

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.06.009

· 基础研究 ·

RNA 干扰下调 *Slug* 表达对肺癌细胞 A549 的细胞周期、增殖和侵袭的影响

何巍¹, 李玉霞¹, 刘佳², 李巍³(1. 沈阳医学院附属中心医院呼吸科, 辽宁 沈阳 110024; 2. 中国医科大学实验动物中心, 辽宁 沈阳 110001; 3. 中国医科大学附属第一医院耳鼻喉科, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] **目的:**应用 RNA 干扰技术下调肺癌 A549 细胞中 *Slug* 基因的表达, 探讨其对 A549 细胞增殖、细胞周期和细胞侵袭能力的影响。**方法:**构建靶向 *Slug* 基因的 shRNA 真核表达质粒 pGPU6-GFP-Neo-*Slug*, 与阴性对照质粒 pNeg-shRNA 分别用脂质体法转染 A549 细胞。Real-time PCR 和 Western blotting 验证转染后 *Slug* mRNA 和蛋白的表达。CCK-8 法、流式细胞术和 Transwell 实验分别检测下调 *Slug* 表达对 A549 细胞增殖、细胞周期和侵袭能力的影响。**结果:**成功构建 pGPU6-GFP-Neo-*Slug* 载体并转染 A549 细胞, 转染率达 90%。与 pNeg-shRNA 组和空白对照组相比, p*Slug*-shRNA 组 A549 细胞中 *Slug* mRNA [(0.23 ± 0.01) vs (0.97 ± 0.08)], [1.0 ± 0.09], $P < 0.05$] 和蛋白 [(0.20 ± 0.09) vs (1.0 ± 0.32)], [1.13 ± 0.26], $P < 0.05$] 表达量显著降低; 细胞增殖抑制率明显上升 [$(35.3 \pm 5.4)\%$ vs $(1.5 \pm 0.2)\%$], [$3.3 \pm 0.7\%$], 均 $P < 0.01$]; 细胞增殖指数显著降低 [$(32.92 \pm 0.69)\%$ vs $(48.19 \pm 0.71)\%$], [$42.88 \pm 0.75\%$], 均 $P < 0.05$], 并且处于 G₁ 期细胞数明显增多 [$(67.08 \pm 0.92)\%$ vs $(52.81 \pm 0.78)\%$], [$56.12 \pm 0.73\%$], 均 $P < 0.05$]; 细胞侵袭能力显著降低[穿透基底膜细胞数: (55 ± 9) vs (169 ± 12)], [173 ± 15], 均 $P < 0.01$]。**结论:** pGPU6-GFP-Neo-*Slug* 转染肺癌 A549 细胞能有效下调 *Slug* 基因的表达, 从而抑制 A549 的增殖侵袭能力、阻滞细胞周期于 G₁ 期。

[关键词] RNA 干扰; *Slug* 基因; 肺癌; A549 细胞; 增殖; 细胞周期; 侵袭

[中图分类号] R734.2; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)06-0685-05

Effect of down-regulation of the *Slug* gene expression by RNAi on cell cycle, proliferation and invasion of lung cancer A549 cells

He Wei¹, Li Yuxia¹, Liu Jia², Li Wei³(1. Department of Respiration, Central Hospital Affiliated to Medical College of Shenyang, Shenyang 110024, Liaoning, China; 2. Laboratory Animal Center, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China; 3. Otolaryngological Department, The First Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of silencing *Slug* gene on proliferation, cell cycle and invasion ability of lung cancer A549 cells by RNA interference technique. **Methods:** The recombinant plasmid expressing short hairpin RNA (shRNA) targeting *Slug* gene was constructed and named as pGPU6-GFP-Neo-*Slug*. A549 cells were transfected with pGPU6-GFP-Neo-*Slug* and the negative control plasmid pNeg-shRNA with liposome method. Real-time PCR and Western blotting analysis was performed to determine the expression of *Slug* mRNA and protein after transfection, respectively. The proliferation, cell cycle distribution and cell invasion of A549 cells were detected by CCK-8 assay, flow cytometry and transwell assay, respectively. **Results:** pGPU6-GFP-Neo-*Slug* vector was successfully constructed and transfected into A549 cells with transfection rate of nearly 90%. Compared to the control and pNeg-shRNA group, *Slug* mRNA [0.23 ± 0.01] vs [0.97 ± 0.08], [1.0 ± 0.09]; all $P < 0.05$) and protein [0.20 ± 0.09] vs [1.0 ± 0.32], [1.13 ± 0.26]; all $P < 0.05$) expression level was significantly reduced in p*Slug*-shRNA group. Compared to the control and pNeg-shRNA group, the inhibition rate of proliferation in *Slug*-silencing A549 cells was significantly increased ($35.3 \pm 5.4\%$ vs $1.5 \pm 0.2\%$), [$3.3 \pm 0.7\%$]; all $P < 0.05$); the cell multiplication index was significantly decreased [32.92 ± 0.69] vs [48.19 ± 0.71], [42.88 ± 0.75]; all $P < 0.05$); the cell number in G₁ phase was significantly increased

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81102057)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81102057)

[作者简介] 何巍(1978-), 男, 辽宁省沈阳市人, 硕士, 主治医师, 主要从事肺癌防治的基础和临床的研究。E-mail: 154868982@qq.com

[通信作者] 何巍(He Wei, corresponding author), E-mail: 154868982@qq.com

($[67.08 \pm 0.92]$ vs $[52.81 \pm 0.78]$, $[56.12 \pm 0.73]$; all $P < 0.05$); and the cell invasion ability of A549 was significantly reduced (number of alive A549 cells through the matrigel chamber: $[55 \pm 9]$ vs $[169 \pm 12]$, $[173 \pm 15]$; all $P < 0.01$). **Conclusion:** pGPU6-GFP-Neo-Slug vector transfected into lung cancer A549 cell can effectively silence *Slug* gene expression, inhibit cell proliferation, influence cell cycle and inhibit cell invasion of A549 cells.

[**Key words**] RNA interference; *Slug* gene; lung cancer; A549 cell; proliferation; cell cycle; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(6): 685-689]

肺癌是当前我国和全球病死率最高的恶性肿瘤之一,病程早期即可发生侵袭和转移,而肿瘤转移又是导致肺癌患者死亡最主要的原因^[1],因此,有效防治肺癌的侵袭和转移将成为降低其病死率的重要措施。*Slug* 基因(又称 SNAL2)是 Snail 超家族成员之一,最早发现于原肠形成和神经脊形成过程中的中胚层细胞。人的 *Slug* 位于 8 号染色体上,基因全长 2 400 bp,含 3 个外显子和 2 个内含子,与鼠、果蝇和鸡具有很高的同源性^[2]。研究^[3-5]发现,*Slug* 在乳腺癌,结肠癌,胰腺癌等多种肿瘤中高表达,与肿瘤的发生相关,有可能成为癌症治疗的新靶点。目前,*Slug* 在肺癌发生、发展中的作用还不十分明确。本研究观察沉默 *Slug* 基因表达对 A549 细胞增殖、细胞周期和细胞侵袭能力的影响,探讨 *Slug* 蛋白在肺癌发生、发展中作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人肺癌 A549 细胞株购自中科院上海细胞所。载体 pGPU6/GFP/Neo 购自上海吉玛制药技术有限公司,DMEM 培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司。Lipofectamine™ 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司,限制性内切酶、T4 连接酶、Taq 酶和 SYBR Real-time PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司,Transwell 小室购自美国 Millipore 公司,Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司,RIPA 裂解液购自上海碧云天公司,*Slug* 兔抗人多克隆抗体及鼠抗人 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,质粒 DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司。

1.2 *Slug*-shRNA 真核表达载体的构建

根据人类 *Slug* mRNA 结构(GenBank 编号:NM-003068)确定以 *Slug* mRNA 的 5'-GGAATATGT-GAGCCTGGGC-3' 序列为 siRNA 靶点,设计短发夹 shRNA 序列,同时设置无义阴性对照(scramble shRNA)序列 5'-GAACCGTGTCTTCCTCAGT-3'。在退火缓冲液中,正义链和反义链等摩尔退火并结合形成双链,pGPU6-GFP-Neo 空载体经 *Bam*H I 和 *Bbs* I 双酶切后与双链 DNA 进行连接反应,随后转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,挑选阳性的重组克隆进行 PCR

鉴定及测序,对测序正确的克隆进行培养、扩增并提取重组质粒,分别命名为 p*Slug*-shRNA 和 pNeg-shRNA。

1.3 p*Slug*-shRNA 和 pNeg-shRNA 转染 A549 细胞

处于对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,常规培养 24 h 后(生长至 50%~80% 汇合),弃完全培养基,PBS 清洗 2 次,每孔加入 1.5 ml 无血清无抗生素的 DMEM。将 8 μ l Lipofectamine™ 2000 转染试剂与 200 μ l 双无 DMEM 混匀后,室温放置 5 min;8 μ l shRNA 溶液与 200 μ l 双无 DMEM 混匀。将以上两步所得溶液混匀,室温放置 20 min 后加入 A549 细胞培养孔中,混匀,继续培养 4 h,更换为含 10% 胎牛血清的培养基。以转染带 FAM 荧光标记的无义 shRNA 序列的 A549 细胞作为对照组,通过荧光显微镜观察并计数细胞以测定转染效率,若转染效率大于 80%,则认为转染成功。取 RNA 干扰成功的 p*Slug*-shRNA 组和 pNeg-shRNA 组 A549 细胞,以未处理的 A549 细胞作为空白对照组,用于后续实验。

1.4 Real-time PCR 检测 p*Slug*-shRNA 转染对 A549 细胞 *Slug* mRNA 表达的影响

三组细胞按 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书操作收集细胞并提取 RNA,逆转录成 cDNA,采用 Real-time PCR 检测 *Slug* mRNA 的表达情况,引物序列如下:*Slug* 引物正义链为 5'-GACACACATACAGT-GATTATT-3',反义链为 5'-AAACTTTTCAGCTTCAATG GC-3';以 *GAPDH* 为内参,正义链为 5'-CCCTTCATT-GACCTCAACTA-3',反义链为 5'-CCAAAGTTGTCAT-GGATGAC-3'。PCR 循环如下:94 $^{\circ}$ C 初始变性 5 min,94 $^{\circ}$ C、30 s,60 $^{\circ}$ C、30 s 和 72 $^{\circ}$ C、30 s,共 40 个循环。样本 mRNA 值的计算应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。

1.5 Western blotting 检测 p*Slug*-shRNA 转染对 A549 细胞 *Slug* 蛋白表达的影响

三组细胞分别用 RIPA 裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,BCA 法定量蛋白。SDS-PAGE 分离蛋白质,转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入 *Slug* 抗体(1:800)、 β -actin 抗体(1:2 000)4 $^{\circ}$ C 过夜,1 \times TBST(1% Tween-20, TBS)漂洗 3 次,10 min/次;加入相应二抗

(1:2 000)室温孵育 2 h。用 ECL 化学发光剂孵育, Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片并进行灰度值分析, 数据经 β -actin 进行校正后加以分析。

1.6 CCK-8 法检测转染 p*Slug*-shRNA 对 A549 细胞增殖的影响

取 RNA 干扰成功的 p*Slug*-shRNA 组和 pNeg-shRNA 组 A549 细胞,以未处理的 A549 细胞作为空白对照组,调整细胞密度为 1.5×10^4 个/ml,各取 100 μ l 细胞悬液接种于 96 孔培养板。设立空白孔,空白孔加入 200 μ l 的培养基。培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养,在培养 24、48、72 h 时,每孔加入 20 μ l CCK-8 溶液,培养箱内继续孵育 1.5 h 后用酶标仪检测 450 nm 波长处的光密度 (D)值,计算细胞生长抑制率(%) = $(1 - D_{\text{实验孔}} / D_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测转染 p*Slug*-shRNA 对 A549 细胞周期的影响

胰酶分别消化三组细胞,冰冷 PBS 洗涤,200 $\times g$ 离心 5 min,收集细胞,加入 70% 的冰乙醇 1 ml,4 $^{\circ}$ C 过夜。第 2 天重复洗涤和离心收集细胞,再以冰 PBS 重悬细胞,各组样品分别加入 PI (50 μ g/ml)及 RNase (100 μ g/ml),避光冰浴 15 min 后流式细胞仪计数细胞周期各阶段的细胞数。以增殖指数(proliferation index, PI)表示 A549 细胞的增殖水平,PI (%) = $(S + G_2/M) / (S + G_2/M + G_1) \times 100\%$ 。

1.8 Transwell 实验检测转染 p*Slug*-shRNA 对 A549 细胞侵袭的影响

用培养基稀释好的 Matrigel 基质胶(1.25 mg/ml)置于冰浴融化,取 50 μ l 铺于 Transwell 小室(24 孔板小室)的聚碳酸酯膜上,37 $^{\circ}$ C 放置 1 h 使 Matrigel 聚合成凝胶。取三组细胞各 1×10^5 个(200 μ l 细胞悬液),分别加入到上室孔中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。姬姆萨法染色 15 min,冲洗干净后,倒置显微镜下计数穿过人工基底膜和 8 μ m 微孔膜的细胞数,每张膜中央部分和周围部分各随机取 5 个视野,计数每个视野内穿过的细胞数。独立重复 3 次实验后取均值进行统计分析。

1.9 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件分析,各组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p*Slug*-shRNA 成功转染 A549 细胞

荧光显微镜下观察结果(图 1)显示,p*Slug*-shR-

NA 组和 pNeg-shRNA 组阳性细胞呈现绿色荧光。转染率测定结果显示,两组转染效率均在 90% 以上,可满足实验要求。

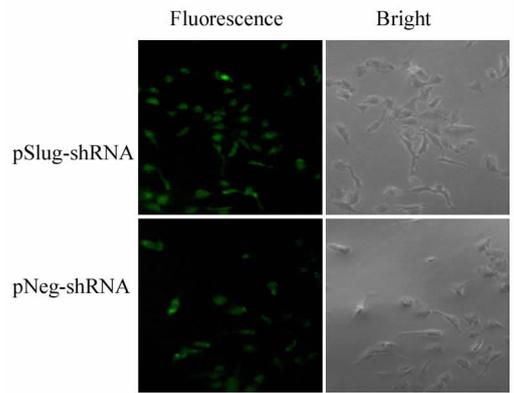


图 1 *Slug*-shRNA 转染 A549 细胞后荧光蛋白的表达($\times 200$)
Fig. 1 Expression of fluorescent protein in A549 cells transfected with *Slug*-shRNA ($\times 200$)

2.2 p*Slug*-shRNA 转染降低了 A549 细胞中 *Slug* mRNA 与蛋白的表达

Real-time PCR 检测结果显示,与 pNeg-shRNA 组及对照组相比,p*Slug*-shRNA 组的 *Slug* mRNA 表达水平明显下降[(0.23 ± 0.01) vs (0.97 ± 0.08) 、 (1.0 ± 0.09) ,均 $P < 0.05$]。Western blotting 检测结果(图 2)显示,p*Slug*-shRNA 组 *Slug* 蛋白表达水平显著低于 pNeg-shRNA 组和对照组[(0.20 ± 0.09) vs (1.13 ± 0.26) 、 (1.0 ± 0.32) ,均 $P < 0.05$],而对照组与 pNeg-shRNA 组的 *Slug* 蛋白表达水平没有显著差异($P > 0.05$)。

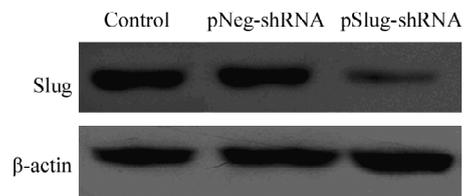


图 2 *Slug*-shRNA 转染降低 A549 细胞中 *Slug* 蛋白的表达
Fig. 2 p*Slug*-shRNA transfection inhibited the expression of *Slug* protein of A549 cells

2.3 p*Slug*-shRNA 转染抑制 A549 细胞的增殖

CCK-8 法检测的结果(图 3)显示,转染 2 d 后,p*Slug*-shRNA 组 A549 细胞生长抑制率显著高于对照组和 pNeg-shRNA 组[$(35.3 \pm 5.4)\%$ vs $(1.5 \pm 0.2)\%$ 、 $(3.3 \pm 0.7)\%$,均 $P < 0.05$],并且,随着时间的延长,差

异随之增大。而 pNeg-shRNA 组和对照组 A549 细胞的生长抑制率始终没有显著差异 ($P > 0.05$)。

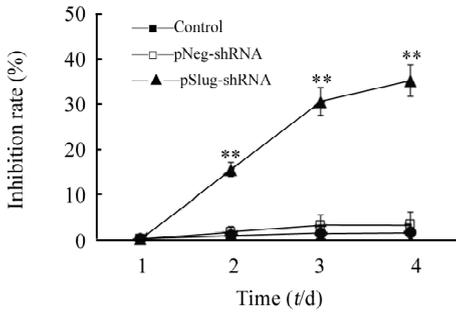


图 3 沉默 Slug 蛋白表达抑制 A549 细胞的增殖

Fig. 3 Silencing Slug protein expressions inhibited proliferation of A549 cells

* $P < 0.01$ vs control or pNeg-shRNA

2.4 pSlug-shRNA 转染阻滞 A549 细胞周期于 G₁ 期

流式细胞术检测细胞周期结果(表 1)显示, pSlug-shRNA 组 A549 细胞增殖指数显著低于 pNeg-shRNA 组和空白对照组 [(32.92 ± 0.69)% vs (48.19 ± 0.71)%、(42.88 ± 0.75)%], 均 $P < 0.05$]; 并且处于 G₁ 期细胞数明显多于 pNeg-shRNA 组和空白对照组 [(67.08 ± 0.92)% vs (52.81 ± 0.78)%、(56.12 ± 0.73)%], 均 $P < 0.05$], 表明细胞增殖阻滞于 G₁ 期。

2.5 pSlug-shRNA 转染抑制 A549 细胞的侵袭能力

Transwell 实验结果(图 4)显示, pSlug-shRNA 组穿透基底膜细胞数明显少于 pNeg-shRNA 组及对照组 [(55 ± 9) vs (169 ± 12)、(173 ± 15)个], 均 $P < 0.01$], 对照组穿膜细胞数与对照组穿膜细胞数无显著差异 ($P > 0.05$)。

表 1 pSlug-shRNA 转染阻滞 A549 细胞周期于 G₁ 期(%)

Tab. 1 The cell cycle of pSlug-shRNA transfection cell blocked in G₁(%)

Group	G ₁	G ₂ /M	S	PI
Control	56.12 ± 0.73	9.26 ± 0.72	33.62 ± 0.68	42.88 ± 0.75
pNeg-shRNA	52.81 ± 0.78	11.97 ± 0.63	36.22 ± 0.77	48.19 ± 0.71
pSlug-shRNA	67.08 ± 0.92*	11.80 ± 0.48	21.12 ± 0.84*	32.92 ± 0.69*

* $P < 0.05$ vs control or pNeg-shRNA

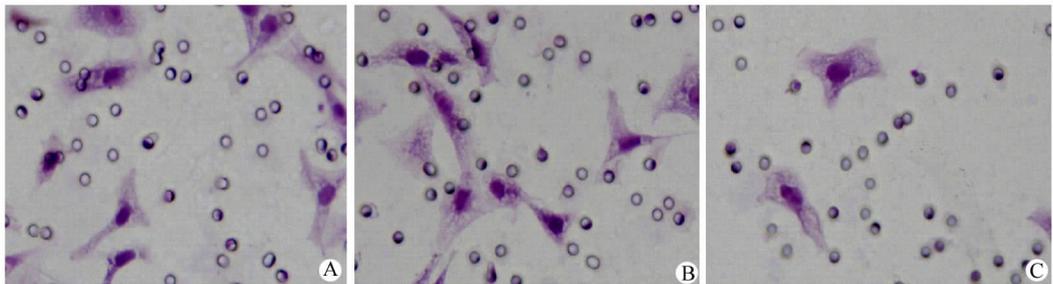


图 4 pSlug-shRNA 转染抑制 A549 细胞的侵袭能力(×200)

Fig. 4 pSlug-shRNA trasfection inhibited invasion ability of A549 cells(×200)

A: Control; B: pNeg-shRNA; C: pSlug-shRNA

3 讨论

Slug 是转录因子 SNAIL 家族中编码锌指蛋白的基因, 研究^[6]表明, Slug 在胎盘、心、肝、肾等多种组织中均有表达。在发育过程中, Slug 通过连接到 E-box 以抑制靶基因的转录, 从而参与神经胚的形成与神经干的正常发育。Slug 在多种恶性肿瘤中存在明显上调, 同时, Slug 上调与肿瘤出现远处转移、

较深的肿瘤浸润程度和较差的预后相关。Carvalho 等^[7]发现, Slug 在乳腺癌中过度表达, 而且 Slug 高表达的乳腺癌容易出现远处转移并有较差的预后; Bolos 等^[8-9]研究发现, Slug 通过调控靶基因 MMP-2 影响细胞 IV 型胶原和明胶的降解, 进而参与肿瘤细胞的侵袭与转移。

本研究发现, shRNA 下调 Slug 基因表达后, A549 细胞的增殖受到抑制, 这可能是由于细胞阻滞在 G₁

期检测点引起细胞周期改变所致,其具体作用机制还需要进一步研究。同时可以推测 *Slug* 的高表达与肺癌恶性增殖密切相关,*Slug* 在肺癌中过度表达有可能成为一个新的诊断和治疗的靶分子。另有研究^[12-13]报道,*Slug* 可以调节凋亡相关蛋白 *Bcl-2* 基因^[10-11]及 *PUMA* 基因,从而影响细胞凋亡。所以,*Slug* 可能通过类似的机制参与调节肺癌细胞的增殖。总之,*Slug* 具有成为肺癌分子靶向治疗靶点的潜力,沉默其表达有可能抑制肺癌细胞的生长、增殖。

研究^[14-16]表明,*Slug* 基因过度表达参与乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤的发展和转移过程,并且 *Slug* 高表达的患者有较差的预后。本研究结果表明, RNA 干扰抑制 *Slug* 基因表达可降低肺癌细胞的侵袭和转移能力。Zhang 等^[17]也发现,沉默 *Slug* 基因影响食管癌细胞的侵袭、转移能力,与本研究实验结果相符。研究^[18-19]发现,肿瘤中转录抑制子 *Slug* 与 E-cadherin 呈负相关表达,*Slug* 通过锌指结构与 E-cadherin 启动子区 E-box 结合,而 E-cadherin 表达减少与淋巴结的转移密切相关。另外,*Slug* 可以上调细胞内 VEGF 蛋白的表达,进而影响血管的生成^[20]。因此,*Slug* 可能通过调控 E-cadherin 及影响恶性肿瘤的血管生成来影响细胞的侵袭和转移。

本研究通过体外 RNA 干扰 *Slug* 基因的表达,发现抑制 *Slug* 表达能够降低人肺癌 A549 细胞的增殖和侵袭,为深入认识 *Slug* 与肺癌发生、发展的关系及发展靶向 *Slug* 基因的肿瘤治疗提供了实验基础。

[参 考 文 献]

[1] 龙浩,林志潮,林勇斌,等. 早期非小细胞肺癌胸腔镜手术与小切口肺切除术后患者生活质量的对比研究 [J]. 癌症, 2007, 26(6): 624-628.

[2] Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, et al. Requirement of the Akt/beta-catenin pathway for uterine carcinosarcoma genesis, modulating E-cadherin expression through the transactivation of slug [J]. Am J Pathol, 2009, 174(6): 2107-2115.

[3] Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7 (2): 131-142.

[4] Li Z, Mou H, Wang T, et al. A non-secretory form of FAM3B promotes invasion and metastasis of human colon cancer cells by upregulating Slug expression [J]. Cancer Lett, 2013, 328(2): 278-284.

[5] Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: Mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation [J]. Curr Mol Med, 2009, 9(7): 873-886.

[6] Lambertini E, Franceschetti T, Torreggiani E, et al. SLUG: A

new target of lymphoid enhancer factor-1 in human osteoblasts [J]. BMC Mol Biol, 2010, 11: 13-30.

[7] Carvalho ST, Stiepeich MM, Fregnani JH, et al. Evaluation of prognostic factors in stage IIA breast tumors and their correlation with mortality risk [J]. Clinics (Sao Paulo), 2011, 66(4): 607-612.

[8] Bolos V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: A comparison with Snail and E47 repressors [J]. J Cell Sci, 2003, 116 (Pt 3): 499-511.

[9] Chandler HL, Kusewitt DF, Colitz CM. Modulation of matrix metalloproteinases by ultraviolet radiation in the canine cornea [J]. Vet Ophthalmol, 2008, 11(3): 135-144.

[10] Tang P, Yu Z, Zhang K, et al. Slug down-regulation by RNA interference inhibits invasion growth in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. BMC Gastroenterol, 2011, 20(11): 60-66.

[11] Vitali R, Mancini C, Cesi V, et al. Slug (SNAI2) down-regulation by RNA interference facilitates apoptosis and inhibits invasive growth in neuroblastoma preclinical models [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(14): 4622-4630.

[12] Wu WS, Heinrichs S, Xu D, et al. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma [J]. Cell, 2005, 123(4): 641-653.

[13] Chen S, Zheng J, Hao Q, et al. p53-insensitive PUMA down-regulation is essential in the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice [J]. J Hepatol, 2010, 52(6): 864-871.

[14] Wu ZQ, Li XY, Hu CY, et al. Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic breast cancer 1, early onset (BRCA1) repression [J]. PNAS, 2012, 109(41): 16654-16659.

[15] Hajra KM, Chen DY, Fearon ER. The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer [J]. Cancer Res, 2002, 62 (6): 1613-1618.

[16] Qian J, Liu H, Chen W, et al. Knockdown of Slug by RNAi inhibits the proliferation and invasion of HCT116 colorectal cancer cells [J]. Mol Med Rep, 2013, 8(4): 1055-1059.

[17] Zhang K, Zhang S, Jiao X, et al. Slug regulates proliferation and invasiveness of esophageal adenocarcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Med Oncol, 2011, 28(4): 1089-1100.

[18] Chiang C, Ayyanathan K. Characterization of the E-box binding affinity to snag-zinc finger proteins [J]. Mol Biol (Mosk), 2012, 46(6): 907-914.

[19] Wang YP, Wang MZ, Luo YR, et al. Lentivirus-mediated shRNA interference targeting SLUG inhibits lung cancer growth and metastasis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(10): 4947-4951.

[20] Yang AD, Camp ER, Fan F, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells [J]. Cancer Res, 2006, 66(1): 46-51.