

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.010

· 基础研究 ·

肝星状细胞条件培养基对肝癌细胞 PLC/PRF/5 耐药性的影响及其机制

喻国锋^{1,2}, 井莹莹², 寇兴瑞¹, 李蓉², 吴孟超², 卫立辛^{2Δ} (1. 苏州大学研究生院, 江苏 苏州 215006; 2. 东方肝胆外科医院, 肿瘤免疫与基因治疗研究中心, 上海 200438)

[摘要] **目的:**探讨肝星状细胞条件培养基(hepatic stellate cell conditioned medium, HSC-CM)对人肝癌 PLC/PRF/5 细胞耐药性的影响及其可能的机制。**方法:**用无血清 RPMI 1640 培养肝星状细胞 LX-2, 使其在缺营养的环境下活化, 收集其条件培养基上清即为 HSC-CM。PLC/PRF/5 细胞在 HSC-CM 条件下培养 24 h 后, 顺铂处理 12 h 或 24 h, 采用流式细胞术检测 PLC/PRF/5 细胞的凋亡情况, MTT 法检测 PLC/PRF/5 细胞的增殖, real-time PCR 检测 PLC/PRF/5 细胞上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相关基因的表达水平。**结果:**顺铂组 12 和 24 h 两个时间点 PLC/PRF/5 细胞的凋亡率为(22.34 ± 1.12)% 和(26.78 ± 1.56)%; HSC-CM + 顺铂组细胞的凋亡率为(17.22 ± 1.42)% 和(21.52 ± 1.76)% , 顺铂组细胞凋亡率显著高于 HSC-CM + 顺铂组($P < 0.05$)。同在这两个时间点, 顺铂组和 HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞的增殖活性分别为(68.65 ± 2.56)% 和(79.47 ± 1.43)% , (46.54 ± 3.65)% 和(62.77 ± 2.89)% , HSC-CM + 顺铂组细胞增殖活性均高于顺铂组($P < 0.05$)。Real-time PCR 结果显示, 与顺铂组相比较, HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞中上皮标记物钙黏蛋白(E-cadherin)的表达下降($P < 0.05$) , 而间质细胞标记物神经黏附素(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)以及 EMT 相关转录因子 Snail 和 ZEB1 的表达显著上调($P < 0.01$)。**结论:** HSC-CM 可能通过诱导 PLC/PRF/5 细胞发生 EMT, 从而增强 PLC/PRF/5 细胞对顺铂的抵抗作用。

[关键词] 肝星状细胞条件培养基; 肝癌; PLC/PRF/5 细胞; 化疗抵抗; 上皮间质转化

[中图分类号] R735.7; R730.5; Q279

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0187-05

Effect of hepatic stellate cell condition medium on chemo-resistance of hepatocellular carcinoma PLC/PRF/5 cells and its mechanism

Yu Guofeng^{1,2}, Jing Yingying², Kou Xingrui¹, Li Rong², Wu Mengchao², Wei Lixin^{2Δ} (1. Graduate school of Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; 2. Tumor Immunology and Gene Therapy Research Center, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of the hepatic stellate cell condition medium (HSC-CM) on chemo-resistance of human hepatocellular carcinoma PLC/PRF/5 cells and its possible mechanism. **Methods:** Hepatic stellate cell line LX-2 was incubated and activated in serum-free RPMI 1640 medium, and then this condition medium was collected, named HSC-CM. PLC/PRF/5 cells were incubated in HSC-CM for 24 h. After the treatment of cisplatin for 12 or 24 h, the apoptosis of PLC/PRF/5 cells was identified by flow cytometry, the cell proliferation of PLC/PRF/5 cells was detected by MTT assay, and the expression of epithelial mesenchymal transition (EMT) associated genes in PLC/PRF/5 cells was detected by real-time PCR. **Results:** The apoptosis rates of PLC/PRF/5 cells in the cisplatin group were (22.34 ± 1.12)% and (26.78 ± 1.56)%; those in the HSC-CM + cisplatin group were (17.22 ± 1.42)% and (21.52 ± 1.76)% at 12 and 24 h time points, which showed that the apoptosis rates of the cisplatin group were higher than of the HSC-CM + cisplatin group ($P < 0.05$). The proliferation of PLC/PRF/5 cells in the cisplatin group and HSC-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 31171321, No. 81201584); 上海市自然科学基金资助项目(No. 2ZR1439800, No. 12ZR1454200)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31171321, No. 81201584), and the Natural Science Foundation of Shanghai (No. 2ZR1439800, No. 12ZR1454200)

[作者简介] 喻国锋(1988-), 男, 江西省吉安市人, 硕士生, 主要从事肝癌防治的基础和临床研究。E-mail: ygfycl@163.com。

[通信作者] 吴孟超(Wu Mengchao, corresponding author), E-mail: wuyuz@yahoo.com.cn; 卫立辛(Wei Lixin, co-corresponding author), E-mail: weilixin@yahoo.com。Δ共同通信作者

CM + cisplatin group at these two time points were (68.65 ± 2.56)% and (79.47 ± 1.43)% , (46.54 ± 3.65)% and (62.77 ± 2.89)% respectively, showing a stronger proliferation activity of PLC/PRF/5 cells from the HSC-CM + cisplatin group. Real-time PCR results indicated that compared with the cisplatin group, the expression of epithelial marker E-cadherin in PLC/PRF/5 cells from the HSC-CM + cisplatin group was decreased ($P < 0.05$), and the mesenchymal markers (N-cadherin, vimentin) and EMT-associated transcription factor (Snail, ZEB1) expressions were significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** HSC-CM may promote the chemo-resistance of PLC/PRF/5 cells through inducing EMT of PLC/PRF/5 cells.

[**Key words**] hepatic stellate cell condition medium; hepatocellular carcinoma; PLC/PRF/5 cell; chemo-resistance; epithelial mesenchymal transition

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 187-191]

原发性肝癌在全球许多区域的发病率不断上升,被认为是人类最致命的癌症之一^[1]。活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)/成肌纤维细胞浸润肝癌组织的基质,遍布于肿瘤血窦、纤维隔片,是炎性细胞因子和细胞外基质蛋白的主要来源^[2]。作为肝癌组织中一种重要的间质细胞,活化的肝星状细胞在肝癌的发生、侵袭、转移过程等方面发挥重要作用^[3-5],但其是否参与肿瘤耐药却不甚清楚。本实验用无血清的培养基培养和活化肝星状细胞,获得肝星状细胞条件培养基(hepatic stellate cell cultured medium, HSC-CM),然后在 HSC-CM 条件下培养人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 细胞,并以化疗药物顺铂进行处理,观察 PLC/PRF/5 细胞凋亡和增殖活性变化,以及上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相关基因的表达情况。此研究初步探讨 HSC-CM 与 EMT 和肝癌耐药性之间的关系,以期肿瘤耐药提供新的实验依据和治疗靶点。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

胎牛血清、DMEM 和 RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司,噻唑蓝和二甲基亚砷购自美国 Sigma 公司,Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂购自 BD Biosciences 公司,顺铂(批号 20120827)购买于齐鲁制药有限公司,TRIzol、逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。实验中相关的 PCR 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.2 细胞培养

人肝星状细胞株 LX-2 购于中国科学院上海细胞生物研究所,人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 由东方肝胆外科医院肿瘤免疫与基因治疗研究中心提供。人肝癌细胞 PLC/PRF/5 细胞于含 10% 胎牛血清、100 μg/ml 青霉素的 DMEM 培养基中;人肝星状细胞 LX-2 于含 10% 胎牛血清、100 μg/ml 青霉素的 RPMI

1640 培养基中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞密度达 80% 左右时,传代细胞。在 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养的 LX-2 细胞,密度达 50% 时,换无血清的 RPMI 1640 培养基孵育 24 h 后,收集 HSC-CM,1 000 × g 离心 5 min,上层液体置 -20 °C 保存,作为本实验使用的一种常用试剂。

1.3 流式细胞术检测 PLC/PRF/5 细胞的凋亡

实验分顺铂组和 HSC-CM + 顺铂组,顺铂组 PLC/PRF/5 细胞在正常培养基、HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞在 HSC-CM 中培养 24 h 后,两组细胞均加入 0.8 μg/ml 顺铂进行处理。在加入顺铂处理后的 12 和 24 h 两个时间点检测 PLC/PRF/5 细胞的凋亡和活性情况。0.25% 胰酶消化离心收集 PLC/PRF/5 细胞,PBS 洗涤 2 次后离心(1 000 × g, 5 min)、弃上清;然后用 50 μl 结合缓冲液重悬细胞,加入碘化丙啶(PI)及 Annexin V/FITC,4 °C 避光 20 min;最后,200 μl PBS 重悬 PLC/PRF/5 细胞,滤膜过滤,上机检测细胞凋亡率。

1.4 MTT 检测 PLC/PRF/5 细胞的增殖活性

采用 MTT 法检测肝癌 PLC/PRF/5 细胞的增殖活性。取肝癌 PLC/PRF/5 细胞以 5×10^4 /ml 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μl 培养基,每组设 5 个复孔。各组细胞经过预处理后,每孔加入 20 μl MTT 溶液,继续培养 4 h。小心吸去孔内培养基,每孔加入 150 μl 二甲基亚砷,置摇床上低速震荡 10 min。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的光密度值。

1.5 Real-time PCR 检测 PLC/PRF/5 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、snail 和 ZEB1 mRNA 的水平

TRIzol 提取肝癌 PLC/PRF/5 细胞总 RNA,并检测其纯度和完整性,逆转录 cDNA 后进行 PCR 扩增。数据用 iCycler 进行分析,RNA 表达水平以 GAPDH 为基础进行标准化,以 CT 值表示,高的 CT

值表示相对低的表达水平,结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示相对定量值。PCR 扩增条件为:95 ℃、10 min 1 个循环;紧接着 95 ℃、15 s,60 ℃、30 s,72 ℃、30 s,42 循环;最后以 95 ℃、1 min,55 ℃、30 s,95 ℃、30 s,1 个循环结束。实验所用的引物见表 1。

表 1 Real-time PCR 检测用引物

Tab. 1 Primers used in real-time PCR

Gene	Primer
E-cadherin	
Forward	5'-TCAGCCGCTTTCAGATTTTCA-3'
Reverse	5'-ATGAGTGTCCCCGGTATCTT-3'
N-cadherin	
Forward	5'-TGGATGGACCTTATGTTGCT-3'
Reverse	5'- AACACCTGTCTTGGGATCAA-3'
Vimentin	
Forward	5'-GCAATCTTTCAGACAGGATGTTGAC-3'
Reverse	5'-GATTCCTCTTCGTGGAGTTTCTTC-3'
ZEB1	
Forward	5'-TTCAGCATCACCAGGCAGTC-3'
Reverse	5'-GAG-TGGAGGAGGCTGAGTAG-3'
Snail	
Forward	5'-GCTGCCAATGCTCATCTGGGACTCT-3'
Reverse	5'-TTGAAGGGCTTTCGAGCCTGGAGAT-3'
GAPDH	
Forward	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'
Reverse	5'-GCGCCCAATACGACCAAAT-3'

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件处理,多样本比较采用单因素方差分析,两样本比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HSC-CM 抑制顺铂对 PLC/PRF/5 细胞的致凋亡作用

实验首先在顺铂处理 PLC/PRF/5 细胞 12、24 h 两个时间点检测 PLC/PRF/5 细胞的凋亡率。随着顺铂处理时间的延长,顺铂组和 HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞的凋亡率不断增加,顺铂组 12、

24 h 的 PLC/PRF/5 细胞凋亡率为(22.34 ± 1.12)% 和 (26.78 ± 1.56)% ; HSC-CM + 顺铂组的为 (17.22 ± 1.42)% 和 (21.52 ± 1.76)% 。实验数据表明,顺铂组凋亡率高于 HSC-CM + 顺铂组($P < 0.05$,图 1)。结果说明,HSC-CM 抑制了顺铂对 PLC/PRF/5 细胞的致凋亡作用。

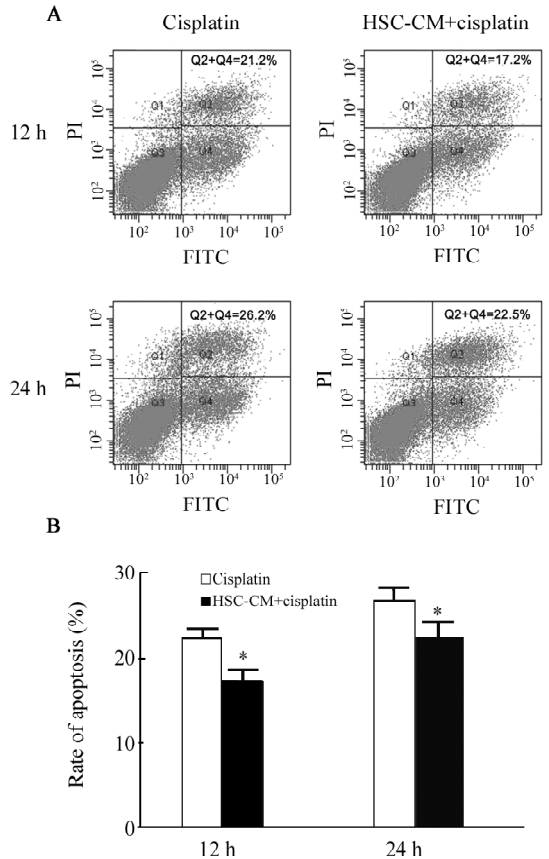


图 1 HSC-CM 抑制顺铂对 PLC/PRF/5 细胞的致凋亡作用

Fig. 1 Apoptotic effect of cisplatin on PLC/PRF/5 cells inhibited by HSC-CM

A: Flow cytometry; B: Apoptotic rate

* $P < 0.05$ vs cisplatin group

2.2 HSC-CM 减轻顺铂对 PLC/PRF/5 细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测结果(图 2)显示,顺铂组和 HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞增殖活性在 12、24 h 两个时间点分别为:(68.65 ± 2.56)%、(79.47 ± 1.43)% 和 (46.54 ± 3.65)%、(62.77 ± 2.89)%。结果表明,随着顺铂处理时间延长,两组 PLC/PRF/5 细胞增殖活性都不断降低,且两个时间点的 HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞增殖活性均高于顺铂组($P < 0.05$)。由此可见,HSC-CM 可以减轻顺铂

对 PLC/PRF/5 细胞增殖的抑制作用。

2.3 HSC-CM 诱导 PLC/PRF/5 细胞发生 EMT

Real-time PCR 法检测在 HSC-CM 培养的 PLC/PRF/5 细胞上皮细胞标记物 E-cadherin, 间质细胞标记物 N-cadherin 和 vimentin 以及 EMT 相关的转录因子 Snail 和锌指 E-盒结合同源异形盒 (zinc finger E box binding homeobox 1, ZEB1) 的 mRNA 水平。结果(图 3)显示, 与顺铂组比较, HSC-CM + 顺铂组的 PLC/PRF/5 细胞上皮标记物 E-cadherin 表达下降 ($P < 0.05$), 而间质细胞标记物 N-cadherin 和 vimentin 以及 EMT 相关转录因子 Snail 和 ZEB1 的表达显著上调 ($P < 0.01$), 这些都符合肿瘤细胞发生 EMT 时的分子变化。因此, 在 HSC-CM 中培养的肝癌 PLC/PRF/5 细胞发生了 EMT。

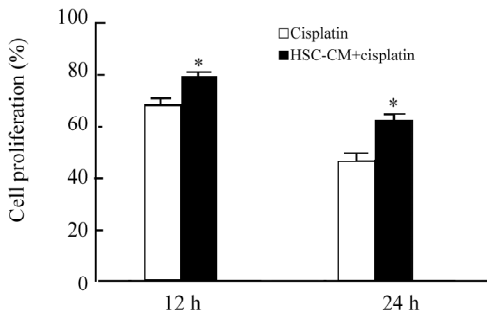


图 2 HSC-CM 减轻顺铂对 PLC/PRF/5 细胞增殖的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effect of cisplatin on the proliferation of PLC/PRF/5 cells alleviated by HSC-CM

* $P < 0.05$ vs cisplatin group

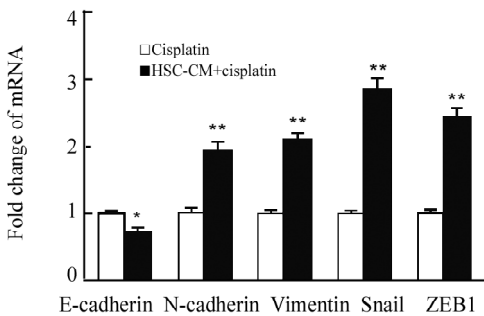


图 3 HSC-CM 对 PLC/PRF/5 细胞中 EMT 相关基因的影响

Fig. 3 Influence of HSC-CM on the expression of EMT associated genes in PLC/PRF/5 cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs cisplatin group

3 讨论

肝星状细胞是位于肝细胞和肝血窦内皮细胞之

间窦间隙的一种特殊的周细胞。在正常的肝脏组织中, 肝星状细胞处于静止状态, 主要发挥着存储维生素 A、参与肝脏再生与免疫反应的功能^[6-8]。当肝损伤时, 肝星状细胞经历活化或者转分化过程, 转换成一个激活的肌纤维样表型: 失去维生素 A, 开始不断增殖, 合成和释放大量的细胞因子、生长因子及细胞外基质^[9]。研究^[2,10]表明, 在肝癌组织中, 活化的肝星状细胞也主要通过释放的各种因子影响肝癌肿瘤微环境, 进而影响肿瘤细胞的生物学行为。上述这些研究中的体外实验, 多采用无血清的培养基, 营造一个缺营养的环境, 活化从正常肝脏分离的肝星状细胞; 并收集其条件培养上清来处理肝癌细胞, 以研究活化的肝星状细胞在肝癌发生、发展和侵袭过程中的作用。本实验采用无血清 RPMI 1640 培养基培养 LX-2 肝星状细胞, 获得 HSC-CM; 然后, HSC-CM 作为一种处理试剂, 作用于肝癌细胞株 PLC/PRF/5 细胞; 最后用 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂处理正常培养基(顺铂组)和 HSC-CM 中(HSC-CM + 顺铂组)培养的 PLC/PRF/5 细胞, 并观察肝癌 PLC/PRF/5 细胞凋亡和增殖活性。结果发现, 在顺铂处理后 12 和 24 h 两个时间点, 顺铂组和 HSC-CM + 顺铂组的 PLC/PRF/5 细胞凋亡率都逐渐上升, 细胞增殖活性逐渐下降, 并且 HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞凋亡率低于顺铂组肝癌 PLC/PRF/5 细胞凋亡率, 而 PLC/PRF/5 细胞增殖活性具有相反的表现。说明顺铂对肝癌 PLC/PRF/5 细胞的促凋亡和增殖抑制作用, 可被 HSC-CM 部分逆转或者减轻。也就是说, HSC-CM 抑制 PLC/PRF/5 细胞对顺铂的敏感性。

耐药性的产生被认为是肿瘤化疗作用局限性的关键因素^[12]。微环境异质性导致细胞增殖的速率改变、缺氧和酸度的改变, 是影响肿瘤细胞对药物治疗的敏感性的重要因素。而肿瘤微环境的改变, 如低氧、缺血等, 往往伴随着肿瘤 EMT 的发生^[13]。EMT 是上皮细胞转化成间质细胞表型的分子过程^[14]。最近研究^[15-16]证实, EMT 的发生不仅能上调细胞外基质蛋白成分, 增加细胞侵袭和转移, 也可增强对凋亡的抵抗, 这可能在化疗抵抗的形成中起重要的作用。同时发现 EMT 标记基因与耐药性的存在相关, 操纵 EMT 转录因子可以调节化疗药物的耐药性^[17]。此外, 也有研究^[18]认为, EMT 可以通过诱导肿瘤干细胞基因的表达而增强肿瘤耐药。EMT 可以通过不同方式诱导肿瘤细胞耐药性的形成, 它可能也参与 HSC-CM 抑制 PLC/PRF/5 细胞对顺铂敏感性的过程。因此, 本研究进一步检测顺铂组和 HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞 EMT 相关基因

mRNA 的表达情况。E-cadherin 是上皮细胞标记物,在发生 EMT 的细胞中表达下调^[22];N-cadherin 和 vimentin 是间质细胞标记物,在发生 EMT 的细胞中表达上调^[23-25];Snail 和 ZEB1 是两种在 EMT 发生过程中上调的转录调控因子^[23-24]。本实验发现与顺铂组 PLC/PRF/5 细胞相比,HSC-CM + 顺铂组 PLC/PRF/5 细胞,E-cadherin 表达水平下降;N-cadherin、Vimentin、ZEB1、Snail 表达水平上升,这说明 PLC/PRF/5 细胞在 HSC-CM 作用下发生了 EMT。由此推测,HSC-CM 促进 PLC/PRF/5 细胞耐药性的机制可能是诱导肿瘤细胞发生 EMT。

综上所述,本实验探讨了 HSC-CM 与肝癌细胞耐药的关系。结果说明,HSC-CM 可能通过诱导 PLC/PRF/5 细胞发生 EMT,从而增强 PLC/PRF/5 细胞对顺铂的抵抗作用,该结果为肝癌的化学药物治疗提供了一定的实验依据。

[参考文献]

- [1] GLOBOCAN 2008, world incidence and mortality: FAST STATS [J]. International Agency for Research on Cancer, 2013.
- [2] Yang JD, Nakamura I, Roberts LR. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: Current status and therapeutic targets [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(1): 35-43.
- [3] Zhang DY, Friedman SL. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2): 769-775.
- [4] Zhao W, Zhang L, Yin Z, et al. Activated hepatic stellate cells promote hepatocellular carcinoma development in immunocompetent mice [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(11): 2651-2661.
- [5] Wang BB, Cheng JY, Gao HH, et al. Hepatic stellate cells in inflammation-fibrosis-carcinoma axis [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(9): 1492-1496.
- [6] Chen L, Zhang W, Zhou QD, et al. HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration [J]. *Cell Biochem Funct*, 2012, 30(7): 588-596.
- [7] Reynaert H, Urbain D, Geerts A. Regulation of sinusoidal perfusion in portal hypertension [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2008, 291(6): 693-698.
- [8] Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, et al. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders [J]. *J Immunol*, 2011, 186(10): 5549-5555.
- [9] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(2): 209-218.
- [10] Santamato A, Fransvea E, Dituri F, et al. Hepatic stellate cells stimulate HCC cell migration via laminin-5 production [J]. *Clin Sci (Lond)* 2011, 121(4): 159-168.
- [11] Majumder S, Tamilarasan KP, Kolluru GK, et al. Activated pericyte attenuates endothelial functions: Nitric oxide-cGMP rescues activated pericyte-associated endothelial dysfunctions [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(6): 709-720.
- [12] Brito AF, Abrantes AM, Pinto-Costa C, et al. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: The Role of p53 [J]. *Chemotherapy*, 2012, 58(5): 381-386.
- [13] Jiao M, Nan KJ. Activation of PI3 kinase/Akt/HIF-1alpha pathway contributes to hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(2): 461-468.
- [14] Heinrich EL, Walser TC, Krysan K, et al. The inflammatory tumor microenvironment, epithelial mesenchymal transition and lung carcinogenesis [J]. *Cancer Microenviron*, 2012, 5(1): 5-18.
- [15] Wang Y, Shang Y. Epigenetic control of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer metastasis [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(2): 160-169.
- [16] Yu J, Ren X, Chen Y, et al. Dysfunctional activation of neurotensin/IL-8 pathway in hepatocellular carcinoma is associated with increased inflammatory response in microenvironment, more epithelial mesenchymal transition in cancer and worse prognosis in patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56069.
- [17] Zhang W, Feng M, Zheng G, et al. Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial-mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(2): 679-685.
- [18] Chu PY, Hu FW, Yu CC, et al. Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer [J]. *Oral Oncol*, 2013, 49(1): 34-41.
- [19] Jung JO, Gwak GY, Lim YS, et al. Role of hepatic stellate cells in the angiogenesis of hepatoma [J]. *Korean J Gastroenterol*, 2003, 42(2): 142-148.
- [20] Shah PP, Kakar SS. Pituitary tumor transforming gene induces epithelial to mesenchymal transition by regulation of Twist, Snail, Slug, and E-cadherin [J]. *Cancer Lett*, 2011, 311(1): 66-76.
- [21] Hao L, Ha JR, Kuzel P, et al. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEEN pathway through Twist and Snail [J]. *Br J Dermatol*, 2012, 166(6): 1184-1197.
- [22] Pan TL, Wang PW, Huang CC, et al. Network analysis and proteomic identification of vimentin as a key regulator associated with invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Proteomics*, 2012, 75(15): 4676-4692.
- [26] Becker KF, Rosivatz E, Blechschmidt K, et al. Analysis of the E-cadherin repressor Snail in primary human cancers [J]. *Cells Tissues Organs*, 2007, 185(1/2/3): 204-212.
- [27] Zhou YM, Cao L, Li B, et al. Clinicopathological significance of ZEB1 protein in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(5): 1700-1706.

[收稿日期] 2012 - 10 - 12

[修回日期] 2013 - 02 - 22

[本文编辑] 王莹,黄静怡