

肌动蛋白结合蛋白对肝癌细胞迁移与侵袭能力的影响及其机制研究

李 亮 刘 辉 彭习兰 江明万*

(重庆市三峡中心医院消化内科, 重庆 404000)

摘要 该文旨在探讨肌动蛋白结合蛋白(actin-binding protein, ANLN)对肝癌细胞迁移与侵袭能力的影响。应用荧光定量PCR(qRT-PCR)检测ANLN在肝癌组织和癌旁组织中的表达差异, 运用慢病毒介导shRNA干扰技术靶向敲低肝癌细胞Huh-7中ANLN的表达, 并通过qRT-PCR和Western blot方法验证敲低效率; 通过细胞迁移实验和侵袭实验检测肝癌细胞的迁移与侵袭能力。进一步通过qRT-PCR和Western blot检测ANLN基因敲低对基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)mRNA和蛋白质水平的影响。最后, 分析MMP9在ANLN敲低调控的肝癌细胞迁移侵袭过程中的作用。结果显示, 在20例肝癌组织样本和癌旁组织中, ANLN在肝癌组织中mRNA水平较癌旁组织显著增高($P < 0.001$)。其中, 在发生转移的肝癌组织中, ANLN mRNA水平较无转移的肝癌组织显著增高($P < 0.001$)。慢病毒介导shRNA能显著抑制肝癌细胞中ANLN的表达, ANLN基因敲低能抑制肝癌细胞的迁移能力, 并能显著抑制肝癌细胞的侵袭能力。机制研究发现, ANLN的基因敲低能显著抑制MMP9的表达, MMP9的过表达能逆转ANLN基因敲低对肝癌细胞迁移侵袭能力的抑制作用。该研究结果提示, 在肝癌组织中, ANLN mRNA水平明显增高, ANLN的表达水平与迁移侵袭能力密切相关。ANLN基因敲低可能通过调节MMP9的表达, 从而抑制肝癌细胞的迁移侵袭能力。

关键词 肝肿瘤; 肿瘤迁移; 肌动蛋白结合蛋白

Effect of ANLN on Cell Migration and Invasion of Liver Cancer Cells and Its Potential Mechanism

Li Liang, Liu Hui, Peng Xilan, Jiang Mingwan*

(Department of Gastroenterology, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of actin-binding protein (ANLN) on migration and invasion in hepatocellular carcinoma. The mRNA levels of ANLN in 20 paired hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and adjacent nontumoral tissues were examined by qRT-PCR. Knockdown of ANLN gene was performed by lentivirus-mediated RNA interference and the efficiency was analyzed by qRT-PCR and Western blot analysis. Migration assay and invasion assay were carried out to examine the effect of ANLN knockdown on cell migration and invasion. The mRNA and protein level of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) were analyzed by qRT-PCR and Western blot analysis, respectively. Our results showed that the mRNA level of ANLN was significantly upregulated in HCC tissues compared with adjacent tissues in 20 cases. The ANLN mRNA level was significantly associated

收稿日期: 2017-04-14 接受日期: 2017-06-12

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2016jcyjA0183)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13594721652, E-mail: jiangmwan@qq.com

Received: April 14, 2017 Accepted: June 12, 2017

This work was supported by the Chongqing Natural Science Foundation (Grant No.cstc2016jcyjA0183)

*Corresponding author. Tel: +86-13594721652, E-mail: jiangmwan@qq.com

网络出版时间: 2017-07-19 10:22:51

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170719.1022.004.html>

with migration and invasion. Lentivirus-mediated shRNA interference inhibited markedly both ANLN mRNA and protein levels. Knockdown of *ANLN* inhibited Huh-7 cell migration and invasion. Furthermore, knockdown of *ANLN* gene inhibited MMP9 mRNA and protein level. MMP9 overexpression significantly abolished inhibitory effect of *ANLN* knockdown on cell migration and invasion. Taken together, these data indicated that *ANLN* knockdown inhibited migration and invasion of HCC cell by regulating MMP9.

Keywords hepatocellular carcinoma; tumor invasion; actin-binding protein

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界范围内的多发性肿瘤,在全球恶性肿瘤死亡率中居第3位,目前居我国恶性肿瘤死亡率第2位。肝癌起病隐匿,绝大部分患者就诊时已处于中晚期,失去了手术治疗的最佳时机。同时,很多肝癌患者在初诊时已出现了转移,最终导致HCC疗效差、死亡率高^[1]。目前,HCC发生、发展、转移和复发的精确分子机制尚不完全清楚,阐明HCC发生、发展过程中的分子调节机制对于肝癌的早期诊断、转移预测以及干预治疗均具有重要意义。

ANLN是一种肌动蛋白结合蛋白,其基因位于染色体7q14.2,编码1 125个氨基酸,包括一个保守的N-端的肌动蛋白(F-actin)和肌球蛋白结合区域和一个保守的C-端pH结合域^[2]。研究发现,在多种肿瘤组织中ANLN表达水平均显著上调,包括乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌等^[3]。但是目前其在肝癌中的研究还未见报道。本研究主要探讨肝癌中ANLN表达水平,并通过RNA干扰技术敲低ANLN基因后,观察其对肝癌细胞迁移与侵袭能力的影响,为肝癌转移的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

ANLN抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司。GAPDH抗体购自碧云天生物技术公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的驴抗兔IgG抗体购自GE Healthcare公司。靶向ANLN的shRNA慢病毒购自GeneChem公司。shANLN-1和shANLN-2的序列分别为: 5'-GCC AAT ATT CAC TAC GTA TTA-3'、5'-CCT CAC ATC TAT AAC CAC AAA-3'; shCont序列为: 5'-GCA ACA AGA TGA AGA GCA CCA A-3'。Transwell小室(353097)和Invasion小室(354480)购自BD公司。Trizol试剂购自天根生化科技有限公司。质粒pCMV6-XL5和pCMV6-XL5-MMP9购自ORIGENE公司。

1.2 临床资料

随机选择2010~2014年收入我院行肝癌切除术的患者20例,其中男性16例,女性4例,年龄为31~68岁,诊断均为原发性肝癌(经B超、CT、MRI、AFP检测和术后病理学确诊)。提取肝癌组织和癌旁组织的总RNA,进行qRT-PCR检测。标本收集得到重庆市三峡中心医院伦理学会的批准。

1.3 细胞培养

肝癌细胞系Huh-7培养于含有10%胎牛血清的DMEM培养基中,在5% CO₂、37 °C孵箱中常规培养。

1.4 Western blot分析

细胞处理后,使用RIPA裂解液裂解细胞,提取总蛋白后经BCA法测蛋白质浓度。取等量(30 μg)蛋白质样品加热变性后上样,进行9% SDS-PAGE,使用90 V电压将蛋白转移至NC膜。NC膜用5%脱脂奶粉室温封闭3 h,加入一抗(ANLN抗体1:800稀释, MMP9抗体1:1 000稀释)4 °C摇床过夜。TBST洗膜5 min×3次,室温孵育二抗2 h(二抗1:3 000稀释),洗膜后ECL后显影。其中,以GAPDH为内参。

1.5 qRT-PCR相对定量方法

将表达shANLN-1、shANLN-2或shCont的慢病毒感染细胞3 d后,加入Trizol提取细胞总RNA,测定RNA浓度后进行逆转录反应。逆转录反应体系: 1 μg RNA、4 μL Master mix、1 μL酶、去RNase水补充至20 μL。混匀后按下述条件反应: 25 °C 5 min, 42 °C 30 min, 85 °C 5 min, 4 °C 5 min。取1 μL cDNA、5 μL SYBGreen、上游引物和下游引物(10 μmol/L)各0.2 μL,去RNase水3.6 μL。混匀后按下述条件反应: 94 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 15 s, 共计35个循环。每个实验样本均采用3管重复,重复3次,取其平均值。qRT-PCR引物信息见表1。

1.6 建立稳定低表达ANLN的细胞株

将Huh-7肝癌细胞接种于6孔板中,待细胞汇度达到60%~70%时,将表达shANLN-1、shANLN-2

表1 qRT-PCR引物序列
Table 1 Sequences of qRT-PCR primers

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequences
<i>ANLN</i>	F: 5'-CAT GGC CAG TCC AGG AGG TC-3' R: 5'-GGG ACC TTG TCC AGA ACA AAC TTA GTA-3'
<i>MMP2</i>	F: 5'-TCT TGA CCA GAA TAC CAT CG-3' R: 5'-TAC TTC ACA CGG ACC ACT TG-3'
<i>MMP7</i>	F: 5'-AGT GGT CAC CTA CAG GAT CGT A-3' R: 5'-ATC TCC TCC GAG ACC TGT CC-3'
<i>MMP9</i>	F: 5'-CAA CAT CAC CTA TTG GAT CC-3' R: 5'-GGG TGT AGA GTC TCT CGC TG-3'
<i>MMP10</i>	F: 5'-GGC CCT CTC TTC CAT CAT ATT-3' R: 5'-ACC TCA TTT CCT CTG ATG GC-3'
<i>MMP11</i>	F: 5'-GAC GCC ACT CAC CTT TAC TG-3' R: 5'-CGA AGT CGA TCA TGA TGT CAG-3'
<i>MMP13</i>	F: 5'-GCA GCT GTT CAC TTT GAG GA-3' R: 5'-CAC CAA TTC CTG GGA AGT CT-3'

或shCont慢病毒分别感染细胞(每孔加入4 μ L病毒液)。感染24 h后换液,用0.5 μ g/mL嘌呤霉素筛选1周。设立实验组(shANLN-1和shANLN-2)和对照组(shCont)。

1.7 细胞迁移实验

将Transwell小室(无Matrigel包被上室聚碳酸酯滤膜,滤膜孔径为8 μ m)放入6孔板中。将分别表达shANLN-1、shANLN-2或shCont的Huh-7细胞经胰蛋白酶消化后离心,重悬后进行细胞计数。将350 μ L无血清DMEM培养基加入Transwell上室,其中,含细胞数 5×10^4 /孔,下室加900 μ L DMEM培养基含10%胎牛血清,37 $^{\circ}$ C孵育8 h。取出小室使用100%甲醇固定细胞,并用0.1%结晶紫染色30 min,倒置显微镜拍照计数。

1.8 细胞侵袭实验

将分别表达shANLN-1、shANLN-2或shCont Huh-7细胞经胰蛋白酶消化后离心,重悬后进行细胞计数。将Matrigel包被上室(Matrigel包被上室聚碳酸酯滤膜,滤膜孔径为8 μ m)加入500 μ L无血清DMEM培养基含实验组或对照组Huh-7细胞 2×10^4 /孔,下室加含10%胎牛血清的DMEM培养基700 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育10 h。其余步骤同细胞迁移实验。

1.9 统计学分析

采用SPSS 11.5统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较用配对 t -test分析,多样本均数比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在肝癌组织中检测ANLN mRNA水平

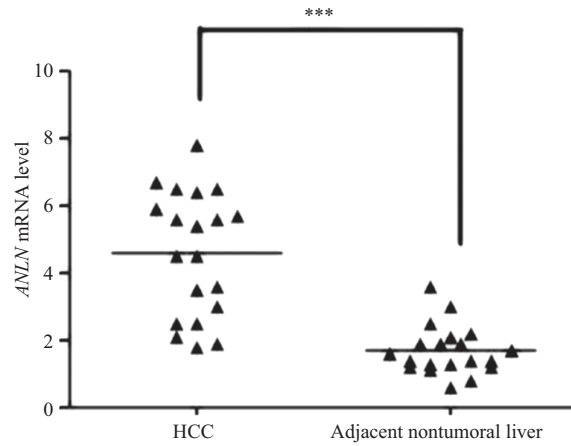
为了探索ANLN在肝癌细胞侵袭过程中发挥的作用,我们首先提取20对肝癌组织和癌旁组织样本中RNA并检测了ANLN的mRNA水平。通过qRT-PCR方法检测发现,肝癌组织中ANLN的mRNA水平显著高于癌旁组织($P < 0.001$,图1)。为了进一步分析,在肝癌样本中ANLN的表达水平和侵袭转移的相关性,将20例肝癌组织依据其有无转移情况分为两组,即肝癌转移组和肝癌无转移组。通过统计学分析发现,在肝癌转移组中,ANLN mRNA水平显著高于肝癌无转移组($P < 0.001$,图2),提示ANLN与肝癌的侵袭过程相关。

2.2 qRT-PCR和Western blot检测ANLN基因敲低效果

为了进一步分析ANLN在肝癌细胞中的功能,我们建立稳定低表达ANLN的Huh-7细胞和对照细胞。通过qRT-PCR检测发现,实验组细胞(shANLN-1和shANLN-2)中ANLN抑制率高达66%和73%(图3A)。应用Western blot检测细胞中ANLN的蛋白质水平,与shCont组相比,shANLN-1组和shANLN-2组均显示成功下调(图3B)。

2.3 ANLN的基因敲低对肝癌细胞迁移能力的影响

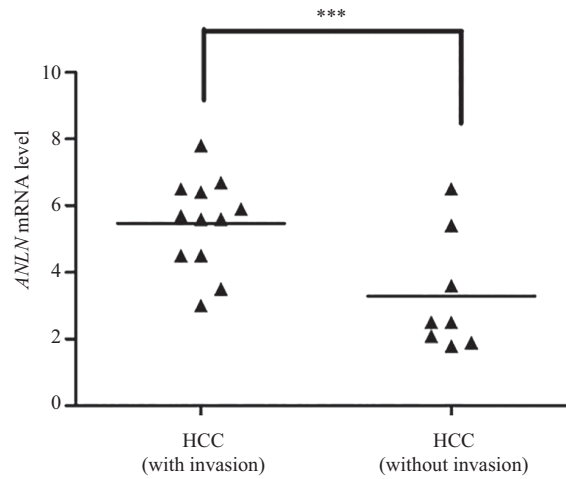
我们运用细胞迁移实验观察了不同处理组细胞的迁移能力。随机选择6个视野进行细胞计数,结果显示,对照组中穿过膜的细胞数为 19.0 ± 3.0 ,



*** $P < 0.001$.

图1 20对肝癌组织和癌旁组织中ANLN mRNA水平的比较

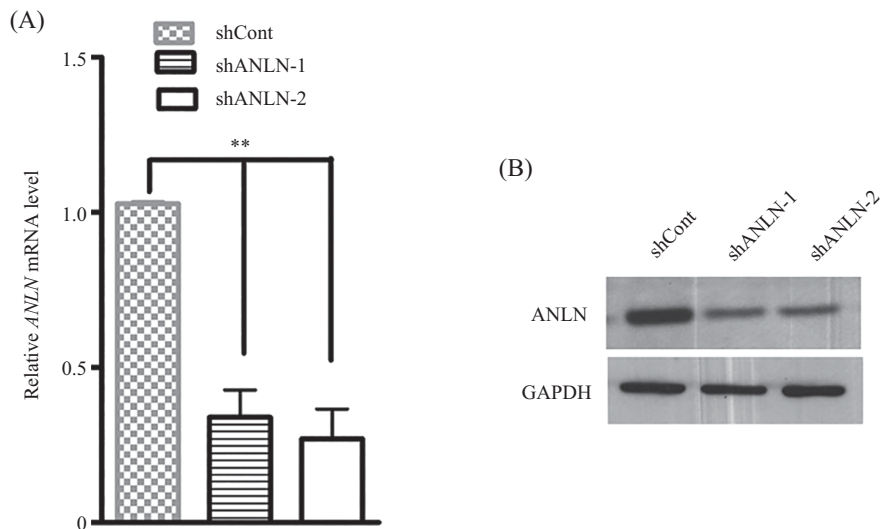
Fig.1 Comparison of ANLN mRNA in 20 paired HCC tissues with adjacent nontumoral tissues



*** $P < 0.001$.

图2 20例肝癌组织转移组和无转移组中ANLN mRNA水平的比较

Fig.2 The mRNA levels of ANLN in 20 HCC tissues with or without metastasis



A: qRT-PCR检测ANLN mRNA水平; ** $P < 0.01$ 。B: Western blot检测ANLN蛋白质水平。

A: the mRNA level of ANLN analyzed by qRT-PCR; ** $P < 0.01$. B: the protein level of ANLN analyzed by Western blot.

图3 qRT-PCR和Western blot检测细胞中ANLN基因敲低

Fig.3 The knockdown of ANLN gene analyzed by qRT-PCR and Western blot

shANLN-1组和shANLN-2组中细胞中穿过膜的细胞数分别为 7.5 ± 1.5 、 6.5 ± 2.3 (图4)。此结果提示,*ANLN*基因敲低可以显著抑制肝癌细胞的迁移能力。

2.4 *ANLN*的基因沉默对肝癌细胞侵袭的影响

我们进一步通过细胞侵袭实验分析了细胞侵袭能力的变化。随机选择6个视野进行细胞计数,结果显示,在未处理组穿过包被Matrigel膜的细胞数为 35.0 ± 11.0 , shANLN-1组和shANLN-2组中细胞中穿过包被Matrigel膜的细胞数分别为 9.0 ± 3.5 、 12.0 ± 4.2 。*ANLN*基因敲低的Huh-7细胞穿过包被Matrigel膜的细胞数明显减少,提示*ANLN*基因敲低可以抑制肝癌细胞的侵袭能力(图5)。

2.5 人肝癌细胞中*ANLN*基因敲低能抑制*MMP9*基因的表达

MMP具有降解组成细胞外基质各组分的能力,如胶原、层黏连蛋白、纤维结合蛋白等。在多种肿瘤中,MMP与肿瘤的转移侵袭密切相关。为了阐明*ANLN*对人肝癌细胞转移侵袭影响的分子机制,在敲低*ANLN*的细胞中,我们应用qRT-PCR检测多个MMP家族成员的mRNA水平。结果显示,与对照细胞相比,shANLN-1组和shANLN-2组中*MMP9* mRNA水平分别降低了61%和65%(图6)。*ANLN*基因敲低对其他家族成员的mRNA水平未见明显影响。我们进一步发现,*ANLN*基因敲低可以显著下调

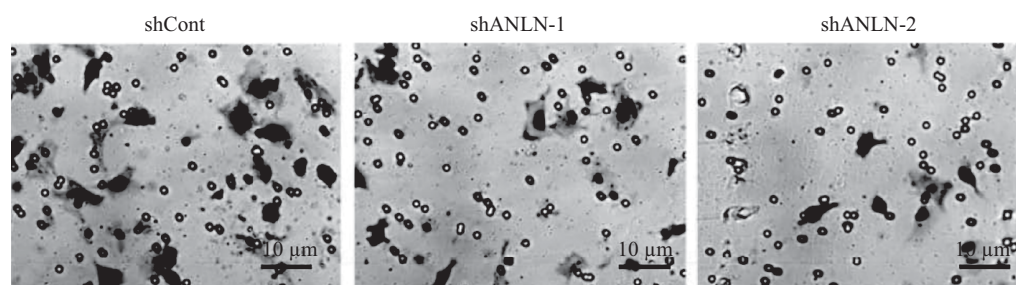


图4 细胞迁移实验检测*ANLN*基因敲低对肝癌细胞迁移能力的变化

Fig.4 The effect of *ANLN* knockdown on cell migration examined by migration assay

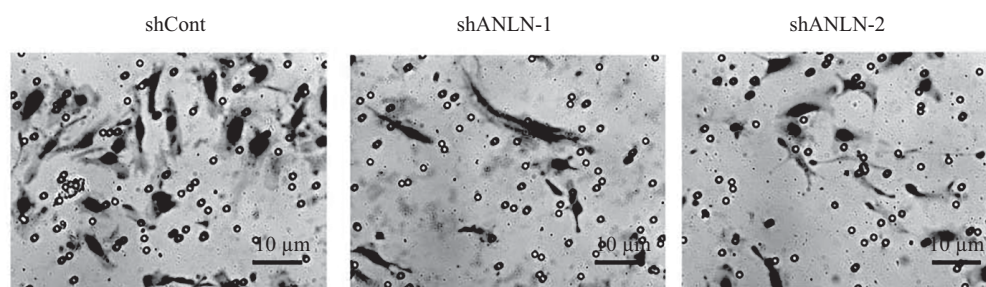
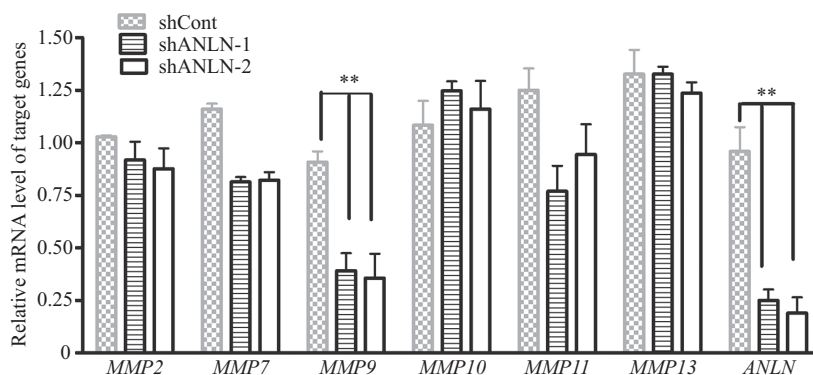


图5 细胞侵袭实验检测*ANLN*基因敲低对细胞侵袭能力的变化

Fig.5 The effect of *ANLN* knockdown on cell invasion examined by invasion assay



** $P < 0.01$.

图6 qRT-PCR检测*ANLN*基因敲低Huh-7肝癌细胞对MMP家族成员mRNA水平的影响

Fig.6 The mRNA levels of MMP family members in *ANLN* knockdown Huh-7 cells analyzed by qRT-PCR

MMP9的蛋白质水平(图7)。

2.6 ANLN基因敲低通过下调MMP9抑制肝癌细胞的迁移与侵袭

为了进一步证实MMP9在ANLN调控的细胞迁移与侵袭过程中的重要作用,我们在Huh-7细胞上

敲低ANLN并同时过表达MMP9。在验证ANLN敲低和MMP9过表达都是成功(图8)的基础上,我们发现,ANLN敲低可以显著抑制肝癌细胞的迁移;敲低ANLN同时过表达MMP9,细胞的迁移与侵袭能力得到显著恢复(图9)。此结果说明,过表达MMP9可以

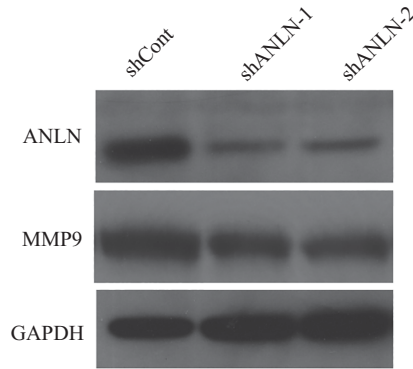


图7 Western blot检测ANLN基因敲低对MMP9蛋白质水平的影响

Fig.7 The protein level of MMP9 in ANLN knockdown cells analyzed by Western blot analysis

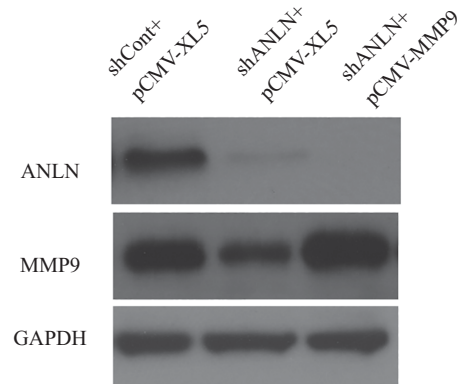


图8 Western blot检测ANLN、MMP9蛋白质水平

Fig.8 The protein levels of ANLN and MMP9 analyzed by Western blot

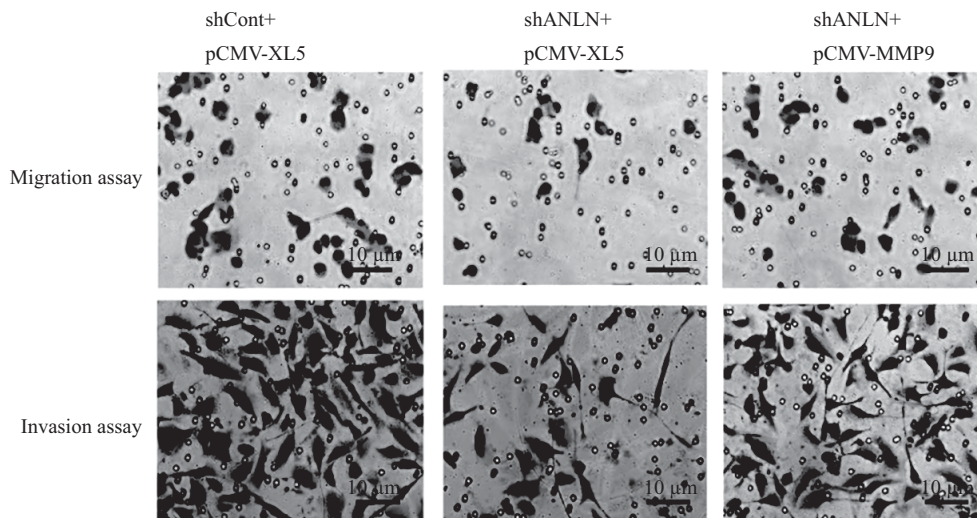


图9 过表达MMP9对ANLN敲低调控Huh-7肝癌细胞的迁移与侵袭能力的影响

Fig.9 The effect of MMP9 overexpression on the decreased migration and invasion in ANLN knockdown Huh-7 cells

拮抗ANLN基因敲低对肝癌细胞迁移侵袭的抑制作用。

3 讨论

许多研究发现, ANLN在胞质分裂中具有重要作用。在分裂过程中, ANLN从细胞转移到应力纤维上, 从而参与细胞肌动蛋白的解离过程^[4]。细胞进入分裂最后阶段, ANLN的表达逐渐增高并与RhoA、肌动蛋白(actin)、肌球蛋白II(myosin II)和隔膜蛋白(septins)形成肌动蛋白收缩环^[5]。在人类细胞中, ANLN的基因缺失可以导致分裂后期肌动蛋白收缩环的形成^[6]。

目前多篇报道发现, ANLN与肿瘤的发生密切相关。文献报道, ANLN mRNA水平在乳腺癌、卵巢癌、肺癌、胰腺癌等肿瘤组织中表达均异常增高。ANLN在非小细胞肺癌细胞中通过与RhoA相互作用从而促进肺癌细胞的侵袭能力; 同时, 高表达ANLN的肺癌患者预后差^[7]。Olakowski等^[8]报道, ANLN在约50%的胰腺癌中高表达, 其有望成为诊断胰腺癌的一个新的分子标志物。Zhou等^[9]报道, 在乳腺癌中, ANLN基因敲低可以抑制乳腺癌细胞的增殖能力和迁移侵袭能力。本研究发现, ANLN在肝癌组织中mRNA水平显著增高, 并且ANLN的基因敲低可以显著抑制肝癌细胞的迁移侵袭能力。

迁移和侵袭是恶性肿瘤的重要特征, 而上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是这个过程中非常重要的一步。目前, 已有多条信号通路可以参与肝癌细胞的迁移侵袭过程。例如, PI3K/AKT/mTOR信号通路^[10]中AKT可磷酸化内皮型一氧化氮合酶, 促成血管生成, 并促进肝癌细胞转化和血管侵袭。mTOR的磷酸化水平与肝癌细胞的浸润密切相关^[11]。有研究报道, E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达降低与WNT信号通路活化均可导致 β -联蛋白(β -catenin)表达增加从而加速EMT的进程, 最终促进肝癌细胞迁移和侵袭^[12]。另一方面, 在肝癌的侵袭和转移过程中, 降解细胞外基质成分是非常重要的一步。MMP是已知的唯一能降解原纤维胶原并能降解所有的细胞外基质成分且与肿瘤转移的其他过程相关的一类酶。研究发现, 香叶木素可以通过调控MMP2和MMP9的表达, 从而抑制肝癌细胞的转移侵袭^[13]。表观调控蛋白4(bromodomain-containing protein 4, BRD4)通过活

化MMP2和MMP9, 可以显著增加肝癌细胞的转移侵袭能力^[14]。高尔基体蛋白73(Golgi protein73, GP73)通过激活MMP13, 促进肝癌细胞的转移侵袭^[15]。而目前关于ANLN参与肝癌转移侵袭过程未见报道, 其具体机制也更不清楚。目前, 关于ANLN参与肿瘤侵袭转移的过程的文献非常有限。有研究发现, ANLN可以参与在非小细胞肺癌细胞的侵袭转移过程, 其具体机制ANLN可与Rho GTP酶结合并形成复合物, 从而调节细胞骨架的重组, 为细胞迁移提供动力^[7]。在肝癌细胞中, 我们的研究发现, ANLN基因敲低可以显著下调基质金属蛋白酶MMP9, MMP9的过表达可以拮抗ANLN基因敲低对肝癌细胞转移侵袭能力的抑制作用。基于以上发现, 我们推测, ANLN作为一种肌动蛋白结合蛋白, 在肝癌细胞的转移侵袭过程中, 可能主要通过调控基质金属蛋白酶的表达, 从而参与降解细胞外基质成分等过程, 调节肿瘤细胞的转移侵袭过程。

本研究初步发现了ANLN在肝癌细胞迁移侵袭过程中的重要作用。本课题组将进一步深入研究ANLN基因敲低与肝癌细胞迁移侵袭的分子机制, 从而为肝癌的基因治疗探索新的分子生物学靶点。

参考文献 (References)

- 1 Rimassa L, Santoro A. The present and the future landscape of treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010; 42(3): S273-80.
- 2 Liang PI, Chen WT, Li CF, Li CC, Li WM, Huang CN, *et al.* Subcellular localisation of anillin is associated with different survival outcomes in upper urinary tract urothelial carcinoma. *J Clin Pathol* 2015; 68(12): 1026-32.
- 3 Piekny AJ, Maddox AS. The myriad roles of anillin during cytokinesis. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(9): 881-91.
- 4 Pacquelet A, Uhart P, Tassan JP, Michaux G. PPAR-4 and anillin regulate myosin to coordinate spindle and furrow position during asymmetric division. *J Cell Biol* 2015; 210(7): 1085-99.
- 5 Hickson GR, O'Farrell PH. Anillin: A pivotal organizer of the cytokinetic machinery. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(3): 439-41.
- 6 Piekny AJ, Glotzer M. Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. *Curr Biol* 2008; 18(1): 30-6.
- 7 Suzuki C, Daigo Y, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Ito T, *et al.* ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Cancer Res* 2005; 65(24): 11314-25.
- 8 Olakowski M, Tyszkiewicz T, Jarzab M, Król R, Oczko-Wojciechowska M, Kowalska M, *et al.* NBL1 and anillin (ANLN) genes over-expression in pancreatic carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47(2): 249-55.

- 9 Zhou W, Wang Z, Shen N, Pi W, Jiang W, Huang J, *et al.* Knockdown of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer. *Mol Cell Biochem* 2015; 398(1/2): 11-9.
- 10 Lin JJ, Su JH, Tsai CC, Chen YJ, Liao MH, Wu YJ. 11-epi-Sinulariolide acetate reduces cell migration and invasion of human hepatocellular carcinoma by reducing the activation of ERK1/2, p38MAPK and FAK/PI3K/AKT/mTOR signaling pathways. *Mar Drugs* 2014; 12(9): 4783-98.
- 11 Chen X, Wang Y, Tao J, Shi Y, Gai X, Huang F, *et al.* mTORC1 up-regulates GP73 to promote proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells and growth of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology* 2015; 149(3): 741-52.
- 12 Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers, and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1796(2): 75-90.
- 13 Liu J, Wen X, Liu B, Zhang Q, Zhang L, Miao H, Zhu R. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9. *Mol Med Rep* 2016; 13(3): 2401-8.
- 14 Wang YH, Sui XM, Sui YN, Zhu QW, Yan K, Wang LS, *et al.* BRD4 induces cell migration and invasion in HCC cells through MMP-2 and MMP-9 activation mediated by the Sonic hedgehog signaling pathway. *Oncology Letter* 2015; 10(4): 2227-32.
- 15 Jin D, Tao J, Li D, Wang Y, Li L, Hu Z, *et al.* Golgi protein 73 activation of MMP-13 promotes hepatocellular carcinoma cell invasion. *Oncotarget* 2015; 6(32): 33523-33.