

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2018.05.005

· 基础研究 ·

葡萄糖转运蛋白-1通过Wnt/ β -catenin通路促进骨肉瘤MG63细胞迁移

郝俊龙, 王亚鹏, 杨凯, 齐进, 王旭, 汪静(兰州大学第二医院 骨肿瘤科, 甘肃 兰州 730000)

[摘要] **目的:**探讨葡萄糖转运蛋白-1(glucose transporter-1, Glut-1)通过Wnt/ β -catenin通路促进骨肉瘤细胞MG63的迁移及其机制。**方法:**构建针对*Glut-1*基因的RNA干扰重组腺病毒(Ad-Glut-siRNA)及含对照序列的重组腺病毒(Ad-GFP),感染MG63细胞沉默*Glut-1*基因表达;通过Transwell小室法检测Blank组、Ad-AFP组、Ad-Glut-siRNA组、GSK-3抑制剂AZD2858组细胞的迁移能力;应用免疫荧光实验检测各组细胞E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)的表达变化以及 β -连环蛋白(β -catenin)的进核情况,通过Western blotting实验检测各组细胞的MMP-2、MMP-9表达变化以及Blank组、Ad-AFP组、Ad-Glut-siRNA组细胞FZD7、 β -catenin、Dsh蛋白表达变化。**结果:**沉默*Glut-1*基因后, MG63细胞迁移能力明显下降($P<0.05$);再给予AZD2858处理后,细胞的迁移能力恢复($P<0.05$)。与Blank组和Ad-GFP组细胞相比, Ad-Glut-siRNA组MG63细胞E-cadherin表达显著升高($P<0.05$), vimentin、MMP-2、MMP-9以及FZD7、 β -catenin、Dsh蛋白表达显著降低(均 $P<0.05$);与Ad-Glut-siRNA组相比, AZD2858组细胞E-cadherin表达显著降低($P<0.05$), vimentin、MMP-2和MMP-9表达显著升高($P<0.05$)。**结论:** *Glut-1*基因高表达与骨肉瘤MG63细胞侵袭转移具有密切联系,其可能机制在于*Glut-1*高表达后激活Wnt/ β -catenin通路使EMT相关蛋白E-cadherin表达降低、vimentin以及MMP-2、MMP-9含量上升,从而促进MG63细胞的转移。

[关键词] 葡萄糖转运蛋白-1;骨肉瘤;MG63细胞;Wnt/ β -Catenin通路;迁移

[中图分类号] R738.1; R730.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)05-0469-06

Glucose transporter-1 promotes migration of osteosarcoma MG63 cells via the Wnt/ β -catenin pathway

HAO Junlong, WANG Yapeng, YANG Kai, QI Jin, WANG Xun, WANG Jing (Department of Bone Oncology, The Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of glucose transport protein-1(Glut-1) promoting the migration of osteosarcoma MG63 cells through Wnt/ β -catenin pathway. **Methods:** RNA interference recombinant adenovirus targeting *Glut-1* gene (Ad-Glut-siRNA) and control recombinant adenovirus (Ad-GFP) were constructed and transfected into MG63 cells to silence *Glut-1* gene expression. The cell migration ability of Blank group, Ad-AFP group, Ad-Glut-siRNA group and AZD2858 (inhibitor of GSK-3) group were detected by Transwell chamber migration assay. Immunofluorescence assay was used to detect the expression of E-cadherin and vimentin in each group and the nuclear translocation of β -catenin. The expression of MMP-2 and MMP-9 in each group and FZD7, β -catenin, Dsh protein in Blank group, Ad-AFP group, Ad-Glut-siRNA group were detected by Western blotting assay. **Results:** The migration ability of MG63 cells was significantly decreased ($P<0.05$) after *Glut-1* gene silencing, which was restored after AZD2858 treatment ($P<0.05$). Compared with Blank group and Ad-GFP group, the E-cadherin level in MG63 cells in Ad-Glut-siRNA group was significantly increased ($P<0.05$), while the expressions of vimentin, MMP-2, MMP-9, FZD7, β -catenin and Dsh protein were significantly reduced (all $P<0.05$). Compared with Ad-Glut-siRNA group, E-cadherin expression of AZD2858 group was significantly reduced, while the expressions of vimentin, MMP-2, MMP-9 were significantly up-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** The high expression of *Glut-1* gene is closely related to the invasion and metastasis of MG63 cells. The possible mechanism is that the high expression of *Glut-1* leads to the activation of Wnt/ β -catenin pathway, which leads to the decrease of EMT-related protein E-cadherin, and the increase of vimentin and MMP-2, MMP-9, and further promotes the migration of MG63 cells.

[Key words] glucose transporter-1(Glut-1); osteosarcoma; MG63 cell; Wnt/ β -Catenin pathway; migration

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(5): 469-474. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.005]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81371230)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81371230)

[作者简介] 郝俊龙(1974-),男,硕士,副主任医师,主要从事骨肿瘤基础与临床的研究

[通信作者] 郝俊龙(HAO Junlong, corresponding author), E-mail: zhouxiaolihean@163.com

骨肉瘤是源于原始间充质细胞的较常见的高度恶性的成骨性肿瘤,骨肉瘤恶性程度高,有较高的转移率和复发率^[1]。在综合治疗方法问世以前,90%以上的患者最终死于肺转移,因此转移是骨肉瘤致死的主要原因^[2-3]。肿瘤发生转移的机制很复杂,不同的肿瘤由于发病机制与所处环境不同,其发病机制不一。葡萄糖转运蛋白-1(glucose transporter-1, Glut-1)是葡萄糖转运载体,在骨肉瘤中高表达^[4]。由于 Glut-1 高表达标志着肿瘤葡萄糖代谢方式的转变,这种转变从侧面给予肿瘤缺乏营养和缺氧的刺激,从而将促使肿瘤转移^[5]。因此,Glut-1 高表达与肿瘤转移密切相关。有研究^[6]发现,Wnt/ β -catenin 在许多转移性肿瘤中异常激活,因此本研究将以 Wnt/ β -catenin 通路为基础,探讨 Glut-1 对骨肉瘤 MG63 细胞迁移能力的影响机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与主要试剂

骨肉瘤细胞系 HEK293 和 MG63 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。空病毒载体 Ad-GFP 作为阴性对照,只含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因序列和 Ad-Glut-siRNA(含靶向抑制 Glut 基因的 Glut-siRNA 和 GFP 基因)重组腺病毒由上海生工构建完成,DMEM 高糖培养液购自美国 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自北京四季青生物科技有限公司,胰蛋白酶、RIPA 裂解液、超敏型 ECL 检测试剂、SDS-PAGE 的凝胶配制试剂盒、上样缓冲液、电泳液以及蛋白质印迹转膜液均购自上海碧云天生物技术有限公司,E-cadherin、vimentin、MMP-2、MMP-9、 β -catenin、FZD7 和 Dsh 兔单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,DyLight594 标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 GeneTex 公司,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购买自德国 CST 公司,GSK-3 抑制剂 AZD2858 购自 MedChemExpress 公司。

1.2 细胞培养

将 HEK293 和 MG63 细胞均用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液,置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞贴壁生长至 80%~90% 汇合度时传代。

1.3 实验分组及慢病毒感染

在对数增殖期的 HEK293 细胞中加入 1 μ l 的 Ad-RFP 或 1 μ l 的 Ad-Glut-siRNA 病毒原液进行病毒反复扩增,最终获得效价为 5×10^{10} pfu/ μ l 的 Ad-Glut-siRNA 和 Ad-RFP 重组腺病毒。MG63 细胞传代培养,待贴壁细胞增殖至 50%~60% 汇合度时,分别加入相应最佳感染浓度的腺病毒(MOI 为 25),于 24 h 后观察记录各组细胞荧光表达情况。实验分组如下:(1)Blank

组,未用任何病毒处理的 MG63 细胞;(2)Ad-RFP 组,感染空载体腺病毒 Ad-RFP 的 MG63 细胞;(3)Ad-Glut-siRNA 组,感染重组腺病毒 Ad-Glut-siRNA 的 MG63 细胞;(4)AZD2858 组,在 Ad-Glut-siRNA 组细胞中加入 AZD2858 处理 24 h 的 MG63 细胞。

1.4 Transwell 小室法检测 MG63 细胞的迁移能力

分别取 Blank 组、Ad-RFP 组、Ad-Glut-siRNA 组和 AZD2858 组细胞用 0.25% 胰酶消化,并用无血清培养基配制成 1.5×10^5 个/ml 的单细胞悬液,以每孔 400 μ l 加入到 Transwell 小室上室中,并在下室中加入 600 μ l 含有 20% 血清的培养基,每组设 6 个平行孔,放入 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,取出培养板,将 Transwell 小室取出,放入 -20°C 无水甲醇固定 5 min,棉签轻轻拭去上室中未迁移细胞后,0.25% 结晶紫染色 5 min,PBS 洗去未染色结晶紫,显微镜下观察拍照,并随机选取 6 个视野计数细胞,统计迁移细胞数。

1.5 免疫荧光法检测 MG63 细胞中 E-cadherin、vimentin 和 β -catenin 蛋白变化

取各组细胞,胰酶消化并用含有 10% FBS 的高糖型 DMEM 培养基配制成 1×10^4 个/ml 的单细胞悬液,以每孔 1 ml 种植于 6 孔板中,置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,PBS 洗涤,加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,PBS 漂洗,加入 0.25% Triton 透膜 15 min,加入用 0.25% Triton 配制的 5% BSA 封闭液封闭 30 min,吸去封闭液,加入用封闭液配制的一抗,其中 E-cadherin(1:500)、vimentin(1:500)和 β -catenin(1:200),4°C 孵育过夜;PBS 洗涤后,加入以 DyLight594 标记的二抗(1:2000),室温孵育 1 h,PBS 洗涤,荧光显微镜下拍照,用 Image Pro Plus 软件对荧光度进行分析。

1.6 Western blotting 检测 MG63 细胞中 MMP-2、MMP-9、FZD7、Dsh 和 β -catenin 蛋白变化

取各组细胞,用 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞,后收集于离心管中继续裂解 30 min,13 000 \times g 离心 10 min,收集上清,测定蛋白浓度,加入 4 \times 上样缓冲液,煮沸 5 min,充分变性,-20°C 保存备用。制胶:10% 分离胶+5% 浓缩胶;按蛋白浓度确定上样量;然后经过电泳、转膜、封闭。一抗孵育过夜(其中 MMP-2 和 MMP-9 以 1:1 000 稀释,FZD7、Dsh 以及 β -catenin 以 1:800 稀释),PBS 洗涤,二抗(1:2 000)室温孵育 1.5 h,PBS 洗涤,ECL 发光液显色、显影、拍照,用 Image Pro Plus 软件对灰度值进行分析。

1.7 统计学处理

使用 SPSS21.0 统计学软件对数据进行处理,计量计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 P

<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建重组腺病毒感染的MG63细胞株

通过图1可以看到Blank组未见绿色荧光,Ad-GFP组与Ad-Glut-siRNA组细胞内可见较强烈的绿色荧光。结果表明,成功构建重组腺病毒感染的骨肉瘤MG63细胞株可用于后续实验。

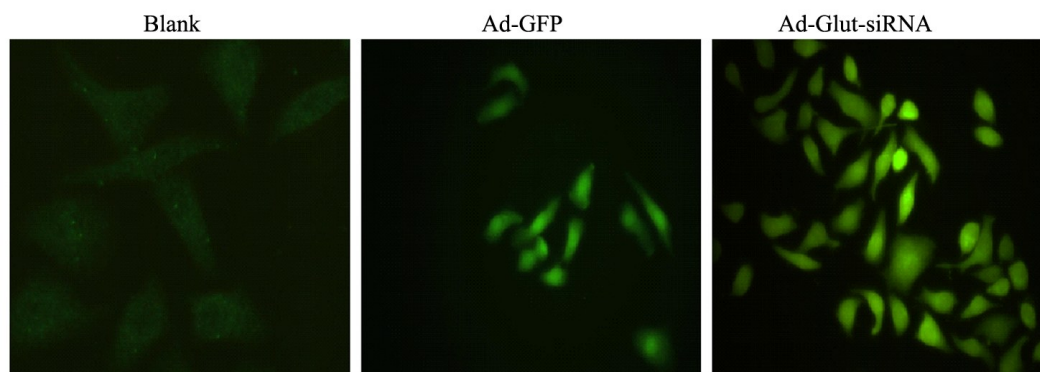


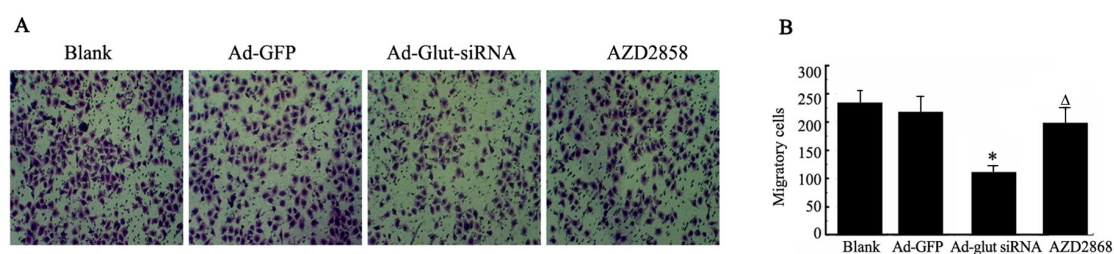
图1 成功构建重组腺病毒感染的MG63细胞(免疫荧光染色,×400)

Fig. 1 Recombinant adenovirus was successfully constructed and transfected into MG63 cells (immunofluorescence staining, ×400)

2.2 Glut-1对MG63细胞迁移能力的影响

将Ad-AFP和Ad-Glut-siRNA通过腺病毒感染MG63细胞后,Transwell小室实验结果(图2)显示,Ad-Glut-siRNA组MG63细胞穿膜数显著低于Blank

组和Ad-GFP组细胞($t=0.918, 1.375$;均 $P<0.05$);AZD2858组细胞穿膜数显著高于Ad-Glut-siRNA组细胞($t=1.106, P<0.05$)。结果表明,Glut-1促进MG63细胞迁移。



* $P<0.05$ vs Blank or Ad-GFP group; $^{\Delta}P<0.05$ vs Ad-Glut-siRNA group

A: Crystal violet staining(×200); B: Number of migrated cells

图2 各组细胞迁移数的变化

Fig. 2 Changes of migrated cells in each group

2.3 Glut-1对MG63细胞E-cadherin、vimentin分泌的影响

免疫荧光染色结果(图3)显示:(1)Ad-Glut-siRNA组MG63细胞E-cadherin显著高于Blank组和Ad-GFP组细胞($t=1.025, 0.667$,均 $P<0.05$;图3A、B),而AZD2858组细胞表达显著低于Ad-Glut-siRNA组细胞($t=0.861, P<0.05$);(2)Ad-Glut-siRNA组MG63细胞vimentin表达显著低于Blank组和Ad-GFP组细胞($t=1.121, 0.736$;均 $P<0.05$;图3C、D),而AZD2858组细胞的表达显著高于Ad-Glut-siRNA组细胞($t=0.932, P<0.05$)。结果表明,Glut-1可降低MG63细胞中E-cadherin的表达,增加vimentin的表达。

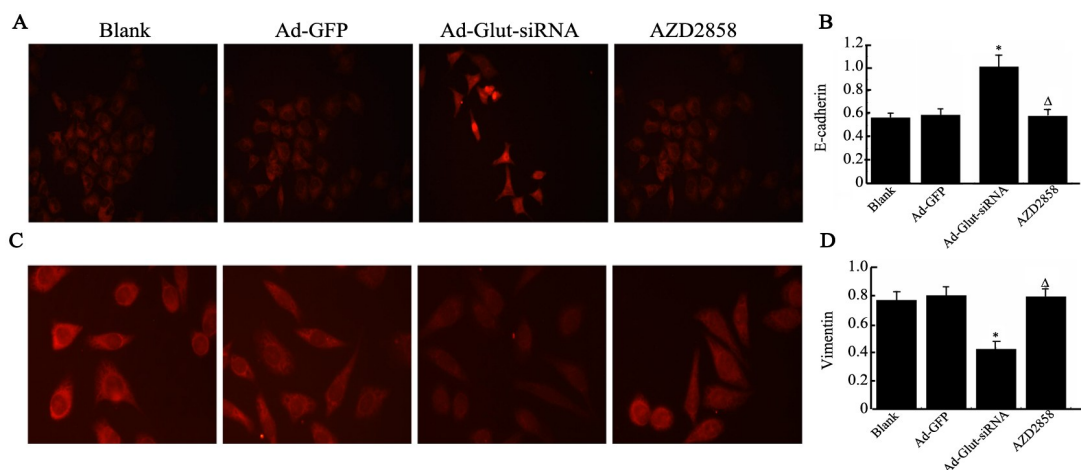
2.4 Glut-1对MG63细胞MMP-2、MMP-9的影响

Western blotting实验结果(图4)显示,Ad-Glut-siRNA组MG63细胞MMP-2、MMP-9表达水平显著高于Blank组和Ad-GFP组细胞(MMP2: $t=2.357, 2.545$;MMP-9: $t=1.981, 2.021$;均 $P<0.05$);AZD2858组细胞MMP-2、MMP-9表达水平显著低于Ad-Glut-siRNA组($t=1.557, 1.945$;均 $P<0.05$)。结果表明,Glut-1可上调MG63细胞中MMP-2、MMP-9的表达。

2.5 Glut-1对 β -catenin进核的影响

免疫荧光染色结果(图5)显示,Ad-Glut-siRNA组MG63细胞 β -catenin被激活后进入细胞核的量显著低于Blank组和Ad-GFP组细胞($t=0.981, 0.734$;均 $P<0.05$);而AZD2858组细胞 β -catenin进入细胞核的量显著高于Ad-Glut-siRNA组($t=0.665, P<0.05$)。结

果表明, Glut-1 可促进 MG63 细胞中 β -catenin 进核。

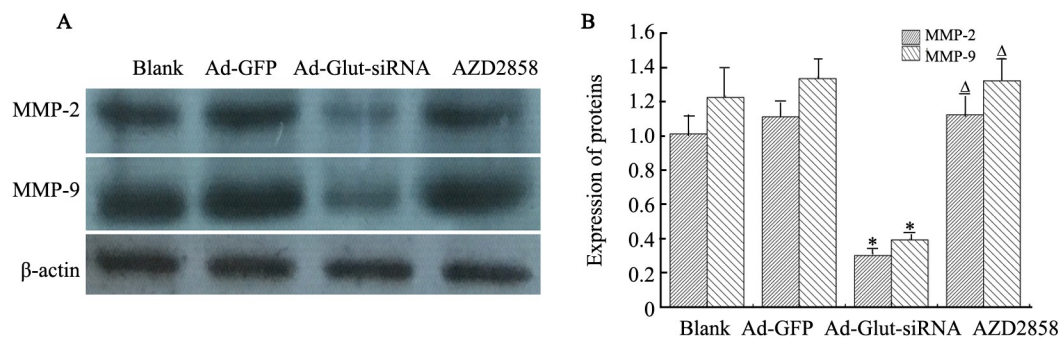


* $P < 0.05$ vs Blank or Ad-GFP group; ^Δ $P < 0.05$ vs Ad-Glut-siRNA group

A: Immunofluorescence staining of E-cadherin ($\times 400$); B: The fluorescence density of E-cadherin protein; C: Immunofluorescence staining of vimentin ($\times 400$); D: The fluorescence density of vimentin protein in each group

图3 各组细胞 E-cadherin (A, B) 和 vimentin (C, D) 的变化

Fig. 3 Changes of E-cadherin (A, B) and vimentin (C, D) in each group

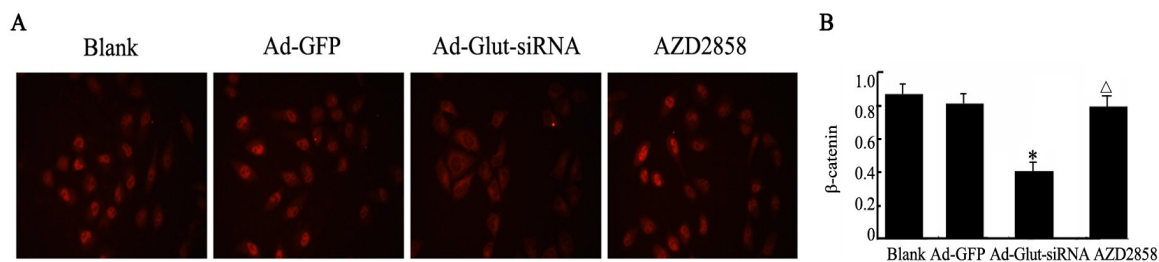


* $P < 0.05$ vs Blank or Ad-GFP group; ^Δ $P < 0.05$ vs Ad-Glut-siRNA group

A: Western blotting band of MMP-2 and MMP-9; B: The relative expression level of MMP-2 and MMP-9

图4 各组细胞 MMP-2 和 MMP-9 表达变化

Fig. 4 Changes of MMP-2 and MMP-9 expression in each group



* $P < 0.05$ vs Blank or Ad-GFP group; ^Δ $P < 0.05$ vs Ad-Glut-siRNA group

A: Immunofluorescence staining of β -catenin ($\times 400$); B: The optical density of β -catenin protein

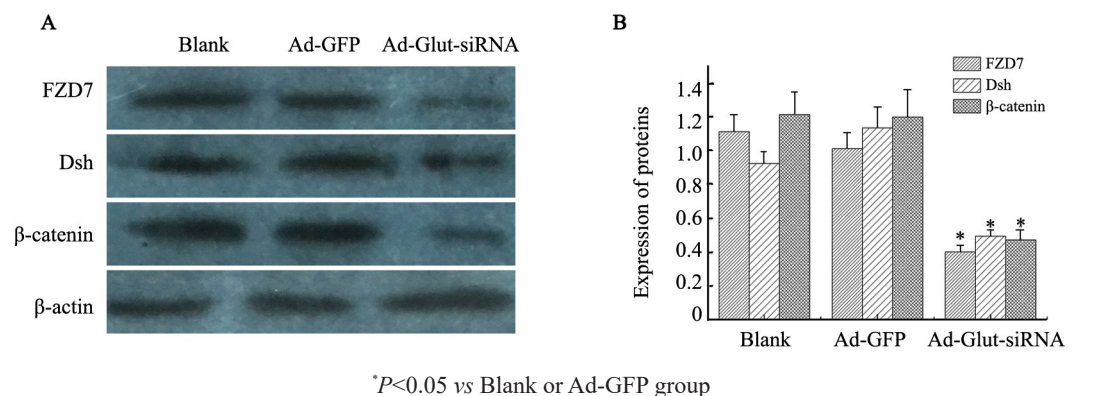
图5 各组细胞内 β -catenin 进核情况

Fig. 5 The contents of β -catenin entering the nucleus in each group

2.6 Glut-1 对 FZD7、 β -catenin、Dsh 蛋白的影响

Western blotting 检测结果 (图6) 显示, Ad-Glut-siRNA 组 MG63 细胞 β -catenin、FZD7 和 Dsh 蛋白表

达水平均显著低于 Blank 组和 Ad-GFP 组细胞 ($P < 0.05$)。结果表明, Glut-1 可上调 MG63 细胞中 FZD7、 β -catenin、Dsh 蛋白表达。



A: Western blotting band of FZD7, Dsh and β -catenin; B: The relative expression level of FZD7, Dsh and β -catenin

图6 各组细胞内 β -catenin、FZD7和Dsh蛋白的表达变化

Fig. 6 The changes of β -catenin, FZD7 and Dsh protein expression in each group

3 讨论

侵袭迁移是恶性肿瘤的重要标志,其特性的获得将显著提高肿瘤的致死率。目前,对肿瘤发生转移的机制探索依旧处在起步阶段。大量研究^[7-8]表明,肿瘤的转移不是一件孤立的事件,是在内外因素的影响下肿瘤细胞内部发生信号网络的改变,该改变以积累-突变的模式进行,当这种改变达到一定的积累量后,肿瘤细胞便获得了由基因-信号网络改变而形成的转移特性。骨肉瘤是一类恶性程度高、早期极易发生转移的肿瘤,其血行转移发生率高,极易出现复发和转移,其中最常见的是肺转移,其临床疗效不佳,愈后不良^[9]。目前对骨肉瘤发生转移的机制研究较少,本研究选取人骨肉瘤细胞系MG63作为研究对象,探索骨肉瘤发生转移的机制。在骨肉瘤组织及相关细胞中Glut-1表达水平显著高于正常组织^[9],Glut-1的升高是肿瘤代谢途径改变的重要体现,其升高意味着肿瘤细胞对葡萄糖的需求增加^[10],提示肿瘤内部由于缺氧导致肿瘤无氧呼吸增加。低效的无氧呼吸在糖摄入量一定的情况下,无法满足快速增殖的肿瘤细胞的需要,因此导致肿瘤细胞通过高表达Glut-1蛋白,增加葡萄糖摄入量以满足对能量的需求^[11]。随着Glut-1的增加,将给肿瘤细胞一个类似于缺氧的信号,刺激肿瘤组织分泌血管生成相关基因的表达,导致肿瘤内部血管大量生成。目前研究^[12]发现,肿瘤失控的血管生成同时伴随着肿瘤细胞的转移,由于肿瘤组织内部缺氧、营养以及严苛的微环境,导致肿瘤细胞发生大量的EMT并向周围组织发生侵袭,以逃避限制自身生长的环境,一旦进入血液获得免疫抗性,将随血液循环至其他部位而发生转移。

在本研究中,腺病毒载体 siRNA 技术沉默 MG63

细胞中 *Glut-1* 基因后,通过 Transwell 小室实验发现, Ad-Glut-siRNA 组 MG63 细胞迁移数目显著低于 Blank 组和 Ad-GFP 组细胞(均 $P < 0.05$),提示抑制 MG63 细胞 *Glut-1* 表达后,细胞的迁移能力明显被抑制。为探索 *Glut-1* 沉默后是否将在分子水平对转移相关蛋白产生影响,本研究免疫荧光实验发现, Ad-Glut-siRNA 组 MG63 细胞 E-cadherin 表达水平显著高于 Blank 组和 Ad-GFP 组细胞(均 $P < 0.05$),而 Ad-Glut-siRNA 组 MG63 细胞 vimentin 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$); Western blotting 检测结果发现, Ad-Glut-siRNA 组 MG63 细胞 MMP-2、MMP-9 表达水平显著低于 Blank 组和 Ad-GFP 组细胞(均 $P < 0.05$)。E-cadherin 和 vimentin 介导细胞间连接,前者是介导细胞间相互聚集的黏附分子,在有 Ca^{2+} 存在时,可以抵抗蛋白酶的水解作用,是上皮细胞的标志物;后者是间质细胞标志物,其在维持间质细胞特性中发挥重要作用。两者皆在 EMT 过程中发挥重要作用,参与胚胎的形成与发育及肿瘤的侵袭与转移过程^[13-14]。EMT 现象被证实存在多种恶性肿瘤中存在,其相关标志物的表达与肿瘤的侵袭与转移显著相关。其中, E-cadherin 在转移性恶性肿瘤中表达水平降低, vimentin 在转移性恶性肿瘤中表达水平增高^[15]。MMP-2 和 MMP-9 作为胞外基质降解酶,直接参与肿瘤细胞的迁移,与肿瘤的侵袭转移皆呈正相关^[16-17]。综上可知,在 MG63 细胞中 *Glut-1* 表达被抑制后,可明显导致 MG63 细胞迁移侵袭能力的降低。

尽管上述已证明 *Glut-1* 的表达可直接影响 MG63 细胞的转移,但其具体通过怎样的通路影响 MG63 细胞的转移仍不清楚。本研究进一步进行实验,将 GSK-3 β 抑制剂(AZD2858)作用于 Ad-Glut-siRNA 组 MG63 细胞后,通过 Transwell 迁移实验、免疫荧光染色和 Western blotting 实验皆证实 MG63 细

胞重新获得较高的迁移能力。GSK-3 β 蛋白复合物与 β -catenin结合,可磷酸化 β -catenin,导致 β -catenin降解,因此GSK-3 β 具有抑制Wnt/ β -catenin通路的作用,因此推测Glut-1高表达可能是通过Wnt/ β -catenin通路赋予MG63细胞较高的转移能力的。为验证此推测,本课题组对各组细胞中Wnt/ β -catenin通路相关蛋白进行检测。免疫荧光结果显示,Ad-Glut-siRNA组MG63细胞 β -catenin被激活后进入细胞核的量显著低于Blank组和Ad-GFP组细胞(均 $P<0.05$);AZD2858组细胞 β -catenin被激活进入细胞核的量显著高于Ad-Glut-siRNA组($P<0.05$),结果提示沉默*Glut-1*基因可减少MG63细胞中被激活后进入细胞核的 β -catenin量。Western blotting实验结果显示,Ad-Glut-siRNA组MG63细胞 β -catenin、FZD和Dsh蛋白表达量均显著低于Blank组和Ad-GFP组(均 $P<0.05$)。FZD作为Wnt/ β -catenin通路的受体,其蛋白的减少直接影响该通路的激活阈,而FZD被配体结合活化后,进一步活化细胞内蛋白Dsh,从而抑制GSK-3 β / β -catenin复合物的形成,从而使 β -catenin积累激活,进入细胞核,启动相关基因表达^[18]。上述实验结果皆提示,*Glut-1*基因沉默使MG63细胞中Wnt/ β -catenin通路由活化状态转变为关闭状态,相关蛋白含量减少。因此,在MG63细胞中Glut-1高表达可导致Wnt/ β -catenin通路的激活。

综上所述,骨肉瘤MG63细胞中*Glut-1*基因的高表达与癌细胞的侵袭转移密切相关。其可能机制在于Glut-1高表达导致Wnt/ β -catenin通路的激活,该通路的激活促使EMT相关蛋白E-cadherin、vimentin以及MMP-2、MMP-9水平上调,从而促进MG63细胞的转移。

[参考文献]

- [1] HE X, GAO Z, XU H, et al. A meta-analysis of randomized control trials of surgical methods with osteosarcoma outcomes[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, 12(1): 5. DOI: 10.1186/s13018-016-0500-0.
- [2] GELLER D S, GORLICK R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies[J/OL]. *Clin Adv hematol Oncol*, 2010, 8(10): 705-708[2017-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21317869>.
- [3] ISAKOFF M S, BIELACK S S, MELTZER P, et al. Osteosarcoma: current treatment and a collaborative pathway to success[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4895.
- [4] FAN J, MEI J, ZHANG M Z, et al. Clinicopathological significance of glucose transporter protein-1 overexpression in human osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2): 2439-2445. DOI: 10.3892/ol.2017.6437.
- [5] MAO W B, SHAO Z W, PEI H, et al. Relationship between the expression of HIF-1 α , iNOS and GLUT-1 and angiogenesis in osteosarcoma[J]. *China Oncol*, 2007. DOI: 10.1007/s11999-014-3910-5.
- [6] XI Y, CHEN Y. Wnt signaling pathway: implications for therapy in lung cancer and bone metastasis[J]. *Cancer Lett*, 2014, 353(1): 8-16. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.07.010.
- [7] VINCENT C T, FUXE J. EMT, inflammation and metastasis[J/OL]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 47: 168-169[2017-12-20]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/1044579X>. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.09.003.
- [8] WU Y, ZHOU B P. New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(7): 643-650. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008.00443.x.
- [9] PETTY J C, LANA S E, THAMM D H, et al. GLUT-1 expression in canine osteosarcoma[J]. *Vet Comp Oncol*, 2008, 6 (2): 133-140. DOI: 10.1111/j.1476-5829.2007.00155.x.
- [10] SWMAAN A, MUNKARAH A R, ARABI H, et al. Expression of GLUT-1 in epithelial ovarian carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, angiogenesis, survival and ability to predict optimal cytoreduction[J]. *Gynecol Oncol*, 2011, 121(1): 181-186. DOI: 10.1016/j.ygyno.2010.11.019.
- [11] 茅文斌, 邵增务, 裴洪. HIF-1 α 、GLUT-1在骨肉瘤中的表达及其与血管生成的关系研究[J]. *实用癌症杂志*, 2006, 21(4): 348-350. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2006.04.004.
- [12] 马兆生, 周士福, 金琳芳, 等. HIF-1 α 和Glut-1在乳腺癌中的表达及其与血管生成的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2008, 35(8): 569-571. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.305.
- [13] YILMAZ M, CHRISTOFORI G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(2): 15-33. DOI: 10.1007/s10555-008-9169-0.
- [14] JIANG J, TANG Y L, LIANG X H. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(8): 714-723. DOI: 10.1007/s10555-008-9169-0.
- [15] ZHOU J, TAO D, XU Q, et al. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma[J/OL]. *Inter J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 3150-3154[2017-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440141/>.
- [16] WEBB A H, GAO B T, GOLDSMITH Z K, et al. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in vitro models of retinoblastoma[J/OL]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 434 [2017-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5477686/>. DOI: 10.1186/s12885-017-3418-y.
- [17] SUN X F, SHAO Y B, LIU M G, et al. High-concentration glucose enhances invasion in invasive ductal breast carcinoma by promoting Glut1/MMP2/MMP9 axis expression[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13 (5): 2989-2995. DOI: 10.3892/ol.2017.5843.
- [18] ANASTAS J N, MOON R T. WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(1): 11-26. DOI: 10.1038/nrc3419.

[投稿日期] 2017-12-21

[修回日期] 2018-03-08

[本文编辑] 党瑞山