

异长春花碱抑制人乳腺癌细胞转移侵袭的作用及其机制

马一平

天津环湖医院, 天津 300060

摘要: 目的 探讨异长春花碱抑制人乳腺癌细胞转移侵袭的作用及其机制。方法 人乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞分别用异长春花碱 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 处理后, MTS 法检测细胞黏附能力, Transwell 法检测细胞侵袭能力, ELISA 法检测细胞转移生长因子- β (TGF- β) 分泌的变化, 明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶 (MMP)-2 和 MMP-9 活性, Western blotting 法检测肿瘤细胞 E-钙黏素、N-钙黏素、MMP-2、MMP-9、p-JNK 及 p-Akt 蛋白的表达, RT-PCR 法检测肿瘤细胞 E-钙黏素、N-钙黏素及 MMP-2、MMP-9 基因的表达, 双荧光素酶报告基因实验考察 AP-1 和核因子- κB (NF- κB) 活性的变化。结果 异长春花碱 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 给药后, 细胞黏附能力: MCF-7 细胞分别下降 34.8%、66.8%, MDA-MB-435 细胞分别下降 42.6%、72.3%; 侵袭能力: MCF-7 细胞分别下降 44.4%、72.2%, MDA-MB-435 细胞分别下降 47.7%、86.4%; TGF- β 分泌: MCF-7 细胞分别下降 28.2%、52.1%, MDA-MB-435 细胞分别下降 39.0%、55.1%; E-钙黏素基因表达: MCF-7 细胞分别上调 86.5%、181.6%, MDA-MB-435 细胞分别上调 116.6%、160.7%; N-钙黏素基因表达: MCF-7 细胞分别下降 33.7%、74.1%, MDA-MB-435 细胞分别下降 57.6%、76.9%; MMP-2 基因表达: MCF-7 细胞分别下降 71.6%、88.4%, MDA-MB-435 细胞分别下降 57.4%、69.4%; MMP-9 基因表达: MCF-7 细胞分别下降 15.0%、84.0%, MDA-MB-435 细胞分别下调 22.1%、73.0%; E-钙黏素蛋白表达显著上调, N-钙黏素蛋白表达明显下调, MMP-2 和 MMP-9 及 p-JNK、p-Akt 蛋白表达显著下降; AP-1 活性: MCF-7 细胞分别下降 27.7%、68.2%, MDA-MB-435 细胞分别下降 34.8%、71.4%; NF- κB 活性: MCF-7 细胞分别下降 18.4%、44.8%, MDA-MB-435 细胞分别下降 24.4%、51.9%。结论 异长春花碱可抑制人乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞体外侵袭能力, 其机制可能与下调肿瘤转移相关信号通路及上皮间质转化表达有关。

关键词: 异长春花碱; 人乳腺癌 MCF-7 细胞; 人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞; 肿瘤转移; 信号通路; 上皮间质转化表达

中图分类号: R282.710.5; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)13-1786-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.016

Inhibition of vinorelbine on invasion and metastasis of breast cancer cell and its mechanism

MA Yi-ping

Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of vinorelbine (VRB) on the invasion and metastasis of breast cancer cell and its mechanism. **Methods** The MCF-7 and MDA-MB-435 cells were treated with 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$ VRB. The cell adhesion was tested by MTS, the invasion was detected by Transwell, secretion of TGF- β was detected using ELISA, the activities of MMP-2 and MMP-9 were detected by zymography, the expression of proteins, including E-cadherin (E-CAD), N-cadherin (N-CAD), MMP-2, and MMP-9, p-JNK and p-Akt was evaluated by Western blotting, RT-PCR was used to detect E-CAD, N-CAD, MMP-2, and MMP-9 genes, and dual-luciferase reporter assay was used to validate the activities of AP-1 and NF- κB . **Results** After being treated with 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$ VRB, for MCF-7 and MDA-MB-435, the adhesion ability was decreased by 34.8% and 66.8%, 42.6% and 72.3%; The metastatic ability was decreased by 44.4% and 72.2%, 47.7% and 86.4%; The secretion of TGF- β was reduced by 28.2% and 52.1%, 39.0% and 55.1%, significantly; The mRNA expression levels of E-CAD were increased by 86.5% and 181.6%, 116.6% and 160.7%; while the levels of N-CAD were decreased by 33.7% and 74.1%, 57.6% and 76.9%; The gene expression of MMP-2 was decreased by 71.6% and 88.4%, 57.4% and 69.4%; The gene expression of MMP-9 was decreased by 15.0% and 84.0%, 22.1% and 73.0%, respectively. The protein expression of E-CAD was up-regulated while the protein expression of N-CAD, MMP-2, MMP-9, p-JNK, and p-Akt were down-regulated significantly; And dual-luciferase reporter assay validated VRB could inhibit the transcriptional

收稿日期: 2013-01-13

作者简介: 马一平 (1971—), 硕士, 副主任药师, 研究方向为临床药物研究。

activity of AP-1 and NF- κ B by 27.7% and 68.2%, 34.8% and 71.4%, 18.4% and 44.8%, 24.4% and 51.9%, respectively.

Conclusion VRB could inhibit the metastasis of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-435 cells via down-regulation of inhibition and blocking of signaling pathway correlated with metastasis and epithelial-mesenchymal transition.

Key words: vinorelbine; human breast cancer MCF-7 cells; human breast cancer MDA-MB-435 cells; tumor metastasis; signaling pathway; epithelial-mesenchymal transition expression

长春碱类化合物是一类具有抗癌活性的生物碱，其以细胞微管蛋白为作用靶点，通过与微管蛋白相结合，从而抑制微管聚合、使微管解聚，使分裂的细胞不能形成纺锤体而使细胞分裂终止，起到抑制细胞增殖的作用^[1]。异长春花碱(vinorelbine, VRB)是以长春碱为原料、通过结构修饰半合成得到的衍生物，在保持原料药抗癌活性的基础上降低了毒性，在临床上主要用于非小细胞肺癌、急性淋巴细胞白血病、转移性乳腺癌等多种肿瘤的治疗^[2-3]。本实验研究异长春花碱对乳腺癌细胞转移能力的影响，为明确其抗癌作用及其机制提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

异长春花碱，质量分数为99.9%，Sigma公司；胎牛血清、RPMI-1640培养基，Gibco公司；Trizol RNA提取试剂，Invitrogen公司；逆转录试剂盒、Sybree实时定量PCR(RT-PCR)试剂盒，Ambion公司；转移生长因子- β (TGF- β) ELISA试剂盒，达科为公司；Matrigel Invasion Chamber试剂盒，BD公司；Bradford蛋白测定试剂盒，碧云天生物技术研究；E-钙黏素、N-钙黏素、基质金属蛋白酶-2/9(MMP-2/9)、p-JNK、p-Akt抗体，Abcam公司；ECL化学发光试剂，GE公司；双荧光素酶报告试剂盒，Promega公司；荧光报告质粒3xAP-1-pGL3、3xNF- κ B-pGL3，Addgene公司；3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲基苯基)-2-(4-磺酸苯基)-2H-四氮唑(MTS)，Promega公司。

1.2 细胞系

人乳腺癌细胞系MDA-MB-435、MCF-7，美国标准生物制品收藏中心提供，均保存于本实验室。

1.3 仪器

ABI7500型荧光定量PCR(RT-PCR)仪，ABI公司；PowerPac Basic电泳仪、PowerPac HC转膜电泳仪、ChemiDocXRS凝胶成像系统，Bio Rad公司；PTC-200 PCR仪，MJ公司；CO₂培养箱，Forma公司；生物化学发光测量仪，Promega公司；显微镜，尼康公司。

2 方法

2.1 细胞培养与给药

MDA-MB-435和MCF-7细胞均用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在37℃、饱和湿度、5%CO₂培养箱中常规传代培养。

2.2 MTS法检测细胞增殖

将乳腺癌细胞按 5×10^3 /孔密度接种于96孔板中，每组5个复孔，37℃、5%CO₂孵育24h后，分别加入异长春花碱0、0.5、1、5、10、50、100 μ mol/L，继续孵育24h，吸出上清液，磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次，加入MTS孵育4h，490nm波长下测定A值，计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{给药组}} / A_{\text{对照组}})$$

2.3 MTS法检测细胞黏附力

实验分成3组：对照组(给予RPMI培养液)，异长春花碱1、10 μ mol/L组。培养细胞密度至80%时加入异长春花碱。给药后将3组乳腺癌细胞按 1×10^5 /孔密度接种于铺有Matrigel胶的96孔板中，每组5个复孔，37℃、5%CO₂孵育1h，吸出上清液，PBS洗3次，加入MTS孵育4h，490nm波长下测定A值，计算细胞黏附率。

$$\text{细胞黏附率} = 1 - (A_{\text{未贴壁细胞数}} / A_{\text{接种细胞总数}})$$

2.4 Transwell法检测细胞侵袭能力

细胞分组、给药同“2.3”项。将-20℃保存的Matrigel Invasion Chamber小室在室温下放置30min，在上室、下室中各加入无血清培养基500 μ L，37℃孵箱水化2h，弃去无血清培养基。下室每孔加入750 μ L含20%胎牛血清的培养基，上室每孔加入500 μ L含 2.5×10^4 个细胞的无血清培养基重悬的各组细胞悬液，置于孵箱培养12h后用棉签拭去上层未穿过的细胞，固定、染色，自来水漂洗3次，室温风干，中性树胶固定，镜下观察($\times 40$)穿孔细胞数目，随机选取5个视野计数并取其平均值。

2.5 ELISA法检测TGF- β 分泌量

细胞分组、给药同“2.3”项。将各组乳腺癌细胞按 3×10^5 /孔密度接种于6孔板中，每组5个复孔，37℃、5%CO₂孵育24h，收集上清，按ELISA试剂盒说明书检测TGF- β 分泌量。

2.6 RT-PCR 检测乳腺癌细胞转移相关基因表达

细胞分组、给药同“2.3”项。将各组处于对数生长期细胞用 PBS 清洗 3 次, 加入适量 Trizol 试剂, 按说明书提取总 RNA、进行逆转录。25 μL 反应体系包括 1 μL cDNA、2.5 μL 10×PCR 缓冲液 (Mg²⁺ 游离)、2.8 μL MgCl₂ (25 mmol/L)、2 μL dNTP (2.5 mmol/L)、0.5 μL 上下游引物 (10 mmol/L)、0.25 μL Taq DNA 聚合酶、2.5 μL 10×Sybgreen I。PCR 反应条件: 50 °C 温育 2 min, 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变

性 30 s, 58~64 °C 退火延伸 1 min, 40 个循环。计算各样本待测基因的 Ct 值 (荧光信号达到设定阈值所经过的循环数) 与 GAPDH 的 Ct 值的差, 即 ΔCt, 2^{-ΔCt} 为该样本中待测基因相对于 GAPDH 基因的表达量。引物由大连宝生物工程有限公司合成并纯化, 引物序列见表 1。

2.7 Western blotting 法检测相关蛋白表达

细胞分组及给药同“2.3”项。将各组对数生长期细胞用 PBS 清洗 3 次, 加入适量预冷的细胞裂解

表 1 基因引物序列及片段长度

Table 1 Gene primer sequence and fragment length

基因	引物序列	片段长度 / bp
E-钙黏素	上游: 5'-CGAGAGCTACACGTTTCACGG-3'	593
	下游: 5'-GGGTGTTCGAGGAAAAATAGG-3'	
N-钙黏素	上游: 5'-GCCACCATATGACTCCCTCTTAGT-3'	454
	下游: 5'-CAGAAAATAATTCCAATCTGAAA-3'	
MMP-2	上游: 5'-CCCCTGCGTTTTCTCGAAT-3'	447
	下游: 5'-CAAAGGGGTATCCATCGCCAT-3'	
MMP-9	上游: 5'-AGACCTGGGCAGATCCAAAC-3'	754
	下游: 5'-CGGCAAGTCTCCGAGTAGT-3'	
GAPDH	上游: 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3'	231
	下游: 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'	

液冰浴裂解 30 min, 移至 1.5 mL EP 管中, 4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清至新的 EP 管中, Bradford 法测定蛋白的量。取 40 μg 总蛋白, 在 80 V 下聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE, 4%浓缩胶、10%分离胶) 电泳 3 h, 电转印至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入相应一抗, 4 °C 孵育过夜。Tris-HCl/Tween20 缓冲液 (TBST) 洗膜 6 次, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1:5 000), 室温孵育 30~45 min, TBST 洗膜 6 次后用 ECL 化学发光试剂显色 1~2 min, 曝光 X 胶片。检测 MMP-2/9、E-钙黏素、N-钙黏素、p-JNK、p-Akt 蛋白表达。

2.8 双荧光素酶报告基因实验检测 AP-1 和 NF-κB 的活性

细胞分组及给药同“2.3”项。将各组细胞按 3×10⁵/孔密度接种于 6 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 孵育 24 h, 将 1 μg AP-1 和核因子-κB (NF-κB) 荧光报告质粒、0.02 μg 对照质粒转染进入对照组和给药组细胞, 24 h 后应用荧光酶标仪检测荧光强度。

2.9 统计学方法

统计学分析采用 SPSS 13.0 软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$

表示, 根据数据处理的不同方法及统计学处理的不同要求, 选用方差分析或 t 检验进行组间差异分析。每个实验均重复 3 次。

3 结果

3.1 对乳腺癌细胞增殖的影响

异长春花碱 1、10 μmol/L 对 MDA-MB-435 和 MCF-7 细胞的抑制率均低于 5% (无毒)、15% (低毒)。结果见图 1。故采用这 2 个浓度进行后续实验。

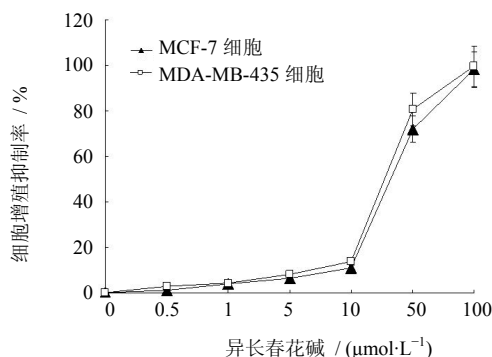


图 1 异长春花碱对乳腺癌细胞增殖的影响 (n = 3)

Fig. 1 Effect of VRB on proliferation of breast cancer cells (n = 3)

3.2 对乳腺癌细胞黏附能力的影响

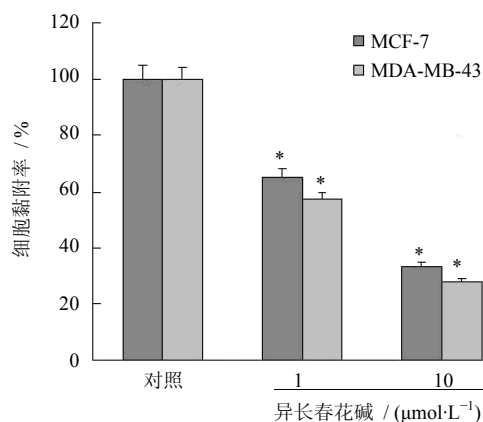
与对照组相比, 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱组 MCF-7 细胞黏附能力分别下降 34.8%、66.8% ($P < 0.05$), MDA-MB-435 细胞黏附能力分别下降 42.6%、72.3% ($P < 0.05$)。结果见图 2。

3.3 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响

与对照组相比, 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱组 MCF-7 细胞侵袭能力分别下降 44.4%、72.2% ($P < 0.05$), MDA-MB-435 细胞侵袭能力分别下降 47.7%、86.4% ($P < 0.05$)。结果见图 3。

3.4 对乳腺癌细胞 TGF- β 分泌的影响

与对照组相比, 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱组 MCF-7 细胞 TGF- β 分泌量分别下降 28.2%、52.1% ($P < 0.05$), MDA-MB-435 细胞 TGF- β 分泌分别下降 39.0%、55.1% ($P < 0.05$)。结果见图 4。



与对照组比较: * $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs control group, same as below

图 2 异长春花碱对乳腺癌细胞黏附能力的影响 ($n = 3$)
Fig. 2 Effect of VRB on adhesion of breast cancer cells ($n = 3$)

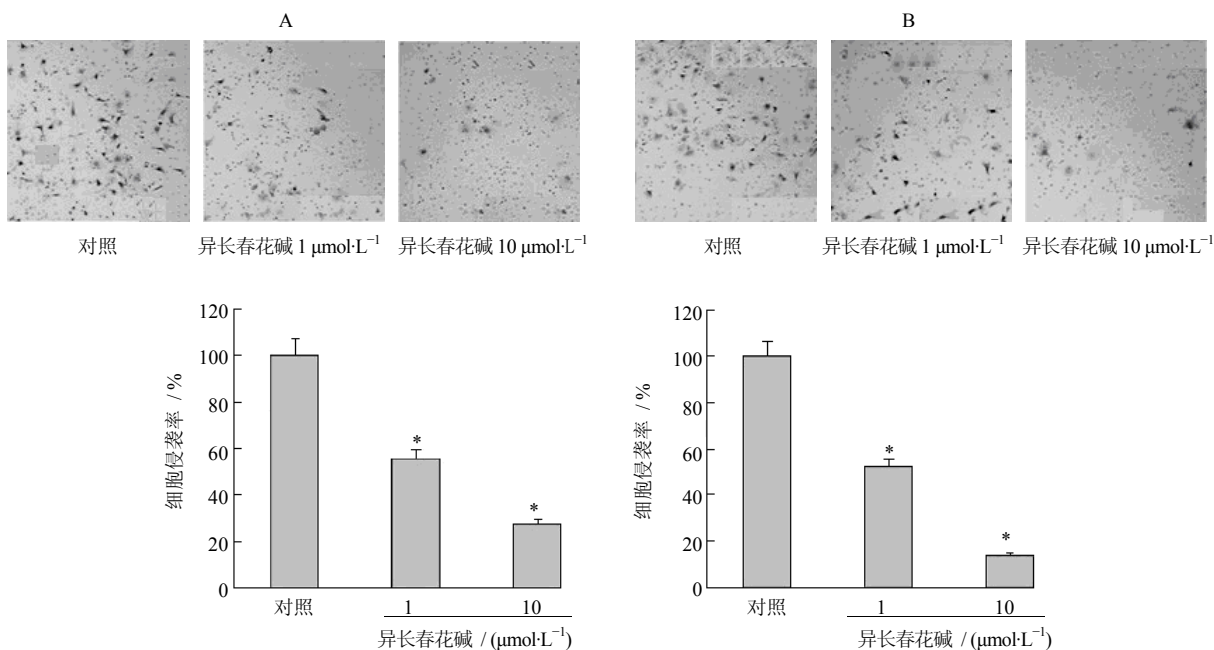


图 3 异长春花碱对乳腺癌 MCF-7 细胞 (A) 和 MDA-MB-435 细胞 (B) 侵袭能力的影响 ($n = 3$)
Fig. 3 Effect of VRB on invasion of breast cancer cells MCF-7 (A) and MDA-MB-435 (B) ($n = 3$)

3.5 对乳腺癌细胞转移相关基因和蛋白表达的影响

与对照组相比, MCF-7 细胞经 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱处理后, MMP-2 基因表达下调 71.6%、88.4%, MMP-9 基因表达下调 15.0%、84.0%; N-钙黏素基因表达下调 33.7%、74.1%, E-钙黏素基因表达上调 86.5%、181.6%。MDA-MB-435 细胞经 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱处理后, MMP-2 基因表达下调 57.4%、69.4%, MMP-9 基因表达下调 22.1%、73.0%; N-钙黏素基因表达下调 57.6%、76.9%, E-

钙黏素基因表达上调 116.6%、160.7%。结果见图 5。与对照组相比, MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞经 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱处理后, E-钙黏素蛋白表达均显著上调, N-钙黏素、MMP-2、MMP-9 蛋白表达均显著下调。结果见图 6。

3.6 对乳腺癌细胞转移相关信号通路的影响

Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, 经 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 异长春花碱处理后, MCF-7 和 MDA-MB-435 细胞 p-JNK、p-Akt 蛋白表达均显著

下降; 异长春花碱 1.10 μmol/L 组 MCF-7 细胞 AP-1 报告质粒活性下降 27.7%、68.2%, NF-κB 报告质粒活性下降 18.4%、44.8%; 与对照组相比, 异长春花碱 1、10 μmol/L 组 MDA-MB-435 细胞 AP-1 报告质粒活性下降 34.8%、71.4%, NF-κB 报告质粒活性下

降 24.4%、51.9%; 表明异长春花碱能抑制转录因子 JNK 和 Akt 的磷酸化, 以及 AP-1 和 NF-κB 转录因子的活化。结果见图 7。

4 讨论

乳腺癌是女性最常罹患的恶性肿瘤, 其转移是乳腺癌患者的首要致死原因。异长春花碱是临床治疗转移性乳腺癌的主要药物之一, 其通过作用于肿瘤细胞微管蛋白而干扰肿瘤细胞分裂、增殖, 从而发挥抑癌作用。本研究结果表明, 异长春花碱使乳腺癌细胞异质黏附能力、转移侵袭能力明显下降, 使 E-钙黏素表达上调、N-钙黏素表达下调, MMP-2 和 MMP-9 表达下调, 并促进肿瘤细胞转移的信号通路如 TGF-β 分泌减少、AP-1 和 NF-κB 活性下降、JNK 和 Akt 磷酸化程度降低, 表明异长春花碱抑制乳腺癌细胞转移可能与通过下调肿瘤细胞转移及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关信号通路有关。

EMT 是胚胎形态发展中的一个重要进程。EMT 时, 上皮细胞极性丢失, 与周围细胞和基质的接触

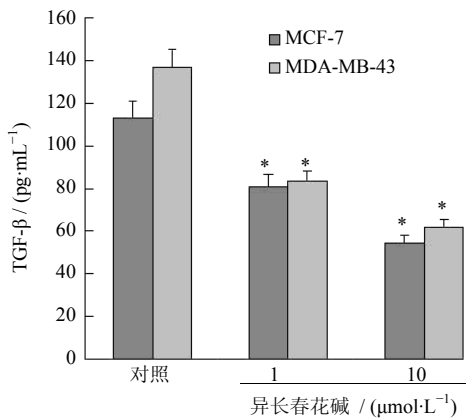


图 4 异长春花碱对乳腺癌细胞 TGF-β 分泌的影响 (n = 3)

Fig. 4 Effect of VRB on TGF-β secretion of breast cancer cells (n = 3)

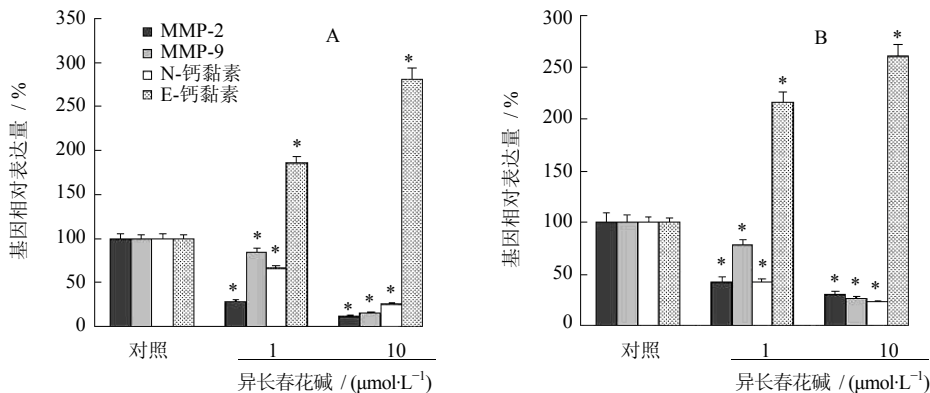


图 5 异长春花碱对乳腺癌 MCF-7 细胞 (A) 和 MDA-MB-435 细胞 (B) 转移相关基因表达的影响 (n = 3)

Fig. 5 Effect of VRB on mRNA expression of metastasis-related genes in breast cancer cells MCF-7 (A) and MDA-MB-435 (B) (n = 3)

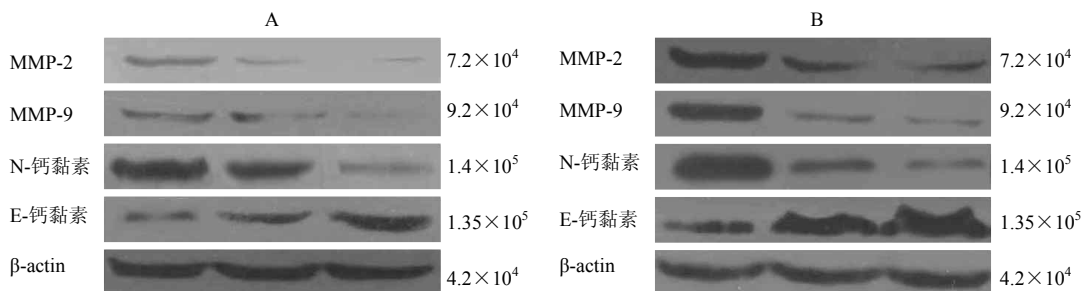


图 6 异长春花碱对乳腺癌 MCF-7 细胞 (A) 和 MDA-MB-435 细胞 (B) 转移相关蛋白表达的影响 (n = 3)

Fig. 6 Effect of VRB on metastasis-related protein expression in breast cancer cells MCF-7 (A) and MDA-MB-435 (B) (n = 3)

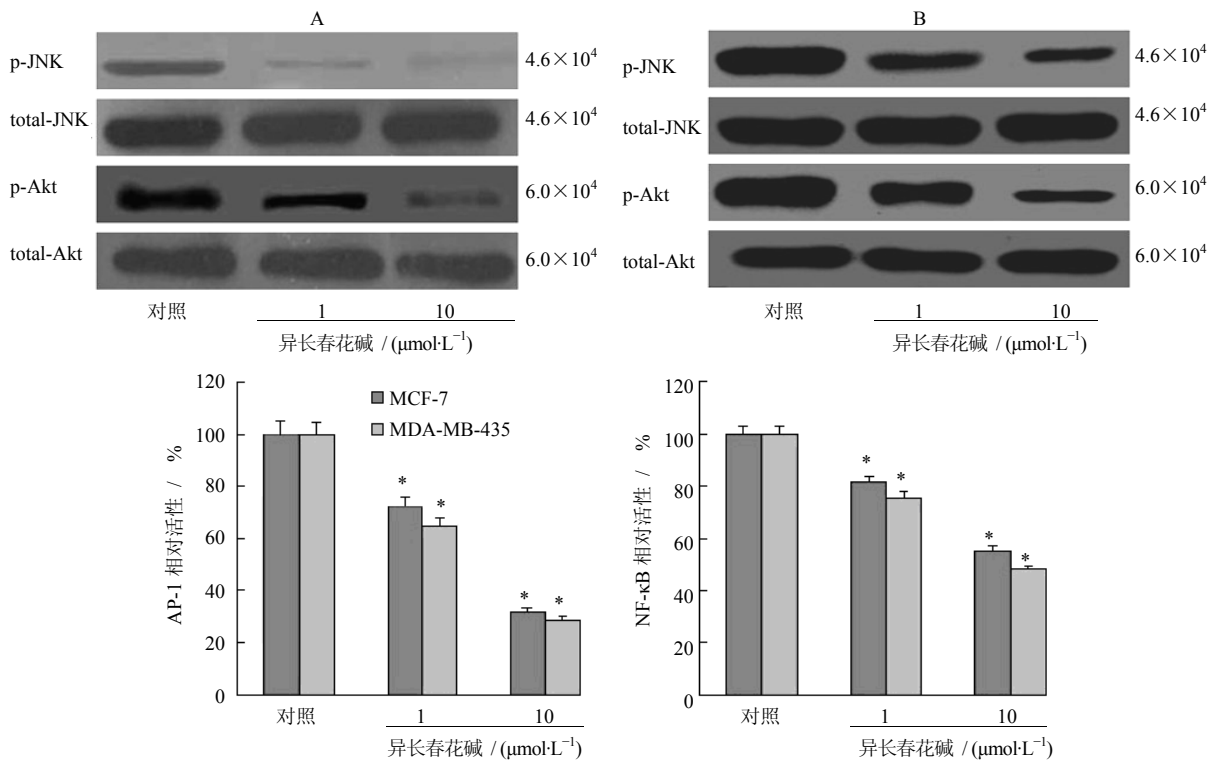


图7 异长春花碱对乳腺癌细胞 MCF-7 (A) 和 MDA-MB-435 (B) 转移相关信号通路的影响 (n = 3)

Fig. 7 Effect of VRB on metastasis-related signal pathway in breast cancer cells MCF-7 (A) and MDA-MB-435 (B) (n = 3)

减少, 细胞黏附力下降, 迁移和运动能力增加, 上皮细胞表现出间质细胞表型^[4-5]。同时上皮标记物, 如 E-钙黏素、角蛋白等表达降低, 间质标记物, 如 NCAD、VIM 等表达增加及 MMP-2 和 MMP-9 的表达增加^[6]。因此 EMT 在肿瘤转移中也起着重要作用, 是肿瘤细胞转移的重要机制之一^[7-9]。EMT 过程受多条信号通路的调控, 如 TGF- β 不仅参与胚胎发育过程中的 EMT, 也诱导肿瘤发展过程中的 EMT^[10]。过度表达 TGF- β 信号通路的效应分子 Smad 2 和 Smad 3, 可以促进在乳腺上皮细胞模型中 EMT 的发生^[11]。Smad 2 和 Smad 3 功能的下调则与乳腺癌细胞的转移潜力下降相关^[12]。此外, 参与 TGF- β 信号通路中众多激酶中, 如 RAS、JNK/AP-1、p38MAP 可协同促进 EMT^[10,13-14]。NF- κ B 是 EMT 的另一个关键调节信号通路^[5,15], 在 EMT 诱导和维持方面必不可少, 激活 NF- κ B 信号通路, 在无 TGF- β 存在的情况下也可诱导上皮细胞发生 EMT, 而抑制 NF- κ B 活性, 则可以阻止上皮细胞 EMT 的发生。PI3K-Akt 信号通路与肿瘤细胞的侵袭转移及 EMT 也密切相关, 其激活可增加细胞的侵袭和转移^[16]; Akt 的持续性表达能诱导 EMT, 赋予细胞侵袭和转

移所需的运动性^[17-18]。本研究结果显示异长春花碱使乳腺癌细胞 TGF- β 分泌减少、AP-1 和 NF- κ B 活性下降、JNK 和 Akt 磷酸化程度下降, 表明其可能通过抑制相关信号通路, 从而抑制 EMT 的发生, 抑制肿瘤细胞转移。

综上所述, 异长春花碱对乳腺癌转移具有一定的抑制作用, 作用机制可能与其抑制转移相关信号通路以及 EMT 有关。确切机制和更深层次的抗乳腺癌细胞转移机制还需进行更深入和多途径研究。

参考文献

- [1] 崔 萍, 霍长虹, 李力更, 等. 作用于微管的天然产物 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 139-147.
- [2] Capasso A. Vinorelbine in cancer therapy [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13(8): 1065-1071.
- [3] Galano G, Caputo M, Tecce M F, et al. Efficacy and tolerability of vinorelbine in the cancer therapy [J]. *Curr Drug Saf*, 2011, 6(3): 185-193.
- [4] Thierry J P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15(6): 740-746.
- [5] Huber M A, Kraut N, Beug H. Molecular requirements

- for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(5): 548-558.
- [6] Zeisberg M, Neilson E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6): 1429-1437.
- [7] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer onset and progression [J]. *Bull Acad Natl Med*, 2009, 193(9): 1969-1978.
- [8] Trimboli A J, Fukino K, de Bruin A, *et al*. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(3): 937-945.
- [9] Lim J, Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions: Insights from development [J]. *Development*, 2012, 139(19): 3471-3486.
- [10] Zavadil J, Bottinger E P. Tgf-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions [J]. *Oncogene*, 2005, 24(37): 5764-5774.
- [11] Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, *et al*. Tgf-beta and the smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition [J]. *Mol Biol cell*, 2005, 16(4): 1987-2002.
- [12] Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, *et al*. Integration of tgf-beta/smad and jagged1/notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *EMBO J*, 2004, 23(5): 1155-1165.
- [13] Buijs J T, Henriquez N V, van Overveld P G, *et al*. Tgf-beta and bmp7 interactions in tumour progression and bone metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24(8): 609-617.
- [14] Lv Z M, Wang Q, Wan Q, *et al*. The role of the p38 mapk signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e22806.
- [15] Huber M A, Azoitei N, Baumann B, *et al*. Nf-kappab is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(4): 569-581.
- [16] Wallin J J, Guan J, Edgar K A, *et al*. Active pi3k pathway causes an invasive phenotype which can be reversed or promoted by blocking the pathway at divergent nodes [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e36402.
- [17] Grille S J, Bellacosa A, Upson J, *et al*. The protein kinase akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2172-2178.
- [18] Li J, Zhou B P. Activation of beta-catenin and akt pathways by twist are critical for the maintenance of emt associated cancer stem cell-like characters [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11(2): 49-60.