

文章编号:1004-7220(2016)05-0384-06

# 流体剪切力诱导喉鳞癌 Hep2 细胞上皮-间充质转化

张莹莹, 冯唐, 沈阳, 刘静霞, 闫志平, 刘双凤, 刘肖珩

(四川大学 华西基础医学与法医学院, 生物医学工程研究室, 成都 610041)

**摘要:** 目的 探究流体剪切力(fluid shear stress, FSS)对喉鳞癌 Hep2 细胞发生上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)的影响。方法 对 Hep2 细胞加载 140 mPa 的 FSS, 观察不同时间点细胞的形态学变化; 划痕实验检测力学加载后 Hep2 细胞迁移能力的变化; 共聚焦显微镜下观察细胞骨架蛋白 F-actin 的分布; Western blotting 检测 EMT 相关蛋白的表达。结果 FSS 力学加载后, Hep2 细胞形态由多边形向梭形转变, 撤销 FSS 后, 细胞恢复初始的多边形; Hep2 细胞迁移能力的增加依赖于 FSS 加载时间。FSS 促使细胞骨架蛋白 F-actin 重排, 从而增强 Hep2 细胞的迁移行为。FSS 使 Hep2 细胞 EMT 标志蛋白发生了时序性变化。结论 FSS 是诱导 Hep2 细胞发生 EMT 的一个重要物理因素。

**关键词:** 流体剪切力; 喉鳞癌细胞; 细胞迁移; 上皮-间充质转化

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.05.384

## Fluid shear stress regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in Hep2 cells

ZHANG Ying-ying, FENG Tang, SHEN Yang, LIU Jing-xia, YAN Zhi-ping, LIU Shuang-feng, LIU Xiao-heng (Institute of Biomedical Engineering, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** To examine the effects of fluid shear stress (FSS) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in Hep2 cells. **Methods** Hep2 cells were exposed to 140 mPa FSS. The morphologic changes of Hep2 cells exposed to FSS at different durations were observed using inverted microscope. The migration ability of Hep2 cells after FSS loading was investigated using scratch wound assay. The distribution and expression of cytoskeleton protein F-actin were examined by confocal microscope. The expression of the EMT marker proteins were detected by Western blotting. **Results** Most of Hep2 cells changed their morphology from polygon to elongated spindle with well-organized F-actin under FSS. After removing FSS, Hep2 cells recovered their initial morphology with flat polygon. FSS regulated Hep2 cells to enhance their migration capacity in a time-dependent manner. FSS promoted the rearrangement of cytoskeletal protein F-actin, which enhanced the migration behavior of Hep2 cells. In addition, FSS induced a time regularity of expression of the EMT marker proteins in Hep2 cells. **Conclusions** FSS as an important physical factor can induce EMT in Hep2 cells.

**Key words:** Fluid shear stress (FSS); Hep2 cells; Cell migration; Epithelial-mesenchymal transition (EMT)

喉鳞状细胞癌是一种常见的喉癌,其发病率逐年上升,一旦发生转移治疗效果很差,5年生存率低

于60%。其局部浸润和转移的分子机制十分复杂,目前尚未完全清楚。近年来,上皮-间充质转化

收稿日期:2016-04-15; 修回日期:2016-06-24

项目基金:国家自然科学基金项目(11172189,11372203)。

通信作者:刘肖珩,教授,博士研究生导师, E-mail: liuxiaohg@scu.edu.cn。

(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 成为解释肿瘤转移的新模型而受到普遍关注。EMT 是指上皮细胞发生间质表型转化,失去细胞极性和基底膜的连接等上皮表型,而获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质等能力的间质表型。发生 EMT 的上皮来源肿瘤细胞在经历了表型的转化后,转变成具有运动和迁徙能力更强的间质样细胞,增强了肿瘤的侵袭能力并促进了其发生转移<sup>[1]</sup>。

肿瘤细胞发生 EMT 的主要表现是上皮细胞的分子标志如 E-钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) 表达下调,而间充质细胞分子标志如 N-钙黏蛋白 (N-cadherin, N-cad) 等表达上调<sup>[2]</sup>。其中, E-cad 的缺失是 EMT 发生的典型特征。E-cad 是维持上皮表型的重要分子,其表达下调将导致细胞黏附能力减弱,细胞逐步失去极性、细胞间连接减少进而运动能力增强,侵袭性增加<sup>[3]</sup>。当前研究证实,多种因子如 TGF- $\beta$ 、Wnt、FGF、EGF 等均可诱导细胞 EMT 的发生,涉及 integrin、Wnt/ $\beta$ -catenin、Notch 等多条信号途径<sup>[4]</sup>。大量研究表明, Snail、Slug 和 Twist 等均为调控 EMT 的重要转录因子,也是 EMT 的重要间质标志物<sup>[5]</sup>。肿瘤细胞处于一个复杂的肿瘤力-化学微环境中,体液流动是体内肿瘤物理微环境的重要因素。喉鳞癌细胞在体内肿瘤周围淋巴道、血管以及喉鳞癌转移起始部位-淋巴、血道循环均为低剪切应力区<sup>[6]</sup>。肿瘤微环境中喉部鳞状细胞癌经常暴露于剪切力为 10~200 mPa 的间隙流及周围的淋巴及血液循环中<sup>[7]</sup>。研究表明,200 mPa 流体剪切力 (fluid shear stress, FSS) 可显著上调肿瘤细胞 MMP-12,并促进软骨肉瘤的侵袭<sup>[8]</sup>,而对于 FSS 是否能够调控肿瘤细胞发生 EMT 的研究鲜有报道。本文以喉鳞癌 Hep2 细胞为模式细胞,利用平行平板流动腔模拟肿瘤细胞的力学微环境,研究 FSS 对肿瘤细胞发生 EMT 的作用和影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

人喉鳞癌细胞株 (Hep2) 为本实验室保存; RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清购自 Invitrogen 公司; E-cadherin (G-10)、Vimentin (V9)、Slug (A-7)、Twist (Twist2C1a) 单克隆 IgG, N-cadherin (H-63)、Snail (H-130) 多克隆 IgG 均购自 Santa 公

司;辣根过氧化物酶标记的二抗购自北京鼎国生物科技有限公司;血清、FITC 标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉公司。

### 1.2 细胞培养

Hep2 细胞分别接种于含有  $1 \times 10^5$  U/L 青霉素、100 mg/mL 链霉素以及 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基中,并置于 37 °C 恒温、5% CO<sub>2</sub> 含量的孵箱中培养。待细胞长至 80%~90% 融合时,用 2.5% 的胰蛋白酶消化后传代再培养,取对数生长期的细胞进行实验。

### 1.3 实验分组

取处于对数生长期的 Hep2 细胞分别消化传代接种于 75 mm  $\times$  25 mm 的载玻片上培养,待细胞融合至 90% 后,取玻片置于平行平板流动腔,并通过蠕动泵控制培养基的流速,对 Hep2 细胞加载大小为 140 mPa 的 FSS 后用倒置显微镜观察细胞形态、划痕实验检测力学加载后的 Hep2 细胞迁移能力的变化、共聚焦显微镜下观察细胞骨架蛋白 F-actin 的分布、Western blotting 检测 EMT 相关蛋白的表达。实验分组按照力学加载时间分为静态培养的对照组、加力 2 h 组、4 h 组、8 h 组以及先力学加载再力学松弛的 8+4 h 组和 8+8 h 组(即加载 FSS 8 h 后再分别静态培养 4、8 h)。

### 1.4 显微镜观察 Hep2 细胞形态变化

对 Hep2 细胞加载 140 mPa 的 FSS,分别取对照组、8 h 组和 8+8 h 组的细胞玻片, PBS 清洗 3 次,每次 5 min,倒置显微镜下观察两种细胞的细胞形态变化,分别以 40 $\times$ 、100 $\times$  视野随机选取 5 个视野拍照,并与静态培养的对照组相比较。

### 1.5 划痕实验检测 Hep2 细胞迁移能力变化

对 Hep2 细胞加载 140 mPa 的 FSS,分别作用 2、4、8 h 后,从平行平板流动腔取出玻片,行划痕实验,洗涤后置于培养皿中静态培养,取培养 0、4、8、12、24 h 各时间点观察细胞迁移情况,并与静态培养的对照组比较。

### 1.6 共聚焦显微镜观察细胞骨架 F-actin 变化

取对照组、8 h 组、8+8 h 组的细胞培养载玻片以 PBS 缓冲液清洗 3 次,每次 5 min,后加入一定量的 4% 多聚甲醛,使之覆盖载玻片,固定 8 min。用 PBS 冲洗,并加入 1% BSA,封闭 15 min, PBS 缓冲液清洗 1 min。按 1:100 稀释 BODIPY,滴加 200  $\mu$ L 稀

释液覆盖载玻片,37 °C 孵育 1 ~ 2 h。1:400 配制 DAPI 储存液,加入等体积的 DAPI 稀释液,37 °C 孵育 15 ~ 30 min。用 PBS 缓冲液清洗 3 次后,甘油封片,立即在激光共聚焦显微镜(Leica TCS SP5,德国)下观察并拍照。

### 1.7 Western blotting 测定 EMT 相关蛋白表达变化

Hep2 细胞加载 FSS 0、2、4、8 h 以及加载 8 h 后对细胞松弛 4、8 h 后,RIPA 裂解液收集蛋白,定量后变性。经跑胶、转膜、孵育一、二抗后,ECL 显色在凝胶成像仪(ChemiDoc™ XPS+ with Image Lab™,Bio-Rad 公司,美国)上观察蛋白表达效果。对蛋白条带进行灰度分析后,将目的蛋白条带与内参的比值作为半定量指标。

### 1.8 统计学分析

上述实验均做 3 次重复,数据以均数 ± 标准差表示并采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FSS 诱导 Hep2 细胞形态的变化

对 Hep2 细胞施加 140 mPa 的 FSS(见图 1 中白色箭头方向)后,采用倒置显微镜观察细胞形态。未加载 FSS 对照组细胞排列紧密,细胞形态呈多边形。随着力学刺激时间延长,细胞形态逐渐由多边形变为长梭状,细胞长短轴比显著增加。与对照组细胞相比,8 h 组的梭状细胞明显增多。而撤销 FSS 后静态培养 8 h(8+8 h 组),大部分细胞形态又逐渐恢复为多边形,长短轴比降低,其形态与对照组相似。

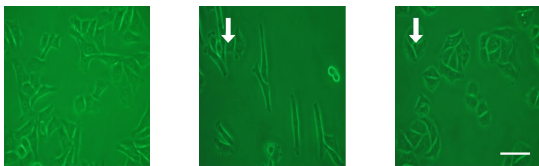


图 1 倒置显微镜下观察 FSS 作用下 Hep2 细胞形态的变化 (标尺 = 50  $\mu\text{m}$ )

Fig.1 Changes of Hep2 cells morphology under FSS observed by inverted microscope (a) Control group, (b) 8 h group, (c) 8+8 h group

### 2.2 FSS 对 Hep2 细胞迁移能力的影响

140 mPa FSS 分别作用于 Hep2 细胞 2、4、8 h

后,打开流动腔取出玻片并置于培养皿,行划痕实验后放置于培养箱静态培养。随后于 4、8、12、24 h 各时间点用倒置显微镜观察 FSS 对 Hep2 细胞迁移的影响(以静态培养的 Hep2 细胞为对照),所得实验结果如图 2(a)所示。图 2(b)统计结果显示,对照组细胞迁移距离与 2 h 组比较,在 12 h 内无显著性差异( $P > 0.05$ ),但在 24 h 后迁移距离与 2 h、4 h、8 h 组比较均有统计学差异( $P < 0.05$ )。而 4 h、8 h 组的细胞迁移距离在 4 h 时,与 2 h 组和对照组比较有显著性差异( $P < 0.05$ )。细胞迁移实验结果表明,经 FSS 加载后的 Hep2 细胞迁移距离明显增加,且细胞的迁移能力随着 FSS 刺激时间的延长而增加。

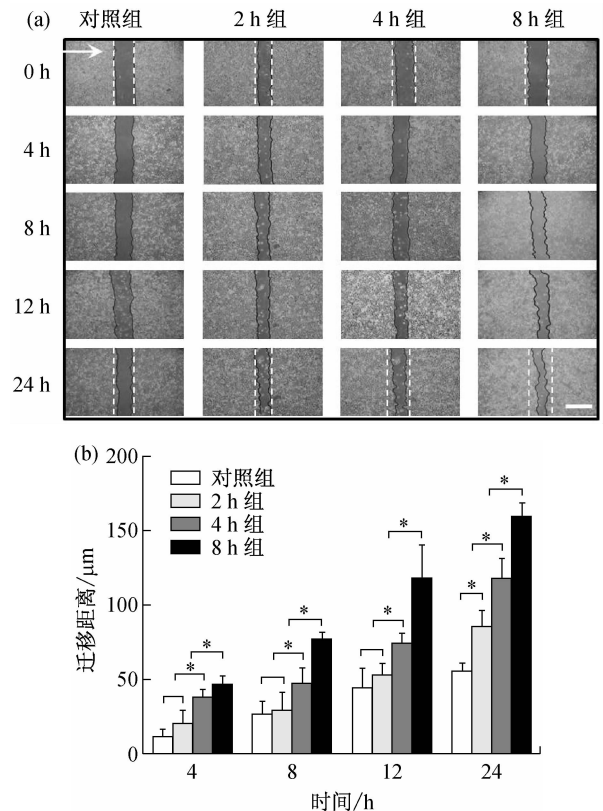


图 2 FSS 作用不同时间 Hep2 细胞迁移能力的变化 (a) 各时间点喉鳞癌细胞的迁移图片(标尺 = 500  $\mu\text{m}$ ), (b) 各时间点细胞迁移距离的统计结果(\* $P < 0.05$ )

Fig.2 Changes of Hep2 cells migration under FSS at different durations (a) Typical images of scratch wound migration at different durations, (b) Statistic results of average cell migration distance at different durations

### 2.3 FSS 对 Hep2 细胞骨架蛋白 F-actin 的影响

FSS 可诱导 Hep2 细胞骨架的重排,从而改变细

胞形态,并促进细胞的迁移和侵袭。图 3 显示 FSS 对 Hep2 细胞骨架蛋白 F-actin 的分布影响。对各实验组细胞骨架蛋白 F-actin 进行染色观察,结果显示,静态培养对照组的 Hep2 细胞铺展面积较小,胞体和细胞前段未观察到明显的应力纤维和丝状伪足。140 mPa FSS 刺激 Hep2 细胞 8 h 后,可观察到细胞铺展面积明显增大,胞体出现明显的应力纤维

(图 3 中红色方框所示),细胞前端的丝状伪足也增加(图 3 中黄色方框所示)。而撤销 FSS 对细胞静态培养 8 h 后观察可得,细胞伪足逐渐消失,但 F-actin 的排列结构仍保持完好。该结果表明,FSS 能促使细胞 F-actin 发生重排,并通过诱导细胞丝状伪足和应力纤维丝的形成增强喉鳞癌 Hep2 细胞的迁移能力。

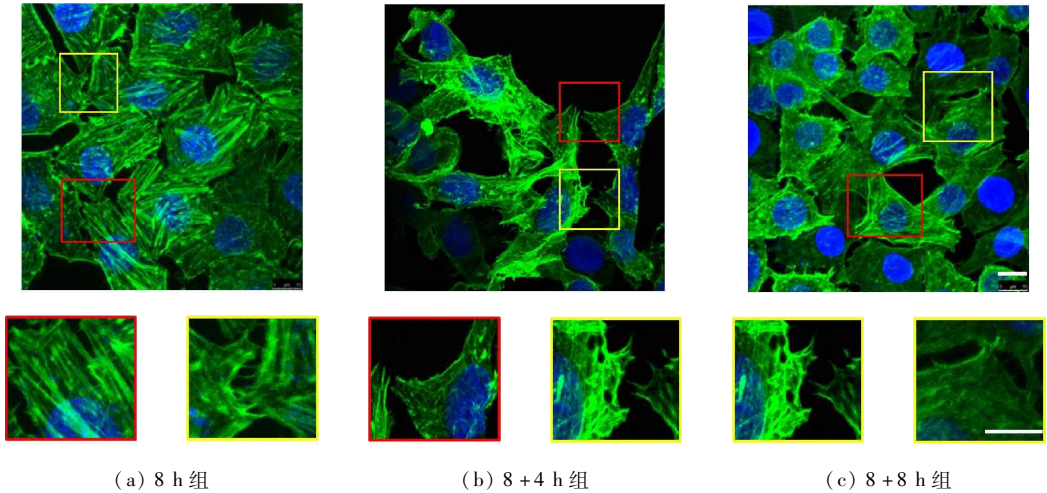


图 3 FSS 对 Hep2 细胞的 F-actin 的影响(标尺 = 10  $\mu\text{m}$ )

Fig. 3 Effects of FSS on the F-actin changes of Hep2 cells at different durations (a) 8 h group, (b) 8+4 h group, (c) 8+8 h group

## 2.4 FSS 对 Hep2 细胞 E-cad 和 N-cad 表达的影响

上皮细胞的分子标志 E-cad 表达下调,而间质细胞的分子标志 N-cad 表达上调是细胞发生 EMT 最显著的标志。图 4 描述了 Hep2 细胞加载 FSS 后 E-cad 和 N-cad 表达的时序性变化规律。加载 FSS 后,两者的变化趋势正好相反。E-cad 随着 FSS 加载时间延长,表达逐渐降低;撤销 FSS 后,表达水平恢复至对照水平。而 N-cad 随 FSS 加载时间延长而表达量增加,撤销 FSS 后表达水平降低。值得注意的是,N-cad 在撤销 FSS 4 h 后,表达水平仍出现明显增加,而 8 h 才出现显著下调。实验结果表明,FSS 刺激可显著上调 Hep2 细胞 E-cad 的表达水平,且下调 N-cad 的表达;撤销 FSS 后,E-cad 和 N-cad 的表达量均呈现向初始水平恢复的趋势,证实 FSS 能够触发 Hep2 细胞的 EMT 过程。

## 2.5 FSS 对 Hep2 细胞间充质蛋白表达的影响

检测 Vimentin、Twist、Snail 1、Slug 等间充质标志物蛋白在 FSS 作用下的时序表达,结果如图 5 所示。几种间充质标志物蛋白在 FSS 刺激下表达水平均

出现明显升高,而撤销 FSS 后,表达水平减低。Vimentin、Twist、Snail 1 蛋白的表达依赖于 FSS 加载时间,在 8 h 达到峰值;Twist 的表达水平在撤销 FSS 4 h 时即发生显著下调。而 Slug 在加载 FSS 2 h 后出现显著的上调表达,撤销 FSS 4 h 后,表达仍上调,达到峰值,8 h 后其表达才开始下调。实验结果进一步证明了 FSS 可诱导 Hep2 细胞发生 EMT,而撤销 FSS 后,Hep2 细胞发生了反转的间质-上皮转化(mesenchymal-epithelial transition, MET)过程。

## 3 讨论

上皮来源的肿瘤细胞在发生 EMT 过程中出现表型转换,细胞极性消失,并伴随细胞间黏附分子的表达降低。同时,E-cad、 $\alpha$ -SMA 等上皮标志物蛋白表达下调,而 N-cad、Vimentin、Snail、Slug 和 Twist 等间充质标志物蛋白表达显著增加<sup>[9]</sup>。在肿瘤细胞发生 EMT 后,细胞骨架发生重排,细胞的迁移和侵袭能力显著增强,从而介导了癌细胞的远端转移。其中,发生 EMT 最重要的典型事件是细胞内 E-cad 的

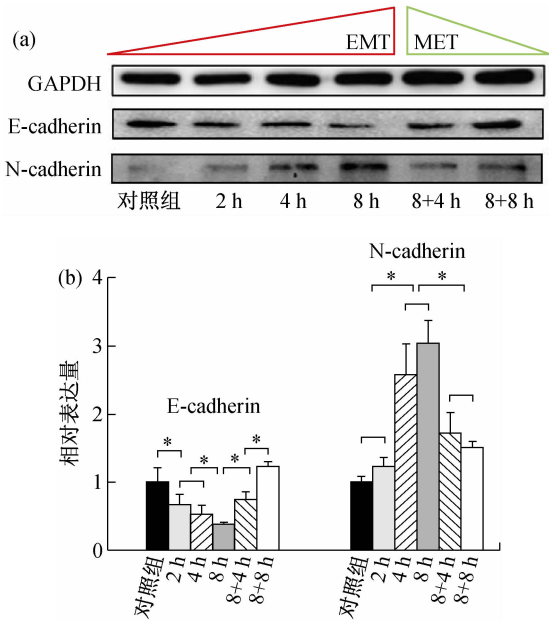


图4 FSS对Hep2细胞E-cadherin和N-cadherin表达的影响

(a) Western blotting检测E-cadherin和N-cadherin表达,  
(b) E-cadherin和N-cadherin相对表达量(\* $P < 0.05$ )

Fig. 4 Effects of FSS on the expression of E-cadherin and N-cadherin of Hep2 cells (a) E-cadherin and N-cadherin detected by Western blotting, (b) Quantification of E-cadherin and N-cadherin

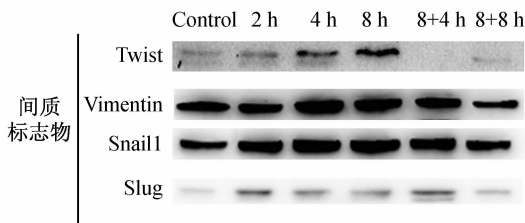


图5 FSS对Hep2细胞间充质蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of FSS on the expression of mesenchymal biomarkers in Hep2 cells

丢失和N-cad上调表达<sup>[10]</sup>。研究发现,N-Cad参与了EMT的发生发展过程,并且与癌细胞迁移这一生物学现象密切相关<sup>[11]</sup>。Vimentin是构成细胞骨架的一种重要组成成分,它能很好维持细胞骨架的完整性。Snail、Slug和Twist是常见的转录因子,它们都能与E-cad的启动子结合后抑制E-cad的表达,进而促使了EMT发生<sup>[12]</sup>。因此,临床上常将E-cad、 $\beta$ -catenin、Snail和Twist等分子标志结合起来作为诊断和治疗癌症的依据,也是判断患者化疗效

果和预后的重要指标。其中,Snail家族在肿瘤发展的EMT过程中起到了关键作用,是EMT的关键调控因子。Snail通过TGF- $\beta$ 或酪氨酸激酶(RTKs)通路活化Notch配体,与SMAD互作蛋白(smad interacting protein1, SIP1)竞争性结合E-cad启动子区域的连接序列,抑制上皮E-cad蛋白的表达,导致胞间连接减少,触发EMT的发生<sup>[13]</sup>。Bruun等<sup>[14]</sup>研究发现,直肠癌患者预后与核内 $\beta$ -catenin、SOX 9等表达量无关,但与细胞膜上E-cad和 $\beta$ -cadherin表达量有密切联系。

肿瘤细胞处于动态的力学微环境中,各类液体流动时必然会产生FSS。流体剪切可以影响肿瘤细胞的生物学行为,如促进肿瘤迁移、诱导细胞凋亡等<sup>[15]</sup>。因此,本研究力图探讨力学刺激对喉鳞癌Hep2细胞EMT的影响。细胞形态观察结果显示,FSS可以促使细胞形态发生改变。未加载FSS的Hep2细胞为多边形,FSS加载8h时,细胞顺应FSS方向,呈梭状排布,长短轴比例增加。撤销FSS后,细胞具有向原始形态转变的趋势;撤销FSS静置培养8h时,细胞长短轴比下降,但细胞仍按力学刺激方向排列,细胞恢复为多边形。划痕实验结果表明,FSS能够显著增强Hep2细胞的迁移能力,且随FSS加载时间延长,细胞迁移距离增加,证实了力学诱导Hep2细胞发生EMT后细胞迁移能力增加依赖于FSS加载的时间。图3细胞骨架蛋白F-actin染色结果显示,静态培养的细胞铺展面积小,几乎没有应力纤维和丝状伪足。随着力学刺激时间的增加,FSS加载8h时,细胞逐渐被拉伸,铺展面积增大,细胞胞内的应力纤维更加清晰,细胞边缘富集丝状伪足。FSS加载8h再静置培养8h后,虽然丝状伪足减少,但是细胞应力纤维仍清晰可见。该研究结果表明,FSS诱导Hep2细胞骨架重排,促进应力纤维形成和细胞前端丝状伪足富集,导致Hep2细胞迁移能力增加。蛋白水平的检测结果显示,上皮标志物E-cad在FSS加载2h后表达即出现显著下调,随着FSS加载时间的延长,其表达水平逐渐降低,而撤销FSS后其表达水平逐渐升高至对照水平。而间充质标志物N-cad、Vimentin、Twist、Slug在FSS加载2h时表达水平即出现升高,并且随时间的增加,表达水平逐渐升高。撤销FSS后N-cad、Twist、Slug、Snail表达水平均出现明显下调。其中,E-cad和Slug在撤

销 FSS 4 h 后的表达水平仍出现上升趋势,在 8 h 才观察到明显的下调,其原因可能是由于 Hep2 细胞正在发生 MET 的逆转过程中,细胞骨架仍在重塑过程中。综上所述,本研究结果表明,FSS 能够诱导喉鳞癌细胞发生 EMT,影响 EMT 关键蛋白的表达水平,其上皮和间质标志物蛋白表达的时序规律具有差异性。

FSS 可诱导 Hep2 细胞发生 EMT,发生 EMT 的 Hep2 细胞胞体拉伸,长短轴比增加,迁移能力增强,上皮标志物 E-cad 表达下调而间质标志物 N-cad 表达升高。此外,撤销 FSS 后,Hep2 细胞发生逆向的 MET 过程,E-cad 表达水平恢复而 N-cad 逐渐下调,Hep2 细胞恢复至多边形形态,且细胞胞体应力纤维和细胞前端丝状伪足逐渐消失。本研究证实 FSS 是诱导 Hep2 细胞发生 EMT 的一个重要物理因素,为探究肿瘤转移的分子机制并理解 EMT 的发生发展过程提供新方向。

#### 参考文献:

- [1] ZUO J, WEN J, LEI M, *et al.* Hypoxia promotes the invasion and metastasis of laryngeal cancer cells via EMT [J]. *Med Oncol*, 2016, 33(2): 1-9.
- [2] WELLS A, YATES C, SHEPARD CR. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas [J]. *Clin Exp Metastas*, 2008, 25(6): 621-628.
- [3] THIERY JP, SLEEMAN JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2): 131-142.
- [4] NIETO MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease: Old views and new perspectives [J]. *Int J Dev Biol*, 2009, 53(8-10): 1541-1547.
- [5] STEINESTEL K, EDER S, SCHRADER AJ, *et al.* Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Clin Transl Med*, 2014, 3(17): 1-12.
- [6] KOUMOUTSAKOS P, PIVKIN I, MILDE F, *et al.* The fluid mechanics of cancer and its therapy [J]. *Annu Rev Fluid Mech*, 2012, 45(1): 325-355.
- [7] MITCHELL MJ, KING MR. Computational and experimental models of cancer cell response to fluid shear stress [J]. *Front Oncol*, 2013, 3(44): 1-11.
- [8] WANG P, CHEN SH, HUNG WC, *et al.* Fluid shear promotes chondrosarcoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase 12 via IGF-2 and VEGF signaling pathways [J]. *Oncogene*, 2015, 34(35): 4558-4569.
- [9] IWATSUKI M, MIMORI K, YOKOBORI T, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(2): 293-299.
- [10] KO H, SO Y, JEON H, *et al.* TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition and acetylation of Smad2 and Smad3 are negatively regulated by EGCG in human A549 lung cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2013, 335(1): 205-213.
- [11] THIERY JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies [J]. *Curropin Cell Biol*, 2003, 15(6): 740-746.
- [12] SANCHEZ-TILLO E, LIU Y, DE BARRIOS O, *et al.* EMT-activating transcription factors in cancer: Beyond EMT and tumor invasiveness [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(20): 3429-3456.
- [13] YU H, SHEN Y, HONG J, *et al.* The contribution of TGF- $\beta$  in epithelial-mesenchymal transition (EMT): Down-regulation of E-cadherin via snail [J]. *Neoplasma*, 2015, 62(1): 1-15.
- [14] BRUUN J, KOLBERG M, NESLAND JM, *et al.* Prognostic Significance of beta-catenin, E-cadherin, and SOX9 in colorectal cancer: Results from a large population-representative series [J]. *Front Oncol*, 2014, 4(118): 1-16.
- [15] LIEN SC, CHANG SF, LEE PL, *et al.* Mechanical regulation of cancer cell apoptosis and autophagy: Roles of bone morphogenetic protein receptor, Smad1/5, and p38 MAPK [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3124-3133.