

# 外源性TGFB1抑制乳腺癌细胞生长的体内外实验

张鹤美<sup>1</sup>, 贺金奖<sup>1</sup>, 高四海<sup>1</sup>, 尉红<sup>1</sup>, 张增利<sup>1</sup>, 童建<sup>1</sup>, Tom K·Hei<sup>2</sup>, 李冰燕<sup>1</sup>

**TGFB1 Inhibits Proliferation of Breast Cancer Cell *in vitro* and *in vivo***

ZHANG Hemei<sup>1</sup>, HE Jinjiang<sup>1</sup>, GAO Sihai<sup>1</sup>, WEI Hong<sup>1</sup>, ZHANG Zengli<sup>1</sup>, TONG Jian<sup>1</sup>, Tom K·Hei<sup>2</sup>, LI Bingyan<sup>1</sup>

1. Department of Health Toxicology, School of Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Center for Radiological Research, Columbia University Medical Center, New York, U.S.A.

Corresponding Author: LI Bingyan, E-mail: bingyanli@suda.edu.cn

**Abstract: Objective** To explore if transforming growth factor- $\beta$  induced gene (TGFB1) could inhibit the proliferation of human breast cancer cell lines MDA-MB-231 *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Ectopic TGFB1 was stably transfected into MDA-MB-231. Cell proliferation, cell cycle, soft agar cloning efficiency, protein expression of P21 and P53 were analyzed to test tumorigenicity of human breast cancer cells. **Results** Ectopic TGFB1 was expressed highly and stably in MDA-MB-231 cells, with the significant decrease of cells proliferation rate. Compared with V23101 transfected with empty plasmid, ectopic TGFB1 expression resulted in a significant decrease of relative soft agar colony formation number by 90.89%. Tumor cells transfected with TGFB1 were arrested in the G<sub>1</sub> phase and delayed into the S phase. Ectopic TGFB1 reduced tumorigenicity by 16.99% and delayed the incubation of tumor growth. **Conclusion** TGFB1 could inhibit the proliferation of human breast cancer cell *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** TGFB1; Human breast cancer; Proliferation; *in vitro*; *in vivo*

**摘要: 目的** 研究转化生长因子 $\beta$ 诱导基因 (transforming growth factor- $\beta$  induced gene, TGFB1) 是否能抑制人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)的体内外增生。**方法** 将外源性TGFB1稳定转染到人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)中, 测定细胞增殖率、细胞周期、软琼脂克隆形成率及P21、P53蛋白表达变化, 检测乳腺癌细胞的致瘤性。**结果** 外源性TGFB1在人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)中能够稳定地高表达; 外源性TGFB1可以明显地抑制乳腺癌细胞因血清生长因子刺激的增生; 与转染空质粒的对照组细胞V23101比较, 外源性TGFB1相对软琼脂克隆形成数减少了90.89%; TGFB1可以使乳腺癌细胞阻滞在G<sub>1</sub>期, 延缓其进入S期的时间。外源性TGFB1可以延长裸鼠肿瘤发生的潜伏期, 并降低肿瘤发生率。**结论** TGFB1能够抑制人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)的体内外增生。

**关键词:** 转化生长因子 $\beta$ 诱导基因; 人乳腺癌; 细胞增殖; 体内; 体外

**中图分类号:** R73-3; R737.9 **文献标识码:** A

## 0 引言

乳腺癌在女性癌症死因中占首位<sup>[1]</sup>, 且因其新发病例最多<sup>[2]</sup>, 发病年龄呈年轻化趋势, 严重威胁女性健康。但乳腺癌患病原因和恶性进程的精确分子机制仍不十分清楚。

转化生长因子 $\beta$ 诱导基因 (transforming growth factor- $\beta$  induced gene, TGFB1) 也被称为Betaig-3,

是一种由TGF- $\beta$ 诱导的分泌蛋白, 最初认为其与肿瘤相关, 是因为发现TGFB1能够使接种裸鼠体内肿瘤细胞的致瘤能力减弱<sup>[3]</sup>。最近研究发现, TGFB1的FAS1结构域有抑制肿瘤作用, 表现在抑制肿瘤生长、血管发生及促凋亡作用<sup>[4]</sup>。Zhao等<sup>[4-8]</sup>发现很多肿瘤细胞中TGFB1表达下降, 并且体内、外实验都发现外源性TGFB1能够抑制肿瘤细胞的恶性转变。

本研究将外源性TGFB1转染到人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)中, 得到稳定性表达TGFB1的细胞株, 观察TGFB1对乳腺癌细胞的生长和侵袭是否具有抑制作用。

收稿日期: 2013-04-29; 修回日期: 2013-08-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072286); 江苏省自然科学基金资助项目(SBK201221995)

作者单位: 1. 215123 苏州, 苏州大学公共卫生学院卫生毒理学教研室; 2. 哥伦比亚大学放射研究中心

通信作者: 李冰燕, E-mail: bingyanli@suda.edu.cn

作者简介: 张鹤美 (1987-), 女, 硕士在读, 主要从事妇科肿瘤的防治

## 1 材料与方法

### 1.1 TGFBI转染及鉴定

人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231)来源于美国模式培养物集库存,使用DMEM完全培养液(英杰公司,美国),10%胎牛血清(Gibco公司,美国),100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素,100  $\text{u/ml}$ 青霉素。TGFBI转染的主要过程为:制备4  $\mu\text{g}$ 载体pRc/CMV2-TGFBI或pRc/CMV2-空载体与转染试剂Lipofectamine Plus(英杰公司,美国)混合后,加入已接种细胞的6孔培养板培养3 h;然后换完全培养液继续培养72 h。按1:10比例把已转染TGFBI或空载体的细胞分到100 mm的培养板中,在400  $\text{mg/ml}$ 的G418培养液(Sigma公司,美国)中培养,挑选稳定性表达TGFBI或空载体的抗性集落。

采用实时定量PCR检测TGFBI mRNA的表达。TRIzol (Invitrogen公司,美国)提取细胞总RNA;RT试剂盒(英杰公司,美国)将提取的总RNA反转录成cDNA;实时定量PCR仪7300(AB公司,美国),用SYBR Green定量分析TGFBI mRNA。内参基因GAPDH(目录号PPH00150E),靶基因TGFBI(目录号PPH01904B)。PCR循环参数:95 $^{\circ}\text{C}$  15 min;95 $^{\circ}\text{C}$  30 s,55 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s,40个循环。实验结果以倍数的变化 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示, $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{TGFBI}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}$ , $\Delta\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{样品}} - \text{Ct}_{\text{对照}}$ 。

细胞培养24 h提取蛋白,加10%的三氯乙酸后离心,用丙酮洗涤沉淀物两次,室温干燥;加50  $\mu\text{l}$ 上样缓冲液煮沸5 min,上样,Western blot法检测细胞培养上清液中TGFBI蛋白的表达。免疫组织化学方法鉴定TGFBI在细胞内分布情况。使用染色试剂盒(Vector Laboratories公司,美国),先用1.5%马血清封闭样品,加1:1 000的人抗TGFBI单抗(Minneapolis公司,美国)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,PBS洗3次后;加1:5 000的二抗,室温孵育30 min,加VECTASTAIN Elite ABC室温反应30 min,最后加DAB(3,3'-二氨基联苯胺)底物显色6 min,双蒸水冲洗;酒精梯度脱水后,加封片剂封固样品。在BX60奥林巴斯显微镜下观察TGFBI蛋白在细胞内的分布。

### 1.2 细胞增殖测定

细胞增殖测定试剂盒(英杰公司,美国)检测细胞增殖,先用无血清的DMEM培养液培养细胞36h,然后换用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养0、12、16、20及24后用PBS冲洗,加入100  $\mu\text{l}$ 染料结合液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。使用酶标仪(Bio-Tec公司,美国)测定荧光强度。细胞增殖

率用增加的荧光强度百分数表示,即增加的百分比 = (n 时的荧光强度 - 0时的荧光强度) / 0时的荧光强度。

### 1.3 软琼脂克隆形成测定

将1 000个细胞与1 ml 0.35%琼脂糖混合,接种于底部铺有0.75%琼脂糖的培养皿中,每组4个平行样本。在10倍显微镜下观察并计算集落数,实验结果用相对集落数表示,即相对克隆形成数 = 外源性TGFBI表达细胞的克隆形成数 / 母代细胞的克隆形成数。

### 1.4 细胞周期分析

无血清培养液培养细胞36 h,使细胞周期同步化于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。换用含10%胎牛血清的培养液培养,在0、4、8、12、16、20及24 h后,收集包括培养液中悬浮的全部细胞,75%冰乙醇4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,用PI标记细胞,流式细胞仪(BD公司,美国)分析细胞周期。

### 1.5 Western blot检测

将细胞接种于100 mm的培养皿中,使细胞同步化于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,换用10%胎牛血清培养液刺激细胞进入新的细胞周期,在血清刺激后的不同时间点,用冷的PBS冲洗细胞。用细胞裂解液(50 mM Tris-HCl, pH8, 150 mM NaCl, 1% SDS, 1 mM PMSF)提取蛋白质,用蛋白浓度试剂盒(美国伯乐公司)测蛋白浓度,取30  $\mu\text{g}$ 蛋白质加入到50  $\mu\text{l}$ 的上样缓冲液中煮沸5 min,上样于10%~20% SDS胶(伯乐公司,美国),在电压20V的条件下电泳2~4 h,在半干燥条件下将蛋白样品转移到PVDF膜上。洗膜,5%脱脂牛奶封闭,分别加入1:1 000的P21、P53或 $\beta$ -actin一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,洗膜三次;1:5 000的二抗孵育2 h,洗膜三次;ECL显色液(Amersham Biosciences公司,美国),全自动洗片机(KODAK公司,美国)进行全自动显色、洗片和烘干。

### 1.6 体内致瘤性检测

2月龄裸鼠饲养在特殊的无病原体的环境中,小鼠可以自由进食,饮水,日光/黑暗为12 h/12 h。每组皮下注射 $5 \times 10^6$ 个肿瘤细胞于裸鼠背部。每周称体重,观察肿瘤的发生情况,注射细胞16周后处死裸鼠。

### 1.7 免疫组织化学染色

将裸鼠皮下取出的肿瘤组织用10%福尔马林固定一周左右,送病理室进行脱水、石蜡包埋、切片后,进行Ki67和MECA-32的免疫组织化学染色。一抗分别是Ki67和MECA-32,浓度为1:100。每

个样品随机选择5个视野共100个细胞，计数细胞核或胞质呈棕黄色的Ki67或MECA-32的阳性细胞数，数据以相对阳性细胞百分比表示，即阳性细胞减少率 = (实验组-对照组) / 对照组。

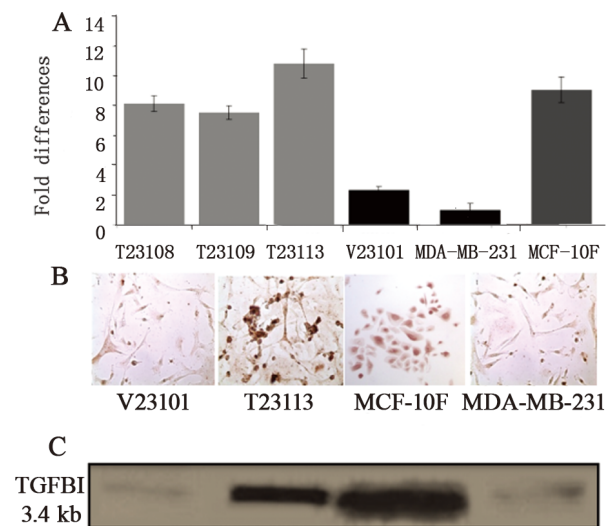
## 1.8 统计学方法

采用SPSS 17.0进行统计学分析，各组实验数据均重复3次，以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。先作方差齐性检验，再用 $t$ -test进行两个均数之间的比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TGFBI稳定性表达细胞株的鉴定

将外源性pRc/CMV2-TGFBI载体转染到MDA-MB-231中，转染细胞株命名为T231，从中挑选T23108、23109和T23113细胞株用于本研究。实时定量PCR结果显示，T23108、23109和T23113细胞株中TGFBI mRNA表达明显高于其母代MDA-MB-231细胞，与永生化乳腺上皮细胞MCF-10F中的表达一致，见图1A。免疫组织化学结果显示，T23113的细胞质和细胞核中均有TGFBI蛋白的表达，见图1B。Western blot结果显示，T23113细胞培养上清液中TGFBI蛋白也明显高于母代细胞，见图1C。以上结果表明，外源性TGFBI转染后得到了稳定性高表达的乳腺癌细胞株，接近于永生化乳腺上皮细胞MCF-10F中TGFBI的表达。



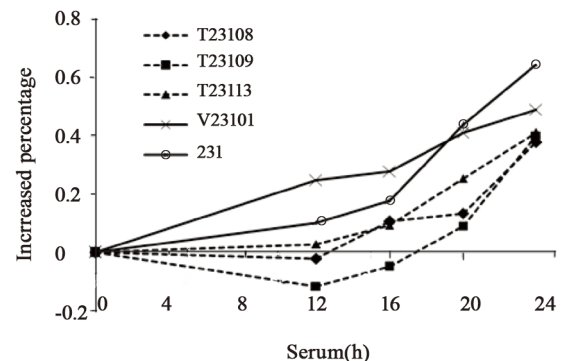
A: the fold change of TGFBI mRNA expression level of the stable transfected cells calculated by  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ; B: TGFBI protein expression in MDA-MB-231 transfected with TGFBI detected by immunohistochemical staining (DAB); C: TGFBI protein expression in MDA-MB-231 transfected with TGFBI detected by Western blot

图1 外源性TGFBI稳定性转染的乳腺癌细胞株中mRNA和蛋白表达

Figure1 Expression of mRNA and protein in breast cancer cells transfected with ectopic TGFBI

### 2.2 外源性TGFBI对乳腺癌细胞增殖的影响

图2的结果表明，母代MDA-MB-231细胞在血清刺激后12 h和24 h的增殖率分别为5.02%和64.44%，而外源性TGFBI表达的T23108、T23109和T23113细胞在血清刺激后的12 h，细胞几乎没有增殖，在血清刺激后24 h的平均增殖率为39.62%。说明外源性TGFBI可以明显地抑制乳腺癌细胞因血清生长因子刺激的增殖。



Cell proliferation was assessed by CyQUANT NF proliferation kit at indicated times after serum stimulation. Proliferation rate was expressed as increased percentages = (fluorescence density at nh - fluorescence density at 0h) / Fluorescence density at 0 h

图2 稳定转染外源性TGFBI与母代乳腺癌细胞株MDA-MB-231增殖率比较

Figure2 Comparison of proliferation rates of parental ectopic MDA-MB-231 cells and cells transfected with ectopic TGFBI

### 2.3 外源性TGFBI对乳腺癌细胞锚着独立性生长的影响

与转染空质粒的V23101细胞相比，外源性TGFBI表达的细胞T23113，形成了较少的克隆 ( $P < 0.01$ )，相对软琼脂克隆形成数减少了90.89%，表明TGFBI显著地抑制了乳腺癌细胞的锚着独立性生长能力，见图3。

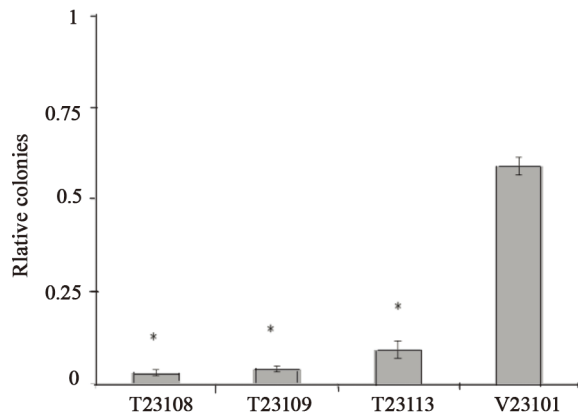
### 2.4 外源性TGFBI对乳腺癌细胞周期的影响

细胞周期同步化后，外源性TGFBI表达和母代乳腺癌细胞处在 $G_1$ 期的比例分别是68.57%和64.29%。血清刺激后的不同时间，与母代细胞相比较，外源性TGFBI表达的细胞处于 $G_1$ 期的比例明显增多 ( $P < 0.05$ )，而处于S期细胞比例减少，尤其是在血清刺激后16 h更为明显 ( $P < 0.05$ )。表明外源性TGFBI使乳腺癌细胞阻滞于 $G_1$ 期，延缓细胞分裂的进程，结果与2.2对细胞增殖的影响结果相一致。

### 2.5 TGFBI对细胞周期调节蛋白P21和P53表达的影响

转染空载体的V23101细胞与母代乳腺癌细胞一样，在血清刺激后12和24 h时P21和P53表达没有明显变化，而外源性TGFBI表达的T23113细胞

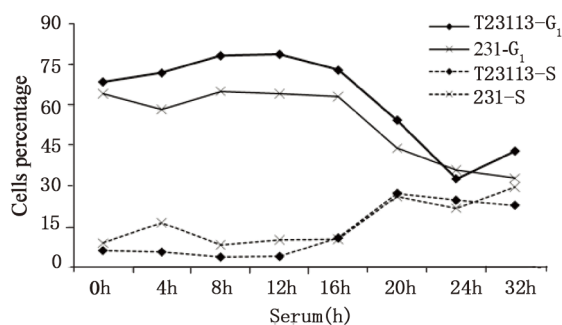




Data were expressed as relative colonies = (colonies in TGFBI-expression tumor cells) / (colonies in parental tumor cells), \*:  $P < 0.01$ , compared with V23101 transfected with vector control

图3 转染外源性TGFBI与空质粒的乳腺癌细胞株锚定独立性生长能力比较

**Figure3 Comparison of anchorage independent growth of breast cancer cell lines transfected with ectopic TGFBI and MDA-MB-231 cells**



Line graph and plot illustrated the distribution of cells in the G<sub>1</sub> and S phases over a time period of 32h

图4 外源性TGFBI对乳腺癌细胞周期的影响

**Figure4 Effects of ectopic TGFBI on cell cycle of breast cancer cells**

在血清刺激12和24 h时, P21和P53表达明显增多, 见图5。实验结果提示, TGFBI是通过上调P21和P53表达延缓乳腺癌细胞进入S期的。

## 2.6 TGFBI对乳腺癌细胞体内致瘤性的影响

### 2.6.1 外源性TGFBI对裸鼠成瘤性的影响

在注射母代乳腺癌细胞后第4周, 裸鼠开始出现肿瘤包块, 至第5周时, 所有注射母代和空载体的MDA-MB-231细胞的裸鼠都发现肿瘤, 肿瘤发生率100%; 而注射外源性TGFBI表达T23108、T23109和T23113细胞的裸鼠至第6周时才发现有肿瘤包块。至注射后第12周时, TGFBI组的肿瘤发生率为83.33%[(3+4+3)/(4+4+4)], 见表1。说明外源性TGFBI表达使裸鼠肿瘤发生潜伏期延长了2周, 发生率也减少了16.7%。

### 2.6.2 外源性TGFBI对肿瘤组织细胞增殖的影响

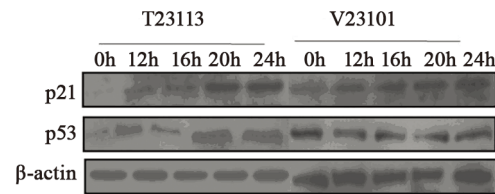
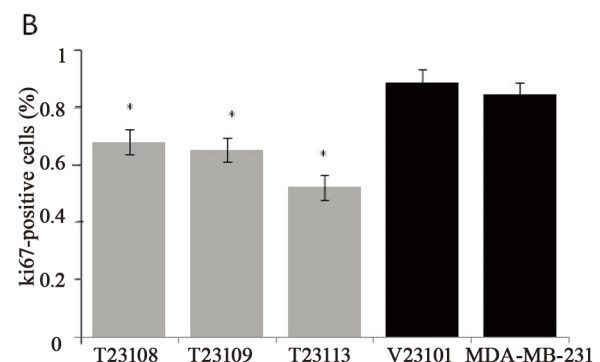
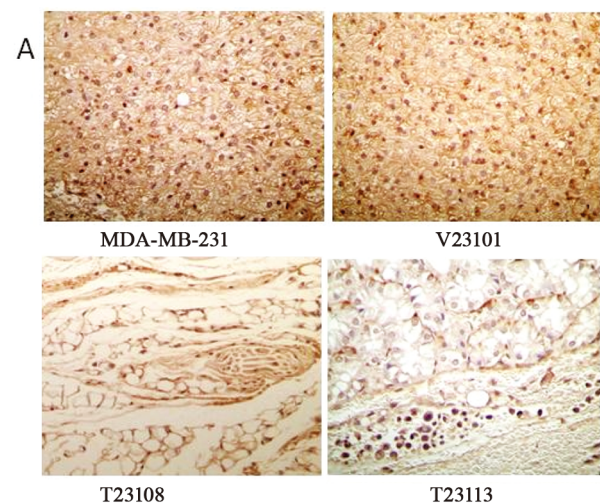


图5 外源性TGFBI对乳腺癌细胞P21和P53瞬时表达的影响  
**Figure5 Effects of ectopic TGFBI on temporal expressions of breast cancer cells P21 and P53**

Ki67是肿瘤组织中细胞增殖的标志蛋白, 可证明TGFBI对体内肿瘤细胞生长的影响。结果显示, 与对照组相比较, 注射T23108、T23109和T23113细胞后, 肿瘤组织中Ki67表达位于细胞核内, 呈棕黄色, 见图6A, 阳性细胞的百分比平均减少了33.84%, 见图6B。说明外源性TGFBI可以抑制肿瘤组织中细胞的增殖, 这与TGFBI抑制乳腺癌细胞体外生长的结果一致。



A: Immunohistochemical staining of Ki67 protein in nude mice subcutaneously injected with breast cancer cells transfected with TGFBI; B: data showed relative percentage of positive cells, \*:  $P < 0.01$ , compared with V23101 cells

图6 外源性TGFBI对裸鼠体内肿瘤组织中Ki67表达的影响  
**Figure6 Effects of TGFBI on Ki67 expression in nude mice tumor tissue *in vivo***

表1 转染TGFB1的乳腺癌细胞对裸鼠体内肿瘤发生率的影响  
Figure1 Effects of breast cancer cells transfected with ectopic TGFB1 on tumor occurrence rate of nude mice *in vivo*

Cell lines	Mice	Tumors	Occurrence rate(%)
MDA-MB-231	6	6	100
V23113	6	6	100
T23108	4	3	75
T23109	4	4	100
T23113	4	3	75

### 3 讨论

TGFB1是TGF- $\beta$ 诱导分泌的一种细胞外分泌蛋白 (ECM)，也被称为 $\beta$ ig-H3。TGFB1参与多种生理过程，包括细胞形态、黏附、转移、血管发生及炎症<sup>[9]</sup>。小鼠胚胎组织的研究发现<sup>[10]</sup>，胚胎发育各阶段的许多组织间质都可以检测到TGFB1的高表达，提示TGFB1对正常组织的发育是不可缺少的。本研究也发现在永生化的乳腺上皮细胞MCF-10F中，TGFB1蛋白不仅存在于培养细胞的上清液中，也存在于细胞质和细胞核中，并且证实了外源性TGFB1可以在乳腺癌MDA-MB-231细胞中稳定性表达。Zhao等<sup>[4]</sup>发现在放射诱导的恶变BEP2D细胞中TGFB1表达降低，过表达TGFB1后，肿瘤细胞克隆形成率下降，同时裸鼠成瘤率也下降，对130例人肺癌组织进行免疫组织化学分析发现，有45个肺癌组织表现为TGFB1低表达。本研究体外实验结果表明，外源性TGFB1可能抑制乳腺癌细胞的增殖，并且显著地抑制了乳腺癌细胞的锚着独立性生长能力；体内实验结果也发现，外源性TGFB1可抑制乳腺癌细胞增殖，从而降低乳腺癌发生率，这与以上研究结果相一致，提示TGFB1对乳腺癌细胞的生长也存在抑制作用。但是，TGFB1抑制肿瘤细胞生长的机制尚不明确。Wen等<sup>[11]</sup>研究发现，TGFB1可以抑制肺癌和乳腺癌细胞的体内外增殖，并且发现这种抑制作用与减少软琼脂克隆形成能力、激活MMP2/9酶的活性，从而提高细胞外基质穿透能力有关。

本研究结果显示，外源TGFB1能够使乳腺癌细胞阻滞于G<sub>1</sub>期，从而减少进入S期的细胞，抑制肿瘤细胞的增殖。有研究者发现<sup>[12]</sup>，TGFB1缺陷小鼠胚胎成纤维细胞更易发生染色体畸变，细胞增殖活性增强，细胞复制过早进入S期，从而增加癌变几率。这与本研究结论相符。TGFB1是否通过这一途径调节细胞周期，还需要进一步研究。

细胞周期在G<sub>1</sub>期停留是为了检查DNA完整性，主要是P53发挥作用。正常状态下，P53蛋白含量低，当细胞异常时，p53基因活化，作用于

p21、DNA修复基因及Bax基因。p21基因活化后通过抑制CDK及参与DNA复制的蛋白质，阻止细胞进入S期，从而控制细胞增殖。本研究发现外源性TGFB1可以使乳腺癌细胞P53和P21的瞬时表达增高，与细胞周期停滞在G<sub>1</sub>期相一致，说明调控p53和p21基因是TGFB1影响细胞周期的一个途径。但精确的分子途径仍需进一步研究。

综上所述，TGFB1可以明显抑制乳腺癌细胞增殖，作为乳腺癌治疗的肿瘤抑制基因，具有潜在的应用价值。

### 参考文献:

- [1] Chen WQ,Zeng HM,Zheng RS,*et al.*Cancer incidence and mortality in China,2007[J].Chin J Cancer Res,2012,24 (1):1-8.
- [2] Siegel R,Naishadham D,Jemal A.Cancer statistics 2012[J].CA Cancer J Clin,2012,62(1):10-29.
- [3] Nam JO,Jeong HW,Lee BH,*et al.*Regulation of tumor angiogenesis by fastatin,the fourth FAS1 domain of betaig-h3,via alphavbeta3 integrin[J].Cancer Res,2005,65 (10):4153-61.
- [4] Zhao YL,Piao CQ,Hei TK.Overexpression of Betaig-h3 gene downregulates integrin alpha5beta1 and suppresses tumorigenicity in radiation-induced tumorigenic human bronchial epithelial cells[J]. Br J Cancer,2002,86 (12): 1923-8.
- [5] Zhao YL,Piao CQ,Hei TK.Downregulation of Betaig-h3 gene is causally linked to tumorigenic phenotype in asbestos treated immortalized human bronchial epithelial cells[J]. Oncogene,2002,21 (49):7471-7.
- [6] Zhao Y,El-Gabry M,Hei TK.Loss of Betaig-h3 protein is frequent in primary lung carcinoma and related to tumorigenic phenotype in lung cancer cells[J].Mol Carcinog,2006,45(2):84-92.
- [7] Ahmed AA,Mills AD,Ibrahim AE,*et al.*The extracellular matrix protein TGFB1 induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel[J].Cancer Cell,2007,12(6):514-27.
- [8] CaoYM,Zhang HM,Gao SH,*et al.*Transforming growth factor- $\beta$  induced gene inhibits cell proliferation of malignant mesothelioma in vitro[J].Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2013,40(12):1123-7.[曹艳梅,张鹤美,高四海,等.转化生长因子 $\beta$ 诱导的基因抑制恶性间皮瘤细胞增殖的体外研究[J].肿瘤防治研究,2013,40(12):1123-7.]
- [9] Thapa N,Lee BH,Kim IS.TGFB1p/betaig- h3 protein: a versatile matrix molecule induced by TGF-beta[J].Int J Biochem Cell Biol,2007,39 (12), 2183-94.
- [10] Schorderet DF,Menasche M,Morand S,*et al.*Genomic characterization and embryonic expression of the mouse Bigh3 (Tgfb1) gene[J]. Biochem Biophys Res Commun,2000,274(2),267-74.
- [11] Wen G,Partridge MA,Li B,*et al.*TGFB1 expression reduces in vitro and in vivo metastatic potential of lung and breast tumor cells[J]. Cancer Lett,2011,308(1): 23-32.
- [12] Zhang Y,Wen G,Shao G,*et al.* TGFB1 deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development[J]. Cancer Res, 2009, 69(1): 37-44.

[编辑校对: 安 凤]