DOI:10.16016/j.2097-0927.202404047

骨转移肝细胞瘤差异高表达基因 HDGF 的筛选及细胞生物学效应的初步研究

张 希[1,2],何永鹏[2],邵高海[1] 402177 重庆,重庆医科大学附属永川医院骨科[1];400000 重庆,重庆大学附属肿瘤医院肝胆胰肿瘤中心[2]

[摘要] **目的** 探究肝癌衍生生长因子(hepatoma-derived growth factor, HDGF)在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达,以及其对 DNA 损伤、增殖、迁移、上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)以及骨保护素(osteoprotegerin, OPG)的表达影响作用。**方法** 分析 GEO 数据库中 HCC 骨转移患者与 HCC 非转移患者的肝脏肿瘤中 mRNA 的差异表达特征,筛选出差异最显著基因 HDGF。利用 qRT-PCR 技术验证 HDGF mRNA 在转移能力不同的 HCC 细胞中的表达情况。分别通过 γ-H2AX 免疫荧光实验,分析不同组肝癌细胞的 DNA 损伤程度。采取 Cell counting Kit-8 试剂盒、集落形成实验和 Transwell 迁移实验检测 HDGF 对细胞增殖、迁移能力的影响。通过蛋白质印迹法,检测 EMT 相关蛋白 Vimentin、E-cadherin 在不同程度骨转移组 HCC 细胞中的表达差异。运用 qRT-PCR 技术和蛋白质印记法(western blot,WB)检测各组肝癌细胞中 OPG 的差异表达。**结果** HDGF 在骨转移的 HCC 组织和高转移性 HCC 细胞系中高表达;HDGF 高表达能够抑制细胞 DNA 损伤修复;HDGF 能够促进 HCC 细胞系增殖、迁移;HDGF 上调 Vimentin 的蛋白表达水平,同时下调 E-cadherin 的蛋白表达水平(P 均<0.05),且 HDGF 过表达下调了 OPG 的表达。**结论** HDGF 在骨转移肝细胞瘤中高表达,并可能通过促进 EMT、迁移和增殖而促进骨转移。

[关键词] 肝癌衍生生长因子;DNA 损伤;肝细胞癌骨转移;骨保护素;上皮-间质转化
[中图法分类号] R730.23; R735.7; R738.1 [文献标志码] A

Screening of hepatoma-derived growth factor with highly expression in HCC bone metastasis and its cellular biological effects

ZHANG Xi[1,2], HE Yongpeng[2], SHAO Gaohai[1] [1]Department of Orthopedics, Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 402177; [2]Hepatobiliary and Pancreatic Oncology Center, Affiliated Cancer Hospital of Chongqing University, Chongqing, 400000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of hepatoma-derived growth factor (HDGF) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effects on DNA damage, proliferation, migration, epithelial mesenchymal transition (EMT), and expression of osteoprotegerin (OPG) in HCC cells. **Methods** GEO database was analyzed to obtain the expression features of differential expressed mRNAs in liver tumors between HCC patients with bone metastasis and those without, and then HDGF was found as the most significantly differentially expressed gene. The mRNA expression of HDGF was verified in the HCC cells with varying metastatic capabilities by qRT-PCR. DNA damage levels in different groups of liver cancer cells were analyzed through γ-H2AX immunofluorescence assay. The effects of HDGF on cell proliferation and migration were detected with CCK-8 assay, colony formation assay, and Transwell migration assay. Western blotting was employed to measure the expression of EMT-related proteins Vimentin and E-cadherin in HCC cells with

[基金项目] 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(CSTB2022TIAD-KPX0172);重庆市技术创新与应用发展专项面上项目(2022yc-cxfz30008);重庆市自然科学基金面上(CSTB2023NSCQ-MSX0821);重庆市医药生物技术协会(cmba2022kyym-zkxmQ0012);沙坪坝区科卫联合医学科研项目(2023SQKWLH23)

[通信作者] 邵高海, E-mail:shanggaohai567@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

various capacities of bone metastasis. Then qRT-PCR and Western blotting were performed to determine the differential expression of OPG in various groups of liver cancer cells. **Results** HDGF was highly expressed in HCC tissues with bone metastasis and in high-metastatic HCC cell lines. High expression of HDGF inhibited DNA damage repair. HDGF promoted the proliferation and migration of HCC cell lines. HDGF up-regulated the protein expression level of Vimentin while down-regulated that of E-cadherin (both $P<0.05$), and overexpression of HDGF down-regulated the expression of OPG. **Conclusion** HDGF is highly expressed in bone metastatic hepatocellular tumors and may promote bone metastasis by facilitating EMT, migration, and proliferation.

[**Key words**] hepatoma-derived growth factor; DNA damage; bone metastasis of HCC; osteoprotegerin; epithelial mesenchymal transition

Supported by the Special Key Project of Technological Innovation and Application Development of Chongqing (CSTB2022TIAD-KPX0172), the Special General Project of Technological Innovation and Application Development of Chongqing (2022yc-cxfz30008), the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0821), the Project of Chongqing Medicinal Biotech Association (cmba2022kyym-zkxmQ0012), and the Joint Medical Research Project of Shapingba Science and Technology Commission and Health Commission (2023SQKWLH23). Corresponding author: SHAO Gaohai, E-mail: shanggaohai567@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内危害人类健康的恶性肿瘤,其发病率高和死亡率高[1],且易发生肺、骨、脑等处转移[2];总体而言,大约有25.5%至38.5%的肝外转移患者最终表现为骨骼转移导致骨骼受累[3]。溶骨性病变是HCC的骨转移的主要表现形式,在此过程中,破骨细胞的数量增多和功能增强,打破了破骨细胞和成骨细胞之间的动态平衡,从而导致骨组织的破坏[4]。发生骨转移的肿瘤细胞通过旁分泌多种细胞因子,如NF-κB受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor-κB ligand, RANKL)、甲状旁腺激素相关肽(parathyroid hormone-related peptide, PTHrP)、骨保护素(osteoclastogenesis inhibitory factor, OPG)、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)以及增殖诱导配体(aproliferation inducingligand, APRIL)等,影响破骨细胞前体的分化,从而调节破骨细胞的形成和成熟[4-5]。在骨吸收过程中,大量的生长因子和钙离子从矿化的骨基质中释放出来,从而可以促进肿瘤细胞的定植和增殖[4]。在肿瘤细胞和破骨细胞发生相互作用之前,肝癌细胞必须在体循环中存活并跨越血窦壁定居在骨髓中[6]。

上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是上皮来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要过程,通过减弱细胞黏附力,增强流动性、可塑性和抗凋亡能力,从而提高肿瘤细胞在迁移过程中存活率以及转移到目标部位[7]。到目前为止,开发肝癌骨转移治疗方法主要针对通过使用骨吸收抑制剂,例如RANKL抗体或双膦酸盐来恢复骨微环境的动态平衡,以对抗破骨细胞的形成。然而,接受这些治疗的患者中有30%-50%会出现新的骨并发症或疾病进展[4]。因此,需要对HCC骨转移有更深刻的了解,以开发更有效的治疗方法。

HCC通常与慢性肝损伤密切相关,慢性肝损伤导致细胞反复死亡和再生,慢性肝脏炎症和纤维化导致肝细胞DNA损伤。作为对DNA损伤的反应,肝细胞激活DNA损伤反应(DNA-damage response, DDR)信号来修复DNA损伤[8]。破坏损伤修复途径可能导致DNA突变和正常细胞转化为肿瘤细胞,导致基因组不稳定,这可能导致正常细胞死亡或转化为肿瘤细胞,从而导致肿瘤的发生发展[8]。

HDGF最早是从人肝癌细胞系Huh-7的条件培养基中分离得到,早期研究表明其是一种酸性肝素结合蛋白,分子量为$(18.5\sim19.5)\times10^3$,其结构与bFGF相关[9]。虽然它被认为是一种分泌型生长因子,但它的氨基酸序列缺乏信号肽,但包括一个与核蛋白的高迁移率基团盒同源的区域[10]。有研究发现该生长因子能够增强成纤维细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和一些肝癌细胞的增殖能力。最近的研究证实,肝、肺、肾、肠道和心血管系统的发育过程有HDGF的参与[11-13]。与邻近的非肿瘤区域相比,在小鼠和人类的几种类型的癌症中,HDGF的表达增加[13]。HDGF在一些实验中被发现,其过度表达影响恶性肿瘤细胞的侵袭性相关表型,比如细胞增殖、迁移和侵袭[14-17]。因此,对于肝[18]、胃[19]、胰腺[20]和肺[21]的恶性肿瘤,以及胃肠道间质瘤[22]患者来说,HDGF可能是影响疾病预后的积极因素。

在本研究中,我们报道了HDGF通过抑制DNA损伤修复来促进肝癌的发生发展,并且可能通过EMT途径以及下调OPG的表达来促进HCC的骨转移,探讨HDGF在HCC发生及骨转移中的作用,以期为HCC

骨转移的诊断、治疗及预后提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒与病毒 人高转移性 HCC 细胞系 MHCC97H 购自碧云天公司。人正常肝细胞系(LO2)以及人原发性肝癌细胞系(SMMC-7721)是从上海中科院购得。HDGF 过表达质粒、重组敲低 HDGF 慢病毒和阴性对照由吉凯基因公司合成。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂、仪器及厂家见表 1。

表 1 主要试验试剂及仪器

名称	生产厂家
胎牛血清(FBS)	以色列 BI 公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
反转录和 qRT-PCR 试剂盒	湖南艾科瑞公司
GAPDH PCR 引物	上海生工公司
OPG PCR 引物	上海生工公司
HDGF PCR 引物	上海生工公司
CCK-8 试剂盒	北京索莱宝公司
Transwell 小室	美国 Corning 公司
总蛋白提取试剂盒	碧云天生物技术(上海)有限公司
BCA 蛋白定量试剂盒	碧云天生物技术(上海)有限公司
十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒	碧云天生物技术(上海)有限公司
聚偏二氟乙烯膜	碧云天生物技术(上海)有限公司
骨保护素(OPG)抗体	北京博奥森公司
波形蛋白(Vimentin)	北京博奥森公司
E-钙黏蛋白(E-cadherin)	北京博奥森公司
β-actin 抗体	北京博奥森公司
辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗	北京博奥森公司
SW-9800 型超净工作台	苏州泰安空气技术有限公司
PCR 逆转录仪	美国 Bio-Rad 公司
CFX96™ 实时荧光定量 PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
蛋白垂直电泳电转系统	美国 Bio-Rad 公司
酶标仪	美国 ThermoFisher 公司

1.2 方法

1.2.1 GEO 数据库数据分析 所有微阵列数据均从 GEO 数据库(http://www.ncbi.nih.gov/geo;GSE27635)原始数据下载为 MINiML 文件。它包含了 GSE 的所有平台、样本和 GSE 记录的数据。归一化处理前,先对提取的数据进行 $\log_2$ 变换。微阵列数据通过 R 软件(version 3.4.1)中的 preconditioningCore 程序包的标准化分位数函数进行标准化下载。基于归一化后数据的注释内容,将探针转换为基因符号。删除这些数据集中匹配多个基因的探针,并计算测得的多个探针的基因平均表达值作为最终的表达值。

1.2.2 细胞培养与质粒、慢病毒转染 在质粒转染实验中,将处于对数生长期的细胞使用胰酶进行消化、计数、铺板。提前将细胞按一定数量接种到 6 孔板中,观察细胞,当细胞数量达到 50%左右用于进行下一步转染实验。按照 Lipofectamine 2000 说明书的步骤进行转染。在 HCC 细胞慢病毒转染实验中,向 DMEM 培养基中加入 10% 胎牛血清(FBS),并放置在 37 ℃,5%CO_2 的恒温培养箱中培养。按照 MOI = 40 加入慢病毒液感染汇合度为 30%~40%的 HCC 细胞 24 h,以转染空白载体细胞为阴性对照组,HDGF 敲低细胞为实验组,72 h 后加入嘌呤霉素筛选。

1.2.3 qRT-PCR 采用 TRIzol 试剂法提取组织及细胞中的总 RNA,然后按照逆转录试剂盒说明书将其逆转录为 cDNA,将原液稀释 5 倍后进行 RT-PCR 反应,每组设置 3 个复孔。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 RNA 的相对表达量。引物序列如表 2。

表 2 引物名称及序列

引物名称	引物序列
HDGF	正义:CTTAGCAAAGGCGGACGTAG 反义:GCTTGCCAAACTTCTCCTTG
GAPDH	正义:CAGCTAGCCGCATCTTCTTTT 反义:GTGACCAGGCGCCCAATAC

1.2.4 CCK-8 增殖实验 取转染 48 h 后的细胞(8 000 个/孔),接种于 96 孔板,每组设置 3 个复孔。将 CCK-8 溶液和无血清 DMEM 培养基按 1∶10 配置,弃掉原液后,每孔加 100 μL 配置液,培养箱中孵育 2 h 后检测 450 nm 波长处的吸光度。

1.2.5 Transwell 实验 细胞转染 48 h 后进行消化、计数,取 500 μL DMEM 培养基加入 Transwell 下室、200 μL 细胞悬液(含 5×10^4 个细胞)接种于上室,放入孵箱中培养 36 h。取出 Transwell 小室,依次用 4%多聚甲醛固定、结晶紫染色处理、PBS 洗涤后晾干,放于倒置显微镜下拍照。

1.2.6 蛋白质印迹法 ①提取各组细胞或组织总蛋白,使用 BCA 法测其浓度,定量后 100 ℃沸水中煮 10 min 使蛋白变性。②配胶,上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,切胶,转膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入一抗(稀释比例为 OPG 1∶1 000、Vimentin 1∶1 000、E-cadherin 1∶1 500 和 β-actin 1∶1 000),放入 4 ℃冰箱孵育过夜。③复温,TBST 洗膜每次 10 min,洗 3 次,加入二抗(稀释比 1∶2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜每次 10 min,洗 3 次。④使用 ECL 试剂盒进行发光显

影。采用 ImageJ 软件进行半定量分析。

1.2.7　γ-H2AX 免疫荧光　　取转染后 48 h 处于对数生长期的细胞(5×10^4 个/孔),接种于 24 孔板。放入培养箱中培养 24 h,弃旧培养液,PBS 清洗 1 次,余步骤按照 DNA 损伤检测试剂盒说明书的步骤进行操作。使用荧光显微镜进行拍照。

1.2.8　统计学分析　　利用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,两个样本计数资料间差异采用四格表 χ^2 检验,采用 t 检验进行两组间比较。每个实验至少重复 3 次,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　HDGF 在 HCC 骨转移数据集中高表达

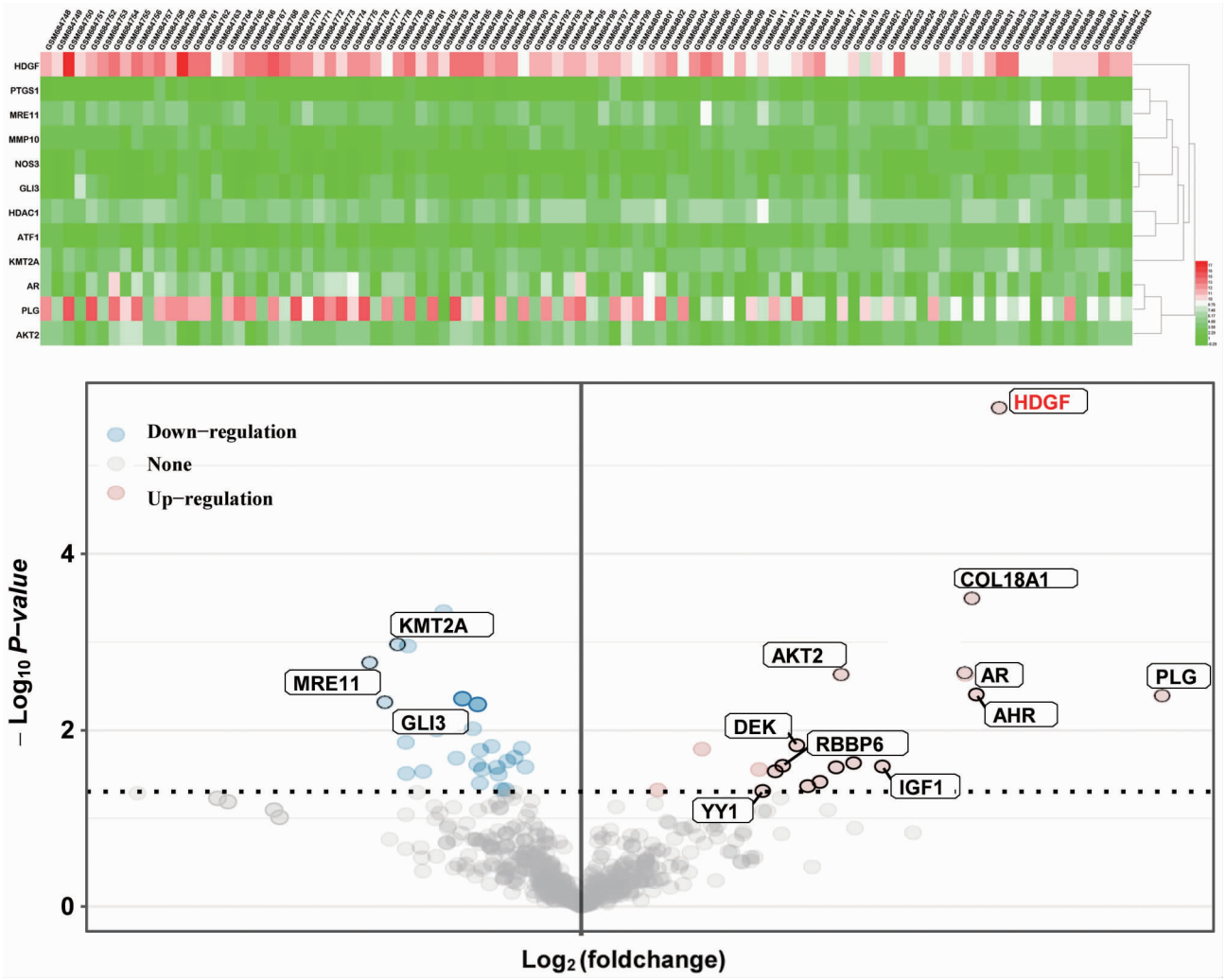
根据 GEO 数据库分析,在数据集 GSE27635 的 96 组样本中,与未发生任何部位转移的 HCC 肿瘤(48 例)相比,发生骨转移的 HCC 肿瘤样本(48 例)中多个基因表达存在显著差异。火山图显示了从每个数据集中鉴定出的差异表达基因的数量,值得注意的是,HDGF mRNA 的表达在骨转移 HCC 样本中上调最为显著(图 1B)。

2.2　高转移性的 HCC 细胞系中 HDGF 的表达增加

如图 2 所示,与人正常肝细胞系 LO2 相比,低转移性 HCC 细胞系 SMMC-7721 中 HDGF mRNA 的表达量增高($P<0.001$),而在高转移性的 HCC 细胞系 MHCC97H 中 HDGF mRNA 的表达量比 SMMC-7721 细胞有更明显的增加($P<0.01$)。

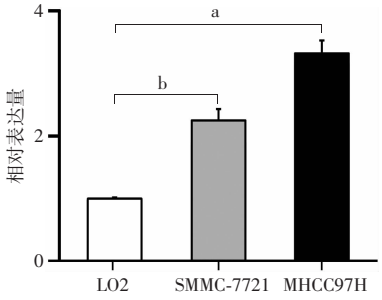
2.3　过表达及敲低 HDGF 的 HCC 细胞模型构建

如图 3 所示,运用质粒与重组慢病毒转染 HCC 细胞系 SMMC-7721 后,qRT-PCR 结果和 WB 结果显示实验组 HDGF mRNA 表达水平与对照组相比显著升高或降低($P<0.001$),表明在 HCC 细胞中 HDGF 被成功上调和下调。



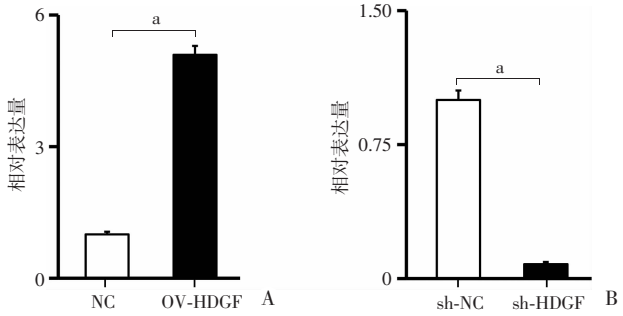
A: HCC 骨转移数据集差异基因表达热图;B: HCC 骨转移数据集差异基因表达火山图

图 1　原发性肝癌骨转移 GEO 数据集中差异基因表达



a:$P<0.01$, b:$P<0.001$; $n=3$

图 2 通过 qRT-PCR 检测原发性肝癌细胞中 HDGF 的表达情况



a:$P<0.001$, $n=3$, $\bar{x}\pm s$;A:转染载体质粒(vector)或 HDGF 过表达质粒(HDGF)的 SMMC-7721 细胞中 HDGF 的表达;B:转染 sh-nc 或 sh-HDGF 的 SMMC-7721 细胞中 HDGF 的表达

图 3 通过 qRT-PCR 验证 SMMC-7721 细胞中 HDGF 的过表达或敲除的效率

2.4 HDGF 抑制 HCC 细胞的 DNA 损伤修复

采用 γ-H2AX 免疫荧光法检测 HDGF 对 HCC 细胞的 DNA 损伤修复的影响。如图 4 所示,与对照组相比,转染 HDGF 过表达质粒后明显抑制 SMMC-7721 细胞的 DNA 损伤修复,而转染 HDGF 敲低慢病毒的 SMMC-7721 细胞 DNA 损伤修复能力则显著增强(图 4)。

2.5 HDGF 促进 HCC 细胞的增殖与迁移

通过 CCK8 和集落形成实验,研究 HDGF 对 HCC 细胞系增殖能力的影响;通过 Transwell 迁移实验研究 HDGF 对 HCC 细胞系迁移能力的影响。CCK-8 结果显示,转染 HDGF 过表达质粒的 SMMC-7721 细胞增殖活性较对照组细胞升高($P<0.01$,图 5A),而转染重组敲低 HDGF 慢病毒的 SMMC-7721 细胞增殖活性较对照组细胞降低($P<0.01$,图 5B)。集落形成实验也佐证了这一结果(图 5C)。与对照组相比,在 SMMC-7721 细胞中过表达 HDGF 后,穿过小室的细胞数增多($P<0.01$,图 5D),而在 SMMC-7721 细胞中敲低 HDGF 后穿过小室的细胞数减少($P<0.05$,图 5E)。结果表明过表达 HDGF 能够促进 HCC 细胞的增殖及迁移。

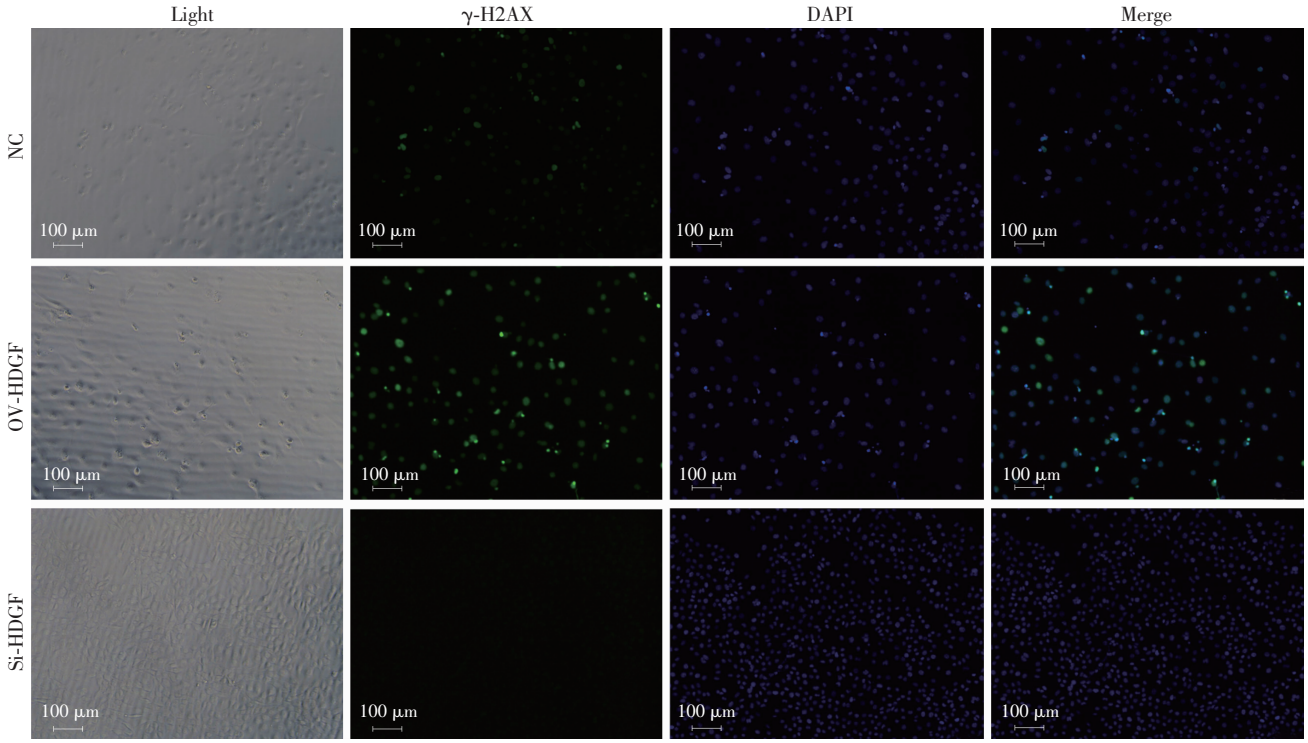
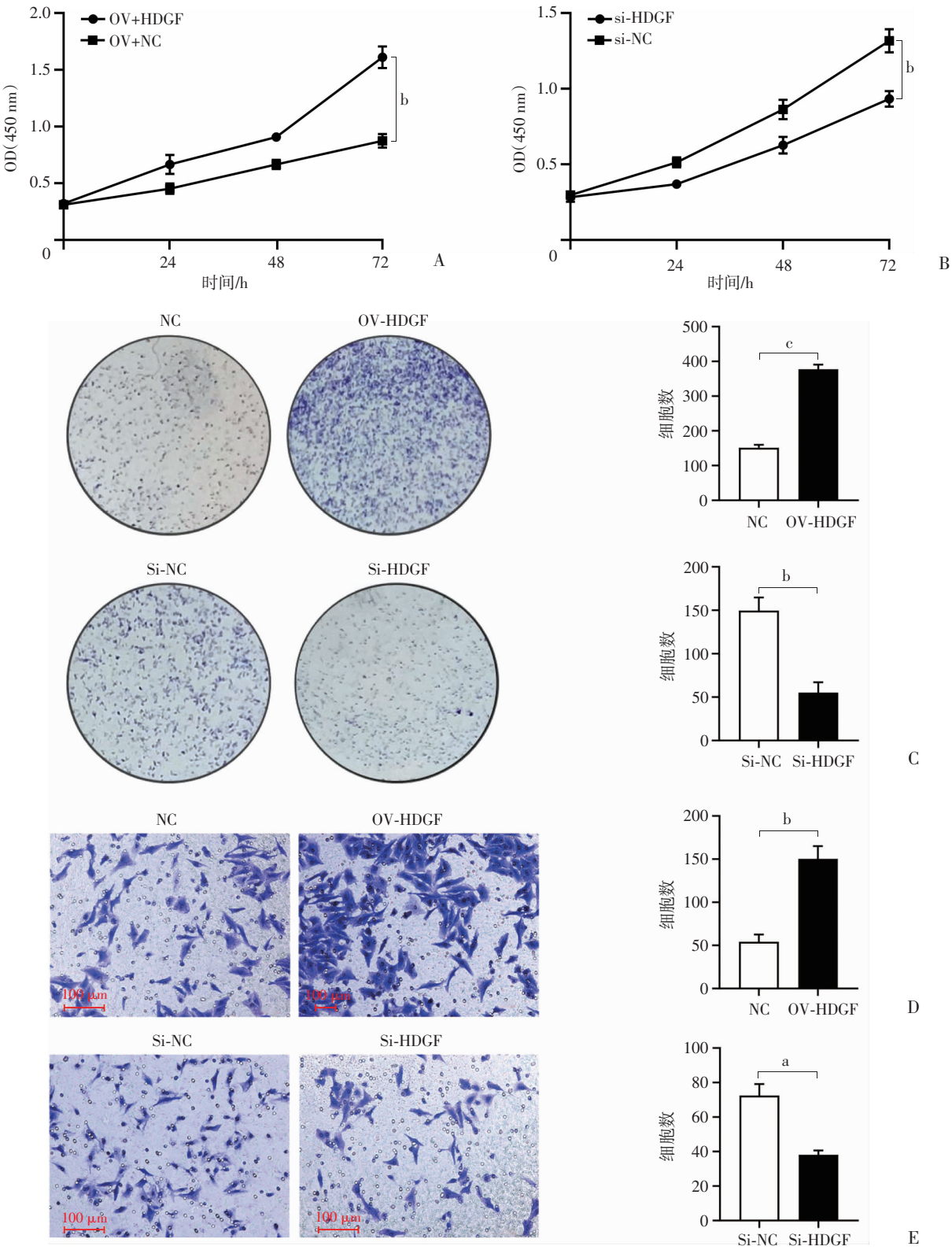


图 4 γ-H2AX 免疫荧光实验评估原发性肝癌细胞中 DNA 损伤修复情况



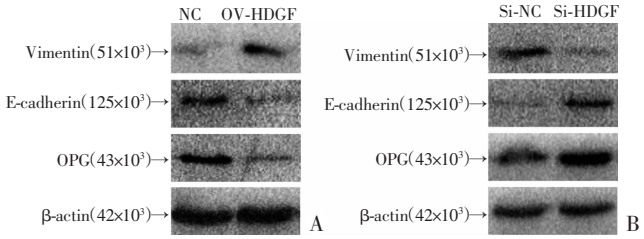
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$; $n=3$

A、B:采用 CCK-8 法测定 HCC 细胞的生长曲线;C:集落形成法检测 HCC 细胞的增殖情况;D、E: Transwell 法检测肝癌细胞的迁移情况

图 5 CCK-8 增殖实验、集落形成实验以及 Transwell 迁移实验探究 HDGF 对 HCC 细胞增殖及迁移的影响

2.6 HDGF 激活肝癌细胞 EMT 途径并下调 OPG 的表达

基于上述实验,我们通过 western blot 检测了不同处理组的 Vimentin、E-cadherin 以及 OPG 蛋白表达情况。实验结果表明,SMMC-7721 细胞经过转染过表达 HDGF 后,细胞中 Vimentin 蛋白的表达水平也有显著升高,然而 E-cadherin 和 OPG 蛋白表达降低(P 均<0.05,图 6A)。与此同时,转染重组 HDGF 敲低慢病毒后,细胞中 Vimentin 蛋白表达显著降低,E-cadherin 以及 OPG 蛋白表达显著升高(P 均<0.05,图 6B)。



A、B:空载体质粒(vector)、HDGF 过表达质粒(HDGF)、si-nc 或 si-HDGF 转染 SMMC-7721 细胞中 EMT 相关蛋白和 OPG 蛋白水平。$n=3$

图 6 HDGF 对原发性肝癌细胞中 EMT 相关蛋白和 OPG 蛋白表达的影响

3 讨论

直到几年前,HCC 的骨骼受累还很少被描述。近年来,尽管在 HCC 治疗方法方面取得了很多进展,如手术切除、射频消融、经导管动脉化疗栓塞术以及使用小分子多激酶抑制剂治疗,延长了 HCC 患者的生存时间。但是,部分治疗方法同时也加速了 HCC 骨转移的进程。众所周知,骨是仅次于肺和淋巴结的所有肿瘤的第三大转移部位,据报道,大约 20%的 HCC 患者有骨转移[23-24]。

我们通过 GEO 数据库发现 HDGF 在合并骨转移的 HCC 中显著高表达,提示其可能与 HCC 的骨转移进程相关。本研究发现 HDGF 在高转移性的 HCC 细胞系中显著高表达,并且过表达 HDGF 会促进 HCC 的增殖与迁移。以上这些提示我们 HDGF 与 HCC 的发生发展紧密相关,这些有意义的结果值得我们继续去探索 HDGF 成为 HCC 诊断标志物和治疗靶点的可能性。

更好地了解骨转移在肝癌扩散中的致病机制很重要,因为与其他嗜骨性癌症一样,血管生成和 EMT 都是与肿瘤发展有关的重大事件[25-26]。HCC 骨转移可能与门脉高压和椎静脉系统的侧支生长有关[27-28]。在 EMT 过程中,上皮细胞失去细胞极性和上皮表型,重塑细胞骨架,从而获得具有高迁移能力的间质表型。既往实验结果表明,是恶性肿瘤细胞获得侵袭迁移能力的一个重要过程[29],并被认为是肿瘤发生转移的重要标志[30]。其主要的特征为通过 Wnt 和 Notch 信号通路使 E-钙黏蛋白表达减少、波形蛋白表达增加。结合我们的研究,HDGF 可能通过 EMT 信号通路促进 HCC 的转移。我们检测 HDGF 对 HCC 细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响。结果显示,过表达 HDGF 可促进 Vimentin 蛋白表达显著升高,E-cadherin 蛋白表达降低,而敲低 HDGF 则产生相反的作用。以上结果说明,HDGF 可能通过 EMT 通路相关蛋白表达促进 HCC 的转移。

当 DNA 损伤发生时,细胞通过激活 DDR 信号来识别损伤的 DNA,并招募 DNA 修复蛋白到 DNA 损伤位点,以促进损伤修复[31]。损伤修复途径的中断可能导致某些癌基因或肿瘤抑制基因的突变或失活,从而导致正常细胞死亡或转化为肿瘤细胞[31]。与此一致,我们发现在 HCC 细胞系中,HDGF 高表达抑制 DNA 损伤修复并增加癌变进展。

在本实验中,我们先检测了 HDGF 在 HCC 中的表达,随后探究了其对 HCC 增殖、迁移的作用,发现 HDGF 可通过 EMT 通路以及下调 OPG 的表达来促进肝细胞肝癌的迁移。但未更进一步研究 HDGF 对血管形成以及破骨细胞功能的影响从而促进 HCC 骨转移的机制。这是本研究的局限性,希望能在后续研究中完善这一方面的实验。骨转移涉及的机制很多,EMT 相关通路是肝癌转移的普遍过程,在本实验中,我们只初步探索了 HDGF 与 EMT 途径的相关性,可在后续课题中进一步探究 EMT 相关通路和 OPG 的相互作用以及肝癌骨转移和其他转移(如肺转移、脑转移等)的特异性机制网络。

参考文献:

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, *et al*. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263. DOI: 10.3322/caac.21834.

[2] HUANG Z, WEN J Y, WANG Y F, *et al*. Bone metastasis of hepatocellular carcinoma: facts and hopes from clinical and translational perspectives[J]. Front Med, 2022, 16(4):

551-573. DOI: 10.1007/s11684-022-0928-z.

[3] OZER M, GOKSU S Y, LIN R Y, *et al*. Effects of clinical and tumor characteristics on survival in patients with hepatocellular carcinoma with bone metastasis [J]. J Hepatocell Carcinoma, 2023, 10: 1129-1141. DOI: 10.2147/JHC.S417273.

[4] WEILBAECHER K N, GUISE T A, MCCAULEY L K. Cancer to bone: a fatal attraction [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6): 411-425. DOI: 10.1038/nrc3055.

[5] HEMINGWAY F, TAYLOR R, KNOWLES H J, *et al*. RANKL-independent human osteoclast formation with APRIL, BAFF, NGF, IGF I and IGF Ⅱ [J]. Bone, 2011, 48(4): 938-944. DOI: 10.1016/j.bone.2010.12.023.

[6] CHEN S X, LEI J C, MOU H C, *et al*. Multiple influence of immune cells in the bone metastatic cancer microenvironment on tumors[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1335366. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1335366.

[7] HANAHAN D. Hallmarks of cancer: new dimensions[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 31-46. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

[8] HONG W F, ZHANG Y, WANG S W, *et al*. Deciphering the immune modulation through deep transcriptomic profiling and therapeutic implications of DNA damage repair pattern in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2024, 582: 216594. DOI: 10.1016/j.canlet.2023.216594.

[9] KLAGSBRUN M, SASSE J, SULLIVAN R, *et al*. Human tumor cells synthesize an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(8): 2448-2452. DOI: 10.1073/pnas.83.8.2448.

[10] ENOMOTO H, NAKAMURA H, LIU W, *et al*. Hepatoma-derived growth factor: its possible involvement in the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(6): 14086-14097. DOI: 10.3390/ijms160614086.

[11] LI Y T, DITTMANN N L, EVE A, *et al*. Hepatoma derived growth factor enhances oligodendrocyte genesis from subventricular zone precursor cells[J]. ASN Neuro, 2022, 14: 17590914221086340. DOI: 10.1177/17590914221086340.

[12] WANG E M, HU T H, HUANG C C, *et al*. Hepatoma-derived growth factor participates in concanavalin A-induced hepatitis[J]. FASEB J, 2020, 34(12): 16163-16178. DOI: 10.1096/fj.202000511RR.

[13] YANG J, AMBADE A S, NIES M, *et al*. Hepatoma-derived growth factor is associated with pulmonary vascular remodeling and PAH disease severity and survival[J]. Pulm Circ, 2022, 12(1): e12007. DOI: 10.1002/pul2.12007.

[14] HUGE N, REINKENS T, BUURMAN R, *et al*. MiR-129-5p exerts Wnt signaling-dependent tumor-suppressive functions in hepatocellular carcinoma by directly targeting hepatoma-derived growth factor HDGF[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 192. DOI: 10.1186/s12935-022-02582-2.

[15] ELTAHIR H M. Insight into the roles of hepatoma derived growth factor related protein-3 under physiological and pathological conditions[J]. Biochem Cell Biol, 2018, 96(6): 707-712. DOI: 10.1139/bcb-2018-0098.

[16] CHANG K C, TAI M H, LIN J W, *et al*. Hepatoma-derived growth factor is a novel prognostic factor for gastrointestinal stromal tumors[J]. Int J Cancer, 2007, 121(5): 1059-1065. DOI: 10.1002/ijc.22803.

[17] CHU T H, HUANG S T, YANG S F, *et al*. Hepatoma-derived growth factor participates in *Helicobacter pylori*-induced neutrophils recruitment, gastritis and gastric carcinogenesis[J]. Oncogene, 2019, 38(37): 6461-6477. DOI: 10.1038/s41388-019-0886-3.

[18] KOH H M, HYUN C L, JANG B G, *et al*. The relationship between hepatoma-derived growth factor and prognosis in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2020, 99(51): e23837. DOI: 10.1097/MD.0000000000023837.

[19] WUPUTRA K, KU C C, PAN J B, *et al*. Independent signaling of hepatoma derived growth factor and tumor necrosis factor-alpha in human gastric cancer organoids infected by *Helicobacter pylori*[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7): 6567. DOI: 10.3390/ijms24076567.

[20] CHEN X Y, YUN J, FEI F, *et al*. Prognostic value of nuclear hepatoma-derived growth factor (HDGF) localization in patients with breast cancer[J]. Pathol Res Pract, 2012, 208(8): 437-443. DOI: 10.1016/j.prp.2012.03.004.

[21] HAN S Y, TIAN Z H, TIAN H F, *et al*. HDGF promotes gefitinib resistance by activating the PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways in non-small cell lung cancer[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 181. DOI: 10.1038/s41420-023-01476-0.

[22] LEPOURCELET M, TOU L Q, CAI L, *et al*. Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF)[J]. Development, 2005, 132(2): 415-427. DOI: 10.1242/dev.01579.

[23] UCHINO K, TATEISHI R, SHIINA S, *et al*. Hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: clinical features and prognostic factors[J]. Cancer, 2011, 117(19): 4475-4483. DOI: 10.1002/cncr.25960.

[24] UKA K, AIKATA H, TAKAKI S, *et al*. Clinical features and prognosis of patients with extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(3): 414-420. DOI: 10.3748/wjg.v13.i3.414.

[25] CHUNG C L, WU C H, HUANG Y H, *et al*. Blocking hepatoma-derived growth factor attenuates vasospasm and neuron cell apoptosis in rats subjected to subarachnoid hemorrhage[J]. Transl Stroke Res, 2022, 13(2): 300-310. DOI: 10.1007/s12975-021-00928-y.

[26] WANG C, JIANG K, KANG X N, *et al*. Tumor-derived secretory clusterin induces epithelial-mesenchymal transition and facilitates hepatocellular carcinoma metastasis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(12): 2308-2320. DOI: 10.1016/j.biocel.2012.09.012.

[27] LIU X J, LIU W L, YANG F M, *et al*. Hepatoma-derived growth factor predicts unfavorable prognosis of epithelial ovarian cancer[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2101-2109. DOI: 10.2147/OTT.S85660.

[28] BUIJS J T, VAN DER PLUIJM G. Osteotropic cancers: from primary tumor to bone[J]. Cancer Lett, 2009, 273(2): 177-193. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.05.044.

[29] MICALIZZI D S, FARABAUGH S M, FORD H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 117-134. DOI: 10.1007/s10911-010-9178-9.

[30] LU Z, NI H H, YANG X H, *et al*. Prognostic potential of preoperative circulating tumor cells to predict the early progression recurrence in hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy[J]. BMC Cancer, 2023, 23(1): 1150. DOI: 10.1186/s12885-023-11629-0.

[31] REICHL P, HAIDER C, GRUBINGER M, *et al*. TGF-β in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(27): 4135-4147. DOI: 10.2174/138161212802430477.

[32] LORD C J, ASHWORTH A. The DNA damage response and cancer therapy[J]. Nature, 2012, 481(7381): 287-294. DOI: 10.1038/nature10760.

(收稿:2024-04-13;修回:2024-08-10)

(编辑 邓强庭)