

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.03.013

· 基础研究 ·

## 类泛素化蛋白酶 1 基因的表达与肝癌细胞株侵袭转移的关系

刘延<sup>1</sup>, 李湘斌<sup>2</sup>, 杨定华<sup>2</sup>(1. 贵州省人民医院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550000; 2. 南方医科大学南方医院 肝胆外科, 广东 广州 510515)

**[摘要]** **目的:**研究类泛素化蛋白酶-1(sentrin-specific protease-1, *SENP-1*)基因在不同侵袭潜能肝细胞肝癌细胞株及人永生肝细胞中 mRNA 和蛋白的表达水平及其与肝癌细胞侵袭能力的关系。**方法:**使用 RT-PCR、Real-time PCR、Western blotting 和免疫荧光方法对肝癌细胞株 MHCC97L(低侵袭性)、MHCC97H 和 HCCLM3(高侵袭性)、SMMC-7721 和 HepG2(无明显侵袭性) *SENP-1* mRNA 和蛋白表达水平进行检测,以人永生肝细胞株 HL-7702 为对照,分析 *SENP-1* 的表达与肝癌细胞株侵袭转移能力的关系。**结果:**RT-PCR 和 Real-time PCR 检测结果显示, *SENP-1* mRNA ( $F = 5.658; P = 0.042$ )和蛋白 ( $F = 88.909, P = 0.000$ )在肝癌细胞株中的表达随着肝癌细胞株侵袭潜能的增高而增高;Western blotting 检测结果显示,5 种肝癌细胞株 *SENP-1* 蛋白水平均显著高于人永生肝细胞株;免疫荧光法观察发现, *SENP-1* 蛋白在肝癌细胞株内主要为胞质表达,部分胞核表达。**结论:***SENP-1* 基因在肝癌细胞株中的高表达可能具有促进肝癌细胞侵袭转移的作用。

**[关键词]** 类泛素化蛋白酶-1 基因;肝癌细胞;侵袭;转移

**[中图分类号]** R735.7; R730.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2014)03-0309-05

## Levels of sentrin specific-protease-1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells with different invasive and metastatic capacities

Liu Yan<sup>1</sup>, Li Xianghong<sup>2</sup>, Yang Dinghua<sup>2</sup>(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550000, Guizhou, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:**To determine mRNA and protein levels of sentrin-specific protease 1 (*SENP-1*) in human non-tumor hepatic cells and various types of human hepatocellular carcinoma (HCC) cells with different invasive and metastatic capacities. **Methods:** Low invasive HCC cell lines MHCC97L, high invasive HCC cell lines MHCC97H and HCCLM3, non-invasive HCC cell lines SMMC-7721 and HepG2 and immortalized normal liver cell line HL-7702 were utilized. Their levels of *SENP-1* mRNA and protein were determined by RT-PCR and quantitative real-time PCR and Western blotting respectively while the intracellular location of *SENP-1* assessed by immunofluorescence staining. **Results:** RT-PCR and real-time PCR analyses showed that *SENP-1* mRNA abundance was significantly different between the cell lines evaluated ( $F = 5.658; P = 0.042$ ) and increased with the invasive capacity of the cells. protein ( $F = 88.909, P = 0.000$ ) in HCC cell lines were increased significantly. Western blotting analysis showed that *SENP-1* protein levels were significantly higher in all five HCC cell lines tested as compared the immortalized normal liver cell line ( $F = 88.9, P = 0.0001$ ). Immunofluorescence staining revealed that *SENP-1* protein was localized predominantly in cytoplasm and in a small quantity in the nucleus. **Conclusion:** The higher the invasive and metastatic capacities of hepatocellular carcinoma cells, the higher the *SENP-1* mRNA and protein levels. This observation suggests that *SENP-1* may promote hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis.

**[Key words]** sentrin-specific protease 1 gene (*SENP-1*); hepatocellular carcinoma; invasion; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(2): 309-313]

**[基金项目]** 广州市白云区科技计划项目资助(No. 2011-KZ-56)。Project supported by the Science and Technology Project of Baiyun District of Guangzhou City(No. 2011-KZ-56)

**[作者简介]** 刘延(1987-),男,贵州省贵阳市人,博士,主要从事肝癌基础与临床研究。E-mail: l\_yan1987@126.com

**[通信作者]** 杨定华(Yang Dinghua, corresponding author), E-mail: dhyang5810@yahoo.com

肝细胞肝癌是当前危害人类生命和健康最严重的恶性肿瘤之一, 它也是我国最常见且恶性程度最高的肿瘤之一。类泛素( small ubiquitin-like modifier, SUMO)化修饰是一种重要的蛋白翻译后修饰形式, 可调节蛋白质的活性与功能。SUMO 化修饰是一个动态的过程, 受 SUMO 特异的 E1、E2 和 E3 酶催化, 而其逆反应则由 SUMO 特异的蛋白酶( SUMO-specific protease, SENP)家族来完成。类泛素化蛋白酶-1( sentrin-specific protease-1, SENP-1)是一种核蛋白酶, 在睾丸、肝脏、胰腺等组织中表达较高, 可催化大量 SUMO 化蛋白的去 SUMO 化, 其功能的紊乱与肿瘤的发生发展可能有着密切关系<sup>[1,2]</sup>。研究<sup>[3]</sup>发现, 在甲状腺嗜酸细胞肿瘤中 SENP-1 的表达水平上调超过 2 倍。SENP-1 在人类前列腺癌组织高表达, 而且在转 *SENP-1* 基因小鼠中, *SENP-1* 的高表达导致正常前列腺上皮细胞向肿瘤细胞分化<sup>[4]</sup>。本课题组以往研究<sup>[5]</sup>发现, SENP-1 在肝癌组织中的表达显著高于非癌组织, 其表达与肝癌新生血管生成密切相关, 且与肝癌患者临床预后相关。为进一步探讨 SENP-1 与肝癌侵袭和转移的关系, 本研究通过检测 SENP-1 在不同侵袭转移潜能的肝癌细胞株中的表达情况, 探讨其在肝癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 肝癌细胞株与主要试剂

肝癌细胞株 MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3 购自复旦大学肝癌研究所; 人永生代肝细胞株 HL-7702 及肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 购自中国科学院细胞库。其中 MHCC97H、HCCLM3 具有明显的侵袭性, MHCC97L 具有低侵袭性, HepG2、SMMC-7721 无明显侵袭性。TRIzol 和 RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, Real-time PCR 试剂盒( LightCycler® 480 SYBR Green I Master)购自 Roche 公司, 鼠抗人 SENP-1 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体及兔抗鼠二抗( HRP 标记)均购自上海 Abmart 公司, 免疫组化试剂盒( PV-9000)、二氨基联苯胺( DAB)显色剂均购自北京中山生物技术有限公司, 其余试剂均为国产分析纯。寡核苷酸引物由上海捷瑞生物公司合成。

### 1.2 RT-PCR 定性检测 *SENP-1* mRNA 在不同细胞株内的表达

MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3、HL-7702、HepG2 和 SMMC-7721 细胞总 RNA 抽提、cDNA 逆转录合成实验操作按试剂盒说明进行。*SENP-1* 的

PCR 引物序列选自引物银行( <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> ), 可用于 RT-PCT 及 Real-time PCR, 引物经 BLAST 配对确认( 表 1 ), 以 GAPDH 为内参。RT-PCR 反应体系: 25  $\mu$ l 反应体系包括 12.5  $\mu$ l Master Mix、上下游引物各 0.5  $\mu$ l、10  $\mu$ l 去离子水、1.5  $\mu$ l cDNA 模板; RT-PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min  $\rightarrow$  ( 95  $^{\circ}$ C、30 s  $\rightarrow$  引物对应 Tm 的温度、30 s  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C、1 min )  $\times$  35 个循环  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C、7 min, 5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 用 Kodark 1D 凝胶成像系统进行扫描分析。

表 1 PCR 引物序列  
Tab . 1 PCR primer sequences

Gene	Primer sequence	Product ( bp )
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	137
	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	
SENP-1	5'-AGTGAACCACAACCTCCGTATTTC-3'	112
	5'-CAAATGTCCTGCCTGGAAGATA-3'	

### 1.3 Real-time PCR 定量检测 *SENP-1* mRNA 在不同细胞株内的表达

Real-time PCR 检测 *GAPDH*、*SENP-1* mRNA 的实时荧光曲线, 作出标准曲线, 计算 *GAPDH* 与 *SENP-1* 扩增效率均在 0.95 ~ 1.05 之间, 相差不超过 0.1, 且各样本的扩增曲线都已达平台期, 溶解曲线均未检测到引物二聚体, 无非特异性荧光信号。反应体系如下: Master Mix( 2  $\times$  ) 10  $\mu$ l、PCR Primer( 10  $\times$  ) 2  $\mu$ l、cDNA 5  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ l, 总体积 20  $\mu$ l。反应程序采用 3 步法: 第一步 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 第二步 95  $^{\circ}$ C 扩增 10 s、引物 Tm 对应温度退火 20 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 共 45 个循环; 第三步溶解 95  $^{\circ}$ C、5 s, 65  $^{\circ}$ C、1 min。所有反应均设 3 个复孔, 实验数据应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ( 双  $\Delta Ct$  法) 公式进行处理。

### 1.4 细胞免疫荧光检测 SENP-1 蛋白在不同细胞株内表达强度及分布

制备细胞爬片, 用 1% BSA 室温下封闭 45 min, 加入封闭液稀释的 SENP-1 抗体( 1:30 ), 4  $^{\circ}$ C 湿盒过夜; PBS 洗涤 3 次后加入封闭液稀释的荧光二抗( 1:200 ), 室温下避光孵育 1 h; PBS 洗 3 次, 加入 50  $\mu$ l DAPI, 室温下避光孵育 5 min; PBS 洗 2 次, 封片剂封片, 激光共聚焦荧光显微镜下观察并拍照。

### 1.5 Western blotting 定量检测 SENP-1 蛋白在不同细胞株内表达

细胞接种到 60 mm 培养皿中,当汇合至 80% ~ 90% 时,提取细胞总蛋白,用 8% SDS-PAGE 分离,后转到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h,4 ℃ 条件下孵育一抗过夜,室温下孵育二抗 1 h,在暗室内显影曝光,胶片扫描仪采集图片,用 ImageJ 测量蛋白条带灰度值。

### 1.6 统计学处理

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件。组间比较采用 ANOVA 进行分析,采用双侧性检验,以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SENP-1 mRNA 的表达水平与细胞侵袭能力成正比

RT-PCR(图 1)与 Real-time PCR(表 2)检测 SENP-1 mRNA 在不同细胞株内的表达,结果显示,

5 种肝癌细胞株 SENP-1 mRNA 的表达均显著高于人永生化的肝细胞株 HL-7702;在肝癌细胞株中,高侵袭潜能肝癌细胞株 HCCLM3 中 SENP-1 mRNA 表达显著高于低侵袭潜能肝癌细胞株 MHCC97L,而低侵袭潜能肝癌细胞株 MHCC97L 又显著高于无侵袭潜能肝癌细胞株 HepG2 ( $F = 5.658; P = 0.042$ )。

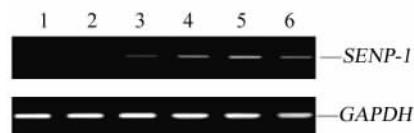


图 1 RT-PCR 检测 SENP-1 mRNA 在肝癌细胞株和人永生化的肝细胞株中的表达

Fig. 1 Expression of SENP-1 mRNA in HCC cell lines and immortalized liver cell line detected by RT-PCR

1: HL-7702; 2: HepG2; 3: SMMC-7721; 4: MHCC97L; 5: MHCC97H; 6: HCCLM3

表 2 肝癌细胞株及人永生化的肝细胞株中 SENP-1 mRNA 表达的定量分析

Tab. 2 The mRNA expressions of SENP-1 in HCC cell lines and immortalized liver cell lines

Cell line	n	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	95% CI	
			Lower limit	Upper limit
HL-7702	3	1		
HepG2	3	$2.73 \pm 0.75$	0.88	4.59
SMMC-7721	3	$3.35 \pm 1.20$	0.37	6.33
MHCC97L	3	$3.97 \pm 0.87$	1.80	6.12
MHCC97H	3	$4.35 \pm 0.40$	3.37	5.33
HCCLM3	3	$4.55 \pm 0.23$	3.98	5.11
F		5.658		
P*		0.042		

\* Value of P was compared among HCCLM3, MHCC97L and HepG2

### 2.3 SENP-1 蛋白表达水平与细胞侵袭能力成正比

Western blotting 分析细胞株之间 SENP-1 蛋白水平表达差异,结果(图 2,3)显示,5 种肝癌细胞株 SENP-1 蛋白表达量均比人永生化的肝细胞株高,而在肝癌细胞株中,SENP-1 蛋白在肝癌细胞株中的表达随着肝癌细胞株侵袭转移潜能增强而增高[方差齐性检验: $F = 2.145, P = 0.129$ ;单向方差分析结果: $F = 88.909, P = 0.000$ ]。

### 2.4 6 种细胞株中 SENP-1 蛋白的表达部位及水平

应用细胞免疫荧光方法对 SENP-1 在 HL-7702、

HepG2、SMMC-7721、MHCC97L、MHCC97H、HCCLM3 六种细胞株的表达进行定位及定性分析(图 4)。高侵袭力肝癌细胞株 HCCLM3 胞质内 SENP-1 显示强阳性表达,胞核内弱阳性表达,胞质荧光强度明显高于胞核;高侵袭力肝癌细胞株 MHCC97H 胞质及胞核内 SENP-1 均显示强阳性表达,胞质与胞核之间荧光强度没有明显区别;低侵袭力肝癌细胞株 MHCC97L 胞质内 SENP-1 显示阳性表达,胞核内没有 SENP-1 表达;无侵袭性肝癌细胞株 SMMC-7721 胞质及胞核内 SENP-1 均显示弱阳性表达;无

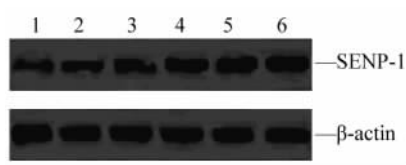


图2 SENP-1在肝癌细胞株和人永生肝细胞株中表达的Western blotting检测

Fig. 2 Expression of SENP-1 in HCC cell lines and immortalized liver cell line by Western blotting

1: HL-7702; 2: HepG2; 3: SMMC-7721; 4: MHCC97L; 5: MHCC97H; 6: HCCLM3

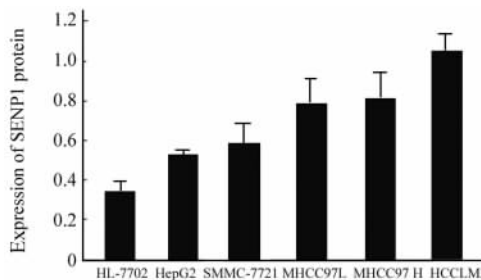


图3 SENP-1蛋白在肝癌细胞株和人永生肝细胞株中的相对表达量

Fig. 3 The relative expression of SENP1 protein in HCC cell lines and immortalized liver cell lines

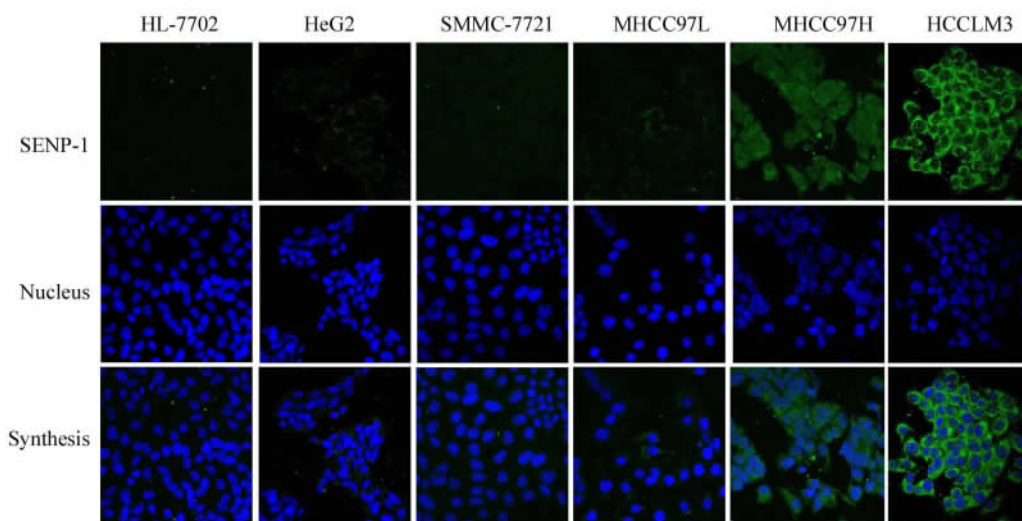


图4 SENP-1蛋白在6种细胞内的表达水平和表达部位(×400)

Fig. 4 The location and qualitative of SENP1 expression in six cell lines(×400)

侵袭性肝癌细胞株 HepG2 胞质内 SENP-1 显示弱阳性表达,胞核内没有 SENP-1 表达;人永生肝细胞株 HL-7702 胞质有微弱荧光染色,胞核内没有 SENP-1 表达。综上结果提示,SENP-1 荧光染色强度随肝癌细胞株转移侵袭能力的增加而增高。

### 3 讨论

本研究发现,无论在 mRNA 还是蛋白水平,5 种肝癌细胞株内 *SENP-1* 表达均比人永生肝细胞株高;在肝癌细胞株内,*SENP-1* 表达随着肝癌细胞株侵袭转移能力的增高而增高。细胞免疫荧光结果进一步显示,高侵袭力肝癌细胞株 HCCLM3 胞质内 SENP-1 显示强阳性表达,胞核内弱阳性表达,胞质荧光强度明显高于胞核。由此推测,SENP-1 在 HCC 转移方面起到重要的作用,但 SENP-1 是否对提高其侵袭转移能力起决定性作用,目前仍不清楚。

SUMO 通过参与功能蛋白翻译后的修饰,在转录、DNA 修复、核质物质转运及染色体分离等方面发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。已发现能与 SUMO 结合并被其修饰的蛋白百余种,其大部分是核蛋白,其中包括诸如 P53、MDM2 等与转录及调控细胞周期密切相关的蛋白<sup>[8]</sup>;部分为胞质表达,如低氧耐受因子(HIF-1 $\alpha$ )。很多癌基因和抑癌基因功能都受 SUMO 修饰的调节,包括 p53、双微基因 2(*MDM2*)、*PML* 等,这些基因的活性、表达水平及定位的变化对肿瘤发展至关重要<sup>[9]</sup>,而 SENP-1 可催化大量的 SUMO 化蛋白去 SUMO 化<sup>[10-11]</sup>。研究<sup>[12]</sup>发现,SUMO-1 可与泛素竞争某些底物蛋白的受体结合位点,抑制泛素对底物(如 P53)的降解,最终增强 p53 等抑癌基因的稳定性 and 转录活性;而 SENP-1 对这些底物蛋白的去 SUMO 化,则增加 P53 蛋白的降解,促进肿瘤的发展转移。另一项研究<sup>[13]</sup>发现,SUMO-1 修饰的

PML-NB 能够进一步招募其他蛋白质,从而调节其功能。其中 SUMO 可以作为 PML/P53 通路中的一种调节蛋白,在滑膜成纤维细胞中,SENP-1 通过移除 PML-NB 上的 DAXX 基因而恢复 SUMO-1 的凋亡抑制作用。类似的许多研究<sup>[14-17]</sup>均表明,SENP 的缺失或过表达严重地改变了细胞的生物学特性,在许多肿瘤组织中,如胃癌、甲状腺嗜酸细胞癌、喉癌和乳腺癌等,SENP 的表达均发生改变。目前对 SENP-1 的研究主要在于其在前列腺癌发生过程中的作用,在低氧环境中,SENP-1 参与了对 HIF-1 $\alpha$  的调控,缺氧条件下 SENP-1 对 HIF-1 $\alpha$  的去 SUMO 化对 HIF-1 $\alpha$  的稳定起到关键作用<sup>[18-19]</sup>。但肝癌的发展过程与 SENP-1 表达是否有关还不明确,国内外尚无相关文献报道。

本研究发现,SENP-1 蛋白在肝癌细胞株中的表达主要在胞质内,部分胞核也有表达。这种表达部位的差异提示,SENP-1 在肝癌细胞中参与多种靶蛋白的去 SUMO 修饰。此外还发现,尽管 SENP-1 是一种核蛋白,在肝癌细胞株主要表达于胞质内,提示 SENP-1 作用的靶蛋白或许主要位于胞质内。Tang 等<sup>[20]</sup>曾用基因芯片技术研究肝癌细胞株 MHCC97L 与 HCCLM3 之间基因表达差异,发现有 25 种基因存在明显不同的表达水平,指出这些基因与肝癌细胞转移性相关,SENP-1 是否可调控这些基因的表达,也是本课题组的下一步研究计划。

结合本课题组此前在组织水平的研究,推测肝癌细胞中 SENP-1 主要针对某些与肝癌细胞侵袭转移相关的靶蛋白去 SUMO 化,这些靶蛋白可能主要位于胞质内,进而影响肝癌细胞侵袭转移的能力,SENP-1 的高表达可能具有促进肝癌侵袭转移的作用。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Mattosio D, Segré CV, Chiocca S. Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: The SUMO lesson [ J ]. *World J Virol*, 2013, 2( 2 ): 79-90.
- [ 2 ] Li R, Wei J, Jiang C, et al. Akt SUMOylation regulates cell proliferation and tumorigenesis [ J ]. *Cancer Res*, 2013, 73( 18 ): 5742-5753.
- [ 3 ] Jacques C, Baris O, Prunier-Mirebeau D, et al. Two-step differential expression analysis reveals a new set of genes involved in thyroid oncogenic tumors [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90( 4 ): 2314-2320.
- [ 4 ] Cheng J, Bawa T, Lee P, et al. Role of desumoylation in the development of prostate cancer [ J ]. *Neoplasia*, 2006, 8( 8 ): 667-676.
- [ 5 ] 刘延,李湘斌,杨定华,等. SENP-1 和 HIF-1 $\alpha$  在肝癌中的表达及其与微血管密度的关系[ J ]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2012, 33( 4 ): 464-470.
- [ 6 ] Yeh ET. SUMOylation and De-SUMOylation: Wrestling with life's processes [ J ]. *J Biol Chem*, 2009, 284( 13 ): 8223-8227.
- [ 7 ] 韩琳,伍会健. SENPs 对肿瘤发展的分子调控机理 [ J ]. *生理科学进展*, 2013, 44( 1 ): 55-58.
- [ 8 ] Muller S, Hoegge C, Pyrowolakis G, et al. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin [ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2( 3 ): 202-210.
- [ 9 ] Watson IR, Irwin MS. Ubiquitin and ubiquitin-like modifications of the p53 family [ J ]. *Neoplasia*, 2006, 8( 8 ): 655-666.
- [ 10 ] Cubeñas-Potts C, Goeres JD. SENP1 and SENP2 affect spatial and temporal control of sumoylation in mitosis [ J ]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24( 22 ): 3483-3495.
- [ 11 ] Chen CH, Chang CC, Lee TH, et al. SENP1 deSUMOylates and regulates Pin1 protein activity and cellular function [ J ]. *Cancer Res*, 2013, 73( 13 ): 3951-3962.
- [ 12 ] Melchior F. SUMO--nonclassical ubiquitin [ J ]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 591-626.
- [ 13 ] Meinecke I, Cinski A, Baier A, et al. Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104( 12 ): 5073-5078.
- [ 14 ] Bawa KT, Yeh ETH. Conjugation and deconjugation of ubiquitin family modifiers [ M ]. Texas: Landes Bioscience and Springer Science Business Media, 2010: 584-595.
- [ 15 ] 陈军,高琦,王晓燕,等. SENP1 和 HER-2 在胃癌组织中的表达及意义 [ J ]. *中国现代普通外科进展*, 2013, 16( 2 ): 102-106.
- [ 16 ] 沈晓辉,倪荣生,钱晓云,等. 基因芯片筛选喉鳞状上皮细胞癌相关基因的实验研究 [ J ]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2010, 24( 9 ): 411-413.
- [ 17 ] Wang RT, Zhi XY, Zhang Y, et al. Inhibition of SENP1 induces radiosensitization in lung cancer cells [ J ]. *Exp Ther Med*, 2013, 6( 4 ): 1054-1058.
- [ 18 ] Cheng J, Kang X, Zhang S, et al. SUMO-specific protease 1 is essential for stabilization of HIF1 $\alpha$  during hypoxia [ J ]. *Cell*, 2007, 131( 3 ): 584-595.
- [ 19 ] Xu Y, Zuo Y, Zhang H, et al. Induction of SENP1 in endothelial cells contributes to hypoxia-driven VEGF expression and angiogenesis [ J ]. *J Biol Chem*, 2010, 285( 47 ): 36682-36688.
- [ 20 ] Li Y, Tang Y, Ye L, et al. Establishment of a hepatocellular carcinoma cell line with unique metastatic characteristics through in vivo selection and screening for metastasis-related genes through cDNA microarray [ J ]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129( 1 ): 43-51.

[ 收稿日期 ] 2013 - 12 - 30

[ 修回日期 ] 2014 - 03 - 18

[ 本文编辑 ] 黄静怡