

[文章编号] 1671-587X(2024)01-0143-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240118

下调 HMGB2 表达对肝癌 LM3 细胞上皮-间质转化的抑制作用及其 AKT/mTOR 信号通路机制

魏雁虹¹, 杨晨雪¹, 杨广民¹, 宋帅¹, 李明¹, 杨海娇¹, 魏海峰²

(1. 吉林省人民医院医学检验中心, 吉林 长春 130021; 2. 吉林省人民医院生物治疗与基因诊断重点实验室, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨下调肝癌细胞中高迁移率族框蛋白 2 (HMGB2) 表达对肝癌细胞生物学行为及上皮-间质转化 (EMT) 进程的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 对数生长期的人肝癌 LM3 细胞分为阴性对照组和 HMGB2 RNA 干扰组 (HMGB2 siRNA 组), 分别以 Lipofectamin 2000 为载体转染无关序列的 RNA 寡核苷酸 (RNA oligo) 和敲除 HMGB2 序列的 RNA oligo。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法和 Western blotting 法检测 2 组细胞中 HMGB2 mRNA 和蛋白表达水平, 分别采用细胞划痕实验和 Transwell 小室实验检测 2 组细胞的迁移和侵袭能力, 采用 Western blotting 法检测 2 组细胞中 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 和蛋白激酶 B (AKT) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路相关蛋白表达水平。**结果:** 与阴性对照组比较, HMGB2 siRNA 组细胞中 HMGB2 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), HMGB2 siRNA 组细胞划痕愈合率明显降低 ($P < 0.01$), 侵袭细胞数明显减少 ($P < 0.01$), 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), N-cadherin、Vimentin、mTOR、AKT 和磷酸化 AKT (p-AKT) 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** 下调 HMGB2 的表达可降低肝癌 LM3 细胞迁移和侵袭能力并抑制 EMT, 其作用机制可能与参与调节 AKT/mTOR 通路相关蛋白表达有关。

[关键词] 肝肿瘤; 高迁移率族框蛋白 2; 上皮-间质转化; 细胞迁移; 细胞侵袭; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Inhibitory effect of downregulating HMGB2 expression on epithelial-mesenchymal transition of liver cancer LM3 cells and its AKT/mTOR signaling pathway mechanism

WEI Yanhong¹, YANG Chenxue¹, YANG Guangmin¹, SONG Shuai¹, LI Ming¹,
YANG Haijiao¹, WEI Haifeng²

(1. Medical Laboratory Center, People's Hospital, Jilin Province, Changchun 130021, China;

2. Key Laboratory of Biotherapy and Gene Diagnosis, People's Hospital, Jilin province,
Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of downregulating of high mobility group box protein 2

[收稿日期] 2023-03-20

[基金项目] 吉林省科技厅自然科学基金项目 (20200201346JC)

[作者简介] 魏雁虹 (1975—), 女, 吉林省长春市人, 副主任技师, 医学硕士, 主要从事临床检验诊断学和肿瘤早期诊断方面的研究。

[通信作者] 魏海峰, 副研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: whfweb@163.com)

(HMGB2) expression on the biological behavior of the liver cancer cells and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process, and to clarify its mechanism. **Methods:** The human liver cancer LM3 cells at logarithmic growth phase were divided into negative control group and HMGB2 RNA interference group (HMGB2 siRNA group); the cells in two groups were transfected with RNA oligonucleotides (RNA oligos) with irrelevant sequences and RNA oligos designed to knock down HMGB2, and the Lipofectamine 2000 was regarded as the vector. The expression levels of HMGB2 mRNA and protein in the cells in two groups were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blotting methods; cell scratch assay and Transwell chamber assay were used to detect the migration and invasion abilities of the cells in two groups; the expression levels of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin proteins and protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway related proteins in the cells in two groups were detected by Western blotting method. **Results:** Compared with negative control group, the expression levels of HMGB2 mRNA and protein in the cells in HMGB2 siRNA group were significantly decreased ($P < 0.05$), the cell scratch healing rate was significantly decreased ($P < 0.01$), the number of invasion cells was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression level of E-cadherin protein in the cells was significantly increased ($P < 0.01$), while the expression levels of N-cadherin, Vimentin, mTOR, AKT, and phosphorylated AKT (p-AKT) proteins in the cells were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Downregulating the expression of HMGB2 can reduce the migration and invasion abilities of the liver cancer LM3 cells and inhibit the EMT, and its mechanism may be related to regulating the expression of the AKT/mTOR pathway related proteins.

KEYWORDS Liver carcinoma; High mobility group box protein 2; Epithelial-mesenchymal transition; Cell migration; Cell invasion; Protein kinase B/mammalian target of rapamycin

高迁移率族框蛋白2 (high mobility group box protein 2, HMGB2) 作为高迁移率族蛋白 (high mobility group protein, HMG) 家族成员之一, 广泛参与多种重要的核内生物学功能, 包括调节DNA复制、转录、重组和修复等^[1-2]。研究^[3-5]显示: HMGB2在多种肿瘤组织中的表达均存在异常, 肝癌组织中HMGB2表达高于正常组织, 并且与肝癌的严重程度和预后呈正相关关系。研究^[6]表明: HMG家族成员可能是一种新型的上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 介导体, 在肿瘤的侵袭和转移方面发挥重要作用。但有关HMGB2与肝癌EMT之间的关系尚未完全阐明。本研究拟通过体外实验, 探讨采用小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 下调肝癌细胞中HMGB2表达对肝癌细胞迁移和侵袭的影响, 并从如何调控EMT进程的角度阐明HMGB2的作用机制, 为揭示HMGB2在肝癌转移和复发中的作用提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人肝癌LM3细胞株 (WHELAB C1010) 购自上海盈湾生物科技有限公司。DMEM高糖培养基购自德国Brand公司,

青-链霉素双抗购自美国Gibco公司, 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国CLARK公司, RIPA裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司, 总RNA提取剂 (TRIzol) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 逆转录试剂盒和实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒均购自北京全式金生物有限公司, E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 和磷酸化AKT (phosphorylated AKT, p-AKT) 一抗及二抗均购自美国Abcam公司, RNA oligo购自苏州吉玛基因股份有限公司, Lipofectamine 2000购自法国Polyplus公司。倒置光学显微镜购自日本Olympus公司, 7500 Fast型荧光定量PCR仪购自美国ABI公司, 电泳仪购自美国Wealtec公司, 全自动化学发光图像分析系统购自上海Tanon公司。

1.2 细胞培养 LM3细胞采用含10% FBS和1%青-链霉素双抗的DMEM高糖培养基于37℃、5%CO₂条件下孵育。当细胞融合度达80%~100%时消化传代。

1.3 细胞分组和处理方法 当LM3细胞生长至对数生长期时, 将细胞消化, 铺于6孔细胞培养板中。将细胞分为阴性对照组和HMGB2 RNA干扰组(HMGB2 siRNA组), 分别转染RNA干扰无关序列和HMGB2 siRNA。RNA寡核苷酸(RNA oligonucleotides, RNA oligo)(GCAGUCAGCC-AAAGAUAAATT)由苏州吉玛基因股份有限公司设计并通过化学合成法合成。转染时以Lipofectamin 2000为载体, 按照说明书进行操作。

1.4 RT-qPCR法检测2组细胞中HMGB2 mRNA表达水平 细胞分组见“1.3”。细胞转染24 h后, 采用TRIzol试剂(每孔100 μ L)提取细胞总RNA, 逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA, 采用SYBR Green 荧光定量PCR试剂盒进行RT-qPCR检测, 实验重复3次。PCR引物序列: HMGB2, F 5'-GTGAAATGTGGTCTGAGCAGTC-3', R 5'-CCTGCTTCACTTTTGCCCTTGG-3'; 18S, F 5'-CATTCGAACGTCTGCCCTAT-3', R 5'-GATGTGGTAGCCGTTTCTCA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算2组细胞中HMGB2 mRNA表达水平。

1.5 细胞划痕实验检测2组细胞划痕愈合率 细胞分组见“1.3”。取对数生长期的LM3细胞接种于6孔细胞培养板, 24 h后细胞汇合度达100%时, 采用枪头小侧划破细胞中轴, 进行转染并换液。以上实验每组重复2次。于转染0、24、48和72 h时用显微镜拍摄划痕的愈合程度, 计算细胞划痕愈合率, 细胞划痕愈合率=(0 h细胞划痕宽度-不同时间点细胞划痕宽度)/0 h细胞划痕宽度 \times 100%。

1.6 Transwell小室实验检测2组细胞中侵袭细胞数 细胞分组见“1.3”。采用含5%FBS的DMEM培养基将2组LM3细胞制成密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 每个Transwell小室上层中加入100 μ L细胞悬液, 小室下方加入含10%FBS的DMEM培养基500 μ L。培养48 h后, 结晶紫染色, 显微镜拍照, 记录侵入小室下方的细胞数量, 即侵袭细胞数。以上实验每组重复3次。

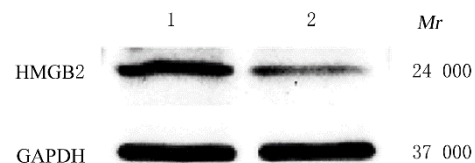
1.7 Western blotting法检测2组细胞中HMGB2、EMT相关蛋白和AKT/mTOR通路相关蛋白表达水平 细胞分组见“1.3”。细胞转染48 h后, 加入适量的RIPA提取细胞总蛋白, 采用BCA法测定蛋白浓度, 用SDS-PAGE凝胶电泳蛋白, 然后将蛋白转移至PVDF膜上, 用5%脱脂牛奶进行封闭

后, 分别加入HMGB2、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、mTOR、AKT和p-AKT一抗(1: 1000), 4 $^{\circ}$ C过夜, 第2天用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育2 h, 显影仪显影, 拍照, 分析蛋白条带灰度值, 计算细胞中目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH蛋白条带灰度值。

1.8 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。2组细胞划痕愈合率, 侵袭细胞数, 细胞中HMGB2 mRNA和蛋白表达水平, 细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、mTOR、AKT和p-AKT蛋白表达水平, 均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验, 不同时间点样本均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组细胞中HMGB2 mRNA和蛋白表达水平与阴性对照组(1.00 \pm 0.04和1.96 \pm 0.17)比较, HMGB2 siRNA组细胞中HMGB2 mRNA和蛋白表达水平(0.27 \pm 0.09和1.03 \pm 0.95)均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图1。



Lane 1: Negative control group; Lane 2: HMGB2 siRNA group.

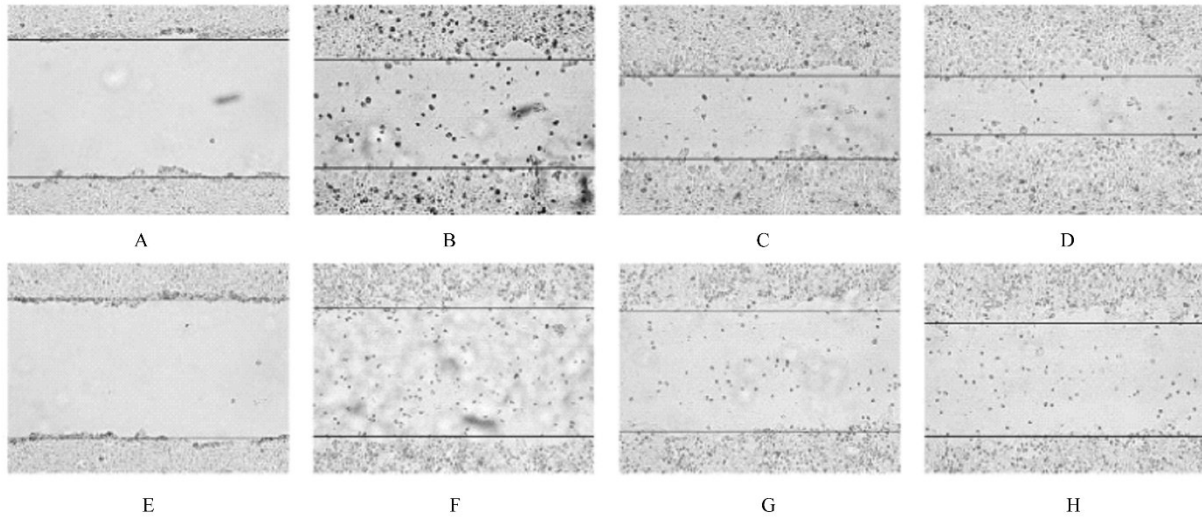
图1 Western blotting法检测2组细胞中HMGB2蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of expression of HMGB2 protein in cells in two groups detected by Western blotting method

2.2 2组细胞划痕愈合率 与阴性对照组比较, 24、48和72 h时HMGB2 siRNA组细胞划痕愈合率均明显降低($P < 0.01$)。见图2和3。

2.3 2组细胞中侵袭细胞数 与阴性对照组(232.67个 \pm 11.67个)比较, HMGB2 siRNA组细胞中侵袭细胞数(8.62个 \pm 2.52个)明显减少($P < 0.01$)。见图4。

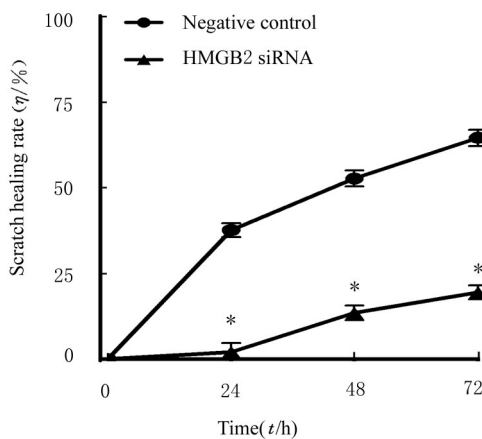
2.4 2组细胞中EMT相关蛋白表达水平 与阴性对照组比较, HMGB2 siRNA组细胞中E-cadherin



A-D: Negative control group; E-H: HMGB2 siRNA group; A, E: 0 h; B, F: 24 h; C, G: 48 h; D, H: 72 h.

图2 细胞划痕实验检测2组细胞划痕愈合情况($\times 100$)

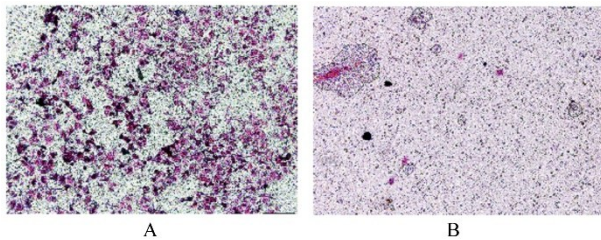
Fig. 2 Scratch healing of cells in two groups detected by cell scratch assay($\times 100$)



* $P < 0.01$ compared with negative control group.

图3 2组细胞划痕愈合率

Fig. 3 Scratch healing rates of cells in two groups



A: Negative control group; B: HMGB2 siRNA group.

图4 Transwell小室实验检测2组细胞侵袭情况(结晶紫, $\times 200$)

Fig. 4 Invasion of cells in two groups detected by Transwell chamber assay(Crystal violet, $\times 200$)

蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。

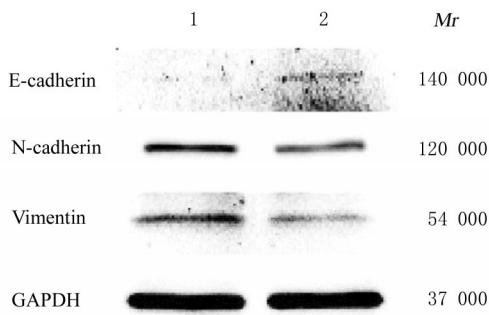
见图5。

2.5 2组细胞中AKT/mTOR通路相关蛋白表达水平 与阴性对照组比较, HMGB2 siRNA组细胞中mTOR、AKT和p-AKT蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图6。

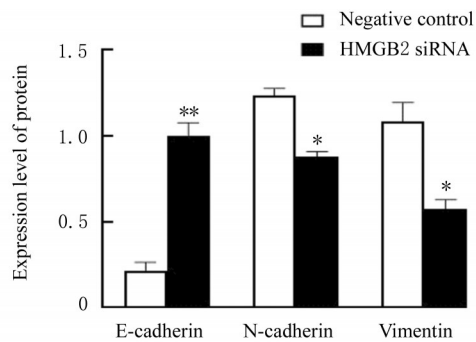
3 讨论

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 具有发病率高、病程隐匿和预后凶险等临床特征。与肺癌、结肠癌和乳腺癌等其他恶性肿瘤比较, 肝癌患者术后复发率相对更高, 一般术后3年复发率为40%~50%, 术后5年复发率达到60%~70%^[7]。肝癌恶性程度较高, 肝癌患者临床生存率偏低, 预后较差, 主要是由于肝癌容易出现复发和转移^[8]。通过寻找潜在的药物新靶点实现对肝癌细胞侵袭能力的抑制, 进而预防肝癌的转移和复发, 是目前肝癌研究的重点。

HMG是一种高度进化的保守核蛋白, 普遍存在于所有真核生物的细胞内^[9], 其家族成员HMGB2能与DNA结构域结合, 参与DNA核小体的稳定, 可与多种转录因子如c-Myc、p21、p53和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)结合参与转录调控, 同时可接受微小RNA (microRNA, miRNA)的调控, 在DNA重组、损伤修复、细胞复制和分化成熟等过程中起重要作用^[10-13]。HMGB2除了具有作为核蛋白的生物学作用外, 还是一个在炎症反应和细胞分化过程中发挥功能的细



A



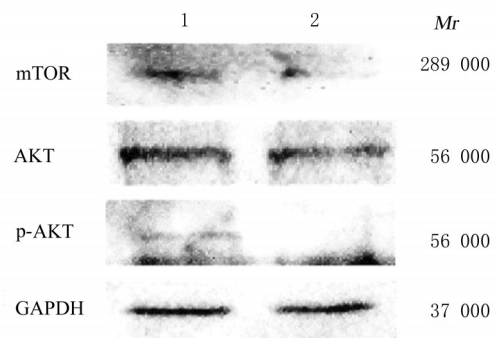
B

Lane 1: Negative control group; Lane 2: HMGB2 siRNA group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with negative control group.

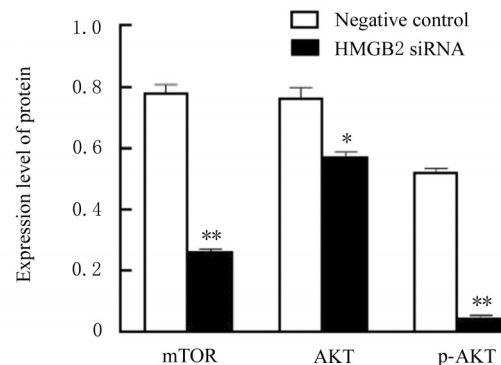
图5 Western blotting法检测2组细胞中E-cadherin、N-cadherin和Vimentin蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 5 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin proteins in cells in two groups detected by Western blotting method

胞外信号分子^[14-15],因此在肿瘤的侵袭和转移方面可能发挥着重要作用。为了研究HMGB2在肝细胞癌中的作用及相关机制,本研究首先将敲低HMGB2表达的RNA oligo序列转染至肝癌细胞中,结果显示:敲低HMGB2的肝癌细胞划痕愈合率明显低于阴性对照组,且其侵袭能力明显降低。研究^[5]表明:HMGB2高表达与肝癌病理分级和TNM分期有密切关联。越来越多的研究^[16-18]也已经证实:HMGB2与癌症患者的不良预后有关,其高表达加速了癌细胞的体外增殖、迁移和侵袭,敲低HMGB2表达则可导致相反结果。HMGB2是一种肿瘤转移促进基因,因此已成为非常有潜力的肿瘤早期诊断、预后评估和耐药监测方面的标志物,也有研究者^[10, 19]将其作为对抗癌症复发及转移方面药物治疗的靶点。



A



B

Lane 1: Negative control group; Lane 2: HMGB2 siRNA group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with negative control group.

图6 Western blotting法检测2组细胞中mTOR、AKT和p-AKT蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 6 Electrophoregram(A) and histogram(B) of expressions of mTOR, p-AKT and AKT proteins in cells in two groups detected by Western blotting method

EMT是上皮细胞通过特定的程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,赋予了细胞较高的迁移、侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力。因此, HMGB2可能通过EMT途径促进肝癌细胞迁移和侵袭。本研究对细胞中EMT相关蛋白进行检测,结果显示: HMGB2 siRNA组细胞中E-cadherin蛋白表达水平升高, N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平降低,与EMT受到抑制后的趋势相同,即HMGB2高表达可以促进EMT的发生,下调HMGB2表达可以逆转该过程。

AKT是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,是许多信号通路的关键组成部分, mTOR是AKT磷酸化的重要下游效应分子,也是控制细胞生长、增殖和存活及基因组稳定性、葡萄糖代谢和新生血管的效应因子, AKT/mTOR通路相关蛋白表达水平变化是

EMT发生的基础^[20-22]。ZHU等^[23]研究发现:异牡荆素可通过磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/AKT/mTOR信号通路调节细胞凋亡和EMT,从而抑制人类结肠癌细胞的生长。LUO等^[24]研究发现:YTH N6-甲基腺苷(m6A) RNA结合蛋白1[YTH N6-methyladenosine (m6A) RNA binding protein 1, YTHDF1]通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进肝细胞癌细胞生长,并通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路和诱导EMT促进肝细胞癌进展。以上研究均证实:AKT/mTOR是导致EMT发生的重要通路,是癌细胞迁移和侵袭能力提高的重要机制之一。本研究结果显示:下调HMGB2表达后,肝癌细胞中p-AKT和mTOR蛋白表达水平均明显升高,提示HMGB2对肝癌细胞EMT进程的影响同样是通过AKT/mTOR途径实现的。

本研究初步证实了降低HMGB2的表达能够抑制肝癌细胞侵袭和迁移,并且能够通过AKT/mTOR通路抑制肝癌细胞EMT发生。但本研究还存在一定的局限性:由于实验条件限制并没有建立HMGB2过表达组,通过增加HMGB2的表达对肝癌细胞的影响尚不清楚,尚未确定HMGB2与AKT/mTOR信号通路蛋白之间的关系。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

魏雁虹参与实验设计、论文起草和论文撰写,杨晨雪参与实验研究、数据处理和统计学分析,杨广民参与论文审校和学术指导,宋帅、李明和杨海娇参与数据采集和整理,魏海峰参与课题指导、论文审阅和论文修订。

[参考文献]

- [1] MUKHERJEE A, VASQUEZ K M. Targeting chromosomal architectural HMGB proteins could be the next frontier in cancer therapy [J]. *Cancer Res*, 2020, 80(11): 2075-2082.
- [2] NIU L R, YANG W L, DUAN L L, et al. Biological functions and theranostic potential of HMGB family members in human cancers [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920970850.
- [3] HAN X, ZHONG S Y, ZHANG P N, et al. Identification of differentially expressed proteins and clinicopathological significance of HMGB2 in cervical cancer [J]. *Clin Proteomics*, 2021, 18(1): 2.
- [4] FANG J, GE X H, XU W J, et al. Bioinformatics analysis of the prognosis and biological significance of HMGB1, HMGB2, and HMGB3 in gastric cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3438-3446.
- [5] 石小康, 丁佑铭, 汪 斌, 等. HMGB2基因表达对原发性肝癌患者临床病理和预后的影响 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2019, 40(3): 379-384.
- [6] LIU W W, CHENG J. LINC00974 sponges miR-33a to facilitate cell proliferation, invasion, and EMT of ovarian cancer through HMGB2 upregulation [J]. *Genet Mol Biol*, 2022, 45(1): e20210224.
- [7] YU X C, LIU J B, TANG Q H, et al. Recent trends in the incidence and survival of stage I liver cancer: a surveillance, epidemiology, and end results analysis [J]. *Ann Med*, 2022, 54(1): 2785-2795.
- [8] 赫 捷, 陈万青, 沈洪兵. 中国人群肝癌筛查指南(2022,北京) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(8): 1739-1758.
- [9] BENTLEY D R, DELOUKAS P, DUNHAM A, et al. The physical maps for sequencing human chromosomes 1, 6, 9, 10, 13, 20 and X [J]. *Nature*, 2001, 409(6822): 942-943.
- [10] YUAN F, ZHAO Z T, JIA B, et al. TSN inhibits cell proliferation, migration, invasion, and EMT through regulating miR-874/HMGB2/ β -catenin pathway in gastric cancer [J]. *Neoplasma*, 2020, 67(5): 1012-1021.
- [11] KIM H K, KANG M A, KIM M S, et al. Transcriptional repression of high-mobility group box 2 by p21 in radiation-induced senescence [J]. *Mol Cells*, 2018, 41(4): 362-372.
- [12] LI W, WANG Q X, FENG Q, et al. Oncogenic KSHV-encoded interferon regulatory factor upregulates HMGB2 and CMPK1 expression to promote cell invasion by disrupting a complex lncRNA-OIP5-AS1/miR-218-5p network [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15(1): e1007578.
- [13] VOONG C K, GOODRICH J A, KUGEL J F. Interactions of HMGB proteins with the genome and the impact on disease [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1451.
- [14] SHIROUZU S, SUGITA N, CHOIJOOKHUU N, et al. Pivotal role of High-Mobility Group Box 2 in ovarian folliculogenesis and fertility [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 133.
- [15] MORINAGA H, MUTA Y, TANAKA T, et al. High-mobility group box 2 protein is essential for the early phase of adipogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 557: 97-103.

- [16] YANG S C, YE Z Y, WANG Z, et al. High mobility group box 2 modulates the progression of osteosarcoma and is related with poor prognosis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(17): 1082.
- [17] QIU X, LIU W, ZHENG Y F, et al. Identification of HMGB2 associated with proliferation, invasion and prognosis in lung adenocarcinoma via weighted gene co-expression network analysis [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 310.
- [18] HE Z H, GUO F, HU X X, et al. Knockdown of HMGB2 inhibits proliferation and invasion of renal tumor cells via the p-38MAPK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(9): 4729-4737.
- [19] GAO K L, LI M, ZHANG K P. Imperatorin inhibits the invasion and migration of breast cancer cells by regulating HMGB2[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2021, 35(1): 227-230.
- [20] LI Y H, YIN Y L, HE Y, et al. SOS1 regulates HCC cell epithelial-mesenchymal transition via the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 637: 161-169.
- [21] YUN H E, HAN G H, KIM J, et al. NANOG regulates epithelial-mesenchymal transition via AMPK/mTOR signalling pathway in ovarian cancer SKOV-3 and A2780 cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26 (20): 5277-5291.
- [22] YUAN R, FAN Q M, LIANG X W, et al. Cucurbitacin B inhibits TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in NSCLC through regulating ROS and PI3K/Akt/mTOR pathways [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 24.
- [23] ZHU H, ZHAO N, JIANG M Z. Isovitexin attenuates tumor growth in human colon cancer cells through the modulation of apoptosis and epithelial-mesenchymal transition via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(6): 741-749.
- [24] LUO X Y, CAO M D, GAO F, et al. YTHDF1 promotes hepatocellular carcinoma progression via activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and inducing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2021, 10(1): 35.