

刘远光,刘怀海. LncRNA HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴来调控肝癌细胞的增殖、凋亡与上皮-间质转化 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 44-55.

Liu YG, Liu HH. LncRNA HULC regulates proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells via the miR-372/CXCR4 axis [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 44-55.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.10.007

LncRNA HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴来调控 肝癌细胞的增殖、凋亡与上皮-间质转化

刘远光^{1*}, 刘怀海²

(1.河北省唐山市工人医院 肝胆外科,河北 唐山 063000; 2.河北医科大学第二医院 普外科,石家庄 050000)

【摘要】 目的 探讨 LncRNA HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴在肝癌细胞增殖、凋亡与上皮-间质转化(EMT)中的作用。**方法** 在线生物信息学 TargetScan 数据库预测靶基因;细胞转染建立基因过表达和沉默细胞模型;qRT-PCR 和 Western blot 检测基因和蛋白质表达;CCK-8 分析用于细胞活力检测;细胞集落形成实验用于分析细胞增殖能力;Annexin V-FITC/PI 分析用于细胞凋亡检测;免疫组织化学染色检测蛋白的阳性表达。**结果** 在肝癌组织和肝癌细胞中,HULC 和 CXCR4 表达上调,miR-372 表达下调;TargetScan 数据库分析和双荧光素酶分析揭示了 miR-372 与 HULC 或 CXCR4 之间的靶向关系;CCK-8 分析显示 HULC 和 CXCR4 提高细胞活力,miR-372 抑制细胞活力;细胞集落形成实验表明,HULC 和 CXCR4 促进细胞增殖,miR-372 抑制细胞增殖;细胞流式术结果表明,HULC 和 CXCR4 抑制细胞凋亡,miR-372 促进细胞凋亡;Western blot 结果表明,HULC 和 CXCR4 抑制 E-cadherin 表达,促进 Vimentin 表达,而 miR-372 促进 E-cadherin 表达,抑制 Vimentin 表达。**结论** HULC 抑制 miR-372 的表达,从而促进 CXCR4 的表达,因此促进了肝癌细胞的增殖、抑制其凋亡并促进 EMT 进程。

【关键词】 肝细胞癌;LncRNA HULC;miR-372/CXCR4 轴;增殖;凋亡;上皮-间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)10-0044-12

LncRNA HULC regulates proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition of hepatoma cells via the miR-372/CXCR4 axis

LIU Yuanguang^{1*}, LIU Huaihai²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Tangshan GongRen Hospital, Tangshan 063000, China.

2. Department of General Surgery, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

【Abstract】 Objective To investigate the role of LncRNA HULC in hepatoma cell proliferation, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) via the miR-372/CXCR4 axis. **Methods** The online bioinformatics TargetScan database was used to predict target genes. Cell transfection was used to establish gene overexpression and silencing cell models. qRT-PCR and Western blot were used to detect gene and protein expression, respectively. CCK-8 assays were used to assess cell viability. Cell colony formation assays were used to analyze cell proliferation. Annexin V-FITC/PI was used to analyze apoptosis. Immunohistochemical staining was used to detect expression of proteins. **Results** In liver cancer tissues

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划(20181504)。

[作者简介] 刘远光(1971—),男,硕士,研究方向:肝胆外科疾病的治疗与相关研究。E-mail:yellowsubmarinexj@163.com

and cells, HULC and CXCR4 expression was upregulated, and miR-372 expression was downregulated. TargetScan database analysis and dual luciferase assays revealed a relationship between miR-372 and HULC or CXCR4. CCK-8 assays showed that HULC and CXCR4 increased cell viability, and miR-372 inhibited cell viability. Colony formation assays showed that HULC and CXCR4 promoted cell proliferation, and miR-372 inhibited cell proliferation. Flow cytometry showed that HULC and CXCR4 inhibited apoptosis, and miR-372 promoted apoptosis. Western blot analysis showed that HULC and CXCR4 inhibited the expression of E-cadherin and promoted the expression of Vimentin, while miR-372 promoted the expression of E-cadherin and inhibited the expression of Vimentin. **Conclusions** HULC inhibits the expression of miR-372, thereby promoting CXCR4 expression, proliferation, and EMT progression of hepatoma cells, while inhibiting apoptosis.

【Keywords】 hepatocellular carcinoma; LncRNA HULC; miR-372/CXCR4 axis; proliferation; apoptosis; epithelial-mesenchymal transition

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是高风险、高度有害的恶性肿瘤, 对人类健康构成威胁^[1]。此外, 肝癌的发病机理尚未完全了解。据报道, 环境和饮食因素影响肝癌的发生。目前, 手术仍是肝癌治疗的首选。但是, 肝癌的复发率仍然很高, 其 5 年生存率一般低于 50%^[2]。因此, 探索肝癌的发病机制以筛选有效的诊断标志物和治疗靶点对于肝癌患者非常迫切。

长非编码 RNA (LncRNA) 是一类 RNA 转录物, 长度大于 200 个核苷酸^[3]。LncRNA 可以调节蛋白质编码基因、转录和转录后, 并在生物学过程中发挥重要作用^[4]。研究表明, 已 LncRNA 在生物学过程中的许多功能, 包括心血管疾病、炎症反应和癌症^[5]。这些作用由表观遗传调控、转录和转录后调控介导。在 HCC 中已鉴定出许多 LncRNA, 例如 H19、HOTAIR、MALAT1 和 MEG3^[6]。肝癌中高度上调 (highly upregulated in liver cancer, HULC) 是一种长的非编码 RNA (lncRNA), 最近已被确定为肝细胞癌、神经胶质瘤和胃癌进展中的关键调节剂^[7]。研究表明, HULC 在肝癌发生过程中发挥积极作用, 例如, HULC 调节肝癌细胞中的脂质代谢^[8]。因此, LncRNA 可以作为肝癌诊断、预后和药物基因组学的潜在标志物。

microRNA (miRNA) 是小的非编码 RNA, 其长度约为 22 个核苷酸, 实际上参与了细胞所有过程, 例如增殖、分裂分化、凋亡、蛋白质分泌和病毒感染过程^[9]。通常, miRNA 通过抑制翻译或诱导目标信使 RNA (mRNA) 降解来负调控基因表达。但是, miRNA 也可以通过调节启动子活性或激活翻译来积极调节基因表达^[10]。近几年的研究表明 miRNA 在肝病发展和进展中的特定作用^[11], 提示 miRNA 可能与肝癌的发生发展有关。因此, miRNA 可以作

为肝癌诊断、预后和药物基因组学的潜在标志物。

C-X-C 趋化因子受体 4 (C-X-C chemokine receptor 4, CXCR4) 是趋化因子配体 12 (CXCL12) 特异受体。大量研究表明, CXCR4 与 HCC 的发展有关, 包括细胞增殖、血管生成、侵袭和转移^[12-13]。例如, HCC 细胞中 EphA1 表达的升高增强了内皮祖细胞 (EPC) 向肿瘤部位的募集, 从而通过激活 SDF-1/CXCR4 轴来促进血管生成^[14]。肿瘤内皮细胞中高水平的 CXCR4 可以诱导肿瘤血管生成, 从而促进肿瘤转移并与 HCC 患者的不良预后相关^[15]。因此, CXCR4 在肝癌的发生发展中起着重要作用。

综上所述, 本研究分析了 LncRNA、miRNA 和 mRNA 在 HCC 组织和肝癌细胞系中的表达, 研究了 HULC、miR-372 和 CXCR4 的潜在关系以及 HULC/miR-372/CXCR4 轴对肝癌细胞增殖、凋亡与上皮-间质转化的影响。我们的研究结果可能有助于增进对肝癌细胞分子机制的了解, LncRNA HULC 可能作为 HCC 的潜在诊断生物标志物和治疗靶标。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 临床组织

所有肿瘤组织 (20 例) 和配对的癌旁正常组织 (20 例) 均来自接受肝癌切除手术的患者。所有患者均未接受任何栓塞治疗或在手术前进行化疗, 并在术后进行病理诊断。所有患者均签署了知情同意书, 所有实验均获得本医院伦理委员会的批准与监督 (IACUC2018011505)。每个组织标本都保存在 -80℃ 直至使用。

1.1.2 实验细胞

六种 HCC 细胞系 Huh7 (批号: SAc0188)、Hep3B (批号: I110643)、MHCC-97L (批号: YCL-

0497)、MHCC-97H(批号:CL-H153)、SMMC-7721(批号:L4821)、HepG2(批号:YS-C3688)和正常肝细胞系(LO2,批号:0158),均购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基(批号:CD-100043GM)、DMEM 培养基(批号:BH-S3208)和胎牛血清(批号:164210-500)(美国 Gibco 公司);CCK-8 试剂盒(批号:IC-CCK8-Hu)、青霉素(批号:B25911)和链霉素(批号:S66602)(美国 Sigma 公司);TRIzol 试剂(批号:CD102523GM)、cDNA 逆转录试剂盒(批号:4368814)和 SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒(批号:RR420A)(日本 TaKaRa 公司);阴性对照、miR-372 mimics、miR-372 inhibitor(Genepharma 公司);PcDNA3.1-control、pcDNA3.1-HULC、si-control、si-HULC 和 Lipofectamine™ 3000(批号:L3000015)(美国 Invitrogen 公司);pmirGLO 载体(批号:GN1439)、双荧光素酶活性检测试剂盒(批号:C-8304)(美国 Promega 公司);Annexin V-FITC/PI 试剂盒(批号:120248)、RIPA 裂解液(批号:R21235)(英国 Abcam 公司);DAB 显色剂(批号:SNM477-ARB,北京百奥莱博科技有限公司);双氧水(批号:R23672,扬州市天泰化工有限公司);E-cadherin 抗体(批号:3195T)、Vimentin 抗体(批号:5741T)、β-actin 抗体(批号:4970T)和山羊抗兔 IgG 二抗(批号:2985S)(美国 Cell Signaling Technology 公司)。SDS-PAGE 电泳仪(型号:DYY-7C,北京六一生物科技有限公司);凝胶扫描仪(型号:4466611,美国 BIO-RAD 公司);酶标仪(型号:SMR16.1,上海科华实验系统有限公司);流式细胞仪(型号:1026,美国 BD 公司);StepOnePlus Real-Time PCR System(型号:401411,日本 TaKaRa 公司);倒置相差显微镜(型号:CKX53,日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

LO2 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 IU/mL 青霉素、100 IU/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养;Huh7、Hep3B、MHCC-97L、MHCC-97H、SMMC-7721 和 HepG2 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 IU/mL 青霉素、100 IU/mL 链霉素的 DMEM 培养基培养,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱,2 d 更换一次培养基,以保证细胞所需的营养成分。取对数期、状态良好的细胞进行后续实验。

1.3.2 Quantitative real time RT-PCR(qRT-PCR)

用 TRIzol 试剂提取组织样本或者细胞总 RNA。用 Nanodrop 2000 仪器测量样品总 RNA 浓度,并将每个配对的样品调节至相同浓度。然后按照 cDNA 逆转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒进行 qRT-PCR。U6 和 β-actin 分别用作 LncRNA、miRNA 和 mRNA 的内部参考。使用 FTC-3000p 实时 PCR 系统完成实验后,采用 2^{-ΔΔCt} 法分析数据。其中使用的引物见表 1。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence
HULC	F:5'-AGGTGGCTTGCAAAGCTCAGT-3' R:5'-AGTACTGCTTGTCTGCTCT-3'
miR-372	F:5'-ACACTCCAGCTGGGAGGUCAGGCCGAGGAC-3' R:5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAA TTCAGTTGAGAGTCCGT-3'
CXCR4	F:5'-CTTCTTAAGTGGCATTGTGG-3' R:5'-GTGATGACAAAGAGGAGGTC-3'
U6	F:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' R:5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT-3'
β-actin	F:5'-GAAGCTCACTGGCATGGCCTTC-3' R:5'-GACCACCTGCTGCTCACTGTAG-3'

1.3.3 细胞转染

按照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂说明书将质粒(阴性对照、miR-372 mimics、miR-372 inhibitor、pcDNA3.1-control、pcDNA3.1-HULC、si-control 和 si-HULC)分别转入至 MHCC-97L 和 HepG2 细胞中。在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 6 h 后,更换新鲜的培养基继续培养。48 h 后结束培养,收集各组细胞进行后续实验。

1.3.4 双荧光素酶报告基因检测

通过 TargetScan 数据库分析 miR-372 分别与 HULC 和 CXCR4 的非编码区区域的结合位点。将 HULC 3'UTR wt/mut 或 CXCR4 3'UTR wt/mut 克隆到 pmirGLO 载体中,然后将阴性对照、miR-372 mimics、miR-372inhibitor、pmirGLO-HULC-wt、pmirGLO-HULC-mut、pmirGLO-CXCR4-wt 或 pmirGLO-CXCR4-mut 转染至 MHCC-97L 或 HepG2 细胞中。48 h 后,用双荧光素酶活性检测试剂盒测定 MHCC-97L 细胞和 HepG2 细胞的荧光素酶活性。

1.3.5 CCK-8

将转染后的细胞接种到 96 孔板上,培养 24、48、72、96 h。然后,将 10 μL CCK-8 溶液添加到每

个孔中,并在 37℃ 下孵育 2 h。最后,使用自动酶标仪检测在 450 nm 波长的吸光度。

1.3.6 细胞集落形成实验

将 MHCC-97L、HepG2 细胞分别接种到 6 孔板中,并用指定的质粒转染。48 h 后,收集各组细胞并铺在 60 mm 的培养皿中。3 d 更换一次培养基。14 d 后,用结晶紫染色,并计数含有 ≥ 50 个细胞的集落,并进行拍照。

1.3.7 细胞流式术

收集转染的各组细胞,离心并重悬于结合缓冲液中。将细胞依次用异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC) 溶液 (10 μ L) 和碘化丙啶 (PI) 溶液 (10 μ L) 染色。将染色的细胞在室温下黑暗中孵育 30 min,然后使用 FACSCalibur™ 流式细胞仪进行分析。

1.3.8 免疫组织化学染色

组织经固定、包埋、石蜡切片、脱水、缓冲液清洗,3%过氧化氢溶液去除内源性过氧化物酶,滴加非免疫动物血清 20 min,滴加一抗、PBS 冲洗、滴加二抗、冲洗后加 ABC 复合物、DAB 显色,在 400 倍显微镜下观察并拍照。

1.3.9 Western blot

各组细胞用 RIPA 裂解提取总蛋白,并通过

BCA 方法进行定量,样品经变性后进行上样。按照实验步骤进行电泳-转膜-封闭 (5% 脱脂奶粉)-一抗孵育 (4℃ 过夜)-二抗孵育 (室温 1 h)-显影曝光。Image-Pro Plus 图像分析系统对蛋白条带进行分析。

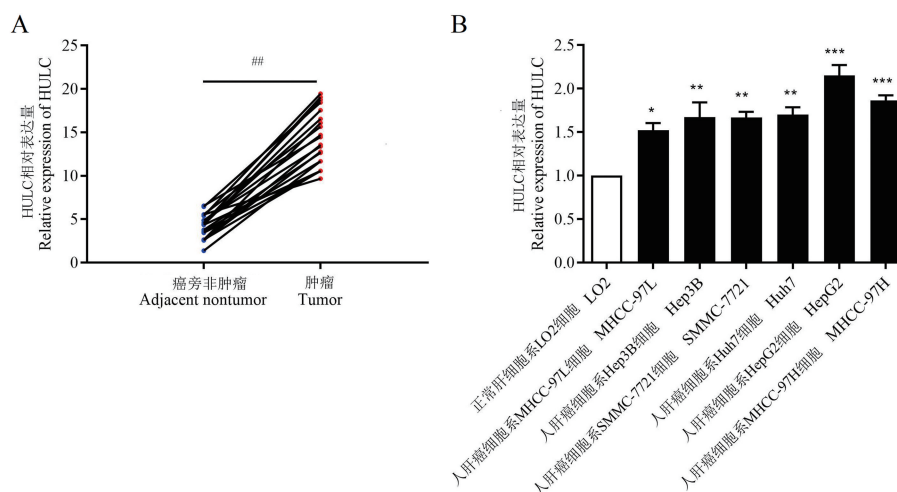
1.4 统计学方法

统计学分析用 SPSS 19.0 软件进行,至少取 3 次独立实验结果,以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间数据比较采用单向方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HULC 在肝癌组织和肝癌细胞中高表达

qRT-PCR 结果表明 HULC 在肝癌组织和肝癌细胞中高表达:与癌旁非肿瘤组织组相比,HULC 在肝癌组织中表达上调 ($P < 0.01$,图 1A);与 LO2 细胞相比,在六个 HCC 细胞系中均观察到 HULC 高表达,其中,MHCC-97L 细胞中 HULC 表达最低 ($P < 0.05$),而 HepG2 细胞中 HULC 表达最高 ($P < 0.001$,图 1B),因此,因此这两种细胞系分别用于功能增强和功能缺失实验。总之,研究人员得到结论:HULC 在肝癌组织和肝癌细胞中高表达。



注:A:qRT-PCR 分析,与癌旁非肿瘤组织相比,HULC 在肿瘤组织样本中表达上调;B:qRT-PCR 检测 HULC 在 HCC 细胞系中表达上调。与 Adjacent nontumor 组相比,## $P < 0.01$;与 LO2 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 1 HULC 在肝癌组织和肝癌细胞中的表达

Note. A, qRT-PCR analysis. Compared with Adjacent nontumor tissues, HULC expression was up-regulated in tumor tissue samples. B, qRT-PCR detected that HULC was up-regulated in HCC cell lines. Compared with Adjacent nontumor group, ## $P < 0.01$. Compared with LO2 group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 1 HULC expression in liver cancer tissues and liver cancer cells

2.2 HULC 对 HCC 细胞增殖和凋亡的影响

pcDNA3.1-HULC 转染 MHCC-97L 细胞, si-HULC 转染 HepG2 细胞。qRT-PCR 分析显示, pcDNA3.1-HULC 和 si-HULC 在 MHCC-97L 和 HepG2 细胞中显著调节了 HULC 的表达(均 $P < 0.01$, 图 2A、2B)。从功能上看, CCK-8 分析表明, 过表达 HULC 明显增强 MHCC-97L 细胞的活力($P < 0.01$; 图 2C), 而低表达 HULC 明显减弱 HepG2 细胞的活力($P < 0.01$, 图 2D)。细胞集落形成实验表明, 过表达 HULC 明显增强 MHCC-97L 细胞的增殖能力($P < 0.01$, 图 2E), 而低表达 HULC 明显减弱 HepG2 细胞的增殖能力($P < 0.01$, 图 2F)。细胞流式术结果表明, 过表达 HULC 明显抑制 MHCC-97L 细胞的凋亡能力($P < 0.01$, 图 2G), 而低表达 HULC 明显增强 HepG2 细胞的凋亡能力($P < 0.01$, 图 2H)。

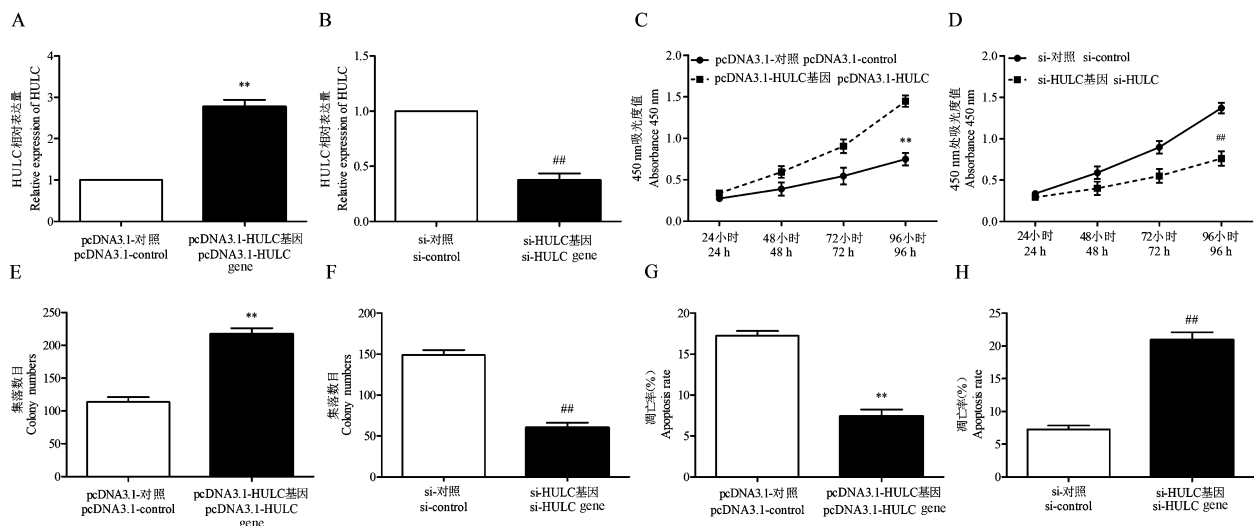
2.3 HULC 对 HCC 细胞 EMT 的影响

免疫组织化学染色揭示了 HULC 和 EMT 标记物(E-cadherin 和 Vimentin)之间的关联, 结果表明,

与低表达 HULC 组相比, 过表达 HULC 组的 HCC 组织具有较低的 E-cadherin 和较高的 Vimentin 表达($P < 0.01$, 图 3A)。Western blot 结果表明, 过表达 HULC 可以明显抑制 MHCC-97H 细胞中 E-cadherin 的表达并提高 Vimentin 的表达(均 $P < 0.01$); 低表达 HULC 可提高 HepG2 细胞中 E-cadherin 的表达并抑制 Vimentin 的表达(均 $P < 0.01$, 图 3B)。综上所述, HULC 促进 HCC 细胞的增殖、抑制 HCC 细胞凋亡以及促进 HCC 细胞 EMT 的进展。

2.4 miR-372 是 HULC 的靶标

TargetScan 数据库揭示了 miR-372 与 HULC 的潜在结合位点(图 4A)。qRT-PCR 的数据表明, miR-372 在肝癌组织和肝癌细胞中的表达明显下降(均 $P < 0.01$, 图 4B、4C)。Pearson 相关分析显示, miR-372 与 HCC 组织中的 HULC 表达相关分析表明, 在肝癌组织中观察到 miR-372 与 HULC 表达之间呈负相关($r = -0.56$, $P < 0.001$, 图 4D)。接下来, 分别将 MHCC-97L 和 Hep2G 细胞转染了

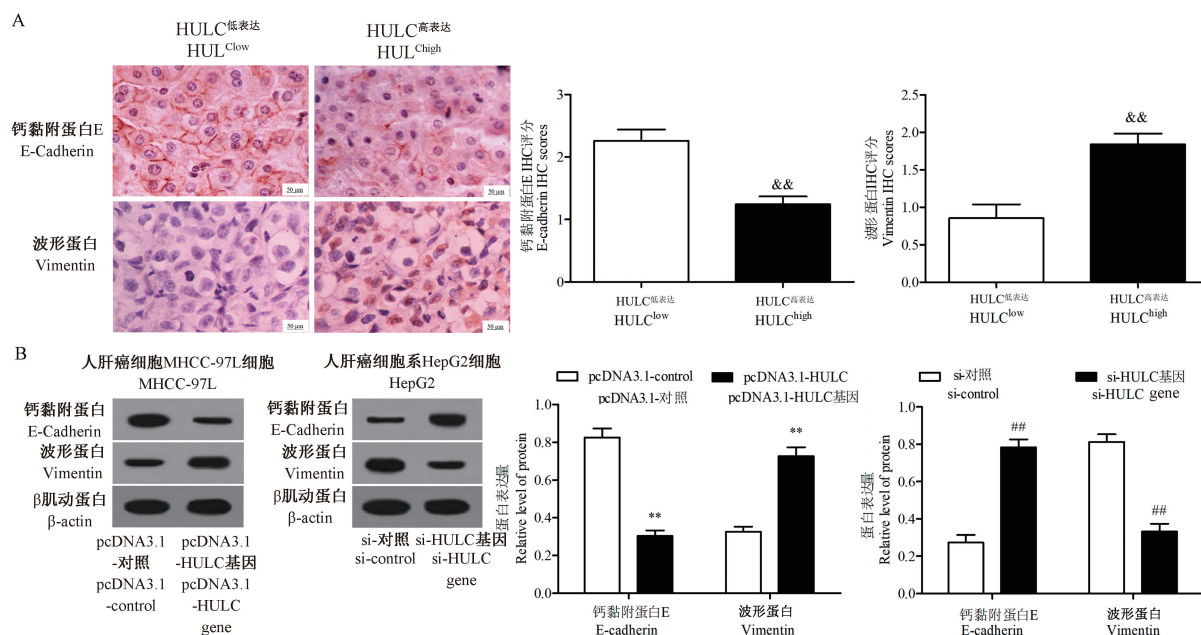


注: A: qRT-PCR 分析 pcDNA3.1-HULC 可以明显上调 MHCC-97L 细胞中 HULC 的表达; B: qRT-PCR 分析 si-HULC 可以明显下调 HepG2 细胞中 HULC 的表达; C: CCK-8 分析 pcDNA3.1-HULC 可以明显增强 MHCC-97L 细胞的活力; D: CCK-8 分析 si-HULC 可以明显减弱 HepG2 细胞的活力; E: 细胞集落形成实验分析 pcDNA3.1-HULC 可以明显增强 MHCC-97L 细胞的增殖能力; F: 细胞集落形成实验分析 si-HULC 可以明显减弱 HepG2 细胞的增殖能力; G: 细胞流式术分析 pcDNA3.1-HULC 可以明显减弱 MHCC-97L 细胞的凋亡能力; H: 细胞流式术分析 si-HULC 可以明显增强 HepG2 细胞的凋亡能力。与 pcDNA3.1-control 组比较, ** $P < 0.01$; 与 si-control 组比较, ## $P < 0.01$ 。

图 2 HULC 促进 HCC 细胞的增殖、抑制 HCC 细胞凋亡

Note. A, qRT-PCR analysis of pcDNA3.1-HULC can significantly increase the expression of HULC in MHCC-97L cells. B, qRT-PCR analysis of si-HULC can significantly down-regulate the expression of HULC in HepG2 cells. C, CCK-8 analysis of pcDNA3.1-HULC can significantly enhance the viability of MHCC-97L cells. D, CCK-8 analysis of si-HULC can significantly reduce the viability of HepG2 cells. E, Experimental analysis of cell colony formation pcDNA3.1-HULC can significantly enhance the proliferation ability of MHCC-97L cells. F, Experimental analysis of cell colony formation si-HULC can significantly reduce the proliferation ability of HepG2 cells. G, Cell flow cytometry analysis of pcDNA3.1-HULC can significantly reduce the apoptosis ability of MHCC-97L cells. H, Cell flow cytometry analysis of si-HULC can significantly enhance the apoptosis ability of HepG2 cells. Compared with pcDNA3.1-control group, ** $P < 0.01$. Compared with si-control group, ## $P < 0.01$.

Figure 2 HULC promotes HCC cell proliferation and inhibits HCC cell apoptosis



注:A:免疫组织化学分析显示,与低表达 HULC 组相比,过表达 HULC 组的 HCC 组织具有较低的 E-cadherin 和较高的 Vimentin 表达;B:Western blot 分析显示,在 MHCC-97L 细胞中,过表达 HULC 明显降低了 E-cadherin 的表达,并增加了 Vimentin 的表达;在 HepG2 细胞中,低表达 HULC 明显增加了 E-cadherin 的表达,并降低了 Vimentin 的表达。与 HULC^{low} 组比较,^{&&} $P < 0.01$;与 pcDNA3.1-control 组比较,^{**} $P < 0.01$;与 si-control 组比较,^{##} $P < 0.01$ 。

图 3 HULC 促进 HCC 细胞 EMT 进展

Note. A, Immunohistochemical analysis showed that the HCC tissues in the HULC overexpression group had lower E-cadherin and higher Vimentin expression compared to the HULC group with low expression. B, Western blot analysis showed that in MHCC-97L cells, overexpression of HULC significantly reduced the expression of E-cadherin and increased the expression of Vimentin. In HepG2 cells, low expression of HULC significantly increased the expression of E-cadherin and decreased the expression of Vimentin. Compared with HULC^{low} group, ^{&&} $P < 0.01$. Compared with pcDNA3.1-control group, ^{**} $P < 0.01$. Compared with si-control group, ^{##} $P < 0.01$.

Figure 3 HULC promotes the EMT progression of HCC cells

miR-372 抑制剂和 miR-372 模拟物,qRT-PCR 证实 miR-372 的低表达和过表达(均 $P < 0.05$,图 4E)。双荧光素酶报告基因测定表明,miR-372 明显抑制了携带 HULC 3'UTR wt 的荧光素酶活性,但当报告质粒携带 HULC 3'UTR mut 时未观察到明显的抑制作用(均 $P < 0.01$,图 4F)。此外,HULC 可以负调控 HCC 细胞中 miR-372 的表达(均 $P < 0.05$,图 4G)。另一方面,通过调节 HCC 细胞中的 miR-372 水平,HULC 表达明显升高或降低(均 $P < 0.01$,图 4H)。综上所述,HULC 可直接与 HCC 细胞中的 miR-372 结合,且两者具有相互抑制的作用。

2.5 miR-372 对 HCC 细胞的增殖和凋亡的影响

CCK-8 分析表明,低表达 miR-372 明显增强了 MHCC-97 的活力($P < 0.01$),而过表达 miR-372 明显降低 HepG2 细胞的活力($P < 0.01$,图 5A)。细胞集落形成实验表明,低表达 miR-372 明显增强了 MHCC-97 的增殖能力($P < 0.01$),而过表达 miR-372

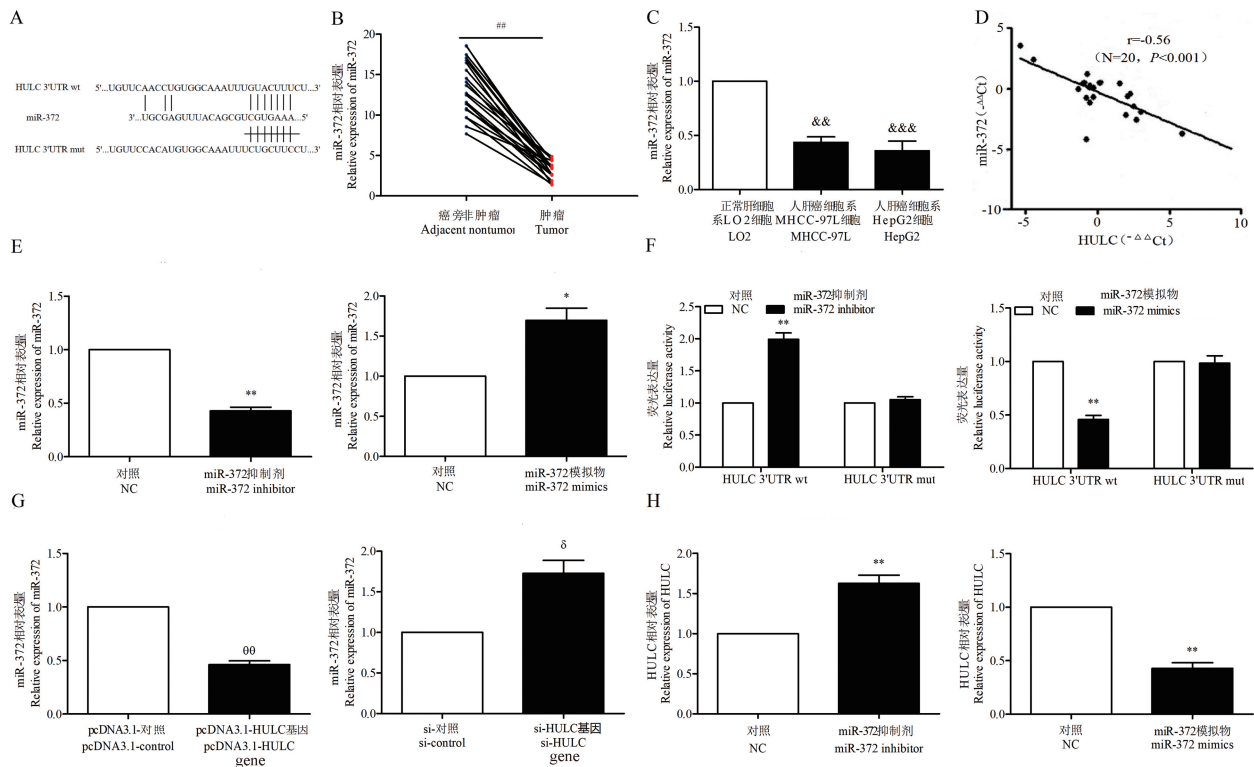
明显降低 HepG2 细胞的增殖能力($P < 0.01$,图 5B)。细胞流式结果表明,敲低 miR-372 明显抑制了 MHCC-97 的凋亡能力($P < 0.05$),而过表达 miR-372 明显增强 HepG2 细胞的凋亡能力($P < 0.01$,图 5C)。

2.6 miR-372 对 HCC 细胞 EMT 的影响

免疫组织化学染色以探讨 miR-372 和 EMT 标记物(E-cadherin 和 Vimentin)之间的关联,结果表明,与高 miR-372 组相比,低 miR-372 组的 E-cadherin 表达明显降低,且 Vimentin 表达明显升高(均 $P < 0.01$,图 6A)。此外,Western blot 分析显示,低表达 miR-372 可降低 MHCC-97L 细胞中 E-cadherin 的表达并增加 Vimentin 的表达含量($P < 0.01$),而过表达 miR-372 抑制了 HepG2 细胞的 EMT 过程(均 $P < 0.01$,图 6B)。因此,我们得出的结论是 miR-372 可以抑制 HCC 细胞的增殖、促进凋亡以及抑制 HCC 细胞 EMT 的进展。

2.7 miR-372 直接靶向 HCC 细胞中的 CXCR4

TargetScan 预测了 miR-372 与 CXCR4 的结合位



注:A:miR-372与HULC之间的结合位点;B:qRT-PCR分析,与癌旁非肿瘤组织相比,miR-372在肿瘤组织样本中表达下调;C:qRT-PCR检测miR-372在HCC细胞系中表达下调;D:Pearson相关分析显示,miR-372与HULC的呈负相关;E:miR-372模拟物或抑制剂可以明显调节HCC细胞中miR-372的表达;F:双荧光素酶报告基因测定表明,miR-372可以负调节HULC 3'UTR wt的荧光素酶活性,而不是HULC 3'UTR mut;G:qRT-PCR显示HULC可以负调控HCC细胞中miR-372的表达;H:miR-372反向调节HCC细胞中的HULC表达。与Adjacent nontumor组相比,## $P < 0.01$;与LO2组比较,&& $P < 0.01$,&&& $P < 0.001$;与LO2组比较,&&& $P < 0.001$;与NC组比较,* $P < 0.05$;与NC组比较,** $P < 0.01$;与pcDNA3.1-control组比较,00 $P < 0.01$;与si-control组比较,δ $P < 0.05$ 。

图4 miR-372在肝癌组织和肝癌细胞中的表达以及其关系

Note. A, The binding site between miR-372 and HULC. B, qRT-PCR analysis. Compared with Adjacent nontumor tissues, miR-372 was down-regulated in tumor tissue samples. C, qRT-PCR detected that the expression of miR-372 was down-regulated in HCC cell lines. D, Pearson correlation analysis showed that miR-372 had a negative correlation with HULC. E, miR-372 mimics or inhibitors can significantly regulate the expression of miR-372 in HCC cells. F, Dual luciferase reporter gene assay showed that miR-372 can negatively regulate the luciferase activity of HULC 3'UTR wt instead of HULC 3'UTR mut. G, qRT-PCR showed that HULC can negatively regulate the expression of miR-372 in HCC cells. H, miR-372 reversely regulates HULC expression in HCC cells. Compared with Adjacent nontumor group, ## $P < 0.01$. Compared with LO2 group, && $P < 0.01$. Compared with LO2 group, &&& $P < 0.001$. Compared with NC group, * $P < 0.05$. Compared with NC group, ** $P < 0.01$. Compared with pcDNA3.1-control group, 00 $P < 0.01$. Compared with si-control group, δ $P < 0.05$.

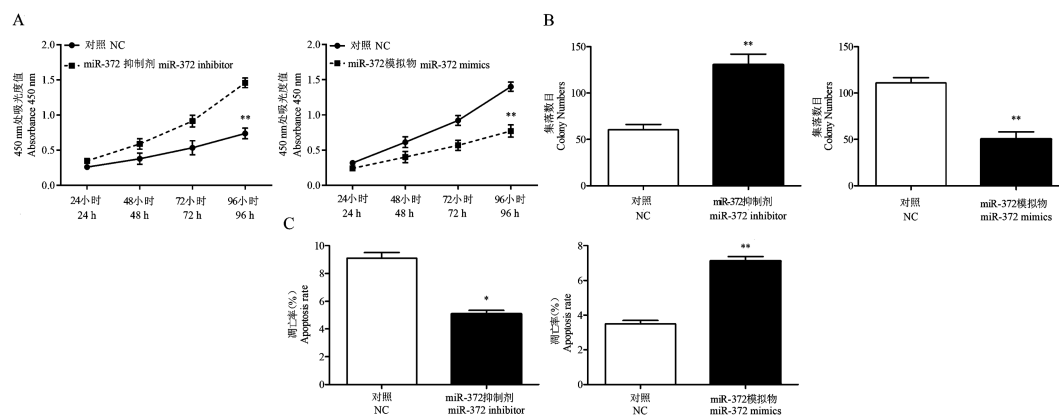
Figure 4 miR-372 expression in liver cancer tissues and liver cancer cells and its relationship with HULC

点(图7A)。qRT-PCR的数据表明,CXCR4在肝癌组织和肝癌细胞中的表达明显上调降(均 $P < 0.05$,图7B、7C)。Pearson相关分析显示,miR-372与HCC组织中CXCR4表达相关分析表明,在肝癌组织中观察到miR-372与CXCR4表达之间呈负相关($r = -0.415$, $P < 0.01$,图7D)。使用双荧光素酶报告基因检测CXCR4的表达是否受miR-372调节,结果表明,当报告质粒携带CXCR4 3'UTR wt时,miR-372抑制了HCC细胞中的荧光素酶活性,但当报告质粒携带CXCR4 3'UTR mut时未观察到明显的抑制作用(均 $P < 0.01$;图7E)。qRT-PCR分析结果表

明,miR-372可以直接靶向CXCR4,并负调节CXCR4在HCC细胞中的表达(均 $P < 0.01$,图7F)。接下来,我们探讨了HULC是否可以调节CXCR4的表达,数据表明,CXCR4表达可以在肝癌细胞中受到HULC的正调控(均 $P < 0.01$,图7G)。因此,我们得出的结论是,CXCR4是miR-372的直接靶标,并且在HCC细胞中受到HULC的正调控。

2.8 HULC/miR-372/CXCR4轴可影响肝癌细胞的增殖、凋亡与EMT

qRT-PCR结果表明,在MHCC-97L细胞中,过表达HULC使CXCR4表达上调,而过表达miR-372

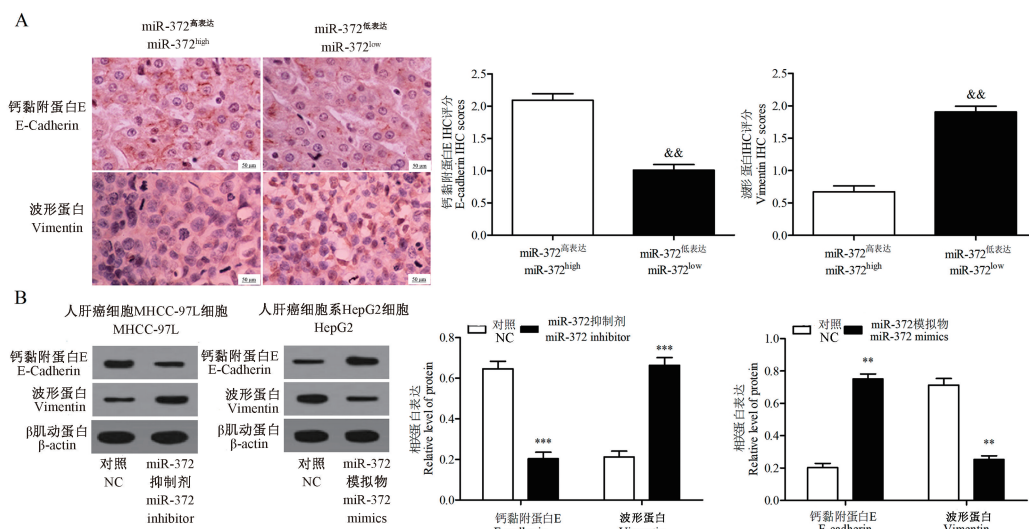


注:A:CCK-8 分析,低表达 miR-372 可以明显增强 MHCC-97L 细胞的活力,而过表达 miR-372 可以明显减弱 HepG2 细胞的活力;B:细胞集落形成实验分析,低表达 miR-372 可以明显增强 MHCC-97L 细胞的增殖能力,而过表达 miR-372 可以明显减弱 MHCC-97L 细胞的增殖能力;C:细胞流式术分析,低表达 miR-372 可以明显减弱 MHCC-97L 细胞的凋亡能力,而过表达 miR-372 可以明显增强 HepG2 细胞的凋亡能力。与 NC 组比较, * $P < 0.05$; 与 NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 5 miR-372 抑制 HCC 细胞的增殖、促进 HCC 细胞凋亡

Note. A, CCK-8 analysis, low expression of miR-372 can significantly enhance the viability of MHCC-97L cells, while overexpression of miR-372 can significantly reduce the viability of HepG2 cells. B, Experimental analysis of cell colony formation. Low expression of miR-372 can significantly enhance the proliferation ability of MHCC-97L cells, while overexpression of miR-372 can significantly reduce the proliferation ability of MHCC-97L cells. C, Cell flow cytometry analysis. Low expression of miR-372 can significantly reduce the apoptosis ability of MHCC-97L cells, while overexpression of miR-372 can significantly enhance the apoptosis ability of HepG2 cells. Compared with NC group, * $P < 0.05$. Compared with NC group, ** $P < 0.01$.

Figure 5 miR-372 inhibits HCC cell proliferation and promotes HCC cell apoptosis

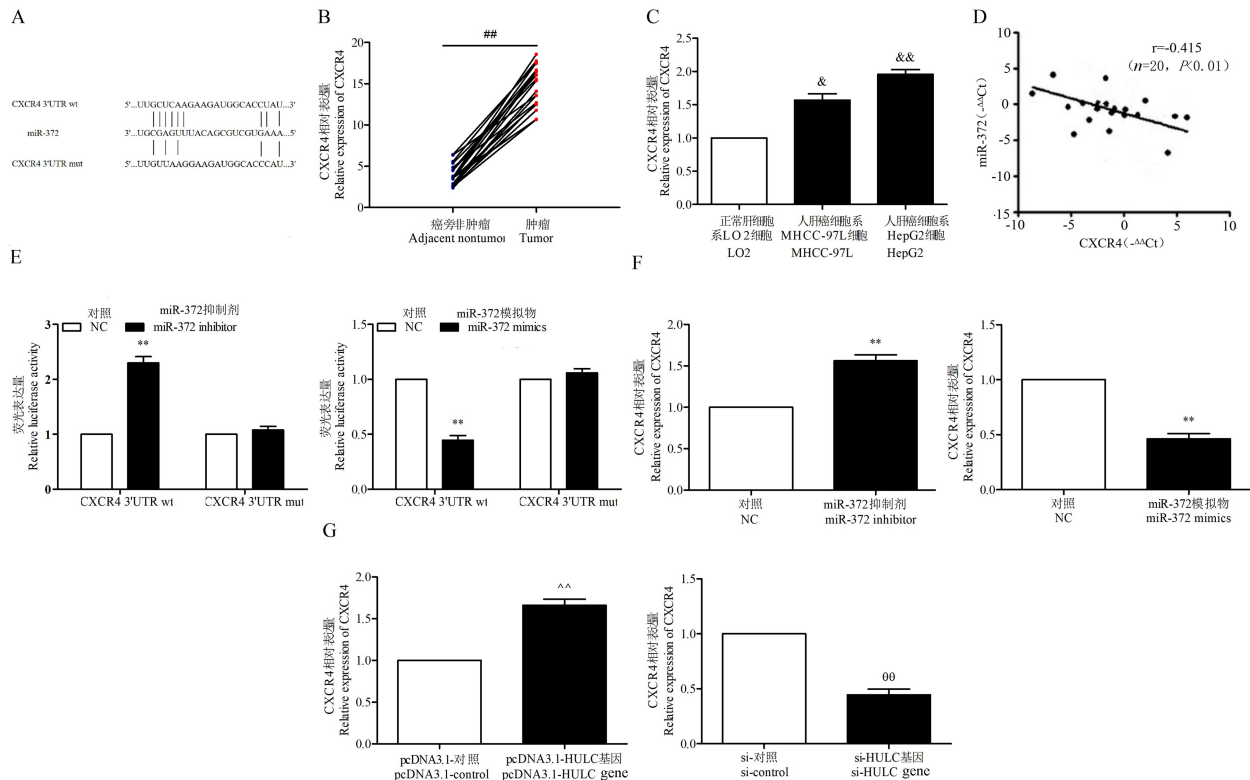


注:A:免疫组织化学分析显示,与高 miR-372 组相比,低 miR-372 组的 HCC 组织具有较低的 E-cadherin 和较高的 Vimentin 表达;B:Western blot 分析显示,在 MHCC-97L 细胞中,低表达 miR-372 明显降低了 E-cadherin 的表达,并增加了 Vimentin 的表达;在 HepG2 细胞中,高表达 miR-372 明显增加了 E-cadherin 的表达,并降低了 Vimentin 的表达。与 miR-372^{high} 组比较, && $P < 0.01$; 与 NC 组比较, ** $P < 0.01$; 与 NC 组比较, *** $P < 0.001$ 。

图 6 miR-372 抑制 HCC 细胞 EMT 进展

Note. A, Immunohistochemical analysis showed that the HCC tissues in the low miR-372 group had lower E-cadherin and higher Vimentin expression compared with the high miR-372 group. B, Western blot analysis showed that in MHCC-97L cells, low expression of miR-372 significantly reduced E-cadherin expression and increased Vimentin expression. In HepG2 cells, high expression of miR-372 significantly increased E-cadherin expression and reduced the expression of Vimentin. Compared with miR-372^{high} group, && $P < 0.01$. Compared with NC group, ** $P < 0.01$. Compared with NC group, *** $P < 0.001$.

Figure 6 miR-372 inhibits the EMT progression of HCC cells



注:A:miR-372与CXCR4之间的结合位点;B:qRT-PCR分析,与癌旁非肿瘤组织相比,CXCR4在肿瘤组织样本中表达上调;C:qRT-PCR检测CXCR4在HCC细胞系中表达上调;D:Pearson相关分析显示,miR-372与CXCR4的呈负相关;E:双荧光素酶报告基因测定表明,miR-372可以负调节CXCR4 3'UTR wt的荧光素酶活性,而不是CXCR4 3'UTR mut;F:miR-372负调节HCC细胞中CXCR4 mRNA的水平;G:HULC正调节HCC细胞中CXCR4 mRNA的水平。与Adjacent nontumor组相比,## $P < 0.01$;与LO2组比较,& $P < 0.05$;与LO2组比较,&& $P < 0.01$;与NC组比较,** $P < 0.01$;与pcDNA3.1-control组比较,~ $P < 0.01$;与si-control组比较,00 $P < 0.01$ 。

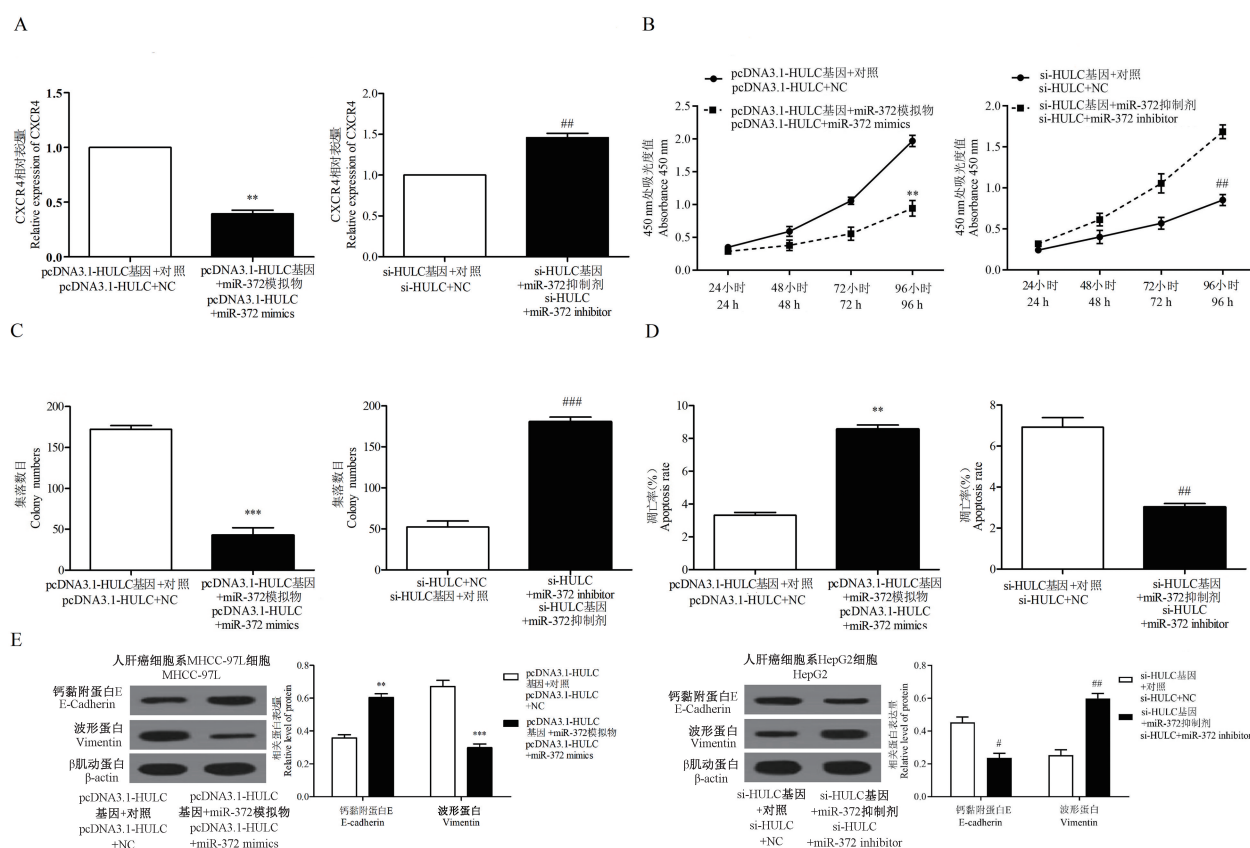
图7 CXCR4在肝癌组织和肝癌细胞中的表达以及其关系与miR-372

Note. A, The binding site between miR-372 and CXCR4. B, qRT-PCR analysis. Compared with Adjacent nontumor tissue, CXCR4 was up-regulated in tumor tissue samples. C, qRT-PCR detected that CXCR4 was up-regulated in HCC cell lines. D, Pearson correlation analysis showed that miR-372 was negatively correlated with CXCR4. E, Dual luciferase reporter gene assay showed that miR-372 can negatively regulate the luciferase activity of CXCR4 3'UTR wt, but not CXCR4 3'UTR mut. F, miR-372 negatively regulates the level of CXCR4 mRNA in HCC cells. G, HULC is positively regulating the level of CXCR4 mRNA in HCC cells. Compared with Adjacent nontumor group, ## $P < 0.01$. Compared with LO2 group, & $P < 0.05$. Compared with LO2 group, && $P < 0.01$. Compared with NC group, ** $P < 0.01$. Compared with pcDNA3.1-control group, ~ $P < 0.01$. Compared with the si-control group, 00 $P < 0.01$.

Figure 7 CXCR4 expression in liver cancer tissues and liver cancer cells and its relationship with miR-372

下调了CXCR4的表达($P < 0.01$);在HepG2细胞中,低表达HULC使CXCR4的表达下调,而低表达miR-372上调了CXCR4的表达($P < 0.01$,图8A)。CCK-8分析表明,过表达HULC使MHCC-97L细胞活力增强,而过表达miR-372降低了细胞活力($P < 0.01$);低表达HULC降低了HepG2细胞活力,而低表达miR-372增加细胞活力($P < 0.01$,图8B)。细胞集落形成实验表明,过表达HULC使MHCC-97L细胞的增殖能力增强,然而过表达miR-372降低了细胞的增殖能力($P < 0.001$);低表达HULC降低了HepG2细胞的增殖能力,而低表达miR-372增强细胞的增殖能力($P < 0.001$,图8C)。细胞流式术结果表

明,过表达HULC使MHCC-97L细胞凋亡能力减弱,然而过表达miR-372提高了细胞的凋亡能力($P < 0.01$);低表达HULC提高了HepG2细胞的凋亡能力,而低表达miR-372减弱了细胞的凋亡能力($P < 0.001$,图8D)。Western blot结果表明,与pcDNA3.1-HULC组相比,过表达miR-372可增加MHCC-97L细胞中E-cadherin的表达并减少Vimentin的表达(均 $P < 0.01$);与si-HULC组比,低表达miR-372可减少HepG2细胞中E-cadherin的表达并增加Vimentin的表达(均 $P < 0.01$,图8E)。因此,我们证明了HULC可通过HULC/miR-372/CXCR4轴发挥其对HCC增殖、凋亡和EMT的影响作用。



注: A: qRT-PCR 分析, 过表达 miR-372 下调了 HULC 过表达的 MHCC-97L 细胞中 CXCR4 的表达, 低表达 miR-372 上调了 HULC 过表达的 HepG2 细胞中 CXCR4 的表达; B: CCK-8 分析显示, miR-372 可以逆转 HULC 对 MHCC-97H 和 HepG2 细胞活力的影响; C: 细胞集落形成实验分析, miR-372 可以逆转 HULC 对 MHCC-97L 和 HepG2 细胞的增殖能力; D: 细胞流式术分析, miR-372 可以逆转 HULC 对 MHCC-97L 和 HepG2 细胞的凋亡能力; E: Western blot 结果显示, miR-372 可以逆转 HULC 对 MHCC-97L 和 HepG2 细胞中 E-cadherin 和 Vimentin 的表达。与 pcDNA3.1-control 组比较, ** $P < 0.01$; 与 pcDNA3.1-control 组比较, *** $P < 0.001$; 与 si-control 组比较, # $P < 0.05$; 与 si-control 组比较, ## $P < 0.01$; 与 si-control 组比较, ### $P < 0.001$ 。

图 8 HULC/miR-372/CXCR4 轴调节肝癌细胞的细胞增殖、凋亡与 EMT

Note. A, qRT-PCR analysis, overexpression of miR-372 downregulated the expression of CXCR4 in HULC overexpressing MHCC-97L cells, and low expression of miR-372 upregulated the expression of CXCR4 in HULC overexpressing HepG2 cells. B, CCK-8 analysis showed that miR-372 can reverse the effect of HULC on the viability of MHCC-97H and HepG2 cells. C, Experimental analysis of cell colony formation. D, Cell flow cytometry analysis, miR-372 can reverse HULC's ability to apoptotic MHCC-97L and HepG2 cells. E, Western blot results show that miR-372 can reverse HULC expression of E-cadherin and Vimentin in MHCC-97L and HepG2 cells. Compared with pcDNA3.1-control group, ** $P < 0.01$. Compared with pcDNA3.1-control group, *** $P < 0.001$. Compared with si-control group, # $P < 0.05$. Compared with si-control group, ## $P < 0.01$. Compared with si-control group, ### $P < 0.001$.

Figure 8 HULC/miR-372/CXCR4 axis regulates cell proliferation, apoptosis and EMT of liver cancer cells

3 讨论

在全球范围内,肝细胞癌(HCC)占有所有肝癌病例的 75%~85%^[16]。据估计,2015 年中国有 46.61 万新诊断的肝癌患者,占有全球所有肝癌病例的 50% 以上^[17]。显然,肝癌对中国人民而言是沉重的公共卫生威胁^[18]。因此,进一步研究肝癌进展的机制,为肝癌治疗提供更多的靶标。

人类基因组计划表明,大约 90% 的基因组被转录为非编码 RNA^[19]。据报道,非编码 RNA,包括长非编码 RNA(LncRNA,长度超过 200 个核苷酸)和 microRNA(miRNA,长度为 18~25 个核苷酸),是癌症和其他疾病的关键调节因子^[20-21]。另外,LncRNA 和 miRNA 能够调节几乎所有与癌症发生和发展有关的过程。LncRNA HULC 与癌症进展有关^[7]。研究表明,HULC 在肝癌发生过程中发挥积

极作用,例如,HULC 调节肝癌细胞中的脂质代谢^[8]。而且 HULC 增强上皮-间质转化(EMT),促进肝癌细胞的转移^[22]。本实验中,我们发现 HULC 在肝癌组织和肝癌细胞中高表达,且 HULC 可促进肝癌细胞增殖和 EMT、抑制细胞凋亡。因此,HULC 有可能作为一类新型的潜在生物标志物或癌症的治疗靶标。

miRNA 是一类内源性、高度保守的、小的非蛋白质编码 RNA,长度约为 22 个核苷酸^[23]。miRNA 在许多生物中表达,并通过复杂的过程在调节靶基因表达中发挥作用^[24]。miR-372 属于 miR-371-372 基因簇,位于染色体 19q13.42。研究表明,miR-372 可调节许多类型人类癌症中的细胞周期、凋亡、侵袭和增殖^[25]。Lai 等^[26]研究表明,miR-372 可能在非小细胞肺癌患者中转录后下调大肿瘤抑制基因 2,从而导致肿瘤的发生和增殖。但是,miR-372 在肝癌中的作用尚不清楚,有研究表明 miR-372 在 HCC 中低水平表达,并且通过负控制其靶基因 ATAD2 发挥抗癌基因作用^[27]。我们的实验结果表明 miR-372 在肝癌组织和肝癌细胞中低表达,与上述文献一致。我们还发现,过表达 miR-372 可能会显著抑制肝癌细胞的增殖和 EMT,促进其凋亡。因此,miR-372 可能作为具有足够敏感性和特异性的一系列生物标志物的候选物,用于临床诊断 HCC。

CXCR4 在 20 多种肿瘤类型中过表达,并且在肿瘤生长、肿瘤侵袭性、癌细胞微环境相互作用和转移中起关键作用^[28]。CXCR4 的存在与多种不同肿瘤实体的不良结局有关,包括血液系统恶性肿瘤、乳腺癌、肾细胞癌、妇科恶性肿瘤、胰腺腺癌和肝细胞癌^[29]。本实验研究发现,CXCR4 在肝癌组织和肝癌细胞中高表达,低表达 CXCR4 可能会抑制肝癌细胞的增殖和 EMT,促进其凋亡。

因此,了解 lncRNA、miRNA 和 mRNA 之间的相互作用关系将有助于深入了解疾病。

本实验中发现 miR-372 可能靶向 HULC 和 CXCR4,并且通过靶向关系进行负调控,进一步影响 HCC 细胞的增殖、凋亡和 EMT。因此,HULC/miR-372/CXCR4 轴可能促进 HCC 细胞的增殖和 EMT 进程、抑制细胞凋亡,这可能是将来 HCC 有价值且有希望的治疗靶点。

综上所述,这项研究说明了肝癌中 HULC、miR-

372 与 CXCR4 之间的分子相互作用。低表达 HULC 通过 miR-372/CXCR4 轴抑制肝癌的发生和发展。这些结果表明,HULC/miR-372/CXCR4 轴可以用作缓解肝癌进展的有希望的治疗靶标。

参考文献:

- [1] Donadon M, Solbiati L, Dawson L, et al. Hepatocellular carcinoma: the role of interventional oncology [J]. Liver cancer, 2016, 6(1): 34-43.
- [2] Liu PH, Hsu CY, Hsia CY, et al. Prognosis of hepatocellular carcinoma: assessment of eleven staging systems [J]. J Hepatol, 2016, 64(3): 601-608.
- [3] Novikova IV, Hennelly SP, Sanbonmatsu KY. Tackling structures of long noncoding RNAs [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(12): 23672-23684.
- [4] Eades G, Zhang YS, Li QL, et al. Long non-coding RNAs in stem cells and cancer [J]. World J Clin Oncol, 2014, 5(2): 134-141.
- [5] Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(1): 7-21.
- [6] Sun J, Bie B, Zhang S, et al. Long non-coding RNAs: critical players in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(11): 20434-20448.
- [7] Chen S, Wu DD, Sang XB, et al. The lncRNA huc functions as an oncogene by targeting atg7 and itgb1 in epithelial ovarian carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3118.
- [8] Cui M, Xiao Z, Wang Y, et al. Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in hepatoma cells through an miR-9-mediated RXRA signaling pathway [J]. Cancer Res, 2015, 75(5): 846-857.
- [9] Wang Y, Xue J, Kuang H, et al. miR-1297 inhibits the growth and metastasis of colorectal cancer by suppressing cyclin d2 expression [J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(11): 991-999.
- [10] Van Peer G, Mets E, Claeys S, et al. A high-throughput 3' utr reporter screening identifies microRNA interactomes of cancer genes [J]. PloS One, 2018, 13(3): e0194017.
- [11] Xiao D, Gao HX. Mechanism of miR-107-targeting of regulator of G-protein signaling 4 in hepatocellular carcinoma [J]. Oncol Lett, 2019, 18(5): 5145-5154.
- [12] Ghanem I, Riveiro ME, Paradis V, et al. Insights on the cxcl12-cxcr4 axis in hepatocellular carcinoma carcinogenesis [J]. Am J Transl Res, 2014, 6(4): 340-352.
- [13] Liu H, Liu Y, Liu W, et al. Ezh2-mediated loss of miR-622 determines cxcr4 activation in hepatocellular carcinoma [J]. Nat Commun, 2015, 6(9): 8494.
- [14] Wang Y, Yu H, Shan Y, et al. EphA1 activation promotes the

- homing of endothelial progenitor cells to hepatocellular carcinoma for tumor neovascularization through the sdf-1/cxcr4 signaling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(4): 65.
- [15] Xu J, Liang J, Meng YM, et al. Vascular cxcr4 expression promotes vessel sprouting and sensitivity to sorafenib treatment in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(15): 4482-4492.
- [16] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [17] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [18] 陈浩, 杨振国, 伍水龙, 等. Kruppel 样因子 6 对肝癌 HepG2 细胞的作用及其缺失对斑马鱼肝脏发育的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(5): 42-50.
- [19] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81(6): 145-166.
- [20] Qiu L, Tang Q, Li G, et al. Long non-coding RNAs as biomarkers and therapeutic targets: recent insights into hepatocellular carcinoma [J]. *Life Sci*, 2017, 191(10): 273-282.
- [21] Lakner AM, Bonkovsky HL, Schrum IW. micrornas: fad or future of liver disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(20): 2536-2542.
- [22] Li SP, Xu HX, Yu Y, et al. Lncrna huc enhances epithelial-mesenchymal transition to promote tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma via the miR-200a-3p/zeb1 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42431-42446.
- [23] Barshack I, Meiri E, Rosenwald S, et al. Differential diagnosis of hepatocellular carcinoma from metastatic tumors in the liver using microrna expression [J]. *Int J Biochem Cell Bio*, 2010, 42(8): 1355-1362.
- [24] Li D, Liu X, Lin L, et al. microrna-99a inhibits hepato-cellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(42): 36677-36685.
- [25] Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates mirna-372 and mirna-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors [J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1169-1181.
- [26] Lai JH, She TF, Juang YM, et al. Comparative proteomic profiling of human lung adenocarcinoma cells (cl1-0) expressing miR-372 [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(4): 675-688.
- [27] Wu G, Liu H, He H, et al. miR-372 down-regulates the oncogene atad2 to influence hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(2): 107.
- [28] Walenkamp AME, Lapa C, Herrmann K, et al. Cxcr4 ligands: the next big hit [J]. *J Nucl Med*, 2017, 58(2): 77-82.
- [29] Zhao H, Guo L, Zhao H, et al. Cxcr4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(7): 5022-5040.

[收稿日期] 2020-03-25