doi:10.11659/jjssx.12E017042

·基础研究·

缺氧微环境调控 Twist 促进人肝癌细胞株 SMMC-7721 的上皮间质转化

郭莉娜[1],黄小梅[1],马 燕[2],李 灿[1],严伟恒[2],刘漪沦[2],邓峰美[1] (1.成都医学院基础医学院,四川 成都 610500;2.成都医学院第一附属医院,四川 成都 610500)

[摘 要] **目的** 探讨缺氧条件下,Twist 基因的表达及其在人肝癌 SMMC-7721 细胞株上皮间质转化中的作用机制。**方法** 模拟缺氧微环境,分别在常氧(21% O_2)和缺氧(1% O_2)条件下培养 SMMC-7721 细胞 24 h。在倒置光学显微镜下检测 SMMC-7721 细胞形态学的改变;RT-PCR 和 Western blot 法检测细胞中 HIF-1α、Twist、上皮表型标记蛋白 E-cadherin 及间质表型标记蛋白 Vimentin 的表达;Transwell 小室侵袭实验检测缺氧条件和常氧条件下细胞侵袭能力的变化。使用 Twist1 靶向 siRNA 抑制其表达后,进一步采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 HIF-1α、Twist、E-cadherin 和 Vimentin 的表达水平,Transwell 法检测细胞侵袭能力变化。**结果** 在缺氧模拟条件下,人肝癌 SMMC-7721 细胞中 Twist 基因表达水平显著升高,同时细胞发生上皮-间质转化和侵袭能力增强。靶向沉默 Twist 基因后,低氧诱导的上皮间质转化过程被逆转,同时细胞侵袭能力显著减弱。**结论** 低氧条件下 Twist 基因异常激活,进而促进 SMMC-7721 细胞上皮-间质转化的发生和侵袭能力的增强。

[关键词] 肝癌;低氧;上皮间质转化;侵袭

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-12-14

Hypoxia microenvironment promotes epithelial-mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 via inducing Twist expression

GUO Li-na[1],HUANG Xiao-mei[1],MA Yan[2],LI Can[1],YAN Wei-heng[2],LIU Yi-lun[2],DENG Feng-mei[1] (1.School of Basic Medical Sciences,Chengdu Medical College,Chengdu Sichuan 610500,China;2.First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College,Chengdu Sichuan 610500,China)

Abstract: Objective To investigate the expression of Twist gene and its mechanism in epithelial-mesenchymal transition(EMT) of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 in the hypoxia microenvironment. **Methods** In this study,the hypoxia microenvironment was simulated to culture SMMC-7721 cells under normoxia(21% O2) and hypoxia(1% O_2) conditions respectively for 24 hours. The change of SMMC-7721 in cell morphology was checked under the inverted optical microscope. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression level of HIF-1α,Twist,epithelial phenotype marker protein E-cadherin and mesenchymal phenotype marker protein Vimentin. And the changes of cell invasion ability under hypoxia and normoxia were detected through the Transwell invasion assays. After Twist1 was used to inhibit its expression by targeting siRNA,RT-PCR and Western blot were further used to detect the expression levels of HIF-1α,Twist,E-cadherin and Vimentin,as well as the changes in cell invasion ability through the Transwell invasion assays. **Results** Under the simulated hypoxia microenvironment,the expression level of Twist gene in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 was significantly raised and EMT and cell invasion ability was enhanced. Furthermore,after targeted silencing of Twist gene,the hypoxia induced EMT process was reversed and the cell invasion ability was weakened significantly. **Conclusion** Under the hypoxic condition,the Twist gene is extraordinarily activated,so as to promote epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and enhancement of its invasion ability.

Keywords: hepatocellular carcinoma;hypoxia;epithelial-mesenchymal transition;invasion

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)发病率位居我国恶性肿瘤前列,而肝炎-肝硬化-肝癌这一序贯步骤的发生使得肝癌的发病基础极其广泛。由于肝癌在发病初期临床症状不明显,易被忽视,就诊时多已到晚期,已发生癌旁和远处器官的侵袭转移。晚期肝癌的治疗和预后很差,且肝癌术后极易发生转移和再复发[1]。因此,肝癌远处侵袭转移的具体机制研究一直是肝癌领域研究热点。恶性肿瘤的发生和发展依赖于其特定的微环境,而肿瘤局部的缺血缺氧是构成微环境的一部分[2]。缺氧微环境在多种恶性肿瘤的远处侵袭和迁移中扮演重要角色,但是其如何发挥作用目前鲜有报道。上皮间质转化(epithelial-

[基金项目] 成都医学院大学生创新训练计划项目(No.CXXS201303)

[通信作者] 邓峰美,E-mail:dengfm2004@163.com

mesenchymal transition,EMT)指恶性肿瘤上皮细胞在体内外多种刺激因素的长期作用下,通过启动特定程序来使上皮表型细胞逐渐转化为具有间质表型的细胞的复杂过程[3-4]。EMT 程序的异常激活与多种恶性肿瘤的发生发展紧密关联。研究表明,EMT 过程受多个转录因子的调控,其中 Twist 作为 EMT 启动的关键调控因子,也参与了多种恶性肿瘤的侵袭转移[5-6]。本研究旨在体外模拟缺氧条件下 Twist 基因的表达变化及其对人肝癌 SMMC-7721 细胞 EMT 过程的调控机制。

1 资料与方法

1.1 材料

人肝癌 SMMC-7721 细胞株购自深圳赛恩斯细胞科技有限公司;TRIzol RNA 提取试剂购自日本宝生物;本研究所用 PCR 引物的设计与合成均委托天津拜恩斯瑞生物科技公司完成;多克隆兔抗人 HIF-1α、E-cadherin、Vimentin、Twist1 和 β-actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,辣根酶标记羊抗小鼠或抗兔 IgG 购自上海瑞伊和源生物科技公司;中分子量 Protein marker 购自 Thermo Fisher 公司;ECL 超敏型化学发光试剂盒购自上海百谷歌生物科技公司;胎牛血清购自 GIBCO 公司;DMEM-H 培养基购自美国 GIBCO 公司; 0.45 mm PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;6 孔板、25 cm^2 塑料培养瓶以及 24 孔 Transwell 小室(孔径 8 μm)均购自海狸生物科技有限公司;Transwell 小室侵袭实验所用细胞级基质胶(Matrigel)购自湖南佳浩能生物科技公司;Co170R-230-0200 三气细胞培养箱(用于模拟缺氧细胞培养环境)购自德国 Eppendorf 公司;倒置相差显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.2 细胞培养

人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞使用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM-H 培养基进行培养,放置于 5% CO_2 浓度 37 ℃恒温细胞培养箱中。培养 48 h 之后,当细胞铺满培养瓶采用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,随后取状态较好且处于对数生长期的细胞进行后续实验。细胞分别在常氧和低氧条件下培养 24 h,随后进行相关实验检测。为了研究 Twist 基因的作用,我们进一步分为低氧组、低氧下转染 si NC 组以及低氧下转染 Twist 组。

1.3 siRNA 的设计、合成和目的基因的转染

Twist siRNA 干扰片段由广州锐博生物有限公司设计合成,设计 3 条针对 Twist 基因的特异 siRNA,其序列如下:siRNA1 靶序列:5'-CCTCTGCATTCTGATAGAA-3',siRNA2 靶序列:5'-AAGAGGTGGATATGTCTGG-3',siRNA3 靶序列:5'-GCTGAAACATGCAGTTGTA-3';及 1 条无义干扰序列 siN05815122147-1-5 作为阴性对照组。转染 siRNA 实验分为空白对照组(细胞中除培养液外不加任何试剂)、阴性对照组(细胞中加入细胞培养液、NC-siRNA、转染试剂)和干扰组(细胞中加入细胞培养液、siRNA Twist 转染试剂)。转染前 1 d,将对数生长期的细胞按 2×10^5 个/孔的细胞密度接种 6 孔板中,待细胞融合度达 40% ~50% 时,按照转染试剂盒说明书进行基因转染实验。37 ℃、5% CO_2 条件下继续培养24 h 或 48 h 后于荧光显微镜下观察转染阳性细胞数,计算细胞转染率。细胞转染率(%)=转染阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.4 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

β-actin 引物序列:上游 5'-TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT-3',下游 5'-ATGCACATCCTTCGATAAGACTG-3';HIF-1α 引物序列:上游 5'-AGCTTCCAGACACGCTATCAT-3',下游 5'-CGGTACAACGAGC TGT TTCTAC-3'E-cadherin 引物序列:上游 5'-ATTTTTCCCTCGACACCCGAT-3',下游 5'-TCCCAGGCGTAGACCAAGA-3';Vimentin 引物序列:上游 5'-AG TCC ACTGAGTACCGGAGAC-3',下游 5'-CATTTCACGCATCTGGCGTTC-3'。PCR 反应条件:94 ℃预变性 2 min,94 ℃变性 20 s,56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 30 s。

1.5 Western blot 检测

将已处理好的 SMMC-7721 细胞系用 PBS 洗涤 3 次,随后加入 RIPA 裂解液并用细胞刮刀刮下放入 1.5 mL EP 管中冰上裂解 30 min。随后于 12 000 r/min 离心 10 min 并将蛋白上清液冻存于 -20 ℃。使用 5x 蛋白上样缓冲液混匀蛋白上清后于 95 ℃中加热 10 min,待其充分变性。上机跑电泳,随后转膜并置于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h。封闭结束后使用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,随后将膜置于多克隆兔抗人的 β-catenin(浓度 1∶1 000)和多克隆兔抗人 β-actin(浓度 1∶3 000)中 4 ℃孵育过夜。次日,洗膜 3 次,每次 5 min,置于辣根酶标记羊抗兔 IgG 中室温孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,采用 ECL 化学发光法金鼎显影。应用 Quantity One 软件分析条带灰度值并作统计分析。

1.6 肿瘤细胞侵袭实验

将 Matrigel 胶(Matrigel 原液与无血清培养基之比为 1∶3铺在小室上面,置于 37 ℃培养箱中待用。将 SMMC-7721 细胞系在无血清 DMEM 培养基中饥饿处理 4 h 后,将其消化、重悬。上室加入无血清细胞悬液 200 μL(细胞量 4×10^5/mL),下室加入含 20% FBS 的

DMEM 高糖细胞培养基,每孔 600 μL,培养箱中培养 48 h。处理完成后取出小室,用 PBS 洗涤 3 次,并用湿棉签轻柔擦除上室面的细胞,随后置于 4% 多聚甲醛中固定 20 min。取出室温下风干 3 ~5 min,随后置于结晶紫染料中染色 15 min。最后用 PBS 洗涤 3 次,并置于倒置显微镜下观察穿过微孔膜的细胞数量,并进行统计分析。

1.7 统计学方法

所有数据采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。所有实验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 t 检验或单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义,$P<0.01$ 为差异具有极显著统计学意义。

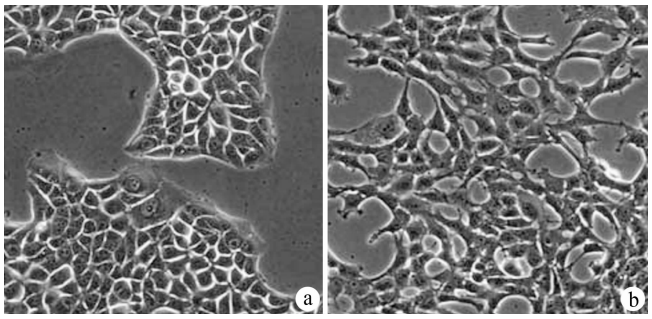
2 结果

2.1 低氧条件下肝癌 SMMC-7721 细胞形态学改变

在常氧环境下,肝癌 SMMC-7721 细胞呈典型上皮细胞样形态,各个细胞之间排列紧密,相互连接。在低氧环境下刺激 24 h 之后,低氧组中细胞极性消失,由连接紧密的扁平状上皮形态逐渐变成连接松散的长梭形狭长形态细胞,细胞排列分散,呈现游走状态(图 1)。

2.2 低氧微环境诱导肝癌 SMMC-7721 细胞 EMT 发生

肝癌 SMMC-7721 细胞在常氧条件和低氧条件下培养 24 h 之后,RT-PCR 及 Western blot 结果显示,与常氧培养组相比,低氧处理组中 SMMC-7721 细胞的上皮表型蛋白 E-cadherin 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低,而间质表型蛋白 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高,同时伴有低氧诱导因子 HIF-1α 的显著上调(图 2、3)。



a:常氧环境下 SMMC-7721 细胞形态;b:低氧环境下 SMMC-7721 细胞形态

图 1 低氧微环境诱导 SMMC-7721 细胞 EMT(×400)

2.3 低氧微环境增强肝癌 SMMC-7721 细胞的体外侵袭能力

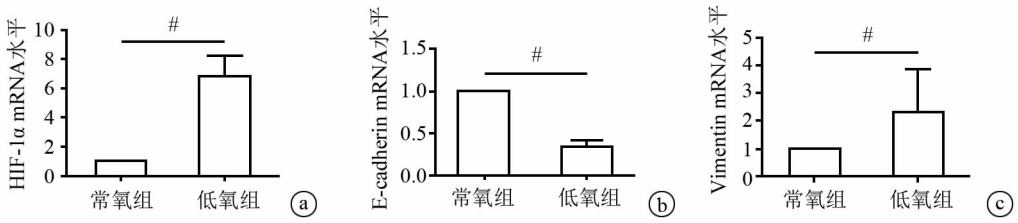
经过常氧和低氧环境下分别处理 24 h 后,与常氧组相比,低氧处理组 SMMC-7721 细胞的侵袭能力显著增强(图 4)。

2.4 沉默 Twist1 表达抑制低氧诱导的 EMT

通过使用 Twist1 靶向沉默 siRNA 来抑制其表达,进一步检测 Twist1 在低氧诱导的 EMT 中的作用。RT-PCR和 Western blot 结果表明,靶向沉默 Twist 后,低氧微环境诱导的 EMT 过程被显著逆转,伴随着 E-cadherin mRNA和蛋白表达水平的表达增高和 Vimentin mRNA 和蛋白表达水平表达下降(图 5、6)。

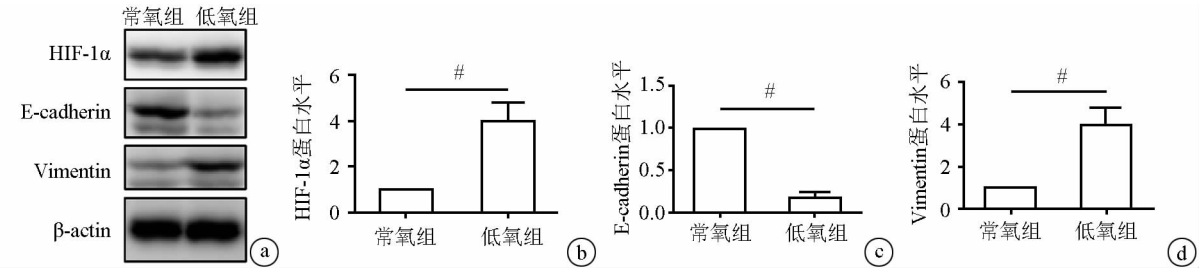
2.5 沉默 Twist1 表达减弱低氧诱导的体外侵袭能力

在 Transwell 小室侵袭实验中,发现在使用 Twist1 靶向沉默 siRNA 阻断其表达后,低氧培养的 SMMC-7721 细胞的侵袭能力被显著削弱(图 7)。



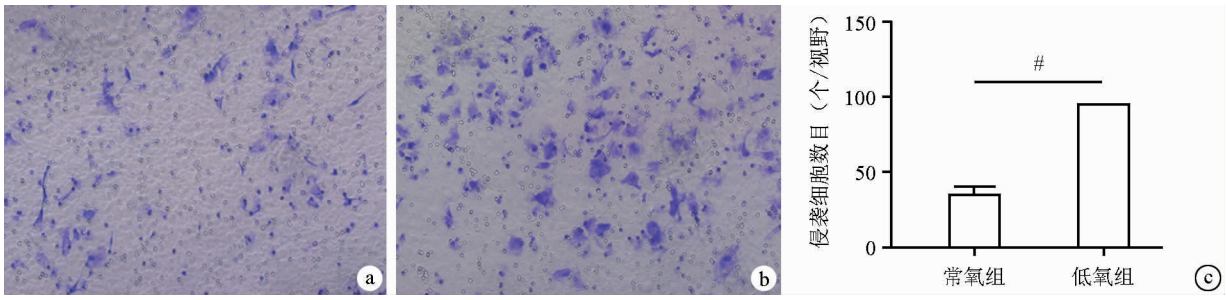
a:HIF-1α mRNA 表达;b:E-cadherin mRNA 表达;c:Vimentin mRNA 表达 #:$P<0.01$

图 2 RT-PCR 结果定量分析



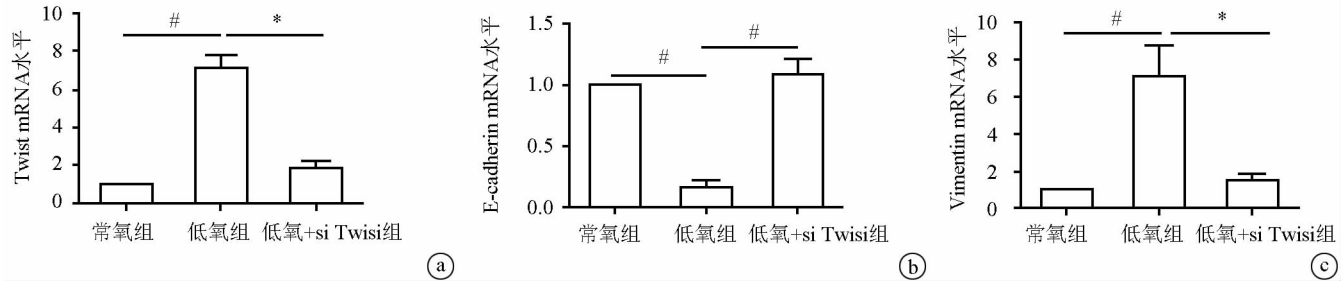
a:Western blot 检测 HIF-1α、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达;b、c、d:Western blot 结果定量分析 #:$P<0.01$

图 3 Western blot 检测 HIF-1α、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达



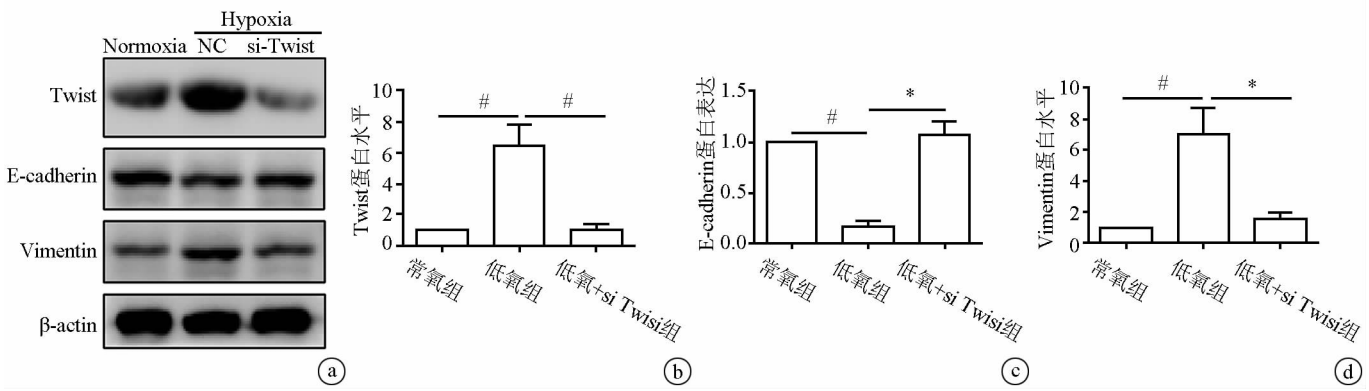
a:常氧组;b:低氧组;c:侵袭能力统计分析柱状图 #:$P<0.01$

图 4 低氧微环境增强肝癌 SMMC-7221 细胞侵袭能力(结晶紫染色 ×200)



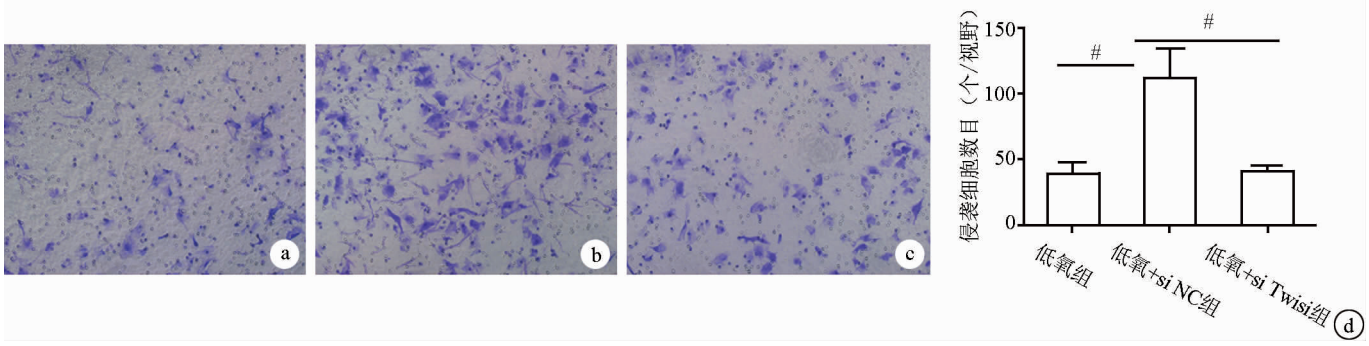
a:Twist mRNA 相对表达水平;b:E-cadherin mRNA 相对表达水平;c:Vimentin mRNA 相对表达水平 *:$P<0.05$; #:$P<0.01$

图 5 RT-PCR 定量分析 Twist、E-cadherin、Vimentin mRNA 表达



a:Western blot 检测 Twist、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达;b、c、d:Western blot 结果定量分析 *:$P<0.05$; #:$P<0.01$

图 6 Western blot 检测 Twist、E-cadherin、Vimentin 蛋白表达



a:低氧组;b:低氧 + si NC 组;c:低氧 + si Twist 组;d:Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力定量分析 #:$P<0.01$

图 7 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力(结晶紫染色 ×200)

3 讨论

恶性肿瘤最主要的特征是浸润和远处侵袭转移,既往研究表明约90%的癌症患者死于恶性肿瘤的转移。肝细胞癌作为一种快速生长的恶性肿瘤,血供极其丰富,早期便有高度的血管侵犯和转移能力,导致60%~80%的患者诊断时即为肝癌晚期,且根治性切除机会极少,从而丧失了治疗机会[7]。实体瘤在生长过程中由于肿瘤细胞的快速增殖,而局部新生血管形成相对滞后,使得局部肿瘤组织的血液供应不足,导致肿瘤细胞处于缺血缺氧微环境[8-9]。低氧作为肿瘤微环境的基本特征,同时也参与恶性肿瘤的侵袭转移、增殖、凋亡等生物学行为的调控[10-12]。作为最常见的实体瘤,原发性肝癌的生长异常迅速,使得局部肿瘤细胞处于缺氧微环境中,尤以巨块型肝癌最常见。既往研究表明,原发性肝癌组织中低氧诱导因子(HIF-1α)表达水平显著升高,并与临床预后呈负相关[13-14]。此外,原发性肝癌组织中处于慢性缺氧环境下的肿瘤细胞具有更强的侵袭转移能力,而EMT过程的启动可能在其中起着关键作用[15-16]。

EMT是一个高度保守的过程,其通过特定程序使具有黏附形态的上皮细胞极性消失、失去细胞间紧密连接,并突破基底膜成为侵袭能力更强的间质细胞。EMT过程不仅参与胚胎形态的形成、多种组织器官的发育以及慢性退行性纤维化变,而且在恶性肿瘤的侵袭转移过程中也扮演重要角色[17]。EMT的发生常伴随着上皮细胞表型标志物E-cadherin的下调,间质细胞表型标志物Vimentin的上调[18]。研究证实,多种因素能够诱导EMT的发生,而低氧微环境是重要的EMT诱导因素之一[19]。局部缺血缺氧微环境能引起卵巢癌[20]、前列腺癌[21]等多种肿瘤细胞发生EMT特征的转变,提高其侵袭转移能力。

Twist是一类新发现的癌基因,主要参与细胞分化和胚胎的发育过程,也是EMT过程中的关键调控因子[22-23]。研究证实,Twist与临床上多种恶性肿瘤的发生发展紧密联系,包括乳腺癌[24]、前列腺癌[25]、胃癌[26]以及肝癌[27]等,这些研究均显示Twist在这些肿瘤组织中呈现高表达。另有研究表明,在肿瘤缺氧条件下存在Twist基因的异常激活,其通过调控下游靶基因对一系列诸如细胞凋亡、增殖、凋亡、侵袭等生物学事件进行干预,最终影响多种肿瘤的发生发展[28-29]。但是在低氧微环境下Twist基因在肝细胞癌EMT中的中的作用及其调控机制目前鲜有报道。

本实验中,我们首先将SMMC-7721细胞分别在常氧和低氧环境下培养,并采用RT-PCR和Western blot技术验证了体外低氧微环境是否能够诱导SMMC-7721细胞EMT的发生。结果表明,与常氧对照组相比,在低氧环境下培养24 h后的,SMMC-7721细胞的形态由最初的多边形向成纤维样细胞形态改变,呈长梭形、纺锤状。同时并伴随着上皮表型蛋白E-cadherin表达的下降和间质表型蛋白Vimentin表达的升高。Transwell结果也证实低氧刺激后发生EMT的SMMC-7721细胞具有更强的侵袭潜能。接下来我们进一步对EMT的关键调控基因Twist进行检测,结果显示,低氧环境下培养24 h后SMMC-7721细胞中Twist基因显著激活,提示其可能参与低氧环境下SMMC-7721细胞EMT过程。为了明确Twist基因在其中的作用机制,我们通过特异性Twist si-RNA来靶向沉默阻断其表达,并进一步检测其对细胞EMT启动和侵袭能力影响。研究发现,在靶向沉默Twist基因之后,低氧介导的SMMC-7721细胞EMT过程和侵袭现象被逆转,表明Twist基因在这一过程中起着关键作用。基于以上研究,我们推测低氧微环境通过激活Twist基因来调控SMMC-7721细胞EMT过程和体外侵袭转移,最终促进肝癌的远处转移和复发。

综上所述,本研究初步证实在肝癌SMMC-7721细胞中低氧微环境能够通过激活Twist基因来诱导EMT的发生和肿瘤细胞的侵袭转移。因此,深入研究Twist基因在肝癌EMT过程中的作用及其调节机制,通过靶向阻断Twist基因,从而逆转EMT过程并抑制肿瘤细胞侵袭转移,这将为肝细胞癌的侵袭转移的预防和特异性治疗提供新的思路和理论依据。

[参考文献]

[1] Schlachterman A, Craft WWJr., Hilgenfeldt E, et al. Current and future treatments for hepatocellular carcinoma[J]. World J gastroenterolo, 2015,21(28):8478-8491. doi:10.3748/wjg.v21.i28.8478.

[2] Manoochehri Khoshinani H, Afshar S, Najafi R. Hypoxia: A double-edged sword in cancer therapy[J]. Cancer Invest, 2016, 34(10):536-545. doi:10.1080/07357907.2016.1245317.

[3] Chen T, You Y, Jiang H, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): a biological process in the development, stem cell differentiation and tumorigenesis[J]. J cell physiol, 2017, 12(13):341-322. doi:10.1002/jcp.25797.

[4] Smith BN, Bhowmick NA. Role of EMT in metastasis and therapy resistance[J]. J Clin Med, 2016, 5(2):12-17. doi:10.3390/jcm5020017.

[5] Yang J, Hou Y, Zhou M, et al. Twist induces epithelial-mesenchymal transition and cell motility in breast cancer via ITGB1-FAK/ILK signaling axis and its associated downstream network[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 71:62-71. doi:10.1016/j.biocel.2015.12.004.

[6] Yao C,Li P,Song H,et al. CXCL12/CXCR4 axis upregulates twist to induce EMT in human glioblastoma[J]. Mol Neurobiol,2016,53(6):3948-3953. doi:10.1007/s12035-015-9340-x.

[7] Hu B,An HM,Wang SS,et al. Preventive and therapeutic effects of chinese herbal compounds against hepatocellular carcinoma[J]. Molecules,2016,21(2):142. doi:10.3390/molecules21020142.

[8] Chiche J,Ricci JE,Pouyssegur J. Tumor hypoxia and metabolism-towards novel anticancer approaches[J]. Ann Endocrinol,2013,74(2):111-114. doi 10.1016/j.ando.2013.02.004.

[9] Voss M J,Niggemann B,Zanker K S,et al. Tumour reactions to hypoxia[J]. Curr Mol Med,2010,10(4):381-386. doi:10.2174/156652410791317020.

[10] Zhang Y,Liu Q,Wang F,et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1alpha[J]. J Pineal Res,2013,55(2):121-130. doi:10.1111/jpi.12052.

[11] Wang L,Wu B,Zhang Y,et al. Hypoxia promotes the proliferation of MC3T3-E1 cells via the hypoxia-inducible factor-1alpha signaling pathway[J]. Mol Med Rep,2015,12(4):5267-5273. doi:10.3892/mmr.2015.4034.

[12] Wang X,Li J,Wu D,et al. Hypoxia promotes apoptosis of neuronal cells through hypoxia-inducible factor-1alpha-microRNA-204-B-cell lymphoma-2 pathway[J]. Exp l Biol Med,2016,241(2):177-183. doi:10.1177/1535370215600548.

[13] Luo D,Wang Z,Wu J,et al. The role of hypoxia inducible factor-1 in hepatocellular carcinoma[J]. Bio Med Res Int,2014,4(1):427-431. doi:10.1155/2014/409272.

[14] Yao DF,Jiang H,Yao M,et al. Quantitative analysis of hepatic hypoxia-inducible factor-1alpha and its abnormal gene expression during the formation of hepatocellular carcinoma[J]. HBPD Int,2009,8(4):407-413.

[15] Meng FD,Wei JC,Qu K,et al. FoxM1 overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. World J gastroenterol,2015,21(1):196-213. doi:10.3748/wjg.v21.i1.196.

[16] Mima K,Hayashi H,Imai K,et al. High CD44s expression is associated with the EMT expression profile and intrahepatic dissemination of hepatocellular carcinoma after local ablation therapy[J]. J Hepato Bil Pan Sci,2013,20(4):429-434. doi:10.1007/s00534-012-0580-0.

[17] Yoshida GJ. Emerging role of epithelial-mesenchymal transition in hepatic cancer[J]. J Exp Clin Cancers Res,2016,35(1):141. doi:10.1186/s13046-016-0419-7.

[18] Davis FM,Stewart TA,Thompson EW,et al. Targeting EMT in cancer: opportunities for pharmacological intervention[J]. Trends Pharmacol Sci,2014,35(9):479-488. doi:10.1016/j.tips.2014.06.006.

[19] Jiang J,Tang YL,Liang XH. EMT:a new vision of hypoxia promoting cancer progression[J]. Cancer Biol Ther,2011,11(8):714-723. doi:10.4161/cbt.11.8.15274.

[20] Du J,Sun B,Zhao X,et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma[J]. Gynecol Oncol,2014,133(3):575-583. doi:10.1016/j.ygyno.2014.02.034.

[21] Li W,Dong Y,Zhang B,et al. PEBP4 silencing inhibits hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer cells[J]. Biomed pharmacother,2016,81:1-6. doi:10.1016/j.biopha.2016.03.030.

[22] Khan MA,Chen HC,Zhang D,et al. Twist:a molecular target in cancer therapeutics[J]. Tumor Biol,2013,34(5):2497-2506. doi:10.1007/s13277-013-1002-x.

[23] Wushou A,Hou J,Zhao YJ,et al. Twist-1 up-regulation in carcinoma correlates to poor survival[J]. Int J mol Sci,2014,15(12):21621-21630. doi:10.3390/ijms151221621.

[24] Grzegrzolka J,Biala M,Wojtyra P,et al. Expression of EMT markers SLUG and TWIST in breast cancer[J]. Anticancer Res,2015,35(7):3961-3968.

[25] Gajula RP,Chettiar ST,Williams RD,et al. The twist box domain is required for Twist1-induced prostate cancer metastasis[J]. Mol Cancer Res,2013,11(11):1387-1400. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0218-T

[26] Liu AN,Zhu ZH,Chang SJ,et al. Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. Mol Cell Biochem,2012,367(1-2):195-203. doi:10.1007/s11010-012-1333-8

[27] Matsuo N,Shiraha H,Fujikawa T,et al. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cell Biochem,2009,18,9:240. doi:10.1186/1471-2407-9-240

[28] Glackin CA. Targeting the Twist and Wnt signaling pathways in metastatic breast cancer[J]. Maturitas,2014,79(1):48-51. doi:10.1016/j.maturitas.2014.06.015.

[29] Tseng JC,Chen HF,Wu KJ. A twist tale of cancer metastasis and tumor angiogenesis[J]. Histol histopathol,2015,30(11):1283-1294. doi:10.14670/HH-11-638.

(编辑:刘 艺)