

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.30.010

FBW7 泛素化修饰 Snail 促进上皮间质转化的实验研究 *

张 勇 叶明翔 张信信 常 宁 韩志萍 熊 洁 张 艰[△]

(第四军医大学西京医院呼吸内科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨 FBW7(F-box/WD repeat-containing protein 7)是否参与转录抑制因子 Snail 的泛素化修饰,通过调节上皮间质转化(EMT)进而导致非小细胞肺癌的侵袭和转移,为治疗非小细胞肺癌(NSCLC)患者晚期转移提供新的思路。**方法:**首先,通过 Western Blot 方法检测多种人肺细胞系中 Snail 的表达水平。上调(药物处理)及下调(设计并合成特异性 shRNA 转染)H460 细胞中 FBW7 的表达后,检测 Snail 的表达水平。采用平板克隆及 Transwell 方法检测下调 FBW7 的 H460 细胞形态改变和侵袭转移能力变化。**结果:**人非小细胞肺癌 H460 细胞中 Snail 表达水平较高。上调 FBW7 表达可使 Snail 表达下降,经蛋白酶抑制剂 MG132 处理后 Snail 表达升高;而下调 FBW7 表达后 Snail 表达增加。下调 FBW7 表达细胞后,细胞形态改变,侵袭转移能力增强。**结论:**FBW7 参与了 Snail 泛素化修饰,进而经蛋白酶体途径将其降解引起 EMT,导致肿瘤转移和进展的发生。

关键词:FBW7; 上皮间质转化; Snail; 侵袭转移

中图分类号:R-33; R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)30-5844-05

The Ubiquitination of Snail by FBW7 leads to Epithelial-to-Mesenchymal Transition*

ZHANG Yong, YE Ming-xiang, ZHANG Xin-xin, CHANG Ning, HAN Zhi-ping, XIONG Jie, ZHANG Jian[△]

(Department of Pulmonary Medicine, Xi Jing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore whether F-box/WD repeat-containing protein 7 (FBW7) participates in the ubiquitination of transcription factor, Snail, which leads to epithelial to mesenchymal transition and then induces tumor invasion and metastasis in non small cell lung cancer (NSCLC), and provides new insights for the treatment of advanced NSCLC. **Methods:** The expression levels of Snail in different lung cancer cell lines are detected by western blot. Up-regulation (drug treatment) and down-regulation (specific siRNAs are designed and synthesized) of FBW7 in H460 lung cancer cell line are applied to detect the variation of Snail expression. Utilization of plate clone formation assay and transwell assay are to confirm morphological changes and the capacity of metastasis and invasion in FBW7-down-regulated H460. **Results:** Compared with other cell lines, Snail expresses in higher grade. The down-regulation of Snail after enhancement of FBW7 can be blocked by treatment of proteasome inhibitor, MG132, while up-regulation of FBW7 may lead to opposite results. Morphological varieties and enhancement of the ability of metastasis and invasion are proved by down-regulation of FBW7 in H460. **Conclusion:** FBW7 participates in the ubiquitination of Snail, which in turn is degraded by ubiquitin-proteasome pathway, and then triggers EMT, leading to tumor metastasis and progression.

Key words: FBW7; EMT; Snail; Invasion and metastasis

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

Article ID: 1673-6273(2017)30-5844-05

前言

目前,恶性肿瘤的发病率呈逐年增高的趋势,而肺癌作为发病率最高的恶性肿瘤之一,多数患者在确诊时已发展至终末期,错过了治疗的最佳时期。部分晚期肺癌患者死于远处转移,其中脑^[1]、骨^[2]等部位的转移尤为明显。针对肺癌细胞转移的研究已逐步成为肺癌研究领域的热点。

上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)概念的提出为肿瘤侵袭转移机制的研究提供了新的研究思路。即上皮细胞失去细胞极性,细胞间粘附性降低,并开始出现侵

袭和转移能力^[3],此过程可发生于胚胎早期发育^[4]、伤口愈合^[5]以及肿瘤转移等多种生理和病理过程。在这一过程中,E-钙离子依赖的细胞粘附素蛋白(E-cadherin)可作为 EMT 标记物以判断此过程的发生,即 E-cadherin 表达下降和 Vimentin 表达升高^[6]。而 E-cadherin 的表达与其上游的转录抑制因子(如 Snail1/2, Twist, ZEB1/2 等)有关,其中 Snail 抑制 E-cadherin 表达的作用最为明显^[7]。

真核细胞内蛋白质有多种降解途径,其中泛素-蛋白酶体途径可对细胞中多种蛋白进行泛素化修饰并通过蛋白酶体对蛋白质进行降解。泛素连接酶可与多种底物结合并降解而发挥

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81272518)

作者简介:张勇(1991-),硕士研究生,研究方向:肺癌个体化治疗和耐药机制,电话:15829245717, E-mail: 15829245717@163.com

[△] 通讯作者:张艰,教授,主任医师,博士生导师, E-mail: 13991802890@163.com

(收稿日期:2017-05-19 接受日期:2017-06-10)

作用。FBW7 作为泛素连接酶 SCF 复合体中的一种 F-box 分子在调控细胞周期、细胞增殖、分化、凋亡、转移等细胞生物学过程中起到重要作用^[9]。研究证实 FBW7 可降解多种蛋白分子(如 Mcl-1^[9]、Notch^[10]、mTOR^[11]、Cyclin E^[12]、KLF5^[13]、c-Jun^[14]等)发挥抑制肿瘤增殖、转移等作用。本实验通过检测不同肺癌细胞系中 Snail 表达水平,并改变细胞系中 FBW7 表达水平,检测其侵袭转移能力变化,以明确 FBW7 是否参与了肺癌细胞系中 Snail 的泛素化降解过程。

1 材料与方法

1.1 材料

H460 细胞购自 ATCC;RPMI1640 和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司;兔抗人 FBW7 抗体(CDC4) 购自 SanTaCruz 公司,兔抗人 Snail 抗体、鼠抗人 β -actin 抗体、HRP 标记的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG 购自 Cell Signaling Technology 公司;化学发光试剂盒购自 Millipore 公司;Matrigel 购自美国 BD 公司;Transwell 小室购自 Corning 公司;Lipo2000 转染试剂购自 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H460 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,5%CO₂ 37℃ 孵育箱中常规培养,定期更换培养液,0.25%胰酶消化后 800 rpm 5 min 离心传代。

1.2.2 Western blot 实验 细胞样品收集于 2 mL EP 管中,各 EP 管中加入 100 μ L 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,置于冰上裂解 20 min 后进行超声裂解,再继续裂解 10 min。待裂解充分后 12000 rpm 4℃ 离心 10 min,收集裂解液上清。BCA 法测定蛋白浓度,加入 1/4 体积的 5 $\times$ loading buffer,100℃ 煮沸 10 min,于 -80℃ 保存备用。配置聚丙烯酰胺凝胶,于加样孔中加入待检测蛋白样品,设置电泳装置 120 V,2 h。300 mA 恒流低温转膜 90 min,根据待检测蛋白分子量大小将 NC 膜裁剪至适宜大小,置于 5%浓度脱脂牛奶中,摇床上室温封闭 1h。经 TBST 冲洗后,将膜置于配制好的一抗缓冲液中 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 15 min 后,加入相应二抗缓冲液中 4℃ 孵育 1h。将膜取出并经 TBST 洗膜 15min 后,待发光检测。

1.2.3 人 FBW7 特异性干扰序列 shRNA 的合成 由北京奥科公司合成 FBW7 特异性干扰序列,shFBW7#1:5'-CCGGCCTAAAGAGTTGGCAC TCTATCTCGAGATAGAGTGCCAACTCTTAGGTTTTT-3',shFBW7#2:5'-CCGGTCAAACAGGTGCAAT-TATTTCTCGA GAAATAATTGCACCTGGTTTGATTTTTT-3' 以及对照序列 shGFP:5'-CCGGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCA TCTCGAGATGAAGTTCAGGGTCAGCTTGCTTTTTT-3'。

1.2.4 细胞转染 将细胞常规消化离心后,细胞均匀铺入 6 cm 细胞培养皿中,待细胞密度约达到 60%时,更换为无血清培养液(DMEM) 采用脂质体转染法将 shGFP、shFBW7#1、shFBW7#2 用 Lipo-2000 按转染试剂说明书相应比例稀释混匀后加入 H460 细胞中,转染 6h 后更换为含血清培养液(RPMI1640)继续培养。

1.2.5 Transwell 侵袭转移实验 提前用无血清培养液处理细胞 12 h。于 4℃ 条件下将 50 mg/L Matrigel 融化为液态,并用 RPMI1640 培养液以 1:8 比例稀释,吸取 100 μ L 均匀覆盖

Transwell 小室底部,室温风干。常规消化细胞离心,进行细胞计数,用无血清 RPMI1640 调整细胞密度至 2×10^5 /mL,吸取 200 μ L 细胞悬液分别置于无 Matrigel 包被及有 Matrigel 包被的 Transwell 小室内。向 24 孔板下室内加入 500 μ L 含 10%血清的 RPMI1640 培养液并将小室置于孔中,常规培养 24 h 后,固定、染色并进行细胞计数。相关结果进行统计分析。

1.2.6 平板克隆形成实验 取对数生长期细胞,常规消化离心。重悬细胞沉淀进行细胞计数,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL,倍比稀释只 1×10^3 /mL。取 200 μ L 细胞悬液接种平皿,补加培养液至 10 mL。十字晃动使细胞分散均匀,放入孵箱常规培养 2-3 周。当镜下出现细胞集落时进行拍照,选取单个克隆集落进行观察。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。每组实验重复 3 次以上,每次实验至少重复 3 个复孔。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行两独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 Snail 在多种肺细胞系中的表达

Western blot 方法检测人支气管上皮样细胞(Beas2B)、小细胞肺癌细胞(H345、H446) 和非小细胞肺癌细胞(H520、H460、H358、A549、H1299)中 Snail 的蛋白表达水平,结果显示:在众多细胞系中,H460、A549 和 H1299 肺癌细胞系中 Snail 表达水平较高,以 H460 最为明显。这表明 H460 是高表达内源性 Snail 的肺癌细胞系,后续实验主要在 H460 细胞系中进行。

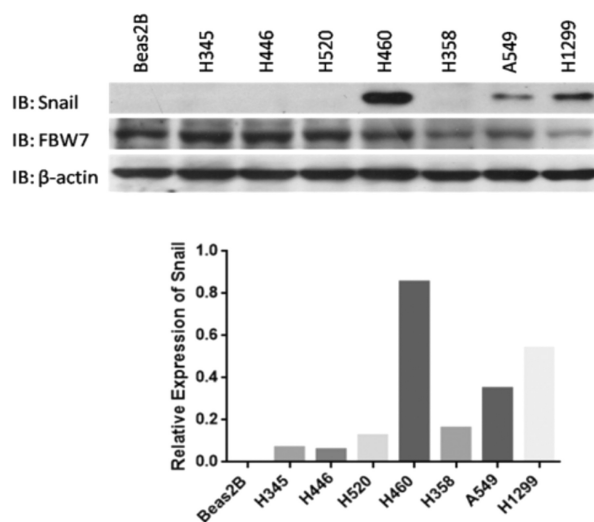


图 1 Western blot 检测多种肺细胞系中 Snail 的表达水平
Fig.1 The expression level of Snail in different lung cell lines were detected by western blot

2.2 Snail 可通过 FBW7 修饰经蛋白酶体途径降解

Oridonin 是从中药中提取的一种双萜类化合物,可通过上调 FBW7 的表达并促进 FBW7 与底物的结合,在体内外显著降低 c-myc 蛋白水平^[15]。因此,Oridonin 可作为抗肿瘤药物应用于临床。本实验中主要应该用其对 FBW7 的激动作用以提高细

胞内 FBW7 的表达水平。预先给予 H460 细胞相应浓度 Oridonin 处理(μM),24h 后给予蛋白酶体抑制剂 MG132($10 \mu\text{M}$, 5h)处理。采用 Western blot 方法检测 FBW7 和 Snail 的蛋白表达水平。结果显示:随着 Oridonin 浓度的增加,H460 细胞中 FBW7 表达升高而 Snail 表达减少;经 MG132 处理后,FBW7 表达未见明显变化而 Snail 表达增加。这表明 Snail 可通过与 FBW7 结合经蛋白酶体途径降解。

2.3 干扰 FBW7 表达可上调 H460 中 Snail 表达

干扰细胞中 FBW7 表达,建立稳定低表达 FBW7 的 H460 细胞系。采用 Western blot 方法检测干扰效率。结果显示:与 shGFP 组相比,shFBW7#1 及 shFBW7#2 组 H460 细胞中 FBW7 表达减少,而 Snail 和 Vimentin 表达升高。H460 细胞中 E-cadherin 表达量低,未能用 Western blot 方法检测。这表明 FBW7 与 Snail 间可能存在作用关系,并可发生上皮间质转化引起细胞侵袭转移能力的变化。

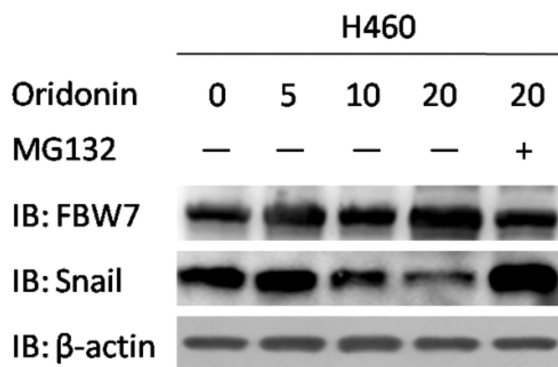


图2 上调 FBW7 表达并予以 MG132 处理后 H460 细胞中 Snail 表达
Fig.2 Snail expression in H460 cells after up-regulation of FBW7 and MG132 treatment

2.4 下调 FBW7 表达可引起细胞形态和侵袭转移能力的变

对 H460 shGFP、shFBW7#1 和 shFBW7#2 组细胞进行平板克隆形成实验,观察单克隆集落形态。结果显示:与对照组细胞相比,实验组细胞形态改变,呈梭形长条状,集落边缘尤为明显,细胞间连接疏松并向周围伸展。这表明敲除 FBW7 引起细胞形态的改变可能与细胞侵袭转移能力改变有关。

根据上述实验结果,对 H460 shGFP、shFBW7#1 和 shFBW7#2 组细胞进行 Transwell 实验,观察不同组细胞侵袭和转移能力的差异并进行统计。结果显示:与对照组相比,实验组细胞穿过小室的细胞数明显增多,差异存在统计学意义($p < 0.05$)。这说明在敲除 FBW7 后,H460 细胞的侵袭转移能力增强,这一过程可能有 EMT 的发生。

3 讨论

EMT 可发生于胚胎组织器官的早期发育、组织损伤修复、抗细胞衰老死亡、细胞干性的获得、肿瘤进展及侵袭转移等诸多生理病理过程。在不同的生理病理阶段,EMT 的发生受转录调节、转录后修饰及翻译后修饰等复杂的调控网络参与。EMT 的发生机制十分复杂,涉及 TGF- β 、Wnts、Notch、EGF、HGF、

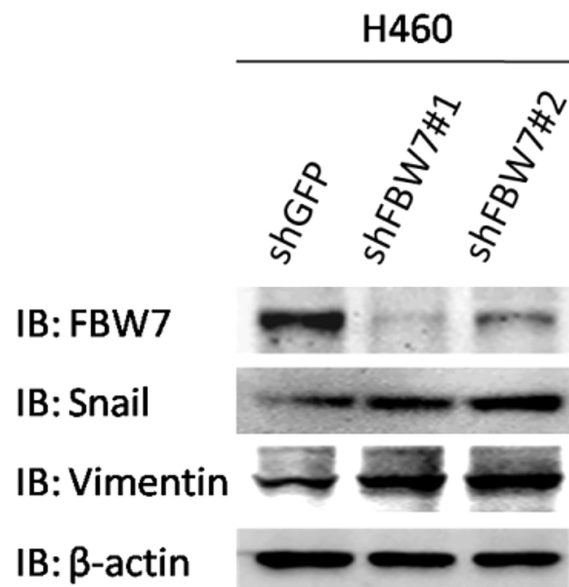


图3 H460 细胞 shGFP、shFBW7#1 和 shFBW7#2 组中 Snail 表达
Fig.3 Snail expression levels in shGFP and shFBW7 groups of H460

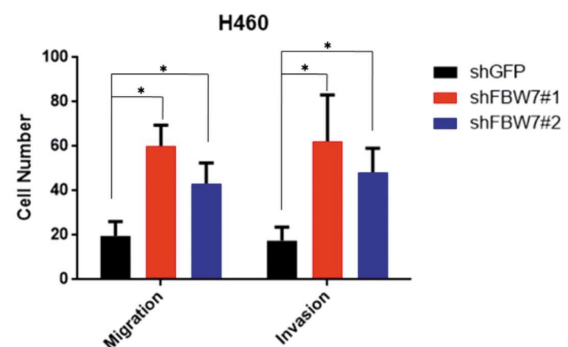
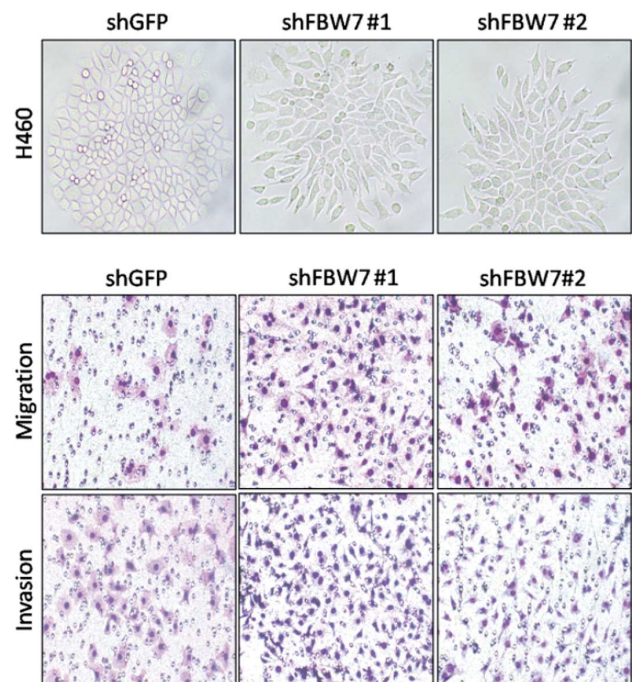


图4 平板克隆和 Transwell 实验检测细胞形态和侵袭转移能力变化
Fig.4 Morphological changes and the capacity of metastasis and invasion detected by plate clone formation assay and transwell assay. * $p < 0.05$

FGF 和 HIF 等多种信号通路,这些通路的激活可进一步调控下游的关键分子从而引起上皮细胞标志物 (E-cadherin) 的改变。E-cadherin 表达主要受结合在其基因上的转录抑制因子影响,这些分子可结合在特定的 DNA 区域抑制 E-cadherin 基因转录,从而降低其 mRNA 水平进而影响蛋白表达。这些转录抑制因子主要包括 Snail1/2、Twist、Zeb1/2 和 E47 等。另外,miRNA(如 miR-200 家族、miR-373 和 miR-21 等)在调控肿瘤细胞的侵袭转移过程各种也起到重要作用^[9]。目前诸多研究已明确 Snail 在 EMT 发生过程中起到关键作用。Snail 首次于果蝇中发现,其可下调果蝇细胞内 E-cadherin 的同源类似物进而控制原肠胚的形成。即各种信号分子激活细胞内信号通路,在不同水平引起 Snail 蛋白表达变化,E-cadherin 上游的转录抑制因子 Snail(Snail1 和 Snail2)表达增多,抑制 E-cadherin 的转录过程从而降低蛋白表达水平,同时引起 Vimentin 表达升高,进而导致 EMT 的发生。

针对 Snail 的研究最早在 2004 年由 Mien-Chie Hung 等人提出,即 Snail 可由 GSK3- β 磷酸化修饰从而被 β -Trcp 进行泛素化降解^[17]。其降解过程大致为:未磷酸化的 GSK-3 β 与 Snail 其中一个磷酸化位点结合介导其从细胞核进入细胞质,随后再结合 Snail 第二个磷酸化位点使其磷酸化并与 β -Trcp 结合进行泛素化修饰后经蛋白酶体途径降解。 β -Trcp 又称 FBXW1,属于 E3 连接酶中 SCF 复合体 F-box 成员,可与 β -catenin 等多种底物结合将其降解而发挥功能。目前已发现多种 SCF 复合体 F-box 成员参与 EMT 的发生,并引起肿瘤细胞转移能力的改变,如 β -Trcp^[18]、FBW7^[19]、FBXL5^[20]以及 FBXO11^[21]等。

基于前期研究,我们将研究重点放在 FBW7 分子上。FBW7 为肿瘤抑制因子,多种肿瘤相关蛋白可与之结合从而被降解发挥抑癌作用,主要包括 cyclinE、Notch、c-Jun、c-Myc 及 mTOR 等与细胞周期、代谢、分化以及凋亡有关分子 22。人类 FBW7 基因定位于染色体 4q32,其序列长度约为 210 kb。其转录过程中进行选择性地拼接,翻译后形成 3 种 N 端不同的 FBW7 亚型,即 FBW7 α 、FBW7 β 和 FBW7 γ ,分别定位于核浆、细胞质及核仁^[22]。所有亚型均由 D domain、F-box domain、WD40-repeat domain 以及底物识别模体构成。既往报道中,FBW7 介导 EMT 发生主要与 Notch 与 c-Myc 等通路相关^[23],而与 EMT 转录抑制因子有关的研究却鲜有报道。鉴于 FBW7 与 β -Trcp 在结构和功能上的相似性,我们着重研究 FBW7 在泛素化修饰 Snail 引起 E-cadherin 表达水平改变并导致上皮间质转化的作用。这对于揭示 FBW7 在肿瘤侵袭转移中发挥作用及临床上对晚期肿瘤转移患者的治疗具有重要意义。

本研究通过上调 H460 细胞中 FBW7 的表达并给予 MG132 处理,结果显示随着 FBW7 表达升高,Snail 蛋白水平降低,但抑制其蛋白酶体途径后 Snail 蛋白表达水平明显升高。这说明 FBW7 可能参与 E-cadherin 上游控制其基因表达的转录抑制因子 Snail 的泛素化修饰,进而通过蛋白酶体途径降解。其次,构建稳定下调 FBW7 的 H460 细胞系并经 Western Blot 检测发现,FBW7 表达水平的下降伴随着 Snail 与 Vimentin 表达大水平的升高,这说明 FBW7 可能参与到 Snail 的降解过程并由此引起 EMT 的发生。最后,对稳定下调 FBW7 的 H460 细胞进行 Tranwell 和平板克隆形成实验,结果显示下调 FBW7

可引起细胞转移和侵袭能力变化,细胞在形态上由上皮细胞向间质细胞改变。这说明 FBW7 与细胞形态、细胞间黏附以及细胞的侵袭转移有关,而这一过程可能有 EMT 的发生。

以上结果提示 FBW7 在晚期非小细胞肺癌转移过程中发挥重要作用,有望成为治疗非小细胞肺癌转移的新靶点。但 FBW7 泛素化修饰 Snail 并经蛋白酶体途径降解的分子机制仍有待进一步研究,如 FBW7 对 Snail 修饰的磷酸化位点的确定,介导 Snail 泛素化修饰的细胞定位以及其他信号通路在这一过程中发挥作用等,这些问题对于完善 Snail 经泛素-蛋白酶体途径降解的分子机制和临床应用 FBW7 激动剂对晚期非小细胞肺癌远处转移的治疗具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] Yoshiharu Ohno, Takeshi Yoshikawa, Yuji Kishida, et al. Diagnostic Performance of Different Imaging Modalities in the Assessment of Distant Metastasis and Local Recurrence of Tumor in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer [J]. Journal of Magnetic Resonance Imaging, 2017, 00: 1-11
- [2] Rui Zhang, ZhiYu Wang, Yue-Hua Li, et al. Usefulness of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging for predicting treatment response to vinorelbine-cisplatin with or without recombinant human endostatin in bone metastasis of non-small cell lung cancer[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(12): 2890-2900
- [3] Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma [J]. Histopathology, 2007, 50(1): 151-162
- [4] Schafer G, Narasimha M, Vogelsang E, et al. Cadherin switching during the formation and differentiation of the Drosophila mesoderm-implications for epithelial-to-mesenchymal transitions [J]. J Cell Sci, 2014, 127(7): 1511-1522
- [5] Shaw TJ, Martin P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration[J]. Curr Opin Cell Biol, 2016, 42: 29-37
- [6] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, et al. Epithelial mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890
- [7] Lamouille S, Xu J, Derynck R, et al. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 178-196
- [8] Welcker M, Clurman BE. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation[J]. Nature Reviews Cancer, 2008, 8(2): 83-93
- [9] Inuzuka H, Shaik S, Onoyama I, et al. SCFFBW7 regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction [J]. Nature, 2011, 471(1): 104-109
- [10] Oberg C, Li J, Pauley A, et al. The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Scf-10 homolog [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (38): 35847-35853
- [11] Mao JH, Kim JJ, Wu D, et al. FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression [J]. Science, 2008, 321(5895): 1499-1502
- [12] Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, et al. Human Fbox protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line[J]. Nature, 2001, 413(6853): 316-322
- [13] Zhao D, Zheng HQ, Zhou Z, et al. The Fbw7 tumor suppressor targets

- KLF5 for ubiquitin-mediated degradation and suppresses breast cell proliferation[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(11): 4728-4738
- [14] Nateri AS, Riera-Sans L, Da Costa C, et al. The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling[J]. *Science*, 2004, 303 (5662): 1374-1378
- [15] Huang HL, Weng HY, Wang LQ, et al. Triggering Fbw7-mediated proteasomal degradation of c-Myc by oridonin induces cell growth inhibition and apoptosis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(5): 1155-1165
- [16] Kim J, Bartel DP. Allelic imbalance sequencing reveals that single-nucleotide polymorphisms frequently alter microRNA-directed repression[J]. *Nature Biotechnology*, 2009, 27(5): 472-477
- [17] Nieto, MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(3): 155-166
- [18] Zhou BP, Deng J, Xia W, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(10): 931-940
- [19] Li CW, Xia W, Lim SO, et al. AKT1 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer through Phosphorylation-Dependent Twist1 Degradation [J]. *Cancer Res*, 2016, 76 (6): 1451-1462
- [20] Tu K, Zheng X, Zhou Z, et al. Recombinant human adenovirus-p53 injection induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines mediated by p53-Fbxw7 pathway, which controls c-Myc and cyclin E [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68574
- [21] Xiong Y, Sun F, Dong P, et al. iASPP induces EMT and cisplatin resistance in human cervical cancer through miR-20a-FBXL5/BTG3 signaling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 48
- [22] Jin Y, Shenoy AK, Doernberg S, et al. FBXO11 promotes ubiquitination of the Snail family of transcription factors in cancer progression and epidermal development [J]. *Cancer Lett*, 2015, 362 (1): 70-82
- [23] Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes [J]. *Current Diabetes Reviews*, 2013, 9(1): 25-53

(上接第 5839 页)

- [11] Niraula S, Dowling RJ, Ennis M, et al. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 135(3): 821-830
- [12] Richardson AE, Hamilton N, Davis W, et al. Insulin-like growth factor-2 (IGF-2) activates estrogen receptor- α and - β via the IGF-1 and the insulin receptors in breast cancer cells [J]. *Growth Factors*, 2011, 29(2-3): 82-93
- [13] Byrski T, Huzarski T, Dent R, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 115(2): 359-363
- [14] Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, et al. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28 (3): 375-379
- [15] Sharma P, Lopez-Tarruella S, Garcia-Saenz JA, et al. Efficacy of Neoadjuvant Carboplatin plus Docetaxel in Triple-Negative Breast Cancer: Combined Analysis of Two Cohorts [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(3): 649-657
- [16] Isakoff SJ, Mayer EL, He L, et al. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of Platinum Monotherapy With Biomarker Assessment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(17): 1902-1909
- [17] A Tutt, P Ellis, L Kilburn, et al. Abstract S3-01: The TNT trial: A randomized phase III trial of carboplatin (C) compared with docetaxel (D) for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple negative or BRCA1/2 breast cancer (CRUK/07/012)[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(9 Supplement): S3- 01-S3-01
- [18] Wahdan-Alaswad R, Harrell JC, Fan Z, et al. Metformin attenuates transforming growth factor beta (TGF- β) mediated oncogenesis in mesenchymal stem-like/claudin-low triple negative breast cancer[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(8): 1046-1059
- [19] Deng XS, Wang S, Deng A, et al. Metformin targets Stat3 to inhibit cell growth and induce apoptosis in triple-negative breast cancers[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(2): 367-376
- [20] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreras C, Cufi S, et al. The anti-diabetic drug metformin suppresses the metastasis-associated protein CD24 in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 135-140
- [21] Shi P, Liu W, Tala, et al. Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation [J]. *Cell Discov*, 2017, 3: 17010