

miR-29a 促进人乳腺癌 MCF-7 细胞体外迁移和侵袭的机制

吴 悠, 汤婷婷, 朱琴华, 金 亮*, 潘 怡**

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 探讨微小核酸 miRNA-29a 对人乳腺癌细胞 MCF-7 体外迁移和侵袭的促进作用及其机制。采用 miR-29a 模拟物及 miR-29a 抑制剂分别上调和下调 miR-29a 的表达; 采用细胞划痕法和 Transwell 小室法检测 miR-29a 对细胞迁移和侵袭能力的影响; 采用 Targetscan7.1 数据库预测 miR-29a 的靶基因; 荧光素酶报告法验证 miR-29a 的靶基因; Western blot 和实时荧光定量 PCR 验证其表达结果。结果表明: miR-29a 可显著促进 MCF-7 细胞的迁移和侵袭能力。Targetscan 软件预测 *HBPI* 可能为 miR-29a 的靶基因, 荧光素酶报告实验显示 miR-29a 靶向 *HBPI* 基因的 3'-UTR 区。Western blot 和实时荧光定量 PCR 结果显示, miR-29a 下调了 *HBPI* 蛋白水平的表达, 而 mRNA 水平则无明显变化。研究结果揭示在乳腺癌中高表达的 miR-29a 通过下调 *HBPI*, 从而使乳腺癌细胞获得高的迁移和侵袭能力, 促进乳腺癌的转移。

关键词 miR-29a; 乳腺癌; MCF-7 细胞; 肿瘤转移; 迁移; 侵袭; *HBPI* 蛋白

中图分类号 Q789; R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)03-0348-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180314

引用本文 吴悠, 汤婷婷, 朱琴华, 等. miR-29a 促进人乳腺癌 MCF-7 细胞体外迁移和侵袭的机制[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(3): 348-353.

Cite this article as: WU You, TANG Tingting, ZHU Qinhu, et al. Mechanisms of miR-29a in migration and invasion of breast cancer MCF-7 cells *in vitro* [J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(3): 348-353.

Mechanisms of miR-29a in migration and invasion of breast cancer MCF-7 cells *in vitro*

WU You, TANG Tingting, ZHU Qinhu, JIN Liang*, PAN Yi**

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The aim of this study was to investigate the effect and mechanisms of miR-29a in migration and invasion of human breast cancer MCF-7 cells *in vitro*. MCF-7 cells were treated with miR-29a mimic or miR-29a inhibitor to up-regulate/down-regulate the expression level of miR-29a. Wound-healing assay and transwell chamber were employed to determine cell migration and invasion *in vitro*. The target gene of miR-29a was predicted with the Targetscan7.1 database and verified through luciferase reporter method. The effects of miR-29a on the expression of the potential target were detected by Western blot and real-time PCR. Results showed that *in vitro* migration and invasion ability of MCF-7 cells was increased significantly by miR-29a, which could target *HBPI* in the 3'-UTR region. The protein expression of *HBPI* was decreased by miR-29a overexpression. However, the alteration of miR-29a had no significant effect on the expression of *HBPI* mRNA. The results validated that miR-29a, highly expressed in breast cancer, could down-regulate *HBPI*, which in turn promotes migration and invasion ability of breast cancer cells, thus promoting breast cancer metastasis.

Key words miR-29a; breast cancer; MCF-7 cells; cancer metastasis; migration; invasion; *HBPI* protein

收稿日期 2018-01-24 通信作者 * Tel: 025-83271152 E-mail: ljstemcell@cpu.edu.cn

** Tel: 025-83271152 E-mail: 1020162543@cpu.edu.cn

基金项目 国家高技术研究发展计划(“八六三”计划)资助项目(No. 2015AA020314); 国家自然科学基金资助项目(No. 81570696, No. 81702941); 江苏省高校“青蓝工程”资助项目; 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. 2632017PY06)

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, No. 2015AA020314); the National Natural Science Foundation of China (No. 81570696, No. 81702941); the Qing-Lan Project for Universities of Jiangsu Province; and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2632017PY06)

乳腺癌是一种发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤,是全世界女性中发病率和死亡率最高的肿瘤。乳腺癌癌细胞转移造成的疾病是绝大多数乳腺癌患者死亡的根本原因^[1],因此寻找抑制乳腺癌细胞转移的潜在药物十分必要。

微小核糖核酸(miRNA)是一类由内源基因编码的长度为18~24个核苷酸的非编码单链RNA分子。miRNA与乳腺癌的发生发展、侵袭与转移、血管生成、细胞周期、细胞凋亡等密切相关^[2]。不同的miRNA在肿瘤中的表达情况不同,对肿瘤的发生及转移也起到不同的作用^[3]。研究表明,miR-29a在乳腺癌组织中有所升高,并促进了乳腺癌细胞的增殖和转移^[4-5]。因此,本研究考察miR-29a对乳腺癌转移的生物学作用,研究miR-29a调控乳腺癌转移的新机制,为抗乳腺癌的药物筛选提供了实验依据和新思路。

1 材 料

1.1 试 剂

DMEM高糖培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);Lipofectamine 2000、Trizol试剂(美国Invitrogen公司);苯甲基磺酰氟(PMSF)、RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、胰蛋白酶、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗人GAPDH单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(美国CST公司);兔抗人HBP1多克隆抗体(美国SAB公司);miR-29a模拟物、miR-29a抑制剂、模拟物阴性对照、抑制剂阴性对照、miRNA实时荧光定量RT-PCR定量试剂盒(上海吉玛制药技术公司)。

1.2 仪 器

实时荧光定量PCR仪(美国Roche公司);酶标仪(美国Bioteck公司);显微图象采集系统(日本Olympus公司)。

1.3 细 胞

人乳腺癌细胞株MCF-7、人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、人胚肾细胞系HEK-293T由中国药科大学生物技术中心保存。

2 方 法

2.1 细胞培养

用含10%胎牛血清+1%青链霉素混合液的DMEM高糖培养基置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,待细胞融合率达90%以上时,用胰蛋白酶消化,按照1:3的比例传代。将细胞以每孔2×10⁵个的细胞比例种于6孔板,置于细胞培养箱中继续培养用于后续实验。

2.2 RT-qPCR实验

用Trizol法提取总RNA,进行反转录得到cDNA,然后以cDNA为模板进行qPCR反应,检测其中miR-29a和HBP1基因mRNA水平的表达,qPCR反应数据以循环阈值(Ct)记录,实验结果利用ΔΔCt法进行计算,miR-29a以u6为内参,HBP1以GAPDH为内参,相对定量各实验组样品内miR-29a和HBP1基因的表达(miR-29a和u6的引物来自miRNA实时荧光定量RT-qPCR定量试剂盒;HBP1和GAPDH引物序列见表1)。

Table 1 Primer sequences used for qPCR

Primer	Sequence (5'→3')
GAPDH-F	GGAGCGAGATCCCTCCAAAT
GAPDH-R	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
HBP1-F	TCATCACCATTGGAAGGAGGA
HBP1-R	TTGCACCATCCCAAATCATCA

2.3 细胞转染

将miR-29a模拟物、miR-29a抑制剂、模拟物阴性对照、抑制剂阴性对照(序列见表2)干粉瞬时离心后,用含RNA酶抑制剂的ddH₂O溶解,在避光的条件下吹打混匀,配制终浓度为20 μmol/L的工作液(使用时的终浓度均为100 nmol/L),-20℃贮存。取“2.1”项中所述种于6孔板的细胞,按照Lipofectamine 2000试剂说明书进行转染,6 h后更换为新的DMEM培养液,继续培养用于后续实验。

2.4 划痕愈合迁移实验

将种植于6孔板中的细胞按照“2.3”项下方法转染24 h后,利用1 mL枪头在细胞层中形成划痕,于0,48 h在显微镜下观察细胞迁移情况,随机

选取3处进行拍照。每组细胞设3个复孔。

Table 2 Sequences of miR-29a mimic/inhibitor and their controls

Primer		Sequence (5'→3')
miR-29a mimic	Sense	UAGCCACCAUCUGAAUCCGUUA
	Antisense	ACCGAUUUCAGAUGGUGCUAUU
Control mimic	Sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
miR-29a inhibitor		UAACCGAUUUCAGAUGGUGCUA
Control inhibitor		CAGUACUUUUGUGUAGUACAA

2.5 Transwell 小室侵袭实验

按照“2.3”项下方法转染细胞24 h后,将细胞进行消化,加入无血清DMEM培养基吹打混匀,调整细胞的浓度为每毫升 5×10^5 个,在Transwell小室的下室加入含5% FBS的DMEM培养基800 μL ,在上室加入混匀的细胞悬液200 μL (在实验前4~6 h将matrigel胶储液用无血清及抗生素的DMEM培养基按1:6进行稀释,以每孔50 μL 的体积加入到Transwell侵袭小室中),置于培养箱培养36~48 h后,经4%多聚甲醛固定20 min和结晶紫染色

20 min后,用棉签小心擦去膜上面的细胞,用显微图像采集系统进行观察并随机选取视野进行拍照。

2.6 靶基因预测和荧光素酶报告实验

通过生物信息预测数据库TargetScan7.1对miR-29a进行检索,预测其靶基因,然后将预测到的靶基因HBP1作为研究对象。人工合成野生型片段(HBP1-WF/WR),并引入Spe I和Hind III限制性核酸内切酶位点;在野生序列基础上,另外设计合成了种子序列互补序列的突变位点,合成突变型片段(HBP1-MF/MR)(具体序列见表3,粗体表示酶切位点)。包含目标基因的片段经退火后导入pMIR-REPORT质粒。将生长良好的HEK-293T细胞种于24孔板中,于24孔板的每一孔中,分别共转染荧光素酶质粒(或相对应的突变质粒)1 μg 、海肾荧光素酶质粒0.3 μg 以及相应量的miR-29a模拟物或miR-29a抑制剂或各自对应的阴性对照。转染48 h后按照试剂盒说明书检测荧光水平以及进行数据计算。

Table 3 Primer sequences used for luciferase report assay

Primer	Sequence (5'→3')
HBP1-WF	CTAGTGTAAATAATAGGCTTGAAAATTGATATCCTGTGGTCTAAAGTACAGTAGAAAGA
HBP1-WR	AGCTTCTTTCTACTGTACTTTAGCACCACAGGATATCAATTTCAGCCTATTATTAC
HBP1-MF	CTAGTGTAAATAATAGGCTTGACGCCAGCGTACTCTAGATGCCAGTACAGTAGAAAGA
HBP1-MR	AGCTTCTTTCTACTGTACTGGCATCTAGAGTACGCCAGCGTCAAGCCTATTATTAC

2.7 Western blot实验

细胞转染48 h后,收集细胞裂解提取蛋白,加入上样缓冲液,100 °C煮沸10 min,10% SDS-PAGE电泳分离蛋白质,再转印至PVDF膜上,将膜置于含50 g/L脱脂牛奶的TBST室温封闭1 h;再分别加入相应的兔抗人HBP1抗体及兔抗人GAPDH抗体,4 °C过夜,次日以TBST洗涤3次,加入HRP标记羊抗兔IgG抗体室温孵育1 h,TBST洗涤3次,ECL显色系统定影显色,观察条带并进行灰度扫描。以GAPDH作为内参对照。

2.8 数据统计

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用GraphPad Prism 5统计软件进行数据统计及图像处理。两组间的比较用配对t检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 miR-29a在不同乳腺癌细胞系中的表达

MDA-MB-231属于高转移性恶性乳腺癌细胞系,MCF-7为原位ER阳性乳腺癌细胞系,恶性程

度较MDA-MB-231低,本研究比较了不同乳腺癌细胞系中miR-29a的表达水平。RT-qPCR检测结果(图1)显示,miR-29a在MDA-MB-231中的表达明显高于在MCF-7中,miR-29a在恶性程度更高的MDA-MB-231中表达较高提示miR-29a的潜在促肿瘤作用。

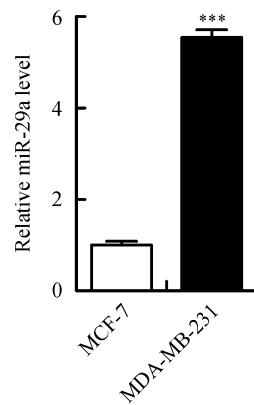


Figure 1 Expression of miR-29a in different breast cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

*** $P < 0.001$ vs MCF-7 group

3.2 过表达和敲除 miR-29a 的转染效率验证

将 miR-29a 模拟物、miR-29a 抑制剂及其阴性对照转染乳腺癌细胞 MCF-7, 细胞转染 48 h 后, RT-qPCR 检测结果(图 2)显示, 与模拟物阴性对照组相比, 转染 miR-29a 模拟物的细胞中 miR-29a 的表达水平上调, 差异有统计学意义; 与抑制剂阴性对照组相比, 转染 miR-29a 抑制剂的细胞中 miR-29a 的表达水平下调, 差异有统计学意义。总之, 以上结果说明有效地实现了 miR-29a 的过表达和敲除。

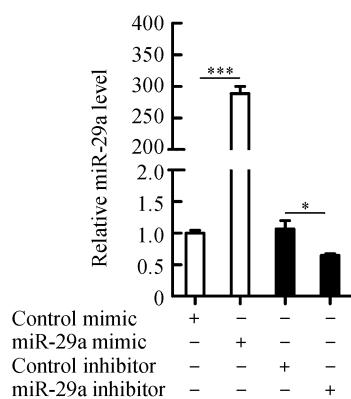


Figure 2 Transfection efficiency of miR-29a in MCF-7 cells after treated with miR-29a mimic/inhibitor ($\bar{x} \pm s, n=3$)

*** $P < 0.001$ vs control mimic group; * $P < 0.05$ vs control inhibitor group

3.3 miR-29a 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外侵袭和迁移的促进作用

体外迁移实验结果显示, 与模拟物阴性对照组相比, 过表达 miR-29a 的细胞划痕间隙变化显著升高(图 3-A); 与抑制剂阴性对照组相比, 敲除 miR-29a 的细胞划痕间隙变化显著降低(图 3-B)。体外侵袭实验结果显示, 过表达 miR-29a 的细胞迁移和侵袭数增多(图 4-A); 相应的, 敲除 miR-29a 的细胞侵袭数减少(图 4-B), 差异有统计学意义。

3.4 靶基因预测及 HBP1 的荧光素酶验证

通过预测分析, miR-29a 序列与 HBP1 3'非翻译区(3'-UTR)存在一个互补结合区, HBP1 可能为 miR-29a 的特异性靶基因。本研究进行了荧光素酶报告实验, 实验结果(图 5)表明 HBP1 为 miR-29a 的直接靶基因, miR-29a 与 HBP1 的 3'-UTR 区

存在直接靶向作用。

3.5 Western blot 和 RT-qCR 检测 HBP1 蛋白水平和转录水平的表达

Western blot 结果(图 6)显示, 过表达和敲除 miR-29a 分别可下调和上调 HBP1 在蛋白水平的表达。然而, RT-qPCR 结果(图 7)显示, miR-29a 的过表达和敲除对 HBP1 的 mRNA 水平没有影响。

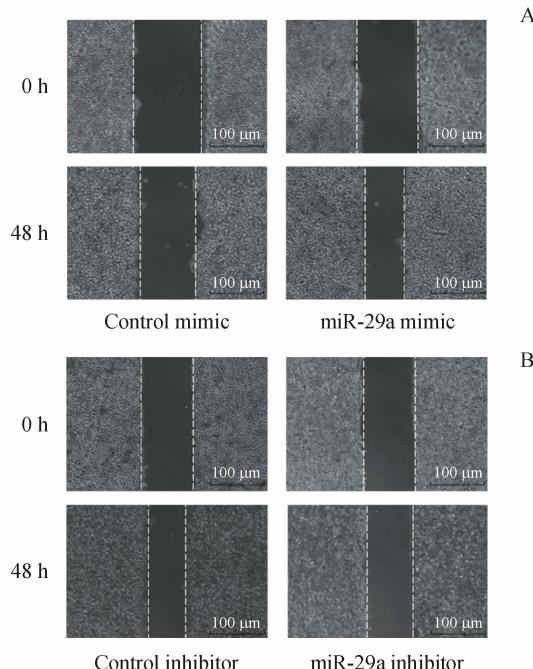


Figure 3 Effects of miR-29a mimic (A) and inhibitor (B) on the migration of MCF-7 cells

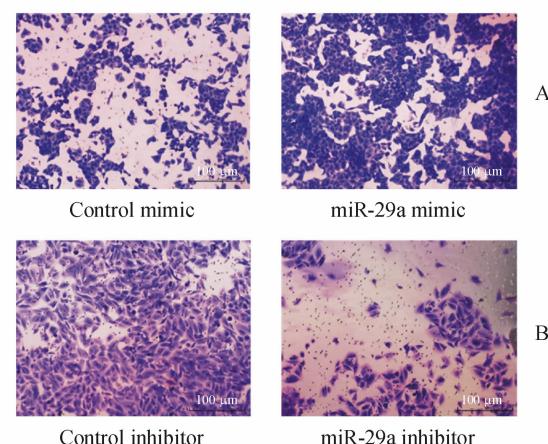


Figure 4 Effects of miR-29a mimic (A, 36 h) and inhibitor (B, 48 h) on the invasion of MCF-7 cells

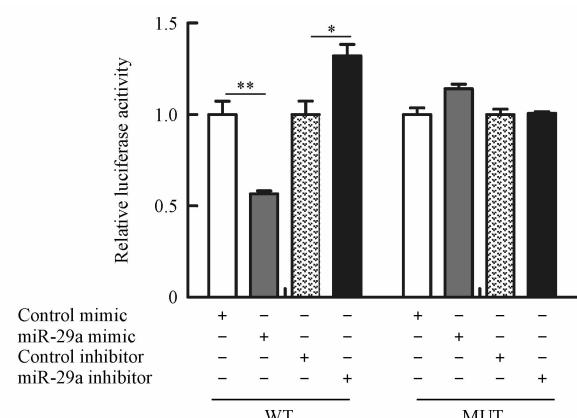


Figure 5 Luciferase reporter assay after transfection ($\bar{x} \pm s, n=3$)
** $P < 0.01$ vs control mimic/WT group; * $P < 0.05$ vs control inhibitor/WT group

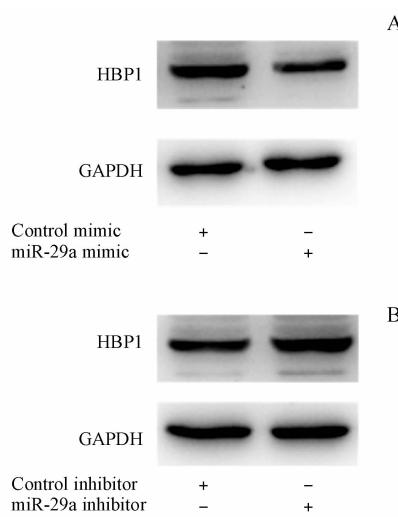


Figure 6 Effects of miR-29a mimic (A) and inhibitor (B) on the protein expression of HBP1 in MCF-7 cells

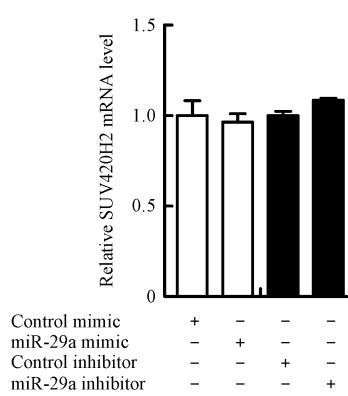


Figure 7 Effects of miR-29a on the mRNA expression of HBP1 in MCF-7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨 论

miRNA 参与细胞增殖、迁移、分化和细胞周期

等多种生物过程。miRNA 主要通过结合靶基因的 3'非翻译区(3'-UTR)来控制其靶 mRNA 的表达,单个基因的 UTR 区可以具有多个 miRNA 的结合位点或者某一个 miRNA 的多个结合位点,这表明由这些 miRNA 通过复杂的转录后调控影响基因表达^[6]。

miR-29a 位于染色体 7q32.3 负链的普通型脆性位点 FRA7H 内,可能与肿瘤密切相关^[7]。miR-29a 被报道在多种肿瘤中低表达且是抑癌因子,如胃癌^[8]、胰腺癌^[9]、宫颈癌^[10]、前列腺癌^[11]、食管癌^[12]等;然而 miR-29a 也被报道在乳腺癌^[4]、结肠癌^[13]中表达上调,作为促癌基因促进了肿瘤的发生及发展。本研究首先通过实时荧光定量 RT-qPCR 检测了乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 miR-29a 的表达水平,发现与 MCF-7 细胞相比,miR-29a 在 MDA-MB-231 中的表达上调,因为相比 MCF-7 细胞,MDA-MB-231 转移性和恶性程度更高,这提示 miR-29a 在乳腺癌发生和发展过程中可能起促进的作用。为了进一步明确 miR-29a 在乳腺癌中的作用,本研究以 MCF-7 细胞作为研究对象,通过脂质体法将 miR-29a mimic 及 miR-29a inhibitor 及其相应的阴性对照转染至细胞中,通过划痕实验和 Transwell 实验发现,与阴性对照组相比较,转染 miR-29a mimic 后细胞的迁移和侵袭的能力增加,而转染 miR-29a inhibitor 后细胞的迁移和侵袭的能力减少,这表明 miR-29a 对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力具有正向调控作用。

此外,为了进一步研究 miR-29a 调控肿瘤转移的机制,本研究用目前常用的 miRNA 靶基因预测软件 Targetscan 7.1 对 miR-29a 的靶基因进行预测,发现 *HBP1* 的 3'-UTR 区域存在与 miR-29a 不完全配对的序列,这说明 *HBP1* 有可能是 miR-29a 的靶基因。*HBP1*(HMG 盒转录因子 1),是一种核蛋白,人体多种组织中均有表达^[14],如大脑、子宫、睾丸、肺以及心脏等。*HBP1* 是一种重要的肿瘤抑制因子,其抑制肿瘤机制有多种^[15]:*HBP1* 抑制转录因子 c-Myc 的活性及表达;通过与 p38-MAPK 通路作用调控细胞周期的阻滞;参与 Ras 介导的早衰;*HBP1* 还可阻滞 Wnt-β 连环蛋白信号通路从而抑制 G₁ 进程,进而抑制肿瘤细胞生长。一些临床研究表明,在浸润性乳腺癌中发生 *HBP1* 的突变或表达减少,并且 *HBP1* 可能调节几种类型的乳腺癌

的增殖和侵袭^[16-17]。HBP1 是通过抑制 LEF/TCF 转录因子抑制 Wnt/b-catenin 信号传导^[18],而 Wnt 信号通路是会进一步影响肿瘤细胞的侵袭和转移的^[19-20]。综合以上几点推测, HBP1 通过 Wnt 信号通路抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭,因此选择 *HBP1* 基因作为下一步研究的对象。

为了验证 miR-29a 与 *HBP1* 之间是否存在调控的关系,本研究先进行了荧光素酶报告基因验证实验,发现 miR-29a 直接与 *HBP1* 基因的 3'-UTR 区域相结合,然后又检测了 miR-29a 变化后 *HBP1* 的表达情况。Western blot 结果显示,与阴性对照组相比较,当细胞转染 miR-29a mimic 后, *HBP1* 蛋白质的表达下调,而细胞转染 miR-29a inhibitor 后, *HBP1* 蛋白质的表达上调,说明 miR-29a 可负向调控 *HBP1* 蛋白的表达。然而, RT-qPCR 的结果显示,过表达或敲除 miR-29a 后, *HBP1* 在 mRNA 水平上的表达没有变化,说明 miR-29a 调控 *HBP1* 的表达是通过结合 *HBP1* 的 mRNA 抑制其蛋白水平表达,而非使其 mRNA 降解,这符合 miRNA 调控靶基因的一般规律。

综合以上实验结果,本研究推测,在乳腺癌中高表达的 miR-29a 通过下调 *HBP1*,从而使乳腺癌细胞获得高的迁移和侵袭能力,促进乳腺癌的转移,其具体机制可能是通过 Wnt 信号通路,还有待进一步实验研究确认。

参 考 文 献

- Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis[J]. *J Intern Med*, 2013, **274**(2): 113-126.
- Zhang K, Zhang Y, Liu C, et al. MicroRNAs in the diagnosis and prognosis of breast cancer and their therapeutic potential[J]. *Int J Oncol*, 2014, **45**(3): 950-958.
- Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. microRNAs in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, **9**: 287-314.
- Pei YF, Lei Y, Liu XQ. MiR-29a promotes cell proliferation and EMT in breast cancer by targeting ten eleven translocation 1[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1862**(11): 2177-2185.
- Rostas JW, Pruitt HC, Metge BJ, et al. microRNA-29 negatively regulates EMT regulator N-myc interactor in breast cancer[J]. *Mol Cancer*, 2014, **13**: 200.
- Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions[J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2011, **3**(3): 83-92.
- Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2007, **16**(2): 150-158.
- Chen L, Xiao H, Wang ZH, et al. miR-29a suppresses growth and invasion of gastric cancer cells *in vitro* by targeting VEGF-A[J]. *BMB Rep*, 2014, **47**(1): 39-44.
- Tréhoux S, Lahdaoui F, Delpu Y, et al. Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1853**(10 Pt A): 2392-2403.
- Yamamoto N, Kinoshita T, Nohata N, et al. Tumor-suppressive microRNA-29a inhibits cancer cell migration and invasion via targeting HSP47 in cervical squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2013, **43**(6): 1855-1863.
- Pasqualini L, Bu H, Puhr M, et al. miR-22 and miR-29a are members of the androgen receptor cistrome modulating LAMC1 and Mcl-1 in prostate cancer[J]. *Mol Endocrinol*, 2015, **29**(7): 1037-1054.
- Liu C, Duan P, Li B, et al. miR-29a activates Hes1 by targeting Nfia in esophageal carcinoma cell line TE-1[J]. *Oncol Lett*, 2015, **9**(1): 96-102.
- Tang W, Zhu Y, Gao J, et al. MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4[J]. *Br J Cancer*, 2014, **110**(2): 450-458.
- Shih HH, Xiu M, Berasi SP, et al. HMG box transcriptional repressor HBP1 maintains a proliferation barrier in differentiated liver tissue[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(17): 5723-5732.
- Huang JS, Xiao R, Pang Y, et al. HBP1—an important tumor inhibitor[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2012, **28**(10): 913-918.
- Paulson KE, Rieger-Christ K, McDevitt MA, et al. Alterations of the HBP1 transcriptional repressor are associated with invasive breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(13): 6136-6145.
- Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, et al. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression[J]. *Gene*, 2004, **336**(1): 1-13.
- Sampson EM, Haque ZK, Ku MC, et al. Negative regulation of the Wnt/b-catenin pathway by the transcriptional repressor HBP1[J]. *EMBO J*, 2001, **20**(16): 4500-4511.
- Qin X, Zhang H, Zhou X, et al. Proliferation and migration mediated by Dkk-1/Wnt/b-catenin cascade in a model of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Transl Res*, 2007, **150**(5): 281-294.
- Wang Z, Ma Q. Beta-catenin is a promising key factor in the SDF-1/CXCR4 axis on metastasis of pancreatic cancer[J]. *Med Hypotheses*, 2007, **69**(4): 816-820.