

HMGB1低表达对结直肠癌细胞迁移和侵袭的影响

龙露叶 王思萱 徐建昕 方雪娇 钱诗菡 吕建新*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325035)

摘要 该文研究了低表达高迁移率族蛋白(high mobility group box 1, HMGB1)对结直肠癌细胞迁移侵袭的影响, 构建了稳定低表达HMGB1的结直肠癌细胞系SW480和HCT-15。采用Transwell实验检测细胞迁移和侵袭能力, 免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达水平。Transwell实验结果表明, shHMGB1组(HMGB1低表达组)的迁移侵袭能力明显强于shNC组(阴性对照组)(** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。Western blot结果显示, 与shNC组相比, shHMGB1组上皮标志物E-Cadherin蛋白的表达水平下降(* $P<0.05$, ** $P<0.01$), 间质标志物Snail蛋白的表达水平上升(* $P<0.05$)。此外shHMGB1组的c-Myc和GSK3B蛋白表达水平明显高于shNC组(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)。上述结果表明, 低表达HMGB1能显著促进结直肠癌细胞SW480和HCT-15的迁移和侵袭能力以及上皮-间质化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 这为结直肠癌的治疗提供了新的潜在靶点和视角。

关键词 结直肠癌; HMGB1; 迁移; 侵袭

Knockdown of HMGB1 Influence the Migration and Invasion Abilities of Colorectal Cancer Cells

Long Luye, Wang Sixuan, Xu Jianxi, Fang Xuejiao, Qian Shihan, Lü Jianxin*

(School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract In this study, we investigated the effect of HMGB1 on migration and invasion in colorectal cancer cells. We constructed the colorectal cancer cell lines SW480 and HCT-15 with stable suppression of HMGB1. Transwell assay was used to detect cell migration and invasion. Western blot was used to detect protein expression. Transwell experiments showed that the migratory and invasive ability of shHMGB1 group was significantly greater than that of shNC group (negative control group) (** $P<0.01$, *** $P<0.001$). Western blot results showed that the epithelial marker E-Cadherin protein in the shHMGB1 group (knockdown of HMGB1 group) was decreased compared with the shNC group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$). However, the mesenchymal marker, Snail protein expression level was increased (* $P<0.05$). In addition, the expression levels of c-Myc and GSK3B proteins in shHMGB1 group were significantly higher than those in shNC group (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$). The results indicated that suppression of HMGB1 expression significantly promoted the migration and invasion of colorectal cancer cells as well as epithelial mesenchymal transition, providing new potential targets and new perspectives for the treatment of colorectal cancer.

Keywords colorectal cancer; HMGB1; migration; invasion

结直肠癌是最常见的肿瘤之一, 最新数据显示, 在美国, 不论在男性还是女性中, 结肠癌的新发病例

和死亡率均排名第三^[1]。2015年, 美国癌症协会的数据表明^[2], 中国结肠癌的发病率处于较高水平, 在所

收稿日期: 2018-12-04 接受日期: 2019-02-01

国家自然科学基金(批准号: 81170257)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86689717, E-mail: jxlu313@163.com

Received: December 4, 2018 Accepted: February 1, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81170257)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689717, E-mail: jxlu313@163.com

网络出版时间: 2019-05-10 14:01:06

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190510.1033.002.html>

有癌症中位居第五位。结直肠癌早期症状不明显,患者就诊时已经进入中晚期,有研究表明50%~60%的患者在确诊不久后便发生远处转移^[3]。然而对于结直肠癌的转移,临床上缺乏有效的治疗措施,因此对于结肠癌发病机制的研究依然非常迫切。

高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1, HMGB1),是广泛存在于真核细胞核内的非组蛋白染色体结合蛋白,最早于1973年在小牛胸腺中被发现^[4]。1999年,Wang等^[5]首次报道HMGB1作为新的潜在的晚期炎症介质,参与脓毒症的发病过程,它是内毒素致死效应的晚期重要炎症介质。HMGB1作为非组蛋白染色体结合蛋白,与组蛋白一样,是重要的染色体蛋白之一,具有三个结构域:A盒、B盒以及C尾端,其中A盒包含转录因子P53的结合域,B盒上有Toll样受体4(Toll like receptors 4, TLR4)的结合域,B盒与C尾端之间有晚期糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycation end products, RAGE)的结合域^[6]。在细胞核中,HMGB1是高度保守的染色质蛋白,作为DNA的分子伴侣,维持DNA的稳定性,与核小体、转录因子和组蛋白相互作用^[7],调控DNA的合成及转录。此外,HMGB1与DNA结合可以折叠DNA^[8],使得DNA可以与其他蛋白质相结合^[9],特别是核激素受体家族的成员^[10]。而在细胞外,HMGB1是一个与损害相关的典型分子,充当细胞因子、生长因子、趋化因子,能够诱发炎症。HMGB1是一个具有多重并且动态作用的分子,可以通过多种信号通路来调控肿瘤细胞的存活、增殖、侵袭、迁移和死亡^[11]。有研究表明,HMGB1可以通过抑制结直肠癌细胞的有氧呼吸从而导致细胞死亡^[12],然而HMGB1在结直肠癌中的作用机制还有待进一步阐明。本文研究了在结直肠癌细胞中低表达HMGB1后其迁移和侵袭能力的变化情况,并对HMGB1在结直肠癌迁移和侵袭过程中发挥作用的机制进行了初步探讨,从而为结直肠癌的临床研究提供理论依据和潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人结直肠癌细胞SW480和HCT-15购自中国科学院细胞库。RPMI-1640培养基购自美国Gibco公司。DMSO购自美国Sigma公司。胰蛋白酶消化液、100×青/链霉素混合液、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂(PMSF)、BCA蛋白浓度测定试剂盒、丽春红、

Tween-20、Western一抗稀释液、一抗二抗去除液、 β -actin鼠多克隆抗体、GAPDH鼠多克隆抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或抗兔(IgG)购自杭州联科生物公司。SuperSignal化学发光试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司。30%丙烯酰胺(29:1)购自北京索莱宝科技有限公司。转染试剂Lipofectamine 3000、G418购自美国Invitrogen公司。Transwell小室、细胞培养板、细胞培养皿购自美国Corning公司。基质胶购自美国BD公司。Snail(C15D3) Rabbit mAb(#3897)单克隆抗体购自美国Cells Signaling Technology公司。Anti-E Cadherin(ab40772)、Anti-HMGB1(ab79823)单克隆抗体购自美国Abcam公司。胎牛血清购自南美LONSERA公司。SuperSilencing shRNATM质粒表达载体套装(shHMGB1以及阴性对照shRNA)购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SW480和HCT-15细胞培养于RPMI-1640培养基中,内含10%灭活新生小牛血清以及100 U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素,置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞转染 质粒shHMGB1的载体为pGPU6/GFP/Neo,序列为5'-CCC GTT ATG AAA GAG AAA TGA-3'。取对数生长期细胞接种于6孔板中,放入二氧化碳培养箱(37 °C、5% CO₂)中常规培养,待细胞密度为80%时,根据Lipofectamine™ 3000试剂实验方案进行细胞转染。于24 h后在荧光显微镜下观察并计算转染效率。

1.2.3 单克隆细胞筛选 细胞转染24 h后,加入含G418的RPMI-1640培养基进行克隆筛选,SW480细胞加入G418的终浓度为600 μ g/mL,HCT-15细胞加入G418的终浓度为700 μ g/mL。经过14天的筛选,显微镜下可以观察单克隆细胞群,在荧光显微镜下挑选带有绿色荧光的单克隆细胞群,消化并扩大培养。

1.2.4 Western blot检测相关蛋白的表达水平 收集各组细胞,用预冷的PBS清洗细胞2遍,在冰上用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA试剂盒测定总蛋白浓度。并将各组蛋白浓度调成1 μ g/ μ L,用2×SDS-Loading Buffer 95 °C变性5 min。变性好的蛋白在5% SDS-PAGE的浓缩胶(70 V, 30 min)以及12% SDS-PAGE的分离胶(110 V, 80 min)中进行电泳。将电泳

分离好的蛋白电转到硝酸纤维膜(NC膜)上,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h, TBST(20 mL 1 mol/L Tris-HCl pH8.0、8.8 g NaCl、0.5 mL 0.5% Tween-20, 用去离子水定容至1 L)洗涤5 min, 剪下目的条带放入对应的一抗中, 4 °C摇床中孵育过夜。TBST洗膜(10 min, 3遍)。加入到对应的二抗(辣根过氧化物标记的山羊抗兔或抗小鼠IgG)中, 室温摇床孵育1 h。TBST洗膜3遍(方法同前)。滴加ECL发光液, 在Bio-Rad成像仪中成像, 选择合适的曝光时间保存图片, 用Image J软件分析各蛋白的灰度值并做相应统计学分析。

1.2.5 Transwell小室迁移实验 取对数期各组稳定转染细胞, 消化计数, 用培养基原液(不含胎牛血清)清洗细胞2遍。在24孔板中加入600 μ L含有20%胎牛血清的RPMI-1640培养基, 并将Transwell小室放入24孔板中, 然后在上室加入200 μ L用培养基原液配制的细胞悬液(SW480细胞 4×10^4 个/200 μ L, HCT-15细胞 3×10^4 个/200 μ L), 放入二氧化碳培养箱(37 °C、5% CO₂)中继续培养。48 h后, 取出24孔板, 吸去小室中剩余的培养基, 放入另一个已加600 μ L 4%多聚甲醛的24孔板中固定15 min。之后取出小室, 待4%多聚甲醛挥发后, 再放入含有600 μ L结晶紫的24孔板中染色15 min。最后用纯水洗去上室的结晶紫, 用棉签擦去上室中的细胞, 于Nikon倒置显微镜下, 拍摄下室细胞(100倍下取随机5个视野)。用Image Pros Plus软件计数所拍摄图片内细胞数目, 并做统计分析。

1.2.6 Transwell小室侵袭实验 将基质胶提前放入4 °C融化, 提前将枪头、EP管、Transwell小室放入4 °C遇冷。按照基质胶:培养基原液=1:10的体积比稀释基质胶, 混匀, 取40 μ L稀释好的基质液加入小室内, 在二氧化碳培养箱(37 °C、5% CO₂)中孵育8~12 h, 待基质胶凝固后吸去小室内残留的液体, 加入40 μ L培养基原液水化30 min。其他步骤同1.2.5。

1.3 统计学分析

每组实验均需独立重复3次, 且实验所得数据以“均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)”表示, 独立样本分析采用*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用SPSS 17.0统计软件进行分析, Graph Pad Prism 5绘制统计图。

2 结果

2.1 稳定转染后结直肠癌细胞HMGB1的蛋白表达水平变化

用Western blot检测经G418筛选后单克隆细胞

株中HMGB1表达水平的变化情况。与Control组(未转染的结直肠癌细胞)和shNC组相比, shHMGB1组中蛋白表达水平明显下调(图1A), 并且具有统计学意义(图1B)。

2.2 HMGB1低表达促进结直肠癌细胞的迁移能力

利用Transwell小室实验检测HMGB1低表达对SW480细胞和HCT-15细胞迁移的影响。结果显示, 与shNC组相比, 迁移的结直肠癌细胞数目明显增加, 且差异具有统计学意义(图2)。

2.3 HMGB1低表达促进结直肠癌细胞的侵袭能力

利用Transwell小室实验检测HMGB1低表达对SW480细胞、HCT-15细胞侵袭的影响。结果显示, 与shNC组相比, shHMGB1组侵袭的结直肠癌细胞数目明显增加, 且差异具有统计学意义(图3)。

2.4 HMGB1低表达对结直肠癌细胞相关蛋白表达水平的影响

利用Western blot实验检测HMGB1低表达后相关标志物的表达水平。与shNC组相比, shHMGB1组上皮标志物E-Cadherin表达水平下调, 而间质上皮标志物Snail表达水平上调(图4A), 且E-Cadherin和Snail的蛋白变化差异具有统计学意义(图4B)。

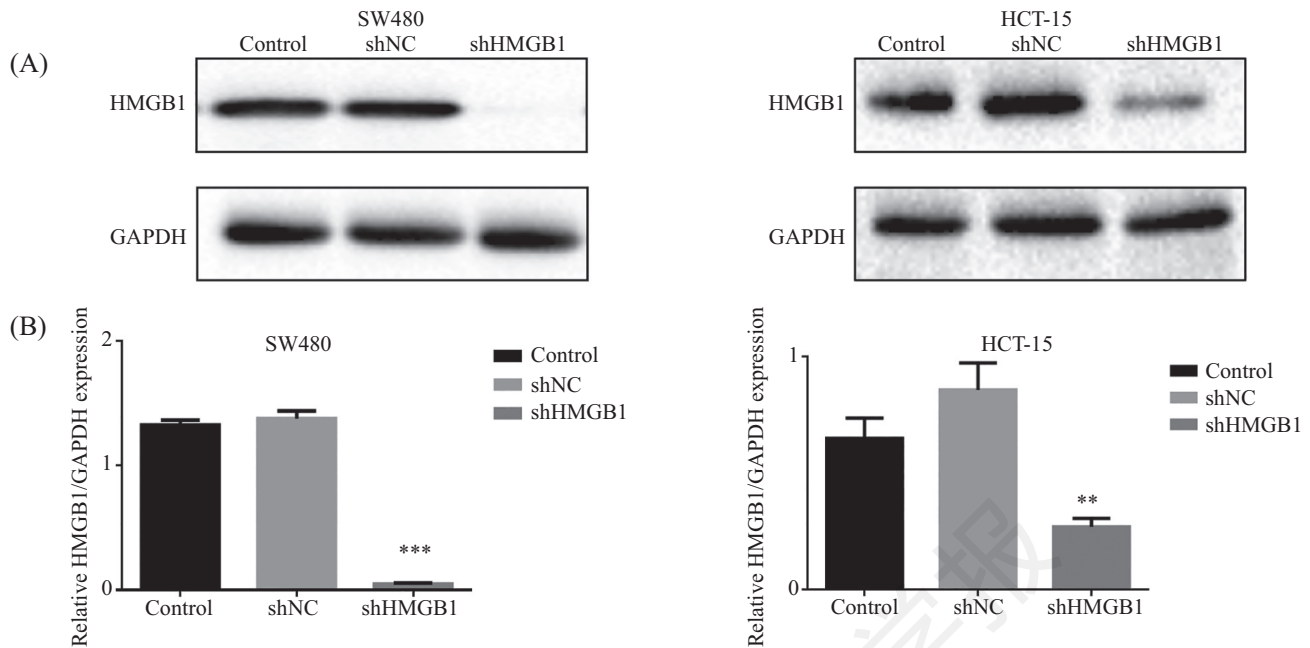
2.5 HMGB1低表达对c-Myc和GSK3B蛋白表达水平的影响

利用Western blot实验检测HMGB1低表达后c-Myc和GSK3B蛋白的表达水平, 与shNC组相比, shHMGB1组c-Myc和GSK3B的蛋白表达水平明显升高(图5A), 且差异具有统计学意义(图5B)。

3 讨论

本研究在结直肠癌细胞SW480和HCT-15中通过抑制HMGB1的蛋白表达量, 发现SW480和HCT-15细胞的迁移和侵袭能力增加, 并且上皮标志物E-Cadherin的表达水平下调, 间质标志物Snail的表达量上调, 同时c-Myc和GSK3B的表达量也上调。这说明, 结直肠癌细胞SW480和HCT-15中低表达HMGB1, 会使肿瘤细胞发生EMT, 迁移侵袭能力增强, 并且可以增加c-Myc和GSK3B的表达量。

HMGB1在许多疾病中起重要作用, 如感染、癌症、神经退行性疾病、衰老、和心脏病等^[13], 并且发现HMGB1可以作为组织损伤介导的无菌炎症和病原体介导的感染的治疗靶点^[14]。有研究表明, 细胞内HMGB1是通过维持染色体的稳定性以及限

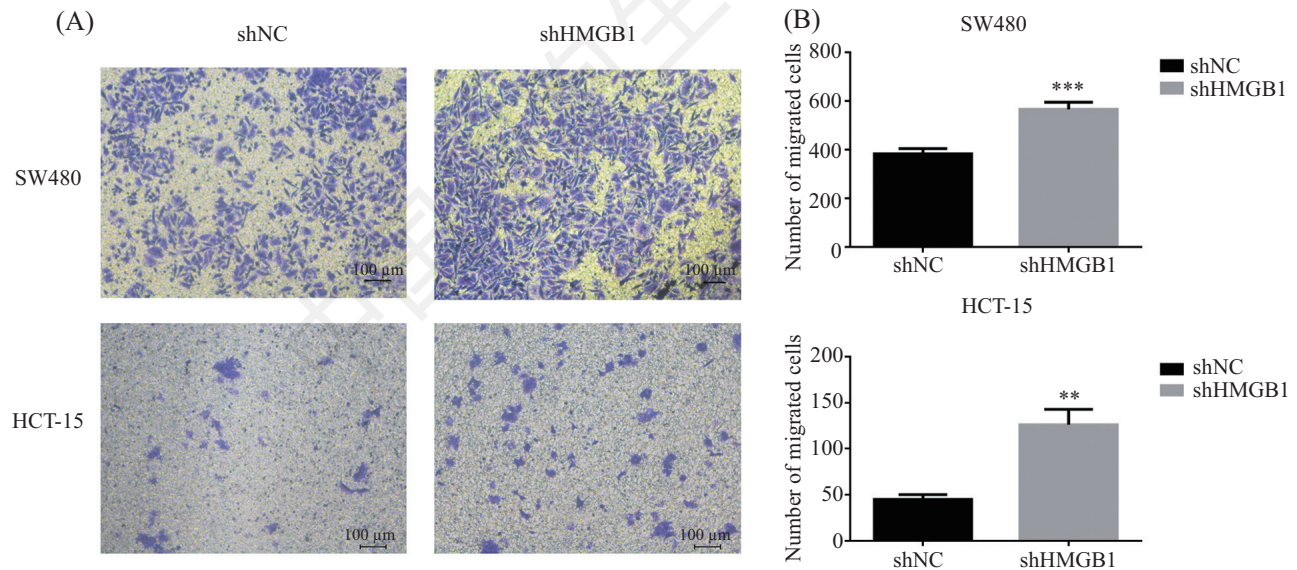


A: Western blot检测HMGB1的蛋白表达水平; B: 蛋白灰度相对分析; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与Control组和shNC相比较。

A: determination of HMGB1 protein levels detected by Western blot; B: relative protein levels of HMGB1 analysed by densitometry; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the Control and shNC groups.

图1 shHMGB1转染结直肠癌SW480细胞和HCT-15细胞后HMGB1蛋白水平

Fig.1 The level of HMGB1 protein in colorectal cancer SW480 and HCT-15 cells after transfected with shHMGB1



A: Transwell小室迁移实验; B: 统计分析各组迁移细胞数; $n=3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与shNC组比较。

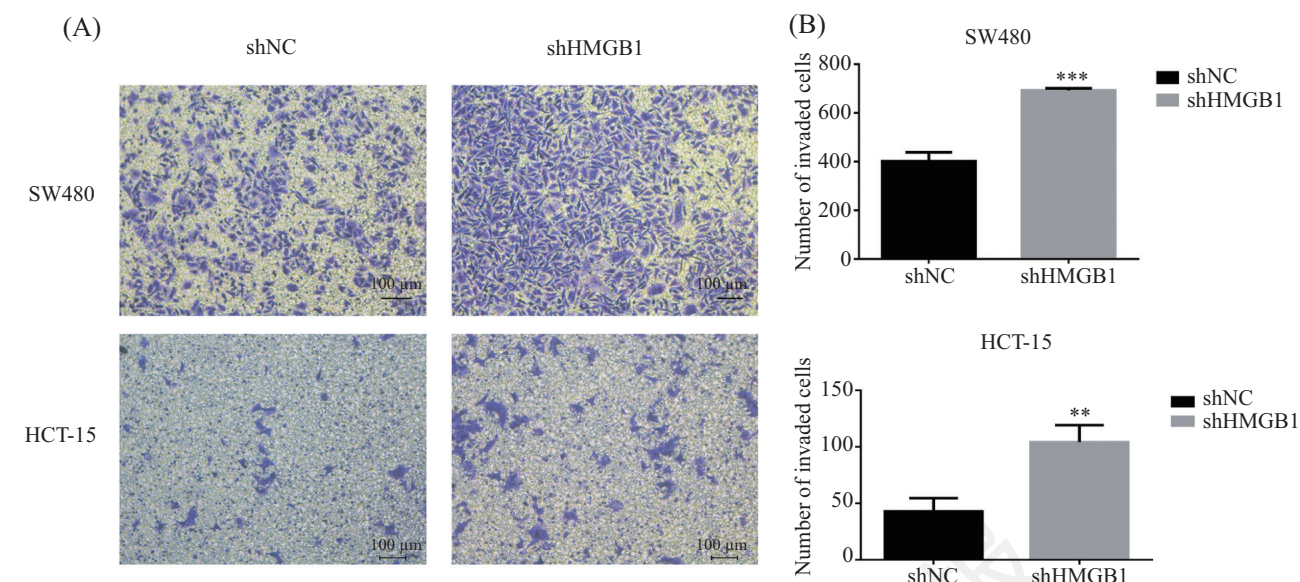
A: Transwell migrated assay; B: statistical analysis the number of cell migration; $n=3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the shNC group.

图2 shHMGB1对结直肠癌SW480和HCT-15细胞迁移能力的影响

Fig.2 The effects of shHMGB1 on migration abilities of colorectal cancer SW480 and HCT-15 cells

制促炎小体的活性和释放来发挥其抑制胰腺导管腺癌的作用^[15]。在肝细胞肝癌HepG2细胞中, 低表达HMGB1通过Stat3/NF κ B通路促进HepG2细胞的迁移和侵袭^[16]。这些研究与本文实验结果一致, 即

HMGB1在肝细胞肝癌HepG2细胞中, 通过不同的信号通路发挥其抑癌作用。在神经退行性疾病脊髓小脑性共济失调1型(SCA1)小鼠模型中, 过表达HMGB1促进线粒体DNA损伤修复, 改善SCA1小鼠

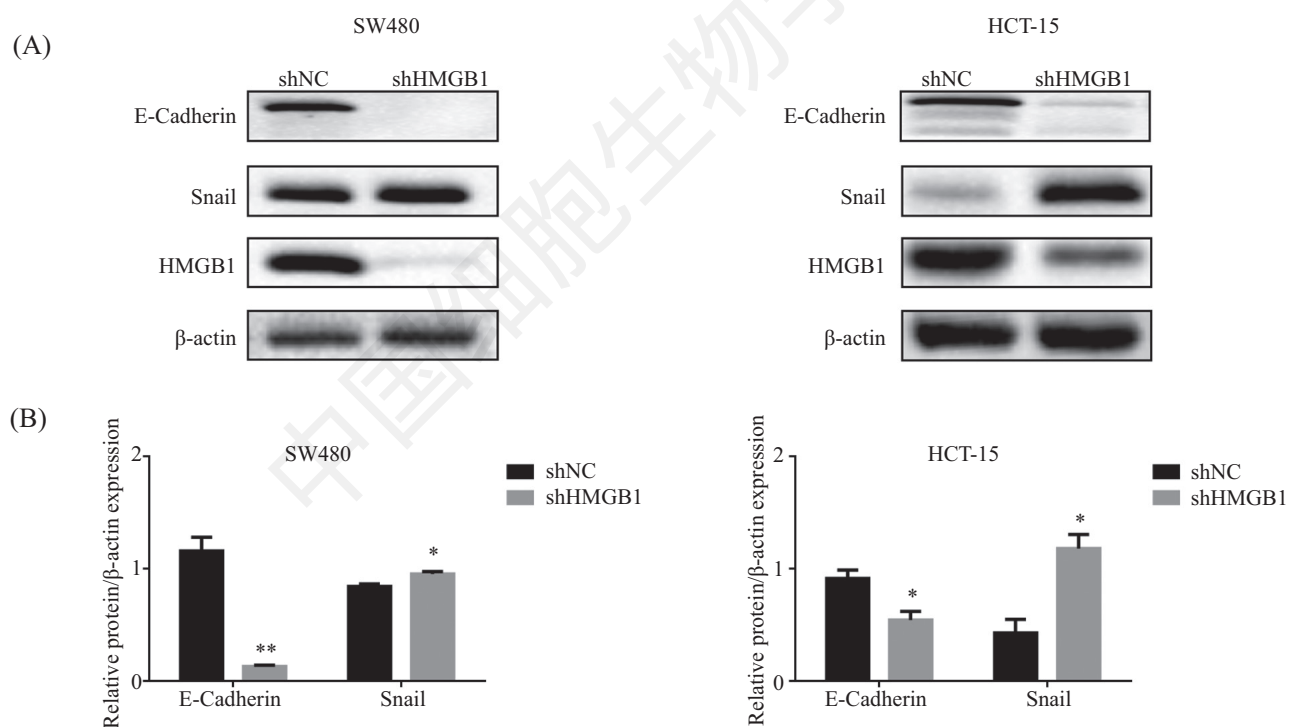


A: Transwell小室侵袭实验; B: 统计分析各组侵袭细胞数; $n=3$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与shNC组比较。

A: Transwell invaded assay; B: statistical analysis the number of cell invasion; $n=3$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ vs the shNC group.

图3 shHMGB1对结直肠癌SW480和HCT-15细胞侵袭能力的影响

Fig.3 The effects of shHMGB1 on invasion abilities of colorectal cancer SW480 and HCT-15 cells



A: Western blot检测EMT相关标志物蛋白表达水平; B: 蛋白灰度相对分析; $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与shNC相比较。

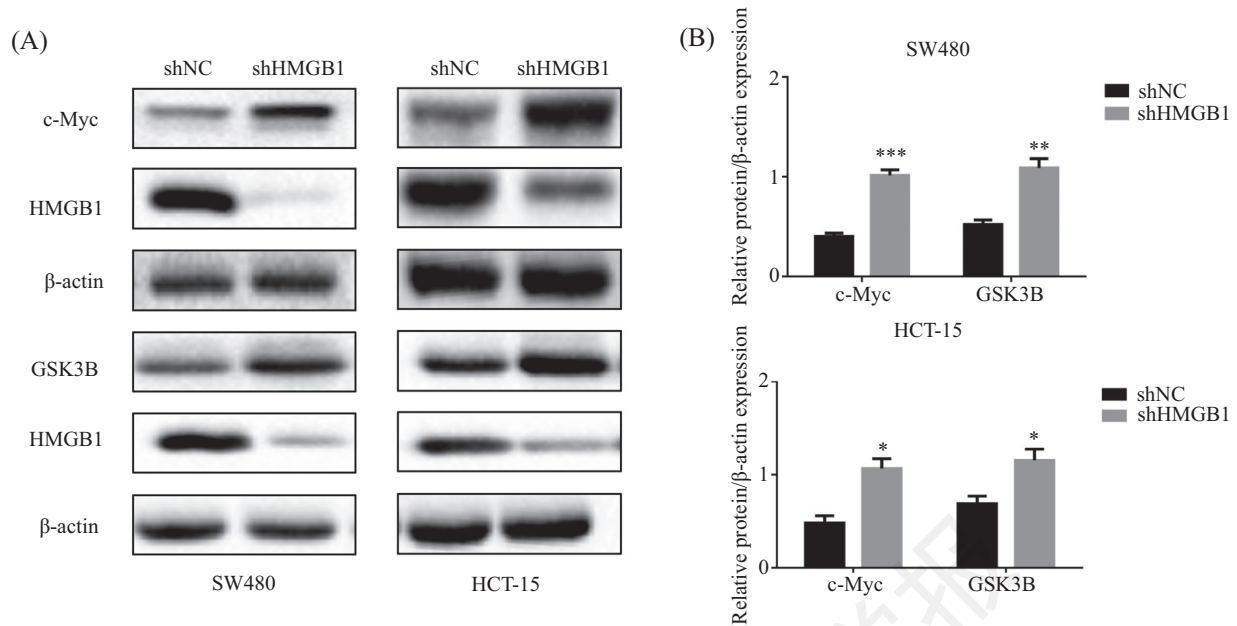
A: determination of EMT associated proteins level detected by Western blot; B: relative protein level of EMT associated proteins detected by densitometry; $*P<0.05$, $**P<0.01$ vs the shNC group.

图4 shHMGB1转染结直肠癌SW480细胞和HCT-15细胞后EMT相关标志物蛋白水平

Fig.4 The levels of EMT associated protein in colon cancer SW480 and HCT-15 cells after transfected with shHMGB1

神经病理学和运动缺陷, 继而延长小鼠的寿命^[17], 为HMGB1在疾病中发挥正面作用提供又一理论依据。有趣的是, 在前列腺癌、膀胱癌和胶质瘤中,

HMGB1通过不同的通路促进肿瘤的发生发展^[18-20]。综上所述, HMGB1在肿瘤的发生发展中发挥双重作用, 本文在结直肠癌细胞中低表达HMGB1, 促进肿



A: Western blot检测c-Myc和GSK3B的蛋白表达水平; B: 蛋白灰度相对分析; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, 与shNC相比较。

A: determination of c-Myc and GSK3B proteins levels by Western blot; B: relative proteins levels detected by densitometry; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs the shNC group.

图5 shHMGB1转染结直肠癌SW480细胞和HCT-15细胞后c-Myc和GSK3B蛋白水平

Fig.5 The levels of c-Myc and GSK3B protein in colon cancer SW480 and HCT-15 cells after transfected with shHMGB1

瘤细胞的迁移和侵袭能力,并探讨了与之相关的作用机制。

转移癌占癌症相关死亡率的90%以上,当原发肿瘤中的癌细胞脱离相邻细胞并侵入基底膜时,这些涉及多个过程的二次生长就被启动^[22]。癌细胞从附近基质中接收局部入侵的信号,触发,使细胞获得恶性肿瘤相关特征^[23]。是肿瘤迁移和侵袭的主要原因^[24-25]。GSK3B是糖原合成酶激酶-3的其中一个亚型,主要参与糖和脂肪代谢。GSK3B在多种癌症中过表达,并发挥促癌作用,促进子宫内膜癌、胃癌和结直肠癌^[26-28]的迁移侵袭。Myc是人类中最常见的癌基因,它的扩增在很多肿瘤中都可以观察到,包括乳腺癌、肺癌和前列腺癌^[29]。c-Myc靶向调节E-钙粘蛋白,促进肿瘤的迁移和侵袭^[30],且c-Myc为GSK3B的下游靶基因^[31]。在本研究中,低表达HMGB1后,GSK3B和c-Myc的表达水平均上调,因此HMGB1通过影响GSK3B/c-Myc通路,从而影响结直肠癌细胞的迁移和侵袭能力。

本文在结直肠癌细胞中低表达HMGB1后,结果表明肿瘤细胞的迁移和侵袭能力增加,进一步丰富了HMGB1抑癌作用的理论基础,为结直肠癌的治疗提供了理论依据和潜在靶点。此外,HMGB1通过GSK3B/c-Myc通路调控结直肠癌细胞的迁移、侵袭

能力的具体机制和过表达HMGB1对结直肠癌细胞的影响及其相关的机制,还需要我们进行更深入地探讨,继而为结直肠癌的分子靶向治疗提供更加科学的理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67(1): 7-30.
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 3 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6): 394-424.
- 4 Goodwin GH, Johns EW. Isolation and characterisation of two calf-thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973; 40(1): 215-9.
- 5 Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285(5425): 248-51.
- 6 Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 367-88.
- 7 Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2005; 15(5): 496-506.
- 8 Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 2008; 14(7-8): 476-84.

- 9 Murugesapillai D, McCauley MJ, Maher LJ 3rd, Williams MC. Single-molecule studies of high-mobility group B architectural DNA bending proteins. *Biophys Rev* 2017; 9(1): 17-40.
- 10 Muller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, *et al.* New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J* 2001; 20(16): 4337-40.
- 11 Tang D, Kang R, Zeh HJ 3rd, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(1-2): 132-40.
- 12 Gdynia G, Sauer SW, Kopitz J, Fuchs D, Duglova K, Ruppert T, *et al.* The HMGB1 protein induces a metabolic type of tumour cell death by blocking aerobic respiration. *Nat Commun* 2016; 7: 10764.
- 13 Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, *et al.* HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med* 2014; 40: 1-116.
- 14 Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 139-62.
- 15 Kang R, Xie Y, Zhang Q, Hou W, Jiang Q, Zhu S, *et al.* Intracellular HMGB1 as a novel tumor suppressor of pancreatic cancer. *Cell Res* 2017; 27(7): 917-32.
- 16 Alduais S, Alduais Y, Wu X, Li H, Mao J. HMGB1 knock-down promoting tumor cells viability and arrest pro-apoptotic proteins via Stat3/NFkappaB in HepG2. *Biofactors* 2018; 44(6): 570-76.
- 17 Ito H, Fujita K, Tagawa K, Chen X, Homma H, Sasabe T, *et al.* HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. *EMBO Mol Med* 2015; 7(1): 78-101.
- 18 Gnanasekar M, Thirugnanam S, Ramaswamy K. Short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting high mobility group box-1 (HMGB1) expression leads to inhibition of prostate cancer cell survival and apoptosis. *Int J Oncol* 2009; 34(2): 425-31.
- 19 Yin H, Yang X, Gu W, Liu Y, Li X, Huang X, *et al.* HMGB1-mediated autophagy attenuates gemcitabine-induced apoptosis in bladder cancer cells involving JNK and ERK activation. *Oncotarget* 2017; 8(42): 71642-56.
- 20 Zhang J, Liu C, Hou R. Knockdown of HMGB1 improves apoptosis and suppresses proliferation and invasion of glioma cells. *Chin J Cancer Res* 2014; 26 (6): 658-68.
- 21 Kang R, Zhang Q, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in cancer: good, bad, or both? *Clin Cancer Res* 2013; 19(15): 4046-57.
- 22 Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 453-8.
- 23 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(6): 442-54.
- 24 Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(6): 740-6.
- 25 Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res* 2009; 69(18): 7135-9.
- 26 Wang D, Tian Y, Feng W, Zhao L, Zhao M, Liu J, *et al.* Pseudolaric acid B induces endometrial cancer Ishikawa cell apoptosis and inhibits metastasis through AKT-GSK-3beta and ERK1/2 signaling pathways. *Anticancer Drugs* 2017; 28 (6): 603-12.
- 27 Li C, Zhang J, Wu H, Li L, Yang C, Song S, *et al.* Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 facilitates metastasis of gastric cancer through driving epithelial-mesenchymal transition and PI3K/Akt/GSK3beta activation. *Sci Rep* 2017; 7: 45275.
- 28 Chen WF, Gao WD, Li QL, Zhou PH, Xu MD, Yao LQ. SLIT2 inhibits cell migration in colorectal cancer through the AKT-GSK3beta signaling pathway. *Int J Colorectal Dis* 2013; 28(7): 933-40.
- 29 Lin CY, Loven J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, *et al.* Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 2012; 151(1): 56-67.
- 30 Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, *et al.* miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 2010; 12(3): 247-56.
- 31 Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012; 149(6): 1192-205.