

· 论 著 ·

# 骨桥蛋白反义寡核苷酸对微缺氧下人结肠癌细胞 HT-29 增殖活性及侵袭力的影响

杨庆强<sup>1</sup>, 唐春燕<sup>2</sup>

(泸州医学院:1. 附属医院普外科;2. 护理学院卫校, 四川 646000)

**摘要:**目的 观察靶向骨桥蛋白(OPN)的反义寡核苷酸(ASODN)对微缺氧下 HT-29 细胞增殖活性、侵袭转移潜能等的影响,探讨 OPN 与微缺氧诱导的肿瘤恶性表型的关系。方法 合成 ASODN,以 Lipofectamine 为载体,将其转染入微缺氧下高表达 OPN 的 HT-29 细胞。用 RT-PCR 和 Western blot 法分别检测转染细胞微缺氧下 OPN mRNA 和蛋白的表达,MTT 检测转染的 HT-29 细胞微缺氧下的增殖活性,MTT 比色试验测定 HT-29 细胞的异质性黏附能力,明胶酶谱分析检测分泌的 MMP-2/9 活性变化。结果 微缺氧诱导的 OPN mRNA 和蛋白表达被靶向 OPN 的 ASODN 特异性地抑制,表达量分别是对照组的 31.5% 和 35.4%。ASODN 组 HT-29 细胞的吸光度值(A570)明显低于各对照组( $P < 0.01$ ),生长抑制率(IR)达(41.6 ± 1.2)%。ASODN 组 HT-29 细胞在各时限点的黏附率均明显降低,明胶酶活性下降 71%,与各对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 靶向 OPN 的 ASODN 明显抑制微缺氧诱导的 OPN mRNA 和蛋白表达,显著拮抗微缺氧诱导的细胞增殖、异质性黏附,并显著下调微缺氧诱导的细胞分泌 MMP2/9 的活性。OPN 在微缺氧促进肿瘤向恶性表型转化中起着重要作用。

**关键词:**微缺氧;反义寡核苷酸;骨桥蛋白;恶性表型

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.008

中图分类号:R735.35;R73-37

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)22-3018-04

## Effects of antisense oligonucleotide targeting osteopontin on proliferation and invasion of colon carcinoma cell lines HT-29 in vitro under moderate hypoxia

YANG Qing-qiang<sup>1</sup>, TANG Chun-yan<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital; 2. Health School, Nursing College, Luzhou Medical College, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of antisense oligonucleotide (ASODN) targeting osteopontin on proliferation and the invasiveness of HT-29 cells under moderate hypoxia. To investigate correlation between osteopontin and malignant phenotype induced by moderate hypoxia. **Methods** ASODN targeting osteopontin were synthesized with a phosphorothioate backbone. Mediating by lipofectamine, ASODN was transfected into HT-29 cells with high expression of osteopontin induced by moderate hypoxia. The osteopontin mRNA and protein levels of HT-29 cells treated with ASODN were detected by RT-PCR and Western blot respectively. The proliferation of HT-29 cells was assessed using MTT color metric assay. The heterotypic adhesiveness of HT-29 cells was detected by MTT assay. The activity of MMP-2 and MMP-9 was assessed using gelatin zymography. **Results** ASODN targeting osteopontin could selectively and significantly down-regulate the levels of osteopontin mRNA and protein, with 31.5% and 35.4% of the controls respectively. The absorbance value in ASODN group was lower than that of the controls with a significant difference. The cellular inhibition rate went up to (41.6 ± 1.2)%. The cells treated with ASODN targeting osteopontin obviously had a lower adhesive rate than that of the controls at different duration. ASODN targeting osteopontin could suppress significantly the MMP2/9 activities down to 71% in HT-29 cells exposed to moderate hypoxia. **Conclusion** ASODN targeting osteopontin could down-regulate the osteopontin mRNA and protein levels in HT-29 cells exposed to moderate hypoxia. The strong proliferation, heterotypic adhesiveness and MMP2/9 activities previously induced by moderate hypoxia could be inhibited when osteopontin was suppressed by ASODN. It suggests that osteopontin could play a key role in malignant phenotype when HT-29 cells are exposed to moderate hypoxia.

**Key words:** moderate hypoxia; antisense oligonucleotide; osteopontin; malignant phenotype

在适度缺氧的应激下,肿瘤细胞的起始因子-2 $\alpha$ 被磷酸化,大多数蛋白质的翻译被抑制,另一方面,特定的缺氧诱导蛋白合成增加,由此基因表达和表型出现转变,肿瘤细胞的生物学行为发生改变,该反应受缺氧程度及时间的影响<sup>[1]</sup>。作者在前期的研究中将培养液 PO<sub>2</sub> 20 mm Hg 作为微缺氧环境,检测到在微缺氧下 HT-29 细胞骨桥蛋白(OPN)特异性的表达上调,且 HT-29 细胞异质性黏附能力、侵袭游走能力显著增强,MMP-2/9 活性上调而向恶性表型转化。反义寡核苷酸(anti-

sense oligonucleotide, ASODN)是能与目标 mRNA 互补的 DNA 片段。应用 ASODN 阻断特定基因的表达,研究基因的功能已经成为可能。本实验将靶向 OPN ASODN 转染至微缺氧下高表达 OPN 的 HT-29 细胞,试图特异性地封闭 OPN mRNA,以进一步探讨 OPN 在微缺氧诱导的恶性转化中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** Lipofectamine 2000 (invitrogen 公司, Santa Cruz

Biotechnology), RT-PCR 试剂盒(杭州博日公司), 明胶(Sigma), matrigel 基底膜基质(BD Bioscience), 含 4.8% O<sub>2</sub>、90.2% N<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 三元混合气体, 自行设计的缺氧培养装置等。

**1.2 细胞培养** HT-29 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中贴壁生长, 以 0.1% 胰酶传代。在前期的实验中, 作者用溶解氧测定仪实时监测, 已摸索出持续低流量灌注 4.8% O<sub>2</sub>, 培养液氧分压恒定于 20 mm Hg。缺氧条件参照文献[2], 并稍作改进。

**1.3 ASODN 的设计** 在 Genbank 查询 OPN 基因序列 NM\_000582, 参照文献[3]设计并合成了由 20 个碱基组成的正义、反义、错义寡核苷酸(missense oligonucleotide, MODN)。各自序列如下: ASODN 序列为 5'-CTA ACT TAA AAA ACA AAA GA-3'。正义寡核苷酸(sense oligonucleotide, SODN)序列为 5'-TCT TTT GTT TTT TAA GTT AG-3'。MODN 序列为 5'-AGT TGC GGA AAT GAG TG-3'。

**1.4 ASODN 的转染** 将处于对数生长期的 HT-29 细胞制成浓度为 1×10<sup>5</sup> 个/mL 的细胞悬液, 每孔 2 mL 接种于 6 孔培养板, 待细胞增殖至 60%~70% 融合时, 吸弃培养液, 每孔加入 1 mL 含 10 μL/mL ODN 及终浓度为 10 μL/mL 脂质体的转染液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中培养 6 h。去除转染液, 加入 2 mL 10% FBS/RPMI-1640 培养液, 继续培养 18 h。根据实验所需, 将细胞进行微缺氧培养用于后续实验。

**1.5 RT-PCR 分析** 实验分组: 微缺氧空白组、脂质体对照组、SODN 组、MODN 组、ASODN 组。各 ODN 组均以 10 μmol/L 转染 HT-29 细胞, 转染 24 h 后再微缺氧培养 24 h。各组细胞均用 0.1% 胰酶消化, 制成细胞悬液并行细胞计数, 每个样本收集等量细胞 2×10<sup>6</sup>, 用 TRNzol 试剂抽提总 RNA, 步骤按说明书进行。在 genbank 查询 OPN 基因序列 NM\_000582, 用 primer5.0 软件自行设计引物序列, 上游引物为 5'-ACC CTT CCA AGT AAG TCC AAC-3'; 下游引物为 5'-GGT GAT GTC CTC GTC TGT AGC-3', 预计扩增片断为 354 bp。内参 β-actin 的上游引物为 5'-TTG TAA CAA ACT GGG ACG ATA TGG-3'; 下游引物为 5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3', 预计扩增片断为 764 bp。用逆转录酶和 oligo-dT 等按 42 °C 60 min, 70 °C 10 min 条件进行 cDNA 的合成。取逆转录产物 5 μL、10× RT-PCR Buffer 5 μL, MgCl<sub>2</sub> 3 μL, dNTP Mixture 1 μL, 上、下游引物各 1 μL 及 Taq mix DNA polymerase 0.5 μL 加入无菌双蒸水至反应总体积为 50 μL。反应条件为: 94 °C 变性 3 min; 94 °C 变性 45 s, 53 °C 退火复性 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 32 个循环后再 72 °C 延伸 5 min。反应体系以 β-actin 作为内参照。PCR 产物用含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶在 Bio-Rad 的 UVI 图像处理系统上分析、计算, 得出 OPN、β-actin 的光密度, 以 β-actin 的光密度为参照物, 求出 OPN 光密度与之相比的相对值, 得到 OPN mRNA 表达的半定量结果。

**1.6 Western blot 分析** 将细胞质蛋白进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 1:400 稀释的羊抗人骨桥蛋白多克隆抗体, 4 °C 过夜, β-actin 作内参照。TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入 1:1000 稀释的辣根酶标记兔抗山羊 IgG, 37 °C 1 h, 同样洗膜 3 次, 膜上均匀滴加 ECL 发光试剂, 在 Bio-Rad 图像处理系统 Hisensitivity 模式下连续曝光显影, 对蛋白条带进行灰度相对

强度测定, 得出积分灰度值, 以积分值代表蛋白的表达量。

**1.7 MTT 检测 HT-29 细胞的增殖活性** 收集对数生长期 HT-29 细胞, 胰酶消化制成 5×10<sup>4</sup>/mL 细胞悬液, 以 200 μL/孔接种于 96 孔板, 常氧下、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 待细胞贴壁。各组细胞微缺氧培养 6、12、24、48 h。同时设不加细胞的背景对照, 每组设 8 个复孔, 实验重复 3 次。到达预设时限点时, 每孔加入 (5 mg/mL) MTT 溶液 20 μL, 37 °C 孵育 4 h。弃旧液, 每孔加入 150 μL DMSO, 37 °C, 水平振荡 5 min, 用酶联免疫检测仪于波长 570 nm 处测定各孔吸光度 (A570)。扣除背景对照的 A570 值即代表存活细胞数量。制作细胞生长曲线, 计算细胞抑制率 (IR)。IR = (微缺氧空白组 A570 - 实验组 A570) / 微缺氧空白组 A570 × 100%。

**1.8 细胞黏附力检测** 用无血清 RPMI-1640 1:3 稀释 matrigel, 以 20 μL/孔加入 96 孔培养板, 成胶后紫外光消毒灭菌后备用, 接种细胞前水化基底膜。取对数生长期 HT-29 细胞配成浓度为 1×10<sup>5</sup>/mL 的细胞悬液, 各组均取 4 mL 接种于培养瓶。微缺氧下培养 48 h 后, 取出各组细胞, 用 0.1% 胰酶消化, 调整细胞密度为 5×10<sup>5</sup>/mL, 每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板常规培养。每组细胞均设对照, 并分为 30、60、90、120 min 时段组, 每时段组设 8 个平行孔。于各时段点吸弃培养液及悬浮细胞, PBS 冲洗除去未黏附的肿瘤细胞, 弃 PBS 加入 200 μL 无血清 RPMI-1640, 20 μL MTT 培养 4 h, 吸弃培养液, 加入二甲亚砜 (DMSO) 200 μL, 用酶联免疫检测仪于波长 570 nm 处测定各孔吸光度 (A570)。细胞黏附率 = 实验组 A570 值 / 对照组 A570 值 × 100%。

**1.9 明胶酶谱分析** 待测细胞常规消化后, 以 10<sup>6</sup> 个细胞/孔、10% FBS/RPMI-1640 接种到 6 孔板内过夜培养。次日用 0.01 mmol/L PBS (pH 7.4) 洗涤后, 各组细胞用无血清 RPMI-1640 分别在微缺氧下培养 24 h, 收集其上清液, 实验方法参照文献[4]: 上清液与 4× 上样缓冲液 (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% 甘油, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝) 按照 1:3 混合, 上样后在 1.5% 明胶/8% 聚丙烯酰胺凝胶、80 V 20 min、100 V 2 h 衡压电泳。凝胶分别用洗脱液 (2.5% Triton X-100)、孵育液 37 °C、24 h (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Triton X-100), 染色缓冲液 (0.4% 考马斯亮蓝 R-250, 10% 冰醋酸, 20% 甲醇) 和脱色缓冲液 (10% 冰醋酸, 20% 甲醇) 至显现出明显的蛋白负染条带。用 Bio-Rad 的图像处理系统对负染条带进行扫描并定量分析, 负染条带的大小、亮度反映 MMP-2/9 的活性。

**1.10 统计学处理** 用 SAS9.0 统计软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用方差分析或 *t* 检验。

## 2 结果

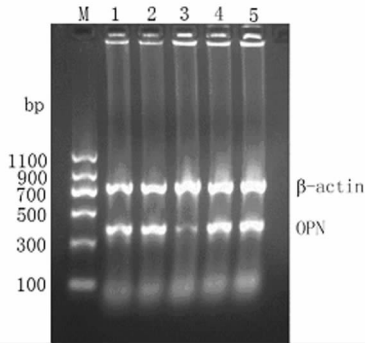
**2.1 OPN mRNA 表达** RT-PCR 结果显示, 各组均分别在 354, 764 bp 处出现特异性的 OPN 基因条带和内参照 β-actin 条带。OPN ASODN 转染 HT-29 细胞 24 h 后, 再微缺氧培养 24 h, 其 OPN mRNA 的表达较微缺氧空白组、脂质体对照组、SODN 组、MODN 组下调 68.5% (*P* < 0.01), 而各对照组间差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见图 1。

**2.2 OPN 蛋白表达** ASODN 组 OPN 蛋白表达较各对照组均明显下调 (*P* < 0.01), 表达量是对照组的 35.4%, 而各对照组间差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 见图 2。

**2.3 OPN ASODN 对微缺氧下 HT-29 细胞增殖的影响**

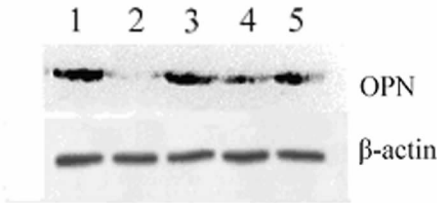
MTT 结果显示,微缺氧下不同时限点的吸光度值(A570)及生长抑制率(IR)在各对照组间差异无统计学意义( $P>0.05$ );而 ASODN 组的 A570 值及 IR 与各对照组比较,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),IR 为(41.6±1.2)%,各组的生长曲线见图 3。

**2.4 OPN ASODN 对微缺氧后 HT-29 细胞黏附力的影响**与微缺氧空白组、脂质体对照组、SODN 组、MODN 组比较,ASODN 组 HT-29 细胞在各时限点的黏附率均明显下降( $P<0.01$ ),而各对照组间的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),各组细胞在不同时限点的黏附曲线见图 4。



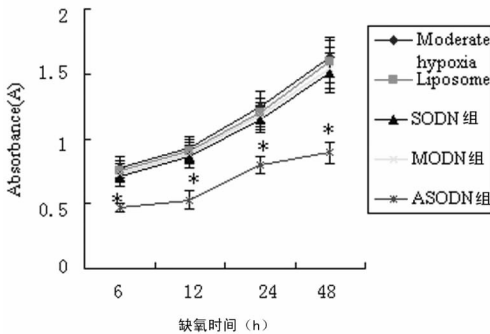
M: Marker; 1: Mh; 2: Li; 3: ASODN 组; 4: SODN 组; 5: MODN 组。

图 1 RT-PCR 检测 OPN ASODN 对微缺氧下 HT-29 细胞 OPN mRNA 表达的影响



1: Mh; 2: ASODN 组; 3: Li; 4: SODN 组; 5: MODN 组。

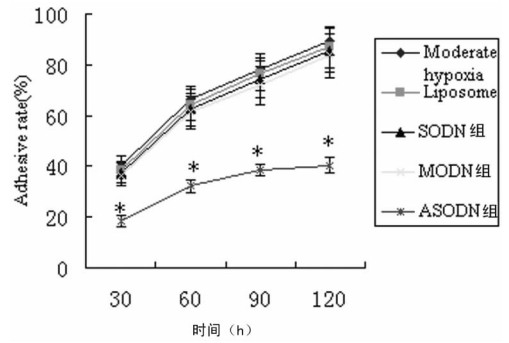
图 2 Western blot 检测 OPN ASODN 对微缺氧下 HT-29 细胞 OPN 蛋白表达的影响



\*: 与对照组比较,  $P<0.01$ 。

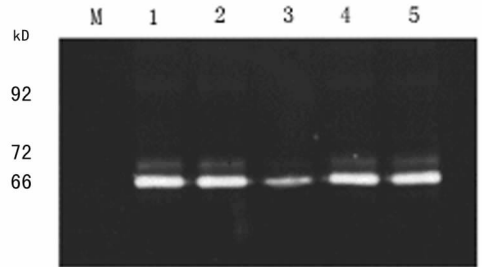
图 3 微缺氧下 ASODN 组与各对照组 HT-29 细胞的生长曲线

**2.5 MMP-2/9 活性** 明胶酶谱分析呈现相对分子质量为 66/72 kD 的 MMP-2 及其前体、92 kD 的 MMP-9 溶解明胶后的负染条带,尤以前者为著。与各对照组比较,ASODN 组 HT-29 细胞分泌的 MMP-2/9 活性下调 71% ( $P<0.01$ ),而各对照组间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 5。



\*: 与对照组比较,  $P<0.01$ 。

图 4 微缺氧后 ASODN 组与对照组 HT-29 细胞的黏附曲线



M: Marker; 1: Mh; 2: Li; 3: ASODN 组; 4: SODN 组; 5: MODN 组。

图 5 微缺氧下 ASODN 组与各对照组的明胶酶谱

**3 讨 论**

肿瘤组织的氧分压为 0~20 mm Hg,而正常组织则为 40 mm Hg 以上,缺氧乃实体肿瘤物理微环境的基本特征<sup>[5]</sup>。适度缺氧可能是肿瘤细胞发生遗传不稳定、恶性转化甚至转移的始动因素,缺氧介导肿瘤细胞恶性筛选,对凋亡不敏感的、在缺氧环境下生存下来的细胞更富有侵袭性和对放、化疗的抗拒性<sup>[6]</sup>。作者在前期的研究中将培养液 PO<sub>2</sub> 20 mm Hg 作为微缺氧环境,检测到 HT-29 细胞在微缺氧下 OPN 特异性的表达上调,且 HT-29 细胞异质性黏附能力、侵袭游走能力显著增强,MMP-2/9 活性上调而向恶性表型转化<sup>[7]</sup>。

在设计 ASODN 的软件中,Mfold 软件可以识别基因序列中呈环状或发夹状的区域,选择单直链的区域作为靶点,由其设计的 ASODN 更容易与目的基因结合,基因的抑制效率更高。Adwan 等<sup>[3]</sup>使用该软件,设计合成了 10 条靶向 OPN 的 ASODN,并筛选出最有效率的 1 条,该条 ASODN 可以使 OPN 蛋白表达下调 84%。作者参照 Adwan 设计的此条序列,合成 ASODN,并参照其浓度用 Lipofectamine 将其转染入微缺氧下高表达 OPN 的 HT-29 细胞,用 RT-PCR 和 Western Blot 分析,结果显示 ASODN 组 OPN mRNA、蛋白表达较各对照组分别下调 68.5% 和 64.6%。表明靶向 OPN 的 ASODN 能特异、有效地抑制微缺氧下 HT-29 细胞 OPN mRNA 和蛋白的表达。OPN 在多种肿瘤组织中高表达,它可增强肿瘤细胞与基质的异质性黏附,促进其移行,并通过与整合素受体、CD44 受体结合而参与信号转导,使肿瘤细胞无限制增殖,被认为是恶性转化的分泌性蛋白<sup>[8]</sup>。

Liu 等<sup>[9]</sup>报道骨肉瘤(OS)中过度表达的 OPN 可上调细胞周期调节蛋白 A(Cyclin A)的表达,进而加速细胞分裂周期,促进 OS 细胞的增殖。Muramatsu 等<sup>[10]</sup>将 OPN 的反义寡核苷

酸(AS)转染至高表达 OPN 的口腔肿瘤细胞株 BSF-OF, AS 组的肿瘤细胞生长速度较对照组明显减慢, 肿瘤细胞的侵袭能力也显著降低。本实验表明, ASODN 组 HT-29 细胞转染 OPN ASODN 后, 随着 OPN 的下调, 其 A570 值明显低于各对照组, 微缺氧下的高增殖活性受到明显抑制, IR 达  $(41.6 \pm 1.2)\%$ 。表明靶向 OPN 的 ASODN 对微缺氧下 HT-29 细胞的增殖有明显的抑制作用, 同时也提示微缺氧诱导的 HT-29 细胞高增殖活性与 OPN 的上调密切相关。

肿瘤细胞的远处转移是一个主动的过程, 在进入和离开转移通道时都需要肿瘤细胞具备选择性黏附和主动移行的能力。当 OPN 的 RGD 序列与整合素受体  $\alpha\beta_3$  或 CD44 突变体识别结合后, 可增强肿瘤细胞的黏附和迁移能力<sup>[11]</sup>。Moye 等<sup>[12]</sup>将乳腺良性细胞株 Rma 通过转染使其表达 OPN, 发现细胞的黏附力和迁移能力显著增加, 而且该细胞株可在大鼠体内形成转移灶。丁凌和郑树<sup>[13]</sup>分别构建 OPN 反义和正义真核表达质粒, 将其转染入大肠癌细胞株 Colo205 和 SW480。在高表达 OPN 的大肠癌细胞 CD44 的表达也上调, E-cadherin 的表达则减弱。由此表明, 细胞间同质黏附减弱, 与 ECV304 细胞之间的异质黏附增强。本实验用反义寡核苷酸技术, 特异性地封闭微缺氧诱导的 OPN, 结果显示, 随着 OPN 的下调, 微缺氧诱导的高异质性黏附力也明显降低。表明 OPN 参与了肿瘤细胞与基质膜基质之间的异质性黏附, 靶向 OPN 的 ASODN 能显著下调 OPN 的表达, 从而减弱微缺氧诱导的 HT-29 细胞的异质性黏附力。

MMP-2/9 活性的高低是评估肿瘤侵袭性的重要指标<sup>[14]</sup>。ASODN 组 HT-29 细胞转染 OPN ASODN 后, 随着 OPN 的下调, 其分泌的 MMP-2/9 活性下调了 71%, 表明靶向 OPN 的 ASODN 能显著下调微缺氧下 HT-29 细胞分泌的 MMP-2/9 活性。实验结果还提示, 在微缺氧下 MMP-2/9 是 OPN 的下游效应因子。但 MMP-2/9 没有 OPN 的调控点, 并不直接受 OPN 的调控, 两者之间可能还存在某种因子介导。

作者参照 Adwan 合成靶向 OPN 的 ASODN, 用阳性脂质体为载体, 将其转染至高表达 OPN 的微缺氧 HT-29 细胞, 发现靶向 OPN 的 ASODN 可明显抑制微缺氧诱导的 OPN mRNA 和蛋白表达, 并显著拮抗微缺氧诱导的细胞增殖、异质性黏附, 阻抑 OPN 的表达, MMP-2/9 的活性也随之下调, 表明 OPN 在微缺氧促进肿瘤向恶性表型转化中起着重要作用。

#### 参考文献:

[1] Koumenis C, Wouters BG. "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways[J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(7):423.  
 [2] Fukuda R, Hirota K, Fan F, et al. Insulin-like growth factor I induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent

on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:38205.

- [3] Adwan H, Bauerle TJ, Berger MR. Downregulation of osteopontin and bone sialoprotein II is related to reduced colony formation and metastasis formation of MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11:109.  
 [4] Paul F, Ziprin P, Alkhamesi N, et al. Hypoxia Augments Gelatinase Activity in a Variety of Adenocarcinomas in Vitro[J]. *J Surg Res*, 2005, 124(2):180.  
 [5] Semensa GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10):721.  
 [6] Le QT, Denko NC, Giacca AJ. Hypoxic gene expression and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2004, 23:293.  
 [7] 杨庆强, 张才全. 微缺氧对人结肠癌细胞 HT-29 骨桥蛋白及核转录因子表达及其侵袭能力的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24(11):1353.  
 [8] Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, et al. The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16(6):1087.  
 [9] Liu SJ, Hu GF, Liu YJ, et al. Effect of human osteopontin on proliferation, transmigration and expression of MMP-2 and MMP-9 in osteosarcoma cells[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(2):235.  
 [10] Muramatsu T, Shima K, Ohta K, et al. Inhibition of osteopontin expression and function in oral cancer cell lines by antisense oligonucleotide[J]. *Cancer Lett*, 2005, 217(1):87.  
 [11] Nemoto H, Rittling SR, Yoshitake H, et al. Osteopontin deficiency reduce experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(4):652.  
 [12] Moye VE, Barraeloush R, West C, et al. Osteopontin expression correlates with adhesive and metastatic potential in metastasis inducing DNA-transfected rat mammary cell lines[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(9):1796.  
 [13] 丁凌, 郑树. 骨桥蛋白在不同大肠癌细胞株中的转移相关功能研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(3):460.  
 [14] 秦千子, 黄顺荣. 结直肠癌 MMP7 和 MMP13 的表达和意义[J]. *广西医学*, 2005, 27(10):1539.

(收稿日期:2010-03-19 修回日期:2010-04-08)

**《重庆医学》——中国科技论文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!**