

· 论 著 ·

原发性肝细胞癌术后复发转移患者 长链非编码 RNA 的表达分析

赵冀¹, 周超², 邓小凡¹, 张宇¹, 刘兴超¹, 朱世凯¹, 陈凯¹, 陈云飞¹, 杨洪吉¹

1. 四川省人民医院器官移植中心, 四川 成都 610072; 2. 四川省人民医院消化内科, 四川 成都 610072

摘要: **目的** 分析原发性肝细胞癌(HCC)术后复发转移患者长链非编码 RNA(lncRNA)的表达情况。**方法** 纳入 2010 年 7 月至 2012 年 9 月四川省人民医院收治的 32 例术后 3 年内局部复发、22 例远处转移、17 例局部(肝内)复发合并远处转移和 56 例无瘤生存的 HCC 患者,采用原位杂交法测定其手术原发肿瘤组织、癌旁正常组织和复发转移灶中肌动蛋白丝相关蛋白 1-反义 RNA1(AFAP1-AS1)、肝癌微血管浸润相关 lncRNA(MVIH)和肺腺癌转移相关转录本 1(MALAT-1)的表达分布,比较它们在癌旁正常组织、原发肿瘤灶和转移复发灶中的表达差异。**结果** AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 均主要定位于细胞质中。AFAP-AS1 在原发肿瘤组织中的表达下调,显著低于癌旁正常组织(P 均 < 0.01);在复发转移瘤样本中 AFAP-AS1 表达与原发肿瘤组织相近(P 均 > 0.05)。MVIH 在原发肿瘤组织中的表达上调,显著高于癌旁正常组织($P < 0.01, P < 0.05$),在发生远处转移患者原发肿瘤组织中 MVIH 的表达显著高于无瘤生存患者的原发肿瘤组织($P < 0.05$),发生远处转移患者远处转移灶中 MVIH 表达显著高于其原发肿瘤组织($P < 0.05$)。MALAT-1 在原发肿瘤组织中的表达上调,显著高于癌旁正常组织($P < 0.01, P < 0.05$);发生局部复发、远处转移及复发合并转移患者原发肿瘤组织中的 MALAT-1 均显著高于无瘤生存患者的原发肿瘤组织(P 均 < 0.05);而复发转移瘤灶中的 MALAT-1 表达与原发肿瘤组织相近($P > 0.05$)。**结论** AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 等三种 lncRNA 与 HCC 的发生发展密切相关,MVIH 和 MALAT-1 的过度上调与 HCC 的复发转移有关。

关键词: 原发性肝细胞癌; 复发; 转移; 长链非编码核糖核酸; 原位杂交

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)08-1017-05

Expressions of long non-coding RNAs in patients with primary hepatocellular carcinoma of recurrent or/and metastasis after surgical resection

ZHAO Ji*, ZHOU Chao, DENG Xiao-fan, ZHANG Yu, LIU Xing-chao

ZHU Shi-kai, CHEN Kai, CHEN Yun-fei, YANG Hong-ji

* Organ Transplant Center, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China

Abstract: Objective To analyze the expressions of long non-coding RNAs(lncRNA)in patients with primary hepatocellular carcinoma (HCC)of recurrent or/and metastasis after surgical resection. **Methods** Thirty-two patients with local recurrence within 3 years after operation,22 with distant metastasis,17 with intrahepatic local recurrence combined with distant metastasis and 56 with tumor-free survival who were received and treated in Sichuan Provincial People's Hospital between July 2010 and September 2012 were included in this study. The hybridization in situ method was used to detect the expressions of actin filament associated protein 1- antisense RNA1 (AFAP1-AS1),lncRNA associated with microvascular invasion in HCC(MVIH) and metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT-1) in the primary tumor tissues,normal tissues adjacent to cancer and the tissues of recurrent/metastatic lesions,and their expression levels in these tissues were compared. **Results** AFAP1-AS1,MVIH and MALAT-1 were mainly located in the cytoplasm. AFAP-AS1 expression in primary tumor tissue was down-regulated and was significantly lower than that in normal tissues adjacent to cancer (all $P < 0.01$);AFAP-AS1 expression in recurrent or/and metastatic tumor tissues was similar with that in primary tumor tissues(all $P > 0.05$). MVIH expression in primary tumor tissues was up-regulated and was significantly higher than that in normal tissues adjacent to cancer ($P < 0.01, P < 0.05$);MVIH expression in primary tumor tissues of distant metastasis patients was significantly higher than that in primary tumor tissues of tumor-free survival patients ($P < 0.05$);MVIH

expression level in distant metastasis foci of patients with distant metastasis was significantly higher than that in the primary tumor tissues ($P < 0.05$). MALAT-1 expression level in primary tumor tissues was up-regulated and was significantly higher than that in normal tissues adjacent to cancer ($P < 0.01, P < 0.05$); MALAT-1 expression levels in primary tumor tissues of patients with local recurrence, distant metastasis and recurrence combined with metastasis were significantly higher than that in primary tumor tissues of tumor-free survival patients (all $P < 0.05$); MALAT-1 expression level in the foci of recurrent or/and metastatic tumor was similar with that in primary tumor tissues ($P > 0.05$). **Conclusions** AFAP1-AS1, MVIH and MALAT-1 belonging to lncRNA are closely correlated with occurrence and development of HCC, in which MVIH and MALAT-1 over up-regulations are associated with recurrence and metastasis of HCC.

Key words: Primary hepatocellular carcinoma; Recurrence; Metastasis; Long non-coding RNAs; Hybridization in situ

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 在全世界的发病率和病死率排名均较靠前, 由于我国人口基数较大, 在我国 HCC 的年新发病例数约占全球总新发病数的 55%^[1]。虽然 HCC 的发生与乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的关系十分密切, 研究报道约 50% 的 HCC 病例是由 HBV 感染导致, 但对于 HCC 的治疗现状仍不乐观, 患者预后也相对较差, 给患者及其家庭带来了巨大的痛苦和压力^[2]。而目前对于 HCC 仍缺乏早期诊断和评价预后的生物学指标, 这对改善 HCC 患者的预后也是不利因素之一^[3]。

长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, 二、三级结构复杂, 在细胞凋亡、分化等生物学过程中发挥着重要作用^[4], 越来越多的研究表明一些 lncRNA 在恶性肿瘤的发生、发展中也扮演着重要角色, 其在癌症组织中的表达往往低于或高于相应正常组织, 因此学者们也在探讨这些 lncRNA 在恶性肿瘤发病风险评估、疾病诊断和预后预测中的潜在价值^[5]。在关于 HCC 的研究中, 肺腺癌转移相关转录本 1 (MALAT-1)、肝癌微血管浸润相关 lncRNA (MVIH) 和肌动蛋白丝相关蛋白 1-反义 RNA1 (AFAP1-AS1) 等 lncRNA 被发现在 HCC 组织中差异表达, 并且部分 lncRNA 还与 HCC 的临床特征相关^[6-8]。

临床研究表明不同的 HCC 患者术后的预后不尽相同, 有些转移复发, 有些可长期无瘤生存, 这种差异可能由患者的基因异质性所致, 因此寻找这些异质性表达的基因对预测患者的预后具有重大意义。本研究旨在分析上述与 HCC 发生发展密切相关的 lncRNA 在 HCC 术后复发转移患者中的差异表达, 以探讨它们与肿瘤复发和转移的关系, 为其作为临床预测生物学指标提供有力的参考。

1 对象与方法

1.1 研究对象 纳入 2010 年 7 月至 2012 年 9 月四川省人民医院收治的 HCC 患者。纳入标准: (1) 明

确的病理学诊断为 HCC; (2) 在四川省人民医院首诊治疗; (3) 术前临床分期为 I 或 II 期, 已行肿瘤手术切除术; (4) 术前肝功能 Child-Pugh 分级标准 A 级; (5) 有手术切除肿瘤组织和癌旁正常组织样本, 且保存完好、可用; (6) 术后复发转移者有明确的复发转移灶的病理学诊断和组织样本; (7) 患者或其家属同意加入本研究。排除标准: (1) 临床分期 III 期或不具有手术适应证者; (2) 合并其他部位恶性肿瘤或其他器官严重功能障碍; (3) Child-Pugh 分级标准 B/C 级; (4) 肿瘤组织样本不全或无法获得者; (5) 患者及家属不同意参与本研究。根据以上原则共纳入 32 例术后 3 年内局部复发、22 例远处转移、17 例局部 (肝内) 复发合并远处转移和 56 例无瘤生存的 HCC 患者, 纳入受试者的一般资料见表 1, 各特征的组间水平比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。所有受试者均签署知情同意书, 研究已经医院伦理学委员会批准同意。

1.2 组织芯片制作 将 32 例局部复发患者、22 例远处转移患者和 17 例复发合并转移患者的手术切除肿瘤组织、癌旁正常组织和复发后的肿瘤组织, 以及 56 例无瘤生存患者的手术切除肿瘤组织和癌旁正常组织标本送西安艾丽娜生物科技有限公司加工制作, 每张芯片包含 325 个组织点 (每点都来源于不同患者或同一患者的不同类型组织), 囊括了所有患者所有类型的组织, 为保证后续实验顺利进行, 共制作 18 张组织芯片, 其中 3 张用作不同 lncRNAs 原位杂交实验条件摸索, 9 张用作检测, 6 张备用。

1.3 原位杂交

1.3.1 寡核苷酸探针的设计和合成 在美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 核酸数据库中查找 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 相应基因的 DNA 序列, 利用 Primer 5.0 软件设计寡核苷酸探针, 并在 BLAST 软件中进行精确匹配, 并参阅相应文献为每个 lncRNA 选出特异性较好、杂交参数最佳的探针。AFAP1-AS1、

表 1 受试者的一般资料

指标	局部复发 (n=32)	远处转移 (n=22)	复发合并转移 (n=17)	无瘤生存 (n=56)
首诊年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	51.74 ± 11.30	52.09 ± 11.24	53.11 ± 10.47	52.04 ± 9.82
性别 (例)				
男	22	16	13	42
女	10	6	4	14
乙肝病史 (例)	14	7	5	23
术前临床分期 (例)				
I 期	13	8	6	20
II 期	19	14	11	36
术前大体分型 (例)				
巨块型	8	7	6	27
结节型	24	15	11	29
AFP (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)				
术前	294.62 ± 81.55	302.48 ± 74.15	301.77 ± 78.64	302.41 ± 89.24
术后 1 周	34.75 ± 22.49	35.67 ± 18.64	29.82 ± 20.48	31.47 ± 19.61

MVIH 和 MALAT-1 三个 lncRNA 基因的探针序列分别为 5'-TGTTGATTCTAAGAGGACACAGACTGCTTC-ATTTC-3'、5'-CAAACAGGGAGTAGTTCTTAGTGAGTAGTTC-3' 和 5'-GAACATGTAACCTTGTAGACTGGAGAAGATAGG-3'。最后送北京金唯智生物科技有限公司完成寡核苷酸探针的序列合成和标记(3'端采用地高辛标记)。

1.3.2 杂交检测 包含 325 个组织点的组织芯片经 60 min 烤片、30 min 脱蜡、梯度酒精、灭活内源性过氧化物酶、暴露 mRNA 核酸片段、后固定等标准的流程处理后,进行预杂交(37 °C 4 h)、杂交(37 °C 过夜)、洗涤和封闭,再向芯片上滴加生物素化鼠抗地高辛、SABC 和生物素化过氧化物酶等进行 DAB 染色,最后清洗封片。同一 lncRNA 的 3 张检测用芯片的处理条件保持一致。

1.4 结果判断 应用 Leica 荧光倒置显微镜观察 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 在各组织中的表达分布,并将图像拍照存档为 Tiff 格式。采用半定量评分法^[9]评价染色情况:(1)使用 ImagePro Plus 软件分析组织的平均光密度或阳性染色强度(阴性为 0 分、弱阳性为 1 分、阳性为 2 分、强阳性为 3 分);(2)两名研究者分别对切片进行阳性染色细胞比率计分(0~5%为 0 分、6%~25%为 1 分、26%~50%为 2 分、51%~75%为 3 分、76%~100%为 4 分);(3)染色分数 = 染色强度 × 阳性染色细胞比率。

1.5 统计学分析 使用 SPSS 18.0 软件管理数据。采用多变量方差分析比较不同组织样本、术后不同预后间基因表达的差异,采用 SNK-q 检验进行两两比较。双侧 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

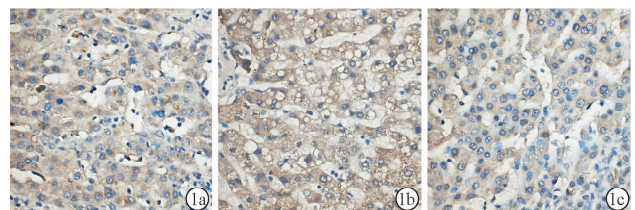
2.1 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 的表达定位

研究采用原位杂交法对 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 三个 lncRNA 的表达定位进行检测,结果显示 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 均主要定位于细胞质中,少量细胞的细胞核也有阳性表达(图 1)。

2.2 AFAP-AS1 在患者中的表达特征 采用半定量评分法对 AFAP-AS1 原位杂交染色结果进行评分,结果显示在所有 HCC 手术样本中,AFAP-AS1 在肿瘤组织中的表达下调,显著低于癌旁正常组织(P 均 < 0.01),而复发转移瘤样本的 AFAP-AS1 表达与原发肿瘤组织无统计学差异(P 均 > 0.05)。见表 2。

2.3 MVIH 在患者中的表达特征 采用半定量评分法对 MVIH 原位杂交染色结果进行评分,结果显示在所有 HCC 手术样本中,MVIH 在肿瘤组织中的表达上调,显著高于癌旁正常组织($P < 0.01, P < 0.05$);发生远处转移患者原发肿瘤组织中的 MVIH 表达显著高于无瘤生存患者的原发肿瘤组织($P < 0.05$),发生远处转移患者远处转移灶中 MVIH 表达显著高于其原发肿瘤组织($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 MALAT-1 在患者中的表达特征 同样采用半定量评分法对 MALAT-1 原位杂交染色结果进行评分,结果显示在所有 HCC 手术样本中,MALAT-1 在肿瘤组织中的表达上调,显著高于癌旁正常组织($P < 0.01, P < 0.05$);发生局部复发、远处转移及复发合并转移患者原发肿瘤组织中的 MALAT-1 表达均



注:1a:AFAP1-AS1;1b:MVIH;1c:MALAT-1。

图 1 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 的表达定位 (原位杂交染色, ×200)

表 2 AFAP1-AS1 在患者中的表达特征 (染色分数, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	手术样本		复发/转移 样本	P 值
		肿瘤	癌旁		
局部复发	32	1.46 ± 0.44	2.85 ± 1.25 ^①	1.76 ± 1.06	<0.01
远处转移	22	1.57 ± 0.67	2.59 ± 1.33 ^①	2.03 ± 0.94	<0.01
复发合并转移	17	1.49 ± 1.21	2.61 ± 1.08 ^①	1.67 ± 0.84	<0.01
无瘤生存	56	1.55 ± 1.18	2.62 ± 1.84 ^①	—	<0.01

注:与肿瘤手术样本比较,^① $P < 0.01$ 。

表 3 MVIH 在患者中的表达特征 (染色分数, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	手术样本		复发/转移 样本	P 值
		肿瘤	癌旁		
局部复发	32	3.07 ± 1.64	1.57 ± 0.73 ^{①②}	3.12 ± 1.55	<0.01
远处转移	22	3.14 ± 1.34 [△]	1.73 ± 0.66 ^{①②}	4.12 ± 1.30 [#]	<0.01
复发合并转移	17	3.10 ± 2.31	1.61 ± 0.73 ^①	3.54 ± 1.67	<0.05
无瘤生存	56	2.39 ± 1.49	1.59 ± 0.91 ^{①②}	—	<0.01

注:与手术样本肿瘤组织比较,^① $P < 0.05$,^② $P < 0.01$;与无瘤生存肿瘤手术样本比较,[△] $P < 0.05$;与本组肿瘤手术样本比较,[#] $P < 0.05$ 。

表 4 MALAT-1 在患者中的表达特征 (染色分数, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	手术样本		复发/转移 样本	P 值
		肿瘤	癌旁		
局部复发	32	3.85 ± 1.24 [△]	2.77 ± 1.38 ^{①②}	3.64 ± 0.57	<0.01
远处转移	22	3.70 ± 1.36 [△]	2.65 ± 1.15 ^{①②}	3.53 ± 1.64	<0.01
复发合并转移	17	3.92 ± 1.08 [△]	2.71 ± 1.18 ^{①②}	3.97 ± 1.47	<0.01
无瘤生存	56	3.06 ± 1.22	2.55 ± 1.43 ^①	—	<0.05

注:与肿瘤手术样本比较,^① $P < 0.05$,^② $P < 0.01$;与无瘤生存比较,[△] $P < 0.05$ 。

显著高于无瘤生存患者的原发肿瘤组织(P 均 < 0.05);而复发转移瘤样本的 MALAT-1 表达与原发肿瘤组织无明显差异($P > 0.05$)。见表 4。

3 讨论

大量基础研究表明, lncRNA 作为基因组中的“暗物质”,实际上参与蛋白修饰过程、翻译水平、转录和表观遗传水平等多层面的生物学过程,并与肝癌、肺癌、结直肠癌等多种肿瘤的发生发展密切相关^[10],然而这类分子是否可作为临床诊断和疾病预后预测的生物学标志物,一直以来都受到国内外学者的关注^[11]。本研究分析了 HCC 术后复发转移患者 lncRNA 的表达情况,重点关注了 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 三种 lncRNA,通过原位杂交技术分析,结果显示 AFAP1-AS1 在癌组织中表达下调,而 MVIH 和 MALAT-1 表达上调,并且在术后复发转移患者的原发肿瘤灶和转移灶中上调更为显著,不仅提示这三类 lncRNA 与 HCC 发生发展的关系密切,并且还可考虑将 MVIH 和 MALAT-1 的过度上调作为 HCC 术后复发转移的预测性生物标志物。

AFAP1-AS1 起源于 AFAP1 基因的反义链,而 AFAP1 基因本身被认为是病毒癌基因依赖的酪氨酸蛋白激酶的作用底物之一,有肌动蛋白衔接蛋白的功

能,对维持上皮细胞张力丝的完整性十分重要,并且与前列腺癌和乳腺癌等密切相关。赵艳华^[6]的研究认为 AFAP1-AS1 在 HCC 中的表达下调,并且可能通过 RNA-RNA 之间的相互作用影响 AFAP1 生物学功能的发挥,从而参与到 HCC 的发生发展中。本研究的原位杂交结果与其研究结果一致,认为 AFAP1-AS1 在 HCC 中的表达下调,但并未发现足够的证据支持 AFAP1-AS1 与 HCC 的复发转移存在一定关系。

MVIH 是一种与肿瘤微血管浸润相关的 lncRNA^[12],袁声贤^[7]的研究在 215 例肝癌患者中证实了 MVIH 过表达与频繁的微血管浸润及较高的肿瘤淋巴结转移阶段以及无复发生存率下降有关。本研究不仅认为 MVIH 在 HCC 中上调,并且术后远处转移患者的原发灶中 MVIH 较术后无瘤生存者更高,此外,在其远处转移灶中也发现高表达的 MVIH。推测 MVIH 作为一种与肝癌微血管浸润相关的 lncRNA,它的高表达可能使血管浸润更易发生,从而更易发生远处转移,而实际上大多数肿瘤的远处转移都是通过血液循环实现的^[13]。因此我们认为 HCC 原发灶高表达 MVIH 更具有术后早期转移的倾向。

MALAT-1 之前被认为是非小细胞肺癌预后的特异性标记物,然而近些年的研究发现它也可作为肝移植后肝癌患者有无复发的一个新的独立预测指标^[14]。Zhu 等^[15]的研究发现将肝细胞内 MALAT-1 基因沉默,肝移植后肿瘤复发率也随之降低,认为 MALAT-1 可作为阻止肝癌复发的潜在治疗靶点。赖明春^[8]的研究显示 MALAT-1 过表达广泛存在于 HCC 中,并参与它的增殖、凋亡、迁移、侵袭等生物学行为,是预测肝癌肝移植后肿瘤复发的独立危险因素。北京协和医院刘武韬^[16]的结果也与其一致。本研究通过原位杂交分析发现 MALAT-1 在 HCC 原发灶和转移灶中均表达较高,而已发生转移患者的原发灶中 MALAT-1 的表达显著高于同期无瘤生存患者原发灶中的表达量,这一结果与之前的研究结论吻合,并支持 MALAT-1 作为复发预测的生物标志物,但我们的研究对象是 HCC 肿瘤切除术患者,并非肝移植术。

综上所述,本研究结果显示 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 三种 lncRNA 与 HCC 的发生发展密切相关, MVIH 和 MALAT-1 的过度上调与 HCC 的复发转移有关,考虑其可作为潜在预测复发转移的生物学指标。但研究仍存在一些不足:一方面,本研究采用的是原位杂交方法,这种方法的稳定性不如实时荧光定量 PCR,对条件的摸索和控制较为困难,因此外界因素可能对结果产生一定干扰;另一方面,本研究样本

量稍显不足,因此无法进一步分析 AFAP1-AS1、MVIH 和 MALAT-1 三种 lncRNA 的表达与 HCC 临床特征之间的关系,只能“定性”地认为它们与 HCC 发生发展有潜在联系,并不能明确具体时间段所参与的生物学过程;再者,统计学方法的设计也有欠缺,未能反映各因素各水平的交互作用。因此今后的研究还应纳入更多样本,采用实时荧光定量 PCR 方法对 lncRNAs 的表达情况进行分析,以为临床工作提供更有价值的参考。

参考文献

- [1] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*,2012,142(6):1264-1273.
 - [2] Qi P, Cheng SQ, Wang H, et al. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *PLoS One*,2011,6(12):e28486.
 - [3] Tanaka M, Katayama F, Kato H, et al. Hepatitis B and C virus infection and hepatocellular carcinoma in China: a review of epidemiology and control measures[J]. *J Epidemiol*,2011,21(6):401-416.
 - [4] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. *Nat Rev Genet*,2009,10(3):155-159.
 - [5] Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, et al. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer[J]. *Br J Cancer*,2013,108(12):2419-2425.
 - [6] 赵艳华. 肝癌长链非编码 RNA 差异表达谱构建及 AFAP1-AS1 功能初步验证[D]. 长沙:中南大学,2014.
 - [7] 袁声贤. 长链非编码 RNA 在肝癌发生、发展过程中的作用及临床意义[D]. 上海:第二军医大学,2014.
 - [8] 赖明春. 长链非编码 RNA MALAT-1 在肝癌肝移植术后肿瘤复发预测中的价值研究[D]. 杭州:浙江大学,2012.
 - [9] Li Z, Zhao X, Bai S, et al. Proteomics identification of cyclophilin a as a potential prognostic factor and therapeutic target in endometrial carcinoma[J]. *Mol Cell Proteomics*,2008,7(10):1810-1823.
 - [10] Prensner JR, Chinnaiyan AM. The emergence of lncRNAs in cancer biology[J]. *Cancer Discov*,2011,1(5):391-407.
 - [11] Zhang H, Chen Z, Wang X, et al. Long non-coding RNA: a new player in cancer[J]. *J Hematol Oncol*,2013,6(1):1-7.
 - [12] Yuan SX, Yang F, Yang Y, et al. Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy[J]. *Hepatology*,2012,56(6):2231-2241.
 - [13] Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. *Nat Rev Cancer*,2003,3(6):453-458.
 - [14] Ji P, Diederichs S, Wang W, et al. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*,2003,22(39):8031-8041.
 - [15] Zhu Q, Zhou L, Yang Z, et al. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation[J]. *Med Oncol*,2012,29(2):985-993.
 - [16] 刘武韬. 肝细胞癌 lncRNA 表达谱研究[D]. 北京:北京协和医学院,2014.
- 收稿日期:2016-02-06 修回日期:2016-03-08 编辑:王国品

(上接第 1016 页)

- [2] Wang J, Dong L, Xu L, et al. B cell CLL/lymphoma 6 member B inhibits hepatocellular carcinoma metastases in vitro and in mice[J]. *Cancer Lett*,2014,355(2):192-200.
 - [3] Zhang X, Shi K, Li Y, et al. Lipopolysaccharide inhibits the self-renewal of spermatogonial stem cells in vitro via downregulation of GDNF expression in Sertoli cells[J]. *Reprod Toxicol*,2014,45(6):87-93.
 - [4] 董腾慧. BCL6B 基因启动子区异常高甲基化与食管癌的关系研究[D]. 郑州:郑州大学,2012.
 - [5] Wang W, Huang P, Wu P, et al. BCL6B expression in hepatocellular carcinoma and its efficacy in the inhibition of liver damage and fibrogenesis[J]. *Oncotarget*,2015,6(24):20252-20265.
 - [6] 余宗涛,张吉才,高琼,等. 5-氮-2'-脱氧胞苷对肺癌 A549/DDP 细胞凋亡及 hMLH1 表达的影响[J]. *肿瘤研究与临床*,2015,27(3):149-152.
 - [7] Li X, Yu J, Brock MV, et al. Epigenetic silencing of BCL6B inactivates p53 signaling and causes human hepatocellular carcinoma cell resist to 5-FU[J]. *Oncotarget*,2015,6(13):11547-11560.
 - [8] 余昆,李云峰,杨之斌,等. GATA4 基因甲基化在早期结直肠癌诊断中的作用[J]. *肿瘤学杂志*,2015,21(1):30-33.
 - [9] 任卉. Survivin 基因沉默对 HeLa 细胞凋亡、细胞周期和启动子甲基化的影响[D]. 广州:广东医学院,2015.
 - [10] 何琼,王冕,周建文,等. 多重 MethyLight 在结直肠癌相关基因 ALX4 和 SEPT9 甲基化检测中的应用[J]. *中山大学学报(医学科学版)*,2015,36(5):657-662.
 - [11] Yang Q, Gao J, Xu L, et al. Promoter hypermethylation of BCL6B gene is a potential plasma DNA biomarker for gastric cancer[J]. *Biomarkers*,2013,18(8):721-725.
 - [12] 张炯,张鑫,武玉. 子宫颈癌组织中 RASSF2A 基因启动子甲基化状态的研究[J]. *肿瘤研究与临床*,2015,27(2):117-119.
 - [13] Sisakhtnezhad S, Bahrami AR, Matin MM, et al. The molecular signature and spermatogenesis potential of newborn chicken spermatogonial stem cells in vitro[J]. *In Vitro Cell Dev Anim*,2015,51(4):415-425.
- 收稿日期:2016-02-21 修回日期:2016-03-20 编辑:王国品