论著

文章编号:1000-5404(2014)18-1890-05

Wnt5a 在肺癌 A549 细胞球增殖和上皮间质转化中的作用及机制研究

胡欣春[1,2],徐建军[1],喻东亮[1],彭金华[1],魏益平[1] (330006 南昌,南昌大学第二附属医院心胸外科[1];330006 南昌,江西省胸科医院胸外科[2])

[摘要] **目的** 研究 Wnt5a 在 A549 细胞球增殖和 EMT 中的作用及相关机制。**方法** 利用无血清培养出 A549 细胞球后应用流式细胞术对其进行 $CD133^+CD44^+$ 表达检测。实验分为对照组、Wn5a 组、p38 组和 Wnt5a + p38 组。应用 Western blot 观察各组 Wnt5a、p-p38、β-catenin、Vimentin 和 E-cadherin 蛋白的表达变化,并利用 MTT 和裸鼠成瘤实验观察 Wnt5a shRNA 慢病毒感染前后 A549 细胞球的生长抑制率和成瘤能力。**结果** 流式细胞术检测 A549 细胞球中 $CD133^+CD44^+$ 阳性率为 60.5%;Wnt5a 蛋白在 Wnt5a 组和 Wnt5a + p38 组中的表达较对照组明显下调($P<0.05$),p-p38 蛋白、β-catenin 蛋白、Vimentin 蛋白在 Wnt5a 组、p38 组和 Wnt5a + p38 组的表达明显低于对照组($P<0.05$),而 E-cadherin 蛋白在上述 3 组中的表达显著高于对照组($P<0.05$)。Wnt5a shRNA 慢病毒感染 A549 细胞球 12、24 h 和 48 h 时抑制率显著高于对照组($P<0.05$),并且该细胞的成瘤能力较对照组显著下调。**结论** 下调 Wnt5a 表达可抑制 A549 细胞球的增殖及 EMT 能力,可望成为治疗非小细胞肺癌的靶点。

[关键词] Wnt5a;肺癌干细胞;增殖;上皮间质转化
[中图法分类号] R341;R730.23;R734.2 [文献标志码] A

Role and mechanism of Wnt5a regulating proliferation and epithelial mesenchymal transition in A549 spheres

Hu Xinchun[1,2], Xu Jianjun[1], Yu Dongliang[1], Peng Jinhua[1], Wei Yiping[1] ([1]Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi Province, 330006; [2]Department of Chest Surgery, Jiangxi Chest Hospital, Nanchang, Jiangxi Province, 330006, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role and mechanism of Wnt5a regulating the proliferation and epithelial mesenchymal transition (EMT) in lung cancer A549 spheres. **Methods** A549 spheres were cultured in serum-free medium for 2 weeks. $CD133^+CD44^+$ rate of those cells was detected by FACS. Four experimental groups including a control group, a Wnt5a group, a p38 group and a Wnt5a + p38 group were designed. The protein expression of Wnt5a, p-p38, β-catenin, vimentin and E-cadherin among the 4 groups was detected by Western blotting. The cell inhibitory rate and tumorigenicity were detected after Wnt5a shRNA lentivirus transfection of A549 spheres. **Results** $CD133^+CD44^+$ rate was 60.5% in A549 spheres and 1.65% in A549 cells. Wnt5a protein expression was significantly lower in the Wnt5a and Wnt5a + p38 groups than in the control group ($P<0.05$). Compared to the control group, the protein expression of p-p38, β-catenin and vimentin was obviously lower but that of E-cadherin was higher in the Wnt5a, p38 and Wnt5a + p38 groups ($P<0.05$). The cell inhibitory rate was significantly higher and tumor size in node mice was remarkably smaller at 12, 24 and 48 h after Wnt5a shRNA lentivirus transfection ($P<0.05$). **Conclusion** Wnt5a expression down-regulation inhibits the proliferation and EMT of A549 spheres, and Wnt5a might be a novel target for treatment of non-small-cell lung cancer.

[**Key words**] Wnt5a;cancer stem cells;proliferation;epithelial mesenchymal transition

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81160293). Corresponding author: Xu Jianjun, E-mail: ldhbf@126.com

在世界范围内肺癌是威胁人民群众健康的主要原因之一。尽管近年来对肿瘤的治疗取得较大的进展,但肺癌患者的 5 年总体生存率仅为 15%[1]。随着肿瘤干细胞学说的兴起,研究者认为化疗仅能杀灭对化

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81160293)
[通信作者] 徐建军,E-mail:ldhbf@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140621.0849.001.html (2014-06-21)

疗药物敏感的肿瘤细胞,而无法有效杀灭天然耐药或通过突变获得耐药能力的一类亚群肿瘤细胞,即肿瘤干细胞[2]。因此,寻找有效杀灭肿瘤干细胞的基因靶点已成为肿瘤治疗的主要关注点之一。

Wnt家族蛋白是一种分泌型富含半胱氨酸的糖蛋白,包括19种高度保守的蛋白。Wnt蛋白在细胞发育以及调控细胞生理功能,如细胞增殖、分化、凋亡、黏附、迁移和极性等方面发挥着关键作用[3]。Wnt蛋白的调节异常可导致发育、增殖和血管发生的异常,最终可引起肿瘤的发生。Wnt5a主要是通过激活Wnt非经典途径,从而发挥生物学效应。有趣的是,大量Wnt5a在肿瘤中作用的研究发现,Wnt5a在不同种类的肿瘤中发挥着抑癌或促癌作用:许多研究认为Wnt5a可促进肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭[4-5],而一些学者则指出Wn5a具有抑制肿瘤的增殖、侵袭[6-7]等抑癌作用。但目前Wnt5a在肺癌干细胞中的作用尚不清楚。本研究旨在探明Wnt5a在A549细胞球增殖和上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)中的作用,初步研究其相关机制,以期寻找治疗肺癌的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

F12K培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清购自HyClone公司;表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和opti-Mem购自Gibco公司;B27、胰岛素购自Sigma公司;APC标记抗人CD133/(AC133)抗体购自Miltenyi Biotec公司;FITC标记抗人CD44抗体购自BD公司;TRIzol、ViraPower Lentiviral Expression Systems和Lipfectamine 2000购自Invitrogen公司;逆转录试剂盒、Real-time PCR mix试剂盒购自东洋纺公司;M-PER哺乳动物细胞总蛋白抽提试剂购自Thermo公司;抗人Wnt5a、β-catenin、Vimentin和E-cadherin抗体均购自Abcam公司;抗人p-p38单克隆抗体购自CST公司;β-actin抗体购自北京天德悦公司;HRP标记二抗购自中杉金桥公司;Wnt5a shRNA Lentivector购自Abmgood公司,SB 203580购自Santa Cruz公司,MTT试剂盒购自碧云天公司。肿瘤干细胞培养基(serum free medium,SFM)见文献[7]。

1.2 A549细胞球的培养

将A549细胞以200个/孔接种到6孔板中,待其长成克隆后将其消化,置于含有适量的无血清培养基(SFM)的超低粘附培养瓶中培养。2周后观察到细胞形成多细胞球体悬浮于培养基中,收集多细胞球体重置于胰蛋白酶中消化,将细胞球体吹散成为单细胞,离心洗涤后,接种于SFM中继续培养,扩增至第2代多细胞球体形成并进行相关实验[8]。

1.3 流式细胞术检测细胞$CD133^+$、$CD44^+$的表达情况

收集10^7个细胞后用含有2% FBS的PBS(buffer)重悬,300×*g*离心10 min后弃去上清,加入80 μL buffer和20 μL的FC受体阻断剂后,加入10 μL CD133/1(AC133)抗体和20 μL CD44抗体,充分混匀后置于4 ℃避光孵育15~20 min。加入1 mL buffer后300×*g*离心10 min后弃去上清,加入200 μL buffer重悬细胞后,上机检测。

1.4 实验分组

实验分为对照组、Wnt5a siRNA干预组(Wn5a组)、p38抑制剂(SB 203580)干预组(p38组)和Wnt5a siRNA与p38抑制剂共同干预组(Wnt5a+p38组)。

1.5 Wnt5a shRNA慢病毒的包装与转染

按照ViraPower Lentiviral Expression Systems说明书,将Wnt5a(NM_003392) shRNA Lentivector与ViraPower Lentiviral Expression Systems中的pLP1、pLP2和pLP/VSCG质粒使用Lipfectamine 2000共转染293T细胞,培养6 h后弃去培养基,加PBS洗涤后加入培养基继续培养48 h,收集细胞培养基上清,收获与浓缩病毒,并进行滴度实验。在A549细胞球中加入MOI值200的Wnt5a siRNA慢病毒,转染48 h后将分别检测细胞活性以及收集细胞进行RT-PCR和Western blot检测。

1.6 p38抑制剂SB 203580干预A549细胞球

①p38组:在培养基中加入终浓度为10 μmol/L的SB 203580/DMSO溶液,作用48 h后收获细胞;②Wnt5a+p38组:在Wnt5a shRNA慢病毒感染前30 min在培养基中加入终浓度为10 μmol/L的SB 203580/DMSO溶液,在Wnt5a shRNA慢病毒感染48 h后收获细胞。

1.7 Western blot检测Wnt5a、p-p38、β-catenin、Vinmentin和E-cadherin蛋白的表达

收集细胞,加入300 μL M-PER细胞裂解液,置于冰上20 min,期间多吹打,经4 ℃、12 000 r/min离心20 min,取上清液。测浓度后,蛋白煮沸变性。制备SDS-PAGE凝胶,每孔加样40 μg进行电泳。250 mA湿转90 min,将PVDF膜放入5%脱脂奶粉中室温封闭2 h后分别加入抗人Wnt5a、Vimentin和E-cadherin(脱脂奶粉稀释,比例均为1∶1 000)和p-p38(BSA稀释,比例为1∶500)及兔抗β-actin抗体(稀释比例1∶10 000)的抗体稀释液中4 ℃过夜,用TBST洗涤3次,每次5 min,后放入二抗(辣根酶标记山羊抗兔,1∶5 000)室温孵育1 h,TBST洗涤3次,每次5 min,用ECL化学发光法检测各种蛋白的表达水平。所得蛋白条带图片,使用Image Pro Plus 10.0对图像进行分析,以同一标本GAPDH的产物光密度值作为内参,校正各自目的蛋白的积分光密度值。

1.8 MTT检测A549细胞球的生长抑制率

取生长良好的A549细胞球消化成细胞悬液,计数并将细胞浓度调整到3×10^3/孔,接种于96孔板后加入SFM培养液。病毒转染组加入MOI值200的Wnt5a shRNA慢病毒。培养12、24、48 h后换液,每孔加入10 μL(5 mg/mL)的MTT溶液,孵育4 h后,每孔加入100 μL Formanzan溶液,继续孵育直至显微镜下观察到Formanzan全部溶解。用酶标仪在570 nm处检测各孔光密度值[*D*(570)],空白孔调零。细胞生长抑制率=[1-实验组*D*(570)/空白对照组*D*(570)]×100%。

1.9 裸鼠成瘤实验

将8只裸鼠(由第三军医大学实验动物中心提供)平均分成2组(对照组和Wnt5a组),分别将两组5×10^4的细胞种植于裸鼠腹部外侧,待其4周后观察其瘤体的体积。

1.10 统计学处理

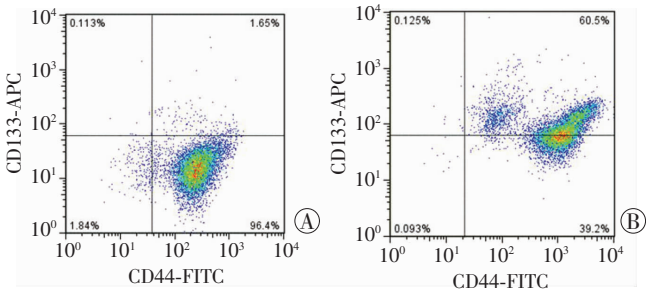
各实验至少重复3次,使用SPSS 13.0统计软件,组间比较

行 t 检验。

2 结果

2.1 A549 细胞球的 $CD133^+$、$CD44^+$ 双阳性表达率

流式细胞术检测结果显示，A549 细胞球中 $CD133^+$、$CD44^+$ 双阳性细胞占总细胞数的60.5%。A549 细胞中 $CD133^+$、$CD44^+$ 双阳性细胞约占总数的1.65%（图1）。

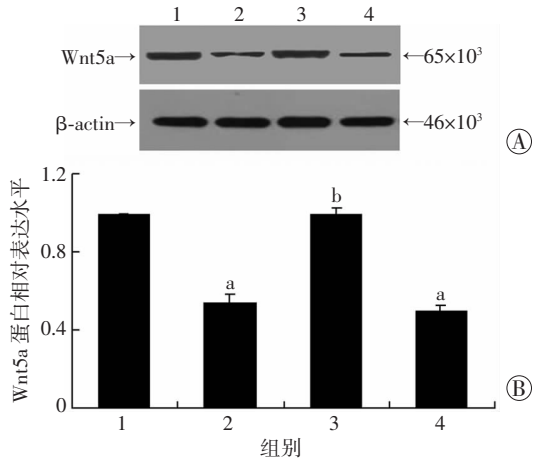


A：A549 细胞；B：A549 细胞球

图1 细胞 $CD133^+$ $CD44^+$ 阳性率检测结果

2.2 Wnt5a 蛋白在不同处理因素下的表达水平

Wnt5a 蛋白在 Wnt5a 组和 Wnt5a + p38 组中的表达较对照组明显下调（$P<0.05$），p38 组中 Wnt5a 蛋白的表达明显高于 Wnt5a 组（$P<0.05$），而与对照组比较无显著差异（$P>0.05$，图2）。



A：Western blot 检测结果 1：对照组；2：Wnt5a 组；3：p38 组；4：Wnt5a + p38 组；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 Wnt5a 组比较

图2 Western blot 检测 Wnt5a 蛋白在不同处理因素下的表达水平

2.3 p-p38 蛋白在不同处理因素下的表达水平

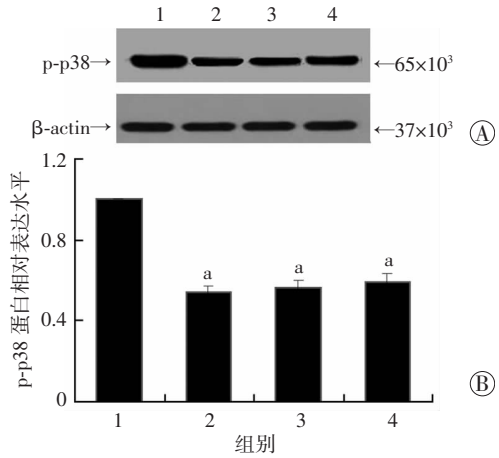
p-p38 蛋白在 Wnt5a 组、p38 组和 Wnt5a + p38 组的表达明显低于对照组（$P<0.05$），p-p38 蛋白在上述3组间无显著差异（$P>0.05$，图3）。

2.4 β-catenin 蛋白在不同处理因素下的表达水平

β-catenin 蛋白在 Wnt5a 组、p38 组和 Wnt5a + p38 组的表达明显低于对照组（$P<0.05$），Wnt5a + p38 组中 β-catenin 蛋白表达明显低于 Wnt5a 组（$P<0.05$），β-catenin 蛋白在 Wnt5a 组和 p38 组组间比较无显著差异（$P>0.05$，图4）。

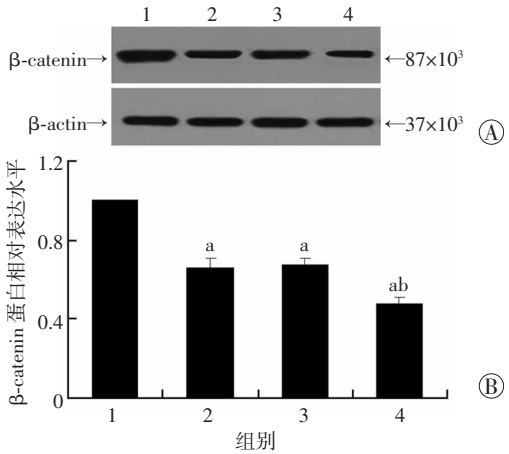
2.5 Vimentin 蛋白在不同处理因素下的表达水平

Vimentin 蛋白在 Wnt5a 组、p38 组和 Wnt5a + p38 组的表达明显低于对照组（$P<0.05$），Vimentin 蛋白在上述3组间无显著差异（$P>0.05$，图5）。



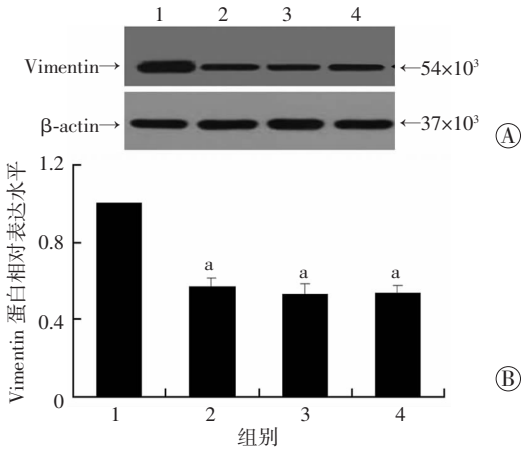
A：Western blot 检测结果 1：对照组；2：Wnt5a 组；3：p38 组；4：Wnt5a + p38 组；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与对照组比较

图3 Western blot 检测 p-p38 蛋白在不同处理因素下的表达水平



A：Western blot 检测结果 1：对照组；2：Wnt5a 组；3：p38 组；4：Wnt5a + p38 组；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 Wnt5a 组比较

图4 Western blot 检测 β-catenin 蛋白在不同处理因素下的表达水平

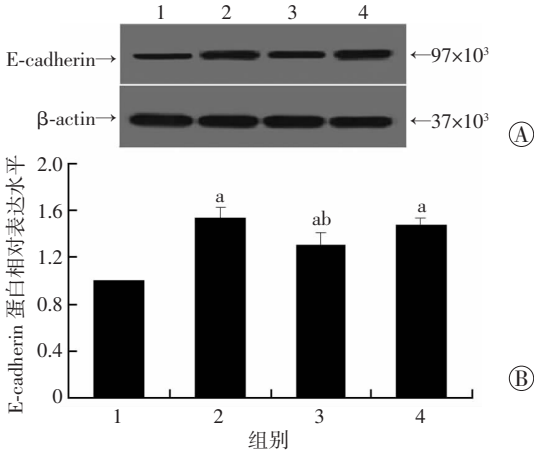


A：Western blot 检测结果 1：对照组；2：Wnt5a 组；3：p38 组；4：Wnt5a + p38 组；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与对照组比较

图5 Western blot 检测 Vimentin 蛋白在不同处理因素下的表达水平

2.6 E-cadherin 蛋白在不同处理因素下的表达水平

E-cadherin 蛋白在 Wnt5a 组、p38 组和 Wnt5a + p38 组的表达明显高于对照组($P<0.05$)，E-cadherin 蛋白在 p38 组中的表达明显低于 Wnt5a 组($P<0.05$)，而在 Wnt5a 组和 Wnt5a + p38 组之间表达无显著差异($P>0.05$，图 6)。

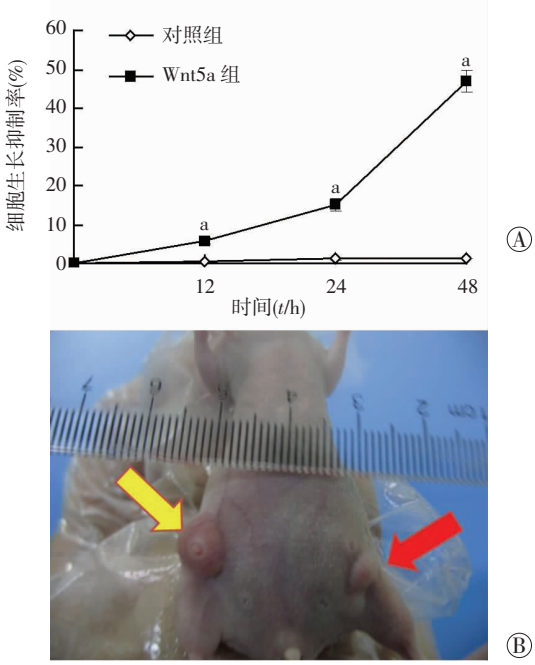


A：Western blot 检测结果　1：对照组；2：Wnt5a 组；3：p38 组；4：Wnt5a + p38 组；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 Wnt5a 组比较

图 6　Western blot 检测 E-cadherin 蛋白在不同处理因素下的表达水平

2.7 Wnt5a shRNA 干预 A549 细胞球后细胞生长抑制率及裸鼠成瘤情况

Wnt5a shRNA 慢病毒感染 A549 细胞球 12、24 h 和 48 h 时抑制率明显高于对照组($P<0.05$，图 7A)。观察 4 周后裸鼠成瘤可见 Wnt5a shRNA 慢病毒感染 A549 细胞球形成的瘤体体积为(0.03 ± 0.01) cm^3，对照组瘤体体积为(0.25 ± 0.01) cm^3，Wnt5a 组瘤体体积明显小于对照组瘤体($P<0.05$，图 7B)。



A：A549 细胞球的抑制率曲线　a：$P<0.05$，与对照组比较；B：裸鼠成瘤实验　黄色箭头：示对照组；红色箭头：示 Wnt5a 组

图 7　Wnt5a shRNA 干预 A549 细胞球后的细胞生长抑制率曲线和裸鼠成瘤情况

3 讨论

随着近年来大气污染(特别是 PM2.5 和 PM10 颗粒增多)的日益严重和吸烟人数的增加，肺癌的发生率和病死率逐年升高[9-10]。肺癌患者中有 80% 被诊断为非小细胞肺癌，化疗是治疗非小细胞肺癌的重要手段之一，但是化疗后出现的肿瘤耐药和复发已经成为临床上非常棘手的问题。肿瘤干细胞理论表明其关键原因在于肺癌干细胞多处于“静止期”，多数药物无法杀伤，并且肿瘤干细胞具有很强的耐药性、抗凋亡以及增殖能力[8, 11]。本研究通过无血清培养的方法培养出 A549 细胞球，流式细胞术检测示其表达肿瘤干细胞标志物 $CD133^+$ 和 $CD44^+$ 的双阳性率为 60.5%，提示 A549 细胞球中富含肺癌干细胞。

Wnt5a 主要通过自分泌或旁分泌的形式作为细胞生长、分化等的信号，与胞膜上受体结合主要激活 Wnt/Ca^{2+} 非经典信号通路，发挥生物学效应[12]。Wnt5a 可调控正常的血管内皮细胞、成纤维细胞等的增殖和迁移[13-14]，而在不同的肿瘤细胞中则发挥着抑癌或促癌的作用[7, 15-16]。本研究发现 Wnt5a shRNA 干预 A549 细胞球后，Wnt5a 蛋白显著下调，A549 细胞球增殖受到明显的抑制，细胞的成瘤能力显著降低，说明下调 Wnt5a 可抑制 A549 细胞球的增殖。

本研究发现抑制 Wnt5a 的表达和 p38 特异性抑制剂均可下调磷酸化 p38 的表达水平，与文献[17-18]报道一致。p38 是促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase，MAPK) 中的成员之一，其活化通过转录调节引起 Cyclin D_1 等多种基因相继激活导致在肿瘤的发生、发展等过程中发挥着重要作用。研究指出 S100A6 通过激活 p38MAPK 信号通路促进肿瘤细胞的增殖[19]，当 p38 MAPK 受到抑制时肿瘤细胞的增殖也会明显受到抑制[20]。无论在间充质干细胞还是肿瘤干细胞中，p38 MAPK 主要发挥着抑制分化、抵抗凋亡、调控增殖等作用[21-23]。这提示 Wnt5a 可能通过 p38 介导的相关信号通路发挥抑制 A549 细胞球增殖水平的作用。本研究还发现抑制 Wnt5a 的表达和应用 p38 特异性抑制剂均可抑制 β-catenin 的表达，说明 Wnt5a 和 p38 均可调控 β-catenin 的表达。其他研究指出上调的 Wnt5a 可通过促进 Wnt 经典信号通路下游的效应分子 β-catenin 到达细胞核内达到而发挥其生物学效应[24-25]。这提示 Wnt5a 可通过 p38 调控 β-catenin 的表达，从而调控细胞的增殖。

近年来研究表明，细胞在 EMT 过程中，不仅细胞形态和移动性以及 EMT 的标志物会发生改变，而且发生 EMT 的肿瘤细胞的细胞间迁移和侵袭能力增强，被

认为具有干细胞特性[26]。同时黄学德等[27]研究指出富含肺癌干细胞的A549细胞球的EMT标志物Vimentin显著高于A549细胞,而E-cadherin蛋白的表达则低于A549细胞。上述研究提示肿瘤干细胞具有更强的EMT的能力,是肿瘤发生转移、侵袭的关键。本研究发现在抑制Wnt5a的表达时,Vimentin蛋白表达降低,而E-cadherin蛋白表达明显升高,说明抑制Wnt5a的表达可抑制A549细胞球的EMT。Kanzawa等[5]研究指出Wnt5a在维持肿瘤干细胞特性和调控EMT中发挥着关键作用。研究指出激活p38可调控肿瘤细胞的EMT[28],而AKT/β-catenin信号通路可促进肿瘤干细胞样的A549/CDDP细胞的EMT[29]。本研究发现抑制Wnt5a、p-p38、β-catenin的表达均可影响EMT标志物E-cadherin和Vimentin蛋白的表达,推测抑制Wnt5a可能是通过p38/β-catenin信号通路来抑制A549细胞球EMT能力。

综上所述,本研究成功分离培养了富含肺癌干细胞的A549细胞球,发现下调Wnt5a表达可抑制A549细胞球的增殖和EMT,其可能是通过p38/β-catenin信号通路发挥调节A549细胞球增殖和EMT的作用。然而Wnt5a调控A549细胞球增殖和EMT的精确调控机制尚不清楚,有待于进一步研究。此外,Wnt5a是否通过其他信号通路发挥调节A549细胞球增殖及EMT的作用仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Collins L G, Haines C, Perkel R, *et al*. Lung cancer: diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2007, 75(1): 56-63.

[2] Dalerba P, Cho R W, Clarke M F. Cancer stem cells: models and concepts[J]. Annu Rev Med, 2007, 58: 267-284.

[3] Wang Y, Li Y P, Paulson C, *et al*. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2014, 19: 379-407.

[4] Bakker E R, Das A M, Helvensteijn W, *et al*. Wnt5a promotes human colon cancer cell migration and invasion but does not augment intestinal tumorigenesis in Apc1638N mice[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(11): 2629-2638.

[5] Kanzawa M, Semba S, Hara S, *et al*. WNT5A is a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in human gastric carcinoma cells[J]. Pathobiology, 2013, 80(5): 235-244.

[6] Jiang W, Crossman D K, Mitchell E H, *et al*. WNT5A inhibits metastasis and alters splicing of Cd44 in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58329.

[7] Gu L, Feng J, Xu H, *et al*. Polyphyllin I inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cell line HO-8910PM *in vitro*[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3): 325-333.

[8] 孙芬芬,贺斌峰,余时沧,等. A549肺癌细胞球抗凋亡能力及耐药蛋白表达分析[J]. 肿瘤, 2011, 31(2): 111-116.

[9] Nakano T, Otsuki T. Environmental air pollutants and the risk of cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2013, 40(11): 1441-1445.

[10] Li H, Li Q D, Wang M S, *et al*. Smoking and air pollution exposure and lung cancer mortality in Zhaoyuan County[J]. Int J Hyg Environ Health, 2013, 216(1): 63-70.

[11] Ye X Q, Li Q, Wang G H, *et al*. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells[J]. Int J Cancer, 2011, 129(4): 820-831.

[12] Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, *et al*. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases[J]. Acta Physiol (Oxf), 2012, 204(1): 17-33.

[13] Cheng C W, Yeh J C, Fan T P, *et al*. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 365(2): 285-290.

[14] Vuga L J, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, *et al*. WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(5): 583-589.

[15] Yu J M, Jun E S, Jung J S, *et al*. Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells[J]. Cancer Lett, 2007, 257(2): 172-181.

[16] Huang Y, Liu G, Zhang B, *et al*. Wnt-5a regulates proliferation in lung cancer cells[J]. Oncol Rep, 2010, 23(1): 177-181.

[17] Jung Y S, Lee H Y, Kim S D, *et al*. Wnt5a stimulates chemotactic migration and chemokine production in human neutrophils[J]. Exp Mol Med, 2013, 45: e27.

[18] Ma L, Wang H Y. Mitogen-activated protein kinase p38 regulates the Wnt/cyclic GMP/Ca^{2+} non-canonical pathway[J]. J Biol Chem, 2007, 282(39): 28980-28990.

[19] Duan L, Wu R, Zou Z, *et al*. S100A6 stimulates proliferation and migration of colorectal carcinoma cells through activation of the MAPK pathways[J]. Int J Oncol, 2014, 44(3): 781-790.

[20] Chen L, Mayer J A, Krisko T I, *et al*. Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2009, 69(23): 8853-8861.

[21] Lin S P, Lee Y T, Wang J Y, *et al*. Survival of cancer stem cells under hypoxia and serum depletion *via* decrease in PP2A activity and activation of p38-MAPKAPK2-Hsp27[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49605.

[22] Kim J, Hwangbo J, Wong P K. p38 MAPK-Mediated Bmi-1 down-regulation and defective proliferation in ATM-deficient neural stem cells can be restored by Akt activation[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16615.

[23] Sonowal H, Kumar A, Bhattacharyya J, *et al*. Inhibition of actin polymerization decreases osteogeneic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway[J]. J Biomed Sci, 2013, 20: 71.

[24] Wu W K, Cho C H, Lee C W, *et al*. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer[J]. Cancer Lett, 2010, 295(2): 144-153.

[25] Cervenka I, Wolf J, Masek J, *et al*. Mitogen-activated protein kinases promote WNT/beta-catenin signaling *via* phosphorylation of LRP6[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(1): 179-189.

[26] Bonnomet A, Brysse A, Tachsidis A, *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 261-273.

[27] 黄学德,熊吕平,叶小群. 低氧对人肺腺癌A549多细胞球体上皮-间质转化促转移的影响[J]. 肿瘤, 2012, 32(3): 182-188.

[28] Zohn I E, Li Y, Skolnik E Y, *et al*. p38 and a p38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation[J]. Cell, 2006, 125(5): 957-969.

[29] Wang H, Zhang G, Zhang H, *et al*. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype and cancer stem cell-like properties in cisplatin-resistant lung cancer cells through AKT/β-catenin/Snail signaling pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723: 156-166.

(收稿:2014-03-24;修回:2014-04-15)

(编辑 邓强庭)