

· 论 著 ·

肝癌细胞 HepG2 外泌体对其自身生长行为的影响及其机制研究*

阴 迪, 王一涵, 王奕丹, 黄钰雯, 刘丽梅, 夏 薇[△]
 北华大学医学技术学院, 吉林吉林 132013

摘要:目的 探讨肝癌细胞 HepG2 外泌体对细胞增殖、迁移、周期和凋亡的影响及其机制。方法 培养肝癌细胞 HepG2 并用差速离心法提取其外泌体, 采用粒径分析、透射电镜、蛋白质印迹法(Western blot)等方法对其进行鉴定。将外泌体与肝癌细胞 HepG2 共培养, 采用细胞划痕实验比较其对细胞增殖能力的影响; 采用 Transwell 实验比较其对细胞迁移能力的影响; 采用流式细胞仪分析其细胞周期变化; 采用实时荧光定量 PCR 检测实验组和对照组的细胞周期蛋白(Cyclin D)、细胞周期蛋白依赖性激酶调节亚基 1(CKS1)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)的相对表达水平。结果 提取后的外泌体经过 Western blot 实验, CD63 和 CD9 均有条带出现, 颗粒大小在 30~100 nm, 电镜形态正常。与对照组比较, 实验组的细胞增殖率较高, 肿瘤迁移能力提升; 细胞 G1 期缩短, G2 期延长; Cyclin D、CKS1 和 Bax 相对表达水平均上升, Bcl-2 相对表达水平降低。结论 肝癌细胞 HepG2 外泌体通过调控 Cyclin D、CKS1 基因缩短其细胞周期, 调控 Bax、Bcl-2 基因抑制细胞凋亡, 从而对其增殖和迁移能力起促进作用。

关键词:外泌体; 肝癌细胞 HepG2; 细胞周期; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.003

中图法分类号:R735.7

文章编号:1673-4130(2021)01-0012-05

文献标志码:A

Effects and mechanism of hepatic cancer cell HepG2 exosomes on their growth behavior*

YIN Di, WANG Yihan, WANG Yidan, HUANG Yuwen, LIU Limei, XIA Wei[△]
 Beihua University Medical Technology College, Jilin, Jilin 132013, China

Abstract: Objective To investigate the effects of exosomes from hepatic cancer cell HepG2 on cell proliferation, migration, cell cycle and apoptosis and try to explore its mechanism. **Methods** The exosomes of hepatic cancer cell HepG2 were extracted by differential centrifugation, and identified with nanoparticle size analyzer, electromicroscope and Western blot. The effects of hepatic cancer cell HepG2 exosomes on their proliferation were evaluated with cell scratch test; the effects of HepG2 cells exosomes on their migration ability were estimated with transwell experiment; the cell cycle changes were recorded by flow cytometry; the relative expression levels of cell cycle regulatory genes Cyclin D, cycline dependent kinase regulatory sulaunit 1 (CKS1) and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 related x protein (Bax) were detected with real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The extracted exosomes were subjected to Western blot experiments. Both CD63 and CD9 had bands, the particle size was 30—100 nm, and the electron microscope morphology was normal. Compared with the control group, the cell proliferation rate of the experimental group was higher than that of the control group, and the tumor migration ability was significantly improved; the cell G1 phase was shortened, and the G2 phase was prolonged; the relative expression levels of Cyclin D, CKS1 and Bax increased, the relative expression level of Bcl-2 decreased. **Conclusion** The exosomes of HepG2 can shorten the cell cycle by regulating Cyclin D and Cks1 genes, and inhibit apoptosis by regulating Bax and Bcl-2 genes, thus promoting the proliferation and migration of HepG2 cells.

Key words: exosomes; hepatic cancer cell HepG2; cell cycle; apoptosis

肝癌的发生、转移与肿瘤微环境密切相关。有研究表明, 肿瘤细胞可以通过细胞与细胞间的直接接触或者旁分泌的方式影响肿瘤微环境, 从而促进肿瘤的形成与发展^[1-2], 然而其自身生长调节方式与行为改

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81201354); 吉林省教育厅科研项目(2017-196); 北华大学研究生创新项目(2018-006)。

作者简介: 阴迪, 女, 技师, 主要从事肿瘤学相关研究。△ 通信作者, E-mail: 496966717@qq.com。

本文引用格式: 阴迪, 王一涵, 王奕丹, 等. 肝癌细胞 HepG2 外泌体对其自身生长行为的影响及其机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(1): 12-15.

变模式还不清晰。外泌体是细胞分泌的一类 30~100 nm 的微小囊泡状结构,内含蛋白成分与核酸成分,已有研究表明,外泌体参与细胞通讯,是细胞间沟通的重要媒介^[3]。因此,本研究推测肿瘤细胞的外泌体对肿瘤细胞会存在某种影响。为进一步验证该推测,本研究从细胞实验、核酸分析等角度,探讨了肝癌细胞 HepG2 外泌体对其自身细胞的增殖、迁移、周期及相关基因转录水平的影响。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 肝癌细胞 HepG2 购自上海中科院细胞库;DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;CD63 抗体、CD9 抗体均购自美国 Abcam 公司;HRP-羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、HRP-羊抗鼠 IgG、超敏 ECL 化学发光即用型底物均购自美国 Boster 公司;Transwell 细胞板购自美国 Corning 公司;DiI 红色荧光探针购自中国碧云天公司;碘化丙啶试剂购自德国 BioFroxx 公司;RNA 提取与反转录试剂盒、SYBR Green 试剂均购自日本 Takara 公司;实时荧光定量 PCR(qPCR)仪、超速离心机均购自美国 Thermo 公司;透射电子显微镜购自日本 Hitachi 公司;纳米粒度仪购自美国 Microtrac 公司;垂直板电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将肝癌细胞 HepG2 用 DMEM 培养基培养,加入 10% 的胎牛血清和 1% 的青霉素链霉素混合双抗,放至 5% CO₂、37 °C、湿度饱和的细胞培养箱培养,待第 2 天胰酶消化后传代。

1.2.2 外泌体的提取 外泌体提取之前,将细胞培养液换成无血清的 DMEM 培养基处理 48 h,收集上清液,用 0.22 μm 滤器过滤后进行 4 °C 差速离心提取^[4],过程如下:将收集好的细胞上清液以 3 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀;将上清液转移至聚碳酸酯管中,35 000 r/min 离心 90 min,弃上清液;加 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗内壁沉淀;转移至 1.5 mL 小型离心管中,涡旋振荡 15 min 后,10 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀;将上清液转移至超速离心管中,35 000 r/min 离心 120 min,弃上清液,加 90 μL PBS 混匀。

1.2.3 外泌体的鉴定 透射电镜拍照:将样品置于铜网上,3% 磷钨酸溶液 20 μL 负染 5 min 后滤纸吸干,置于透射电镜样品室内观察形态并拍照。粒径检测:先用无菌 PBS 将参数调零,擦干后加 200 μL 的外泌体悬液到样品室内,时间设置 90 s,3 次平行检测液体中粒径大小。蛋白质印迹法(Western blot)检测 CD63 和 CD9 两种蛋白:选择 10% 的分离胶和 4% 的浓缩胶制备聚丙烯酰胺凝胶电泳,裂解液裂解外泌体蛋白,另裂解细胞总蛋白做阳性对照;将两组样品与 4×Loading buffer 混合,95 °C 煮样 15 min,冷却后上样,上样量为 30 μg,浓缩胶以电压 80 V 电泳,进入分

离胶后调整电压为 100 V,跑到底部即可停止;采用半干转的方法转膜,阳极到阴极的放置顺序为厚滤纸、聚偏二氟乙烯膜、胶、厚滤纸,25 V 转膜 15 min;转膜后把膜放在 5% 的脱脂奶粉中室温摇床封闭 3 h,取出膜置于 1:1 000 的一抗稀释液中 4 °C 摇床过夜,5% 脱脂奶粉摇床洗 3 次,每次 10 min;置于 1:4 000 的二抗稀释液中室温摇床 1 h,5% 脱脂奶粉摇床洗 5 min,PBS 摇床洗 2 次,每次 5 min;按说明书配制发光底物,加入作用底物后用成像系统显影。

1.2.4 肿瘤细胞对自身外泌体的摄取 制备细胞爬片备用,将无菌清洁的小玻片(1 cm×1 cm)放于 24 孔板中,计数 3×10⁴ 个细胞接种至 24 孔板,培养细胞至贴壁。使用 DiI 染料按说明书标记外泌体^[5],使用 PBS 洗两遍后,超高速离心浓缩外泌体,用 DMEM 培养基将沉淀重悬备用。第 1 孔加入 100 μL PBS 作为对照组,第 2 孔加入 100 μL 混有标记好外泌体的 DMEM 培养基作为实验组。为排除非特异性染色,将最后一遍清洗的 PBS 上清液取 100 μL 加入第 3 孔,培养箱孵育 12 h 后将 24 孔板取出,用荧光染料 Hoechst33258 标记细胞核,用多聚甲醛避光固定细胞 20 min,PBS 洗两遍。三乙稀二胺封片,倒置荧光显微镜观察。

1.2.5 细胞划痕实验 在 24 孔板中每孔接种 1×10⁴ 个肝癌细胞 HepG2,待细胞长满后,弃上清液,用普通标准黄枪头进行划痕,保持枪头垂直,保证各孔划痕基本一致;用 PBS 洗去脱落的细胞和漂浮在孔内的细胞碎片;向各孔中加入 DMEM 培养基,第 1 孔加入 100 μL PBS 作为对照组,第 2 孔加入 100 μL 的外泌体悬液(0.5 mg/mL)作为实验组,放回培养箱培养;取时间点 6、12 h 观察细胞分布状态并进行镜下拍照;以划痕面积占图片面积的比例来计算细胞的增殖率,实验平行 3 次。

1.2.6 细胞迁移实验 将细胞无血清培养 24 h 后,胰酶消化并计数 2×10⁴ 个细胞接种于上室,实验组上室加入 100 μL 溶有外泌体的 DMEM 培养基,对照组上室只加入 100 μL DMEM 培养基。下室均加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 600 μL。两组平行,分别培养 24、48 h 后,将上室取出,下室液体弃去,吉姆萨染液染色 30 min 后 PBS 冲洗干净,观察并计数细胞数量,镜下拍照,实验平行 3 次。

1.2.7 细胞周期实验 将 1×10⁵ 个细胞接种于 6 孔板,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。实验组每孔加入 0.5 mg/mL 的外泌体 100 μL,对照组每孔加入 PBS 100 μL,处理 3 d 后胰酶消化,1 500 r/min 离心 5 min 后加入预冷 PBS 洗涤 2 次;加入预冷的 70% 乙醇 4 °C 固定过夜;PBS 洗涤 1 次;加入 400 μL 碘化丙啶试剂(50 μg/mL),4 °C 避光孵育 30 min,PBS 洗涤 2 次,最后用 100 μL PBS 混匀,用流式细胞仪对细胞周期进行检测,每个样品计数 2×10⁴ 个细

胞,结果用细胞周期拟合软件进行分析,实验独立重复 3 次。

1.2.8 引物设计、合成与荧光定量分析 选定细胞周期相关基因细胞周期蛋白(Cyclin D)、细胞周期蛋白依赖性激酶调节亚基 1(CKS1),凋亡相关基因 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)进行检测^[6-8]。提取 0.5 mg/mL 外泌体处理的细胞作为实验组,没有外泌体处理的细胞作为对照组。提取两组细胞的 RNA 进行反转录,再进行 qPCR 扩增,体系为 20 μ L,其中上下游引物各 0.4 μ L,cDNA 模板 0.4

μ L,去离子水 8.8 μ L,SYBR Premix ExTaq II 10 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C,15 s;60 $^{\circ}$ C,30 s;72 $^{\circ}$ C,30 s;共 40 个循环。60~95 $^{\circ}$ C 绘制熔解曲线。内参为 β -actin,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对各基因的相对表达水平进行计算,实验独立重复 3 次。见表 1。

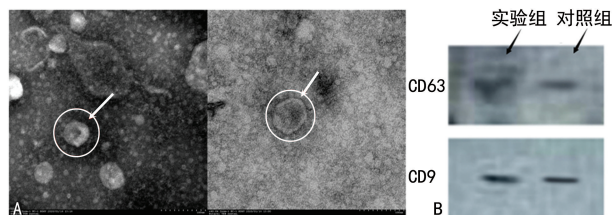
1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS16.0 进行数据处理分析,实验数据均经正态性检验和方差齐性检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较方差齐时采用 *t* 检验,方差不齐时采用近似 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 基因引物序列及退火温度

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	退火温度($^{\circ}$ C)
β -actin	GAT GAG ATT GGC ATG GCT TT CAC CTT CAC CGT TCC AGT TT	100	55.0
Cyclin D	GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	196	62.0
CKS1	TAC CAC GCA GCA GAG TTT GAG T AGC AAG ATG TGA GGT TCT GGT C	170	59.0
Bcl-2	TCC TCT TTA CAC TGG CCA GG GAG TAT TTG TGC AGC GAG GG	145	57.0
Bax	CAT CAT GGG CTG GAC ATT GG CCT CAG CCC ATC TTC TTC CA	177	56.0

2 结 果

2.1 外泌体鉴定结果 透射电镜拍照镜下呈圆形中间凹陷的膜状结构,粒径检测结果显示悬液中粒子大小均在 30~100 nm,Western blot 成像后显示蛋白 CD63 和 CD9 均有条带出现,结果表明外泌体已成功提取,见图 1。



注:A 为透射电镜观察,标尺长度 100 nm;B 为 Western blot 显影图。

图 1 外泌体鉴定结果

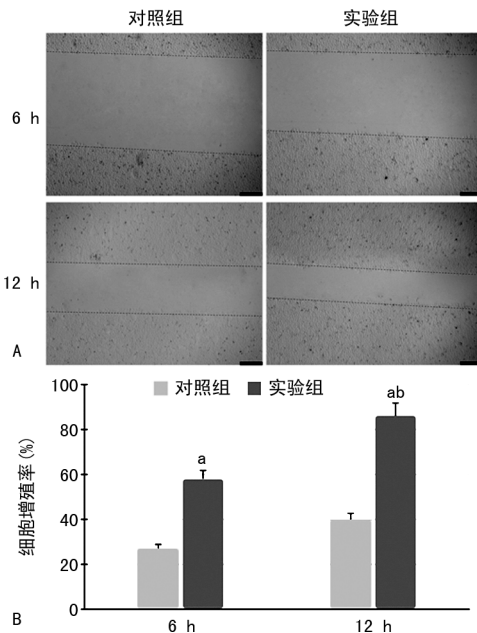
2.2 HepG2 对荧光标记自身外泌体的摄取 倒置荧光显微镜下观察细胞爬片,并对图片进行融合,结果显示红色小颗粒荧光的外泌体进入了细胞内,围绕于蓝色大颗粒荧光的细胞核周围或核上。收集了最后洗涤的 PBS 做平行实验,没有发现红色小颗粒荧光信号,说明没有非特异性荧光染色。

2.3 肿瘤自身外泌体对细胞增殖的影响 实验组的细胞面积占比高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

2.4 肿瘤自身外泌体对细胞迁移的影响 镜下拍照可见 24 h 和 48 h 的 2 个时间点,实验组进入到下室的细胞数量均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。

2.5 肿瘤自身外泌体对细胞周期的影响 对照组的

G1、S、G2 各期所占比例分别为 51.59%,44.33%,2.46%,G2/G1 比值为 1.81;实验组的 G1、S、G2 各期所占比例分别为 38.30%,43.99%,16.25%,G2/G1 比值为 1.79。与对照组比较,实验组细胞 G1 期明显缩短($P < 0.05$),S 期持平,G2 期明显延长,细胞分裂周期缩短。

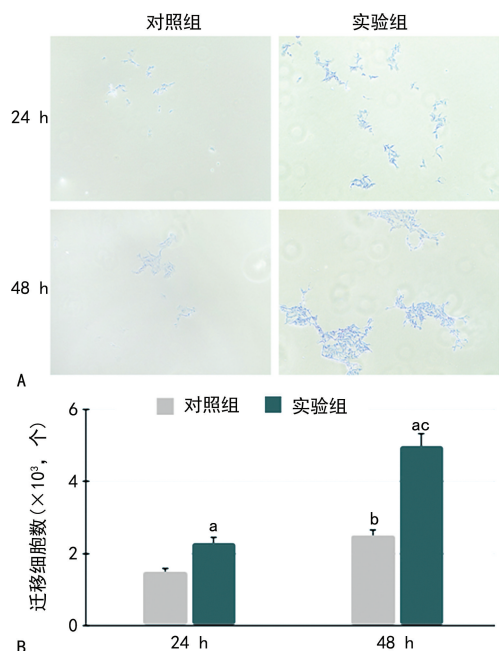


注:A 为划痕 6 h 和 12 h 显微镜下视野,标尺长度 250 μ m;B 为划痕 6 h 和 12 h 后细胞增殖率,与同时间段对照组比较,^a $P < 0.05$,与实验组 6 h 比较,^b $P < 0.05$ 。

图 2 细胞划痕实验结果

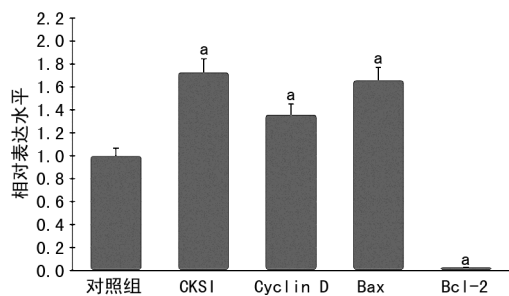
2.6 肿瘤自身外泌体对细胞周期、凋亡相关基因相对表达水平的影响 qPCR 结果可见,基因 Cyclin D、CKS1、Bax 在肿瘤自身外泌体的作用下相对表达水平

上升,而 Bcl-2 相对表达水平降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。



注:A为细胞迁移后下室的细胞经过吉姆萨染色后 10 倍镜下视野;B为细胞迁移后下室的细胞计数情况,与同时时间段对照组比较,^a $P < 0.05$,与对照组 24 h 比较,^b $P < 0.05$,与对照组 48 h 比较,^c $P < 0.05$ 。

图 3 细胞迁移实验结果



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

图 4 细胞周期和凋亡基因的相对表达水平

3 讨 论

外泌体是细胞生长代谢过程中分泌出来的一类包含蛋白成分、核酸成分的有膜囊泡状结构。它能够作用于靶细胞,通过其内容物来调控靶细胞的生理状态。本研究对肝癌细胞 HepG2 的外泌体进行了提取、鉴定,检测了肿瘤细胞对自身外泌体的摄取和吸收,还有其摄取外泌体后的肿瘤细胞的增殖能力和迁移能力,笔者发现肿瘤细胞自身外泌体对肿瘤细胞增殖、迁移等细胞动力学指标均有正向调控趋势。对实验组和对照组进行了细胞周期的检测,结果显示实验组的细胞 G1 期缩短,G2 期延长,说明细胞分裂旺盛,周期正在缩短。对细胞周期调控基因 Cyclin D、CKS1 和凋亡调控基因 Bax、Bcl-2 进行相对定量分析,发现两组细胞的 CKS1、Cyclin D 的相对表达水平都有所上升,所以外泌体很有可能是通过调控 CKS1 和 Cyclin D 等细胞周期调控基因的相对表达水平来促使细

胞通过 G1~S 转折期^[6],致使 G1 期缩短,G2 期延长从而缩短细胞周期,达到促进肿瘤细胞生长的作用。而凋亡调控基因 Bax 相对表达水平上升,由于基因之间复杂的关系,它会抑制 Bcl-2 的相对表达水平,导致 Bcl-2 的相对表达水平降低趋近于不转录^[9],所以实验组细胞的凋亡能力会降低从而促进生长。本研究表明,肝癌细胞的细胞周期缩短原因与周期调控类基因相对表达水平上升密切相关,凋亡基因间相互影响而使凋亡受抑制,故增殖能力与迁移能力旺盛。

肿瘤的病程进展与微小 RNA(miRNA)密切相关,其中与肝癌相关的 miRNA-23、miRNA-139、miRNA-34a 等均会影响肿瘤细胞的周期和凋亡情况^[10]。miRNA-23 和 miRNA-139 作为肝癌细胞特有的小 RNA 极有可能被外泌体包裹,从而完成细胞间的信息传递,参与调控细胞的周期和凋亡^[11]。在许多肿瘤细胞的外泌体中已经检测到 miRNA-34a 的存在,并且影响细胞的增殖能力^[12]。这些 miRNA 极有可能以外泌体为载体靶向运输至细胞内,达到调控基因转录的作用。结合本研究分析,肝癌细胞外泌体对其自身来说,起到一定促进生长的作用。这种多基因的调控通常互相影响、十分复杂,需要进一步确定这些基因对于肿瘤发生、发展的生物学作用,从而为疾病的治疗提供更多的指导。

综上所述,肿瘤自身外泌体可以在体外通过调控 Cyclin D 和 CKS1 基因的相对表达水平,缩短肿瘤细胞周期,调控 Bax、Bcl-2 基因的相对表达水平抑制细胞凋亡,从而使肿瘤细胞增殖更快,迁移能力更强。总体来看,一定水平的肿瘤自身外泌体对肿瘤细胞自身的增殖和迁移能力有促进作用,在以后的实验中还需要进一步明确其对细胞生长的影响,从而为肝癌的临床靶向治疗提供参考。

参考文献

- [1] SUN C, MEZZADRA R, SCHUMACHER T N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint[J]. Immunity, 2018, 48(3): 434-452.
- [2] BLANK C U, ENK A. Therapeutic use of anti-CTLA-4 antibodies[J]. Int Immunol, 2015, 27(1): 3-10.
- [3] RAPOSO G, STOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends [J]. J Cell Biol, 2013, 200(4): 373-383.
- [4] LI X, LI C Y, ZHANG L P, et al. The significance of exosomes in the development and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Molecular cancer, 2020, 19(1): 1-3.
- [5] CHEN L, CHEN R J, KEMPER S, et al. Pathways of production and delivery of hepatocyte exosomes[J]. J Cell Commun Signal, 2018, 12(1): 343-357.
- [6] 甘颖,李虹怡. 下调 DPT 基因通过调节 Cyclin D1 抑制食道癌细胞的增殖[J]. 解剖科学进展, 2019, 25(2): 136-138.

- Lett, 2020, 19(1): 317-322.
- [7] HASHEMI M, BAHARI G, TABASI F, et al. LAPT4B gene polymorphism augments the risk of cancer; evidence from an updated meta-analysis[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(12): 6396-6400.
- [8] CHENG X J, TIAN X Y, WU X J. Relationship between LAPT4B gene polymorphism and prognosis of patients following tumor resection for colorectal and esophageal cancers[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0158715.
- [9] MENG Y, WANG L, XU J J, et al. AP4 positively regulates LAPT4B to promote hepatocellular carcinoma growth and metastasis, while reducing chemotherapy sensitivity[J]. Mol Oncol, 2018, 12(3): 373-390.
- [10] TIAN M, CHEN Y, TIAN D, et al. Beclin1 antagonizes LAPT4B-mediated EGFR overactivation in gastric cancer cells[J]. Gene, 2017, 626: 48-53.
- [11] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol, 2014, 15(7): e279-e289.
- [12] MONTASERI H, KRUGER C A, ABRAHAMSE H. Review: organic nanoparticle based active targeting for photodynamic therapy treatment of breast cancer cells[J]. Oncotarget, 2020, 11(22): 2120-2136.
- [13] JAMESON J L, LONGO D L. Precision medicine-personalized, problematic, and promising[J]. N Engl J Med, 2015, 372(23): 2229-2234.
- [14] UENO T. Biomarkers of neoadjuvant/adjuvant endocrine therapy for ER-positive/HER2-negative breast cancer[J]. Chin Clin Oncol, 2020, 9: 35.
- [15] SCHMID P, CORTES J, PUSZTAI L, et al. Pembrolizumab for early Triple-Negative breast cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 382(9): 810-821.
- [16] 刘歆荣, 周柔丽, 张青云, 等. 人肝癌相关新基因编码产物 LAPT4B 的鉴定及其生物学特性[J]. 北京大学学报(医学版), 2003, 35(4): 340-347.
- [17] KONG F M, GAO F F, CHEN J, et al. Overexpressed LAPT4B-35 is a risk factor for cancer recurrence and poor prognosis in non-small-cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56193-56199.
- [18] LI M, ZHOU R L, SHAN Y, et al. Targeting a novel cancer-driving protein (LAPT4B-35) by a small molecule (ETS) to inhibit cancer growth and metastasis[J]. Oncotarget, 2016, 7(36): 58531-58542.
- [19] SHAO G Z, ZHOU R L, ZHANG Q Y, et al. Molecular cloning and characterization of LAPT4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2003, 22(32): 5060-5069.
- [20] MENG F, LI H, ZHOU R, et al. LAPT4B gene polymorphism and endometrial carcinoma risk and prognosis[J]. Biomarkers, 2013, 18(2): 136-143.
- [21] WANG S, ZHANG Q Y, ZHOU R L. Relationship between LAPT4B gene polymorphism and susceptibility of primary liver cancer[J]. Ann Oncol, 2012, 23(7): 1864-1869.
- [22] ZHANG M, XU J J, ZHOU R L, et al. cAMP responsive element binding protein-1 is a transcription factor of lysosomal-associated protein transmembrane-4 beta in human breast cancer cells[J]. PLoS One, 2013, 8: e57520.
- [23] WANG L, MENG Y E, XU J J, et al. The transcription factor AP4 promotes oncogenic phenotypes and cisplatin resistance by regulating LAPT4B expression[J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(5): 857-868.
- [24] MENG Y, WANG L, CHEN D, et al. LAPT4B: an oncogene in various solid tumors and its functions[J]. Oncogene, 2016, 35(50): 6359-6365.
- [25] WANG Z X, GUO M Y, REN J, et al. Identification of lysosome-associated protein transmembrane-4 as a novel therapeutic target for osteosarcoma treatment. orthop Surg[J]. Orthop Surg, 2020, 12(4): 1253-1260.
- [26] XIA L Z, YIN Z H, REN Y W, et al. The relationship between LAPT4B polymorphisms and cancer risk in Chinese Han population: a meta-analysis[J]. Springerplus, 2015, 4(1): 1-8.
- [27] FAN M, LIU Y, ZHOU R, et al. Association of LAPT4B gene polymorphism with breast cancer susceptibility[J]. Cancer Epidemiol, 2012, 36(4): 364-368.
- [28] 吕杨. LAPT4B 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系生物学行为的影响[D]. 大连: 大连医科大学, 2017.

(收稿日期: 2020-04-30 修回日期: 2020-08-26)

(上接第 15 页)

- [7] 方丽, 周进, 谢华, 等. 姜黄素对结肠癌 HT-29 细胞生长增殖、细胞周期分布及 Cyclin D1 基因表达的影响[J]. 重庆医学, 2016, 45(32): 4479-4481.
- [8] 马俊芳, 崔博, 沈东超, 等. Cyclin D1 基因过表达慢病毒载体的构建和对神经干细胞增殖的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2015, 10(2): 98-101.
- [9] 杨思霞, 李纬, 谢泽萍, 等. 五指毛桃提取物对 HepG_2 细胞凋亡的影响及机制研究[J]. 中药材, 2019, 42(7): 1670-1673.
- [10] 文全庆, 贾延劼, 王明闯, 等. 大鼠脑缺血急性期脑组织 miRNA 的表达变化[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(1): 23-26.
- [11] 张鹏飞. MiR-139 直接抑制 TOP1 的表达影响肝细胞肝癌的增殖和迁移[D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [12] 沙如拉. 红花黄色素 B 通过 miR34a, p53/caspase9 通路调控肝癌凋亡的机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.

(收稿日期: 2020-05-11 修回日期: 2020-09-10)