DOI:10.16016/j.1000-5404.201512154

IBP 通过上皮间质转化促进结肠癌细胞迁移和侵袭

何 颖[1],张竹君[2] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院超声科[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院医学检验系临床微生物及免疫学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨干扰素调节因子 4 结合蛋白(interferon regulatory factor-4 binding protein, IBP)能否影响结肠癌细胞上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)的发生,观察 IBP 在肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭中作用。**方法** 干预结肠癌细胞中 IBP 的表达,构建 IBP 过表达的 HT-29-IBP 细胞株与 IBP 沉默的 HCT116-shIBP 细胞株;干预 IBP 表达后,采用 Western blot 检测结肠癌细胞 EMT 相关分子的蛋白表达;Transwell 实验检测结肠癌细胞迁移、侵袭能力的改变;MTT 实验检测结肠癌细胞增殖能力的改变。**结果** HT-29-IBP 细胞中上皮相关分子 E-cadherin 和 ZO-1 表达水平降低,间质相关分子 Fibronectin 表达升高,细胞增殖、迁移和侵袭能力增强($P<0.05$); HCT116-shIBP 细胞则 E-cadherin、ZO-1 表达水平升高, Fibronectin 及 Snail 表达降低,细胞增殖、迁移和侵袭能力降低($P<0.05$)。**结论** IBP 通过调节 EMT 促进结肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 干扰素调节因子 4 结合蛋白;结肠癌;上皮间质转化;迁移;侵袭
[中图法分类号] R341; R730.23; R735.35 [文献标志码] A

IBP promotes migration and invasion in colon cancer cells *via* epithelial to mesenchymal transition

He Ying[1], Zhang Zhujun[2] ([1]Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Clinical Microbiology and Immunity, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of interferon regulatory factor-4 binding protein (IBP) in epithelial to mesenchymal transition (EMT), and investigate its effect on the migration and invasion of colon cancer cells. **Methods** Colon cancer HT-29 and HCT116 cells were transfected with pcDNA3.1(+)-IBP plasmid or infected with recombined shIBP lentivirus, and the stable clones were selected with G418 or puromycin. The expression of IBP and EMT-related molecules was detected in the HT-29-IBP cells and HCT116-shIBP cells by Western blotting. MTT assay was performed to investigate the effect of IBP on the proliferation, and Transwell chamber assay was carried out on the migration and invasion in colon cancer cells. **Results** Over-expression of IBP decreased the expression levels of epithelial markers, E-cadherin and ZO-1, while increased the mesenchymal marker, Fibronectin, and promoted the proliferation, migration and invasion in the HT-29-IBP cells ($P<0.05$). However, silencing of IBP up-regulated the expression of E-cadherin and ZO-1, but down-regulated the levels of Fibronectin and Snail, and decreased the proliferation, migration and invasion in the HCT116-shIBP cells ($P<0.05$). **Conclusion** IBP promotes the proliferation, migration and invasion of colon cancer cells through regulating EMT.

[**Key words**] interferon regulatory factor-4 binding protein; colon cancer; epithelial-mesenchymal transition; migration; invasion

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81201952). Corresponding author: Zhang Zhujun, E-mail: 13110287605@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81201952)
[通信作者] 张竹君, E-mail:13110287605@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160504.0935.001.html(2016-05-04)

结肠癌是常见的消化道肿瘤,其发病率和死亡率均居恶性肿瘤前列,严重威胁人类健康[1],约 1/3 的结肠癌患者确诊时已处于进展期。肿瘤细胞的侵袭和转

移能力与患者预后密切相关,上皮间质转化(epithelial to mesenchymal transition, EMT)是结直肠癌细胞获得转移能力的关键事件[2],因而研究结肠癌细胞 EMT 发生的分子机制具有重要意义。EMT 是指具有极性的上皮细胞转换成能够在基质间自由移动的间质细胞的过程。EMT 以上皮细胞特性的丧失和间质细胞特性的获得为关键特征[3]。大量研究证实结肠癌细胞一旦发生 EMT,其侵袭和转移能力显著增强[4-6]。

干扰素调节因子 4 结合蛋白(interferon regulatory factor-4 binding protein, IBP)是具有鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)活性的 Rho GTPase 调控分子[7],GEF 通过催化 GDP 的释放和 GTP 的结合激活 Rho GTPase。Rho GTPase 通过调节细胞骨架重构和钙粘蛋白的转录后调控,在 EMT 过程中发挥关键调控作用[8]。Rho GTPase 家族中 Rac1、RhoA 和 Cdc42 异常与结肠癌的发生发展关系极为密切[5,9]。目前对 IBP 功能的研究主要集中在免疫系统:参与 TCR 信号刺激下 T 细胞免疫突触的形成[10];对维持免疫内环境的稳定发挥重要作用,IBP 敲除小鼠表现出自身免疫性疾病症状[11]。我们前期研究证实 IBP 通过激活 Rac1、RhoA 和 Cdc42 调节乳腺癌细胞 EMT 过程,促进乳腺肿瘤细胞转移[12]。通过临床样本分析发现 IBP 与结肠癌细胞分化程度、淋巴结转移密切相关[13]。本研究拟通过干预结肠癌细胞 HT-29 和 HCT116 中 IBP 的表达,观察其对结肠癌细胞 EMT、增殖和转移的影响,初步探讨 IBP 是否参与结肠癌细胞 EMT 过程进而影响肿瘤细胞的转移。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人结肠癌细胞株 HT-29、HCT116、SW480、SW620 引自美国 ATCC 标准细胞株。RPMI1640、高糖 DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂、SDS-PAGE 试剂购自上海碧云天公司;兔抗 GAPDH、E-cadherin、ZO-1、Snail、MMP2、MMP9 购自 CST 公司;兔抗 Fibronectin 购自 Sigma 公司;IBP 单克隆抗体为实验室制备[14];HRP 标记山羊抗鼠/兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥;ECL 试剂购自 Millipore 公司;胶片购自柯达公司;MTT、DMSO 购自 Sigma 公司;Matrigel 购自 BD 公司;Transwell 小室购自 Costar 公司。

1.2 IBP 质粒、干扰慢病毒制备

IBP 全长 ORF 插入 pcDNA3.1(+)质粒构建表达质粒 pcDNA3.1(+)-IBP,pcDNA3.1(+)质粒作为阴性对照,根据生物信息学分析针对 IBP 基因(NM_022047)设计 RNA 干扰序列,靶点序列为:5′-GGAACAGTATGCTCTCCAATC-3′;干扰序列为:5′-TGGAACAGTATGCTCTCCAATCTTCAGAGATTGGAGAGCATACTGTTCCTT-3′。IBP 干扰慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司制备。穿梭质粒和包装质粒共转染入 293T 细胞,收集细胞培养上清,超速离心浓缩病毒,-80 ℃保存。

1.3 细胞培养与细胞株构建

HCT116 和 HT-29 细胞使用高糖 DMEM 培养基培养。HT-29 细胞在 6 孔板中细胞汇合率 90% 左右开始转染,Opti-MEM 培养基洗涤细胞 2 次,脂质体/质粒复合体作用细胞 6 h 后,更换为完全培养基。转染 24 h 后,按照 1∶10 的比例接种细胞于培养瓶,1 mg/mL G418 筛选 14 d,得到稳定转染细胞株。生长良好的 HCT116 肿瘤细胞按照每孔 5×10^4 个接种至 24 孔板,培养 18 h 待细胞贴壁。感染细胞采用 MOI 值 10。用完全培养基稀释病毒液并添加终浓度为 5 μg/mL 的 Polybrene。持续感染 18 h 时后更换新鲜的完全培养基。待细胞长满培养孔,做 1∶10 稀释后移入培养瓶培养,并加入 1 μg/mL Puromycin 进行筛选。筛选时间 14 d,得到稳定感染细胞株。SW480 和 SW620 细胞使用 RPMI1640 培养基培养。

1.4 Western blot 检测蛋白表达水平

冰冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 RIPA 细胞裂解液,冰上充分裂解,15 000 × *g* 离心 10 min,留上清。BCA 试剂盒测定样本蛋白浓度,加入适量 5 × 蛋白上样缓冲液,100 ℃处理 5 min,-80 ℃保存备用。SDS-PAGE 凝胶电泳分离样品蛋白,恒流 0.25 A 转印 210 min,PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉膜封闭 1 h,一抗孵育 4 ℃过夜(鼠抗 IBP 1∶2 000,兔抗 E-cadherin、ZO-1、Snail、Fibronectin、MMP2、MMP9、GAPDH 1∶10 000),TBST 洗涤 3 × 15 min,HRP 标记山羊抗鼠/兔 IgG(1∶10 000)室温孵育 1 h,TBST 洗涤 6 次 × 10 min,ECL 试剂作用 5 min,胶片曝光检测。

1.5 MTT 细胞增殖实验

对数期细胞加入 96 孔板,每孔 2×10^3 个细胞,过夜培养后细胞贴壁更换新鲜培养液,继续培养 1 ~ 5 d。每孔加入 20 μL MTT 试剂(5 mg/mL),继续培养 4 h 后弃培养液,每孔加入 150 μL DMSO 终止反应并振荡 15 min 让结晶充分溶解混匀,酶标仪 490 nm 读取光密度值[*D*(490)],每组实验设置 3 复孔,重复 3 次,绘制曲线。

1.6 Transwell 细胞迁移实验

细胞生长至对数期,无血清饥饿过夜。无血清培养液调整细胞浓度至 5×10^6/mL,每个小室接种 0.2 mL 细胞悬液,24 孔板中每孔加入 0.5 mL 相应的含 10% FBS 的完全培养基,Transwell 小室(8 μm)置于 24 孔板中,6 或 12 h 后取出 Transwell 小室,棉签擦去内层细胞,4% 多聚甲醛固定 10 min,苏木精染色

5 min。光镜下随机计数 5 个视野,计算平均细胞数,每组设置复孔 3 个。

1.7　Transwell 细胞侵袭实验

Transwell 小室(8 μm)置于24 孔板中,加入50 μL Matrigel (Matrigel: DMEM = 1∶9),在小室底部铺均匀,37℃凝结 1 h,24 孔板中每孔加入 0.5 mL 相应的含10% FBS 的完全培养基。对数期细胞以无血清培养基洗涤一次,调整细胞浓度至 5×10^5/mL,每个小室接种 0.2 mL 细胞悬液,侵袭时间 48 h。取出 Transwell 小室,计数方法同上。

1.8　统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

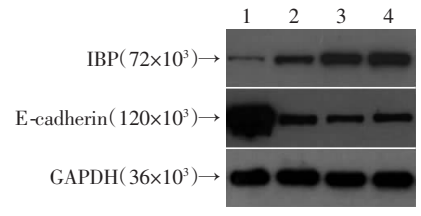
2　结果

2.1　IBP 真核表达质粒与 IBP 干扰慢病毒构建

重组质粒 pcDNA3.1 (+)-IBP 经酶切鉴定和测序确认插入的 IBP 基因完全正确。基于 pGL V10/U6/RFP/Puro 穿梭质粒构建的 IBP 干扰慢病毒由上海吉玛制药技术有限公司鉴定并合成。

2.2　结肠癌细胞株 IBP 和 E-cadherin 表达水平分析

Western blot 检测人结肠癌细胞株 HT-29、SW480、SW620、HCT116 中 IBP 和 E-cadherin 的表达。结肠癌细胞中均有不同水平的 IBP 和 E-cadherin 表达。IBP 表达水平由少到多依次为 HT-29、SW480、SW620、HCT116,E-cadherin 的表达水平由少到多依次为 SW620、HCT116、SW480、HT-29,提示 IBP 表达水平可能与 EMT 的发生呈正相关。SW480 和 SW620 细胞来源于同一患者,转移灶分离株 SW620 细胞中 IBP 表达水平明显高于原发灶分离株 SW480(图 1),提示肿瘤发生转移的过程中 IBP 表达水平提高。

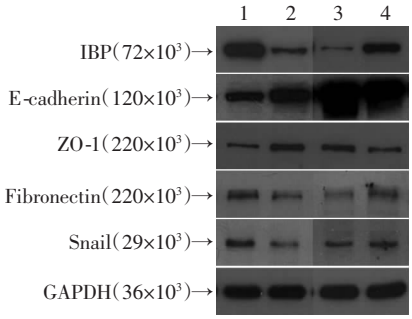


1:HT-29;2:SW480;3:SW620;4:HCT116

图 1　Western blot 检测结肠癌细胞株 IBP 和 E-cadherin 表达

2.3　IBP 对结肠癌细胞 EMT 标志物表达的影响

构建了 IBP 过表达细胞 HT-29-IBP、IBP 沉默细胞 HCT116-shIBP 作为实验组,对照组(NC)分别为 HT-29-NC 细胞和 HCT116-NC 细胞。Western blot 检测结果显示 HCT116-shIBP 细胞中 IBP 表达水平较 HCT116-NC 细胞显著降低(抑制率大于 80%),而且上皮标志物 E-cadherin 和 ZO-1 表达水平较对照组细胞明显提高,间质分子 Fibronectin 和转录因子 Snail 表达水平较对照组细胞明显降低;HT-29-IBP 细胞的 IBP 表达水平较 HT-29-NC 细胞显著升高,其 E-cadherin 和 ZO-1 表达水平较对照组细胞降低,间质分子 Fibronectin 较对照组细胞表达水平升高(图 2)。这提示 IBP 的沉默与过表达可能分别在结肠癌细胞 EMT 的发生中会发挥抑制和促进的作用。

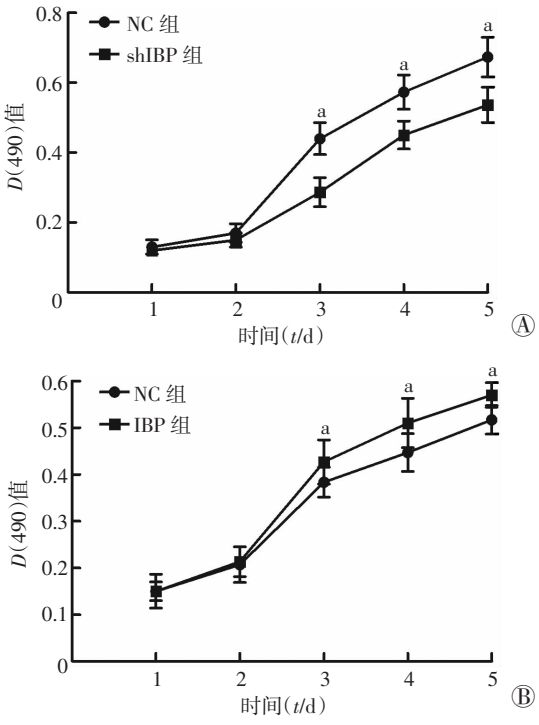


1:HCT116-NC;2:HCT116-shIBP;3:HT-29-NC;4:HT-29-IBP

图 2　Western blot 检测 IBP 对结肠癌细胞 EMT 相关分子表达的影响

2.4　IBP 对结肠癌细胞增殖的影响

实验组 HCT116-shIBP 细胞增殖的速度较对照组细胞明显降低,实验组 HT-29-IBP 细胞增殖速度较对照组细胞明显增加($P<0.05$,图 3)。



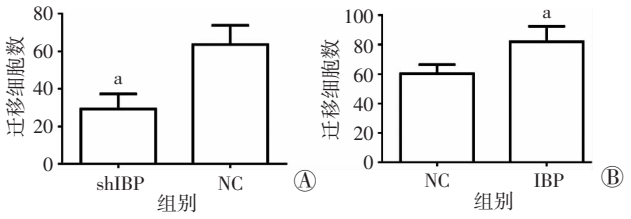
A: HCT116; B: HT-29

a: $P<0.05$,与 NC 组比较

图 3　MTT 检测 IBP 对结肠癌细胞增殖速度的影响

2.5 IBP 对结肠癌细胞迁移和侵袭能力的影响

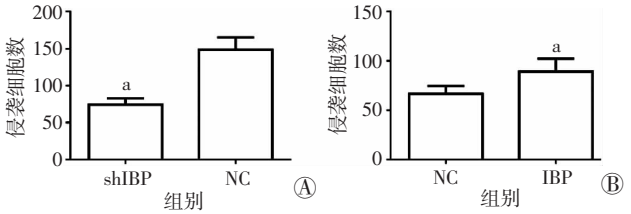
实验组 HCT116-shIBP 细胞穿过聚碳酸酯膜的数量明显低于对照组细胞($P<0.05$),说明降低 IBP 的表达水平会降低细胞的迁移和侵袭能力。与之相对应的是,实验组 HT-29-IBP 细胞穿过聚碳酸酯膜的细胞数量高于对照组细胞,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4、5。说明外源性的 IBP 提高了 HT-29 细胞的迁移和侵袭能力。



A: HCT116; B: HT-29

a: $P<0.05$,与 NC 组比较

图 4 Transwell 迁移实验检测 IBP 对结肠癌细胞迁移能力的影响



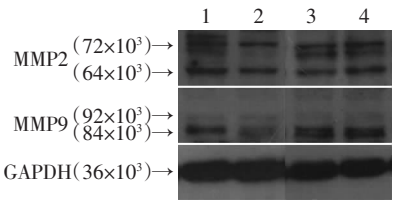
A: HCT116; B: HT-29

a: $P<0.05$,与 NC 组比较

图 5 Transwell 侵袭移实验检测 IBP 对结肠癌细胞侵袭能力的影响

2.6 IBP 对结肠癌细胞 MMP2 和 MMP9 表达的影响

实验组 HCT116-shIBP 细胞中 MMP2 和 MMP9 的表达水平明显低于对照组细胞,实验组 HT-29-IBP 细胞 MMP2 蛋白表达较对照组细胞表达水平升高,但 MMP9 无明显变化(图 6)。



1:HCT116-NC;2:HCT116-shIBP;3:HT-29-NC;4:HT-29-IBP

图 6 Western blot 检测 IBP 对结肠癌细胞 MMP2 和 MMP9 表达的影响

3 讨论

结肠癌的发病率在我国居第 3 位,且发病率仍在增长。由于早期症状不明显,很多患者确诊时已经属于中晚期,多已经出现远处转移[15]。因此,研究结肠癌发生和转移的机制具有重要意义。

IBP 由人淋巴结 cDNA 文库中筛选出,分子量约 75Kd,编码基因位于染色体 6p21.31,与 SWAP-70 高度同源,SWAP-70 在 B 细胞激活和 Ig 亚类转换中具有重要作用[16]。前期研究证明 IBP 在免疫系统中具有重要的功能,如:IBP 参与 T 细胞分化和免疫突触形成的调控[10,17];IBP 参与免疫自稳的维系,IBP 缺失小鼠表现出自身免疫性疾病症状[11,18];IBP 具有与其他 GEF 相似的 DH 结构域[7],能够激活 Rho GTPase 家族中 Rac1、RhoA 和 Cdc42 进而参与众多生理病理过程的调控[18-20]。但 IBP 与其他 Rho-GEF 分子(如 Vav1、Tiam1)的 DH 结构域同源性极低,说明 IBP 可能代表一类新的 GEF 分子。Hotfilder 等[21]发现 IBP 在软骨肉瘤中差异表达,提示 IBP 可能在肿瘤中具有重要作用。本课题组前期研究证实 IBP 通过激活 Rac1、RhoA 和 Cdc42 促进乳腺癌细胞 EMT 过程,并证实 IBP 与结肠癌分化程度和淋巴转移密切相关。本研究拟通过观察 IBP 表达水平对结直肠癌细胞 EMT 分子表达水平和转移能力的影响,探讨 IBP 在结直肠癌细胞 EMT 发生中的作用。

本研究中选取的结肠癌细胞株均有不同水平的 IBP 表达,同一来源的 SW620 细胞(淋巴结转移灶分离)IBP 表达水平明显高于 SW480 细胞(原发灶分离株),提示 IBP 表达水平可能与结直肠癌的转移能力有关。通过检测结直肠癌细胞株中上皮标志物 E-cadherin 的表达,结果显示 IBP 表达水平高的细胞 E-cadherin 表达水平低,提示 IBP 与 E-cadherin 负相关。E-cadherin 在细胞极性、细胞连接和上皮组织完整性的维持中具有重要作用,肿瘤发生发展常伴随着 E-cadherin 的缺失和异常;紧密连接蛋白 ZO-1 对维持上皮极性同样重要。间叶标志物 Fibronectin 在结肠癌细胞黏附、浸润和转移中发挥重要作用。本研究证实 IBP 抑制结肠癌细胞中 E-cadherin 和 ZO-1 表达,促进间叶标志物 Fibronectin 表达。Snail 是含锌指结构的核转录因子,对 E-cadherin 的转录表达起到直接抑制作用,抑制 IBP 明显降低了结肠癌细胞中 Snail 的表达水平,说明 IBP 通过影响 Snail 参与 E-cadherin 的表达调控进而促进结肠癌细胞 EMT 的发生。增殖速度快是肿瘤细胞重要特点,本研究证实 IBP 具有促进结肠癌细胞增殖的作用。迁移和侵袭能力是肿瘤细胞发生远处转移的必要条件。胶原酶 MMP2 和明胶酶 MMP9 是基质金属蛋白酶(MMPs)家族成员,与肿瘤的侵袭和转移关系及其密切,MMPs 能够降解肿瘤细胞外的基质和基底膜,帮助肿瘤细胞向邻近组织浸润、侵袭,促进肿瘤细胞发生转移[22-23]。本研究证实 IBP 通过调控 MMP2 和 MMP9 的表达促进结肠癌细胞的迁移和

侵袭。具体的调控机制仍需进一步研究。

本研究结果初步提示了 IBP 可能通过促进结直肠癌细胞 EMT,并显著增强结肠癌细胞的迁移和侵袭能力,进一步研究 IBP 促进结肠癌转移的具体作用机制,有可能为研究结肠肿瘤发生、发展提供新的思路。

参考文献:

[1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al*. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87 – 108. DOI: 10.3322/caac.21262

[2] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442 – 454. DOI: 10.1038/nrc822

[3] Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, *et al*. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(3): 194 – 207. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.02.013

[4] Bates R C, Goldsmith J D, Bachelder R E, *et al*. Flt-1- dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids[J]. Curr Biol, 2003, 13(19): 1721 – 1727.

[5] Gulhati P, Bowen K A, Liu J, *et al*. mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways[J]. Cancer Res, 2011, 71(9): 3246 – 3256. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4058

[6] Bowen K A, Doan H Q, Zhou B P, *et al*. PTEN loss induces epithelial--mesenchymal transition in human colon cancer cells[J]. Anticancer Res, 2009, 29(11): 4439 – 4449.

[7] Mavrakis K J, McKinlay K J, Jones P, *et al*. DEF6, a novel PH-DH-like domain protein, is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1, Cdc42, and RhoA[J]. Exp Cell Res, 2004, 294(2): 335 – 344. DOI: 10.1016/j.yexcr.2003.12.004

[8] Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 15 – 33. DOI: 10.1007/s10555-008-9169-0

[9] Vega F M, Ridley A J. Rho GTPases in cancer cell biology[J]. FEBS Lett, 2008, 582(14): 2093 – 2101. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.04.039

[10] Becart S, Charvet C, Canonigo-Balancio A J, *et al*. SLAT regulates Th1 and Th2 inflammatory responses by controlling Ca2 +/NFAT signaling[J]. J Clin Invest, 2007, 117(8): 2164 – 2175. DOI: 10.1172/JCI31640

[11] Fanzo J C, Yang W, Jang S Y, *et al*. Loss of IRF-4-binding protein leads to the spontaneous development of systemic autoimmunity[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 703 – 714. DOI: 10.1172/JCI24096

[12] Zhang Z, Yang M, Chen R, *et al*. IBP regulates epithelial-to-mesenchymal transition and the motility of breast cancer cells via Rac1, RhoA and Cdc42 signaling pathways[J]. Oncogene, 2014, 33(26): 3374 – 3382. DOI: 10.1038/onc.2013.337

[13] Zhang Z, Wang Q, Li P, *et al*. Overexpression of the Interferon regulatory factor 4-binding protein in human colorectal cancer and its clinical significance[J]. Cancer Epidemiol, 2009, 33(2): 130 – 136. DOI: 10.1016/j.canep.2009.05.004

[14] Li P, Zhang Z, Wang Q, *et al*. The ectopic expression of IFN regulatory factor 4-binding protein is correlated with the malignant behavior of human breast cancer cells[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(7/8): 1002 – 1009. DOI: 10.1016/j.intimp.2009.04.008

[15] Chalya P L, McHembe M D, Mabula J B, *et al*. Clinicopathological patterns and challenges of management of colorectal cancer in a resource-limited setting: a Tanzanian experience[J]. World J Surg Oncol, 2013, 11: 88. DOI: 10.1186/1477-7819-11-88

[16] Gupta S, Lee A, Hu C, *et al*. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system[J]. Hum Immunol, 2003, 64(4): 389 – 401.

[17] Tanaka Y, Bi K, Kitamura R, *et al*. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells[J]. Immunity, 2003, 18(3): 403 – 414.

[18] Canonigo-Balancio A J, Fos C, Prod'homme T, *et al*. SLAT/Def6 plays a critical role in the development of Th17 cell-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2009, 183(11): 7259 – 7267. DOI: 10.4049/jimmunol.0902573

[19] Goudevenou K, Martin P, Yeh Y J, *et al*. Def6 is required for convergent extension movements during zebrafish gastrulation downstream of Wnt5b signaling[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26548. DOI: 10.1371/journal.pone.0026548

[20] Chen Q, Gupta S, Pernis A B. Regulation of TLR4- mediated signaling by IBP/Def6, a novel activator of Rho GTPases[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85(3): 539 – 543. 10.1189/jlb.0308219

[21] Hotfilder M, Baxendale S, Cross M A, *et al*. Def-2, -3, -6 and -8, novel mouse genes differentially expressed in the haemopoietic system[J]. Br J Haematol, 1999, 106(2): 335 – 344.

[22] Shuman-Moss L A, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson W G. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis[J]. Am J Pathol, 2012, 181(6): 1895 – 1899. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.044

[23] Arvelo F, Cotte C. Metalloproteinases in tumor progression. Review[J]. Invest Clin, 2006, 47(2): 185 – 205.

(收稿:2015-12-24;修回:2016-02-25)

(编辑 郭建秀)