

敲低心肌连接斑株蛋白对人胃癌SGC-7901细胞的迁移和侵袭能力的影响及机制研究

陈燕林 席磊 杨丹 付立新 柳满然*

(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

摘要 该文研究了敲低心肌连接斑株蛋白(junction plakoglobin, *JUP*)对人胃癌SGC-7901细胞迁移和侵袭的影响及其机制。通过shRNA慢病毒介导的方式构建了敲低*JUP*基因的慢病毒载体序列及其阴性对照病毒,并感染至人胃癌SGC-7901细胞中,荧光检测细胞感染效率,获得*JUP*基因稳定沉默及其对照细胞株。用嘌呤霉素筛选阳性转染细胞株,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和蛋白质免疫印记法(Western blot)检测*JUP*表达水平。采用细胞划痕愈合实验和Transwell小室实验检测敲低*JUP*基因之后对人胃癌SGC-7901细胞迁移和侵袭能力的影响。采用Western blot检测敲低*JUP*之后β-连环蛋白水平的影响。结果显示,通过shRNA介导的慢病毒成功构建了敲低*JUP*基因的人胃癌SGC-7901稳定细胞株。与对照组相比,敲低*JUP*表达可促进细胞的迁移和侵袭能力($P<0.05$),上调了β-连环蛋白的水平($P<0.05$)。以上结果表明,敲低人胃癌SGC-7901细胞中*JUP*基因表达后可促进胃癌细胞SGC-7901的迁移和侵袭能力可能与其上调β-连环蛋白的水平从而活化Wnt信号通路有关。

关键词 胃癌; 连接斑株蛋白; 迁移和侵袭; β-连环蛋白

Effects of *JUP* on Migration and Invasion Ability of Human Gastric Cancer Cell Line SGC-7901 and Its Mechanism

Chen Yanlin, Xi Lei, Yang Dan, Fu Lixin, Liu Manran*

(College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The purpose of this study was to investigate the effects of junction plakoglobin (*JUP*) knockdown on the migration and invasion of human gastric cancer cell line SGC-7901 and its mechanism. The lentiviral vector sequence of knockdown *JUP* gene and its negative control virus were constructed by shRNA lentivirus-mediated method. The lentivirus and its negative control virus were transfected into human gastric cancer cell SGC-7901. After transfection for 3 days, the transfection efficiency of the cells was detected by microscope fluorescence, finally get well silenced *JUP* gene cell and the control. Positive transfected cell lines were screened with puromycin, the Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to detect the *JUP* mRNA and protein level. The migration and invasion ability of human gastric cancer SGC-7901 cells were detected by cell wound healing and Transwell chamber test. Western blot was used to detect the effect of *JUP* knockdown on the level of β-catenin. The results showed that human gastric cancer SGC-7901 stable cell line knockdown by *JUP* gene was successfully constructed by shRNA-mediated lentivirus. Compared with control, knockdown *JUP* gene could promote cell migration and invasion ($P<0.05$), the level of β-catenin was increased ($P<0.05$). The above results indicated that knockdown of *JUP* gene

收稿日期: 2017-09-28 接受日期: 2017-12-25

2016年重庆市研究生科研创新项目(批准号: CYS16137)和国家自然科学基金(批准号: 81172296、81472476)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15111991149, E-mail: mliu-hncq@hotmail.com

Received: September 28, 2017 Accepted: December 25, 2017

This work was supported by Chongqing Graduate Research and Innovation Project (2016) (Grant No.CYS16137) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172296, 81472476)

*Corresponding author. Tel: +86-15111991149, E-mail: mliu-hncq@hotmail.com

网络出版时间: 2018-03-09 15:31:55 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1531.018.html>

expression in human gastric cancer SGC-7901 cells might promote the migration and invasion of gastric cancer cell SGC-7901, which might be related to its upregulation β -catenin and activation of Wnt signaling pathway.

Keywords gastric cancer; junction plakoglobin; migration and invasion; β -catenin

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,也是全球第二大癌症死亡的主要原因^[1-2]。由于胃癌早期常无症状,因此发现时常已处于晚期,5年生存率在发展中国家和发达国家分别为4%和27%^[3]。肿瘤转移是肿瘤细胞向远处器官的传播和生长,是癌症最具破坏性的特征^[4],胃癌的高转移能力也是其致死率较高的原因之一。在胃癌患者中,腹膜转移是胃癌患者复发的最常见方式。紧密连接包括黏着连接和桥粒连接,它对于胃癌中细胞团的形成至关重要,一般来说,连接的接头是由跨膜组分和多种组成的细胞质衔接蛋白组成,这些蛋白质连接细胞骨架结构到细胞接触部位。研究表明,改变这些细胞质衔接蛋白的表达与肿瘤进展和/或抑制有关^[5]。其中,心肌连接斑株蛋白(junction plakoglobin, JUP)是高度的犰狳(armadillo)重复蛋白,其与 β -连环蛋白(β -catenin)同源,且在细胞桥粒上作为连接蛋白, JUP目前已被证明可以调节Wnt信号通路^[6-7]。然而,清楚的是, JUP同样也可扮演“非连接作用”的角色^[8],以及提供细胞间作用以对抗细胞的黏附和强度。在末期分化型心肌细胞, β -连环蛋白的稳定通过参与招募独立于Wnt机制的活化蛋白激酶B(protein kinase B/threonine kinase 1, PKB/AKT)与 β -连环蛋白降解复合物而形成复合物^[9]。JUP也可以绑定TCF/LEF(T-cell factor/lymphocyte enhancer factor),并激活或抑制基因转录,不过这取决于细胞环境^[10-11]。大量证据表明, JUP的非连接作用在调节细胞生物学方面至关重要^[12-13]。近来研究表明, JUP基因异常表达及调控与肿瘤的转移密切相关^[14-15]。因此,深入研究JUP对探讨肿瘤发生发展及转移以及相关机制和肿瘤的靶向治疗具有重要意义。

本研究采用shRNA介导的慢病毒载体靶向敲低JUP基因,探讨JUP基因敲低后对人胃癌SGC-7901细胞迁移和侵袭能力的影响及Wnt信号通路的改变,为深入研究其调节机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌SGC-7901细胞来自重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。shRNA干扰序

列为: 5'-CUC UGU GCG UCU CAA CUA UTT-3', 阴性对照序列为: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', 均由上海吉玛制药技术公司合成。胎牛血清和RPMI1640培养基购自Gibco公司。SYBR Green购自TaKaRa公司。兔抗人JUP抗体购自生工生物工程(上海)股份有限公司。兔抗人 β -actin的抗体购自Cell Signaling Technology公司。山羊抗兔辣根过氧化物酶IgG购自Abcam公司。ECL发光液购自上海伯乐生命医学产品有限公司。Western blot专用一抗、二抗稀释液购自上海碧云天生物技术有限公司。8 μ m孔径大小Transwell™小室购自Millipore公司。ECM基质胶购自Sigma公司。其他试剂均为国产分析纯。Eclipse 80i光学显微镜为Nikon公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及慢病毒感染 人胃癌SGC-7901细胞培养于含10%胎牛血清以及1%青霉素和链霉素的双抗的RPMI1640完全培养基中,放置于37 °C、5% CO₂孵箱中。于前一天晚上将细胞以5 \times 10⁴的细胞密度铺板于6孔板中,第2天待细胞长到60%汇合度时,将慢病毒及阴性对照病毒以MOI=20加到细胞培养板中,并加入5 μ g/ μ L的polybrene(1:1 000),并将培养基换为无双抗的培养基,放于孵箱中。24 h后在显微镜下观察细胞状态并换液。72 h后在荧光显微镜下检测细胞的感染效率,并加入1.5 μ g/mL的嘌呤霉素筛选阳性感染细胞株,连续筛选3天,嘌呤霉素的浓度减半维持一周,获得SGC-7901胃癌细胞稳定干扰JUP基因细胞株(shJUP)、阴性对照细胞株(shNC)以及空白对照细胞株(WT)。

1.2.2 qRT-PCR检测细胞JUP mRNA水平 利用Trizol提取各细胞总的RNA,并逆转录为cDNA,用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法检测各细胞株的JUP mRNA水平。JUP的上游引物序列为: 5'-TCT CCA ACC TGA CAT GCA ACA-3', 下游引物序列为: 5'-CAT AGT TGA GAC GCA CAG AGT TC-3'; β -actin的上游引物序列为: 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3', 下游引物序列为: 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'。反应程序为: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性10 s, 56.5 °C退火30 s, 72 °C延伸20 s,

40个循环。

1.2.3 Western blot检测细胞JUP蛋白质水平 使用RIPA蛋白质裂解液(使用前5 min加入1/100 PMSF蛋白酶抑制剂)冰上裂解细胞,裂解30 min,并每隔5 min震动一次,12 000 r/min离心30 min,提取各组细胞蛋白质。用BCA蛋白质标准曲线法测定蛋白质浓度,利用Western blot检测各细胞株的JUP蛋白质水平。用10%的分离胶进行电泳,用转膜液将分离蛋白质转移至PVDF膜。1.5 h后,用TBST配制的5%脱脂奶粉于室温下封闭2 h,再用一抗(1:1 000)分别是兔抗人JUP单克隆抗体和兔抗人 β -actin抗体,4 °C封闭过夜。用TBST洗3次,每次5 min,再用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1:1 000)于室温下孵育1 h,加入ECL发光液,凝胶成像分析仪采集图像。

1.2.4 划痕愈合实验检测敲低JUP后SGC-7901细胞迁移能力 常规消化细胞,铺板于6孔板中,待细胞长到80%~90%汇合度时,用中号移液器头于细胞底部划十字线,倒去培养基,用PBS洗2次,在显微镜下拍照,并分别于0 h、24 h、48 h拍照,比较细胞的迁移快慢。

1.2.5 Transwell法检测敲低JUP后SGC-7901细胞侵袭能力 常规消化细胞,用无血清的培养基重悬并在显微镜下计数,放置包被了ECM基质胶(1:7.5)的小室于24孔板中,在小室的下层,加入500 μ L有血清的培养基,在小室的上层加入200 μ L一定数量的细胞悬液,每组做3个重复孔。一定时间后取出小室,用棉签轻轻擦去内层细胞,5%的多聚甲醛固定20 min,PBS洗3次,结晶紫染5 min,PBS洗3次,在显微镜下于不同视野拍具有代表性的图像。

1.2.6 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件分析实验数据,两组样本的均数比较采用独立样本的 t 检验,所有实验都独立重复3次, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒感染SGC-7901细胞后获得稳定敲低JUP细胞株

利用shRNA介导慢病毒。阴性对照(shNC)和敲低JUP(shJUP)感染SGC-7901细胞,3天之后,用慢病毒带的嘌呤霉素抗性进行筛选。再过3天,在荧光显微镜下观察细胞中的绿色荧光,从而计算得到SGC-7901的荧光感染效率。荧光感染效率(%)=同一视野荧光显微镜下转染细胞数/相同视野下自然光中

的细胞总数 $\times 100\%$ 。shNC和shJUP的感染效率都在90%以上(图1),其中shNC感染效率为(92.34 \pm 3.00)%,shJUP感染效率为(93.32 \pm 2.00)%。结果说明,获得了稳定感染细胞株,且该细胞株可用于后续实验。

2.2 慢病毒感染胃癌SGC-7901细胞后JUP mRNA水平降低

利用qRT-PCR检测慢病毒感染胃癌细胞SGC-7901后JUP mRNA水平。qRT-PCR结果显示,SGC-7901细胞中,与WT相比,shNC组JUP的mRNA水平无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。敲低JUP后,JUP mRNA水平明显降低,降低了80%(图2),明显低于WT组($P < 0.001$)与shNC组($P < 0.001$),差异均具有统计学意义。结果表明,慢病毒成功感染胃癌SGC-7901细胞株,并成功抑制JUP的mRNA水平。

2.3 慢病毒感染胃癌SGC-7901细胞后JUP蛋白质水平降低

采用Western blot检测SGC-7901感染慢病毒之后JUP蛋白质水平的变化。结果显示,敲低JUP之后,JUP蛋白质水平明显降低,降低了75%(图3),明显低于WT组($P < 0.01$)和shNC组($P < 0.01$),差异均具有统计学意义,而shNC组与WT组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 敲低JUP后胃癌SGC-7901细胞迁移能力增强

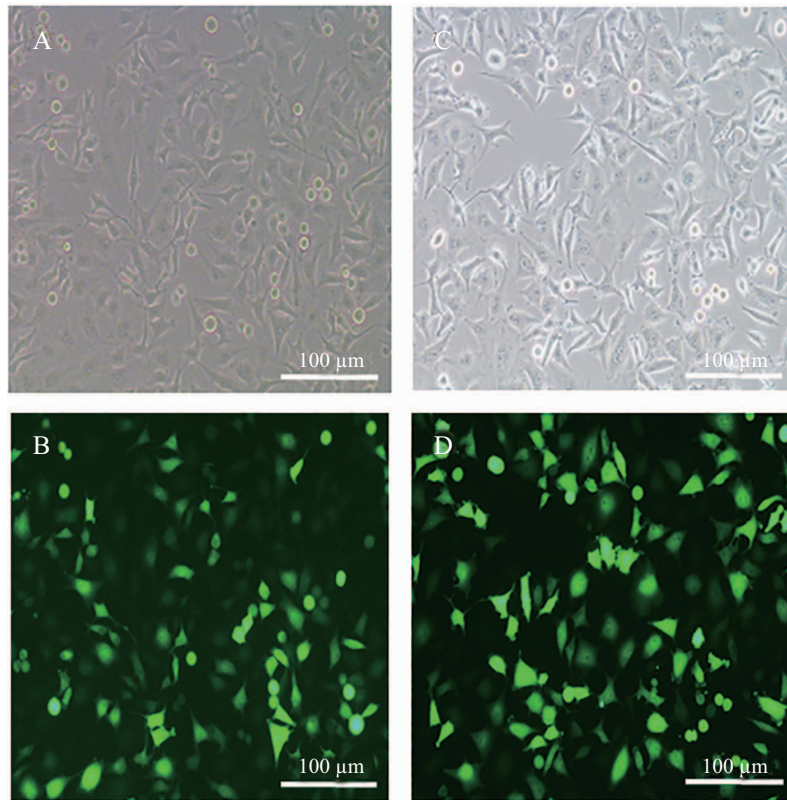
为了检测敲低JUP基因是否对胃癌SGC-7901细胞迁移能力造成影响,我们利用细胞划痕愈合实验检测shNC和shJUP组的迁移能力。与对照组相比,敲低JUP之后,细胞的迁移能力明显增强,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。shNC组和shJUP组细胞培养12 h后,shNC的迁移率为82%,shJUP的迁移率为60%。培养48 h后,shNC的迁移率为63%,shJUP的迁移率为29%(图4)。结果表明,敲低JUP后胃癌SGC-7901细胞迁移能力增强。

2.5 敲低JUP后SGC-7901细胞侵袭能力增强

用Transwell实验检测细胞的侵袭能力,结果显示,与对照组相比,敲低JUP之后,细胞的侵袭能力明显增强,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。shNC的细胞数为(42 \pm 2),shJUP的细胞数为(94 \pm 2)(图5)。结果表明,敲低JUP基因表达后胃癌SGC-7901细胞的侵袭能力增强。

2.6 敲低JUP后胃癌SGC-7901细胞的 β -连环蛋白表达水平升高

鉴于JUP与 β -连环蛋白高度同源,于是我们思

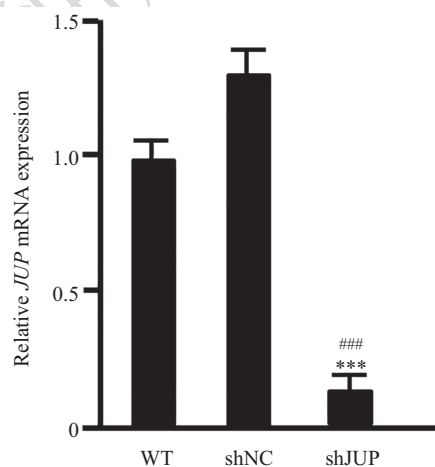


A: 自然光下shNC组SGC-7901细胞形态; B: 荧光下shNC组SGC-7901细胞形态; C: 自然光下shJUP组SGC-7901细胞形态; D: 荧光下shJUP组SGC-7901细胞形态。

A: morphology of SGC-7901 cells in shNC group under natural light; B: morphology of SGC-7901 cells in shNC group under fluorescent; C: morphology of SGC-7901 cells in shJUP group under natural light; D: morphology of SGC-7901 cells in shJUP group under fluorescent.

图1 感染shNC和shJUP后的细胞形态

Fig.1 Morphology of SGC-7901 cells with transfection of shNC or shJUP



$P < 0.001$, 与WT组比较; *** $P < 0.001$, 与shNC组比较。

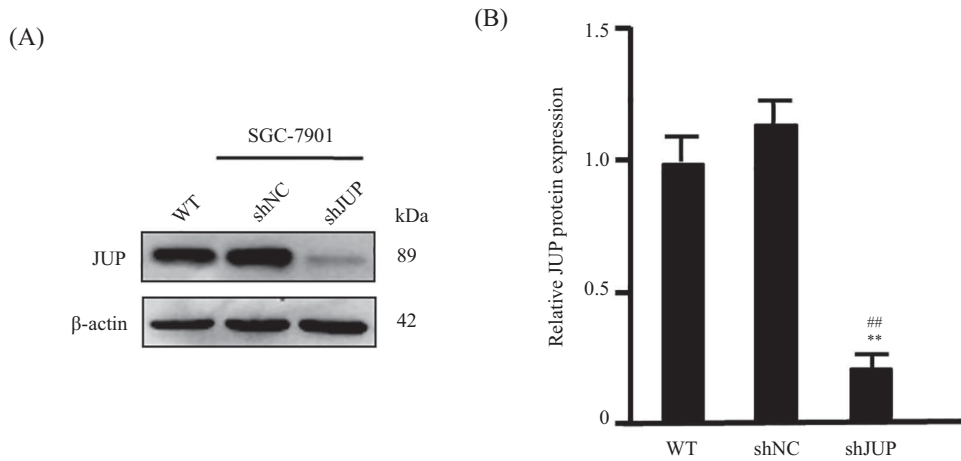
$P < 0.001$ vs WT group, *** $P < 0.001$ vs shNC group.

图2 qRT-PCR检测敲低JUP后SGC-7901细胞中JUP mRNA水平

Fig.2 The level of JUP mRNA in SGC-7901 cells with JUP knockdown detected by qRT-PCR

考敲低JUP之后对SGC-7901细胞中 β -连环蛋白的水平有没有影响。利用Western blot方法检测胃癌SGC-7901细胞WT、shNC及shJUP各组细胞中 β -连

环蛋白的蛋白质水平。结果表明, shJUP组细胞中, β -连环蛋白水平明显高于WT组($P < 0.01$)和shNC组($P < 0.01$), 差异均具有统计学意义, 而shNC组与WT

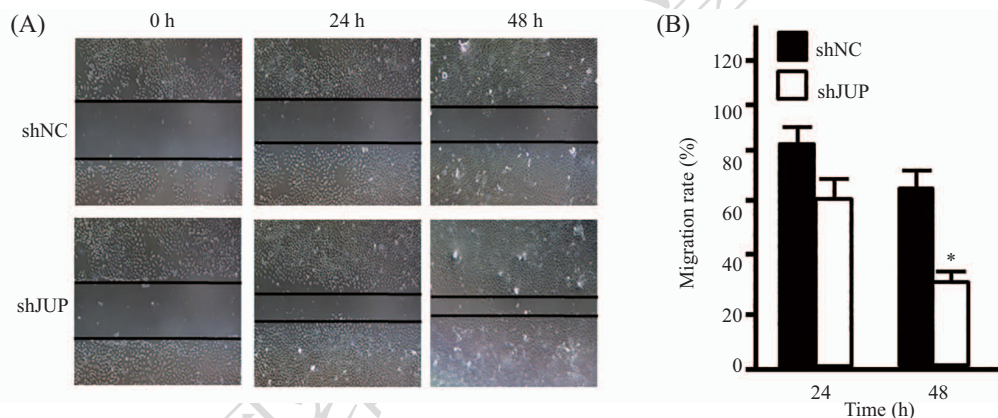


A: Western blot检测WT、shNC、shJUP各组细胞中JUP蛋白质水平; B: 各组细胞中JUP蛋白质水平的半定量分析。^{##} $P < 0.01$, 与WT组比较; ^{**} $P < 0.01$, 与shNC组比较。

A: Western blot was used to detect the levels of JUP proteins in WT, shNC and shJUP cells; B: semi-quantitative analysis of JUP protein level in each group. ^{##} $P < 0.01$ vs WT group, ^{**} $P < 0.01$ vs shNC group.

图3 Western blot检测敲低JUP后SGC-7901细胞中JUP蛋白质水平

Fig.3 The level of JUP protein in SGC-7901 cells with JUP knockdown detected by Western blot

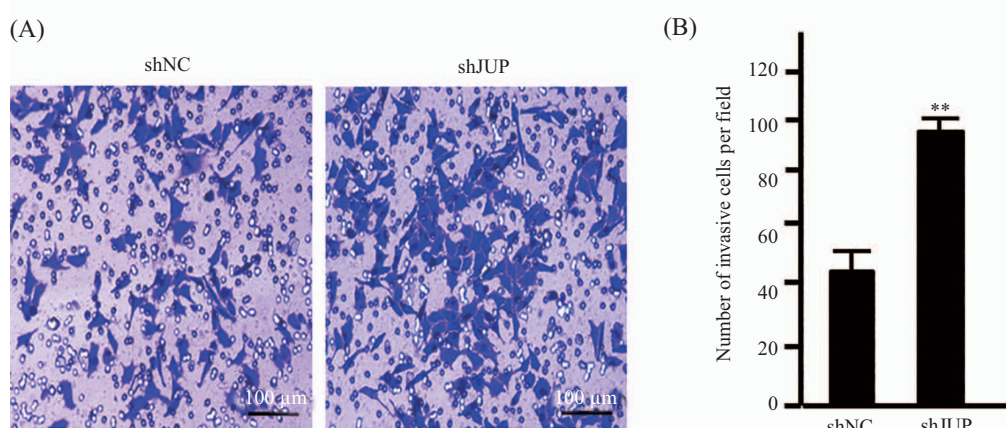


A: 划痕实验检测细胞的迁移能力; B: 细胞迁移能力的半定量分析。^{*} $P < 0.05$, 与shNC组比较。

A: cell migration ability was detected by wound healing assay; B: semi-quantitative analysis of cell migration capacity. ^{*} $P < 0.05$ vs shNC group.

图4 划痕实验检测细胞迁移能力

Fig.4 The ability of cell migration detected by wound healing assay

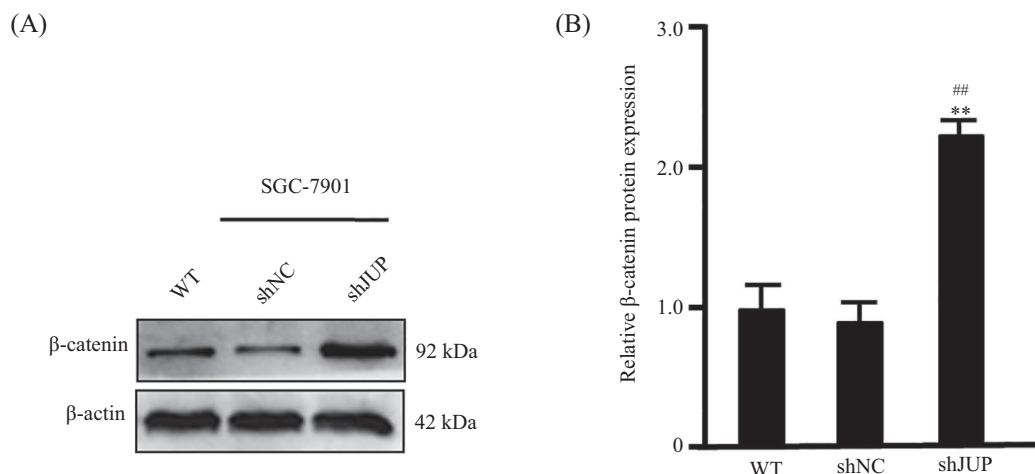


A: Transwell实验检测细胞的侵袭能力; B: 细胞侵袭能力的半定量分析。^{**} $P < 0.01$, 与shNC组比较。

A: cell invasion was performed by transwell experiments; B: semi-quantitative analysis of cell invasion ability. ^{**} $P < 0.01$ vs shNC group.

图5 Transwell实验检测细胞侵袭能力

Fig.5 The ability of cell invasion detected by Transwell assay



A: Western blot检测WT、shNC、shJUP中 β -连环蛋白水平; B: 各细胞中 β -连环蛋白水平的半定量分析。## $P < 0.01$, 与WT组比较; ** $P < 0.01$, 与shNC组比较。

A: the levels of β -catenin proteins in WT, shNC and shJUP detected by Western blot; B: semi-quantitative analysis of β -catenin protein level in each group. ## $P < 0.01$ vs WT group; ** $P < 0.01$ vs shNC group.

图6 Western blot检测敲低JUP后SGC-7901细胞中 β -连环蛋白水平

Fig.6 The level of β -catenin protein in SGC-7901 cells with JUP knockdown detected by Western blot

组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(图6)。

3 讨论

胃癌是一种恶性程度极高的恶性肿瘤之一^[16], 由于其缺乏早期的诊断指标, 所以致死率居全世界肿瘤第二。由于肿瘤的迁移和侵袭一直是肿瘤治疗的障碍, 所以找到与胃癌早期转移相关的生物标志物(biomarker), 显得尤其重要。JUP是一个同时起着紧密连接作用和桥粒连接作用的连接蛋白, 但是越来越多的研究发现, JUP同时具有除了作为连接蛋白之外的其他作用。在心脏中发现, JUP可以影响 β -连环蛋白的稳定性, 从而参与Wnt信号通路^[11]。在食管癌中也发现, 敲低JUP之后, 可以促进肿瘤的进展^[17]。然而, 关于JUP在胃癌中的研究还比较局限, 本文首次在胃癌SGC-7901细胞中敲低JUP, 以探讨JUP对胃癌SGC-7901细胞迁移和侵袭能力的影响及对 β -连环蛋白水平的影响。

本研究利用慢病毒介导的shRNA感染人胃癌SGC-7901细胞, 建立稳定敲低JUP细胞株, 利用PCR和Western blot检测发现, SGC-7901胃癌细胞中JUP的mRNA和蛋白水平都明显降低。利用划痕和Transwell实验检测敲低JUP之后, 对胃癌SGC-7901细胞的迁移和侵袭能力的影响。结果显示, 敲低JUP之后, 促进了胃癌SGC-7901细胞的迁移和侵袭能力。为了进一步阐明敲低JUP之后对胃癌SGC-7901细胞

的迁移、侵袭能力的分子机制, 我们进一步检测了JUP的高度同源蛋白 β -连环蛋白水平的变化, 结果表明, SGC-7901细胞被有效敲低JUP之后, β -连环蛋白的水平升高。以上结果表明, JUP基因可以上调 β -连环蛋白的水平, 从而抑制胃癌SGC-7901细胞的迁移和侵袭能力, 但其具体机制有待进一步研究。初步有研究表明, 敲低JUP之后, 可能会使 β -连环蛋白水平增加, 增加的 β -连环蛋白激活Wnt信号通路, 从而使磷酸化的 β -连环蛋白降低, β -连环蛋白的泛素化降解减少。胞质中增加的 β -连环蛋白入核, 核 β -连环蛋白表达升高, 可与TCF/LEF转录因子结合, 从而调控 β -连环蛋白下游的与侵袭转移相关的基因表达, 进一步促进了癌细胞的侵袭与转移能力^[18]。

综上所述, 本文通过shRNA成功构建了低表达JUP基因的人胃癌SGC-7901稳定细胞株, 并且低表达JUP基因的胃癌SGC-7901细胞的迁移和侵袭能力明显增强, β -连环蛋白的表达水平升高, 但是其具体机制有待进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 Khazaei S, Rezaeian S, Soheylizad M, Khazaei S, Biderafsh A. Global incidence and mortality rates of stomach cancer and the human development index: an ecological study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; 17(4): 1701-4.
- 2 Yari F, Abiri R, Aryan E, Ahmadi Jouybari T, Navabi J, Alvandi A. Loop-mediated isothermal amplification as a fast noninvasive method of *Helicobacter pylori* diagnosis. *J Clin Lab Anal* 2016;

- 30(5): 464-70.
- 3 Eybpoosh S, Talebkhan Y, Saberi S, Esmacili M, Oghalaie A, Ebrahimzadeh F, *et al.* Age-specific gastric cancer risk indicated by the combination of *Helicobacter pylori* sero-status and serum pepsinogen levels. *Ira Biomed J* 2015; 19(3): 133-42.
- 4 丁海涛, 赵凯, 郭青龙, 卢娜. 肿瘤转移前微环境的特征及其作用. 世界最新医学信息文摘(Ding Haitao, Zhao Kai, Guo Qinglong, Lu Na. Tumor microenvironment before transfer characteristics and role. *World Latest Medicine Information*) 2017; 17(14): 43-5.
- 5 McCrean PD, Gu D. The catenin family at a glance. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 5): 637-42.
- 6 Lai YH, Cheng J, Cheng D, Feasel ME, Beste KD, Peng J, *et al.* SOX4 interacts with plakoglobin in a Wnt3a-dependent manner in prostate cancer cells. *BMC Cell Biol* 2011; 12: 50.
- 7 Aktary Z, Pasdar M. Plakoglobin: role in tumorigenesis and metastasis. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 189521.
- 8 Matthes SA, LaRouere TJ, Horowitz JC, White ES. Plakoglobin expression in fibroblasts and its role in idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med* 2015; 15: 140.
- 9 Haq S, Michael A, Andreucci M, Bhattacharya K, Dotto P, Walters B, *et al.* Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(8): 4610-5.
- 10 Maeda O, Usami N, Kondo M, Takahashi M, Goto H, Shimokata K, *et al.* Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene* 2004; 23(4): 964-72.
- 11 Li J, Swope D, Raess N, Cheng L, Muller EJ, Radice GL. Cardiac tissue-restricted deletion of plakoglobin results in progressive cardiomyopathy and activation of {beta}-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 2011; 31(6): 1134-44.
- 12 Winn RA, Bremnes RM, Bemis L, Franklin WA, Miller YE, Cool C, *et al.* gamma-Catenin expression is reduced or absent in a subset of human lung cancers and re-expression inhibits transformed cell growth. *Oncogene* 2002; 21(49): 7497-506.
- 13 Rieger-Christ KM, Ng L, Hanley RS, Durrani O, Ma H, Yee AS, *et al.* Restoration of plakoglobin expression in bladder carcinoma cell lines suppresses cell migration and tumorigenic potential. *Br J Cancer* 2005; 92(12): 2153-9.
- 14 Aktary Z, Chapman K, Lam L, Lo A, Ji C, Graham K, *et al.* Plakoglobin interacts with and increases the protein levels of metastasis suppressor Nm23-H2 and regulates the expression of Nm23-H1. *Oncogene* 2010; 29(14): 2118-29.
- 15 Todorović V, Desai BV, Patterson MJ, Amargo EV, Dubash AD, Yin T, Jones JC, *et al.* Plakoglobin regulates cell motility through Rho- and fibronectin-dependent Src signaling. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 20): 3576-86.
- 16 Lawrence W, Jr. Gastric cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. *CA Cancer J Clin* 1986; 36(4): 216-36.
- 17 Fang WK, Liao LD, Gu W, Chen B, Wu ZY, Wu JY, *et al.* Down-regulated gamma-catenin expression is associated with tumor aggressiveness in esophageal cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (19): 5839-48.
- 18 Sagredo AI, Sagredo EA, Cappelli C, Baez P, Rodrigo AM, Blanco C, *et al.* TRPM4 regulates Akt/GSK3-activity and enhances b-catenin signaling and cell proliferation in prostate cancer cells. *Mol Oncol* 2017; doi: 10.1002/1878-0261.12100.