

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.08.006

· 基础研究 ·

## 过表达 KLF4 通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径调控膀胱癌细胞上皮间质转化及迁移

席剑铭, 张能, 李晓光, 黄翔, 苏鹏, 陈书练, 罗旭(遵义医科大学附属医院 泌尿外科, 贵州 遵义 563000)

**[摘要]** **目的:** 探讨 Krüppel 样因子 4 (KLF4) 调控膀胱癌细胞 EMT 及迁移的作用及其机制。**方法:** 在膀胱癌 5637 和 T24 细胞中构建稳定过表达 KLF4 的实验组 (LV-KLF4) 和阴性对照组 (LV-NC), 用 qPCR 和 WB 实验验证 KLF4 mRNA 和蛋白的表达水平。用 Transwell 小室法检测 LV-KLF4 组、LV-NC 组细胞的迁移能力变化, 用 WB 检测 EMT 相关标志物上皮钙黏蛋白、神经钙黏蛋白、波形蛋白及 Wnt 信号通路相关蛋白的表达水平, 用免疫荧光技术检测过表达 KLF4 后细胞内  $\beta$ -catenin 的分布变化情况。**结果:** 成功构建 KLF4 过表达的 5637 和 T24 细胞。与 LV-NC 组比较, LV-KLF4 组细胞中 KLF4 mRNA 及蛋白表达水平升高 (均  $P < 0.01$ ), 上皮钙黏蛋白的表达水平升高 ( $P < 0.01$ ), 神经钙黏蛋白和波形蛋白的表达水平降低 (均  $P < 0.01$ ), 总  $\beta$ -catenin、核  $\beta$ -catenin、MMP9 及 c-Myc 表达水平显著降低 (均  $P < 0.01$ ), 细胞的迁移能力显著下降 ( $P < 0.01$ ), 细胞内  $\beta$ -catenin 蛋白荧光表达减弱。**结论:** 过表达 KLF4 可能通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路抑制 EMT 过程, 从而抑制膀胱癌 5637 和 T24 细胞的迁移。

**[关键词]** 膀胱癌; 5637 细胞; T24 细胞; 上皮间质转化; Krüppel 样因子 4; Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路; 迁移

**[中图分类号]** R737.14; R730.2; R730.59 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)08-0862-06

## Over-expression of KLF4 regulates EMT and migration of bladder cancer cells via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway

XI Jianming, ZHANG Neng, LI Xiaoguang, HUANG Xiang, SU Peng, CHEN Shulian, LUO Xu (Department of Urology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role and mechanism of Krüppel-like factor 4 (KLF4) in regulating epithelial-mesenchymal transition (EMT) and migration of bladder cancer cells. **Methods:** Bladder cancer 5637 and T24 cell lines that stably over-expressing KLF4 (LV-KLF4, experiment group) were constructed, and the negative control group (LV-NC) was also established; the mRNA and protein expressions of KLF4 were verified by qPCR and WB, respectively. Transwell chamber assay was used to detect the migration ability of cells in LV-KLF4 and LV-NC groups. WB was performed to detect the expression levels of EMT-related markers (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin) and Wnt signaling pathway-related proteins. Immunofluorescence technique was used to detect the distribution of  $\beta$ -catenin in cells after over-expression of KLF4. **Results:** The 5637 and T24 cell lines over-expressing KLF4 gene were successfully constructed. Compared with the LV-NC group, the mRNA and protein expressions of KLF4 increased in LV-KLF4 groups (all  $P < 0.01$ ); the expression of E-cadherin increased ( $P < 0.01$ ), while the expressions of N-cadherin, vimentin, and the expression levels of total  $\beta$ -catenin, nuclear  $\beta$ -catenin, MMP 9 and c-Myc decreased (all  $P < 0.01$ ); moreover, the migration ability of cells decreased significantly ( $P < 0.01$ ); the fluorescence expression of  $\beta$ -catenin in cells also decreased significantly in LV-KLF4 group as compared to LV-NC group. **Conclusion:** Over-expression of KLF4 gene in bladder cancer cells may inhibit EMT process by regulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, and further inhibit the migration of bladder cancer 5637 and T24 cells.

**[Key words]** bladder cancer; 5637 cell; T24 cell; epithelial-mesenchymal transition (EMT); Krüppel-like factor 4 (KLF4); Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; migration

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(8): 862-867. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.08.006]

**[基金项目]** 贵州省科技厅基金资助项目 (No. 黔科合 LH 字 [2015]7493); 贵州省遵义市红花岗区科技基金 (No. 遵红科合社字 [2015]12)。Project supported by the Science and Technology Department Foundation of Guizhou Province (No. [2015]7493), and the Science and Technology Foundation of Honghuagang District in Zunyi City (No. [2015]12)

**[作者简介]** 席剑铭 (1991-), 男, 硕士生, 主要从事膀胱癌基础与临床研究, E-mail: 1101557671@qq.com

**[通信作者]** 罗旭 (LUO Xu, corresponding author), 学士, 教授, 硕士生导师, 主要从事膀胱癌基础与临床研究, E-mail: lx66989@qq.com

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。据WHO全球癌症观察站数据库(Global Cancer Observatory, GCO)统计显示,膀胱癌是男、女性中发病第9位的恶性肿瘤<sup>[2]</sup>。高复发率是膀胱癌最显著的特征,高复发也导致了其极易侵袭与转移。EMT是一种常见的病理现象,与肿瘤侵袭转移等过程密切相关<sup>[3]</sup>。EMT过程的激活是上皮类型肿瘤细胞获得恶性表型的关键步骤。研究<sup>[4]</sup>表明,EMT是膀胱癌转移或浸润进展的重要基础,而EMT是一个可逆的过程,诱导EMT逆转(MET)使细胞恢复上皮极性,可能会抑制肿瘤细胞的迁移和转移。KLF4是Krüppel样因子(KLF)中的一员,被称作肠道富集因子<sup>[5]</sup>。2003年,OHNISHI等<sup>[6]</sup>首先发现KLF4在正常膀胱上皮细胞中表达丰富,但在肿瘤组织中表达水平降低,提示KLF4能够抑制膀胱癌的发生发展。本课题组前期在膀胱癌术后病理标本中发现KLF4表达随肿瘤进展蛋白表达水平逐渐减弱<sup>[7-8]</sup>,提示KLF4的表达参与了EMT过程,并起抑癌的作用。然而,KLF4在膀胱癌中参与调控EMT发生并以此介导肿瘤细胞迁移的机制尚不清楚。本研究通过体外实验干预膀胱癌细胞中KLF4的表达,并检测与EMT相关蛋白的表达变化、信号转导及癌细胞侵袭能力的变化,旨在探究KLF4在体外调控膀胱癌细胞EMT的作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系及主要试剂

中分化的人膀胱癌细胞株5637和低分化的人膀胱癌细胞株T24均购自中科院上海细胞库。10%胎牛血清、RPMI-1640培养基购自美国GIBCO公司,脂质体Lipofectamine<sup>TM</sup>2000、RNA提取试剂TRIzol购于美国Invitrogen公司,逆转录试剂盒和SYBR Green Mix购于TaKaRa公司,PCR引物由上海生博生物医药科技有限公司合成,鼠抗人KLF4和 $\beta$ -actin(内参照)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG购自美国Abcam公司,兔抗人神经钙黏蛋白(N-cadherin)、上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、c-Myc、 $\beta$ -catenin及MMP9单克隆抗体均购自武汉Proteintech公司,细胞侵入检测试剂盒购于德国Millipore公司,M-MLV逆转录酶和dNTP购自Promega公司,Oligo dT购自上海生工,RNase-free的物品均购自Axygen公司,BCA蛋白测定试剂盒购自Sigma公司,胰蛋白酶购自上海化学试剂公司,PVDF膜购自Thermo Fisher公司。

### 1.2 细胞培养、转染与分组

膀胱癌5637和T24细胞在10%胎牛血清、RPMI 1640培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中常规培养,

至对数生长期后,再用10%胎牛血清DMEM高糖培养基中继续培养。慢病毒载体的构建、包装及慢病毒感染委托上海生博生物医药科技有限公司制备。取处于对数生长期的5637和T24细胞接种到6孔板,并保证感染时细胞汇合度达80%左右,加入适量病毒上清进行感染。感染72h后利用荧光倒置显微镜观察病毒感染效率,然后用0.25  $\mu$ g/ml的嘌呤霉素进行筛选,1周后90%以上均是过表达KLF4的LV-KLF4单克隆细胞株和LV-NC细胞株,收集细胞进入后续实验。

### 1.3 qPCR法检测膀胱癌5637和T-24细胞中KLF4 mRNA的达水平

用总RNA快速提取试剂盒提取总RNA,Nano-Drop2000分光光度仪测定RNA的浓度和纯度。按Prime Script<sup>TM</sup> RT Reagent Kit说明书提供的方法将RNA逆转录成cDNA,并以此为模板进行qPCR。PCR所需引物序列:KLF4 F为5'-TCTCCACATG AAGCGACTT-3',R为5'-ATGGGTCAGCGAATTG-GAGA-3'; $\beta$ -actin F为5'-ACCACAGTCCATGC-CATCCAC-3',R为5'-TCCACCACCCTGTTGCTG-TA-3'。PCR反应条件:预变性95℃15s,之后每一步变性95℃5s,退火延伸至60℃30s,共40个循环;以 $\beta$ -actin作为内参照。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因KLF4的mRNA表达水平。

### 1.4 WB检测膀胱癌5637和T-24细胞中KLF4及EMT相关蛋白的表达水平

分别收集对数生长期的细胞 $5 \times 10^6$ 个,加入300  $\mu$ l的RIPA裂解液提取细胞总蛋白,用BCA法测定蛋白质浓度。取蛋白质40  $\mu$ g/孔,进行10% SDS-PAGE分离蛋白、转膜、封闭、室温封闭1h,分别加入鼠抗人KLF4、兔抗人上皮钙黏蛋白、神经钙黏蛋白、波形蛋白和 $\beta$ -actin单克隆抗体(1:2 000),4℃反应过夜;TBST漂洗3次,10 min/次,加入HRP标记的山羊抗兔IgG(1:10 000),室温反应1h;TBST充分漂洗3次,用ECL显影液使底物显色,并于凝胶成像系统中进行显影,通过Quantity one对相应目的蛋白条带进行光密度(D)分析,通过目的蛋白D与内参( $\beta$ -actin)蛋白的D比值作为目的蛋白的相对表达量。

### 1.5 Transwell实验检测膀胱癌5637和T-24细胞的迁移能力

分别取 $5 \times 10^5$ 个对数生长期的LV-KLF4、LV-NC组细胞,重悬于100  $\mu$ l完全培养液并接种于Transwell上室中,在24孔培养板中加入500  $\mu$ l完全培养液,并将接种各组细胞后的Transwell小室置于其中,常规培养细胞12h后取出小室,用棉签除去小室内及微孔膜上层的细胞,将小室在室温下置于4%多聚甲醛

溶液中 15 min 以固定迁移至小室微孔膜下层的细胞, 0.5% 结晶紫溶液室温染色 20 min, ddH<sub>2</sub>O 漂洗除去浮色。在光学显微镜下(×100)随机观察 5 个视野, 计数迁移至小室微孔膜下层的细胞数。

### 1.6 免疫荧光技术检测过表达 KLF4 后膀胱癌细胞 β-catenin 等蛋白的表达水平

将干净的载玻片置于 6 板内, 接种 1×10<sup>6</sup> 个细胞培养过夜, 吸尽培养液后加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, 去除多聚甲醛、PBS 冲洗后, 吸尽液体, 加入 7% BSA 和 0.3% Triton-100 的封闭液封闭 30 min, 去封闭液。加入稀释的兔抗人 β-catenin 单克隆抗体 (1:200) 4 °C 孵育过夜。次日, 去除一抗, PBS 冲洗 3 次 (15 min/次) 后, 加入 1 ml 荧光标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:400), 于湿盒中避光孵育 60 min 后, 滴加 DAPI 作用 10 min, PBS 冲洗 3 次 (5 min/次), 弃去多余的 DAPI。取出载玻片, 加 50% 的甘油, 将玻片扣到载玻片上, 于荧光显微镜下观察并采集图像。

### 1.7 统计学处理

qPCR、WB 及 Transwell 实验均重复 3 次。用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P*<0.05 或 *P*<0.01 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 膀胱癌 5367 细胞中 KLF4 mRNA 和蛋白高表达

qPCR 检测结果 (图 1A) 显示, 膀胱癌 5637 细胞中 KLF4 mRNA 表达水平显著高于 T24 细胞 (*t*=-2.074, *P*<0.01)。WB 实验结果 (图 1B) 显示, 5637 细胞中 KLF4 蛋白的表达水平也显著高于 T24 细胞 (*t*=4.702, *P*<0.01)。

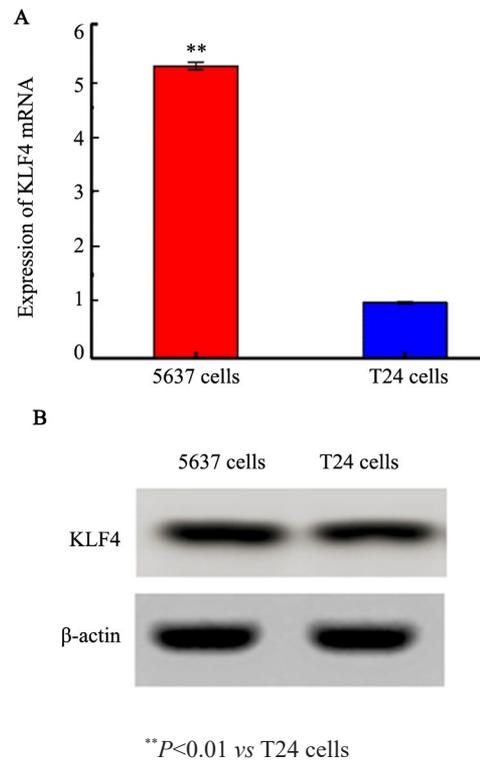


图 1 T24 和 5637 细胞中 KLF4 mRNA (A) 及蛋白 (B) 的表达  
Fig.1 mRNA (A) and protein (B) expressions of KLF4 in T24 and 5637 cells

### 2.2 感染 LV-KLF4 后 5637 和 T24 细胞中 KLF4 mRNA 和蛋白表达水平升高

WB、qPCR 检测结果 (图 2) 显示, LV-KLF4 组 5637 和 T24 细胞中 KLF4 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于 LV-NC 组 (*t*=24.686、23.098, *t*=8.553、4.639; 均 *P*<0.01)。

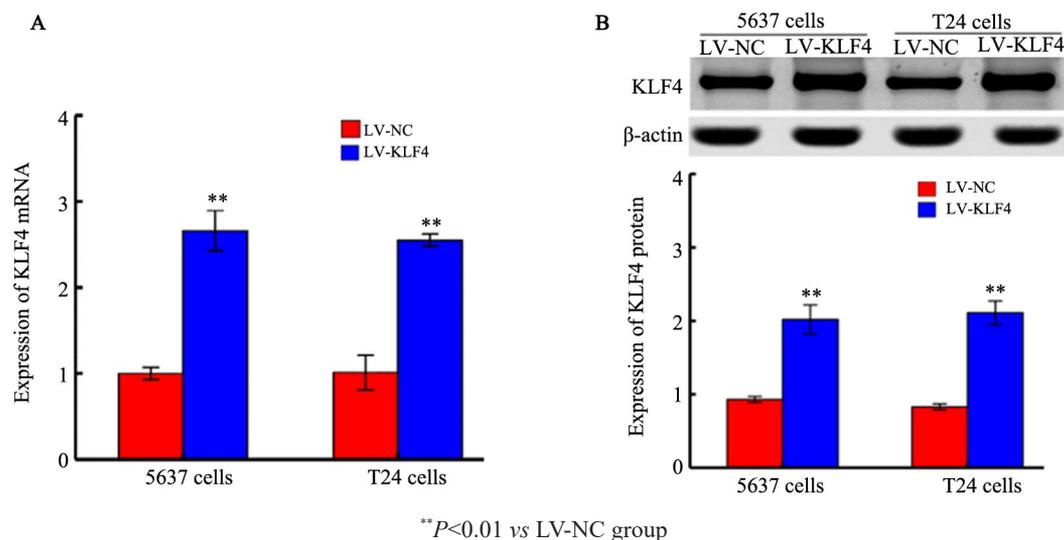


图 2 感染 LV-KLF4 对 5637 和 T24 细胞中 KLF4 mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响  
Fig.2 Effects of LV-KLF4 transfection on mRNA (A) and protein (B) expressions of KLF4 in 5637 and T24 cells

### 2.3 过表达KLF4对5637和T24细胞EMT相关蛋白表达的影响

WB检测结果(图3)显示,与LV-NC组比较,LV-KLF4组5637和T24细胞中上皮标志物上皮钙黏蛋白

白表达水平显著上调( $t=4.334$ 、 $12.999$ ,均 $P<0.01$ )、间质标志物神经钙黏蛋白和波形蛋白水平显著下调( $t=-13.93$ 、 $-9.312$ , $t=-15.808$ 、 $-9.576$ ;均 $P<0.01$ )。

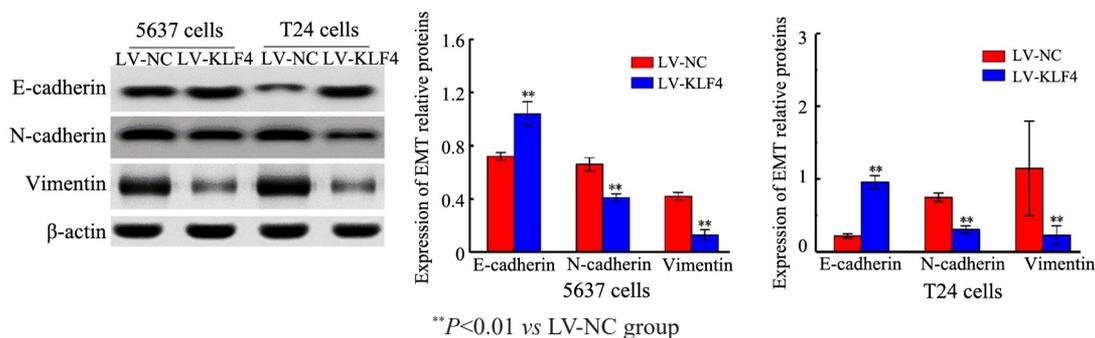


图3 过表达KLF4对5637和T24细胞中EMT相关蛋白表达的影响

Fig.3 Effects of KLF4 over-expression on the expressions of EMT related proteins in 5637 and T24 cells

### 2.4 过表达KLF4降低5637和T24细胞的迁移能力

Transwell实验结果(图4)显示,与LV-NC组比较,LV-KLF4组5637和T24细胞的迁移数目显著减

少( $t=12.135$ 、 $-7.989$ ,均 $P<0.01$ )。结果提示,上调KLF4表达水平显著抑制癌细胞的迁移能力。

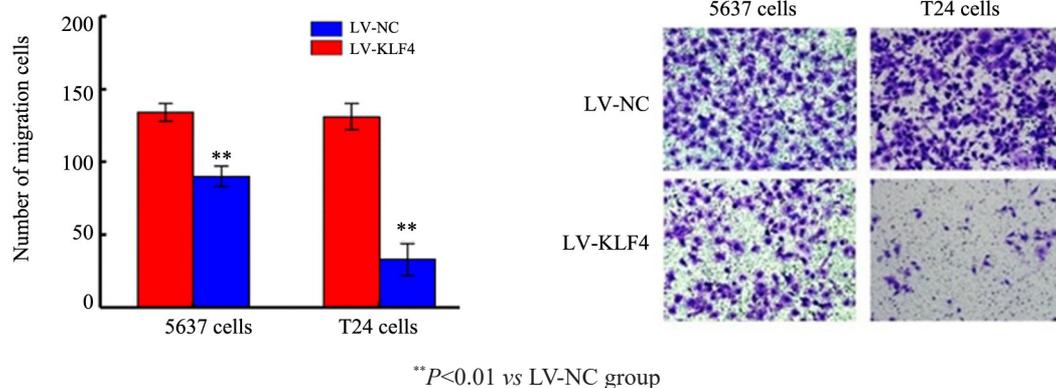


图4 过表达KLF4对5637和T24细胞迁移能力的影响(结晶紫染色,×100)

Fig.4 Effect of KLF4 over-expression on migration ability of 5637 and T24 cells (crystal violet staining, ×100)

### 2.5 过表达KLF4降低5637和T24细胞Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路靶基因蛋白的表达

WB检测结果(图5)显示,与LV-NC组比较,LV-KLF4组5637和T24细胞中总 $\beta$ -catenin蛋白、核 $\beta$ -catenin蛋白、c-Myc蛋白和MMP9蛋白表达水平均显著下调( $t=0.557$ 、 $0.609$ 、 $0.789$ 、 $0.731$ , $t=0.269$ 、 $0.294$ 、 $0.654$ 、 $0.776$ ;均 $P<0.01$ )。

### 2.6 过表达KLF4降低5637和T24细胞中 $\beta$ -catenin蛋白荧光的表达

免疫荧光技术检测结果(图6)显示,与LV-NC组比较,LV-KLF4组5637和T24细胞中 $\beta$ -catenin蛋白荧光表达水平显著降低,胞核内表达水平也显著减弱,阳性细胞数减少。

## 3 讨论

恶性肿瘤治疗的最大障碍就是肿瘤细胞容易发生侵袭与转移。研究<sup>[9-10]</sup>表明,EMT是膀胱癌在转移或浸润进展的重要基础。KLF4参与膀胱癌EMT并在其中可能起重要的作用。LI等<sup>[11]</sup>通过去甲基化处理诱导癌细胞中KLF4不同程度的恢复,发现促进了上皮钙黏蛋白的表达,并抑制神经钙黏蛋白、波形蛋白及 $\beta$ -catenin的表达,提示在膀胱癌中恢复KLF4的表达水平起抑制EMT的作用。为了研究膀胱癌中KLF4的表达对EMT的影响,本研究采用慢病毒转染膀胱癌细胞株建立稳定过表达KLF4的细胞株,通过qPCR、WB实验结果发现LV-KLF4组的上皮标志物

上皮钙黏蛋白的表达与KLF4呈正相关,而间质标志物神经钙黏蛋白、波形蛋白的表达呈负相关。LV-KLF4组EMT相关蛋白的表达水平与LV-NC组比较

差异有显著的统计学意义( $P<0.01$ ),提示在膀胱癌中显著过表达KLF4后EMT过程在膀胱癌中遭到抑制,甚至可能发生逆转。

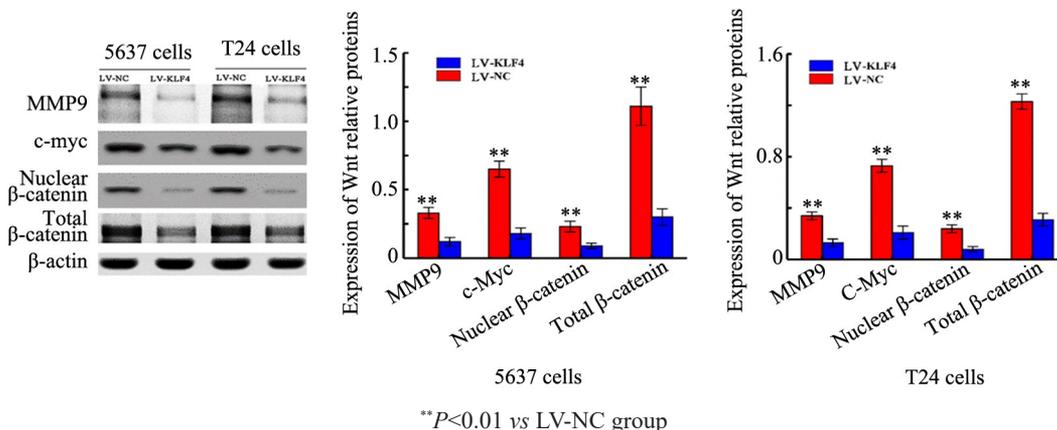


图5 过表达KLF4对5637和T24细胞中Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of KLF4 over-expression on the expressions of Wnt/β-catenin signaling pathway related proteins in 5637 and T24 cells

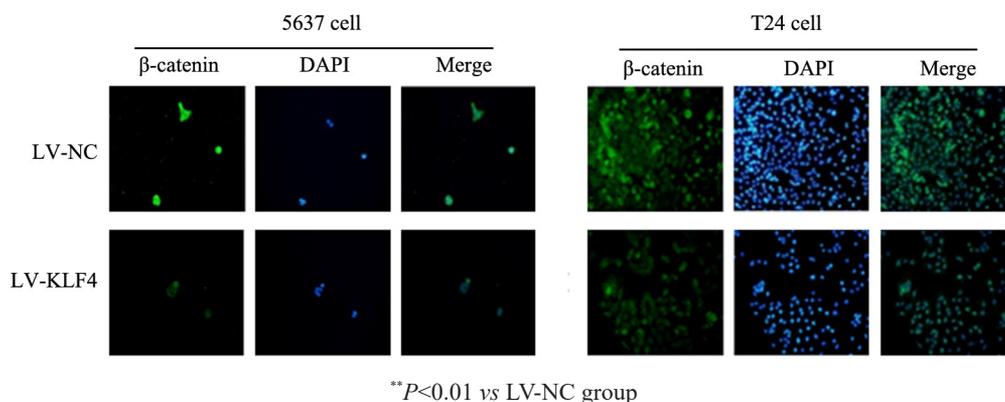


图6 过表达KLF4对5637和T24细胞中β-catenin蛋白荧光表达的影响(×100)

Fig.6 Effect of KLF4 over-expression on fluorescence expression of β-catenin in 5637 and T24 cells(×100)

β-catenin是细胞内的一种多功能蛋白,其作为Wnt信号通路中的核心调控蛋白主要参与细胞之间黏附的调控<sup>[12]</sup>。本研究在过表达KLF4的基础上进一步WB实验发现,LV-KLF4组细胞内总β-catenin蛋白、核内β-catenin蛋白表达显著降低。因此,假设过表达KLF4基因抑制膀胱癌细胞的EMT时,上皮钙黏蛋白表达增加,使得细胞内游离的β-catenin有更多被结合成E-cadherin/β-catenin复合体的几率,而β-catenin是复合体的组成部分,是维持上皮细胞完整及稳定黏附性的重要复合体,有助于细胞和组织的完整性<sup>[13]</sup>,复合体的破坏可导致细胞黏附减弱,而侵袭性增强<sup>[14]</sup>。上皮钙黏蛋白是抑制癌细胞侵袭性的关键抑制剂,被称为EMT过程发生的“钙黏蛋白开关”<sup>[15]</sup>。因此,本研究认为过表达KLF4基因抑制膀胱癌细胞的EMT时,上皮钙黏蛋白表达增加,使得细

胞内游离的β-catenin有更多被结合成E-cadherin/β-catenin复合体,复合体的增加使得细胞间的完整性、黏附性更强,进而削弱癌细胞的侵袭与转移能力。过表达KLF4后在细胞内、核β-catenin的表达变化是有差异的,免疫荧光实验发现过表达KLF4后阳性细胞数减少,细胞内总β-catenin及核β-catenin均显著降低。有学者<sup>[16]</sup>发现,沉默癌细胞中β-catenin后,细胞的侵袭能力降低,可能与β-catenin未能核移位与LEF/TCF转录因子结合有关。据此推测,过表达KLF4后核内β-catenin的减少可能消除核内β-catenin聚集的影响,降低了β-catenin与TCF/LEF结合几率,抑制下游靶基因的激活。

同时发现,当膀胱癌细胞过表达KLF4后,细胞内MMP-9、c-Myc蛋白表达水平均不同程度的降低。MMP-9通过降解、破坏细胞外基质中参与肿瘤细胞

黏附、血管的侵入而使肿瘤细胞发生侵袭和远处转移<sup>[17-18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>发现,人膀胱癌转移癌细胞中MMP9和核 $\beta$ -catenin表达显著升高,且MMP9和核 $\beta$ -catenin之间有明显的关联。抑制细胞质内 $\beta$ -catenin磷酸化的降解,刺激Wnt信号的激活,显著增加核 $\beta$ -catenin,导致MMP9活化。反之,则抑制Wnt信号转导,显著降低核 $\beta$ -catenin并导致MMP9表达受到抑制,提示 $\beta$ -catenin的核转位可能通过直接启动子结合激活MMP9。与此类似,本实验中过表达KLF4后细胞内 $\beta$ -catenin蛋白表达均减少,提示Wnt信号通路可能参与了KLF4的下游调控,Wnt信号通路并下游靶基因c-Myc的转录也受到抑制作用。Transwell迁移实验则直接证明,过表达KLF4后肿瘤细胞的侵袭性明显下降。LV-KLF4组发生迁移的细胞数较LV-NC组分别减少了约30%和70%,表明过表达KLF4可能经Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,影响细胞质及细胞核内 $\beta$ -catenin的分布及表达,抑制下游靶基因转录,使癌细胞的侵袭能力显著降低。

综上,本研究首次将膀胱癌、EMT过程、 $\beta$ -catenin及KLF4转录因子联系起来,发现KLF4可在体外抑制膀胱癌细胞EMT的发生。通过对Wnt经典信号通路关键分子 $\beta$ -catenin、下游靶基因c-Myc及体现肿瘤侵袭转移的MMP9表达的研究,KLF4可能经Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路影响E-cadherin/ $\beta$ -catenin复合体的稳定连接,增强癌细胞之间的黏附性,抑制癌细胞的侵袭与转移。

## [参考文献]

- [1] 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. 癌症进展, 2013, 11(1): 89-95. DOI: 10.3969/j.issn.1672-1535.2013.01.021.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. DOI:10.3322/caac.21492.
- [3] KALLURI R, WEINBERG R A. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420-1428. DOI: 10.1172/jci39104.
- [4] BRYAN R T, TSELEPIS C. Cadherin switching and bladder cancer [J]. J Urol, 2010, 184(2): 423-431. DOI:10.1016/j.juro.2010.04.016.
- [5] TETREAULT M P, YANG Y, KATZ J P. Krüppel-like factors in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(10): 701-713. DOI: 10.1038/nrc3582.
- [6] OHNISHI S, OHNAMI S, LAUB F, et al. Downregulation and growth inhibitory effect of epithelial-type Krüppel-like transcription factor KLF4, but not KLF5, in bladder cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 308(2): 251-256. DOI:10.1016/s0006-291x(03)01356-1.
- [7] 李晓光. 初发非肌层浸润性膀胱癌中KLF4、E-cadherin的表达及其关系探讨[D]. 遵义: 遵义医学院, 2018.
- [8] 王得胜. KLF4及E-cadherin在复发非肌层浸润性膀胱癌中表达检测及意义[D]. 遵义: 遵义医学院, 2018.
- [9] WANG X, LIANG Z, XU X, et al. MiR-148a-3p represses proliferation and EMT by establishing regulatory circuits between ERBB3/AKT2/c-myc and DNMT1 in bladder cancer[J/OL]. Cell Death Dis, 2016, 7(12): e2503[2019-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5261009/>. DOI:10.1038/cddis.2016.373.
- [10] PANG X, FU X, CHEN S, et al. Overexpression of CIP2A promotes bladder cancer progression by regulating EMT[J]. Clin Transl Oncol, 2016, 18(3): 289-295. DOI: 10.1007/s12094-015-1366-z.
- [11] LI H, WANG J, XIAO W, et al. Epigenetic inactivation of KLF4 is associated with urothelial cancer progression and early recurrence [J]. J Urol, 2014, 191(2): 493-501. DOI:10.1016/j.juro.2013.08.087.
- [12] NUSSE R, CLEVERS H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999. DOI:10.1016/j.cell.2017.05.016.
- [13] 郝俊龙, 王亚鹏, 杨凯, 等. 葡萄糖转运蛋白-1通过Wnt/ $\beta$ -catenin通路促进骨肉瘤MG63细胞迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(5): 469-474. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.005.
- [14] DU Y H, WANG Y C, ZHANG F, et al. Regulation of metastasis of bladder cancer cells through the WNT signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2015, 36(11): 8839-8844. DOI: 10.1007/s13277-015-3563-3.
- [15] DROCAŞ A I, TOMESCU P I, MITROI G, et al. The cadherin switch assessment in the epithelial-mesenchymal transition of urothelial bladder carcinomas[J]. Rom J Morphol Embryol, 2016, 57(3): 1037-1044.
- [16] 刘全海, 申骏龙, 李晶, 等.  $\beta$ -catenin在膀胱癌上皮-间质转化中的作用及相关机制[J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(11): 1671-1674. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2018.11.006.
- [17] 胡松, 郭建极, 刘涛, 等. 食管鳞癌患者血清IL-23和MMP-9的相关性及其临床意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(18): 2905-2907. DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2014.18.012.
- [18] YANG X Z, CUI S Z, ZENG L S, et al. Overexpression of Rab1B and MMP9 predicts poor survival and good response to chemotherapy in patients with colorectal cancer[J]. Aging, 2017, 9(3):914-931. DOI:10.18632/aging.101200.
- [19] 孙琳, 张文静, 吴靖芳. E-钙黏素、 $\beta$ -连环蛋白与肿瘤关系的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(11): 2832-2834. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.11.104.

[收稿日期] 2019-03-23

[修回日期] 2019-05-27

[本文编辑] 党瑞山