

· 临床研究 ·

PGAM1在涎腺腺样囊性癌中的表达及其临床和生物学意义

罗亚东,武和明,杜洪明,宋海洋,马虞楠,李萌,丁旭*

南京医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室,江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**研究磷酸甘油酸变位酶1(phosphoglycerate mutase1,PGAM1)在人涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma,SACC)的表达及其临床和生物学意义。**方法:**收集31例SACC和25例正常腺体组织病理切片,免疫组化法检测两者中PGAM1蛋白的表达水平,分析其表达与临床病理之间的相关性。以人SACC高转移潜能细胞系(SACC-LM)为研究对象,构建PGAM1-siRNA干扰片段,检测分析PGAM1干扰前后细胞周期、增殖能力、迁移能力和侵袭能力变化;蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测干扰前后基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)表达的变化。**结果:**PGAM1在31例SACC中20例(64.5%)为高表达,11例(35.5%)为低表达;在25例正常腺体中均为低表达。PGAM1在实体型SACC的表达明显高于筛孔型和腺管型SACC($P < 0.05$),PGAM1的表达与性别、年龄和发生部位等无关($P > 0.05$)。PGAM1基因表达下调后细胞的迁移和侵袭能力明显减弱($P < 0.05$),MMP-2、MMP-9的表达也明显下调($P < 0.05$),但细胞增殖和细胞周期比例没有变化($P > 0.05$)。**结论:**PGAM1在SACC中的表达与其病理分型有关。PGAM1的表达下调可以显著抑制SACC的迁移和侵袭能力。

[关键词] PGAM1;涎腺腺样囊性癌;病理;迁移;侵袭**[中图分类号]** R739.87**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)04-528-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190411

Expression of PGAM1 in salivary adenoid cystic carcinoma and its clinical and biological significances

Luo Yadong, Wu Heming, Du Hongming, Song Haiyang, Ma Yunan, Li Meng, Ding Xu*

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the Affiliated Stomatological Hospital of NMU, Jiangsu Key Laboratory of Oral Diseases, NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To study the expression of phosphoglycerate mutase1 (PGAM1) in salivary adenoid cystic carcinoma (SACC) and its clinical and biological significance. **Methods:** PGAM1 expression was detected by immunohistochemistry in 31 cases of SACC and 25 normal glands, and the correlation with the clinical pathology parameter was analyzed. The highly metastatic human salivary adenoid cystic carcinoma cell line (SACC-LM) was transiently transfected by PGAM1 siRNA interference clips. Cell cycle changes, cell proliferation, migration, invasion were evaluated. The changes of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, N-cadherin, E-cadherin and vimentin expression were examined before and after the interference by Western blot. **Results:** PGAM1 was expressed at a low level in 25 normal glands. In 31 cases of SACC, 20 cases (64.5%) expressed PGAM1 at a high level, while 11 cases (35.5%) expressed at a low level. The PGAM1 expression was significantly higher in the solid pattern than that in the tubular and cribriform pattern ($P < 0.05$). The expression of PGAM1 had no correlation with gender, age or tumor location ($P > 0.05$). The down-regulation of PGAM1 had no effect on the proliferation capability and cell cycle of SACC-LM cells ($P > 0.05$), while cells migration and cell invasion were inhibited significantly after PGAM1 was down-regulated ($P < 0.05$). The expression of MMP-2 and MMP-9 was also down-regulated after PGAM1 was inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of PGAM1 was associated with pathological types of SACC; down-regulation of PGAM1 can significantly inhibit the migration and invasion of adenoid cystic carcinoma.

[Key words] PGAM1; salivary adenoid cystic carcinoma; pathology; migration; invasion

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04):528-533, 562]

[基金项目] 国家自然科学基金(81600908);江苏省医学创新团队(CXTDA2017036)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dingxu2018@aliyun.com

涎腺腺样囊性癌(salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是涎腺最常见的上皮性恶性肿瘤之一,占涎腺恶性肿瘤的21%~24%^[1]。头颈部好发于小涎腺及大涎腺,身体其他部分如支气管、乳腺较少见^[2]。SACC生长缓慢,浸润性强,易沿血管生长,有很强的嗜神经性,容易早期发生远处转移,其肺转移率最高可达40%,预后差^[3]。SACC从病理上分为3型,分别为实体型、管状型和筛孔型,其中实体型SACC的预后明显较管状型和筛孔型差^[4]。目前SACC的治疗方法以局部扩大切除联合放射治疗为主,但由于其强侵袭性和强嗜神经性以及口腔颌面部结构的复杂性,治疗效果都不是很理想,仍有较高的复发率和转移率^[5]。

近年研究结果证实,肿瘤细胞的增殖与糖代谢异常有着密切的关系,肿瘤细胞即使在有氧环境下也更倾向于通过糖酵解来获得能量,这被称为Warburg效应^[6]。在糖酵解过程中少不了代谢酶的参与,以代谢酶和糖酵解过程作为靶点也成为肿瘤治疗的一个新思路^[6]。磷酸甘油酸变位酶1(phosphoglycerate mutase1, PGAM1)是糖酵解过程中的关键酶,研究发现PGAM1在许多恶性肿瘤中都呈高表达,并与疾病预后有较大关系^[7-9],但目前尚无关于PGAM1与SACC关系的相关报道,本研究通过免疫组化方法研究PGAM1在SACC中的表达及与临床病理参数之间的关系。此外,通过siRNA干扰技术下调SACC高转移潜能细胞系(SACC-LM)中PGAM1基因表达,检测干扰后基质金属蛋白酶2(MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)表达情况的变化以反映其对SACC增殖、迁移和侵袭的影响,初步探讨PGAM1在SACC发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

收集南京医科大学附属口腔医院2007年4月—2011年11月期间在口腔颌面外科治疗的SACC患者病理切片共31例,年龄27~75岁,中位年龄45岁,男15例,女16例;小于45岁的13例,45岁及以上的18例;腮腺3例,颌下腺3例,舌下腺9例,小唾液腺16例(腭腺14例,颊腺2例)。按2005年WHO唾液腺肿瘤组织学分类标准确诊并行病理分型:实体型6例(19.35%),筛孔型和腺管型25例(80.65%)。

所有病例均已通过临床检查及病理诊断明确诊断为SACC,术前均未接受过化疗、放疗和生物治疗,且均在本院接受手术治疗。对照组选取25例颈部淋巴结清扫术的患者,其原发病与SACC无关,取其颌下腺腺体作为阴性对照,均取得患者知情同意,所有患者腺体病理均明确未见转移。

1.1.2 主要实验试剂

SACC高转移细胞系SACC-LM购自上海弘顺生物科技有限公司。RPMI1640培养液、胎牛血清(Gibco公司,美国),Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司,美国),兔抗人PGAM1抗体(Abcam公司,英国),鼠抗人MMP-2、MMP-9、vimentin、E-cadherin、N-cadherin、 β -actin抗体(Cell Signaling Technology公司,美国),qRT-PCR检测试剂盒(TaKaRa公司,日本),CCK8试剂盒(同仁化工公司,日本),Transwell小室(CORNING公司,美国),Matrigel(BD公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色

标本经福尔马林固定、石蜡包埋后切片(厚4 μ m),贴片,烤片,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,3% H₂O₂孵育20 min。抗原修复,加热后5%牛血清白蛋白封闭。一抗(1:200),4 $^{\circ}$ C过夜,以PBS作为阴性对照。二抗孵育30 min, SABC孵育20 min。DAB反应显色5 min,冲洗。苏木素复染,常规脱水、透明、干燥、封片。

所有切片分别请2位有经验的病理科医生在双盲下评估。通过观察PGAM1在细胞中表达的染色强度和阳性细胞的比例进行评估,评估标准按照文献报道方法^[16]:染色强度,无染色为0分;淡黄色为1分,弱阳性;棕黄色为2分,中阳性;棕褐色为3分,强阳性。每张病理切片在高倍镜(200倍)下随机选取5个视野,人工计数阳性细胞数占总细胞数的百分率为表达率。表达率按照以下标准分级:0分(0%~5%),1分(6%~25%),2分(26%~50%),3分(51%~75%),4分(>75%)。综合评分为染色强度及阳性表达率相乘:高于或等于6分为高表达,低于6分为低表达。

1.2.2 细胞培养与转染

SACC-LM细胞株采用含10%胎牛血清(FBS)的RPMI1640完全培养基,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)序列由上海吉玛基因工程有限公司合成,序列如下:靶向PGAM1的siRNA正义序列:5'-GUCCUGU-

CCAAGUGUAUCUTT-3';反义序列:5'-AGAUACA-CUUGGACAGGACTT-3';阴性对照正义序列:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3';反义序列5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3';转染方法按 Lipofectamine™2000 产品说明书进行。

1.2.3 Western blot 检测干扰效率和相关蛋白的表达变化情况

转染 48 h 后,收集细胞沉淀 RIPA 裂解,BCA 法蛋白定量后等量上样行 SDS-PAGE 电泳,转膜,5% BSA 封闭 2 h,一抗(1:1 000)4 ℃过夜,洗膜。二抗(1:1 000)室温孵育 1 h,洗膜,曝光。以 β -actin(1:1 000)作为参照。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测干扰效率

转染 48 h 后,收集细胞沉淀,TRIzol 法提取细胞 RNA,逆转录成 cDNA。PGAM1 引物序列为上游:5'-CCATGCAGTTTCTGGGGAT-3';下游:5'-CCGTCTGCAGCTACAACACTCA-3'。以 GAPDH 为内参对照,重复 3 次。

1.2.5 CCK8 检测细胞增殖

转染 24 h 后,每孔按 5×10^4 个细胞接种至 96 孔板中,每组设置 6 个复孔,孵育 24 h,每孔加入新鲜配制的 100 μ L 含 10% CCK8 的检测液,孵育 2 h,酶标仪测波长为 450 nm 的吸光值,重复 3 次。

1.2.6 流式检测仪检测细胞周期

转染 48 h 后,收集细胞沉淀并加入预冷的 70% 乙醇固定过夜。收集沉淀,加入碘化丙啶(PI)染色液室温孵育 30 min;流式细胞仪检测 DNA-PI 的荧光强度,重复 3 次。

1.2.7 划痕试验检测细胞迁移能力

取转染后生长状态良好的细胞,待细胞铺满后作“—”字划痕,无血清培养液漂洗细胞 2~3 次,用无血清培养液继续培养;分别于 0、36 和 72 h 在倒置显微镜下观察划痕内的细胞运动变化,重复 3 次。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

取 BD matrigel(5 mg/mL)基质胶 1:8 稀释,Tran-

swell 小室上室各孔加入 50 μ L,37 ℃孵育 5 h 呈固态,水化基底膜。每孔加入 200 μ L 细胞悬液(2×10^4 个),下室中加入 500 μ L 含有 10% FBS 的培养液,孵育 24 h;PBS 清洗、5% 戊二醛固定;棉签擦去膜内层细胞,结晶紫染色。随机取 5 个高倍镜视野计数分析,重复 3 次。

1.3 统计学方法

统计分析使用 SPSS22.0 数据分析软件包,PGAM1 的表达与临床病理参数关系的分析使用 Fisher 确切概率法。计量数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 *t* 检验进行统计分析。显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PGAM1 在 SACC 中的表达

PGAM1 染色后黄色阳性颗粒定位于胞浆,PGAM1 在 SACC 中表达明显,一般为中阳性或强阳性(图 1)。PGAM1 在 SACC 中高表达(综合评分 ≥ 6 分)20 例,占 64.52%,在 25 例正常腺体中均为低表达,SACC 中 PGAM1 的表达明显高于正常腺体,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

PGAM1 在 SACC 中表达率高低与患者性别、年龄及发生部位无关(P 值分别为 0.273、0.719、0.929)。PGAM1 在实体型 SACC 中的表达高于筛孔型和腺管型($P = 0.043$,表 1)。

2.2 si-PGAM1 抑制 PGAM1 的表达效率

转染 24 h 后,qRT-PCR 检测发现 PGAM1-siRNA 转染组(si-PGAM1 组)与阴性对照组(siNCtrl 组)相比,SACC-LM 细胞中 PGAM1 基因表达明显下调,干扰效率较高(图 2A)。转染 48 h 后,Western blot 检测干扰后 PGAM1 表达,结果显示:si-PGAM1 组 PGAM1 的灰度值下降,提示 PGAM1 表达下降(图 2B)。

2.3 si-PGAM1 对 SACC 细胞周期和增殖的影响

转染 72 h 后,si-PGAM1 组与 siNCtrl 组各期细胞

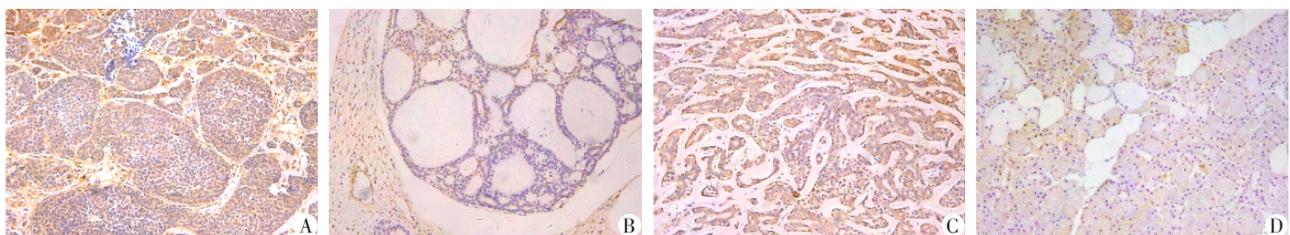


图1 PGAM1在实体型(A)、筛孔型(B)、腺管型(C)SACC以及正常腺体(D)中的表达情况(免疫组化,×200)

Figure 1 PGAM1 expression in solid pattern (A), cribriform pattern (B), tubular pattern (C) of SACC, and in normal glands (D) (immunohistochemistry, ×200)

表1 PGAM1表达与临床参数的关系

Table 1 Relationship between PGAM1 expression and clinical parameters [n(%)]

| 临床参数 | 例数 | 高表达 | 低表达 | P值 |
|--------|----|----------|----------|-------|
| 性别 | | | | 0.273 |
| 男 | 15 | 8(53.3) | 7(46.7) | |
| 女 | 16 | 12(75.0) | 4(25.0) | |
| 年龄 | | | | 0.718 |
| < 45岁 | 13 | 9(69.2) | 4(30.8) | |
| ≥ 45岁 | 18 | 11(61.1) | 7(38.9) | |
| 部位 | | | | 0.929 |
| 腮腺 | 3 | 2(66.7) | 1(33.3) | |
| 颌下腺 | 3 | 2(66.7) | 1(33.3) | |
| 舌下腺 | 9 | 5(55.6) | 4(44.4) | |
| 小唾液腺 | 16 | 11(68.8) | 5(31.2) | |
| 病理分型 | | | | 0.043 |
| 实体型 | 6 | 6(100.0) | 0(0.0) | |
| 筛孔及腺管型 | 25 | 14(56.0) | 11(44.0) | |

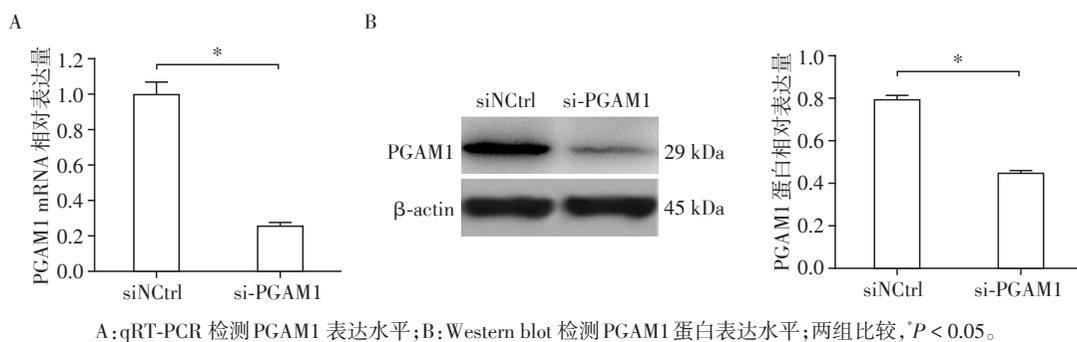
比例的差异均无统计学意义($P > 0.05$,图3A);转染24 h后,si-PGAM1和siNCtrl组SACC-LM细胞增殖情况没有明显差异($P > 0.05$,图3B)。

2.4 si-PGAM1对SACC细胞迁移和侵袭能力的影响

划痕实验发现si-PGAM1组较siNCtrl组细胞迁移受到抑制(图4A)。Transwell结果显示siNCtrl组穿膜细胞数为(183.00 ± 10.60)个,si-PGAM1组的穿膜细胞数为(42.00 ± 8.70)个,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4B),提示PGAM1下调后SACC-LM细胞的侵袭能力明显降低。

2.5 si-PGAM1对SACC细胞相关蛋白表达的变化

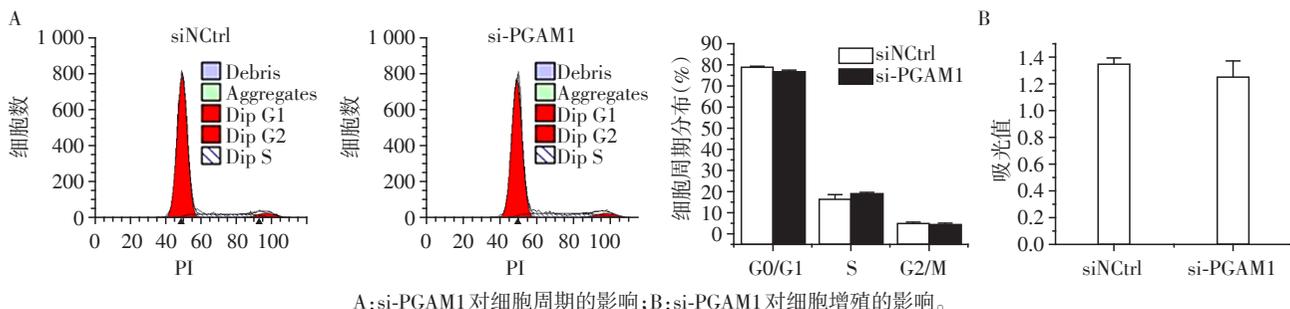
PGAM1下调后,MMP-2、MMP-9的条带灰度值降低,电泳条带变细;而N-cadherin、E-cadherin、vimentin的条带在干扰后未见明显变化(以β-actin为内参),说明干扰后MMP-2、MMP-9的表达明显降低,而N-cadherin、E-cadherin、vimentin的表达没有明显变化(图5)。



A: qRT-PCR 检测PGAM1 表达水平;B: Western blot 检测PGAM1 蛋白表达水平;两组比较,* $P < 0.05$ 。

图2 si-PGAM1对SACC-LM细胞中PGAM1的下调作用

Figure 2 The down-regulation of PGAM1 after transfection of si-PGAM1 in SACC-LM cells



A: si-PGAM1对细胞周期的影响;B: si-PGAM1对细胞增殖的影响。

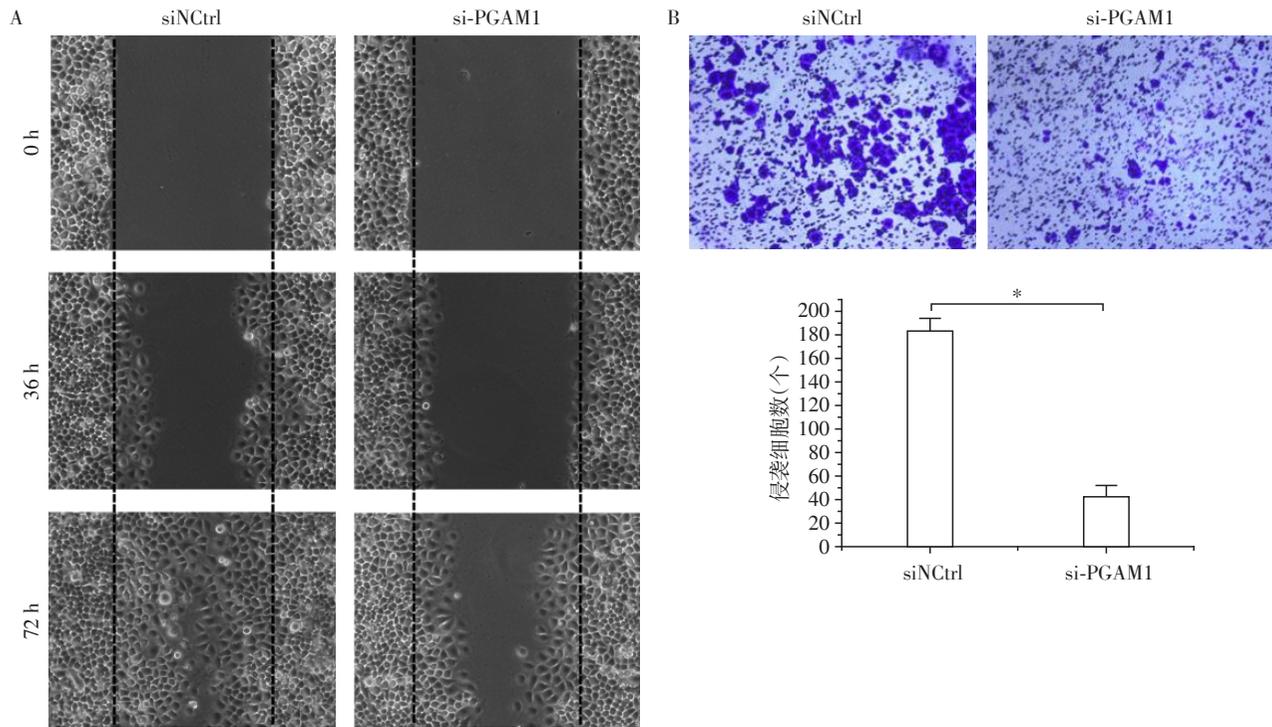
图3 si-PGAM1对SACC-LM细胞周期和增殖的影响

Figure 3 Effects of si-PGAM1 on cell cycle and proliferation of SACC-LM cells

3 讨论

SACC是口腔颌面部常见的恶性肿瘤之一,频繁局部复发和远处转移是患者生存质量差的主要原因^[5]。由于对其发病机制的认识有限,目前常

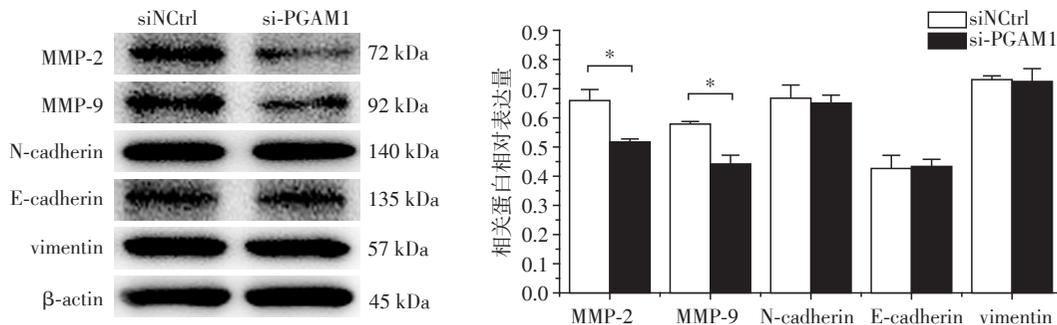
规的治疗方式仍是手术扩大切除以后放射治疗,效果不佳。肿瘤细胞的糖酵解过程近年来成为肿瘤研究的热点,有研究认为糖酵解过程的抑制剂可能为肿瘤靶向治疗开辟新的局面^[6]。近几年,PGAM1被发现在许多肿瘤中呈高表达状态,在肿瘤的生长



A: si-PGAM1 对细胞迁移能力的影响($\times 100$); B: si-PGAM1 对细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 100$), 两组比较, $P < 0.05$ 。

图4 si-PGAM1对SACC-LM细胞迁移和侵袭能力的影响

Figure 4 Effect of si-PGAM1 on migration and invasion of SACC-LM cells



Western blot 检测相关蛋白表达水平, $P < 0.05$ 。

图5 si-PGAM1 转染后相关蛋白的表达

Figure 5 The expression of related proteins after si-PGAM1 transfection

中起重要作用^[10],同时研究发现抑制这种酶可以导致肿瘤死亡,这使PGAM1成为肿瘤治疗的一个新靶点。目前在口腔鳞状细胞癌^[11]、肺癌^[9]、膀胱癌^[12]等多种肿瘤中发现有异常表达,可能与肿瘤的预后存在一定的相关性。

目前PGAM1在SACC的表达情况尚无文献报道,其在肿瘤的发生过程中是否发挥作用也不清楚,本研究通过免疫组化实验显示,PGAM1在31例SACC中高表达率为64.52%(20/31),而在25例正常腺体组织中PGAM1均为低表达,说明PGAM1在SACC的发生发展中起着一定作用,可能参与到

SACC细胞的糖酵解过程中,为肿瘤的生长提供能量,但PGAM1在SACC中的表达与患者的年龄、性别和发生部位没有相关性,与SACC的病理分型相关。Szanto等^[13]对SACC 15年的随访发现实体型生存率明显低于筛孔型、腺管型(实体型、筛孔型、腺管型15年生存率分别为5%、26%、39%)。Witt^[14]研究发现SACC的组织分型对预后具有重要影响,并且实体型SACC的生存率明显低于筛孔型和腺管型。Perzin等^[15]在其研究中发现实体型SACC的复发概率最高,预后最差。本研究免疫组化结果提示PGAM1在实体型中的表达明显高于腺管型和筛孔

型,而实体型的恶性程度更高,说明PGAM1的表达与SACC的恶性程度呈正相关,并可能与其预后有一定的相关性。同时,我们下调PGAM1在SACC-LM细胞的表达,探讨对其侵袭和迁移能力的影响。

MMP-2、MMP-9可以降解多种细胞外基质,促进恶性肿瘤细胞的侵袭和转移,多项研究表明其在恶性肿瘤中高表达,且与预后有一定的相关性^[16]。MMP-2、MMP-9在SACC中呈高表达^[17-18],且研究结果显示MMP-2、MMP-9在肿瘤的生长、侵袭、转移^[19]以及肿瘤血管的生成方面^[20]起着重要作用。本研究通过下调PGAM1,发现MMP-2、MMP-9的表达明显降低,说明PGAM1高表达促进SACC侵袭和转移的原因可能与MMP-2、MMP-9有关,但具体机制有待进一步研究。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)指上皮细胞到间质细胞的转化,使其迁移和运动能力增强,在癌症发生和转移中起着很重要的作用^[21]。vimentin是EMT的标志物,其高表达与肿瘤的恶性程度和不良预后相关^[22]。E-cadherin表达下调和N-cadherin的表达上调可促进EMT的进程和肿瘤细胞的侵袭和转移,往往预示着肿瘤的预后欠佳^[23-25]。本研究下调PGAM1后发现N-adherin、E-cadherin、vimentin在干扰后表达没有明显变化,说明PGAM1高表达促进SACC的侵袭和转移可能不是通过增强肿瘤细胞的EMT来实现的。此外,本研究样本量有限,PGAM1对SACC迁移和侵袭的具体机制有待进一步研究。

综上所述,PGAM1在SACC中的表达与其病理分型有关。下调PGAM1的表达可以显著抑制SACC的迁移和侵袭能力,PGAM1有望为SACC肿瘤靶向治疗提供新的选择。

[参考文献]

[1] 张志愿. 口腔颌面肿瘤学[M]. 山东:山东科技出版社, 2004:395-412

[2] Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—An update[J]. Oral Oncol, 2015, 51(7):652-661

[3] Liu S, Ye D, Xu D, et al. Autocrine epiregulin activates EGFR pathway for lung metastasis via EMT in salivary adenoid cystic carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7(18): 25251-25263

[4] Dong Q, Ding X, Chang B, et al. PRL-3 promotes migration and invasion and is associated with poor prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma[J]. J Oral Pathol Med, 2016, 45(2):111-118

[5] Husain Q, Kanumuri VV, Svider PF, et al. Sinonasal adenoid cystic carcinoma: systematic review of survival and treatment strategies [J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 148(1):29-39

[6] Ganapathy-Kanniappan S, Geschwind JF. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects [J]. Mol Cancer, 2013, 12: 152

[7] Gao H, Yu B, Yan Y, et al. Correlation of expression levels of ANXA2, PGAM1, and CALR with glioma grade and prognosis[J]. J Neurosurg, 2013, 118(4): 846-853

[8] Li C, Shu F, Lei B, et al. Expression of PGAM1 in renal clear cell carcinoma and its clinical significance[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8):9410-9415

[9] Sun Q, Li S, Wang Y, et al. Phosphoglyceric acid mutase-1 contributes to oncogenic mTOR-mediated tumor growth and confers non-small cell lung cancer patients with poor prognosis[J]. Cell Death Differ, 2018, 25(6):1160-1173

[10] Li C, Shu F, Lei B, et al. Expression of PGAM1 in renal clear cell carcinoma and its clinical significance[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(8):9410-9415

[11] Zhang D, Wu H, Zhang X, et al. Phosphoglycerate mutase 1 predicts the poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and is associated with cell migration[J]. J Cancer, 2017, 8(11): 1943-1951

[12] Peng XC, Gong FM, Chen Y, et al. Proteomics identification of PGAM1 as a potential therapeutic target for urothelial bladder cancer[J]. J Proteomics, 2016, 132:85-92

[13] Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, et al. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands [J]. Cancer, 1984, 54(6):1062-1069

[14] Witt RL. Adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands[J]. Ear Nose Throat J, 1991, 70(4):218-222

[15] Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course [J]. Cancer, 1978, 42(1):265-282

[16] Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M, et al. *In vitro* modulation of MMP-2 and MMP-9 in pediatric human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors [J]. Int J Oncol, 2014, 44(1):27-34

[17] Zhou X, Huang S, Jiang L, et al. Expression of RECK and MMP-2 in salivary adenoid cystic carcinoma: Correlation with tumor progression and patient prognosis [J]. Oncol Lett, 2014, 7(5):1549-1555

[18] Zhao L, Jiang L, Du P, et al. Expression of SKA1 and MMP-9 in primary salivary adenoid cystic carcinoma: Correlation with tumor progression and patient prognosis [J]. Acta Otolaryngol, 2016, 136(6):575-579

(下转第562页)

in patients with gestational diabetes[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 181(2): 199-206

[5] Bain E, Crane M, Tieu J, et al. Diet and exercise interventions for preventing gestational diabetes mellitus [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2015, 4(4): CD010443

[6] Zhu WW, Fan L, Yang HX, et al. Fasting plasma glucose at 24-28weeks to screen for gestational diabetes mellitus: new evidence from China[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36: 2038-2040

[7] Ozgurdinc AS, Yilmaz S, Yeral MI, et al. Prediction of gestational diabetes mellitus in the first trimester: Comparison of C-reactive protein, fasting plasma glucose, insulin and insulin sensitivity indices [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2014, 28(16): 1957-1962

[8] Eren MA, Vural M, Cece H, et al. Association of serum amyloid A with subclinical atherosclerosis in women with gestational diabetes [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2012, 28(12): 1010-1013

[9] Salmi AA, Zaki NM, Zakaria R, et al. Arterial stiffness, inflammatory and pro-atherogenic markers in gestational diabetes mellitus [J]. *Vasa*, 2012, 41(2): 96-104

[10] Iwama N, Sugiyama T, Metoki H, et al. Maternal body mass index is a better indicator of large-for-gestational-age infants compared with a 75-goral glucose tolerance test in early pregnancy: The JAGS trial [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 132: 10-18

[11] 魏青文, 颜彬, 龚丽娟. 糖化血红蛋白、糖化血清蛋白、C反应蛋白联合检测对早期妊娠期糖尿病的诊断价值[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2018, 10(1): 54-56

[12] Hao M, Lin L. Fasting plasma glucose and body mass index during the first trimester of pregnancy as predictors of gestational diabetes mellitus in a Chinese population [J]. *Endocr J*, 2017, 64(5): 561-569

[13] 李青, 包玉倩, 潘洁敏, 等. 新诊断2型糖尿病患者糖化血清白蛋白水平与胰岛β细胞功能的关系[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(12): 814-817

[14] 李青, 潘洁敏, 马晓静, 等. 糖化血红蛋白和糖化血清白蛋白联合检测在糖尿病筛查中的应用[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(26): 1813-1816

[15] 马付坚, 梁林慧, 黄艳. 糖化白蛋白筛查妊娠糖尿病的研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(z1): 316-319

[16] 徐湘, 朱晓巍, 蒋艳敏, 等. 2 748 例住院孕妇妊娠期糖发病率及危险因素的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(5): 695-698

[收稿日期] 2018-10-22

(上接第 533 页)

[19] Song J, Wu C, Korpos E, et al. Focal MMP-2 and MMP-9 activity at the blood-brain barrier promotes chemokine-induced leukocyte migration [J]. *Cell Rep*, 2015, 10(7): 1040-1054

[20] Lv Y, Zhao X, Zhu L, et al. Targeting intracellular MMPs efficiently inhibits tumor metastasis and angiogenesis [J]. *Theranostics*, 2018, 8(10): 2830-2845

[21] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196

[22] Brzozowa M, Wyrobiec G, Kołodziej I, et al. The aberrant overexpression of vimentin is linked to a more aggressive status in tumours of the gastrointestinal tract [J]. *Gastroenterol Rev*, 2015, 1: 7-11

[23] Cai D, Chen SC, Prasad M, et al. Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration [J]. *Cell*, 2014, 157(5): 1146-1159

[24] Zhang X, Liu G, Kang Y, et al. N-cadherin expression is associated with acquisition of EMT phenotype and with enhanced invasion in erlotinib-resistant lung cancer cell lines [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57692

[25] 张丽娟, 郑文亭, 兰玲, 等. 二甲双胍对甲状腺未分化癌侵袭转移的影响及机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(5): 554-558

[收稿日期] 2018-09-27