

Musashi1 正调控肝细胞癌细胞的生长并促进其增殖

李杰, 闫堃, 杨屹, 李华, 王志东, 徐心

西安交通大学第二附属医院普外科, 陕西 西安 710004

摘要:目的 Musashi1(MSI1)属于RNA结合蛋白(RBP)家族,可特异性地结合mRNA并对蛋白质的翻译起激活或抑制作用,但它在肝细胞癌(HCC)中的功能还未被深入探究。本课题主要探讨MSI1在HCC细胞生长及增殖中的作用及机制。方法 构建MSI1过表达或敲除细胞系。采用免疫组化和Western blot技术检测MSI1在HCC组织中的表达。采用MTT、流式等方法探讨过表达或沉默MSI1对HCC细胞增殖、细胞活力及细胞周期分布的影响,同时检测细胞内PCNA、Cyclin D1以及Wnt/ β -catenin通路关键分子APC和 β -catenin的表达。结果 MSI1在HCC组织中的表达比非肿瘤的癌旁组织高。与对照细胞相比,HepG2细胞过表达MSI1不仅显著促进了其生长(7 d时的MTT值从 0.52 ± 0.12 大幅增加至 1.01 ± 0.14 , $P < 0.01$),且处于G0/G1期的细胞比率也从 $(58.42 \pm 3.18)\%$ 降至 $(40.67 \pm 1.22)\%$,而S期细胞比率则从 $(28.51 \pm 1.93)\%$ 增加至 $(40.06 \pm 1.92)\%$ ($P < 0.01$)。与此同时,细胞PCNA和Cyclin D1蛋白的表达明显上调。反之,敲除MSI1使Huh7细胞的生长显著受抑,更多细胞停滞于G0/G1期(G0/G1期细胞比率从 $(43.83 \pm 1.57)\%$ 增加至 $(62.84 \pm 1.22)\%$ ($P < 0.01$),同时细胞PCNA和Cyclin D1的表达则显著下调。MSI1的过表达可以降低Wnt/ β -catenin信号通路分子APC但增加 β -catenin的表达,反之MSI1的敲低却可以增加细胞内APC而降低 β -catenin的表达。结论 MSI1可以通过正调控HCC细胞的生长及细胞周期的进程而加速HCC病程的进展,其作用可能是通过激活Wnt/ β -catenin信号通路实现的。

关键词:肝细胞癌;MSI1;细胞增殖

Musashi-1 positively regulates growth and proliferation of hepatoma cells *in vitro*

LI Jie, YAN Kun, YANG Yi, LI Hua, WANG Zhidong, XU Xin

Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004

Abstract: Objective To investigate the regulatory role of Musashi-1 (MSI1) in the proliferation and growth of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** We examined the expression of MSI1 in HCC and paired adjacent tissues from 24 patients using immunohistochemistry and Western blotting. A MSI1-expressing vector was constructed and stably transfected into HepG2 cells, and short hairpin RNAs (shRNAs) that targeted MSI1 mRNA were ligated into the vector and stably transfected in Huh7 cells. The effects of MSI1 overexpression and silencing on the proliferation, viability and cell cycle of HepG2 cells were investigated using flow cytometry or MTT assay. The expressions of PCNA, cyclin D1, APC and β -catenin in the HCC cells were detected with Western blotting. **Results** MSI1 expression was significantly up-regulated in HCC tissues as compared with that in the adjacent tissues. Overexpression of MSI1 in HepG2 cells resulted in significantly enhanced cell growth ($P < 0.01$) and significantly reduced G0/G1 phase cells from $(58.42 \pm 3.18)\%$ to $(40.67 \pm 1.22)\%$ and increased S phase cells from $(28.51 \pm 1.93)\%$ to $(40.06 \pm 1.92)\%$ ($P < 0.01$), causing also increases in the expressions of PCNA and Cyclin D1. Knockdown of MSI1 in Huh7 cells obviously inhibited the cell growth and caused cell cycle arrest at the G1/S phase ($P < 0.01$) with reduced protein expressions of PCNA and cyclin D1. Overexpression of MSI1 in HepG2 cells also down-regulated the expression of APC and up-regulated the expression of β -catenin protein, while MSI1 knockdown caused reverse changes in Huh7 cells. **Conclusion** MSI1 promotes the progression of HCC through positive modulation of cell growth and cell cycle *via* the Wnt/ β -catenin pathway.

Keywords: hepatocellular carcinoma; Musashi-1; proliferation

肝细胞癌(HCC)是最为常见的恶性肿瘤之一,在全球癌症致死率中排名第3^[1-2]。尽管在过去的几十年里,对其治疗已取得了很大的进展,但大多数患者一旦被确诊为HCC仍会在1年内死亡。因而,HCC瘤细胞

侵袭性生长、增殖速度快、易复发的分子机制仍需更为深入的探讨^[3-5]。

Musashi1(MSI1)是哺乳动物的果蝇蛋白同源类似物,为神经前体细胞不对称分裂所必需,与细胞自我更新的维持和分化关系密切。最新研究表明,MSI1在包括骨肉瘤^[6]、肺癌^[7]、食管鳞状细胞癌^[8]、胃癌^[9]、胶质瘤^[10]和女性生殖系统^[11-12]等多种类型肿瘤的发生、发展中具有重要作用。MSI1可通过多种信号通路参与调节细胞周期、细胞凋亡、侵袭以及增殖等过程。因而,MSI1是潜在的新型致癌基因之一。已有资料显示,它可通过调

收稿日期:2019-01-22

基金项目:国家自然科学基金(81001588);陕西省自然科学基金(2017JM8095)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81001588).

作者简介:李杰,博士,副主任医师,E-mail: lijie.0531@hotmail.com

通信作者:徐心,副主任医师,E-mail: 397769648@qq.com

节包括 MYCN、PTEN、NUMB 等基因在内的 Notch、mTOR、SMAD 及 Wnt 通路的活化参与肿瘤的扩散以及分化,并最终影响患者的生存率^[13-14]。Jones 等^[15]的研究结果还表明,在胶质瘤细胞的生长及肿瘤的形成过程中,MSI1 的作用还与 PI3K/AKT 信号通路的活化有关。

虽然上述研究成果对 MSI1 的致癌作用有了初步的探讨,但其对 HCC 病程进展有何意义目前还未见报道,需要进一步的深入探究。本研究重点关注 MSI1 对 HCC 肿瘤细胞生长、细胞周期进展等方面的影响,以期对肝癌的治疗寻找新的干预靶点。

1 资料和方法

1.1 主要试剂

HeLa、HepG2 和 HuH7 等细胞购自中国科学院上海细胞库,DMEM 培养基 (Hyclone), Lipofectamine 2000 转染试剂、胎牛血清 (Invitrogen), 抗 MSI1、抗 PCNA、抗 Cyclin D1、抗 β -catenin、抗 APC 以及抗 β -actin—抗 (Santa Cruz), pIRES2-EGFP 载体 (Clontech), 碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 及 RNaseA (Sigma) 均由相关公司购得。引物由上海生工公司合成,其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人体肝癌组织 收集 2012~2013 年间在西安交通大学医学部第二附属医院接受治疗的 24 例肝癌患者的临床标本。所有患者在标本采集之前均未接受化疗、免疫治疗或放射治疗。该研究获得了西安交通大学医学院伦理审查委员会的批准。

1.2.2 免疫组化 4 μ m 的组织切片经脱蜡、水化,在蒸汽压力锅中用柠檬酸盐缓冲液 (2 mmol/L 柠檬酸和 10 mmol/L pH 6.0 的柠檬酸钠) 处理并进行抗原修复。室温下用 3% H_2O_2 处理后,将切片 4 $^{\circ}C$ 下与抗 MSI1—抗温育过夜,随后与二抗室温孵育 20 min,使用 0.05% 的 DAB 显色,细胞核用苏木精复染。以 PBS 替代—抗设为阴性对照。染色结果在显微镜下观察,胞质中有棕黄色颗粒者为阳性表达细胞,不着色者为阴性表达细胞。在原发性肝癌组织及相邻非癌组织分别随机选取 3 个视野并拍摄图片,采用 Image J 图像分析软件测量每个视野的积分光密度 (IOD) 和图片面积 (Area), 计算平均光密度 (MD), $MD = IOD / Area$, 取这几个视野 MD 的平均值为该样本的免疫组化测定结果,以 MD 表示 MSI1 蛋白的表达水平。

1.2.3 细胞培养 实验用 HeLa、HepG2 和 HuH7 等细胞系均培养于含有 10% 胎牛血清 (FBS) 及 1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中。细胞生长于 37 $^{\circ}C$, 5% CO_2 的环境中, 2~3 d 采用胰酶进行消化传代。

1.2.4 蛋白质印迹实验 采用添加有蛋白酶抑制剂的裂

解液 (RIPA) 处理肝癌组织或肝癌细胞系,提取总蛋白进行定量。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量蛋白,将其转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭后—抗孵育、4 $^{\circ}C$ 过夜,二抗孵育后化学发光法显色, β -actin 作为内参对照。蛋白质印迹条带密度通过软件 Image J 分析。

1.2.5 质粒构建 以 cDNA 模板及特异引物通过聚合酶链反应扩增编码 MSI1 的 DNA 片段。将扩增后的 DNA 片段插入到载体-pIRES2-增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的多克隆位点中用以生成 pIRES2-EGFP-MSI1。

为生成表达 MSI1 特异性小干扰 RNA (siRNA) 的质粒,使用在线 siRNA 设计软件 Ambion 设计针对 MSI1 mRNA 的 siRNA 寡核苷酸,并将其克隆到 pSilencer4.1-neo 载体中。采用 Lipofectamine 2000 转染试剂进行转染。将细胞维持在含有 10% FBS 和 1000 μ g/mL G418 的新鲜培养基中 3~4 周。提取稳定转染的克隆并进行鉴定。引物信息如下:

pIRES2-EGFP-MSI1 F: 5'-gttgatcgcacatggagactgacgcgccagcc-3';

pIRES2-EGFP-MSI1 R: 5'-gttgatcctcagtggtaccattggtgaag-3';

shMSI1 F: 5'-gatcctgttcatggtgttccaattcaagagattcgaaccatgtaacatca-3';

shMSI1 R: 5'-gacaatgtaccacaaagcttaagttgagaaagctttggtacattgtagttcga-3'。

1.2.6 细胞增殖和活力分析 根据标准操作流程,采用 MTT 法评估细胞活力,每组设 6 个复孔。将大约 1000 个细胞接种在 96 孔板中,细胞干预完成后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 液 20 μ L,继续孵育 4 h 后,弃上清液,再加入 100 μ L 的 DMSO,室温充分振荡,使紫色结晶充分溶解,测定各孔 A_{490nm} 值评估细胞的增殖情况。

1.2.7 细胞周期检测 收集细胞 (1×10^6 个) 并用 PBS 洗涤,4 $^{\circ}C$ 条件下 75% 冰乙醇固定过夜。细胞重悬于含有 10 μ L PI (50 μ g/mL) 及 10 μ L RNaseA (10 μ g/mL) 的 100 μ L PBS 中,于 4 $^{\circ}C$ 黑暗条件下孵育 30 min。细胞周期分布通过美国 BD 公司的 FACSCalibur 检测,并采用 Flow Jo 7.6.1 软件进行分析。

1.2.8 qRT-PCR 提取细胞总 RNA,逆转录为 cDNA, qRT-PCR 进行扩增。Cyclin D1 正向引物: 5'-ccatccagtgaggtttgtc-3', 反向引物: 5'-gtgggacaggtggccttt-3'; APC 正向引物: 5'-cccgatgaacaagttacc-3', 反向引物: 5'-agcagccatctcacctcaaa-3'; C-myc 正向引物: 5'-ggctcctggcaaaaggtca-3', 反向引物: 5'-ctgcgtagttgtgctgatgt-3'; β -actin 正向引物: 5'-gtgacgttgacatccgtaaa-3', 反向引物: 5'-taaacgcagctcagtaaca-3'。聚合酶链反应扩增条件: 95 $^{\circ}C$ 预变性 10 s; 95 $^{\circ}C$ 变性 5 s, 56 $^{\circ}C$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 s, 共 40 个循环。 β -actin 作为内参对照,目的基因相对表

定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.3 统计处理

统计软件采用SPSS 18.0,数据以均数±标准差表示,组间差异使用*t*检验或单因素ANOVA分析进行比较, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达MSI1的HepG2细胞及沉默MSI1的Huh7细胞的构建

由于现有HCC细胞系的来源与生物学行为存在较大差异,我们首先分析了本实验中所采用的HepG2及Huh7细胞系中MSI1的表达。以宫颈癌细胞系HeLa作

为阳性对照,结果显示,不同细胞系中MSI1的含量不同,HepG2细胞中的MSI1表达水平较低,而Huh7细胞中MSI1的表达水平则相对较高(图1A)。

为了明确MSI1是否能够调节肝癌细胞的增殖,我们构建了MSI1表达载体并将其稳定转染进HepG2细胞中,同时也设计了专门针对MSI1 mRNA的shRNAs并将其连接到pSilencer4.1-neo线性载体上,从而获得了HepG2-MSI1及Huh7-shMSI1细胞。如图所示,与HepG2-EGFP细胞相比,HepG2-MSI1细胞中MSI1的表达大幅增加,而Huh7-shMSI1细胞系中的MSI1基本被敲除了(图1B)。

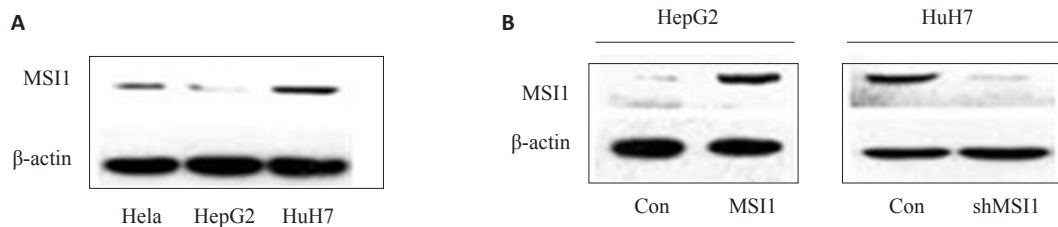


图1 HepG2-MSI1细胞与Huh7-shMSI1细胞的构建与鉴定

Fig.1 Expression of MSI1 in HeLa, HepG2 and Huh7 cells (A) and in HepG2-MSI1 and Huh7-shMSI1 cells (B) detected by Western blotting.

2.2 人体肝癌组织中MSI1蛋白的表达

人们已经在包括胶质瘤、乳腺癌和膀胱癌等人体多种癌组织中检测到MSI1的表达。Shu等发现MSI1在小鼠肝脏及人类HCC细胞系中均有表达^[8]。但MSI1的表达水平与HCC发生间的关系尚未深入研究。我们采用免疫组化法检测人HCC及其邻近非癌组织中MSI1的表达情况。结果表明,MSI1主要定位于阳性细胞的胞质中,且HCC肿瘤细胞中的MSI1免疫染色信号较强(图2A)。Western blot结果也表明HCC癌组织中MSI1的表达水平显著高于非癌组织(图2B)。以上结果均提示作为致癌基因的MSI1其功能可能与HCC肿瘤的进展有关。

2.3 MSI1可以正调控HCC细胞的增殖

随后,我们采用MTT比色法检测MSI1对HCC细胞增殖的影响。过表达MSI1的HepG2-MSI1细胞较作为对照的HepG2-EGFP细胞具有更强的增殖能力,而敲除了MSI1,Huh7-shMSI1细胞较对照细胞的增殖及活力明显受抑(图3)。

2.4 MSI1参与HCC细胞周期的调控

为了进一步探讨MSI1调控的HCC细胞增殖能力改变是否与其细胞周期进程的变化相关,我们采用流式

分析技术检测了HepG2-MSI1、Huh7-shMSI1及其相应对照细胞内的DNA含量。图4A、4B显示由于MSI1的过表达,处于G0/G1期的HepG2-MSI1细胞比率从58.42%降至40.67% ($P < 0.01$),而S期细胞比率则从28.51%增加至40.06% ($P < 0.01$)。同时,因MSI1的敲除,处于G0/G1期的Huh7-shMSI1细胞比率显著增加至62.84%,而S期细胞比例则降至27.69%。

2.5 MSI1正调控细胞周期相关分子PCNA及Cyclin D1的表达

我们也采用蛋白印迹技术对细胞增殖相关分子PCNA及Cyclin D1在MSI1促HCC作用中的变化进行了检测。如图5所示,与对照细胞相比,HepG2-MSI1细胞中PCNA及Cyclin D1的表达显著升高,而Huh7-shMSI1细胞中二者的表达降低非常明显。

2.6 Wnt通路在MSI1促HCC细胞增殖中的地位

为了深入探究MSI1调控肝癌细胞生长和增殖的细胞分子机制,我们进一步分析了MSI1的可能作用靶点。大量文献报道已证实Cyclin D1的表达受到Wnt/ β -catenin通路的调控。我们进一步对Wnt/ β -catenin通路中的一些经典靶基因的mRNA表达情况进行了检测。在过表达MSI1的HepG2-MSI1细胞中,Wnt通路关键抑制因

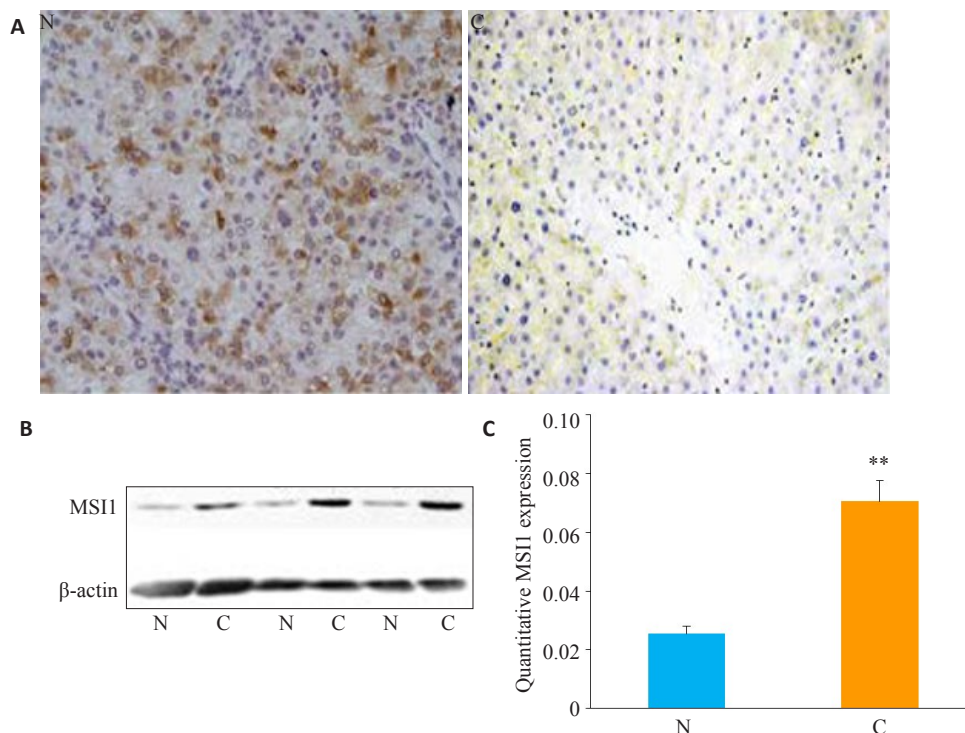


图2 人HCC(C)和相邻非癌组织(N)中MSI1的表达情况

Fig.2 Expression of MSI1 in HCC tissues (C) and adjacent tissues (N) detected by immunohistochemical staining (A, Original magnification: $\times 100$) and Western blotting (B). C: Statistical analysis of MSI1 expression in HCC tissues (C) and adjacent tissues (N). ** $P < 0.01$ vs N.

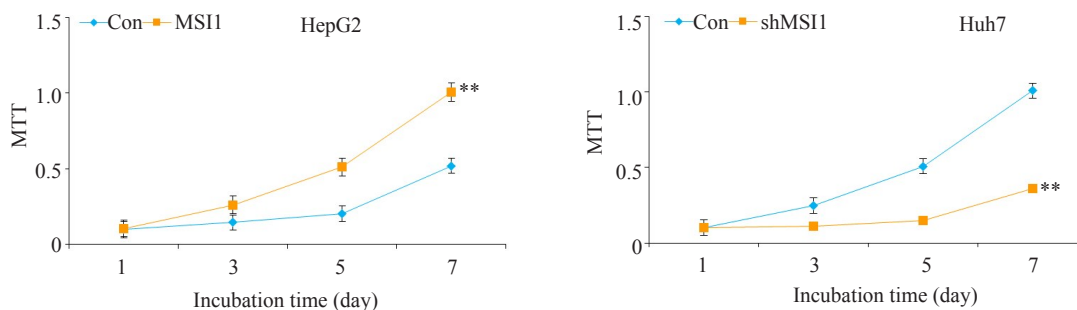


图3 MSI1对HepG2和Huh7细胞增殖及活力的影响

Fig.3 Effect of modulation of MSI1 expression on proliferation and activity of HepG2 and Huh7 cells. ** $P < 0.01$ vs Con.

子APC的mRNA表达水平与对照组细胞相比下调明显 (0.51 ± 0.01 vs 1.00 ± 0.02 , $P < 0.01$), 与此同时 Cyclin D1 的表达水平与对照组相比显著升高 (3.49 ± 0.06 vs 0.96 ± 0.04), C-myc的变化趋势与 Cyclin D1 一致。在 MSI1 敲低的 Huh7-shMSI1 中, APC 的 mRNA 表达水平与对照组细胞相比则显著增高 (2.46 ± 0.04 vs 1.01 ± 0.01), 而 Cyclin D1 与 C-Myc 的表达水平与对照组相比下调显著, 与 HepG2-MSI1 细胞中的情况相反(图6A,B)。蛋白水平的检测结果如图6C所示, 与对照细胞相比, HepG2-MSI1 细胞中 Wnt 通路关键分子 β -catenin 的表达显著增高, 而其抑制分子 APC 的表达却明显降低。Huh7-shMSI1 细胞中二者的表达与 HepG2-MSI1 细胞中的情

况相反。

3 讨论

MSI1 是一种对维持干细胞状态具有重要作用的 RNA 结合蛋白。大量研究表明 MSI1 主要表达于人类正常的干细胞, 包括肠道、造血系统和生殖系统的细胞等^[16-19]。最新研究发现 MSI1 在包括 HCC 在内的多种恶性肿瘤组织中也有较高表达^[20-21], 但其在 HCC 发生发展中的作用还远未探明。

本实验中, 我们首先检测人体 HCC 肿瘤及其邻近非癌组织中 MSI1 的表达情况。免疫组化及 Western Blot 实验结果均证实了 HCC 肿瘤组织中 MSI1 的高表

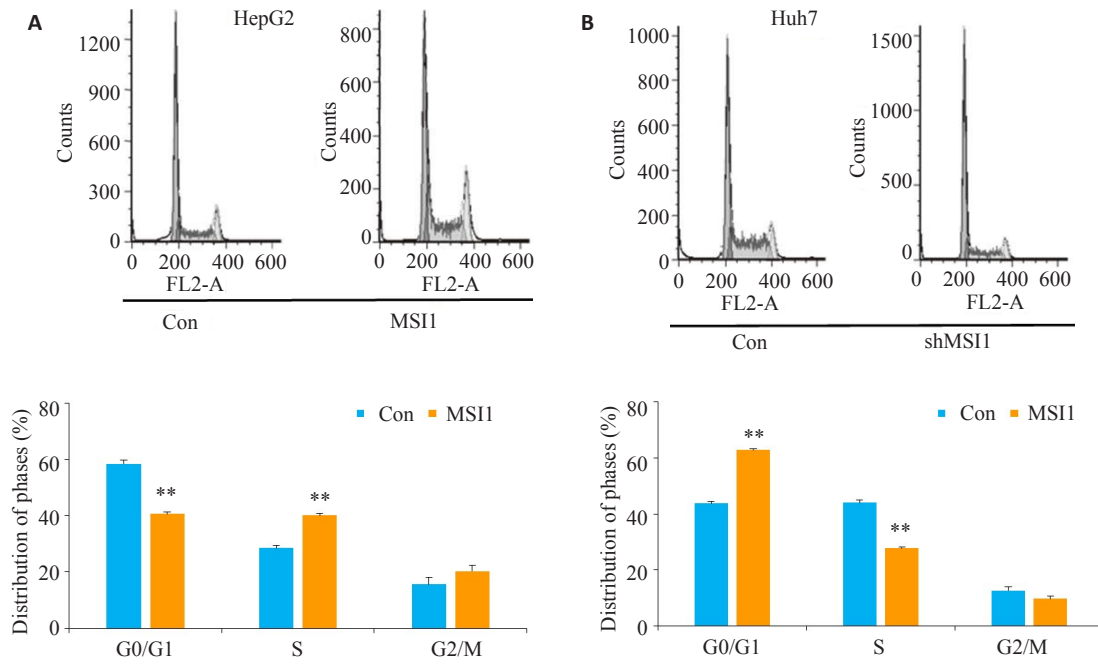


图4 MSI1对HepG2和Huh7细胞周期的调控

Fig.4 Effect of modulation of MSI1 expression on cell cycle distribution in HepG2 and Huh7 cells. ** $P < 0.01$ vs Con.

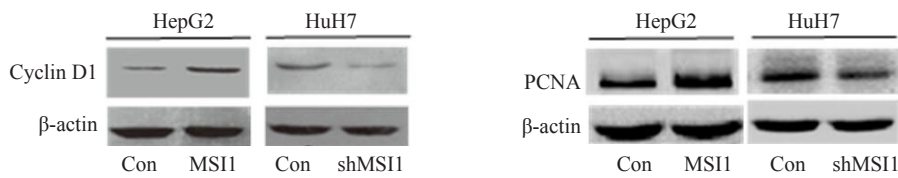


图5 MSI1正调控细胞周期相关分子PCNA及Cyclin D1的表达

Fig.5 Effect of modulation of MSI1 expression on the expression of PCNA and cyclin D1 in HepG2 and Huh7 cells.

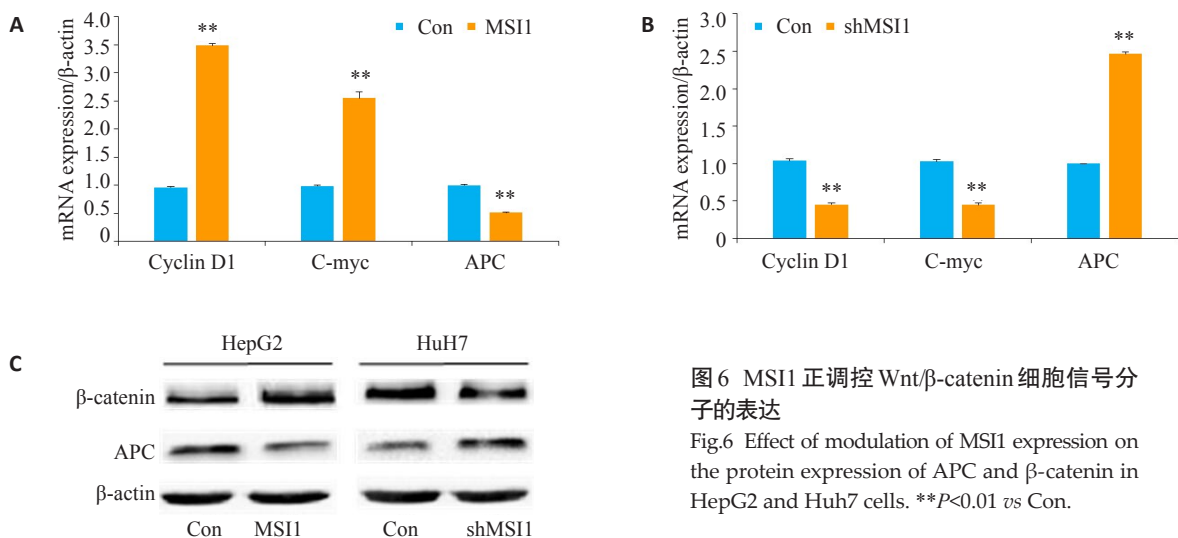


图6 MSI1正调控Wnt/β-catenin细胞信号分子的表达

Fig.6 Effect of modulation of MSI1 expression on the protein expression of APC and β-catenin in HepG2 and Huh7 cells. ** $P < 0.01$ vs Con.

达,表明MSI1确实可能参与了人体HCC病程的进展(图1)。随后,我们选择了目前国际上最为常用的两个

人源性的HCC细胞系:HepG2及Huh7^[22-24],同时检测了这两种细胞内MSI1的表达情况。结果表明,MSI1在

Huh7细胞中的表达水平较高,而在HepG2细胞系中的表达则较低。为了进一步深入观察MSI1对HCC细胞生长和增殖的影响,我们随之采用基因克隆技术在上述两个细胞系中过表达或敲除了MSI1基因。图2B结果显示实验结果较为满意,我们成功的获得了HepG2过表达而Huh7细胞敲除MSI1的工具细胞。MTT实验结果显示(图3),HepG2中MSI1的高表达促进了细胞的生长及增殖,而Huh7细胞中MSI1的敲低则显著抑制了细胞的生长及增殖。本结果提示了MSI1在HCC细胞增殖及肿瘤生长过程中的重要作用。

细胞周期测定是检测细胞增殖状况的一项常用技术^[25-26],我们随之采用流式细胞仪观察MSI1对上述细胞周期分布的影响。结果显示,MSI1的过表达使处于G0/G1期的HepG2-MSI1细胞比率显著降低,而S期细胞比率大幅增加,差异十分明显($P<0.05$)。而MSI1的敲除,处于G0/G1期的Huh7-shMSI1细胞比率明显增多,而S期的细胞比例则大幅降低(图4A、B)。细胞停滞于G0/G1期常常表明其向DNA复制加倍的S期及M期转化受阻,最终造成肿瘤细胞生长缓慢和增殖活性降低^[27-28]。因此,我们上述的结果显示MSI1对HCC细胞的侵袭性生物学行为及细胞周期的进展有促进作用。

已有资料显示,MSI1可以调节与细胞增殖、细胞周期和肿瘤发生相关的多个基因的表达,其中包括DKK1、APC、 β -catenin、C-myc、Cyclin D1和Cyclin D2等。我们随之进一步检测了细胞Cyclin D1以及在细胞增殖启动过程中起重要作用、并与细胞DNA合成关系密切的PCNA蛋白的表达情况。结果表明,当HepG2细胞过表达MSI1时,Cyclin D1和PCNA蛋白的表达均增加明显,而当Huh7细胞中的MSI1敲低时,Cyclin D1和PCNA蛋白的表达则降低显著

已有报道证实包括Ras、src和Wnt在内的多种致癌信号均可诱导Cyclin D1的转录^[29]。Wnt信号通路在维持细胞的自我更新及增殖分化等过程中具有非常重要的作用。而在肿瘤的发生过程中,包括Wnt在内的数个重要信号通路通常会被激活。有研究提示MSI1可以调控增殖活性较高细胞中的Wnt通路^[30-31]。因而,我们的实验也进一步检测了HCC细胞MSI1的过表达和敲低对Wnt信号通路是否有影响?结果显示,MSI1的过表达可以显著下调Wnt通路抑制因子APC mRNA的表达,而增加细胞Cyclin D1及C-myc mRNA的表达,而Huh7细胞中MSI1的敲低则与上述情况刚好相反。蛋白水平的检测也证实MSI1的过表达可以增加 β -catenin同时降低APC蛋白的表达,说明MSI1促进HCC细胞的增殖可能是通过正调控Wnt/ β -catenin信号通路实现的。

总之,MSI1不仅可以调控HCC细胞的增殖,还可以调节一系列在细胞增殖过程中重要蛋白的表达,其表

达的缺失对HCC细胞的生长具有反向作用。MSI1的这一作用可能与其对HCC细胞中Wnt/ β -catenin信号通路的正向调控有关。在未来的研究中,我们尚需对MSI1在HCC肿瘤发生中的作用进行更为深入的研究,从而为未来HCC诊疗方案的优化提供坚实的理论和实验基础。

参考文献:

- [1] Clark T, Maximin S, Meier J, et al. Hepatocellular carcinoma: review of epidemiology, screening, imaging diagnosis, response assessment, and treatment[J]. *Curr Probl Diagn Radiol*, 2015, 44(6): 479-86.
- [2] Zhang RY, Zhang Z, Liu ZK, et al. Adoptive cell transfer therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Front Med*, 2019, 13(1): 3-11.
- [3] Singh AK, Kumar R, Pandey AK. Hepatocellular carcinoma: causes, mechanism of progression and biomarkers[J]. *Curr Chem Genom Transl Med*, 2018, 12: 9-26.
- [4] Villani R, Vendemiale G, Serviddio G. Molecular mechanisms involved in HCC recurrence after Direct-Acting antiviral therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 20(1): pii: E49.
- [5] Roth GS, Decaens T. Liver immunotolerance and hepatocellular carcinoma: Patho-physiological mechanisms and therapeutic perspectives[J]. *Eur J Cancer*, 2017, 87: 101-12.
- [6] Niu JB, Zhao XL, Liu QS, et al. Knockdown of MSI1 inhibited the cell proliferation of human osteosarcoma cells by targeting p21 and p27[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5271-8.
- [7] Liu L, Qiu F, Chen J, et al. Functional polymorphism in the MSI1 gene promoter confers a decreased risk of lung cancer in Chinese by reducing MSI1 expression[J]. *Curr Genomics*, 2018, 19(5): 75-383.
- [8] Moghbeli M, Sadrizadeh A, Forghanifard MM, et al. Role of Msi1 and PYGO2 in esophageal squamous cell carcinoma depth of invasion[J]. *J Cell Commun Signal*, 2016, 10(1): 49-53.
- [9] Nikpour P, Emadi-Baygi M, Mohhammad-Hashem F, et al. MSI1 overexpression in diffuse type of gastric cancer [J]. *Pathol Res Pract*, 2013, 209(1): 10-3.
- [10] Yi C, Li G, Ivanov DN, et al. Luteolin inhibits Musashi1 binding to RNA and disrupts cancer phenotypes in glioblastoma cells[J]. *RNA Biol*, 2018, 15(11): 1420-32.
- [11] Gong PJ, Wang YD, Gao YE, et al. Msi1 promotes tumor progression by epithelial-to-mesenchymal transition in cervical cancer[J]. *Hum Pathol*, 2017, 65: 53-61.
- [12] Shi C, Zhang Z. miR-761 inhibits tumor progression by targeting MSI1 in ovarian carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 5437-43.
- [13] Bish R, Vogel C. RNA binding Protein-Mediated Post-Transcriptional gene regulation in medulloblastoma[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(5): 357-64.
- [14] Kudinov AE, Karanicolas J, Golemis EA. Musashi RNA-Binding proteins as cancer drivers and novel therapeutic targets [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2143-53.
- [15] Jones NM, Rowe MR, Shepherd PR. Targeted inhibition of dominant PI3-kinase catalytic isoforms increase expression of stem cell genes in glioblastoma cancer stem cell models[J]. *Int J Oncol*, 2016, 49

- (1): 207-16.
- [16] Kharas MG, Lengner CJ. Stem Cells, Cancer, and MUSASHI in Blood and Guts [J]. Trends Cancer, 2017, 3(5): 347-56.
- [17] El-Salhy M, Mazzawi T, Umezawa K, et al. Enteroendocrine cells, stem cells and differentiation progenitors in rats with TNBS-induced colitis[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(6): 1743-51.
- [18] Fan HB, Chen LX, Qu XB, et al. Transplanted miR-219-overexpressing oligodendrocyte precursor cells promoted remyelination and improved functional recovery in a chronic demyelinated model [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41407.
- [19] Sutherland JM, Siddall N, Hime GR, et al. RNA binding proteins in spermatogenesis: an in depth focus on the Musashi family[J]. Asian J Androl, 2015, 17(4): 529-36.
- [20] He L, Zhou XK, Qu C, et al. Musashi2 predicts poor prognosis and invasion in hepatocellular carcinoma by driving epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(1): 49-58.
- [21] Liu NL, Chen TR, Wang XH, et al. Msi1 confers resistance to TRAIL by activating ERK in liver cancer cells [J]. FEBS Lett, 2015, 589(8): 897-903.
- [22] Zhou XE, Wen Y, Tian Y, et al. Heat shock protein 90 alpha-Dependent B-Cell-2-Associated transcription factor 1 promotes hepatocellular carcinoma proliferation by regulating MYC Proto-Oncogene c-MYC mRNA stability [J]. Hepatology, 2019, 69(4): 1564-81.
- [23] Bidkhorji G, Benfeitas R, Klevstvig M, et al. Metabolic network-based stratification of hepatocellular carcinoma reveals three distinct tumor subtypes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(50): E11874-83.
- [24] Roy S, Hooiveld GJ, Seehawer M, et al. microRNA 193a-5p regulates levels of nucleolar- and Spindle-Associated protein 1 to suppress hepatocarcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2018, 155(6): 1951.
- [25] Gao X, Du HJ, Zhang RX, et al. Overexpression of cancer susceptibility candidate 2 inhibited progression of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 9008-18.
- [26] Engl T, Rutz J, Maxeiner S, et al. mTOR inhibition reduces growth and adhesion of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 7064-71.
- [27] Kim YW, Jang EJ, Kim CH, et al. Sauchinone exerts anticancer effects by targeting AMPK signaling in hepatocellular carcinoma cells[J]. Chem Biol Interact, 2017, 261: 108-17.
- [28] Xu XQ, Huang, Xiao XF, et al. Tripartite motif-containing 3 (TRIM3) inhibits tumor growth and metastasis of liver cancer [J]. Chin J Cancer, 2017, 36(9): 407-19.
- [29] Wen B, Sun H, He S, et al. Effects of biejiajian pills on Wnt signal pathway signal molecules β -catenin/TCF4 complex activities and downstream proteins cyclin D1 and MMP-2 in hepatocellular carcinoma cells [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2014, 34(12): 1758-62.
- [30] Yang SC, Liu Y, Li MY, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 124.
- [31] Huynh H, Ong R, Goh KY, et al. Sorafenib/MEK inhibitor combination inhibits tumor growth and the Wnt/ β -catenin pathway in xenograft models of hepatocellular carcinoma [J]. Int J Oncol, 2019, 54(3): 1123-33.

(编辑:余诗诗)