论著

文章编号:1000-5404(2012)23-2378-06

过表达人RI抑制人膀胱癌T24细胞的侵袭、转移及EMT发生

姚 雪,熊冬梅,舒 静,李 林,陈俊霞 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院细胞生物学与遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] **目的** 检测过表达人核糖核酸酶抑制因子(ribonuclease inhibitor,RI)基因的质粒pIRES2-EGFP-RI对人膀胱癌T24细胞侵袭转移及上皮细胞间质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)现象的影响。**方法** 将连有RI的质粒pIRES2-EGFP-RI稳定转染T24细胞后利用G418筛选出阳性克隆。根据转染的质粒不同分为3组:T24组(未转染组)、T24-0(转染pIRES2-EGFP质粒)和T24-RI组(转染pIRES2-EGFP-RI质粒)。RT-PCR检测T24细胞中RI的mRNA水平变化,细胞免疫荧光及Western blot检测RI蛋白的表达,利用HE染色观察其细胞形态的变化,Transwell方法检测细胞侵袭及转移能力的变化,Western blot检测侵袭转移及EMT相关蛋白Twist、MMP-9和Snail及E-cadherin的表达,构建移植瘤模型,利用HE染色观测肺组织切片癌细胞转移情况,组织免疫化学方法检测移植瘤中RI、Twist、Snail及E-cadherin的表达。**结果** T24-RI组人RI的mRNA水平及蛋白表达显著升高($P<0.05$);HE染色结果表明细胞铺展良好,核质比明显减小,细胞由间质形态向上皮形态转变;Transwell方法显示T24-RI组细胞的侵袭及转移能力较T24组、T24-0组明显下降;Western blot结果表明T24-RI组Twist、MMP-9和Snail较T24组、T24-0组显著降低($P<0.01$),E-cadherin较T24组、T24-0组显著升高($P<0.01$);HE染色肺组织切片显示T24-RI组较其他两组癌细胞转移降低,组织免疫化学结果表明T24-RI组RI、E-cadherin蛋白明显升高,而Twist、Snail显著降低。**结论** 过表达人RI载体提高了RI蛋白的表达水平,并抑制了人膀胱癌T24细胞EMT的发生,从而抑制了膀胱癌T24细胞的侵袭、转移。

[关键词] 人核糖核酸酶抑制因子;T24细胞;细胞转移;细胞侵袭;EMT
[中图法分类号] R394.2;R73-37;R737.14 [文献标志码] A

Over-expression of human ribonuclease inhibitor suppresses invasion, migration and EMT in human bladder cancer T24 cells

Yao Xue, Xiong Dongmei, Shu Jing, Li Lin, Chen Junxia (Department of Cell Biology and Genetics, Molecular Medicine and Cancer Research Center, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of over-expression of human ribonuclease inhibitor (RI) on the invasion, migration and epithelial mesenchymal transition (EMT) in human bladder cancer T24 cells. **Methods** The vectors of pIRES2-EGFP (T24-0 group) and pIRES2-EGFP-RI (T24-RI group) were used to transfect human bladder cancer T24 cells, respectively, and the positive clones were screened by G418. The T24 cells without transfection were served as control (T24 group). The expression of RI gene at mRNA and protein levels was evaluated by RT-PCR, immunofluorescence and Western blot analysis. HE staining was used for detect the changes of cell morphology. The protein levels of twist, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), snail and E-cadherin were determined by Western blot analysis. Tumor cells at 2×10^6 of the three groups were respectively injected subcutaneously into the back of BALB/c nude mice to establish the xenograft models. HE staining was performed to observe the EMT and metastasis of the T24 cells in lung tissues, and immunohistochemical assay was applied to detect the expression of RI, E-cadherin, twist and snail in the tumors. **Results** Compared with the T24 group and T24-0 group, the expression of RI was significantly higher in the T24-RI group ($P<0.05$). The cells spread well, the nucleo-cytoplasmic ratio decreased, and EMT was observed. The cell invasion and migration abilities significantly reduced in the T24-RI group compared with the T24 group and T24-0 group. The expression of twist, MMP-9 and snail significantly decreased, but the expression of E-cadherin significantly increased in the T24-RI group compared with the T24 group and T24-0 group ($P<0.01$). Cell

[基金项目] 国家自然科学基金(81071719,81172424);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5273)
[通信作者] 陈俊霞,电话:(023)68485806,E-mail:chjunxia@126.com

invasion and metastasis reduced in the lung tissues of BALB/c nude mice receiving an injection of pIRES2-EGFP-RI-transfected T24 cells. The expression of RI and E-cadherin significantly increased, but the expression of twist and snail significantly decreased in the T24-RI group compared with the T24 group and T24-0 group. **Conclusion** Over-expression of RI can suppress EMT in bladder cancer T24 cells, and subsequently inhibit cell invasion and metastasis.

[**Key words**] ribonuclease inhibitor; T24 cell; neoplasm metastasis; neoplasm invasiveness; EMT

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81071719, 81172424) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5273). Corresponding author: Chen Junxia, Tel: 86-23-68485806, E-mail: chjunxia@126.com

人核糖核酸酶抑制因子(ribonuclease inhibitor, RI)是一种胞浆内酸性蛋白,由 460 个氨基酸残基组成,相对分子质量约为 50×10^3,在核酸代谢中起着重要的作用。其结构中含有 7 个串联的亮氨酸残基重复片段,含有这种重复序列的 100 多种蛋白显示出了包括 DNA 修复、细胞黏附、RNA 剪切等多种生物学功能。RI 位于染色体 11p15.5,与原癌基因 ras 邻近。根据结构基因组学,RI 可能还存在我们未知的生物学功能。

上皮细胞间质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT)是一个上皮细胞失去上皮特性同时获得间皮特性,并且具有运动能力的生物学过程[1],在胚胎发育、组织发生中起着重要作用。该过程的发生与细胞分子水平的变化、形态学的改变有关。Yang 等[2]认为,EMT 是一种有序的调节过程,包括以下关键步骤:①细胞间连接(黏附连接、紧密连接、桥粒连接)解体,细胞分散;②细胞骨架重排,形成细胞-基质黏附,细胞迁移和侵袭能力增强。越来越多的研究[3]报道,肿瘤的发生与 EMT 有着密切的联系,认为 EMT 与肿瘤转移初始阶段有关,即肿瘤细胞失去上皮细胞特性及细胞极性,获得间皮特性及运动能力向癌旁组织侵袭的过程。研究表明,EMT 存在于乳腺癌[4]、卵巢癌[5]、食道癌[6]等多种癌细胞中。我们前期的实验[7]证明下调人 RI 的表达能促进非侵袭性人膀胱癌细胞 BIU-87 侵袭和转移潜能力,另外,过表达人 RI 能够抑制老鼠黑色素瘤细胞 B16 的侵袭和转移[8-10]及 EMT 的发生[10]。而对于过表达 RI 对高侵袭性人膀胱癌细胞 T24 的侵袭、转移和 EMT 的影响少见报道,且分子机制尚不清楚。本研究将过表达人 RI 的质粒转染 T24 细胞,观察其对 T24 细胞侵袭、迁移及 EMT 的影响,为进一步研究人 RI 抗肿瘤作用及机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及动物

RPMI1640 培养基、标准胎牛血清购于天津灏洋(TBD)公司,Trizol 试剂盒、质粒抽提纯化试剂盒,2×*Taq* Mix、逆转录试剂盒、*Sal* Ⅰ 酶、*Eco*R Ⅰ 酶等购于大连宝生物公司,转染试剂 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司,Matrigel 基质胶购于购自 OMGA 公司,Twist、MMP-9、Snail、及 N-cadherin 单克隆抗体,兔抗人 β-actin 购于 Bioworlde 公司,人膀胱癌细胞株 T24、兔抗人 RI、质粒 pIRES2-EGFp 及已接入 RI 基因的真核表达载体 pIRES2-EGFP-RI 来自于本实验室保存。

BALB/c 裸鼠 4~6 周,体质量(20±3)g,购于北京大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 人膀胱癌细胞 T24 的培养及转染

1.2.1.1 细胞培养 用含 10%(体积分数)的标准胎牛血清的 RPMI1640 培养基于 37 ℃含 5% CO_2 的培养箱中培养 T24 细胞。

1.2.1.2 细胞转染与分组 取对数期 T24 细胞接种于 6 孔板中培养,待细胞数达到 2×10^5/孔,根据 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书的步骤转染不同质粒。根据转染的质粒不同分为 3 组,T24 组:未转染质粒的 T24 细胞;T24-0 组:转染空质粒 pIRES2-EGFP 的 T24 细胞;T24-RI 组:转染已接入 RI 的真核表达质粒 pIRES2-EGFP-RI 的 T24 细胞。

1.2.2 筛选稳定转染人 RI 的人膀胱癌细胞株 T24 待质粒 pIRES2-EGFP 及 pIRES2-EGFP-RI 转染 24 h 后传代,48 h 后用含有 400 μg/ml G418、10%(体积分数)胎牛血清的 RPMI1640 进行筛选,每 2 天换液 1 次,筛选 14 d 后,挑取带有绿色荧光的单个细胞于 24 孔板中,维持 200 μg/ml G418 浓度进行培养,14 d 后将单克隆细胞团吹散传代,扩大培养。

1.2.3 过表达 RI 对 T24 细胞中 RI 基因影响的检测

1.2.3.1 RT-PCR 检测细胞 RI 的 mRNA 水平表达 Trizol 试剂盒分别提取各组细胞的总 mRNA,经 RT-PCR 检测各组细胞 RI mRNA 水平表达量。RI 基因上游引物:5′-TCAGCGACAACCTCTTGGG-3′,下游引物:5′-CACAATGCCGCACAGGTC-3′,扩增产物约 400 bp;内参 GAPDH 基因上游引物:5′-GCTGTCCCTGTCGCCTCTG-3′,下游引物:5′-TGCCGATGGTGATGACCTGG-3′,扩增产物约 500 bp。反应条件:95 ℃预变性 5 min;95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,30 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。各组细胞 PCR 扩增产物经含 Gold view 的 0.8% 琼脂糖电泳后,由 Bio-Rad 凝胶成像仪成像保存,用 Quantity One 定量分析,以 RI/GAPDH 的比值表示 RI 的相对表达量。

1.2.3.2 Western blot 检测细胞 RI 的蛋白水平表达 经蛋白裂解液抽提各组细胞的总蛋白,测其浓度,各组细胞上样相

等量的总蛋白,10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,200 mA 恒流电转至 PDVF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入一抗(兔抗人 RI 1∶250,兔抗人 β-actin 1∶1 000),4℃孵育过夜,TBST 洗 3 次,HRP 标记的羊抗兔(1∶1 000) 二抗室温孵育 1.5 h,TBST 洗 3 次,每次 5 min,ECL 化学发光显色,Bio-Rad 凝胶成像仪成像,并用 Quantity One 定量分析,以 RI/β-actin 的比值作为 RI 蛋白的相对表达量。

1.2.3.3 细胞免疫荧光分析 取对数期细胞爬片,待细胞融合度达到 80% 左右取出,PBS 洗 3 遍,冷丙酮固定 30 min,0.3% Triton 通透 10 min,BSA 封闭 20 min,一抗兔抗人 RI 4℃孵育过夜(1∶150 稀释),羊抗兔 IgG-TRITCb 标记的二抗(1∶50)37 ℃孵育 2 h,抗荧光淬灭剂封片。于荧光显微镜下拍照,并分析各组细胞的荧光强度。

1.2.4 细胞侵袭转移能力检测

1.2.4.1 Trenswell 实验检测各组细胞的侵袭能力 取50 μl 的 50 μg/ml 的基质胶用无血清 RPMI1640 按 1∶8 比例稀释后包被小室基底膜上室,4 ℃风干过夜,使用前于 37 ℃孵箱恒温水化,收集各组细胞,置于无血清的 RPMI1640 培养基中,调整各组细胞使其细胞数为 2×10^6/ml,取各组细胞 100 μl 加入各小室,下室加入 800 μl 的含 10% 体积的标准胎牛血清的RPMI 1640 培养基,常规培养 8 h,取出甲醇固定,结晶紫染色,光镜下随机选取 8 个视野拍照计数,取平均值。

1.2.5 HE 染色 取对数期细胞爬片,培养 24 h 后取出,PBS 洗 3 次,甲醇固定 10 min,苏木精染色 5 min,自来水冲洗,1% 盐酸乙醇分化 5 s,自来水冲洗,0.5% 伊红染色 2 min,自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明封片,中性树脂封片,观察拍照。

1.2.6 Western blot 检测细胞 Twist、MMP-9、Snail 以及 E-cadherin 蛋白的表达 经蛋白裂解液抽提各组细胞的总蛋白,测其浓度,各组细胞上样相等量的总蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,200 mA 恒流电转至 PDVF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入一抗(兔抗人 Twist 1∶250、MMP-9 1∶500、Snail 1∶250 以及 E-cadherin 1∶500,兔抗人 β-actin 1∶1 000),4 ℃孵育过夜,TBST 洗 3 次,HRP 标记的羊抗兔(1∶1 000) 二抗室温孵育 70 min,TBST 洗 3 次,每次 5 min,Bio-Rad 凝胶成像仪成像,并用 Quantity One 定量分析,以目的蛋白/β-actin 的比值作为各蛋白的相对表达量。

1.2.7 动物水平检测过表达 RI 对 T24 细胞侵袭转移及 EMT 的影响

1.2.7.1 动物移植瘤模型 收集对数期细胞,用 PBS 将收集的各组细胞制备为 2×10^7/ml 悬液,分别皮下注射 BALB/c 裸鼠 0.1 ml,每组 8 只。记录各组肿瘤形成时间,5 周后处死老鼠,取肺及肿瘤组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中。

1.2.7.2 HE 染色观察各组裸鼠肺转移情况 取固定于 4% 多聚甲醛溶液的肺组织,石蜡包埋,5 μm 切片,二甲苯,梯度乙醇脱蜡至水,苏木精染色 5 min,自来水冲洗,1% 盐酸乙醇分化 5 s,自来水冲洗,,0.5% 伊红染色 2 min,自来水冲洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明封片,中性树脂封片,观察拍照。

1.2.7.3 免疫组织化学观察各组移植瘤组织中 RI、Twist、Snail 以及 E-cadherin 的表达 取固定于 4% 多聚甲醛溶液的肺组织,石蜡包埋,5 μm 切片,二甲苯,梯度乙醇脱蜡至水,蒸馏水洗 3 次,PBS 洗 3 次,3% 过氧化氢灭活过氧化物酶,PBS 洗 3 次,枸橼酸钠溶液修复抗原,PBS 洗3 次,5% 羊血清封闭,一抗(RI 1∶50,Twist,Snail,E-cadherin 均 1∶100)4 ℃孵育过夜,PBS 洗 3 次,滴加生物素化山羊抗兔 IgG,37 ℃孵育 20 min,PBS 洗 3 次,滴加链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液 37 ℃孵育 20 min,PBS 洗 3 次,DAB 显色,自来水终止,复染,烤干,中性树胶封片,拍照观察。

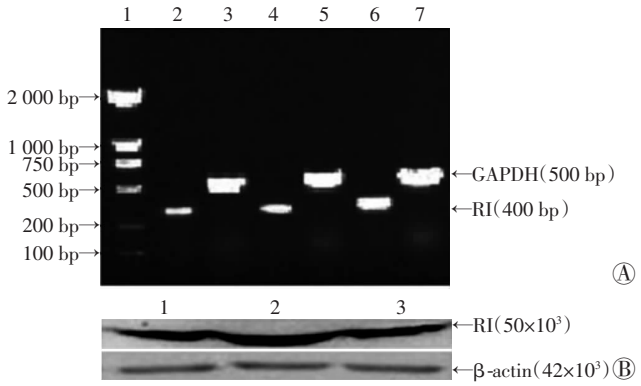
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,配对组间比较采用配对样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 稳定转染的 T24 细胞过表达 RI 的鉴定

2.1.1 各组细胞 RI mRNA 和蛋白表达 RT-PCR 结果见图 1A,与 T24 组及 T24-0 组比较,T24-RI 组 RI mRNA 表达分别升高了 54%、58%,而两对照组间无统计学差异($P<0.05$)。Western blot 结果见图 1B,与 T24 组及 T24-0 组比较,T24-RI 组的 RI 蛋白表达明显升高,分别升高了 45.57% 和 35.95%($P<0.05$),而两对照组间无统计学差异($P>0.05$)。



A:RT-PCR 检测结果 1:标准(2 000 bp ladder);2、3:T24 组;4、5:T24-0 组;6、7:T25-RI 组;2、4、6:RI mRNA;3、5、7:GAPDH mRNA;B:Western blot 检测结果 1:T24 组;2:T24-RI 组;3:T24-0 组

图 1 各组细胞 RI mRNA 和蛋白的表达

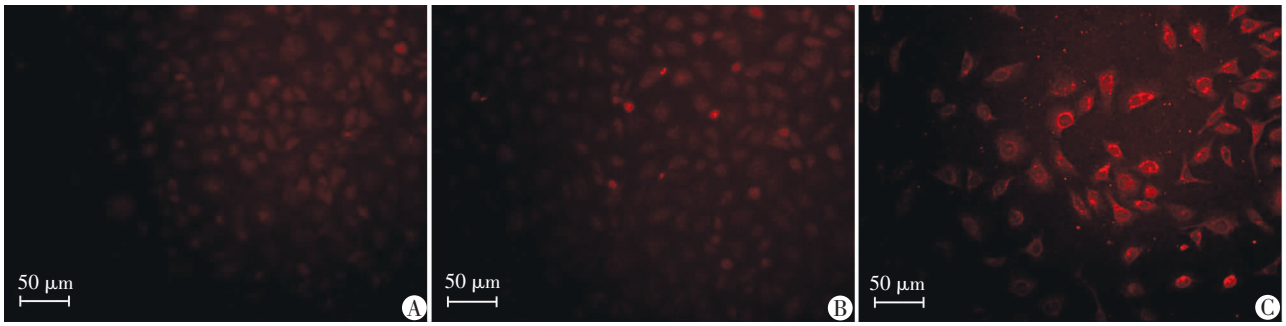
2.1.2 细胞免疫荧光分析结果 与 T24 组及 T24-0 组比较,T24-RI 组荧光明显增亮,而两对照组间荧光亮强度无统计学差异。这与前面的 RT-PCR 及 Western blot 结果一致(图 2)。

2.2 各组细胞形态学观察

与两对照组相比,T24-0 组的细胞核明显减小,核质比减小,染色较浅,细胞由间质形态向上皮形态转变,表明细胞的恶性程度降低,EMT 现象受到抑制。见图 3。

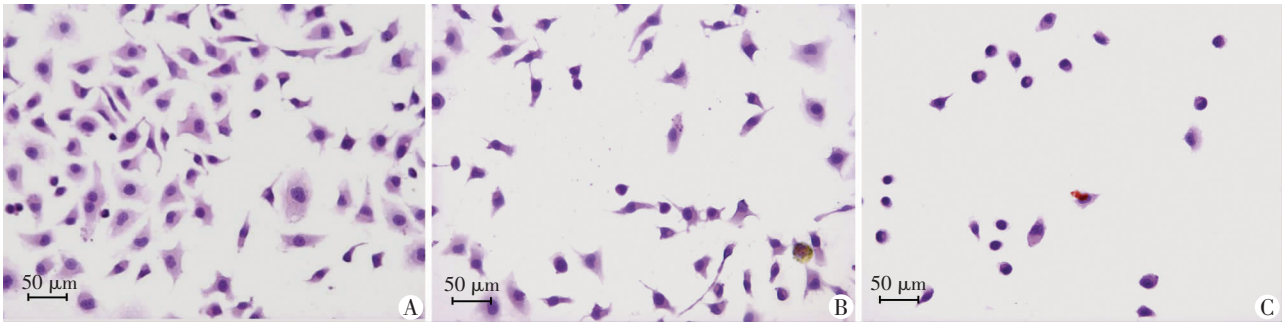
2.3 过表达 RI 后各组细胞侵袭转移能力的变化

光镜下拍照计数,T24-RI 组平均视野细胞侵袭数为(39.8±17.4)个,较 T24 组[(128.2±35.1)个]及 T24-0 组[(119.8±58.4)个]明显减少($P<0.01$)。见图 4。



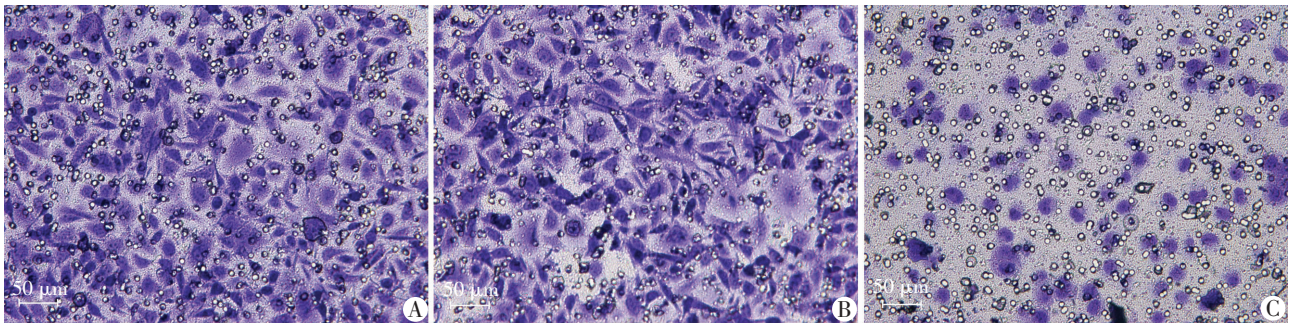
A:T24 组;B:T24-0 组;C:T24-RI 组

图 2　免疫荧光观察各组细胞 RI 蛋白的表达



A:T24 组;B:T24-0 组;C:T24-RI 组

图 3　光学显微镜下 HE 染色观察各组细胞形态变化

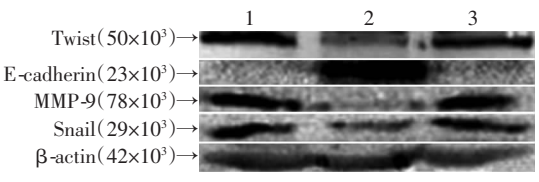


A:T24 组;B:T24-0 组;C:T24-RI 组

图 4　Transwell 方法观察各组细胞侵袭及转移能力

2.4　各组细胞中 Twist、MMP-9 和 Snail 及 E-cadherin 蛋白的表达

与 T24 组及 T24-0 组比较,T24-RI 组的 Twist、MMP-9、Snail 蛋白表达明显降低,Twist 降低了 65% 和 62%($P<0.01$),MMP-9 降低了 33%、32%($P<0.05$),Snail 降低了 51% 和 49%($P<0.01$);而 E-cadherin 蛋白升高了 736% 和 743%,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见图 5。



1:T24 组;2:T24-RI 组;3:T24-0 组

图 5　Western blot 检测各组细胞 Twist、MMP-9 和 Snail 及 E-cadherin 蛋白的表达

2.5　免疫组化检测过表达 RI 后移植瘤中 RI、Twist、E-cadherin 及 Snail 蛋白的表达情况

各组裸鼠在皮下注射相应的细胞后,T24-RI 组所形成的移植瘤明显小于两对照组,说明移植瘤的形成受到抑制,相应的 T24-RI 组 RI 蛋白表达明显上升,而两对照组间无明显差异,EMT 标志性蛋白 E-cadherin、Twist、Snail 蛋白的表达量却显著下降,表明上调 RI 的表达对 EMT 现象具有抑制作用。见图 6。

2.6　HE 染色观察各组裸鼠肺组织癌细胞转移情况

T24-RI 组肺组织未见明显转移,而两对照组在血管周围均可见到细胞核增大,细胞核染色加深的细胞团,表明癌细胞向肺组织转移。见图 7。

3　讨论

本实验将过表达 RI 的质粒转染膀胱癌 T24 细胞,

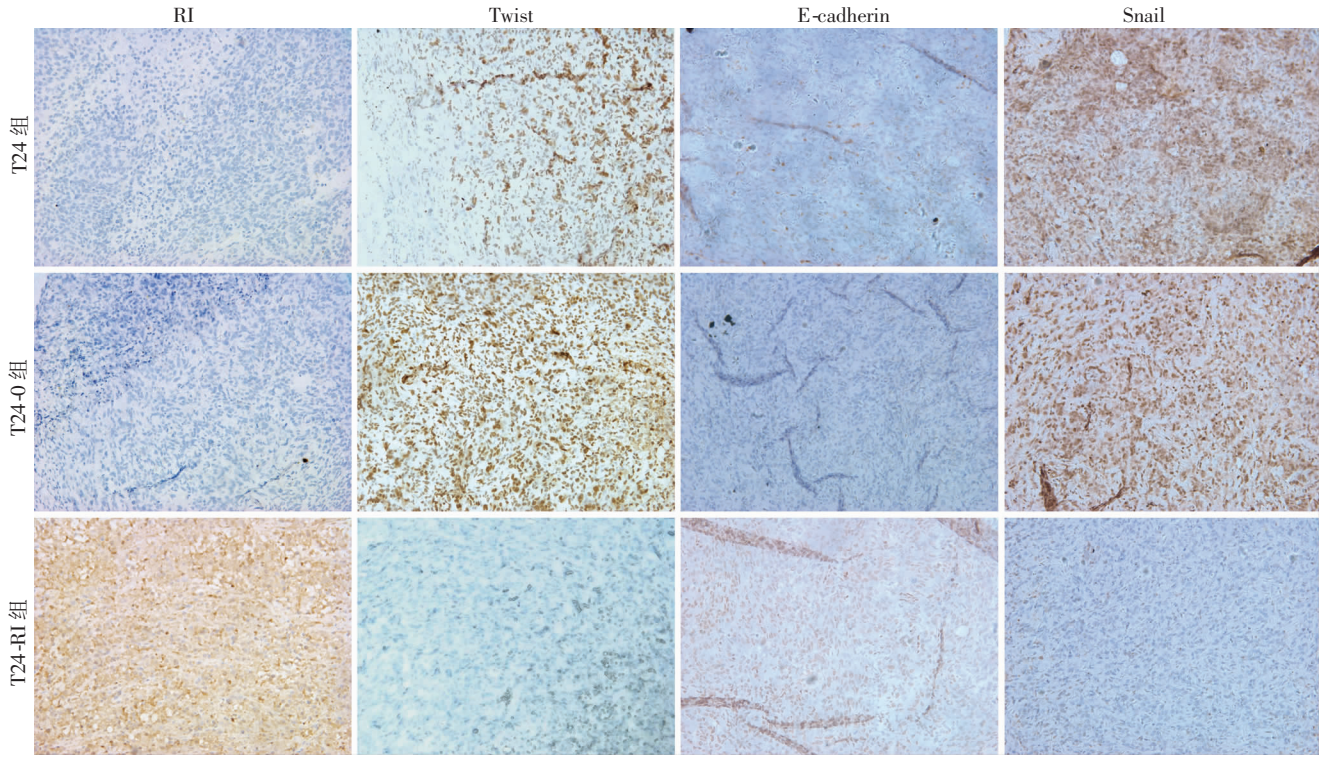
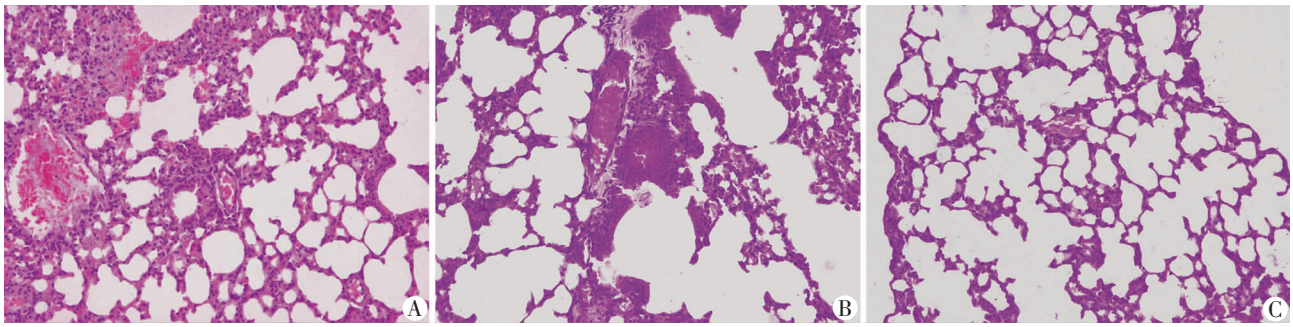


图6 免疫组织化学观察移植瘤中RI、Twist、E-cadherin及Snail蛋白的表达 （×200）



A:T24组;B:T24-0组;C:T24-RI组

图7 光学显微镜观察各组裸鼠肺组织转移情况 （HE ×200）

经G418筛选得到稳定过表达RI的膀胱癌T24细胞株,过表达RI的T24细胞发生了显著的生物学功能改变。HE染色观察细胞形态,显示细胞过表达RI后,细胞核质比减小,细胞核染色加深,分裂象减少,细胞由间质形态向上皮形态转变。为研究细胞的侵袭与转移能力的改变,我们运用Matrigel作为人工基底膜铺于Transwell小室内,通过Transwell小室实验证实过表达RI的T24细胞侵袭与迁移能力明显降低,同时构建移植瘤模型,观察到过表达RI抑制了癌细胞向肺组织转移。

本研究对过表达RI抑制人膀胱癌细胞T24的侵袭、转移及EMT的发生的机制进行了初步探论。侵袭、转移是恶性肿瘤细胞的一大特点,基膜和细胞外基质是肿瘤转移的屏障,MMPs能对其进行降解,在肿瘤的侵袭转移中起着重要作用,而MMP-9是MMPs中ECM重要的蛋白水解酶之一,其表达增加与肿瘤侵袭转移十分相关。研究证明MMP-9在胶质瘤细胞的侵袭过程中起着至为关键的作用[11-12]。本研究显示过表达RI后,T24细胞中MMP-9蛋白的表达明显降低,而细胞的侵袭与转移能力也显著下降。EMT作为肿瘤转移和侵袭的初始阶段,标志性蛋白E-cadherin、Twist、Snail与其密切相关。E-cadherin是一类主要介导细胞之间相互黏附的钙依赖性跨膜蛋白,主要表达在上皮细胞,广泛参与细胞间的连接。它的表达异常被认为与EMT的发生直接相关[13]。已有研究证实,E-cadherin的表达下调或抑制会促使EMT发生,并促

进肿瘤的侵袭和迁移[14]。另外,E-cadherin 蛋白表达的丢失也促使癌细胞由上皮形态向间质形态转化[15]。肿瘤发生过程中,转录因子 Twist、Snail 能够启动 EMT,Twist 在胚胎生长发育阶段诱导细胞迁移的调控过程中发挥重要作用,它是一个癌基因,而在 EMT 发生过程中起着调控作用[16]。研究表明 Twist 异常表达可能参与宫颈鳞癌的浸润[17],另外,Twist 介导的 EMT 可能与卵巢癌的侵袭转移有关[18]。Snail 是一类锌指转录因子,越来越多的研究认为 Snail 蛋白是 EMT 中的关键调控因子之一[19-20]。Twist、Snail 都能够降低 E-cadherin 的转录和翻译,从而促进肿瘤的迁移和转移。已有实验证实,Snail、Twist 在口腔鳞癌细胞系中高表达,且都可以单独并直接抑制 E-cadherin 表达,诱导产生 EMT,使上皮细胞向纤维原细胞表型转化,并获得转移性[21]。本实验中 RI 的过表达抑制了 Twist 和 Snail 在蛋白水平的表达,而 E-cadherin 也明显升高,移植瘤中各个蛋白也呈现相同趋势的变化,同时,HE 染色显示细胞由间质形态向上皮形态转化。

总之,RI 基因与癌细胞的侵袭迁移及 EMT 的发生有着紧密联系,上调 RI 的表达可以抑制膀胱癌细胞 EMT 的发生,进而抑制侵袭及转移,降低细胞恶性程度,为 RI 成为抗肿瘤治疗的一个新的药物靶点提供进一步的依据。

参考文献:

[1] Tsuji T, Ibaragi S, Hu G F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis[J]. Cancer Res, 2009, 69(18): 7135-7139.

[2] Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis[J]. Am J Pathol, 2001, 159(4): 1465-1475.

[3] Kabashima A, Higuchi H, Takaishi H, *et al*. Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion[J]. Int J Cancer, 2009, 124(12): 2771-2779.

[4] 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.

[5] Gallo D, Ferlini C, Scambia G, *et al*. The epithelial-mesenchymal transition and the estrogen-signaling in ovarian cancer[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(4): 474-481.

[6] Usami Y, Satake S, Nakayama F, *et al*. Snail-associated epithelial-mesenchymal transition promotes oesophageal squamous cell carcinoma motility and progression[J]. J Pathol, 2008, 215(3): 330-339.

[7] Chen J, Ou-Yang X, Gao J, *et al*. Knockdown of ribonuclease inhibitor expression with siRNA in non-invasive bladder cancer cell line BIU-87 promotes growth and metastasis potentials[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 349(1/2): 83-95.

[8] 陈俊霞, 田余祥, 傅攀峰, 等. 转染人核糖核酸酶抑制因子基因对 B16 黑色瘤细胞及肿瘤转移的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 2004, 31(6): 523-531.

[9] 潘湘阳, 李红彦, 姚雪, 等. 核糖核酸酶抑制因子过表达抑制 B16 细胞的侵袭和转移[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(4): 284-289.

[10] Pan X, Xiong D, Yao X, *et al*. Up-regulating ribonuclease inhibitor inhibited epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in murine melanoma cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(6): 998-1008.

[11] Puli S, Lai J C, Bhushan A. Inhibition of matrix degrading enzymes and invasion in human glioblastoma (U87MG) cells by isoflavones[J]. J Neurooncol, 2006, 79(2): 135-142.

[12] 宋剑, 焦保华, 王惊涛. 应用 siRNA 敲低 MMP-9 基因表达后对人 U251 胶质瘤细胞增殖和侵袭的作用[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(5): 299-302.

[13] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 151-166.

[14] Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology[J]. Pathology, 2007, 39(3): 305-318.

[15] 朱月琴, 范钦和, 姜松梅, 等. 结直肠癌组织 E-cadherin 和 β-catenin 的表达与临床病理特征相关性研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(7): 510-513.

[16] Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis[J]. Cell, 2004, 118(3): 277-279.

[17] 范琼, 鲍伟, 杨婷婷, 等. Twist、E-cadherin、N-cadherin 在宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(6): 783-787.

[18] 王文双, 杨兴升, 马先莹. Twist 介导的上皮间质转化在卵巢癌组织中的作用[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(2): 175-177.

[19] Yuen H F, Chan Y K, Grills C, *et al*. Polyomavirus enhancer activator 3 protein promotes breast cancer metastatic progression through Snail-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. J Pathol, 2011, 224(1): 78-89.

[20] Argast G M, Krueger J S, Thomson S, *et al*. Inducible expression of TGFβ, Snail and Zeb1 recapitulates EMT *in vitro* and *in vivo* in a NSCLC model[J]. Clin Exp Metastasis, 2011, 28(7): 593-614.

[21] Takkunen M, Grenman R, Hukkanen M, *et al*. Snail-dependent and -independent epithelial-mesenchymal transition in oral squamous carcinoma cells [J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(11): 1263-1275.

(**收稿**:2012-08-04;**修回**:2012-09-12)

(编辑 汪勤俭)