DOI:10.16016/j.1000-5404.201506030

miR-148b/DUSP1 调节巨噬细胞分泌细胞因子 CD206 促进肝癌的发生

谭 翠[1],莫春容[2] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院分子肿瘤及表观遗传学重庆市重点实验室[1],附属儿童医院胃肠新生儿外科[2])

[摘要] **目的** 探讨 miR-148b/DUSP1 信号通路调节巨噬细胞分泌细胞因子 CD206 的表达对肝癌发生的影响。**方法** 利用全自动磁珠提取纯化系统提取外周血单核细胞并培养,用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)分别诱导生成 M1 型和 M2 型巨噬细胞,CD68、CD206 进行表型鉴定,ELISA 检测 M1 和 M2 型巨噬细胞分泌的细胞因子 CD206 的表达, CCK-8 和 Transwell 实验检测巨噬细胞分泌细胞因子 CD206 对肝癌细胞(HepG2 和 Huh7 细胞)增殖、侵袭、转移的影响,双荧光素酶报告基因系统验证 miR-148b 与 DUSP1 的靶向结合。**结果** 初步分离并鉴定 M1 和 M2 型巨噬细胞,M2 型巨噬细胞分泌的细胞因子 CD206 促进肝癌细胞的生长和侵袭、转移,双荧光素酶报告基因证实 DUSP1 为 miR-148b 的靶基因,miR-148b/DUSP1 信号通路促进肝癌的发生、发展,巨噬细胞标志物与肝癌患者的临床病理特征相关。**结论** miR-148b/DUSP1 信号通路影响巨噬细胞分泌的细胞因子促进肝癌发生、发展。

[关键词] 巨噬细胞;微小 RNA;DUSP1 信号通路;肝癌
[中图法分类号] R394.2; R730.23; R735.7 [文献标志码] A

miR-148b/DUSP1 mediates macrophage CD206 secretion to induce hepatocarcinoma cell growth

Tan Cui[1], Mo Chunrong[2] ([1]Chongqing Key Laboratory of Molecular Oncology and Epigenetics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Gastrointestinal Neonatal Surgery, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of miR-148b/DUSP1 signaling pathway on the level of cytokine CD206 produced by macrophages and on the growth of hepatocarcinoma cells. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were screened with CD14 microbeads, and then induced to M1 and M2 macrophages with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) respectively. Phenotypes and functions of the obtained polarized monocyte-derived macrophages were identified by CD68 and CD206. ELISA was used to determine the secretion of CD206 by M1 and M2 macrophages. CCK-8 and Transwell assays were used to verify the growth, invasion and migration of hepatoma cells (HepG2 and Huh7 cell lines) after the treatment of the secreted growth factors. Dual luciferase reporter system was used to determine whether DUSP1 was a bona fide target of miR-148b. **Results** Monocyte-derived M1 and M2 macrophage cultures were established successfully. The presence of growth factor CD206 produced by M2 macrophages promoted the proliferation, invasion and migration of hepatoma cell lines. Dual luciferase reporter system indicated that miR-148b functioned to directly suppress DUSP1 gene expression through the miR-148b-binding sequence located at the 3′-UTR of the DUSP1 mRNA. miR-148b/DUSP1 signaling pathway promoted the occurrence and development of hepatoma, and macrophage markers were associated with clinical and pathological features of liver cancer. **Conclusion** miR-148b/DUSP1 signaling pathway affects macrophage-secreted cytokines in promotion of occurrence and development of hepatocarcinoma, and may provide new evidence for targeted therapy of liver cancer.

[**Key words**] macrophage; miR-148b; DUSP1 signaling pathway; hepatocarcinoma

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81072148). Corresponding author: Mo Chunrong, E-mail:690813614@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81072148)
[通信作者] 莫春容,E-mail:690813614@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1355.035.html(2015-12-04)

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是常见的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率均位居恶性肿瘤的前列[1]。流行病学调查提示:HCC 是一种与炎症密切相关的恶性肿瘤,炎症在 HCC 的发生和转移过程中具有促进作用,然而炎症引起 HCC 的分子和细胞机制尚未完全明确[2]。近年研究发现,肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAMs) 是肿瘤微环境中浸润的主要细胞,可以对肿瘤的增殖、血管形成以及迁移、侵袭等多种生物学行为产生影响[3]。研究表明 miRNAs 通过调控免疫相关基因的表达影响免疫系统的发育和功能,进而参与诸如自身免疫性疾病炎症及肿瘤等相关疾病的发生、发展[4]。有关 miR-148b 的研究提示其在炎症反应中具有重要的作用,其与恶性肿瘤的发病关系近年来引起许多学者的重视[5-7]。以往研究表明 miR-148b 与肝癌的发生、发展、预后密切相关[8],但其如何参与巨噬细胞调控肝癌发生的作用及分子机制尚不清楚。本研究通过体外分离培养外周血单核细胞诱导生成 M1 和 M2 型巨噬细胞,证实 miR-148b 调节巨噬细胞分泌的细胞因子参与肝癌细胞生长、侵袭和转移,通过 HCC 临床组织样本分析巨噬细胞标志物与肝癌患者临床病理特征的关系,旨在为肝癌的发病机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验采用的人肝癌细胞株 HepG2 和 Huh7 细胞冻存于液氮中,于 37 ℃水浴快速解冻复苏后,1 000 × *g* 离心 5 min,分别培养在适宜各自生长的培养基中。肝癌组织和相应癌旁组织标本(40 例)由重庆医科大学附属第一医院生物样本库提供。本研究经重庆医科大学附属第一医院伦理学委员会批准。

1.2 巨噬细胞分离和培养

采用全自动磁珠提取纯化系统分离外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基调整细胞数为 3 × 10^6/mL,置于 6 孔板中培养。37 ℃、5% CO_2 孵箱培养 3 h 后,用预温的培养基洗去未黏附细胞,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 2 mL 及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF),终浓度为 1 000 U/mL。隔 2 d 半量换液,培养 7 d,成贴壁细胞。

1.3 细胞瞬时转染

细胞转染按照 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen 公司)试剂说明书的要求,分别混匀脂质体、无血清的培养基和质粒,或 miRNA 模拟物,或 miRNA 抑制剂,或各自的阴性对照,培养 4 ~ 6 h 后换为含血清的培养基。miRNA 及其对照序列转染的终浓度为 50 nmol/L。miR-148b 模拟物(miRNA mimics)和阴性对照,miR-148b 抑制剂(miRNA inhibitor)和阴性对照,DUSP1-shRNA 及阴性对照购自上海 GenePharma 公司。

1.4 实时荧光定量 PCR

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)提取总 RNA。使用 M-MLV 逆转录试剂盒(Promega,USA)进行第 1 链 cDNA 的合成,以 U6 RNA 作为 miRNA 的内参基因,以 β-actin 作为其他内参基因。使用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪及 SYBR Green 试剂(Fermentas, USA)进行基因检测。miR-148b 成熟体和 U6 引物由广州 Ribobio 公司合成。CD68 基因上游:5′-GCTACATGGCGGTGGAGTACAA-3′,下游:5′-ATGATGAGAGGCAGCAAGATGG-3′;CD206 上游:5′-TTCGGACACCCATCGGAATTT-3′,下游:5′-CACAAGCGCTGCGTGGAT-3′;β-actin 上游:5′-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3′,下游:5′-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3′。

1.5 双荧光素酶载体构建

利用 PCR 方法,根据 DUSP1 (human) 3′-UTR 序列信息设计其扩增引物,设计扩增引物如下。DUSP1-3′UTR 上游:5′-GCGGCGATCGCAAGGCCACGGGAGGTGAG-3′,下游:5′-AATGCGGCCGCGAGAGGGATTGGGTGTGGTTG-3′; DUSP1-mut 上游:5′-TGTTTTCACGTGACTTGGAAAATACCAGTGTTG-3′,下游:5′-ATTTTCCAAGTCACGTGAAAACAAACCTGCTTA-3′;以 293T 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 DUSP1 基因的 3′ -UTR 序列,将其克隆到 pmiR-RB-REPORT™(Ribobio)双荧光素酶报告载体中,所用载体的报告荧光为 hRluc,校正荧光为 hluc(做内参校正)。

1.6 双荧光素酶检测分析

HepG2 细胞培养至对数生长期,按 4 × 10^3/孔接种于 96 孔板中,每孔总体积 100 μL,37 ℃培养箱中培养 24 h,采用 Lipofectamine™ 2000 试剂转染,将 miRNA mimics、N control 与靶基因 3′-UTR 报告基因载体及突变载体共转入 HepG2 细胞,转染终浓度为 50 nmol/L,转染 48 h 后采用 Luciferase Reporter Assay System (Promega)检测荧光值。

1.7 Western blot 检测蛋白表达

提取细胞的总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,Western blot 检测按我们前期研究[9]的方法进行,分别用 DUSP1 (Santa Cruz Biotechnology, CA)、anti-β-actin(Abcam),经化学发光法检测各蛋白的表达情况。采用 Image-Pro Plus 分析条带光密度,以目的蛋白与 β-actin 光密度比值作为蛋白的相对表达量。

1.8　CCK8 实验

在 96 孔板中配置 100 μL 的细胞悬液。将培养板在培养箱预培养 24 h(37 ℃,5% CO_2),向培养板加入 10 μL 不同浓度的待测物质,将培养板在培养箱孵育一段适当的时间(6、12、24、48 h),向每孔加入 10 μL CCK 溶液(注意不要在孔中生成气泡),将培养板在培养箱内孵育 1 ~4 h,用酶标仪测定在波长 450 nm 处的光密度值[D(450)],若暂时不测定光密度值,可以向每孔中加入 10 μL 0.1 mol/L 的 HCl 溶液或者 1% SDS 溶液,并遮盖培养板避光保存在室温条件下。24 h 内测定,光密度不会发生变化。

1.9　侵袭转移实验

所有细胞培养试剂和 Transwell 小室置 37 ℃温育;待测细胞培养至对数生长期,消化细胞,用 PBS 和无血清培养基先后洗涤 1 次,用无血清培养基悬浮细胞,计数,调整细胞数为 2×10^5/mL;在下室(即 24 孔板底部)加入 600 ~800 μL 含 10% 血清的培养基,上室加入 100 ~150 μL 细胞悬液,继续在孵箱培养 24 h;用镊子小心取出小室,吸干上室液体,移到预先加入约 800 μL 甲醇的孔中,室温固定 30 min;取出小室,吸干上室固定液,移到预先加入约 800 μL Giemsa 染液的孔中,室温染色 15 ~30 min;轻轻用清水冲洗浸泡数次,取出小室,吸去上室液体,用湿棉棒小心擦去上室底部膜表面上的细胞;用小镊子小心揭下膜,底面朝上晾干,移至载玻片上用中性树胶封片;显微镜下取 9 个随机视野计数,统计结果。

1.10　统计学处理

实验至少重复 3 次,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件行 χ^2 检验。

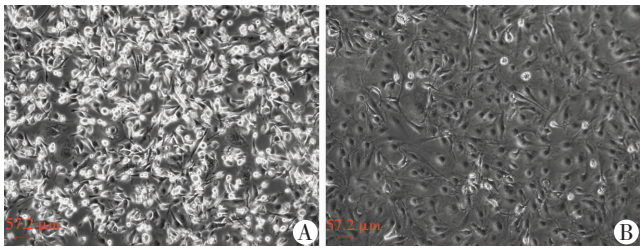
2　结果

2.1　M1 和 M2 巨噬细胞的表型鉴定

外周血单核细胞经 GM-CSF 诱导转化为 M1 型巨噬细胞,细胞体积较大,形态主要为圆形和类圆形;经 M-CSF 诱导转化为 M2 型巨噬细胞,形态主要为扁长型(图 1)。RT-PCR 检测 M1 巨噬细胞标志物 CD68 及 M2 巨噬细胞标志物 CD206 的表达($P<0.05$),LPS 刺激巨噬细胞模拟肿瘤微环境,ELISA 检测巨噬细胞分泌的细胞因子 CD206,结果显示,LPS 可明显增加细胞因子 CD206 分泌水平,且 M2 型巨噬细胞分泌的 CD206 明显高于 M1 型巨噬细胞。

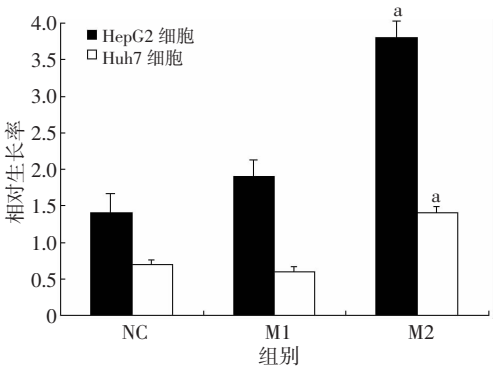
2.2　巨噬细胞促进肝癌细胞生长和侵袭转移

M1 和 M2 型巨噬细胞分别与人肝癌细胞株 HepG2 细胞和 Huh7 细胞中共培养 48 h,CCK-8 实验结果显示,M2 型巨噬细胞能明显促进肝癌细胞的生长($P<0.05$,图 2)。为了检测巨噬细胞否对肝癌细胞的侵袭转移产生影响,Transwell 实验发现 M2 型细胞也可以促进肝癌细胞的侵袭与转移($P<0.05$,图 3)。



A:M1 型; B:M2 型

图 1　倒置显微镜观察 M1 和 M2 型巨噬细胞形态



a: $P<0.05$,与 NC 和 M1 组比较

图 2　CCK-8 实验检测与巨噬细胞共培养对 HepG2 细胞和 Huh7 细胞生长的影响

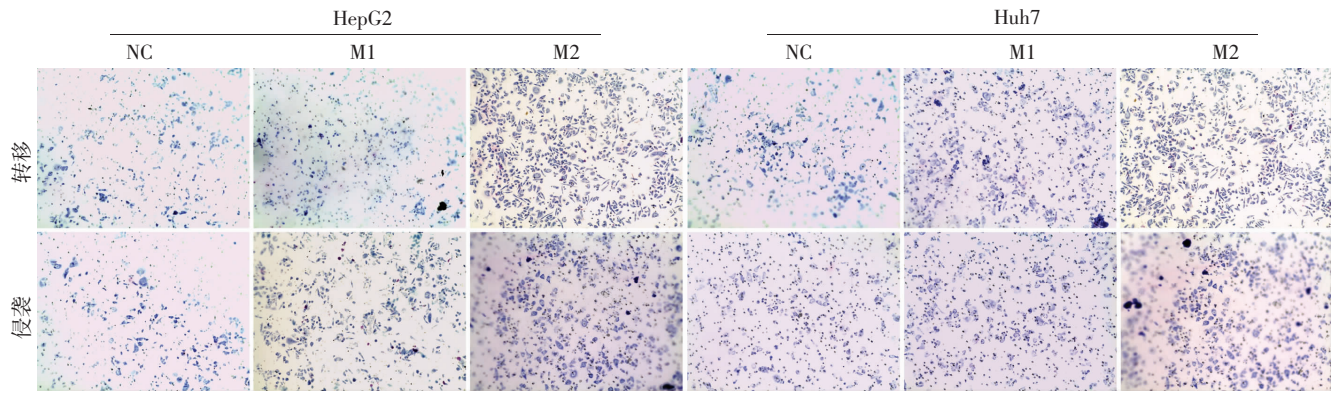
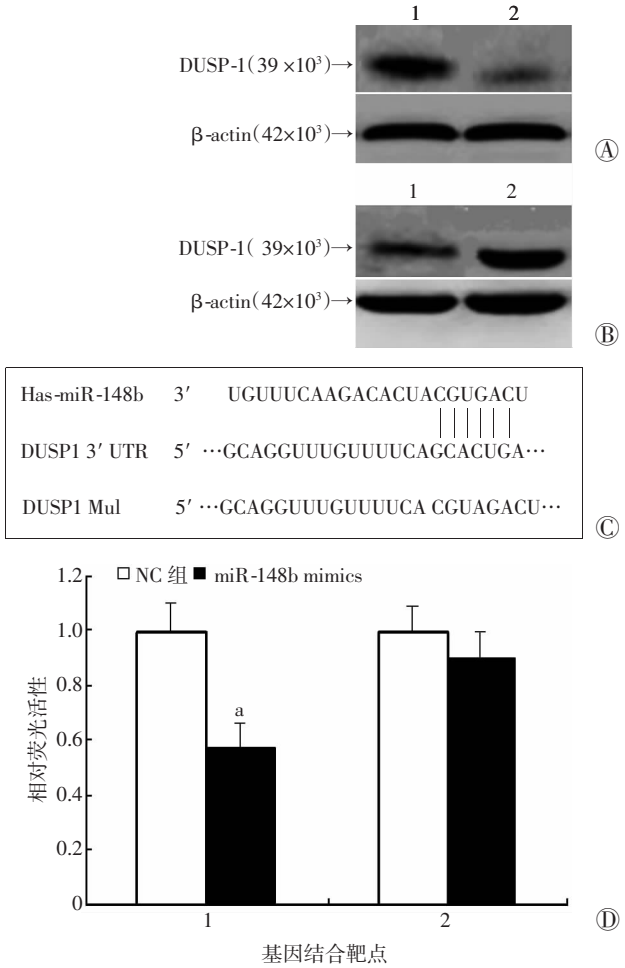


图 3　Transwell 实验检测与巨噬细胞共培养对肝癌细胞侵袭、转移的影响　(×400)

2.3　DUSP1 是 miR-148b 的靶标基因

HepG2 细胞分别转染 miR-148b mimics、inhibitor 以及各自的阴性对照,Western blot 检测结果显示,增加增强 miR-148b 表达可以使 DUSP1 的蛋白水平发生下调,而抑制 miR-148b 的表达可以使 DUSP1 的蛋白水平发生上调,初步证实 miR-148b 可以调节 DUSP1 在肝癌的发生发展中产生作用(图 4A、B)。为了进一步证实 DUSP1 确实是 miR-148b 的靶基因,通过双荧光素酶报告基因系统检测,结果显示 miR-148b 确实可以与 DUSP1 的 3′-UTR 特异性结合(图 4C、D)。

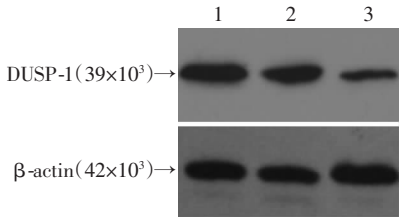


A: Western blot 检测转染 miR-148b mimics 的肝癌细胞 DUSP1 的蛋白表达　1:Control dsRNA;2:miR-148b mimics;B: Western blot 检测转染 miR-148b inhibitor 的肝癌细胞 DUSP1 的蛋白表达　1:Control dsRNA;2:miR-148b inhibitor;C:miR-148b 与 DUSP1 基因 3′-UTR 预测结合靶点;D:双荧光素酶报告基因系统验证 miR-148b 与 DUSP1 基因 3′-UTR 预测结合靶点　1:DUSP1 基因 3′-UTR(WT);2:DUSP1 基因 3′-UTR(MT);a:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 4　miR-148b 与 DUSP1 基因 3′-UTR 结合并调控其表达

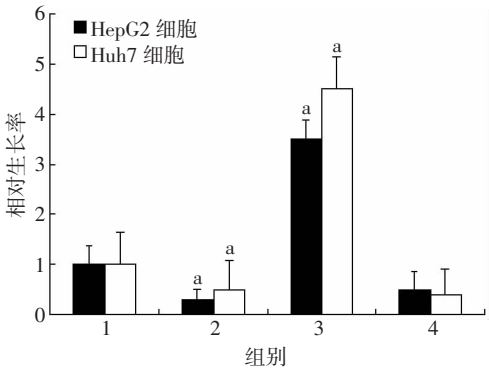
2.4　miR-148b/DUSP1 信号通路调控巨噬细胞促进肝癌细胞生长和侵袭转移

虽然通过靶向验证确定 DUSP1 为 miR-148b 的下游靶基因,为了进一步探讨该信号通路是否在巨噬细胞促进肝癌细胞生长和侵袭转移中发挥作用。首先在 M2 型巨噬细胞中转染 DUSP1-shRNA 抑制其表达(图 5),转染 miR-148b mimics 的 M2 巨噬细胞经 LPS 处理后,其分泌的细胞因子 CD206 的表达水平较对照组明显增加($P<0.05$),而转染 miR-148b inhibitor 的 M2 巨噬细胞经 LPS 处理后,CD206 的表达量明显下调($P<0.05$),共转染 miR-148b inhibitor 和 DUSP1-shRNA 后,CD206 分泌量上调,初步证实该信号通路可调节细胞因子 CD206 的分泌;CCK-8 实验结果显示,转染 miR-148b inhibitor 可以抑制肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 的生长($P<0.05$),而共转染 miR-148b inhibitor 和 DUSP1-shRNA 后,分泌量增加的 CD206 可以促进细胞生长($P<0.05$,图 6);Transwell 实验结果显示,转染 miR-148b inhibitor 的肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 的侵袭转移能力明显降低($P<0.05$),而共转染 miR-148b inhibitor 和 DUSP1-shRNA 的肝癌侵袭转移能力明显增加($P<0.05$,图 7)。



1:Control;2:N-shRNA;3:DUSP1-shRNA

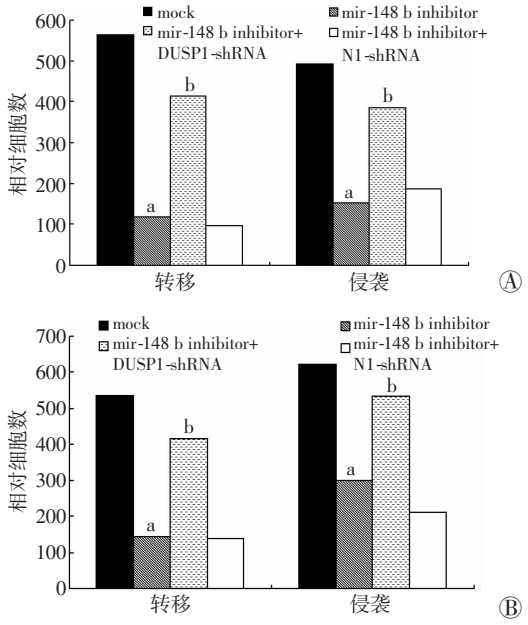
图 5　M2 巨噬细胞中转染 DUSP1-shRNA 抑制其表达



1: mock; 2: miR-148b inhibitor; 3: miR-148b inhibitor + DUSP1-shRNA;4:miR-148b inhibitor + N1-shRNA

a: $P<0.05$, 与 mock 比较

图 6　CCK-8 实验检测肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 的生长情况



a: $P<0.05$, 与 mock 比较; b: $P<0.05$, 与 miR-148b inhibitor 比较

图 7 Transwell 实验检测肝癌细胞 HepG2(A)和 Huh7(B)的侵袭转移情况

2.5 巨噬细胞分泌因子 CD206 与临床特征的相关性分析

为了研究 HCC 组织标本中的 CD206 的表达水平是否临床病理特征存在一定的相关性,检测 40 例 HCC 组织标本中 CD206 mRNA 的表达 CD206 水平,发现 CD206 的表达与 ALT、AST、肝癌的 TNM 分期明显相关($P<0.05$,表 1)。

表 1 CD206 的表达与肝癌患者临床病理特征的相关系分析

临床特征	例数 ($n=40$)	血清 CD206 浓度 (pg/mL)		P 值
		<100	≥100	
年龄(岁)				
<40	13	8	5	0.890
≥40	27	16	11	
性别				
男性	14	10	4	0.297
女性	26	14	12	
AFP(μg/L)				
<400	15	10	5	0.505
≥400	25	14	11	
ALT(U/L)				
<40	10	2	8	0.003
≥40	30	22	8	
AST(U/L)				
<40	15	9	6	0.008
≥40	25	11	14	
TNM 分期				
Ⅰ	17	5	12	0.036
Ⅱ	5	4	1	
Ⅲ	15	12	3	

3 讨论

炎症是导致肿瘤发生或促进肿瘤发展的最主要因素之一,约 20% 的恶性肿瘤由炎症诱发或促进。炎症与肝癌的发生发展同样有着密切联系[10]。TAMs 是炎性细胞的主要成分,通过表达多种细胞因子、生长因子、趋化因子介导免疫反应参与肿瘤发展的多个环节相关,包括肿瘤细胞形成、增殖、浸润、血管生成及转移[11-13]。肿瘤相关巨噬细胞与肝癌的不良预后也存在相关性[14],但其与肝癌发生的分子机制仍然不清楚。

异常表达的 miR-148b 频繁出现在多种肿瘤中,对肿瘤细胞的增殖、血管生成、侵袭转移等病理过程都有着调控作用[15-16]。Zhang 等[17]研究发现肝癌中 miR-148b 表达显著下调,可将肝癌细胞阻滞于 G_0/G_1 期而抑制肿瘤细胞的增殖,miR-148b 还可以通过调节 WNT1 基因的表达来发挥抑制肝癌细胞的侵袭与转移的作用,进一步构建动物模型研究发现,miR-148b 能够在动物体内减慢肿瘤细胞生长。同时,有学者报道肝癌中 miR-148b 的表达降低与患者的生存期存在相关性[8]。由此可见,miR-148b 确实在肝癌的发生过程中起着至关重要的作用。但其在 TAMs 对肝癌发生的作用及其分子机制尚未完全阐明。

在细胞的炎症反应中,MAPK 的激活处于核心地位。DUSP1 在细胞内主要催化已活化的 MAPK 家族成员(p38、JNK、ERK)特异性基序 TxY 中磷酸基团的水解,抑制其活性,从而减轻炎症反应[18]。DUSP1 在多种肿瘤中存在异常的表达,近来的研究表明 DUSP1 在肝癌的发生发展及其预后中有着重要的作用[19]。同时,有学者报道 miRNA 可以调控巨噬细胞中的 DUSP1 的表达水平参与肿瘤的发生、发展[20]。

为了探讨在肝癌中是否存在着异常表达的能调控 DUSP1 的 miRNAs 参与了 TAMs 对肝癌的发生过程影响,本研究首先提取外周血单核细胞并诱导生成 M1 型和 M2 型巨噬细胞,经 LPS 处理后的 M2 型巨噬细胞分泌的细胞因子 CD206 显著增加,并且 M2 型巨噬细胞能够明显促进肝癌细胞的生长和侵袭转移;我们进一步的研究证实,DUSP1 是 miR-148b 的靶基因,转染 miR-148b mimics 的 M2 巨噬细胞经 LPS 处理后,CD206 的表达水平明显增加,而转染 miR-148b inhibitor 的 M2 型巨噬细胞经 LPS 处理后,CD206 的表达量明显下调,共转染 miR-148b inhibitor 和 DUSP1-shRNA 后,CD206 分泌量上调;转染 miR-148b inhibitor 可以抑制肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 的生长和侵袭转移,而共转染 miR-148b inhibitor 和 DUSP1-shRNA 后,分泌量

增加的 CD206 可以促进细胞生长和侵袭转移;同时,CD206 的表达与肝癌的 TNM 分期明显相关。因此,提示在巨噬细胞中 miR-148b 可以通过靶向调控 DUSP1 的表达水平参与调控肝癌的发生、发展过程。

总之,本研究发现了 miR-148b 调节 DUSP1 影响细胞因子 CD206 的分泌参与了肝癌的发生过程,初步探讨了 miR-148b/DUSP1 这一信号通路抑制肝癌细胞生长、侵袭和转移的机制,将可能为肝癌的分子靶向的治疗提供新的治疗策略。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 – 90. DOI: 10.3322/caac.20107

[2] Pikarsky E, Porat R M, Stein I, *et al*. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer[J]. Nature, 2004, 431(7007): 461 – 466. DOI: 10.1038/nature02924

[3] Solinas G, Germano G, Mantovani A, *et al*. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation[J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(5): 1065 – 1073. DOI: 10.1189/jlb.0609385

[4] Okada H, Kohanbash G, Lotze M T. MicroRNAs in immune regulation—opportunities for cancer immunotherapy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1256 – 1261. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.02.002

[5] Song Y, Xu Y, Wang Z, *et al*. MicroRNA-148b suppresses cell growth by targeting cholecystokinin-2 receptor in colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2012, 131(5): 1042 – 1051. DOI: 10.1002/ijc.26485

[6] Zhao G, Zhang J G, Liu Y, *et al*. miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPKα1 [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(1): 83 – 93. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0534-T

[7] Wang G, Cao X, Lai S, *et al*. Altered p53 regulation of miR-148b and p55PIK contributes to tumor progression in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2015, 34(7): 912 – 921. DOI: 10.1038/onc.2014.30

[8] Zhang Z, Zheng W, Hai J. MicroRNA-148b expression is decreased in hepatocellular carcinoma and associated with prognosis[J]. Med Oncol, 2014, 31(6): 984.

[9] Ding G, Huang G, Liu H D, *et al*. MiR-199a suppresses the hypoxia-induced proliferation of non-small cell lung cancer cells through targeting HIF1α[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 384(1/2): 173 – 180. DOI: 10.1007/s11010-013-1795-3

[10] Marx J. Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger[J]. Science, 2004, 306(5698): 966 – 968. DOI: 10.1126/science.306.5698.966

[11] Xia L, Huang W, Tian D, *et al*. Forkhead box Q1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by transactivating ZEB2 and VersicanV1 expression[J]. Hepatology, 2014, 59(3): 958 – 973. DOI: 10.1002/hep.26735

[12] Fan Q M, Jing Y Y, Yu G F, *et al*. Tumor-associated macrophages promote cancer stem cell-like properties via transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2014, 352(2): 160 – 168. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.05.008

[13] Wang S, Zhao E, Kryczek I, *et al*. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal *via* STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells [J]. Gastroenterology, 2014, 147(6): 1393 – 1404. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.08.039

[14] Shirabe K, Mano Y, Muto J, *et al*. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma [J]. Surg Today, 2012, 42(1): 1 – 7. DOI: 10.1007/s00595-011-0058-8

[15] Chang H, Zhou X, Wang Z N, *et al*. Increased expression of miR-148b in ovarian carcinoma and its clinical significance[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(5): 1277 – 1280. DOI: 10.3892/mmr.2012.794

[16] Shen J, Hu Q, Schrauder M, *et al*. Circulating miR-148b and miR-133a as biomarkers for breast cancer detection[J]. Oncotarget, 2014, 5(14): 5284 – 5294.

[17] Zhang J G, Shi Y, Hong D F, *et al*. miR-148b suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting WNT1/β-catenin pathway[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8087. DOI: 10.1038/srep08087

[18] Lei Y Y, Wang W J, Mei J H, *et al*. Mitogen-activated protein kinase signal transduction in solid tumors[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(20): 8539 – 8548.

[19] Frau M, Feo F, Pascale R M. Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis[J]. J Hepatol, 2013, 59(4): 830 – 841.

[20] Wang Q, Shi S, He W, *et al*. Retaining MKP1 expression and attenuating JNK-mediated apoptosis by RIP1 for cisplatin resistance through miR-940 inhibition [J]. Oncotarget, 2014, 5(5): 1304 – 1314. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.20.8539

(**收稿**:2015-06-07;**修回**:2015-09-25)

(编辑 邓强庭)