

CD147 在乳腺癌细胞中的表达及对癌细胞增殖及 TGF- β 信号通路的影响

唐小乔,桑剑锋,张寅,史先彪,苏磊

(南京大学医学院附属鼓楼医院,江苏 南京 210000)

摘要:[目的] 观察细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(CD147)在乳腺癌细胞表达及对癌细胞增殖及转化生长因子- β (TGF- β)信号通路的影响。[方法] 收集 2018 年 4 月至 2019 年 2 月我院诊治的 50 例乳腺癌患者的乳腺癌和癌旁组织样本,CD147 表达采用免疫组化检测。采用 Western blot 检测不同乳腺癌细胞中 CD147 蛋白表达,乳腺癌细胞 HCC1806 中转染 siRNA 后检测乳腺癌细胞增殖能力和 TGF- β 信号通路蛋白表达。[结果] 与癌旁组织相比,乳腺癌组织中 CD147 蛋白表达明显上调($\chi^2=54.958, P<0.001$)。与正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 相比,乳腺癌细胞中 CD147 蛋白表达水平明显上调($F=10.841, P<0.001$)。与对照组相比,转染 CD147-siRNA 后第 2d 和 3d 细胞增殖能力明显下降($t=5.029$ 和 $5.316, P=0.007$ 和 0.006),同时 TGF- β 、磷酸化 SMAD 家族成员 3(p-Smad3)和转录因子 E2F(E2F4)蛋白水平明显升高($t=7.934, 10.427$ 和 $9.985, P=0.001, <0.001$ 和 0.001),而 Myc 家族蛋白 c(c-Myc)蛋白水平明显下降($t=10.137, P=0.001$)。[结论] 乳腺癌中 CD147 表达明显上调,CD147 可能通过抑制 TGF- β /Smad3 信号通路来促进乳腺癌细胞增殖。乳腺癌中 CD147 表达在乳腺癌诊断和治疗中具有一定临床意义。

关键词:细胞外基质金属蛋白酶诱导因子;乳腺癌;增殖;转化生长因子- β

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2020)05-0413-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2020.05.B009

Expression of CD147 in Breast Cancer Cells and Its Effect on Proliferation and TGF- β Signaling

TANG Xiao-qiao, SANG Jian-feng, ZHANG Yin, SHI Xian-biao, SU Lei

(Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210000, China)

Abstract:[Objective] To investigate the expression of CD147 in breast cancer cells and its effect on proliferation and TGF- β signaling. [Methods] The expression of CD147 in breast cancer and pericancerous tissue samples of 50 breast cancer patients treated in our hospital from April 2018 to February 2019 was detected by immunohistochemistry. Western blotting was used to detect CD147 protein expression in breast cancer cell lines. Breast cancer HCC1806 cells were transfected with siRNA, the cell proliferation capacity and the expression of TGF- β signaling pathway protein were detected. [Results] Compared with the adjacent tissues, CD147 protein expression in breast cancer tissues was significantly up-regulated($\chi^2=54.958, P<0.001$). Compared with MCF-10A normal breast epithelial cells, CD147 protein expression was significantly up-regulated in HCC1806 breast cancer cells($F=10.841, P<0.001$). Compared with the control group, the proliferation of CD147-siRNA transfected HCC1806 cells significantly decreased cells at d2 and d3 after transfection ($t=5.029$ and $5.316, P=0.007$ and 0.006), the expression levels of TGF- β , p-Smad3 and E2F4 proteins were significantly increased($t=7.934, 10.427$ and $9.985, P=0.001, <0.001$ and 0.001), while c-Myc protein levels were significantly decreased($t=10.137, P=0.001$). [Conclusion] CD147 expression is significantly up-regulated in breast cancer, which may promote proliferation of breast cancer cells by inhibiting TGF- β /Smad3 signaling pathway.

Subject words:extracellular matrix metalloproteinase inducer; breast cancer; proliferation; transforming growth factor- β .

乳腺癌容易发生骨转移和肺转移,导致乳腺癌

患者的预后较差^[1]。在肿瘤转移过程中,一系列胞外基质蛋白的表达水平异常^[2]。细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN/CD147)是一种胞外基质蛋白,参与细胞间黏附和信号转导过程,与肺癌等肿瘤细胞的

基金项目:南京市医学科技发展项目(YKK17063)

通信作者:苏磊,副主任医师,博士;南京大学医学院附属鼓楼医院普
通外科,江苏省南京市中山路 321 号(210000);E-mail:
suleinjg@163.com

收稿日期:2019-10-30; **修回日期:**2019-11-29

增殖和转移密切相关, 可以作为胃癌等肿瘤的预后和诊断标志物^[3-4]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 参与细胞生长和分化的调节, 在肺癌等肿瘤中 TGF- β 信号通路的异常激活会导致肿瘤生长和转移抑制^[5]。本研究对乳腺癌中 CD147 表达情况进行检测, 观察沉默 CD147 表达对乳腺癌细胞增殖的影响及其作用机制。

1 资料与方法

1.1 临床样本采集

收集 2018 年 4 月至 2019 年 2 月我院手术治疗的乳腺癌患者 50 例的乳腺癌组织样本及距离癌组织 5cm 以上的正常乳腺组织作为癌旁组织。手术切除组织样本用 PBS 冲洗 3 次将组织上残留血液冲洗干净, 吸水纸吸干残留磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 后置于 10% 中性甲醛中固定。本研究经过医院伦理委员会审核批准, 患者签署知情同意书。

1.2 细胞、试剂和仪器

人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 和乳腺癌细胞 MCF7、T47D、BT474、SUM149PT 和 HCC1806 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。DMEM 高糖培养基和胎牛血清均购自美国 Hyclone 生物科技有限公司, CD147、磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、TGF- β 、SMAD 家族成员 3 (SMAD family member 3, Smad3)、磷酸化 SMAD 家族成员 3 (phosphorylated SMAD family member 3, p-Smad3)、转录因子 E2F (transcription factor E2F, E2F4) 和 Myc 家族蛋白 c (Myc family protein c, c-Myc) 抗体均购自美国 Abcam 生物科技有限公司。Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂盒购自美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 免疫组化检测

临床组织样本经固定后依次将组织浸泡于 70%、80%、90%、95% 和 100% 乙醇中, 分别处理 60min 对组织样本进行脱水。二甲苯处理 1h 后将组织样本浸没于石蜡中包埋 2h, 包埋结束后将组织切片成 5 μ m 左右并放置于载玻片上。依次经二甲苯、100%、95%、90%、80% 和 70% 处理 5min 以脱蜡。抗原修复采用高压修复法, 将组织样本放置于高压锅中, 加入柠檬酸缓冲液 (pH=6.0) 后煮沸并维持高压

10min。自然冷却后使用 PBS 缓冲液冲洗 3 次组织样本。于组织样本上滴加经稀释的一抗溶液, 使一抗均匀覆盖在组织样本上, 稀释比例为 1:200。PBS 缓冲液冲洗 3 次后将多余 PBS 缓冲液吸去, 并将二抗滴加于组织样本上, 使二抗均匀覆盖组织样本, 室温下孵育 30min。PBS 冲洗 3 次后滴加二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色液于组织样本上, 显色 10min 后采用苏木精复染 5min。经 70%、80%、90%、95%、100% 乙醇和二甲苯处理组织样本脱水, 中性树脂封片后于倒置显微镜下观察免疫组化染色结果。细胞阳性数分为 5 个等级, 分别为 0、1、2、3 和 4 分, 阳性细胞比例 $\leq 5\%$ 为 0 分, $5\% < \text{阳性比例} < 25\%$ 为 1 分, $25\% \leq \text{阳性比例} < 50\%$ 为 2 分, $50\% \leq \text{阳性比例} < 75\%$ 为 3 分, 阳性比例 $\geq 75\%$ 为 4 分。染色强度分为无色 (0 分), 淡黄色 (1 分), 棕黄色 (2 分) 和棕褐色 (3 分), 最终评分为阳性细胞数评分和染色强度评分乘积, 最终评分按等级分为阴性 (0~4 分) 和阳性 (5~12 分)。

1.4 乳腺癌细胞中蛋白表达检测

收集乳腺癌细胞于离心管中, 5000rpm 离心 10min 后弃去上清液, 加入细胞裂解液并用移液器反复吹打重悬细胞, 冰上裂解 30min 后 12000rpm 离心 10min。将上清液转移至另一干净离心管中, 采用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid disodium, BCA) 蛋白定量试剂盒测定上清液中蛋白浓度。行 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 采用湿转法将蛋白转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 将 PVDF 膜浸没在 5% 脱脂奶粉中封闭 1h。PBST 冲洗 PVDF 膜 3 次后根据蛋白大小裁剪 PVDF 膜, 在蛋白对应位置条带上滴加一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日弃去一抗, 使用 PBS-吐温缓冲液 (PBS-tween buffer, PBST) 冲洗 3 次 PVDF 膜, 并在膜上滴加二抗 (1:5000) 稀释, 室温孵育 1h, PBST 冲洗 3 次。ECL 化学发光显色试剂盒显影。以目的条带和 GAPDH 内参蛋白条带的灰度值比值作为蛋白的相对蛋白表达量。实验重复 3 次。

1.5 siRNA 转染乳腺癌细胞

转染前 1d 将 HCC1806 乳腺癌细胞铺种于 6 孔板中, 8×10^5 个细胞/孔, 共铺种 9 孔, 每孔培养基为 2ml。铺种细胞 16h 后进行转染, 细胞分为对照组、

NC-siRNA 组和CD147-siRNA 组, 每组转染 3 孔, 对照组只加入脂质体试剂, 不添加 siRNA。NC-siRNA 组和 CD147-siRNA 组则在加入脂质体试剂的基础上, 分别加入 20pmol 阴性对照 NC-siRNA 和 CD147-siRNA, 转染过程严格按照 Lipofectamine 3000 脂质体转染试剂盒进行。转染 4h 后更换培养基, 培养至 48~72h 可进行后续检测。

1.6 磺酰罗丹明 B(SRB)实验检测乳腺癌细胞增殖

将 HCC1806 乳腺癌细胞铺种于 96 孔板中, 3×10^4 个细胞/孔, 100 μ l 培养基/孔。按照 1.5 实验步骤转染 siRNA 于乳腺癌细胞中。于转染后 8h(0d)、1d 和 2d 三个时间点处理细胞, 将培养基吸出后加入 10%三氯醋酸室温固定细胞 30min, 固定完成后将 10%三氯醋酸吸出, 并加入 PBS 缓冲液 100 μ l 清洗细胞, 清洗结束后将 PBS 吸出。待 2d 细胞收集完成即可进行 SRB 染色, 每孔加入 100 μ l SRB 溶液并于室温孵育 30min, 染色结束后将 SRB 吸出, 使用 1% 醋酸清洗 3 次, 室温晾干后加入 1% Tris 碱溶液 100 μ l, 吹打混匀后于酶标仪中读取 540nm 波长处吸光值, 以吸光值作为纵坐标, 时间为横坐标绘制生长曲线。每组设置 3 个复孔。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件分析数据, 相对蛋白表达水平等计量资料采用平均值 $\pm$ 标准差来表示, 采用 t 检验; CD147 阳性率等计数资料以百分比来表示, 通过 χ^2 检验进行统计学分析; 不同乳腺癌细胞系 CD147 蛋白表达量比较采用方差检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌及其癌旁组织中 CD147 表达比较

CD147 在乳腺癌组织中表达水平较高, 50 例癌旁组织中, 8 例 CD147 阳性, 42 例 CD147 阴性。而在 50 例乳腺癌组织中, 45 例 CD147 阳性, 5 例 CD147 阴性, 两组间阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 54.958, P < 0.001$) (Figure 1, Table 1)。

2.2 乳腺癌细胞中 CD147 表达

以人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 作为对照, 采用 Western blot 检测乳腺癌细胞 MCF7、T47D、BT474、SUM149PT 和 HCC1806 中 CD147 蛋白表达水平, Western blot 结果见 Figure 2。乳腺癌细胞中 CD147 表达明显高于 MCF-10A 对照细胞 ($F = 10.841, P < 0.001$), 其中 HCC1806 细胞 CD147 表达水平最高, 故后续实验选择 HCC1806 细胞作为研究材料。

2.3 转染效果验证

CD147 siRNA 转染 HCC1806 细胞 36h 后, CD147 蛋白表达情况见 Figure 3。CD147-siRNA 组 CD147 蛋白表达明显低于对照组 ($t = 9.945, P < 0.001$); 而 NC-siRNA 组 CD147 蛋白表达与对照组之间差异无统计学意义 ($t = 0.190, P = 0.858$) (Figure 3)。

2.4 转染 CD147 siRNA 对 HCC1806 细胞增殖的影响

与对照组相比, CD147-siRNA 组在第 1d 和 2d 细胞数目明显下降 ($t = 5.029$ 和 $5.316, P = 0.007$ 和

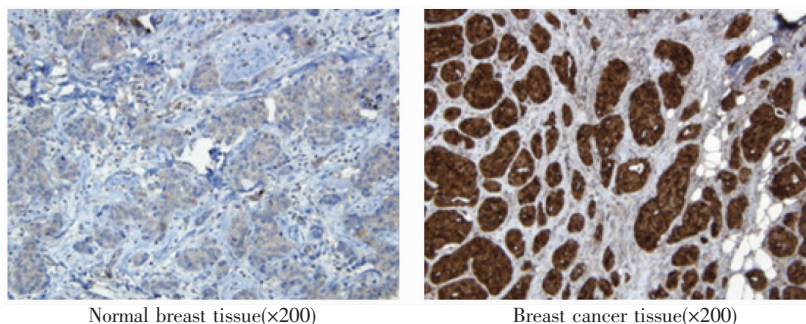


Figure 1 CD147 expression in breast cancer tissue and normal breast tissue

Table 1 CD147 expression in breast cancer tissue and normal breast tissue

Group	N	CD147 expression		χ^2	P
		Positive	Negative		
Normal breast tissue	50	8	42	54.958	<0.001
Breast cancer tissue	50	45	5		

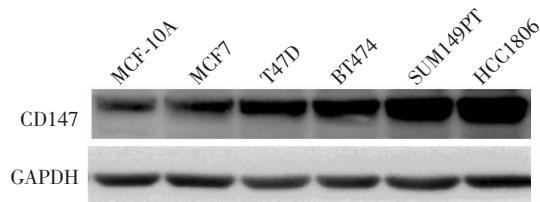


Figure 2 CD147 expression in breast cancer cells

0.006), 组间差异具有统计学意义。细胞的生长曲线见 Figure 4。

2.5 转染 CD147 siRNA 对 HCC1806 细胞 TGF- β 信号通路的影响

与对照组相比, CD147-siRNA 组 TGF- β 、p-Smad3 和 E2F4 蛋白水平明显升高 ($t=7.934, 10.427$ 和 $9.985, P=0.001, <0.001$ 和 0.001), 而 c-Myc 蛋白水平明显下降 ($t=10.137, P=0.001$), GAPDH 和 Smad3 蛋白水平差异无统计学意义 ($t=0.077$ 和 $0.058, P=0.943$ 和 0.956) (Figure 5)。

3 讨论

在肿瘤中 CD147 作为促癌基因发挥相应生物学功能, 在肺癌和肝癌等肿瘤中 CD147 表达水平异常升高, 并且与肺癌患者的不良预后以及肝癌转移密切相关^[6-7], 能够促进前列腺癌和神经胶质瘤等肿瘤细胞的增殖和转移^[8-9]。CD147 是一种跨膜蛋白, 参与细胞信号转导和细胞间黏附等过程, 与肿瘤细胞增殖和转移密切相关^[10]。本研究发现在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中 CD147 的蛋白表达均明显上调, 实验结果表明在乳腺癌中 CD147 可能作为促癌基因发挥作用。Pawena 等^[11]发现在胆管癌中 CD147 作为促癌基因发挥作用, CD147 能够明显上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)蛋白的表达, 从而促进胆管癌细胞的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)转化, 进而导致胆管癌细胞发生侵袭和转移。Zou 等^[12]发现在卵巢癌中 CD147 表达与乙型肝炎病毒 X 蛋白相互作用蛋白(hepatitis B virus X interacting protein, HBXIP)表达呈正相关。HBXIP 在卵巢癌中是较强的促癌基因, 在卵巢癌中 CD147 基因转录受到 SP1 转录因子调控, 并且 HBXIP 能够促进转录因子 SP1(transcription factor Sp1, SP1)转录因子结合到 CD147 基因启动子区域, 从而激活 CD147 基因转录, 使得 CD147 表达上调, 进而促进卵巢癌细胞对顺铂的耐药性。Huang 等^[13]发现在甲状腺癌中 CD147 表达水平明显上调, 并且能够明显促进甲状腺癌细胞的葡萄糖代谢、增殖和转移, 与甲状腺癌患者的不良预后也存在密切联系。因此, 在肿瘤中 CD147 作为促癌基因具有普遍性, 在肿瘤转移、耐药和增殖等过程中均起到

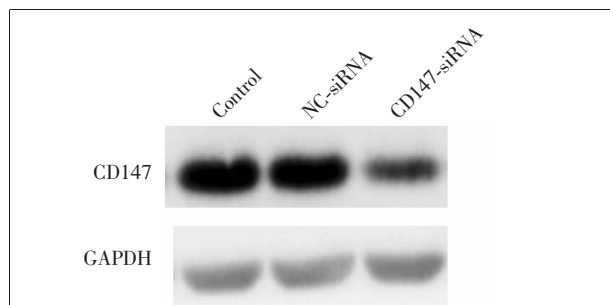


Figure 3 CD147 expression after CD147 siRNA transfected in breast cancer cells

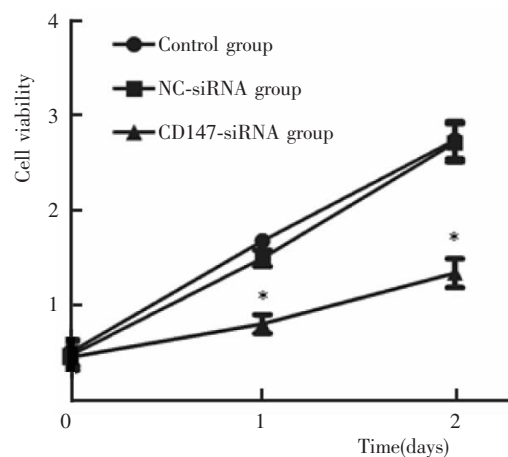


Figure 4 Effect of CD147 siRNA on cell proliferation of HCC1806

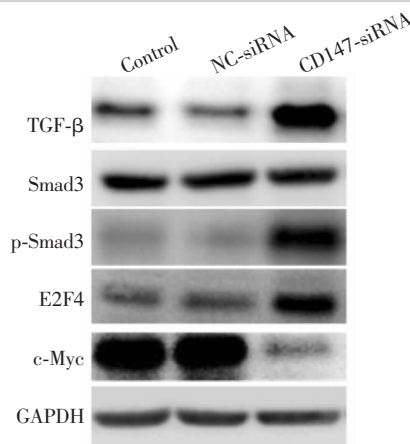


Figure 5 Effect of CD147 siRNA on expression of TGF- β , p-Smad3, E2F4, c-Myc, and Smad3 in HCC1806 cell

一定的促进作用。

本研究发现使用 siRNA 沉默 CD147 表达后, 乳腺癌细胞的增殖受到明显抑制, 实验结果表明在乳腺癌中 CD147 能够明显促进乳腺癌细胞增殖。Qin 等^[14]发现在前列腺癌中 CD147 蛋白能够与 Smad4

蛋白相互作用并阻断 Smad4 信号通路,从而抑制前列腺癌细胞增殖。Horikawa 等^[15]发现在膀胱癌中 Ad-REIC 能够抑制丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的活化,从而抑制 MAPK 下游分子 c-Myc 表达,进而抑制 c-Myc 对 CD147 的转录激活,使得 CD147 表达下调并抑制膀胱癌细胞增殖。因此,在乳腺癌中 CD147 可能通过激活 Smad4 和 MAPK 等增殖相关信号通路来促进乳腺癌细胞增殖。本研究进一步发现使用 siRNA 沉默 CD147 表达后 TGF- β /Smad3 信号通路激活,同时 TGF- β /Smad3 信号通路下游靶分子 E2F4 表达上调,而 c-Myc 表达明显下调。Zhu 等^[16]发现在胰腺癌中 E2F4 蛋白能够与网膜母细胞瘤样蛋白 2 (retinoblastoma-like protein 2, RBL2) 蛋白形成转录抑制复合物,通过结合到周期蛋白相关基因的启动子上抑制相应基因转录,导致肿瘤细胞周期受阻,使得胰腺癌细胞增殖能力下降,在胰腺癌中 E2F4 和 RBL2 均作为抑癌基因发挥作用。Lu 等^[17]发现在卵巢癌中 c-Myc 能够促进 DANCER 基因转录,而 DANCER 是 CDKN1A 的转录抑制因子,CDKN1A 能够抑制细胞周期进程,因此 c-Myc 通过促进 DANCER 基因转录而抑制 CDKN1A 的表达,从而促进细胞周期进程和肿瘤细胞增殖。Wang 等^[18]发现在非小细胞肺癌中抑制 TGF- β /Smad3 信号通路会导致 c-Myc 蛋白表达水平下降,同时肺癌细胞的增殖能力明显下降,表明 c-Myc 是 TGF- β /Smad3 信号通路的下游靶分子,并且在肿瘤细胞增殖中起到重要作用。因此,在乳腺癌细胞中由于 CD147 蛋白主要分布于细胞膜上,可能与 TGF- β 受体形成竞争关系,CD147 表达水平下降会导致 TGF- β 受体的大量活化,导致 TGF- β /Smad3 信号通路的活化,活化的 Smad3 蛋白入核并结合到 c-Myc 和 E2F4 基因的启动子上,抑制 c-Myc 基因表达的同时促进 E2F4 基因表达,从而抑制乳腺癌细胞增殖。

参考文献:

- [1] Sun X, Li P, Zhang M, et al. Effect of strychnine on expression of bone metastasis-related factors in breast cancer [J]. Journal of Chinese Oncology, 2017, 23(12): 1093-1097. [孙鑫, 李平, 张梅, 等. 马钱子碱对乳腺癌骨转移相关因子表达的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2017, 23(12): 1093-1097.]
- [2] Li YG. A microenvironment that tumor immunotherapy should not ignore: cancer-related fibroblasts [J]. Journal of Chinese Oncology, 2018, 24 (11): 1060-1064. [李营歌. 肿瘤免疫治疗不容忽视的微环境: 癌相关成纤维细胞[J]. 肿瘤学杂志, 2018, 24(11): 1060-1064.]
- [3] Zhou Y, Wu B, Li JH, et al. Rab22a enhances CD147 recycling and is required for lung cancer cell migration and invasion [J]. Exp Cell Res, 2017, 357(1): 9-16.
- [4] Hu C, Dong X, Wu J, et al. CD147 overexpression may serve as a promising diagnostic and prognostic marker for gastric cancer: evidence from original research and literature [J]. Oncotarget, 2017, 8(19): 30888-30899.
- [5] Zhang C, Hao Y, Wang Y, et al. TGF- β /SMAD4-regulated LncRNA-LINP1 inhibits epithelial-mesenchymal transition in lung cancer [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(12): 1715-1723.
- [6] Zhang X, Tian T, Zhang X, et al. Elevated CD147 expression is associated with shorter overall survival in non-small cell lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(23): 37673-37680.
- [7] Cui J, Huang W, Wu B, et al. N-glycosylation by N-acetylglucosaminyltransferase V enhances the interaction of CD147/basigin with integrin β 1 and promotes HCC metastasis [J]. J Pathol, 2018, 245(1): 41-52.
- [8] Mori A, Watanabe M, Sadahira T, et al. The downregulation of the expression of CD147 by tumor suppressor REIC/Dkk-3, and its implication in human prostate cancer cell growth inhibition [J]. Acta Med Okayama, 2017, 71(2): 135-142.
- [9] Yin H, Shao Y, Chen X. The effects of CD147 on the cell proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis in glioma [J]. Neurol Sci, 2017, 38(1): 129-136.
- [10] Muramatsu, Takashi. Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners [J]. J Biochem, 2016, 159(5): 481-490.
- [11] Paweena D, Ryusho K, Kulthida V, et al. Upregulation of CD147 promotes metastasis of cholangiocarcinoma by modulating the epithelial-to-mesenchymal transitional process [J]. Oncol Res, 2017, 25(7): 1047-1059.
- [12] Zou W, Ma X, Yang H, et al. Hepatitis B X-interacting protein promotes cisplatin resistance and regulates CD147 via Sp1 in ovarian cancer [J]. Exp Biol Med, 2017, 242(5): 497-504.
- [13] Huang P, Mao LF, Zhang ZP, et al. Down-regulated miR-125a-5p promotes the reprogramming of glucose metabolism and cell malignancy by increasing levels of CD147 in thyroid cancer [J]. Thyroid, 2018, 28(5): 613-623.
- [14] Qin H, Rasul A, Li X, et al. CD147-induced cell proliferation is associated with Smad4 signal inhibition [J]. Exp Cell Res, 2017, 358(2): 279-289.
- [15] Horikawa Y, Watanabe M, Sadahira T, et al. Overexpression of REIC/Dkk 3 suppresses the expression of CD147 and inhibits the proliferation of human bladder cancer cells [J]. Oncol Lett, 2017, 14(3): 3223-3228.
- [16] Zhu Y, Gu J, Li Y, et al. MiR-17-5p enhances pancreatic cancer proliferation by altering cell cycle profiles via disruption of RBL2/E2F4-repressing complexes [J]. Cancer Lett, 2018, 412(1): 59-68.
- [17] Lu Y, Hu Z, Mangala L S, et al. Myc targeted long non-coding RNA DANCER promotes cancer in part by reducing p21 levels [J]. Cancer Res, 2018, 78(1): 64-74.
- [18] Wang X, Li M, Hu M, et al. BAMBI overexpression together with β -sitosterol ameliorates NSCLC via inhibiting autophagy and inactivating TGF- β /Smad2/3 pathway [J]. Oncol Rep, 2017, 37(5): 3046-3054.