

人 β 防御素-2通过TGF- β /Smad信号通路对胃癌SGC7901细胞增殖、迁移和侵袭的影响

时妍梅¹ 李娟¹ 刘燕² 陈康³ 周蕾¹ 陈新年^{1*}

(¹兰州大学, 基础医学院病理生理学研究所, 兰州 730000; ²河西学院医学院, 张掖 743000;

³兰州大学第二医院普通外科三病区, 兰州 730000)

摘要 该文探讨了人 β 防御素-2(hBD2)对胃癌SGC7901细胞的增殖、迁移和侵袭的影响。将真核表达载体pCMV-hBD2转染于人胃癌SGC7901细胞。采用qPCR和免疫印迹法(Western blot)检测转染效率。Western blot检测TGF- β 1、p-Smad2/3、Smad2/3、MMP9的蛋白表达水平。Transwell法检测SGC7901细胞迁移和侵袭能力。EdU法和流式细胞术分别检测增殖能力与细胞周期。结果显示, 转染真核表达载体pCMV-hBD2的SGC7901细胞, hBD2的表达水平明显高于SGC7901和转染pCMV-Blank的SGC7901细胞。SGC7901-hBD2细胞中TGF- β 1、p-Smad2/3和MMP9的蛋白表达水平均低于SGC7901和SGC7901-Blank细胞, 而Smad2/3表达水平不变。同时, 其迁移侵袭和增殖能力均受到抑制, 细胞周期G₀/G₁期阻滞。该实验结果表明, hBD2可能通过下调TGF- β /Smad信号通路调控SGC7901细胞的迁移侵袭以及增殖能力。

关键词 人 β 防御素-2; 迁移; 侵袭; 增殖; 胃癌SGC7901细胞; TGF- β /Smad信号通路

The Effect of Human β Defensin-2 on Proliferation, Migration, Invasion of Gastric Cancer SGC7901 Cells via TGF- β /Smad Signaling Pathway

Shi Yanmei¹, Li Juan¹, Liu Yan², Chen Kang³, Zhou Lei¹, Chen Xinnian^{1*}

(¹Department of Pathophysiology, College of Basic Medicine, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; ²Hexi University School of Medicine Zhangye 743000, China; ³Department 3 of General Surgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730000, China)

Abstract To study the effect of human β defensin-2 (hBD2) on the proliferation, migration, invasion of gastric cancer SGC7901 cells, eukaryotic expression vector pCMV-hBD2 are transfected onto human gastric cancer SGC7901 cells. The expression of hBD2, TGF- β 1, p-Smad2/3, Smad2/3 and MMP9 were detected by Western blot. Transwell assay was evaluated migration and invasion of SGC7901 cells. EdU method and flow cytometry respectively were detected cell proliferation and cell cycle. The results showed that overexpression of hBD2, the expression levels of hBD2 in SGC7901 cells transfected eukaryotic expression vector pCMV-hBD2 were higher than that in SGC7901 and SGC7901-Blank cells transfected pCMV-Blank. The expression levels of TGF- β 1, p-Smad2/3 and MMP9 in SGC7901-hBD2 cells all decreased, while the expression levels of Smad2/3 remained unchanged. At the same time, its migration, invasion and proliferation were inhibited and cell cycle G₀/G₁ phase was blocked. It is pos-

收稿日期: 2019-01-28 接受日期: 2019-04-04

甘肃省自然科学基金(批准号: 1506RJZA205)和中央高校基本科研专项资金(批准号: lzujbky-2018-86)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13893415642, E-mail: chenxn@lzu.edu.cn

Received: January 28, 2019 Accepted: April 4, 2019

This study was supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (Grant No.1506RJZA205) and the Foundation Research Funds for the Central Universities (Grant No.lzujbky-2018-86)

*Corresponding author. Tel: +86-13893415642, E-mail: chenxn@lzu.edu.cn

网络出版时间: 2019-08-12 15:08:00

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1507.026.html>

sibly that hBD2 regulates the migration, invasion and proliferation cycle of SGC7901 cells through downregulating the TGF- β /Smad signaling pathway.

Keywords human β defensin-2; proliferation; migration; invasion; gastric cancer SGC7901 cells; TGF- β /Smad signaling pathway

胃癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤, 预后相对较差, 外科手术、放化疗对患者带来一定的不良反应及并发症^[1-2], 随着分子生物学技术的发展和肿瘤发生分子机制研究的深入, 分子靶向治疗已成为胃癌治疗的新途径^[3]。人 β 防御素-2(human β -defensin-2, hBD2)作为一种可诱导表达的内源性抗微生物肽, 普遍存在于人体上皮组织^[4], 具有广谱抗菌活性、趋化作用和调节获得性免疫应答的功能^[5-9], 还可与免疫细胞相互作用, 抑制HIV的复制^[10]。此外, 在骨髓间充质干细胞中过表达hBD2, 有利于放射性损伤大鼠创面愈合^[11]。hBD2通过增加微生物群的多样性, 对实验阶段结肠炎的治疗发挥作用^[12]。在特异性皮炎中, hBD2可促进抑瘤素M的产生^[13]。hBD2可刺激人脐静脉内皮细胞发生迁移、增殖及血管形成^[14]。研究发现, hBD2在癌症方面也发挥了一定作用^[15], 在不同肿瘤中产生不同的效果。过表达的hBD2促进食管癌生长与侵袭作用^[16]。感染高危HPV病毒后, hBD2可影响肛门生殖器区域发生癌变^[17]。相反, 重组hBD2可抑制人皮肤鳞癌细胞、黑色素瘤细胞和甲状腺癌细胞的增殖^[18-20]。同时, hBD2可通过趋化作用和免疫佐剂活性增强适应性免疫应答来发挥间接抗肿瘤作用^[21-23]。目前hBD2在肿瘤方面有较多研究, 但其对胃癌细胞作用的相关文献报道很少。本研究拟构建稳定过表达hBD2的胃癌细胞株SGC7901-hBD2, 观察hBD2对胃癌细胞SGC7901的增殖、迁移和侵袭能力的影响, 并探讨hBD2与TGF- β /Smad信号通路的相互关系。

1 实验材料与方法

1.1 质粒、细胞株

实验材料包括: pCMV-Blank(上海碧云天生物技术有限公司)、pCMV-hBD2(本研究所构建并保存)、人胃腺癌细胞SGC7901(由兰州大学第二医院胃肠病学研究所馈赠)。

1.2 试剂及仪器

RPMI-1640培养基购自Hyclone公司; 胎牛血清购自BI公司; 0.25%胰酶、Opti-MEM均购自Gibco

公司; Lipofectamine[®] 2000转染试剂与Trizol试剂购自Invitrogen公司; 反转录试剂盒、TB Green及抗体稀释液均购自TaKaRa公司; EdU试剂盒购自广州瑞博公司; Transwell小室购自Corning公司, Matrigel胶购自BD公司; 人源hBD2抗体购自Abcam公司, GAPDH、TGF- β 1、p-Smad2/3、Smad2/3抗体均购自Immunoway公司, 二抗购于Proteintech公司; 6孔和24孔细胞培养板购自美国NEST公司; CO₂细胞培养箱购自上海一恒科技有限公司; 倒置显微镜购自Olympas公司; 荧光显微镜购自德国卡尔蔡司公司。

1.3 细胞培养

人胃腺癌细胞系SGC7901培养于含10%胎牛血清的RPIM-1640中, 培养箱条件: 37 °C、5% CO₂。待传至第4代, 细胞状态良好时, 取对数期细胞用于实验。

1.4 细胞转染与稳定过表达hBD2的细胞株筛选

取SGC7901细胞制备成单细胞悬液接种到6孔板中, 每孔 3×10^5 个细胞, 培养24 h后, 将Lipofectamine[®] 2000转染试剂和真核表达载体pCMV-Blank、pCMV-hBD2按2.5 μ L:1 μ g比例分别转染于6孔板SGC7901细胞中, 转染48h之后, 将含有浓度为600 μ g/mL、800 μ g/mL、1 000 μ g/mL的G418的培养基(不含青-链霉素)加入到相应6孔板中进行筛选, 每48 h筛选一次, 14天左右, 显微镜下观察并挑出单细胞克隆团后进行扩增。提取总RNA和总蛋白进行检测, 稳定过表达hBD2的细胞株用于后续试验。

1.5 实时荧光定量PCR(Real quantitative PCR detecting system, qPCR)

用Trizol试剂分别提取SGC7901、SGC7901-Blank、SGC7901-hBD2细胞总RNA。反转录为cDNA, 上机测定。qPCR反应体系: 10 μ L TB Green、0.8 μ L上游引物、0.8 μ L下游引物、7.4 μ L DEPC水和1 μ L cDNA。循环条件为: 95 °C 2 min循环1次, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 循环40次。进行3次独立重复实验, 用比较CQ法测定相对mRNA水平的平均值 $2^{-\Delta\Delta CQ}$ 。本研究使用的引物为: 内参 β -actin上游引物, 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3', 下游引物, 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3'; hBD2上游引物, 5'-

TGA AGC TCC CAG CCA TCA GCC AT-3', 下游引物, 5'-TGG ACA CCA TAG TTT AAT TTG G-3'。

1.6 EdU检测细胞增殖

分别取SGC7901、SGC7901-Blank和SGC7901-hBD2细胞, 胰酶消化后, 以 5×10^4 个细胞/孔接种于24孔板内。当细胞汇合度到80%时, 按照EdU说明书, 将稀释的EdU溶液加入24孔板, 培养箱孵育2 h后, 4%多聚甲醛室温固定30 min, 再用Apollo染色, Hoechst33342溶液染细胞核, 避光保存。于荧光显微镜下观察, 每个孔内随机选取5个视野进行拍照并计数。用ZEN(blue edition) 2.3 ReadMe软件处理图片, 计算增殖细胞比例。绿色荧光细胞数与总细胞数的比值代表细胞增殖能力。

1.7 流式细胞技术检测细胞周期

分别将SGC7901、SGC7901-Blank、SGC7901-hBD2细胞, 制备成单细胞悬液。收集 1×10^6 个细胞, 弃上清液, 加入1 mL预冷的70%乙醇溶液, 混匀, 置于4 °C冰箱固定。固定好的细胞1 000 r/min离心5 min, 弃上清。PBS清洗1次, 100 μL PBS重悬细胞后加入500 μL碘化丙啶溶液, 轻柔混匀后避光孵育30 min。上机检测, 结果用FlowJo软件进行分析。

1.8 Transwell小室迁移实验

细胞进行饥饿处理24 h后, 胰酶消化后用0.1% BSA制备成单细胞悬液, 细胞浓度为 5×10^5 /mL。24孔板内加入600 μL含10% FBS的RPMI-1640后, 将Transwell小室放入24孔板内, 上室加入200 μL细胞悬液(约 1×10^5 个细胞), 培养18 h。甲醇室温固定30 min, PBS清洗3次, 结晶紫室温下染色20 min, 用PBS清洗3遍。擦去上室内膜表面未能穿过的细胞, 晾干后于显微镜下随机挑选5个视野拍照并计数。

1.9 Transwell侵袭实验

将Matrigel基质胶置于冰上与预冷的RPMI-1640培养基按1:8的比例稀释, 向Transwell上室内均匀加入100 μL基质胶, 37 °C中放置1 h, 观察胶变成固态后, 接种 5×10^5 /mL细胞, 培养24 h, 其余步骤与1.8中迁移实验一致。穿过Transwell基质胶与膜进入下室的细胞数可反应侵袭力。

1.10 蛋白免疫印迹实验

分别提取3组细胞总蛋白, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE电泳), 转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 一抗4 °C孵育过夜。TBST洗膜3次后, 二抗室温孵育1 h, TBST洗膜3次, 暗室曝光。所有使

用的一抗如下所示: hBD2(1:800), TGF-β1(1:500, p-Smad2/3(1:500), Smad2/3(1:1 000)和GAPDH(1:3 000)。二抗比例是1:5 000。

1.11 统计学分析

用Graphpad软件对实验数据进行统计分析, 采用均数±标准差(mean±S.E.M.)表示, 两组间采用独立样本t检验, 多组间统计用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。当 $P < 0.05$ 时, 代表差异性具有统计学意义。

2 结果

2.1 构建hBD2稳定过表达胃癌细胞SGC7901-hBD2

qPCR与Western blot结果显示, 转染组SGC7901-hBD2细胞中hBD2的表达水平比未转染组SGC7901细胞和转染组SGC7901-Blank细胞中hBD2的表达水平高, 差异具有统计学意义($**P < 0.01$), 未转染组SGC7901细胞和转染组SGC7901-Blank细胞中hBD2的表达水平无差异(图1)。该实验结果表明, 过表达hBD2稳定胃癌细胞株SGC7901-hBD2构建成功, 可以用于后续肿瘤细胞的增殖周期、迁移侵袭、Western blot等实验。

2.2 hBD2对胃癌细胞SGC7901增殖的影响

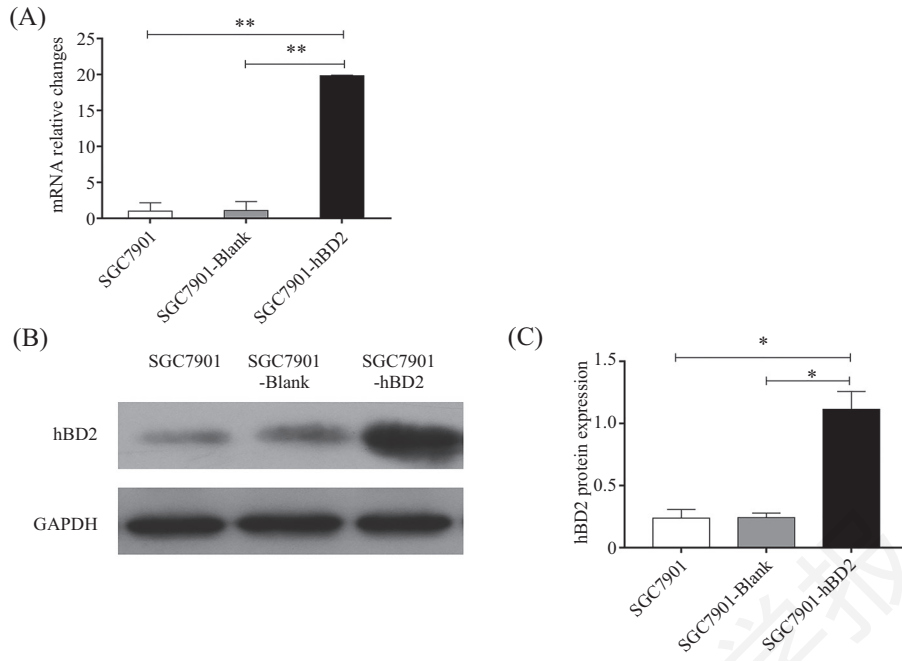
EdU法检测过表达hBD2对SGC7901细胞增殖能力的影响, 结果显示, SGC7901-hBD2细胞中EdU阳性率明显低于SGC7901和SGC7901-Blank细胞($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 图2)。此结果表明, hBD2对SGC7901细胞的增殖能力有显著的抑制作用。

2.3 hBD2对SGC7901细胞周期的影响

流式细胞术检测SGC7901、SGC7901-Blank和SGC7901-hBD2细胞的细胞周期分布情况, 结果显示, 与SGC7901、SGC7901-Blank细胞相比, SGC7901-hBD2细胞的G₀/G₁期细胞比例明显升高, S期细胞比例减少, G₂/M期细胞比例减少, G₀/G₁期细胞比例差异具有统计学意义($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 图3)。以上结果表明, hBD2可使SGC7901细胞停滞在G₀/G₁期。

2.4 hBD2对SGC7901细胞的迁移和侵袭的影响

Transwell检测SGC7901、SGC7901-Blank和SGC7901-hBD2细胞的迁移和侵袭能力, 结果显示, 与SGC7901、SGC7901-Blank细胞相比, SGC7901-hBD2细胞迁移和侵袭至下室的细胞数明显减少($*P < 0.05$, 图4)。Transwell检测结果说明, hBD2可显

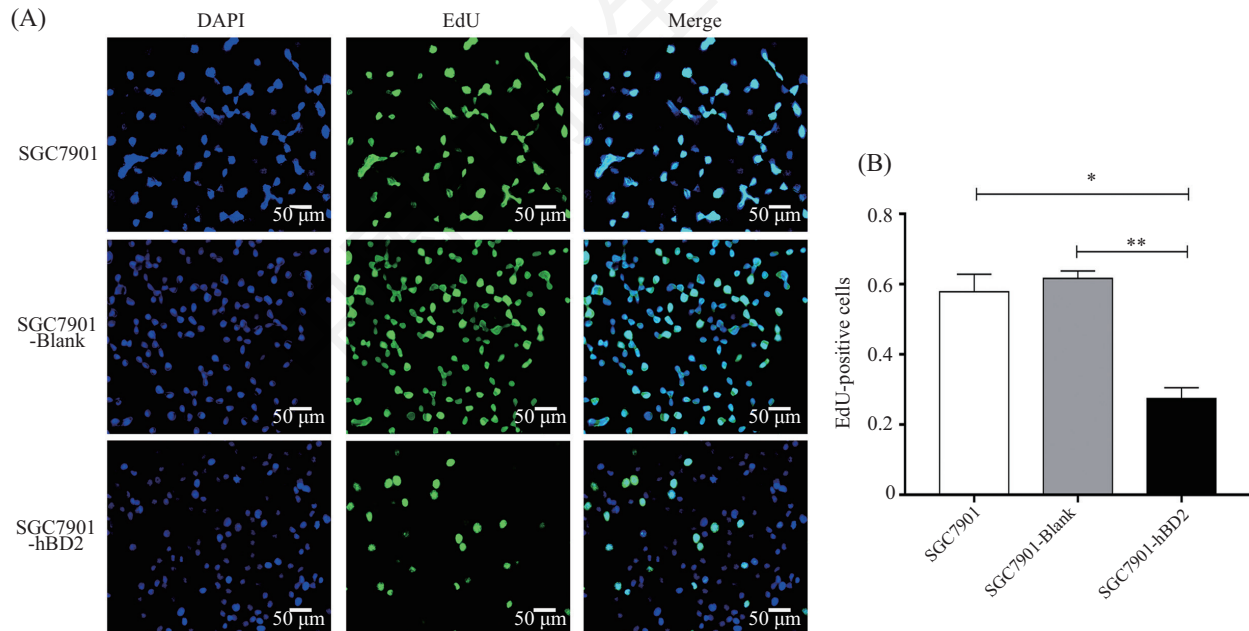


A: qPCR检测细胞中*hBD2*的mRNA表达水平; B: Western blot检测细胞中*hBD2*的蛋白表达水平; C: 细胞中*hBD2*蛋白表达分析, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $n=3$ 。

A: expression levels of *hBD2* mRNA in cells by qPCR; B: expression levels of *hBD2* protein in cells by Western blot; C: statistic analysis of *hBD2* protein levels in cells, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $n=3$ 。

图1 稳定表达*hBD2*细胞株SGC7901-*hBD2*细胞的构建

Fig.1 Establishment of a stable *hBD2*-expressing gastric cell line



A: EdU法检测细胞的增殖能力; B: 增殖统计分析, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $n=6$ 。

A: detected of cell proliferation by EdU assay; B: statistic analysis of proliferation. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $n=6$ 。

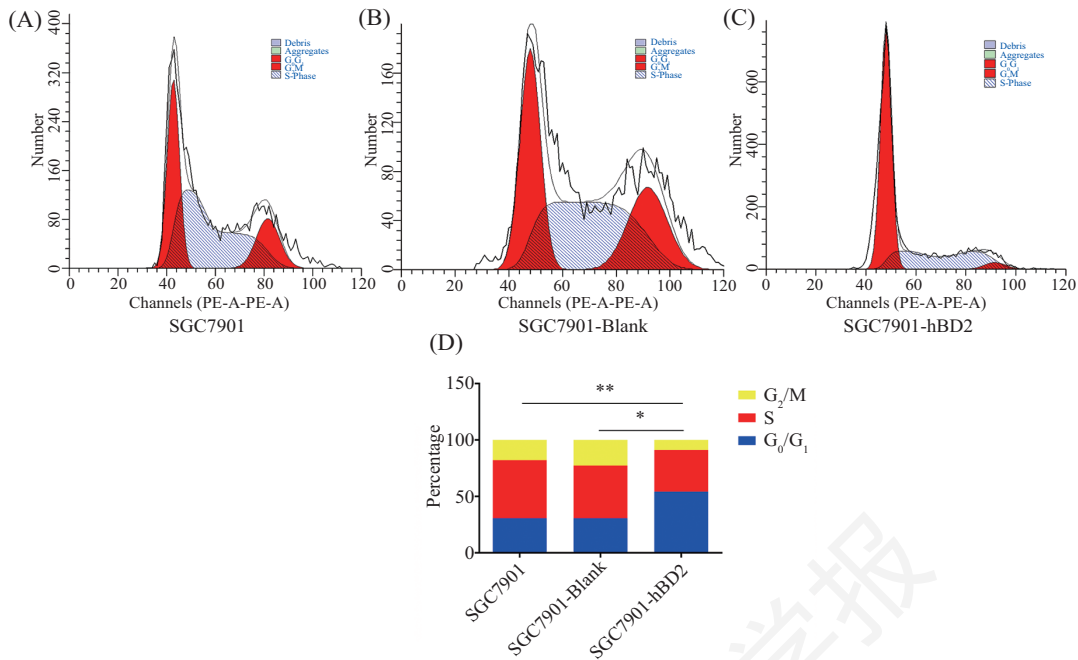
图2 *hBD2*对SGC7901细胞增殖的影响

Fig.2 The effect of *hBD2* on proliferation in SGC7901 gastric cancer cells

著抑制SGC7901细胞的迁移和侵袭。Western blot检测显示, *hBD2*通过下调MMP9的表达水平抑制胃癌细胞SGC7901的迁移和侵袭。

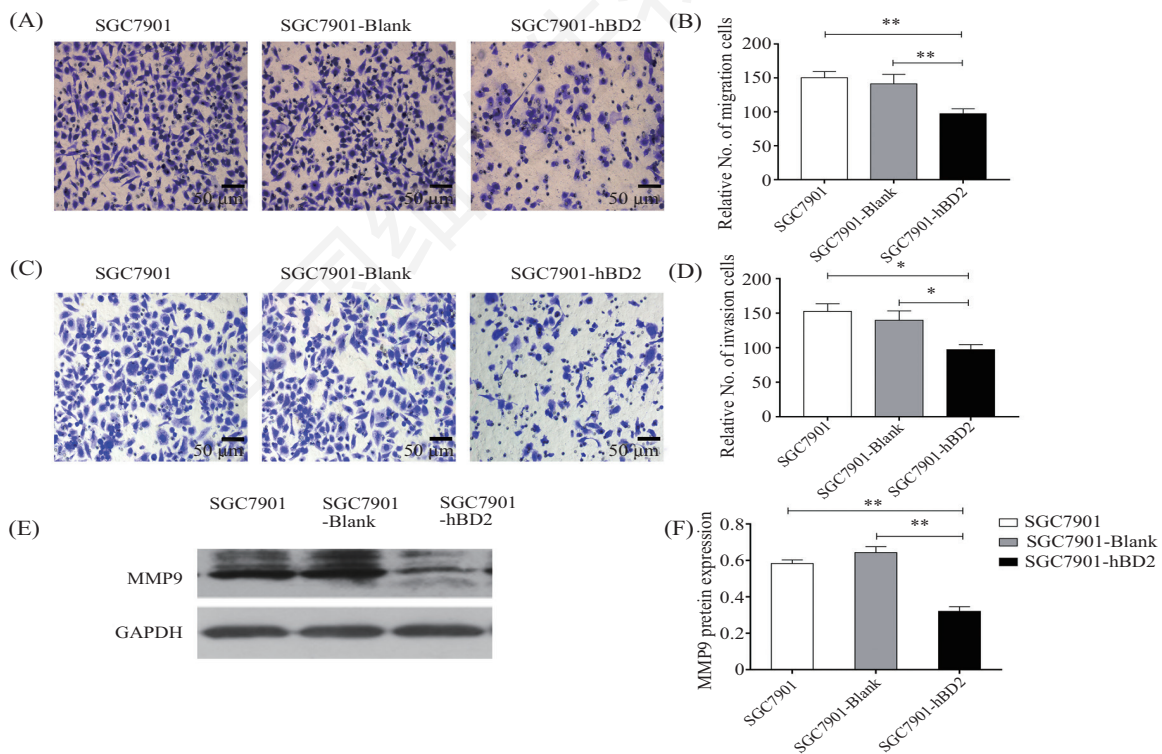
2.5 *hBD2*对胃癌细胞SGC7901TGF- β /Smad信号通路蛋白的影响

Western blot检测SGC7901-*hBD2*细胞中TGF- β 1、



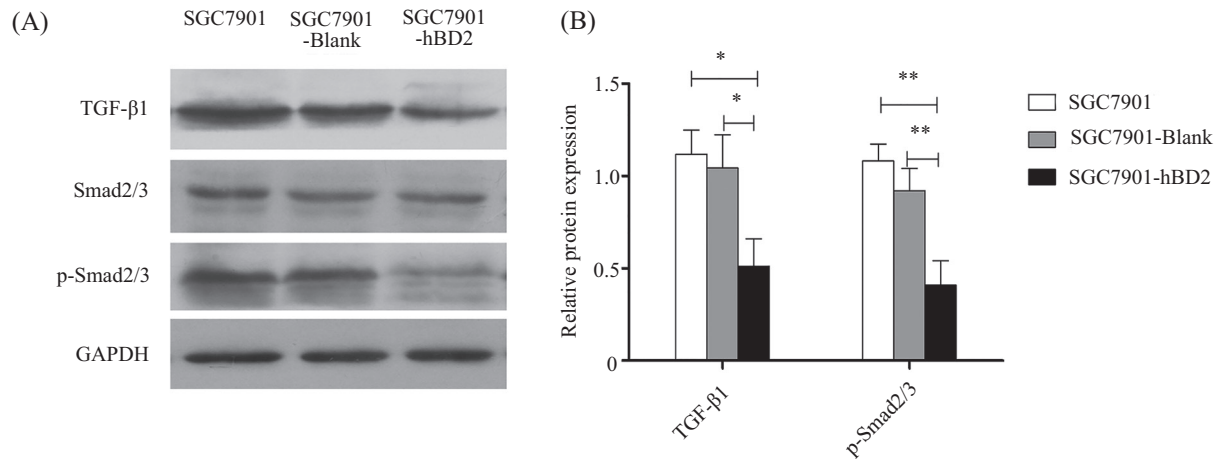
A~C: 流式细胞术检测细胞的细胞周期分布; D: 细胞周期统计分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。
 A~C: detect of cell cycle distribution by flow cytometry; D: statistic analysis of cell cycle distribution, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$ 。

图3 hBD2对SGC7901细胞G₀/G₁期影响
 Fig.3 The effect of hBD2 on G₀/G₁ phase arrest in SGC7901 gastric cancer cells



A: Transwell检测细胞的迁移能力; B: 细胞迁移能力的分析; C: Transwell检测三组细胞的侵袭能力; D: 细胞侵袭能力的分析; E: Western blot检测MMP9蛋白的表达情况; F: MMP9蛋白表达水平分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。
 A: detect of the cells the migration ability by transwell; B: detect of the cells the invasion ability by transwell; C: statistic analysis of the migration ability; D: statistic analysis of the invasion ability; E: expression levels of MMP9 protein by Western blot; F: statistic analysis of MMP9 protein levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

图4 hBD2对SGC7901细胞的迁移和侵袭影响及MMP9的表达
 Fig.4 Detect the effect of hBD2 on migration and invasion in SGC7901 gastric cancer cell and MMP9 protein expression



A: Western blot检测TGF-β/Smad信号通路相关蛋白的表达; B: 相关蛋白表达水平的分析, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

A: expression levels of TGF-β/Smad signaling associated proteins by Western blot; B: statistic analysis of protein levels, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 6$ 。

图5 TGF-β/Smad信号通路相关蛋白的表达

Fig.5 Expression levels of TGF-β/Smad signaling associated proteins

p-Smad2/3、Smad2/3的表达水平。与SGC7901、SGC7901-Blank细胞相比,SGC7901-hBD2细胞中TGF-β1、p-Smad2/3的表达水平明显下调,Smad2/3表达不变(图5)。以上结果说明,hBD2可能通过TGF-β/Smad信号通路抑制SGC7901细胞迁移、侵袭和增殖的发生。

3 讨论

研究表明,人β防御素-2(hBD2)作为一种先天免疫因子,亦对肿瘤的发生、发展具有重要作用^[24-25]。胃癌作为常见的一种消化系统恶性肿瘤,其发病率和死亡率较高。研究报道,hBD2在黑色素瘤细胞中,通过激活qRB、上调p21^{WAF1}的表达水平、下调B-Raf、CyclinD1和CyclinE的表达水平,使黑色素瘤细胞发生G₁/S期细胞周期阻滞^[19]。在人皮肤鳞癌细胞A431和甲状腺癌细胞中,通过下调CyclinD1的表达水平、激活qRB使细胞停滞于G₁/S期来抑制细胞的增殖和活性^[18,20]。

本研究实验数据显示,hBD2可显著抑制细胞的增殖能力,诱导SGC7901细胞发生G₀/G₁期阻滞。表明hBD2可通过使SGC7901细胞停滞在G₀/G₁期,而抑制胃癌细胞的增殖。有研究报道,恶性肿瘤的侵袭性和增殖力与MMP9有关^[26]。本研究中Transwell实验结果显示,过表达hBD2的胃癌细胞迁移和侵袭能力明显降低,同时,Western blot检测到SGC7901-hBD2细胞中MMP9蛋白的表达量明显降低。TGF-β/Smad信号通路参与细胞生长、能量代谢等多种细

胞功能的调节在恶性肿瘤演进过程中发挥重要调控作用,能够抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞发生凋亡、加速细胞周期进程和促进肿瘤细胞迁移^[27-29]。TGF-β/Smad信号通路相关蛋白在胃腺癌中的表达量增高^[30]。此外,阻断TGF-β1信号有助于抑制癌症进展^[31-32]。Western blot检测观察到SGC7901-hBD2细胞中TGF-β/Smad信号通路蛋白的表达量明显降低,这与上述的研究结论相吻合,提示hBD2可能是通过下调TGF-β/Smad信号通路相关蛋白的表达水平,抑制SGC7901细胞的迁移和侵袭,进而抑制胃癌的演进过程。

综上所述,hBD2在胃癌的发生和进展过程中发挥一定抑制作用,hBD2通过负向调控TGF-β/Smad信号通路的活性抑制胃癌细胞SGC7901的增殖能力并且抑制胃癌细胞SGC7901的迁移和侵袭能力。本研究结果可为胃癌的基础研究和临床应用研究奠定理论基础和实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65(2): 87-108.
- 2 Coburn N, Cosby R, Klein L, Knight G, Malthaner R, Mamazza J, et al. Staging and surgical approaches in gastric cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2018; 63: 104-15.
- 3 Kanat O, O'Neil BH. Metastatic gastric cancer treatment: a little low but worthy progress. *Med Oncol* 2013; 30(1): 1-10.
- 4 杨剑, 陈新年, 李娟, 陈逸轩, 陈文莉. 人β防御素-2稳定表达细胞株的建立及其表达产物对耐药大肠埃希菌抗菌活性研究. *免疫学杂志* (Yang Jian, Chen Xinnian, Li Juan, Chen Yixuan, Chen Wenli. Antimicrobial activities against *E. coli* by the stable

- cell line transfected with recombinant hBD-2 gene eukaryotic expression plasmid. Immunological Journal) 2014; 30(8): 704-11.
- 5 Bals R. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Re Respir Res* 2000; 1(8): 141-50.
- 6 Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 181-215.
- 7 Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 2005; 6(6): 551-7.
- 8 Zhao C, Wang I, Lehrer RI. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett* 1995; 396(2/3): 319-22.
- 9 Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(9): 710-20.
- 10 Machado LR, Ottolini B. An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. *Front Immuno* 2015; 6: 115.
- 11 Hao L, Wang J, Zou Z, Yan G, Dong S, Deng J, *et al.* Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury. *Gene Ther* 2009; 69(1): 34-42.
- 12 Koeninger L, Armbruster NS, Hu Z, Jensen B, Stange E, Nordkild P, *et al.* 129-oral delivery of human beta-defensin 2 is reversibly increasing microbiome diversity and is effective in the treatment of experimental colitis. *Gastroenterology* 2018; 154(6): S34-5.
- 13 Wang F, Qiao L, Lü X, Trivett A, Zhang N, Yang R, *et al.* Alarmin human α defensin HNP1 activates plasmacytoid dendritic cells by triggering NF- κ B and IRF1 signaling pathways. *Cytokine* 2016; 83: 53-60.
- 14 Baroni A, Donnarumma G, Paoletti I, Longanesi-Cattani I, Carriero MV. Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *Peptides* 2008; 30(2): 267-72.
- 15 Lapis K. Host defense peptides and peptidomimetics as new weapons for cancer treatment. *Magyar Onkologia* 2010; 54(1): 47-58.
- 16 Shi N, Jin F, Zhang X, Clinton SK, Pan Z, Chen T, *et al.* Overexpression of human β -defensin 2 promotes growth and invasion during esophageal carcinogenesis. *Oncotarget* 2014; 5(22): 11333-44.
- 17 Szukiewicz D, Alkhalayla H, Pyzlak M, Watroba M, Szewczyk G, Wejman J, *et al.* Human beta-defensin 1, 2 and 3 production by amniotic epithelial cells with respect to human papillomavirus (HPV) infection, HPV oncogenic potential and the mode of delivery. *Microb Pathog* 2016; 97: 154-65.
- 18 Zhuravel E, Shestakova T, Efanova O, Yusefovich Y, Lytvin D, Soldatkina M, *et al.* Human beta-defensin-2 controls cell cycle in malignant epithelial cells: *in vitro* study. *Exp Oncol* 2011; 33(3): 114-21.
- 19 Gerashchenko O, Zhuravel E, Skachkova O, Khranovska N, Pushkarev V, Pogrebnoy P, *et al.* Involvement of human beta-defensin-2 in regulation of malignant potential of cultured human melanoma cells. *Exp Oncol* 2014; 36(1): 17-23.
- 20 Zhuravel OV, Gerashchenko OL, Khetsuriani MR, Soldatkina MA, Pogrebnoy PV. Expression of human beta-defensins-1-4 in thyroid cancer cells and new insight on biologic activity of hBD-2 *in vitro*. *Exp Oncol* 2014; 36(3): 174-8.
- 21 Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, *et al.* Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; 298(5595): 1025-9.
- 22 Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, *et al.* Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 2001; 167(11): 6644-53.
- 23 Lapteva N, Aldrich M, Rollins L, Ren W, Goltsova T, Chen SY, *et al.* Attraction and activation of dendritic cells at the site of tumor elicits potent antitumor immunity. *Mol Ther* 2009; 17(9): 1626-36.
- 24 Biragyn A, Ruffini PA, Leifer CA, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, *et al.* Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; 298(5595): 1025-9.
- 25 Biragyn A, Surenhu M, Yang D, Ruffini PA, Haines BA, Klyushnenkova E, *et al.* Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens. *J Immunol* 2001; 167(11): 6644-53.
- 26 Chen XF, Qiu JR, Yang DP, Lu JL, Yan CY, Zha XM, *et al.* MDM2 promotes invasion and metastasis in invasive ductal breast carcinoma by inducing matrix metalloproteinase-9. *PLoS One* 2013; 8(11): e78794.
- 27 V Syed. TGF- β signaling in cancer. *J Cell Biochem* 2016; 117(6): 1279-87.
- 28 Jakowlew SB. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25(3): 435-57.
- 29 Panagiotis P. TGF- β signaling in tumor initiation, epithelial-to-mesenchymal transition, and metastasis. *J Oncol* 2015; 2015: 587193.
- 30 马景超, 耿敬姝. TGF β RI和Smad系列蛋白在胃腺癌中的表达. *肿瘤学杂志* (Ma Jingchao, Geng Jingshu. Expression of TGF β RI and Smads proteins in gastric adenocarcinoma. *Journal of Chinese Oncology*) 2012; 18(5): 325-9.
- 31 Sun JW, He HF, Smitha P, Xiong Y, Challa S, Xu LY, *et al.* GATA3 transcription factor abrogates smad4 transcription factor-mediated fascin overexpression, invadopodium formation, and breast cancer cell invasion. *J Biol Chem* 2013; 288(52): 36971-82.
- 32 Li TT, Huang HP, Shi GY, Zhao LY, Li TJ, Zhang Z, *et al.* TGF- β 1-SOX9 axis-inducible COL10A1 promotes invasion and metastasis in gastric cancer via epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 2018; 9(9): 849.