

研究论文

肝癌细胞中骨桥蛋白基因表达调控的分子机制研究

赵慎安 梅馨予 乔晓京 刘雪妮 乔守怡* 吴燕华*

(复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘要 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是人体内一种重要的分泌蛋白, 在细胞黏附、迁移、机体免疫等作用中发挥重要的生理功能。近年来的研究发现, OPN在恶性肿瘤组织中参与诱导细胞外基质的降解及重构, 对肿瘤细胞的侵袭能力有重要调控作用。此外, OPN在肝癌及其他多种肿瘤类型中表达均显著上调, 但调控机制尚未完全阐明。该研究从肝癌细胞株中克隆了OPN基因*SPPI*的启动子序列*pSPPI*, 尝试鉴定肝癌中*SPPI*的主要调控机制。截断突变体及点突变体分析发现, 完整的区域(-24~17)是*pSPPI*转录活性所必需的, 外源表达AP-1转录因子的c-jun亚基, 能够显著提高这一区域的转录活性, 然而, c-fos没有这种作用效果。凝胶迁移实验进一步证明AP-1转录因子与*pSPPI*的直接相互作用。利用实时定量PCR和Western blot还发现, 外源表达c-jun能够显著提高内源性OPN的表达水平。以上实验结果揭示, AP-1转录因子介导的转录调控很可能是肝癌细胞OPN表达调控的关键机制, 这一研究有望为肝癌诊断及治疗提供新的思路。

关键词 肝癌; 骨桥蛋白; 转录调控; AP-1

Transcriptional Regulation of Human Osteopontin in Hepatocellular Carcinoma Cells

Zhao Shen'an, Mei Xinyu, Qiao Xiaojing, Liu Xueni, Qiao Shouyi*, Wu Yanhua*

(School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract Osteopontin (OPN) is a secreted glycoposphoprotein which is important in cell adhesion, migration, body immune, etc. Recent studies recognized the essential role of OPN in carcinogenesis and tumor metastasis through regulating extracellular cell matrix (ECM) degradation and remodeling. OPN is significantly up-regulated in multiple cancers including hepatocellular carcinoma (HCC), and is relevant with the malignancy. However, the molecular mechanism of OPN regulation remains largely illusive. In our study, in order to investigate the regulation mechanism of OPN gene *SPPI* in hepatocellular carcinoma, the full-length promoter (*pSPPI*) was cloned. Deletion and point mutation analysis demonstrated that -24~17 region is essential for the transcriptional activity of *pSPPI*. Overexpression of AP-1 factor subunit c-jun, but not c-fos, can significantly enhance the transcriptional activity, and EMSA assay proved the direct binding of c-jun to *pSPPI*. Moreover, overexpression of c-jun can effectively induce endogenous OPN expression, which is demonstrated by both Western blot and qRT-PCR assay.

收稿日期: 2015-05-14 接受日期: 2015-07-06

国家自然科学基金委青年科学基金项目(批准号: 31000558)和上海市教委“晨光”计划(2012年)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65643716, E-mail: syqiao@fudan.edu.cn; Tel: 021-65643298, E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

Received: May 14, 2015 Accepted: July 6, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (Grant No.31000558) and “Cheng Guang” Project (2012) Supported by Shanghai Municipal Education Commission and Shanghai Education Development Foundation

*Corresponding authors. Tel: +86-21-65643716, E-mail: syqiao@fudan.edu.cn; Tel: +86-21-65643298, E-mail: yanhuawu@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2015-08-21 15:53:48 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20150821.1553.003.html>

Taken together, our findings recognize AP-1 factor as a key mechanism of OPN regulation in HCC cell, which brings new insights into HCC diagnosis and gene therapy.

Keywords hepatocellular carcinoma (HCC); osteopontin (OPN); gene transcription; AP-1

在恶性肿瘤转移的早期阶段,肿瘤细胞与其他细胞的黏附能力及与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)黏附能力的变化,对细胞侵袭能力有重要影响。在这一过程中,以整合素(integrin)、CD44等为主的一些细胞表面受体分子发挥着关键的调控作用。例如,经配体活化的整合素可以通过磷酸化激活金属蛋白酶以降解ECM,从而促进肿瘤细胞的侵袭^[1]。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种分泌性钙结合磷酸化蛋白,属于小整合素配体家族成员^[2]。OPN在人体中表达广泛,参与多种重要的生理、病理过程^[3-4]。近年来,越来越多的研究表明,OPN与恶性肿瘤的迁徙转移有密切的关系^[5]。在多种器官类型的恶性肿瘤中,相对于正常癌旁组织,肿瘤组织中的OPN呈现显著高表达,并且恶性程度较高的肿瘤中OPN表达水平相对恶性程度较低的肿瘤也有显著升高^[6-7]。对于OPN功能与机制的研究主要围绕着其与integrin $\alpha_3\beta_3$ 、CD44等细胞受体的相互作用以及细胞内信号转导途径进行展开,已知包括促进细胞外基质降解、介导细胞-细胞和细胞-ECM黏附、抑制细胞凋亡等,强烈提示了OPN与肿瘤转移的功能联系^[8]。

在具有高转移率的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中,癌组织中OPN的表达水平也显著高于正常组织^[9],并且与肿瘤恶性程度呈现正相关性^[10]。2003年,Ye等^[11]的研究发现,OPN是转移性肝癌组织与非转移性肝癌组织的主要差异蛋白,靶向OPN的封阻性抗体可以有效抑制肝癌细胞的转

移。但是,OPN基因*SPPI*在肝癌发生发展过程中的表达调控机制仍未明确阐明。OPN在不同生理病理组织中的表达受到多样化的信号通路调控,先后鉴定出多种通路转录因子均与OPN的表达水平密切相关^[12-15],不同肿瘤细胞中OPN的表达调控机制存在显著差异^[15],而其在肝癌中详细的调控机制尚不明确。为此,本研究着重于探究在肝癌细胞中的OPN基因*SPPI*的转录调控机制。

1 材料与方法

1.1 分子克隆和载体构建

利用基因组DNA抽提试剂盒(Axygen公司)提取肝癌细胞Hep-3B的基因组DNA(gDNA)。以该gDNA为模板,扩增*SPPI*的启动子序列*pSPPI*,构建到pGL3质粒载体(Promega公司)中。PCR扩增的相关引物序列以及对应的片段位置如表1所示。

*SPPI*的D2启动子片段点突变构建利用QuickChange点突变试剂盒(Stratagene公司, USA),根据提供的说明书进行。pCMV-myc-cjun和pCMV-myc-cfos质粒受赠于韩丁丁博士(中国科学院上海生命科学研究院计算生物学研究所)。

1.2 细胞培养及瞬时转染

Hep-3B、SK-HEP-1及SMMC-7721细胞培养于DMEM完全培养基中,内含10%胎牛血清(Gibco公司),置于37℃、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中。细胞传代后18~24 h,待细胞汇合度为80%时,以Lipofectin 2000(Invitrogen公司)脂质体转染试剂进行质粒转染。

表1 PCR引物序列

Table 1 The primer sequence of PCR

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence
<i>SPPI</i> -P (-2 178~+402 nt)	F: 5'-CGG TAC CTG AGA GAG GCC TTG GGA CTA GGA-3' R: 5'-CCT CGA GAT CGG TGG TTT CCG TTC TTT TGA-3'
<i>SPPI</i> -P1 (-2 178~+687 nt)	F: 5'-CGG TAC CTG AGA GAG GCC TTG GGA CTAG GA-3' R: 5'-CCT CGA GAA TAC TAT TAC CTA GGT CAT GGG-3'
<i>SPPI</i> -P2 (-998~+402 nt)	F: 5'-CGG TAC CTT GGG AGA AAA ACTA GAA AAA AAA-3' R: 5'-CCT CGA GAT CGG TGG TTT CCG TTC TTT TGA-3'
<i>SPPI</i> -D1 (-473~+59 nt)	F: 5'-CAC GGT ACC TAG TGC CAT TTG TCT AAG-3' R: 5'-CGC TAG CCC TGC TCC CAC ACT T-3'
<i>SPPI</i> -D2 (-57~+180 nt)	F: 5'-ACG GTA CCA AGT GTG GGA GCA GG-3' R: 5'-CGC TAG CCA CAA CCC AGT AGC AA-3'

1.3 双荧光素酶报告基因活性检测

以 1×10^5 /孔的密度将对数生长期的细胞接种于24孔培养板, 实验组转染构建有OPN启动子的pGL3报告基因质粒以及pRL-TK质粒, 以空pGL质粒为对照。转染后24 h收集细胞, 检测双荧光素酶报告基因的信号强度。根据Promega公司提供的说明书进行。

1.4 实时定量PCR检测mRNA转录

细胞转染后24~36 h, 以Trizol试剂(Axygen公司)抽提总RNA, 并取1~2 μ g RNA反转录成cDNA(TaKaRa公司试剂盒)。反转录后的cDNA稀释20~100倍作为模板, 采用SYBR PremixEx Taq(TaKaRa公司)进行荧光定量PCR检测。相关引物序列如表2所示。

1.5 Western blot

细胞转染后36~48 h, 以SDS裂解液裂解细胞获取总蛋白, 煮沸10 min。蛋白质在100 V电压下, 通过10% SDS-PAGE蛋白电泳分离, 湿转法转移至PVDF膜上。依次以5%脱脂奶粉于室温下封闭1 h, 加入一抗于4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育45 min, 以ECL(enhanced chemiluminescence)化学发光试剂(Pierce公司)显影并在凝胶成像系统上检测信号。

1.6 凝胶迁移实验

以细胞核蛋白抽提试剂盒(Thermo Scientific公司)提取核蛋白, 每10 μ L蛋白与20 fmol生物素标记的核酸探针在室温下孵育30 min[孵育体系20 μ L, 含缓冲buffer及1 μ g poly(Di:dC)], 竞争性抑制组孵育体系

中同时加入2 pmol非标记探针, 对照组中同时加入2 pmol带有突变的非标记探针。孵育后, 样品与5 μ L loading buffer混合, 在150 V电压下通过6.5% PAGE非变性电泳分离, 湿转法转至尼龙膜上, 尼龙膜于245 nm紫外光源下交联15 min。膜依次以封闭液孵育15 min, 加入辣根过氧化物酶的封闭液孵育15 min, 洗膜后以ECL化学发光试剂盒(Thermo Scientific公司)显影并在凝胶成像系统上检测。相关探针序列如表3所示(Invitrogen公司合成)。

1.7 数据处理

数据用平均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ S.D.)表示, 组间均数采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 SPPI基因启动子的克隆及转录活性检测

利用BIMAS在线分析软件预测人SPPI的启动子区域位于转录起始位点上游2 Kb范围内, 以肝癌细胞Hep-3B的基因组为模板, 扩增获得该启动子预测区域全长SPPI-P(-2 178~+402 nt)。再以该全长启动子(P)为模板, 扩增两个截断体, 分别命名为P1(-2 178~-687 nt)和P2(-998~+402 nt)。上述DNA区段均构建至pGL3报告基因质粒中。图1A所示为重组质粒双酶切结果, 可见插入的片段大小符合理论预期。质粒转染至肝癌细胞系SK-HEP-1及Hep-3B, 并以双荧光素酶报告基因系统检测其对下游报告基因的转录调控活性。如图1B所示, pGL3-P2与pGL3-P相比, 转录激活活性呈现持平(Hep-3B)或上升(SK-HEP-1), 而pGL3-P1在两种细胞中均失去了转录激活活性, 提示激活SPPI基因转录水平的关键元件主要分布在-687~+402区间。

为了进一步缩小转录调控候选区域, 将P2做截断突变体, 分别为D1(-473~-59 nt)、D2(-57~+180 nt)和D3(+156~+402 nt)(图1C)。以与上述相同的方法分析其活性, 结果如图1D所示, 有且仅有D2区段保留了P2的转录激活活性, 提示SPPI启动子的D2区是主要激活型顺式转录元件的所在区段。

2.2 SPPI启动子上AP-1结合元件转录活性鉴定

根据转录因子分析软件发现, 在D2区域, 主要顺式转录调控元件是转录因子AP-1结合位点, 序列为TGACACAA, 位于-24~-17区, 且除D2外的其余启动子区域上并不再有其他AP-1结合位点。AP-1

表2 qRT-PCR引物序列

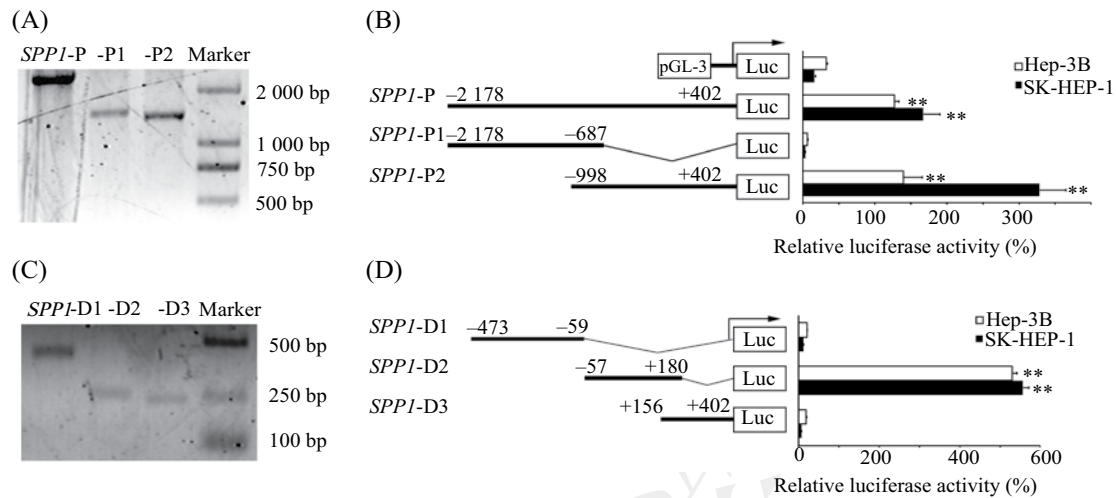
Table 2 The primer sequence of qRT-PCR

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence
<i>c-jun</i>	F: 5'-TCG ACA TGG AGT CCC AGG A-3' R: 5'-GGC GAT TCT CTC CAG CTT CC-3'
<i>SPPI</i>	F: 5'-CCG AGG TGA TAG TGT GGT TTA TGG-3' R: 5'-TGG ACT GCT TGT GGC TGT GG-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3' R: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'

表3 EMSA探针序列

Table 3 The probe sequence of EMSA assay

目的基因 Target gene	探针序列 Probe sequence
<i>SPPI</i> -D2w.t.	5'-GAA AAC CTC ATG ACACAA TCT CTC CGC C-3'
<i>SPPI</i> -D2mut	5'-GAA AAC CTC ATC CTA CAATCT CTC CGC C-3'
AP-1 consensus	5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3'

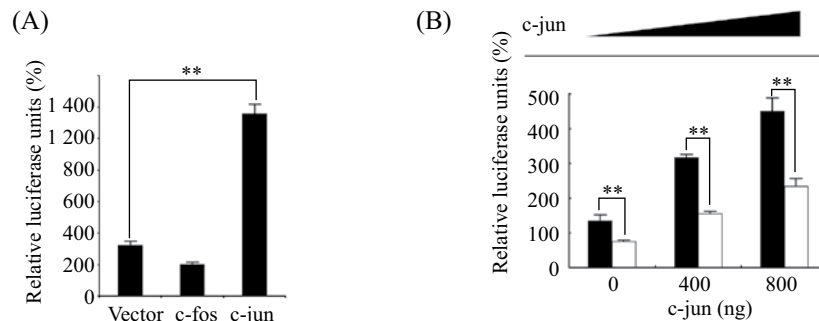


A、B: *SPP1*的全长启动子(P)和截断体(P1、P2)的双荧光素酶报告基因表达检测; C、D: 截断体(D1、D2、D3)的双荧光素酶报告基因表达检测。实验在SK-HEP-1和Hep-3B两种细胞株中进行, 实验独立重复3次, $**P<0.01$, 与P组相比(A和B); $**P<0.01$, 与D1组相比(C和D)。

A,B: full length *SPP1* promoter (P) and two large truncates (P1 and P2) were cloned and luciferase activities were assessed in both SK-HEP-1 and Hep-3B cells. Values are indicated as the mean $\pm$ S.D.; C,D: three small truncates (D1, D2, D3) from P2 fragment were further constructed and luciferase assay was conducted in SK-HEP-1 and Hep-3B cells. $n=3$, $**P<0.01$ compared with P group (A, B); $**P<0.01$ compared with D1 group (C, D).

图1 *SPP1*启动子各区段截断体的构建及转录活性分析

Fig.1 *SPP1* promoter construction cloning and activity analysis



A: 外源转染AP-1因子c-jun和c-fos对D2活性的影响。实验独立重复3次, $**P<0.01$, 与Vector组相比; B: 构建带有点突变的*SPP1*启动子D2-mut, 外源转染0, 400, 800 ng c-jun表达质粒, 分别对D2及D2mut活性的影响。实验独立重复3次, $**P<0.01$, 与c-jun 0 ng组相比。

A: SK-HEP-1 cells were co-transfected with AP-1 factor c-jun and c-fos respectively, and luciferase activities were further assayed. Values are indicated as the mean $\pm$ S.D., $n=3$, $**P<0.01$ compared with Vector group; B: point mutations were introduced into the AP-1 site inside *SPP1* promoter before luciferase assay was conducted. $n=3$, $**P<0.01$ compared with c-jun 0 ng group.

图2 *SPP1*启动子AP-1结合位点的活性分析

Fig.2 Transcriptional activity analysis of the AP-1 binding-site on *pSPP1*

途径是已知的与肿瘤生长及转移均密切相关的信号通路, 推测其可能对D2的转录活性有关键性作用。为了验证这一猜想, 我们在SK-HEP-1细胞中, 外源共转染AP-1转录因子的蛋白亚基c-jun或c-fos, 检测D2截断体的转录激活活性。结果可见, 在共转染c-jun后, 下游报告基因的表达水平显著上升, 提示表达c-jun可进一步提高D2的转录激活活性, 但共转染c-fos对D2活性没有影响(图2A)。

为了验证上述结果, 我们在D2的AP-1结合元件上引入3个连续的点突变(TGACACAA突变为TCCTACAA), 命名为D2-mut, 并构建入pGL3质粒以进行双荧光素酶分析。结果显示, 点突变的引入不仅使D2自身的转录活性显著降低, 而且还抑制了D2对外源c-jun的应答(图2B)。

2.3 *SPP1*启动子与AP-1的蛋白质-DNA互作验证

为了进一步证明D2上存在有功能的AP-1结合

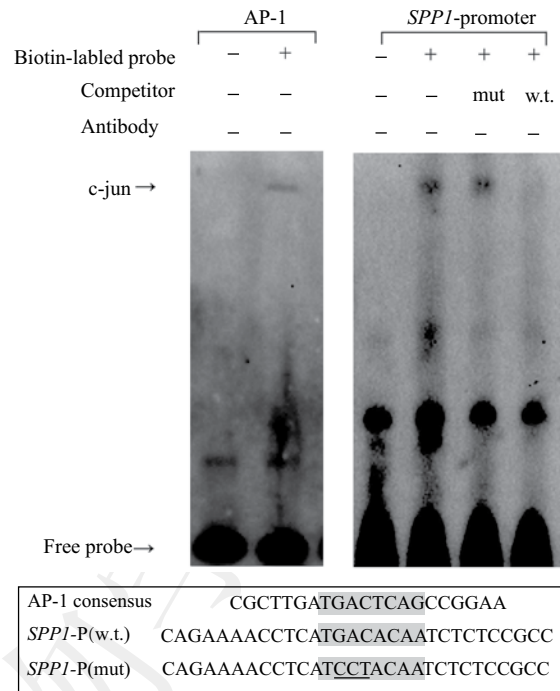
元件, 我们进行了凝胶阻滞实验。以生长状态良好的肝癌细胞SMMC-7721提取细胞核蛋白, 以*SPPI*启动子D2区的AP-1结合位点序列设计探针, 分别以生物素标记的探针、非标记的探针以及非标记的突变探针进行核蛋白结合凝胶迁移实验, 以文献报导的AP-1结合探针序列作为阳性对照^[16]。如图3所示, 生物素标记的*SPPI*启动子探针能够与核蛋白结合, 非标记的相应探针能够抑制标记探针与核蛋白的结合, 而突变的非标记探针不能抑制。启动子探针与蛋白结合的迁移条带大小与阳性对照大小位置相符合。

2.4 AP-1转录因子对肝癌细胞内源性OPN的表达调控作用鉴定

上述的体外转录活性实验均提示, 在肝癌中*SPPI*启动子上的AP-1结合元件很可能对其转录调控事件起到关键性作用。为进一步验证AP-1转录因子及其结合位点对内源性OPN表达的调控作用, 我们在SK-HEP-1肝癌细胞中转染c-jun后检测了内源性OPN的表达变化。实时定量PCR实验和Western blot实验分别从mRNA水平和蛋白质水平证明, AP-1转录因子的c-jun亚基可以显著提高内源性OPN的表达水平(图4)。

3 讨论

OPN基因*SPPI*位于染色体4q13, 由7个外显子和6个内含子组成, 其编码的骨桥蛋白OPN是一种带有RGD黏附序列的分泌性蛋白, 作为细胞表面受

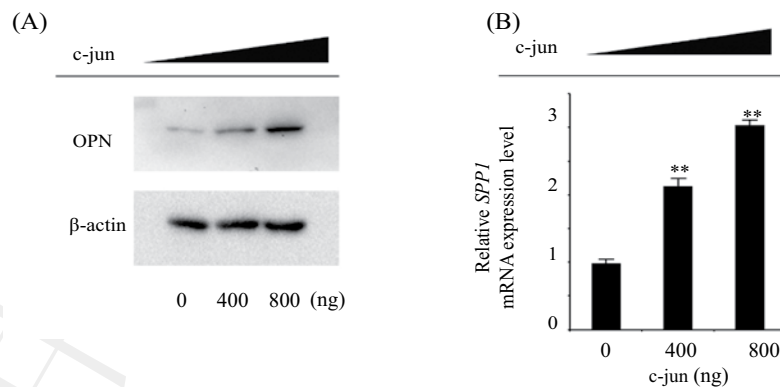


左栏: 以文献报导的AP-1结合序列作为阳性对照探针; 右栏: 以*SPPI*启动子上的AP-1结合位点为探针, 与SMMC-7721肝癌细胞核蛋白孵育, 进行凝胶迁移实验。探针以生物素于5'端标记, 竞争性抑制组加入过量的(100倍)非标记的探针或非标记的带点突变探针。

Left panel: a consensus AP-1 binding site was used as the positive control; Right panel: the AP-1 site from *SPPI* promoter was labeled with biotin and incubated with SMMC-7721 nuclear extracts after cell transfection with c-jun. 100-fold excess of the competitor wildtype oligonucleotides, mutant oligonucleotides and anti-c-jun antibody were added as indicated.

图3 凝胶迁移实验鉴定AP-1转录因子c-jun能够与*SPPI*启动子上AP-1结合位点互作

Fig.3 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) demonstrating c-jun protein binding affinity to AP-1 on *pSPPI*



A: 外源转染不同剂量的c-jun表达质粒, 对SK-HEP-1细胞中OPN蛋白质表达量的影响; B: 外源转染不同剂量的c-jun表达质粒, 对SK-HEP-1细胞中*SPPI* mRNA转录水平的影响。

A: SK-HEP-1 cells were transfected with c-jun at different dosages and OPN protein were investigated through Western blot; B: SK-HEP-1 cells were transfected with c-jun at different dosages and endogenous *SPPI* mRNA were investigated through qRT-PCR.

图4 Western blot和qRT-PCR 鉴定AP-1转录因子c-jun上调肝癌细胞内源OPN的表达水平

Fig.4 Western blot and qRT-PCR assay demonstrated c-jun inducing OPN expression in HCC cells

体integrin $\alpha_v\beta_3$ 、CD44所识别的重要配体,参与调控ECM的降解以及重构,从而在多种恶性肿瘤中促进细胞的移动及侵袭。例如,在肝癌中OPN在经蛋白酶切割后与CD44的互作能够诱导细胞的侵袭性增强,从而促进肿瘤转移^[17]。鉴于OPN在恶性肿瘤转移中的重要功能,多项研究尝试将OPN分子及其相关功能通路应用于恶性肿瘤的治疗策略,OPN的信号转导通路以及表达调控途径也成为相关领域的关注热点。根据现有的研究结果,OPN在不同的病理环境及各种癌症中的表达调控机制不尽相同。

AP-1家族是已知的与肿瘤生长和转移密切相关的一类转录因子,其复合物的主要组成亚基为c-jun及c-fos。癌症病理中,多种细胞外源刺激均可以激活AP-1转录复合物^[18],在肝癌中AP-1可以诱导细胞恶性转化;在乳腺癌^[19]、梭状细胞癌^[20]、乳腺上皮细胞^[21]以及多种动物模型中的研究结果显示^[18],AP-1高表达可以增强细胞的转移和侵袭能力。除此之外,有研究报导AP-1促进细胞侵袭能力变化的功能机制是由CD44介导的^[22],鉴于OPN与CD44在肿瘤转移中密切的互作关系,可以推测AP-1途径很可能参与到癌症中OPN的表达调控。在成骨细胞中,AP-1通过肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)促进OPN的表达,且c-jun和c-fos亚基均验证可以与启动子上的相应碱基位点结合^[23];在动脉平滑肌细胞中,AP-1也被证实与OPN的转录激活相关^[24]。

我们的研究结果揭示在肝癌细胞中,AP-1途径是OPN转录调控的关键性机制,其中AP-1家族的c-jun因子,而非c-fos起到主导作用。凝胶迁移实验证明了c-jun蛋白与OPN基因*SPPI*启动子上位于-24~-17的AP-1结合位点的直接互作,通过启动子截断体/报告基因重组质粒的构建,我们证实包含AP-1结合位点的D2区域具有最强的转录激活活性,该区段的缺失以及在AP-1结合位点中引入点突变均会使启动子的整体转录激活活性显著降低。除此之外,外源过表达c-jun能够成功促进肝癌细胞中OPN基因的表达水平,在mRNA及蛋白水平上均得到验证。近年来,也有少量研究报道了肝癌细胞中OPN的转录调控机制,如Chen等^[25]鉴定肝癌细胞HCCLM6中转录因子c-Myb能够与OPN基因*SPPI*启动子结合并提高转录活性,利用siRNA削减细胞内源c-Myb,可使OPN的表达

显著下降,进而抑制细胞迁移、侵袭能力。Guo等^[26]发现,肝癌样本中OPN与诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)正相关,Hep-G2细胞中一氧化氮(nitric oxide, NO)能够诱导OPN基因*SPPI*的转录,促进蛋白表达。这些研究结果的差异性既反映了在不同肝癌细胞中OPN表达调控的异质型,同时也提示了肝癌中OPN可能受到多途径的表达调控作用。因此,在将来的研究中,我们还将借助其他手段,如临床肝癌样本的基因表达谱的相关性分析,进一步阐明OPN与其他转录因子的互作网络,分析肝癌发生发展过程中不同转录调控机制在OPN表达调控中所发挥功能的主次关系。

综上所述,本文首次在肝癌细胞中较为清晰地阐明了骨桥蛋白OPN的转录调控机制,提示通过干预AP-1信号通路实现OPN表达调控的可能性,为临床肿瘤转移的诊断标记物的开发及靶向治疗提供了新策略。

参考文献 (References)

- 1 Steeg PS. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 2006; 12(8): 895-904.
- 2 Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(2): 460-5.
- 3 Weber GF. The metastasis gene osteopontin: A candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1552(2): 61-85.
- 4 Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian-cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 1979; 16(4): 885-93.
- 5 Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci* 2008; 103(1): 4-13.
- 6 Wai PY, Kuo PC. Osteopontin: Regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(1): 103-18.
- 7 Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PH, *et al.* Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98(1): 119-27.
- 8 Crawford HC, Matrisian LM, Liaw L. Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression *in vivo*. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5206-15.
- 9 Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Qin LX, Sun HC, Ye QH, *et al.* A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin* 2004; 130(4): 187-96.
- 10 Gotoh M, Sakamoto M, Kanetaka K, Chuuma M, Hirohashi S. Overexpression of osteopontin in hepatocellular carcinoma. *Pathol Int* 2002; 52(1): 19-24.

- 11 Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, *et al.* Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003; 9(4): 416-23.
- 12 Wang DY, Yamamoto S, Hijiya N, Benveniste EN, Gladson CL. Transcriptional regulation of the human osteopontin promoter: Functional analysis and DNA-protein interactions. *Oncogene* 2000; 19(50): 5801-9.
- 13 Tezuka KI, Denhardt DT, Rodan GA, Harada SI. Stimulation of mouse osteopontin promoter by v-Src is mediated by a CCAAT box-binding factor. *J Biol Chem* 1996; 271(37): 22713-7.
- 14 Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S, *et al.* Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: Evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin Exp Metastas* 2003; 20(1): 77-84.
- 15 El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin DC, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17(6): 463-74.
- 16 Renault MA, Jalvy S, Potier M, Belloc I, Desgranges C, Gadeau AP. UTP-induced osteopontin expression is mediated via AP-1, NF-kappa B, and USF in arterial smooth muscle cells. *Circulation* 2004; 110(17): 87.
- 17 Takafuji V, Forgues M, Unsworth E, Goldsmith P, Wang XW. An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2007; 26(44): 6361-71.
- 18 Ozanne BW, Spence HJ, McGarry LC, Hennigan RF. Transcription factors control invasion: AP-1 the first among equals. *Oncogene* 2007; 26(1): 1-10.
- 19 Rinehart JP, Denlinger DL. Heat-shock protein 90 is down-regulated during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, but remains responsive to thermal stress. *Insect Mol Biol* 2000; 9(6): 641-5.
- 20 Zoumpourlis V, Papassava P, Linardopoulos S, Gillespie D, Balmain A, Pintzas A. High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene* 2000; 19(35): 4011-21.
- 21 Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, *et al.* Activation of an inducible C-fos fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 1992; 71(7): 1103-16.
- 22 Lamb RF, Hennigan RF, Turnbull K, Katsanakis KD, MacKenzie ED, Birnie GD, *et al.* AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol* 1997; 17(2): 963-76.
- 23 Chen HT, Tsou HK, Chang CH, Tang CH. Hepatocyte growth factor increases osteopontin expression in human osteoblasts through PI3K, Akt, c-Src, and AP-1 signaling pathway. *PLoS One* 2012; 7(6): e38378.
- 24 Renault MA, Jalvy S, Belloc I, Pasquet S, Sena S, Olive M, *et al.* AP-1 is involved in UTP-induced osteopontin expression in arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2003; 93(7): 674-81.
- 25 Chen RX, Xia YH, Xue TC, Ye SL. Transcription factor c-Myb promotes the invasion of hepatocellular carcinoma cells via increasing osteopontin expression. *J Exp Clin Canc Res* 2010; 10.1186/1756-9966-29-172.
- 26 Guo HT, Marroquin CE, Wai PY, Kuo PC. Nitric oxide-dependent osteopontin expression induces metastatic behavior in HepG2 cells. *Digest Dis Sci* 2005; 50(7): 1288-98.