

槐耳多糖通过 EMT 和 AEG-1 路径失活抑制肝癌 MHCC97-H 细胞转移

郑加生^{1,2} 李聪^{1,2} 吴霞³ 刘萌萌⁴ 孙喜财⁵ 杨颖卓³ 郝美君^{1,2} 生守鹏^{1,2} 孙玉^{1,2} 张洪海^{1,2} 龙江^{1,2} 梁毅^{6,7} 胡彩霞^{1,2}

【作者单位】

1. 首都医科大学附属北京佑安医院肿瘤肝胆介入治疗中心（北京 100069）
2. 首都医科大学附属北京佑安医院北京肝病研究所（北京 100069）
3. 哈尔滨医科大学附属第二医院传染科（哈尔滨 150081）
4. 哈尔滨医科大学药学院药理学系（哈尔滨 150081）
5. 清华大学生命科学中心（北京 100084）
6. 沈阳医学院公共卫生学院（沈阳 110034）

【摘要】我们最近报道，星形细胞上调基因 1 (AEG-1) 可能是一种人肝细胞癌 (HCC) 上皮-间质转化 (EMT) 相关的生物标记物，在肝癌的进展中发挥重要的作用。为了扩展我们的研究，在此我们研究槐耳多糖 (HP) 对人肝癌细胞株 MHCC97-H 的抗侵袭和转移的作用并探讨其可能的作用机制。体外实验中，用 HP 治疗可剂量依赖性地抑制 MHCC97-H 增殖、黏附、迁移和细胞侵袭。这种作用的实现不仅通过减少 AEG-1 和 N-cadherin 的表达，而且还通过加强 E-cadherin 的表达。因此，这些数据表明，HP 可通过对 AEG-1 / EMT 通路调节，抑制 MHCC97-H 细胞的生长和转移潜能。

【关键词】抗转移；星形细胞上调基因 1 (AEG-1)；肝细胞癌；MHCC97-H 细胞；槐耳多糖

1 引言

肝细胞癌 (HCC) 是一种具有高发病率和死亡率，往往晚期才能诊断出的常见的恶性肿瘤 [1,2]。HCC 诊断晚和高死亡率的主要原因是其侵袭和转移。一个有效阻断肝癌的进展和降低死亡率的方法是抑制其侵袭和转移。肿瘤的侵袭和转移是一个非常复杂的多步骤的过程，是导致患者死亡的关键点。这个过程包括穿透基质组织从原发部位分离，通过血管或淋巴循环，对基底膜的粘附，侵袭靶器官完成远处转移 [3 - 6]。任何一种能够抑制这种级联中某一步骤的药物，都可能在肿瘤转移过程中发挥抑制作用 [7]。众所周知，常见的疗法如手术、移植或经皮经动脉介入治疗其疗效有限 [8]。虽然一些化学合成的药物，目前可用于本病的治疗，但是其副作用难以耐受。因此，从天然物质中寻找具有更好的效果和较低的毒性的新药物是很有必要的 [9]。最近，许多天然物质作为新的抗肿瘤药物的潜在来源，受到越来越多的关注 [10 - 13]。了解这些化合物的作用机制可为其在癌症治疗和癌症预防中的应用提供有用的信息 [14,15]。我们以前的研究发现，肝癌细胞形态学和入侵性是通过抑制 AEG-1 的表达实现的。使用 RNA 序列为基础的基因表达谱，在 AEG-1 基因沉默后，我们发现了两个不同的靶基因 (AKR1C2 和 NF1 基因)。我们还发现，144 例肝癌组织出现 AEG-1 基因的过度表达，同时出现上皮 - 间质转化 (EMT)，这是癌症发展和提高癌细胞的转移能力的一个关键过程 [16]。一种能够阻断或抑制 AEG-1 表达和 EMT 的天然来源抗转移药物，对于预防 HCC 发生和侵袭具有重要的临床价值。人肝癌 MHCC97-H 细胞是具有高转移潜能的人类肝癌细胞株，具有典型的上皮样外观和类似临床转移的恶性生物学行为 [17]。这些细胞已被批准用于对肿瘤转移机制的临床和实验研究，筛选新的转移预测因子，以及发展新的预防和治疗的方法。因此本研究的目的是评估槐耳多糖 (HP) 对 MHCC97-H 细胞侵袭的抑制作用及其机制。

2 材料和方法

2.1 材料与化学试剂

槐耳提取物由启东盖天力医药有限公司（江苏，中国）捐赠。所有其他化学品均是最高商业级别。

2.2 制备多糖及分析理化特性

槐耳提取物（300 克）用蒸馏水稀释至浓度为 8% (m/v)。然后，将五分之三体积的 *Sevage* 试剂添加到上述溶液中去掉蛋白质，重复五次 [18]。在无蛋白溶液进行彻底的透析去水 2 天后，将浓缩液用四倍体积的 95% 乙醇在 4°C 温度下沉淀 24 小时，以沉淀出粗 HP。

样品中的蛋白质含量的测定采用 *Lowry* 法，使用结晶牛血清白蛋白为标准 [19]。糖含量由苯酚硫酸法估计，D-葡萄糖作为标准 [20]。糖醛酸含量的比色用间羟基联苯法分析，D-半乳糖醛酸作为标准 [21]。

2.3 细胞株及其培养

人肝癌细胞株 *MHCC97-H* 来自美国典型微生物菌种保藏中心（ATCC，马纳萨斯，弗吉尼亚州，美国），保持在高糖 *DMEM*（*Gibco* 公司，美国）中，添加 100 U / ml 青霉素和 10 μg / ml 链霉素以及 10% 热灭活胎牛血清（*FBS*，*ScienCell*，美国）。

2.4 细胞增殖试验

通常采用 *MTT* 法计算细胞活力。简单来说，将 *MHCC97-H* 细胞（ 2×10^4 个/）在 37°C 温度下铺于 96 孔板（康宁，NY，USA）。细胞培养过夜后，每孔中的培养基替换为含有不同量 HP 的新鲜 *RPMI1640* 培养基。培养 24，48 和 72 h 后，去除每孔中的培养基，细胞活力用 *MTT* 法分别测定如下。将细胞用 *PBS* 清洗后，50 μL *MTT*（5 毫克/毫升）37°C 培养 4 小时。活细胞数正比于溶解于二甲基亚砷的甲基含量，其值可用分光光度法，采用酶标仪（*BIO-RAD*，美国）于 570 nm 处测定。

2.5 伤口愈合实验

将 *MHCC97-H* 细胞接种于 24 孔板，培养 24 小时。细胞平铺后，用 1ml 吸量管尖端划单层培养细胞，获得“受伤”的单层培养细胞，之后用磷酸盐缓冲液（*PBS*）冲洗三次 [22]。然后，分别将细胞培养在有和无 25，50 和 100 μg/ml HP 的无血清培养基中。培养 48 小时后，观察细胞迁移并在尼康倒置显微镜下拍摄。比较迁移细胞领先侧边缘和伤口边缘的迁移距离。迁移率进行量化的公式如下：迁移率 = (HP 处理细胞迁移距离 / 未经处理的对照细胞的迁移距离) × 100%。实验分别进行至少四次。

2.6 细胞粘附试验

24 孔板的每个孔都覆以 *Matrigel*（11 毫克/毫升，*Sigma*）培养 1 小时。将细胞加入 24 孔培养板前，*MHCC97-H* 细胞（ 2×10^6 ）在分别含有 HP（0，25，50 和 100 μg/毫升）的培养基中进行预培养 60 分钟，温度 37°C，并轻柔地用 *PBS* 洗三次以洗去未贴壁细胞。贴壁到板底的细胞进行苏木精伊红 - 试剂染色并用 *Olympus IX70* 显微镜（*Olympus*，冈谷，日本）下计数。每个实验独立地进行至少四次。

2.7 细胞侵袭实验

细胞侵袭实验使用具有 6.5 毫米直径聚碳酸酯膜的 *Transwell* 系统（孔径，8 μm）（康宁，康宁，纽约）来评估细胞的侵袭率。简单地说，在 *Transwell* 细胞培养室，8 毫米孔径的过滤器上表面涂上 *Matrigel*。用胰蛋白酶消化肿瘤细胞（ 2×10^5 ）并悬浮在无血清培养基中，将 100 μL 的细胞悬液添加到每个具有不同 HP 浓度的上部隔室。在下室，含 20% 胎牛血清的 *RPMI-1640* 培养基被用来刺激迁移。对照组同样方式操作。在 37°C 下培养 48 小时后，用棉签完全除去过滤器上表面的细胞。迁移到过滤器的下表面的细胞，用乙醇和 1% 的结晶紫染色并在五个随机的微观视野内使用具有 ×400 倍的显微镜（*ix70*；*奥林巴斯*，日本）计数。结果表示为至少四个独立的实验对照的百分比。

2.8 免疫印迹分析

将 MHCC-97 H 细胞以 2×10^4 个/毫升浓度接种于含 50, 100 和 200 $\mu\text{g/ml}$ 的 HP 的 t-75 组织培养瓶中。培养 48 h 后,用冰冷的 PBS 液洗涤,总蛋白提取操作如同前述[23]。用 Bradford 法定量的细胞裂解液蛋白浓度 (1976) [24]。相等数量的细胞蛋白质则用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转移到硝酸纤维素膜,用特定的初级抗体如 AEG-1, E-cadherin, N-cadherin 和 β -肌动蛋白的抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。进一步与辣根过氧化物酶标记的二次抗体 (圣克鲁斯,海德堡,德国) 在室温下培养 1 小时,最后,用增强化学荧光 (ECL) 试剂盒按照说明书操作即可看到印记。

2.9 统计分析

数据表示为均数 \pm SD。进行 Student' s t 检验,方差分析测试显著性。对照差异 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 多糖的制备及其理化特性

从槐耳提取物中得到的 HP 为水溶性褐色粉末,HP 产出率约为 7.4% (基于原材料的重量)。对 HP 中碳水化合物的含量,蛋白质含量,和糖醛酸含量进行了测定。结果表明,HP 含有 56.2%的碳水化合物,19.2%的蛋白质和 23.4%的糖醛酸。

3.2 HP 对 MHCC97-H 细胞迁移的影响

对比 HP 组和对照组的细胞之间,迁移细胞前缘和伤口边缘的偏移距离。结果表明,对照组和 HP 治疗组在 0 小时伤后创面的广度几乎相同,而 48 小时后,HP 组创面宽度比的对照组宽得多。如图 1 所示,细胞迁移由 HP 以时间依赖性的方式控制,25, 50 和 100 $\mu\text{g/ml}$ HP 组的抑制率分别高达 28.57%, 47.81%和 57.19% ($P < 0.001$)。

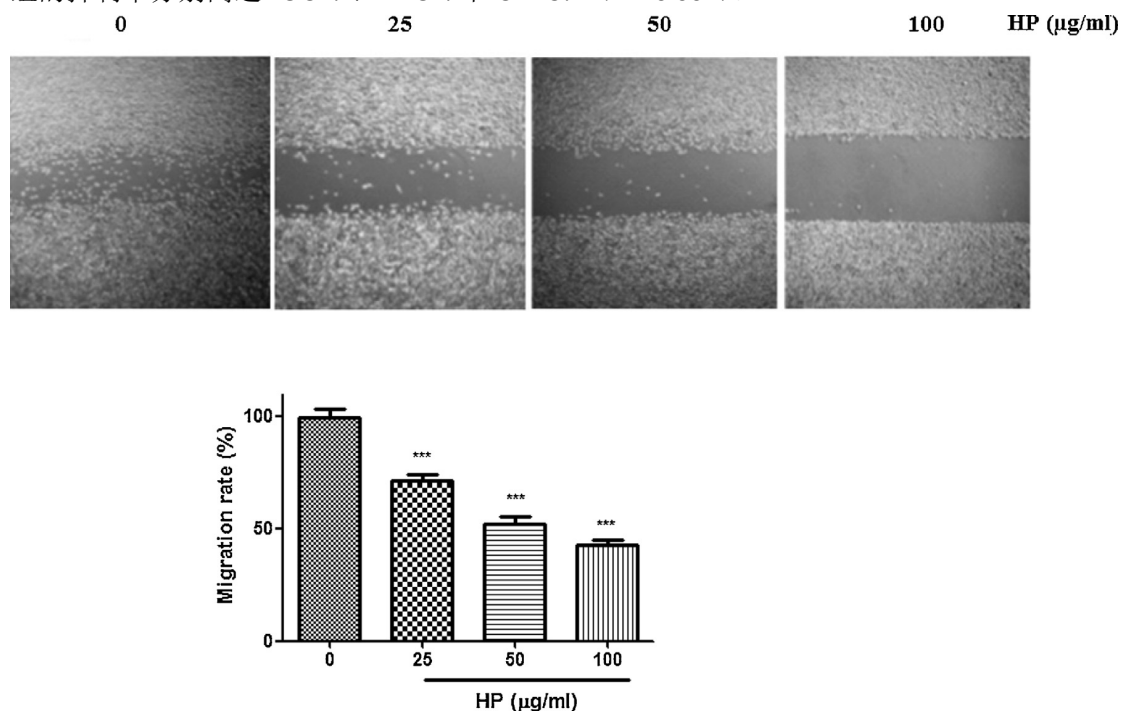


图 1 HP 对 MHCC97-H 细胞迁移的影响。数据代表的是均数 \pm SD 和使用 Student' s t 检验进行比较的结果。***与对照组比 $P < 0.001$ 。

3.3 HP 对 MHCC97-H 细胞的杀伤作用

因为伤口通常会通过细胞的增殖和迁移愈合,HP 对人肝癌 MHCC97-H 细胞增殖的抑制作用可以用 MTT 测试评估。MHCC97-H 细胞接种于 96 孔培养板板,以不同浓度 HP 浓度 (0, 25, 50 和 100 $\mu\text{g/ml}$) 培养 24, 48 和 72 小时。如图 2 所示,与未经处理的对照组相比,48 或 72 小时处,HP 处理组 MHCC97-H 细胞的细胞存活率显著降低,且具有剂量依赖性。

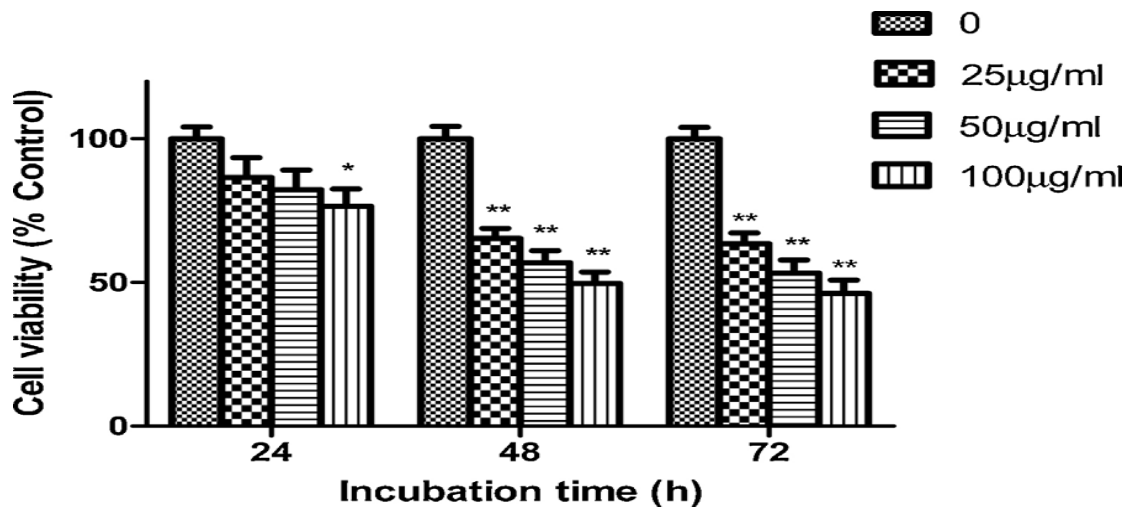


图2 HP对MHCC97-H细胞杀伤性的影响。数据代表的是均数±SD和用Student's t检验进行比较的结果。与对照组相比* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.4 HP对MHCC97-H细胞粘附的影响

为了研究HP对MHCC97-H细胞黏附的影响,将覆有Matrigel的粘附细胞用苏木精伊红-试剂染色,在倒置显微镜下计数。HP处理的MHCC97-H细胞在显示剂量下培养60分钟时,可显著抑制细胞粘附到Matrigel层,且具有浓度依赖效应(图3);在25, 50和100 µg/ml三个HP组分别减少了28.55%, 47.48%和56.47%。

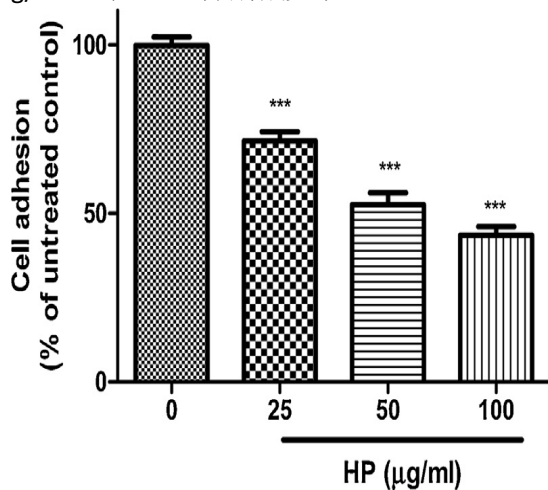


图3。HP对MHCC97-H细胞粘附的影响。数据代表的是均数±SD和用Student's t检验进行比较的结果。*** $P < 0.001$ 对照组。

3.5 HP对MHCC97-H细胞侵袭能力的影响

众所周知,MHCC97-H细胞在Matrigel中侵袭性很强。在这项研究中,我们使用Transwell系统覆以Matrigel细胞研究HP对细胞侵袭的抑制作用。我们发现,HP处理组在48小时时可显著抑制MHCC97-H细胞在20%胎牛血清的引导下通过Transwell膜的迁移。当加入25, 50和100 µg/mlHP时,对比未处理组,抑制作用更为明显,抑制率分别为34.50%, 48.53%和57.43%(图4)。

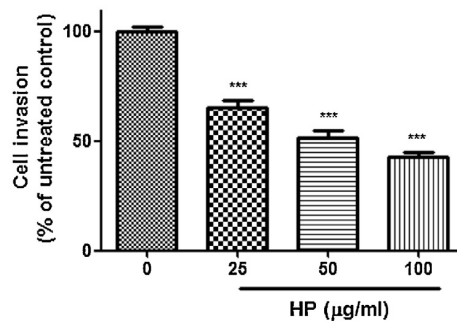
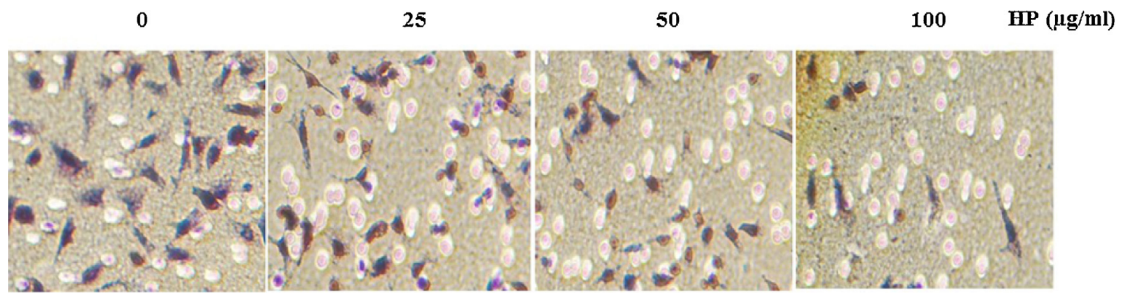


图4 HP对MHCC97-H细胞侵袭能力的影响。数据代表的是均数±SD 和用 Student' s t 检验进行比较的结果。×××P<0.001 与对照组相比。

3.6 HP对MHCC97-H细胞AEG-1, E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达的影响

考虑到AEG-1是在癌症(包括肝癌)的发生和发展多方面起作用的重要基因[25,26],我们用Western blot法分析了HP对MHCC97-H细胞AEG-1表达的影响。结果表明,MHCC97-H细胞经25, 50和100 μg/mlHP处理后48小时显著抑制AEG-1表达,且有剂量依赖性(图5)。由于上皮-间质转化(EMT)在浸润性癌细胞的发展进程中发挥了重要的作用[27],因此我们通过确定其E-cadherin 和 N-cadherin 的标志物,研究了HP对MHCC97-H细胞的抗侵袭和转移作用是否通过MET介导。正如预期的那样,在三个剂量HP处理组,上皮标记E-cadherin 明显增加,间质标记的N-cadherin 显著减少(图5)。

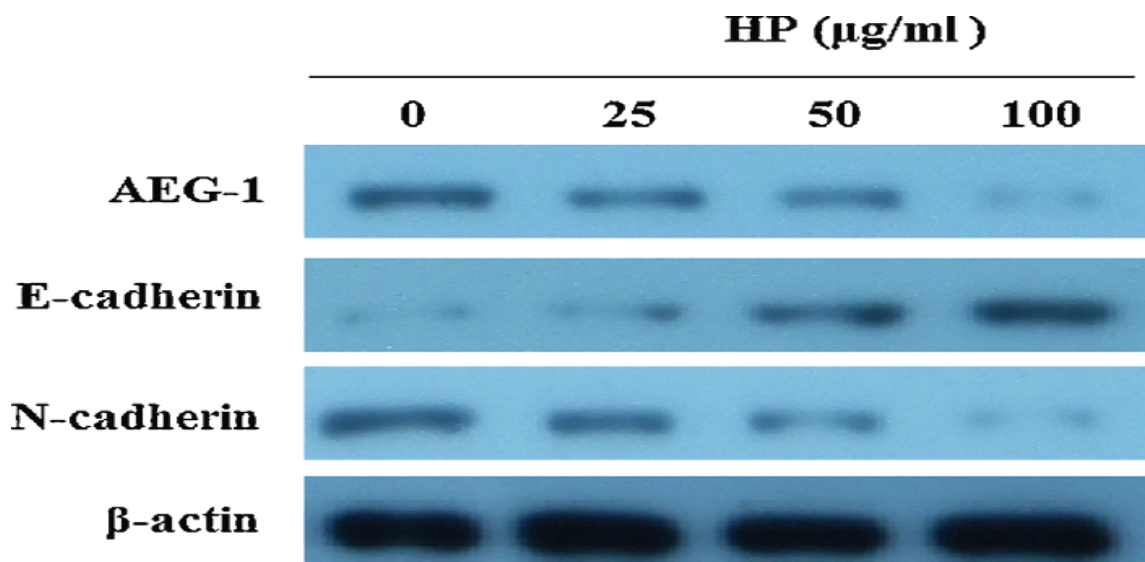


图5 HP对MHCC97-H细胞AEG-1, E-cadherin, N-cadherin 和β肌动蛋白表达的影响

4 讨论和结论

肿瘤侵袭转移是一个多步骤的过程,由肿瘤细胞附着到基底膜开始,分泌基质降解酶,通过基底膜和底部的基质[28,29]。近年来,许多研究工作的目标为中断转移过程的任一步

骤[30]。肿瘤细胞的粘附，迁移和侵袭是肿瘤转移进程中的重要步骤[31]。为了开发新的抗转移治疗方法，我们选择具有高转移潜能的 MHCC97-H 细胞研究 HP 对人肝癌细胞的转移活性的影响。伤口迁移试验，细胞粘附和细胞侵袭试验是评价肿瘤细胞运动的经典方法，也是我们实验所采用的。我们发现，在体外 HP 抑制 MHCC97-H 细胞粘附，侵袭和迁移。此外，HP 对 MHCC97-H 细胞增殖的抑制作用显著。这些结果表明，HP 可以抑制 MHCC97-H 细胞的扩散。

作为 Ha-Ras 信号通路的下游基因[32]，AEG-1 成为一个重要调节癌症的发展和进展的基因，包括变形，逃避细胞凋亡，化疗耐药和转移作用[32,33]。AEG-1 表达的异常升高经常发生在人类癌症，包括乳腺癌，神经胶质瘤，黑色素瘤，食管鳞状细胞癌，前列腺癌，肝细胞癌和胃癌[26,34 - 39]。因此我们鉴定了 HP 处理对在 MHCC97-H 细胞 AEG-1 蛋白表达的影响。在 HP 处理组的细胞中观察到 AEG-1 表达的显著降低，而在未经处理的对照细胞则表现出更高的表达。所以我们可以得出结论，AEG-1 的表达与 MHCC97-H 细胞侵袭和转移相关。

在肿瘤的发展进程中，晚期的肿瘤细胞已经发生上皮间质转化（EMT）并表现出明显的上皮性标志物表达下调和细胞间连接的损失，导致上皮细胞极性的损失和降低细胞间黏附[40]。上皮特征的消失往往伴随着细胞移动增加和间充质基因表达缺失[41,42]。在侵袭性的肿瘤，EMT 的特点是上皮性标志（E-cadherin）的表达降低和间充质标记（N-cadherin）表达上调，这使其具有基质细胞的粘附性质并增加肿瘤细胞的移动和侵袭特性[43]。为了了解 HP 的抗肿瘤转移作用，通过 Western blot 分析了 E-cadherin 和 N-cadherin 的表达。结果表明，HP 在 MHCC97-H 细胞的抗转移活性直接与对 E-cadherin 表达的恢复和 N-cadherin 的表达抑制有关。

总之，HP 是一种新型的抗癌剂，通过阻断 AEG-1 信号通路和恢复 EMT 能抑制癌细胞的侵袭和迁移。本研究为支持 HP 在肿瘤转移的治疗潜力提供了新的证据。为了进一步探讨人肝细胞癌潜在的基因和与 AEG-1 相互作用的基因，我们进行 RNA 序列为基础的分析来研究 AEG-1 缺失的 MHCC-97 H 细胞基因谱表达。我们的研究表明，AEG-1 基因缺失后，有些基因（包括 NF1，RAP1A 和 SRPX）上调，而有些基因（包括 AKR1C2，Fos 和 GDF15）下调。我们将进一步在实验或临床中研究这些基因，探究 HP 治疗肝细胞癌的潜力。

【鸣谢】本论文由中国“十二五”国家科技支撑计划支持（第 2012bai15b08）。

参考文献

- [1] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, CA: A Cancer Journal for Clinicians 61 (2011) 69–90.
- [2] D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, P. Pisani, CA: A Cancer Journal for Clinicians 55(2002) 74–108.
- [3] J.A. Wyke, European Journal of Cancer 36 (2000) 1589–1594.
- [4] J.A. Lawrence, P.S. Steeg, World Journal of Urology 14 (1996) 124–130.
- [5] N.J. MacDonald, P.S. Steeg, Cancer Surveys 16 (1993) 175–199.
- [6] I.H. Song, Korean Journal of Gastroenterology 43 (2004) 1–7.
- [7] M. Inami, I. Kawamura, S. Tsujimoto, F. Nishigaki, S. Matsumoto, Y. Naoe, Y. Sasakawa, M. Matsuo, T. Manda, T. Goto, Cancer Letters 181 (2002) 39–45.
- [8] L.C. Dai, X. Wang, X. Yao, Y.L. Lu, J.L. Ping, J.F. He, World Journal of Gastroenterology 13 (2007) 1989–1994.
- [9] J.Q. Yu, H.B. Liu, J.C. Lei, W.J. Tan, X.M. Hu, G.L. Zou, Phytotherapy Research 21(2007) 817–822.
- [10] L. Harhaji, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, I. Stojanovic, M. Momcilovic, V. Maksimovic, S.

- Tufegdžic, Z. Marjanovic, M. Mostarica-Stojkovic, Z. Vucinic, S. Stosic-Grujicic, *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 1825–1833.
- [11] S. Rashid, A. Unyayar, M.A. Mazmanci, S.R. McKeown, I.M. Banat, J. Worthington, *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 1477–1483.
- [12] W. Yin, X.K. Deng, F.Z. Yin, X.C. Zhang, B.C. Cai, *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) 1700–1708.
- [13] A. Vickers, *Cancer Investigation* 20 (2002) 1069–1079.
- [14] A.K. Taraphdar, M. Roy, R.K. Bhattacharya, *Current Science* 80 (2001) 1387–1396.
- [15] H.H. Lin, J.H. Chen, W.H. Kuo, C.J. Wang, *Chemico-Biological Interactions* 165(2007) 59–75.
- [16] J.S. Zheng, C. Li, X. Wu, Y.Z. Yang, M.J. Hao, S.P. Sheng, Y. Sun, H.H. Zhang, J. Long, C.X. Hu, *Tumor Biology* (2013), <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-013-1300-3>.
- [17] J. Tian, Z.Y. Tang, S.L. Ye, Y.K. Liu, Z.Y. Lin, J. Chen, Q. Xue, *British Journal of Cancer* 81 (1999) 814–821.
- [18] A.M. Staub, *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5 (1965) 5–6.
- [19] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.I. Randa, *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265–275.
- [20] M. Dubois, K.A. Gilles, I.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Analytical Chemistry* 28 (1956) 350–356.
- [21] T.M.C.C. Filisetti-Cozzi, N.C. Carpita, *Analytical Biochemistry* 197 (1991) 157–162.
- [22] J.C. Yarrow, Z.E. Perlman, N.J. Westwood, T.J. Mitchison, *BMC Biotechnology* 4(2004) 21.
- [23] M. Kedmi, S. Yannai, A. Haj, F.A. Fares, *Food and Chemistry Toxicology* 41 (2003) 745–752.
- [24] M.M. Bradford, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248–254.
- [25] G. Hu, Y. Wei, Y. Kang, *Clinical Cancer Research* 15 (2009) 5615–5620.
- [26] B.K. Yoo, L. Emdad, Z.Z. Su, A. Villanueva, D.Y. Chiang, N.D. Mukhopadhyay, A.S. Mills, S. Waxman, R.A. Fisher, J.M. Llovet, P.B. Fisher, D. Sarkar, *Journal of Clinical Investigation* 119 (2009) 465–477.
- [27] D. Sarrio, S.M. Rodriguez-Pinilla, D. Hardisson, A. Cano, G. Moreno-Bueno, J. Palacios, *Cancer Research* 68 (2008) 989–997.
- [28] A. Harlozinska, *Anticancer Research* 25 (2005) 3327–3333.
- [29] L. Weiss, *Advances in Cancer Research* 54 (1990) 159–211.
- [30] J.A. Zell, S.H. Ou, A. Ziogas, H. Anton-Culver, *Cancer* 112 (2008) 136–143.
- [31] P. Rouhi, S.L. Lee, Z. Cao, E.M. Hedlund, L.D. Jensen, Y. Cao, *Cell Cycle* 9 (2010) 913–917.
- [32] S.G. Lee, Z.Z. Su, L. Emdad, D. Sarkar, P.B. Fisher, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006) 17390–17395.
- [33] B.K. Yoo, L. Emdad, S.G. Lee, Z.Z. Su, P. Santhekadur, D. Chen, R. Gredler, P.B. Fisher, D. Sarkar, *Pharmacology & Therapeutics* 130 (2011) 1–8.
- [34] L. Liu, J. Wu, Z. Ying, B. Chen, A. Han, Y. Liang, L. Song, J. Yuan, J. Li, M. Li, *Cancer Research* 70 (2010) 3750–3759.
- [35] C. Yu, K. Chen, H. Zheng, X. Guo, W. Jia, M. Li, M. Zeng, J. Li, L. Song, *Carcinogenesis* 30 (2009) 894–901.
- [36] J. Li, N. Zhang, L.B. Song, W.T. Liao, L.L. Jiang, L.Y. Gong, J. Wu, J. Yuan, H.Z. Zhang, M.S. Zeng, M. Li, *Clinical Cancer Research* 14 (2008) 3319–3326.
- [37] L. Emdad, D. Sarkar, S.G. Lee, Z.Z. Su, B.K. Yoo, R. Dash, A. Yacoub, C.E. Fuller, K. Shah, P. Dent, J.N. Bruce, P.B. Fisher, *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (2010) 79–88.

- [38] N. Kikuno, H. Shiina, S. Urakami, K. Kawamoto, H. Hirata, Y. Tanaka, R.F. Place, D. Pookot, S. Majid, M. Igawa, R. Dahiya, *Oncogene* 26 (2007) 7647–7655.
- [39] X. Jian-bo, W. Hui, H. Yu-long, Z. Chang-hua, Z. Long-juan, C. Shi-rong, Z. Wen-hua, *Medical Oncology* 28 (2011) 455–462.
- [40] J.J. Christianson, A.K. Rajasekaran, *Cancer Research* 66 (2006) 8319–8326.
- [41] J.P. Thiery, J.P. Sleeman, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2006) 131–142.
- [42] S. Grunert, M. Jechlinger, H. Beug, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(2003) 657–665.
- [43] H. Peinado, D. Olmeda, A. Cano, *Nature Reviews Cancer* 7 (2007) 415–428.