

吉非替尼对敲低ANXA7的HepG2细胞 增殖和凋亡的影响

焦海涛¹ 王爱民² 田焕娜¹ 王小杰¹ 梁秀军¹ 李欣^{1*}

(¹承德医学院, 承德 067000; ²河北省承德市中心医院, 承德 067000)

摘要 该文目的为研究吉非替尼对敲低膜联蛋白A7(annexin A7, ANXA7)的人肝癌HepG2细胞增殖及凋亡的影响, 为肝癌的治疗提供参考依据。应用MTT法检测0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ 等浓度的吉非替尼作用72 h后HepG2细胞的增殖情况, 计算 IC_{50} 为5 $\mu\text{mol/L}$; 将HepG2细胞分为敲低加药组、单加药组、敲低组、阴性对照组和空白对照组, 采用RNA干扰技术将靶向ANXA7的siRNA和阴性对照siRNA通过脂质体转染法分别转染入HepG2细胞。转染72 h后采用Western blot法对ANXA7的抑制效果进行鉴定; 用MTT法和流式细胞术检测HepG2细胞增殖和凋亡情况。结果显示, 吉非替尼浓度越大, 对HepG2细胞增殖的抑制作用越明显; 靶向ANXA7的siRNA能显著抑制ANXA7的表达; 敲低加药组、单加药组、敲低组、阴性对照组和空白对照组的生长抑制率分别为73.88%、48.67%、54.33%、1.02%和0.02%, 早期凋亡率分别为8.48%、3.06%、2.93%、1.72%和1.64%。与阴性对照组和空白对照组相比, 敲低加药组、单加药组和敲低组细胞的增殖抑制率和凋亡率均明显增加($P < 0.05$), 且敲低加药组较敲低组对抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的效果更为显著。由此说明, 敲低ANXA7后联合药物吉非替尼能抑制HepG2细胞的增殖, 促进其凋亡, 可能是一种临床治疗的方法。

关键词 吉非替尼; ANXA7; HepG2细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; RNA干扰

Influence of Gefitinib on Proliferation and Apoptosis of HepG2 Cells with ANXA7 Knockdown

Jiao Haitao¹, Wang Aimin², Tian Huanna¹, Wang Xiaojie¹, Liang Xiujun¹, Li Xin^{1*}

(¹Chengde Medical University, Chengde 067000, China; ²Chengde Central Hospital, Chengde 067000, China)

Abstract The paper aimed at investigating the influences of Gefitinib on the proliferation and apoptosis of HepG2 cells with annexin A7 (ANXA7) knockdown in order to developing a potential therapy for hepatocellular carcinoma. The human hepatoblastoma cell line HepG2 cells were incubated for three days with Gefitinib at different concentrations ranging from 0.1 to 50, and then studied by MTT to measure 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of Gefitinib, the IC_{50} was 5 $\mu\text{mol/L}$. The cells were divided into A7si combine Gefitinib group, Gefitinib group, A7si group, negative control group and blank control group. RNA interference technology was used to transfect the siRNA targeted ANXA7, scrambled siRNA into HepG2 cells with lipofectine 2000. After 72 hours, the suppression of ANXA7 on protein level was assured by Western blot. The inhibitory rate was tested using MTT assay and the

收稿日期: 2015-07-30 接受日期: 2015-10-29

河北省高校省级重点学科资助项目(病理与病理生理学)[冀教高(2013)4号]

*通讯作者。Tel: 0314-2291043, E-mail: cd-lixin@163.com

Received: July 30, 2015 Accepted: October 29, 2015

This work was supported by Hebei Province Key Subject (Pathology and Pathophysiology) [Grant No.(2013)4]

*Corresponding author. Tel: +86-314-2291043, E-mail: cd-lixin@163.com

网络出版时间: 2015-12-23 11:11:58

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151223.1111.002.html>

apoptosis ratio was detected by flow cytometry. The results showed that HepG2 cells proliferation was significantly suppressed with Gefitinib concentration increasing in a dose-dependent manner. The suppression of ANXA7 on protein level was assured by Western blot. It also showed by MTT assay and Flow cytometry that the inhibition rate and apoptotic rate of the HepG2 cells in the A7si combine Gefitinib group, Gefitinib group and A7si group, were much higher than that in the negative control group and the blank control group ($P < 0.05$). When compared A7si combine Gefitinib group with Gefitinib group and A7si group respectively, the A7si combine Gefitinib group had the greatest effect of proliferation inhibition and apoptosis promotion. Taken together, our results suggested that Gefitinib and ANXA7 knockdown can synergistically inhibit HepG2 cell proliferation, and promote cell apoptosis which might be a potential method for clinic treatment.

Keywords Gefitinib; ANXA7; HepG2 cells line; proliferation; apoptosis; RNA interference

我国肝癌的发病率和死亡率始终居高不下,位于恶性肿瘤死亡的第二位^[1-2]。目前没有特效药物能够阻止肿瘤的复发和转移扩散,严重影响了肝癌患者的生存和预后^[3]。对肝癌患者而言,手术结合术后化疗依然是主要的治疗手段,但根治性手术和肝移植不适用于所有病人,并且治疗后仍有较高的复发率,特别是对于晚期肿瘤的患者,传统化疗药物的高细胞毒性和高耐药性也成为治疗过程中不可逾越的障碍。近年来,随着人们对肿瘤发生发展分子机制认识的不断深入,开启了针对相应靶点如调控分子、细胞受体、关键基因的靶向治疗。

酪氨酸激酶是近年来研究的重要靶点之一,吉非替尼作为一种通过口服途径给药的小分子酪氨酸激酶抑制剂,它已成为临床治疗一线化疗失败的中晚期非小细胞肺癌(non small lung cancer, NSCLC)患者的常用药,具有一定的临床疗效^[4-5]。膜联蛋白A7(ANXA7)作为annexin A家族最重要的成员之一,在多种组织和细胞中都有分布,已被证实具有胞外分泌、膜运输及钙离子通道活性等功能^[6]。Höpfner等^[7]通过MTT法和流式细胞仪检测细胞周期发现,吉非替尼对人肝癌HepG2细胞的增殖具有明显的抑制作用;本课题组成员王小杰等^[8-9]通过脂质体转染法、Western blot、MTT法和Annexin V-FITC/PI双染等方法研究证实,ANXA7可被siRNA有效抑制,其抑制效率可达到80%以上,敲低ANXA7的HepG2细胞其增殖能力明显受到抑制,凋亡能力明显增强。因此,吉非替尼和敲低HepG2细胞中ANXA7蛋白的表达均能抑制细胞的生长与增殖。如果将二者联合应用,是否能够更强地抑制肝癌细胞增殖并促进细胞凋亡,或是敲低ANXA7蛋白后可减少药物吉非替尼的用药剂量,本实验意在探讨吉非替尼未来应用于

肝癌的可能性。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器设备

细胞培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)为美国Gibco公司产品;转染试剂Lipofectamine2000(Lipo2000)、MTT(四甲基偶氮唑蓝)粉剂及靶向ANXA7的siRNA均为Invitrogen公司产品;Annexin V/FITC及PI试剂盒购于北京晶美生物有限公司;人肝癌HepG2细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库;吉非替尼(粉末5 mg)购于阿斯利康公司;细胞培养皿(60 mm)和细胞培养板(6孔、96孔)均购于北京华美公司;流式细胞仪(型号:FACSCalibur)购于美国BECTON DICKINSON公司;Multiskan MK3酶标仪购于Thermo公司。

1.2 HepG2细胞的培养

人肝癌HepG2细胞用含10% FBS的DMEM并置于37 °C、含5% CO₂的细胞培养箱中培养。

1.3 MTT法检测吉非替尼对HepG2细胞抗增殖作用

HepG2细胞培养于60 mm细胞培养板中,收集对数生长期的HepG2细胞,利用浓度为0.25%的胰蛋白酶消化细胞,小心将其吹打成单细胞悬液,种96孔板,每孔加入DMEM 200 μL,其中细胞的数量控制在每孔 1×10^5 ,放入37 °C、含5% CO₂的培养箱中培养,24 h后吸去培养液,将HepG2细胞分为对照组和实验组种于96孔板中,每组设置6个复孔。对照组中不加吉非替尼,只加入200 μL的DMEM,实验组加入200 μL浓度分别为0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 μmol/L吉非替尼的DMEM,继续培养72 h;然后每孔加入MTT 20 μL(5 mg/mL),置37 °C、5% CO₂避光继续培养4 h后,

出现呈蓝紫色结晶的甲瓚,小心吸去上清液,每孔加入DMSO 150 μL ,立即放于酶标仪上检测吸光度(D)值。酶标仪设置震荡时间为10 min,波长为490 nm。应用SPSS软件计算 IC_{50} ,实验在同等条件下重复3次。

1.4 Western blot检测ANXA7蛋白水平

1.4.1 细胞分组及转染 将细胞分为敲低组、阴性对照组和空白对照组。其中,敲低组转染靶向ANXA7的siRNA,阴性对照组转染非特异性siRNA,空白对照组只加转染试剂Lipo2000。将培养于60 mm细胞培养板中的HepG2细胞,在转染前1 d按 5×10^4 /孔种于6孔板中,使细胞密度在24 h内达到40%以上,不超过70%;配置体积为250 μL 的无血清DMEM与siRNA寡核苷酸的混合物,其中包含30 pmol/L siRNA寡核苷酸,轻柔混匀,室温放置5 min后与Lipo2000转染试剂混合,再在室温放置20 min,然后将混合物分别加至所需要的培养孔中,转染后6 h更换成含10% FBS的DMEM,72 h收集细胞。

1.4.2 Western blot检测 收集3组HepG2细胞,分别加入细胞裂解液150 μL ,待裂解充分后提取总蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒来检测浓度,与各样品处理液混合后煮沸10 min,每孔加入样品30 μg ,进行80~120 V、12% SDS-PAGE凝胶电泳2 h;聚偏乙烯(PVDF)膜2 mA/ cm^2 、4 $^{\circ}\text{C}$ 稳流转膜2 h;5%脱脂奶粉封闭2 h;ANXA7小鼠抗人单克隆抗体(1:1 000)室温下孵育2 h;TBST洗膜(15 min、10 min、10 min),洗掉非特异结合的一抗;羊抗鼠二抗(1:5 000)室温下孵育1 h;再次用TBST对膜进行清洗(5 min \times 3次);用ECL发光法,可在X光胶上获得黑色条带,获得实验结果。扫描胶片,利用Quantity One 4.6.2软件进行显影条带灰度值检测,计算ANXA7和 β -actin条带的比值,就可以得出ANXA7蛋白在HepG2细胞中的相对表达量。

1.5 MTT检测吉非替尼对敲低ANXA7后HepG2细胞增殖的影响

1.5.1 细胞分组 转染后6 h接种96孔板,每组设6个复孔,将细胞分为敲低加药组、单加药组、敲低组、阴性对照组和空白对照组。其中,采用脂质体转染法向敲低加药组和敲低组内的HepG2细胞转染靶向ANXA7的siRNA,并且在转染后6 h将敲低加药组换为吉非替尼终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ (IC_{50})的DMEM,阴性对照组只转染非特异性siRNA,吉非替尼组只加入

含吉非替尼浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 的DMEM,空白对照组只加转染试剂Lipo2000,继续放入细胞培养箱培养至72 h。

1.5.2 MTT检测 转染后72 h每组分别加入20 μL (5 mg/mL)MTT后,放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中继续培养4 h,然后取出,小心吸去上清液,每孔加入DMSO 150 μL ,酶标仪设置振荡10 min,波长为490 nm,获得 D 值,计算各组细胞抑制率。

1.6 流式细胞术检测吉非替尼对敲低ANXA7后HepG2细胞凋亡的影响

将转染后的细胞分为敲低加药组、单加药组、敲低组、阴性对照组和空白对照组,72 h后各组细胞用PBS充分洗涤后,用0.25%不含EDTA的胰蛋白酶进行常规消化,终止消化后吹打制成单细胞悬液,然后进行细胞计数。分别将各组收集到的单细胞悬液混匀,加入离心管内,用离心机1 000 r/min离心5 min,小心吸去上清,用4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的PBS轻轻重悬细胞,取出 1×10^5 的重悬细胞,1 000 r/min离心5 min后吸去上清液,并加入Binding Buffer 500 μL 将细胞重悬后,操作均在室温下进行,加入Annexin V-FITC 5 μL 和PI 10 μL ,混匀后,等待15 min的避光反应时间,利用流式细胞仪进行检测,激发波长488 nm,计细胞数10 000个,Cell Quest软件计算凋亡率。

1.7 统计处理

每组实验在同等条件下重复3次以上,所有数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS 19.0统计软件进行数据处理,多组间比较采用单因素方差分析,组间变量比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

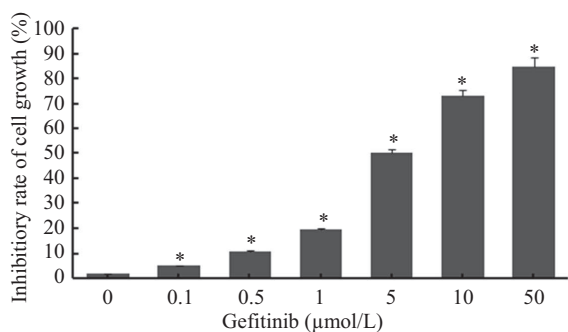
2 结果

2.1 吉非替尼对HepG2细胞体外抗增殖作用

MTT检测结果(图1)显示,不同浓度的吉非替尼作用于HepG2细胞72 h后有显著差异,实验组和空白对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)的细胞抑制率存在显著差异($P < 0.05$);随着给予吉非替尼浓度的逐渐增加, D 值较对照组逐渐减小,对HepG2细胞的相对抑制率也随之提高,当吉非替尼的用量升高至约5 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞增殖的抑制率接近50%。因此,后续实验中,吉非替尼的干预剂量选定为5 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 Western blot检测ANXA7蛋白的表达

通过Western blot分析ANXA7蛋白水平,结果(图2)显示,靶向ANXA7 siRNA能明显降低HepG2细

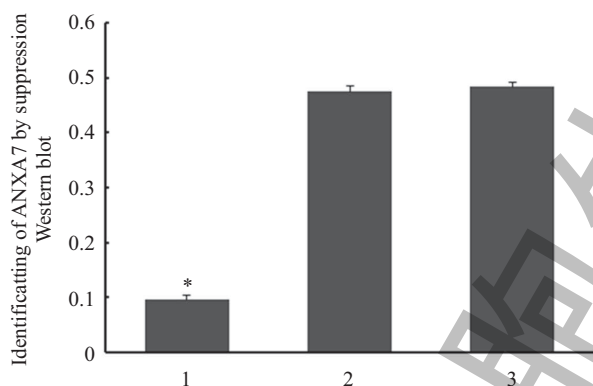
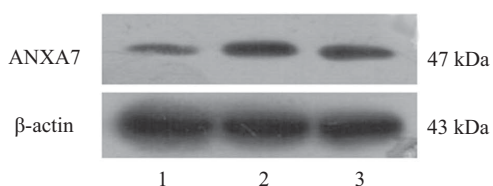


* $P < 0.05$, 空白对照组相比较。

* $P < 0.05$ compare with the blank control group.

图1 MTT法检测HepG2细胞生长抑制率

Fig.1 The inhibitive rate of HepG2 cell growth was tested by the MTT assay



1: 敲低组; 2: 阴性对照组; 3: 空白对照组。* $P < 0.05$, 敲低组与其他两组相比较。

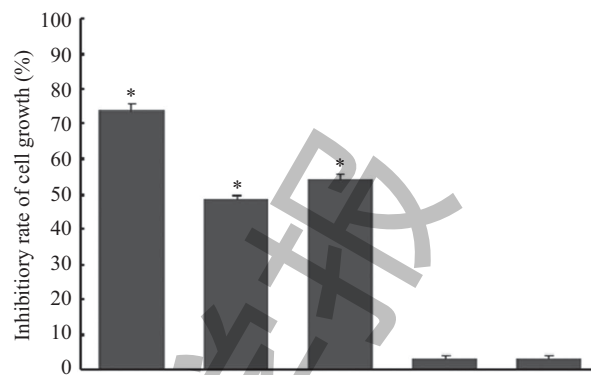
1: knockdown group; 2: negative control group; 3: blank control group. * $P < 0.05$, knockdown group compared with the other two groups of cells.

图2 Western blot检测ANXA7在HepG2细胞中蛋白质水平
Fig.2 ANXA7 protein levels of HepG2 cells by Western blot

胞中ANXA7蛋白水平, 敲低组ANXA7蛋白水平明显低于转染阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$); 而转染阴性对照组和空白对照组ANXA7蛋白水平无明显差别($P > 0.05$), 经统计得出ANXA7蛋白抑制率为80%左右。

2.3 吉非替尼对敲低ANXA7后HepG2细胞增殖的影响

选择 IC_{50} 浓度的吉非替尼作用于HepG2细胞, 经统计得出各组的 D 值分别为: 敲低加药组(0.187 ± 0.004)、单加药组(0.368 ± 0.012)、敲低组(0.327 ± 0.013)、阴性对照组(0.789 ± 0.066)和空白对照组



1: 敲低加药组; 2: 吉非替尼; 3: 敲低组; 4: 阴性对照组; 5: 空白对照组。* $P < 0.05$, 与阴性对照组和空白对照组相比较。

1: knockdown combined Gefitinib group; 2: Gefitinib group; 3: knockdown group; 4: negative control group; 5: blank control group. * $P < 0.05$ compare with the negative control group and blank control group.

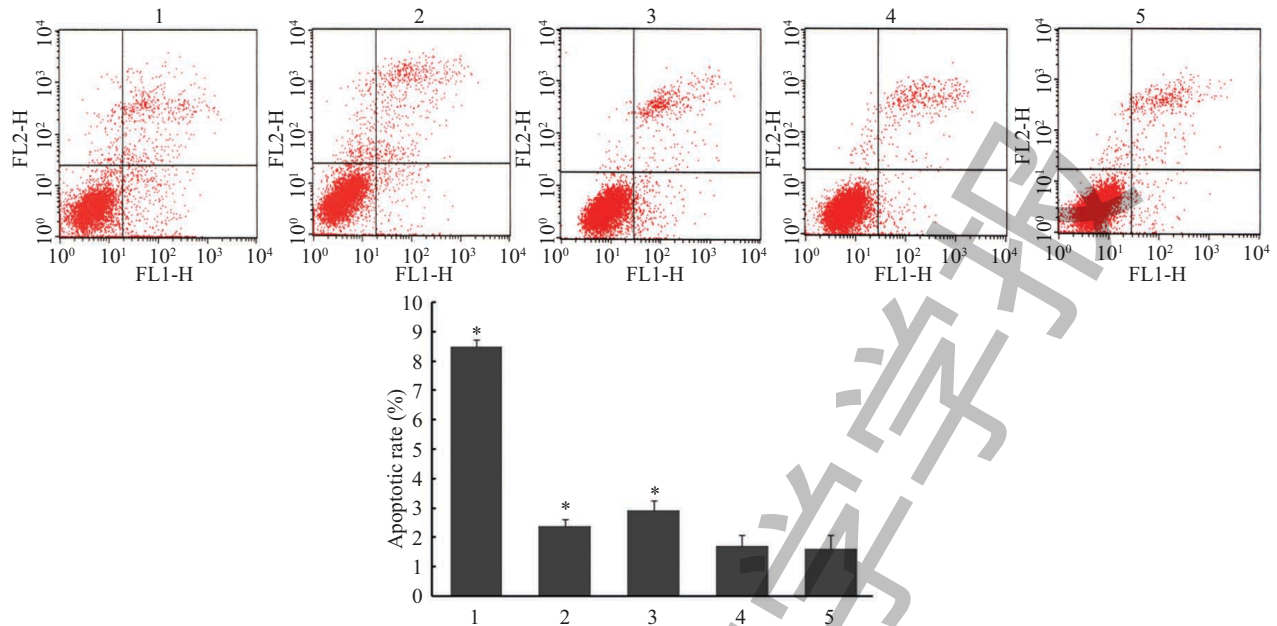
图3 MTT法检测各组HepG2细胞的抑制率

Fig.3 Inhibitory rate of HepG2 cells in each group by MTT assay

(0.716 ± 0.051)。敲低加药组、单加药组和敲低组的 D 值明显低于阴性对照组和空白对照组, 其中, 敲低加药组的 D 值最低($P < 0.05$), 说明敲低加药组、单加药组和敲低组对HepG2细胞增殖有明显的抑制作用, 敲低加药组对细胞的抑制作用最为显著, 抑制效果要好于单加药组和敲低组; 单加药组和敲低组的 D 值之间亦无显著差异($P > 0.05$), 说明单独敲低ANXA7蛋白和单独应用吉非替尼对细胞的增殖具有一定的抑制作用, 但这两种因素的作用差别不大; 阴性对照和空白对照组之间也无明显差异($P > 0.05$) (图3)。

2.4 吉非替尼对敲低ANXA7后HepG2细胞凋亡的影响

采用Annexin V-FITC/PI双染法对6组细胞的早期凋亡率进行检测, 结果显示, 敲低加药组为(8.48 ± 0.32)%、单加药组为(2.41 ± 0.37)%、敲低组为(2.93 ± 0.35)%、阴性对照组为(1.72 ± 0.21)%和空白对照组为(1.64 ± 0.25)%。可见, 敲低加药组、单加药组和敲低组的早期凋亡率明显高于阴性对照组和空白对照组, 其中, 敲低加药组的早期凋亡率最高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 说明敲低加药组、单加药组和敲低组均可以促进HepG2细胞的凋亡, 并且敲低加药组促进细胞凋亡的能力要显著强于单加药组和敲低组; 敲低组和单药组之间无明显差异($P > 0.05$), 阴性对照组和空白对照组之间亦无明显差异($P > 0.05$) (图4)。



1: 敲低加药组; 2: 吉非替尼; 3: 敲低组; 4: 阴性对照组; 5: 空白对照组。* $P < 0.05$, 与阴性对照组和空白对照组相比。

1: knockdown combined Gefitinib group; 2: Gefitinib group; 3: knockdown group; 4: negative control group; 5: blank control group. * $P < 0.05$ compare with the negative control group and blank control group.

图4 流式细胞术检测各HepG2组细胞凋亡情况

Fig.4 Apoptosis of HepG2 cells in each group by Flow cytometry

3 讨论

吉非替尼作为一种酪氨酸蛋白激酶抑制剂,它通过选择性地作用于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)而发挥作用,它可与EGFR竞争结合保守度较高的ATP结合点,通过对HER-1酪氨酸激酶(tyrosine kinase, TK),活性产生抑制作用,减少AKT、HER-1和HER-2的磷酸化,使得下游的Ras/Raf/MAPK信号途径和PI3K/Akt信号途径受到干扰,即吉非替尼通过抑制TK,从而阻断肿瘤细胞生长信号的传递,最终促进细胞凋亡^[10]。正常情况下,EGFR在组织中的含量很少,但Buckley等^[11]通过FISH和免疫组化法,证实其在肝癌组织中的表达率为66%,呈高表达。有实验证实,乙肝病毒X基因可以诱导呈EGFR的高表达趋势^[12]。吉非替尼在肝癌的临床治疗中还未见报道,但将吉非替尼作用于体外培养肝癌细胞的研究一直在不断地探索当中。本次实验研究将不同浓度的吉非替尼作用于人肝癌HepG2细胞,72 h后MTT法检测显示,随着药物浓度的增高,吉非替尼对细胞的抑制率也会随之增高,高浓度组与低浓度组之间存在明显的差异,计算得出吉非替尼作用于HepG2细胞72 h后的 IC_{50} 为5 $\mu\text{mol/L}$ 。实验得出的吉非替尼 IC_{50} 结果与Höpfner等^[7]通过MTT法检测HepG2细胞 IC_{50} 为(4.8 \pm 0.3) $\mu\text{mol/L}$ 接近;并

且, Giannelli等^[13]也通过实验证实,吉非替尼能抑制HepG2细胞增殖,并计算吉非替尼的 IC_{50} 在0.7~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 之间,充分证明我们实验得出的5 $\mu\text{mol/L}$ 吉非替尼的 IC_{50} 在后续实验中的可行性。

ANXA7在肝癌组织中的表达,目前的研究结果并不一致。Qazi等^[14]通过对不同转移性的两个肝癌细胞系Hca-F和Hca-P中的ANXA7进行检测,发现在高转移性的Hca-F肝癌细胞系中ANXA7表达显著高于低转移性的Hca-P肝癌细胞。Sun等^[15]在对已经发生肝癌细胞淋巴结转移的大鼠研究发现,ANXA7在远处转移的淋巴结中表达增高。Srivastava等^[16]对敲除ANXA7^{-/-}后的小鼠进行研究,发现肝癌的发生率增高且发展迅速,转移灶中除淋巴结转移ANXA7的表达均高于原发灶。以上研究提示,ANXA7与肝癌转移密切相关。本课题组前期实验已经证实,敲低HepG2细胞中ANXA7能抑制细胞增殖、促进细胞凋亡,并在此基础上对促进凋亡的机制进行了探讨^[8-9]。

因此,我们在课题组前期研究的基础上,采用吉非替尼作用于敲低ANXA7的肝癌细胞,旨在观察吉非替尼与ANXA7敲低联合作用是否能更有效地抑制肝癌细胞的增殖并促进其凋亡。本文结果发现,敲低加药组的肝癌细胞生长抑制率和凋亡

率均显著高于吉非替尼单独作用组和敲低ANXA7组。我们可以得出, 在确定siRNA干扰对HepG2细胞中ANXA7蛋白的表达能起到有效抑制的前提下, 选择吉非替尼作用于HepG2细胞的最佳时间点, 敲低ANXA7并联合使用吉非替尼, 能协同抑制人肝癌HepG2细胞的增殖, 促进其凋亡, 下一步我们将继续探索敲低ANXA7后是否能降低吉非替尼的IC₅₀浓度以及二者产生协同作用的机制。

参考文献 (References)

- 1 El-Serag HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: An update. *Ann Intern Med* 2003; 139(10): 817-23.
- 2 McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer* 2001; 94(2): 290-6.
- 3 El-Serag HB, Mason AC. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 1999; 340(10): 745-50.
- 4 Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ Jr, Prager D, Belani CP, *et al.* Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: A randomized trial. *JAMA* 2003; 290(16): 2149-58.
- 5 Grünwald V, Hidalgo M. Development of the epidermal growth factor receptor inhibitor Tarceva (OSI-774). *Adv Exp Med Biol* 2003; 532: 235-46.
- 6 Hayes MJ, Longbottom RE, Evans MA, Moss SE. Annexinopathies. *Subcell Biochem* 2007; 45: 1-28.
- 7 Höpfner M, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherübl H. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 41(6): 1008-16.
- 8 王小杰, 李欣. 膜联蛋白A7低表达对人肝癌HepG2细胞增殖的影响. *解剖学报*(Wang Xiaojie, Li Xin. Influence of annexin A7 low expression on proliferation of HepG2 cells. *Acta Anatomica Sinica*) 2013; 44(5): 656-60.
- 9 王小杰, 梁秀军, 李欣. 敲低膜联蛋白A7对人肝癌HepG2细胞Bcl-2和Bax表达的影响. *解剖学报*(Wang Xiaojie, Liang Xiujun, Li Xin. Influence of annexin A7 knockdown and Bax of HepG2 on expression of Bcl-2 cells. *Acta Anatomica Sinica*) 2014; 45(6): 809-13.
- 10 Anido J, Matar P, Albanell J, Guzmán M, Rojo F, Arribas J, *et al.* ZD1839, a specific epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor, induces the formation of inactive EGFR/HER2 and EGFR/HER3 heterodimers and prevents heregulin signaling in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9(4): 1274-83.
- 11 Buckley AF, Burgart LJ, Sahai V, Kakar S. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2008; 129(2): 245-51.
- 12 Miyaki M, Sato C, Sakai K, Konishi M, Tanaka K, Muraoka M, *et al.* Malignant transformation and EGFR activation of immortalized mouse liver epithelial cells caused by HBV enhancer-X from a human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 85(4): 518-22.
- 13 Giannelli G, Sgarra C, Porcelli L, Azzariti A, Antonaci S, Paradiso A. EGFR and VEGFR as potential target for biological therapies in HCC cells. *Cancer Lett* 2008; 262(2): 257-64.
- 14 Qazi AS, Sun M, Huang Y, Wei Y, Tang J. Subcellular proteomics: Determination of specific location and expression levels of lymphatic metastasis associated proteins in hepatocellular carcinoma by subcellular fractionation. *Biomed Pharmacother* 2011; 65(6): 407-16.
- 15 Sun MZ, Liu S, Tang J, Wang Z, Gong X, Sun C, *et al.* Proteomics analysis of two mice hepatocarcinoma ascites syngeneic cell lines with high and low lymph node metastasis rates provide potential protein markers for tumor malignancy attributes to lymphatic metastasis. *Proteomics* 2009; 9(12): 3285-302.
- 16 Srivastava M, Montagna C, Leighton X, Glasman M, Naga S, Eidelman O, *et al.* Haploinsufficiency of Anx7 tumor suppressor gene and consequent genomic instability promotes tumorigenesis in the Anx7^{-/-} mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(24): 14287-92.