

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.003>

## 钙敏感受体逆转子宫内膜癌细胞上皮-间充质转化

胡瑜<sup>1</sup>, 肖瑞丽<sup>1</sup>, 马静蕊<sup>1</sup>, 辛小燕<sup>2</sup>, 汪宏波<sup>2</sup>

(1. 邓州市中心医院产一科, 河南 邓州 474150; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科, 武汉 430022)

**[摘要]** 目的: 探讨钙敏感受体(calcium-sensing receptor, CaSR)在缺氧环境下对子宫内膜癌细胞发生上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transitions, EMT)的影响。方法: 将子宫内膜癌Ishikawa细胞分别转染相应腺病毒, 并分为空白组、空载组、沉默CaSR组和过表达CaSR组。将各组细胞进行缺氧后细胞免疫荧光(immunofluorescence, IF)法观察细胞骨架的变化; 蛋白质印迹法及IF法检测钙黏附蛋白E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、CaSR蛋白表达变化; 荧光染料Fura-2/AM示踪监测细胞内钙离子的浓度变化; Transwell迁移试验检测细胞侵袭迁移能力变化。结果: 缺氧后, 子宫内膜癌细胞的细胞骨架呈梭形样改变; 同时E-cadherin表达降低, Vimentin和CaSR表达增加; 子宫内膜癌细胞转染沉默及过表达CaSR腺病毒后细胞内钙离子内流分别减少及增加, 而与Vimentin表达和细胞侵袭迁移能力呈负相关。结论: 缺氧后子宫内膜癌细胞发生EMT及CaSR表达增加, 而CaSR的表达增加抑制EMT发生, 其机制可能与调控细胞钙离子有关。

**[关键词]** 钙敏感受体; 子宫内膜癌; 缺氧; 上皮-间充质转化; 钙离子

## Calcium-sensitive receptors reverse epithelial-mesenchymal transformation of endometrial cancer cells

HU Yu<sup>1</sup>, XIAO Ruili<sup>1</sup>, MA Jingrui<sup>1</sup>, XIN Xiaoyan<sup>2</sup>, WANG Hongbo<sup>2</sup>

(1. First Department of Obstetrics, Dengzhou Central Hospital, Dengzhou Henan 474150; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Union Hospital, Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of calcium sensitive receptor (CaSR) on epithelial mesenchymal transformation (EMT) of endometrial cancer cells in hypoxic environment. **Methods:** The Ishikawa cells of endometrial carcinoma were transfected with corresponding adenovirus respectively to form a blank group, a no-load group, a silent CaSR group and an overexpressed CaSR group. The change of cytoskeleton in different groups was observed by immunofluorescence assay after hypoxia. Expression of E-cadherin, Vimentin and CaSR were detected by Western blotting and immunofluorescence. Fluorescence dye fura-2/AM tracer was used to monitor the change of intracellular calcium ion concentration. Transwell assay was used to detect change in the ability of cell invasion and migration. **Results:** After hypoxia, the cytoskeleton of endometrial cancer cells changed like a spindle. Meanwhile, the expression of E-cadherin decreased, while the expression of Vimentin and CaSR

收稿日期 (Date of reception): 2018-11-21

通信作者 (Corresponding author): 汪宏波, Email: [hb\\_wang1969@sina.com](mailto:hb_wang1969@sina.com)

increased. Endometrial cancer cells transfected with silencing and overexpressed CaSR adenovirus reduced and increased intracellular calcium flow respectively, which was negatively correlated with the expression of Vimentin and the ability of cell invasion and migration. **Conclusion:** The expression of EMT and CaSR in endometrial cancer cells increases after hypoxia, and the increased expression of CaSR inhibits the occurrence of EMT, which may be related to the regulation of cellular calcium ions.

**Keywords** calcium-sensing receptor; endometrial cancer; hypoxia; epithelial mesenchymal transitions; calcium ion

近年子宫内膜癌发病率及病死率均明显上升, 并有年轻化趋势<sup>[1]</sup>。原位、局部及远处转移的子宫内膜癌患者5年生存率分别为95%, 68%和18%, 可见肿瘤转移是影响患者复发及预后的最重要因素之一<sup>[2]</sup>。肌层的浸润深度及子宫外转移是影响子宫内膜癌患者预后的主要因素, 其发生的过程与肿瘤细胞发生上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transitions, EMT)息息相关<sup>[3]</sup>。EMT是指具有细胞紧密连接和黏附功能的上皮来源细胞受内在或外在因素调控、形态及功能逐渐转变成梭形, 并能脱离上皮细胞之间的连接, 进入细胞基质间运动的过程, 其上皮细胞标志分子E-cadherin含量下降或丢失, 间质细胞标志分子波形蛋白(Vimentin)表达增加是EMT发生的标志。肿瘤细胞的微环境、EMT及其相互作用与肿瘤侵袭转移密切相关, 同时也是挖掘子宫内膜癌侵袭转移机制的关键。

钙感受受体(calcium-sensing receptor, CaSR)属于G蛋白偶联受体C家族成员之一, 其具有7次跨膜肽链的螺旋结构, 主要参与调控机体血液及细胞内外钙离子的平衡。CaSR同时还与EMT、缺氧有关联。CaSR表达增加可以促进E-cadherin, miR-145, 转化生长因子 $\beta$ -R1,  $\beta$ -R2表达增加, 诱导肿瘤细胞向分化、低恶性、成熟表型方向转变<sup>[4-5]</sup>。同时, 在结肠癌细胞中, CaSR表达下降可以激活Wnt/catenin通路促进EMT发生, CaSR过表达抑制肿瘤细胞向EMT、干细胞表型的发展<sup>[6]</sup>。此外有研究<sup>[7]</sup>报道: 成神经母细胞瘤经间断缺氧后破骨细胞相关基因CaSR、易位子相关蛋白和组织蛋白酶K表达增加而促使细胞向破骨细胞分化。本课题组在前期的研究<sup>[8]</sup>中发现CaSR可抑制子宫内膜癌的发展, 同时与E-cadherin表达呈正相关。关于肿瘤细胞缺氧微环境下CaSR作用并未见相关报道, 本研究将创新性地探究缺氧微环境下CaSR在子宫内膜癌细胞中发挥的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和仪器

从美国ATCC细胞库购买人子宫内膜癌细胞株Ishikawa细胞进行培养并传代, 液氮冻存保种。实验所需抗体E-cadherin, Vimentin, CaSR和 $\beta$ - $\beta$ -actin, Fura-2/AM钙离子荧光探针购自美国Santa Cruz公司; 抗人微管蛋白( $\beta$ -tubulin)购自苏州睿瀛生物技术有限公司; 荧光染料4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)购自美国Sigma公司; 荧光染料Cyanine 3(CY3)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的二抗购自武汉谷歌生物有限公司; 增强化学发光法(ECL)显色试剂盒购自美国Thermo Scientific公司。共聚焦显微镜购自日本Olympus公司; 凝胶成像系统购自美国Bio-rad公司; 普通光学显微镜购自日本奥林巴斯公司(型号KX51)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养、缺氧

子宫内膜癌Ishikawa细胞培养于含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI1640培养液中, 正常组Ishikawa细胞置于21% O<sub>2</sub>, 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>饱和湿度细胞培养箱中培养, 密度达90%以上传代培养。缺氧组Ishikawa细胞置于1% O<sub>2</sub>, 37 °C和5%CO<sub>2</sub>饱和湿度细胞培养箱中培养48 h后行免疫荧光或蛋白质印迹法检测相关因子或表型变化。

#### 1.2.2 细胞免疫荧光

取对数生长子宫内膜癌Ishikawa细胞, 调整其至 $5 \times 10^5$ 个/100  $\mu$ L细胞密度, 均匀加入100  $\mu$ L细胞悬液至6孔板孔玻片上, 待细胞贴壁后从6孔板侧壁加2 mL培养基于正常或缺氧培养箱中继续培养。在培养箱中培养48 h后取出用预温磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗, 纯甲醇室温固定10 min后PBS漂洗, 0.3% Triton-100破细胞膜, 使用5%胎牛蛋白(BSA)封闭1 h再分别加一抗 $\beta$ -tubulin(浓度1:50)、E-cadherin(浓度1:50)、Vimentin(浓度1:50)4 °C冰

箱孵育过夜。取出6孔板复温30 min后PBS漂洗3次, 加入相应种属荧光标记二抗(1:100)室温避光孵育1 h, DAPI染核, 漂洗后避光直接共聚焦显微镜拍照, 观察细胞骨架变化和蛋白荧光表达变化。

### 1.2.3 腺病毒转染及分组

腺病毒由上海吉凯基因化学技术有限公司构建, 具体目的基因名称为NC\_000003.12(物种: Human)。分别利用腺病毒转染Ishikawa细胞并分组: 沉默CaSR组(shRNA-CaSR组)、过表达CaSR组(cDNA-CaSR组)及其对应的对照组空白组(Control组)和空载组(Vector组)。首先预实验确定腺病毒能够转染Ishikawa细胞及后续转染细胞腺病毒滴度(100 MOI)。转染前将细胞接种于6孔板上, 加入完全培养基, 待细胞生长融合接近70%时开始转染。提前1 d换液, 取预实验滴度病毒加入到细胞中, 液体总量2 mL, 转染细胞48~72 h后提取蛋白行蛋白质印迹法验证转染效果再进一步检测钙浓度和缺氧后CaSR等的变化。

### 1.2.4 蛋白质印迹法

将缺氧或病毒转染后各组细胞置于冰上, 预冷PBS漂洗, 每孔加入裂解液和蛋白酶抑制剂冰上裂解细胞30 min, 12 000 r/min, 4 °C离心15 min, 吸取上清液。按Bradford法检测蛋白浓度, 并将各组蛋白调整至统一终浓度, 沸水变性10 min后用于电泳分离。将蛋白置于十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)中电泳分离, 湿转蛋白至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 含5%脱脂奶粉的枸橼酸盐缓冲液(TBST)室温封闭2 h, 分别加入一抗 $\beta$ -actin (1:2 000), CaSR(1:2 000), E-cadherin (1:1 000)和Vimentin (1:2 000)4 °C孵育过夜, TBST漂洗, 分别加入相应种属二抗(1:5 000)室温孵育1 h, TBST漂洗, ECL显影, Image Lab软件分析各蛋白条带灰度值, 以 $\beta$ -actin为内参, 计算CaSR, E-cadherin和Vimentin蛋白的相对表达水平。

### 1.2.5 胞内游离Ca<sup>2+</sup>浓度测定

均匀加入腺病毒沉默CaSR(shRNA-CaSR组)、过表达CaSR(cDNA-CaSR组)Ishikawa细胞100  $\mu$ L密度 $1 \times 10^5$ 个/100  $\mu$ L细胞悬液至6孔板直径22 mm圆形盖玻片上, 细胞贴壁后加入完全培养基培养。待

细胞密度达到80%左右时, 将盖玻片置入特制灌流槽, 应用现配的预温含钙液漂洗, 应用浓度为3  $\mu$ m Fura-2/AM含钙液室温避光孵育细胞30 min, 含钙液漂洗并浸泡孵育30 min去酯化Fura-2/AM, 将含玻片灌流槽放置于倒置荧光显微镜上, 340, 380 nm波长处的激发光激发Fura-2发射的荧光, 先使用0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>浓度外钙液灌流15 min后更换成2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>浓度外钙液灌流, 图像控制器实时接收荧光的动态强度, 再通过钙荧光成像系统(InVivo-IPA)转换荧光数据, 胞内钙离子浓度由校正公式 $[Ca^{2+}] = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R)(S_{f2} / S_{b2})$ 计算所获得。Kd=224 mmol/L, Sf2和Sb2分别是游离钙和结合钙在380 nm波长激发下的荧光强度, R<sub>mi</sub>和R<sub>max</sub>通过校正实验获得<sup>[9]</sup>。

### 1.2.6 Transwell 迁移试验

将Matrigel胶在每个Transwell小室上室进行铺胶, 使用2%血清培养基重悬细胞制成 $5 \times 10^5$ 个/mL密度, 每个Transwell小室加入细胞悬液200  $\mu$ L, 在小室下室中加入20%血清培养基600  $\mu$ L/孔, 培养箱培养24 h后进行甲醇固定、漂洗、0.1%结晶紫染色及晾干, 在高倍镜显微镜下随机选取5个视野进行细胞计数并统计分析。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0软件进行统计学分析。多组间比较采用单因素方差分析, 以Levene法进行方差齐性检验, 若方差齐, 采用Least Significant Difference和Student-Newman-Keuls法验算, 若方差不齐, 采用Games-Howell法; 2组间比较采用t检验, P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IF 法观察 Ishikawa 细胞缺氧后骨架改变

Ishikawa细胞在正常氧环境下 $\beta$ -tubulin染色均匀, 细胞间的连接紧密; 经缺氧处理后,  $\beta$ -tubulin染色的细胞微管排列紊乱, 细胞间连接较正常组稀疏, 间隙增宽, 同时可见部分细胞有伪足伸出, 向梭形间充质细胞样变化(图1)。

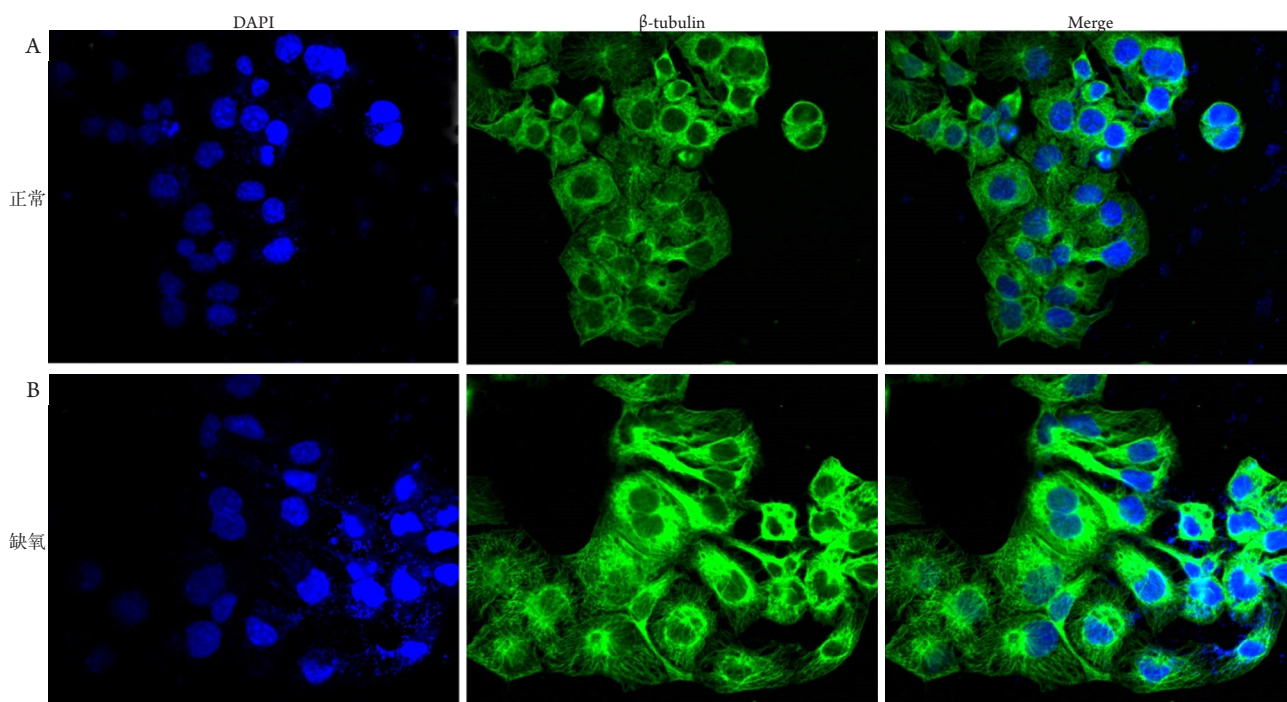


图1 IF检测子宫内膜癌细胞株Ishikawa缺氧48 h后对细胞形态骨架影响( $\times 600$ )

Figure 1 Change of cytoskeleton after hypoxia 48 h in endometrial cancer cell line were observed by immunofluorescence staining ( $\times 600$ )

(A) Ishikawa细胞缺氧前 $\beta$ -tubulin染色; (B) Ishikawa细胞缺氧后 $\beta$ -tubulin染色(蓝色为DAPI, FITC为 $\beta$ -tubulin)。

(A)  $\beta$ -tubulin staining of Ishikawa cells before hypoxia; (B)  $\beta$ -tubulin staining of Ishikawa cells after hypoxia (blue: DAPI, FITC:  $\beta$ -tubulin).

## 2.2 IF法观察Ishikawa细胞缺氧后E-cadherin和Vimentin表达变化

Ishikawa细胞膜表达E-cadherin, 细胞经缺氧处理后, 细胞膜E-cadherin表达降低, 同时细胞质内可见E-cadherin聚集。Ishikawa细胞在正常氧低表达Vimentin蛋白, 其定位主要于细胞质内表达, 经缺氧处理后, 细胞质内Vimentin蛋白表达增加(图2)。

## 2.3 检测Ishikawa细胞缺氧后CaSR表达变化及CaSR对细胞内钙浓度影响

正常Ishikawa细胞表达CaSR蛋白, 经缺氧后细胞CaSR表达明显增高( $P < 0.001$ )。蛋白质印迹法验证腺病毒携带shRNA-CaSR及cDNA-CaSR转染Ishikawa细胞后WB方法其效果。动态监测内钙浓度发现: 沉默CaSR后给予含0.1 mmol/L  $Ca^{2+}$ 浓度外钙液灌流后, Ishikawa细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度变化不明显, 15 min后加入2 mmol/L  $Ca^{2+}$ 浓度外钙液灌流Ishikawa细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度有所增加( $P = 0.028$ )。过表达CaSR后发现, 给予含0.1 mmol/L  $Ca^{2+}$ 浓度外钙液灌流后, Ishikawa细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度有轻微的增加, 15 min后加入2 mmol/L  $Ca^{2+}$ 浓度

外钙液灌流Ishikawa细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度增加很明显( $P < 0.001$ , 图3)。

## 2.4 蛋白质印迹法检测Ishikawa细胞缺氧后CaSR, E-cadherin和Vimentin表达变化

Ishikawa细胞在缺氧条件下CaSR表达增加( $P < 0.001$ ), Vimentin表达升高( $P = 0.012$ ), 而E-cadherin表达降低( $P = 0.038$ ), 差异均有统计学意义。腺病毒转染Ishikawa细胞后, 过表达CaSR细胞E-cadherin表达增加( $P < 0.001$ ), Vimentin表达降低( $P < 0.001$ ); 而抑制CaSR表达的细胞经缺氧干预后CaSR表达增高( $P = 0.026$ ), Vimentin表达升高更加明显( $P < 0.001$ ), E-cadherin表达降低( $P < 0.001$ , 图4)。

## 2.5 Transwell检测CaSR对Ishikawa细胞侵袭迁移能力影响

子宫内膜癌Ishikawa细胞腺病毒转染沉默CaSR(CaSR shRNA组)24 h后的细胞穿透Transwell底膜数量增多, 侵袭迁移能力增强; 而腺病毒转染过表达CaSR(CaSR cDNA组)后的细胞穿透Transwell底膜数量减少, 侵袭能力减弱, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ , 图5)。

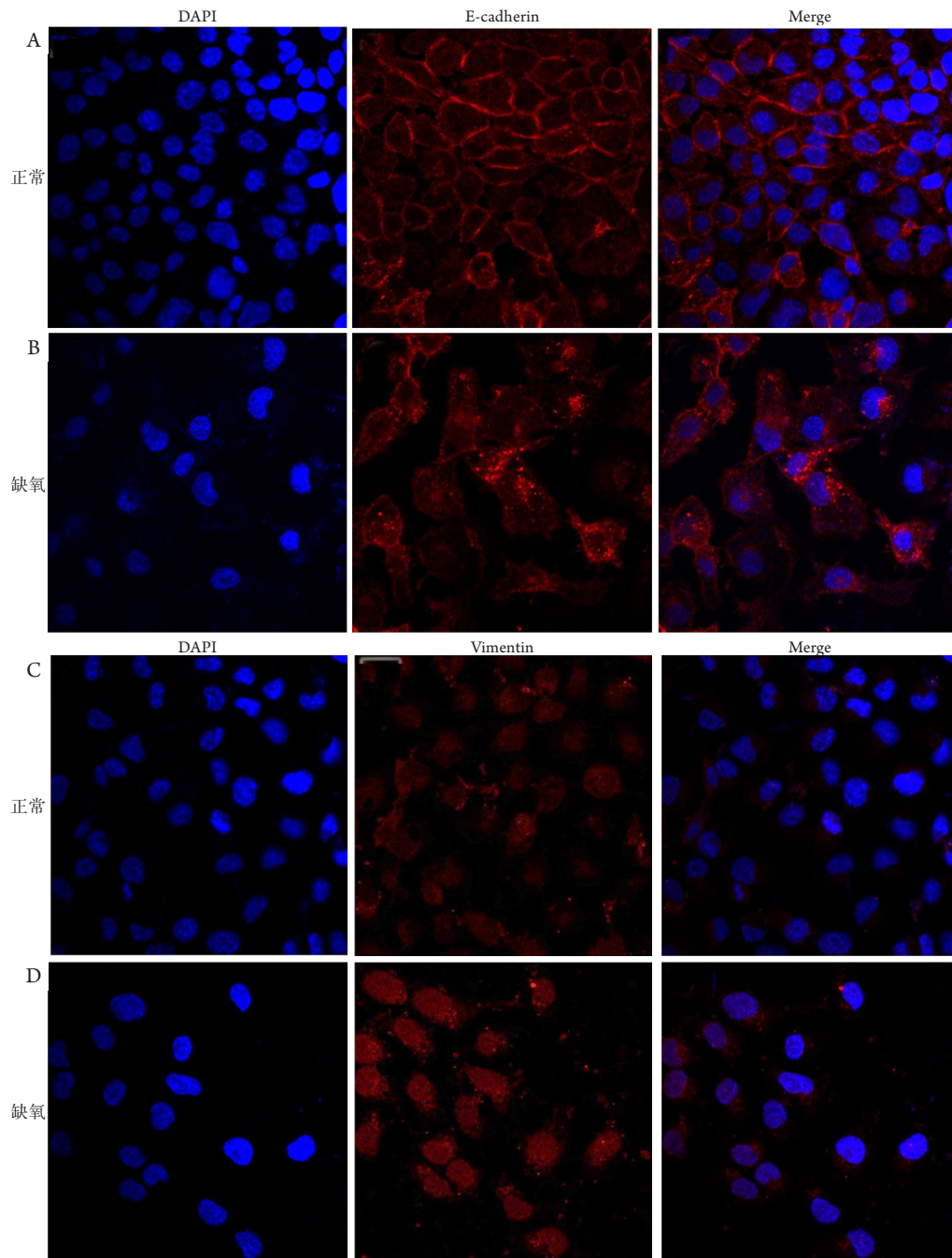


图2 IF法检测子宫内膜癌细胞株Ishikawa缺氧48 h后对E-cadherin和Vimentin表达的影响( $\times 600$ )

**Figure 2 Effect on expression of E-cadherin, vimentin after hypoxia 48 h in endometrial cancer cell line were observed by immunofluorescence staining ( $\times 600$ )**

(A)缺氧前Ishikawa细胞E-cadherin表达; (B)缺氧后Ishikawa细胞E-cadherin表达; (C)缺氧前Ishikawa细胞Vimentin表达; (D)缺氧后Ishikawa细胞Vimentin表达(蓝色为DAPI, CY3为E-cadherin/Vimentin)。

(A) E-cadherin expression of Ishikawa cells before hypoxia; (B) E-cadherin expression of Ishikawa cells after hypoxia; (C) Vimentin expression of Ishikawa cells before hypoxia; (D) Vimentin expression of Ishikawa cells after hypoxia (blue: DAPI, CY3: E-cadherin/Vimentin).

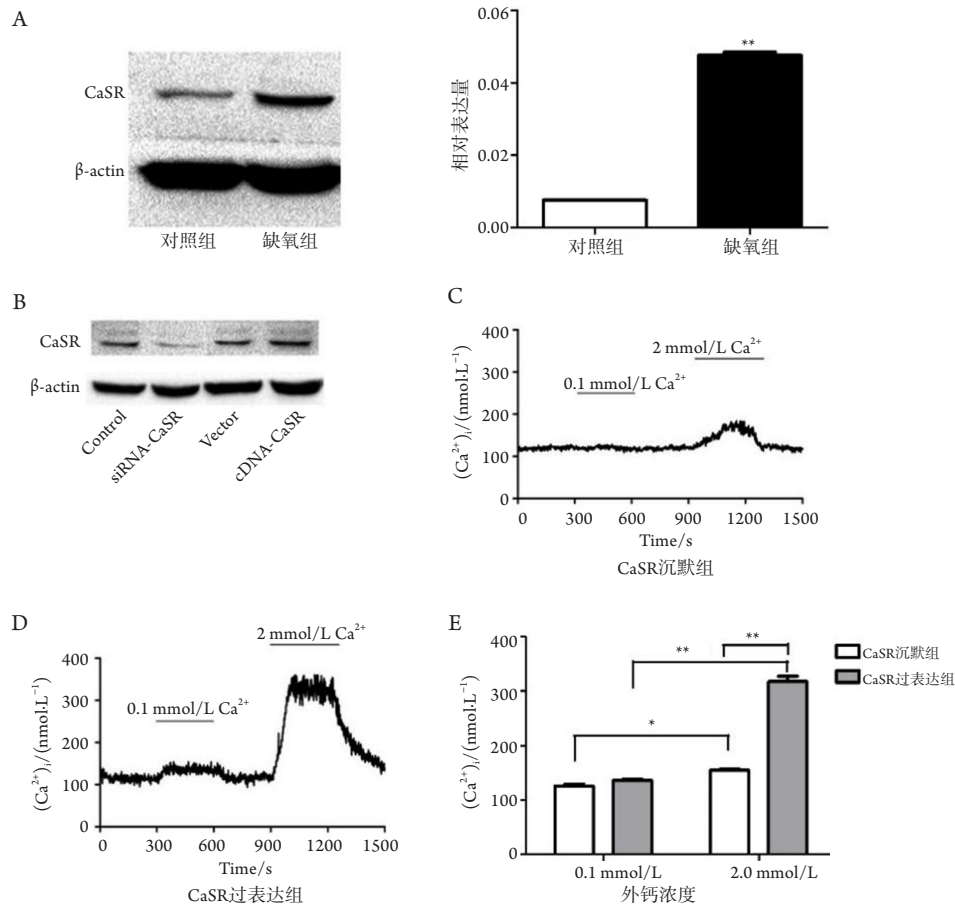


图3 缺氧后CaSR表达增高，增加CaSR表达可以促进外钙内流

**Figure 3 Increasing expression of CaSR after hypoxia and promoting intracellular calcium ion flow**

(A)蛋白质印迹法检测缺氧后CaSR表达；(B)蛋白质印迹法检测腺病毒转染后CaSR表达；(C, E)沉默细胞CaSR对不同浓度(0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>)外钙液处理后细胞内钙浓度变化；(D, E)过表达细胞CaSR对不同浓度(0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>)外钙液处理后细胞内钙浓度变化(\**P*<0.05, \*\**P*<0.001)。

(A) CaSR expression was detected by Western blotting after hypoxia; (B) CaSR expression was detected by Western blotting after adenovirus transfection; (C, E) Change in intracellular calcium concentration of CaSR silenced cells treated with calcium solution at different concentrations (0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>); (D, E) Change in intracellular calcium concentration of CaSR overexpressed cells treated with calcium solution at different concentrations (0.1 mmol/L Ca<sup>2+</sup>, 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>; \**P*<0.05, \*\**P*<0.001).

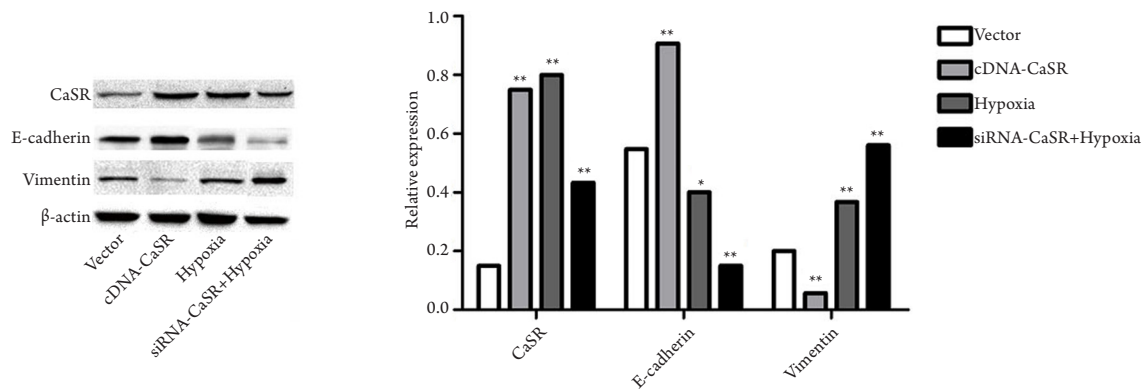


图4 腺病毒转染CaSR和缺氧后对CaSR, E-cadherin和Vimentin表达的影响(\**P*<0.05, \*\**P*<0.001)

**Figure 4 Effect on expression of CaSR, E-cadherin and Vimentin after adenovirus transfection and hypoxia in endometrial cancer cell line were observed by Western blotting (\**P*<0.05, \*\**P*<0.001)**

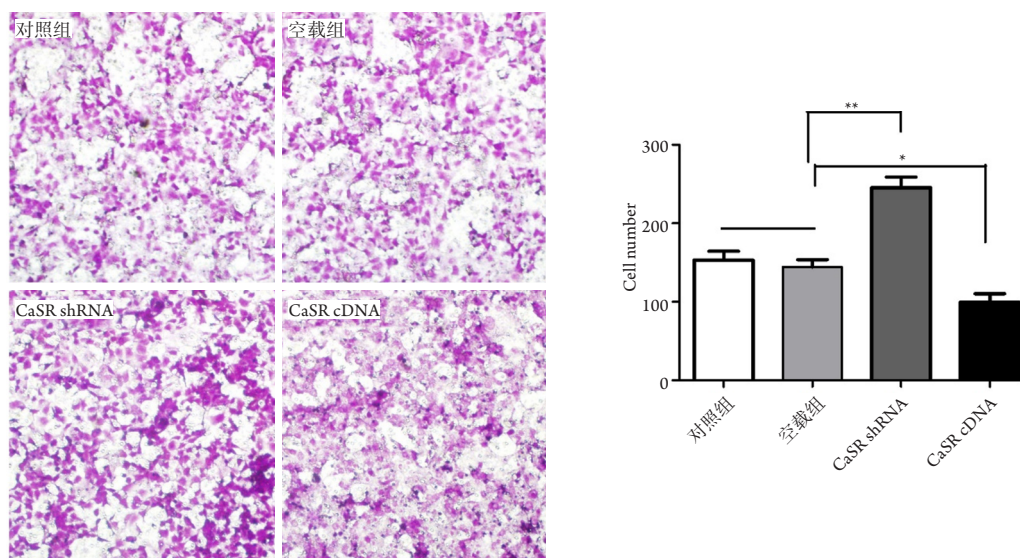


图5 Transwell迁移试验检测CaSR对Ishikawa细胞侵袭能力影响(结晶紫染色,  $\times 100$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.001$ )

Figure 5 Effect of CaSR on the invasiveness of Ishikawa cells was detected by Transwell migration (crystal violet staining,  $\times 100$ ; \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.001$ )

### 3 讨论

快速增殖是肿瘤的一个重要基本特征, 持续快速的增殖过程需要消耗大量的原料和能量, 形成肿瘤缺氧微环境, 为适应此环境, 肿瘤细胞的生物学行为会发生了一系列改变, 除发生代谢重编程之外, 同时为获得更佳适宜生长的土壤, 肿瘤细胞侵袭与转移能力也会进一步提高。本研究结果显示: 对子宫内膜癌细胞进行缺氧处理, 可以发现肿瘤细胞形态及细胞骨架发生变化, 向梭形间充质细胞样改变, 同时检测细胞蛋白(E-cadherin, Vimentin)也提示肿瘤细胞在缺氧微环境下可以从上皮细胞样向间质细胞转变。既往也有相关研究<sup>[10-11]</sup>报道: 卵巢癌细胞经缺氧后抑制E-cadherin的表达, 促进EMT表型及血管拟态的形成。在食管癌及直肠癌中, 激活HIF-1 $\alpha$ 也可抑制E-cadherin表达, 促进MMP-2表达增高, 进而使肿瘤细胞在缺氧微环境下发生EMT和血管的形成, 致使侵袭和转移增强<sup>[12-13]</sup>, 与本研究结论一致。

在本实验中, 我们还发现在子宫内膜癌细胞中有CaSR蛋白表达, 子宫内膜癌缺氧后CaSR表达增高。既往研究<sup>[7]</sup>显示: 成神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞间断缺氧之后也发现CaSR表达增高促进破骨细胞分化。为进一步研究CaSR在子宫内膜癌进展中发挥的作用, 通过沉默CaSR表达后发现E-cadherin表达降低, Vimentin表达升高, 肿瘤细胞侵袭迁移能力增强, 在缺氧环境下抑制CaSR的

表达还具有协同促进肿瘤细胞发生EMT的作用, CaSR在子宫内膜癌中扮演着抑制肿瘤细胞侵袭转移的角色。

CaSR主要通过调控细胞内外钙离子浓度变化从而诱导细胞发生转变。几项关于乳腺癌及骨髓瘤等的研究<sup>[14-17]</sup>指出: CaSR可以通过影响胞外钙离子浓度及E-cadherin表达而参与调节EMT的发生。本研究发现子宫内膜癌CaSR表达增高促进细胞内钙的内流和EMT的转变, 由此推测, CaSR可能通过改变细胞内外钙离子影响相关信号通路而参与调节子宫内膜癌EMT的发生, 但其具体的作用机制仍需进一步探究。

综上, 子宫内膜癌细胞在缺氧微环境下可促进CaSR表达及EMT的发生, 而高表达CaSR可增加细胞钙离子内流及抑制EMT发生, CaSR可能通过影响细胞内钙离子浓度参与抑制EMT的发生, 但其调控的分子机制还有待于进一步研究。

### 参考文献

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
2. Fares R, Kehoe S, Shams N. Preoperative prediction of lymph nodal metastases in endometrial carcinoma: is it possible? A literature review[J]. Int J Gynecol Cancer, 2018, 28(2): 394-400.
3. Colas E, Pedrola N, Devis L, et al. The EMT signaling pathways

- in endometrial carcinoma[J]. *Clin Transl Oncol*, 2012, 14(10): 715-720.
4. Singh N, Aslam MN, Varani J, et al. Induction of calcium sensing receptor in human colon cancer cells by calcium, vitamin D and aquamin: promotion of a more differentiated, less malignant and indolent phenotype[J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(7): 543-553.
  5. Chakrabarty S, Wang H, Canaff L, et al. Calcium sensing receptor in human colon carcinoma: interaction with Ca<sup>2+</sup> and 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(2): 493-498.
  6. Aggarwal A, Prinz-Wohlgenannt M, Gröschel C, et al. The calcium-sensing receptor suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell-like phenotype in the colon[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 61.
  7. Bhaskara VK, Mohanam I, Gujrati M, et al. Intermittent hypoxia effect on osteoclastogenesis stimulated by neuroblastoma cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105555.
  8. Xin X, Zeng X, Feng D, et al. The suppressive role of calcium sensing receptor in endometrial cancer[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 1076.
  9. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(6): 3440-3450.
  10. Du J, Sun B, Zhao X, et al. Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 575-583.
  11. Cheng JC, Klausen C, Leung PC. Hypoxia-inducible factor 1 alpha mediates epidermal growth factor-induced down-regulation of E-cadherin expression and cell invasion in human ovarian cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 329(2): 197-206.
  12. Jing SW, Wang YD, Kuroda M, et al. HIF-1 $\alpha$  contributes to hypoxia-induced invasion and metastasis of esophageal carcinoma via inhibiting E-cadherin and promoting MMP-2 expression[J]. *Acta Med Okayama*, 2012, 66(5): 399-407.
  13. Zhang J, Zhu L, Fang J, et al. LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1 $\alpha$  activation[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 29.
  14. El Hiani Y, Ahidouch A, Lehen'kyi V, et al. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 23(4/5/6): 335-346.
  15. Vizard TN, Newton M, Howard L, et al. ERK signaling mediates CaSR-promoted axon growth[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 603: 77-83.
  16. Yamaguchi T, Yamauchi M, Sugimoto T, et al. The extracellular calcium Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor is expressed in myeloma cells and modulates cell proliferation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(4): 532-538.
  17. Tu CL, Chang W, Xie Z, et al. Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(6): 3519-3528.

本文引用: 胡瑜, 肖瑞丽, 马静蕊, 辛小燕, 汪宏波. 钙感受受体逆转子宫内膜癌细胞上皮-间充质转化[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(4): 823-830. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.003

**Cite this article as:** HU Yu, XIAO Ruili, MA Jingrui, XIN Xiaoyan, WANG Hongbo. Calcium-sensitive receptors reverse epithelial-mesenchymal transformation of endometrial cancer cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(4): 823-830. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.04.003