

· 论 著 ·

MDM2 对人乳腺癌细胞上皮间质转化的影响及其机制研究*

210029 南京 南京医科大学第一附属医院肿瘤科

闫彩云, 仇金荣, 卢建磊¹, 殷咏梅²

【摘要】 目的 探讨鼠双微体 2 (MDM2) 在上皮间质转化 (EMT) 过程中的作用及其分子机制。方法 采用 Western blotting 检测人乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞株中 MDM2 及 EMT 相关标记分子 (E-cadherin、N-cadherin 及 Vimentin) 水平; 分别于 MCF-7 细胞中瞬时转染 MDM2 空质粒 pcmv、MDM2 过表达质粒 pcmv-MDM2, MDA-MB-231 细胞中瞬时转染针对 MDM2 三个不同靶点的干扰质粒 36h 后观察细胞形态, 并采用 Western blotting 和免疫荧光检测 EMT 相关标记分子及 MDM2 的表达情况; 采用 Western blotting 及实时定量 PCR 检测在 MCF-7、MDA-MB-231 细胞过表达 MDM2 后对促 EMT 转录因子 Snail1、Twist 蛋白和 mRNA 水平的影响。结果 MCF-7 细胞过表达 MDM2 后形态由鹅卵石形变为纺锤形, E-cadherin 蛋白随 MDM2 表达水平的上调表达降低; MDA-MB-231 细胞敲低 MDM2 后形态由长梭形变为卵圆形, Vimentin、N-cadherin 蛋白随 MDM2 表达水平的下调表达依次降低; MCF-7 及 MDA-MB-231 细胞过表达 MDM2 后 Snail1、Twist 的蛋白及 mRNA 水平均升高。结论 在乳腺癌细胞株中 MDM2 可促进 EMT 发生, 其可能通过上调转录因子 Snail1 和 Twist 表达来实现。

【关键词】 鼠双微体 2; 乳腺癌; 上皮间质转化; Snail1; Twist

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2014)08-0678-06

Influences of MDM2 on epithelial mesenchymal transition of human breast cancer cells and its molecular mechanism

YAN Caiyun, QIU Jinrong, LU Jianlei, YIN Yongmei. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: YIN Yongmei, E-mail: ym.yin@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the influence of murine double minute 2 (MDM2) on epithelial mesenchymal transition (EMT) of human breast cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** Western blotting method was performed to examine the protein expressions of MDM2 and EMT-related proteins (E-cadherin, N-cadherin and Vimentin) in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231 and MDA-MB-435. The optical microscope was used to observe the morphological changes at 36th hour after transiently transfection of MCF-7 cells with empty plasmid (pcmv) or MDM2 overexpression plasmid (pcmv-MDM2) and MDA-MB-231 cells with three different interference plasmids. Meanwhile, the expressions of MDM2 and EMT related molecular markers were measured by Western blotting and immunofluorescence assays, respectively. The Western blotting and real-time quantitative PCR were used to evaluate the protein and mRNA level changes of Snail1 and Twist in MCF-7, MDA-MB-231 cells after overexpression of MDM2. **Results** MCF-7 cells displayed decreased protein levels of E-cadherin and its morphology changed from tightly packed colonies to spindle-shaped growth after overexpression of MDM2. MDA-MB-231 cells exhibited reduced levels of Vimentin and N-cadherin and its morphology changed from fibroblast-like growth to cobblestone-like colonies after the knockdown of MDM2. Both the protein and mRNA levels of Snail1 and Twist increased after overexpression of MDM2 in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. **Conclusion** MDM2 can promote the EMT in human breast cancer cells with the possible mechanism of up-regulating the expressions of Snail1 and Twist.

【Key Words】 Murine double minute 2; Breast cancer; Epithelial mesenchymal transition; Snail1; Twist

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81172503); 江苏省临床医学科技专项项目 (BL2012008)

1 210029 南京医科大学发育与遗传学系

2 通讯作者, E-mail: ym.yin@hotmail.com

近年来,乳腺癌发病率在我国部分大中城市已占女性恶性肿瘤第 1 位,尽管治疗手段不断提高,但仍有约 25%~40%的乳腺癌发生转移并导致治疗失败^[1]。肿瘤转移是一个多因子参与的多步骤复杂过程,其中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是决定肿瘤侵袭和转移程度的关键因素之一^[2]。现有资料表明,鼠双微粒体 2(murine double minute 2, MDM2)在包括乳腺癌在内的人类 50 多种不同类型的肿瘤中高表达,且 MDM2 高表达与肿瘤侵袭转移有高度相关性,但 MDM2 在 EMT 过程中发挥的作用及其分子机制目前尚不清楚^[3]。本研究通过在乳腺癌细胞中瞬时转染 MDM2 过表达和敲低质粒,探讨 MDM2 在 EMT 中的作用,进而初步探讨 MDM2 与促进 EMT 发生的转录因子 Snail1、Twist 间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞系均购自美国 ATCC 公司, DMEM 培养液、RPMI 1640 培养液和小牛血清均购自美国 Gibco 公司,胰酶购自美国 Amersco 公司,二甲基亚砜购自美国 Sigma 公司, ECL 发光液购自美国 Thermo 公司,质粒纯化试剂盒购自美国 Qiagen 公司, Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, 荧光定量 PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒均购自 Takara 公司,兔抗人 E-cadherin 抗体、兔抗人 Vimentin 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗人 N-cadherin 抗体、小鼠抗人 β -actin 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,小鼠抗人 MDM2 抗体购自美国 Calbiochem 公司,兔抗人抗体 Snail1 抗体、鼠抗人 Twist 抗体均购自美国 Abcam 公司,山羊抗小鼠 IgG-HRP 和山羊抗兔 IgG-HRP 均购自美国 Bioworld 公司。过表达 MDM2 的 pcmv-MDM2 质粒由本实验室自行构建,敲低 MDM2 表达的 si-MDM2-1、si-MDM2-3 和 si-MDM2-5 质粒均由吉凯基因公司构建, Target 序列分别为 5'-CAGCCATCAACTTCTAGTA-3'、5'-TTCCAGAGAGTCATGTGTT-3' 和 5'-GTGTGTAATAAGGGAGATA-3'。

1.2 细胞培养 MCF-7、MDA-MB-435 细胞均用含 10% 小牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基培养; MDA-MB-231 细胞用含 10% 小牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基培养。所有细胞置于 37 $^{\circ}$ C、5%

CO₂ 的培养箱中常规培养。

1.3 Western blotting 检测 分别取 5×10^6 个 MCF-7、MDA-MB-231 及 MDA-MB-435 细胞,裂解后提取细胞总蛋白, Bradford 分光光度法测定蛋白浓度。取 60 μ g 总蛋白上样,以 10% SDS-PAGE 凝胶恒压电泳,待溴酚蓝刚跑出时终止电泳。恒压 80V,湿转 2h 后,5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液室温封闭 1h 后,分别加入 MDM2(1:500)、E-cadherin(1:3000)、N-cadherin(1:1000)及 Vimentin 一抗(1:3000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,按 1:5000 稀释二抗,室温孵育 1h, ECL 发光液压片、曝片、分析。各实验均重复 3 次。应用 Image J 软件分析条带灰度值。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.4 瞬时转染 (1)待 MCF-7 细胞融合 60%~70% 时进行转染,将质粒 pcmv(2.0 μ g)、pcmv-MDM2(0.5、1.0、2.0 μ g)加至无血清培养液中,混匀后与 Lipofectamin 2000 悬液混合,室温静置 20min 后于培养箱中培养。(2)于 MDA-MB-231 细胞中瞬时转染针对 MDM2 三个不同靶点的干扰质粒 si-MDM2-1、si-MDM2-3、si-MDM2-5(各 2.0 μ g),选取干扰效果最强的质粒来转染 MDA-MB-231 细胞,浓度分别为 0.5、1.0、2.0 μ g,同时瞬时转染 si-Control(2.0 μ g)作对照。(3)分别于 MCF-7、MDA-MB-231 细胞中瞬时转染 pcmv(2.0 μ g)、pcmv-MDM2(2.0 μ g)。(2)和(3)中的转染方法与(1)相同。于 MCF-7、MDA-MB-231 细胞进行上述转染 36h 后采用 Western blotting 法检测 MDM2、E-cadherin、N-cadherin、Snail1 及 Twist 的蛋白水平。

1.5 免疫荧光检测 MCF-7 细胞瞬时转染 pcmv-MDM2 质粒 36h 后,弃培养液,4%多聚甲醛室温固定 20min,0.1% Triton X-100 透化 10min, PBS 洗涤后 4% 小牛血清白蛋白封闭 45min,加入 E-cadherin 一抗(1:75),4 $^{\circ}$ C 过夜,加入驴抗兔荧光二抗(1:400),遮光摇床 1h。PBS 洗涤后 DAPI 染核,加入抗荧光猝灭封片液后荧光显微镜观察。MDA-MB-231 细胞瞬时转染干扰效果最强质粒 36h 后行免疫荧光实验检测 Vimentin(1:75),方法同上。实验重复 3 次。

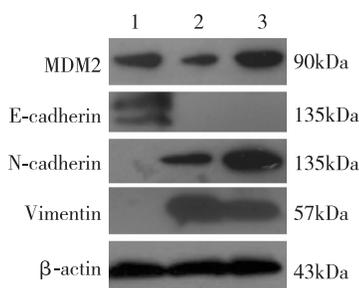
1.6 实时定量 PCR 在 MCF-7、MDA-MB-231 细胞均瞬时转染 pcmv-MDM2 质粒 36h 后,用 Trizol 提取细胞总 RNA,然后根据反转录试剂盒说明书按 20 μ l 体系将 1.0 μ g RNA 反转录生成 cDNA。以获得的 cDNA 为模板,用 EvaGreen qPCR Master Mix 试剂盒对目的基因进行定量 PCR 扩增。Snail1 上游引物:

5'-CTGCGGGAAGGCCTTCTCT-3', 下游引物: 5'-CGCCTGGCACTGGTACTTCTT-3'; Twist 上游引物: 5'-AGCTGAGCAAGATTCAGACCCTCA-3', 下游引物: 5'-CTGCAGCTTGCCATCTTGGAGT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GGTCTCCTCTGACTTCAACA-3', 下游引物: 5'-AGCCAAATTCGTTGTCATAC-3'。反应体系: SYBR[®] Premix Ex TaqTM (2×) 10μl, ROX Reference Dye (50×) 0.4μl, 模板 2μl, 上、下游引物各 0.4μl, 灭菌蒸馏水 6.8μl。采用 ABI 7500 Real-Time PCR System 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件如下: 95℃ 预变性 30s, 随后 95℃ 变性 5s, 60℃ 退火延伸 30s, 共 40 个循环。实验重复 3 次, 每次 3 个复孔。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示相对表达量。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计处理。数据以均数±标准差表示, 组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞株中 EMT 相关标记分子及 MDM2 蛋白水平 MCF-7 细胞中上皮标记分子 E-cadherin 的蛋白水平较高, 而其余两株细胞中 E-cadherin 不表达; 相反, MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞中间质标记分子 N-cadherin 和 Vimentin 具有较高表达水平, 而在 MCF-7 细胞中不表达; MDA-MB-231 细胞中 Vimentin 蛋白表达水平较 MDA-MB-435 细胞更高, 而其 N-cadherin 蛋白表达水平较低; MDM2 的蛋白表达水平在 MDA-MB-435 细胞中最高, 在 MDA-MB-231 细胞中最低。见图 1。



注: 1: MCF-7; 2: MDA-MB-231; 3: MDA-MB-435

图 1 不同乳腺癌细胞株中 EMT 相关标记分子及 MDM2 蛋白水平

2.2 过表达 MDM2 促进 MCF-7 细胞 EMT 发生 MCF-7 细胞过表达 MDM2 后形态由鹅卵石形变为纺锤形, E-cadherin 蛋白随 MDM2 表达水平的上调

表达依次降低; 荧光显微镜显示 MDM2 过表达后, 反映 MDM2 的红色荧光较强, 而反映 E-cadherin 的绿色荧光较弱。见图 2、图 3。

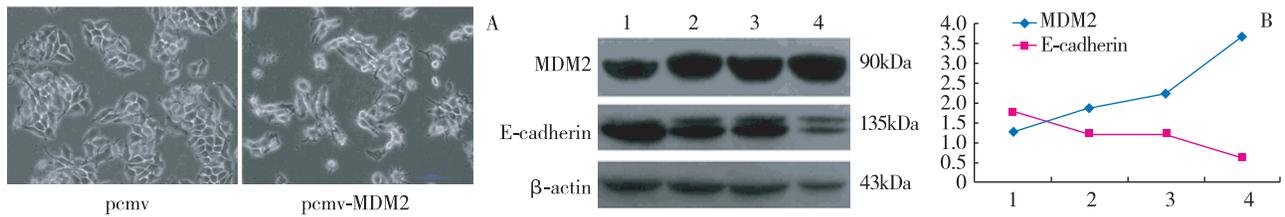
2.3 敲低 MDM2 抑制 MDA-MB-231 细胞 EMT 的发生 干扰质粒 si-MDM2-5 对 MDM2 的抑制作用最明显(图 4)。MDA-MB-231 细胞敲低 MDM2 后形态由长梭形变为卵圆形, Vimentin、N-cadherin 蛋白随 MDM2 表达水平的下调表达依次降低(图 5); 荧光显微镜显示 MDM2 敲低后, 反映 MDM2 的红色荧光及反映 Vimentin 的绿色荧光均较弱(图 6)。

2.4 MDM2 过表达上调转录因子 Snail1、Twist MCF-7 细胞过表达 MDM2 后 Snail1、Twist 的蛋白及 mRNA 水平表达均上调($P < 0.05$), 在 MDA-MB-231 细胞中得到与 MCF-7 细胞中类似的结果。见图 7。

3 讨论

EMT 与肿瘤的侵袭和转移有密切关系, 以上皮细胞特性丧失及间质细胞特性获得为重要特征^[4]。在此过程中, 介导上皮细胞间紧密连接的胞膜蛋白 E-cadherin 表达下调, 间质细胞间的连接蛋白如 N-cadherin 表达上调, 同时细胞骨架重排, 这一系列改变使细胞粘附能力下降, 运动迁移能力增加, 最终细胞获得了向胞外基质侵袭和运动的能力^[5]。本研究选取了侵袭能力较弱的 MCF-7 细胞及侵袭能力较强的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-435 细胞并检测 3 种细胞中 EMT 相关标记蛋白表达, 结果与之前的研究结果一致^[6], 提示侵袭较弱的细胞上皮标记蛋白表达较高, 侵袭力较强的细胞间质标记蛋白表达较高。此外, 本研究发现 MDA-MB-231 细胞的 Vimentin 蛋白表达水平较 MDA-MB-435 细胞更高, 而其 N-cadherin 蛋白表达水平较低, 这种不一致的变化提示 Vimentin、N-cadherin 可能不仅仅是 EMT 的一个标记分子。有研究显示, Vimentin 能够在细胞质中与 p53 结合, 抑制 p53 进入细胞核, 进而促进细胞凋亡^[7]。另外, 曾有报道称 N-cadherin 通过激活 PKB/Akt/Bcl2 通路抑制细胞凋亡^[8]。以上表明 Vimentin 和 N-cadherin 在肿瘤的转移过程中还发挥着其他作用, 有待于进一步研究。

大量研究已证实 MDM2 是肿瘤抑制基因 p53 重要的负性调节因子, 而众所周知 p53 是人类肿瘤发生最重要的分子之一, 因而 MDM2 在肿瘤发生、发展中占据重要地位。目前为大家所公认的是 p53 与 MDM2 之间存在的一个负反馈调节环, 即 MDM2



注:A: 荧光显微镜($\times 200$); B: Western blotting; 1: pcmv; 2~4 依次为: 0.5 μg , 1.0 μg , 2.0 μg pcmv-MDM2

图 2 MCF-7 细胞过表达 MDM2 后的形态学观察及 Western blotting 检测

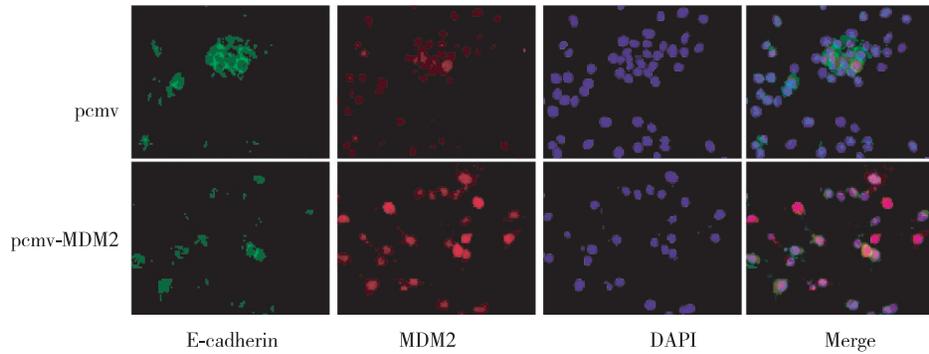
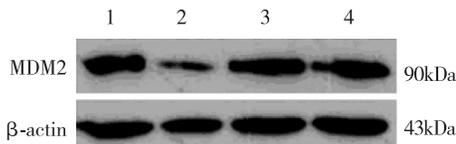


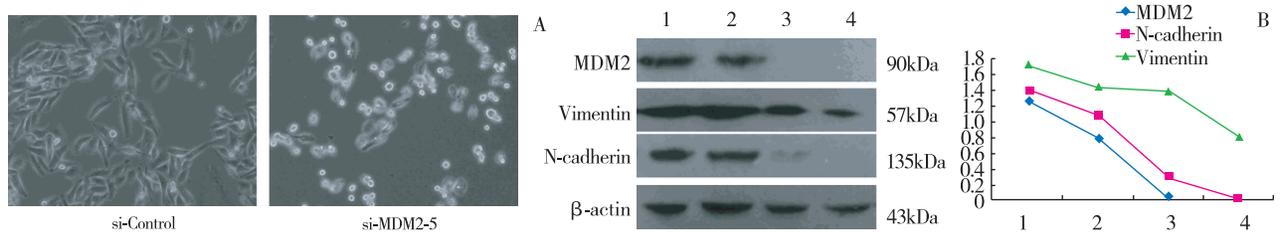
图 3 MCF-7 细胞转染 pcmv-MDM2 质粒 36h 后的免疫荧光检测($\times 200$)



注: 1: si-Control; 2: si-MDM2-5; 3: si-MDM2-3; 4: si-MDM2-1

图 4 针对 MDM2 3 个不同靶点的干扰质粒验证

可在 p53 诱导下转录增强, 导致细胞中 MDM2 蛋白水平上调, MDM2 水平升高后又通过多种途径抑制 p53 功能。然而, 近期越来越多研究发现 MDM2 也可不依赖于 p53 在调控细胞增殖、凋亡中发挥促癌作用^[9]。有研究发现 MDM2 通过降解 E-cadherin 蛋白促进细胞运动和侵袭^[10], 因此推测 MDM2 在乳



注:A: 荧光显微镜($\times 200$); B: Western blotting; 1: si-Control; 2~4 依次为: 0.5 μg , 1.0 μg , 2.0 μg si-MDM2-5

图 5 MDA-MB-231 细胞敲低 MDM2 后的形态学观察及 Western blotting 检测

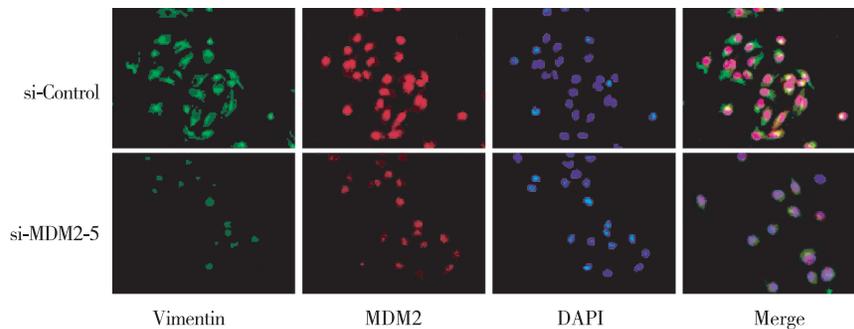
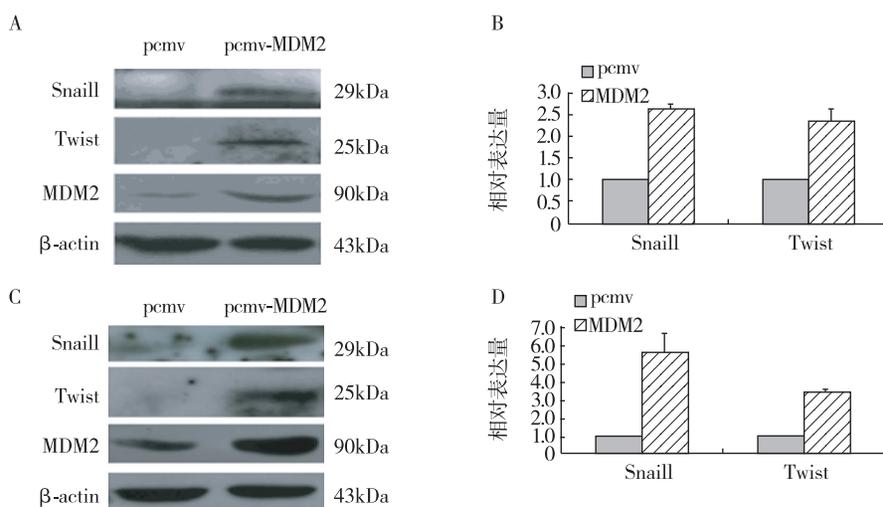


图 6 MDA-MB-231 细胞转染 si-MDM2-5 质粒 36h 后的免疫荧光检测($\times 200$)



A,C; MCF-7、MDA-MB-231 细胞 Western blotting 检测; B,D; MCF-7、MDA-MB-231 细胞定量 PCR

图 7 过表达 MDM2 导致促 EMT 转录因子 Snail1、Twist 表达上调

腺癌细胞中能够诱导 EMT 发生。本研究中 Western blotting 和免疫荧光检测结果均显示,在乳腺癌细胞中过表达 MDM2 能够下调上皮标记分子 E-cadherin,敲低 MDM2 能够下调间质标记分子 N-cadherin 和 Vimentin,且 MDM2 表达的变化引起了相应细胞形态改变。另外,本课题组前期的研究成果已证明 MDM2 高表达使乳腺癌细胞的侵袭、迁移能力增强,敲低 MDM2 则使侵袭、迁移能力减弱^[11]。综合上述结果,可以确定 MDM2 促进乳腺癌细胞 EMT 的发生。

MDM2 有 40 多种剪接体,能够编码不同分子量的 MDM2 蛋白,可能具有不同的生物学功能^[12]。本研究发现 MDA-MB-231 细胞中 MDM2 蛋白表达量较 MCF-7 细胞低,与预想的间质型细胞中 MDM2 表达较高不相符。有研究报道 MDA-MB-231 细胞的主要表达分子量为 57、53kDa 的 MDM2 蛋白剪接体,而不是 MDM2 P90^[13],这可作为我们研究结果的合理解释之一。另外,有研究报道结直肠癌组织能够表达多种 MDM2 剪接体,可能在肿瘤进展过程中发挥不同的作用^[14]。因此,检测 MDM2 不同剪接体在特定组织中的表达差异来推测它们在肿瘤进展中的不同作用是非常重要的,有待于我们进一步深入研究。

EMT 过程涉及非常复杂的分子机制,很多转录因子在其中发挥不可或缺的作用。有研究报道活化的核转录因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 通过稳定乳腺癌细胞中的 Snail1 来促进细胞的侵袭转移,研究结果显示下调 Snail1 表达能使紧密连接

蛋白 ZO-1 和 claudin 表达水平降低,间质标记分子 N-cadherin 表达升高,进而抑制炎症因子介导的细胞侵袭、转移^[15]。有研究发现 Snail1 与 Suv39H1 作用下调 E-cadherin 表达介导乳腺癌细胞 EMT 的发生^[16]。近期有研究报道 TNF- α 诱导 EMT 发生需要 NF- κ B 介导 Twist 的上调^[17]。本研究结果显示 MDM2 高表达促进乳腺癌细胞 EMT 发生,且 MDM2 在蛋白水平及 mRNA 水平均上调 Snail1、Twist 表达。由此提示 MDM2 在乳腺癌细胞株中通过介导转录因子 Snail1、Twist 表达上调,进而促进 EMT 的发生。

综上所述,本研究首次证实在乳腺癌细胞株中 MDM2 通过上调转录因子 Snail1、Twist 进而促进细胞 EMT 的发生,明确了 MDM2 在 EMT 过程中所扮演的角色,进一步完善了对 MDM2 在肿瘤侵袭转移中所起作用的认识,并初步探索了 MDM2 促进 EMT 发生的分子机制,为将 MDM2 作为乳腺癌转移预防和治疗的靶点提供了理论依据和实验基础。然而 MDM2 上调 Snail1、Twist 的具体作用机制以及 MDM2 在 EMT 过程中涉及的其他相关因子仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] Guarneri V, Conte P. Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy[J]. *Oncologist*, 2009, 14(7):645-656.
- [2] 苏云涛,许妍洁,仇金荣,等.上皮间质转化分子标记物在乳腺浸润性导管癌组织中的表达及临床意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(6):505-510.

- [3] Manfredi JJ. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(15):1580-1589.
- [4] Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(3):194-207.
- [5] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5):871-890.
- [6] Dong C, Yuan T, Wu Y, et al. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(3):316-331.
- [7] Yang X, Wang J, Liu C, et al. Cleavage of p53-vimentin complex enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(3):705-719.
- [8] Tran NL, Adams DG, Vaillancourt RR, et al. Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36):32905-32914.
- [9] Thomasova D, Mulay SR, Bruns H, et al. p53-independent roles of MDM2 in NF-kappaB signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(12):1097-1101.
- [10] Yang JY, Zong CS, Xia W, et al. MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(19):7269-7282.
- [11] Chen X, Qiu J, Yang D, et al. MDM2 promotes invasion and metastasis in invasive ductal breast carcinoma by inducing matrix metalloproteinase-9 [J/OL]. *PLoS One*, 2013 [2014-02-24]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3827260>.
- [12] Wade M, Li YC, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(2):83-96.
- [13] Alkhalaf M, El-Mowafy AM, Abou-Zeid LA. Progesterone inhibition of MDM2 p90 protein in MCF-7 human breast cancer [J]. *J Mol Genet Med*, 2005, 1(1):33-37.
- [14] Yu Z, Zhang B, Cui B, et al. Identification of spliced variants of the proto-oncogene HDM2 in colorectal cancer [J]. *Cancer*, 2012, 118(4):1110-1118.
- [15] Wu Y, Deng J, Rychahou PG. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(5):416-428.
- [16] Dong C, Wu Y, Wang Y, et al. Interaction with Suv39H1 is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 32(11):1351-1362.
- [17] Li CW, Xia W, Huo L, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1 [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(5):1290-1300.

收稿日期:2014-05-05; 修回日期:2014-05-30