

文章编号:1000-5404(2014)20-2087-06

论著

敲低 MSX2 可抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的上皮-间质转化

张登勇¹, 马翔¹, 王秋月², 吴斌全¹, 崔培元¹, 刘会春¹, 鲁正¹ (233000 安徽蚌埠, 蚌埠医学院第一附属医院: 肝胆外科¹, 消化内科²)

[摘要] 目的 探讨 MSX2 基因在胰腺癌 PANC-1 细胞上皮-间质转化/间质-上皮转化(EMT/MET)相互转换中的作用。方法 将含有 MSX2 干扰序列的质粒转染胰腺癌 PANC-1 细胞,利用 Real-time RT-PCR、Western-blot 等技术检测 MSX2、EMT 相关上皮标志分子 E-cadherin、间质标志分子 Vimentin 在基因和蛋白水平的表达变化,利用 CCK8、Transwell 和划痕试验观察细胞的增殖、侵袭转移能力变化,利用 RT-PCR 初步探索敲低 MSX2 后 EMT 相关转录因子 twist、snail、slug、zeb1 等的表达变化,以寻找 MSX2 的下游靶基因。结果 敲低 MSX2 后的 PANC-1 细胞增殖($P < 0.05$)、侵袭转移能力降低,EMT 相关分子 E-cadherin 表达升高,而 Vimentin 表达降低,细胞形态由松散的长梭形变成紧密连接的椭圆形,细胞有发生 MET 转变趋势,RT-PCR 发现敲低 MSX2 后转录因子 twist 和 snail 表达降低($P < 0.05$),而 slug 和 zeb1 表达变化无差异($P > 0.05$)。结论 敲低 MSX2 可逆转 PANC1 细胞的 EMT,促进 MET 发生,并且可降低 PANC-1 细胞的侵袭转移和增殖能力,MSX2 可能通过 twist、snail 发挥其抑制作用。

[关键词] 胰腺癌;干扰;上皮间充质转化;MSX2

[中图分类号] R394.3;R73-362;R735.9

[文献标志码] A

Interfering expression of MSX2 gene suppresses epithelial-mesenchymal transitions in pancreatic cancer PANC-1 cells

Zhang Dengyong¹, Ma Xiang¹, Wang Qiuyue², Wu Binquan¹, Cui Peiyuan¹, Liu Huichun¹, Lu Zheng¹ (¹Department of Hepatobiliary Surgery, ²Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of interfering MSX2 on epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-epithelial transition (MET) of pancreatic cancer PANC-1 cells with high metastatic ability, strong drug resistance and strong mesenchymal characteristics. **Methods** MSX2 shRNA was used to transfect PANC-1 cells with Lipofectamine 2000. Real-time RT-PCR and Western blotting were used to observe the MSX2, E-cadherin, and vimentin expression on gene and protein levels. CCK-8 assay was applied to assess the influence of MSX2 shRNA on cell growth. Cell invasion and metastasis capability was detected by wound scratch assay and Transwell assay. The expression of EMT-related transcription factors, twist snail, slug, and zeb1, was detected by RT-PCR. **Results** MSX2-specific shRNA reduced invasion, metastasis and proliferation of PANC-1 cells ($P < 0.05$), and increased E-cadherin expression and decreased vimentin expression on gene and protein levels. MSX2 down-regulated cells changed morphology to cobblestone-like appearance, and got much more closely connected. RT-PCR found that the expression of twist and snail decreased ($P < 0.05$), while that of slug and zeb1 had no difference ($P > 0.05$) after interference of MSX2. **Conclusion** Down-regulation of MSX2 can reverse EMT, induce MET, and reduce invasion, metastasis and proliferation of PANC1 cells, which may involves transcription factor twist and snail.

[Key words] pancreatic cancer; interference; epithelial-mesenchymal transitions; MSX2

Supported by the Key Research Project of Education Bureau of Anhui Province (KJ2009B016). Corresponding author: Lu Zheng, E-mail: luzhengdr@163.com

[基金项目] 安徽省教育厅重点研究项目(KJ2009B016)

[通信作者] 鲁正, E-mail: luzhengdr@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1510.030.html>(2014-08-21)

上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transitions, EMT) 是指细胞失去上皮特性逐渐向间充质转变, 在此过程中, 细胞极性消失, 连接松散, 更易于经血流转移, 在分子学上表现为上皮标志蛋白 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、紧密连接 ZO-1 (zonula occluden-1) 等表达下调或缺失, 而波形蛋白 (Vimentin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin) 等间质标志蛋白表达升高^[1]。EMT 在胚胎发育及组织器官的形成过程中起着重要作用。近年发现在肿瘤的发生发展中, EMT 也扮演着重要的角色, 如 EMT 与肿瘤细胞的增殖、转移、耐药以及癌干细胞 (cancer stem cell, CSC) 关系密切。还有观点认为 EMT 是肿瘤发生恶变的一个过渡形态, 并且是肿瘤患者预后较差, 死亡率高的原因之一^[2-5]。MSX2 基因是 HOX 家族的一员, 其编码的蛋白可调控细胞的生存与凋亡。MSX2 与很多癌细胞的耐药、增殖、转移能力有密切关系, 如过表达 MSX2 的 PANC-1 细胞对吉西他滨的耐药性明显增加^[6]; 过表达 MSX2 可促进乳腺小叶分支导管的形成以及 EMT 的发生^[7-8]; 另外在心肌组织 EMT 的过程中 MSX2 也发挥着重要作用^[9]。为了研究 MSX2 在胰腺癌 PANC-1 细胞 EMT 中的作用, 本研究利用 RNA 干扰的方法敲低 MSX2 表达, 观察干扰后的细胞形态变化, 检测 EMT 标志分子的表达, 探讨敲低 MSX2 是否有逆转 PANC-1 细胞 EMT 的作用, 为进一步探索胰腺癌针对 MSX2 的靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人胰腺癌细胞 PANC-1 (中科院上海生命科学研究院), DMEM、胎牛血清 (HyClone 公司), 逆转录及 PCR 试剂盒 (Thermo scientific), qPCR 试剂盒 (广州复能基因), shMSX2 质粒 (上海艾博思生物科技有限公司), Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), 引物由上海生工合成, 小鼠抗人多克隆抗体 MSX2、E-cadherin、Vimentin、 β -catenin、兔抗小鼠二抗 (博士德生物技术有限公司), CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术有限公司), 质粒提取试剂盒 (Omega 公司)。

1.2 质粒转染与分组

根据 Omega 质粒小提试剂盒说明书提取细菌质粒, 并测浓度及纯度用于转染。参照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书进行转染, 取对数生长期细胞消化收集计数, 以 6×10^5 /孔接种于 6 孔板培养过夜, 次日将孔中培养液换成无血清无抗生素的 Opti-MEM, 培养 1 h 后加入质粒与 OPTI-MEM 混合液, 6 h 后换成含 10% FBS 的培养液, 继续培养 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察转染效率, 目测荧光数在 70% 左右可用于后续实验。根

据转染质粒不同分为 3 组: PC-1 组为没有做过处理的正常对照组, NC 组为转染空质粒的阴性对照组, shMSX2-1、shMSX2-2、shMSX2-3 组分别为转染不同 MSX2 干扰片段的处理组。

1.3 Real-time PCR 检测 MSX2、E-cadherin、Vimentin 的表达

转染后收集各组细胞, 采用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 分光光度计定量, 取 2 μ L 用于 RNA 浓度及纯度测定。取 2 μ g 加入 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录合成 cDNA。PCR 引物采用 Premier 5.0 软件设计, 由上海生工合成。Real-time PCR 在 ABI Step One 机器上进行反应, 采用两步法进行扩增。引物: MSX2 (广州复能基因 HQP0011529), 150 bp; E-cadherin 上游: 5'-ATTCTGATTCTGCTGC TCTTG-3', 下游: 5'-AGTAGTCATAGTCCTGGTCTT-3', 片段大小 421 bp; Vimentin 上游: 5'-GAAGAGAACTTTGCCGTTGAAG-3', 下游: 5'-GAAGGT GACGAGCCATTTC-3', 片段大小 100 bp。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 循环 40 次, 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 60 $^{\circ}$ C, 20 s, 72 $^{\circ}$ C, 15 s; 溶解曲线条件机器默认。反应结束后通过溶解曲线判断扩增的特异性, 待测基因表达通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。

1.4 Western blot 检测 MSX2、E-cadherin、Vimentin 蛋白的表达

PANC-1 细胞生长达到 80% 左右, PBS 清洗 2 遍, 加入适量 RIPA 裂解液 (用时以 1:100 体积加如 PMSF), 细胞刮收集细胞, 冰浴 30 min, 12 000 r/min 离心 15 min 后, 取上清, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。BCA 法测定蛋白浓度后, 每孔上样 30 μ g, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 上层胶 90 V, 30 min, 分离胶 120 V, 2 h; 经 90 V 电转 30 min, 使蛋白转移到 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗封闭 4 $^{\circ}$ C 过夜; TBST 漂洗 (3 次 \times 10 min), 加入二抗室温孵育 2 h, TBST 室温摇床漂洗 (3 次 \times 10 min), 化学发光显示。蛋白表达以光密度表示, 以目的蛋白/ β -actin 表示蛋白相对表达量。

1.5 CCK-8 法测 shRNA-MSX2 对 PANC-1 细胞增殖能力的抑制作用

取对数生长期细胞以 5 000/孔接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ L 培养液, 分组同前, 每组 3 个复孔, 另外设置空白对照只加培养液不加细胞, 重复 3 次试验。将 96 孔板在正常条件下培养, 分别于 1、2、3、4、5 d 测定 450 nm 处光密度值 [D(450)], 测前 2 h 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 以空白对照孔调零, 用酶联免疫检测分析仪测定各孔 D(450) 值, 计算平均值, 以时间为横坐标, 光密度值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.6 划痕试验检测 shMSX2 对 PANC-1 细胞迁移能力的影响

12 孔板培养的 PC-1 组和 shMSX2-1 组细胞, 待转染后 24 h 用无菌枪头沿孔的直径划直线, 用无菌 PBS 冲洗干净后, 加入无血清培养液培养, 分别于划痕后 0、20、40 h 于倒置荧光显微镜下观察细胞迁移生长情况, 定性判断细胞迁移能力变化。

1.7 Transwell 小室试验检测 shMSX2 对 PANC-1 细胞侵袭能力的影响

用无血清 DMEM 1:4 稀释 Matrigel 胶,取 80 μ L 包被 Transwell 小室底部膜,37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 30 min 凝固成胶,重悬细胞使细胞浓度为 $(30 \sim 50) \times 10^4$ /mL,取 200 μ L 接种于 24 孔板小室中,下室加入含 10% 胎牛血清的培养液 800 μ L。正常培养 40 h 后取出小室以 4% 多聚甲醛固定 20 min,结晶紫染色 30 min,轻轻擦去上室面的细胞,显微镜下分别取 10 个不同视野计数并拍照。

1.8 RT-PCR 试验初步探索 MSX2 促进胰腺癌 PANC-1 细胞发生 MET 的分子机制

RNA 提取及逆转录方法同 1.3,2 \times PCR Master Mix 进行 PCR 反应。snail 上游: 5'-GAGGCGGTGCAGACTAG-3',下游: 5'-GACACATCGGTCAGACCAG-3',片段大小 179 bp; slug 上游: 5'-CATGCCTGTCATACCACAAC-3',下游: 5'-GGTGTGATGG-AGGAGGG-3',片段大小 169 bp; twist 上游: 5'-GCCAGGTACA-TCGACTTCCTCT-3',下游: 5'-TCCATCCTCCAGACCGAGA-AGG-3',片段大小 122 bp; zeb1 上游: 5'-CAGCTTGATACCTGTGAATGGG-3',下游: 5'-TATCTGTGGTCTGTGGGACT-3',片段大小 100 bp; 内参 GAPDH(上海生工 PHS05)片段大小 138 bp。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,紫外灯下拍照,实验重复 3 次, Gene5 软件测量灰度值比较各组分子表达变化。

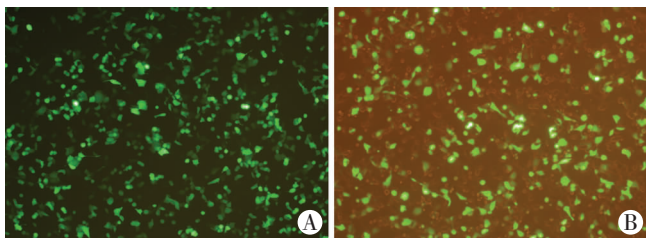
1.9 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 统计软件,两组数据比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 特异性 MSX2 shRNA 转染 PANC-1 细胞

质粒提取后检测纯度 $D(260)/D(280)$ 为 1.8 ~ 2.0,浓度在 0.7 μ g/ μ L 左右,适合转染。转染后 24 h 在荧光显微镜下观察绿色荧光,通过视野观察估测转染效率在 70% 左右(图 1),可用于后续实验。



A: 荧光显微镜; B: 相差显微镜

图1 转染 shMSX2-1 后 24 h 观察判断 PANC-1 细胞的转染效率 ($\times 100$)

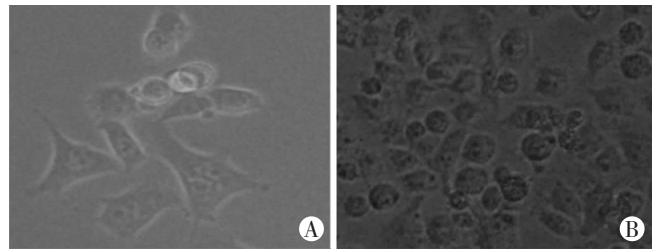
2.2 干扰 MSX2 前后细胞形态变化

干扰 MSX2 后 72 h 细胞形态发生变化,由原来松散的长梭形变成了连接紧密的椭圆形,NC 组较 PC-1 组则没有明显变化(图 2),提示干扰 MSX2 后细胞由间质形态向上皮表型转变。

2.3 Real-time PCR 检测干扰前后 MSX2、E-cadherin、Vimentin 等基因的表达

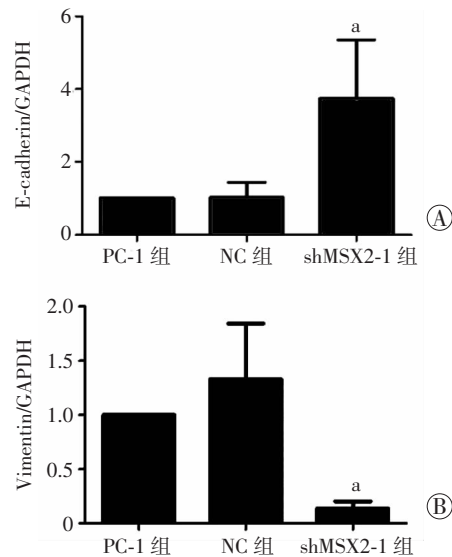
转染后 MSX2 相对于 PC-1 组表达量变化 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): NC 组 (1.097 ± 0.036), shMSX2-1 组 (0.091 ± 0.005), shMSX2-2 组

(0.479 ± 0.175), shMSX2-3 组 (0.349 ± 0.012), 3 个干扰组较 PC-1 组、NC 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 PC-1 组和 NC 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且 shMSX2-1 组干扰效率最高,故选取 shMSX2-1 组用于后续试验。NC 组中 E-cadherin、Vimentin 变化较 PC-1 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), shMSX2-1 组中 E-cadherin 表达升高, Vimentin 降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。



A: PC-1 组; B: shMSX2-1 组

图2 倒置显微镜观察干扰前后 PANC-1 细胞的形态变化 ($\times 200$)



A: E-cadherin; B: Vimentin a: $P < 0.05$, 与 PC-1 组比较

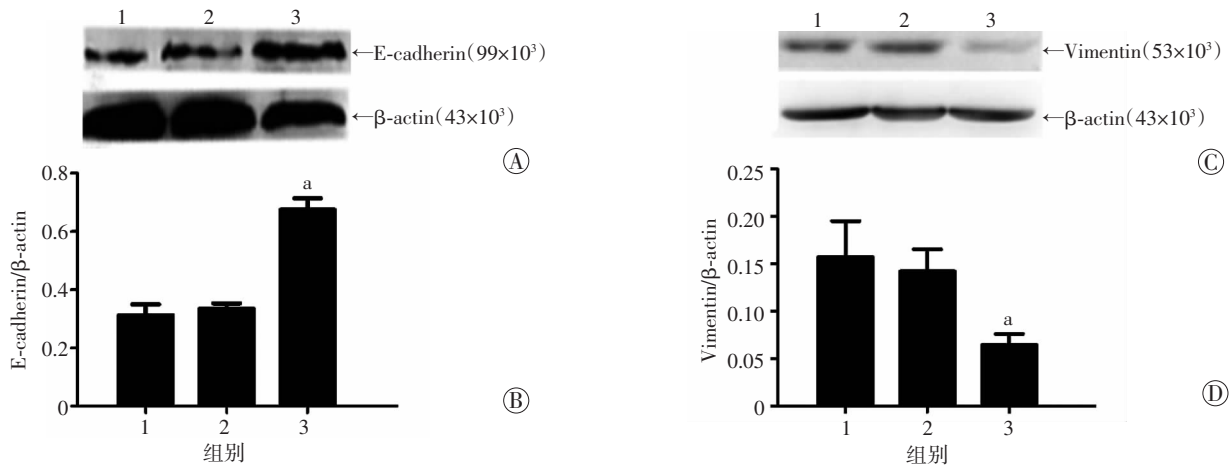
图3 干扰前后 EMT 标志分子 E-cadherin 和 Vimentin 在基因水平的表达

2.4 Western blot 检测干扰前后 MSX2、E-cadherin、Vimentin 蛋白的表达

shMSX2-1 组中 MSX2 蛋白相对表达量 (0.070 ± 0.015) 明显低于 NC 组 (0.496 ± 0.095) 和 PC-1 组 (0.624 ± 0.862), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 NC 组与 PC-1 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 从蛋白水平印证了干扰效率的可用性。E-cadherin 蛋白在 shMSX2-1 组中表达明显高于 NC 和 PC-1 组 ($P < 0.05$), Vimentin 蛋白表达明显低于 NC 组和 PC-1 组 ($P < 0.05$), 而两分子在 NC 组和 PC-1 组中表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4、5)。说明干扰 MSX2 后可引起 PANC-1 细胞的上皮标志蛋白表达升高, 间质标志物波形蛋白表达下调, 有发生 MET 的趋势。

2.5 CCK-8 检测干扰前后 PANC-1 细胞的增殖能力变化

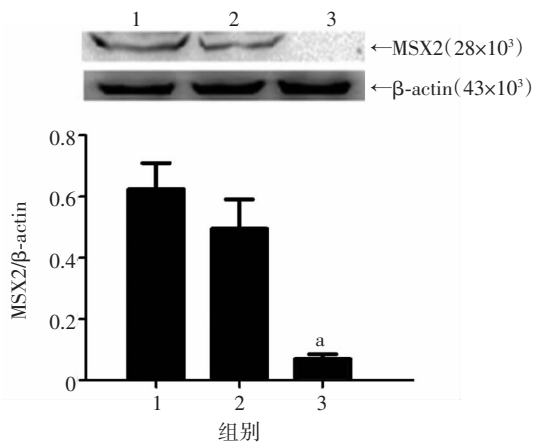
增殖实验发现 shMSX2-1 组细胞增殖能力在第 3 天 (0.798 ± 0.146) 较 NC 组 (1.029 ± 0.053) 和 PC-1 组 (1.096 ± 0.045) 明



1: PC-1 组; 2: NC 组; 3: shMSX2-1 组; a: $P < 0.05$, 与 PC-1 组比较 A: Western blot 检测 E-cadherin 蛋白表达; B: E-cadherin 蛋白半定量分析; C: Western blot 检测 Vimentin 蛋白表达; D: Vimentin 蛋白半定量分析

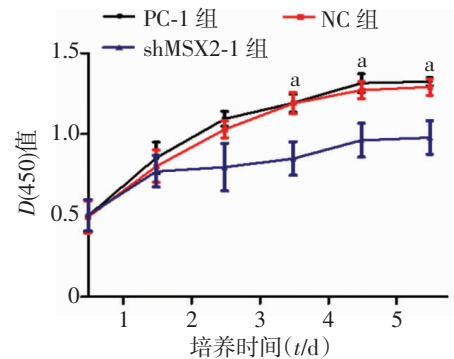
图4 干扰 MSX2 前后 PANC-1 细胞中 EMT 标志分子在蛋白水平的表达变化

显受到抑制, 并且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 NC 组与 PC-1 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图6)。这说明干扰 MSX2 后对 PANC-1 细胞的增殖有抑制作用。



1: PC-1 组; 2: NC 组; 3: shMSX2-1 组; A: Western blot 检测结果; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$, 与 PC-1 组比较

图5 干扰 MSX2 前后 PANC-1 细胞中 MSX2 蛋白表达变化

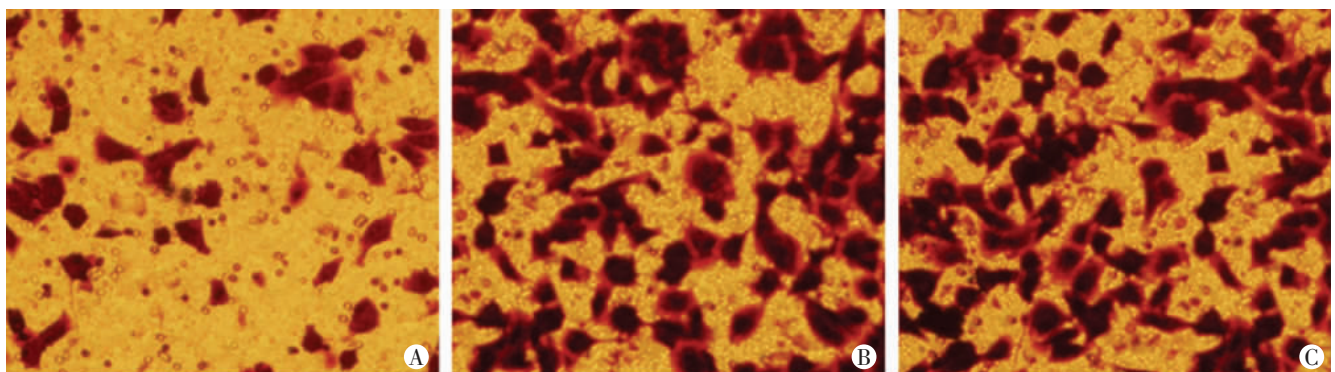


a: $P < 0.05$, 与 PC-1 组比较

图6 干扰 MSX2 前后 PANC-1 细胞增殖能力变化

2.6 Transwell 小室实验观察细胞侵袭能力变化

培养 40 h 后, shMSX2-1 组细胞的侵袭能力(下室细胞数 43 ± 6)较 PC-1 组(下室细胞数 108 ± 8)和 NC 组(下室细胞数 115 ± 9)明显减弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 PC-1 组和 NC 组细胞的侵袭能力变化无统计学意义 ($P > 0.05$, 图7)。



A: shMSX2-1 组; B: NC 组; C: PC-1 组

图7 倒置显微镜下观察干扰 MSX2 前后 PANC-1 细胞的侵袭能力变化 (×100)

2.7 划痕实验检测干扰前后 PANC-1 细胞的迁移能力变化

培养 40 h 后, shMSX2-1 组细胞划痕尚未愈合, 而 PC-1 组和 NC 组细胞划痕已经愈合完全(图 8), 干扰 MSX2 后使 PANC-1 细胞迁移能力减弱。

2.8 RT-PCR 检测干扰前后 twist、snail、slug、zeb1 等基因的表达

干扰 MSX2 后 twist 和 snail 基因表达明显降低($P < 0.05$), 而 slug 和 zeb1 基因表达差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 9)。

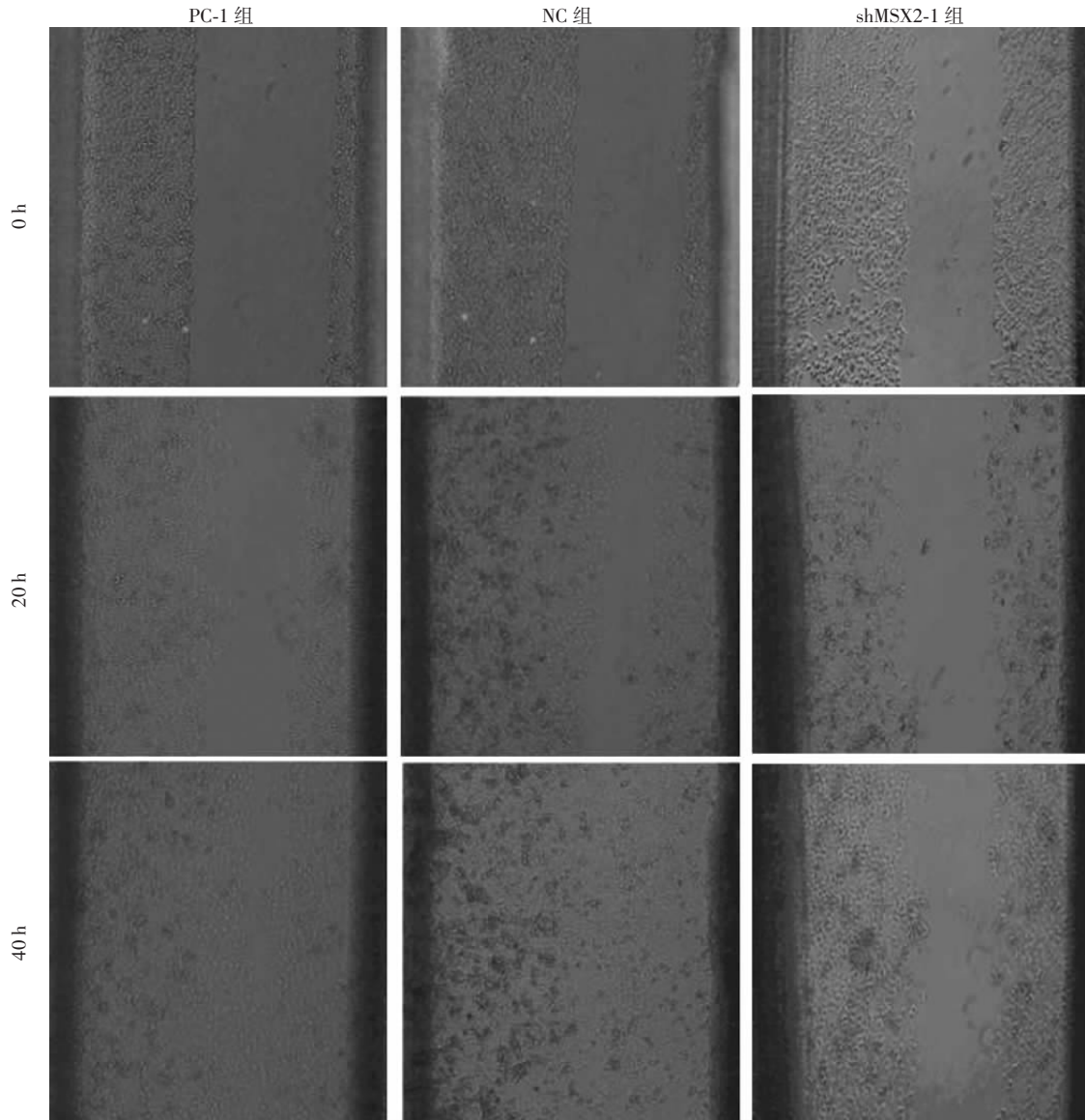
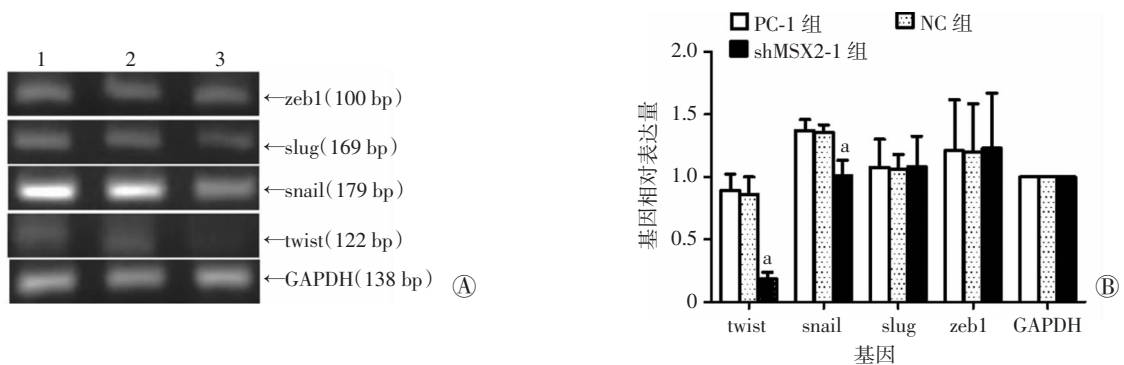


图 8 倒置显微镜下观察干扰 MSX2 前后 PANC-1 细胞的迁移能力变化 (×40)



A: RT-PCR 检测结果 1: PC-1 组; 2: NC 组; 3: shMSX2-1 组; B: 半定量分析结果 a: $P < 0.05$, 与 PC-1 组比较

图 9 RT-PCR 检测干扰 MSX2 前后 PANC-1 细胞中 twist、snail、slug、zeb1 基因的表达变化

3 讨论

近年研究表明 MSX2 在肿瘤的发生、发展中具有重要作用,并且与 EMT 关系密切,为了研究在胰腺癌中 MSX2 与 EMT 关系,本实验采用 Real-time RT-PCR 和 Western blot 在基因和蛋白水平检测 EMT 标志分子,发现干扰 MSX2 后 PANC-1 细胞中 E-cadherin 表达上调,而 Vimentin 表达下降。E-cadherin 是一种广泛表达于上皮细胞并介导细胞间连接的钙依赖性跨膜蛋白,它的表达缺失伴随着上皮细胞表型的丧失,使细胞黏附能力下降,而间质标志分子 Vimentin 表达升高使得细胞易于发生侵袭转移,而本实验发现 E-cadherin 的升高,说明在癌细胞中 E-cadherin 的表达是可逆的, Tsuji 等^[10] 也认为 E-cadherin 表达的缺失与再表达不是取决于不可逆转的基因缺失或者突变,调节其表达的机制是可逆的;还有研究表明在很多转移癌组织中的上皮标志蛋白表达高于原发灶^[11],并且在形态上也更偏向于上皮形态,也就是说在一些癌细胞中由于 E-cadherin 等表达缺失发生了 EMT,癌细胞转移到其他脏器后又重新恢复上皮细胞特性,发生了 MET。MET 是 EMT 的逆向过程,以上皮表型的获得为特征,起到对肿瘤的恶性表现的抑制作用。有研究发现发生 MET 的卵巢癌细胞对顺铂的敏感性较未发生 MET 的癌细胞高,并提出 EMT 的逆转是解决卵巢癌顺铂耐药的假说^[12-13];发生 MET 的肿瘤细胞侵袭转移能力也明显降低^[14-15]。本实验通过划痕和 Transwell 实试验也发现干扰 MSX2 后的 PANC-1 细胞侵袭转移能力明显减弱。在肿瘤的形态学发展中 EMT-MET 有着重要意义,伴随着间叶-上皮的转变,肿瘤细胞的表现特性也趋向于良性改变,如转移侵袭、增殖能力、耐药等,所以研究肿瘤细胞 MET 的分子机制尤为重要。本实验还发现干扰 MSX2 后的 PANC-1 细胞在形态上也趋向于上皮表型转变,细胞由松散的长梭形变成了连接紧密的椭圆形,通过 CCK-8 检测发现细胞的增殖能力也明显受到抑制,进一步印证了干扰 MSX2 可促进 PANC-1 细胞发生 MET 这一观点。一般认为在肿瘤细胞中,转录因子 snail、slug、twist、zeb1 等直接或间接地控制着 EMT 的过程^[16]。我们通过 RT-PCR 检测发现,干扰 MSX2 后可抑制 EMT 相关转录因子 twist 和 snail 的表达,而 slug 和 zeb1 表达变化不明显,说明在 PANC-1 细胞中 MSX2 可能通过转录因子 twist 和 snail 发挥其抑制 EMT 作用。

本研究发现,针对 MSX2 基因的胰腺癌靶向治疗将在针对肿瘤细胞 EMT/MET 转换过程中发挥着关键作用,以往的靶向治疗研究很少以肿瘤的 EMT/MET

转换为思路,所以本实验结果的发表将为胰腺癌的靶向治疗提供一种新的理念,为探究胰腺癌的发生、发展开辟新的分支。

参考文献:

- [1] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(6): 442-454.
- [2] Krantz S B, Shields M A, Dangi-Garimella S, et al. Contribution of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells to pancreatic cancer progression[J]. *J Surg Res*, 2012, 173(1): 105-112.
- [3] Karamitopoulou E. Role of epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma: is tumor budding the missing link? [J]. *Front Oncol*, 2013, 3: 221.
- [4] Yamada S, Fuchs B C, Fujii T, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition predicts prognosis of pancreatic cancer[J]. *Surgery*, 2013, 154(5): 946-954.
- [5] 姚雪,熊冬梅,舒静,等.过表达人 RI 抑制人膀胱癌 T24 细胞的侵袭、转移及 EMT 发生[J].*第三军医大学学报*, 2012, 34(23): 2378-2383.
- [6] Hamada S, Satoh K, Hirota M, et al. The homeobox gene MSX2 determines chemosensitivity of pancreatic cancer cells via the regulation of transporter gene ABCG2[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(2): 729-738.
- [7] di-Bari M, Ginsburg E, Plant J, et al. Msx2 induces epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells through upregulation of Cripto-1[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219(3): 659-666.
- [8] Satoh K, Hovey R C, Malewski T, et al. Progesterone enhances branching morphogenesis in the mouse mammary gland by increased expression of Msx2[J]. *Oncogene*, 2007, 26(54): 7526-7534.
- [9] Chen Y H, Ishii M, Sucov H M, et al. Msx1 and Msx2 are required for endothelial-mesenchymal transformation of the atrioventricular cushions and patterning of the atrioventricular myocardium[J]. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 75.
- [10] Tsuji T, Ibaragi S, Hu G F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7135-7139.
- [11] Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(2): 293-299.
- [12] Yew K H, Crow J, Hirst J, et al. Epimorphin-induced MET sensitizes ovarian cancer cells to platinum[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72637.
- [13] Marchini S, Fruscio R, Clivio L, et al. Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(2): 520-530.
- [14] Hong K O, Kim J H, Hong J S, et al. Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 28.
- [15] Roca H, Hernandez J, Weidner S, et al. Transcription factors OVOL1 and OVOL2 induce the mesenchymal to epithelial transition in human cancer[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76773.
- [16] 丛宁宁,张庆瑜. EMT 在消化系肿瘤中的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2013, 21(3): 205-210.

(收稿:2014-04-14;修回:2014-04-17)

(编辑 龙亮)