论著

文章编号:1000-5404(2014)22-2272-05

人乳腺癌MCF-7他莫昔芬耐受细胞株EMT表型的鉴定及其机制的初步研究

袁 杰[1],杨 丽[2],陈茂山[1],朱 庆[1],付伟杰[1],成 宏[3],柳满然[2],杨光伦[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院内分泌乳腺外科[1],临床检验诊断学教育部重点实验室[2]; 445000 湖北 恩施,恩施土家族苗族自治州中心医院乳腺外科[3])

[摘要] **目的** 观察乳腺癌细胞MCF-7发生他莫昔芬耐受后细胞形态的变化及上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)现象,并初步研究其机制。**方法** 免疫荧光染色观察乳腺癌细胞MCF-7及其他莫昔芬耐药株MCF-7R细胞的形态;qRT-PCR、Western blot检测两种细胞EMT相关标志蛋白的表达;Transwell法检测两种细胞的迁移能力;分别抑制PI3K-Akt及MAPK/Erk信号通路,检测MCF-7R细胞的迁移能力及EMT表型的变化。**结果** MCF-7细胞间的联系紧密,发生他莫昔芬耐受后,细胞间隙明显增大;MCF-7细胞发生他莫昔芬耐受后迁移能力明显增强,并发现E-钙粘素(E-cadherin)分布从细胞膜向细胞质转移,波形蛋白(vimentin)及纤维粘连蛋白(fibronectin)表达水平明显升高($P<0.05$);在耐药细胞中PI3K-Akt及MAPK/Erk信号通路均处于异常活化状态,抑制PI3K-Akt信号通路能明显抑制细胞的迁移能力,同时能使波形蛋白和纤维粘连蛋白表达水平降低($P<0.05$)。**结论** 乳腺癌MCF-7细胞发生他莫昔芬耐受后其迁移能力增强可能与其发生EMT样表型有关。

[关键词] 乳腺癌;他莫昔芬耐受;上皮-间质转化;细胞迁移

[中图法分类号] R394-33;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

Identification of epithelial-mesenchymal transition phenotype in tamoxifen-resistant MCF-7 cells

Yuan Jie[1], Yang Li[2], Chen Maoshan[1], Zhu Qing[1], Fu Weijie[1], Cheng Hong[3], Liu Manran[2], Yang Guanglun[1] ([1]Department of Endocriology and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnosis of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [3]Department of Breast Surgery, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei Province, 445000, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the changes of the cell morphology and the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker proteins after MCF-7 cells acquired tamoxifen resistance. Methods The cell morphology was revealed through immunofluorescent staining. The expression of EMT marker proteins was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting. Transwell assay was used to detect the difference of cell migration. PI3K-Akt and MAPK/Erk signaling pathways were evaluated in MCF-7 cells and tamoxifen-resistant MCF-7R cells. The migration and the expression of EMT marker proteins were reevaluated after inhibiting the signaling pathways. Results In the MCF-7 cells, intercellular contact was close and E-cadherin was predominantly localized in the membrane. However, cell contact became loose and E-cadherin was almost translocated to the cytoplasm in the tamoxifen-resistant MCF-7R cells. The migration was enhanced and the expression of vimentin and fibronectin was increased when the MCF-7 cells acquired tamoxifen resistance ($P<0.05$). PI3K-Akt and MAPK/Erk signaling pathways were abnormally activated in the tamoxifen-resistant MCF-7R cells. Meanwhile, the migration and the expression of mesenchymal marker proteins were significantly suppressed when inhibiting PI3K-Akt pathway rather than MAPK/Erk pathway ($P<0.05$). Conclusion EMT may contribute to the increased migration of tamoxifen-resistant breast cancer cells.

[**Key words**] breast cancer; tamoxifen resistance; epithelial-mesenchymal transition; cell migration

Supported by the General Program of National Nature Science Foundation of China (81072149). Corresponding author: Yang Guanglun, E-mail: guanglunyang@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072149)

[通信作者] 杨光伦, E-mail:guanglunyang@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140929.1641.001.html(2014-09-29)

乳腺癌是女性最好发的恶性肿瘤,近年来随着乳腺癌治疗方法的多样化,其生存率明显改善。对于雌激素受体(estrogen receptor,ER)和(或)孕激素受体(progesterone receptor,PR)阳性的乳腺癌患者,内分泌治疗能明显改善其预后,但原发或继发性耐药严重影响其临床应用效果[1]。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)不仅存在于胚胎发育及炎症反应过程中,大量研究还发现它参与肿瘤的复发及远处转移[2-3]。它以上皮细胞连接蛋白[如E-钙粘素(E-cadherin)]的消失或减少以及间质细胞标志蛋白[如波形蛋白(vimentin)、纤维粘连蛋白(fibronectin)]的表达为特征。近年有研究证实该过程与肿瘤药物治疗耐受相关[4-5]。研究表明,乳腺癌细胞发生他莫昔芬(tamoxifen,TAM)耐受后,细胞的恶性程度会增加,进而加快了肿瘤的复发及远处转移,同时伴随EMT样表型的改变[6]。本课题组前期已成功从乳腺癌MCF-7细胞诱导出TAM耐受的细胞株MCF-7R细胞[7]。本研究拟观察MCF-7细胞及MCF-7R细胞的形态及细胞间的连接方式,同时检测细胞中E-钙粘素、波形蛋白及纤维粘连蛋白的表达情况,并在MCF-7R细胞中初步分析其EMT现象的调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人乳腺癌MCF-7细胞购自中科院上海细胞库,胎牛血清购自BioInd公司,DMEM培养基购自Gibco公司,ECL化学发光试剂盒及Transwell小室购于Millipore公司,4-羟基他莫昔芬(OHT)、FITC标记的鬼笔环肽购于Sigma公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒、磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase,PI3K)的抑制剂wortmannin及细胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2,Erk1/2)的抑制剂U0126均购于碧云天生物技术有限公司,兔源性抗体(抗E-cadherin、vimentin、fibronectin、p-Erk1/2、Erk1/2、p-Akt及Akt)均购于Bioworld公司,鼠抗人β-actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠/抗兔购自北京中杉金桥生物技术有限公司,qRT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.2 细胞培养

MCF-7细胞常规培养于含5%胎牛血清的DMEM培养液、37 ℃、5% CO_2 饱和培养箱。当细胞生长密度达80%时,0.125%胰蛋白酶消化传代。用于实验的细胞均处于对数生长期。MCF-7/TAM耐药株(MCF-7R细胞)按照我们前期报道的高浓度短时间TAM冲击法[7]诱导获得,将MCF-7细胞暴露于1 μmol/L OHT中21 d,在无OHT干预下扩增细胞7 d,为维持细胞的耐药性,常规培养在含1×10^{-7} mol/L OHT、5%胎牛血清的DMEM培养液中;MTT法及流式细胞术均证明MCF-7R细胞的耐药性。

1.3 免疫荧光染色及细胞形态的观察

MCF-7细胞及MCF-7R细胞融合至80%,0.125%胰蛋白酶消化,离心、重悬细胞,将细胞接种于底部已平铺无菌爬片的24孔板内,继续培养48 h。4%多聚甲醛固定15 min,0.1% Triton X-100透膜10 min,PBS清洗细胞3次,山羊血清封闭30 min,FITC标记的鬼笔环肽(5 μg/mL)室温下孵育1 h,PBS洗3次,DAPI染核5 min,PBS洗3次,50%甘油封片,荧光显微镜下观察。

1.4 qRT-PCR检测E-cadherin、vimentin、fibronectin基因的表达

常规提取MCF-7细胞及MCF-7R细胞总RNA,并逆转录成cDNA,以β-actin为内参,进行qRT-PCR检测ITGB1基因mRNA的表达水平,重复实验3次。β-actin引物序列:上游5′-CACCCCACTTCTCTCTAAGG-3′,下游5′-AAAAAGTATTAAGGCGA-AGAT-3′,扩增片段为126 bp;E-cadherin引物序列:上游5′-CGGTGGTCAAAGAGCCCTTACT-3′,下游5′-TGAGGGTTGGTGCAA-CGTCGTTA-3′,扩增片段为171 bp;vimentin引物序列:上游5′-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3′,下游5′-GCTTCCTGTAGGTGG-CAATC-3′,扩增片段为186 bp;fibronectin引物序列:上游5′-AACTTCCTGGTGCGTTACTCA-3′,下游5′-TGTGCTCTCATGTT-GTTCGT-3′,扩增片段长度为156 bp。反应条件:95 ℃预变性15 s,95 ℃变性5 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸30 s,共45个循环。

1.5 Western blot检测

MCF-7细胞及MCF-7R细胞融合至80%,0.125%胰蛋白酶消化,以50%~60%密度接种于培养皿内,培养48 h后提取细胞总蛋白。对于需要加药处理的实验,接种细胞后培养24 h待细胞贴壁后更换无血清培养基,继续培养24 h,分别加入药物处理(1 μmol/L wortmannin、10 μmol/L U0126为实验组,1 μmol/L无水乙醇作为对照组)24 h后提取细胞总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度,经SDS-PAGE电泳分离、转膜,5%脱脂奶粉室温摇床封闭3 h,分别加入兔抗人E-cadherin、vimentin、fibronectin、p-Erk1/2、Erk1/2、p-Akt及Akt多克隆抗体(1∶500稀释)和鼠抗人β-actin单克隆抗体(1∶1 000稀释),4 ℃过夜;TBST洗膜3次,5 min/次,然后,分别加入HRP标记的羊抗兔和羊抗鼠IgG(1∶1 000稀释),室温孵育2 h;洗膜3次后,ECL化学显色剂显色。Quantity One软件进行灰度值的半定量分析。

1.6 Transwell实验检测细胞迁移能力

取处于生长对数期的细胞或已按上述方法加药处理过的细胞,胰蛋白酶消化、离心、重悬(用不含血清培养基)、计数后,将200 μL含5×10^4个细胞的悬液加入Transwell上室,同时在下室加入含10%胎牛血清的培养基500 μL,37 ℃、5% CO_2 培养24 h,棉签擦拭上室残余细胞,结晶紫染色,镜检。在100倍视野下,随机计算5个视野下的细胞数,计算平均数。

1.7 统计学分析

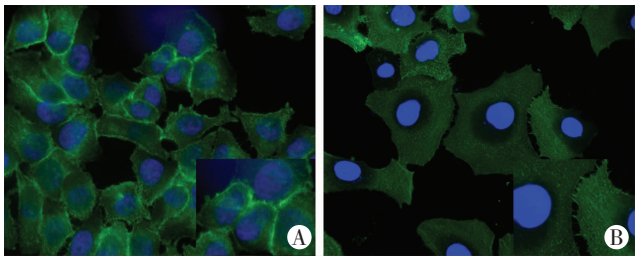
采用SPSS 19.0统计软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,两独立样本组间分析采用t检验,多组样本均数比较采用方差分析,两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 两种细胞形态的比较

亲代MCF-7细胞呈鹅卵石样紧密排列,细胞间连接紧密,

表现为典型的上皮细胞特征;而发生耐药的MCF-7细胞失去细胞间的紧密连接,呈分散式生长,并出现细胞膜的特殊形态,如边缘波动(ruffling)及板状伪足(lamellipodia),表现出处于播散状态细胞的特征,但细胞形态未呈现明显的纺锤体样(图1)。



A:MCF-7细胞呈鹅卵石样紧密排列;B:MCF-7R细胞分散生长,细胞间联接疏松,可见细胞膜的特殊形态

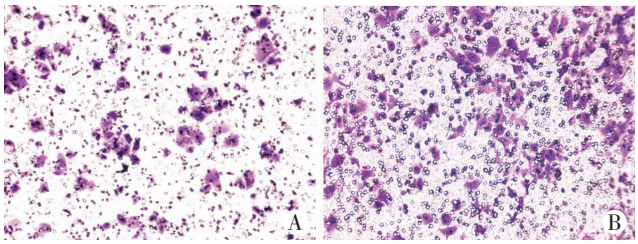
图1 免疫荧光染色显示MCF-7及MCF-7R细胞形态 (鬼笔环肽×200,右下角×400)

2.2 EMT标志蛋白在两种细胞中的表达水平

在mRNA及蛋白质水平,vimentin和fibronectin在MCF-7R细胞中的表达较MCF-7细胞明显增高($P<0.05$),而E-cadherin在两种细胞中的表达无显著差异($P>0.05$,图2)。

2.3 两种细胞迁移能力的比较

Transwell实验结果显示,MCF-7细胞(21.7±2.5)和MCF-7R细胞(124.0±10.1)比较,后者从Transwell小室上层迁移到膜背面的细胞数明显增多($P<0.05$,图3)。

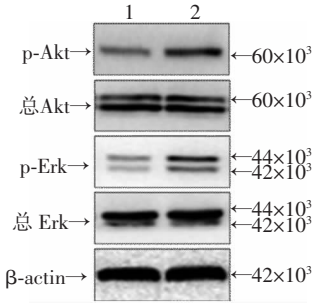


A:MCF-7细胞;B:MCF-7R细胞

图3 Transwell法检测两种细胞迁移能力的差异 (结晶紫×100)

2.4 PI3K-Akt与MAPK/Erk信号通路在两种细胞中的活化程度

Western blot结果显示:MCF-7R细胞中p-Akt(0.782±0.038)与p-Erk(0.667±0.043)的表达均明显高于MCF-7细胞中p-Akt(0.312±0.017)与p-Erk(0.227±0.023)的表达,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图4。



1:MCF-7;2:MCF-7R

图4 Western blot检测两种细胞中p-Akt与p-Erk的表达

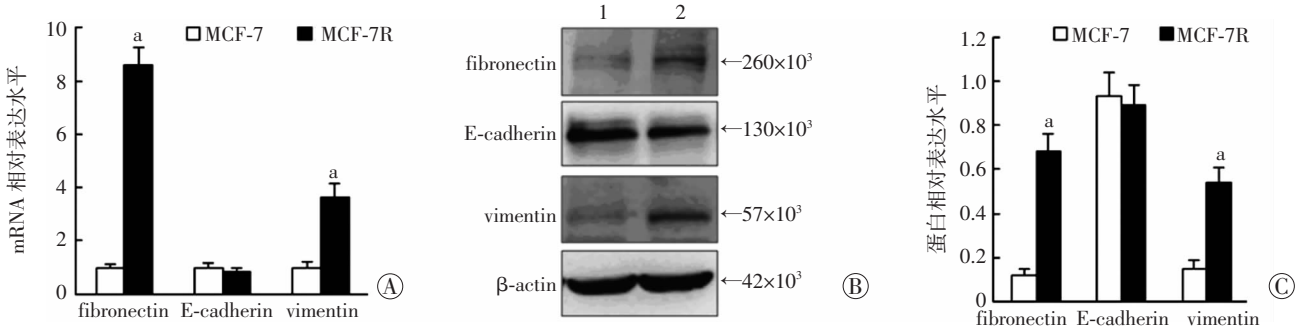
2.5 抑制PI3K-Akt与MAPK/Erk信号通路对MCF-7R细胞迁移能力的影响

分别加入wortmannin抑制PI3K及U0126抑制Erk的活化后,检测MCF-7R细胞的迁移能力的变化:对照组(133.3±10.3),U0126组(118.3±9.5),wortmannin组(31.3±4.7),表明抑制PI3K-Akt通路可明显减弱MCF-7R细胞的迁移能力($P<0.05$);而抑制MAPK/Erk通路对MCF-7R细胞迁移能力的影响无统计学差异($P>0.05$)。见图5。

2.6 MCF-7R细胞的EMT现象受PI3K-Akt信号通路调控

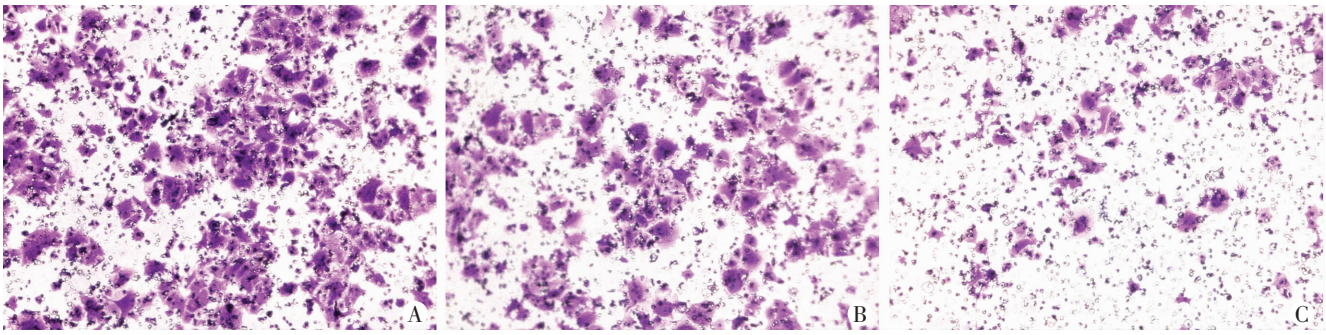
Western blot检测1、10 μmol/L U0126及对照组对Erk表达的影响,结果分别为0.643±0.061、0.238±0.046、0.615±0.056,10 μmol/L U0126与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图6)。Western blot检测1、5 μmol/L wortmannin及对照组对Akt表达的影响,结果分别为0.216±0.049、0.133±0.054、0.764±0.048,表明2个浓度的wortmannin均能抑制Akt的表达($P<0.05$,图6)。

前期实验发现抑制PI3K-Akt信号通路能减弱MCF-7R细胞的运动能力,为证明其是否与EMT表型的改变有关,本实验分析10 μmol/L U0126及1 μmol/L wortmannin对fibronectin及vimentin表达的影响。Western blot检测发现wortmannin使MCF-7R细胞中fibronectin和vimentin的表达明显下调($P<0.05$),而U0126的作用不显著($P>0.05$,图7)。



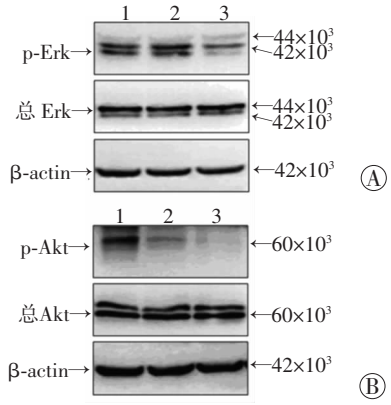
A:qRT-PCR检测 a:$P<0.05$,与MCF-7细胞比较;B:Western blot检测 1:MCF-7;2:MCF-7R;C:Western blot半定量分析 a:$P<0.05$,与MCF-7细胞比较

图2 qRT-PCR及Western blot检测两种细胞中EMT标志蛋白的表达



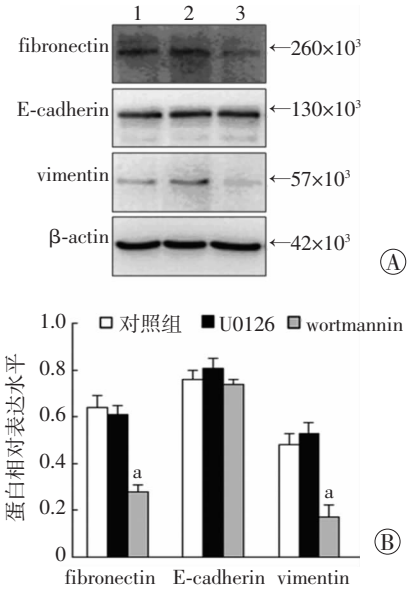
A:对照组;B:U0126 组;C:wortmannin 组

图 5 抑制 PI3K-Akt 与 MAPK/Erk 信号通路对 MCF-7R 细胞迁移能力的影响 (结晶紫×100)



A:p-Erk 表达 1:对照组;2:1 μmol/L U0126;3:10 μmol/L U0126;B:p-Akt 表达 1:对照组;2:1 μmol/L wortmannin;3:5 μmol/L wortmannin

图 6 Western blot 检测不同浓度 U0126 及 wortmannin 对 Erk 及 Akt 表达的影响



A:Western blot 检测 1:对照组;2:10 μmol/L U0126;3:1 μmol/L wortmannin;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较

图 7 Western blot 检测 U0126 及 wortmannin 对 EMT 标志蛋白表达的影响

3 讨论

TAM 广泛应用于激素受体阳性的绝经前乳腺癌患者,单独使用 5 年可使雌激素受体 α(estrogen receptor α, ERα)阳性的早期乳腺癌患者 15 年死亡率降低 31%,复发率降低 47%[8],50% 的晚期乳腺癌患者经 TAM 治疗可获得客观缓解,延长无进展生存期[9]。然而,几乎一半长期接受 TAM 治疗的乳腺癌患者将会逐渐失去对 TAM 的敏感性,并最终发生复发或远处转移[1]。但对于 TAM 获得性耐药的机制至今仍不明了。

研究发现肿瘤治疗耐药与肿瘤细胞运动能力增强有关,发生耐药后的细胞迁移及侵袭能力明显增强[10-11]。EMT 指上皮-间质转化,它以间质细胞标志蛋白的获得和上皮细胞标志蛋白的减少或丢失为特征。它增强细胞的迁移能力及肿瘤干细胞特性,通过使肿瘤细胞从原发灶分离、侵袭周围组织及播散至远处器官从而促进恶性肿瘤的进展和远处转移。肿瘤性的 EMT 转变是转录重组事件,通过引起相关蛋白的表达或信号通路的活化,从而使细胞发生迁移和侵袭、化学和放射性治疗耐受、失巢凋亡抵抗及非凡的肿瘤形成能力[5,12-13]。已经在很多肿瘤内(乳腺癌、头颈部鳞癌、肺癌等)证实 EMT 与抗肿瘤治疗耐药密切相关[11,14]。在形态上,EMT 使上皮细胞间的紧密连接消失及骨架发生重构,并呈现间质细胞纺锤体样的形态,同时增加细胞迁移或侵袭能力。本课题组前期已经成功诱导出 MCF-7 细胞来源的 TAM 耐受细胞,并证实 MCF-7R 与 MCF-7 细胞比较,细胞骨架发生重构,MCF-7R 细胞中出现大量应力纤维及板状伪足[15]。本研究比较两种细胞形态及生长方式,发现 MCF-7R 细胞生长呈播散状,可见明显的板状伪足,表现出高运动性间质细胞的形态,而 MCF-7 细胞成簇生长,细胞排列紧密;同时发现 MCF-7R 细胞的迁移能力较 MCF-7 细胞明显增强,与 Ward 等[6]的研究结果相符。本课题组前期实验发现在 MCF-7 细胞中,E-cadherin 主要富集在毗连细胞膜周边,细胞外围可通过 E-cadherin

与周围细胞形成完整的黏附连接,而在MCF-7R细胞中,随着纤维状肌动蛋白(fibros actin,F-actin)细胞骨架的伸展而向细胞质里弥散[15]。为研究MCF-7R细胞的运动能力增强与EMT是否相关,我们检测了EMT标志蛋白在两种细胞中的表达,发现fibronectin和vimentin的表达在MCF-7R细胞中明显上调,而E-cadherin的表达水平差异不大,但E-cadherin分布发生明显改变:在MCF-7细胞主要分布在细胞膜,而在MCF-7R细胞主要弥散在细胞质中,与前期结果[15]一致。E-cadherin是一种跨膜的糖蛋白,只有分布在细胞膜,与β-链蛋白(β-catenin)结合才能发挥其介导细胞间的黏附作用,当它们之间的联系被破坏,细胞的运动能力会明显增强[16],这或许可以解释虽然MCF-7R细胞较MCF-7细胞E-cadherin表达水平差异不大,但迁移能力MCF-7R细胞却明显增强。虽然MCF-7R细胞未出现间质细胞典型的纺锤体样形态,但间质细胞的标志蛋白fibronectin及vimentin在MCF-7R细胞中明显升高,表明MCF-7R细胞发生EMT现象。研究发现PI3K-Akt与MAPK/Erk信号通路参与乳腺癌TAM治疗耐药,抑制信号通路的活化能够逆转或改善耐药[17-20]。本研究发现MCF-7R细胞发生EMT受PI3K-Akt信号通路的调控。Kim等[17]发现MCF-7R细胞中的PI3K-Akt信号通路活化是因为第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,PTEN)表达下降所致,进而引起细胞EMT。Wang等[3]及Okui等[21]发现在口腔鳞癌细胞中,EMT现象也受PI3K-Akt信号通路的调控。

综上,本研究证实MCF-7细胞获得TAM耐受后发生EMT,并发现在MCF-7R细胞中其EMT现象受PI3K-Akt信号通路调控,但具体的调控机制还不甚明确,深入研究其关键调控靶点或可为解决临床乳腺癌TAM耐受提供新的方法。

参考文献:

[1] Zhang L, Gong C, Lau S L, *et al*. SpliceArray profiling of breast cancer reveals a novel variant of NCOR2/SMRT that is associated with tamoxifen resistance and control of ERalpha transcriptional activity[J]. Cancer Res, 2013, 73(1): 246-255.

[2] Zhang H, Liu L, Wang Y, *et al*. KLF8 involves in TGF-beta-induced EMT and promotes invasion and migration in gastric cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, 139(6): 1033-1042.

[3] Wang Y, Lin Z, Sun L, *et al*. Akt/Ezrin Tyr353/NF-kappaB pathway regulates EGF-induced EMT and metastasis in tongue squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2014, 110(3): 695-705.

[4] Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Cufi S, *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin)[J]. Cell Cycle, 2012, 11(21): 4020-4032.

[5] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.

[6] Ward A, Balwierz A, Zhang J D, *et al*. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer[J]. Oncogene, 2013, 32(9): 1173-1182.

[7] 莫志强,涂刚,罗浩军,等. 人乳腺癌MCF-7他莫昔芬耐药细胞株的建立及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(21): 2256-2259.

[8] Darby S, Mcgale P, Correa C, *et al*. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials[J]. Lancet, 2011, 378(9804): 1707-1716.

[9] He Y Y, Du G Q, Cai B, *et al*. Estrogenic transmembrane receptor of GPR30 mediates invasion and carcinogenesis by endometrial cancer cell line RL95-2[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(5): 775-783.

[10] Zhang X, Liu G, Kang Y, *et al*. N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e57692.

[11] Neel D S, Bivona T G. Secrets of drug resistance in NSCLC exposed by new molecular definition of EMT[J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(1): 3-5.

[12] Polyak K, Weinberg R A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(4): 265-273.

[13] 刘磊, 刘臣海, 黄强, 等. 胆管癌组织中microRNA21的表达与上皮间质转化的关系及对预后评估的价值[J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12(3): 228-232.

[14] Maseki S, Ijichi K, Tanaka H, *et al*. Acquisition of EMT phenotype in the gefitinib-resistant cells of a head and neck squamous cell carcinoma cell line through Akt/GSK-3beta/snail signalling pathway[J]. Br J Cancer, 2012, 106(6): 1196-1204.

[15] 李振华, 涂刚, 李维东, 等. MCF-7细胞他莫昔芬耐药过程中F-actin细胞骨架的重构促进细胞迁移[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(14): 1475-1479.

[16] Hiscox S, Jiang W G, Obermeier K, *et al*. Tamoxifen resistance in MCF7 cells promotes EMT-like behaviour and involves modulation of beta-catenin phosphorylation[J]. Int J Cancer, 2006, 118(2): 290-301.

[17] Kim M R, Choi H K, Cho K B, *et al*. Involvement of Pin1 induction in epithelial-mesenchymal transition of tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. Cancer Sci, 2009, 100(10): 1834-1841.

[18] Mo Z, Liu M, Yang F, *et al*. GPR30 as an initiator of tamoxifen resistance in hormone-dependent breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2013, 15(6): R114.

[19] Wang L J, Han S X, Bai E, *et al*. Dose-dependent effect of tamoxifen in tamoxifen-resistant breast cancer cells *via* stimulation by the ERK1/2 and AKT signaling pathways[J]. Oncol Rep, 2013, 29(4): 1563-1569.

[20] Tanic N, Milovanovic Z, Tanic N, *et al*. The impact of PTEN tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(12): 1165-1174.

[21] Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, *et al*. AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(9): 2039-2049.

(**收稿**:2014-06-23;**修回**:2014-07-29)

(编辑 龙 亮)