

①

NGX6 对 Wnt/ β -catenin 通路 β -catenin/TCF/LEF 转录活化的影响

刘 芬,沈守荣,李宏韬,王晓艳,彭 娅,廖曼甜,郭 勤

(中南大学湘雅三医院消化内科,长沙 410013)

[摘要] 目的:探讨 NGX6 基因对结肠癌 Wnt 信号转导通路 β -catenin/TCF/LEF 转录活化的影响,明确 NGX6 在 Wnt/ β -catenin 信号转导通路中的作用机制。方法:(1)构建 β -catenin 野生型真核表达载体 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT), (2)转染外源性 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)及 pCMV-myc-NGX6 于 COS-7 细胞,TCF-4 荧光素酶报告质粒检测转染 NGX6 前后 TCF-4 的转录活性。(3)无外源性 β -catenin, pCMV-myc-NGX6 单独转染 COS-7 细胞及结肠癌 SW620 细胞, TCF-4 荧光素酶报告质粒检测 TCF-4 的转录活性,并采用 Western blot 的方法检测两组细胞核内 β -catenin 及 TCF-4 的表达。结果:(1)成功构建真核表达载体 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT); (2) pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)与 pCMV-myc-NGX6 共转染 COS-7 细胞较 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)单独转染时 TCF-4 荧光素酶活性明显下降 ($P < 0.05$); (3)无外源性 β -catenin, pCMV-myc-NGX6 转染 COS-7 及 SW620 细胞后 TCF-4 荧光素酶活性较空白质粒转染组下降 ($P < 0.05$); (4) NGX6 转染 COS-7 及 SW620 后核内 β -catenin 及 TCF-4 的表达下降。结论:NGX6 对结肠癌中 Wnt/ β -catenin 通路的 β -catenin/TCF/LEF 转录活化具有负性调节作用,其作用机制可能与 NGX6 抑制 β -catenin 的核转位有关。

[关键词] NGX6 基因; 结肠癌; 信号转导; Wnt/ β -catenin; TCF/LEF

[中图分类号] R735.35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)06-0985-07

Effects of NGX6 on the transcriptional activation of β -catenin/TCF/LEF in Wnt/ β -catenin signal pathway

LIU Fen, SHENG Shou-rong, LI Hong-tao, WANG Xiao-yan, PENG Ya, LIAO Man-tian, GUO Qin

(Department of Gastroenterology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of NGX6 on the transcriptional activation of β -catenin/TCF/LEF in Wnt/ β -catenin signal pathway, and to identify the role of NGX6 in Wnt signal pathway. **Methods** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT) was constructed. pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT) and pCMV-myc-NGX6 were cotransfected to COS-7 and the transcriptional activity of TCF/LEF was detected by TCF-4 luciferase report system. Without exogenous β -catenin, pCMV-myc-NGX6 was transfected alone to COS-7 and colon cancer cell line SW620, and the transcriptional activity of TCF/LEF was detected by TCF-4 luciferase report system, and then the expression of nucleus β -catenin and TCF-4 was detected by Western blot. **Results**

The eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT) was successfully constructed. The activation of TCF-4 luciferase report gene in the cotransfection group in COS-7 was less than

①收稿日期(Date of reception) 2007-04-11

作者简介(Biography) 刘芬(1979-),女,湖南永州人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤分子发病机制的研究。

通讯作者(Corresponding author) 沈守荣, E-mail: sss-35403@163.com

基金项目(Foundation items) 国家“973”重大科技计划项目子课题(2006CB910503);国家自然科学基金项目(30500238; 30770972);湖南省自然科学基金(06JJ20068; 04JJ3109);中南大学研究生学位论文创新工程(234075245);中南大学湘雅三医院博士化基金 This work was supported by “973” Program (2006CB910503); National Natural Science Foundation of China (30500238;30770972); Natural Science Foundation of Hunan Province (06JJ20068; 04JJ3109); Postgraduate Thesis Creation Project of Central South University (234075245); Doctor's Foundation of The Third Xiangya Hospital, Central South University

that in NGX6 alone transfection group ($P < 0.05$). The activation of TCF-4 luciferase report gene in NGX6 alone transfection group without exogenous β -catenin was less than that in pCMV-myc transfection group in COS-7 and SW620. The expression of β -catenin and TCF-4 was decreased after the NGX6 transfection in COS-7 and SW620 cells. **Conclusion** NGX6 can inhibit the transcriptional activation of β -catenin/TCF/LEF in Wnt signal pathway by its negative regulation in the nuclear translocation of β -catenin.

Key words: *NGX6* gene; colon cancer; signal transduction; Wnt/ β -catenin; TCF/LEF

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007,32(6):0985-07]

结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,在西方国家结肠癌是癌相关性死亡的主要原因,我国结肠癌的发病率亦呈逐年上升趋势。从分子机制上阐明这一肿瘤的发生将会对我们更好地诊断和治疗该肿瘤,改善预后产生深远影响。*NGX6* 基因是中南大学肿瘤研究所分子遗传室采用定位侯选克隆策略克隆的一个侯选抑瘤基因(基因登陆号:AF188239),定位在染色体 9P21-22 区。9P21-22 区域的等位基因杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)现象是人类多种肿瘤中的共同事件^[1-3],提示 *NGX6* 可能是肿瘤相关基因。本课题组的前期研究工作已经证实 *NGX6* 具有抑制结肠癌增殖和转移的作用^[4-6]。随后利用 cDNA microarray 技术探讨 *NGX6* 对结肠癌细胞系 *HT-29* 基因表达谱的影响时发现 *NGX6* 重表达可以引起 Wnt/ β -catenin 信号通路上的相关分子 *DKK1* (*dikkopf Xenopus laevis* homolog 1) 表达上调, *MMP1* (*matrix metalloproteases-1*), *ILK* (*integrin-linked kinase*), *COL11A1* (*Collagen, type XI, alpha 1*) 表达下调^[7], 而 Wnt 通路与结肠癌增殖和转移密切相关^[8-11]。这一信息给我们一个强烈提示:*NGX6* 是否通过参与调节 Wnt/ β -catenin 信号通路而发挥其抑制肿瘤增殖和转移的作用? 为了明确 *NGX6* 与 Wnt 通路的关系,本文从 *NGX6* 对 Wnt 通路下游靶分子的影响,结合阻断技术研究 Wnt 通路对 *NGX6* 的反馈调节等方面探讨 *NGX6* 与 Wnt 通路之间可能存在的相互作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和基因瞬时转染 人结肠癌细胞系 *HT-29*, *SW620* 以及非洲绿猴肾细胞 *COS-7* 由中南大学肿瘤研究所分子遗传室惠赠,用含有 12% 的胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃, 5% CO_2 培养箱中传代培养。各种真核表达载体的瞬时转染由 Lipofectamine 2000 或 Lipofectamine 介导(美国

Invitrogen 上海公司),质粒 DNA 与脂质体的比例约为 1.5:1(g/L),48 h 后收获细胞,提取蛋白质或裂解后用于荧光素酶报告实验。

1.2 菌株和质粒载体 大肠杆菌 JM109 (#D9052)购自于日本 TakaRa 公司。pCMV-Myc 真核表达质粒(#K6003-1)购自于美国 BD 公司。pCMV-Myc-NGX6 由彭淑平博士赠送。pcDNA3.1 (+)载体为哺乳动物高效表达载体,购自美国 Invitrogen 公司。pGEM-T Easy 载体系统为美国 Promega 公司产品(#A3600)。Topflash (Tcf reporter plasmid)荧光素酶报告质粒购自美国 Upstate 公司。

1.3 真核表达载体构建 采用 pcDNA3.1- β -catenin (WT) 构建策略图(图 1)。

1.3.1 引物设计 下列引物序列通过 primer3 软件(http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)设计,引物由 Invitrogen 上海公司合成。 β -catenin (WT) 的引物:引物两端加有酶切位点 *Bam* HI 和 *Xho* I, β -catenin (WT) 全长 2.3 kb: left-primer: 5'-TTTGGATCCATGGCTACTCAAGCTG-3' (25 bp); right-primer: 5'-GGGCTC-GAGTTACAGGTCAGTATCAAAA-3' (28 bp)。

1.3.2 HT-29 细胞中目的片段 β -catenin (WT) 的扩增 采用 Pyrobest DNA polymerase (日本 Takara 公司)扩增 β -catenin (WT), PCR 反应体系 50 μL , 反应条件:94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 2 min, 共 30 个循环,72℃ 10 min, 4℃ 终止, PCR 产物进行胶回收纯化。

1.3.3 亚克隆目的片段至 T-A 载体 按 T-A 克隆试剂盒说明书操作。目的片段与 T-A 载体的连接反应体系如下:T4DNA 连接酶 2 \times 快速连接缓冲液 5 μL ; pGEM-TEasy 载体(50 ng) 1 μL ; 目的片段(PCR 纯化产物) 3 μL , T4DNA 连接酶(3 Weiss 单位/ μL) 1 μL ; 转化感受态大肠杆菌 JM109, 挑选阳性克隆, 测序鉴定。*Bam* HI 和 *Xho* I 双酶切载体 pcDNA3.1 (+) 和目的片段。用 T_4 DNA Ligase 连接目的片段及载体。

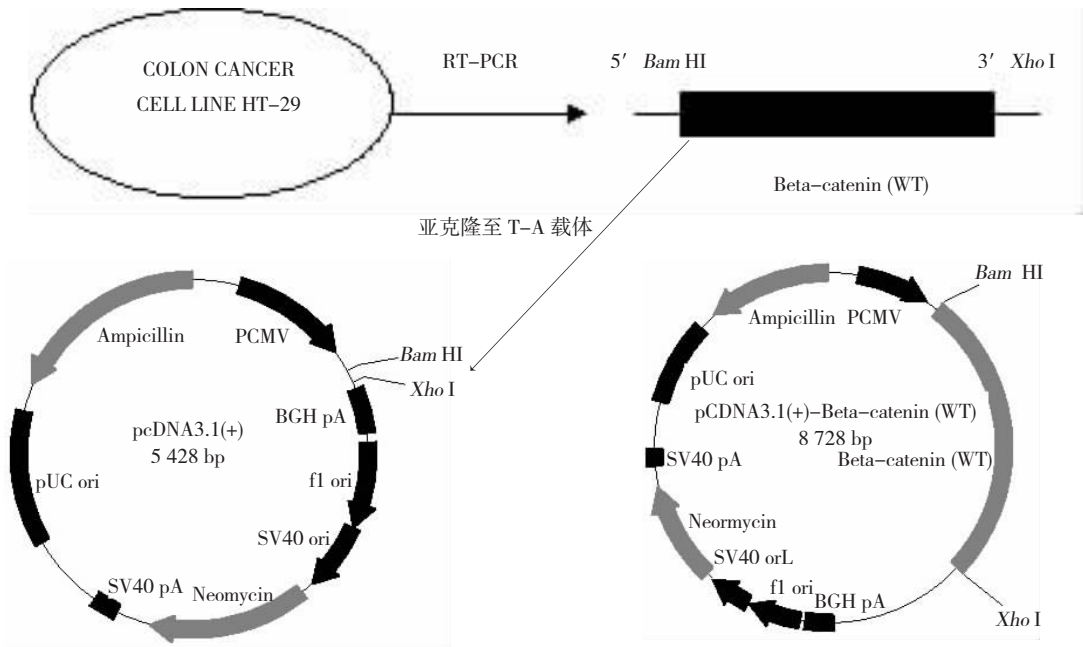


图1 真核表达载体 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)的构建示意图

Fig.1 Construction diagram of eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)

1.3.4 连接产物转化,挑选克隆,提取质粒,双酶切鉴定及 DNA 测序 *Xho I* 酶切鉴定 Topflash 质粒,酶切产物经琼脂糖凝胶电泳判断产物正确。*Bam HI* 和 *Xho I* 双酶切鉴定 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT),鉴定符合要求的阳性质粒送大连宝生物公司测序,测序引物为 T7 及 SP6 引物。

1.4 细胞核蛋白质抽提及 Western blot 实验 细胞核蛋白抽提按照核蛋白抽提试剂盒操作说明进行(美国 promega 公司),Western blot 实验按以下步骤进行:(1)根据待检测蛋白质的大小选择合适浓度的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每泳道上样 50 μ g,先 80 V 2 h,再 120 V 4~6 h,4 $^{\circ}$ C 冷室中进行。(2)用电转移法将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,2 h,4 $^{\circ}$ C 冷室中进行。(3)5% 脱脂牛奶-PBS 封闭硝酸纤维素膜,室温下摇 1 h,用 PBS 洗 2 次。(4)加入一抗,4 $^{\circ}$ C 摇过夜,PBS 洗 4 次,每次 5 min。(5)加入二抗,室温摇 1~2 h,PBS 洗 4 次,每次 5 min。(6)用 Pirece 公司的 ECL 试剂盒进行化学发光检测。X 光片压片、显影、定影。

1.5 TCF-4 荧光素酶报告质粒检测实验 采用 12 孔板进行基因瞬时转染,48 h 后收获细胞,采用 TCF-4 荧光素酶报告测定系统在单光子检测仪上测定 TCF-4 的荧光素酶活性。数据经统计学软

件 SPSS10.0 处理,采用配伍组样本均数间的比较,检验水准 $P = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 真核表达载体 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)的构建 为研究 NGX6 与 β -catenin/TCF/LEF 转录活化之间的关系,本研究构建了真核表达载体 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)用于瞬时共转染。

2.1.1 β -catenin(WT)的扩增与亚克隆 采用 RT-PCR 法从 HT-29 细胞中扩增出 β -catenin(WT)全长为 2.3 kb,然后将 β -catenin(WT)亚克隆至 pGEM-T Easy 载体系统,进行酶切鉴定及 DNA 测序(图 2~4)。

2.1.2 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)的连接转化及鉴定 将纯化后的目的片段 β -catenin(WT)与真核表达载体 pcDNA3.1(+)进行连接,转化大肠杆菌,挑取阳性克隆进行酶切鉴定及 DNA 测序。pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)酶切鉴定结果显示 4,6,8,9 号克隆为阳性克隆,4 号克隆 DNA 测序结果正确(图 5,6)。

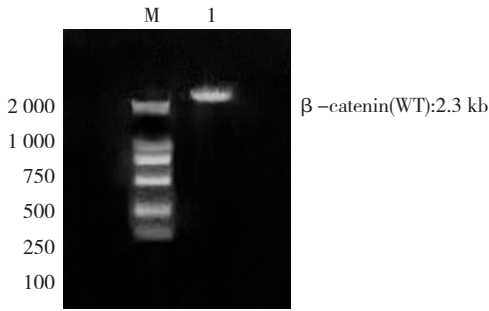


图2 RT-PCR 法扩增 β -catenin(WT) M: Marker; 1: β -catenin(WT)
 Fig.2 Amplification of the full length of β -catenin(WT) by RT-PCR M: Marker; 1: β -catenin(WT)

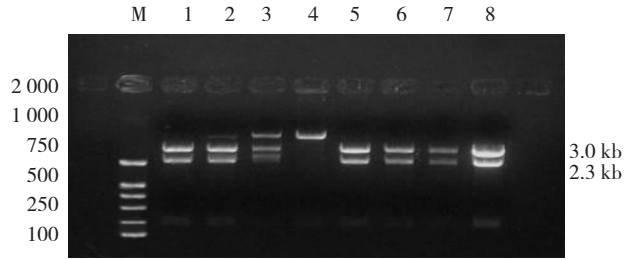


图3 β -catenin(WT)-T-A-vec 酶切鉴定结果 1,2,3,5,6,7,8 号克隆为阳性克隆,1 号克隆送 DNA 测序正确
 Fig.3 Identification of β -catenin(WT)-T-A vector by enzyme digestion Lanes 1,2,3,5,6,7,8 are positive clones, and DNA sequencing of No 1 is correct

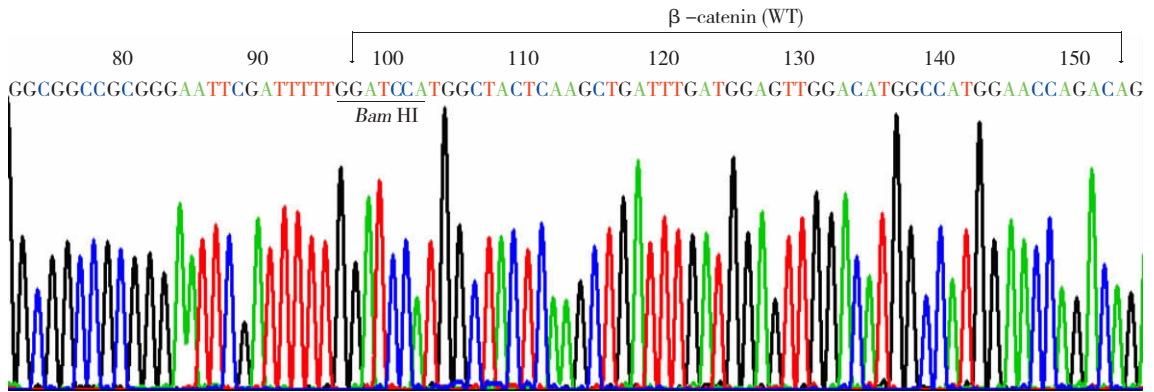


图4 β -catenin(WT)-T-A-vec1 号克隆的 DNA 测序结果
 Fig.4 DNA sequencing of β -catenin(WT)-T-A-vector

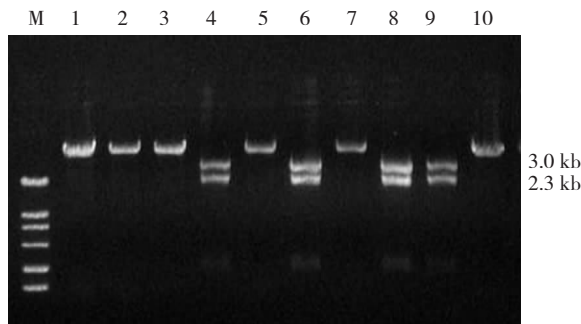


图5 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT) 酶切鉴定结果 其中 4,6,8,9 号克隆为阳性克隆
 Fig.5 Identification of pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT) by enzyme resection Lanes 4,6,8,9 are positive clones

2.2 Topflash luciferase assay 检测 *NGX6* 对 β -catenin/TCF/LEF 转录活化的影响

2.2.1 转染 *NGX6* 和外源 β -catenin COS-7 细胞内源性 β -catenin 的含量较低,本部分以 COS-7 细胞为研究对象,采用瞬时共转染结合荧光素酶报告质粒检测的方法,研究转染 *NGX6* 与外源性 β -catenin 以及单独转染外源性 β -catenin 对转录因子 TCF-4 的转录活性的影响,结果显示,共转染 *NGX6* 及外源性 β -catenin 的细胞组较单独转染外源性 β -catenin 的细胞组 TCF-4 的荧光素酶活性明显下降 ($P < 0.05$) (图 7)。

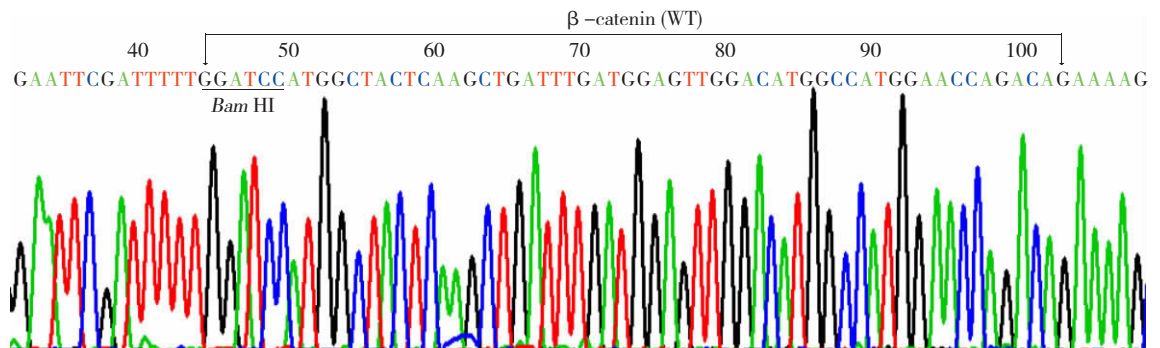


图6 pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)4 号克隆的 DNA 测序结果
 Fig.6 DNA sequencing of pcDNA3.1(+)- β -catenin(WT)

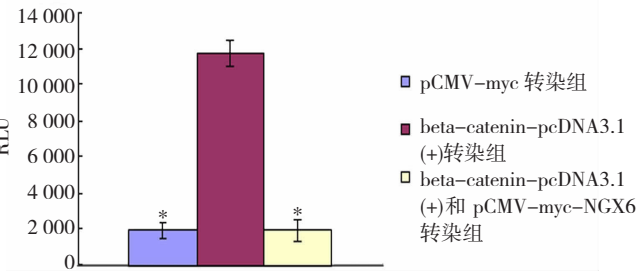


图7 瞬时转染 COS-7 细胞(转染外源 β -catenin)48 h TCF-4 荧光素酶活性测定 与 TCF-4 + β -catenin-pcDNA3.1 转染组比较, * $P < 0.05$

Fig.7 TCF-4 luciferase activity assay in COS-7 cell after transient transfection (with extrogenous β -catenin) for 48 h Compared with NGX6 alone transfection group, * $P < 0.05$

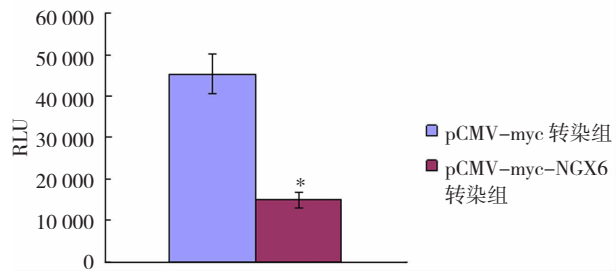


图8 瞬时转染 COS-7 细胞(无外源 β -catenin)48 h TCF-4 荧光素酶活性测定 与 pCMV-myc 转染组比较, * $P < 0.05$

Fig.8 TCF-4 luciferase activity assay in COS-7 cell after transient transfection (without extrogenous β -catenin) for 48 h Compared with pCMV-myc transfection group, * $P < 0.05$

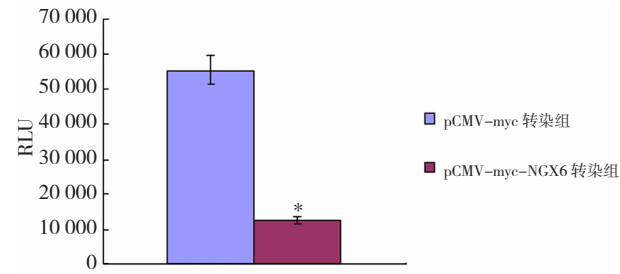


图9 瞬时转染结肠癌 SW620 细胞 48 h TCF-4 荧光素酶活性测定 与 TCF-4 + pCMV-myc 转染组的比较, * $P < 0.05$

Fig.9 TCF-4 luciferase activity assay in SW620 cell after transient transfection for 48 h Compared with pCMV-myc transfection group, * $P < 0.05$

2.2.2 转染 NGX6, 无外源 β -catenin 本部分以含有内源性 β -catenin 较高的结肠癌 SW620 细胞以及含内源性 β -catenin 较低的 COS-7 细胞为研究对象, 同样采用瞬时共转染及 TCF-4 荧光素酶报告质粒检测的方法, 检测 NGX6 转染前后 TCF-4 报告质粒的荧光素酶活性。结果显示, NGX6 转染后两组细胞的 TCF-4 荧光素酶活性均有下降 ($P < 0.05$) (图 8, 9)。

2.3 Western-blot 检测 NGX6 转染前后 SW620 细胞及 COS-7 细胞核内 β -catenin, TCF-4 的表达 Western blot 检测结果表明 NGX6 转染后两株细胞的核内 β -catenin 及 TCF-4 的表达均有下降, SW620 细胞更为明显(图 10, 11)。

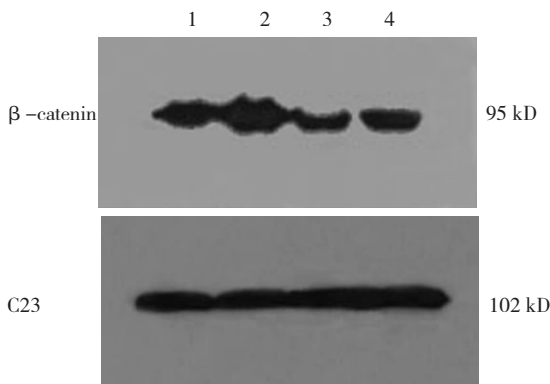


图10 Western blot 检测 NGX6 转染前后 SW620 细胞及 COS-7 细胞核内 β -catenin 表达 1: pCMV-myc/NGX6/SW620; 2: pCMV-myc/SW620; 3: pCMV-myc/NGX6/COS-7; 4: pCMV-myc/COS-7

Fig.10 Expression level of β -catenin in nucleus of SW620 and COS-7 cell by Western blot 1: pCMV-myc/NGX6/SW620; 2: pCMV-myc/SW620; 3: pCMV-myc/NGX6/COS-7; 4: pCMV-myc/COS-7

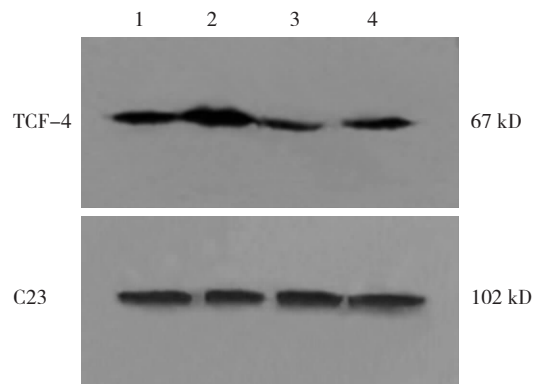


图11 Western blot 检测 NGX6 转染前后 SW620 细胞及 COS-7 细胞核内 TCF-4 的表达 1: pCMV-myc/NGX6/SW620; 2: pCMV-myc/SW620; 3: pCMV-myc/NGX6/COS-7; 4: pCMV-myc/COS-7

Fig.11 Expression level of TCF-4 in nucleus of SW620 and COS-7 cell by Western blot 1: pCMV-myc/NGX6/SW620; 2: pCMV-myc/SW620; 3: pCMV-myc/NGX6/COS-7; 4: pCMV-myc/COS-7

3 讨 论

Wnt 信号通路的核心分子是 β -catenin。正常成熟细胞中 Wnt 信号缺乏时,胞浆及胞核中 β -catenin 亦相对缺乏。胞浆内 β -catenin 大部分与胞膜上 E-cadherin 结合,形成一个类似拐杖的结构,介导细胞间的黏附^[8],少部分与胞浆内 APC、脚手架蛋白 Axin、蛋白激酶 GSK-3 β 以及酪蛋白激酶 CK1 结合形成复合物,后四者又称为“ β -catenin 的破坏复合体”,并受 GSK-3 β 磷酸化而激活^[9],正常情况下,磷酸化的 β -catenin 与泛素连接酶复合物的一个亚单位 β -TrCP 结合,经泛素介导的蛋白酶途径降解。有研究表明, β -catenin 本身并不能直接与 DNA 结合,需要与 DNA 结合蛋白 TCF (T Cell Factor)/LEF (Lymphoid Enhancer Factor) 相互作用,在核内共同调控靶基因的表达,从而完成 Wnt 信号的最终效应^[10]。

为研究 *NGX6* 与 β -catenin/TCF/LEF 转录活化之间的关系,笔者在内源性 β -catenin 含量相对较低的 COS-7 细胞中瞬时共转染 *NGX6* 和外源 β -catenin (WT) 来研究 *NGX6* 对 TCF-4 转录活性的影响,发现 *NGX6* 与外源 β -catenin (WT) 共转染比外源 β -catenin (WT) 单独转染的 COS-7 细胞 TCF-4 的荧光素酶报告质粒活性明显下降。提示 *NGX6* 可能通过对 β -catenin 的负性调节作用来发挥它在 Wnt 通路中的抑制作用。随后我们对比了 COS-7 细胞和结肠癌 SW620 细胞在接受外源 *NGX6* 转染,而无外源 β -catenin 转染的情况下 TCF-4 转录活性的变化情况,结果发现转染 *NGX6* 后两种细胞系中的 TCF-4 转录活性均下降,同时 Western blot 检测结果发现核内 β -catenin 及 TCF-4 的蛋白表达水平明显下降,SW620 细胞的变化更为显著。提示 *NGX6* 对于 β -catenin 的抑制作用是确切的,它通过对 β -catenin 的核内聚集的抑制从而减少 β -catenin 与 TCF-4 的结合进而减少下游靶基因的转录活化。

在前期的研究中,本课题组成员已经证实 *NGX6* 能够调节 β -catenin 的亚细胞定位,使其胞核及胞浆内含量降低,而胞膜聚居增加。在 *NGX6* 稳定转染细胞系 HT-29 中采用 Western blot 测定其蛋白水平发现 β -catenin 的总蛋白、胞浆及胞核蛋白均较未转染组降低。本研究采用 *NGX6* 与外源 β -catenin 共转染以及单独转染 *NGX6*,没有外源 β -catenin 研究结肠癌 SW620 细胞中 TCF-4 的启动子

活性以及检测核内 β -catenin 及 TCF-4 的蛋白水平的表达,结果亦提示 *NGX6* 能够负性调控 β -catenin 及其核内转录因子 TCF-4。从 Wnt/ β -catenin 信号通路的作用途径可以发现基因突变或其他原因导致的 β -catenin 泛素蛋白酶途径降解受阻,胞浆聚集及核内移位都将导致核内转录因子 TCF-4 的激活以及下游靶基因的转录和表达,故推测 *NGX6* 调控 β -catenin 的可能机制为:(1) 增加胞浆内 β -catenin 的降解,减少其向核内转位,这一作用可能是由于 *NGX6* 增强了 β -catenin“破坏复合物”中一个或多个成员的活性从而增加了 β -catenin 的降解;(2) 参与 APC 的核内—胞浆穿梭功能,使 β -catenin/TCF-4 复合物形成受到抑制; β -catenin 核输出增加;出核的 β -catenin 在胞浆内进一步被破坏复合物降解;出核的 β -catenin 移至胞膜与 E-cadherin 结合增加,使得细胞间的黏附增强从而抑制转移。前期的细胞黏附与侵袭转移实验已经初步证实 *NGX6* 可以增强细胞间的黏附,可能参与转移的抑制,那么 *NGX6* 在参与负性调节 Wnt 信号通路中对 β -catenin 的抑制作用是否也通过促进 β -catenin 从核内输出至核外,导致核内 β -catenin 的表达降低,然后在胞浆内促进 β -catenin 被降解复合物降解,或者促进 β -catenin 与胞膜上的 E-cadherin 结合增加从而增加细胞间黏附而发挥作用呢? 这些深入的机制探讨尚待更进一步的实验研究。

NGX6 能够明显抑制 β -catenin 介导的 TCF/LEF 转录活化,并能降低核内 β -catenin 及 TCF-4 的表达,这一结果初步证实 *NGX6* 能够负性调控 Wnt/ β -catenin 信号通路,其作用的靶点可能在 β -catenin,*NGX6* 能够减少 β -catenin 的核内聚集,具体的调控机制可能是通过与 β -catenin 直接的相互作用或者通过影响 Wnt 通路上的其他相关分子间接作用于 β -catenin。

参考文献:

- [1] Kim N G, Kim J J, Ahn J Y, et al. Putative chromosomal deletions on 9P, 9Q and 22Q occur preferentially in malignant gastrointestinal stromal tumors [J]. Int J Cancer, 2000, 85(5):633-638.
- [2] Weber T K, Conroy J, Keitz B, et al. Genome-wide allelotyping indicates increased loss of heterozygosity on 9p and 14q in early age of onset colorectal cancer [J]. Cyto-genet Cell Genet, 1999, 86(2):142-147.

- [3] Martignetti J A, Ge1b B D, Pierce H, et al. Malignant fibrous histio-cytoma: inherited and sporadic forms have loss of heterozygosity at chromosome bands 9p21-22-evidence for a common genetic defect [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 27(2):191-195.
- [4] 张晓梅,沈守荣,王晓艳,等.胃癌和大肠癌中肿瘤相关基因 *NGX6* 的表达[J].*世界华人消化杂志*, 2002, 10(8):873-876.
ZHANG Xia-mei, SHEN Shou-rong, WANG Xiao-yan, et al. Expression of tumor related genes *NGX6* in gastric and colorectal cancer[J]. *World Chin J Digest*, 2002, 10(8): 873-876.
- [5] 王晓艳,沈守荣,刘华英,等.抑瘤基因 *NGX6* 对人结肠癌细胞 HT-29 生长的影响[J].*世界华人消化杂志*, 2004, 12(3):574-579.
WANG Xiao-yan, SHEN Shou-rong, LIU Hua-ying, et al. Effects of tumor suppressor gene *NGX6* on growth of human colon cancer cell line HT-29 [J]. *World Chin J Digest*, 2004, 12(3):574-579.
- [6] 王晓艳,沈守荣,刘芬,等.*NGX6* 基因对人结肠癌细胞 HT-29 细胞周期的影响[J].*生物化学与生物物理进展*, 2006, 33(1):1-6.
WANG Xiao-yan, SHEN Shou-rong, LIU Fen, et al. Effects of *NGX6* gene on cell cycle in colon cancer cell Line HT-29 [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, 33(1):1-6.
- [7] 刘芬,王晓艳,连平,等.*NGX6* 对结肠癌细胞 HT-29 基因表达谱的影响[J].*癌症*, 2005, 24(9):1064-1070.
LIU Fen, WANG Xiao-yan, LIAN Ping, et al. Effects of *NGX6* on gene expression profile of colon carcinoma cell line HT-29 [J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2005, 24(9): 1064-1070.
- [8] Clements W M, Lowy A M, Groden J. Adenomatous polyposis coli/ β -catenin interaction and downstream targets: altered gene expression in gastrointestinal tumors [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2003, 3(2):113-120.
- [9] Wateran M L. Lymphoid enhancer factor/T cell factor expression in colorectal cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, 23(1-2):41-52.
- [10] Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis [J]. *Int J Dev Biol*, 2004, 48(5-6):477-487.
- [11] Kolligs F T, Bomer G, Goke B. Wnt/ β -catenin/Tcf signaling: A critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis [J]. *Digestion*, 2002, 66(3):131-144.

(本文编辑 陈丽文)