

人参皂苷CK通过抑制TGF- β 1/Smads通路诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡的作用

闫岩, 张斯琳, 陈佳欣, 焦文君, 张学武*

(延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 探讨人参皂苷CK (ginsenoside, CK) 通过抑制TGF- β 1/Smads通路诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡的作用。采用MTT法检测人参皂苷CK对人肝癌SMMC-7721细胞增殖的作用; 流式细胞术检测细胞凋亡; Western blot技术分别检测加入人参皂苷CK、TGF- β 1/Smads通路激活剂TGF β 1及抑制剂LY2109761后TGF- β 1/Smads通路相关蛋白及凋亡相关蛋白的表达水平。结果显示, 人参皂苷CK能够抑制人肝癌SMMC-7721细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 上调cleaved caspase-3的表达, 下调Bcl-2/Bax值。检测TGF- β 1/Smads通路发现, 人参皂苷CK能够下调Smad2/3、p-Smad2/3和Smad4表达, 促进Smad7表达; 抑制TGF β 1诱导的Smad2/3、p-Smad2/3和Smad4上调, 并促进cleaved caspase-3的表达, 下调Bcl-2/Bax值; 加入LY2109761后, Smad2/3、p-Smad2/3和Smad4表达量显著降低, 而人参皂苷CK对抑制TGF- β 1/Smads通路诱导的细胞凋亡没有显著影响, LY2109761组与LY2109761+人参皂苷CK组cleaved caspase-3的表达及Bcl-2/Bax值无明显变化。研究表明, 人参皂苷CK可以诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡, 其作用机制与抑制TGF- β 1/Smads通路有关。

关键词: 肝癌; 人参皂苷CK; 转化生长因子 β 1/Smads通路; 细胞凋亡

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)09-1606-06

Ginsenoside CK induces apoptosis of human liver cancer SMMC-7721 cells through inhibition of TGF- β 1/Smads signaling pathway

YAN Yan, ZHANG Si-lin, CHEN Jia-xin, JIAO Wen-jun, ZHANG Xue-wu*

(Yanbian University Medical College, Yanji 133002, China)

Abstract: This study aimed to investigate apoptosis induction of ginsenoside compound K (ginsenoside CK) in human liver cancer SMMC-7721 cells and the involvement of TGF- β 1/Smads signaling pathway. MTT assay was used to detect cell viability following ginsenoside CK treatment in SMMC-7721 cells. Annexin V-FITC/PI assay was used to detect apoptosis. After ginsenoside CK, or TGF- β 1/Smads pathway activator TGF β 1 and inhibitor LY2109761 treatment, the TGF- β 1/Smads pathway proteins and apoptosis proteins were detected by Western blot. The results showed that ginsenoside CK inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells in a dose- and time-dependent manner. Annexin V-FITC/PI showed that ginsenoside CK induced apoptosis in SMMC-7721 cells. Meanwhile, ginsenoside CK inhibited the expression of Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4, but promoted Smad7 expression, cleavage of caspase-3 and down-regulated Bcl-2/Bax. Compared with TGF β 1 treatment alone, levels of Smad2/3, p-Smad2/3, Smad4 and the ratio of Bcl-2/Bax were down-regulated, whereas Smad7 or cleaved caspase-3 was up-regulated in the ginsenoside CK+TGF- β 1 group. In addition, Smad2/3, p-Smad2/3 and Smad4 expression were decreased in LY2109761 group. Compared with LY2109761 group, cleaved caspase-3 expression and Bcl-2/

收稿日期: 2019-01-26; 修回日期: 2019-03-08.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760728).

*通讯作者 Tel: 86-433-2435102, Fax: 86-433-2435104, E-mail: zhangxuewu@ybu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0088

Bax have no significant change in ginsenoside CK+LY2109761 group. Taken together, our results showed that ginsenoside CK induced apoptosis in SMMC-7721 cells, and such induction is related to inhibiting TGF- β 1/Smads signaling pathway.

Key words: hepatocellular carcinoma; ginsenoside CK; TGF- β 1/Smads signaling; apoptosis

肝癌是世界范围内高发的恶性肿瘤之一^[1]。目前,治疗肝癌应用广泛的化学药物治疗毒副作用大,容易导致耐药性。因此,毒副作用小的中药在临床上的需求日渐提升,从中药中提取抗肿瘤药物的任务也显得尤为迫切^[2,3]。

人参,属于五加科植物的干燥根,被称之为“百草之王”,从人参中提取的人参皂苷(ginsenoside)具有良好的抗肿瘤作用^[4,5],由于其毒副作用小,与临床抗癌药物具有协同作用的特点,已经用于癌症的辅助治疗^[6]。人参皂苷CK是天然二醇型人参皂苷在体内发挥药用活性的实体^[7]。研究表明,人参皂苷CK不仅可以有效地抑制人肝癌HepG-2细胞增殖^[8],其聚糖纳米粒可改善肝损伤^[9]。TGF- β 1/Smads通路是一种广泛存在于正常细胞和肿瘤细胞的跨膜信号转导通路,在肿瘤的发生发展中扮演重要角色,参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭转移和凋亡等病理过程^[10,11],已有学者从天然植物中提取抗癌成分通过抑制TGF- β 1/Smads通路表达,抑制肿瘤的转移^[12],筛选TGF- β 1/Smads通路的抑制剂有望成为研究抗肝癌药物的重要作用靶点。

本实验探究人参皂苷CK对人肝癌SMMC-7721细胞促凋亡的作用及对TGF- β 1/Smads通路的影响,为人参皂苷CK抗肿瘤方面的药理作用提供理论依据。

材料与方 法

实验细胞 人肝癌SMMC-7721细胞购于南京凯基生物制品有限公司。

实验药品与试剂 人参皂苷CK购于源叶生物技术有限公司;SDS-PAGE凝胶试剂盒购于索莱宝科技有限公司;PVDF膜、ECL检测显影液购于Merck Millipore公司;小牛血清和青链霉素购于美国Gibco公司;DMEM培养液和胰酶购于Invitrogen公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; β -actin、cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2抗体购于CST公司;TGF β R II、Smad2/3、Smad4、Smad7抗体购于博士德生物工程有限公司;p-Smad2/3购于博奥森生物工程有限公司;羊抗兔IgG购于中杉金桥生物技术有限公司;MTT粉购于美国Sigma公司;人重组蛋白TGF- β 1购于美国Peprotech公司;LY2109761购于美国BioVision公司。

实验仪器 电泳仪(DYY-7C)、转膜仪(DY CZ-40D)(北京市六一仪器厂产品);UPV凝胶成像仪(Biospectrum,美国UVP凝胶成像系统有限公司);超净工作台(C1109C)、CO₂培养箱(COR-1150)(上海智城分析仪制造有限公司);酶标仪(日本TECAN公司);显微镜(日本Olympus公司)。

细胞培养及分组 人肝癌SMMC-7721细胞加入至含10%小牛血清的DMEM培养液中,37℃、5%CO₂恒温全湿培养箱中进行培养。每48h换液传代,取生长良好、处于对数生长期的细胞进行实验。细胞分为空白对照组(vehicle)、人参皂苷CK(10、20、40、60和80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,TGF- β 1组(TGF β 1 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、TGF- β 1+人参皂苷CK组(10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF β 1+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 人参皂苷CK)、LY2109761组(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY2109761)、LY2109761+人参皂苷CK组(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LY2109761+40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 人参皂苷CK)。

MTT法检测细胞增殖 收集对数生长期的肝癌SMMC-7721细胞,制成细胞悬液,调整细胞浓度,将细胞按照每孔 1×10^4 个接种于96孔板中,每孔细胞悬液200 μL 。24h后弃去原孔内的培养液,分别加入含有不同浓度人参皂苷CK(10、20、40、60和80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的培养液培养24、48、72h后,取出96孔板,每孔加入浓度为5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MTT 20 μL ,继续培养,4h后取出弃其上清留底部沉淀,每孔再加入150 μL DMSO,避光放置于酶标仪内,在波长490 nm处测定吸光度值,计算IC₅₀和细胞存活率。计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{实验组OD值} - \text{空白组OD值}}{\text{阴性对照组OD值} - \text{空白OD值}} \times 100\%$$

流式细胞仪检测细胞凋亡率(Annexin V-FITC/PI双染) 取不同浓度人参皂苷CK组和DMEM对照组细胞培养。48h后,用不含EDTA的胰酶消化细胞,冰PBS终止消化,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,再次清洗离心。PBS制成细胞悬液,根据细胞计数取各实验组细胞约 1×10^6 个,用200 μL 结合缓冲液制得细胞重悬液,室温避光孵育15 min,加入Annexin V 10 μL ,室温避光孵育10 min,避光加入5 μL PI,避光孵育,上机检测,FACS Diva 4.1软件分析结果。

免疫蛋白印迹检测蛋白表达 各实验组细胞培养

48 h后,提取细胞全蛋白,BCA试剂盒测定蛋白含量。配置凝胶。根据蛋白浓度计算上样量上样,电泳(100 V, 150 min),转膜(100 V, 30~80 min)。室温下,5%脱脂奶粉封闭PVDF膜1 h。分别加入一抗(TGFβR II、Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4、Smad7、Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3和β-actin)室温孵育1.5~2 h, TBST清洗PVDF膜,放入二抗室温孵育1~1.5 h。ECL试剂盒显影,使用G:BOX chemiXR5成像系统显影,分析数据使用Image J软件进行灰度分析。

数据处理及分析 采用GraphPad Prism 8软件进行数据分析。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同分组采用单因素方差分析统计,组间两两比较采用*t*检验。

结果

1 人参皂苷CK对人肝癌SMMC-7721细胞的增殖作用

MTT结果显示,10、20、40、60和80 μmol·L⁻¹人参皂苷CK作用48 h时人肝癌SMMC-7721细胞的存活率分别为95.21% ± 3.15%、87.98% ± 8.13%、57.00% ± 6.60%、34.20% ± 5.63%和10.01% ± 5.94%。人参皂苷CK能降低人肝癌SMMC-7721细胞的存活率,且呈一定的时间和浓度依赖性,见图1。计算人参皂苷CK对细胞作用48 h时IC₅₀值为44.04 μmol·L⁻¹。

2 人参皂苷CK对人肝癌SMMC-7721细胞凋亡的作用

流式细胞术检测凋亡结果显示,细胞凋亡率逐渐上升,呈剂量依赖性,40、60 μmol·L⁻¹人参皂苷CK与空白对照组相比较,差异显著,有统计学意义(*P*<0.01,

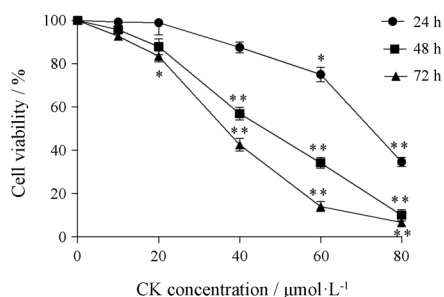


Figure 1 Effect of ginsenoside CK on the survival rate of SMMC-7721 cells. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs vehicle

图2A)。Western blot结果显示与空白对照组相比,40和60 μmol·L⁻¹加药组cleaved caspase-3表达量明显上升,Bcl-2/Bax值显著下调(图2B),有统计学意义(*P*<0.01)。

3 人参皂苷CK对TGF-β1/Smads通路相关蛋白表达的作用

Western blot检测发现,人参皂苷CK对TGF-β1/Smads通路相关蛋白Smad2/3、p-Smad2/3和Smad4蛋白表达有抑制作用,对Smad7蛋白表达有促进作用。其中人参皂苷CK浓度为40和60 μmol·L⁻¹时,与空白对照组相比,差异显著,均有统计学意义(*P*<0.05,图3)。

4 人参皂苷CK对TGFβ1激活后TGF-β1/Smads通路相关蛋白及凋亡相关蛋白表达的作用

Western blot结果显示,人参皂苷CK显著抑制了TGFβ1活化的Smad2/3、p-Smad2/3、Smad4蛋白表达,诱导了Smad7蛋白表达,同时对凋亡相关蛋白cleaved caspase-3表达有促进作用,Bcl-2/Bax值下调(图4)。TGF-β1与TGF-β1+人参皂苷CK组比较,差异显著,有

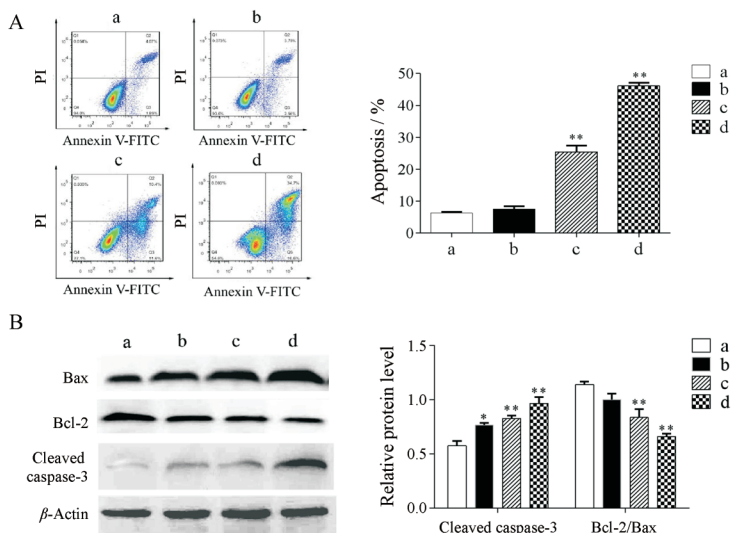


Figure 2 Effect of ginsenoside CK on apoptosis of SMMC-7721 cell. SMMC-7721 cells were treated with ginsenoside CK (20, 40, 60 μmol·L⁻¹) for 48 h. A: Annexin V-FITC/PI double staining assay; B: Western blot assay. a: Vehicle; b: 20 μmol·L⁻¹ ginsenoside CK; c: 40 μmol·L⁻¹ ginsenoside CK; d: 60 μmol·L⁻¹ ginsenoside CK. *n* = 3, $\bar{x} \pm s$. **P*<0.05, ***P*<0.01 vs vehicle

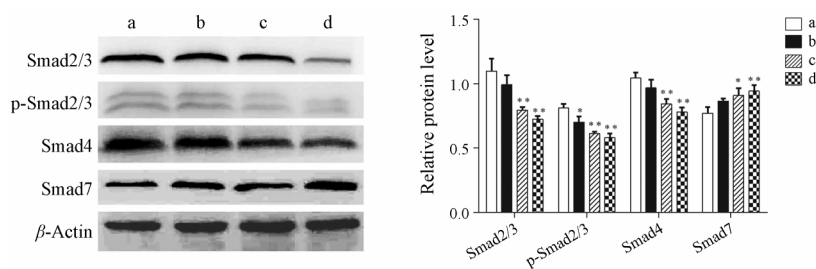


Figure 3 Effect of ginsenoside CK on TGF-β1/Smads pathway related protein expression. SMMC-7721 cells were treated with ginsenoside CK (20, 40, 60 μmol·L⁻¹) for 48 h. a: Vehicle; b: 20 μmol·L⁻¹ ginsenoside CK; c: 40 μmol·L⁻¹ ginsenoside CK; d: 60 μmol·L⁻¹ ginsenoside CK. n = 3, $\bar{x} \pm s$. *P<0.05, **P<0.01 vs vehicle

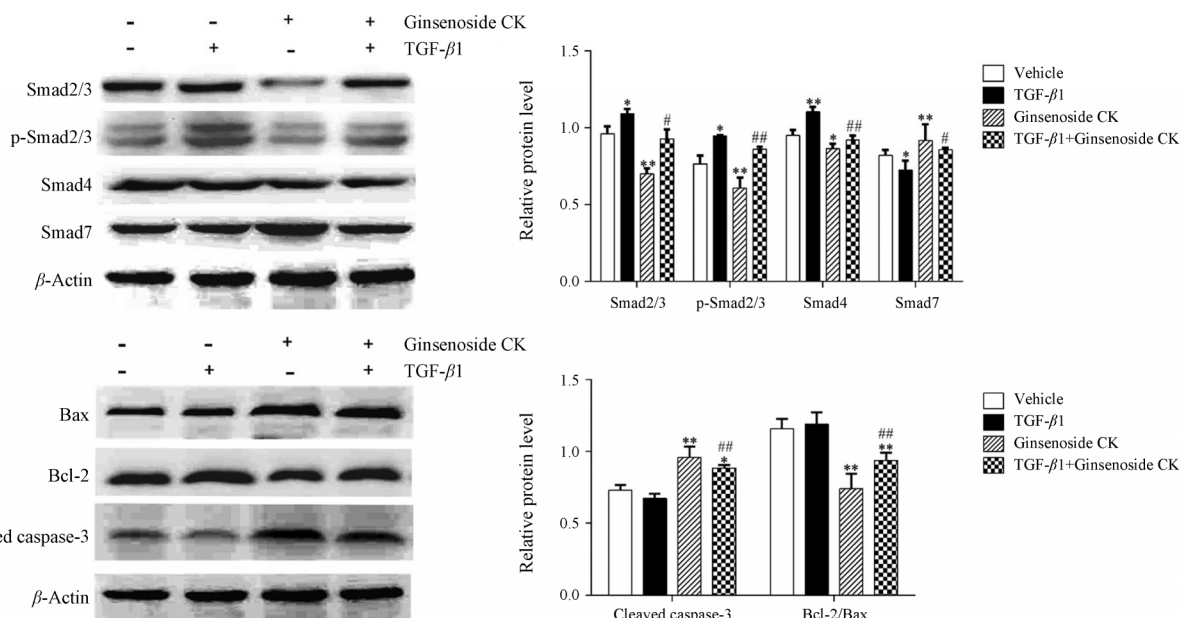


Figure 4 Effect of ginsenoside CK on TGF-β1/Smads pathway related protein and apoptosis related protein expression. SMMC-7721 cells were pretreated with ginsenoside CK (40 μmol·L⁻¹), TGF-β1(10 ng·mL⁻¹), TGF-β1 (10 ng·mL⁻¹) + ginsenoside CK (40 μmol·L⁻¹) for 48 h. n = 3, $\bar{x} \pm s$. *P<0.05, **P<0.01 vs vehicle; #P<0.05, ##P<0.01 vs TGF-β1

统计学意义 (P<0.05)。

5 人参皂苷CK对LY2109761抑制TGF-β1/Smads通路相关蛋白及凋亡相关蛋白表达的作用

Western blot检测(图5)显示,在TGF-β1/Smads通路被抑制后cleaved caspase-3表达显著上调,Bcl-2/Bax值显著下调,LY2109761组与空白对照组相比差异显著(P<0.01)。加入人参皂苷CK后不能抑制TGF-β1/Smads通路相关蛋白及激活cleaved caspase-3表达,Bcl-2/Bax值也无明显变化。LY2109761组与LY2109761+人参皂苷CK组比较,无统计学意义。

讨论

人参皂苷作为人参发挥药用价值的主要成分,具有多项功能活性。已有研究证实人参皂苷Rh4通过激活结肠癌细胞ROS/JNK/p53通路,诱导细胞凋

亡^[13];在小鼠模型中,人参皂苷Rg5通过抑制PI3K/Akt通路诱导乳腺癌细胞凋亡^[14]。人参皂苷CK是天然二醇型人参皂苷在体内发挥药用活性的实体,同时由于其潜在的药用价值受到广泛关注。本研究以人肝癌SMMC-7721细胞作为研究对象,探讨人参皂苷CK抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的抗肿瘤作用。MTT实验结果表明,人参皂苷CK能降低人肝癌SMMC-7721细胞的生存率,流式细胞仪检测发现细胞凋亡率逐渐增加,Western blot结果显示人参皂苷CK能激活cleaved caspase-3的表达,下调Bcl-2/Bax值,当cleaved caspase-3大量表达时,能够促进细胞的凋亡。以上结果说明,人参皂苷CK可以抑制人肝癌SMMC-7721细胞增殖,诱导细胞凋亡。

TGF-β1/Smads通路可介导组织器官的正常生长和发育、胚胎发生、机体免疫等生物过程^[15,16]。TGF-β1/

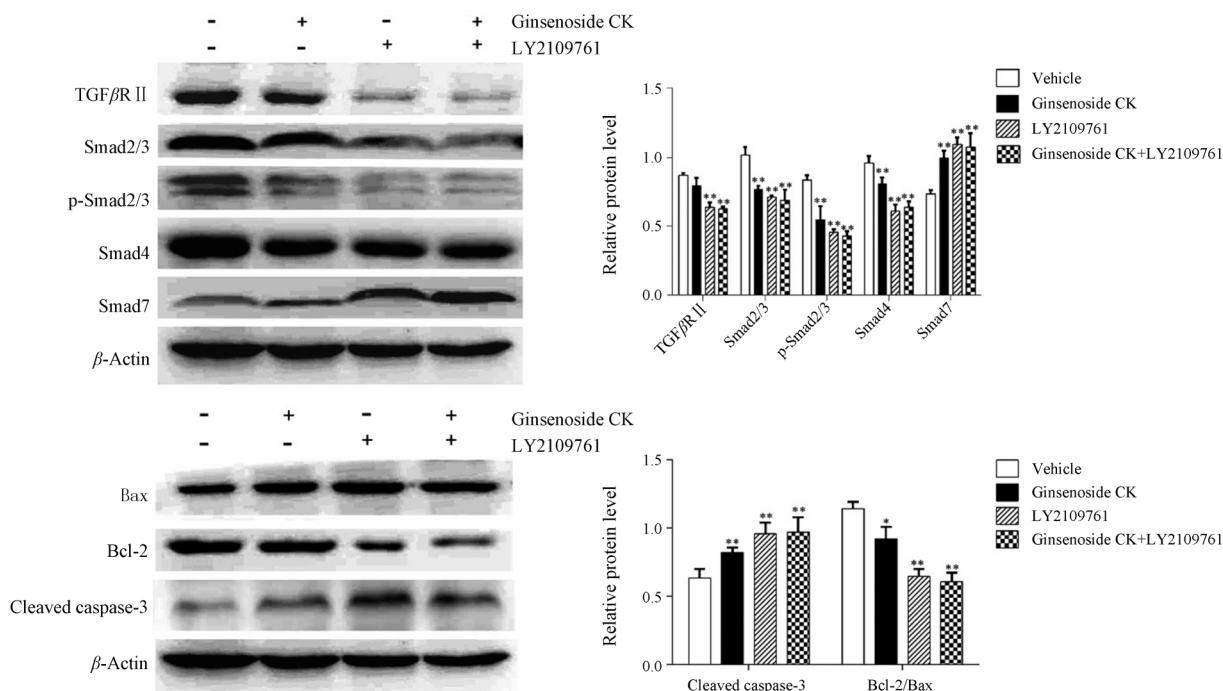


Figure 5 Effect of ginsenoside CK on TGF- β 1/Smads pathway related protein and apoptosis related protein expression. SMMC-7721 cells were pretreated with ginsenoside CK ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), LY2109761 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), LY2109761 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + ginsenoside CK ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 48 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle

Smads 通路可以激活上皮间质转化^[17], 引起肿瘤的发生。TGF- β 1/Smads 通路 与肿瘤细胞凋亡也密切相关, 已有学者证实 TGF- β 1/Smads 通路参与直肠癌细胞、胰腺癌细胞的增殖和凋亡过程^[18,19]。接受 TGF- β 1 信号的膜上受体是一种跨膜蛋白, 分为 TGF- β 1 I 型受体 (TGF β R I)、TGF- β 1 II 型受体 (TGF β R II) 和 III 型受体 (TGF β R III)。TGF- β 1 首先识别膜上的 TGF β R II 并与其结合, 随后 TGF β R II 与 TGF β R I 形成复合物, 活化下游信号分子进而激活细胞内信号传导^[20]。本研究将采用 TGF- β 1/Smads 通路作为靶点进行后续实验, 探究人参皂苷 CK 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡作用。利用 Western blot 法检测 TGF- β 1/Smads 通路相关蛋白发现, 在 40 和 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 人参皂苷 CK 作用下除了抑制型 Smad7 表达量明显上升之外, 其余蛋白均显著下调, 推测人参皂苷 CK 对 TGF- β 1/Smads 通路具有抑制作用。

为了进一步确认人参皂苷 CK 对 TGF- β 1/Smads 信号通路的作用, 本研究利用人重组蛋白 TGF β 1 作用于人肝癌 SMMC-7721 细胞。发现加入 TGF β 1 后 TGF- β 1/Smads 信号通路处在高度激活的状态, 人参皂苷 CK 抑制了此激活作用同时促进 cleaved caspase-3 蛋白表达, 下调了 Bcl-2/Bax 值。而加入 TGF- β 1/Smads 通路抑制剂 LY2109761 后, LY2109761 阻断 TGF- β 1 识别膜上受体 TGF β R II, 抑制下游蛋白表达, 并激活 cleaved caspase-3 蛋白表达。加入人参皂苷 CK 后对

此作用无影响, Bcl-2/Bax 值也无明显变化。以上结果从正、反两个方面证实了人参皂苷 CK 是通过抑制 TGF- β 1/Smads 通路来诱导 SMMC-7721 细胞发生凋亡。

本研究结果显示, 人参皂苷 CK 能诱导 SMMC-7721 细胞发生凋亡, TGF- β 1/Smads 通路发挥了重要作用。今后将进一步结合体内实验深入探讨人参皂苷 CK 的促凋亡作用, 为人参皂苷 CK 抗肿瘤方面的药理作用提供实验依据。

References

- [1] Fu J, Wang H. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China [J]. Cancer Lett, 2018, 412: 283-288.
- [2] Maver SA, Solimando DA, Waddell JA, et al. Cancer chemotherapy update: bevacizumab, etoposide, and cisplatin regimen for refractory brain metastases [J]. Hosp Pharm, 2017, 52: 394-399.
- [3] Shao KY, Zhang X, Jiao WJ, et al. Anti-inflammatory effect of TTF1-NP on lipopolysaccharide stimulated human hepatocellular carcinoma cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1549-1553.
- [4] Wu Q, Deng J, Fan D, et al. Ginsenoside Rh4 induces apoptosis and autophagic cell death through activation of the ROS/JNK/p53 pathway in colorectal cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 148: 64-74.

- [5] Phi LTH, Wijaya YT, Sari IN, et al. The anti-metastatic effect of ginsenoside Rb2 in colorectal cancer in an EGFR/SOX2-dependent manner [J]. *Cancer Med*, 2018, 7: 5621-5631.
- [6] Lu M, Fei Z, Zhang G, et al. Synergistic anticancer activity of 20(S)-ginsenoside Rg3 and sorafenib in hepatocellular carcinoma by modulating PTEN/Akt signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1282-1288.
- [7] Akao T, Kida H, Kanaoka M, et al. Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50: 1155-1160.
- [8] Liu RR, Zhang X, Xiao B, et al. Effect of ginsenoside CK on apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG-2 cells [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2016, 27: 843-845.
- [9] Zhang J, Wang Y, Jiang Y, et al. Enhanced cytotoxic and apoptotic potential in hepatic carcinoma cells of chitosan nanoparticles loaded with ginsenoside compound K [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 198: 537-545.
- [10] Zhao B, Lu YL, Yang Y, et al. Overexpression of lncRNA ANRIL promoted the proliferation and migration of prostate cancer cells via regulating let-7a/TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21: 613-620.
- [11] Li KY, Shi CX, Huang JZ, et al. Cisplatin plus norcantharidin alter the expression of TGF- β 1/Smads signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Bratisl Lek Listy*, 2017, 118: 85-88.
- [12] Sun Y, Jiang X, Lu Y, et al. Oridonin prevents epithelial-mesenchymal transition and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting TGF- β 1/Smad2/3 in osteosarcoma [J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 296: 57-64.
- [13] Wu Q, Deng J, Fan D, et al. Ginsenoside Rh4 induces apoptosis and autophagic cell death through activation of the ROS/JNK/p53 pathway in colorectal cancer cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 148: 64-74.
- [14] Liu Y, Fan D. Ginsenoside Rg5 induces apoptosis and autophagy via the inhibition of the PI3K/Akt pathway against breast cancer in a mouse model [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 5513-5527.
- [15] Lin E, Kuo PH, Liu YL, et al. Transforming growth factor-beta signaling pathway-associated genes Smad2 and TGFBR2 are implicated in metabolic syndrome in a Taiwanese population [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 13589.
- [16] Wiercinska E, Naber HP, Pardali E, et al. The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 128: 657-666.
- [17] Gen Y, Yasui K, Kitaichi T, et al. ASPP2 suppresses invasion and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Smad7 degradation mediated by E3 ubiquitin ligase ITCH in gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2017, 398: 52-61.
- [18] Wu XL, Wang LK, Yang DD, et al. Effects of Glut1 gene silencing on proliferation, differentiation, and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting the TGF- β /PI3K-AKT-mTOR signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 2356-2367.
- [19] Ji YF, Li T, Jiang F, et al. Correlation between S100A11 and the TGF- β 1/Smad4 pathway and its effects on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cell line PANC-1 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 450: 53-64.
- [20] Gulubova M, Manolova I, Ananiev J, et al. Role of TGF-beta 1, its receptor TGFbetaRII, and Smad proteins in the progression of colorectal cancer [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25: 591-599.