

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.12.003

亚砷酸钠抑制肝癌细胞增殖与 PML 蛋白表达^{*}

王 伟,杨俊涛,刘宏鸣,袁 涛,刘孟刚,金世龙[△]
(第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科,重庆 400042)

[摘要] **目的** 研究亚砷酸钠抑制肝癌(HCC)细胞增殖是否与早幼粒细胞白血病(PML)蛋白表达有关。**方法** 免疫组织化学法、免疫荧光、蛋白免疫印迹法(Western blot)和荧光定量 PCR 检测 HCC 组织 PML 蛋白及基因表达。**结果** 免疫组织化学分析显示随机选择 15 例高分化、中度分化和低分化 HCC 组织和细胞均不同程度表达 PML 蛋白。Western blot 分析发现 24 例 HCC 组织、HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 和 L02 细胞均表达 PML 蛋白。免疫荧光提示 HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 细胞核均有 PML 蛋白颗粒,其中 HuH7 和 Hep3B 细胞表达 PML 蛋白较 HepG2、SMMC-7721 细胞多。24 例 HCC 组织、Hep3B、HepG2、SMCC-7721 和 HuH7 细胞都表达 PML 基因。亚砷酸钠不仅可下调 HuH7 和原代 HCC 细胞表达 PML 蛋白,而且亚砷酸钠抑制 HuH7、HepG2、Hep3B 和 SMMC-7721 细胞生长,随着暴露时间延长亚砷酸钠对 HCC 细胞抑制作用增强。**结论** HCC 组织和细胞系普遍表达 PML 基因和蛋白,PML 蛋白可能是砷剂直接靶向作用的分子基础。

[关键词] 肝肿瘤;白血病,早幼粒细胞,急性;亚砷酸盐

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)12-1591-04

Sodium arsenite inhibiting proliferation of hepatocellular carcinoma cells and expression of promyelocytic leukemia protein^{*}
Wang Wei,Yang Juntao,Liu Hongming,Yuan Tao,Liu Menggang,Jin Shilong[△]
(*Department of Hepatobiliary Surgery,Field Surgery Research Institute of Daping Hospital,Third Military Medical University,Chongqing 400042,China*)

[Abstract] **Objective** To investigate whether the sodium arsenite inhibiting proliferation of hepatocellular carcinoma(HCC) cells and having a relation with the expression of promyelocytic leukemia (PML) protein. **Methods** The immunohistochemistry, Western blot analysis,immunofluorescence assay and quantitative PCR were used to examine the PML gene and protein expression in HCC tissue and cells. **Results** The immunohistochemical staining showed that the PML protein was expressed in nucleus of well-differentiated,moderately differentiated and poorly differentiated HCC tissues randomly selected from 15 cases of HCC undergoing hepatic resection. Western blot analysis showed that PML protein was expressed at varying levels in all 24 HCC tissue samples,HuH7,HepG2,Hep3B,SMMC-7721 and L02 cells. The immunofluorescence assay demonstrated that PML protein grains were found in the nuclei of the HuH7,HepG2,Hep3B and SMCC-7721 cells,in which HuH7 and Hep3B expressed more PML proteins than HepG2 and SMMC-7721 cells. 24 HCC tissue samples,Hep3B,HepG2,SMCC-7721 and HuH7 cells all expressed PML gene. Sodium arsenite not only down-regulated the PML protein expressed in HuH7 and primary HCC cells,but also inhibited the HCC cell growth of HepG2,Hep3B,HuH7 and SMMC-7721,with the exposure time extension,the inhibiting effect of sodium arsenite on HCC cells was enhanced. **Conclusion** Both HCC cell lines and tissues generally express their PML protein and gene. PML protein may serve as the molecular basis for the direct targeting effects of arsenical agents.

[Key words] liver neoplasms;leukemia,promyelocytic,acute;arsenites

肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)发病率居世界恶性肿瘤第 5 位,几乎 45% 的 HCC 病例源于中国,且与乙型和丙型肝炎病毒感染有关^[1-2]。20 世纪 70 年代,我国学者用三氧化二砷(As₂O₃)治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukaemia,APL)取得了世人瞩目的突破性进展;近年应用 As₂O₃ 治疗实体肿瘤的试验和临床研究受到广泛重视,显示出其更为广范的应用前景^[3-4]。虽然 As₂O₃ 明显抑制 HCC 细胞增殖、诱导癌细胞凋亡,但 As₂O₃ 对 HepG2 和 SMCC-7721 生长抑制分子机制仍不清楚。前期研究结果提示 As₂O₃ 可下调 HuH7 细胞早幼粒细胞白血病(promyelocytic leukemia,PML)蛋白表达,诱导 HCC 干细胞分化^[5];但是,仅仅知道 HuH7 细胞表达 PML 蛋白,HCC 组织是否普遍表达 PML 基因及蛋白缺乏研究数据。砷剂治疗 HCC 是否与 PML 表达有关更不清楚,本文重点分析 HCC 组织和细胞 PML 蛋白表达及亚砷酸钠对 HCC 细胞 PML 蛋白表达的调节作用,建立砷剂治疗 HCC 与 HCC 细胞表达 PML 的联系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 175 例 HCC 组织于 2012 年 1 月至 2013 年 6 月取自西南医院、新桥医院和大坪医院 HCC 切除的患者。

1.2 细胞与试剂 HuH7、HepG2、Hep3B、L02、SMMC-7721 细胞系由第三军医大学西南医院肝胆科和病理科赠送,其中 L02 为正常肝细胞,其余 4 种为 HCC 细胞,白血病细胞株 HL60 和 NB4 细胞由重庆医科大学生命科学研究院赠送。DMEM 和胎牛血清(FBS)为 Hyclone 产品,RPMI-1640 为 IVD 产品。总 RNA 提取试剂盒、cDNA 逆转录试剂盒为 BioFlux 产品,Promega GoTaq qPCR Master Mix 为 Promega 产品。PML 抗体购自 Abcam 和 Santa Cruz 公司。激光共聚焦显微镜为 LSM780。

1.3 细胞培养 HuH7、HepG2、Hep3B、L02 和 SMCC-7721 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养液,37℃、5% CO₂、饱和湿

^{*} 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会局会中医药科技项目资助(ZY20132047)。 作者简介:王伟(1981—),主治医师,本科,主要从事肝胆外科疾病临床研究。 [△] 通讯作者,E-mail:Shilongjin828@sina.com。

度的培养箱孵育,细胞汇合度达到 70%~80%时,0.25%胰酶消化细胞,收集细胞进行试验。HL60 和 NB4 细胞在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液,37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱孵育,收集细胞提取蛋白。

1.4 CCK-8 法分析 HCC 生长抑制情况 HCC 细胞接种于 96 孔板,每孔加 1.0×10^3 个细胞,加入 100 μ L 10% FBS 的 DMEM 培养基(每 2 天换液)使其贴壁生长。次日细胞贴壁后分别加入不同浓度亚砷酸钠(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μ g/mL)每种浓度设 12 个孔,设调零孔 12 个(不加细胞)和细胞对照孔 12 个(不加药物),在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中孵育 48、72、96 h 后吸出培养液。每孔分别加入 90 μ L DMEM 培养基和 10 μ L CCK-8 溶液,继续培养 2 h,在酶标仪上测定 450 nm 吸光度值[A(450)]。

1.5 Western blot 分析 HCC 细胞和组织 PML 蛋白表达 提取细胞和组织总蛋白。Western blot 检测 PML 蛋白表达:配置 10%分离胶和 4%积层胶。上样量为每泳道 90 μ g 蛋白,体积 25~30 μ L。电泳,积层胶电压 80 V,分离胶电压 100~120 V,电泳 2~3 h。切胶后聚偏氟乙烯(PVDF)膜向正极,胶在负极,将滤纸、PVDF 膜及凝胶整齐重叠后放在湿转槽、电流 150 mA 转移 90 min。取下 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭,室温震荡 1~2 h。将封闭的膜滴加一抗按(1:100),4℃湿盒内过夜,次日 PBS 漂洗 15 min $\times$ 1 次,5 min $\times$ 4 次,二抗按(1:2 500),25℃振荡 1 h,PBS 漂洗 15 min $\times$ 1 次,5 min $\times$ 4 次。混合等体积 A 液和 B 液(各 500 μ L,共 1 mL),将显色剂滴加到 PVDF 膜正面,开始显色记录图像。

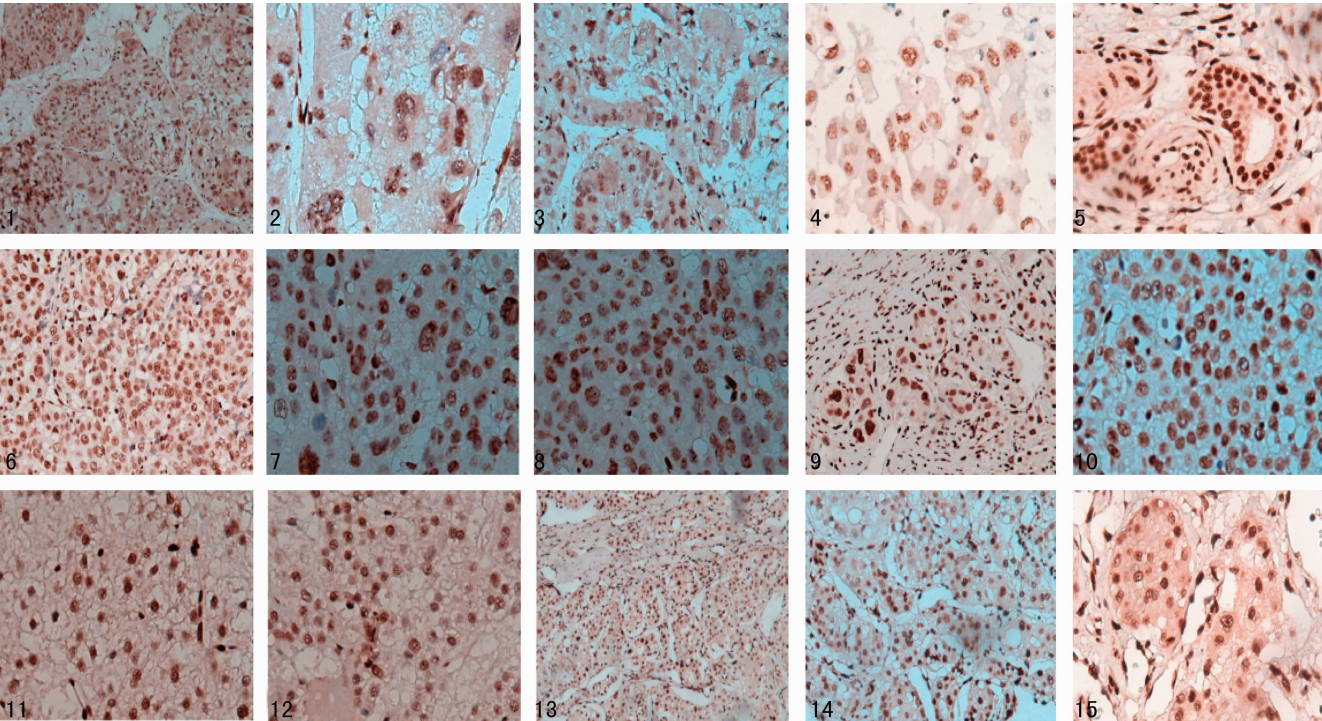
1.6 免疫组织化学检测 HCC 组织 PML 蛋白表达 取低分化、中分化和高分化 HCC 组织标本各 5 例。石蜡包埋的肝组织做超薄切片,切片脱蜡至水,PBS 洗 5 min $\times$ 2 次;甲醇-H₂O₂ 室温处理切片 20 min,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次;枸橼酸缓冲液微波中火修复 5 min,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次;滴加 PML 抗体,4℃过夜;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加增敏剂,37℃孵育 35 min;PBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加二抗,37℃孵育 35 min;PBS 洗 5

min $\times$ 3 次,DAB 显色 10 min,镜下观察显色情况;水洗终止显色后,苏木素衬染 15~30 s;脱水、封片。镜下观察照相。结果判定:阴性对照不着色,DAB 染色呈棕黄色颗粒为表达阳性。

1.7 免疫荧光分析 HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 细胞 PML 蛋白表达 HCC 细胞普通培养在 10 mm 盖玻片上,待细胞融合度达 60%~80%时,用 37℃预热 PBS 清洗 5 min $\times$ 2 次,4%多聚甲醛室温固定 15 min,PBS 洗 5 min $\times$ 2 次,0.5% Triton-x 100 的 PBS 室温下脱色摇床振摇 15 min,PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。取出盖玻片放至载玻片上,10%山羊血清 37℃封闭 30 min,PML 抗体湿盒内 4℃孵化过夜。PBS 脱色洗 5 min $\times$ 3 次,滴加荧光抗体,37℃避光孵育 60 min。PBS 清洗 5 min $\times$ 3 次、Hoechst33342 染色细胞核,PBS 清洗 5 min $\times$ 2 次,取出盖玻片,封片后激光共聚焦显微镜下观察记录细胞 PML 蛋白表达。

1.8 实时定量 PCR 分析 HCC 细胞系和 HCC 组织 PML 基因表达 (1)用 Trizol 提取 HCC 组织(自 175 例 HCC 切除的样本中随机取 24 例,用于 PML 蛋白和基因表达分析)和细胞总 RNA,检测 RNA 含量后立即置-130℃保存。(2)按 Bio-KT cDNA Cirst strand cynthesis Kit 使用说明设置 20 μ L 体系,在室温 10 min,42℃45 min,95℃5 min,冰浴 5 min 的循环条件进行反应。逆转录后检测 cDNA 含量,在-20℃保存。(3)GAPDH 引物:正向 5'-TGC AAC CGG GAAGGA AAT GA-3',反向 5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC AGA-3';PML 引物:正向 5'-GGC TCG AGA AGG ATG TGG TC-3',反向 5'-GAA GTG AGG GCT CCC ATA GC-3'。(4)荧光定量 PCR:按 Promega GoTaq qPCR Master Mix Kit 说明,配制 20 μ L 反应体系于 STRATAGNE mx3000P 荧光定量 PCR 仪进行反应。反应条件:预变性 95℃4 min;95℃30 s,55℃20 s,72℃20 s 反应 40 个循环。扩增产物经 3%琼脂糖凝胶进行鉴定。

1.9 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

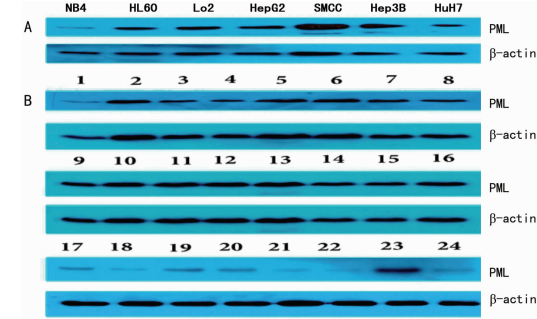


1~5:5 例低分化 HCC;6~10:5 例中分化 HCC;11~15:5 例高分化 HCC。

图 1 高、中、低分化 HCC 组织 PML 蛋白表达(免疫组织化学 $\times 200$)

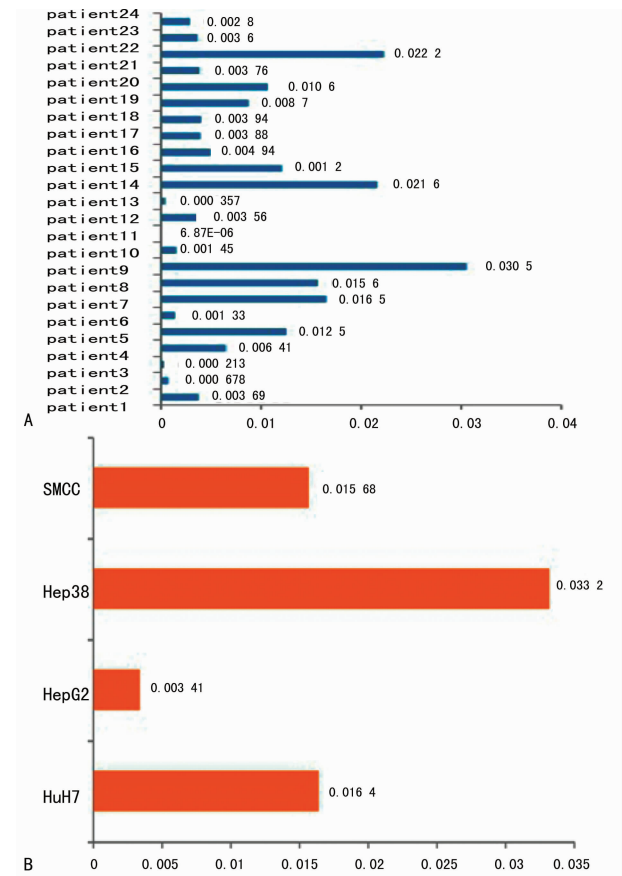
2 结 果

2.1 亚砷酸钠抑制 HCC 细胞生长 本研究采用 CCK-8 法检测 0.1~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠处理 HepG2、Hep3B、SMCC-7721 和 HuH7 细胞 48、72、96 h 生长抑制情况。结果显示 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠显著抑制 SMCC-7721 细胞生长($P<0.05$), 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 抑制其增殖能力更强($P<0.01$)。0.4 $\mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠明显抑制 HepG2($P<0.01$)和 Hep3B($P<0.01$)细胞增殖。0.1~0.4 $\mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠刺激 HuH7 细胞增殖,但每两浓度梯度组间差异无统计学意义($P>0.05$); 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠抑制 HuH7 细胞增殖($P<0.01$),低浓度亚砷酸钠刺激 HuH7 细胞增殖而高浓度抑制 HuH7 细胞增殖。亚砷酸钠抑制 4 种 HCC 细胞生长,随着暴露时间延长亚砷酸钠对 HCC 细胞抑制作用增强,0.4 $\mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠可明显抑制 HepG2、Hep3B 和 SMCC-7721 细胞生长,0.8 $\mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠明显抑制 HuH7 细胞增殖,HuH7 细胞耐受能力最强。



A:细胞;B:组织。

图 2 HCC 组织和细胞表达 PML 蛋白



A:24 例 HCC 组织 PML 基因表达; B:4 种 HCC 细胞 PML 基因表达。

图 3 HuH7、HepG2、Hep3B、SMCC-7721 和 HCC 组织 PML 基因及蛋白表达

2.2 HCC 组织表达 PML 蛋白 自免疫组织化学分析结果显示,HCC 细胞核、细胞质有不同程度表达 PML,细胞质分布不均匀。低分化、中分化和高分化 HCC 组织均表达 PML 蛋白(图 1),而且不同分化程度 HCC 组织 PML 蛋白表达差异无统计学意义。

2.3 Western blot 分析 HCC 组织和细胞系 PML 蛋白结果 为了确定 HCC 细胞是否表达 PML 蛋白,排除假阳性结果,用白血病 NB4 和 HL60 细胞做阳性对照,人正常肝细胞系 L02 为正常对照,Western blot 分析 HCC 组织及细胞 PML 蛋白表达。结果显示 HuH7、HepG2、Hep3B、SMCC-7721 和 L02 细胞均表达 PML 蛋白,见图 2A。24 例 HCC 组织不同程度表达 PML 蛋白,见图 2B。

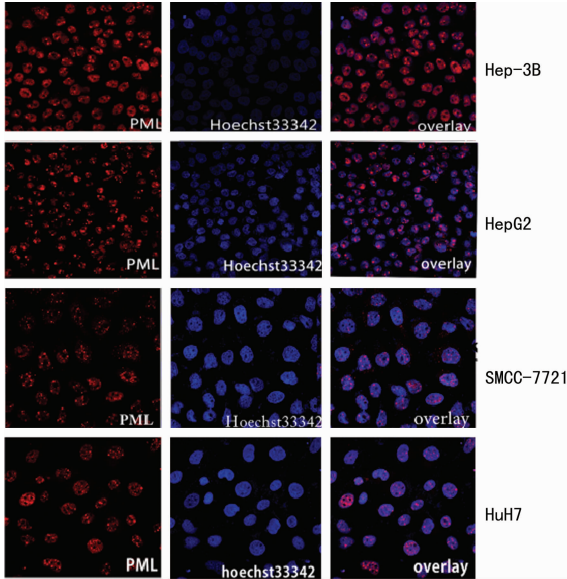
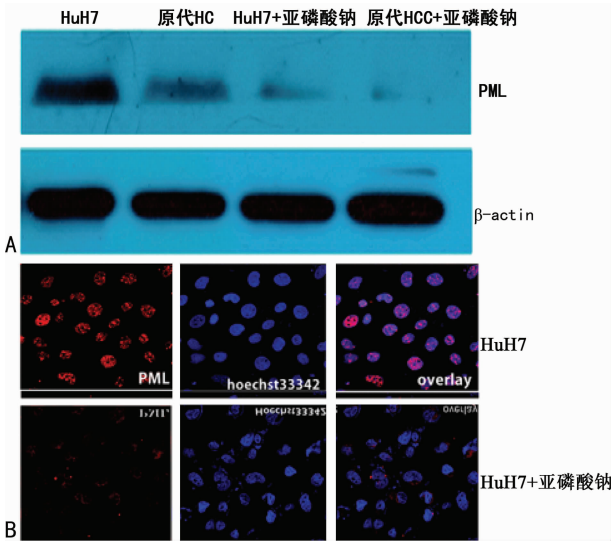


图 4 免疫荧光分析 4 种 HCC 细胞 PML 蛋白表达



A: Western blot; B: 免疫荧光图($\times 200$)。

图 5 亚砷酸钠下调 HuH7 和原代 HCC 细胞 PML 蛋白表达

2.4 荧光定量 PCR 分析 HCC 组织和细胞均有 PML 基因表达 24 例 HCC 组织(图 3A), Hep3B、HepG2、SMCC-7721 和 HuH7 细胞都表达 PML 基因(图 3B)。

2.5 免疫荧光分析 HCC 细胞系 PML 蛋白表达结果 HuH7、HepG2、Hep3B 和 SMCC-7721 细胞核均有 PML 蛋白颗粒,其中 HuH7 和 Hep3B 细胞荧光强度强于 HepG2、

SMMC-7721 细胞,见图 4。

2.6 亚砷酸钠下调 HCC 细胞 PML 蛋白表达 本研究用含 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠处理 HuH7 和原代 HCC 细胞 5 d,检测 HCC 细胞 PML 蛋白表达变化。Western blot 分析结果显示亚砷酸钠处理后 HuH7 和原代 HCC 细胞 PML 蛋白表达下调(图 5A),免疫荧光分析发现 HuH7 细胞核 PML 蛋白荧光颗粒明显减少(图 5B),提示亚砷酸钠直接下调 HuH7 和原代 HCC 细胞 PML 蛋白表达。

3 讨论

As_2O_3 是剧毒中药砒霜的主要成分, As_2O_3 对急性早幼粒细胞白血病(APL)的治愈率达到 95%。Zhang 等^[6]研究发现 APL 细胞 PML-RAR 融合蛋白和 PML 蛋白 RBCC 锌指结构域半胱氨酸残基与砷结合,使 PML 聚合后与 SUMO 和 UBC9 结合,导致 SUMO 泛素化增强和 PML 及 PML-RAR 蛋白降解,阐明了 As_2O_3 降解 PML-RAR 和 PML 蛋白清除 APL 细胞的分子机制。研究显示,砷与邻近半胱氨酸结合,增加活性氧(reactive oxygen species,ROS)产生,后者使 PML 分子间形成二硫化物,再与 Arsenic 直接结合,形成与 PML 核体(PML-nuclear bodys,PML-NBs)有关的 PML 多聚体,进而多聚体泛素化降解,PML-NBs 随之解体,PML-NBs 上的多种核转录因子失去发挥功能平台,诱导 HCC 干细胞分化^[7-10]。Maroui 等^[11]研究证实 As_2O_3 诱发细胞核 PML 蛋白降解,参与了细胞增殖和分化。

前期结果显示 As_2O_3 具有明显抑制 HCC 增殖、细胞周期阻滞和诱导癌细胞凋亡的作用,然而,其具体分子途径不清楚,也未将 As_2O_3 与 PML 蛋白表达联系起来,尤其忽略了 As_2O_3 治疗 APL 在于砷直接与癌蛋白 PML-RAR 结合,使癌蛋白降解后 APL 细胞死亡的分子机制。过去砷剂治疗 HCC 的临床和基础研究存在 4 个缺陷:(1)认定 HCC 细胞不表达 PML 基因及蛋白;(2)不清楚砷剂抑制 HCC 细胞生长的分子机制;(3) As_2O_3 治疗 HCC 是否也通过 PML 蛋白,缺乏相应研究;(4)甚至有研究者先在 HCC 细胞转染 PML 基因,表达 PML 蛋白后,再用 As_2O_3 处理 HCC 细胞^[12]。为探索 As_2O_3 治疗 HCC 的分子途径,在前期研究的基础上,作者假设 HCC 组织及细胞株可能普遍表达 PML 基因及蛋白。本组从 175 例 HCC 切除患者标本中随机选 15 例 HCC 组织(高分化 5 例、中分化 5 例和低分化 5 例)进行免疫组织化学分析,结果发现 15 例 HCC 组织不同程度表达 PML 蛋白(图 1)。Western blot 分析 24 例 HCC 组织,结果 24 例 HCC 组织均不同程度表达 PML 蛋白,且各例 HCC 的 PML 蛋白表达量不尽相同(图 2B)。为了排除假阳性,用急性白血病细胞株 NB4 及 HL60 细胞做阳性对照,L02 细胞做正常对照,Western blot 分析显示,HepG2、HuH7、Hep3B、SMMC-7721 均表达 PML 蛋白(图 2A)。免疫荧光分析显示 HuH7、HepG2、Hep3B、SMMC-7721 细胞核均有 PML 蛋白颗粒,其中 HuH7 和 Hep3B 细胞表达 PML 蛋白较 HepG2、SMMC-7721 细胞多(图 4)。荧光定量 PCR 分析结果显示 24 例 HCC 组织,Hep3B、HepG2、SMCC-7721 和 HuH7 细胞都表达 PML 基因,在 HCC 细胞中 Hep3B 细胞 PML 基因表达较高。以上结果证实 HCC 组织及细胞株可能普遍表达 PML 基因及蛋白,否定此前实体癌细胞不表达 PML 蛋白的观点。而且,前期用 $0.25 \mu\text{g/mL}$ As_2O_3 处理 HuH7 细胞和本实验用 $0.50 \mu\text{g/mL}$ 亚砷酸钠处理可直接下调 HuH7 和原代 HCC 细胞表达 PML 蛋白,这些结果首次证实 HCC 组织和细胞系普遍表达 PML 基因和蛋白,建立 As_2O_3 或亚砷酸钠治疗 HCC 与 PML 蛋白表达的联系。

本研究结果显示亚砷酸钠总体抑制 HepG2、HuH7、

Hep3B、SMMC-7721 等 4 种 HCC 细胞生长,随着暴露时间延长亚砷酸钠对 HCC 细胞抑制作用增强;但是,很低浓度亚砷酸钠就可抑制 HepG2、Hep3B、SMMC-7721 细胞增殖,较高浓度亚砷酸钠才可以抑制 HuH7 细胞增殖,HuH7 细胞对亚砷酸钠双向反应。随着亚砷酸钠处理时间延长,HCC 细胞 PML 蛋白逐渐减少,直至消失,HCC 细胞表现出生长抑制,本结果提示亚砷酸钠对 HCC 抑制与 PML 蛋白表达有关。前期研究观察到, As_2O_3 不仅显著下调 HuH7 细胞 PML 蛋白表达,而且还可以增加对化学治疗药物的敏感性和抑制 HuH7 细胞形成肿瘤球能力, As_2O_3 可能诱导 $\text{CD}13^+ \text{CD}133^+ \text{LCSCs}$ 分化,清除 LCSCs,达到治愈 HCC 的目的^[6]。依据砷剂治疗 APL 的分子机制和本组观察结果,作者认为 As_2O_3 或亚砷酸钠抑制 HCC 细胞增殖与 HCC 细胞表达 PML 蛋白有密切关系。

参考文献

- [1] Llovet JM,Burroughs A,Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet,2003,362(9399):1907-1917.
- [2] Jemal A,Siegel R,Ward E,et al. Cancer statistics[J]. JAMA,2013,310(9):982.
- [3] 刘佳,张大方,李超英. 三氧化二砷的抗肝癌作用研究[J]. 长春中医药大学学报,2008,24(3):252-253.
- [4] 刘小敏,梁晓秋,张杨,等. 三氧化二砷对人肝癌 HepG2 细胞内活性氧水平的影响[J]. 肿瘤学杂志,2009,15(3):229-231.
- [5] 金世龙,余天雾,黄中荣,等. As_2O_3 在 HuH7 及 $\text{CD}13^+ \text{CD}133^+ \text{LCSCs}$ 增殖和分化中作用的初步观察[J]. 第三军医大学学报,2012,34(18):1857-1861.
- [6] Zhang XW,Yan XJ,Zhou ZR,et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML[J]. Science,2010,328(5975):240-243.
- [7] Jeanne M,Lallemant-Breitenbach V,Ferhi O,et al. PML/RARA oxidation and Arsenic binding initiate the antileukemia response of As_2O_3 [J]. Cancer Cell,2010,18(1):88-98.
- [8] Nakahara F,Weiss CN,Ito K. The role of PML in hematopoietic and leukemic stem cell maintenance[J]. Int J Hematol,2014,100(1):18-26.
- [9] Ito K,Bernardi R,Morotti A,et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells [J]. Nature,2008,453(7198):1072-1078.
- [10] Chang FT,McGhie JD,Chan FL,et al. Wong. PML bodies provide an important platform for the maintenance of telomeric chromatin integrity in embryonic stem cells[J]. Nucleic Acids Res,2013,41(8):4447-4458.
- [11] Maroui MA,Kheddache-Atmane S,El Asmi F,et al. Requirement of PML SUMO interacting motif for RNF4- or Arsenic trioxide-induced degradation of nuclear PML isoforms[J]. PLoS One,2012,7(9):e44949.
- [12] Cui L,Zhang S,Zhang W,et al. Arsenic trioxide and promyelocytic leukemia protein-adenovirus synergistically inhibit in vitro and in vivo growth of a hepatoma cell line [J]. Oncol Res,2010,18(7):305-314.