

WIF-1 对人骨肉瘤 MG-63 细胞中 β -catenin 表达的作用研究

张鹏 李书忠 张金锋 曲邵政 高甲科 张志

【摘要】 目的 WIF-1 是 Wnt 信号通路中最常见抑制因子之一, 本实验研究 WIF-1 对人骨肉瘤 MG-63 细胞 Wnt 信号通路中 β -catenin 表达量的影响。方法 细胞培养人骨肉瘤 MG-63 细胞, 0 ng/ml 浓度的 WIF-1 作为空白对照组, 分别以 0、48、60、80、120 ng/ml 浓度的 WIF-1 刺激 MG-63 细胞, 分别用 FQ-PCR 及 Western blot 法从基因水平、蛋白水平测定细胞中 β -catenin 的表达量; 细胞培养人骨肉瘤 MG-63 细胞, 用 WIF-1 刺激细胞, 分别在第 0、12、24、48、72、96 h 对各组细胞进行计数, 观察空白组及 WIF-1 刺激组细胞数目的变化情况。结果 不同浓度 (0、48、60、80、120 ng/ml) WIF-1 刺激下, FQ-PCR 法显示 β -catenin mRNA 的相对表达总量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分别为 1、 0.55 ± 0.30 、 0.44 ± 0.24 、 0.35 ± 0.15 、 0.24 ± 0.21 。与空白组相比较, WIF-1 刺激下 β -catenin mRNA 表达量均降低 ($P < 0.05$)。随着 WIF-1 浓度的增加, β -catenin mRNA 表达量下降, 但组间的抑制作用无明显差别 ($P > 0.05$); Western blot 法显示 β -catenin/ β -actin 蛋白相对表达量分别为 1.40 ± 0.11 、 0.86 ± 0.10 、 0.51 ± 0.11 、 0.45 ± 0.06 、 0.18 ± 0.03 ; 与空白组相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 空白组及 WIF-1 刺激组细胞数目有差异, 空白组细胞增殖情况优于 WIF-1 刺激组。结论 WIF-1 可降低人骨肉瘤 MG-63 细胞 Wnt 信号通路中 β -catenin 表达量, 并抑制人骨肉瘤 MG-63 细胞的增殖。

【关键词】 β 连环素; WIF-1; 人骨肉瘤 MG-63

Effects of WIF-1 on the expression of β -catenin in human osteosarcoma MG-63 cells ZHANG Peng, LI Shu-zhong, ZHANG Jin-feng, QU Shao-zheng, GAO Jia-ke, ZHANG Zhi. Spine Surgery Department of the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China
Corresponding author: LI Shu-zhong, Email: qylsz@163.com

【Abstract】 Objective WIF-1(Wnt inhibitory factor-1) was one of the most common antagonists of wnt signal pathway, this experiment was to study the expression of β -catenin interfered with WIF-1 in human osteosarcoma MG-63 cells. **Methods** Human MG-63 cells interfered with WIF-1 in the concentration of 0 ng/ml, 48 ng/ml, 60 ng/ml, 80 ng/ml, 120 ng/ml was cultured, the concentration of 0 ng/ml was considered as the blank group. The expression of β -catenin was retrospectively detected by the methods of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction(FQ-PCR) and Western blot at the genetic and protein level. Culturing human MG-63 cells, interfered with the same concentration of WIF-1, the quantity of cells was partly noted in the hour of 0, 12, 24, 48, 72, 96 h. The number was compared between in the blank group and experiment group. **Results** Interfered with different concentrations(0, 48, 60, 80, 120 ng/ml) of WIF-1. It was showed by FQ-PCR that the relative fold-chages of β -catenin mRNA was retrospectively recorded as 1, 0.55 ± 0.30 , 0.44 ± 0.24 , 0.35 ± 0.15 , 0.24 ± 0.21 . Compared with the blank group, the stimulating groups were all found to have a lower expression($P < 0.05$). With the improvement of concentrations of WIF-1, the expressions of β -catenin presents a decreasing trend. However, these was no significant differences in the stimulating groups themselves; Western blot showed us that the relative fold-chages of β -catenin/ β -actin was separately memorized as 1.40 ± 0.11 , 0.86 ± 0.10 , 0.51 ± 0.11 , 0.45 ± 0.06 , 0.18 ± 0.03 ; compared with the blank group, differences were statistically significant($P < 0.05$). Compared with the stimulating group, the blank group was found to have a higher proliferation. **Conclusion** WIF-1 could decrease the expressions of β -catenin in the canonical wnt signal pathway of human osteosarcoma MG-63 cells and inhibit the proliferation of human osteosarcoma MG-63 cell.

【Key words】 beta Catenin; WIF-1; Human osteosarcoma MG-63 cells

骨肉瘤是儿童及青少年时期最好发的骨肿瘤之一,好发于10~20岁的青少年,约占骨恶性肿瘤的20%左右^[1-2]。近年来,尽管化疗方案的完善及化疗药物的更新使得骨肉瘤患者的生存率有了明显的提高^[3-4]。然而,肺转移及骨肿瘤复发仍然是骨肉瘤患者长期生存的限制性因素之一。Wnt/ β -catenin 信号转导通路在多种细胞的增殖、分化中扮演重要角色^[5]。

Peifer 等^[5]证明 Wnt 信号在骨细胞中起了重要作用。Guo 等^[6-7]用实验证明,阻断 Wnt/LRP5 的表达可以有效地抑制骨肿瘤细胞的生成集落和迁移能力。WIF-1 被视为 Wnt 信号转导通路中的最常见的拮抗物之一,其可以通过与 Wnt 结合,导致 β -catenin 发生磷酸化而使其含量降低,进而阻断 Wnt/ β -catenin 信号转导通路^[8]。本研究通过外源性 WIF-1 作用于细胞后,观察细胞生长的形态学变化、细胞生长、凋亡情况,进一步在基因和蛋白水平观察 β -catenin 的表达情况,进而探讨 Wnt/ β -catenin 信号转导通路在骨肉瘤发病中的作用。

材料与方法

一、主要材料

人骨肉瘤细胞株 MG-63 (中国科学院上海生物细胞研究所), WIF-1 蛋白 (美国 R&D 公司), PCR 试剂盒 (Takara 公司), β -catenin、GAPDH 引物 (上海生工生物科技公司), β -catenin I 抗、II 抗 (Abcam 公司), β -actin I 抗、II 抗 (Peprotech 公司), 细胞计数器。

二、实验方法

1. 细胞培养: 培养条件: 于 DMEM 高糖培养基中添加 10% 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司)、100 U/ml 青霉素及 100 μ g/ml 链霉素 (美国 Gibco 公司), 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养。待细胞呈 70% 汇合状态时进行传代, 吸除旧培养液, 加入胰蛋白酶少许, 以能覆盖瓶底为宜, 倒置显微镜下观察细胞胞质回缩、间隙增大时加入培养液以终止消化。吸管吸取培养液轻轻反复吹打瓶壁细胞, 使之呈细胞悬液。按 1:2 比例进行传代。

2. 不同浓度的 WIF-1 刺激人骨肉瘤 MG63 细胞: 取对数生长期的骨肉瘤 MG-63 细胞传代后接种到 6 孔板中的 5 孔, 于恒温箱中进行培养。待每孔大约 70% 的汇合浓度时, 0 ng/ml 浓度的 WIF-1 作为空白对照组, 加入不同浓度的 WIF-1 溶液 (0、48、60、80、120 ng/ml) 刺激人骨肉瘤 MG-63 细胞 24 h。上述各浓度组均设置 3 个复孔。

3. 定量 PCR 法检测 β -catenin 基因的表达: 用

TRIzol (美国 Invitrogen) 法对上述加入不同浓度的 WIF-1 溶液 (0、48、60、80、120 ng/ml) 培养 24 h 的细胞提取 RNA, 用紫外分光光度计根据 260 nm 处的吸光值测定 RNA 的纯度, 并进行定量。用 cDNA 反转录试剂盒 (code: DDR047S) 反转录合成 cDNA。用 TaKaRa 公司试剂盒 (Code: DRR081A) 对目的基因及内参进行扩增。 β -catenin 的上游引物为 5'-TGAGG ACAAGCCACAAGATTAC-3', 下游引物为 5'-TCCACCAGAGTGAAAAGAACG-3'; GAPDH 的上游引物为 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游引物为 5'-GAAGATGGTGTATGGGATTTTC-3'。Real-Time PCR 反应体系为 25 μ l, 含 Premix Ex TaqTM II (2 \times) 12.5 μ l, PCR Forward Primer (10 μ mol/L)、Reverse Primer (10 μ mol/L) 各 1 μ l, DNA 模板 2 μ l, dH₂O 8.5 μ l。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环进行 PCR 扩增反应。对所得的 PCR 产物采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。因 CT 值与样本基因的拷贝数有对应关系。根据目的基因 (β -catenin) 和内参基因 (GAPDH) 有相似且接近 100% 的扩增效率, 可按照 Livak ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) 公式计算目的基因 β -catenin 的相对表达量: $\Delta\text{CT}(\text{目的基因}) = \text{CT}(\text{目的基因}) - \text{CT}(\text{管家基因})$, $\Delta\text{CT}(\text{空白组}) = \text{CT}(\text{空白组目的基因}) - \text{CT}(\text{空白组管家基因})$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{CT}(\text{目的基因}) - \Delta\text{CT}(\text{对照组})$, 目的基因的相对总量为 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 定量分析基因表达结果。上述实验同条件下重复三次。

4. Western blot 法检测 β -catenin 蛋白的表达: 对上述加入不同浓度的 WIF-1 溶液 (0、48、60、80、120 ng/ml) 作用后的细胞弃上清, PBS 清洗细胞 3 遍, 预先解冻 RIPA 裂解液后加入 PMSF 混匀, 向每组细胞中加入裂解液 200 μ l, 于冰上充分裂解 30 min, 反复吹打致使细胞充分裂解, 移置 1.5 ml EP 管中。于 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清移置新 EP 管中。蛋白浓度用 BCA 法测定后并行浓度调整。向每组细胞中加入 5 \times 上样缓冲液, 沸水煮 5 min 后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。分别取上述各组蛋白 15 μ l 行 SDS-PAGE 电泳, 切胶后于电转盒中以横流电转膜 60 min, 取印好的 PVDF 膜于孵育袋中, 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 按说明稀释 I 抗 (β -catenin 兔抗人多克隆抗体) 于水平摇床上孵育 2 h, PBST 清洗 3 遍后, 加入按说明稀释后的 II 抗 (山羊抗兔 IgG, HRP), 于水平摇床上孵育 1 h, PBST 清洗 3 遍。避光条件下, 配制显影试剂并行显影检测。计算机进行各条带灰度值检测定量分析。上述实验同条件下重复三次。

5. 细胞形态学观察: 将人骨肉瘤 MG-63 细胞计

数后等分接种于2盘30 mm×60 mm培养基中,对照组用10%胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素的DMEM高糖培养液培养,实验组用加入80 ng/ml WIF-1的DMEM高糖培养液培养,培养相同时间后于倒置显微镜下观察细胞株的细胞形态。

6. WIF-1 刺激下细胞的生长情况:将处于对数生长期的人骨肉瘤 MG-63 细胞接种于48孔板,初始细胞数约为 1×10^3 ,空白组及实验组分别用DMEM高糖培养液及加入80 ng/ml WIF-1的DMEM高糖培养液培养。每天换液,分别在第0、12、24、48、72、96小时各组取4孔细胞,分别滴入台盼蓝染液后在计数器上计数。按每天细胞平均数目绘制细胞生长曲线。

三、统计学分析

以上各个浓度组的数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验及方差分析处理各组数据,应用SPSS 17.0软件处理,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准。

结 果

1. 细胞形态学观察:倒置显微镜下观察:两组细胞均为贴壁生长,细胞形态均呈梭形;空白组细胞排列紧密,WIF-1组细胞较空白组细胞排列稀疏。见图1。

2. 不同浓度的WIF-1刺激下 β -catenin mRNA的表达情况:FQ-PCR法显示 β -catenin mRNA的相对表达总量 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分别为1、 0.55 ± 0.30 、 0.44 ± 0.24 、 0.35 ± 0.15 、 0.24 ± 0.21 。与空白组相比较,WIF-1刺激下 β -catenin mRNA表达量均降低($P < 0.05$)。随着WIF-1浓度的增加, β -catenin mRNA表达量下降,但组间的抑制作用无明显差别($P > 0.05$)。见图2,3。

3. 不同浓度的WIF-1刺激下 β -catenin蛋白的表达情况:如图4,5所示:不同浓度的WIF-1溶液(0、48、60、80、120 ng/ml)刺激人骨肉瘤MG-63细胞 β -catenin蛋白表达情况;Western blot法显示 β -catenin/ β -actin蛋白相对表达量分别为 1.40 ± 0.11 、 0.86 ± 0.10 、 0.51 ± 0.11 、 0.45 ± 0.06 、 0.18 ± 0.03 。与空白组相比较,WIF-1刺激下 β -catenin蛋白表达量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4. 细胞生长曲线的测定:以细胞培养时间为横轴,每次细胞计数的平均数为纵轴,绘制生长曲线。见图6,各细胞株细胞在相同的条件下培养4d。两组细胞数目在细胞培养的24h后开始出现差异,WIF-1刺激组较空白组细胞增殖速度较减慢,斜率变小。表明WIF-1刺激下人骨肉瘤MG-63细胞的增殖程度低于空白组。

讨 论

骨肉瘤是青少年及年轻人最常见的恶性骨肿瘤之

一^[1-2]。近年来,新化疗药物虽屡屡出现,但转移瘤及骨肿瘤复发仍制约着患者长期生存率^[9]。阐明骨肉瘤发生、转移及复发的机制,进而为骨肉瘤患者提供靶向治疗是目前最迫切需要解决的问题之一。随着分子生物学的发展,包括P53基因、P16基因、FFEN基因、Survivin、CTRP3等在内的骨肉瘤信号转导途径及作用逐步被发现,使得骨肉瘤发病机制在基因水平上有了新的认识。

在信号转导通路中,Wnts作为由半胱氨酸残基组成的分泌型糖蛋白家族,对组织细胞的生长发育有重要作用^[10],因此近年来受到了广泛关注。Wnts信号转导通路包括经典和非经典通路两种。而经典通路中,活化的Wnt与膜受体Fz及LRP5、6结合激活转导通路,促使下游Wnt靶基因的转录;抑制Wnt通路时,被酪蛋白激酶-1和GSK-3 β 磷酸化的 β -catenin泛素化而使蛋白酶破坏,进而抑制Wnt靶基因转录^[11]。而非经典Wnt通路主要包括Wnt/Ca²⁺、Wnt/PCP等信号通路。非经典通路目前尚不清楚。

Wnt在多种细胞的分化、增殖及生长调节中有重要作用。Karim等^[12]发现许多肿瘤的发生与Wnt信号转导通路有联系。Matsuda等^[13]和Lee等^[14]分别报道Wnt信号在乳腺癌、肝癌的发病中有重要作用。He等^[15]也曾报道结肠直肠癌的发生与Wnt信号的紊乱有关。Barker等^[16]发现活化的Wnt信号通路与多种人类肿瘤的发生紧密相连。Chen等^[17]发现骨肉瘤可由Wnt10b诱导而产生,且肿瘤的迁移及生长与其相关。激活Wnt5a/Ror2信号转导通路,骨肉瘤细胞株U2OS侵袭性增强;其侵袭性也可因该通路的阻断而抑制^[18]。Hoang等^[19]发现,LRP5作为Wnt信号转导通路中重要受体,在骨肉瘤恶化进程中可以作为标志物来预测转归。而Cai等^[20]研究发现活化Wnt/ β -catenin信号通路可抑制骨肉瘤的细胞增殖;失活的Wnt/ β -catenin信号通路反而促进骨肉瘤的发生发展。

β -catenin作为Wnt/ β -catenin通路中重要信号分子,当Wnt信号通路被激活后,胞质中 β -catenin累积,并向胞核中转移,胞核内 β -catenin与TCF/LEFs形成复合物,从而激活多种基因的转录与表达,进而调节细胞的增殖、分化、凋亡等过程;当Wnt信号通路失活后,胞核中的 β -catenin减少导致上述途径阻断,从而失去对细胞的正常调控^[11]。

WIF-1是一种保守进化型蛋白,位于12q14,拥有379个氨基酸残基^[21],作为Wnt信号通路拮抗剂可以直接结合Wnt蛋白而抑制Wnt信号传导^[22]。李文庭等^[23]研究发现WIF-1能抑制Wnt/ β -catenin信号转导通路,进而可以减缓肝纤维化的发展。Lin等^[24]研究发现,

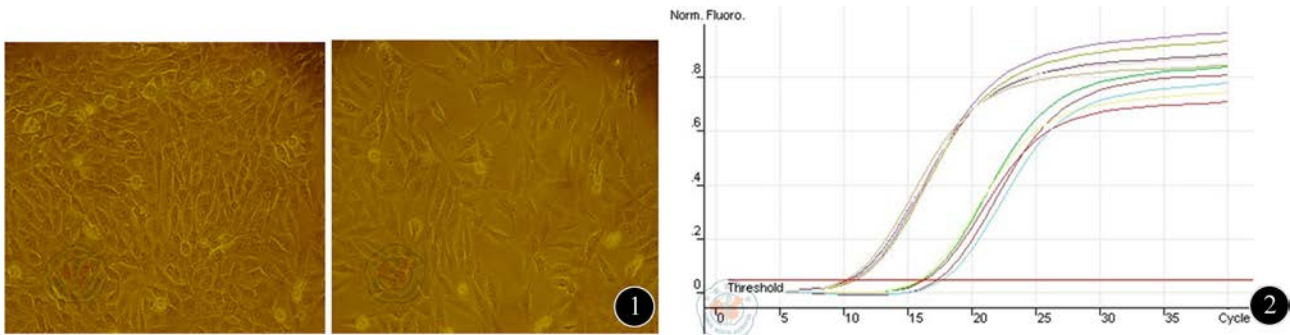


图1 倒置显微镜下细胞的形态(×200),左图为空白组;右图为加入WIF-1组 图2 不同浓度WIF-1刺激下MG-63细胞内mRNA表达的荧光定量PCR线性扩增曲线

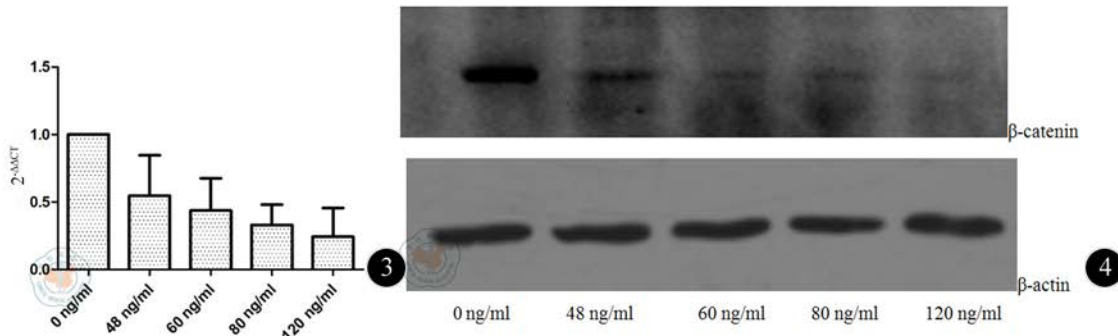


图3 不同浓度WIF-1刺激下β-catenin mRNA相对表达情况 图4 Western blot法检测β-catenin蛋白的表达

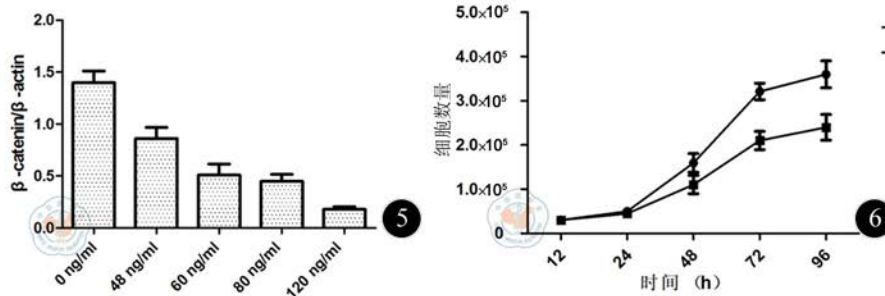


图5 不同浓度WIF-1刺激下β-catenin/β-actin蛋白相对表达情况 图6 空白组及WIF-1实验组细胞生长曲线

转染 WIF-1 后 HNE-1 和 HONE-1 癌细胞中的 WIF-1 表达上调,同时癌细胞生长受到抑制。有文献报道,WIF 对 Wnt 信号转导通路的抑制作用较 sFRP 更广泛^[25],这使得 WIF 成为目前研究的热点^[26]。

本研究旨在通过体外培养人骨肉瘤 MG-63 细胞系,加入不同浓度 Wnt 信号转导通路抑制剂 WIF-1,分别通过 QT-PCR 和 Western blot 法观察 β-catenin 在 MG-63 细胞系中的表达情况,进而观察其对骨肉瘤细胞生长、凋亡的影响。实验表明,WIF-1 刺激下 β-catenin mRNA、蛋白表达量均降低。随着 WIF-1 浓度的增加,β-catenin mRNA、蛋白表达抑制作用更明显。本研究通过细胞生长曲线绘制及倒置显微镜下观察细胞形态及细胞生长密集程度也同样证实了 WIF-1 可通过抑制 Wnt/β-catenin 信号转导通路来抑制细胞的增殖。本研究提示我们 Wnt/β-catenin 在骨肉瘤细胞生长、增殖、凋亡中发挥了重要作用,进而为进一步研究骨肉瘤基

因水平的分子靶向治疗提供了依据。但 Wnt/β-catenin 信号转导通路中具体分子的相互作用机制尚不清楚。另外本研究局限于体外实验,体内 Wnt/β-catenin 的具体机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Niswander LM, Kim SY. Stratifying osteosarcoma: minimizing and maximizing therapy. *Curr Oncol Rep*, 2010, 12: 266-270.
- [2] 徐万鹏, 冯传汉. 骨科肿瘤学. 北京: 人民军医出版社, 2008: 6-7.
- [3] Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, et al. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival-a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 2008, 26: 633-638.
- [4] 杨迪生, 范顺武, 陶惠民, 等. 骨肉瘤辅助化疗方案的中远期疗效观察. *中华骨科杂志*, 2000, 20: 35-39.
- [5] Peifer M, Polakis P. Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-a look outside the nucleus. *Science*, 2000, 287: 1606-1609.
- [6] Guo Y, Rubin EM, Xie J, et al. Dominant negative LRP5 decreases tumorigenicity and metastasis of osteosarcoma in an animal model. *Clin Orthop Relat Res*, 2008(466): 2039-2045.
- [7] Guo Y, Zi X, Koontz Z. Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble

- receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells. *J Orthop Res*, 2007(25): 964-971.
- [8] 江黎珠, 陈鸿雁. WIF-1 与肿瘤关系的研究进展. *中国癌症杂志*, 2010, 20: 299-302.
- [9] Geryk-Hall M, Hughes DP. Critical signaling pathways in bone sarcoma: candidates for therapeutic interventions. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11: 446-453.
- [10] Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*, 2001, 3: 1-15.
- [11] Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006, 127: 469-480.
- [12] Karim R, Tse G, Putti T. et al. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancer. *Pathology*, 2004, 36: 120-128.
- [13] Matsuda Y. WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP-1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth. *Breast Cancer Res*, 2009, 11: 32.
- [14] Lee HH. Wnt-1 protein as a prognostic biomarker for hepatitis B-related and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma after surgery. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009, 18: 1563-1569.
- [15] He B, Reguart N, You L, et al. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene*, 2005, 24: 3054-3058.
- [16] Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 997-1014.
- [17] Chen K, Fallen S, Abaan HO, et al. Wnt 10 induces chemotaxis of osteosarcoma and correlates with reduced survival. *Pediatric Blood Cancer*, 2008, 51: 349-355.
- [18] Enomoto M, Hayakawa S, Itsukushima S, et al. Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. *Oncogene*, 2009, 28: 3197-3298.
- [19] Hoang BH, Kubo T, Healey JH, et al. Expression of LDL receptor-related protein 5(LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer*, 2004, 109: 106-111.
- [20] Cai Y, Mohseny AB, Karperien M, et al. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J Pathol*, 2010, 220: 24-33.
- [21] Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 1999, 398: 431-436.
- [22] 崔忠惠, 孙华文, 赵鹏展. WIF-1 基因启动子区甲基化在胃癌组织中的检测. *临床外科杂志*, 2011, 19: 769-771.
- [23] 李文庭, 陈西柳, 李宜, 等. Wnt 抑制因子-1 对肝星状细胞活化的影响. 2010, 15(5): 338-341.
- [24] Lin YC, You L, Xu Z, et al. Wnt signaling activation and WIF-1 silencing in nasopharyngeal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341: 635-640.
- [25] Calli LM, Barnes T, Cheng T, et al. Differential inhibition of Wnt3a by Sfrp-1, Sfrp-2, and Sfrp-3. *Dev Dyn*, 2006, 235: 681-690.
- [26] Yaccoby S, Ling W, Zhan F, et al. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth *in vivo*. *Blood*, 2007, 109: 2106-2111.

(收稿日期: 2013-09-23)

(本文编辑: 戚红丹)

张鹏, 李书忠, 张金锋, 等. WIF-1 对人骨肉瘤 MG-63 细胞中 β -catenin 表达的作用研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(21): 9590-9594.

中华医学会