

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01277

大鼠神经干细胞通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制神经胶质瘤生长

李一明¹, 李维卿², 卢亦成^{1*}, 余宏宇², 韩焕兴³, 何金², 徐毅²

1. 第二军医大学长征医院神经外科, 上海 200003
2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003
3. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨大鼠神经干细胞对 C6 成胶质细胞瘤细胞生长的影响, 并探讨可能的作用机制。**方法** 采用 0.4 μm 孔径的 Transwell 小室将 C6 成胶质细胞瘤细胞和神经干细胞(NSCs)按不同比例[(C6 : NSCs): 5 : 1(2×10^5 : 4×10^4), 1 : 1(2×10^5 : 2×10^5), 1 : 5(4×10^4 : 2×10^5)]在无血清培养基中共培养 7 d 作为实验组, 以单独培养的 C6 成胶质细胞瘤细胞作为对照组。采用 SCID 荷瘤动物模型观察共培养体系中 C6 成胶质细胞瘤细胞的成瘤能力; 利用半定量 RT-PCR 及蛋白质印迹等方法分析在共培养体系中 C6 成胶质细胞瘤细胞凋亡相关基因(BMP2、c-Myc、Bcl-2、p53 mRNA)及 Wnt 信号分子蛋白(β -catenin、survivin)的表达。**结果** 与实验组相比, 对照组的组织切片中肿瘤细胞恶性程度高, 有较多的核分裂像, 核/质比例高; 大片区域出现单核或多核瘤巨细胞。在实验组中, 随着共培养体系中起始神经干细胞比例增高, 肿瘤细胞异型性逐步降低。随着共培养体系中起始神经干细胞比例增高, C6 成胶质细胞瘤细胞 p53 mRNA 的表达水平逐步增高, BMP2、c-Myc、Bcl-2 mRNA 表达水平则逐步降低($P < 0.05$), β -catenin、survivin 蛋白表达水平逐步降低($P < 0.05$)。**结论** 大鼠神经干细胞在胶质瘤微环境中可能通过 Wnt/ β -catenin 途径促进神经胶质瘤细胞凋亡进而抑制神经胶质瘤生长。

[关键词] 神经干细胞; 胶质母细胞瘤; Wnt/ β -catenin 信号转导通路; 细胞凋亡

[中图分类号] R 730.264 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1277-05

Rat neural stem cells inhibit C6 glioma cell proliferation through Wnt/ β -catenin pathway

LI Yi-ming¹, LI Wei-qing², LU Yi-cheng^{1*}, YU Hong-yu², HAN Huan-xing³, HE Jin², XU Yi²

1. Department of Neurosurgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
3. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of rat neural stem cells on C6 glioma cell proliferation and to explore the possible mechanism. **Methods** We co-cultured neural stem cells with C6 glioma cells at different ratios (1 : 1 [2×10^5 : 2×10^5], 1 : 5 [4×10^4 : 2×10^5], 5 : 1 [2×10^5 : 4×10^4]) in serum-free medium using Transwell chamber culture system for 7 days, and C6 glioma cells cultured alone served as controls. The tumorigenic ability of C6 glioma cells was observed by means of SCID mice transplantation. RT-PCR and Western blotting analysis were used to examine the expression of apoptosis-related proteins (BMP2, c-Myc, Bcl-2 and p53 mRNA) and Wnt signal molecules (β -catenin and survivin). **Results** Compared with the experimental group, the tumor cells in the tissue section of the control group had a higher malignant degree, with more mitoses, higher nuclear/cytoplasm ratio, and there were abundant single- or multi-core giant tumor cells in the tissue section. With the increase of neural stem cell proportion in the co-culture system, the tumor cell atypia degree decreased gradually, the expression of p53 mRNA in C6 glioma cells increased gradually, the expression of bone morphogenetic protein 2, Bcl-2, and c-Myc mRNA was decreased significantly ($P < 0.05$), and the expression of β -catenin, survivin protein was decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Rat neural stem cells may inhibit the tumorigenicity of C6 glioma cells by promoting apoptosis through Wnt/ β -catenin pathway.

[Key words] neural stem cells; glioblastoma; Wnt/ β -catenin transduction pathway; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12):1277-1281]

[收稿日期] 2010-06-23 **[接受日期]** 2010-10-22

[基金项目] 国家高技术研究发展计划("863"计划, 2005AA001070). Supported by Chinese National Programs for High Technology Research and Development ("863" Program, 2005AA001070).

[作者简介] 李一明, 博士, 主治医师. E-mail: yiyimig@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885671, E-mail: luyicheng10@gmail.com

神经胶质瘤是常见中枢神经系统肿瘤,恶性胶质瘤(如成胶质细胞瘤)患者即使接受包括手术、放疗化疗在内的综合治疗,平均生存期仅12~15个月^[1]。恶性胶质瘤患者迫切需要更有效的、分子水平的联合治疗方法。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)在脑内可特异性靶向聚集在胶质瘤细胞团周围,甚至能远距离追踪胶质瘤细胞团外的单个胶质瘤细胞^[2],以神经干细胞为载体的胶质瘤靶向治疗逐渐成为研究热点。但NSCs本身在胶质瘤发生、发展中起的作用并不明确。本研究通过共培养大鼠胶质瘤C6细胞系和NSCs,观察NSCs对C6成胶质细胞瘤细胞生长的影响,并探讨其可能的作用机制,为胶质瘤患者的临床诊治提供帮助。

1 材料和方法

1.1 大鼠胚胎神经干细胞的培养与鉴定

细胞培养:根据Vescovi等^[3]报道的方法进行细胞培养。选取孕14 d的SD大鼠(复旦大学医学院实验动物中心)分离出胚胎海马组织,机械消化至呈单细胞悬液,300×g离心5 min,弃上清。沉淀细胞溶解于含有表皮生长因子(20 μg/L)、碱性成纤维细胞生长因子(20 μg/L)、B27(20 μl/ml)的DMEM/F12无血清培养液中,细胞密度调整为 1×10^6 个/ml。于含5% CO₂、37℃环境中悬浮培养。根据细胞生长速度及培养液pH变化,3~5 d半量换液。当50%神经球直径>10个细胞时,经机械吹打后传代,连续传代6次。

细胞标记:NSCs无血清培养基中去除EGF、bFGF,加入10%胎牛血清(Gibco),相同环境中继续培养,观察细胞分化情况,并于7 d后分别采用β-tubulin III (Chemicon, 1:400)、GFAP (Chemicon, 1:400)、Hoechst 抗体三标方法标记所培养细胞。

1.2 C6成胶质细胞瘤细胞培养

C6细胞(购自中国科学院上海细胞库)在含有表皮生长因子(20 μg/L)、碱性成纤维细胞生长因子(20 μg/L)及B27(20 μl/ml)的DMEM/F12无血清培养液中,于含5% CO₂、37℃环境中悬浮培养^[4]。

1.3 大鼠神经干细胞与C6成胶质细胞瘤细胞共培养体系

采用0.4 μm孔径的Transwell小室(6孔板,Corning公司)将大鼠NSCs和C6细胞按照不同比例:C6:NSCs=5:1(2×10^5 : 4×10^4 ,B组)、C6:NSCs=1:1(2×10^5 : 2×10^5 ,C组)及C6:NSCs=1:5(4×10^4 : 2×10^5 ,D组)分隔共培养7

d,Transwell小孔放置NSCs,6孔板内放置C6细胞;细胞培养基为含有表皮生长因子(20 μg/L)、碱性成纤维细胞生长因子(20 μg/L)及B27(20 μl/ml)的DMEM/F12(Invitrogen)无血清培养基。

1.4 荷瘤动物模型的建立

SCID小鼠由第二军医大学动物实验中心引入,本室育种繁殖,饲养环境为SPF(specific pathogen free,无特定病原体),实验用鼠6~8周龄,体质量约22 g。实验小鼠分为4组,分别于小鼠腋部皮下接种 1×10^6 个细胞:A组($n=10$)为对照组,接种单独培养的C6细胞;B组($n=10$)接种C6:NSCs=5:1(2×10^5 : 4×10^4)共培养体系中的C6细胞;C组($n=10$)接种C6:NSCs=1:1(2×10^5 : 2×10^5)共培养体系中的C6细胞;D组($n=10$)接种C6:NSCs=1:5(4×10^4 : 2×10^5)共培养体系中的C6细胞。在接种肿瘤细胞的第35天,处死小鼠,取肿瘤组织用10%的甲醛固定,依次脱水、透明、石蜡包埋、切片、H-E染色及光镜检查。

1.5 半定量RT-PCR分析

按照TRIzol法(Invitrogen产品)提取共培养体系中各组C6细胞(5×10^5 细胞/组)的总RNA。cDNA合成按照反转录反应Superscript试剂盒(Invitrogen产品)说明书操作。取该产物5 μl进行PCR循环,循环参数为:95℃预变性30 s,95℃变性5 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,30次循环后,保持在4℃。BMP2正义引物序列为:5'-TGT CCC TAC TGA TGA GTT TCT-3';反义引物序列为:5'-GGC TGT GGC AGG CTT TAT-3',产物长度为130 bp。c-Myc正义引物序列为:5'-TCT CCG TCC TAT GTT GCG-3';反义引物序列为:5'-GTC CTG GAT GAT GAT GTT CTT G-3',产物长度为189 bp。p53正义引物序列为:5'-AAA TCC GTA TGC TGA GTA TCT G-3';反义引物序列为:5'-TCC AGC GTG ATG ATG GTA-3',产物长度为177 bp。Bcl-2正义引物序列为:5'-CGG GAG AAC AGG GTA TGA-3';反义引物序列为:5'-CAG GCT GGA AGG AGA AGA TT-3',产物长度为149 bp。β-actin作为内参。以上引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR扩增产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,用凝胶图像扫描系统对扩增产物的电泳条带进行采集分析。

1.6 蛋白质印迹杂交分析

共培养体系中各组C6细胞(1×10^6 细胞/组)经细胞裂解液(0.5 mol/L

Tris-HCl pH 6.8, 10% 十二烷基硫酸钠, 1 mol/L 二硫基苏糖醇) 裂解后 100℃ 变性 5~10 min, 冰水中骤冷, 4℃ 低温离心, 12 850 × g, 10 min。取上清液, 采用 Bradford 法测定总蛋白量。取 10 μg 蛋白上样, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳后, 转至 PVDF 膜; 取出膜放到 T-TBS (含 50 g/L 脱脂奶粉) 室温封闭 2 h, T-TBS 漂洗; 其后加入一抗 β -catenin (1 : 1 000, Cell signal 公司产品) 或 Survivin (1 : 1 000, 碧云天生物技术研究所), 4℃ 过夜, T-TBS 漂洗; 再加入二抗 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 2 000, 碧云天生物技术研究所), 37℃, 轻轻振荡 1 h 后弃反应液, 加入化学发光试剂反应 5 min, 应用图像分析系统观察并扫描。通过 Band-scan 软件分析条带。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包处理数据, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 one-way ANOVA 分析实验组、对照组间目标基因和蛋白表达水平差异, 检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 原代培养神经干细胞的分化鉴定结果 结果表明: 在本实验中原代分离培养的细胞具有神经干细胞球形态。贴壁分化培养后, 免疫荧光染色 (图 1) 显示其能够分化为神经元和神经胶质细胞, 充分说明在本实验中所使用的细胞具有神经干细胞本身的特性和多向分化潜能。

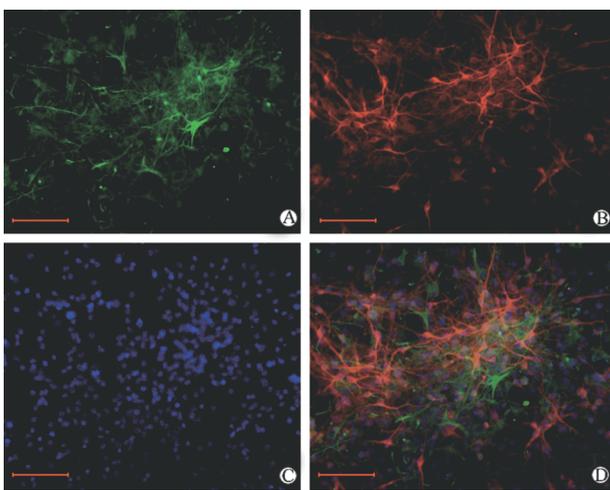


图 1 分离培养的神经干细胞的免疫荧光染色

Fig 1 Immunofluorescence staining of neural stem cells

A: GFAP (green); B: β -tubulin III immunoreactivity (red); C: Hoechst 33342 (blue); D: GFAP, β -tubulin and Hoechst fused image. Scale bar = 100 μm

2.2 荷瘤小鼠的组织切片观察 结果 (图 2) 显示: 对照组 A 的组织切片和实验组 B、C、D 相比, 肿瘤恶性程度高, 有较多的核分裂像, 核/质比例高, 大片区域出现单核或多核瘤巨细胞; 而在实验组 B、C、D 中, 随着共培养体系中的起始神经干细胞比例增高, 肿瘤细胞异型性逐步降低。结果提示: 在荷瘤小鼠模型中, C6 成胶质细胞瘤细胞的致瘤性可以被神经干细胞抑制。

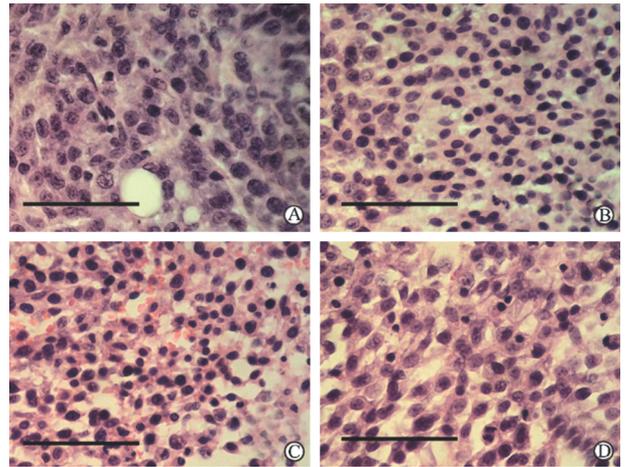


图 2 荷瘤动物模型实验: 神经干细胞抑制 C6 成胶质细胞瘤细胞的致瘤性

Fig 2 Inhibition of tumor formation ability of C6 glioblastoma cells by neural stem cells in SCID mice (H-E staining)

A: C6 control group; B: C6 : neural stem cells = 5 : 1 group; C: C6 : neural stem cells = 1 : 1 group; D: C6 : neural stem cells = 1 : 5 group. Scale bar = 100 μm

2.3 半定量 RT-PCR 分析 结果 (图 3) 表明, 与对照组相比, 实验组中, 随着共培养体系中神经干细胞所占比例的提高, C6 成胶质细胞瘤细胞中的 p53 mRNA 的表达水平增高, 而 BMP2、c-Myc 和 Bcl-2 mRNA 的表达水平则降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示: C6 成胶质细胞瘤细胞的致瘤性可以被神经干细胞抑制, 且随着共培养体系中神经干细胞的起始比例的提高, 其可促进 C6 胶质瘤细胞凋亡。

2.4 蛋白质印迹分析 结果 (图 4) 表明: 与对照组相比, 实验组中随着共培养体系中神经干细胞所占比例的提高, C6 成胶质细胞瘤细胞 β -catenin 和 survivin 蛋白表达水平降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示神经干细胞可能通过 Wnt/ β -catenin 的下调来促进神经胶质瘤细胞的凋亡, 进而抑制 C6 成胶质细胞瘤细胞的致瘤性。

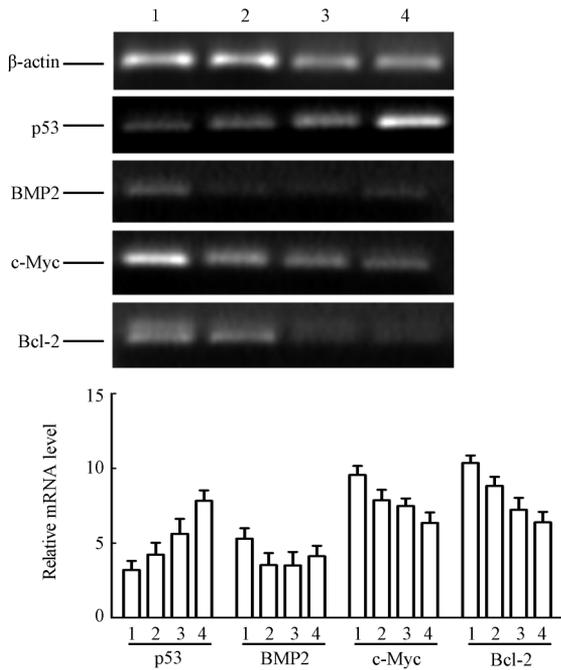


图3 不同比例C6成胶质细胞瘤细胞和神经干细胞共培养体系中的C6成胶质细胞瘤中p53、BMP2、c-Myc、Bcl-2的RT-PCR结果

Fig 3 RT-PCR results of p53, BMP2, c-Myc, and Bcl-2 in C6 glioma cells after co-culturing

neural stem cells with C6 glioma cells at different ratios

1: Control; 2: C6 : neural stem cells=5 : 1 group; 3: C6 : neural stem cells=1 : 1 group; 4: C6 : neural stem cells=1 : 5 group. One-way ANOVA, $P < 0.05$. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

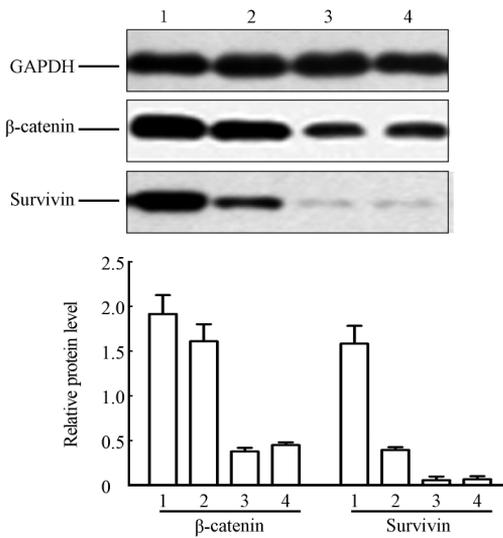


图4 不同比例C6成胶质细胞瘤细胞和神经干细胞共培养体系中C6成胶质细胞瘤中β-catenin和survivin蛋白表达水平

Fig 4 Western blotting results of β-catenin and survivin expression in C6 glioma cells after co-culturing neural stem cells with C6 glioma cells at different ratios

1: Control; 2: C6 : neural stem cells=5 : 1 group; 3: C6 : neural stem cells=1 : 1 group; 4: C6 : neural stem cells=1 : 5 group. One-way ANOVA, $P < 0.05$. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

神经干细胞(NSCs)是一类具有自我更新、多向分化潜能的细胞,其可分化为中枢神经系统内的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞3种主要神经细胞^[5];当中枢神经系统受损情况发生时,NSCs开始增殖和分化,以促进神经细胞修复受损功能^[6]。此外,研究表明 NSCs 也存在有转分化(transdifferentiation)^[7-8]和细胞融合(cell fusion)^[9]现象。Aboody等^[2]发现 NSCs 具有特异性的胶质瘤趋向性,但迁移机制并不清楚,可能与细胞外因子的相互作用及相关细胞内信号转导通路有关。利用神经干细胞所具有的强大迁移能力,将其作为基因载体^[10],携带治疗作用的报告基因进行种植,从而达到细胞修复和基因治疗的双重作用,这一治疗策略对于胶质瘤的靶向性治疗具有重要意义,能够追踪并杀灭残存的肿瘤细胞。但目前胶质瘤微环境下,神经干细胞在肿瘤发生、发展中起的作用并不明确。

本研究通过建立不同比例的神经干细胞和胶质瘤细胞共培养体系,发现随着共培养体系中神经干细胞的比增高,荷瘤小鼠的组织切片却观察到胶质瘤细胞的核/质比例降低,细胞异型性减少,这也许证明了神经干细胞在胶质瘤动物模型中具有的“修复”作用。尽管各自有其独特的起源,干细胞和肿瘤细胞却有着许多共同的特点^[11],如:调节自我更新和分化的信号通路,其中包括 Wnt/β-catenin^[12]、Notch^[13]、TGF-β/Smad^[14]和 BMP^[15]等途径,不同的信号转导通路决定了细胞命运的不同发展转归。因此,了解这些信号级联放大可以进一步了解肿瘤发生发展的分子机制。

Wnt/β-catenin 信号转导通路对于干细胞池的保持和防止细胞分化至关重要:Wnt 信号通路的缺陷会导致干/祖细胞池的萎缩甚至缺如,组织再生、修复受阻,如通过转基因使 Wnt 的拮抗物 Dickkopf-1 过表达,可以引起成年鼠的小肠隐窝缺如^[16]。Wnt 信号通路的异常与不同的肿瘤发生、发展密切相关:如在散发人大肠癌中,90%是 Wnt 信号活化的,其中 70%~80%的肿瘤存在 APC 突变,其他 10%~20%则有 β-catenin 分解抑制的突变^[17];在肝癌、胶质瘤、胰腺癌和肾癌^[18-19]中均可见到 β-catenin 的点突变,使其耐受 GSK3 介导的磷酸化和降解;而肝癌^[20]和结肠癌^[21]中可见 Axin 的突变;此外,还有好几种 Wnt 蛋白在人乳腺癌中和乳腺癌细胞系中呈高表达^[22]。Wnt 信号可以通过 Wnt 配体的过表达而直接被激活,或通过 Wnt 信号的下游组件突变的传递作用而被激活。一般的终点是干细胞区域的

不适当扩增和子代细胞增殖, 最终导致恶性事件的发生, 形成侵袭性肿瘤细胞。因此, 我们推测神经干细胞在胶质瘤动物模型中具有的“修复”作用可能与 Wnt/ β -catenin 信号转导通路密切相关。本研究通过建立离体 NSCs 与 C6 成胶质细胞瘤细胞共培养体系, 动态观察了 2 个主要的 Wnt 信号分子 (β -catenin 和 survivin) 的蛋白水平表达变化。结果发现随着 NSCs 在共培养体系中的比例增多, β -catenin 和 survivin 表达逐渐减少。上述变化提示神经干细胞抑制胶质瘤生长过程中呈现出 Wnt/ β -catenin 途径由活跃到逐步抑制的过程。此外, 半定量 RT-PCR 分析表明随着神经干细胞在共培养体系中所占比例增大, C6 成胶质细胞瘤细胞中凋亡相关基因 c-Myc、Bcl-2、p53 等基因的表达水平逐步降低, 更进一步证明 C6 成胶质细胞瘤细胞的致瘤性可以被神经干细胞抑制, 机制可能与 Wnt/ β -catenin 途径相关^[23-24]。

综上所述, 本研究证明了神经干细胞在胶质瘤微环境中通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制了神经胶质瘤的生长。通过分析恶性胶质瘤细胞在肿瘤微环境与神经干细胞的相互作用, 探索了脑胶质瘤的起源及发生发展的相关因素, 为寻找胶质瘤治疗的新方法提供了一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] Wen P Y, Kesari S. Malignant gliomas in adults[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359:492-507.
- [2] Aboody K S, Najbauer J, Schmidt N O, Yang W, Wu J K, Zhuge Y, et al. Targeting of melanoma brain metastases using engineered neural stem/progenitor cells[J]. *Neuro Oncol*, 2006, 8: 119-126.
- [3] Vescovi A L, Snyder E Y. Establishment and properties of neural stem cell clonesplasticity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Brain Pathol*, 1999, 9:569-598.
- [4] Zheng X, Shen G, Yang X, Liu W. Most C6 cells are cancer stem cellsevidence from clonal and population analyses[J]. *Cancer Res*, 2007, 67:3691-3697.
- [5] Nakafuku M, Nakamura S. Establishment and characterization of a multipotential neural cell line that can conditionally generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes *in vitro* [J]. *J Neurosci Res*, 1995, 41:153-168.
- [6] Craig C G, Tropepe V, Morshead C M, Reynolds B A, Weiss S, Van Der Kooy D. *In vivo* growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain[J]. *J Neurosci*, 1996, 16:2649-2658.
- [7] Bjornson C R, Rietze R L, Reynolds B A, Magli M C, Vescovi A L. Turning brain into blooda hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo* [J]. *Science*, 1999, 283:534-537.
- [8] Assanah M, Lochhead R, Ogden A, Bruce J, Goldman J, Canoll P. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses[J]. *J Neurosci*, 2006, 26:6781-6790.
- [9] Jessberger S Jr, Clemenson G D, Gage F H. Spontaneous fusion and nonclonal growth of adult neural stem cells [J]. *Stem Cells*, 2007, 25:871-874.
- [10] Yip S, Sabetrisekh R, Sidman R L, Snyder E Y. Neural stem cells as novel cancer therapeutic vehicles [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42:1298-1308.
- [11] Reya T, Morrison S J, Clarke M F, Weissman I L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. *Nature*, 2001, 414:105-111.
- [12] Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer[J]. *Nature*, 2005, 434:843-850.
- [13] Androutsellis-Theotokis A, Leker R R, Soldner F, Hoepfner D J, Ravin R, Poser S W, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nature*, 2006, 442:823-826.
- [14] Elliott R L, Blobe G C. Role of transforming growth factor Beta in human cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23:2078-2093.
- [15] Raida M, Heymann A C, Gunther C, Niederwieser D. Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18:735-739.
- [16] Kuhnert F, Davis C R, Wang H T, Chu P, Lee M, Yuan J, et al. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:266-271.
- [17] Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epitheliumfrom endoderm to cancer [J]. *Genes Dev*, 2005, 19:877-890.
- [18] Dreesen O, Brivanlou A H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Rev*, 2007, 3:7-17.
- [19] Espada J, Calvo M B, Diaz-Prado S, Medina V. Wnt signalling and cancer stem cells [J]. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11:411-427.
- [20] Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncogene*, 2006, 25:3787-3800.
- [21] Jin L H, Shao Q J, Luo W, Ye Z Y, Li Q, Lin S C. Detection of point mutations of the Axin1 gene in colorectal cancers [J]. *Int J Cancer*, 2003, 107:696-699.
- [22] Milovanovic T, Planutis K, Nguyen A, Marsh J L, Lin F, Hope C, et al. Expression of Wnt genes and frizzled 1 and 2 receptors in normal breast epithelium and infiltrating breast carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25:1337-1342.
- [23] Joubert A, Bianchi P, Maritz C, Joubert F. Influence of prostaglandin A2 on Bax, Bcl-2 and PCNA expression in MCF-7 cells [J]. *Biomed Res*, 2006, 27:157-162.
- [24] Muncan V, Sansom O J, Tertoolen L, Pheesse T J, Begthel H, Sancho E, et al. Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26:8418-8426.