

# 盐霉素对肝癌HepG2细胞体外增殖和侵袭转移能力的影响

王晶宇<sup>1,3</sup> 王一辰<sup>2</sup> 王 丽<sup>3</sup> 王志平<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>兰州大学生命科学学院, 兰州 730000; <sup>2</sup>兰州大学第二医院泌尿外科研究所, 兰州 730030;

<sup>3</sup>兰州大学基础医学院病理生理学研究所, 兰州 730000)

**摘要** 探讨盐霉素对人肝癌细胞HepG2增殖、侵袭转移能力影响的作用机制。MTT法检测盐霉素对肝癌HepG2细胞和正常肝细胞L02增殖的影响; 利用FITC标记的鬼笔环肽进行微丝免疫荧光染色, 激光共聚焦技术获得盐霉素作用下F-actin细胞骨架的形态变化; Transwell小室法测定盐霉素对HepG2细胞体外迁移侵袭能力的变化。Western blot法检测盐霉素对HepG2细胞中 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达的影响。结果显示, 盐霉素抑制HepG2细胞的增殖, 并呈现出时间、剂量依赖效应; 而盐霉素对正常肝细胞L02的增殖抑制作用不明显。经过盐霉素(1  $\mu$ mol/L和4  $\mu$ mol/L)处理的HepG2细胞, 迁移和侵袭实验中穿膜细胞数均明显低于对照组( $P < 0.05$ ), 且以F-actin为基础的微丝骨架结构发生紊乱。盐霉素(4  $\mu$ mol/L和8  $\mu$ mol/L)还可明显下调MMP-2、MMP-9及 $\beta$ -catenin蛋白的表达水平( $P < 0.05$ )。这些结果提示, 盐霉素能有效抑制人肝癌细胞HepG2的增殖、迁移和侵袭, 其作用机制可能与降低MMP-2、MMP-9及 $\beta$ -catenin蛋白的表达有关。

**关键词** 盐霉素; 肝癌细胞; 增殖; 侵袭转移; 体外实验

## Effects of Salinomycin on Proliferative, Invasive and Metastatic Abilities of Hepatoma Cell Line HepG2 *in vitro*

Wang Jingyu<sup>1,3</sup>, Wang Yichen<sup>2</sup>, Wang Li<sup>3</sup>, Wang Zhiping<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

<sup>2</sup>Institute of Urology, Second Hospital, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China;

<sup>3</sup>Institute of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract** To investigate effects of salinomycin on the proliferative, invasive and metastatic abilities of hepatoma cell line HepG2 *in vitro* and analyze the possible mechanisms, MTT was used for determining the proliferative abilities of HepG2 and human normal liver L02 cells. The cytoskeleton was observed using confocal laser scanning microscopy after F-actin staining by FITC-labeled phalloidin. The invasive and migratory abilities were detected by Transwell assay. The protein expressions of  $\beta$ -catenin, MMP-2 and MMP-9 at protein levels were evaluated by Western blot. The results showed that the treatment of L02 cells with salinomycin (0~8  $\mu$ mol/L) for 24 h and 48 h had no significant effects on cell viability. However, treatment of similar doses of salinomycin suppressed

收稿日期: 2012-12-31 接受日期: 2013-03-25

兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: lzujbky-2010-127)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0931-8942821, E-mail: erywangzhiping@126.com

Received: December 31, 2012 Accepted: March 25, 2013

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No. lzujbky-2010-127)

\*Corresponding author. Tel: +86-931-8942821, E-mail: erywangzhiping@126.com

网络出版时间: 2013-04-22 15:23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130422.1523.008.html>

the growth of HepG2 cells in a time and concentration dependent manner. HepG2 was treated by salinomycin (1, 4  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h before invasive and migratory abilities were examined. Compared with that in the control group, the number of invasive and migratory cells was remarkably decreased ( $P<0.05$ ), the structure of F-actin microfilament cytoskeleton was significantly changed. In addition, immuno-blot showed that the expressions of  $\beta$ -catenin, MMP-2 and MMP-9 at protein levels were significantly down-regulated ( $P<0.05$ ). The results suggested that the proliferative, invasive and migratory abilities of hepatoma cells could be inhibited by salinomycin, which may be related to down-regulating the protein expressions of  $\beta$ -catenin, MMP-2 and MMP-9.

**Key words** salinomycin; hepatoma cell; proliferation; invasion and metastasis; *in vitro* experiment

素有“癌王”之称的肝癌是排名世界第四的常见恶性肿瘤,在癌症的死因中占第三位,其发生转移和侵袭是术后复发和导致患者死亡的主要原因。近年来对肝癌的临床治疗虽有较大进展,疗效也明显提高,但是肝癌患者的长期生存仍不尽如人意。因此,临床上迫切需要探索肝癌侵袭转移的机制、寻找新的药物和治疗靶点是提高治疗效果的关键。

盐霉素(由白色链霉菌发酵产生的聚醚类一元羧酸)是典型的离子载体抗生素。2009年, Gupta等<sup>[1]</sup>从16 000种化合物中首次筛选出盐霉素,它可以直接杀死肿瘤干细胞,其杀死小鼠乳腺癌干细胞的效力比普通抗癌药物紫杉醇(Taxol)高100倍。之前的研究多集中在盐霉素诱导肿瘤细胞凋亡、克服耐药、增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[2-4]</sup>等机制上,而对于盐霉素防治肝癌细胞侵袭和转移的机制,目前未见相关研究报道。本实验旨在研究盐霉素对人肝癌细胞HepG2增殖、侵袭转移能力的影响,为肝癌的发病机制及治疗提供一种新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

人肝癌细胞系HepG2和小鼠成纤维细胞株NIH3T3购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,正常肝细胞L02购自无锡博慧斯生物医药科技有限公司。盐霉素(S4526)、Triton X-100、BSA、DMSO、Hoechst33258和FITC-鬼笔环肽(phalloidin)染料购自美国Sigma公司;DMEM培养液和胎牛血清购自美国Hyclone公司;Matrigel人工重构基底膜材料购自美国BD公司;抗MMP-2、MMP-9抗体购自Abcam公司;抗 $\beta$ -catenin、GAPDH抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自美国Cell Signaling Technology公司;蛋白裂解

液购自南京碧云天生物科技有限公司;Transwell小室及PVDF膜购自Millipore公司。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞增殖活性检测 取肝癌HepG2细胞及正常肝细胞L02以 $6\times 10^4/\text{mL}$ 的细胞密度接种于96孔培养板中,每孔100  $\mu\text{L}$ ,置37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度的条件下培养过夜。待其贴壁后,分别加入盐霉素终浓度达到0.5, 1, 2, 4, 8  $\mu\text{mol/L}$ ,每组设5个复孔,每孔终体积为200  $\mu\text{L}$ 。对照组加入等量的DMEM培养液。培养24 h和48 h后,每孔加入MTT(5 mg/mL) 20 $\mu\text{L}$ ,继续培养4 h,离心去上清,每孔加入DMSO 150  $\mu\text{L}$ 溶解结晶颗粒。酶标仪于570 nm波长测定吸光度( $D$ ),计算不同时间、不同浓度的盐霉素对HepG2细胞的增殖抑制率,实验重复3次。计算增殖抑制率= $[(\text{对照组}D_{570}-\text{实验组}D_{570})/\text{对照组}D_{570}]\times 100\%$ 。

1.2.2 观察HepG2细胞微丝骨架结构 将HepG2细胞按每孔 $3\times 10^3$ 的密度接种于24孔板里的盖玻片上,在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 饱和湿度条件下培养过夜,实验组加入盐霉素,终浓度为1  $\mu\text{mol/L}$ 和4  $\mu\text{mol/L}$ ,对照组加入等体积培养液。继续培养24 h后,吸去培养液,PBS洗3次;4%多聚甲醛室温固定30 min,PBS洗3次;用含0.1% Triton X-100室温处理细胞15 min,PBS洗3次;加1% BSA室温封闭30 min,PBS洗3次;滴加FITC标记的鬼笔环肽(50  $\mu\text{g/mL}$ ) 200  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后PBS洗4次;滴加Hoechst33258染料200  $\mu\text{L}$ 室温避光染核15 min,PBS洗5次,用防淬灭剂封片,激光共聚焦扫描显微镜下观察,照相。FITC标记的F-actin显现绿色荧光。

1.2.3 体外侵袭实验 首先用NIH3T3细胞制备条件培养液,过滤除菌后-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存。将Transwell小室放入24孔板中,在置有聚碳酸酯膜(8  $\mu\text{m}$ 孔径)的Transwell小室的内表面均匀铺100  $\mu\text{L}$  Matrigel以制

作人工基底膜,并置于超净台内过夜。实验前30 min重新成胶,对照组细胞不加任何干预因素,实验组细胞加入Transwell小室前用终浓度分别为1  $\mu\text{mol/L}$ 和4  $\mu\text{mol/L}$ 的盐霉素预处理24 h。将两组细胞悬液各100  $\mu\text{L}$ (细胞数 $2\times 10^5/\text{mL}$ )接种到成胶Transwell小室内,在Transwell外室加600  $\mu\text{L}$ 含趋化因子的条件培养液,常规培养,每组作3个平行孔。培养16 h,然后将小室内培养液吸出,用棉签将膜上层细胞完全擦掉,膜下层细胞以4%多聚甲醛固定后行0.1%结晶紫染色约10 min。倒置显微镜下计数膜下层的肿瘤细胞数,随机选取5个视野计数细胞数,取其平均值,实验重复3次。

**1.2.4 体外迁移实验** 采用Transwell小室法,除不包被Matrigel人工重构基底膜外,其余方法与体外侵袭实验相同。实验重复3次。

**1.2.5 Western blot检测** 将HepG2细胞按 $2\times 10^6/\text{瓶}$ 接种于培养瓶中,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下培养过夜,实验组加入盐霉素,终浓度为4  $\mu\text{mol/L}$ 和8  $\mu\text{mol/L}$ ,对照组加入等体积培养液。继续培养48 h后,提取肝癌HepG2细胞总蛋白,并用BCA法测定蛋白浓度,加热变性后 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。取50  $\mu\text{g}$ 蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,将分离后的蛋白质电转移到PVDF膜上,封闭液封闭滤膜4 h,依次结合相应浓度的一抗(1:1 000), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:2 000)孵育4 h,采用化学发光法(ECL)曝光胶片,冲洗显色检测相应蛋白条带。

### 1.3 统计学分析

用SPSS 15.0软件进行分析,计量资料以均值 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 盐霉素对HepG2细胞增殖的抑制作用

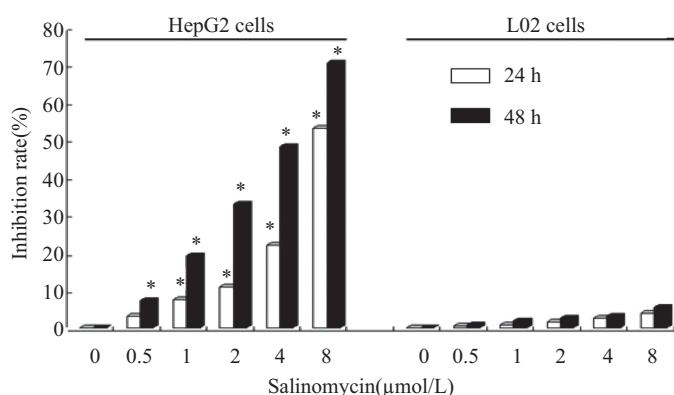
未经盐霉素处理的对照组HepG2细胞体外生长活跃,经0.5~8  $\mu\text{mol/L}$ 的盐霉素作用24 h和48 h后,细胞的生长出现不同程度的抑制,并且呈现出与时间和浓度成正相关的特点,与对照组相比具有统计学意义( $P<0.05$ )。用盐霉素(0.5~8  $\mu\text{mol/L}$ )处理正常肝细胞L02 24 h和48 h后,随着盐霉素浓度的增加其增殖活性未见明显变化,组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ,图1)。

### 2.2 盐霉素对HepG2细胞骨架结构的影响

如图2所示:对照组HepG2细胞质中微丝骨架F-actin呈丝状、细长,分布较为密集、清晰、规则,并与细胞长轴平行。随着盐霉素处理浓度的增加,细胞收缩变小,形态转变为椭圆形、圆形或不规则形。细胞内F-actin分布失去规律,排列不规则,可见大量颗粒状荧光,聚集成团。特别是在4  $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞数量明显减少,有的细胞内微丝骨架F-actin甚至消失。说明盐霉素作用后,以F-actin为基础的微丝骨架结构发生明显变化。

### 2.3 盐霉素对HepG2细胞迁移能力的影响

实验组的HepG2细胞在盐霉素(1  $\mu\text{mol/L}$ 和



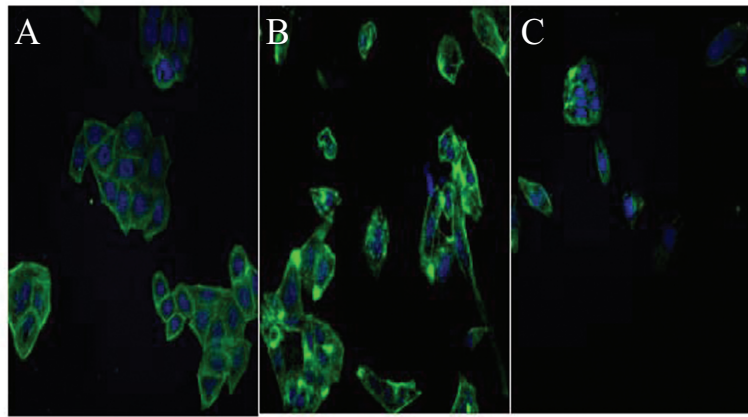
\* $P<0.05$ ,与未处理组HepG2细胞比较。

\* $P<0.05$  compared with untreated HepG2 cells.

图1 盐霉素对HepG2细胞增殖的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

Fig.1 The effect of salinomycin treatment on proliferation of HepG2 cells( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )





A: 对照组; B: 1  $\mu\text{mol/L}$  盐霉素处理组; C: 4  $\mu\text{mol/L}$  盐霉素处理组。

A: control group; B: 1  $\mu\text{mol/L}$  salinomycin treated group; C: 4  $\mu\text{mol/L}$  salinomycin treated group.

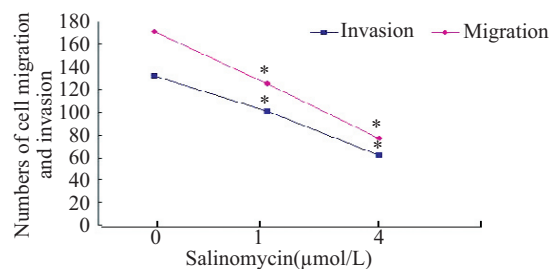
图2 盐霉素对HepG2细胞内F-actin的影响(FITC-phalloidin染色, 400 $\times$ )

Fig.2 Effect of salinomycin on F-actin of HepG2 cells(FITC-phalloidin staining, 400 $\times$ )

4  $\mu\text{mol/L}$ 作用下穿透聚碳酸酯膜的细胞数( $136.25 \pm 7.87$ 和 $84.75 \pm 6.34$ )明显低于对照组( $183.5 \pm 8.96$ ,  $P < 0.05$ ), 说明盐霉素对肝癌细胞自身的迁移能力有抑制作用(图3和图4)。

#### 2.4 盐霉素对HepG2细胞侵袭能力的影响

显微镜下计数Transwell小室滤膜下的细胞数, 结果如图3和图4所示。侵袭16 h后, 结晶紫染色发现, 对照组( $140.75 \pm 8.22$ )与实验组(1  $\mu\text{mol/L}$  盐霉素处理组为 $107.25 \pm 11.02$ , 4  $\mu\text{mol/L}$  盐霉素处理组为 $65.05 \pm 6.83$ )的穿膜细胞数量相比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 提示盐霉素可以抑制人肝癌细胞的体外

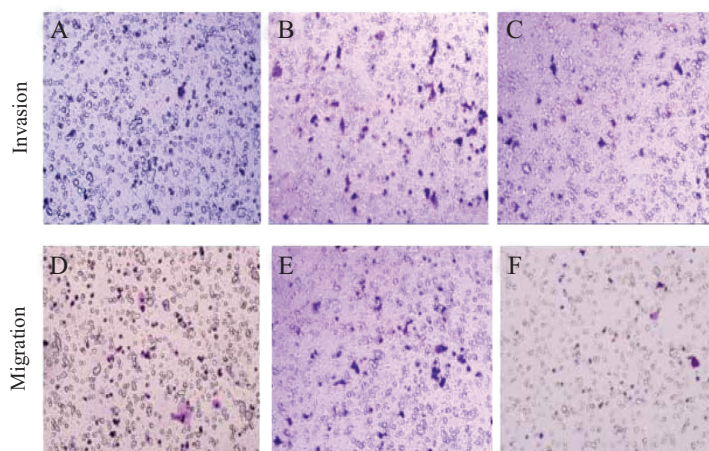


\* $P < 0.05$ , 与未处理组HepG2细胞比较。

\* $P < 0.05$  compared with untreated HepG2 cells.

图3 盐霉素对HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig.3 Effect of salinomycin on the migratory and invasive capability of HepG2( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



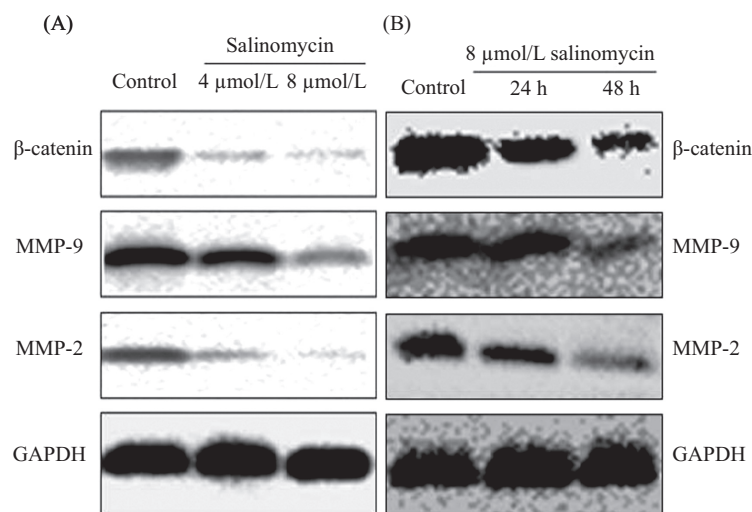
A,D: 对照组; B,E: 1  $\mu\text{mol/L}$  盐霉素处理组; C,F: 4  $\mu\text{mol/L}$  盐霉素处理组。

A,D: control group; B,E: 1  $\mu\text{mol/L}$  salinomycin treated group; C,F: 4  $\mu\text{mol/L}$  salinomycin treated group.

图4 盐霉素对HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响(结晶紫染色, 200 $\times$ )

Fig.4 Effect of salinomycin on the migratory and invasive capability of HepG2 cells(crystal violet staining, 200 $\times$ )





A: 盐霉素处理48 h对HepG2细胞中各种蛋白表达的影响; B: 盐霉素处理不同时间对HepG2细胞中各种蛋白表达的影响。

A: effect of salinomycin treated for 48 h on the expression of related proteins in HepG2 cells; B: effect of salinomycin on the expression of related proteins at different time in HepG2 cells.

图5 Western blot检测相关蛋白的表达

Fig.5 Related protein expressions detected by Western blot

侵袭能力。

## 2.5 Western blot法检测细胞侵袭和转移相关蛋白的表达水平

Western blot分析表明, HepG2细胞经不同浓度的盐霉素(0, 4, 8  $\mu\text{mol/L}$ )作用48 h后, HepG2细胞中的MMP-2、MMP-9及 $\beta$ -catenin蛋白表达水平与对照组相比明显降低( $P < 0.05$ , 图5A)。图5B显示, HepG2细胞经8  $\mu\text{mol/L}$ 盐霉素作用24 h和48 h后, HepG2细胞中的MMP-2、MMP-9及 $\beta$ -catenin蛋白表达水平与对照组相比降低, 以48 h变化最为显著( $P < 0.05$ ), 提示盐霉素以浓度和时间依赖的作用方式降低MMP-2、MMP-9及 $\beta$ -catenin蛋白的表达水平。

## 3 讨论

肝癌发生侵袭转移是一个复杂的多基因调控和多步骤发生过程, 涉及肿瘤细胞增殖、黏附、基质降解、细胞迁移等许多环节<sup>[5-6]</sup>。因此, 阻断肿瘤细胞增殖和侵袭过程的各环节均有可能抑制肿瘤的转移。本研究选用细胞为目前广泛用于肝癌研究的模式细胞HepG2, 其来源于一个15岁美国白人的肝癌组织, 细胞形态为上皮样, 贴壁生长<sup>[7]</sup>。通过盐霉素干预HepG2后检测其对HepG2细胞增殖及侵袭转移能力的影响, 结果表明盐霉素能够显著抑制HepG2的增殖能力(图1)。本实验的研究还表明, 盐

霉素对正常肝细胞L02的生长未见明显的抑制作用。通过Transwell系统, 我们在体外部分模拟了肿瘤微环境, 图3和图4显示, 干预后的肝癌细胞侵袭和迁移能力与对照组相比均明显下降( $P < 0.05$ ), 呈现剂量依赖性。说明盐霉素能够抑制或减弱HepG2和PLC/PRF/5细胞的侵袭、迁移、转移的能力。

肿瘤细胞的侵袭转移能力依赖于自身细胞骨架系统改变, 即肌动蛋白不断反复解聚/聚合<sup>[8]</sup>。FITC标记的鬼笔环肽能与细胞内F-肌动蛋白发生特异性结合, 通过这种染色可以观察和分析细胞内F-肌动蛋白的形态和分布含量的改变。我们用不同浓度的盐霉素作用于人肝癌HepG2细胞后, 其细胞内骨架蛋白F-actin的结构和分布发生重构, 微丝结构发生紊乱, 特别是在4  $\mu\text{mol/L}$ 水平上, 细胞数量明显减少, 有的细胞内微丝骨架F-actin甚至消失。图2提示, 盐霉素可诱导微丝骨架结构蛋白F-actin发生形态改变和重构, 有效地破坏肿瘤细胞运动侵袭的动力系统, 抑制肿瘤细胞向外运动和侵袭。

$\beta$ -catenin是Wnt信号通路的一个关键分子, 其核内高表达可促进细胞增殖, 导致肿瘤的发生。 $\beta$ -catenin与E-cadherin组成复合体, 参与组成细胞黏附/肌动蛋白细胞骨架网络, 在肿瘤浸润转移过程中发挥重要作用。有研究证实, 肝癌标本中 $\beta$ -catenin表达程度与患者淋巴结转移及肝内转移呈正相关<sup>[9-11]</sup>。

MMPs作为肿瘤侵袭转移的促进因子, 是 $\beta$ -catenin的下游基因<sup>[12]</sup>, 是一组锌离子依赖型内肽酶, 其中MMP-2、MMP-9是降解IV型胶原最主要的酶, 在肝癌组织中呈现高表达, 并与肝癌的浸润转移及预后密切相关<sup>[13-15]</sup>。Western blot实验显示, 盐霉素以浓度和时间依赖的作用方式降低MMP-2、MMP-9及 $\beta$ -catenin蛋白的表达水平( $P < 0.05$ , 图5)。提示盐霉素可通过靶向抑制 $\beta$ -catenin的信号转导, 继而导致MMPs下调, 从而有效地阻抑肿瘤细胞运动侵袭。本研究证实盐霉素可明显抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和转移, 下调MMP-2、MMP-9和 $\beta$ -catenin蛋白表达可能是其发挥作用的主要机制之一。

### 参考文献 (References)

- Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, *et al.* Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009; 138(4): 645-59.
- Kim KY, Yu SN, Lee SY, Chun SS, Choi YL, Park YM, *et al.* Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 413(1): 80-6.
- Zhang GN, Liang Y, Zhou LJ, Chen SP, Chen G, Zhang TP, *et al.* Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2011; 313(2): 137-44.
- Kim JH, Chae M, Kim WK, Kim YJ, Kang HS, Kim HS, *et al.* Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein. *Br J Pharmacol* 2011; 162(3): 773-84.
- Fuchs D, Daniel V, Sadeghi M, Opelz G, Naujokat C. Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(4): 1098-104.
- Yilmaz M, Christofori G, Lehembre F. Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis. *Trends Mol Med* 2007; 13(12): 535-41.
- Costantini S, Di Bernardo G, Cammarota M, Castello G, Colonna G. Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene* 2013; 15(2): 335-45.
- Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res* 2010; 8(5): 629-42.
- Suzuki T, Yano H, Nakashima Y. Beta-catenin expression in hepatocellular carcinoma: A possible participation of beta-catenin in the dedifferentiation process. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17(9): 994-1000.
- Tien LT, Ito M, Nakao M, Niino D, Serik M, Nakashima M, *et al.* Expression of betacatenin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11(16): 2398-401.
- Asayama Y, Taguchi Ki K, Aishima Si S, Nishi H, Masuda K, Tsuneyoshi M. The mode of tumour progression in combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: An immunohistochemical analysis of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin. *Liver* 2002; 22(1): 43-50.
- Mei JM, Borchert GL, Donald SP. Matrix metalloproteinase(s) mediate(s) NO-induced dissociation of beta-catenin from membrane bound Ecadherin and formation of nuclear beta-catenin/LEF-1 complex. *Carcinogenesis* 2002; 23(12): 2119-22.
- Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG. Matrix metallo-proteinases: Changing roles in tumor progression and metastasis. *Am J Pathol* 2012; 181(6): 1895-9.
- Nart D, Yaman B, Yilmaz F, Zeytinlu M, Karasu Z, Kiliç M. Expression of matrix metalloproteinase predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Liver Transpl* 2010; 16(5): 621-30.
- Sze KM, Wong KL, Chu GK, Lee JM, Yau TO, Ng IO. Loss of phosphatase and tensin homolog enhances cell invasion and migration through AKT/Sp-1 transcription factor/matrix metalloproteinase 2 activation in hepatocellular carcinoma and has clinicopathologic significance. *Hepatology* 2011; 53(5): 1558-69.