

SB-431542抑制乳腺癌细胞BT-549的增殖和侵袭及其机理研究

曾凡才^{1, 2} 何宗洋² 莫冬阳² 周红^{1*}

(¹电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054; ²泸州医学院生物化学与分子生物学实验室, 泸州 646000)

摘要 肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的最主要原因, TGF- β 超家族成员Nodal分子被证实参与肿瘤细胞的增殖和转移, 因而基于Nodal信号为靶标开展抗肿瘤研究成为可能。该研究应用Western blot检测乳腺癌细胞株BT-549、T-47D、MCF-7、SK-BR-3和MDA-MB-231中的Nodal和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达水平, 发现它们在BT-549细胞中表达量最高。然后采用不同浓度Nodal信号抑制剂SB-431542(1~50 $\mu\text{mol/L}$)处理BT-549细胞48 h, 利用MTT法揭示20~50 $\mu\text{mol/L}$ 的SB-431542抑制该细胞增殖。进一步利用细胞划痕和Transwell实验证明, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的SB-431542可抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭。最后, 通过明胶酶谱和Western blot显示, 10~30 $\mu\text{mol/L}$ 的SB-431542可剂量依赖性地抑制MMP-2的表达和活性。上述结果说明, SB-431542通过阻断Nodal信号通路可抑制乳腺癌细胞BT-549的增殖、迁移和侵袭, 其作用机制可能与降低MMP-2的表达和活性有关。

关键词 乳腺癌; Nodal; 基质金属蛋白酶-2; SB-431542

SB-431542 Inhibits the Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cell BT-549 and Its Regulatory Mechanisms

Zeng Fancal^{1,2}, He Zongyang², Mo Dongyang², Zhou Hong^{1*}

(¹School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China;

²Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract Metastasis is the main cause of death in patients with malignancy. Nodal, as a member of TGF- β superfamily, promotes the proliferation and metastasis of tumor cells. In this study, we hypothesized that SB-431542 as a membrane receptor-specific inhibitor of Nodal may affect the tumor properties of breast cancer cell through blocking Nodal signaling pathway. The expressions of Nodal and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) were detected by Western blot in breast cancer cell line BT-549, T-47D, MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231, showing that the expressions of Nodal and MMP-2 were stronger in BT549 than that in other cell lines. After the BT549 cells were treated with increasing concentrations (1~50 $\mu\text{mol/L}$) of SB-431542 for 48 h, SB-431542 (20~50 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited cell proliferation but 10 $\mu\text{mol/L}$ of the inhibitor had no effects. Furthermore, wound healing and Transwell assays demonstrated that 10 $\mu\text{mol/L}$ of SB-431542 could block breast cancer cell migration and invasion, respectively. By gelatin zymography and Western blot, it was revealed that the expression and activity of MMP-2

收稿日期: 2013-10-25 接受日期: 2013-12-26

国家自然科学基金(批准号: 30972280)资助的课题

*通讯作者。Tel: 028-83206437, E-mail: zhouhongzh@uestc.edu.cn

Received: October 25, 2013 Accepted: December 26, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30972280)

*Corresponding author. Tel: +86-28-83206437, E-mail: zhouhongzh@uestc.edu.cn

网络出版时间: 2014-04-29 16:08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0344.html>

but not MMP-9 were significantly suppressed by this inhibitor in a dose-dependent manner when BT-549 cells were treated by SB-431542 (10~30 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h. Taken together, these results indicated that SB-431542 inhibited the migration and invasion of breast cancer cells through blocking Nodal signaling pathway, which might be related to the down-regulation of MMP-2 expression and activity.

Key words breast cancer cell; Nodal; MMP-2; SB-431542

肿瘤转移是恶性肿瘤的主要特征之一,是导致肿瘤患者死亡的最重要原因。肿瘤细胞发生远处转移之前,需通过侵袭生长突破基质和基底膜等组织屏障,而在肿瘤细胞侵袭生长过程中主要是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等蛋白水解酶分解胞外基质成分^[1]。MMPs是一个大家族,主要作用是分解细胞外基质,其中MMP-2和MMP-9是基质金属蛋白酶家族中两个重要成员,它们在肿瘤转移过程中发挥重要作用^[2]。

Nodal(nodal growth differentiation factor)是TGF- β 超家族成员之一,主要功能是维持胚胎干细胞不分化,中胚层诱导和身体左右不对称模式的形成^[3]。Nodal分子除在胚胎组织中表达外,在成年正常组织一般不表达,不过最近研究发现它在恶性肿瘤中又重新表达,并且可能促进肿瘤的发生和发展^[4-7]。已有研究表明,Nodal分子在低分化的浸润性乳腺癌中比在早期乳腺癌和良性乳腺病中表达更强^[8-9],并且可促进乳腺癌细胞生长和转移^[10-13]。因此,Nodal分子可能作为肿瘤治疗的潜在靶点。

成熟Nodal分子通过细胞膜上的激活素II型受体B(activin type II receptor B, ActRIIB)和激活素I型受体(activin receptor-like kinase, ALK)4(ALK4)或7(ALK7)以及共受体Cripto-1相互作用将信号传递至胞内,发挥相应生物学效应^[14]。SB-431542是一种人工合成的化学小分子,可作为Nodal分子I型受体特异性抑制剂,通过与ALK4或ALK7受体特异结合阻断Nodal信号通路^[15]。本研究拟用SB-431542处理高表达Nodal的高侵袭性乳腺癌细胞BT-549,以观察BT-549细胞在细胞增殖、迁移、侵袭以及基质金属蛋白酶表达和活性等方面的改变,从而探讨Nodal分子的促肿瘤分子机制和SB-431542的潜在抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

BT-549、MCF-7、T-47D、SK-BR-3和MDA-MB-231乳腺癌细胞株购自中国科学院上海细胞

库。RPMI-1640培养基购自Invitrogen公司;胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司;MTT、结晶紫、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白质分子量标准均购自碧云天生物技术公司,丙烯酰胺、甲撑双丙烯酰胺购自Bio-Rad;SB-431542、DMSO(二甲亚砜)、明胶(gelatin)、Brij-35、SDS、TEMED、APS均购自Sigma公司;Tris-base和Glycine购自Solarbio公司;Nodal、MMP-2单克隆抗体和MMP-9多克隆抗体购自Santa Cruz公司(sc-81953、sc-13595和sc-10737);Matrigel购自BD公司;Transwell小室(8.0 μm pore size)、PVDF膜购自Millipore公司, β -actin、兔二抗、鼠二抗等抗体均购自Bioworld公司;显影液、定影液购自乐凯公司;其他普通化学试剂购自成都科龙公司。

1.2 MTT法检测细胞增殖活性

取对数生长期的BT-549细胞,胰酶消化后用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基配成单细胞悬液,计数板计数后以 4×10^3 /孔细胞接种于96孔培养板中,培养24 h后换成用含5%胎牛血清的RPMI-1640培养基配制的不同浓度SB-431542细胞培养液,对照加入等量DMSO,培养48 h后,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养4 h,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min,用酶标仪(波长490 nm)测定各孔的吸光度值,对结果进行统计分析。每组4个重复,实验重复3次。

1.3 明胶酶谱分析

取对数生长期的BT-549细胞,胰酶消化后接种于24孔板中,约80%融合时用无血清RPMI-1640培养基洗3次,每孔加入500 μL 无血清RPMI-1640配制的含不同浓度SB-431542的培养液,培养24 h后收集培养液置于冰上,2 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,取上清。用BCA法测定样品蛋白浓度,保证各样品上样的蛋白质量相同,与4 \times 上样缓冲液混合,上样至10% SDS-PAGE(胶中含1 mg/mL的明胶);电泳后,将凝胶用洗脱液震荡洗胶4次,15 min/次;然后在孵育液中37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育48 h,染色液中震荡染色3 h后,脱色后可见清晰透明条带^[16]。用凝胶图像分析系统分

析读取条带面积,灰度值做统计分析。实验重复3次。

1.4 Western blot检测

预冷PBS洗细胞2次后,加RIPA细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂)冰上裂解10 min, 16 000 r/min, 4 °C离心10 min,小心收集上清,BCA法测定蛋白浓度。取40 μg总蛋白进行SDS-PAGE实验,湿转转至PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭3 h,分别用MMP-2、MMP-9和Nodal一抗4 °C孵育过夜,用TBST溶液洗3次,每次10 min,然后加相应二抗室温孵育1 h,用TBST溶液洗2次,每次5 min,最后一次用TBS洗5 min,暗房化学发光法显影。实验重复3次,灰度值做统计分析。

1.5 细胞迁移实验

取对数生长期BT-549细胞,胰酶消化后以 1.5×10^5 /孔种于24孔培养板(每孔500 μL含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基)中培养24 h,用200 μL移液器吸头在单层细胞上呈“一”字型划痕,用PBS清洗3次,然后加入含有5%胎牛血清的RPMI-1640配制的浓度为10 μmol/L SB-431542的培养液,对照加入等量DMSO,在倒置显微镜下观察并拍照,培养24 h后再拍照。

1.6 肿瘤细胞侵袭实验

Transwell小室置于24孔板上,Matrigel与无血清培养基以1:5的比例稀释,并以60 μL/孔包被Transwell上的多聚碳酸盐膜,将Transwell细胞培养板于37 °C细胞培养箱中放置1 h。取预热的含10% FBS血清RPMI-1640细胞培养液加入Transwell的下室内,在上室内分别加入经37 °C预热无血清1640培养基配制的终浓度为10 μmol/L SB-431542细胞悬

液(4×10^4 /孔),对照加入等量DMSO,37 °C孵育24 h。取出用PBS洗3遍,棉签擦去小室上层细胞,4%多聚甲醛固定细胞15 min,1%结晶紫染色10 min,清水冲洗多余染料,取下带有细胞的多聚碳酸盐膜,反面朝上,显微镜观察,每个样片随机取5个视野拍照并计数,每一剂量组样本数为4,将数据进行统计分析。

1.7 统计学方法

所有数据使用Excel进行统计处理,数据以 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ 形式表示,两组处理间的比较采用配对t检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

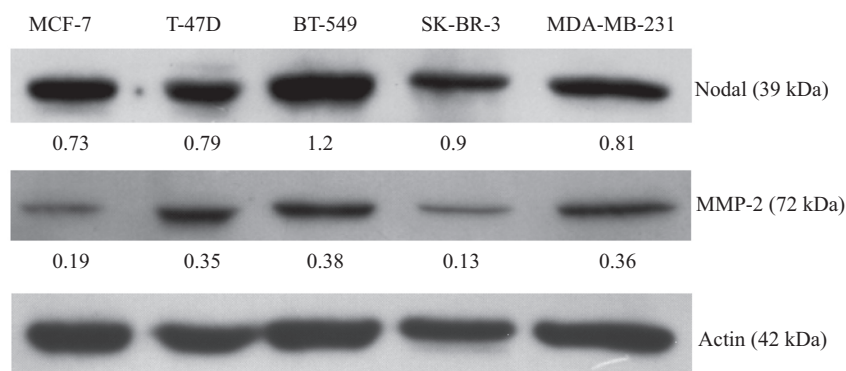
2 结果

2.1 乳腺癌细胞中Nodal和MMP-2的表达

已有研究表明,Nodal分子可促进肿瘤的侵袭和转移,且与乳腺癌的发生和发展密切相关。我们用Western blot检测几种乳腺癌细胞株中Nodal的表达,其中MCF-7、T47D和SK-BR-3是低侵袭性乳腺癌细胞,BT-549和MDA-MB-231是高侵袭性乳腺癌细胞^[17]。结果发现,Nodal在高侵袭性乳腺癌细胞(BT-549和MDA-MB-231)中比低侵袭性乳腺癌细胞(MCF-7、T47D和SK-BR-3)表达更多,特别是在BT-549细胞中表达最强(图1)。MMP-2在肿瘤转移中有重要作用,我们同时检测了这几株乳腺癌细胞中MMP-2的表达。结果显示,在高侵袭性乳腺癌细胞中MMP-2表达更强,在BT-549细胞中最高(图1)。

2.2 SB-431542对BT-549细胞增殖的抑制作用

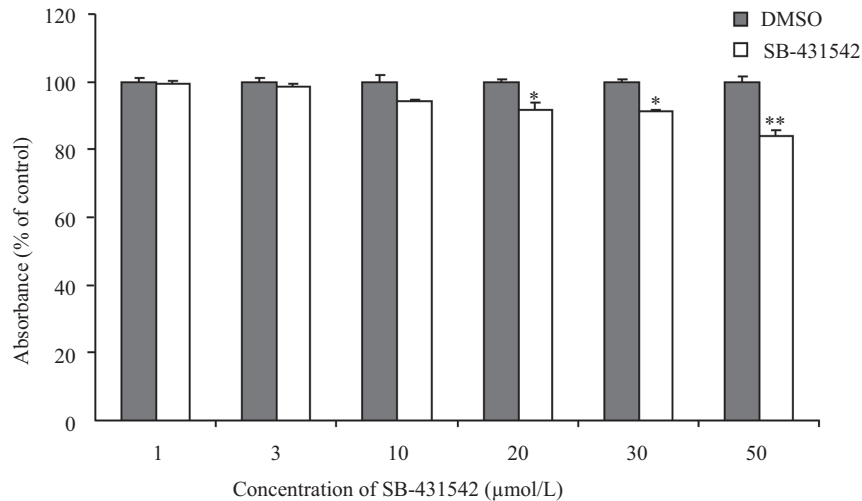
用不同浓度SB-431542处理BT-549细胞48 h,对照管加入等量DMSO,采用MTT法检测细胞增殖。



Western blot检测在高侵袭性乳腺癌细胞(BT-549和MDA-MB-231)和低侵袭性乳腺癌细胞(MCF-7、T47D和SK-BR-3)中Nodal和MMP-2的表达。Expressions of Nodal and MMP-2 in breast cancer cell lines with high (BT-549 and MDA-MB-231) and low (MCF-7, T47D and SK-BR-3) invasion by Western blot.

图1 Nodal和MMP-2蛋白在乳腺癌细胞中的表达

Fig.1 Expressions of Nodal and MMP-2 in various breast cancer cell lines

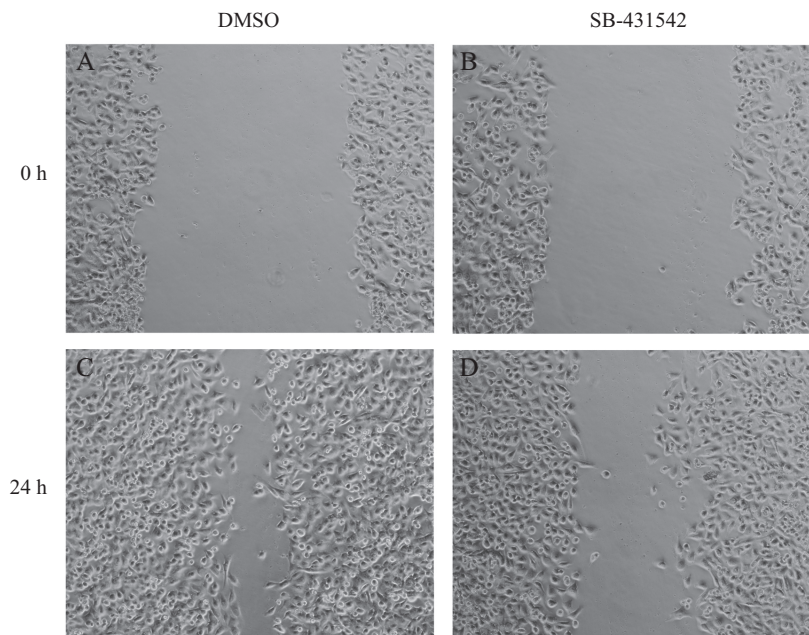


MTT法检测1~50 μmol/L SB-431542处理BT-549细胞48 h的细胞增殖。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与DMSO组比较。

Cell proliferation of BT-549 cells was measured using MTT assay after treatment with SB-431542 (1~50 μmol/L) for 48 h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DMSO group.

图2 SB-431542对BT-549细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of SB-431542 on the proliferation of BT-549 cells



划痕实验检测10 μmol/L SB-431542处理BT-549细胞24 h后迁移能力的变化。A、C: 对照组BT-549细胞培养0 h和24 h的迁移; B、D: 10 μmol/L SB-431542处理BT-549细胞0 h和24 h的迁移。

Wound healing assay of BT-549 cells treats with or without SB-431542 (10 μmol/L) for 24 h; A,C: migration of BT-549 cells in control group after 0 h and 24 h incubation; B,D: effects of 10 μmol/L SB-431542 on the migration of BT-549 cells after treatment for 0 h and 24 h.

图3 SB-431542抑制BT-549细胞迁移(100×)

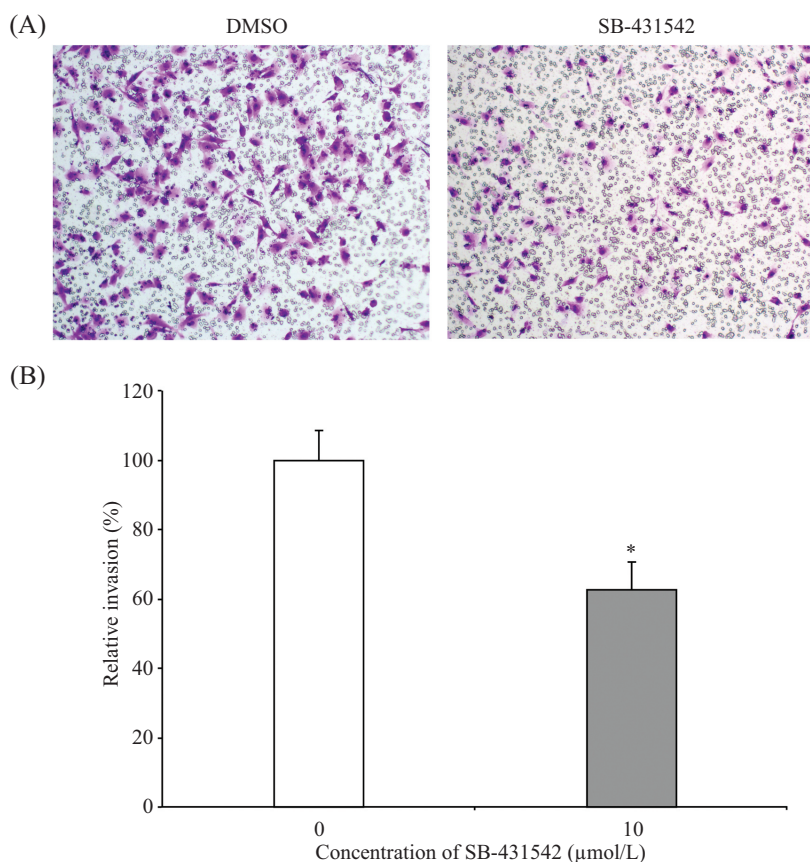
Fig.3 SB-431542 inhibited migration of BT-549 cells (100×)

结果表明, 1 μmol/L和3 μmol/L浓度SB-431542不能抑制BT-549细胞增殖; 10 μmol/L SB-431542有微弱抑制作用, 但无统计学意义; 20 μmol/L和30 μmol/L SB-431542的抑制作用虽有统计学意义, 但抑制率不高; 50 μmol/L SB-431542明显抑制BT-549细胞增殖

(图2)。因此, 为了避免因抑制细胞增殖而影响细胞迁移和侵袭, 选用10 μmol/L SB-431542浓度用于后续的细胞迁移和侵袭实验。

2.3 SB-431542抑制BT-549细胞的迁移和侵袭

恶性肿瘤细胞能够发生转移是因为其具有迁



Transwell实验检测10 μmol/L SB-431542处理BT-549细胞24 h后侵袭能力的变化。BT-549细胞种植于Matrigel包被的Transwell小室上层, 10 μmol/L SB-431542处理24 h后, 用棉签擦去上层细胞, 4%多聚甲醛固定, 结晶紫染色, 观察小室下层细胞并照相(A)(100×), 计数进入下层的细胞并作统计分析(B)。* $P < 0.05$, 与对照组比较。

Transwell cell invasion assay of BT-549 cells treated with or without SB-431542 (10 μmol/L). BT-549 cells are seeded in the upper part of Matrigel-coated transwell chambers. After 24 h, the cells on the upper chamber were carefully wiped with the cotton swab. The wells were fixed with 4% paraformaldehyde, stained with crystal violet solution, observed and photographed (A) (magnification, 100×). Cell invasion index was calculated as the number of cells attached to the bottom of Matrigel-coated membrane, normalizing to control (B). * $P < 0.05$ vs control group.

图4 SB-431542抑制BT-549细胞侵袭

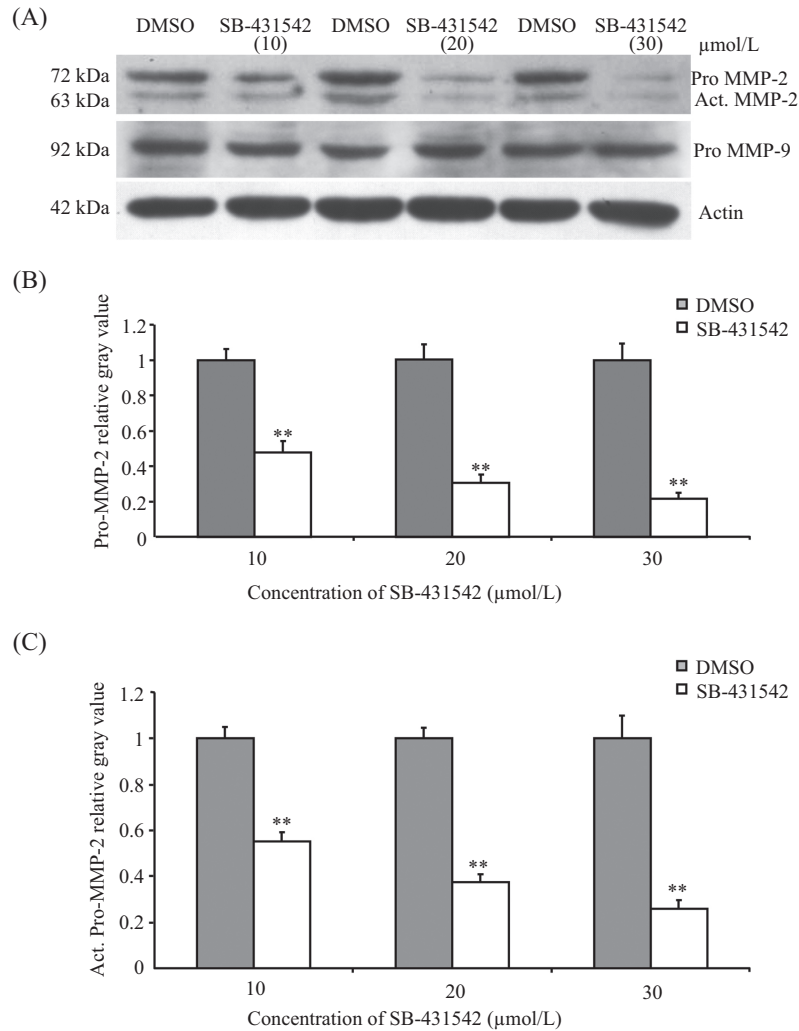
Fig.4 SB-431542 inhibits invasion of BT-549 cells

移能力和侵袭性, 细胞划痕实验可用于证明细胞迁移作用, BT-549乳腺癌细胞是一高迁移性和高侵袭性细胞^[18]。为了避免因抑制细胞增殖而影响细胞迁移(图2), 选用10 μmol/L SB-431542处理BT-549细胞24 h, 观察到与DMSO对照组相比, 处理组中间的划痕间隙明显比对照组更宽, 说明SB-431542可明显抑制BT-549细胞迁移(图3)。Transwell侵袭实验能够较好地在外模模拟肿瘤细胞侵袭过程, 在Transwell侵袭小室上层加入用10 μmol/L SB-431542处理的BT-549细胞, 对照加入与10 μmol/L SB-431542浓度等量的DMSO, 24 h后可观察到处理组与对照组相比, 通过Transwell侵袭小室的细胞明显比对照组更少。说明10 μmol/L SB-431542能够明显抑制BT-549细胞的侵袭(图4)。我们还观察到处理组的细胞形态明显比

对照组细胞更小(图4A), 说明这些细胞还未完全进入小室下层, 而是正在通过Matrigel基质, 这更进一步说明处理组的细胞通过Transwell侵袭小室的速度比对照组慢。因此, 通过细胞划痕实验和Transwell实验证实SB-431542可抑制BT-549细胞的迁移和侵袭。

2.4 SB-431542抑制BT-549细胞的MMP-2表达和活性

BT-549细胞高表达MMP-2(图2), 分别用10, 20, 30 μmol/L SB-431542处理BT-549细胞48 h后, 对照加入等量DMSO, 用Western blot检测MMP-2和MMP-9蛋白表达, 发现SB-431542可抑制MMP-2酶原和成熟的MMP-2蛋白表达, 且随SB-431542浓度增加抑制作用更强, 而MMP-9酶原蛋白的表达几乎没有



Western blot检测10~30 $\mu\text{mol/L}$ SB-431542处理BT-549细胞48 h后MMP-2和MMP-9的表达(A)。MMP-2酶原(B)和成熟MMP-2(C)的条带与对照的灰度值作统计分析。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与对照组比较。

Expressions of MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blot after treatment with SB-431542 (10~30 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h (A). The relative densities of the bands of Pro-MMP-2 (B) and MMP-2 (C) were counted by comparing their densitometry values with those of the corresponding controls. $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs control group.

图5 SB-431542抑制BT-549细胞MMP-2的表达

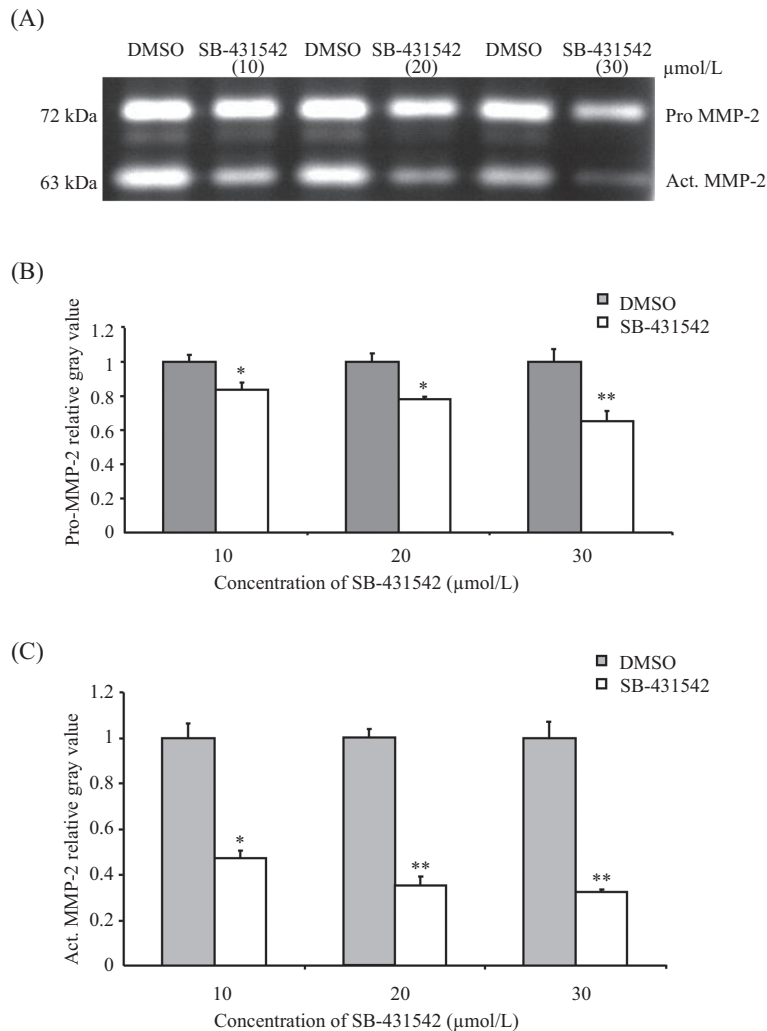
Fig.5 SB-431542 inhibited MMP-2 expression in BT-549 cells

变化(图5A), 三次重复实验的MMP-2酶原和成熟的MMP-2蛋白表达统计结果分别见图5B和图5C。以相同浓度SB-431542处理BT-549细胞24 h, 明胶酶谱法检测MMP-2活性, 观察到MMP-2酶原和成熟的MMP-2活性可被明显抑制, 且随着SB-431542浓度增加而抑制作用增强(图6A), 三次重复实验的MMP-2酶原和成熟的MMP-2活性统计结果分别见图6B和图6C。

3 讨论

Nodal分子可促进乳腺癌的发生、发展和转移^[4-6]。本实验检测了几株乳腺癌细胞中Nodal蛋

白的表达, 结果发现, Nodal分子在高侵袭性乳腺癌细胞株中有更强表达, 特别是BT-549细胞中Nodal的基因表达水平最高。因此, 本实验选用BT-549作为细胞模型, 用Nodal受体特异抑制剂SB-431542阻断Nodal信号通路, 观察对BT-549细胞的影响。SB-431542能阻止ATP与Nodal I型受体ALK4/7结合, 使受体不能催化下游的Smad分子磷酸化, 从而使Nodal信号通路被阻断^[15]。已有研究表明, SB-431542可抑制人胶质瘤细胞的增殖和迁移^[19]以及前列腺癌细胞PC3的迁移^[20]。本实验用不同浓度的SB-431542处理高侵袭性乳腺癌细胞BT-549, 不仅可抑制其细胞增殖, 而且抑制细胞的迁移和侵袭, 证明



明胶酶谱分析10~30 μmol/L SB-431542处理BT-549细胞24 h后MMP-2的活性(A)。MMP-2酶原(B)和成熟MMP-2(C)的条带与相应对照的灰度值作统计分析。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与对照组比较。

MMP-2 activities were analyzed by zymography after treatment with SB-431542 (10~30 μmol/L) for 24 h (A). The relative densities of the bands of pro-MMP-2 (B) and MMP-2 (C) were counted by comparing their densitometry values with those of the corresponding controls. $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs control group.

图6 SB-431542抑制BT-549细胞MMP-2的活性

Fig.6 SB-431542 inhibited MMP-2 activity in BT-549 cells

了该抑制剂可作为潜在的抗肿瘤药物。Transwell侵袭小室实验是在肿瘤研究中用于检测肿瘤细胞侵袭能力的常用方法。该实验结果主要受肿瘤细胞自身的浸润能力、细胞数量、基质的厚度以及培养时间等多个因素的影响。经过多次实验发现, 如果加入 4×10^4 /孔BT-549细胞培养24 h后, 不仅处理组通过侵袭小室的细胞数比对照组更少, 而且处理组细胞的形态明显比对照组细胞更小, 说明处理组细胞还未完全到达小室下层, 而是正在通过Matrigel基质和小室孔, 从而更直观地展示了SB-431542抑制BT-549细胞的侵袭过程。

进一步的研究还发现, SB-431542可抑制MMP-2

的表达和活性, 提示其抑制肿瘤细胞侵袭的可能机制。事实上, 基质金属蛋白酶家族是一类活性依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶, 主要的生理作用是降解细胞外基质, 可帮助肿瘤的侵袭和转移^[21]。该家族已发现超过20个成员, 其中MMP-2和MMP-9是基质金属蛋白酶家族中两个重要成员, 它们在肿瘤转移过程中的作用研究最深入^[21]。在本研究检测的几株乳腺癌细胞中, BT-549细胞有最强的MMP-2的表达, 而且SB-431542对MMP-2表达和活性的抑制作用伴随浓度增加而增强, 但对MMP-9的影响不显著。此外, 前期实验中用明胶酶谱分析发现MMP-2和MMP-9在不同乳腺癌细胞中活性有差异。

在高侵袭性乳腺癌细胞BT-549中MMP-2和MMP-9活性均高,且MMP-2强于MMP-9,不过在高侵袭性乳腺癌细胞MDA-MB-231中MMP-9活性更强;而在低侵袭性的乳腺癌细胞T47D、MCF-7和SK-BR-3细胞中MMP-2和MMP-9活性都较弱。这些结果与本实验的Western blot检测结果一致,说明这两种金属基质蛋白酶与肿瘤细胞侵袭性密切相关。

本研究表明,SB-431542不仅抑制乳腺肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭,而且抑制基质金属蛋白酶MMP-2的表达和活性,说明SB-431542有可能作为抗肿瘤药物。Halder等^[22]也认为SB-431542是一个潜在的抗肿瘤药物。最近一项关于胰腺癌的研究发现,Nodal分子在胰腺星状细胞中高表达,通过旁分泌形式驱动胰腺肿瘤干细胞的自我更新和致瘤性,而用SB-431542可抑制Nodal信号的促肿瘤作用,再组合抑制hedgehog通路后可增加胰腺癌对化疗药物吉西他滨的敏感性^[23-24]。

总之,用Nodal I型受体特异抑制剂SB-431542处理高表达Nodal和MMP-2的高侵袭性乳腺癌细胞BT-549,不仅抑制细胞增殖、迁移和侵袭,而且降低了MMP-2的表达和活性,提示可通过抑制Nodal信号传递达到抗肿瘤作用,为肿瘤治疗提供了一条新思路。

参考文献 (References)

- Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(31): 5287-97.
- Radisky ES, Radisky DC. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(2): 201-12.
- Schier AF. Nodal morphogens. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(5): a003459.
- Topczewska JM, Postovit LM, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW, *et al.* Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: Role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* 2006; 12(8): 925-32.
- Lee CC, Jan HJ, Lai JH, Ma HI, Hueng DY, Lee YC, *et al.* Nodal promotes growth and invasion in human gliomas. *Oncogene* 2010; 29(21): 3110-23.
- Hueng DY, Lin GJ, Huang SH, Liu LW, Ju DT, Chen YW, *et al.* Inhibition of Nodal suppresses angiogenesis and growth of human gliomas. *J Neurooncol* 2011; 104(1): 21-31.
- Quail DF, Siegers GM, Jewer M, Postovit LM. Nodal signalling in embryogenesis and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45(4): 885-98.
- Strizzi L, Hardy KM, Margaryan NV, Hillman DW, Seftor EA, Chen B, *et al.* Potential for the embryonic morphogen Nodal as a prognostic and predictive biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2012; 14(3): R75.
- Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Abbott DE, Seftor RE, S *et al.* Emerging roles of nodal and Cripto-1: From embryogenesis to breast cancer progression. *Breast Dis* 2008; 29: 91-103.
- Quail DF, Taylor MJ, Walsh LA, Dieters-Castator D, Das P, Jewer M, *et al.* Low oxygen levels induce the expression of the embryonic morphogen nodal. *Mol Biol Cell* 2011; 22(24): 4809-21.
- Quail DF, Walsh LA, Zhang G, Findlay SD, Moreno J, Fung L, *et al.* Embryonic protein Nodal promotes breast cancer vascularization. *Cancer Res* 2012; 72(15): 3851-63.
- Fang R, Zhang G, Guo Q, Ning F, Wang H, Cai S, *et al.* Nodal promotes aggressive phenotype via Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in murine melanoma. *Cancer Lett* 2013; 333(1): 66-75.
- Quail DF, Zhang G, Walsh LA, Siegers GM, Dieters-Castator DZ, Findlay SD, *et al.* Postovit LM: Embryonic morphogen nodal promotes breast cancer growth and progression. *PLoS One* 2012; 7(11): e48237.
- Abe Y, Minegishi T, Leung PC. Activin receptor signaling. *Growth Factors* 2004; 22(2): 105-10.
- Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 2002; 62(1): 65-74.
- Hawkes SP, Li H, Taniguchi GT. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs and TIMPs. *Methods Mol Biol* 2010; 622: 257-69.
- Wang C, Navab R, Iakovlev V, Leng Y, Zhang J, Tsao MS, *et al.* Abelson interactor protein-1 positively regulates breast cancer cell proliferation, migration, and invasion. *Mol Cancer Res* 2007; 5(10): 1031-9.
- Iorns E, Hnatyszyn HJ, Seo P, Clarke J, Ward T, *et al.* The role of SATB1 in breast cancer pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102(16): 1284-96.
- Hjelmeland MD, Hjelmeland AB, Sathornsumetee S, Reese ED, Herbstreith MH, Laping NJ, *et al.* SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(6): 737-45.
- Vo BT, Khan SA. Expression of nodal and nodal receptors in prostate stem cells and prostate cancer cells: Autocrine effects on cell proliferation and migration. *Prostate* 2011; 71(10): 1084-96.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141(1): 52-67.
- Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* 2005; 7(5): 509-21.
- Lonardo E, Hermann PC, Mueller MT, Huber S, Balic A, Miranda-Lorenzo I, *et al.* Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell* 2011; 9(5): 433-46.
- Lonardo E, Frias-Aldeguer J, Hermann PC, Heeschen C. Pancreatic stellate cells form a niche for cancer stem cells and promote their self-renewal and invasiveness. *Cell Cycle* 2012; 11(7): 1282-90.