

DLX1过表达对骨肉瘤细胞MG63迁移、侵袭、凋亡和增殖的影响

吕凤香¹ 康 权² 仇 超¹ 董姿杏¹ 罗 庆^{1*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014; ²重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科, 重庆 400014)

摘要 前期经基因芯片筛选发现, 同源盒基因1(distal-less homeobox 1, *DLX1*)低表达是导致骨肉瘤形成的关键基因。该研究在此基础上, 拟通过过表达DLX1探讨其对骨肉瘤细胞MG63迁移和侵袭等生物学特征的影响, 并初步揭示其作用途径。采用含*DLX1*基因的重组腺病毒AdDLX1(adenovirus distal-less homeobox 1)和空载腺病毒AdRFP(adenovirus red fluorescence protein)分别感染人骨肉瘤细胞MG63, 观察细胞荧光表达情况, 并用RT-PCR和Western blot验证DLX1表达水平; Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力; DAPI染色和流式细胞术检测细胞凋亡水平; CCK-8检测细胞增殖能力; RT-PCR和Western blot检测Wnt/ β -catenin信号通路中 β -catenin的表达。结果显示, 与对照组(AdRFP感染组)相比, AdDLX1能显著增加MG63细胞中DLX1的表达, 并导致细胞迁移和侵袭能力下降, 但细胞增殖和凋亡情况无明显改变。DLX1过表达还可以上调Wnt/ β -catenin信号通路中 β -catenin的表达。该研究表明, DLX1可通过Wnt/ β -catenin信号通路抑制骨肉瘤细胞MG63的迁移和侵袭。

关键词 DLX1; MG63; 迁移; 侵袭; 凋亡; 增殖; β -catenin

Effects of Overexpression of DLX1 on Migration, Invasion, Apoptosis and Proliferation in Osteosarcoma Cell MG63

Lü Fengxiang¹, Kang Quan², Qiu Chao¹, Dong Zixing¹, Luo Qing^{1*}

(¹Department of Pediatric Research Institution, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of pediatrics, Chongqing 400014, China; ²Department of Hepatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract To investigate the effects of overexpression of *DLX1* (distal-less homeobox 1) on migration, invasion, apoptosis and proliferation of osteosarcoma cell MG63, we infected the MG63 cells with AdDLX1 (adenovirus distal-less homeobox 1) and AdRFP (adenovirus red fluorescence protein). Then the expression level of DLX1 was confirmed by RT-PCR and Western blot. The cell migration and invasion were analyzed by Transwell assay. DAPI staining and flow cytometry were used to detect the cell apoptosis. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay. The expression of β -catenin, a crucial molecule in Wnt/ β -catenin pathway, was determined by

收稿日期: 2017-03-16 接受日期: 2017-06-21

国家自然科学基金(批准号: 81172545)和重庆市卫计委项目(批准号: 2016MSXM039)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63638834, E-mail: 352934430@qq.com

Received: March 16, 2017 Accepted: June 21, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172545) and Chongqing Municipal Health Planning Commission Project (Grant No.2016MSXM039)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63638834, E-mail: 352934430@qq.com

网络出版时间: 2017-08-16 16:47:43 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170816.1647.006.html>

RT-PCR and Western blot. The results showed that the mRNA and protein levels of DLX1 were significantly increased after infection with AdDLX1, and the capacities of cell migration and invasion were down-regulated. Overexpression of DLX1 could not change the apoptosis and proliferation of MG63 cells. The expression of β -catenin mRNA and protein levels were up-regulated in MG63 cells. These results suggested that the Wnt/ β -catenin pathway which involved in the migration and invasion of MG63 cells was inhibited by DLX1.

Keywords DLX1; MG63; migration; invasion; apoptosis; proliferation; β -catenin

骨肉瘤居儿童和青少年原发性恶性骨肿瘤之首,好发于股骨远端和胫骨近端,有高度的恶性生物学行为,发生转移早、预后差^[1]。随着手术联合新辅助化疗的开展,多种肿瘤的预后明显改善,然而骨肉瘤的远期生存率仍未见明显提高^[2-3]。因此,对骨肉瘤进行深入的分子研究、寻找新的疗法已成为迫切需要。

本课题组通过基因芯片技术筛选出有可能导致骨肉瘤形成的多个关键基因,其中包括同源盒基因1(distal-less homeobox 1, *DLX1*)。*DLX1*属于同源异型盒基因(DLX)家族,已有大量研究证实其控制着人类多方面胚胎形态的发育,也参与骨形成和造血^[4-6]。近年来,在卵巢癌和血液系统等恶性肿瘤中均发现其表达异常^[7-8]。本研究旨在通过过表达DLX1探讨DLX1对骨肉瘤细胞恶性生物学行为的影响及分子机制。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

MG63细胞、HEK293细胞、表达DLX1的重组腺病毒AdDLX1和表达红色荧光的重组空载腺病毒AdRFP均为本课题组保存。DMEM高糖培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司。胰蛋白酶、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE蛋白质上样缓冲液、SDS-PAGE电泳液以及Western blot转膜液购自上海碧云天生物技术有限公司。总蛋白提取试剂盒购自凯基生物技术股份有限公司。Trizol购自Invitrogen公司。反转录试剂盒和PCR Mix购自天根生化科技(北京)有限公司。鼠源 β -actin抗体购自北京四正柏生物科技有限公司。兔源DLX1抗体、羊抗鼠及羊抗兔二抗购自Abgent公司。兔源 β -catenin抗体购自Protech公司。CCK-8试剂购自日本同仁化学研究所。小室和基质胶购自BD公司。PVDF膜和ECL化学发光液购自Milipore公司。DAPI染料购自北京雷根生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MG63、HEK293细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基于37℃、5% CO₂孵育箱中培养,待贴壁生长达约80%汇合时,用胰蛋白酶进行消化、传代。

1.2.2 重组腺病毒AdDLX1和AdRFP扩增及最佳感染复数测定 扩增重组腺病毒: HEK293细胞接种于培养瓶中,细胞达到60%~80%汇合时,加入适量病毒原液,24 h后观察荧光,表达约30%。3~4 d后细胞漂浮约50%时离心收集细胞,离心管内留适量上清液,经-80℃反复冻融3~4次后,低温高速离心(4℃、14 000 r/min离心15 min),取上清液(含有腺病毒)加入HEK293细胞,经反复感染后可得到高滴度的重组腺病毒,分装后于-80℃保存备用。

最佳感染滴度测定: MG63细胞传代于24孔板,生长至50%~60%汇合时,倍比稀释AdDLX1和AdRFP并感染MG63细胞,设置3个复孔,48 h后荧光显微镜观察荧光阳性表达细胞,筛选出最合适的感染滴度(感染率>60%)。

1.2.3 MG63细胞分组处理 实验设DLX1组(AdDLX1表达组)和RFP组(空载腺病毒AdRFP感染组)。MG63细胞经传代生长至50%~60%汇合时,加入最佳感染滴度的病毒量,48 h观测荧光表达情况。

1.2.4 RT-PCR和Western blot检测DLX1和 β -catenin的mRNA和蛋白质水平 用RNA提取试剂盒提取各组细胞RNA(步骤同说明书),反转录合成cDNA,并以其为模板特异扩增引物,进行降落聚合酶链式反应(touch-down PCR)。引物序列见表1,反应程序为:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 65~55℃ 30 s, 72℃ 1 min,每个循环降低1℃,共10个循环; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 18个循环; 72℃ 5 min, 4℃ 储存。PCR产物经2%琼脂糖电泳80 V, 30 min,凝胶成像仪上观察拍照。

细胞增殖达到80%~90%汇合时弃去培养基,冷PBS洗2次,刮下细胞后放入1.5 mL无酶离心管中,加

表1 降落聚合酶链式PCR引物序列
Table 1 Primer sequence of touch-down PCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
<i>β-actin</i>	F: 5'-AGA CCT GTA CGC CAA CAC AG-3' R: 5'-GTA CTT GCG CTC AGG AGG AG-3'
<i>DLX1</i>	F: 5'-CTG GAG GAC CCA GGT CAA G-3' R: 5'-CTG CAT AGC TTC TTG GTG CG-3'
<i>β-catenin</i>	F: 5'-CTG CAG GGG TCC TCT GTG-3' R: 5'-TGC ATA TGT CGC CAC ACC-3'

蛋白裂解液300 μ L, 冰上裂解30 min后, 超声进一步裂解, 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min离心6 min, 吸取上清至1.5 mL无酶离心管中, 检测蛋白浓度, 按15:1加入上样缓冲液, 混匀后煮沸变性5 min。蛋白样品于10%分离胶、5%浓缩胶进行电泳, 湿转法转膜, 5%脱脂牛奶封闭2 h, 一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST洗膜3次, 二抗室温孵育2 h, TBST洗膜3次, ECL发光试剂发光。

1.2.5 Transwell实验检测迁移和侵袭能力 迁移实验: Transwell上室分别加入100 μ L(调整细胞密度为 1×10^5)不同处理组的无血清细胞悬液, 下室加入500 μ L含20% FBS的培养基, 每组设3个复孔, 24 h后取出小室, 吸去上室培养基, 用湿棉签轻拭去上室细胞, 结晶紫染色10 min后, 用PBS浸洗, 显微镜下观察拍照计数, 以上实验重复3次。

侵袭实验: 基质胶(冰上操作)与无血清培养基按1:2混合后, Transwell上室加入50 μ L混合液, 37 $^{\circ}$ C培养箱过夜, 使用前水化, 其他步骤同迁移实验。

1.2.6 DAPI染色和流式细胞术检测细胞凋亡 DAPI染色: 细胞分组处理3 d, 弃去培养基, PBS洗1次。4%多聚甲醛固定15 min, PBS洗3次, 每次10 min。加入DAPI染料, 漫过细胞即可, 避光、室温孵育15 min。PBS洗3次, 每次10 min。荧光显微镜下观察拍照。

流式细胞术: 细胞分组处理后3 d, 用不含EDTA的胰蛋白酶消化离心MG63细胞, PBS清洗3次后离心重悬细胞, 送至流式细胞仪检测室, 加染料上机检测。

1.2.7 CCK-8检测细胞增殖 细胞分DLX1组、RFP组、空白组(DMEM培养基)。取对数期的细胞, 按 1×10^4 的密度均匀铺板, 每孔终体积均为100 μ L, 周边各孔以PBS填充。铺板后96孔板放于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中, 在细胞贴壁后向各孔板中加入10 μ L CCK-8试剂, 置于孵箱中继续培养2 h后, 分别在细胞

培养至6、12、24、36 h时, 用酶标仪检测450 nm处吸光度(D)值, 记录实验结果。

1.3 统计学分析

所获实验数据均以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用SPSS 20.0统计软件, 进行单因素方差分析和方差同质性检验, 如方差齐采用LSD检验, 如方差不齐采用Tamhane's T2检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扩增AdDLX1和AdRFP并检测其感染MG63细胞的感染复数

在HEK293细胞中扩增腺病毒AdDLX1和AdRFP, 72 h后获得高滴度的AdDLX1和AdRFP病毒液(图1)。按MOI=100向MG63细胞中加入腺病毒AdDLX1和AdRFP, 感染MG63细胞。72 h后荧光显微镜下观察到两组细胞都有荧光表达, 且荧光表达量相当, 表明AdDLX1和AdRFP能有效地感染MG63细胞(图2)。

2.2 验证AdDLX1感染MG63细胞后DLX1的表达

分组处理细胞72 h后, RT-PCR检测显示, 与RFP组相比, DLX1组中DLX1的mRNA水平明显上调(图3A和图3B)。Western blot结果显示, DLX1组中DLX1蛋白质水平明显高于RFP组(图3C和图3D)。这一结果说明, MG63细胞内源性DLX1表达较低, AdDLX1能上调外源性DLX1的表达。

2.3 过表达DLX1对MG63细胞迁移和侵袭能力的影响

迁移实验中, 细胞分组处理, 加入小室24 h后, DLX1组穿膜细胞数(227 ± 31)低于RFP组穿膜细胞数(396 ± 33)(图4A~图4C)。侵袭实验中, 细胞加入小室24 h后, 与RFP组穿膜细胞数(215 ± 26)相比, DLX1组的穿膜细胞数(127 ± 12)下降(图4D~图4F)。

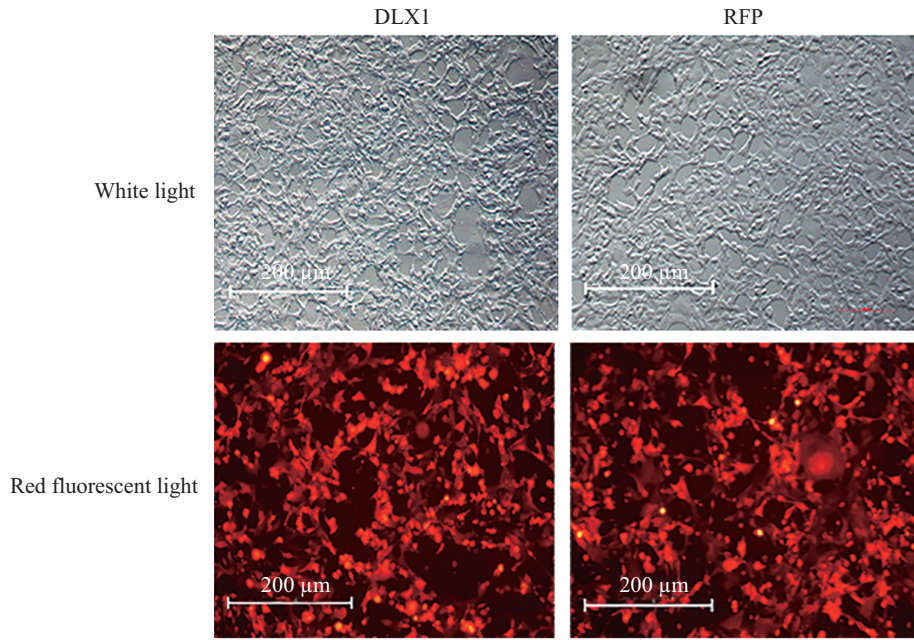


图1 HEK293细胞中扩增腺病毒AdDLX1和AdRFP
Fig.1 Amplificated AdDLX1 and AdRFP in HEK293 cells

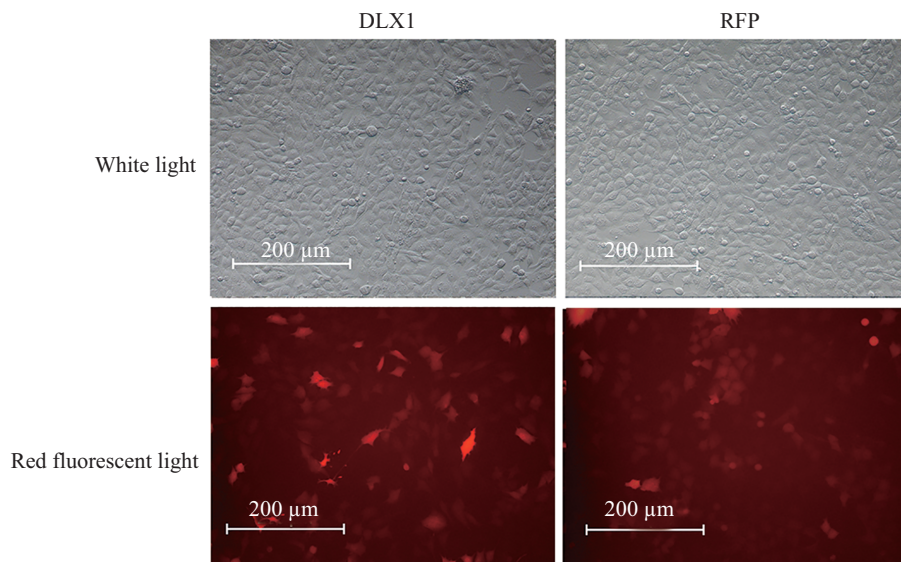


图2 重组腺病毒感染MG63细胞后荧光强度
Fig.2 Fluorescent intensity of MG63 cells after infected with Adenovirus

2.4 过表达DLX1后对MG63细胞凋亡的影响

DAPI染色结果显示, 两组细胞凋亡均少见, 无明显差异(图5A~图5D)。流式细胞术检测结果显示, DLX1组和RFP组凋亡率分别是 $13.0\% \pm 2.1\%$ 和 $11.0\% \pm 2.1\%$, 也无显著差异(图5E~图5G)。

2.5 过表达DLX1后对MG63细胞增殖的影响

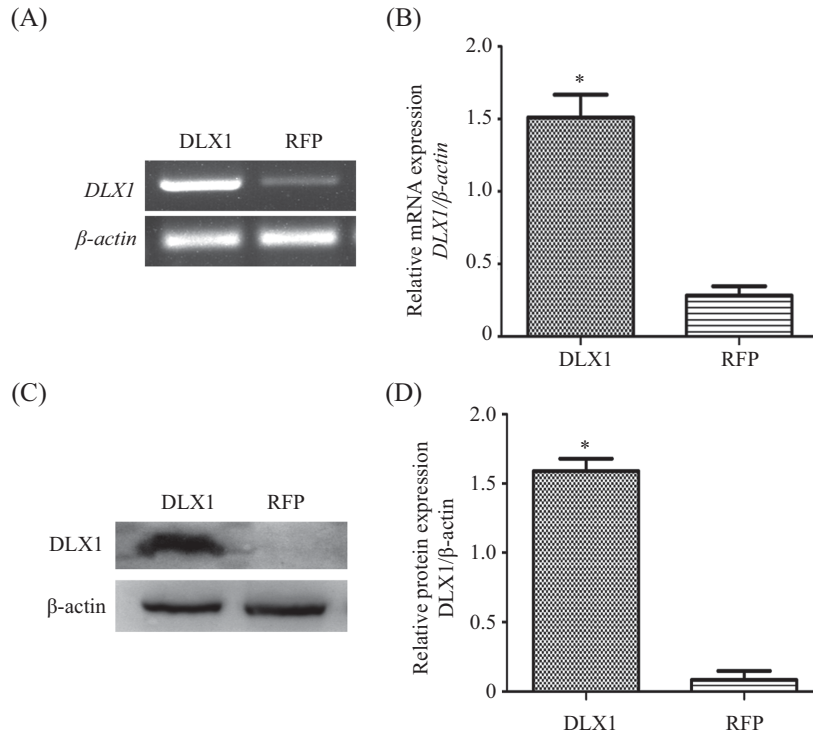
CCK-8实验结果显示, 36 h的DLX1组 D 值是 2.263 ± 0.343 , RFP组 D 值是 2.305 ± 0.402 。两组细胞增殖无明显差异(图6)。

2.6 过表达DLX1后MG63细胞中 β -catenin的变化

细胞分组处理72 h后, 分别检测 β -catenin的mRNA和蛋白质水平。结果显示, DLX1组 β -catenin的mRNA和蛋白质水平较RFP组上调, 差异具有统计学意义(图7)。

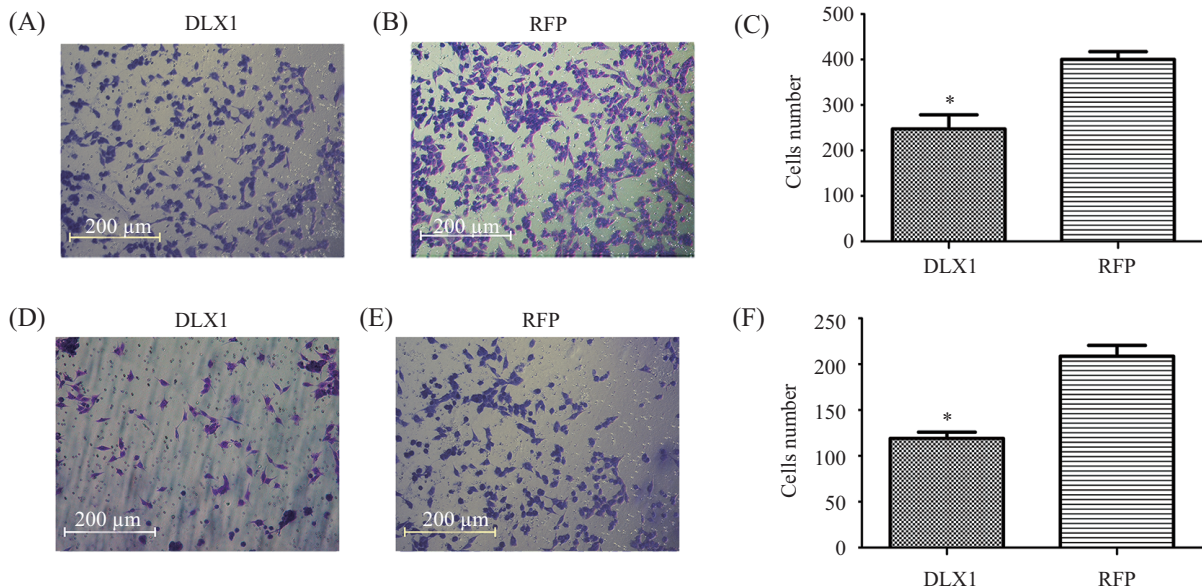
3 讨论

骨肉瘤是儿童和青少年最常见的原发性恶性骨肿瘤, 是青少年最常见的实体肿瘤之一, 发生转移



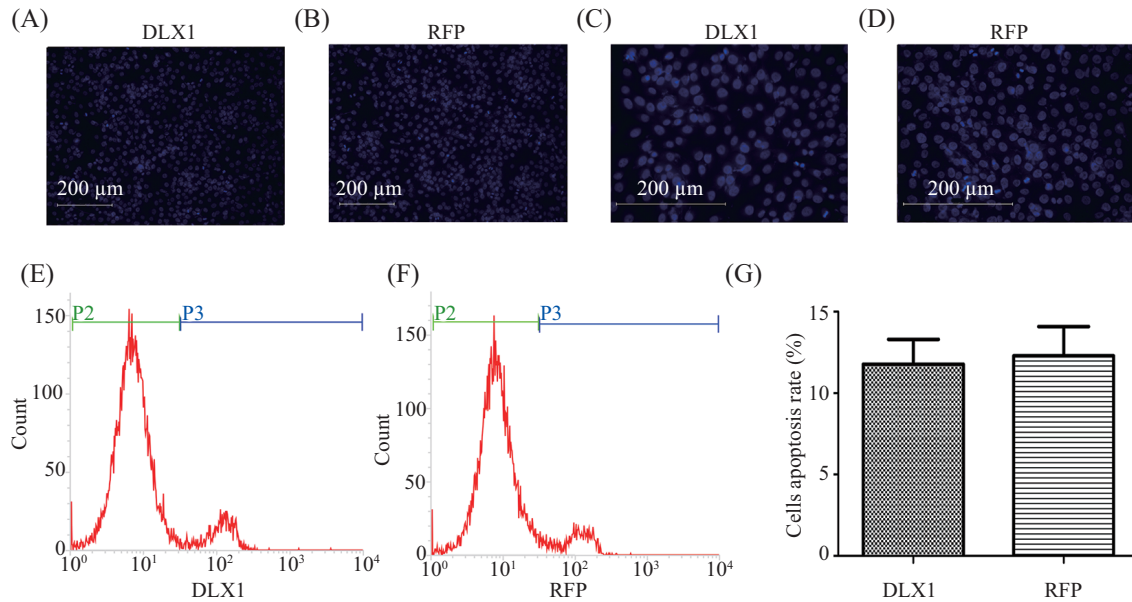
A: *DLX1* mRNA水平; B: 统计分析*DLX1* mRNA水平; C: DLX1蛋白质水平; D: 统计分析DLX1蛋白质水平。* $P < 0.05$, 与RFP组比较。
A: the mRNA level of *DLX1*; B: statistical analysis of *DLX1* mRNA levels; C: the protein level of DLX1; D: statistical analysis of DLX1 protein levels. * $P < 0.05$ vs RFP group.

图3 MG63细胞中DLX1的mRNA和蛋白质水平
Fig.3 The mRNA and protein levels of DLX1 in MG63 cells



A: DLX1组迁移情况; B: RFP组迁移情况; C: 统计分析A和B两组穿膜细胞数; D: DLX1组侵袭情况; E: RFP组侵袭情况; F: 统计分析C和D两组穿膜细胞数。* $P < 0.05$, 与RFP组比较。
A: the migration ability of DLX1 group; B: the migration ability of RFP group; C: statistical analysis of the number of transmembrane cells in A and B groups; D: the invasion ability of DLX1 group; E: the migration ability of RFP group; F: statistical analysis of the number of transmembrane cells in C and D groups. * $P < 0.05$ vs RFP group.

图4 DLX1组和RFP组细胞迁移和侵袭
Fig.4 The abilities of cell migration and invasion of DLX1 and RFP groups



A、C: DLX1组DAPI染色; B、D: RFP组DAPI染色; E、F: DLX1组和RFP组流式细胞术检测凋亡的情况; G: 统计分析各组细胞凋亡情况。

A,C: the apoptosis rate of DLX1 group; B,D: the apoptosis rate of RFP group; E,F: flow cytometry were used to evaluate the cell apoptosis of MG63 cells infected by AdDLX1 and AdRFP; G: cell apoptosis rate of E and F groups.

图5 DLX1组和RFP组细胞凋亡比较

Fig.5 The evaluation of the cell apoptosis of DLX1 group and RFP group

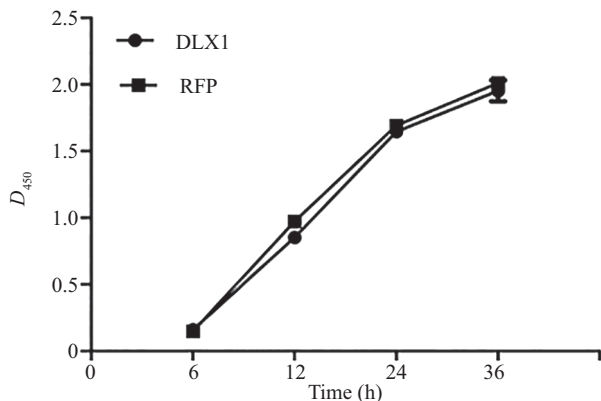


图6 CCK-8实验检测细胞增殖

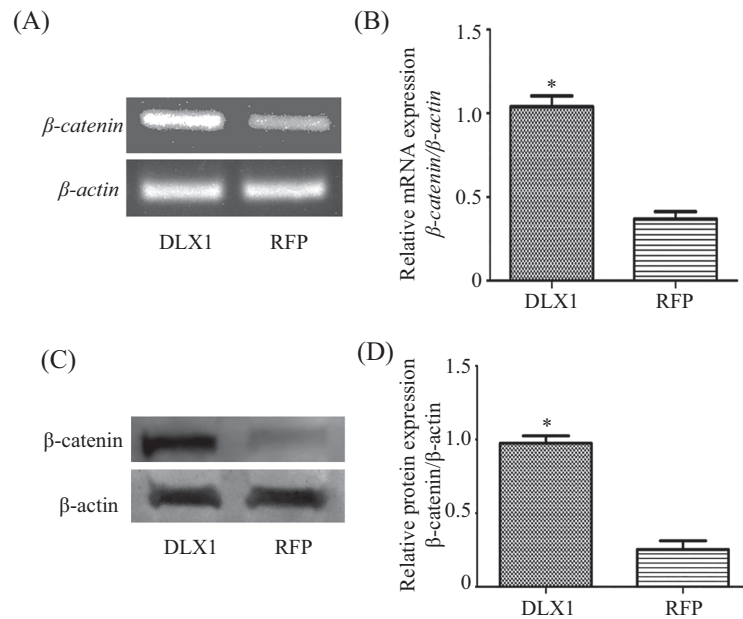
Fig.6 Cell proliferation test by CCK-8 assay

早及恶性程度高^[9]。骨肉瘤大多在确诊时80%已发生微小转移,发生肺转移的概率约20%。患者经外科手术联合新辅助化疗后,5年存活率55%~75%,但其远期生存率并没有增加。目前,在骨肉瘤治疗上还存在很多分歧和争论。因此,如何降低骨肉瘤的侵袭和转移是治疗中亟待解决的问题。

本课题组一直致力于发育异常与肿瘤发生的研究,前期研究发现,正常的成骨过程被扰乱,则有可能发生骨肉瘤。有报道认为,骨肉瘤是一种分化疾病,是间充质干细胞成骨分化中断引起的恶性增生^[10]。研究发现,这种发生失控的阶段越早,发生的骨肉瘤恶性程度则越高,分化程度越低^[11]。本课题

组通过基因芯片技术已筛选出可能导致正常成骨过程调控异常而最终形成骨肉瘤的多个关键基因,包括DLX1和分化抑制因子1(inhibitor of differentiation 1, *Id1*)等。关于Id1,本课题组研究发现,抑制Id1可逆转骨肉瘤恶性生物学行为并促进骨肉瘤早期成骨分化^[12-13]。DLX1属于同源异型盒基因(DLX)家族,DLX1参与面部、眼和肢体的发生发展^[4]。DLX1是TGF- β (transforming growth factor- β)超家族血液生成的调节基因^[6],急性粒细胞白血病患者分离的癌细胞中存在DLX1表达异常^[7],DLX1突变与唇腭裂的发生相关^[14]。DLX1可促进BMP9(bone morphogenetic protein 9)诱导的骨髓间充质干细胞成骨分化,干扰DLX1则会影响BMP9的成骨作用^[15]。但在目前国内外研究中未见DLX1对骨肉瘤生物学行为影响的具体报道。

本研究发现,在内源性DLX1低表达的人骨肉瘤细胞MG63中,采用重组腺病毒AdDLX1感染后,MG63细胞的DLX1表达成功上调。在此基础上,我们进一步研究过表达DLX1对MG63细胞恶性生物学行为,包括迁移、侵袭、凋亡和增殖的影响。结果显示,DLX1过表达可抑制骨肉瘤细胞MG63的侵袭和迁移,而对MG63细胞的凋亡和增殖无显著影响。为此,我们推测,DLX1过表达抑制骨肉瘤的迁移和侵袭后,



A: β -catenin mRNA水平; B: 统计分析 β -catenin mRNA水平; C: β -catenin蛋白质水平; D: 统计分析 β -catenin蛋白质水平。* $P < 0.05$, 与RFP组比较。
A: the mRNA level of β -catenin; B: statistical analysis of β -catenin mRNA levels; C: the protein level of β -catenin; D: statistical analysis of β -catenin protein levels. * $P < 0.05$ vs RFP group.

图7 DLX1组和RFP组 β -catenin的mRNA和蛋白质水平的比较

Fig.7 The β -catenin mRNA and protein levels of DLX1 and RFP groups

可明显降低骨肉瘤的转移, 为进一步提高骨肉瘤疗效提供新的理论依据。那么, DLX1过表达对骨肉瘤迁移和侵袭的抑制是否涉及到信号通路的改变呢?

深入研究分子机制后我们发现, 骨肉瘤细胞MG63中DLX1高表达后, 其 β -catenin的mRNA和蛋白质水平均上调。Wnt/ β -catenin信号通路是胚胎发育所必需的信号通路, 同时在肿瘤(包括骨肉瘤)的发生发展中占有重要地位^[16-17]。目前, 国内外关于Wnt/ β -catenin信号通路对骨肉瘤生物学行为影响的报道存在不同观点。传统观念认为, Wnt/ β -catenin信号通路在骨肉瘤中处于激活状态, 抑制Wnt/ β -catenin信号通路能抑制细胞的恶性生物学行为^[16,18-19]。但近年来的研究结果表明, 激活Wnt/ β -catenin信号通路能抑制骨肉瘤细胞恶性生物学行为^[17,20-21]。本课题组亦有研究表明, β -catenin过表达可抑制骨肉瘤细胞TE85的迁移和侵袭能力^[22]。总之, Wnt/ β -catenin信号通路在DLX1过表达对骨肉瘤迁移和侵袭的抑制中的具体作用机制有待进一步深入研究。

综上所述, DLX1过表达可抑制MG63细胞迁移和侵袭。本课题组已初步发现其机制与Wnt/ β -catenin信号通路相关, 接下来将进一步研究DLX1调控Wnt/ β -catenin信号通路的分子机制, 以期为骨肉瘤的分子治疗提供新的思路。

参考文献 (References)

- Osborne TS, Khanna C. A review of the association between osteosarcoma metastasis and protein translation. *J Comp Pathol* 2012; 146(2/3): 132-42.
- Perkins SM, Shinohara ET, DeWees T, Frangoul H. Outcome for children with metastatic solid tumors over the last four decades. *PLoS One* 2014; 9(7): e100396.
- Kager L, Tamamyran G, Bielack S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. *Future Oncol* 2017; 13(4): 357-68.
- Dollé P, Price M, Duboule D. Expression of the murine Dlx-1 homeobox gene during facial, ocular and limb development. *Differentiation* 1992; 49(2): 93-9.
- Li H, Marijanovic I, Kronenberg MS, Erceg I, Stover ML, Velonis D, *et al.* Expression and function of Dlx genes in the osteoblast lineage. *Dev Biol* 2008; 316(2): 458-70.
- Chiba S, Takeshita K, Imai Y, Kumano K, Kurokawa M, Masuda S, *et al.* Homeoprotein DLX-1 interacts with Smad4 and blocks a signaling pathway from activin A in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(26): 15577-82.
- Chan DW, Hui WW, Wang JJ, Yung MM, Hui LM, Qin Y, *et al.* DLX1 acts as a crucial target of FOXM1 to promote ovarian cancer aggressiveness by enhancing TGF-beta/SMAD4 signaling. *Oncogene* 2017; 36(10): 1404-16.
- Starkova J, Gadgil S, Qiu YH, Zhang N, Hermanova I, Kornblau SM, *et al.* Up-regulation of homeodomain genes, DLX1 and DLX2, by FLT3 signaling. *Haematologica* 2011; 96(6): 820-8.
- Longhi A, Errani C, De Paolis M, Mercuri M, Bacci G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: State of the art. *Cancer Treat Rev* 2006; 32(6): 423-36.
- Williams SA, Maecker HL, French DM, Liu J, Gregg A,

- Silverstein LB, *et al.* USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell* 2011; 146(6): 918-30.
- 11 Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 2008; 466(9): 2114-30.
- 12 迭小红, 罗庆, 毕杨, 罗光金, 仇超, 康权, 等. siRNA沉默Id1基因对小鼠骨肉瘤细胞增殖、迁移及凋亡的影响. *中华小儿外科杂志(Die Xiaohong, Luo Qing, Bi Yang, Luo Guangjin, Qiu Chao, Kang Qu, et al. Effects of Id1 knockdown by small interfering RNA on cell proliferation, migration and apoptosis of murine osteosarcoma cells. Chinese Journal of Pediatric Surgery) 2015; 36(3): 220-5.*
- 13 仇超, 康权, 迭小红, 罗光金, 吕凤香, 罗庆, 等. Id1基因对人骨肉瘤细胞恶性逆转向成骨分化的影响. *第三军医大学学报(Qiu Chao, Kang Quan, Die Xiaohong, Luo Guangjin, Lü Fengxiang, Luo Qing, et al. Effect of Id1 gene on proliferation, migration, invasion and osteogenic differentiation of osteosarcoma cells. Journal of the Third Military Medical University) 2016; 38(4): 344-9.*
- 14 Sabóia TM, Reis MF, Martins ÂM, Romanos HF, Tannure PN, Granjeiro JM, *et al.* DLX1 and MMP3 contribute to oral clefts with and without positive family history of cancer. *Arch Oral Biol* 2015; 60(2): 23-8.
- 15 王文娟. DLX1对BMP9诱导的间充质干细胞成骨分化的影响. 重庆医科大学(Wang Wenjuan. Effect of DLX1 on osteogenic differentiation of BMP9-induced mesenchymal stem cells. Chongqing Medical University), 2014.
- 16 Li C, Shi X, Zhou G, Liu X, Wu S, Zhao J. The canonical Wnt-beta-catenin pathway in development and chemotherapy of osteosarcoma. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2013; 18: 1384-91.
- 17 Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, Sharff KA, *et al.* BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signalling. *J Cell Mol Med* 2009; 13(8B): 2448-64.
- 18 Liu Y, Wang W, Xu J, Li L, Dong Q, Shi Q, *et al.* Dihydroartemisinin inhibits tumor growth of human osteosarcoma cells by suppressing Wnt/beta-catenin signaling. *Oncol Rep* 2013; 30(4): 1723-30.
- 19 McQueen P, Ghaffar Sv, Guo Y, Rubin EM, Zi X, Hoang BH. The Wnt signaling pathway: Implications for therapy in osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2011; 11(8): 1223-32.
- 20 Cai Y, Mohseny AB, Karperien M, Hogendoorn PC, Zhou G, Cleton-Jansen AM. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J Pathol* 2010; 220(1): 24-33.
- 21 Wan Y, Zhao W, Jiang Y, Liu D, Meng G, Cai Y. beta-catenin is a valuable marker for differential diagnosis of osteoblastoma and osteosarcoma. *Hum Pathol* 2014; 45(7): 1459-65.
- 22 罗光金, 康权, 毕杨, 迭小红, 仇超, 罗庆, 等. beta-catenin过表达对骨肉瘤细胞TE85迁移、侵袭及凋亡的影响. *基础医学与临床(Luo Guangjin, Kang Quan, Bi Yang, Die Xiaohong, Qiu Chao, Luo Qing, et al. Effects of beta-catenin on cell migration, invasion and apoptosis of TE85 osteosarcoma cells. Basic & Clinical Medicine) 2014; 34(11): 1491-6.*