

NID1 增强人卵巢癌细胞 OVCAR-3 干细胞特性及分子机制研究

张欢¹, 文韬², 张凯娜¹, 霍泉³, 陈若语⁴, 周亚^{5,6}, 张莹^{5,6}

(1. 重庆医科大学药学院, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学第一临床学院, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学生物医学工程学院, 重庆 400016; 4. 重庆医科大学第二临床学院, 重庆 400016; 5. 重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016; 6. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

摘要: [目的] 探讨 NID1 对卵巢癌干细胞表型的潜在影响以及 NID1 与干细胞标志蛋白联合对预后的潜在价值。[方法] 采用肿瘤干细胞球形成实验、荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 分别检测稳定过表达外源 NID1 的 OVCAR-3 细胞的自我更新能力和卵巢癌干细胞标志物的表达情况。借助生物信息学分析评估 NID1 在卵巢癌临床样本中与卵巢癌干细胞标志物的相关性及两者联合对预后预测的价值。[结果] 与空载细胞相比, 稳定过表达 NID1 的 OVCAR-3 细胞自我更新能力增强 ($P=0.006$), 同时伴随着干细胞标志物 CD44 ($P=0.000$) 和 ABCG2 ($P=0.000$) 表达水平升高。经 ERK/MAPK 通路的抑制剂 U0126 下调 ERK1/2 的磷酸化水平后, 其 CD44 和 ABCG2 的水平下降。此外, 基于两套卵巢癌表达谱芯片数据的生物信息学分析表明, NID1 的表达水平与 CD44 ($P=0.006$; $P=0.036$)、ABCG2 ($P=0.000$; $P=0.000$) 表达水平均显著正相关, 而 NID1 高表达并且携带干细胞表型的卵巢癌患者总体存活时间最短 ($P=0.026$; $P=0.000$)。[结论] NID1 可能通过激活 ERK/MAPK 通路诱导卵巢癌细胞出现干细胞特性, NID1 与干细胞标志物联合可能具有预后预测意义。

关键词: NID1; 卵巢癌; 上皮-间质转化 (EMT); 肿瘤干细胞

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2018)09-0701-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2018.09.A012

NID1 Enhances Cancer Stem Cell Phenotypes of Ovarian Cancer Cells

ZHANG Huan¹, WEN Tao², ZHANG Kai-na¹, HUO Xiao³, CHEN Ruo-yu⁴, ZHOU Ya^{5,6}, ZHANG Ying^{5,6}

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. The First Clinical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4. The Second Clinical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 5. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 6. Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of Nidogen-1 (NID1) on phenotype of cancer stem cell (CSC) of ovarian cancer cells. [Methods] The self-renewal ability of the OVCAR-3 cells and the stable ectopic expression of NID1 were assessed by sphere formation assay, and the expression levels of ovarian CSC markers CD44 and ABCG2 were detected by quantitative RT-PCR and Western blot, respectively. The correlation between NID1 and ovarian CSC markers was examined with bioinformatic analysis, and the prognostic value of these indicators for ovarian cancer was analyzed. [Results] NID1-overexpressed OVCAR-3 cells exhibited significantly greater self-renewal ability ($P=0.006$) and higher level of ovarian CSC markers CD44 and ABCG2, compared with those of the control group ($P=0.000$). After decreasing of ERK1/2 phosphorylation in these cells treated with an MEK inhibitor U0126, the expressions of ovarian CSC markers were diminished. The bioinformatic analysis for two sets of chip data showed that the expression of NID1 was highly correlated with the expression of ovarian CSC markers CD44 ($P=0.006$, $P=0.036$) and ABCG2 ($P=0.000$, $P=0.000$); and the overall survival time of ovarian cancer patients with higher expression of NID1 and CSC phenotype was significantly shorter than others ($P=0.026$; $P=0.000$). [Conclusion] NID1 may induce the

收稿日期: 2018-04-03; 修回日期: 2018-05-28

基金项目: 国家自然科学基金 (81302263); 重庆医科大学大学生科研与创新实验项目 (201628)

通讯作者: 张莹, E-mail: zhangying@cqmu.edu.cn

CSC phenotypes of ovarian cancer by activating ERK/MAPK pathway, and the combination of NID1 with CSC markers may have prognostic value for patients with ovarian cancer.

Key words: Nidogen-1 (NID1); ovarian cancer; epithelial-mesenchymal transition (EMT); cancer stem cells

卵巢癌缺乏有效的早诊手段, 容易出现早期转移扩散, 对化疗药物易耐受。因此, 深入探索卵巢癌转移和化疗耐受的分子机理, 寻找潜在的治疗靶标和预后标志物, 对于制定临床治疗策略具有重要的指导意义。

肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)是指具有干细胞特性的肿瘤细胞, 表现出强致瘤性、自我更新、多向分化潜能和耐药性等特点。普遍认为肿瘤干细胞是造成肿瘤复发的重要原因。在卵巢癌细胞中亦存在卵巢癌干细胞, 表达 CD117、CD44、ABCG2、BMI1、NANOG 等干细胞标志物^[1]。肿瘤干细胞的形成与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)存在密切关联。EMT 是上皮性肿瘤发展进程中的关键事件, 通过促 EMT 转录因子(EMT-inducing transcription factor, EMT-TF)来重塑细胞表型, 使细胞丧失上皮表型而获得间质表型, 并表现出干细胞特性^[2], 进而增强其侵袭转移、抗凋亡、耐药等能力。

Nidogen 家族包括 NID1 和 NID2, 均属于分泌型糖蛋白。作为基膜的重要组成部分, NID1 通过连接基膜其它成分(collagen IV 和 laminin)来稳定基膜的三维结构^[3]。迄今为止, 关于 NID1 在肿瘤中的研究报道极少。*NID1* 基因的启动子区在胃肠肿瘤中呈现高频率的甲基化^[4]; *NID1* 基因的两个单核苷酸多态性(SNP)位点与黑色素瘤相关^[5]; 转录因子 ETV5 直接上调 NID1 表达来增强子宫内膜癌细胞侵袭转移能力^[6]。NID1 促进乳腺癌细胞和黑色素瘤细胞肺转移^[7]。在前期工作中, 我们发现 NID1 是新的候选卵巢癌诊断血浆标志物, 卵巢癌患者外周血中 NID1 蛋白水平明显升高^[8,9]。我们随后又发现 *NID1* 是间质表型相关基因, 它通过激活 ERK/MAPK 通路来诱导卵巢癌细胞发生不完全 EMT, 从而增强卵巢癌细胞侵袭转移能力和顺铂耐药性^[10,11]。NID1 与卵巢癌干细胞之间的联系并不清楚, 但卵巢癌干细胞和

EMT 之间的密切关联提示 NID1 极可能通过 EMT 诱导卵巢癌细胞出现干细胞特性, 进而使其转移能力和耐药性增强。

本研究以稳定过表达外源 NID1 的卵巢癌细胞系 OVCAR-3 为模型, 探讨 NID1 对卵巢癌干细胞表型的潜在影响以及 NID1 与干细胞表型联合对预后预测的潜在价值, 为深入探讨同时靶向 NID1 和干细胞表型的卵巢癌细胞的治疗策略提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

前期在人浆液型卵巢癌细胞株 OVCAR-3 的基础上已成功构建稳定过表达外源 NID1 的单克隆细胞株(命名为 OVCAR-3-NID1-MC)和稳定转染 GV144 质粒的细胞株(命名为 OVCAR-3-vector)^[11], 其中 OVCAR-3-vector 作为阴性对照。常规细胞培养相关试剂购自 Hyclone 公司, 包括 RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶(0.25%)、胎牛血清和青霉素-链霉素溶液(内含 10kU/ml 青霉素和 10mg/ml 链霉素)。无血清细胞培养相关试剂包括血清细胞培养添加剂 B-27(50×)(Gibco 公司)、超低吸附 6 孔细胞培养板(Corning 公司)、重组人成纤维细胞生长因子 bFGF(Cell Signaling Technology 公司)、重组人表皮生长因子 EGF(Cell Signaling Technology 公司)和肝素[生物工程(上海)股份有限公司]。总 RNA 提取及 RT-PCR 相关试剂包括总 RNA 提取试剂盒 Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek 公司)、反转录试剂盒 PrimeScript 1st Stand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa 公司)和荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa 公司)。Western blot 相关试剂包括 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(碧云天生物技术有限公司)、细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司)、PMSF(碧云天生物技术有限公司)、SDS-PAGE 蛋白

电泳上样缓冲液(5×)(碧云天生物技术有限公司)、蛋白浓度测定试剂盒 BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific 公司)、发光试剂盒 Super Signal West Dura (Thermo Scientific 公司)、鼠抗人 NID1 单克隆抗体 (R&D SYSTEMS 公司)、兔抗人 CD44 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司)、兔抗人 ABCG2 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司)、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体 (杭州贤至生物科技有限公司)、兔抗人 EPK1/2 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司)、兔抗人 p-ERK1/2 单克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司)、HRP 标记的兔二抗 (Cell Signaling Technology 公司) 和 HRP 标记的鼠二抗(Santa Cruz 公司)。

1.2 细胞培养与细胞成球实验

采用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基(包含 100 U/ml 青霉素和 100μg/ml 链霉素)培养 OVCAR-3-NID1-MC 细胞和 OVCAR-3-vector 细胞,置于 CO₂ 培养箱(37℃、5%CO₂)。收集对数生长期的 OVCAR-3-NID1-MC 和 OVCAR-3-vector 细胞,消化成单细胞悬液,800r/min 离心 5min 去血清,弃上清,加入 PBS 洗涤 1~2 次,离心后以干细胞条件培养基(添加 20ng/ml EGF、20ng/ml bFGF、4μg/ml 肝素、2% B27、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基)悬浮培养于超低吸附 6 孔细胞培养板中,并静置培养于 CO₂ 培养箱 (37℃、5%CO₂)。以 3000 细胞/孔的数量接种,每组细胞设置 3 个复孔。每隔 2d 观察细胞成球情况,7d 后计数并拍照直径>100μm 的聚合紧密的细胞球。

1.3 抑制剂 U0126 处理细胞

将 OVCAR-3-NID1-MC 细胞加入 6 孔板正常培养,待细胞融合度达到 80%时(次日),加入 U0126 试剂(使其终浓度为 50μmol/L)。等体积 DMSO 溶剂加入对照组。24h 后,提取细胞总蛋白。

1.4 总 RNA 提取与荧光定量 RT-PCR 检测

按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA,并参考反转录试剂盒说明书对 500ng 总 RNA 进行反转录。将反转录 cDNA 产物稀释 20 倍后作为 PCR 的模板,进行荧光定量 PCR 检测。NID1 基因的反应程序如下:95℃预变性 10s;95℃变性 5s,58℃退火 15s,72℃延伸 15s,总共 39 个循环;72℃至 95℃融解曲线分析 5s。其他基因的反应程序如下:95℃预

变性 3min;95℃变性 10s,60℃退火 30s,72℃延伸 15s,总共 39 个循环;65℃至 95℃融解曲线分析 5s。采用 2^{-ΔΔCt} 分析定量 PCR 的结果。反应体系为 10μl,每组样品设置 3 个重复。引物序列见表 1(Table 1)。

Table 1 Primers used for quantitative PCR analysis

Gene	Primer sequences
NID1	F388: 5'-TTATCCCCCTCCATCACTCA-3' R539: 5'-CTCTTGCCTTCTGGTCTGG-3'
CD44	F1657: 5'-GGCATGAGGGATATCGCCAA-3' R1767: 5'-GGCTTGGTGTGTCTTCCT-3'
ABCG2	F2076: 5'-CAGCAGGTCAGAGTGTGGTT-3' R2201: 5'-ACTGAAGCCATGACAGCCAA-3'
GAPDH	F833: 5'-ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3' R1060: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

1.5 总蛋白提取和 Western blot 实验

收集对数生长期的细胞,用 1×PBS 洗涤数次后,加入含 1%PMSF 的细胞裂解液,置于冰上裂解 30min。12 000r/min、4℃离心 15min,取上清液。测定细胞总蛋白浓度后,制备蛋白电泳样品,100℃加热 10min。随后依次进行电泳、湿转、室温封闭 2h、一抗 4℃孵育过夜、洗膜、二抗(稀释比 1:5000)37℃孵育 1h、洗膜、显影曝光。其中,一抗的稀释比分别是:ABCG2(1:500)、CD44(1:1000)、NID1(1:500)、ERK1/2(1:2000)、p-ERK1/2(1:2000)、GAPDH(1:3000)。

1.6 统计学处理

两份卵巢癌相关基因表达谱芯片数据(GSE26712^[12]和 GSE14764^[13])均下载自 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的 Gene Expression Omnibus(GEO)数据库。所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。两组间成球数量的比较、两组间基因表达水平的比较均采用非配对 t 检验。表达谱芯片数据用于 NID1 与 CD44、ABCG2 表达水平的 Pearson 相关分析和 Kaplan-Meier 生存分析。在 Kaplan-Meier 生存分析中,以各自的中位数分别划分 NID1、CD44 和 ABCG2 三者的高表达组和低表达组。NID1 处于高表达水平定义为“NID1+”,否则定位为“NID1-”。CD44 和 ABCG2 同时处于高表达水平定义为“CSC+”,否则定义为“CSC-”,综合考虑 NID1 和卵巢癌干细胞标志物的表达情况,最终将表达谱芯片数据划分为三组,分别是 NID1-/CSC-、NID1+/CSC+、NID1+(-)/CSC-(+)

2 结果

2.1 稳定过表达外源 NID1 增强 OVCAR-3 细胞的自我更新能力

首先采用肿瘤干细胞球形成实验检测稳定过表达外源 NID1 的 OVCAR-3 细胞的自我更新能力(该单克隆细胞株的鉴定已在前期工作中完成^[11])。如图 1A(Figure 1A)所示,OVCAR-3-NID1-MC 细胞的成球直径明显大于 OVCAR-3-vector 细胞。与此同时,与 OVCAR-3-vector 细胞(42 ± 2)相比,OVCAR-3-NID1-MC 细胞形成的肿瘤球数量显著增加(67 ± 8)($P=0.006$)(Figure 1B)。这些结果提示,NID1 可增强卵巢癌细胞 OVCAR-3 的自我更新能力。

2.2 稳定过表达外源 NID1 促进 OVCAR-3 细胞表达卵巢癌干细胞标志物

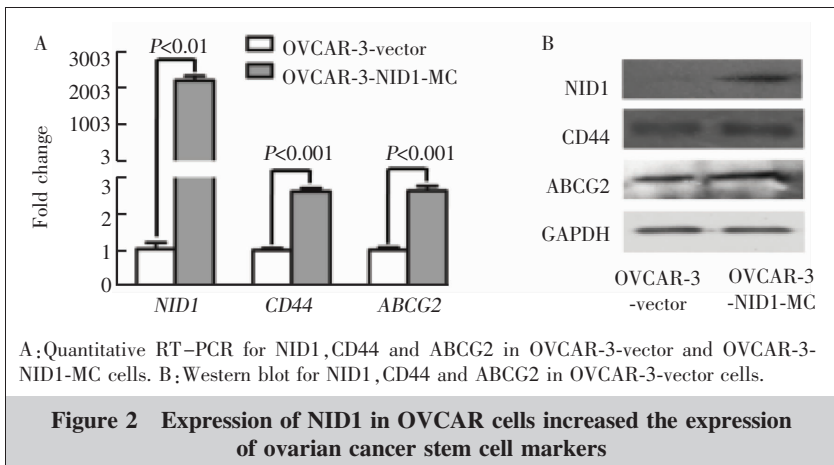
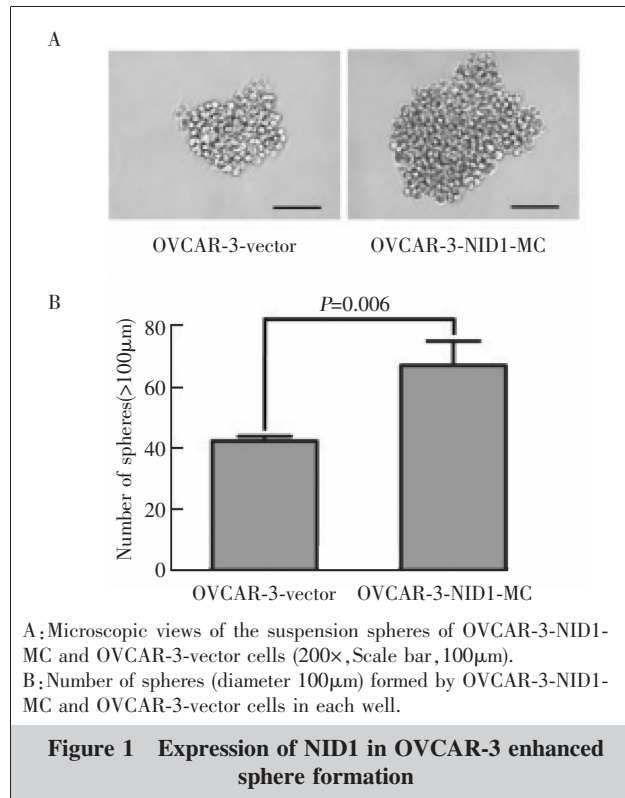
鉴于自我更新能力是肿瘤干细胞的特性之一,我们进一步检测了 OVCAR-3-NID1-MC 细胞中卵巢癌干细胞标志物(CD44 和 ABCG2)的表达情况。定量 RT-PCR 和 Western blot 的结果均显示,较之 OVCAR-3-vector 细胞,OVCAR-3-NID1-MC 细胞中 CD44 和 ABCG2 的 mRNA (NID1: $P=0.001$;CD44: $P<0.001$;ABCG2: $P<0.001$)和蛋白质水平均升高(Figure 2A,2B)。以上结果表明,NID1 可促进卵巢癌细胞 OVCAR-3 出现干细胞特性。

2.3 NID1 通过 ERK/MAPK 通路影响 OVCAR-3 细胞表达卵巢癌干细胞标志物

已发表的工作证实 NID1 通过激活 ERK/MAPK 通路来诱导卵巢癌细胞发生不完全 EMT,从而增强卵巢癌细胞侵袭转移能力和顺铂耐药性^[11],因此我们进一步检测了 ERK/MAPK 通路对卵巢癌干细胞标志物表达的影响。我们采用 ERK/MAPK 通路的抑制剂 U0126 处理 OVCAR-3-NID1-MC 细胞,其 CD44 和 ABCG2 的蛋白水平均降低(Figure 3)。以上结果提示,NID1 极可能通过 ERK/MAPK 通路来增强卵巢癌细胞 OVCAR-3 的干细胞潜能。

2.4 生物信息学分析研究 NID1 是与卵巢癌干细胞标志物相关的预后因子

为了评估 NID1 在卵巢癌临床样本中与卵巢癌



干细胞标志物以及预后的关系,我们从 NCBI 的 GEO 数据库中下载两份卵巢癌肿瘤组织相关的表达谱芯片数据 GSE26712^[12]和 GSE14764^[13],分别包含 185 例和 80 例卵巢癌患者。Pearson 相关分析显示,在这两份表达谱芯片数据中,卵巢癌干细胞标志物 CD44($P=0.006$; $P=0.036$)和 ABCG2($P=0.000$; $P=0.000$)表达水平均与 NID1 的表达水平显著正相关(Figure 4A,4C)。与此同时,基于这两份表达谱芯片数据的 Kaplan-Meier 生存分析均显示,与 NID1-/CSC-组的卵巢癌患者比较,NID1+/CSC+组的卵巢癌

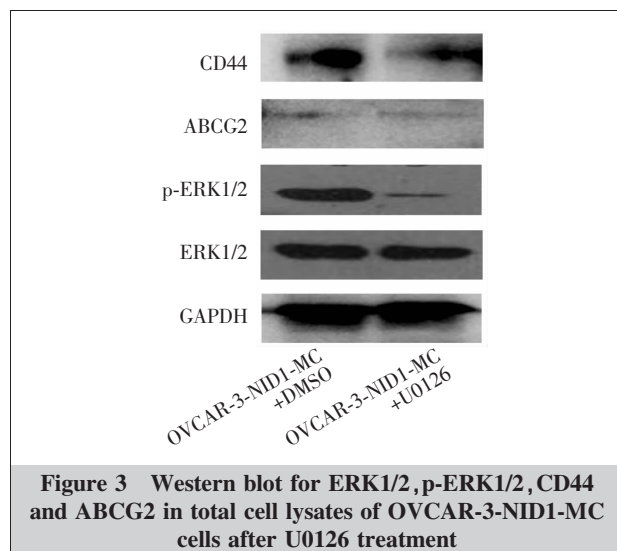


Figure 3 Western blot for ERK1/2, p-ERK1/2, CD44 and ABCG2 in total cell lysates of OVCAR-3-NID1-MC cells after U0126 treatment

患者总体存活时间显著缩短 ($P=0.026$; $P=0.000$) (Figure 4B, 4D)。这些结果提示, NID1 是与卵巢癌干细胞标志物相关的预后分子, 并且两者同时高表达的卵巢癌患者预后差。

3 讨论

缺乏早期诊断标志物、容易出现转移扩散以及

对化疗药物耐受是卵巢癌死亡率高的的重要因素。EMT 通过参与肿瘤细胞远处转移和治疗耐受这两方面来影响肿瘤致死性, 而这两方面又与 EMT 诱导肿瘤细胞出现干细胞特性存在关联^[14]。现普遍认为肿瘤细胞通过 EMT 增强其干细胞特性, 藉此促进自身生长、转移和耐药性等^[2, 14-17], 比如卵巢癌细胞 EMT 表型便与其干细胞特性、耐药性等正相关^[18-21]。

在前期工作中, 我们发现 NID1 是间质表型相关基因, 它诱导卵巢癌细胞发生不完全 EMT, 进而增强卵巢癌细胞侵袭转移能力和顺铂耐药性^[11]。本研究继续揭示 NID1 可促进卵巢癌细胞出现干细胞特性, 表现为自我更新能力的增强 (Figure 1) 和卵巢癌干细胞标志物的表达 (Figure 2)。以上结果证实 NID1 极可能通过诱导卵巢癌细胞 EMT 来促使其向肿瘤干细胞转变, 继而出现转移能力和耐药性的增强。表型可塑性模型 (phenotype plasticity model) 认为分化的肿瘤细胞可通过 EMT 逆转为未分化的肿瘤干细胞, 后者可处于上皮细胞状态或间质细胞状态, 分别称作 EMT-CSC 和 MET-CSC, 两者可相互转变。比如 EMT-CSC 位于肿瘤侵袭前沿, “引领”肿瘤扩张“版图”; MET-CSC 位于肿瘤内部, 加速肿瘤细

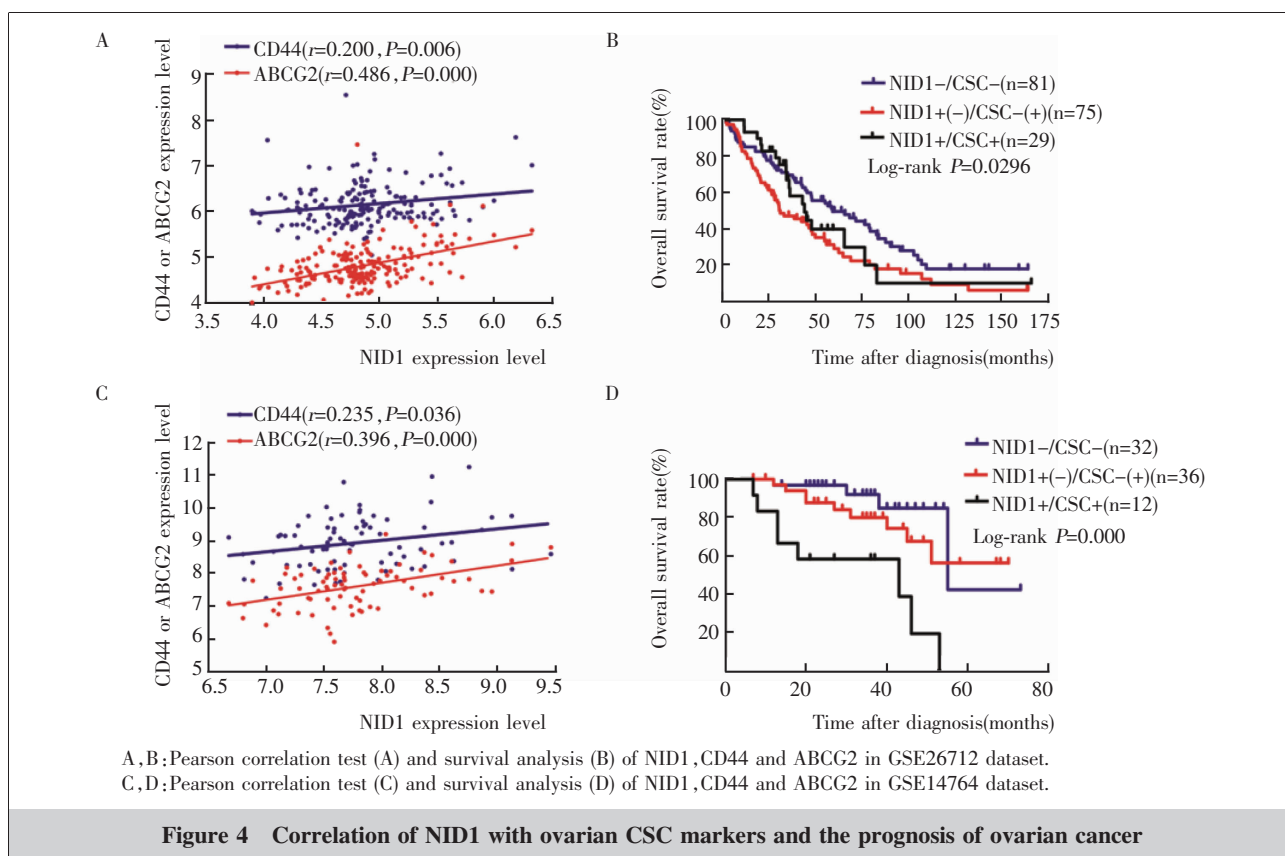


Figure 4 Correlation of NID1 with ovarian CSC markers and the prognosis of ovarian cancer

胞生长。当肿瘤前沿变成肿瘤内部,两类肿瘤干细胞将相互切换模式^[17]。考虑到 NID1 仅诱导卵巢细胞发生不完全 EMT,随之产生的肿瘤干细胞很可能处于 EMT-CSC 和 MET-CSC 之间的状态,即同时携带上皮细胞和间质细胞特征。

鉴于 NID1 通过激活 ERK/MAPK 通路来诱导卵巢癌细胞发生不完全 EMT^[11]以及 EMT 和肿瘤干细胞之间的关联,我们进一步确认 NID1 通过激活 ERK/MAPK 通路增强卵巢癌细胞的干细胞特性,表现之一便是采用 MEK1/2 的抑制剂 U0126 下调 OVCAR-3-NID1-MC 细胞 ERK1/2 的磷酸化水平后,其卵巢癌干细胞标志物 CD44 和 ABCG2 均表达下降 (Figure 3)。已有一系列文献报道在肿瘤细胞中 ERK/MAPK 通路调控 CD44 和 ABCG2 的表达^[22-27]。至于 ERK/MAPK 通路调控 CD44 和 ABCG2 表达的分子机制,值得深入研究。

EMT 和肿瘤干细胞的关联提示肿瘤细胞 EMT 将对肿瘤患者造成双重伤害。一方面,肿瘤细胞通过 EMT 获得一系列恶性表型,包括转移侵袭、抵抗凋亡、治疗耐受等;另一方面,肿瘤细胞通过 EMT 获得干细胞特性,利于自身在新环境中形成转移灶^[28,29]。我们发现 NID1 低表达同时未表现卵巢癌干细胞特性的卵巢癌患者的总体存活时间最长 (Figure 4)。靶向肿瘤干细胞的治疗通过清除肿瘤干细胞来遏制肿瘤,但残留的非肿瘤干细胞可通过 EMT 转变为肿瘤干细胞,最后导致复发和转移。因此,在制定靶向治疗策略时,应考虑到肿瘤细胞的这种表型可塑性,同时靶向具有干细胞特性和 EMT 表型的肿瘤细胞,更能提高治疗效果^[17]。

综上所述,本研究初步证实 NID1 可能诱导卵巢癌细胞出现干细胞特性,其中涉及 ERK/MAPK 通路的活化,因此 NID1 极可能藉此来增强卵巢癌细胞的转移能力和耐药性。与此同时,NID1 与卵巢癌干细胞标志物具有显著的联合预测预后意义,这为深入研究同时靶向 NID1 与卵巢癌干细胞的治疗策略的潜在价值提供了重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Garson K, Vanderhyden BC. Epithelial ovarian cancer stem cells: underlying complexity of a simple paradigm[J]. *Reproduction*, 2015, 149(2): R59-R70.
- [2] Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704-715.
- [3] Kruegel J, Miosge N. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(17): 2879-2895.
- [4] Ulazzi L, Sabbioni S, Miotto E, et al. Nidogen 1 and 2 gene promoters are aberrantly methylated in human gastrointestinal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6: 17.
- [5] Nan H, Xu M, Zhang J, et al. Genome-wide association study identifies nidogen 1 (NID1) as a susceptibility locus to cutaneous nevi and melanoma risk[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(13): 2673-2679.
- [6] Pedrola N, Devis L, Llauro M, et al. Nidogen 1 and nuclear protein 1: novel targets of ETV5 transcription factor involved in endometrial cancer invasion [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32(5): 467-478.
- [7] Aleckovic M, Wei Y, LeRoy G, et al. Identification of Nidogen 1 as a lung metastasis protein through secretome analysis[J]. *Genes Dev*, 2017, 31(14): 1439-1455.
- [8] Li L, Zhang Y, Li N, et al. Nidogen-1: a candidate biomarker for ovarian serous cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45(2): 176-182.
- [9] Zhang Y, Xu B, Liu Y, et al. The ovarian cancer-derived secretory/releasing proteome: a repertoire of tumor markers [J]. *Proteomics*, 2012, 12(11): 1883-1891.
- [10] Zhu YY, Zhang CD, Wang YT, et al. Study of NID1-promoted migration and invasion and its molecular mechanism in ovarian cancer cell OVCAR-3[J]. *Chinese Journal of Cell Biology* 2015, 37(2): 221-228. [朱远远, 张春冬, 王义涛, 等. NID1 促进人卵巢癌细胞 OVCAR-3 侵袭转移及分子机制的研究 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(2): 221-228.]
- [11] Zhou Y, Zhu Y, Fan X, et al. NID1, a new regulator of EMT required for metastasis and chemoresistance of ovarian cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 33110-33121.
- [12] Bonome T, Levine DA, Shih J, et al. A gene signature predicting for survival in suboptimally debulked patients with ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5478-5486.
- [13] Denkert C, Budczies J, Darb-Esfahani S, et al. A prognostic gene expression index in ovarian cancer-validation across different independent data sets[J]. *J Pathol*, 2009, 218(2): 273-280.
- [14] Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer

- [J]. *Oncogene*, 2010, 29(34):4741–4751.
- [15] Pradella D, Naro C, Sette C, et al. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1):8.
- [16] Sato R, Semba T, Saya H, et al. Concise review: stem cells and epithelial-mesenchymal transition in cancer: biological implications and therapeutic targets [J]. *Stem Cells*, 2016, 34(8):1997–2007.
- [17] Jayachandran A, Dhungel B, Steel JC. Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9(1):74.
- [18] Marchini S, Fruscio R, Clivio L, et al. Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(2):520–530.
- [19] Chohanadisai W, Messerli SM, Miller DH, et al. Cisplatin resistant spheroids model clinically relevant survival mechanisms in ovarian tumors[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e151089.
- [20] Wang L, Mezencev R, Bowen NJ, et al. Isolation and characterization of stem-like cells from a human ovarian cancer cell line[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 363(1–2):257–268.
- [21] Davidowitz RA, Selfors LM, Iwanicki MP, et al. Mesenchymal gene program-expressing ovarian cancer spheroids exhibit enhanced mesothelial clearance [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(6):2611–2625.
- [22] Wise R, Zolkiewska A. Metalloprotease-dependent activation of EGFR modulates CD44+/CD24– populations in triple negative breast cancer cells through the MEK/ERK pathway [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 166 (2):421–433.
- [23] He X, Wang J, Wei W, et al. Hypoxia regulates ABCG2 activity through the activation of ERK1/2/HIF-1 α and contributes to chemoresistance in pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17(2):188–198.
- [24] Tomiyasu H, Watanabe M, Sugita K, et al. Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(12):5317–5323.
- [25] Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Fujino Y, et al. The regulation of the expression of ABCG2 gene through mitogen-activated protein kinase pathways in canine lymphoid tumor cell lines[J]. *J Vet Med Sci*, 2014, 76(2):237–242.
- [26] Liu WH, Liu HB, Gao DK, et al. ABCG2 protects kidney side population cells from hypoxia/reoxygenation injury through activation of the MEK/ERK pathway [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(10):1859–1868.
- [27] Imai Y, Ohmori K, Yasuda S, et al. Breast cancer resistance protein/ABCG2 is differentially regulated downstream of extracellular signal-regulated kinase [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(6):1118–1127.
- [28] Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(5–6):396–403.
- [29] Scheel C, Weinberg RA. Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(10):2310–2314.

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。
2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。
3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。
4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。
5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。
6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。
7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。