

TGF- β 1促进人子宫颈癌细胞Siha的侵袭、迁移及其机制研究

毛 敏 蔡留芸 胡建国 胡丽娜*

(重庆医科大学第二附属医院妇产科, 重庆 400010)

摘要 探讨转化生长因子- β 1(TGF- β 1)对人子宫颈癌细胞Siha侵袭、迁移能力的影响及其可能的分子机制。用5 ng/mL TGF- β 1作用Siha细胞72 h, 通过倒置显微镜、CCK-8实验、单细胞克隆形成实验、细胞黏附实验和Transwell小室实验分别观察TGF- β 1作用前后Siha细胞形态、增殖能力、克隆形成能力、黏附能力、迁移及侵袭能力的改变; Western blot检测TGF- β 1作用前后基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9、VEGF、CFTR、P50、P65、E-cadherin及Vimentin蛋白表达的变化。结果表明, 5 ng/mL TGF- β 1作用Siha细胞72 h后, Siha细胞出现上皮细胞向间质细胞形态转变、黏附能力减弱、迁移和侵袭能力增强, 伴随MMP-2、MMP-9、VEGF、CFTR、P50、P65和Vimentin表达上调, E-cadherin表达下调。该研究表明, TGF- β 1可能通过诱导Siha细胞发生上皮-间质转化及上调MMP-2、MMP-9和VEGF的表达, 促进Siha细胞的侵袭转移。

关键词 宫颈癌; 转化生长因子- β 1; 迁移; 侵袭; 上皮-间质转化

Investigating the Migration and Invasion of Human Squamous Cervical Carcinoma Line Siha Stimulated by TGF- β 1 and Its Underlying Mechanisms

Mao Min, Cai Liuyun, Hu Jianguo, Hu Lina*

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract This research investigated the influence of transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) on invasion and metastasis of human squamous cervical carcinoma cell line Siha, and might revealed some possible mechanisms. Cultured human cervical carcinoma cell line, Siha, was stimulated with 5 ng/mL of TGF- β 1 for 72 h. The morphologic changes were observed under inverted microscope. Cell proliferation, clone-formation, adhering ability, migration and invasion ability changes were evaluated by CCK-8, colony-forming, cell adherence and Transwell assays, respectively. The expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, VEGF, CFTR, P50, P65, E-cadherin and Vimentin were detected by Western blot. We found that after TGF- β 1 stimulation, Siha cells converted to an elongated spindle-like shape from a “cobblestone” epithelial structure. The migration and invasion ability of Siha cells were promoted dramatically. The expressions of MMP-2, MMP-9, VEGF, CFTR, P50, P65 and Vimentin were increased and E-cadherin was down-regulated than those of control groups. These results indicated that TGF- β 1 might promote the migration and invasion of Siha cells through EMT and up-regulation of MMP-2, MMP-9 and VEGF.

Keywords cervical carcinoma; TGF- β 1; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition

收稿日期: 2014-08-14 接受日期: 2014-10-27

重庆市自然科学基金(批准号: CSTC2012JJB10030)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63693707, E-mail: cqhulina@126.com

Received: August 14, 2014 Accepted: October 27, 2014

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.CSTC2012JJB10030)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63693707, E-mail: cqhulina@126.com

网络出版时间: 2014-12-26 15:47

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141226.1547.004.html>

子宫颈癌是威胁女性健康的三大癌症(乳腺癌、结直肠癌和宫颈癌)之一,且我国子宫颈癌的发生率和致死率呈现逐年上升的趋势。近年来,子宫颈癌浸润及转移是宫颈癌患者死亡的主要原因。因此,研究宫颈癌浸润及转移的机制,对于宫颈癌的治疗及预后判断尤为重要。

宫颈癌中70%~80%为宫颈鳞癌,重要的致病因素包括人乳头状瘤样病毒(HPV)感染、相关原癌基因的激活和抑癌基因的失活、端粒酶活性增加及转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)生成增加等^[1]。TGF- β 是一种多功能的多肽类分子,可分为TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3和TGF- β 1 β 2这4个亚型。其中TGF- β 1含量最高,主要在内皮细胞、造血细胞和连接组织的细胞中表达。在正常的上皮细胞和肿瘤发展的早期, TGF- β 起着肿瘤抑制作用。在肿瘤进展晚期, TGF- β 选择性地丧失了肿瘤抑制功能,而介导了肿瘤细胞的增殖、浸润和转移^[2-5]。有研究发现, HPV-16 E7蛋白可以激活TGF- β 1/Smads信号通路逃避机体对宫颈癌细胞的免疫抑制,促进宫颈癌的发展^[6]。另有研究表明,在宫颈癌肿瘤组织中,高水平的TGF- β 1往往代表着侵袭性较高的类型^[7]。但TGF- β 1促进宫颈癌进展的分子机制仍有待进一步研究。

本研究通过体外培养人子宫颈鳞癌细胞Siha,观察TGF- β 1对Siha细胞恶性生物学行为的影响;探讨TGF- β 1增强Siha细胞的侵袭转移能力受到何种机制调节。本研究试图揭示宫颈鳞癌转移的新机制,为宫颈鳞癌的靶向药物研究提供一个新的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

宫颈癌细胞系Siha购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC);胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物有限公司;RPMI-1640培养基购自北京HyClone公司;TGF- β 1购自美国PeproTech公司;Matrigel基质胶购自美国BD公司;anti-E-cadherin(rabbit)、anti-Vimentin(rabbit)和anti-VEGF(rabbit)购自美国Abcam公司;anti-MMP2(rabbit)和anti-MMP9(rabbit)购自美国Santa Cruz公司;anti-P50(rabbit)和anti-P65(rabbit)购自美国ImmunoWay公司;anti-GAPDH(rabbit)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;山羊抗兔二抗购自美国Abcam公司;anti-CFTR(goat)和鼠抗羊二

抗购自杭州联科生物公司;8 μ m孔径不带基质胶的Transwell小室购自美国Costar公司。

1.2 细胞培养

Siha细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(含100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素)中,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及饱和湿度培养箱中培养,待细胞进入对数生长期后用于实验。我们在实验组中加入TGF- β 1使其终浓度为5 ng/mL,作用72 h,对照组中不加TGF- β 1。

1.3 光镜观察

于TGF- β 1作用Siha细胞24, 72 h时,用倒置显微镜观察细胞的形态变化并拍照。

1.4 CCK-8法检测细胞增殖

调整Siha细胞浓度为 3×10^4 /mL,以每孔100 μ L培养于96孔培养板中。TGF- β 1作用Siha细胞72 h后,按照CCK-8实验说明书检测光密度值(D值)。

1.5 单细胞克隆形成实验

将Siha细胞用胰酶消化后,以每孔200个细胞接种于6孔板中,使细胞分散均匀。当孔板中出现细胞克隆(50个以上细胞为一个克隆)时,终止培养。弃上清, PBS清洗2次。用4%多聚甲醛固定10 min, PBS清洗3次。结晶紫染色20 min,清水冲洗3次。倒置显微镜随机观察对照组和实验组各四个视野,计数细胞克隆数并照相。

1.6 细胞黏附实验

实验前一天将Matrigel胶放于4 $^{\circ}$ C冰箱中融化过夜。实验前将Matrigel胶用预冷的无血清RPMI-1640按1:4稀释,96孔板中加入稀释好的Matrigel胶50 μ L,置于37 $^{\circ}$ C培养箱中过夜。将TGF- β 1处理前后的Siha细胞用胰酶消化,无血清培养液混悬,稀释至浓度为 2.0×10^4 /mL。每孔加入100 μ L细胞悬液。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温培养箱中培养24 h。吸出培养液, PBS清洗2次,每孔加入不含血清的1640培养液100 μ L,再加入CCK-8液10 μ L。在酶联免疫检测仪上,选择570 nm波长,检测各孔的D值。计算黏附抑制率:黏附抑制率=(对照组平均D值-实验组平均D值)/对照组平均D值 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell细胞迁移和侵袭实验

将TGF- β 1处理前后的Siha细胞用胰酶消化,无血清培养液混悬,稀释至浓度 5×10^5 /mL。细胞迁移实验于Transwell上室直接加入200 μ L细胞悬液,然后于下室中加入500 μ L含10%胎牛血清的RPMI-1640

培养液培养。细胞侵袭实验加入细胞悬液前, 先于Transwell上室中加入1:4稀释好的Matrigel胶50 μ L, 覆盖聚碳脂膜, 置于37 $^{\circ}$ C培养箱中过夜, 然后于下室中加入500 μ L含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液培养。细胞迁移实验及侵袭实验均于细胞孵育48 h后从敷箱中取出小室, 弃去上室中的培养液, 用棉签擦去小室上层细胞。然后将小室放入4%多聚甲醛固定10 min, PBS漂洗3次; 结晶紫染色20 min, 清水洗净背景色。再于倒置显微镜200 $\times$ 下每孔随机观察三个视野, 计数细胞并照相。

1.8 Western blot检测TGF- β 1作用后相关蛋白的表达

裂解细胞, 提取细胞总蛋白, BCA蛋白测定试剂盒(Beyotime)测定蛋白浓度。取30 μ g蛋白进行8% SDS-PAGE凝胶变性电泳, 然后将蛋白转至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶封闭2 h, 4 $^{\circ}$ C过夜孵育一抗, 洗膜。常温孵育二抗1 h, 洗膜。用ECL化学发光检测试剂盒(凯基生物)发光显影。

1.9 数据统计

实验数据以mean $\pm$ S.D.表示, 应用SPSS 17.0统计软件进行分析。两组间均数差异性比较采用 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 TGF- β 1作用后Siha细胞形态发生改变

倒置显微镜观察发现, 5 ng/mL TGF- β 1作用Siha细胞24 h后, 实验组较对照组细胞形态已开始改变, 作用72 h时细胞形态发生显著改变。对照组Siha细胞呈单层贴壁生长, 铺路石样, 细胞与细胞间的连接较为紧密。实验组TGF- β 1作用Siha细胞72 h后细胞呈纺锤形改变, 排列紊乱, 细胞之间的连接较对照组疏松(图1)。

2.2 TGF- β 1对Siha细胞生长增殖及克隆无影响

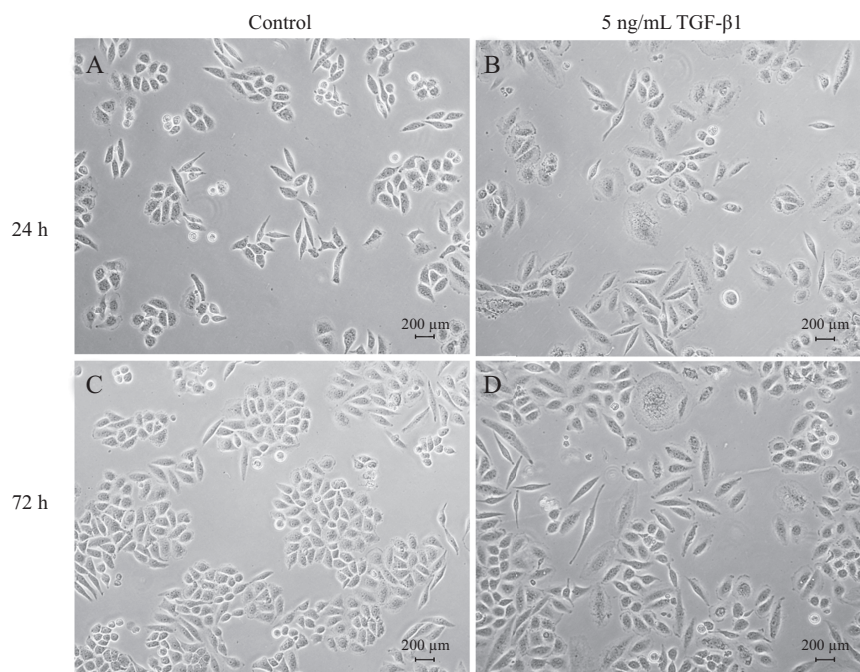
CCK-8实验检测显示, 对照组和实验组的 D 值分别为(0.89 $\pm$ 0.05)和(0.87 $\pm$ 0.05)($P>0.05$), 表明TGF- β 1对Siha细胞生长增殖无显著影响。单细胞克隆形成实验结果显示, TGF- β 1作用前后Siha细胞克隆形成数目分别为(3.92 $\pm$ 1.61)和(3.59 $\pm$ 1.38)($P>0.05$), 表明TGF- β 1对Siha细胞克隆形成无显著影响。

2.3 TGF- β 1减弱Siha细胞与基质的黏附

细胞黏附实验表明, 与对照组相比, 5 ng/mL TGF- β 1作用Siha细胞72 h后, Siha细胞与基质的黏附能力降低, 黏附抑制率为37.20%。

2.4 TGF- β 1促进Siha细胞的迁移和侵袭

为了进一步研究TGF- β 1对Siha细胞侵袭、迁

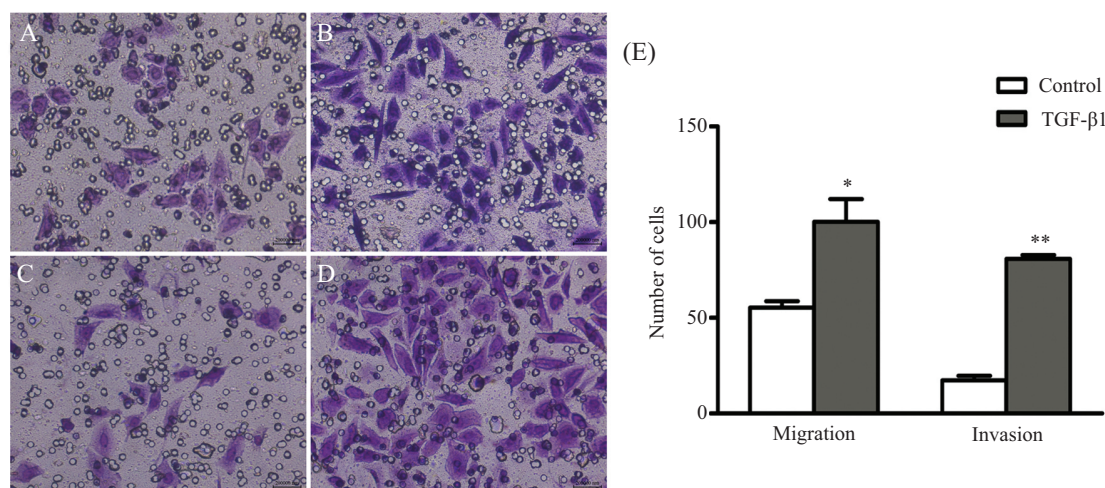


A、C: 空白对照组24, 72 h的细胞形态; B、D: 5 ng/mL TGF- β 1作用Siha细胞24, 72 h的细胞形态。

A,C: morphology of Siha cells in control group for 24, 72 h; B, D: morphology of Siha cells after 5 ng/mL of TGF- β 1 treatment for 24, 72 h.

图1 5 ng/mL TGF- β 1作用Siha细胞24, 72 h后的形态学变化(100 $\times$)

Fig.1 Morphological changes after 5 ng/mL of TGF- β 1 treatment for 24, 72 h in Siha cells (100 $\times$)

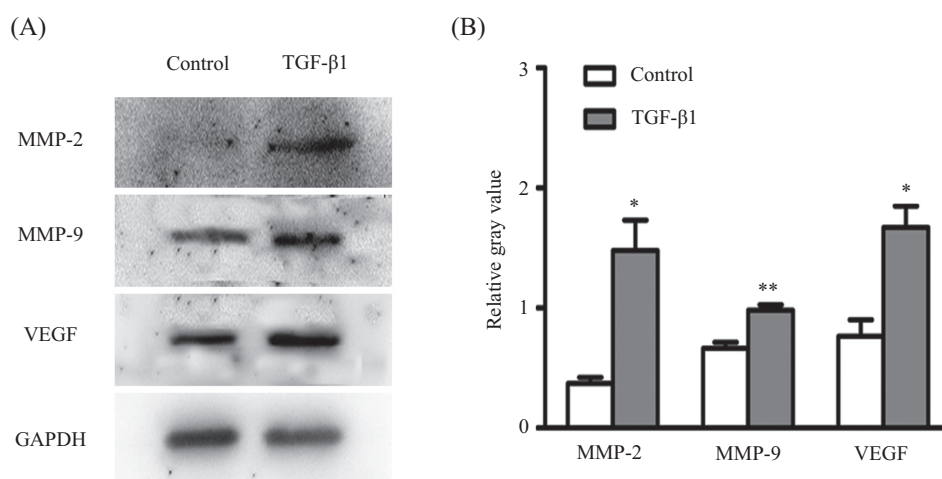


A、B: 空白对照组及5 ng/mL TGF-β1作用SiHa细胞72 h后的迁移(200×); C、D: 空白对照组及5 ng/mL TGF-β1作用SiHa细胞72 h后的侵袭(200×); E: Transwell细胞迁移实验和侵袭实验相对定量结果。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比。

A,B: migration of SiHa cells in control group and 5 ng/mL of TGF-β1 treated group for 72 h (200×); C,D: invasion of SiHa cells in control group and 5 ng/mL of TGF-β1 treated group for 72 h (200×); E: Transwell cell migration assays and invasion assays were scanned and quantified. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图2 TGF-β1促进SiHa细胞迁移和侵袭

Fig.2 TGF-β1 promoted migration and invasion of SiHa cells



A: TGF-β1处理SiHa细胞72 h, Western blot检测SiHa细胞中MMP-2、MMP-9和VEGF蛋白的水平; B: 三次独立Western blot分析实验的相对定量结果, 纵坐标表示MMP-2、MMP-9和VEGF与GAPDH灰度分析的比值, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组相比。

A: expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF were determined by Western blot in SiHa cells after TGF-β1 treated for 72 h; B: Western blot was scanned and quantified. Data presented densitometric analyses of MMP-2, MMP-9 and VEGF relative to GAPDH for 3 independent experiments. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group.

图3 TGF-β1处理SiHa细胞72 h后MMP-2、MMP-9及VEGF的蛋白表达

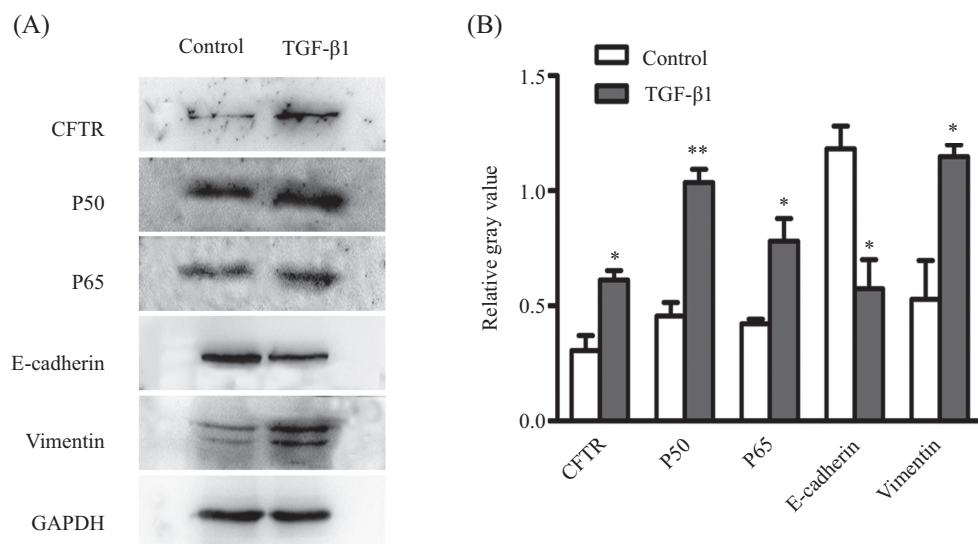
Fig.3 Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF proteins after TGF-β1 treatment for 72 h in SiHa cells

移能力的影响, 我们用Transwell小室实验比较5 ng/mL TGF-β1刺激SiHa细胞72 h后, 细胞侵袭和迁移能力的改变。倒置显微镜下(200×)观察SiHa细胞穿过Transwell小室的细胞数。Transwell细胞迁移实验结果显示, 对照组和实验组穿过Transwell小室的细胞数量分别为(55.33±5.86)/高倍镜和(100.22±20.53)/高倍镜($P=0.02$)。Transwell细胞侵袭

实验结果显示, 对照组和实验组穿过Transwell小室的细胞数量分别为(17.33±4.10)/高倍镜和(80.78±3.42)/高倍镜($P<0.01$)(图2)。5 ng/mL TGF-β1处理SiHa细胞72 h后显示了较强的迁移、侵袭促进作用。

2.5 TGF-β1促进SiHa细胞表达MMP-2、MMP-9及VEGF(vascular endothelial growth factor)

Western blot检测结果显示, 与对照组相比,



A: TGF- β 1处理Siha细胞72 h, Western blot检测Siha细胞中CFTR、NF- κ B(P50和P65)、E-cadherin和Vimentin的水平; B: Western blot分析实验的相对定量结果, 纵坐标表示CFTR、NF- κ B(P50和P65)、E-cadherin和Vimentin灰度分析的比值。* P <0.05, ** P <0.01, 与对照组相比。

A: expressions of CFTR, NF- κ B (P50 and P65), E-cadherin and Vimentin were determined by Western blot in Siha cells after TGF- β 1 treatment for 72 h; B: Western blot was scanned and quantified. Data presented densitometric analyses of CFTR, NF- κ B (P50 and P65), E-cadherin and Vimentin relative to GAPDH. * P <0.05, ** P <0.01 compared with control group.

图4 TGF- β 1处理Siha细胞72 h后CFTR、NF- κ B(P50和P65)、E-cadherin和Vimentin蛋白的表达

Fig.4 Expressions of CFTR, NF- κ B (P50 and P65), E-cadherin and Vimentin proteins after TGF- β 1 treatment for 72 h in Siha cells

5 ng/mL TGF- β 1作用Siha细胞72 h后, 基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9和血管内皮生长因子(VEGF)表达均显著上调(图3)。

2.6 TGF- β 1促进Siha细胞发生上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)

Western blot显示, Siha细胞在基础状态下细胞内囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)水平较低, TGF- β 1作用后CFTR蛋白表达升高, 转录因子NF- κ B蛋白表达也明显上调。上皮细胞标志物E-cadherin蛋白表达下调, 间质细胞标志物Vimentin蛋白表达升高(图4)。以上结果说明, TGF- β 1处理Siha细胞72 h后促进Siha细胞发生上皮向间质的转化。

3 讨论

转移是恶性肿瘤的十大基本生物学特征之一, 临床上90%的恶性肿瘤患者死于转移, 因此研究肿瘤的转移机制、探索防治肿瘤转移的方法, 对于降低患者病死率以及改善预后具有重大的意义。

肿瘤的转移是一个复杂的过程, 包括肿瘤细胞突破基底膜从原发部位脱离进入细胞外基质, 并侵入血管和淋巴系统, 黏附在血管或淋巴管的内皮

细胞上并向脉管外迁移, 转移到其他部位, 形成新的转移灶。肿瘤的侵袭与转移必须满足两个条件: 肿瘤血管生成及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解。肿瘤血管生成是指从已存在的血管床中产生新生血管系统, 受控于多种血管生成因子。正常的血管生成被严格控制于某些暂定的、特定的生理过程, 如生殖过程、发育过程和伤口愈合过程, 而持续的血管生成是某些病理改变如肿瘤生长的特性。血管生成不但是肿瘤生长所必需的, 而且肿瘤细胞与新生血管系统的接触还是导致远处转移的原因。在没有新血管生成以前, 肿瘤只生长到1~2 mm³, 不会发生转移; 而在新血管生成后肿瘤成数倍增长, 转移机会随之增高。另一方面, 细胞外基质是阻止肿瘤转移的第一道屏障, 肿瘤细胞降解基质蛋白是局部侵袭和转移的必需步骤^[8]。与细胞外基质(ECM)相关的肿瘤转移因素中, 关于基质金属蛋白酶(MMP)降解ECM和细胞之间的黏着蛋白的研究最多。MMP主要以三种机制促进肿瘤细胞的侵袭生长^[9]: (1)蛋白酶作用使得肿瘤细胞周围由基质分子如胶原、层黏连蛋白(LN)、纤连蛋白(FN)等形成的物理屏障被破坏; (2)MMP可以重塑细胞间黏附力, 以便肿瘤细胞向周围生长; (3)MMP

作用于基质成分后, 激发其他一些潜在的生物活动, 如MMP-2分解LN-5后可产生具催化作用的可溶性片段, 参与肿瘤的免疫过程。因此, MMP活性上调与肿瘤侵袭、转移密切相关。本研究表明, 5 ng/mL TGF- β 1刺激Siha细胞72 h后, Siha细胞表达VEGF和基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9增加。VEGF是最重要的血管生成因子之一, 可刺激血管内皮细胞的生成, 促进肿瘤的血管形成^[10]。MMP-2、MMP-9属IV型胶原酶, 是重要的肿瘤-间质间相互作用的介导分子, 能降解细胞外基质, 促进肿瘤细胞突破基底膜。此外, MMP-2和MMP-9还可以有效降解血管基底膜, 有利于肿瘤的血管形成。

TGF- β 1刺激Siha细胞72 h后, Siha细胞在增殖能力和克隆形成数目两个方面并无明显改变, 但是Siha细胞的迁移和侵袭能力却较对照组明显增强, 这可能与Siha细胞发生上皮-间质转化(EMT)有关。EMT是指上皮细胞在某些因素的作用下, 丢失细胞间紧密连接和黏附连接, 丧失细胞极性, 获得间质细胞的特征, 并获得运动迁移的能力^[11]。大量形态学和分子学证据表明, 上皮-间质转化(EMT)在上皮细胞恶性肿瘤的浸润和转移中发挥着重大作用, 是导致恶性肿瘤发生转移的重要分子机制^[11-12]。TGF- β 是肿瘤微环境中重要的细胞因子, 目前已有大量有关TGF- β 参与肿瘤EMT并促进肿瘤转移的报道^[13-14], 且研究多集中于乳腺癌上。有研究表明, TGF- β 通过诱导乳腺癌细胞过度表达Smad2和Smad3促进乳腺上皮模型EMT的发生^[15]。另外, 整合素相关激酶(integrin-linked kinase, ILK)通过激活Wnt/ β 连环蛋白途径成为TGF- β 介导EMT的下游调节因子, TGF- β 有时需要协同因子比如Ras和PI3K共同诱导EMT^[16]。本研究中, TGF- β 1刺激Siha细胞后, Siha细胞发生了上皮-间质转化, 不仅形态从上皮细胞铺路石样向间质细胞样的纺锤形改变, 而且上皮细胞的分子标志物E-cadherin表达降低, 间质细胞的分子标志物Vimentin表达升高。同时, Siha细胞与基质的黏附能力明显减弱, 迁移和侵袭能力明显增强。

在前期工作中, 我们发现囊性纤维化跨膜转导因子(CFTR)和转录因子NF- κ B与宫颈癌的临床分期、病理分级、淋巴转移、肌层浸润和预后等明显正相关^[17-18]。另有报道, 转录因子NF- κ B是EMT的重要调节因子, NF- κ B的异常激活在EMT过程的发生和肿瘤的进展中起到关键的作用^[18-19]。此次研究发

现, TGF- β 1能诱导Siha细胞表达CFTR和NF- κ B(P50和P60)增加。CFTR和NF- κ B是否在TGF- β 1诱导Siha细胞发生EMT促进迁移和侵袭中发挥了作用, 以及TGF- β 1促进Siha细胞发生EMT的具体机制如何, 均有待深入研究和探讨。

综上, TGF- β 1通过以下三个方面促进宫颈癌细胞的迁移和侵袭: (1)诱导Siha细胞表达VEGF促进肿瘤血管生成; (2)诱导Siha细胞表达基质金属蛋白酶MMP-2和MMP-9促进细胞外基质降解; (3)通过诱导Siha发生EMT, 使Siha细胞与基质的黏附能力减弱, 变成具有运动侵袭能力的间质细胞。本研究表明, TGF- β 1与宫颈鳞癌的发展密切相关, 为探讨宫颈鳞癌发生侵袭转移提供了新的思路, 可能为治疗宫颈鳞癌提供新的途径。

参考文献 (References)

- 1 张晓金, 归绥琪. 宫颈癌发病机制的研究进展. 中国妇幼健康研究(Zhang Xiaojin, Gui Suiqi. Advances in research on pathogenesis of cervical carcinoma. Chinese Journal of Woman and Child Health Research) 2008; 19(1): 56-9.
- 2 Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. Nat Cell Biol 2007; 9(9): 1000-4.
- 3 Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. Nat Rev Cancer 2006; 6(7): 506-20.
- 4 Oft M, Heider KH, Beug H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. Curr Biol 1998; 8(23): 1243-52.
- 5 Hata A, Shi Y, Massague J. TGF-beta signaling and cancer: Structural and functional consequences of mutations in Smads. Mol Med Today 1998; 4(6): 257-62.
- 6 Xu Q, Wang S, Xi L, Wu S, Chen G, Zhao Y, et al. Effects of human papillomavirus type 16 E7 protein on the growth of cervical carcinoma cells and immuno-escape through the TGF-beta1 signaling pathway. Gynecol Oncol 2006; 101(1): 132-9.
- 7 Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepez S, Neonakis IK, Soufla G, Bonavida B, et al. Overexpression of VEGF and TGF-beta1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: Implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection. Int J Oncol 2007; 31(1): 69-79.
- 8 王拴柱, 马秀梅. 细胞外基质与肿瘤转移关系的研究进展. 内蒙古医学院学报(Wang Shuanzhu, Ma Xiumei. Advancing research on relationship between extracellular matrix and tumor metastasis. Acta Acad Med Nei Mongol) 2009; 31(1): 76-80.
- 9 刘智敏. 基质金属蛋白酶的结构、功能和调节. 生物医学工程学报(Liu Zhimin. Structure, Function and Regulation of MMPs. J Biomed Eng) 2002; 19(4): 680-3.
- 10 Saariisto A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. Oncogene 2000; 19(53): 6122-9.

- 11 Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6): 1420-8.
- 12 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442-54.
- 13 Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, *et al.* Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 19-27.
- 14 Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; 19(2): 156-72.
- 15 Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1987-2002.
- 16 Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT *in vitro*. *Neoplasia* 2004; 6(5): 603-10.
- 17 Peng X, Wu Z, Yu L, Li J, Xu W, Chan HC, *et al.* Overexpression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is associated with human cervical cancer malignancy, progression and prognosis. *Gynecol Oncol* 2012; 125(2): 470-6.
- 18 Li J, Jia H, Xie L, Wang X, Wang X, He H, *et al.* Association of constitutive nuclear factor-kappaB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(8): 1421-6.
- 19 Huber MA, Azoitei N, Baumann B, Grunert S, Sommer A, Pehamberger H, *et al.* NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004; 114(4): 569-81.