

重组表达 hTFF2 促进结肠癌细胞迁移和失巢增殖作用

蒋伟国^{1,2)}, 罗方梅³⁾, 王皓颖¹⁾, 谢薇⁴⁾, 秦钰⁴⁾, 黄尤光¹⁾

(1) 昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤研究所, 云南昆明 650118; 2) 云南省农垦总局第一职工医院普外科, 云南景洪 660101; 3) 云南省曲靖市中医院, 云南曲靖 655000; 4) 昆明医科大学海源学院, 云南昆明 651700)

[摘要] **目的** 通过构建大肠杆菌表达系统获得重组人三叶因子 2 (hTFF2), 并研究其对结肠癌细胞 SW480 的迁移活性和失巢增殖活性作用. **方法** 通过 RT-PCR 获得 hTFF2 的 cDNA, 构建重组载体 pET32a-hTFF2, 转化大肠杆菌 BL21-32a 中诱导表达 TrxA-hTFF2 融合蛋白. 产物经镍-亲和层析分离、透析纯化和 Western-blot 鉴定后, 用 48 孔趋化小室和琼脂软胶法检测重组 hTFF2 的细胞迁移活性和失巢增殖作用. **结果** 通过原核表达系统, 获得高纯度的表达量达到 220 mg/L 的 TrxA-hTFF2 重组融合蛋白, 重组 hTFF2 可促进结肠癌细胞 SW480 的迁移活性和在琼脂软胶中生长形成克隆. **结论** 大肠杆菌可表达高产量和纯度的重组 hTFF2, 其细胞活性提示结肠癌中 TFF2 的表达可能促进结肠癌细胞浸润和转移.

[关键词] 三叶因子 2; 结肠癌; 细胞迁移; 失巢增殖

[中图分类号] R739.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2013) 08-0031-05

Recombinant Expression of hTFF2 and Its Roles in Migration and Anchorage-independent Growth of Colonic Cancer Cells

JIANG Wei-guo^{1,2)}, LUO Fang-mei³⁾, WANG Hao-ying¹⁾, XIE Wei⁴⁾, QIN Yu⁴⁾, HUANG You-guang¹⁾

(1) The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Tumor Institute of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650118; 2) Dept. of General Surgery, the First Staffs Hospital of Land Reclamation Bureau of Yunnan Province, Jinghong Yunnan 650101; 3) Chinese Medicine Hospital of Qujing, Qujing Yunnan 655000; 4) Haiyuan School of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 651700, China)

[Abstract] **Objective** To over-express human trefoil factor 2 (hTFF2) by Escherichia coli system and analyze its activities in promoting migration and anchorage-independent growth in SW480 colonic cancer cells. **Methods** hTFF2 gene encoding mature peptide was obtained by RT-PCR, and the recombinant expression vector pET32a-hTFF2 was constructed. Then pET32a-hTFF2 was transformed into E. coli BL21-32a and TrxA-hTFF2 fusion protein was induced to over-express. The expressed product was isolated by Ni-NTA affinity chromatography, purified by dialysis and identified by Western blotting. The activities of the recombinant hTFF2 in promoting SW480 cells migration and anchorage-independent growth were analyzed by MicroChemotaxis Chamber migration assay and Soft-agar assay, respectively. **Results** The TrxA-hTFF2 fusion protein was expressed to 220 mg/L at high purity. In vitro model demonstrated that recombinant hTFF2 obviously enhanced SW480 cell migration activity and anchorage-independent growth. **Conclusion** The recombinant hTFF2 can be expressed in E. coli with high production, purity and biological activities. And its roles in cell migration and anchorage-independent growth suggest that up-regulation of TFF2 in colonic cancer might be involved in cancer invasion and metastases.

[Key words] Trefoil factor 2; Colonic cancer; Cell migration; Anchorage-independent growth

[基金项目] 云南省科技计划项目 (2011FZ108)

[作者简介] 蒋伟国 (1968~), 男, 云南景洪市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事普外科临床与研究工作.

[通讯作者] 黄尤光. E-mail: huangyouguang2008@126.com

三叶因子 (trefoil factor, TFF) 是在上世纪 80 年代末到 90 初由不同研究小组先后发现的含特殊的三叶因子结构域的蛋白多肽^[1], 其特征是含 38 ~ 40 个氨基酸残基的肽段中, 有 6 个保守的半胱氨酸残基以 1~5、2~4、3~6 的方式形成二硫键, 从而形成紧密的三叶结构域^[2]. 目前, 在哺乳动物中发现三种 TFF, 分别命名为 TFF1、TFF2、TFF3, 主要由粘膜上皮和腺上皮合成和分泌, 对粘膜损伤、修复和重建具有重要作用^[3,4].

TFF2 是第一个被分离纯化和鉴定得到的三叶因子, 丹麦的 Novo 研究所于上世纪 70 年代末从猪胰腺分离胰岛素时, 将其作为主要副产品纯化出来^[5]; TFF2 是目前在哺乳动物中发现的唯一含 2 个三叶结构域的多肽, 由 106 个氨基酸残基组成, 分子量 12 kD. 近年来的研究表明, 人体 TFF2 的异常表达与多种实体瘤的发生、发展关系密切. TFF2 表达上调与乳腺癌、胃肠道癌、胆管癌的浸润转移和血管生成等病理过程正相关, 并提示预后不良^[6,7]. 本研究构建高效表达人体 TFF2 (hTFF2) 的原核表达系统, 并分离纯化得到高纯度的重组 hTFF2, 并以结肠癌细胞株 SW480 为模型, 首次研究 TFF2 对结肠癌细胞迁移和失巢增殖的影响, 为进一步研究 TFF2 在结肠癌发生发展中的分子机制奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试剂材料

E.coli DH5 α 和 BL21-32a 感受态菌株以及质粒载体 pMD19T-simple、pET32a 购自 Novagen 公司, 限制性内切酶 (Kpn I, Sal I)、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶购自大连 TAKARA 公司, DNA 提取和纯化试剂盒购自北京天根公司, hTFF2 一抗和二抗购自美国 Santa Cruz 公司, 人结肠癌细胞株 SW480 为本所保存; 优等胎牛血清、RPMI-1640 培养基购自 Gibco; 胰蛋白酶购自 Hyclone, 其他试剂购自上海生工生物工程公司.

1.2 hTFF2 全长克隆载体质粒的构建

人 TFF2 (hTFF2) 的全长 cDNA 中国科学院昆明动物研究所提供, 利用 PCR 扩增 hTFF2 的 cDNA 编码区. 其中, hTFF2 编码区的正向引物序列和反向引物序列为: hTFF2-F: 5'-CAT GGTACC GACGACGACGACAAGGAGAAACCCTCCCCTG-3' hTFF2-R: 5'-TATGTCGACTTAGTAATGGCAGTC-3'. 正向引物序列按顺序先后含有一个 Kpn I 插入位点 (下划线)、4 个组氨酸标签、编码重组肠激酶切割

位点的核苷酸序列, 反向引物包括一个终止密码子 (框) 和 Sal I 的插入位点 (下划线). PCR 反应条件是 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 预变性; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 进行 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. 室温下, PCR 反应产物与克隆载体 pMD19T-simple Vector 经 T4 DNA 连接酶连接 1 h 并转化 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选、通用引物 M13-47 和 RV-M 行菌落 PCR 扩增确认阳性克隆菌落.

1.3 hTFF2 全长表达质粒载体的构建

在 5 mL LB 培养基培养测序正确的阳性克隆和 pET32a 空载克隆菌落, 抽提其质粒, 分别用 Kpn I / Sal I 双酶切. 酶切产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 用胶回收试剂盒回收目的 DNA, 并分别将回收产物与酶切后的 pET32a 室温连接 1 h, 连接产物转化 BL21 (DE3 plus) 感受态细胞, 挑选阳性克隆行测序, 获得正确插入序列的克隆菌落.

1.4 目的蛋白的表达和分离纯化

将测序正确的若干单克隆 BL21 (DE3 plus) 菌株分别接种到含终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$, 140 r/min 震荡培养至 600 nm OD 值达到 0.6 后, 以 0.5 mM IPTG 诱导表达 3.5 h, 裂解细菌, 取细菌裂解液进行 SDS-PAGE 检测. 取能表达目的融合蛋白的菌株接种到 1L 培养基中放大培养, 相同条件下诱导表达, 菌液经 4 $^{\circ}\text{C}$ 8 000 g 离心 10 min, 收集沉淀并用 100 mL 含 1 mM PMSF 的平衡缓冲液 (50 mM pH8.0 磷酸钠, 0.3 M NaCl, 10 mM 咪唑) 重悬. 在冰浴上超声破碎细菌. 4 $^{\circ}\text{C}$, 16 000 g 将破碎的菌液离心 30 min 后收集上清, 过镍亲和柱 (Sigma 公司), 用 20 倍柱体积的洗涤缓冲液 (50 mM pH8.0 磷酸钠, 0.3 M NaCl, 20 mM 咪唑) 冲洗后, 最后用洗脱缓冲液 (50 mM pH8.0 磷酸盐, 0.3 M NaCl, 250 mM 咪唑) 洗脱, 洗脱得到含 TrxA 的融合蛋白, 即 TrxA-hTFF2. 用 20 mM Tris.HCL (pH: 8.0) 对收集到的洗脱液行 4 $^{\circ}\text{C}$ 、48 h 的透析纯化, 纯化样品经冻干, 按 2 mg/mL 溶于 PBS 液备用.

1.5 重组 hTFF2 融合蛋白的 SDS-PAGE 检测和 Western blotting 鉴定

灌注 12% 的 SDS-PAGE 胶, 取纯化蛋白变性后上样电泳, 一部分凝胶用考马斯亮蓝染色, 检测 hTFF 纯度和含量. 另一部分凝胶经半干转移到 PVDF 膜, 5% BSA/TBS 室温封闭 1 h, 按 1:1 000 加入 hTFF2 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇匀过夜. 第 2 天洗膜后, 加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IgG 第二抗体 (1:5 000), 室温下振摇 1 h, TBS 洗膜, 按试剂盒

说明程序经化学发光底物 (ECL) 反应、X 光片显影和定影。

1.6 重组 hTFF2 的细胞迁移活性检测

细胞迁移活性采用 48 孔趋化小室 (48-Well MicroChemotaxis Chamber, Neuro Probe, USA), 8 μm 孔膜进行. SW480 细胞用含 10% 胎牛血清及 1% 青、链霉素的 RPMI-1640 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 标准条件下常规传代培养 5~6 代, 细胞生长汇合至 80% 时, PBS 洗涤 2 次, 用 1 mL 5 mM EDTA 悬浮细胞, 再经标准培养基洗涤、计数, 按 3×10^6 细胞 /mL 悬浮于含 1% BSA 的 RPMI-1640 培养基中, 100 μL 细胞悬液加入上层孔, 600 μL 含 BSA、重组 hTFF2 浓度梯度的 RPMI-1640/1%BSA 培养基分别加入下层孔. 经 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养孵育 4 h, 取膜置 100% 甲醇中固定 2 min, 分别浸入 QuikDip I 和 QuikDip II (Fronine 公司) 中染色 1 min 和 2 min. 小心擦弃孔膜上层未迁移细胞, 显微镜下观察照相, 每孔取 4 个视野拍照, 计数迁移细胞, 各组迁移细胞数用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

1.7 重组 hTFF2 对 SW480 细胞失巢增殖的促进作用

笔者采用琼脂软胶法检查重组 TFF2 的失巢增殖作用, 将 2% 的琼脂加热溶解后, 置 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 与相同温度条件下的 $2 \times$ RPMI-1640/10% FBS 等量混合得 1% 的底层胶, 取 6 孔板, 每孔加 2 mL 底层胶, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 备用. 培养 SW480 细胞, 胰酶消化, 细胞计数, 悬浮于经 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴的 $2 \times$ RPMI-1640/10% FBS 溶液中 (2×10^4 个细胞 /mL), 将细胞悬液与加热溶解后置 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴的 1% 琼脂等量混合, 得到含 1.0×10^4 细胞 /mL 浓度为 0.5% 的顶层软胶, 迅速取顶层软胶平铺于底层胶上, 每孔 1.5 mL, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 1 h 后, 分别加入 1 mL RPMI-1640/10% FBS 和含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hTFF2 的相同培养基, 相同条件下孵育, 每 7 d 换一次培养基. 待生长形成克隆后, 吸弃培养基, 用 0.05% 结晶紫染色 1 h, 再用蒸馏水洗涤 2 次, 照相保存。

2 结果

2.1 表达载体构建

RT-PCR 扩增得到的 hTFF2 的核苷酸序列经克隆到 pMD19T-simple 载体上, 再转化到 E.coli DH5 α 内扩增, 提取质粒进行 Kpn I/Sal I, 双酶切, 结果得到预期的 354 bp 的酶切片段 (图 1)。

再将酶切片段插入到 pET32a 载体中构建成 hTFF2 重组表达载体. 用 pET32a 通用引物测序, 与 GeneBank (NM005423) 中 hTFF2 的 cDNA 序列比对, 证实插入正确的碱基序列。

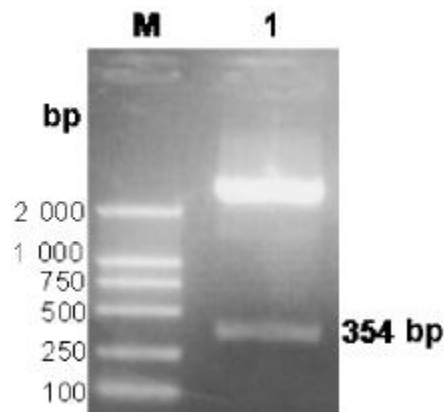


图 1 pET32a-hTFF2 重组质粒酶切鉴定

Fig. 1 Identification of Recombinant pET32a-hTFF2 with enzyme digestion

重组载体 pET32a-hTFF2 经 Kpn I/Sal I 双酶切, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色结果. M: DNA 分子量标准; 1: 重组载体酶切产物, 可见 345 bp 的目的片段。

2.2 重组蛋白的表达、纯化和鉴定

表达载体 pET32a-hTFF2 转化到 E.coli BL21, 经 0.1 mM IPTG 诱导 3 h, 菌株裂解液经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色分析, 发现 32 kD 处有目的蛋白过表达, 见图 2A. TFF2 主要以溶解性蛋白形式存在, 估计其表达量在细胞质总溶解蛋白的 40% 左右. 经超声裂解菌株, 裂解液离心, 再将上清液过 Ni²⁺ 亲和层析柱, 20 mM 的咪唑漂洗, 最后用 250 mM 的咪唑洗脱, 得到纯化的融合蛋白, 经 SDS-PAGE 检测未见非特异条带, 经密度扫描仪扫描纯度为 95.5%, 见图 2B. 将细菌裂解液经 SDS-PAGE 后, 转膜, Western blot 检测, 发现表观分子量 32 kD 位置有目的条带, 见图 2C. 融合蛋白经过透析、冻干, 每升细菌培养液平均可得到纯化的融合蛋白约为 220 mg/L。

2.3 重组 hTFF2 的细胞迁移活性

肿瘤转移涉及一系列复杂过程, 其中细胞浸润和迁移是肿瘤细胞转移的起始关键步骤. 研究表明, 结肠癌组织中 TFF2 表达上调与结肠癌淋巴结转移关系密切. 为此, 笔者们用 48 孔趋化小室检测重组的 hTFF2 对结肠癌细胞 SW480 的迁移活性. 实验结果表明, 与 BSA 对照组比较, 重组 hTFF2 有可明显促进 SW480 细胞跨膜迁移活性,

且呈剂量依赖性 (图 3)。

2.4 重组 hTFF2 促进 SW480 细胞失巢增殖

琼脂软胶中生长形成克隆是检测细胞失巢增殖的常用方法之一, 研究结果显示, 在琼脂软胶中培养 18 d 后, 可观察到含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组 hTFF2 的培养基的 SW480 细胞, 生长形成克隆的数目和大小远多于和大于对照组 (图 4)。

3 讨论

以大肠杆菌 (*E.coli*) 的 TrxA 基因的产物硫氧还蛋白作为融合伴侣的基因融合表达系统, 特别适用于在大肠杆菌胞质中表达高产融合蛋白。在多数情况下, 目的蛋白与硫氧还蛋白形成的融合蛋白形式, 可使目的蛋白形成正确的折叠, 并表现出全部生物学活性。硫氧还蛋白可增加目的蛋白在胞质中的溶解性, 同时, 其固有的热稳定性以及可通过

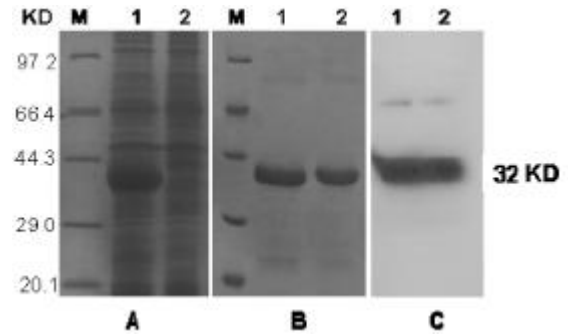


图 2 重组 hTFF2 在 *E.coli* BL21 中表达、纯化和鉴定
Fig. 2 Expression, purification and identification of Recombinant hTFF2

A: 重组载体 pET32a-hTFF2 转化的 *E.coli* BL21 裂解液经 12% SDS-PAGE 检测结果, M: 蛋白质分子量标准; 1: 转化菌经 0.1 mM IPTG 诱导结果; 2: 转化菌未经 IPTG 诱导. B: 镍亲和层析纯化产物经 12% SDS PAGE 检测结果, 1 和 2 分别为 20 μL 、10 μL 咪唑洗脱液电泳结果. C: 1 和 2 为 0.1 mM IPTG 诱导的转化菌裂解液经 Western blot 鉴定结果.

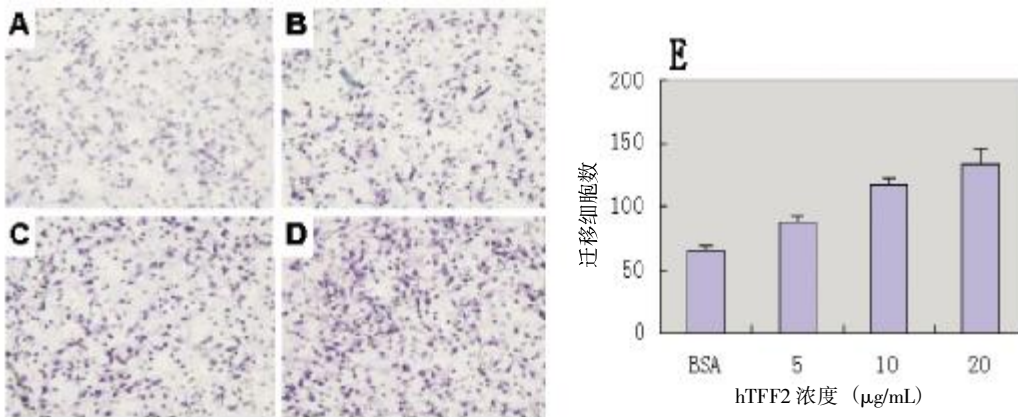


图 3 重组 hTFF2 促进 SW480 细胞迁移活性

Fig. 3 Recombinant hTFF2 promoted SW480 migration

48 孔趋化小室检测重组 hTFF2 诱导 SW480 细胞的迁移活性. A、B、C、D 分别为经 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA 以及 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组 hTFF2 诱导的迁移细胞数, 经 200 倍显微镜照相结果. E: 迁移细胞数统计图.



图 4 琼脂软胶检测重组 hTFF2 促进 SW480 细胞失巢增殖

Fig. 4 Soft agar assay for anchorage-independent growth of SW480 cells incubated with recombinant hTFF2

顶层胶中接种 1.5×10^4 个 SW480 细胞, RPMI1640/10%FBS 培养基中分别加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA 或 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重组 hTFF2 孵育 18 d, 观察到重组 hTFF2 促进细胞克隆形成, 细胞经结晶紫染色, 漂洗, 照相保存.

渗透休克从大肠杆菌中定量释放出来的特性,均可作为纯化硫氧还蛋白融合蛋白的有效工具^[8]。

pET 表达系统是一个能在 E.coli 中高效表达融合蛋白的载体系统,笔者选择含硫氧还蛋白 (TrxA) 的 pET32a 载体,克隆和表达 TrxA-hTFF2 融合重组蛋白。通过超声法裂解 E.coli,裂解液经 SDS-PAGE,显示 TrxA-hTFF2 在大肠杆菌中主要以可溶性蛋白形式存在,并且含量占大肠杆菌胞质可溶性蛋白的 40%以上。表达产物经 Ni-亲和层析,得到纯化的 TrxA-hTFF2 样品。SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析显示,TrxA-hTFF2 呈一条单一一条带,表观分子量为 32 kD,与预期的分子量一致。

为检查表达重组 hTFF2 的细胞活性,笔者选用 SW480 结肠癌细胞株进行细胞迁移和失巢增殖作用研究。48 孔趋化小室进行的细胞迁移法结果显示,重组表达的 hTFF2 可促进结肠癌细胞的迁移活性,呈剂量依赖性,提示 TFF2 在肿瘤组织中表达可能与肿瘤细胞浸润转移有关。临床研究资料表明,TFF2 在 91% 的胃癌组织中表达,其表达上调可促进胃癌浸润生长和淋巴结转移,并提示预后不良^[9,10]。进一步对 TFF2 的细胞活性研究发现,TFF2 可诱导肿瘤细胞 MMP9 的表达上调和 E-Cadherin 的表达下调^[9],而上述指标是肿瘤浸润转移的重要分子标志。众多学者认为 TFF2 可能通过与细胞膜的受体结合而发挥作用,然而至今未找到 TFF2 特异的受体分子。Zinaida 等发现,TFF2 的细胞迁移活性与趋化因子受体 CXCR4 的激活有关,分泌性 TFF2 可通过 CXCR4 促进淋巴母细胞和胃癌细胞 AGS 的增殖和迁移活性,而用 CXCR4 特异的抑制剂可阻断此作用^[11],提示 TFF2 可能参与趋化因子协同发挥功能。近年来的研究表明,趋化因子受体 CXCR4 通路激活在肿瘤细胞组织器官选择性转移中的作用引起人们的重视,有可能成为预防肿瘤转移的有效靶点之一^[12]。失巢增殖是肿瘤细胞的特性之一,本研究结果显示,重组 hTFF2 可促进结肠癌细胞 SW480 在琼脂软胶中生长形成克隆,抑制失巢凋亡的发生,笔者推测此作用可能与 TFF2 激活细胞内 PI3K/Akt 信号通路有关^[13],相关机制有待更深入的研究证实。

[参考文献]

[1] THIM L, MAY F E. Structure of mammalian trefoil factors

and functional insights [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62 (24): 2 956 - 2 973.

[2] KJELLE S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(8): 1 350 - 1 369.

[3] 张静,房涛,马义腾,等. 三叶因子2、表皮生长因子在大鼠胃溃疡愈合中的作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 14: 2 986 - 2 989.

[4] WILLS-KARP M, RANI R, DIENGER K, et al. Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection [J]. *J Exp Med*, 2012, 209(3): 607 - 622.

[5] GAJHEDE M, PETERSEN T N, HENRIKSEN A, et al. Pancreatic spasmolytic polypeptide: first three-dimensional structure of a member of the mammalian trefoil family of peptides [J]. *Structure*, 1993, 1(4): 253 - 262.

[6] PERRY J K, KANNAN N, GRANDISON P M, et al. Are trefoil factors oncogenic [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19(2): 74 - 81.

[7] KOSRIWONG K, MENHENIOTT TR, GIRAUD A S, et al. Trefoil factors: tumor progression markers and mitogens via EGFR/MAPK activation in cholangiocarcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 7(12): 1 631 - 1 641.

[8] STEWART E J, ASLUND F, BECKWITH J. Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins [J]. *EMBO J*, 1998, 17: 5 543 - 5 550.

[9] DHAR D K, WANG T C, TABARA H, et al. Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11 (18): 6 472 - 6 478.

[10] 石磊,赖铭裕,梁志海,等. 三叶因子1、2和环氧合酶-2在结肠癌组织中的表达 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 4: 150 - 153.

[11] DUBEYKOVSKAYA Z, DUBEYKOVSKIY A, SOLAL-C-OHEN J, et al. Secreted trefoil factor 2 activates the CXCR4 receptor in epithelial and lymphocytic cancer cell lines [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3 650 - 3 662.

[12] TEICHER B A, FRICKER S P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16 (11): 2 927 - 2 931.

[13] ORIME K, SHIRAKAWA J, TOGASHI Y, et al. Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic β -Cells through CXCR-4-mediated ERK1/2 phosphorylation [J]. *Endocrinology*, 2012, 209(3): 607 - 622.

(2013-04-08 收稿)