不再参与中胚层细胞形成。移植实验也得到相似结果, 发现在 Wt *PTEN*-GFP 阳性原条组织移植后很少细胞迁移出原条。另外在原肠胚期 *PTEN* siRNA 降调胚胎一侧 *PTEN* 基因后, 降调侧中胚层细胞数明显少于正常侧。上述研究结果均提示 *PTEN* 基因在胚胎原肠胚期三胚层形成过程中可能具有抑制 EMT 的作用。

关键词: EMT; *PTEN*; 基因表达; 细胞迁移; 原肠胚形成

PTEN impedes EMT during chick embryo gastrulation

LI Yan¹, WANG Xiao-Yu¹, WANG Li-Jing², XU Tao², LU Xiao-Ye¹, CAI Dong-Qing¹, GENG Jian-Guo², YANG Xue-Song¹

1. Key Laboratory for Regenerative Medicine Ministry of Education, Division of Histology & Embryology Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Vascular Biological Laboratory, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224, China

Abstract: *PTEN* has been considered as one of the important anti-oncogenes, which possesses very wide biological activities. Endogenous *PTEN* genes begin to express in epiblast during chick embryo gastrulation, and then the expression extends to neural plate and mesoderm. This suggests that *PTEN* might be involved in cell migration, proliferation, and differentiation during early embryo development. In this study, we employed *in vivo* approach to explore if endogenous *PTEN* participates in EMT (Epithelial-mesenchymal transition) in early chick embryo. *PTEN* was initially detected to highly express in primitive streak during chick gastrulation, in which EMT occurs, and subsequently mesoderm structure such as somites etc. Then, overexpression of both Wt *PTEN*-GFP and Wt *PTEN*-GFP positive transplantation of primitive streak resulted in cell accumulation in primitive streak in the development hereafter, indicating that EMT was blocked in both of our assays, either whole embryo transfection of Wt *PTEN*-GFP or transplantation of Wt *PTEN*-GFP primary streak tissue. Finally down-regulation of *PTEN* gene in one side using *PTEN* siRNA led to reduce the more number of mesoderm cells in

收稿日期: 2010-10-29; 修回日期: 2011-01-04

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(编号: 2010CB529702), 国家自然科学基金项目(编号: 30971493, 编号: 31071054)和中央高校基本科研业务费专项资金(编号: 21610601)资助

作者简介: 李艳, 硕士研究生, 专业方向: 早期胚胎发育。E-mail: li_yan_lee@126.com

通讯作者: 杨雪松, 教授, 博士生导师, 研究方向: 发育生物学与细胞生物学。E-mail: yang_xuesong@126.com

PTNE siRNA side than normal side, which suggests that *PTEN* gene is probably involved in regulating EMT process in development of early embryonic gastrulation.

Keywords: EMT; *PTEN*; gene expression; cell migration; gastrulation

PTEN (Phosphatase and tensin homolog)在 1997 年被克隆^[1], 是最早发现的具有磷酸酶活性的抑癌基因, 同时具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶活性, 在多种类型的细胞中有抑制细胞增殖与分化的作用^[2, 3]。*PTEN* 脂质磷酸酶的活性大都通过三磷酸磷脂酰肌醇 (PtdIns(3, 4, 5)P₃, PI3P)信号介导, 作为 PI3K/AKT 信号通路的一部分, 在细胞存活、生长、增殖、分化和迁移中发挥重要作用^[3, 4]。

上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞在一些因素的作用下, 失去极性及细胞间紧密连接和黏附连接, 获得了浸润和游走迁移能力, 变成具备间质细胞形态和特性的细胞。EMT 与肿瘤细胞的原位侵袭和远处转移有着密切的关系^[5], 最新研究表明: EMT 在调控乳腺癌和胰腺癌中均具有重要作用^[6, 7]。

胚胎原肠胚期细胞不断增殖、分化和迁移, 其中一个重要的细胞形态转变过程为 EMT, EMT 最早被描述在胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞所发生的形态学改变。在胚胎早期发育过程中, EMT 存在于整个胚层分化发育进程中, 以发生在上胚层细胞经过原条转变为中胚层细胞为典型特征。原条是胚胎发育中形成的第一个有形结构^[8]。在原肠胚时期, 上胚层细胞向原条中间凹陷形成中胚层和内胚层, 上皮样细胞与间充质样细胞的形态转变, 包括 EMT 和 MET, 是决定胚胎发育是否成功的重要环节。研究表明, 哺乳动物的胚胎发育过程中 EMT 可见于器官形成、胚层分化、神经系统分化等, 但是 EMT 相关的调控过程却所知甚少^[9, 10]。本实验主要关注早期表达的 *PTEN* 是否参与调控胚胎原肠胚 EMT 过程, 从而为 *PTEN* 在胚胎早期发育和肿瘤发生中的作用提供新的理论支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

海南褐新鲜种鸡蛋(华南农业大学正大肉鸡

发展中心)。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取和 *PTEN* 探针制备

DH5α 大肠杆菌感受态 (TaKaRa)转化 *chick pten*(Nick R. Leslie 提供)质粒, 并提取质粒(北京天根生化科技有限公司)。

探针制备: (1) DNA 线性化体系为 20 μL, 包括: 8 μL 模板(*chick pten*), 2 μL 内切酶 *Bam*H I (NEB), 2 μL buffer3, 0.2 μL BSA×100, 7.8 μL RNA free water。反应条件为: 37 °C 酶切 2 h。(2) 用 DNA 回收纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司)对线性化质粒进行纯化。(3) RNA 转录体系(20 μL): 5 μL 线性化 *chick pten*, 2 μL MixNTP(Roche), 2 μL 10×transcription buffer(Roche), 1 μL RNase Inhibitor(Roche), 2 μL T3 RNA Polymerase(Roche), 8 μL RNA free water。反应条件为: 37 °C 转录 2 h。(4)RNA 纯化: 冰上加入 2 μL 0.2 mol/L EDTA(pH=8) 终止反应; 加入 2.5 μL 4 mol/L LiCl 和 75 μL 100%预冷的乙醇, 沉淀; 混匀, -20 °C 过夜; 14 000 r/min, 4 min 去除上清, 加入 200 μL 70%乙醇洗 2 次, 敞口待乙醇挥发; 20 μL DEPC 水溶解(也可用甲酰胺收集);

1.2.2 胚胎整体原位杂交

整体胚胎经 4%多聚甲醛 4 °C 固定过夜, PTW 冲洗, 浓度梯度为 25%、50%、75%甲醇/PTW 脱水, 100%甲醇冲洗, 保存于 100%甲醇中。

胚胎依次经过浓度梯度为 75%、50%、25%的甲醇/PTW, 用 PTW 冲洗 4×5 min。用 1 mL 1:1 PTW/hybridization buffer 洗 1×5 min, 1 mL hybridization buffer 洗 1×5 min, 胚胎置于 1 mL hybridization buffer 中, 65 °C, 至少 1 h。80 °C 预热探针 5 min, 加入胚胎瓶中, 65 °C 过夜; 回收探针, 65 °C 预热的 post hybridization buffer 冲洗约 2 h; 1:1 预热的 post hybridization buffer/TBST 洗 1×20 min; 室温下, TBST 冲洗约 2 h。封闭液(2% Boehringer blocking re-

agents(Roche))室温封闭至少 2 h。Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments(1:1000 Roche)4 过夜。TBST 冲洗 3×1 h, AP buffer 洗 2×10 min, 用 3.5 μ L+4.5 μ L/1 mL AP buffer 避光显色。

1.2.3 电穿孔法转染整体胚胎

EC Culture 方法体外培养早期鸡胚胎^[11], 待发育至 HH3-HH4 期。将 5 μ L 质粒(浓度为 1.2 μ g/ μ L)注入卵黄膜和外胚层之间, 将电极分别放在原条的两侧, 调节电转仪(ECM309 Electroporation System(BTX))电压为 10 V, 电击次数为一边各两次。

对照表达载体 pEGFP-N1 主要原件构成: 启动子 CMV; EGFP 编码区; SV40 表达抗原区; 大肠杆菌限制性筛选位点等。Wt *PTEN*-GFP(Nick R. Leslie 提供)的表达载体是 EGFP-C1, 其启动子也为 CMV, 与对照表达载体相同。

1.2.4 异体移植原条

供体胚胎是电转后荧光表达在原条上的胚胎, 宿主胚胎是正常发育至 HH3 期左右的胚胎。先切取一小块宿主胚胎原条组织(以原条宽度为边长标准的正方形), 然后将供体胚胎有荧光的部分原条移植到宿主胚胎的原条部分, 注意移植的组织块应与宿主切去的原条组织块大小相当, 移植后部原条的迁移模式为参与后部暗区形成。移植成功后继续放入

37 培养箱培养, 并间隔时间拍照观察(MVX10 体视荧光倒置显微镜(Olympus))。

1.2.5 RNAi 降调 *PTEN* 基因

EC Culture 体外培养胚胎至 HH3 期, 将 5 μ L 浓度为 1 μ mol/L *PTEN* siRNA(Dharmacon)显微注射到卵黄囊膜与外胚层之间, 电穿孔方法导入细胞内, 电穿孔条件见 1.2.3。

1.2.6 胚胎整体免疫荧光

整体胚胎 4%多聚甲醛 4 固定过夜, PBS(pH 7.4)冲洗 3 次, PBT(2%BSA, 1% Triton, 1%Tween-20/PBS)-NGS(9:1)封闭, 室温 2 h。一抗 anti-Lim2(DSHB)用 PBT-NGS 以 1:100 的比例稀释, 4 过夜, PBT 冲洗 4×30 min, 荧光二抗 Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(Invitrogen)用 PBT-NGS 以 1:1000 比例稀释后, 4 过夜。

2 结果与分析

2.1 *PTEN* 在早期鸡胚胎中正常表达

选择不同发育时期的胚胎进行整体原位杂交实验并在荧光体视显微镜下拍照(图 1)。随后采用 7.5%明胶和 15%蔗糖包埋法包埋, 最后进行胚胎的冰冻切片(CM1900 型冷冻切片机(Leica)), 切片厚度为 20 μ m。

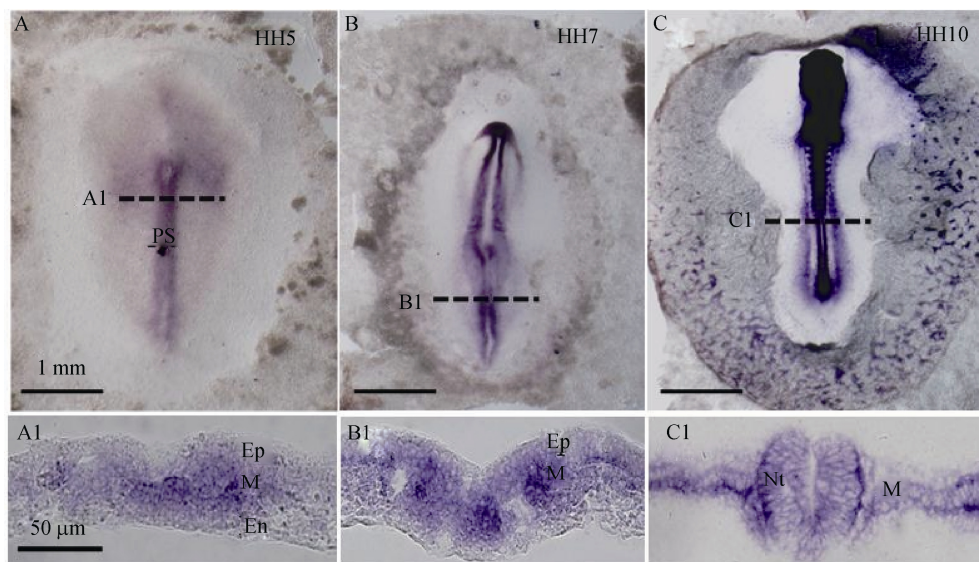


图 1 *PTEN* 在早期鸡胚中的正常表达

A, B, C: 胚胎整体原位杂交, A1, B1, C1: 分别为横切面图示。显示 *PTEN* 在胚胎早期原条(PS)中外胚层开始表达(Ep), 在中胚层(M)也有表达, 内胚层(En)几乎没有表达; 在 HH10 期时在神经管(Nt)及侧板中胚层中有较强的表达。

结果表明, 内源性 *PTEN* 基因在早期原条开始表达, 主要集中在外胚层和中胚层(图 1: A1), 随着胚胎的发育, *PTEN* 表达范围扩大, 在头部、神经管以及体节等结构中均有表达(图 1: C)。提示 *PTEN* 基因可能在胚胎三胚层形成和后期发育过程中发挥重要作用, 参与调控胚胎发育的 EMT 过程。

2.2 整体胚胎过表达 *PTEN* 基因抑制 EMT 过程

电穿孔法转染整体胚胎实验发现, 转染 pEGFP-N1 后, 细胞可经过 EMT 过程迁移至中胚层(图 2: D1, D1'), 表明 EMT 过程正常; 而转染 Wt *PTEN*-GFP 后, 细胞很少迁出原条, 且多滞留于外胚层(图 2: F1, F1')。统计结果表明, 约 90% 的胚胎过表达 *PTEN* 基因后其 EMT 过程受到抑制(图 2: G)。

2.3 异体移植过表达 *PTEN* 原条组织导致细胞迁移障碍

原条组织异体移植实验排除了原有组织所处体内环境的影响, 可直观检测细胞迁移动态以及 *PTEN* 在 EMT 过程的作用, 更便于观察 EMT 过程。

采用同样电转染的方法转染整个原条组织, 5~6 h 后将转染有荧光的原条组织切下, 移植到 HH3 期左右的宿主胚胎上, 移植的后部原条正常的迁移模式是向胚胎后部迁移, 参与血管发生的进程(图 3: A)。结果显示: 异体移植 pEGFP-N1 转染原条组织后, 携带 GFP 的细胞参与正常迁移, 其后部迁移至暗区形成血岛(图 3: D1); 而移植过表达 *PTEN* 原条组织后, 约 97% 的细胞迁移受到抑制, 很少迁移出原条, 更不参与血岛形成(图 3: G1)。

2.4 降调 *PTEN* 基因后 EMT 过程受到抑制

电穿孔方法导入 *PTEN* siRNA 后, 胚胎整体原位杂交显示降调侧 *PTEN* mRNA 表达下降(图 4: A), 随后 lim2(标记中胚层细胞)的整体免疫组化(图 4: B, C)和切片表明降调侧中胚层细胞数与对照侧相比明显减少, 说明 *PTEN* 基因降调后抑制 EMT 过程, 从而导致同侧中胚层细胞数下降(图 4: D, E, F)。

3 讨论

Wt *PTEN* 是 *pten* 家族野生型, 同时具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶活性。*PTEN* 具有的脂质磷酸酶活性, 可通过调节磷脂酰肌醇-3, 4, 5 三磷酸(PIP₃)水

平而调控细胞的生长、分化及凋亡等^[5]; 同时具有的蛋白质磷酸酶活性, 通过影响黏着斑激酶和 SH₂ 包含蛋白的磷酸化, 调节细胞的运动、黏附及迁移等多项生物功能^[12]。*PTEN* 调控 EMT 过程可能通过钙粘蛋白(cadherin)或连环蛋白(catenin)复合体 α -和 β -catenin 的分离和 PIP₃ 的脱磷酸作用来实现^[13, 14]。在 EMT 发生的过程中, 上皮细胞的细胞间粘附性降低, 表现为细胞间粘附蛋白 E-Cadherin、 α -catenin 等的表达减弱, N-Cadherin、slug 等表达增强, 从而实现从上皮到间充质的转化。在胚胎原肠胚期发生 EMT 过程是多个因子、多种信号通路作用的结果。研究报道 FGF、PDGF、VEGF 等细胞因子及 Wnt、PTEN/PIP₃、Notch 等信号通路在胚胎早期发育过程中都具有重要的调控作用^[15, 16]。*PTEN* 作为抑癌基因在 EMT 过程中的作用更是值得关注。

本实验合成鸡胚 *PTEN* 探针, 利用整体胚胎的原位杂交技术, 观察到在胚胎早期 *PTEN* 基因 mRNA 主要在外胚层表达, 随着胚胎发育的进行, 在中胚层结构中也有较强表达, 根据胚胎发育的时空性可以推测 *PTEN* 基因在胚胎早期的 EMT 过程中发挥着重要的调控作用。目前在鸡胚胎中转染效率最高的方法是电转染法, 虽然存在一定的物理性损伤, 但经过探索, 本实验建立了比较完善和高效的电转染体系, 为实验顺利进行提供了保证。原肠胚期正常的上胚层细胞通过原条是一个 EMT 的过程, 经电转染过表达 Wt *PTEN* 后观察到细胞大都停留在上胚层或原条而并未进入中胚层, 表明 *PTEN* 过表达使原肠胚期的 EMT 过程受阻。为了排除细胞周围环境的影响, 进一步采用异体移植实验证实移植的 Wt *PTEN*-GFP 细胞基本上不参与原条上细胞迁移, 从而佐证了过表达 *PTEN* 后胚胎发育过程中的 EMT 过程受阻。同时我们还利用 RNAi 技术降调了 *PTEN* 基因, 发现 *PTEN* siRNA 可以在鸡胚中发挥较好的降调效果, 通过整体胚胎的免疫荧光实验观察到降调 *PTEN* 基因后中胚层数明显减少。以上研究结果均证实 *PTEN* 基因在胚胎原肠胚时期的 EMT 过程中发挥重要的抑制作用。结合文献推测其机制可能是: *PTEN* 作为重要的控制基因在胚胎早期发育的 EMT 过程中, 可以阻断 PI3K/AKT 信号通路, 继而下调转录因子 snail/slug 和细胞粘附分子 E-Cadherin, 抑制 EMT 过程的发生。最近有研究表明, NF- κ B/Snail/RKIP/PTEN 通路与 EMT

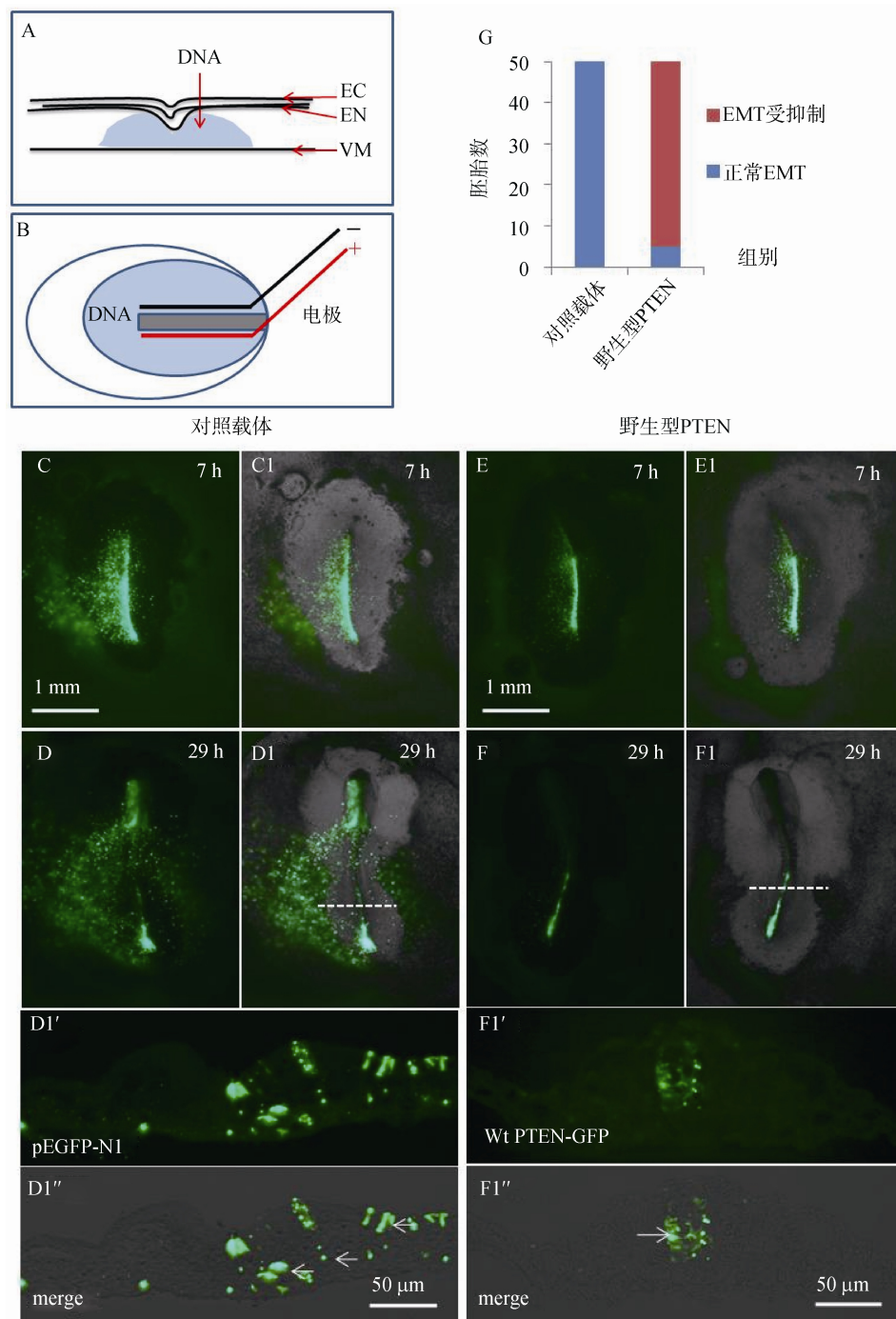


图 2 转染 pEGFP-N1 和 Wt PTEN-GFP 后的细胞迁移情况

A: 为显微注射时胚胎三胚层结构图及质粒注射位置(EC:外胚层; EN:内胚层; VM: 卵黄囊膜); B: 为电穿孔转染法的操作示意图。C、D 和 E、F 分别为转染 pEGFP-N1 和 Wt PTEN-GFP 后 7 h 和 29 h 细胞迁移情况, C1、D1 和 E1、F1 为分别合成的图片, D1'、D1''和 F1'、F1''分别为 D1 和 F1 虚线处的切片。结果显示: 转染 pEGFP-N1 后细胞参与正常迁移, 经过 EMT 过程进入中胚层(图 D1''箭头所示); 转染 Wt PTEN-GFP 后, 细胞迁移受到抑制, 滞留于上胚层中, EMT 过程受到抑制。G: 为正常 GFP 组和 PTEN 组 EMT 过程受到抑制情况统计图。

的发生过程密切相关^[17], *PTEN* 基因在癌细胞转移中也发现类似胚胎存在大量的 EMT 过程^[7,21]。这些研究将有助于深入阐明 *PTEN* 基因在 EMT 发生过程中的调

控机制, 同时也为肿瘤的研究提供一个新的途径。

在实验过程中实验方法的建立和实验条件的稳定是顺利实施试验的保障。在参考国内外文献并根

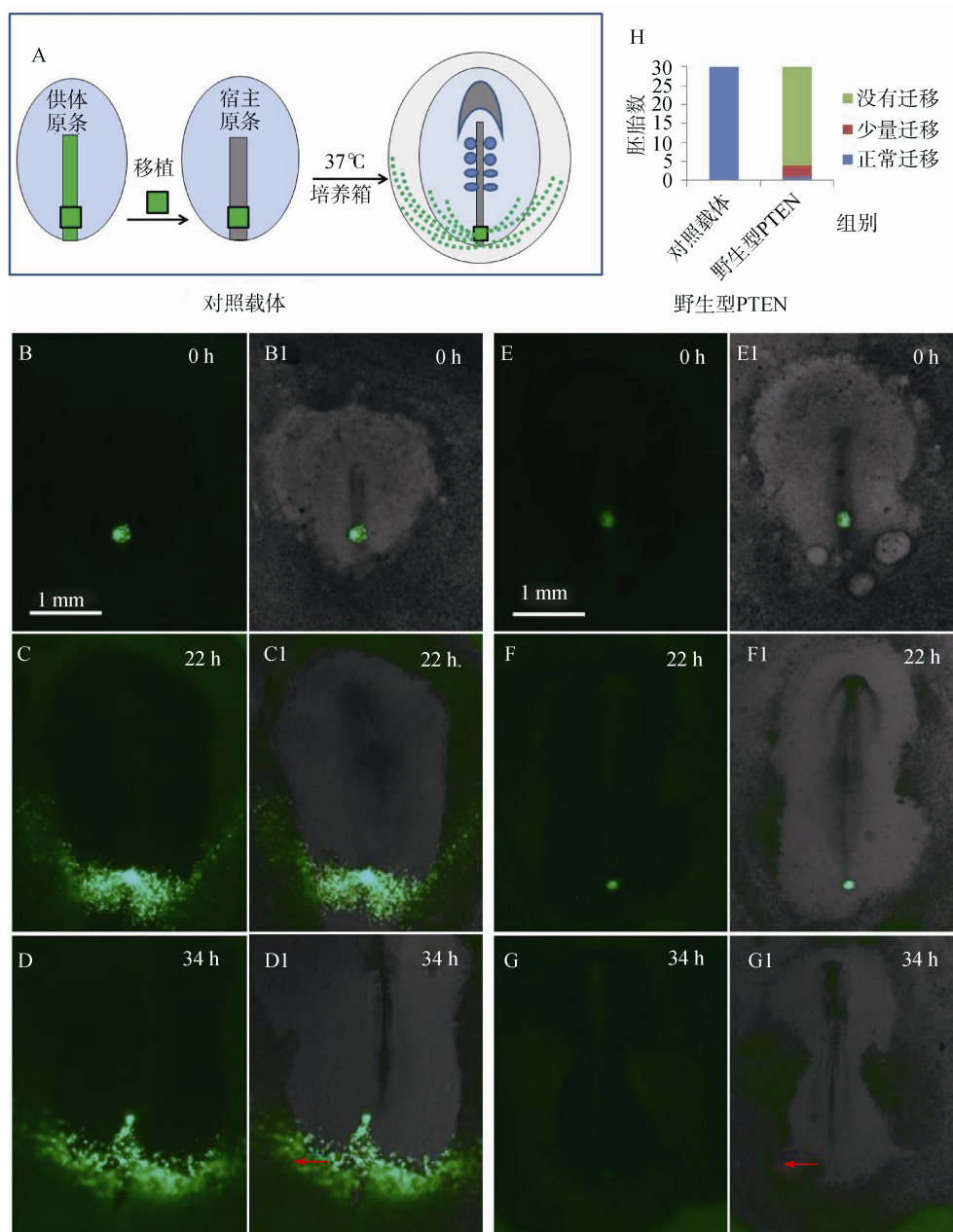


图3 移植 pEGFP-N1 和 Wt PTEN-GFP 后细胞迁移情况

A: 为早期原条移植示意图和后部原条迁移模式图(ps: 原条; donor: 供体; host: 宿主)。B-B1, C-C1, D-D1 和 E-E1, F-F1, G-G1 分别为移植 pEGFP-N1 和 Wt PTEN-GFP 后细胞参与原条迁移情况, 结果显示: 移植 pEGFP-N1 后部原条迁移至暗区, 参与血岛形成(图 D1 箭头所示); 移植 Wt PTEN-GFP 后部原条细胞基本不迁移, 滞留原处, 并未迁移至暗区(图 G1 箭头所示)。图 H 为正常 pEGFP-N1 组和 Wt PTEN-GFP 组细胞迁移情况统计图。

据实验室自身条件的基础上, 建立了稳定的鸡胚转染、移植和检测平台, 现就实验中获得的一些体会总结如下: 原条异体移植是更直接、更方便、更客观的观察细胞迁移的实验方法, 但实验中存在一定的难度, 必须要保证宿主和供体的胚胎正常发育条件良好, 以及移植的原条组织完整, 组织大小合适且移植组织本身无损伤。RNAi 技术是目前比

较有效地降调内源基因表达的手段, 在实验的操作过程中要保证无 RNase 干扰的条件, 要求所有实验所需耗材进过 DEPC 水处理后高压方可使用, 实验所用试剂均为无 RNase 水处理, 全部的操作过程需要带手套和口罩。否则 siRNA 可能会将被降解而无法发挥作用。电转染操作时要根据每个胚胎发育的不同情况, 调整好电极和胚胎之间的距离位置,

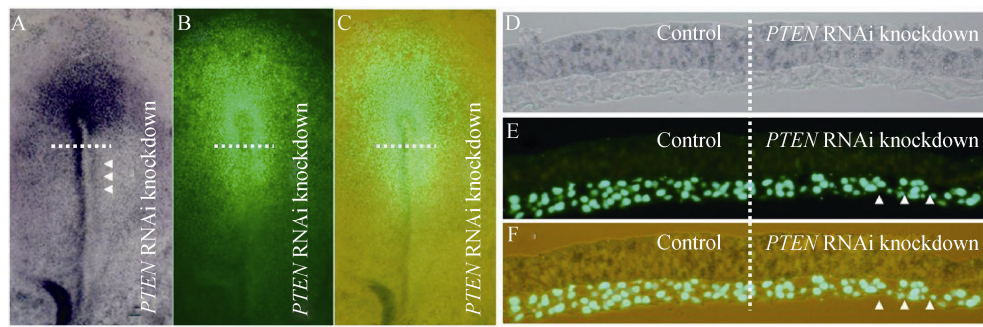


图 4 *PTEN* siRNA 降调 *PTEN* 基因后中胚层细胞变化情况

A: 为 *PTEN* 原位杂交结果检测 *PTEN* siRNA 干扰效果, 结果表明, 转染 *PTEN* siRNA 侧 *PTEN* mRNA 水平表达降低; B: 为整体胚胎 anti-Lim2 免疫荧光; C: 为白光和荧光的合成图像; D~F: 为左侧胚胎的横切面情况(虚线所示位置), 结果显示转染 *PTEN* siRNA 侧中胚层细胞数明显少于对照侧, 如图 F 中箭头所示。

控制好稳定的电压条件, 这样才可以尽量减少电转染所造成的物理损伤。

参考文献(References):

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovannella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science*, 1997, 275(5308): 1943–1947.
- [2] Maehama T, Taylor GS, Dixon, JE. PTEN and myotubularin: Novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70(1): 247–279.
- [3] Leslie NR, Downes CP. PTEN function: How normal cells control it and tumour cells lose it. *Biochemistry*, 2004, 382(Pt 1): 1–11.
- [4] Leslie NR, Yang XS, Downes PC, Weijer CJ. PtdIns (3, 4, 5) P₃-Dependent and-Independent roles for PTEN in the control of cell migration. *Curr Biol*, 2007, 17(2): 115–125.
- [5] Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(6): 740–746.
- [6] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Cufi S, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. *Cell Cycle*, 2010, 9(18): 3807–3814.
- [7] Cano CE, Motoo Y, Iovanna JL. Epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic adenocarcinoma. *Scientific World Journal*, 2010, 10(1): 1947–1957.
- [8] Chuai M, Zeng W, Yang XS, Boychenko V, Glazier JA, Weijer CJ. Cell movement during chick primitive streak formation. *Dev Biol*, 2006, 296(1): 137–149.
- [9] Denker HW, Behr R, Hennewer C, Viebahn C, Thie M. Epithelial-mesenchymal transition in Rhesus monkey embryonic stem cell colonies: a model for processes involved in gastrulation? *Cells Tiss Organs*, 2007, 185(1–3): 48–50.
- [10] Su J, You P, Li WL, Tao XR, Zhu HY, Yao YC, Yu HY, Han QW, Yu B, Liu FX, Xu J, Lau JT, Hu YP. The existence of multipotent stem cells with epithelial-mesenchymal transition features in the human liver bud. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(12): 2047–2055.
- [11] Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn*, 2001, 220(3): 284–289.
- [12] Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *Science*, 2007, 120(Pt 23): 4071–4079.
- [13] Pinal N, Gøberdhan DCI, Collinson L, Fujita Y, Cox IM, Wilson C, Pichaud F. Regulated and polarized PtdIns(3,4,5)P₃ accumulation is essential for apical membrane morphogenesis in photoreceptor epithelial cells. *Curr Biol*, 2006, 16(2): 140–149.
- [14] Vogelmann R, Nguyen-Tat MD, Giehl K, Adler G, Wedlich D, Menke A. TGFβ-induced downregulation of E-cadherin-based cell-cell adhesion depends on PI3-kinase and PTEN. *Cell Sci*, 2005, 118(Pt 20): 4901–4912.
- [15] Yang XS, Dormann D, Münsterberg AE, Weijer CJ. Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell*, 2002, 3(3): 425–437.
- [16] Yang XS, Chrisman H, Weijer CJ. PDGF signalling controls the migration of mesoderm cells during chick gastrulation by regulating N-cadherin expression. *Development*, 2008, 135(21): 3521–3530.
- [17] Lin K, Baritaki S, Militello L, Malaponte G, Bevelacqua Y, Bonavida B. The role of B-Raf mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF-κB/Snail/RKIP/PTEN circuit. *Genes Cancer*, 2010, 1(5): 409–420.
- [18] Wang HH, Quah SY, Dong JM, Manser E, Tang JP, Zeng Q. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 2922–2926.