

肝细胞癌中 TMS1、MBD2 和 DNMT1 的关系及临床意义*

张晓莹¹, 于 静², 程凤凤¹, 房爱菊¹, 张翠娟^{2△}

(1. 山东省立第三医院病理科, 山东济南 250031, 2. 山东大学医学院病理学教研室, 山东济南 250012)

摘要:目的 观察肝细胞癌(HCC)中甲基化相关沉默目标-1(TMS1)、DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)和 DNA 甲基化结构域 2(MBD2)蛋白的表达情况,及 TMS1 基因启动子的甲基化情况,探讨 3 个基因的关系及临床诊断意义。方法 采用免疫组织化学法(IHC)检测 48 例肝癌组织和 48 例对照肝组织中 TMS1、MBD2 和 DNMT1 蛋白表达水平的变化。采用甲基化特异性 PCR (MSP)检测 34 例 HCC 患者、26 例乙型肝炎患者和 23 例健康者血清中的 TMS1 基因甲基化情况。结果 肝癌组织、正常肝组织中 TMS1 的阳性表达率分别为 26.08%、97.92%,MBD2 分别为 18.75%、80.00%;DNMT1 分别为 77.08%、32.25%,TMS1、MBD2 在肝癌组织中的阳性表达率均低于正常肝组织,而 DNMT1 阳性表达率高于正常肝组织,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。TMS1、MBD2 与 DNMT1 的表达均呈负相关($P < 0.05$)。TMS1 蛋白表达水平与年龄、性别无相关性,而与肿瘤的 TNM 分期和分化程度相关($P < 0.05$)。HCC 组、乙型肝炎组、健康者组 TMS1 基因甲基化检出率为 70.6%、50.0%和 0.0%,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。HCC 组、乙型肝炎组的甲基化检出率明显高于健康者组,并随着肿瘤分级、分期的增加而升高。结论 TMS1 高甲基化可能是肝组织癌变的早期事件,TMS1、MBD2 和 DNMT1 蛋白异常表达在 HCC 的发生、发展等过程中起着重要的作用,三者可作为肝癌早期诊断和判断预后的新生物学指标,并可成为 HCC 治疗的新靶点。

关键词:肝细胞癌; TMS1 基因; DNA 甲基化; 去甲基化**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.10.002**中图法分类号:**R363.2**文章编号:**1673-4130(2018)10-1158-05**文献标识码:**A

The relationship and clinical significance of TMS1, MBD2 and DNMT1 in hepatocellular carcinoma*

ZHANG Xiaoying¹, YU Jing², CHENG Fengfeng¹, FANG Aiju¹, ZHANG Cuijuan^{2△}

(1. Department of Pathology, Third Provincial Hospital of Shandong Province, Jinan, Shandong 250031, China; 2. Department of Pathology Pathology Teaching and Research Department, Shandong Medicine University, Jinan, Shandong 250012, China)

Abstract: Objective To observe the expression of methylation related silent target 1 (TMS1), DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and methyl CpG binding domain protein 2 (MBD2), and the methylation of the TMS1 gene promoter, in hepatocellular carcinoma (HCC), and to investigate the relationship between the three genes and the clinical diagnostic significance. **Methods** The protein expression of TMS1, MBD2 and DNMT1 in 48 cases of HCC tissues and 48 case of normal tissues were detected by immunohistochemistry (IHC); the methylation status of TMS1 gene in serum of 34 patients with HCC, 26 patients with hepatitis B and 23 healthy controls were analyzed by methylation specific polymerase chain reaction (MSP). **Results** The positive rates of TMS1 expression in HCC tissues and normal tissues were 26.08% and 97.92%, respectively; the positive rate of MBD2 expression were 18.75% and 80.00%, respectively; the positive rate of expression were 77.08% and 32.25%, respectively. The positive rates of TMS1 and MBD2 expression in HCC tissues were significantly lower than those in the normal tissues, and DNMT1 expression was higher than that in the normal tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression TMS1 and MBD2 were negatively correlated with DNMT1 ($P < 0.05$). TMS1 protein expression was associated with TNM stage and tumor differentiation but not associated with the age and gender ($P < 0.05$). The methylation detection rates

* 基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2015WS0264)。

作者简介: 张晓莹, 女, 硕士研究生, 医师, 主要从事肿瘤表观遗传学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: cuijuanzhang@sdu.edu.cn。

本文引用格式: 张晓莹, 于静, 程凤凤, 等. 肝细胞癌中 TMS1、MBD2 和 DNMT1 的关系及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(10):

of TMS1 gene in HCC group, hepatitis B group and healthy group were 70.6%, 50.0% and 0.0%, respectively, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). The methylation detection rate of HCC group and hepatitis b group was obviously higher than the normal group, which aggravated with the increase of tumor grade and stage. **Conclusion** TMS1 hypermethylation may be an early event in the carcinogenesis of liver tissue, the abnormal expression of TMS1, MBD2 and DNMT1 proteins plays an important role in the occurrence and the development of HCC, which can be used as new molecular markers for the early diagnosis and prognosis of HCC, and become the new targets for the treatment of HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; TMS1 gene; DNA methylation; demethylation

肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌中最常见的组织学类型,受遗传学和表观遗传学共同调控,DNA 甲基化是一种重要的表观遗传学修饰,不仅在胚胎发育和细胞分化中起重要作用,而且在癌变过程中扮演了重要角色。在遗传学中将 DNA 甲基化异常的重要作用称为“肿瘤发生的第三条途径”^[1]。

甲基化相关沉默目标-1(TMS1)是一种较新的 CpG 岛相关基因,也是一种新的抑癌候选基因,抑癌基因失活在肿瘤的发生、发展的过程中起着重要的作用。研究证明 TMS1 促进人类细胞的凋亡,多种恶性肿瘤中已检测到其表达减少或者缺失^[2]。DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)是一种甲基化关键酶,在催化 and 维持基因甲基化过程中发挥着重要的作用。DNA 甲基化结构域 2(MBD2)可以与甲基化的 CpG 岛结合,抑制基因转录和去甲基化,是介导 DNA 甲基化的重要因子。

本研究主要通过检测肝癌组织及正常肝组织中 TMS1、MBD2、DNMT1 的蛋白表达水平及 TMS1 基因启动子的甲基化水平,探讨三者 in HCC 发生发展中的关系及相互作用,为其早期诊断、靶向治疗和判断预后提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集山东大学医学院 2009 年 9 月至 2010 年 10 月的患者外周血血清和手术切除组织,血清样本中 HCC 组 34 例、乙型肝炎组 26 例及健康者组 23 例;手术切除的 HCC 标本 48 例的肝癌组织、正常肝组织 48 例(距离肿瘤 3 cm 以上的肝组织)。48 例 HCC 组中男 38 例,女 10 例,年龄 27~78 岁,中位年龄 53.6 岁。所有病例根据 TNM 分期标准进行分期,均有组织病理学诊断依据,−80℃冰箱保存。

1.2 免疫组织化学法检测 TMS1、MBD2 和 DNMT1 蛋白表达组织蜡块连续切片,切片厚 4 μm,置 60℃烤箱中 1 h。烤片 68℃ 20 min。切片经二甲苯、梯度乙醇、PBS 冲洗 3 遍。加 50 μL 3% H₂O₂ 溶液,37℃放置 10 min。微波抗原修复 15 min 自然冷却,PBS 冲洗 2 遍。滴加 50 μL 一抗,37℃放置 1 h,4℃冰箱孵育过夜。37℃静置 1 h,PBS 冲洗 3 遍。使用山羊超敏二步法试剂盒按照说明进行,滴加试剂 1,

37℃孵育 30 min,PBS 冲洗 2 遍。滴加试剂 2,37℃孵育 30 min,PBS 冲洗 2 遍。滴加新鲜配制的 DAB 溶液,显色并观察。苏木素复染,脱水封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照,细胞质内出现淡黄色至棕褐色颗粒为阳性染色。每张切片双盲计数至少 5 个高倍视野,阳性细胞数≥30%视为阳性表达,阳性细胞数<30%为阴性表达。

1.3 MSP 检测 TMS1 基因启动甲基化状态 使用德国 Qiagen 公司 DNA 提取试剂盒并按说明书步骤操作提取血清基因组 DNA。使用 Berkmandu650 分光光度仪测定核酸吸光度 A260、A280, A260/A280>1.8。将 DNA 浓度稀释为 1 μg/100 μL 以进行修饰。使用美国 Intergen 公司 CpGenome DNA 修饰试剂盒并按照说明书的步骤操作进行 DNA 的亚硫酸氢钠修饰。PCR 反应总体积 25 μL,95℃ 12 min,94℃ 30 s,58℃(或 60℃)30 s,72℃ 45 s,共 45 个循环,72℃ 10 min(TMS1 引物序列见表 1)。PCR 产物置于 3%琼脂糖凝胶电泳,电压 120 V 25 min,紫外光照显带。

表 1 TMS1 基因引物序列			
基因	引物序列(5'~3')	退火温度 (℃)	大小 (bp)
TMS1/ASC-M-F	TTG TAG CGG GGT GAG CGG C	58	191
TMS1/ASC-M-R	AAC GTC CAT AAA CAA CAA CGC G		
TMS1/ASC-U-F	GGT TGT AGT GGG GTG AGT GGT	60	196
TMS1/ASC-U-R	CAA AAC ATC CAT AAA CAA CAC A		

注:U 表示非甲基化特异性引物;M 表示甲基化特异性引物

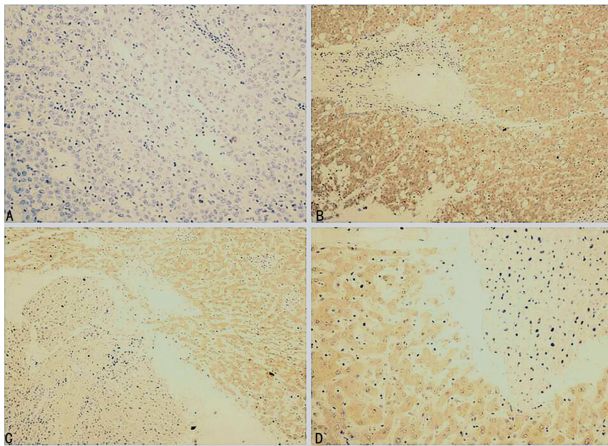
1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,采用 χ^2 检验,以及 Spearman 等级相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果

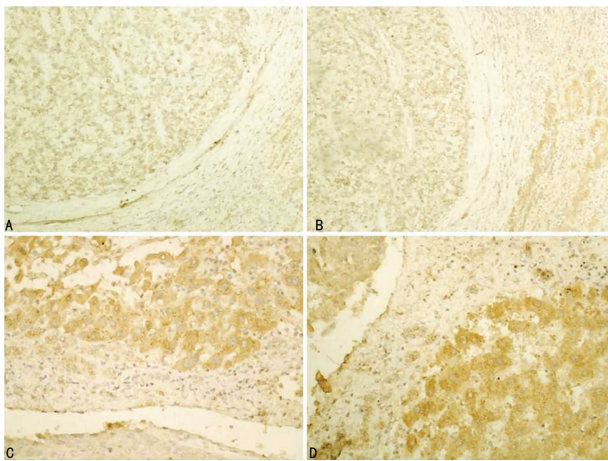
2.1.1 TMS1、MBD2 和 DNMT1 蛋白的免疫组化阳性表达率 48 例肝癌组织、正常肝组织中,TMS1 的阳性表达率分别为 26.08%(10/48)、97.92%(47/48),见图 1;MBD2 分别为 18.75%(9/48)、80%(38/48),见图 2;DNMT1 的阳性表达率分别为 77.08%(37/48)、32.25%(15/48),见图 3。TMS1、MBD2 在

肝癌组织中的阳性表达率均低于正常肝组织,而 DN-MT1 的阳性表达率高于正常肝组织,差异有统计意义($P<0.05$),TMS1、MBD2 与 DNMT1 的表达均呈负相关($P<0.05$)。



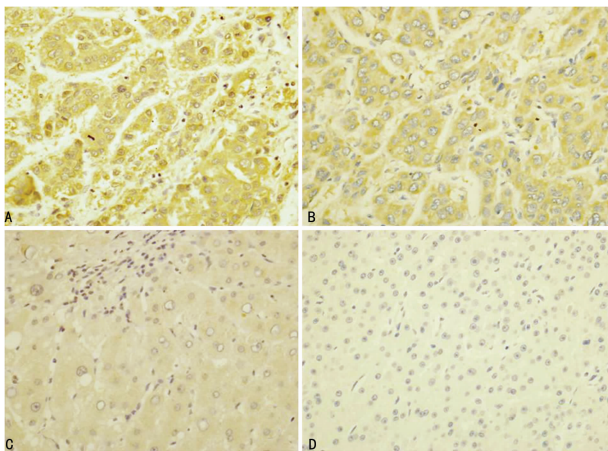
注:A 为肝癌组织;B 为正常肝组织;C 为左下方不着色的是肝癌组织,B 为右上方着色的是正常肝组织;D 为(同 C)

图 1 TMS1 蛋白在 HCC 中的表达($\times 200$)



注:A、B 为肝癌组织;C、D 为正常肝组织

图 2 MBD2 蛋白在 HCC 中的表达($\times 400$)



注:A、B 为肝癌组织;C、D 为正常肝组织

图 3 DNMT1 蛋白在 HCC 中的表达($\times 400$)

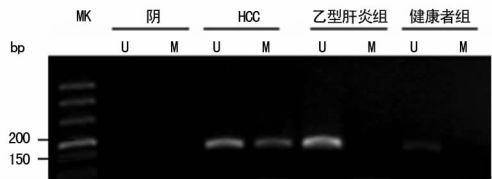
2.1.2 TMS1 蛋白表达与临床病理学参数的关系
TMS1 蛋白表达水平与年龄、性别无相关性($P>0.05$),与肿瘤的 TNM 分期、分化程度相关($P<$

0.05),见表 2。

表 2 TMS1 蛋白表达与临床病理学参数的关系

项目	阳性例数(<i>n</i>)	阴性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)	<i>P</i>
年龄				
≥50 岁	7	25	21.88	0.801 6
<50 岁	3	13	18.75	
性别				
男	8	30	21.05	0.740 5
女	2	8	20	
分化程度				
低	1	20	4.76	0.023 5
中	4	12	25	
高	5	6	45.45	
TNM 分期				
I ~ II	8	14	36.36	0.030 9
III ~ IV	2	24	7.69	

2.2 MSP 检测 TMS1 基因启动子甲基化情况
TMS1 在 HCC 组、乙型肝炎组和健康者组中的甲基化检出率分别为 70.6%(24/34)、50%(13/26)、0%(0/23),见表 3,并随着肿瘤分级、分期的增加,其甲基化水平逐渐升高($P<0.05$),见图 4。



注:MK 为 Mark;M 为基因启动子发生甲基化,甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带;U 为基因未发生甲基化,非甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带;阴为 H₂O 作为阴性对照

图 4 TMS1 基因甲基化 MSP 产物琼脂糖凝胶电泳图像

在 24 例 TMS1 启动子甲基化的肝癌组织中,有 22 例同时伴有 TMS1 基因表达缺失,2 例为阳性表达;在 10 例无启动子甲基化的肝癌组织中,有 6 例同时伴有 TMS1 基因表达缺失,4 例为阳性表达。TMS1 基因表达与其甲基化呈负相关($r=-0.64$, $P<0.05$)。

表 3 不同组别 TMS1 基因启动子甲基化检出率的比较

组别	TMS1 基因甲基化情况(<i>n</i>)		合计(<i>n</i>)	阳性率(%)
	+	-		
健康者组	0	23	23	0.0
乙型肝炎组	13	13	26	50.0
HCC 组	24	10	34	70.6

3 讨 论

HCC 占我国原发性肝癌的 90%以上,其恶性程度高、病情进展快,尽管目前采用手术、放疗、化疗和

局部治疗为主的综合治疗措施,但大多数患者仍预后很差。目前研究发现人类肿瘤的发生、发展与 DNA 甲基化异常密切相关,而且在肿瘤发生的早期即可检测出,因此可作为肿瘤早期诊断的分子标志物、靶向治疗靶点和判断预后的手段。

TMS1 是一个新发现的凋亡相关的抑癌候选基因^[3-5],由 3 个外显子组成,长 1.5 kb,染色体的 16p11.2~12.1 上并 α -编码一种 22×10^3 的 CARD 蛋白,根据 TMS1 的促细胞凋亡功能提示它可抑制肿瘤的发生,当其表达缺失时组织易发生癌变。目前在多种恶性肿瘤包括乳腺癌、结肠癌、卵巢癌等组织中已检测在 TMS1 基因的异常甲基化和 TMS1 蛋白表达下调甚至缺失,且与肿瘤的恶性程度密切相关。EMIETA 等^[6]研究发现 TMS1 功能的缺失是晚期肺癌进展以及转移的重要事件,并与肺腺癌的转移有着密切的关系。张志学等^[7]研究认为 TMS1 基因甲基化可能是肺癌发生的早期事件,并且可能与吸烟有关,在肺癌中 TMS1 的甲基化与蛋白表达下降存在相关性,19 例甲基化阳性的标本中有 18 例表现出蛋白表达下降。本研究结果与其相符,TMS1 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率(26.08%,10/48)明显低于正常肝组织(97.92%,47/48),TMS1 蛋白表达水平与年龄、性别无相关性,而与肿瘤的 TNM 分期和分化程度相关($P < 0.05$),证明肝癌中 TMS1 蛋白表达水平明显下降,并与肿瘤的发生、进展和浸润转移有密切的关系。

随着近年来 PCR 技术在遗传学检测中的广泛应用,PCR 技术敏感性高、特异性高,而且操作简便、快捷,通过 PCR 技术对外周血血清中所提取得到的 DNA 进行基因甲基化检测,可以做到基本无创,该方法可用于 HCC 的早期筛查。

本研究应用 MSP 法检测外周血血清中 TMS1 基因的甲基化情况,其中肝癌组的甲基化检出率为 70.6%(24/34),乙型肝炎组为 50%(13/26),明显高于健康者组(0%,0/23),其检出率随着肿瘤分级、分期的增加而升高;本研究发现在 24 例 TMS1 启动子甲基化的肝癌组织中,有 22 例同时伴有 TMS1 蛋白表达下降,在 10 例无启动子甲基化的肝癌组织中,有 6 例伴有 TMS1 蛋白表达下降。本实验证明肝癌中存在 TMS1 基因的异常甲基化并导致其蛋白表达下调,此现象在乙型肝炎患者中已经开始存在,而在健康人中未发生,证明 TMS1 的异常甲基化可能是 HCC 发生过程中的一个早期事件,并且可能与乙型肝炎病毒感染有关,这在 HCC 的恶性转化及肿瘤细胞的浸润转移过程中起着关键作用。

DNMT1 是 DNA 甲基化过程的其中一个关键酶,其功能异常可引起多种抑癌基因的高甲基化。研

究资料表明,DNMT1 在肺癌和结肠直肠癌中阳性表达率明显高于正常组织,且与肿瘤细胞的低分化趋势有关^[7-9]。本研究结果与国内外文献报道基本一致,DNMT1 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率(77.08%,37/48)明显高于正常肝组织(32.25%,15/48),证明 DNMT1 蛋白在肝癌中表达增加。高表达的 DNMT1 可通过促进抑癌基因的异常高甲基化导致肿瘤的发生。

DNA 甲基化多发生在 CpG 二核苷酸上进而导致基因沉默,成为导致基因失活的重要机制之一。研究发现,MBD2 在甲基化抑制转录和去甲基化作用中有不同的作用方式,其表达异常与肿瘤的关系密切,在不同的肿瘤中的表达不同^[10-11]。在胃癌和结肠癌中 MBD2 因启动子甲基化修饰而表达下调,并随着结肠癌临床分期的演进而下调^[12-15]。本研究发现,MBD2 蛋白在肝癌组织中的阳性表达率(18.75%,9/48)明显低于正常肝组织(80%,38/48),证明在 HCC 中存在 MBD2 基因的异常甲基化而导致其表达下调,其去甲基化酶和抑制基因转录的功能降低,导致抑癌基因 TMS1 的高甲基化无法逆转进而参与 HCC 的发生。

本研究发现,在 HCC 中 TMS1 基因高甲基化导致其蛋白表达率降低。TMS1、MBD2 蛋白在肝癌组织中的表达率降低,而 DNMT1 蛋白的表达率增高,TMS1、MBD2 与 DNMT1 的蛋白表达呈负相关。这表明 HCC 中 TMS1 基因的异常高甲基化,既可能是 DNMT1 高表达,其 DNA 甲基化酶作用增强,又有可能是 MBD2 蛋白表达下调,其抑制转录和去甲基化酶作用减弱,异常甲基化的 TMS1 无法被逆转等原因所致。因此有望通过抑制 DNMT1 的活性及增加 MBD2 的功能以恢复抑癌基因 TMS1 的表达,这对于为 HCC 的早期诊断治疗提供理论依据和防治的关键点。

综上所述,TMS1 的异常甲基化可能是肝组织癌变的早期事件和频发事件,DNMT1、MBD2 和 TMS1 蛋白的异常表达与 HCC 的发生、发展和浸润转移等过程有关,联合检测三者的表达情况,深入探讨其作用机制,对 HCC 的早期诊断、治疗和预后判断有重要价值,并可为肿瘤靶向药物的研发提供新的思路,提高临床的诊治水平。

参考文献

- [1] VERMA M,SRIVASTAVA S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention[J]. Lancet Oncol,2002,3(12):755-263.
- [2] NEPHEW K P,HUAVQ T H. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression[J]. Cancer Lett,2003,190(2):125-133.

- [3] LEVINE J J, STMISON C K, BERTINO P M. Effects of methylation on expression of TMS1/ASC in human breast cancer cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(22): 3475.
- [4] LIU X F, ZHU S G, ZHANG H, et al. The methylation status of the TMS1/ASC gene in cholangio carcinoma and its clinical significance[J]. *Hepato biliary Pancreat Dis Int*, 2006, 5(3): 449.
- [5] MARTINEZ R, SCHACKERT G, ESTELLER M. Hypermethylation of the proapoptotic gene TMS1/ASC: prognostic importance in glioma[J]. *J Neurooncol*, 2007, 82(2): 133-139.
- [6] EMIETA M, MALCOLM V, CRAIG M, et al. Hypermethylation of TMS1/ASC is a putative marker for late-stage lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6210-6218.
- [7] 张志学, 张林. 非小细胞肺癌中 ASC 基因启动子甲基化的意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2006, 33(12): 674-677.
- [8] MIZUNO S, CHIJIWA T, OKAMURA T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia[J]. *Blood*, 2001, 97(5): 1172-1179.
- [9] XU H, WANG Z, LIU D, et al. High expression of DNMT1 was correlated with beta-catenin accumulation and malignant phenotype of lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma[J]. *Zhong guo Fei Ai Za Zhi*, 2010, 13(9): 856-860.
- [10] ZHU Y M, HUANG Q, LIN J, et al. Expression of human DNA methyltransferase 1 in colorectal cancer tissues and their corresponding distant normal tissues[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2007, 22(6): 661-666.
- [11] BILLARD L M, MAGDINIER F, LENOIR G M, et al. MeCP2 and MBD2 expression during normal and pathological growth of the human mammary gland[J]. *Oncogene*, 2002, 21(17): 2704-2712.
- [12] RADVANYI L, SINGH-SANDHU D, GALLICHAN S, et al. Tartaglia J, Berinstein NL: The gene associated with trichorhinophalangeal syndrome in humans is overexpressed in breast cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(31): 11005-11010.
- [13] SIMIC P, VUKICEVIC S. Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(3): 299-308.
- [14] GAI Z, ZHOU G, ITOH S, et al. Trps1 functions downstream of Bmp7 in kidney development[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(11): 2403-2411.
- [15] CERVONI N, BHATTACHARYA S, SZYF M. DNA demethylase is a processive enzyme[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(13): 8363-8366.

(收稿日期: 2017-11-24 修回日期: 2018-01-04)

(上接第 1157 页)

- [21] LIN A F, HU Q S, LI C L, et al. The LINK-A lncRNA interacts with PtdIns(3,4,5)P3 to hyperactivate AKT and confer resistance to AKT inhibitors[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(3): 238-251.
- [22] 朱玉翠, 张晓彤, 胡成进, 等. 长链非编码 RNA 在乳腺癌中的研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2017, 35(8): 628-631.
- [23] ZHAO L, ZHANG Y J, ZHANG Y B. Long noncoding RNA CASC2 regulates hepatocellular carcinoma cell oncogenesis through miR-362-5p/NF- κ B axis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 10: 26446.
- [24] LIU L, CUI S T, WAN T, et al. Long non-coding RNA HOTAIR acts as a competing endogenous RNA to promote glioma progression by sponging miR-126-5p[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 10: 26432.
- [25] LI H L, CHEN S X, LIU J, et al. Long non-coding RNA PVT1-5 promotes cell proliferation by regulating miR-126/SLC7A5 axis in lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(3): 2350-2355.
- [26] YOUNG T L, MATSUDA T, CEPKO C L. The noncoding RNA taurine upregulated gene 1 is required for differentiation of the murine retina[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(6): 501-512.
- [27] LI J J, ZHANG Q H, FAN X M, et al. The long noncoding RNA TUG1 acts as a competing endogenous RNA to regulate the Hedgehog pathway by targeting miR-132 in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 65932-65945.
- [28] HUANG M D, CHEN W M, QI F Z, et al. Long non-coding RNA TUG1 is up-regulated in hepatocellular carcinoma and promotes cell growth and apoptosis by epigenetically silencing of KLF2[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1): 165.
- [29] ZENG Y, YAO X H, CHEN L, et al. Sphingosine-1-phosphate induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma via an MMP-7/syndecan-1/TGF- β autocrine loop[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 63324-63337.
- [30] FENG X N, JIANG J J, SHI S H, et al. Knockdown of miR-25 increases the sensitivity of liver cancer stem cells to TRAIL-induced apoptosis via PTEN/PI3K/Akt/Bad signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49(6): 2600-2610.

(收稿日期: 2017-11-26 修回日期: 2018-01-06)