

其他肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001689

过表达 OTUD1 对结肠癌细胞 HCT116 增殖和侵袭的影响及机制研究

孟小琴¹, 李云峰¹, 周毅², 缪怡¹, 董坚¹

(1. 昆明医科大学第三附属医院结直肠科, 昆明 650051; 2. 陆军军医大学第二附属医院肿瘤研究所, 重庆 400037)

【摘要】目的:探讨卵巢癌结构域蛋白酶-1(ovarian tumor domain-containing protease-1, OTUD1)基因对人结肠癌细胞 HCT116 增殖和侵袭的作用及机制。**方法:**选取低表达 OTUD1 的人结肠癌细胞株, 利用慢病毒包装技术过表达 OTUD1 基因, 空载质粒作对照, 嘌呤霉素筛选后构建稳定转染的结肠癌细胞株。RT-PCR(reverse transcription PCR)和 Western blot 技术检测转染效率。细胞迁移和侵袭实验检测 2 组细胞迁移和侵袭能力的改变。细胞增殖实验和流式细胞术检测 2 组细胞增殖能力的变化。克隆形成实验检测 2 组细胞的克隆形成能力。Western blot 技术分析相关蛋白分子水平的变化, 探讨其可能的机制。**结果:**6 株结肠癌细胞株中 HCT116 细胞的 OTUD1 蛋白表达水平最低, 并成功构建过表达 OTUD1 基因的结肠癌细胞株 HCT116-OTUD1。与对照组 HCT116-Control 细胞相比, HCT116-OTUD1 细胞株迁移($P=0.000$)和侵袭能力减弱($P=0.000$), CCK-8 增殖实验显示实验组细胞增殖水平下降($P=0.004$), EDU 流式检测结果显示细胞增殖水平下降($P=0.000$), 克隆形成能力下降($P=0.017$)。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相关分子 E-cadherin 表达水平上调, Vimentin 表达水平下调, 增殖相关信号通路分子 p-AKT、p-ERK1/2 表达水平下调。**结论:**过表达 OTUD1 可以通过减弱细胞的 EMT 作用来影响其迁移和侵袭能力, 并抑制细胞的增殖能力, 这种变化可能与 MAPK/Erk 和 PI3K/Akt 信号通路的激活受到抑制有关。

【关键词】卵巢癌结构域蛋白酶-1; 结肠癌; 上皮间质化; 迁移与侵袭; 增殖

【中图分类号】R735.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2017-11-27

Overexpression of OTUD1 in HCT116 cells inhibits cell growth, migration and invasion

Meng Xiaoqin¹, Li Yunfeng¹, Zhou Yi², Miao Yi¹, Dong Jian¹

(1. Department of Colorectal Surgery, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University;

2. Institute of Cancer, Xinqiao Hospital, Army Military Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects and mechanism of OTUD1 gene on proliferation and invasion of human colon cancer line HCT116. **Methods:** Human colon cancer cell lines with lower expression of OTUD1 were selected. The OTUD1 gene in HCT116 cells was over expressed by lentivirus infection technique, and empty vector was used as control. After screening by puromycin, HCT116 cells with stably expressed of OTUD1 was constructed. RT-PCR and Western blot were used to detect the transfection efficiency. The abilities of migration and invasion in vitro were observed by Transwell assay. The CCK-8 cell proliferation assay was used to detect the proliferation ability. The colony formation ability was measured by colony forming assay. The changes of associated molecular level was detected by Western blot to predict its possible mechanism. **Results:** The expression of OTUD1 in HCT116 cells was the lowest in the 6 human colon cancer cell lines. HCT116-OTUD1 cells with stably-expressed OTUD1 were successfully established. Compared with that of control group, the migration and invasion ability of HCT116-OTUD1 cells was decreased($P=0.000$), the proliferation ability was inhibited($P=0.004$), the clone formation ability was decreased($P=0.017$), EDU level performed by flow cytometry was down-regulated($P=0.000$). Furthermore, the EMT-associated molecule E-cadherin was up-regulated, while Vimentin was down-regulated, and the proliferation associated molecule p-AKT and p-ERK were down-regulated. **Conclusion:** OTUD1 might promote HCT116 cells proliferation, migration and invasion.

【Key words】 ovarian tumor domain-containing protease 1; colon cancer; epithelial mesenchymal transition; migration and invasion; proliferation

作者介绍: 孟小琴, Email: 254855650@qq.com,

研究方向: 结直肠癌的研究和防治。

通信作者: 董坚, Email: dongjian18@yahoo.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81502045)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180504.1103.016.html>

(2018-05-04)

结肠癌是世界上第三常见的恶性肿瘤,在我国 2015 年的癌症数据统计中,结肠癌的发病率位居第三位,致死率位居第四位,且呈逐年上升趋势^[1]。随着医学的不断进步,虽然在治疗转移性结肠癌上已经有了一些新型药物和小分子制剂的出现。但是在诊断和治疗局部晚期病人上仍然收效甚微。由于近年来尚无有效的靶标进行结肠癌的早期筛查,因此寻找结肠癌转移的新标志物并阐明其发生机制对早期诊断、早期干预、早期治疗并评估患者的预后具有至关重要的作用。既往研究发现多个去泛素化酶在结直肠癌的发生发展和耐药过程中都发挥着不同程度的作用,如去泛素化酶的癌基因泛素醛结合物 1 (OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 1, OTUB1)、泛素特异性蛋白酶 46 (ubiquitin-specific protease 46, USP46)、泛素特异性蛋白酶 22 (ubiquitin-specific protease 22, USP22)、泛素羧基末端酯酶 1 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, UCHL1)、泛素特异性蛋白酶 9 (ubiquitin-specific protease 9X, USP9X)^[2-5]。OTUD1 基因是卵巢肿瘤相关去泛素化酶家族中的一员,目前研究发现 OTUD1 的一个重要功能就是在卵巢癌中具有稳定 p53 蛋白的作用^[6]。且发现 OTUD1 作为抑癌基因在乳腺癌中通过改变细胞的 EMT 作用来影响肿瘤的转移和侵袭^[7]。因此本研究推测 OTUD1 基因在结肠癌的发生发展中可能也发挥着类似的重要作用。

本研究以低表达 OTUD1 的人结肠癌细胞株 HCT116 作为实验对象,通过慢病毒包装技术过表达 OTUD1 基因,观察并分析 OTUD1 在调控 HCT116 细胞的生长、迁移和侵袭中可能的机制。旨在为结肠癌的早期诊断和治疗靶点药物的开发上提供一些新的思路和方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 结肠癌细胞株 HCT116、HCT15、HT29、SW1116、DLD-1、SW480、人胚肾上皮细胞 293T 均购自美国模式培养保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.2 主要试剂与材料 pWXLD 慢病毒包装系统购自 System Bioscience 公司;细胞培养基 DMEM、1640、胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco 公司;RIPA 裂解液、Western blot 显色液、CCK-8 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂购自罗氏公司;磷酸化酶抑制剂购自凯基生物科技发展有限公司;兔抗人—抗 E-cadherin、Vimentin、p-Akt、p-Erk1/2、GAPDH 均购自 Cell Signal Technology 公司;兔抗人—抗 OTUD1

购自 Sigma 公司;山羊抗兔二抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司;RNA 抽提试剂盒 TRIZOL[®] Reagent、实时荧光定量 PCR 试剂 SYBR Green PCR Kit 购自 Invitrogen 公司;质粒抽提试剂盒 E.Z.N.A[®] Plasmid Miniprep Kit 购自 Omega Bio-tek 公司;EDU 法细胞增殖流式检测试剂盒购自广州易锦生物技术有限公司;细胞侵袭装置系统 Transwell chamber、Matrigel matrix 基质胶购自 BD Bioscience 公司;逆转录试剂盒购自 TAKARA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HCT116 以含 10%FBS 的 1640 培养基, HT29、HCT15、SW1116、DLD-1、SW480、人胚肾细胞 293T 以含 10%FBS 的 DMEM 培养基,于 5%CO₂ 培养箱中培养,待细胞长至培养瓶底面积 90%左右时传代。

1.2.2 慢病毒包装及细胞感染 用脂质体转染法将质粒 pWXLD-OTUD1 和空载体 pWXLD 质粒分别和慢病毒包装质粒共转到 293T 细胞中,收集 48 h 病毒液。在慢病毒感染前 1 d,将 HCT116 细胞以每孔 6×10^5 个细胞接种于 6 孔板中,次日弃旧的培养基,加入 1:1 的病毒液和完全培养基的混合液,培养 48 h 后,加入 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的嘌呤霉素,1 周后筛选得到稳定过表达 OTUD1 的 HCT116 细胞。

1.2.3 RT-PCR 检测 mRNA 水平的表达 根据试剂盒说明书用 TRIZOL 法提取细胞总 RNA,使用 TAKARA 试剂盒逆转录得到 cDNA,通过 RT-PCR 分析检测细胞中 OTUD1 的 mRNA 水平。引物如下:OTUD1 的上游引物为 5'-ACTGC-CTCTACCGAGCTGTCA-3',下游引物为 5'-CCACGTCGCC-CTCAATCA-3'; β -Actin 的上游引物为 5'-TGGCACCCA-GCACAATGAA-3',下游引物为 5'-CTAAGTCATAGTCCGC-CTAGAAGCA-3'。

1.2.4 Western blot 检测相关蛋白表达 收集细胞提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。各组分别提取蛋白 80 μg 进行上样,经过 2 h 电泳和 1 h 转膜后,放入含 5%BSA 的 TBS 液中封闭 2 h,加入一抗 OTUD1 (1:500)、E-cadherin (1:1 000)、Vimentin (1:1 000)、p-Akt (1:400)、p-Erk1/2 (1:500)、Akt (1:200)、Erk1/2 (1:200)、GAPDH (1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 轻摇过夜。TBST (1:500) 洗膜 5 次 $\times$ 5 min,加入山羊抗兔二抗 (1:2 000),室温孵育 2 h, TBST (1:500) 洗膜 5 次 $\times$ 5 min,按 1:1 配制化学显色液,迅速置于凝胶成像系统中成像分析并保存曝光图片。

1.2.5 细胞迁移、侵袭实验 待 HCT116-Control 细胞和 HCT116-OTUD1 细胞达到对数生长期,消化计数细胞,用无血清 1640 培养基重悬细胞至每毫升 1×10^6 个细胞,将水化后的 Transwell 小室置于 24 孔板中,上室加入 100 μL 细胞悬液,下室加入 800 μL 含 15%FBS 的 1640 培养基,细胞侵袭实验时在小室里面提前加入 Matrigel 胶,每组设置 3 个复孔,16~24 h 后,将 Transwell 小室放入无水甲醇中固定 10 min,再置于结晶紫染液中染色 10 min, PBS 液漂洗后风干,取 5 个视野照相计数。

1.2.6 CCK-8 法细胞增殖实验 待 HCT116 细胞达到对数生长期后,消化计数细胞,以每孔 4 000 个细胞接种于 96 孔

板,并于接种 6、24、48、72、96 h 后弃旧的培养液,再分别加入含 10% CCK-8 试剂的完全培养基 100 μ L/小室,继续培养 1.5 h 后,置于全自动酶标仪下检测 450 nm 处吸光度值,并绘制细胞增殖曲线图。

1.2.7 流式细胞术检测细胞增殖 将 HCT116 细胞以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,待细胞达到对数生长期,按照 EDU 法细胞增殖流式检测试剂盒说明书对细胞进行标记,孵育 2 h 后将细胞转移至 1.5 mL 的 EP 管中,进行细胞的固定和透膜处理,最后加入 500 μ L 的 $1 \times$ iClick 反应液(配制方法见产品说明书),孵育半小时后,加入 3 mL $1 \times$ iClick permeabilization and wash reagent 重悬细胞,离心弃上清,重复 1 次后加入流式上样 buffer,使用流式细胞仪进行检测分析。

1.2.8 细胞克隆形成实验 待 HCT116 细胞达到对数生长期后,消化计数细胞,以每孔 400 个细胞接种于 6 孔板中,每组 3 复孔,培养 11 d,弃旧的培养液后甲醇固定 10 min,结晶紫染色 10 min,PBS 清洗 2 遍后,风干,拍照计数克隆形成数。

1.3 统计分析

统计分析采用 SPSS 软件包(标准版 17.0),结果均以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,双尾 t 检验用于分析相关实验数据,每个实验至少重复 3 次。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 稳定过表达 OTUD1 结肠癌细胞株的建立

6 株结肠癌细胞中 HCT116 和 HT29 的 OTUD1 表达水平较低,本实验选用 HCT116 细胞作为主要研究对象(图 1A)。应用慢病毒包装技术过表达 OTUD1 基因,采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测感染效率,根据实验结果显示(图 1B、C),RT-PCR 实验中对照组细胞 OTUD1 在 mRNA 水平为 1.00 ± 0.06 ,实验组为 2.36 ± 0.20 ($t=11.420$, $P=0.000$);HCT116-OTUD1 细胞在 mRNA 和蛋白水平都明显高于对照组。

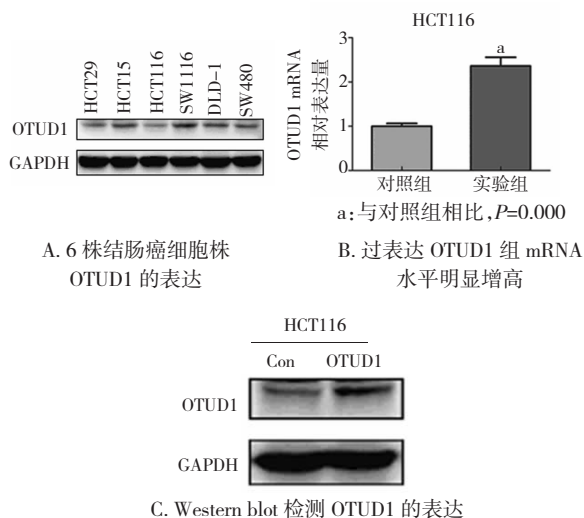


图 1 HCT116 细胞中 OTUD1 的表达水平

Fig.1 Expression level of OTUD1 in HCT116 cells after overexpression of OTUD1

2.2 过表达 OTUD1 基因抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力

利用 Transwell 细胞迁移和侵袭实验,对比 HCT116-OTUD1 细胞和对照组 HCT116-Control 细胞的迁移和侵袭能力(图 2)。实验结果显示,迁移实验中对对照组细胞穿膜数目为 98.40 ± 8.08 ,实验组为 30.40 ± 4.39 ($t=16.530$, $P=0.000$);侵袭实验中对对照组穿膜数目为 68.00 ± 4.85 ,实验组为 19.20 ± 4.87 ($t=15.880$, $P=0.000$);表明过表达 OTUD1 基因抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力。

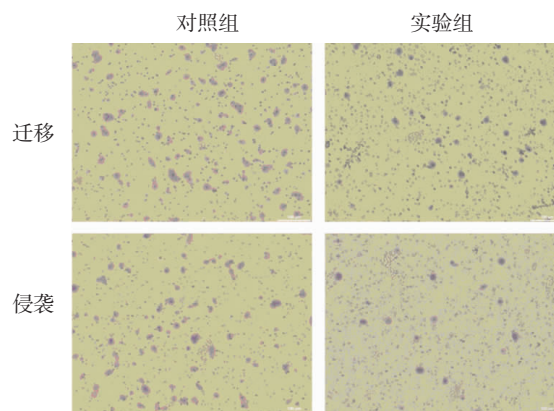


图 2 OTUD1 基因抑制 HCT116 细胞的迁移和侵袭能力
Fig.2 OTUD1 inhibits the migration and invasion of HCT116 cells

2.3 过表达 OTUD1 基因抑制 HCT116 细胞的增殖

利用细胞增殖实验、流式细胞术检测实验对比过表达前后 2 组细胞的增殖能力(图 3)。根据 CCK-8 细胞增殖实验结果显示,72 h 时对照组细胞增殖率为 13.61 ± 0.76 ,实验组为 11.34 ± 0.62 ($t=3.991$, $P=0.016$);96 h 时对照组细胞增殖率为 16.45 ± 0.60 ,实验组为 12.41 ± 0.96 ($t=6.161$, $P=0.004$);根据流式细胞术检测结果显示,对照组 EDU 阳性率为 34.00 ± 1.93 ,实验组为 21.50 ± 1.45 ($t=8.967$, $P=0.000$);2 项实验均表明过表达 OTUD1 基因可以抑制细胞的增殖能力。

2.4 过表达 OTUD1 基因抑制 HCT116 细胞的克隆形成能力

利用细胞克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力(图 4)。根据实验结果显示对照组克隆形成数为 112.67 ± 13.43 ,实验组为 150.00 ± 9.54 ($t=3.926$, $P=0.017$);表明过表达 OTUD1 基因可以抑制 HCT116 细胞的克隆形成能力。

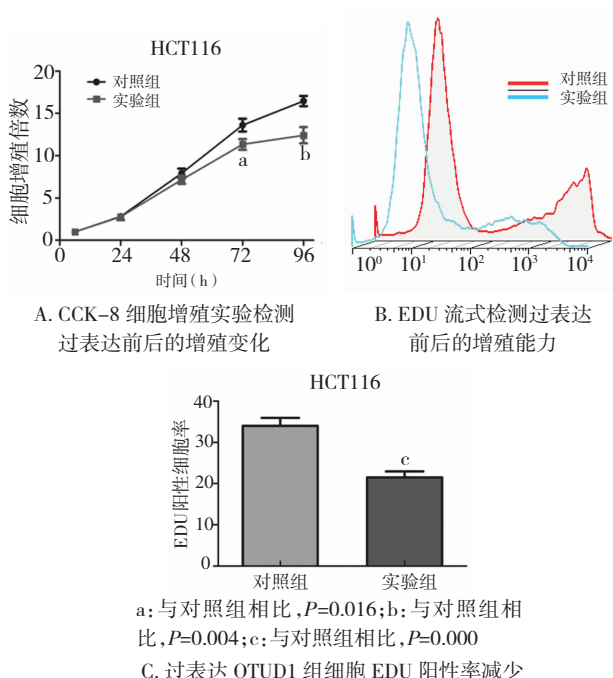


图3 OTUD1 抑制 HCT116 细胞的增殖能力

Fig.3 OTUD1 inhibits the proliferation of HCT116 cells

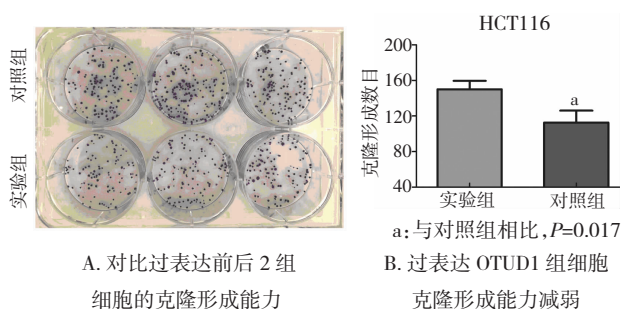


图4 过表达 OTUD1 基因抑制 HCT116 细胞的克隆形成能力

Fig.4 OTUD1 inhibits the clone formation ability of HCT116 cells

2.5 过表达 OTUD1 基因前后细胞蛋白水平的变化

实验结果显示上皮标志物 E-cadherin 表达上调,间充质标志物 Vimentin 表达下调(图 5A),说明过表达 OTUD1 基因后 HCT116 细胞的 EMT 作用减弱,侵袭能力受到抑制。本次实验检测了 2 组细胞中 p-Akt、p-Erk1/2 蛋白水平都有不同程度下调(图 5B),且 Akt、Erk1/2 无明显变化,说明过表达 OTUD1 基因后 MAPK/Erk 和 PI3K/Akt 信号通路的激活受到明显抑制。

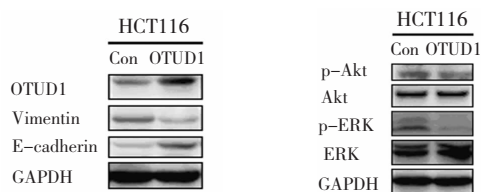


图5 HCT116-Control 和 HCT116-OTUD1 在相关蛋白水平的变化

Fig.5 OTUD1 inhibits the expression of Vimentin, E-cadherin and p-AKT, p-ERK

3 讨论

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,是导致癌症患者死亡的主要因素之一,其中大多数患者明确诊断时已出现肝转移。Scheele 等总结了 1 718 例 CRC 肝转移患者的治疗及预后,其中 434 例患者行手术治疗后中位生存期为 30 个月,不能手术治疗的患者中位生存期仅有 6.9 个月^[8-9]。因此,如何提高手术切除率成为结肠癌患者治疗的关键因素之一。提高结肠癌患者的手术切除率的一个方法就是早期预测和早期干预。目前预测复发和转移的标志物主要是癌胚抗原(carcinoembryonic, CEA),但 CEA 不是一个敏感的指标,其特异性为 84%,敏感性只有 34%,而且中位检出时间是 4.5 个月^[10]。因此寻找敏感性更高的生物标志物来预测转移和评估预后,对于结肠癌患者的综合治疗非常重要。

泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, USP)是人体主要的细胞内蛋白降解途径,对许多病理和生理过程发挥重要作用,包括细胞周期调控、细胞凋亡、炎症、信号转导和应激等^[11-13]。该途径是一可逆过程,其中去泛素化酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)是一种逆转泛素化过程的蛋白酶,研究表明 DUBs 在细胞周期调控、肿瘤发生、神经退行性疾病中等都扮演了重要角色^[14-15],卵巢癌结构域蛋白酶(ovarian tumor domain-containing protease, OTUD)是去泛素化酶家族的主要成员,其中 OTUD1 蛋白广泛表达于人类的很多组织,如肾、肠、脑、肝、肺等^[14]。

EMT 是存在生物体的一个重要生理过程,是指上皮细胞通过多个特定的程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,在胚胎植入、发育与器官形成、损伤修复、组织再生和器官纤维化等过程中发挥重要作用^[16-18]。EMT 被认为是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。肿瘤细胞发生 EMT 及侵袭转移是由细胞内一系列基因表达决定的。EMT 发生过程中,细胞膜 E-cadherin 表达减少被认为是最重要的事件^[19]。既往研究发现 E-cadherin 在结直肠癌的侵袭过程中扮演重要角色。结直肠癌组织和转移组织中 E-cadherin 的表达明显低于正常黏膜组织^[20]。现在 Vimentin 被认为是 EMT 过程中重要的分子,大量实验证明,在上皮向间质转化的过程中,这种表达于间质的蛋白会在上皮来源的细胞中过表达。在上皮来源的肿瘤中, Vimentin 异常高表达,导致前列腺癌、胃癌、肺癌、

黑色素瘤、神经系统肿瘤以及肝癌等多种肿瘤的进展和转移^[21]。结直肠癌组织中,Vimentin 表达在肿瘤细胞间质中,而且主要在间质成纤维细胞、微血管内皮细胞和肿瘤浸润的淋巴细胞中表达,其在间质细胞中的高表达也反映了该结直肠癌患者肿瘤高度恶性,预后较差^[22]。在本次研究中发现 OTUD1 抑制结肠癌细胞株的迁移和侵袭,并通过调控结肠癌细胞株 E-cadherin、Vimentin 等 EMT 相关分子的表达,但是 OTUD1 是如何调控这些分子表达的,其潜在的调控机制是什么还需要在将来的工作中继续探讨。

近年研究发现,PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路在多种肿瘤组织中过度表达和活化^[23]。研究表明,MAPK/Erk 和 PI3K/Akt 信号通路在结肠癌中处于高表达的激活状态^[24]。同样,本次研究中发现 OTUD1 基因可以抑制结肠癌细胞 HCT116 的增殖,同时检测到 PI3K/Akt 和 MAPK/Erk 信号通路的活化也受到相应的抑制。

本课题发现 OTUD1 在体外能够抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭,同时能够抑制结肠癌细胞的增殖。OTUD1 通过调控 E-cadherin 和 Vimentin 等 EMT 相关分子的表达来抑制结肠癌细胞 HCT116 的迁移和侵袭;并通过调控 MAPK/Erk 和 PI3K/Akt 信号通路来抑制结肠癌细胞 HCT116 的增殖。将来,OTUD1 可能作为一个新的抑癌因子标志物预测结肠癌患者的转移和预后。

参 考 文 献

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132
- [2] Zhou Y,Wu J,Fu X,et al. OTUB1 promotes metastasis and serves as a marker of poor prognosis in colorectal cancer[J]. Mol Cancer,2014,13:258.
- [3] Liu YL,Yang YM,Xu H,et al. Aberrant expression of USP22 is associated with liver metastasis and poor prognosis of colorectal cancer[J]. J Surg Oncol,2011,103(3):283-289.
- [4] Harris DR,Mims A,Bunz F. Genetic disruption of USP9X sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil[J]. Cancer Biol Ther,2012,13(13):1319-1324.
- [5] Zhong J,Zhao M,Ma Y,et al. UCHL1 acts as a colorectal cancer oncogene via activation of the beta-catenin/TCF pathway through its deubiquitinating activity[J]. Int J Mol Med,2012,30(2):430-436.
- [6] Piao S,Pei HZ,Huang B,et al. Ovarian tumor domain-containing protein 1 deubiquitinates and stabilizes p53[J]. Cell Signal,2017,33:22-29.
- [7] Mehić M,de Sa VK,Hebestreit S,et al. The deubiquitinating enzymes USP4 and USP17 target hyaluronan synthase 2 and differentially affect its function[J]. Oncogenesis,2017,6(6):e348.
- [8] Scheele J,Stang R,Altendorf-Hofmann A,et al. Resection of colorectal liver metastases[J]. World J Surg,1995,19(1):59-71.
- [9] Sadahiro S,Suzuki T,Ishikawa K,et al. Recurrence patterns after curative resection of colorectal cancer in patients followed for a minimum of ten years[J]. Hepatogastroenterology,2003,50(53):1362-1366.
- [10] Fakih MG,Padmanabhan A. CEA monitoring in colorectal cancer. What you should know[J]. Oncology,2006,20(6):579-587.
- [11] Campello L,Esteve-rudd S,Cuencan N,et al. The ubiquitin-proteasome system in retinal health and disease[J]. Mol Neurobiol,2013,47(2):790-810.
- [12] D'arcy P,Lindery S. Molecular pathways:translational potential of deubiquitinases as drug targets[J]. Clin Cancer Res,2014,20(15):3908-3914.
- [13] Sahara K,Kogleck L,Yashiroda H,et al. The mechanism for molecular assembly of the proteasome[J]. Adv Biol Regul,2014,54:51-58.
- [14] Nijman SM,Lunavargas MP,Velds A,et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes[J]. Cell,2005,123(5):773-786.
- [15] Atanassov BS,Koutelou E,Dent SY. The role of deubiquitinating enzymes in chromatin regulation[J]. FEBS Lett,2011,585(13):2016-2023.
- [16] Vicovac L,Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation[J]. Acta Anat (Basel),1996,156(3):202-216.
- [17] Bischof P,Aplin JD,Bentin-Ley U,et al. Implantation of the human embryo:research lines and models. From the implantation research network 'Fruitful'[J]. Gynecol Obstet Invest,2006,62(4):206-216.
- [18] Zeisberg EM,Tarnavski O,Zeisberg M,et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med,2007,13(8):952-961.
- [19] Thiery JP,Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2006,7(2):131-142.
- [20] Kwak JM,Min BW,Lee JH,et al. The prognostic significance of E-cadherin and liver intestine-cadherin expression in colorectal cancer[J]. Dis Colon Rectum,2007,50(11):1873-1880.
- [21] 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.
- [22] Ngan CY,Yamamoto H,Seshimo I,et al. Quantitative evaluation of vimentin expression in tumour stroma of colorectal cancer[J]. Br J Cancer,2007,96(6):986-992.
- [23] Machado VA,Peixoto D,Queiroz MJ,et al. Antiangiogenic 1-Aryl-3-[3-(thieno[3,2-b]pyridin-7-ylthio)phenyl]ureas Inhibit MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cell lines through PI3K/Akt and MAPK/Erk pathways[J]. J Cell Biochem,2016,117(12):2791-2799.
- [24] Shebaby WN,Bodman-Smith KB,Mansour A,et al. Daucus carota pentane-based fractions suppress proliferation and induce apoptosis in human colon adenocarcinoma HT-29 cells by inhibiting the MAPK and PI3K pathways[J]. J Med Food,2015,18(7):745-752.

(责任编辑:冉明会)