

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.14.007

雌激素对 A549 细胞系 EMT 过程的影响 *

范晓东¹ 靳晓柳² 卢 强³ 张继朋³ 王武平³ 李 哲^{1Δ}

(1 西安市第九医院胸外科 陕西 西安 710054; 2 徐州矿务集团第二医院 江苏 徐州 221000;

3 空军军医大学唐都医院胸外科 陕西 西安 710049)

摘要 目的: 探讨雌激素对 A549 细胞系 EMT 标志物表达量的影响。**方法:** 用不同浓度的雌激素刺激 A549 细胞系, 并用 q-RT-PCR 和 Western-blot 实验检测各组细胞中 EMT 标志物表达量的变化, 用 Transwell 实验检测不同浓度雌激素对细胞迁移能力的影响, 计算各组间有无统计学差异。**结果:** 当雌激素浓度为 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L 时, Vimentin 的 mRNA 表达量分别为: 2.14 ± 0.55 、 4.72 ± 0.63 、 2.21 ± 0.47 , 显著高于空白对照组, 组间有统计学差异, E-cadherin 的 mRNA 表达量分别为: 0.64 ± 0.15 、 0.46 ± 0.11 、 0.59 ± 0.13 , 显著低于空白对照组, 组间有统计学差异, 蛋白表达量也有同样趋势; 细胞迁移数分别为 58.63 ± 7.33 、 80.12 ± 9.32 、 61.89 ± 8.22 , 组间有统计学差异。当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, Vimentin 的表达量最高, E-cadherin 的表达量最低, 细胞迁移数最高。**结论:** 适宜浓度雌激素可以促进 Vimentin 的表达, 抑制 E-cadherin 的表达, 提高细胞迁移能力, 当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, 促进 Vimentin 表达、抑制 E-cadherin 表达和促进细胞迁移的作用最显著。由此认为, 雌激素对 A549 细胞系发生 EMT 过程有促进作用。

关键词: 雌激素; 上皮间质转化; 肺腺癌

中图分类号: R-33; R734.2; Q579.13 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2020)14-2635-05

Effects of Estrogen on Epithelial Mesenchymal Transition Process of A549 Cell Line*

FAN Xiao-dong¹, JIN Xiao-liu², LU Qiang³, ZHANG Ji-peng³, WANG Wu-ping³, LI Zhe^{1Δ}

(1 Department of thoracic surgery, the Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

2 The second hospital of Xuzhou Mining Group, Xuzhou, Jiangsu, 221000, China;

3 Department of thoracic surgery, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710049, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of estrogen on the EMT process of A549 cell line. **Methods:** The A549 cell line was stimulated with different concentrations of estrogen, and the expression of EMT markers in each group was detected by q-RT-PCR and Western blot. The effect of different concentrations of estrogen on cell migration was detected by Transwell experiment, and the statistical difference between each group was calculated. **Results:** When the concentration of estrogen was 1×10^{-9} mol/L, 1×10^{-8} mol/L, 1×10^{-7} mol/L, the mRNA expression of vimentin was 2.14 ± 0.55 , 4.72 ± 0.63 and 2.21 ± 0.47 , which was significantly higher than that of the blank control group, the mRNA expression of E-cadherin was 0.64 ± 0.15 , 0.46 ± 0.11 and 0.59 ± 0.13 , which was significantly lower than that of the blank control group, the protein expression had the same trend as mRNA, the number of cell migration was 58.63 ± 7.33 , 80.12 ± 9.32 , 61.89 ± 8.22 , which was significantly higher than that of the blank control group. When the concentration of estrogen was 1×10^{-8} mol/L, the expression of vimentin was the highest, the expression of E-cadherin was the lowest, and the number of cell migration was the highest. **Conclusion:** The appropriate concentration of estrogen can promote the expression of vimentin, inhibit the expression of E-cadherin, and improve the ability of cell migration. When the concentration of estrogen is 1×10^{-8} mol/L, the effect of promoting the expression of vimentin, inhibiting the expression of E-cadherin and promoting cell migration is the most significant. Therefore, estrogen can promote the EMT process of A549 cell line.

Key words: Estrogen; Epithelial Mesenchymal Transition; Lung adenocarcinoma

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R734.2; Q579.13 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)14-2635-05

前言

肺癌已经成为危害公众健康的一大难题, 目前临床治疗肺

癌的主要手段是以手术为主结合放化疗、靶向治疗以及免疫治疗为一体的综合治疗措施^[1,2], 但仅对于没有发生转移的病灶效果较好, 而对于已经发生远处转移的患者, 则没有较好的治疗

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81572252)

作者简介: 范晓东(1985-), 本科, 主治医师, 主要研究方向: 胸外科, E-mail: 87824832@qq.com

Δ 通讯作者: 李哲(1979-), 本科, 副主任医师, 主要研究方向: 肺和食管肿瘤, E-mail: 13572903345@163.com, 电话: 13572903345

(收稿日期: 2020-02-26 接受日期: 2020-03-22)

办法。肺癌主要通过血液、淋巴和局部扩散进行转移^[3],而上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)则是肿瘤转移的起始环节。EMT 过程中主要的分子特征改变为:上皮标志物 E- 钙黏蛋白(E-cadherin)表达减少和功能缺失,间质细胞标志物 N- 钙黏蛋白(N-cadherin)的过量表达^[4]。这两种蛋白被称为 EMT 标志物,由此,可以通过检测 EMT 标志物的变化来判断细胞是否发生了 EMT 过程。流行病学统计发现,在同样的烟草暴露下,女性罹患肺癌的比例高于男性,女性绝经前患肺癌的比例高于绝经后,且肺腺癌占主要部分^[5]。在非小细胞肺癌患者血清中检测到雌激素含量显著高于正常患者,且血清中雌激素含量与肿瘤的分期及预后相关性,血清中雌激素含量越高,肿瘤分期越晚,患者预后越差^[5,6]。由此,我们认为,雌激素在非小细胞肺癌的转移过程中可能发挥了作用。

研究表明,雌激素有可能在肺癌的 EMT 过程中发挥了作用。本课题组前期实验证实,在众多肺癌细胞系中,肺腺癌 A549 细胞系对雌激素刺激较为敏感,故采用 A549 细胞系作为实验对象。本实验拟采用 q-RT-PCR 及 Western blot 方法检测 A549 细胞中 EMT 标志物在雌激素刺激前后表达量的变化,用 Transwell 实验检测不同浓度雌激素对细胞迁移能力的影响,以此来证实其雌激素在 A549 细胞系 EMT 过程中的表达及作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

下表为本实验主要实验材料,其余实验材料为西安市第九医院胸外科实验室统一采购(表 1)。

表 1 实验材料及厂家

Table 1 Experimental materials and manufacturers	
Material	Manufactor
A549 Cell line	Thoracic Surgery Laboratory of Tangdu Hospital
Estrogen	Estradiol company
Vimentin monoclonal antibody	Abcam company
E-cadherin monoclonal antibody	Abcam company
β -actin monoclonal antibody	Abcam company
Reverse transcription Kit	Thermo company
Primer	Bioengineering Co., Ltd.

1.2 培养细胞

用六孔板培养 A549 细胞系;配制含有雌激素浓度为 1×10^{-10} mol/L、 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-6} mol/L 的 1640 培养基;当 A549 细胞到达对数生长期起始点时,用配置好的培养基常规培养细胞。

1.3 q-RT-PCR 检测各组细胞中 EMT 标志物的 mRNA 表达量

细胞生长至对数生长期时,提取总 RNA,存放于 -80°C 冰箱中备用;用紫外分光光度计测总 RNA 浓度,每次测量前应先做空白对照,测每个样品之间应将仪器擦洗三遍;根据测量所得 RNA 浓度计算反转录需要的加样量,加样量最多不多于 $11 \mu\text{g}$;荧光定量 PCR($20 \mu\text{L}$ 体系);每个样本设 3 个复孔,混

匀,离心,分装入八连管,放入 PCR 仪,运行程序。

1.4 Western-blot 实验检测各组细胞中 EMT 标志物的蛋白表达量

提取总蛋白,取 $20 \mu\text{L}$ 保存于 -20°C 冰箱,用来测蛋白浓度;配备 BCA 工作液,用去离子水稀释蛋白样品,做 3 个复孔,制作标准曲线,计算样品浓度;配分离胶和配浓缩胶,确保胶体均匀平整;正确连接正负极,精确控制加样量,合理安排电泳时间;配制电转缓冲液,将蛋白凝胶转移至 PVDF 膜上,恒流条件下转膜,小分子蛋白转膜条件为: 60 mA 、 30 min ,大分子蛋白转膜条件为 80 mA 、 30 min ;配制 $1 \times$ TBST 溶液,配制封闭用脱脂牛奶,将带有目的蛋白的 PVDF 膜用 TBST 轻轻清洗,然后正面朝上放入已配制好的牛奶中,在摇床上缓慢摇晃封闭 2-3 小时(根据室温的不同调整封闭时间,室温低时可适当延长封闭时间);按照一定比例稀释抗体(E-cadherin、Vimentin 和 β -actin 抗体稀释浓度分别为: $1:2000$ 、 $1:2000$ 、 $1:2000$,二抗稀释浓度为: $1:10000$),清洗,一抗孵育,清洗,二抗孵育;配置显色液,打开仪器,在电脑上运行程序,显色,保存图片。

1.5 Transwell 实验检测各组细胞迁移能力

配制雌激素浓度为 1×10^{-10} mol/L、 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L、 1×10^{-6} mol/L 的 1640 培养基,空白对照组不加雌激素,标号为 A,实验组根据从低到高的雌激素浓度分别编号 B、C、D、E、F;调整细胞浓度至 1×10^5 /mL,向各组小室中分别加入 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液,加入 $500 \mu\text{L}$ 含不同浓度雌激素的 1640 培养基;在细胞孵箱中培养 48 小时,用 PBS 冲洗小室三遍,并用棉签擦去小室内部的 Matrigel 胶和细胞,将小室放入 95%乙醇中固定 10 min,再放入 5%的结晶紫溶液中染色 30 min,用 PBS 冲洗干净,用棉签擦净小室内部残留的染液;在 200 倍倒置相差显微镜下观察细胞,并在每个小室的上下左右中五个位置拍照,细胞计数;重复 7 次,统计数据,分析不同浓度雌激素对 A549 细胞系迁移能力的影响。

1.6 统计学分析

使用 SPSS18.0 进行统计学处理,各组数据以均数 $\pm$ 标准差的形式记录,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为组间有统计学差异。

2 结果

2.1 q-RT-PCR 结果

不同浓度雌激素对 A549 细胞系中 Vimentin 和 E-cadherin 的 mRNA 表达量有不同程度的影响,Vimentin 的 mRNA 表达量随着雌激素浓度升高呈现出先增高后降低的趋势,但降低之后的表达量依然高于空白对照组,其中空白对照组为 1 ± 0.32 ,各实验组依据雌激素浓度由低到高分别为: 1.35 ± 0.34 、 2.14 ± 0.55 、 4.72 ± 0.63 、 2.21 ± 0.47 、 1.26 ± 0.37 ,当雌激素浓度为 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L 时,Vimentin 的 mRNA 表达量显著高于空白对照组,组间有统计学差异($P < 0.05$),当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时,Vimentin 的 mRNA 表达量最高,是空白对照组的 4 倍多,显著高于对照组($P < 0.05$),组间有统计学差异(图 1, A 图);而 E-cadherin 的 mRNA 表达量随着雌激素浓度升高呈现出先降低后增高的趋势,但始终低于对照组,其中空白对照组为 1 ± 0.27 ,各实验组依据雌激素浓度由

低到高分别为: 0.78 ± 0.17 、 0.64 ± 0.15 、 0.46 ± 0.11 、 0.59 ± 0.13 、 0.79 ± 0.22 , 当雌激素浓度为 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L 时, E-cadherin 的 mRNA 表达量显著低于空白对照组, 组间有统计学差异 ($P < 0.05$), 当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, E-cadherin 的 mRNA 表达量最低, 最低值约为空白对

照组的 0.46 倍, 显著低于对照组 ($P < 0.05$), 组间有统计学差异 (图 1, B 图)。从以上结果可以看出, 适宜浓度雌激素可以促进 Vimentin 的 mRNA 表达, 抑制 E-cadherin 的 mRNA 表达, 当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, 促进 Vimentin 和抑制 E-cadherin mRNA 表达的作用最显著。

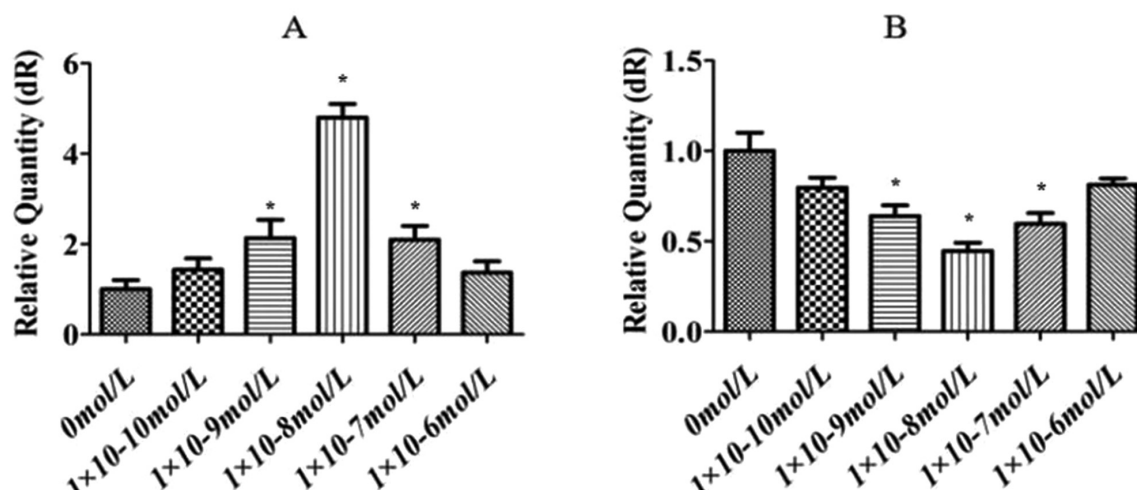


图 1 各组细胞中 EMT 标志物 mRNA 表达量

Fig.1 MRNA expression of EMT markers in each group

注: 与第一组 (0 mol/L) 相比, $P < 0.05$ ($n = 7$)。

Note: Compared with the first group (0 mol/L), $P < 0.05$ ($n = 7$).

2.2 Western-blot 结果

与 q-RT-PCR 实验结果的趋势相同, 不同浓度雌激素对 A549 细胞系中 Vimentin 和 E-cadherin 蛋白表达量有不同程度的影响, Vimentin 的蛋白表达量随着雌激素浓度升高呈现出先增高后降低的趋势, 但降低之后的表达量依然高于空白对照组, 其中当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, Vimentin 的蛋白表达量最高 (图 2); 而 E-cadherin 的蛋白表达量随着雌激素浓度升高呈现出先降低后增高的趋势, 但始终低于对照组, 当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, E-cadherin 的蛋白表达量最低 (图 2)。从以上结果可以看出, 适宜浓度雌激素可以促进 Vimentin 的蛋白表达, 抑制 E-cadherin 的蛋白表达, 当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, 促进 Vimentin 和抑制 E-cadherin 蛋白表达的作用最显著。

2.3 Transwell 实验结果

实验组的细胞迁移数均高于空白对照组, 当雌激素浓度较低时, A549 细胞系的细胞迁移数量随雌激素浓度的增高而增加, 当雌激素浓度较高时, 细胞迁移数量随雌激素浓度的增高而减少, 但依然高于对照组。其中, 当雌激素浓度为 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L 时, 细胞迁移数显著高于对照组, 分别为 58.63 ± 7.33 、 80.12 ± 9.32 、 61.89 ± 8.22 , 组间有统计学差异 ($P < 0.05$) (图 3)。当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时, 细胞迁移数最高。

3 讨论

在世界范围内, 肺癌是严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率逐年升高, 然而目前仍然缺乏有效的防治手段^[7]。全球肺癌的发生率和死亡率基本平行, 每年约有 180

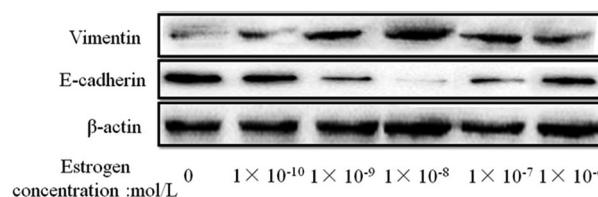


图 2 各组细胞中 EMT 标志物蛋白表达量

Fig.2 Protein expression of EMT markers in each group

万的新生病例和 160 万的死亡病例^[8]。近几年, 女性患肺癌的比率逐年增高, 发病率和死亡率仅次于乳腺癌^[9]。肺癌已经成为危害公众健康的一大难题。目前临床治疗肺癌的主要手段是以手术为主结合放化疗、靶向治疗以及免疫治疗为一体的综合治疗措施^[10], 但仅对于没有发生转移的病灶效果较好, 而对于已经发生远处转移的患者, 则没有较好的办法, 而肺癌致死的主要因素在于肺癌的转移。肺癌致死的主要因素在于肺癌转移带来的一系列并发症, 如肿瘤直接压迫或侵犯重要脏器导致器官功能衰竭, 进而导致死亡。因此, 防治肺癌转移成为了治疗肺癌的突破口。

雌激素作为人体重要的激素之一, 在肿瘤发生、发展过程中所发挥的作用逐渐引起了人们的注意^[11,12]。以往的经验认为, 雌激素作为人体必需的激素之一, 与肿瘤的发生发展没有关系, 然而最近的流行病学统计发现, 在同样的烟草暴露下, 女性罹患肺癌的比例高于男性, 绝经前患肺癌的比例高于绝经后, 且乳腺癌占主要部分^[13,14]。有研究表明, 在非小细胞肺癌患者血清中检测到雌激素含量显著高于正常组织, 且血清中雌激素含量与肿瘤的分期及患者预后有相关性, 血清中雌激素含量越高, 肿瘤分期越晚, 患者预后越差^[6,15]。我们猜测雌激素可能在 NSCLC 的 EMT 过程中扮演重要角色。

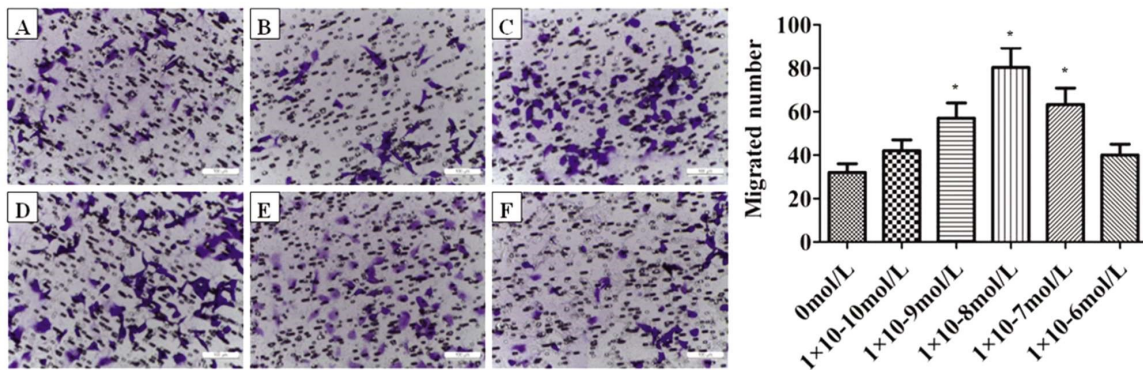


图3 不同浓度雌激素对 A549 细胞系迁移能力的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of estrogen on the migration of A549 cell line

注: 与第一组(0 mol/L)相比, $P < 0.05$ ($n = 7$)。

Note: Compared with the first group (0 mol/L), $P < 0.05$ ($n = 7$).

EMT 是 1982 年由 Greenburg 等人首次在人晶状体上皮细胞中发现的机体内一种普遍的生理及病理现象,即上皮细胞在特定的条件下向间充质细胞转化的过程^[16,17]。EMT 在胚胎发育、伤口愈合、器官纤维化和肿瘤转移过程中均扮演着重要角色^[18,19]。EMT 过程不仅是简单的促进细胞的迁移和侵袭能力,还是一个复杂的重新编码的过程,包括表观遗传学改变、细胞骨架的重新改造、蛋白表达的变化、细胞粘附能力的丢失、细胞极性消失、侵袭和转移能力增加、代谢和分化过程的改变等^[20,21]。该过程通过分化上皮癌细胞来逆转分化状态,不仅表达了干细胞标记物,而且还获得了干细胞样的功能^[22,23]。EMT 在肿瘤发生发展过程中主要的分子特征改变为: E-钙黏蛋白(E-cadherin)等上皮标志物表达和功能缺失^[24,25],同时波形蛋白(Vimentin)等间质细胞标志物过量表达^[26,27]。本课题组以肺腺癌 A549 细胞系作为研究对象,以 E-cadherin 和 Vimentin 作为 EMT 标志物,用不同浓度的雌激素刺激细胞,并用 q-RT-PCR 和 Western-blot 实验检测各组细胞中 EMT 标志物表达量的变化。结果显示:各实验组 Vimentin 的 mRNA 表达量依据雌激素浓度由低到高分别为: 1.35 ± 0.34 、 2.14 ± 0.55 、 4.72 ± 0.63 、 2.21 ± 0.47 、 1.26 ± 0.37 ,当雌激素浓度为 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L 时,表达量显著高于空白对照组,组间有统计学差异;而 E-cadherin 的 mRNA 表达量与 Vimentin 相反,随着雌激素浓度升高呈现出先降低后增高的趋势,但始终低于对照组,各实验组依据雌激素浓度由低到高分别为: 0.78 ± 0.17 、 0.64 ± 0.15 、 0.46 ± 0.11 、 0.59 ± 0.13 、 0.79 ± 0.22 ,当雌激素浓度为 1×10^{-9} mol/L、 1×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L 时, E-cadherin 的 mRNA 表达量显著低于空白对照组,组间有统计学差异。Western-blot 实验结果与 q-RT-PCR 实验结果的趋势基本一致。Transwell 实验提示雌激素可以显著提高 A549 细胞系的迁移能力,更加证实雌激素对 A549 细胞系的 EMT 过程有促进作用。

本次实验结果与前期相关研究的结果趋势相似^[6],适宜浓度雌激素可以促进 Vimentin 的表达,抑制 E-cadherin 的表达,同时提高细胞迁移能力,当雌激素浓度为 1×10^{-8} mol/L 时,促进 Vimentin、抑制 E-cadherin 表达和提高细胞迁移能力的作用最为显著。由此,我们认为在体外条件下,雌激素可以促进 A549 细胞系发生 EMT, 1×10^{-8} mol/L 可以作为后期实验的特

定浓度。但是雌激素是通过何种受体发挥作用并不清楚,我们后期实验将应用特异性雌激素受体拮抗剂分别抑制雌激素 α 受体和 β 受体,再用浓度为 1×10^{-8} mol/L 的雌激素刺激抑制前后的细胞,检测抑制前后各组细胞中 EMT 标志物的基因表达和细胞迁移率有无显著性差异,以此判断是何种雌激素受体在肺腺癌细胞系中发挥作用。

参考文献 (References)

- [1] FE A, S A-A, F P-A, et al. Cost-effectiveness of lung cancer screening and treatment methods: a systematic review of systematic reviews[J]. BMC Health Serv Res, 2017, 17(1): 413
- [2] Y M, D Y, J H, et al. Epidemiology of Lung Cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2016, 25(3): 439-445
- [3] AM R, A D. Multiple primary lung cancer: A literature review [J]. Adv Clin Exp Med, 2018, 27(5): 725-730
- [4] Turley E A, Veisich M, Radisky D C, et al. Mechanisms of disease: epithelial-mesenchymal transition-does cellular plasticity fuel neoplastic progression?[J]. Nat Clin Pract Oncol, 2008, 5(5): 280-290
- [5] Honma N, Hosoi T, Arai T, et al. Estrogen and cancers of the colorectum, breast, and lung in postmenopausal women [J]. Pathology International, 2015, 65(6): 451-459
- [6] Niikawa H, Suzuki T, Miki Y, et al. Intratumoral Estrogens and Estrogen Receptors in Human Non-Small Cell Lung Carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(14): 4417-4426
- [7] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA CANCER J CLIN, 2016, 66(6): 7-30
- [8] Tanoue L T, Tanner N T, Gould M K, et al. Lung cancer screening[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(1): 19-33
- [9] Chakraborty S, Ganti A K, Marr A, et al. Lung cancer in women: role of estrogens[J]. Expert Rev Respir Med, 2010, 4(4): 509-518
- [10] Reinmuth N, Heigener D F, Reck M. Non small cell lung cancer news from immunotherapy [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2015, 140(33): 329-333
- [11] Rodriguez AC B Z, Maurer KA, Gertz J. Estrogen Signaling in Endometrial Cancer: a Key Oncogenic Pathway with Several Open Questions[J]. Horm Cancer, 2019, 10(2): 51-63
- [12] T S, S M, R S, et al. Estrogen signaling: An emerging therapeutic target for breast cancer treatment [J]. Eur J Med Chem, 2019, 177(13): 116-143

- [13] Stanley K M, V D T. Women, Non-Smokers and Lung Cancer Screening Cost[J]. Wall Street Journal (Online), 2014, 6(7): 1-1
- [14] Miki Y, Abea K, Suzuki S, et al. Suppression of estrogen actions in human lung cancer[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2011, 7(6): 1-7
- [15] E K-C, A A, Z M-E. Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast-Cancer Metabolism[J]. Trends Endocrinol Metab, 2019, 30(1): 25-38
- [16] Greenburg G, Hay E D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells [J]. The Journal of Cell Biology, 1982, 95(23): 333-339
- [17] A O-A, K K, LT G, et al. The role of mesenchymal-epithelial transition in endometrial function [J]. Hum Reprod Update, 2019, 25(1): 114-133
- [18] Li L, Li W. Epithelial-mesenchymal transition in human cancer comprehensive reprogramming of metabolism, epigenetic and differentiation[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2015, 150(2015): 33-46
- [19] V M. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis[J]. Annu Rev Pathol, 2018, 24(5): 395-412
- [20] Y Z, RA W. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities[J]. Front Med, 2018, 12(4): 361-373
- [21] TT L, MH Y. Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: the connection between epithelial plasticity and stemness [J]. Mol Oncol, 2017, 11(7): 792-804
- [22] YM Y, WX Y. Epithelial-to-mesenchymal transition in the development of endometriosis[J]. Oncotarget, 2017, 8(25): 41679-41689
- [23] A D, RA W. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84
- [24] HC B, PWB D. Loss of E-Cadherin-Dependent Cell-Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(3): 553-559
- [25] V P, I K, Y S, et al. E-cadherin is required for metastasis in multiple models of breast cancer[J]. Nature, 2019, 573(7774): 439-444
- [26] S Y, FF C, GF Y. Vimentin immunohistochemical expression as a prognostic factor in gastric cancer: A meta-analysis [J]. Pathol Res Pract, 2018, 214(9): 1376-1380
- [27] AM R, LS H, AE K, et al. Vimentin Is Required for Lung Adenocarcinoma Metastasis via Heterotypic Tumor Cell-Cancer-Associated Fibroblast Interactions during Collective Invasion [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(2): 420-432

(上接第 2693 页)

- [21] Huang S, Zhu X, Xiao D, et al. Therapeutic effect of percutaneous kyphoplasty combined with anti-osteoporosis drug on postmenopausal women with osteoporotic vertebral compression fracture and analysis of postoperative bone cement leakage risk factors: a retrospective cohort study[J]. J Orthop Surg Res, 2019, 14(1): 452
- [22] Li YX, Guo DQ, Zhang SC, et al. Risk factor analysis for re-collapse of cemented vertebrae after percutaneous vertebroplasty (PVP) or percutaneous kyphoplasty (PKP)[J]. Int Orthop, 2018, 42(9): 2131-2139
- [23] Tan G, Li F, Zhou D, et al. Unilateral versus bilateral percutaneous balloon kyphoplasty for osteoporotic vertebral compression fractures: A systematic review of overlapping meta-analyses[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(33): e11968
- [24] Wu AM, Li XL, Li XB, et al. The outcomes of percutaneous kyphoplasty in treatment of the secondary osteoporotic vertebral compression fractures: a case-control study [J]. Ann Transl Med, 2018, 6(6): 107
- [25] Bousson V, Hamze B, Odri G, et al. Percutaneous Vertebral Augmentation Techniques in Osteoporotic and Traumatic Fractures[J]. Semin Intervent Radiol, 2018, 35(4): 309-323
- [26] 李庆伟, 王叶新, 章旭, 等. 单、双侧穿刺经皮椎体后凸成形术治疗骨质疏松椎体压缩性骨折对手术区域冠状面侧凸 Cobb 角的影响 [J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(22): 3365-3369
- [27] Lee JK, Jeong HW, Joo IH, et al. Percutaneous balloon kyphoplasty for the treatment of very severe osteoporotic vertebral compression fractures: a case-control study[J]. Spine J, 2018, 18(6): 962-969
- [28] Wang H, Zhang Z, Liu Y, et al. Percutaneous kyphoplasty for the treatment of very severe osteoporotic vertebral compression fractures with spinal canal compromise[J]. J Orthop Surg Res, 2018, 13(1): 13
- [29] Chang W, Zhang X, Jiao N, et al. Unilateral versus bilateral percutaneous kyphoplasty for osteoporotic vertebral compression fractures: A meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(17): e6738
- [30] Feng L, Feng C, Chen J, et al. The risk factors of vertebral refracture after kyphoplasty in patients with osteoporotic vertebral compression fractures: a study protocol for a prospective cohort study [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2018, 19(1): 195