

三白草提取物抗乳腺癌转移作用及其机制研究

吕红¹, 邹乐兰², 麻俊超³, 王珊³, 刘婷³, 柯小琴³, 付剑江^{3*}

(1. 江西中医药大学网络与教育技术中心, 南昌 330004; 2. 南昌大学医院, 南昌 330006;
3. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**研究三白草提取物(extracts from *Saururi Herba*, ESH)的抗乳腺癌转移作用。**方法:**采用尾静脉注射肿瘤细胞法建立实验性转移模型;采用体外细胞黏附、迁移以及侵袭法,观察 ESH 对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞的体外黏附、迁移以及侵袭的影响;采用 Runx2 转录因子分析法和 Western blot 法,观察 ESH 对 Runx2 活性的影响。**结果:**给药后,ESH 200, 400 mg·kg⁻¹剂量组裸鼠肺组织中 *ck19* 的平均表达量分别为 55.85%, 42.28%, 显著低于空白组($P < 0.01$);体外黏附实验表明,ESH 可干扰肿瘤细胞与细胞外基质蛋白之间的黏附($P < 0.01$);ESH 80, 160 g·L⁻¹剂量组的细胞迁移细胞数分别为(106.4 ± 52.4), (40.4 ± 7.6)个,与空白组相比具有统计学差异($P < 0.01$);细胞侵袭实验表明,ESH 低、中、高剂量组的侵袭细胞抑制率分别为 32.57%, 68.04% 和 71.92%, 与空白组相比具有统计学差异($P < 0.01$)。Runx2 转录因子活性分析以及 Western blot 实验结果表明,ESH 可显著抑制 Runx2 的磷酸化,从而抑制其转录活性。**结论:**ESH 具有明显的抗乳腺癌转移作用。抑制细胞内 Runx2 磷酸化可能是其发挥抗转移作用的机制之一。

[关键词] 三白草提取物; 转移; 乳腺癌; Runx2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0123-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070123

Anti-metastatic Effects of Extracts from *Saururi Herba* Downregulating Runx2 Activation on Breast Cancer Cell LYU Hong¹, ZOU Le-lan², MA Jun-chao³, WANG Shan³, LIU Ting³, KE Xiao-qin³, FU Jian-jiang^{3*}
(1. Network and Education Technology Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China; 2. Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 3. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** The study was conducted to investigate the anti-metastatic effects of extracts from *Saururi Herba* (ESH) and its mechanisms. **Method:** Balb/C Nu mice were used to establish *in vivo* experimental metastasis model by tail-vein injection; *in vitro* invasion, *in vitro* migration and *in vitro* adhesion assay were performed to determine the effects of ESH on metastatic properties of breast cancer cells; Runx2 transcription factor assay and western blot method were used to detect the effects of ESH on activation of Runx2. **Result:** ESH exhibited significant suppression on the formation of lung metastatic foci of breast cancer *in vivo* ($P < 0.01$). Moreover, *in vitro* adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 cells were inhibited significantly when these cells were incubated with ESH ($P < 0.01$). It was also shown that ESH had suppression activity of Runx2 and expression of p-Runx2 in breast cancer cells. **Conclusion:** ESH shows significant anti-metastatic properties. The mechanisms of this traditional Chinese medicine may be associated with suppression of Runx2 activation.

[Key words] extracts from *Saururi Herba*; metastasis; breast cancer; Runx2

三白草 *Saururus chinensis* 为三白草科植物,又 称为水木通、九节藕,常生长在水田、路边或林荫湿

[收稿日期] 20140731(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860375, 81160530, 81260656);江西省自然科学基金项目(2010GQY0147);教育部重点科技项目(211091)

[第一作者] 吕红,讲师,从事中药抗肿瘤药理工作, Tel:0791-87118901, E-mail: jianghong_6666 @ 126. com

[通讯作者] *付剑江,博士,副教授,从事中药抗肿瘤药理工作, Tel:0791-87118919, E-mail: jianjiang_fu@ yeah. net

地,在我国长江流域以南各省大部分地区均有分布,江西、福建、广东等地都有野生,资源十分丰富,蕴藏量较高,是我国许多地方民间常用草药。本品具有清热解毒,利尿消肿之功效;用于乳痈、月经不调、水肿、黄疸等疾病的治疗。现代药理学研究表明,三白草具有抗炎、降糖、保肝以及抗氧化等作用^[1]。药物化学研究表明,三白草含有多种化学成分,类型包括木脂素、黄酮等^[2]。近年来,三白草的抗肿瘤活性日益成为人们关注的热点。三白草中所含成分 manassantin B 和 4-O-demthylmanassantin B 是具有分子靶向作用的抗肿瘤物质,二者均是强的 hypoxia-activated HIF-1 抑制剂。而 manassantin A 具有肿瘤选择的细胞的毒性^[3]。为了全面了解三白草的抗肿瘤作用,为三白草的临床使用提供依据,本研究通过实验研究观察了三白草提取物(ESH)的抗肿瘤转移作用,并对其作用机制进行了进一步探讨。

1 材料

1.1 药物 三白草采自江西省九江市,经江西省食品药品检验所中药室鉴定为三白草科植物三白草 *Saururus chinensis* 的干燥地上部分,符合 2010 年版《中国药典》标准。三白草提取物的提取方法为三白草全草 20 kg 粉碎成粗粉,用 95% 乙醇回流提取 3 次,合并醇提液,减压浓缩得浸膏,蒸馏水混悬后,依次用石油醚、三氯甲烷、乙酸乙酯和含水正丁醇萃取,得 5 个部位,其中三氯甲烷部位 153 g,用于本研究作为研究对象。

1.2 动物 Balb/C Nu 裸鼠,雌性,18~22 g 由北京大学医学部实验动物科学部提供。动物合格证号 SCXK(京)-2011-0012。

1.3 细胞株及细胞培养 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞库,由江西中医药大学药理学科组传代、保管。人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中培养,置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱内,3~4 d 传代 1 次。

1.4 试剂 Matrigel (BD bioscience, 批号 354234), fibronectin (FN, Sigma-Aldrich, 批号 F1141), cytoSelect™48 孔细胞黏附试剂盒 (Cell Biolabs, 批号 CBA-070), QIAshredder (Qiagen, 批号 79656), RNeasy Protect Mini 试剂盒 (Qiagen, 批号 74124), OneStep RT-PCR 试剂盒 (Qiagen, 批号 210210), Multiplex PCR 试剂盒 (Qiagen, 批号 206143), TransAM™ AML-3/Runx2 试剂盒 (Active motif, 批号 44496), 抗 p-Runx2 多克隆抗体 (Abgent, 批号 AP3559a), 抗 β-Actin 单克

隆抗体 (Santa Cruz, 批号 SC-130301)。

1.5 仪器 AP48 chamber (美国 Neuro probe 公司), Mastercycler gradient PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司), EC3 型凝胶成像系统 (美国 UVP 公司), ELx800 酶标仪 (美国 BioTek 公司), BX63 型正置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 重组基底膜细胞侵袭实验 采用 AP48 chamber 细胞趋化系统进行。将 PVPF 滤膜 (8.0 μm 孔径, 25 mm × 80 mm) 悬空放置, 在滤膜的粗糙面涂 FN (0.05 g·L⁻¹) 作趋化剂, 置超净台内风干后, 将 matrigel 稀释成 0.5 g·L⁻¹, 以 100 μL 铺在滤膜光洁面, 干燥后, 再铺以 100 μL 稀释的 matrigel, 使之干燥, 形成一个基质屏障层。在 AP48 chamber 的下孔内加入含 0.1% BSA 的无血清 DMEM 培养基, 每孔 30 μL。装好 chamber, 收集对数生长期的细胞, 以 2 mmol·L⁻¹ EDTA/PBS 消化细胞, 悬浮于含 0.1% BSA 的无血清 DMEM 培养基中, 细胞密度为 2 × 10⁶/mL, 同时加入一定浓度的药液。将细胞悬液加到 AP48 chamber 的上孔内, 每孔 50 μL。将 chamber 置于 37 °C, 5% CO₂ 温箱内孵育 14 h。将 chamber 取出, 拆下滤膜, 用甲醇固定 10 min, 0.5% 结晶紫染色 60 min, 水洗, 用棉签擦掉未穿过膜的细胞, 用二甲苯透明后将膜用 Histomount 胶封于载玻片上, 于光学显微镜下计数侵袭细胞数, 每膜计数上中下左右 5 个不同视野的透过细胞数, 计算平均值, 每组平行设 3 孔。以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。

2.2 肿瘤细胞体外趋化运动实验 方法同重组基底膜侵袭实验, 只是不在滤膜光洁面铺 matrigel。加入细胞悬液培养 12 h 后, 固定、染色、计数。

2.3 体外细胞黏附实验 肿瘤细胞与细胞外基质成分的黏附作用采用 cytoSelect™48 孔细胞黏附试剂盒进行检测。收集对数生长期的细胞, 经无血清培养基洗涤 3 次之后, 用完全培养基重悬, 细胞密度为 1 × 10⁷/mL。随后, 在 cytoSelect™48 孔培养板中加入细胞悬液, 每孔 150 μL, 同时加入 100 μL 含 ESH 或 DMSO 的培养基, 37 °C, 5% CO₂ 培养 60 min。培养结束后, 小心吸除培养基, PBS 洗涤 3 次, 以去除未黏附的细胞。随后, 在每孔中加入 150 μL 提取液, 孵育 10 min 后酶标仪测定 A₅₆₀ 和 A₄₅₀。

2.4 实验性肺转移模型 采用肿瘤细胞尾静脉注射法建立实验性肺转移模型。取 Balb/C Nu 裸鼠 30 只, 尾静脉注射含有 2 × 10⁶ 个 MDA-MB-231 细

胞的生理盐水 200 μL 。24 h 后随机分为 3 组,分别为空白组、ESH 低、高剂量组。ESH 低、高剂量组分别 *ig* 给予三白草提取物 200, 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 给药体积 0.02 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$, 空白组则给予同体积生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 8 周。给药结束后, 将动物处死, 取肺组织, 立即在液氮中冻存。随后采用 QIAshredder 和 RNeasy Protect Mini Kit 提取总 RNA, 通过巢式 PCR 检测实验动物肺组织中的人源细胞角蛋白 19 (cytokeratin 19, ck19) 的含量, 以确定肺转移程度。

2.5 RNA 提取及巢式 PCR 肺组织中总 RNA 采用 QIAshredder 和 RNeasy Protect Mini 试剂盒提取。取 10 μL RNA, 2 μL 逆转录酶混合物以及 10 μL 外引物混匀, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下进行逆转录反应 30 min (Qiagen OneStep RT-PCR Kit, Qiagen)。随后进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 活化 *Taq* 酶; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 37 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。随后采用 Qiagen Multiplex PCR Kit 进行巢式扩增, 扩增条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。ck19 (GenBank number: BC010409) 的目标引物采用 Primer Designer (Scientific & Educational Software Version 2.0) 设计, 外引物: forward 5'-CCACGTCGTCCTTCGGAGGCC-3' (64 ~ 84 bp), reverse 5'-GTTCCGTCTCAAACCTTGGTTC-3' (529 ~ 549 bp); 内引物: forward 5'-TACAGCCACTACTACACGACCA-TCC-3' (432 ~ 456 bp), reverse 5'-GGACAATCCTGG-AGTTCTCAATG-3' (488 ~ 510 bp)。 β -actin 基因被用作内参基因, 其扩增条件见参考文献 [4]。巢式 PCR 产物采用 4% 琼脂糖凝胶进行电泳分离, 分离结果在凝胶成像系统中拍照。

2.6 Runx2 转录因子分析 采用 TransAMTM AML-3/Runx2 试剂盒检测核抽提物中 Runx2 的转录活性。该试剂盒将含 Runx2 结合位点的寡聚核苷酸固定于 96 孔板上, 通过显色反应来确定寡聚核苷酸与 Runx2 的结合程度, 从而反应 Runx2 的转录活性。MDA-MB-231 细胞经 ESH 或 DMSO 孵育 12 h 后, 收集细胞, 提取核抽提物 (Nuclear Extract 试剂盒)。随后, 按照试剂盒说明书检测细胞核抽提物中 Runx2 的活性。

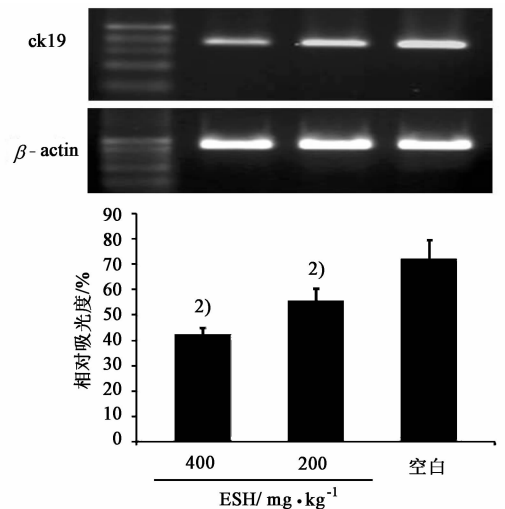
2.7 Western blot 检测蛋白表达 将各处理组细胞加 1 mL 含 0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF 的细胞裂解液 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, pH 7.6, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0, 10 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ Triton X-

100, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT), 冰上裂解 30 min, 离心 (15 000 $\times g$, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$), 取出细胞碎片, 测细胞裂解产物的蛋白含量, 取等量蛋白在 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 电泳结束后将蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 经过封闭阻断后, 加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后用 TTBS 将二抗按 1:1 000 稀释, 在杂交袋中放到摇床上室温孵育 1 h。孵育抗体后的硝酸纤维素膜经过 2 次洗涤后, 加入显色剂显色, 并在凝胶成像系统中拍照。

2.8 统计学分析 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析, 方差齐性采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 ESH 对实验性肺转移动物肺组织中 ck19 的表达影响 与空白组相比, ESH 可显著降低动物肺组织中 ck19 表达量, 其中 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 ck19 的相对表达量为 55.85%, 而 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组的相对表达量为 42.28%, 呈现出明显的剂量依赖关系, 提示 ESH 可显著抑制肿瘤细胞在肺组织中形成转移灶的能力。见图 1。



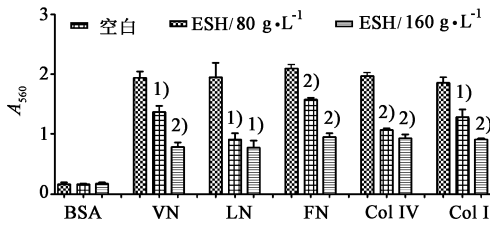
与 CTRL 组相比²⁾ $P < 0.01$

图 1 ESH 对人乳腺癌实验性肺转移动物肺组织中 ck19 表达的影响

Fig.1 Effects of ESH on expression of human ck19 in lung tissues of experimental lung metastatic foci

3.2 ESH 对 MDA-MB-231 细胞与细胞外基质蛋白黏附能力的影响 为了进一步了解 ESH 的体外抗转移作用, 本研究首先检测了 ESH 的体外抗黏附能力。MDA-MB-231 细胞与 ESH 孵育 4 h 后, 与细胞外基质蛋白的黏附能力显著下降 ($P < 0.01$), 并呈现一定剂量依赖关系。这一结果提示, ESH 可干扰

肿瘤细胞与细胞外基质之间的黏附作用,从而发挥抗转移作用。见图 2。

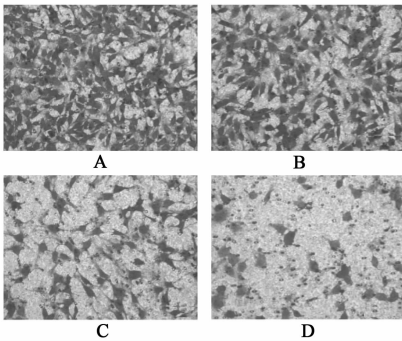


与空白组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$; BSA. 牛血清白蛋白; VN. 玻璃粘连蛋白; LN. 层粘连蛋白; FN. 纤维连接蛋白; Col IV. IV 型胶原蛋白; Col I. I 型胶原蛋白

图 2 ESH 对 MDA-MB-231 细胞与细胞外基质蛋白黏附能力的影响

Fig. 2 Effects of ESH on adhesion in MDA-MB-231 cells

3.3 ESH 对 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力的影响 ESH 可剂量依赖性的抑制乳腺癌细胞的体外迁移能力,其中 80,160 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组的迁移细胞数分别为 (106.4 ± 52.4) , (40.4 ± 7.6) 个,显著低于空白组,具有统计学差异($P < 0.01$)。见图 3。



A. 空白组; B ~ D. ESH 40, 80, 160 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (图 4 同)

图 3 ESH 对 MDA-MB-231 细胞体外迁移能力的影响

Fig. 3 Effects of ESH on migration of breast cancer cells

3.4 ESH 对 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力的影响 ESH 可显著抑制乳腺癌细胞的体外侵袭能力,空白组穿过重组基底膜的细胞数为 (490.0 ± 135.9) 个,而各 ESH 剂量组的侵袭细胞数分别为 (330.4 ± 88.9) , (156.6 ± 29.2) , (137.6 ± 47.8) 个,其中 80,160 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组的抑制作用呈现统计学差异($P < 0.01$)。见图 4。

3.5 ESH 对 MDA-MB-231 细胞 Runx2 活性的影响 Runx2 是一种含有高度保守结构域的转录因子,是肿瘤转移的关键调控蛋白。为了进一步探讨 ESH 抑制 MDA-MB-231 细胞转移作用的机制,本研究采用基于 ELISA 的 Runx2 转录因子分析法以及 Western blot 法检测了 ESH 对 Runx2 活性的影响。

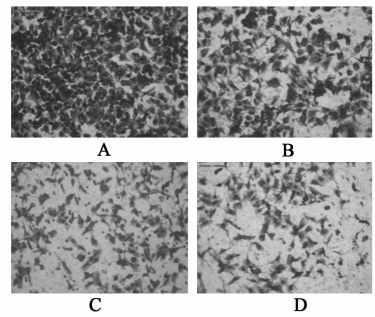
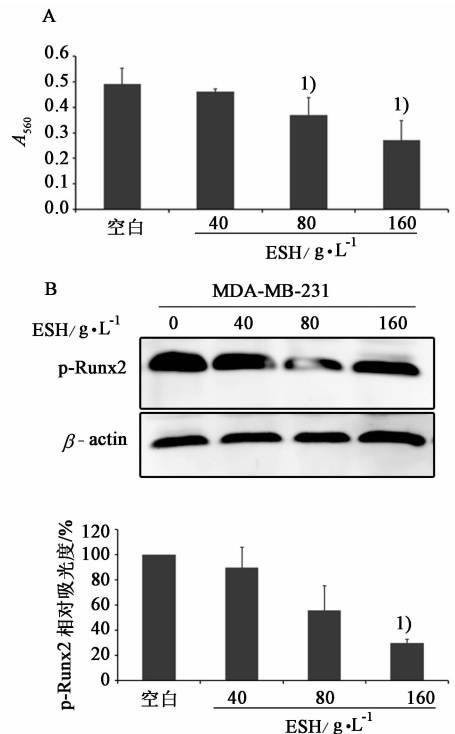


图 4 ESH 对 MDA-MB-231 细胞体外侵袭能力的影响

Fig. 4 Effects of ESH on invasion of breast cancer cells

见图 5。从图 5A 可以看出,ESH 可显著抑制 Runx2 与其底物寡聚核苷酸的结合,并具有统计学差异($P < 0.01$)。Western blot 的结果显示,ESH 可显著抑制磷酸化 Runx2 的表达(图 5B),提示 ESH 可能可以通过抑制 Runx2 的活化,从而发挥抗乳腺癌转移作用。



A. ESH 对 Runx2 活性的影响; B. ESH 对 p-Runx2 表达的影响; 与空白组相比¹⁾ $P < 0.01$

图 5 ESH 对 MDA-MB-231 细胞 Runx2 活性的影响

Fig. 5 Effects of ESH on Runx2 activity in MDA-MB-231 cell

4 讨论

三白草科植物为多年生草本,在我国分布的有裸蒴属的裸蒴 *Gymnotheca chinensis*、蓼菜属的鱼腥草 *Houttuynia cordata* 和三白草属的三白草 *S. chinensis* 等几种,具有清热解毒、利尿消肿等作用,

用于多种疾病的治疗。近年来,三白草的抗肿瘤活性受到人们的关注。临床上,三白草常常与白花蛇舌草、半枝莲、石上柏等配伍,用于肝胆湿热的肝癌,也可与佛耳草、蒲公英,地骨皮等配合应用,治疗痰热壅盛的肺癌。有学者将三白草用于肝癌以及肝癌合并腹水的治疗,取得一定的疗效。韩国一家制药公司科研人员评价了三白草各种提取物的细胞毒性,发现三白草的地上部分在体外对多种实体瘤细胞显示了一定的细胞毒作用^[5]。最近,Hodges等发现,三白草中的成分 manassation B 和 4-O-demthylmanassantin B 是具有分子靶向作用的抗肿瘤物质,二者均是非常强的 hypoxia-activated HIF-1 抑制剂^[3]。而 manassantin A 具有肿瘤选择的细胞的毒性^[5]。鉴于三白草具有良好的临床疗效和广泛的民间使用基础,本文以三白草的乙醇提取物为研究对象,利用体内、外的抗转移研究方法,观察了三白草提取物的抗转移作用,并试图阐明其作用机制,为三白草的深度开发和利用提供资料。

研究发现,三白草提取物可显著抑制体内实验性肺转移小鼠肺组织中转移灶的形成,并可显著抑制人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的体外黏附、迁移以及侵袭能力。为了进一步阐明三白草提取物的抗转移作用机制,本研究采用基于 ELISA 的 Runx2 转录因子分析法以及 Western blot 法检测了三白草提取物对 Runx2 活性的影响。结果显示,三白草提取物可显著抑制 Runx2 的磷酸化,从而抑制其转录活性。

Runx2 又称核心结合因子 a1 (core-binding factor a1, CBFA1),是一种属于 Runt 结构域基因家族的转录因子。最初,Runx2 被发现在骨骼发育和骨形成中起了至关重要的作用,但近年来大量研究证据表明,Runx2 基因还可异位表达与乳腺细胞和乳腺癌细胞,参与乳腺的发育和乳腺肿瘤的发生、发展过程,在肿瘤细胞的浸润、转移以及在远处器官的克隆生长等过程中均起了关键性的调控作用^[6-7]。在许多转移性肿瘤细胞中,均可检测到 Runx2 的异常活化。Runx2 可能是通过对多种基质蛋白、细胞外基质信号因子以及基质蛋白水解酶等的直接活化来参与肿瘤转移过程^[8-9]。有证据表明 Runx2 可以直接参与 MMP-9 和 MMP-13 的活化^[9]。采用 SiRNA 的方法敲除 Runx2 基因后,乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 的 MMP-9 表达明显降低^[9];而在低转移性乳腺癌细胞系 MCF-7 中引入 Runx2 基因后,可以上调多种转移相关因子的功能,如金属基质蛋白酶-2 (MMP-2), MMP-9, MMP-13, 血管内皮生长因子

(VEGF)等。最近,Pratap 等的研究发现,Runx2 还可以直接活化乳腺癌细胞中整合素家族的成分,促进细胞间的黏附^[10]。

综上所述,三白草提取物具有明显的抗乳腺癌转移作用。抑制肿瘤细胞内 Runx2 的磷酸化,从而抑制下游相关靶基因的转录可能是三白草提取物的抗转移机制之一。

[参考文献]

- [1] 彭冰,何春年,许利嘉,等. 三白草的化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(12):1950-1951.
- [2] Seo C S, Zheng M S, Woo M H, et al. Lignans from the roots of *Saururus chinensis* [J]. J Nat Prod, 2008, 71(10):1771-1774.
- [3] Hodges T W, Hossain C F, Kim Y P, et al. Molecular-targeted antitumor agents: the *Saururus cernuus* dineolignans manassantin B and 4-O-demethylmanassantin B are potent inhibitors of hypoxia-activated HIF-1 [J]. J Nat Prod, 2004, 67(5):767-771.
- [4] Fu J, Wang W, Liu Y H, et al. *In vitro* anti-angiogenic properties of LGD1069, a selective retinoid X-receptor agonist through down-regulating Runx2 expression on human endothelial cells [J]. BMC Cancer, 2011, 11: 227-237.
- [5] 郑肖莹. 三白草的细胞毒性成分研究[J]. 中成药, 1999, 21(4):214-216.
- [6] Ferrari N, McDonald L, Morris J S, et al. RUNX2 in mammary gland development and breast cancer [J]. J Cell Physiol, 2013, 228(6):1137-1142.
- [7] Weigelt B, Peterse J L, van t Veer L J. Breast cancer metastasis: markers and models [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(8):591-602.
- [8] Selvamurugan N, Kwok S, Partridge N C. Smad3 interacts with JunB and Cbfa1/Runx2 for transforming growth factor-beta1-stimulated collagenase-3 expression in human breast cancer cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(26):27764-27773.
- [9] Pratap J, Javed A, Languino L R. The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(19):8581-8591.
- [10] Pratap J, Imbalzano K M, Underwood J M, et al. Ectopic runx2 expression in mammary epithelial cells disrupts formation of normal acini structure; implications for breast cancer progression [J]. Cancer Res, 2009, 69(17):6807-6814.

[责任编辑 邹晓翠]