

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00915

· 短篇论著 ·

## 钙黏蛋白与表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂治疗肝细胞癌敏感性的相关性

邢荣春<sup>1</sup>, 郑军<sup>1\*</sup>, 陈平<sup>1</sup>, 郑卫红<sup>2</sup>, 刘伟<sup>1</sup>, 何政<sup>1</sup>, 姚汝铖<sup>1</sup>

1. 三峡大学第一临床医学院普通外科, 宜昌 443003

2. 三峡大学医学院药理学教研室, 宜昌 443002

**[摘要]** **目的** 探讨钙黏蛋白(E-cadherin)表达在表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)治疗肝细胞癌耐药形成中的作用。**方法** 选取常见的4种肝细胞癌细胞HepG<sub>2</sub>、BEL-7404、SK-HEP-1和MHCC97,用蛋白质印迹法检测这4种肝癌细胞中E-cadherin的蛋白表达,MTT法检测E-cadherin的表达与肝癌细胞EGFR-TKI治疗抑制率的相关性。**结果** 4种肝癌细胞中HepG<sub>2</sub>、BEL-7404表达E-cadherin呈阳性并对EGFR-TKI治疗敏感,PD153035和吉非替尼两种EGFR-TKI的药物浓度与肝癌细胞HepG<sub>2</sub>、BEL-7404的生存率之间存在相关性( $P < 0.05$ );然而,肝癌细胞SK-HEP-1和MHCC97中E-cadherin表达阴性并对EGFR-TKI治疗耐药,PD153035和吉非替尼两种药物浓度与肝癌细胞MHCC97、SK-HEP-1的生存率之间不存在相关性( $P > 0.05$ )。另外,E-cadherin表达阴性细胞SK-HEP-1转染E-cadherin目的基因后与转入空载体的肝癌细胞相比,EGFR-TKI治疗的敏感性上调( $P < 0.05$ )。**结论** E-cadherin在调节EGFR分子靶向治疗的敏感性方面起重要作用。

**[关键词]** 钙黏蛋白;表皮生长因子;酪氨酸激酶抑制剂;肝细胞癌;肿瘤抗药性

**[中图分类号]** R 735.7

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2014)08-0915-05

### Association between E-cadherin and sensitivity of hepatocellular carcinoma to treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor

XING Rong-chun<sup>1</sup>, ZHENG Jun<sup>1\*</sup>, CHEN Ping<sup>1</sup>, ZHENG Wei-hong<sup>2</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, HE Zheng<sup>1</sup>, YAO Ru-cheng<sup>1</sup>

1. Department of General Surgery, The First Clinical Medicine College, Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei, China

2. Department of Pharmacology, Medical Science College, Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of E-cadherin in resistance of hepatocellular carcinoma to treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI). **Methods** Four liver cancer cell lines were used in the present study, namely, HepG<sub>2</sub>, BEL-7404, SK-HEP-1 and MHCC97. E-cadherin protein expression in the four cell lines was examined by Western blotting analysis. MTT method was used to examine the relationship between E-cadherin expression and inhibition rates of liver cancer cells treated with EGFR-TKI. **Results** E-cadherin was positive in HepG<sub>2</sub> and BEL-7404 cells, and they were sensitive to EGFR-TKI treatment; the survival rates of HepG<sub>2</sub> and BEL-7404 cells were correlated with the concentrations of PD153035 and gefitinib ( $P < 0.05$ ). E-cadherin was negative in SK-HEP-1 and MHCC97 cells, and they were both resistant to EGFR-TKI treatment, and there was no association between SK-HEP-1 and MHCC97 cell survival rates and concentrations of PD153035 and gefitinib ( $P > 0.05$ ). The sensitivity of SK-HEP-1 cells to EGFR-TKI was significantly increased after transfected with E-cadherin compared with those transfected with empty vectors ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** E-cadherin plays an important role in regulating the sensitivity of EGFR molecule targeted therapy.

**[Key words]** E-cadherin; epidermal growth factor receptor; tyrosine kinase inhibitor; hepatocellular carcinoma; neoplasm drug resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(8):915-919]

肝细胞癌临床上发病率高,中晚期预后不良,且由于外科手术切除不彻底、对放化疗不敏感等原因患者治疗效果并不理想。近年来随着分子生物学的

进展和对癌症发病机制的深入研究,出现了以特定分子为靶点的抗肿瘤药物。研究表明表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的

**[收稿日期]** 2013-04-30 **[接受日期]** 2013-07-31

**[作者简介]** 邢荣春,硕士. E-mail: xingrongchun@sina.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0717-6485272, E-mail: zhengjun1995@163.com

过表达与肿瘤的恶性程度、浸润转移及不良预后密切相关,是一个重要的分子靶点<sup>[1-2]</sup>。目前肝癌分子靶向治疗药物常用 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI),但 EGFR-TKI 的使用会导致获得性耐药的发生<sup>[3]</sup>。钙黏蛋白(E-cadherin)在多种肿瘤中表达,其表达下降或缺失不仅与肿瘤细胞的低分化、高侵袭性和转移性相关,还直接影响着患者的预后<sup>[1-2]</sup>。E-cadherin 与 EGFR 在影响肿瘤的侵袭性、转移及预后方面有着密切的联系。本研究拟通过探讨 E-cadherin 表达在 EGFR-TKI 治疗肝细胞癌敏感/耐药形成中的作用,对其是否直接参与 EGFR-TKI 耐药进行初步研究。

## 1 材料和方法

1.1 材料 上皮性肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>、BEL-7404 细胞,间质性肝癌细胞 MHCC97、SK-HEP-1 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。TRIzol 总 RNA 抽提试剂(Invitrogen 公司);RPMI-1640 培养液(Gibco 公司);青霉素、链霉素(华北制药股份有限公司);小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);RT-PCR 试剂盒(Fermentas 公司);一抗鼠抗人 E-cadherin 单克隆抗体(Cell Signaling 公司),二抗羊抗鼠 RAP 抗体(武汉谷歌生物科技有限公司);一抗兔抗人  $\beta$ -actin 抗体、二抗羊抗兔 RAP 抗体(武汉谷歌生物科技有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司);转染试剂、G418 试剂、MTT 试剂(武汉谷歌生物科技有限公司)。EGFR-TKI PD153035、吉非替尼(gefitinib)购自南京德宝生化器材有限公司。E-cadherin 质粒由澳大利亚昆士兰大学友情提供。

1.2 MTT 法检测细胞增殖 制备单细胞悬液,调整细胞密度为  $2 \times 10^5$ /mL。加 100  $\mu$ L 细胞悬液于 96 孔培养板,即每孔  $2 \times 10^4$  个细胞,每组 3 孔。过夜后,翻板倒净培养液,加入含不同浓度药物的培养液处理细胞(PD153035:0、500、1 000、1 500、2 000、2 500  $\mu$ mol/L;吉非替尼:0、5、10、15、20、25  $\mu$ mol/L),再将培养板放入 CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养 48 h。然后每孔加入 MTT 试剂 20  $\mu$ L 于 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h。翻板倒掉上清,加 100  $\mu$ L DMSO 溶解。用分光光度计测定 570 nm 波长处光密度(D)值,计算细胞生存率。细胞生存率(%)=[(实验组 D 值-本底 D 值)/对照组 D 值]100%。

1.3 蛋白质印迹分析检测 E-cadherin 蛋白表达 提取蛋白并定量样本,将等量的蛋白样品(50  $\mu$ g)加入聚丙烯酰胺凝胶,常规电泳、转膜。用含 5% 脱脂牛奶的 PBS 封闭 NC 膜,室温封闭 60 min;加入一抗(1:1 000)摇床上 4 $^{\circ}$ C 过夜;PBS 洗 4 次;加入二抗(1:50 000)摇床上室温孵育 60 min;PBS 洗 4 次。最后加入 ECL 底物反应 5 min,暗室显影, $\beta$ -actin 为内参。

1.4 转染实验 将已经获得的 E-cadherin 质粒转染耐药的肝癌细胞,转导 2 d 后将细胞转移至 2 个 10 cm 培养皿,待细胞贴壁后换成含抗生素的培养液继续培养,直至阳性克隆肉眼可见。3 周后开始挑阳性克隆,每个克隆的细胞分成 2 份,1 份培养于 6 孔板,另 1 份培养在培养瓶中。收集培养于 6 孔板的细胞作蛋白质印迹分析以挑选 E-cadherin 上调幅度最大的阳性克隆,待筛选和鉴定完毕后仅保留最佳的克隆作后续 MTT 和蛋白质印迹分析实验。

1.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。PD153035 和吉非替尼两种 EGFR-TKI 药物的浓度与 4 种肝细胞癌细胞 HepG<sub>2</sub>、BEL-7404、SK-HEP-1 和 MHCC97 生存率的相关性采用直线相关分析法;E-cadherin 表达阴性细胞 SK-HEP-1 转染 E-cadherin 目的基因后与转入空载体的肝癌细胞生存率的差异比较采用  $\chi^2$  检验。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 MTT 法检测细胞增殖结果 用 MTT 法测定不同浓度的 EGFR-TKI PD153035(0、500、1 000、1 500、2 000、2 500  $\mu$ mol/L)和吉非替尼(0、5、10、15、20、25  $\mu$ mol/L)对肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>、BEL-7404、MHCC97 和 SK-HEP-1 生存率的影响,结果(图 1)显示,HepG<sub>2</sub>、BEL-7404 细胞对 PD153035 和吉非替尼均较敏感,而 MHCC97、SK-HEP-1 细胞对这两种 EGFR-TKI 均表现为耐药。相关分析显示,PD153035 浓度和吉非替尼浓度与肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>、BEL7404 的生存率之间均存在相关性( $P < 0.05$ ),而这两种 EGFR-TKI 浓度与肝癌细胞 MHCC97、SK-HEP-1 的生存率之间无相关性( $P > 0.05$ )。

2.2 蛋白质印迹分析结果 蛋白质印迹分析结果(图 2)显示,HepG<sub>2</sub>、BEL-7404 两种肝癌细胞中 E-

cadherin 蛋白表达阳性;而 SK-HEP-1 和 MHCC97 两种肝癌细胞 E-cadherin 蛋白表达阴性。

### 2.3 转染实验结果

2.3.1 转染后肝癌细胞 SK-HEP-1 的蛋白表达 蛋白质印迹分析结果(图 3)显示,转染 E-cadherin 目的基因的肝癌细胞 SK-HEP-1 中 E-cadherin 蛋白有表达,而转染空载体的肝癌细胞 SK-HEP-1 中无 E-cadherin 蛋白表达。

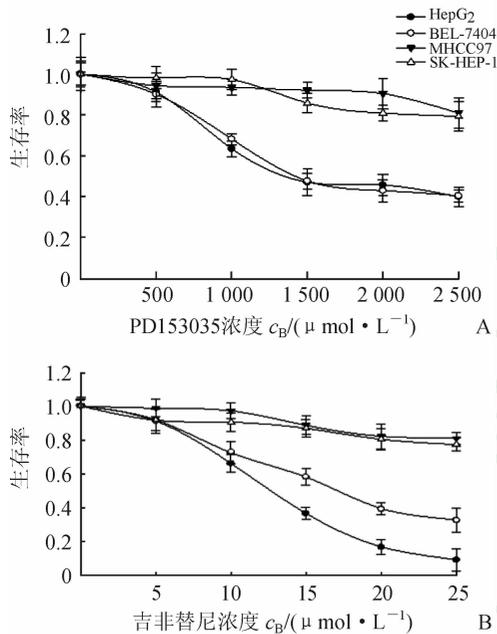


图1 MTT法测定两种EGFR-TKI作用后各肝癌细胞的生存曲线

EGFR-TKI:表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂。A: PD153035; B:吉非替尼。  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$

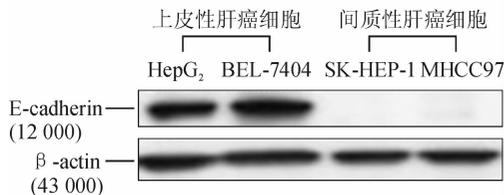


图2 蛋白质印迹分析检测各肝癌细胞中 E-cadherin 蛋白表达

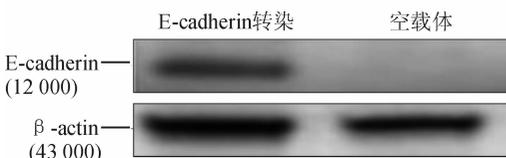


图3 蛋白质印迹分析检测转染后肝癌细胞 SK-HEP-1 中 E-cadherin 蛋白表达

2.3.2 转染后肝癌细胞 SK-HEP-1 的生存率 肝

癌细胞 SK-HEP-1 转染 E-cadherin 目的基因后, MTT 检测结果(图 4)显示,稳定表达 E-cadherin 能逆转 SK-HEP-1 细胞对 PD153035 和吉非替尼的敏感性。经  $\chi^2$  检验发现, SK-HEP-1 细胞对 PD153035、吉非替尼的敏感性与空载体组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

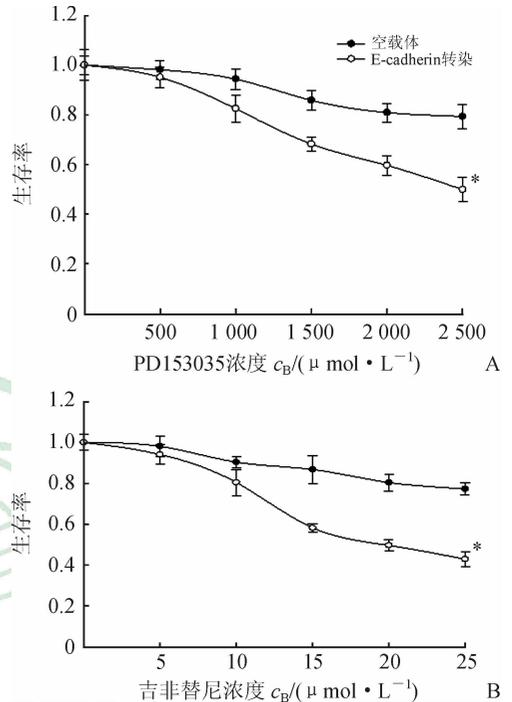


图4 MTT测定稳定表达 E-cadherin 后两种 EGFR-TKI 对肝癌细胞 SK-HEP-1 生存率曲线的影响

EGFR-TKI:表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂。A: PD153035; B:吉非替尼。 \*  $P < 0.05$  与空载体组比较。  $n=6$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

目前针对 EGFR 开展的分子靶向治疗有两大类<sup>[4-5]</sup>:一类是进入细胞内的 TKI,系与 ATP 竞争结合酪氨酸激酶并间接抑制其功能的小分子化合物。常见的 EGFR-TKI 包括吉非替尼、厄洛替尼(erlotinib)、PD153035。另一类是 EGFR 单克隆抗体,主要作用于 EGFR 的细胞外区域,与各种配体(如 EGF、TGF- $\beta$ )竞争结合并导致 EGFR 失去活性,包括西妥昔单抗(cetuximab)和帕尼单抗(panitumumab)。在临床应用方面 TKI 优于 EGFR 单克隆抗体,其疗效最早是在肺癌患者的治疗中得到肯定,尤其对传统化疗药物无效的部分患者仍然有效,以后逐渐应用于乳腺癌、胰腺癌、直肠癌以及盆腔和泌尿系统等肿瘤的治疗<sup>[6-11]</sup>。

本研究中,EGFR-TKI(PD153035 和吉非替尼)对肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>、BEL-7404、SK-HEP-1 和 MH-CC97 抑制率的检测发现,肝癌细胞 HepG<sub>2</sub>、BEL-7404 中 E-cadherin 表达阳性并对 EGFR-TKI 治疗敏感,然而肝癌细胞 SK-HEP-1 和 MHCC97 中 E-cadherin 表达阴性,对 EGFR-TKI 治疗耐药。另外,在 E-cadherin 表达阴性细胞 SK-HEP-1 转染 E-cadherin 后发现 EGFR-TKI 治疗的敏感性上调。这说明 E-cadherin 在基因和蛋白水平的表达与 EGFR-TKI 治疗肝癌细胞耐药/敏感性存在相关性,并在其中可能扮演了重要作用,他们之间可能存在一些相互作用的机制。

E-cadherin 为跨膜的单链多肽,由含氨基末端的膜外部分、跨膜区和含羧基末端的胞质内部分等组成。膜外部分负责细胞黏附,胞内部分与连环蛋白( $\alpha$ -catenin、 $\beta$ -catenin)形成复合物。EGFR 和 E-cadherin 发生相互作用的空间基础是两者的亚细胞定位非常靠近,EGFR 和 E-cadherin 共同存在于细胞间的黏附小带区。研究发现两者存在双向的作用关系<sup>[12]</sup>。在 EGFR 调节 E-cadherin 方面,E-cadherin 的胞质内区与  $\beta$ -catenin 的核心区连接成复合物,再连接到肌动蛋白的细胞骨架上,以维持细胞间的紧密连接。 $\beta$ -catenin 是 EGFR 作用的底物,当 EGFR 配体(如 EGF、TGF- $\beta$  等)与 EGFR 结合后,具有酪氨酸激酶活性的 EGFR 胞质内区活化,引起 E-cadherin 与  $\beta$ -catenin 复合物中的  $\beta$ -catenin 磷酸化,导致  $\beta$ -catenin 从复合体解离并使复合物从肌动蛋白上解离开来,从而降低细胞间的黏附性。因此,配体与 EGFR 的结合能促使 E-cadherin 表达的下调和 EMT 的发生<sup>[13]</sup>。在 E-cadherin 调节 EGFR 方面,E-cadherin 是一个钙依赖的细胞膜表面黏附分子,当细胞环境从低钙向高钙环境变化时能激活 E-cadherin 的活化和 EGFR 的磷酸化<sup>[14-15]</sup>。此外,E-cadherin 通过其细胞外的结构域和 EGFR 受体结合,还将减少后者的活动性以及其 EGF 结合的亲和力<sup>[16]</sup>。近年研究还发现,在 E-cadherin 突变的情况下,EGFR 的磷酸化和内化(internalization)显著增强<sup>[17]</sup>。但是这些研究均未提及 E-cadherin 的正常功能、缺少或突变对 EGFR 靶向治疗敏感性的影响。在 EGF 等生长因子的刺激下,EGFR 内化的速度加快,同时 EGFR 某些区域激活以后,加速蛋白降解,这些

可能是机体内一种控制 EGF 信号强弱和持续性的机制。

另外,在 E-cadherin 调节 EGFR 的过程中,可能存在上游基因 miRNA 对 E-cadherin 的调控,不少研究发现 miRNA 对 E-cadherin 调控在 EGFR 分子靶向治疗中有重要作用。近期研究表明,EMT 可能导致 EGFR 介导治疗的耐药。首先 EMT 改变是细胞在非编码 RNA 作为一个调节因子在细胞发展过程中起作用的一个发展过程,此过程伴有 E-cadherin 的丢失。Adam 等<sup>[18]</sup>发现 miRNAs 在影响 EMT 方面的潜能,其介导的人膀胱肿瘤对 EGFR 治疗的耐药性有抑制效应,用 miRNAs 矩阵列筛选及实时定量反转录聚合酶链反应来鉴定和验证 9 个膀胱肿瘤细胞系中涉及到 EMT 的 miRNAs 的不同表达情况,发现 miRNA-200 家族中 miRNAs 的表达与上皮细胞形态及对 EGFR 阻断剂诱导膀胱肿瘤细胞的生长抑制的敏感性有很密切的联系。在稳定表达 miRNA-200 的间质细胞 UMUC3 中,E-cadherin 表达水平明显上调,而 ZEB1、ZEB2、ERRFI-1 表达以及细胞转移能力下降,对 EGFR 阻断剂敏感性也提高。通过沉默或过表达 ERRFI-1 或 miRNA-200 而引起 EGFR 敏感性的变化也在 UMUC5 和 T24 细胞系中得到验证。认为 miRNA-200 家族成员可能参与了控制 EMT 的过程和对膀胱肿瘤 EGFR 靶向治疗的敏感性。同时认为 miRNA-200 的表达至少在一些间质性的膀胱癌细胞中可以恢复 EGFR 的依赖性,miRNA-200 诱导的 ERRFI-1 靶向治疗可能是一个新的 EGFR 非依赖的调节剂。不少文献还报道 miRNA-9<sup>[19]</sup>、miRNA-34a<sup>[20]</sup> 等对 E-cadherin 及 EMT 有重要的调节作用,至于 miRNA-9 对 EGFR-TKI 分子靶向治疗的调控方面,目前不清楚这些直接或者间接调节 E-cadherin 的 miRNAs 参与肿瘤调控和对 EGFR-TKI 靶向分子治疗的具体作用,需要进一步的研究才能确定瘤体中 miRNA-9 对 E-cadherin 和对其他靶点的作用机制。

以上这些可能是 E-cadherin 参与 EGFR-TKI 分子靶向治疗的一些调控机制,E-cadherin 与 EGFR-TKI 双向作用的关系极其复杂,其具体作用的信号调控通路和如何逆转其耐药机制还有待进一步研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Saif M W. Colorectal cancer in review; the role of the EGFR pathway[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19:357-369.
- [2] Fratto M E, Santini D, Vincenzi B, Silvestris N, Azzariti A, Tommasi S, et al. Targeting EGFR in bilio-pancreatic and liver carcinoma[J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3:16-22.
- [3] 王敬萍, 郑华, 李宝兰, 付瑜. EGFR 基因突变与肺癌 EGFR-TKI 获得性耐药的研究进展[J]. *实用临床医药杂志*, 2008, 12:12-15.
- [4] Okamoto I. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development; EGFR-targeted anticancer therapy[J]. *FEBS J*, 2010, 277:309-315.
- [5] Lurje G, Lenz H J. EGFR signaling and drug discovery [J]. *Oncology*, 2009, 77:400-410.
- [6] Thomson S, Buck E, Petti F, Griffin G, Brown E, Ramnarine N, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:9455-9462.
- [7] Yauch R L, Januario T, Eberhard D A, Cavet G, Zhu W, Fu L, et al. Epithelial versus mesenchymal phenotype determines *in vitro* sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(24 Pt 1):8686-8698.
- [8] Black P C, Brown G A, Inamoto T, Shrader M, Arora A, Siefker-Radtke A O, et al. Sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitor requires E-Cadherin expression in urothelial carcinoma cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:1478-1486.
- [9] Lee M Y, Chou C Y, Tang M J, Shen M R. Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor overexpression, and snail up-regulation [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14:4743-4750.
- [10] Buck E, Eyzaguirre A, Barr S, Thompson S, Sennello R, Young D, et al. Loss of homotypic cell adhesion by epithelial-mesenchymal transition or mutation limits sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6:532-541.
- [11] Fuchs B C, Fujii T, Dorfman J D, Goodwin J M, Zhu A X, Lanuti M, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68:2391-2399.
- [12] Andl C D, Rustgi A K. No one-way street; cross-talk between E-cadherin and receptor tyrosine kinase (RTK) signaling; a mechanism to regulate RTK activity [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4:28-31.
- [13] Yasmeen A, Bismar T A, Al Moustafa A E. ErbB receptors and epithelial-cadherin-catenin complex in human carcinomas[J]. *Future Oncol*, 2006, 2:765-781.
- [14] Pece S, Gutkind J S. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:41227-41233.
- [15] Heijink I H, Kies P M, Kauffman H F, Postma D S, van Oosterhout A J, Vellenga E. Down-regulation of E-cadherin in human bronchial epithelial cells leads to epidermal growth factor receptor-dependent Th2 cell-promoting activity[J]. *J Immunol*, 2007, 178:7678-7685.
- [16] Qian X, Karpova T, Sheppard A M, McNally J, Lowy D R. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases[J]. *EMBO J*, 2004, 23:1739-1748.
- [17] Bremm A, Walch A, Fuchs M, Mages J, Duyster J, Keller G, et al. Enhanced activation of epidermal growth factor receptor caused by tumor-derived E-cadherin mutations[J]. *Cancer Res*, 2008, 68:707-714.
- [18] Adam L, Zhong M, Choi W, Qi W, Nicoloso M, Arora A, et al. MiR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy[J]. *Clin Cancer Res* 2009, 15:5060-5072.
- [19] Liu S, Kumar S M, Lu H, Liu A, Yang R, Pushparajan A, et al. MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- $\kappa$ B1-Snail1 pathway in melanoma[J]. *J Pathol*, 2012, 226:61-72.
- [20] Nalls D, Tang S N, Rodova M, Srivastava R K, Shankar S. Targeting epigenetic regulation of miR-34a for treatment of pancreatic cancer by inhibition of pancreatic cancer stem cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6:e24099.