

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000695

环巴胺阻断 Hedgehog 信号通路对食管癌 EC109 细胞
上皮间质化逆转的影响及机制

陈立前, 秦治明, 左小平, 郑相如, 刘 恒

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨环巴胺阻断 Hedgehog 通路对食管癌 EC109 细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的作用及其可能机制。**方法:**实验分为实验组和对照组, 实验组应用 Hedgehog 通路特异性阻断剂环巴胺作用食管癌 EC109 细胞 48 h。通过 real-time PCR 检测 Gli1 的表达变化, 观察细胞形态变化, 通过血管拟态实验检测血管形成能力变化, Transwell 小室侵袭和迁移实验、黏附实验分别检测细胞侵袭、迁移和黏附能力变化, real-time PCR 及 Western 印迹方法检测 EMT 相关标志物 E 钙粘蛋白(E-cadherin)、 β 连环蛋白(β -catenin)、波形蛋白(Vimentin)及 EMT 调控因子 Snail、Twist1 等的表达变化。**结果:**环巴胺阻断 EC109 细胞 Hedgehog 信号通路 Gli1 的 mRNA 表达明显减少为 $(41.819 \pm 20.150)\%$, 形态发生明显变化, 血管拟态个数较对照组 $[(2.780 \pm 0.424) \text{ vs. } (5.080 \pm 0.634)]$ 明显减少($t=-16.919, P=0.000$), 侵袭实验较对照组 $[(24.800 \pm 2.588) \text{ vs. } (55.400 \pm 4.879)]$ 和迁移实验较对照组 $[(23.200 \pm 1.924) \text{ vs. } (65.400 \pm 4.775)]$ 均明显减少($t=-12.390, P=0.000; t=-18.331, P=0.000$), 同种细胞间黏附增强($F=9.327, P=0.009$), 上皮表型标志物 E-cadherin 表达较对照组 $[(0.388 \pm 0.565) \text{ vs. } (0.228 \pm 0.582)]$ 明显上调($t=3.421, P=0.027$), 而间质表型 Vimentin、 β -catenin 的表达水平较对照组 $[(0.588 \pm 0.109) \text{ vs. } (0.507 \pm 0.051); (0.998 \pm 0.128) \text{ vs. } (0.756 \pm 0.038)]$ 明显下调($t=4.221, P=0.013; t=6.781, P=0.002$); 与对照组相比, 实验组细胞中转录因子 Snail 的表达较对照组 $[(0.401 \pm 0.021) \text{ vs. } (0.756 \pm 0.038)]$ 下调($t=6.774, P=0.002$), Twist1 的 mRNA 表达量相对于对照组也明显下调为 $(74.987 \pm 9.031)\%$ 。**结论:**环巴胺阻断 Hh 信号通路能明显逆转 EC109 细胞 EMT 过程, 其机制可能与下调转录因子 Snail 及 Twist1 表达有关。

【关键词】食管癌; 环巴胺; Hedgehog; 上皮间质化; 细胞黏附

【中图分类号】R735.1; R979.1+9

【文献标志码】A

【收稿日期】2015-01-09

Effect of cyclopamine inhibited hedgehog signaling pathway
on the reversion of epithelial-mesenchymal transition
in esophageal cancer cells and its mechanism

Chen Liqian, Qin Zhiming, Zuo Xiaoping, Zheng Xiangru, Liu Heng

(Department of Thoracocardiac Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To explore the effect of cyclopamine on epithelial-mesenchymal transition in human esophageal cancer EC109 cells and the possible mechanism. **Methods:** EC109 cells were cultured *in vitro*. After adding cyclopamine for 48 h, the expression of Gli1 was tested by real-time PCR, and morphological change of cells was observed by inverted microscope. The transwell chamber assay was used to examine the invasive and metastatic ability of EC109 cells treated with cyclopamine for 48 h. The ability of vascularization was observed by the method of vasculogenic mimicry and the ability of adhesion was detected by adhesion experiment. Real-time PCR and Western blot were used to detect the expressions of such EMT markers as E-cadherin, β -catenin and vimentin and such transcription factors as Snail, Twist1. **Results:** The inhibition of hedgehog signaling significantly reduced the mRNA expression of Gli1 $(41.819 \pm 20.150)\%$, and the invasion $[(24.800 \pm 2.588) \text{ vs. } (55.400 \pm 4.879)]$, migration capacities $[(23.200 \pm 1.924) \text{ vs. } (65.400 \pm 4.775)]$ of EC109 cells *in vitro* were decreased ($t=-12.390, P=0.000; t=-18.331, P=0.000$). Homogeneous cells intercellular

adhesion was increased ($F=9.327, P=0.009$), while heterogeneous cells intercellular adhesion was decreased ($F=20.459, P=0.000$). Angiogenesis capacity $[(2.780 \pm 0.424) \text{ vs. } (5.080 \pm 0.634)]$ was decreased ($t=-16.919, P=0.000$). The expression of E-cadherin increased $[(0.388 \pm 0.565) \text{ vs. } (0.228 \pm 0.582)]$ significantly ($t=$

作者介绍: 陈立前, Email: chenliqian2008@126.com,

研究方向: 食管癌的基础和临床研究。

通信作者: 秦治明, Email: zhimingqin@hotmail.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150709.1508.004.html>
(2015-07-09)

3.421, $P=0.027$), while Vimentin and β -catenin in the cyclopamine treatment group [(0.588 ± 0.109) vs. (0.507 ± 0.051) ; (0.998 ± 0.128) vs. (0.756 ± 0.038)] were significantly down-regulated ($t=4.221$, $P=0.013$; $t=6.781$, $P=0.002$). Compared to those in control group, the expressions of Snail were significantly reduced in the cyclopamine treatment group [(0.756 ± 0.038) vs. (0.401 ± 0.021)] ($t=-6.455$, $P=0.023$). Also, the mRNA expressions of Twist1 were significantly reduced (74.987 ± 9.031)%. **Conclusion:** The inhibition of hedgehog signaling pathway *in vitro* can effectually suppress the process of EMT, even reverse this process. The mechanism is partially correlated with the down-regulations of Snail and Twist1.

[Key words] esophageal cancer; cyclopamine; hedgehog; epithelial-mesenchymal transition; intercellular adhesion

食管癌的死亡率在所有肿瘤中排名第 6, 是常见八大肿瘤之一, 并且发展中国家明显高于发达国家^[1]。在中国, 食管癌的发病率及死亡率也居高不下。近年来, 尽管外科手术技术、影像学检查、新化疗药物不断发展, 但食管癌的预后仍不理想, 其原因是多数食管癌发生早期浸润及转移^[2]。而食管癌细胞早期运动和转移的基础是获得了原位癌移动的能力, 即上皮间质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[3]。EMT 是上皮细胞失去上皮特性获得间质细胞表型的一种生物学现象, 如 E 钙黏蛋白 (E-cadherin) 降低, 波形蛋白 (Vimentin) 增高。EMT 的过程由许多的分子事件包括信号通路组成^[4], Hedgehog (简称 Hh) 信号通路的活化与肿瘤发生发展、转移密切相关^[5-7], 在食管癌中, 运用环巴胺阻断该通路能否阻断或逆转 EMT 却鲜有报道。因此, 本实验以人食管癌 109 细胞系为研究对象, 通过环巴胺阻断 Hh 通路后, 检测细胞侵袭、迁移、黏附、血管形成能力及 EMT 相关指标的变化。

1 材料和方法

1.1 材料

人食管癌细胞系 EC109 购于上海生命科学院细胞所, 保存于重庆医科大学附属第一医院肿瘤实验室; RPMI1640 培养液 (Sigma 公司), 胎牛血清 (Hyclon), 环巴胺 (Apollo Scientific Ltd), 二甲基亚砷 (Sigma 公司), 胰蛋白酶 (Sigma 公司), snail 多克隆抗体 (CST), E-Cadherin、Vimentin 多克隆抗体 (abcam), β -catenin 多克隆抗体 (武汉三鹰), qPCR 试剂盒 (TAKARA 公司), Transwell 小室 (美国 Corning 公司), Matrigel 胶 (美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人食管癌细胞系 EC109 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 置于 37.0 °C、5%CO₂ 的培养箱中, 待细胞贴壁生长至瓶底的 80%~90% 时传代, 实验时取对数生长期的细胞。

1.2.2 实验分组 本实验设置 2 组: 实验组和对照组。实验组为用终浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ (通过 MTT 实验得出的 1/2IC₅₀) 的环巴胺处理 48 h 的 EC109 细胞, 对照组加入等量培养基培养 48 h 后进行实验。

1.2.3 细胞形态改变及血管拟态实验 将细胞以 3 000 个/孔种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后加入终浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的环巴胺, 48 h 后观察细胞形态改变, 并拍照。将 Matrigel 胶用无血清培养基稀释 (1:9) 后种于 96 孔板 (15 μL /孔, 实验组及对照组各 3 个平行孔), 取食管癌细胞制成 30 000 个/ml 的细胞悬液, 每孔加入 100 μL , 待细胞贴壁后, 实验组每孔加入终浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的环巴胺, 对照组加入等体积的无血清培养基, 共培养 5 d, 摄像并随机选取 5 处视野 (100 $\times$) 计录管腔形成数 (以细胞连接呈 C 形即算一个管腔)。

1.2.4 Transwell 小室检测细胞侵袭及迁移力实验 侵袭实验: 将 Matrigel 胶用无血清培养基 (1:4) 稀释后取 40 μL 铺在上室, 紫外线照射过夜, 实验前用 30 μL 培养基 37 °C 30 min 水化基底膜, 取 2 组细胞 1×10^5 个/400 μL 加入上室, 下室加 10% 胎牛血清培养液 600 μL , 培养 24 h, 棉签擦去上室内细胞, 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色、切膜、封片, 镜下随机选取 5 个不重叠视野计算穿膜细胞数并拍照。迁移实验: 上室内不铺胶, 16 h 终止实验, 余操作同前, 实验重复 3 次。

1.2.5 细胞黏附实验 取对数生长期 EC109、HUVEC 细胞, 消化、计数, 制成 2×10^5 个/ml 细胞悬液, 取 EC109 细胞以 100 μL /孔接种于 96 孔板的除第 1、7、12 列的 A~D 排孔内, 取同量 HUVEC 细胞接种于 96 孔板内上述各列的 E~H 排孔内, 培养过夜; 次日调整对照组、实验组细胞浓度为 2×10^5 个/ml, 以 100 μL /孔按要求加入前日接种有 EC109 细胞和细胞 HUVEC 细胞的 96 孔板中, 对照组细胞加至 96 孔板第 3 至 7 列 A~H 孔内, 实验组细胞加入第 8 至 12 列 A~H 孔内, 每隔 30 min 吸出 3、8 列, 4、9 列, 5、10 列, 6、11 列所有孔上清液; 均用 PBS 液洗 2 次, 加 100 μL /孔无血清培养基; 120 min 后将培养板离心, 吸出第 2、7、12 列所有孔内上清液, 加 100 μL /孔无血清培养基。所有孔内加 MTT (10 μL /孔), 4 h 后去上清液加 DMSO (150 μL /孔), 用酶标仪在 570 nm 波长处测吸光值 (A); 计算同 (异) 种黏附率 = [同 (异) 种各时间段 A 值 - 同 (异) 种空白组 A 值] / 对照组或实验组 A 值。

1.2.6 RNA 提取及 real-time PCR 实验组及对照组细胞用 Trizol 试剂提取总 RNA。按照 TAKARA 反转录使用说明书,

取 1 μl 样品 RNA 使用 10 μl 体系进行逆转录。按照试剂盒说明书使用 SYBR-Green 10 μl 体系进行 real-time PCR 实验,各引物序列如下: GAPDH, 上游 5'-cttggatcgtggaaggactc-3' 22 bp, 下游 5'-gtagaggcaggatgatgttct-3' 22 bp; Gli1, 上游 5'-ggcaaatagggtcacatagg-3' 22 bp, 下游 5'-gctcatccagaatagc-cacaaag-3' 23 bp; Vimentin, 5'-cgtgaataccaagacctgctc3' 21 bp, 5atcaaccagaggagtgaatc3' 21 bp; E-cadherin, 上游 5'-ggctctctc-caccactcca-3' 20 bp, 下游 5'-cctcgacacttcactctc-3' 20 bp; β -catenin, 上游 5'-cttacaccacccatccact-3' 20 bp, 下游 5'-gcac-gaacaagcaactgaac-3' 20 bp; Twist-1, 上游 5'-gagcaagattcagac-cctcaa-3' 21 bp, 下游 5'-atctccagaccgagaagg-3' 19 bp; Snail, 上游 5'-cttcgctgaccgctccaac-3' 19 bp, 下游 5'-ggactcttggtgc-ttgtg-3' 20 bp。以 GAPDH 为内参对结果进行分析,用相对量表示各基因的 mRNA 量,即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。重复 3 次独立实验。

1.2.7 Western blot 法检测蛋白量 取对数期生长的 2 组细胞,用蛋白裂解液提取总蛋白,并应用 Bradford 法测定蛋白浓度。分别取 2 组 20 μg 蛋白,在三羟基氨甲烷(Tris)、甘氨酸(Glycine)、十二烷基酸钠(Sodium dodecyl sulfate)的电泳液中,10%聚丙烯酰胺电泳分离后,电转移到聚偏二氟乙烯膜上,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h 后,分别加一抗(Snail、Vimentin、E-cadherin、 β -catenin 和 β -actin,工作浓度分别为 1:500、1:1 000、1:1 000、1:500 和 1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后,TBS 洗膜 3 次,加二抗(工作浓度 1:2 000)孵育 2 h 后洗膜 3 次。应用 ECL 荧光显色系统检测 ECL 杂交信号,暗室曝光。使用凝胶分析系统测定各蛋白条带的面积和灰度值。重复 3 次独立试验。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异的比较使用独立样本均数 t 检验和重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态改变

环巴胺处理 48 h 后的 EC109 细胞形态发生了明显变化,由原来狭长的纺锤体样转变成扁圆的鹅卵石样(见图1)。

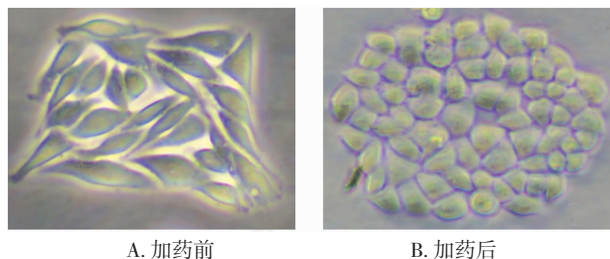
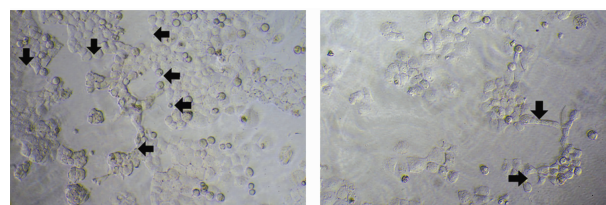


图 1 环巴胺处理 EC109 细胞 48 h 形态变化 (200 $\times$)

Fig.1 Comparison of the morphological of before and after cyclopamine treated EC109 cells (200 $\times$)

2.2 血管拟态实验

实验组血管拟态数为 (2.780 ± 0.424), 而对照组血管拟态数 (5.080 ± 0.634), 两组间差异有统计学意义 ($t=-16.919$, $P=0.000$), 见图 2。



A. 对照组

B. 实验组

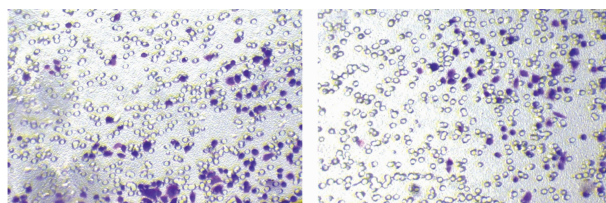
箭头处为血管拟态形成的位置

图 2 细胞血管拟态图 (100 $\times$)

Fig.2 The vascular mimicry of cells in two groups (100 $\times$)

2.3 Transwell 小室检测细胞侵袭及迁移力

侵袭实验: 实验组穿膜细胞数 (24.800 ± 2.588), 对照组穿膜细胞数为 (55.400 ± 4.879), 组间有明显差异 ($t=-12.390$, $P=0.000$), 见图 3。迁移实验: 实验组穿膜细胞数 (23.200 ± 1.924), 对照组穿膜数为 (65.400 ± 4.775), 2 组间差异有统计学意义 ($t=-18.331$, $P=0.000$), 见图 4。

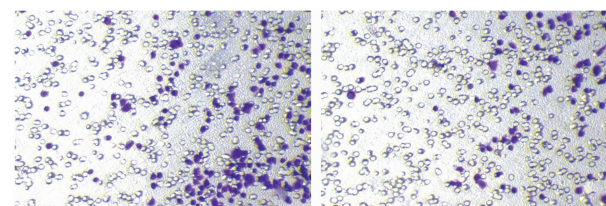


A. 对照组

B. 实验组

图 3 细胞侵袭力比较 (100 $\times$)

Fig.3 Comparison of the invasion force of cells in two groups (100 $\times$)



A. 对照组

B. 实验组

图 4 细胞迁移力比较 (100 $\times$)

Fig.4 Comparison of the migration force of cells in two groups (100 $\times$)

2.4 黏附实验

在黏附实验中, 各组细胞黏附率随时间延长而增加, 各时段细胞间黏附率与对照组相比, 实验组细胞同种细胞间黏附率增加, 异种间黏附率减少(表 1)。

表 1 同种及异种细胞间黏附率的比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

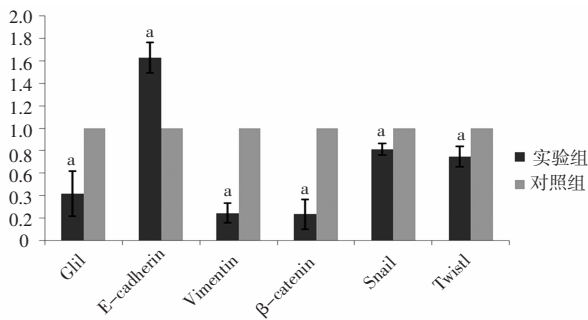
Tab.1 Comparison of the homogeneous and heterogeneous cells intercellular adhesion ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组		黏附率				组间		时间		组间 × 时间	
		30 min	60 min	90 min	120 min	F 值	P 值	F 值	P 值	F 值	P 值
同种	对照组	0.207 ± 0.054	0.346 ± 0.124	0.390 ± 0.043	0.394 ± 0.059	9.327	0.009	42.070	0.000	7.025	0.010
	实验组	0.237 ± 0.055	0.374 ± 0.121	0.494 ± 0.123 ^a	0.644 ± 0.129 ^a						
异种	对照组	0.342 ± 0.994	0.544 ± 0.133	0.634 ± 0.147	0.799 ± 0.241	20.459	0.000	35.510	0.000	3.372	0.027
	实验组	0.223 ± 0.068 ^a	0.332 ± 0.029 ^a	0.392 ± 0.111 ^a	0.462 ± 0.114 ^a						

注:实验组与对照组之间有统计学差异

2.5 Real-time PCR

结果显示实验组 Gli1 mRNA 表达相对对照组下降为 (41.819 ± 20.150)%, E-cadherin mRNA 表达上调为 (162.921 ± 13.388)%, Vimentin、β-catenin mRNA 表达分别下调为 (24.465 ± 8.553)%、(23.222 ± 13.048)%, Snail、Twist1 mRNA 表达量分别下调为 (81.187 ± 5.048)%、(74.987 ± 9.031)%, 见图 5。



注:a,实验组与对照组之间有统计学差异

图 5 Real-time PCR 检测实验组与对照组基因表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.5 Each gene expression in experiment and control groups detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.6 Western blot 检测 E-cadherin、Vimentin、β-catenin 及 Snail 蛋白的表达

Western blot 结果显示实验组 E-cadherin 的表达量明显较对照组增高 (P=0.027), 而 Vimentin、β-catenin 及 Snail 蛋白的表达量明显减少 (P=0.013; P=0.002; P=0.002), 见表 2、图 6。

表 2 4 种蛋白在各组间表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 Comparison of the protein expression among groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

蛋白质	对照组	实验组	t 值	P 值
E-cadherin	0.228 ± 0.582	0.388 ± 0.565	3.421	0.027
Vimentin	0.998 ± 0.128	0.588 ± 0.109	4.221	0.013
β-catenin	0.756 ± 0.038	0.507 ± 0.051	6.781	0.002
Snail	0.756 ± 0.038	0.401 ± 0.021	6.774	0.002

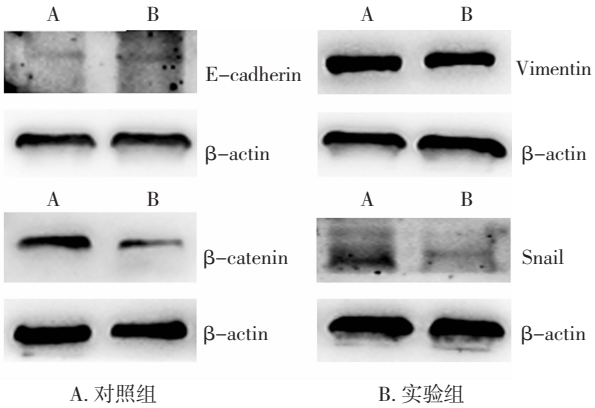


图 6 Western blot 法检测四种蛋白在各组的表达

Fig.6 Expression of protein by Western blot among groups

3 讨论

肿瘤的浸润转移是恶性肿瘤患者死亡的主要原因, 因此研究其机制, 对于降低恶性肿瘤患者的病死率至关重要。目前 EMT 在肿瘤浸润转移中的作用越来越引起关注。EMT 最初由 Greenburg 和 Hay^[8]提出, 在胚胎发育期, EMT 参与形成中胚层及内胚层间充质, 进一步形成不同的器官。而在肿瘤组织中, 肿瘤细胞通过 EMT 获得间充质特性后, 发生浸润、转移, 到达其他部位后形成转移灶。Hh 通路是一个具有较高保守性的通路, 该通路主要由两种跨膜蛋白 Ptch、Smo 及核转录因子 Gli 及下游的目的基因构成, 其最终效应因子为 Gli。而研究显示, Gli1 激活的下游目的基因与调控肿瘤细胞的产生、分化、增殖、侵袭、迁移和凋亡有关^[9]。环巴胺是一种异甾体类生物碱, 能够特异性地与 Smo 结合, 从而阻断 Hh 信号向下游传导。

Hh 通路异常活化参与恶性肿瘤的侵袭和转移, 可能与调控 EMT 的过程有关^[10]。本实验结果显示, 环巴胺处理 EC109 细胞 48 h 后, Hh 主要信号传导分子 Gli1 明显下降, 表明 Hh 信号通路受到抑制,

同时同种细胞间黏附力增强,异种细胞黏附力减弱,提示实验组肿瘤细胞之间更不易脱落,更难与异种细胞黏附而形成转移灶;细胞迁移和侵袭能力均明显减弱,同时伴随上皮细胞标志物 E-cadherin 表达明显升高,间质细胞标志物 Vimentin、 β -catenin 表达明显下降,提示环巴胺抑制 Hh 信号通路后逆转了 EMT 过程,使食管癌细胞的侵袭和转移能力下降。

当细胞发生 EMT 过程时,其特点之一就是 E-cadherin 的表达下降,E-cadherin 参与同种细胞间的黏附,其表达的下调与肿瘤的侵袭转移密切相关。EMT 的另一特点是间质表型标志物 Vimentin、N-cadherin、 β -catenin、Fibronectin 表达上调,其中 Vimentin 在许多上皮细胞癌中过表达,其过表达与肿瘤的生长、侵袭和不良预后密切相关^[1]。因此,在本实验中应用环巴胺抑制 Hh 通路后,通过测定 β -catenin、E-cadherin、Vimentin 的变化来检测 EMT 过程是否受逆转。有文献报道,转录因子 Snail、Twist、Slug、Zinc-finger E-box-binding1 (ZEB1)、Goosecoid (GSC) 和 Forkhead box C2 (FOXC2) 等可促使 EMT 的发生^[12-13]。本实验采用环巴胺抑制 Hh 通路后,结果显示 EMT 相关转录因子 Snail、Twist1 的表达明显下调,提示环巴胺抑制 Hh 通路后,可能是通过调控转录因子 Snail、Twist1 逆转其 EMT 过程。

血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)现象在肿瘤行为学中具有重要意义。而参与形成 VM 的肿瘤细胞模拟内皮细胞的功能和表型,而内皮细胞属于间充质细胞的一种,因而在 VM 形成过程中很可能发生 EMT 现象。有报道证实,增加 Twist1 的表达可明显提高肝细胞肝癌细胞形成 VM 管状结构的能力,而下调 Twist1 表达可降低这一能力^[14];通过小干扰 RNA 下调 ZEB1 表达不仅抑制了结肠癌细胞发生 EMT,还减少了 VM 的形成^[15]。本实验通过环巴胺阻断 Hh 通路后, Twist1、Snail 明显减少, EMT 过程发生逆转, VM 形成能力明显减弱。提示 EC109 细胞中的 Hh 通路异常活化可能促进 VM 形成,这一通路可能与控制 EMT 过程有关。

对肿瘤 EMT 的研究,能让人们对肿瘤侵袭和转移的机制有更深入的认识,从而对癌症的预防和治疗具有重大意义。本实验中,环巴胺阻断 Hh 通路使 EC109 细胞发生 EMT 逆转,并使其行为学发生改变,进一步肯定了环巴胺在对食管癌靶向治疗中的作用,并对食管癌的侵袭和转移调控提供了新的证据,

对靶向治疗药物的开发提供更多靶点。但 Hh 通路是怎样调控 EMT 相关转录因子的表达, EMT 是通过什么途径影响 VM 形成,尚待进一步研究阐明。

参 考 文 献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [2] Qi YJ, Chao WX, Chiu JF. An overview of esophageal squamous cell carcinoma proteomics[J]. *J Proteomics*, 2012, 75(11): 3129-3137.
- [3] Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration[J]. *Dev Biol*, 2012, 366(1): 34-54.
- [4] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. *Nat Rev Can*, 2013, 13(2): 97-110.
- [5] Maitah MY, Ali S, Ahmad A, et al. Up-regulation of sonic hedgehog contributes to TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition in NSCLC cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16068.
- [6] Ohta H, Aoyagi K, Fukaya M, et al. Cross talk between hedgehog and epithelial-mesenchymal transition pathways in gastric pit cells and in diffuse-type gastric cancers[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(2): 389-398.
- [7] Briscoe J, Théron PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(7): 416-429.
- [8] Greenburg, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells[J]. *J Cell Biol*, 1982, 95(1): 333-339.
- [9] Zhu H, Lo HW. The human glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) family of transcription factors in gene regulation and diseases[J]. *Curr Genomics*, 2010, 11(4): 238-245.
- [10] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 22(3): 271-275.
- [11] Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(18): 3033-3046.
- [12] Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, et al. Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(20): 3317-3324.
- [13] Yang MH, Hsu DS, Wang HW, et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(10): 982-992.
- [14] Sun T, Zhao N, Zhao XL, et al. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma; its role in vasculogenic mimicry[J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 545-556.
- [15] Liu Z, Sun B, Qi L, et al. Zinc finger E-box binding homeobox 1 promotes vasculogenic mimicry in colorectal cancer through induction of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(4): 813-820.

(责任编辑:唐宗顺)