论著

文章编号:1000-5404(2014)10-0996-06

# 乙肝病毒X蛋白通过激活 *c-myc* 诱导肝卵圆细胞的恶性转化

王月飞,廖 凯,卢乐乐,张雷达 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[摘要] **目的** 研究 *c-myc* 对乙型肝炎病毒X蛋白(Hepatitis B virus X, HBx)诱导肝卵圆细胞恶性转化的影响。**方法** 通过HEK293细胞扩增腺病毒获得高滴度的Ad-EGFP和Ad-HBx,分别感染肝卵圆细胞株WB-F344细胞,通过RT-PCR和Western blot验证HBx蛋白对 *c-myc* 表达的影响。应用特异性对应 *c-myc* 基因的siRNA转染各组细胞。运用体外成瘤法、流式细胞术、细胞迁移实验,观察 *c-myc* 特异性siRNA对HBx诱导卵圆细胞恶性转化的影响。**结果** 与空白对照组Ad-EGFP相比,实验组转染Ad-HBx后,细胞中的 *c-myc* 表达水平增高;WB-F344-HBx细胞 $G_0/G_1$ 期细胞比例显著降低、S期细胞比例显著升高;第1天3组细胞都以单细胞形式悬浮生长,随着时间延长,WB-F344-HBx细胞逐渐形成致密的细胞球体并且数量逐渐增多、体积逐渐增大;WB-F344-HBx细胞的迁移能力显著高于对照组。WB-F344-Mock和WB-F344-EGFP组之间各项指标均无明显差异。*c-myc* 基因沉默后,3组细胞间各项指标均无明显差异。**结论** 乙型肝炎病毒X蛋白通过激活 *c-myc* 基因从而诱导肝卵圆细胞恶性转化。

[关键词] 乙型肝炎病毒;HBx蛋白;*c-myc*;肝卵圆细胞;恶性转化

[中图法分类号] R322.47;R373.21;R394.3 [文献标志码] A

# Hepatitis B virus X protein induces malignant transformation of hepatic oval cells by activating *c-myc* gene

Wang Yuefei, Liao Kai, Lu Lele, Zhang Leida (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the effect of hepatitis B virus X (HBx) protein on hepatic oval cells and to investigate whether HBx protein can induce malignant transformation of hepatic oval cells after *c-myc* gene silencing. **Methods** The WB-F344 hepatic oval cells was separately infected with adenoviral vector (WB-F344-Mock group, blank control) and adenovirus expressing HBx protein (WB-F344-HBx group) or expressing EGFP (WB-F344-EGFP group, negative control). The expression of *c-myc* in the 3 groups of was confirmed by real-time PCR and Western blotting. The cell cycle, proliferation, ability of metastasis and tumorigenicity were detected with flow cytometry, metastasis experiment and tumor experiment *in vitro*, respectively. **Results** Compare with the WB-F344-Mock and WB-F344-EGFP groups, the WB-F344-HBx group highly expressed *c-myc* protein, showed significantly accelerated process of $G_1/S$ cell cycle, and had stronger ability of metastasis and sphere formation. There was no significant difference in cell cycle, ability of metastasis and sphere formation between the WB-F344- EGFP and WB-F344-Mock groups. There was no significant difference in cell cycle, ability of metastasis and sphere formation between the WB-F344-HBx group and the WB-F344-Mock group as well as the WB-F344-EGFP group after *c-myc* silencing with siRNA. **Conclusion** HBx protein induces the malignant transformation of hepatic oval cells by activating *c-myc* gene.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071979)

[通信作者] 张雷达,电话:(023)68765810,E-mail:zld666@aliyun.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140328.0952.003.html(2014-03-28)

[**Key words**] hepatitis B virus; hepatitis B virus X protein; *c-myc*; hepatic oval cells; malignant transformation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071979). Corresponding author: Zhang Leida, Tel:86-23-68765810, E-mail: zld666@aliyun.com

乙肝病毒X(hepatitis B virus X,HBx)蛋白是一种多功能调节蛋白,被认为在HBV诱发肝癌的过程中起着重要作用[1];能与细胞内多种转录、调控因子结合,促进病毒的复制和转录[2];激活多种原癌基因并抑制抑癌基因;调节细胞周期、增殖和分化[3];干扰破坏细胞DNA损伤修复机制[4];增强多药耐药相关基因的表达,提高肝癌细胞多药耐药性[5]等,最终导致肝细胞的癌变。近几年肿瘤干细胞理论的出现,使人们对肝癌的发生、发展有了新的认识。肿瘤干细胞与正常组织干细胞有多种相似的功能特点,并与肿瘤发生、发展、侵袭转移及化疗后复发密切相关[6-7]。而肿瘤干细胞很可能源于正常干细胞恶变。对于肝干细胞的深入研究发现其可能来源于体内多种细胞,但是只有卵圆细胞作为肝干细胞的观点被广泛接受[8]。研究表明卵圆细胞作为肝干细胞在肝癌的发生和发展中发挥关键作用,卵圆细胞为肝癌发生的始动细胞,在各种致癌因素作用下肝内卵圆细胞异常分化,从而具备了肝癌干细胞特性,由此导致肝癌的发生。但是乙肝病毒在肝癌干细胞起源中的作用和机制目前仍是研究的空白,我们前期的研究已经证实乙型肝炎病毒X蛋白可以诱导肝卵圆细胞发生恶性转化,那么HBx蛋白又是如何引起肝卵圆细胞恶性转化,联系两者之间的"桥梁"又是什么呢?大量研究证实卵圆细胞向肝癌细胞转化与HBx蛋白诱发肝癌两者均主要是细胞内众多癌基因活化的结果,其中*c-myc*基因起着十分关键的作用[9-10]。卵圆细胞在向肝癌细胞转化过程中其*c-myc*的表达上调[9],我们推测HBx蛋白可能正是主要通过激活癌基因*c-myc*诱导卵圆细胞向肝癌细胞转化。因此研究在阻断*c-myc*基因表达后HBx蛋白能否诱导卵圆细胞发生恶性转化具有重要的理论价值和现实意义。本研究拟采用*c-myc*基因的siRNA转染能稳定表达HBx蛋白的实验组肝卵圆细胞株WB-F344细胞和不表达HBx蛋白的对照组,验证HBx蛋白对*c-myc*表达的影响并观察*c-myc*特异性siRNA对HBx诱导卵圆细胞恶性转化的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

WB-F344细胞株购于上海拜力生物科技有限公司。Ad-HBx/Ad-EGFP腺病毒由西南医院肝胆外科实验室构建并保存;胰酶购自碧云天公司;DMEM培养基、胎牛血清购自Hyclone公司;HBx、CD44、CD90、CD133以及β-actin基因扩增引物均由生工生物工程(上海)有限公司设计并合成;DNA聚合酶、Trizol试剂、反转录试剂盒购自TaKaRa公司;HBx抗体(兔抗人)购自Abcam公司;PAS染色试剂盒购自碧云天公司;Matrigel侵袭室试剂盒购自BD公司。*c-myc* siRNA由美国Cell Signaling Techno logy(CST)公司设计合成。

### 1.2 实验方法

1.2.1 腺病毒在HEK293T细胞中的包装、扩增以及滴度的测定 将HEK293T细胞以$0.8\times10^6$/皿接种于6 cm细胞培养皿中。用脂质体Lipofectamine2000及Plusreagent转染,倒置显微镜观察细胞病变效应,第8天出现病毒空斑,转染后第10天收集细胞。反复冻融收集病毒上清。采用终点稀释法在96孔板中测定病毒滴度,在实验24 h,向96孔板每孔加入100 μL浓度为10 /μL的HEK293细胞悬液;将待测病毒液稀释到$10^{-14}$。按照每一稀释度10个复孔占用1行依次将$10^{-7}$~$10^{-14}$稀释的病毒液加入96孔板中,每行最后2孔加入完全培养基(不含病毒)作为对照。培养10 d后观察细胞病变现象,病毒滴度=10(x+0.8)(pfu/mL),x为不同稀释度下CPE阳性率总和。

1.2.2 腺病毒感染肝卵圆细胞株WB-F344 在6孔板中将WB-F344细胞按$3\times10^5$个细胞/孔接种,将Ad-EGFP腺病毒、Ad-HBx腺病毒稀释成20、30、40、50、60和70的滴度感染WB-F344细胞,48 h后观察EGFP的表达情况,根据转染效果选择最佳滴度。将未感染病毒组WB-F344细胞记为WB-F344-Mock(空白对照组)、Ad-EGFP腺病毒感染的WB-F344细胞记为WB-F344-EGFP(阴性对照组)和Ad-HBx腺病毒感染WB-F344细胞记为WB-F344-HBx(实验组)。

1.2.3 WB-F344卵圆细胞的培养 WB-F344细胞培养于DMEM(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素)培养基,腺病毒转染后的WB-F344细胞培养于DMEM(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素)培养基,置于37 ℃、5% $CO_2$培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.4 Real-time PCR、Western blot检测HBx蛋白对*c-myc*表达的影响 Trizol法分别提取WB-F344-Mock、WB-F344-

EGFP、WB-F344-HBx 细胞总 RNA。循环条件为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,共 28 个循环。统计结果用 β-actin 作为内参,用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 表示基因表达差异。△Ct = △Ct 目的基因 − △Ctβ-actin,△△Ct = △Ct 组 1 − △Ct 组 2。使用 RIPA 裂解液分别提取 WB-F344-Mock、WB-F344-EGFP、WB-F344-HBx 细胞总蛋白。酶标仪 BCA 法测蛋白浓度,将蛋白浓度调至 4 μg/μL,变性处理后 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电流 250 mA 半干转至 NC 膜。室温下 5% 脱脂奶粉封闭 30 min。用小鼠抗 *c-myc* 的一抗(1∶1 000)4 ℃过夜,PBST 洗膜,用山羊抗小鼠二抗(HRP 标记)(1∶2 000)孵育 2 h,PBST 洗膜,ECL 发光显影检测 *c-myc* 在蛋白水平的表达情况。

1.2.5 转染 取倍增期肝卵圆细胞株培养于含 10% 胎牛血清(不含抗生素)的 DMEM 培养基中,调整细胞浓度为 $2\times10^5$/mL,每孔 500EL 接种于 24 孔培养板中,用 TransIT-TKO 转染试剂(Mirus 公司),按试剂盒说明书步骤操作。

1.2.6 流式细胞术检测转染 *c-myc* siRNA 前后 HBx 蛋白对 WB-F344 细胞周期的影响 分别收集 WB-F344-HBx、WB-F344-EGFP、WB-F344-Mock 细胞,PBS 清洗后,预冷处理的 70% 乙醇在 4 ℃固定 2 h,PBS 清洗除去乙醇,加入浓度为 50 μg/mL PI(含50 μg/mL RNase)染液在室温避光条件下孵育 30 min,用 300 目尼龙网过滤样品后流式细胞仪检测细胞周期。使用 Multicycle for windows 软件对实验数据进行分析。应用特异性对应 *c-myc* 基因的 siRNA 转染各组细胞后,用相同的方法处理各组细胞并观察细胞周期。

1.2.7 CCK-8 法检测 *c-myc* siRNA 前后 HBx 蛋白对 WB-F344 细胞增殖活性的影响 分别收集对数生长期 WB-F344-Mock、WB-F344-EGFP、WB-F344-HBx 细胞,调整细胞浓度为 $1\times10^4$/mL,每孔 200 μL 接种于 96 孔板(2 000/孔),每组设 4 个复孔,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养。分别于 1、2、3、4、5 d 时加入 20 μL CCK-8 溶液,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中继续培养 1 h。酶标仪在波长 490 nm 处测量各孔的光密度值[*D*(490)]。

1.2.8 体外侵袭性实验 用 DMEM 培养液(不含 10% FBS,含 1% BSA)将各组细胞重悬制成 $1\times10^5$/mL 的单细胞悬液,按每室 500 μL 接种于已铺有 Matrigel 胶的 Transwell 小室的上层,每组设置 3 个复孔。继续培养 48 h,后淋洗小室,棉签擦去基质胶和上室内的细胞,甲醇 4 ℃下固定,苏木精室温下染色 20 min,显微镜下观察每个样本,取 10 个视野计细胞个数、拍照。

1.2.9 体外成球实验 将分选各组细胞以 $1\times10^4$/孔接种于 6 孔板中,设置 3 个复孔,均给予含生长因子的无血清 DMEM/F12 培养基,置于 5% $CO_2$ 的 37 ℃饱和湿度孵育箱中培养,隔 3 d 换液 1 次,于培养第 7 天观察各组的生长情况。应用特异性对应 *c-myc* siRNA 转染各组细胞后,用相同的方法处理各组细胞并观察各组细胞的生长情况。

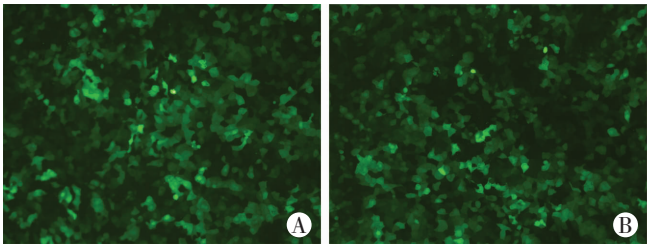
### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件统计,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 腺病毒滴度的测量以及高效感染 WB-F344 细胞

重组腺病毒转染 HEK293T 包装细胞,Ad-EGFP 和 Ad-HBx 感染滴度分别达到 $0.9\times10^{10}$ pfu/mL 和 $1.3\times10^{10}$ pfu/mL。将 Ad-EGFP 腺病毒、Ad-HBx 腺病毒稀释成不同的滴度感染 WB-F344 细胞,观察 EGFP 的表达情况,发现当滴度为 50 时,两组 GFP 阳性细胞数均在 85% 以上且荧光强度接近。说明两组的转染效率和蛋白表达量相近。选择滴度为 50 作为后续实验的最佳滴度(图 1)。



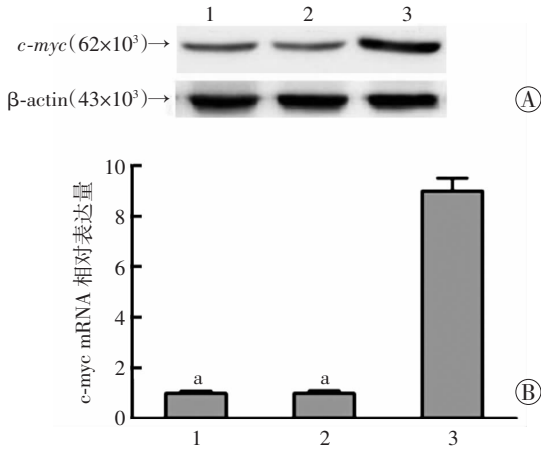

A:Ad-EGFP;B:Ad-HBx

**图 1 重组腺病毒高效感染 WB-F344 细胞 48 h 后形态学变化**

(荧光显微镜 ×100)

### 2.2 重组 Ad-HBx 感染前后 *c-myc* 蛋白在 WB-F344 细胞的表达

RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,与 WB-F344-Mock 和 WB-F344-EGFP 细胞相比,WB-F344-HBx 细胞中 *c-myc* mRNA 和蛋白的表达明显增高(图 2)。




a:$P<0.05$,与 WB-F344-HBx 组比较 1:WB-F344-Mock;2:WB-F344-EGFP;3:WB-F344-HBx A:Western blot 检测 *c-myc* 蛋白的表达;B:RT-PCR 检测 *c-myc* mRNA 的表达($n=9$, $\bar{x}\pm s$)

**图 2 *c-myc* 在各组中蛋白及 mRNA 的表达**

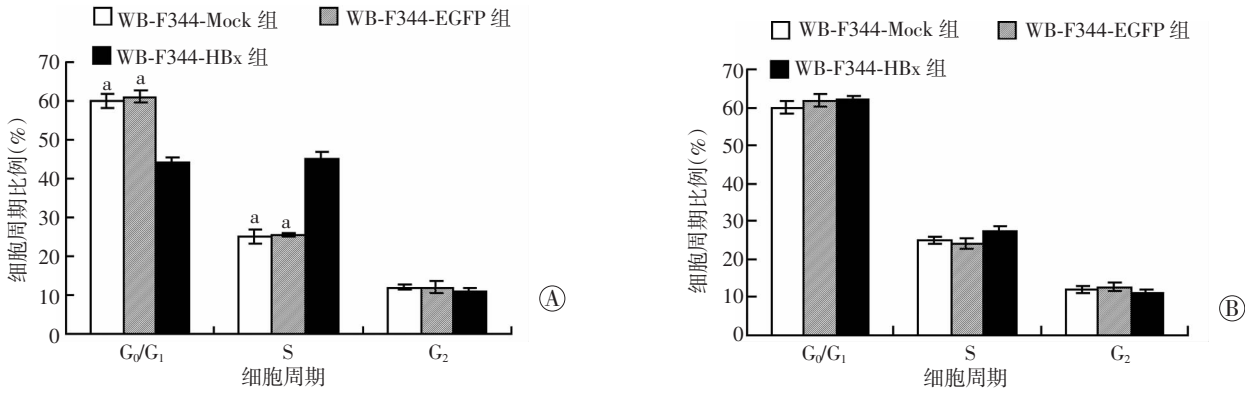
### 2.3 *c-myc* 基因沉默前后 HBx 蛋白对 WB-F344 细胞增殖、体外成球以及转移能力的影响

2.3.1 流式细胞术检测结果 转染 siRNA 前与 WB-F344-Mock 组相比,WB-F344-HBx 组细胞内 $G_0/G_1$ 期细胞比例显著

降低、S 期细胞比例显著升高($P<0.05$),而 WB-F344-EGFP 组细胞无显著变化。应用特异性对应 *c-myc* 基因的 siRNA 转染 WB-F344-HBx 组细胞后,3 组细胞的细胞周期无显著差异(图 3、4)。

2.3.2　Tran-swell 侵袭实验观察　　在 *c-myc* 基因沉默前 WB-F344-Mock 组、WB-F344-EGFP 组和 WB-F344-HBx 组透膜细胞数分别为为(160.33 ± 8.18)、(160.00 ± 7.48)和(364.33 ± 6.24)。WB-F344-Mock 组和 WB-F344-EGFP 组差异无统计学意义,而 WB-F344-HBx 组分别与 WB-F344-Mock 组、WB-F344-EGFP 组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。*c-myc* 基因沉默后,WB-F344-Mock 组、WB-F344-EGFP 组和 WB-F344-HBx 组透膜细胞数分别为为(166.00 ± 9.27)、(151.00 ± 7.26)和(164.67 ± 7.59),3 组无显著性差异(图 5)。

2.3.3　体外成球实验观察　　*c-myc* 基因沉默前用含生长因子的无血清培养基培养 WB-F344-Mock、WB-F344-EGFP、WB-F344-HBx 细胞,第 1 天 3 组细胞都以单细胞形式悬浮生长,WB-F344-Mock、WB-F344-EGFP、WB-F344-HBx 3 组细胞体外成球数量分别为(1.83 ± 0.68)、(1.67 ± 0.75)、(5.00 ± 1.29)。随着时间延长,WB-F344-HBx 细胞逐渐形成致密的细胞球体并且数量逐渐增多、体积逐渐增大,而 WB-F344-Mock、WB-F344-EGFP 细胞并无明显成球生长的特性。到第 7 天,WB-F344-Mock、WB-F344-EGFP、WB-F344-HBx 3 组细胞成球数量分别为(1.83 ± 0.69)、(1.67 ± 0.47)、(1.83 ± 0.69)。在 *c-myc* 基因沉默前,WB-F344-Mock 和 WB-F344-EGFP 无统计学意义,而 WB-F344-HBx 与另外两组均具有统计学意义;*c-myc* 基因沉默后,3 组细胞并无显著差异(图 6)。




a: $P<0.05$,与 WB-F344-HBx 组比较　A:转染前;B:转染后

**图 3　*c-myc* 基因 siRNA 转染前后各组细胞的周期变化**　($n=9, \bar{x} \pm s$)

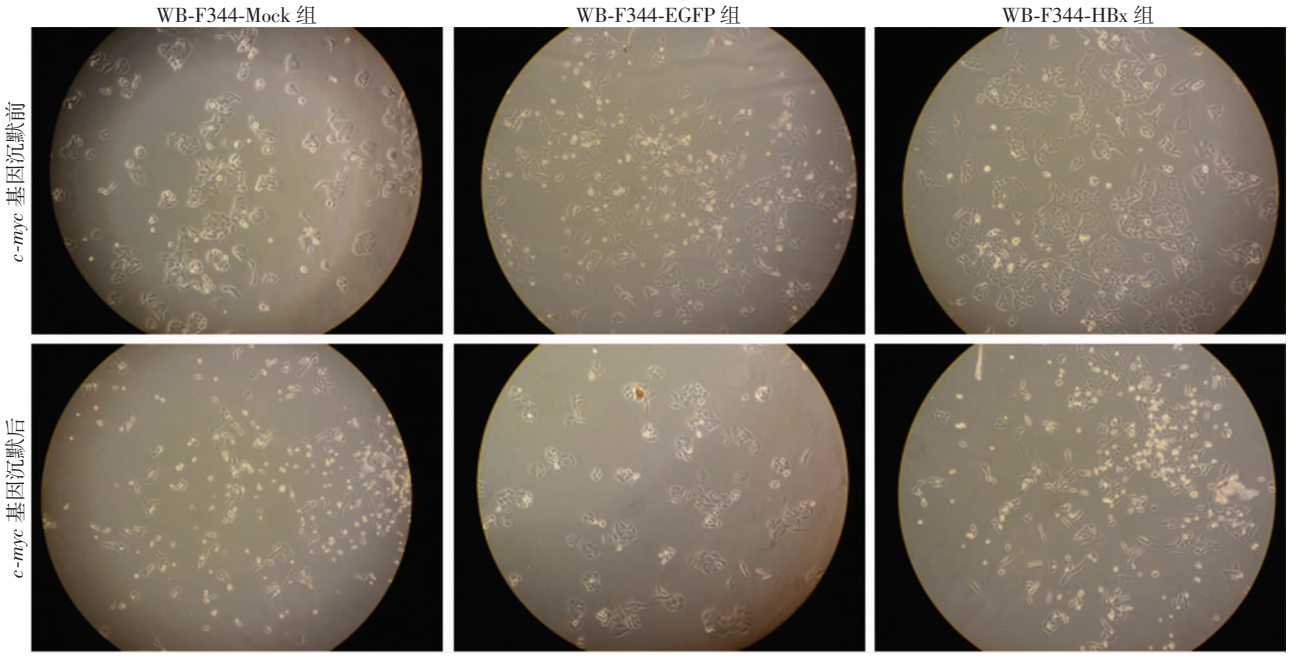



**图 4　*c-myc* 基因 siRNA 转染前后各组细胞的生长增殖情况**　(LM ×40)

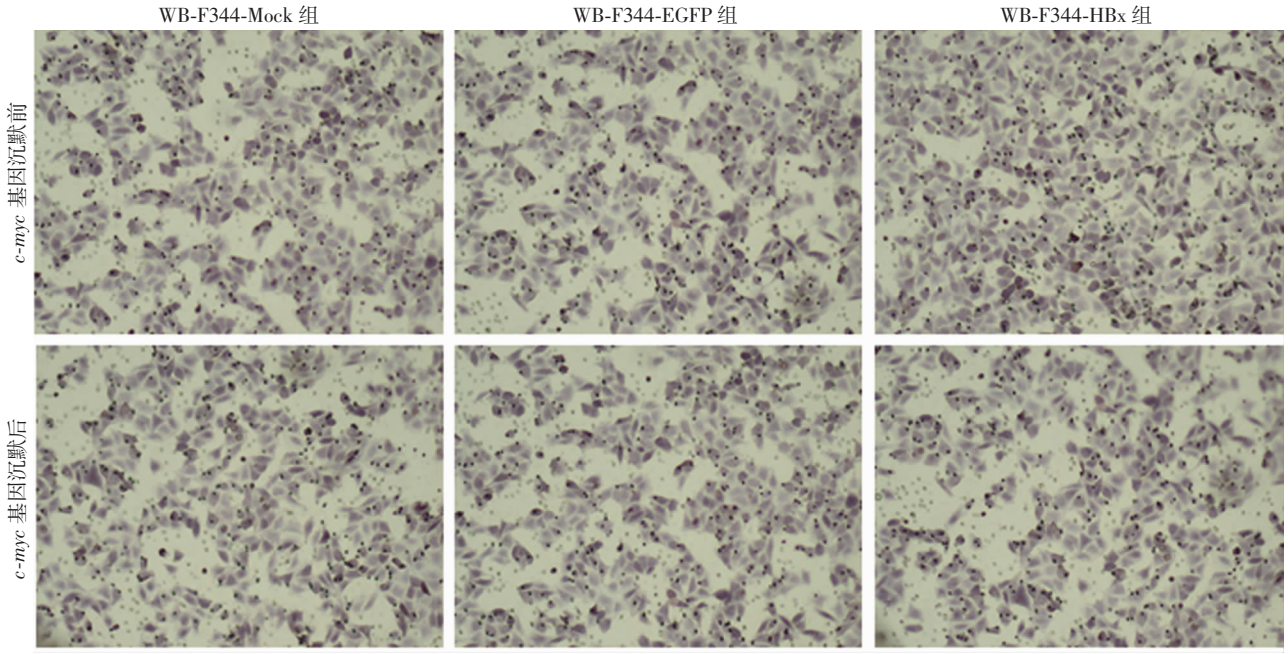



**图5 Transwell 侵袭实验检测 *c-myc* 基因沉默前后3组细胞形态变化** （苏木精 ×100）

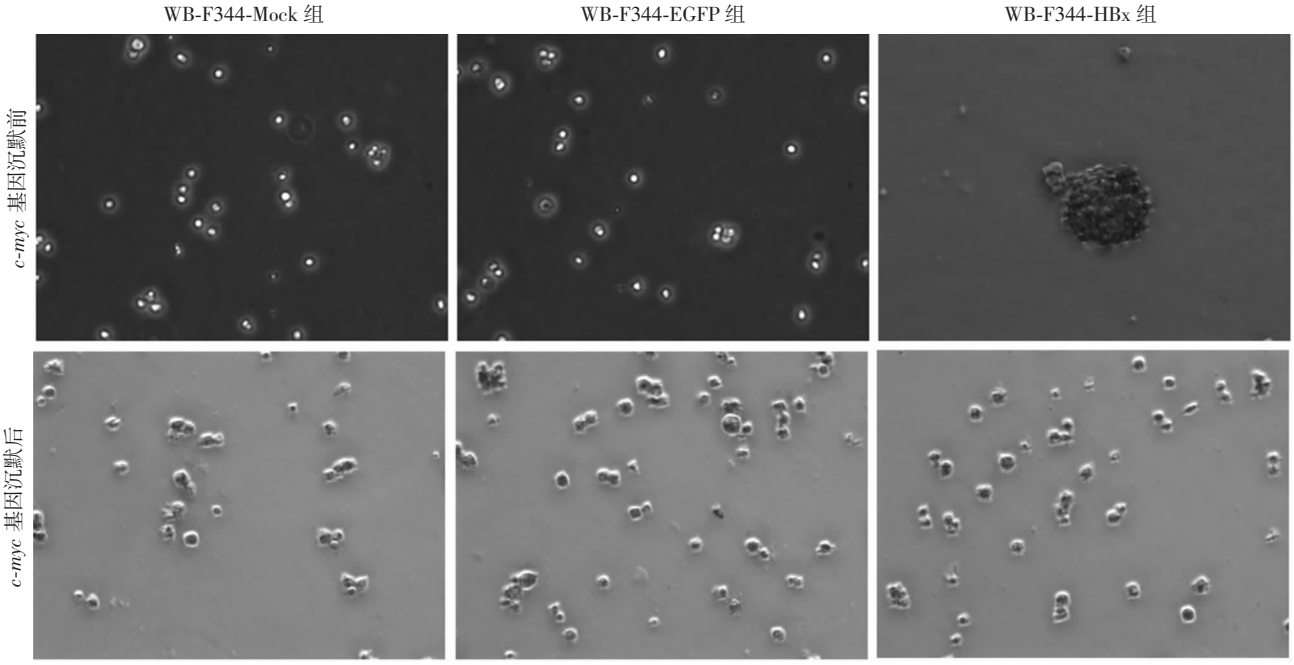



**图6 *c-myc* 基因沉默前后3组细胞的体外成球结果** （LM ×40）

## 3 讨论

原发性肝癌是成人最常见的恶性肿瘤之一，目前其发生的细胞学机制仍不十分清楚。近年来，研究提示肝癌很可能起源于肝干细胞[11-13]。研究显示肝干细胞很可能来源于体内多种细胞，然而卵圆细胞作为肝干细胞的依据更加充分[14]，卵圆细胞作为肝干细胞在肝癌的发生、发展、复发、侵袭以及转移中发挥着关键作用，在各种致癌因素作用下肝内卵圆细胞活化并异常增生分化，从而具备了肝癌干细胞特性，最终导致肝癌的发生[11,13]。有研究发现 HBV 相关的慢性肝病和肝癌组织中有卵圆细胞增生和细胞形态改变[15]。我们前期的研究发现乙肝病毒 X 蛋白可诱导肝卵圆细胞发生恶性转化，但卵圆细胞在 HBV 诱导肝癌发生

中的具体作用和机制仍是研究的空白。目前不清楚HBx蛋白和卵圆细胞两者是否和如何共同在乙肝病毒相关的肝癌发生中发挥作用。

*c-myc*基因属于“永生性”癌基因,被证明为细胞增殖必不可少的早期基因,其表达产物在细胞增殖过程中是调控转录的反式作用因子,是细胞增殖信号转导的必需因子;其作用的机制是*c-myc*激活改变了细胞内基因调控,使细胞易于向恶性表型转化,基于上述研究成果,我们推测HBx蛋白可能正是主要通过激活癌基因*c-myc*诱导卵圆细胞向肝癌细胞转化。

本实验中,我们首先通过腺病毒感染的方法构建了稳定表达HBx的卵圆细胞株。通过RT-PCR和Western blot实验检测HBx蛋白对*c-myc*表达的影响,结果显示,*c-myc*在mRNA和蛋白水平的表达明显增高。这也证明了HBx蛋白能够激活细胞内的*c-myc*基因。*c-myc* siRNA转染该肝卵圆细胞,通过流式细胞术、Transwell以及体外成球实验观察在沉默*c-myc*靶基因后HBx蛋白能否保持诱导肝卵圆细胞恶性转化的能力。结果表明在转染siRNA之前稳定表达HBx蛋白的肝卵圆细胞与不表达HBx蛋白的肝卵圆细胞相比,有更强的增值、侵袭能力和体外成瘤能力。转染siRNA之后,稳定表达HBx蛋白的肝卵圆细胞与不表达HBx蛋白的肝卵圆细胞相比,增值侵袭能力和体外成瘤能力并无显著性差异。

那么HBx蛋白又是如何激活卵圆细胞*c-myc*基因的呢?作为生物进化过程中高度保守的Wnt信号转导通路,参与了卵圆细胞增殖、分化和凋亡等的调控,它的异常激活对卵圆细胞向肝癌干细胞转化至关重要[16-17]。以往的研究发现HBx可阻滞β-连环蛋白(β-catenin)的遍在蛋白化,从而逃避被蛋白酶体的降解,而β-catenin是Wnt信号转导通路中致癌的关键分子,其降解障碍致使胞质内游离的β-catenin积累,然后激活下游的靶基因*c-myc*的转录。鉴于此,后续的研究我们将探讨HBx可能正是通过上述途径激活Wnt信号通路介导卵圆细胞*c-myc*基因的活化。

**参考文献:**

[1] Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer[J]. J Lab Clin Med, 2006, 147(2): 58-66.

[2] Yang B, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein elevates cytosolic calcium signals by modulating mitochondrial calcium uptake [J]. J Virol, 2012, 86(1): 313-327.

[3] Gearhart T L, Bouchard M J. The hepatitis B virus X protein modulates hepatocyte proliferation pathways to stimulate viral replication [J]. J Virol, 2010, 84(6): 2675-2686.

[4] Tian Y, Hu Y, Wang Z, *et al*. Hepatitis B virus regulates Raf1 expression in HepG2.2.15 cells by enhancing its promoter activity[J]. Arch Virol, 2011, 156(5): 869-874.

[5] Xu J, Liu H, Chen L, *et al*. Hepatitis B virus X protein confers resistance of hepatoma cells to anoikis by up-regulating and activating p21-activated kinase 1 [J]. Gastroenterology, 2012, 143(1): 199-212.e4.

[6] Marquardt J U, Factor V M, Thorgeirsson S S. Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: current concepts and clinical implications [J]. J Hepatol, 2010, 53(3): 568-577.

[7] Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, *et al*. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective[J]. Cancer Lett, 2009, 286(2): 145-153.

[8] Marquardt J U, Thorgeirsson S S. Stem cells in hepatocarcinogenesis: evidence from genomic data [J]. Semin Liver Dis, 2010, 30(1): 26-34.

[9] Tang H, Oishi N, Kaneko S, *et al*. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein [J]. Cancer Sci, 2006, 97(10): 977-983.

[10] Kalra N, Kumar V. The X protein of hepatitis B virus binds to the F box protein Skp2 and inhibits the ubiquitination and proteasomal degradation of c-Myc [J]. FEBS Lett, 2006, 580(2): 431-436.

[11] Shen Y, Cao D. Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2012, 4: 1157-1169.

[12] Yao Z, Mishra L. Cancer stem cells and hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(18): 1691-1698.

[13] Mishra L, Banker T, Murray J, *et al*. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2009, 49(1): 318-329.

[14] Kubota K, Soeda J, Misawa R, *et al*. Bone marrow-derived cells fuse with hepatic oval cells but are not involved in hepatic tumorigenesis in the choline-deficient ethionine-supplemented diet rat model [J]. Carcinogenesis, 2008, 29(2): 448-454.

[15] Brechot C, Kremsdorf D, Soussan P, *et al*. Hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC): molecular mechanisms and novel paradigms [J]. Pathol Biol (Paris), 2010, 58(4): 278-287.

[16] Huynh T T, Rao Y K, Lee W H, *et al*. Destruxin B inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through modulation of the Wnt/β-catenin signaling pathway and epithelial-mesenchymal transition[J]. Toxicol *In Vitro*, 2014, 28(4): 552-561.

[17] Sun X, He Y, Huang C, *et al*. Distinctive microRNA signature associated of neoplasms with the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Cell Signal, 2013, 25(12): 2805-2811.

(**收稿**:2014-03-05;**修回**:2014-04-02)

(编辑 汪勤俭)