

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.13.002
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20220316.1045.005.html(2022-03-17)

基于芯片技术探讨结直肠癌中沉默 DNA 结合蛋白 A 的基因表达谱分析*

刘瑞廷¹,田利飞¹,王国荣^{1△},刘 昌²,白继蓉³,邱 健¹,闫立昆¹,李小军¹,王小强¹
(1. 陕西省人民医院普外一科,西安 710068;2. 西安交通大学第一附属医院肝胆外科,西安 710068;3. 美国石溪大学医学中心病理科,纽约 11777)

[摘要] **目的** 基于基因芯片技术探讨短发夹 RNA 沉默人结直肠癌细胞 DNA 结合蛋白 A(dbpA)表达后利用基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析发现与 dbpA 相关的结直肠癌发生、发展的信号通路。**方法** 选取结直肠癌 SW620 细胞中表达差异的基因进行深度检测和分析,采用基因芯片技术挖掘差异基因,并运用定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)对芯片结果进行验证,综合分析工具进行 GO 功能富集分析及 KEGG 信号通路分析。**结果** dbpA 敲低后基因芯片检测差异表达基因有 578 条,其中 181 个基因上调,397 个基因下调,显著上调基因有 CFL2、C12orf39、EREG、SESN2、CXCL3、CXCL1、VLDLR、DDIT4、INHBE 等 60 个基因,显著下调基因在 PRDM10、PCDH19、SRSF8、FGFBP1、TFF2、MTDH、TCF7、EHHADH、WDR77、CEACAM6 等 60 个基因。dbpA 敲除后 SW620 细胞中与肿瘤形成有关的通路主要与“生物过程”有关,包括丝裂原活化蛋白激酶信号通路、癌症途径、NOD 样受体信号通路、趋化因子信号通路、粘着斑、基底细胞癌、Wnt 信号通路等。基因网络图分析显示有 10 个基因表达水平下降(FASLG、PDGFA、FGF18、MAP3K7、FGF3、CSDA、NF1、RAP1A、HSPA1A、LAMTOR3 等),4 个基因表达水平上升(DUSP5、PRAS2、CDC42、DUSP2 等),dbpA 与 MAPK 信号通路相关性最大。选择 KMAPK 信号通路中的 5 个相关基因即 RAP1A、TAK1(MAP3K7)、DUSP5、CDC42、ZAK 进行 Western blot 验证表明,DUSP5 表达水平明显上调($P<0.05$),RAP1A、TAK1、ZAK 表达水平下降,RAP1A、TAK1 表达水平下降明显($P<0.05$)。dbpA 可能通过 MAPK 通路调节结直肠癌细胞的发生。**结论** dbpA 参与调控的靶基因和信号通路可能为 MAPK 相关通路,还需要进一步在多细胞和动物实验中研究揭示 dbpA 下调通路之间的关系及 CDC42 在结直肠癌发展中的作用。

[关键词] 基因芯片;结直肠癌;DNA 结合蛋白 A;基因表达;基因本体分析
[中图分类号] R73-34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)13-2166-06

Gene expression profile analysis on silencing DNA binding protein A in colorectal cancer based on chip technology*

LIU Ruiting¹,TIAN Lifei¹,WANG Guorong^{1△},LIU Chang²,BAI Jirong³,QIU Jian¹,
YAN Likun¹,LI Xiaojun¹,WANG Xiaoqiang¹
(1. First Department of General Surgery,Shaanxi Provincial People's Hospital,Xi'an,Shaanxi 710068,China;2. Department of Hepatobiliary Surgery,First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University,Xi'an,Shaanxi 710061,China;3. Department of Pathology, Stony Brook University Medical Center,NewYork 11777,USA)

[Abstract] **Objective** To investigate to use the gene ontology(GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) assay to find dbpA-related signaling pathways for the occurrence and development of colorectal cancer after shRNA silencing colorectal cancer cells dbpA expression based on the chip technology. **Methods** The differentially expressed genes in colorectal cancer SW620 cells were selected for in-depth detection and analysis,and the differentially expressed genes were extracted by using gene chip technology,and the chip results were verified by q-PCR. The GO function enrichment analysis and KEGG signaling pathway analysis were performed by the comprehensive analysis tools. **Results** After dbpA knockdown,there were 578 differentially

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81172363);陕西省自然科学基金项目(2014JM4089);陕西省国际科技合作与交流计划面上项目(2017KW-046);陕西省人民医院科技人才支持计划项目(2021BJ-19);陕西省区域创新能力引导计划专项基金项目(2022QFY01-08)。 作者简介:刘瑞廷(1982—),副主任医师,博士,主要从事胃肠道肿瘤的基础及临床研究。 △ 通信作者,E-mail:wangguorong66@126.com。

expressed genes detected by gene chip, in which 181 genes were up-regulated and 397 genes were down-regulated, the significantly up-regulated genes included 60 genes of CFL2, C12orf39, EREG, SESN2, CXCL3, CXCL1, VLDLR, DDIT4, INHBE, etc. The significantly down-regulated genes included 60 genes of PRDM10, PCDH19, SRSF8, FGFBP1, TFF2, MTDH, TCF7, EHHADH, WDR77, CEACAM6, etc. After dbpA knockout, the tumor formation related pathways in SW620 cells were mainly related to “biological processes”, including the MAPK signaling pathway, pathways in cancer, NOD like receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway, focal adhesion, basal cell carcinoma and Wnt signaling pathway, etc. The gene network analysis showed that the expression levels of 10 genes (FASLG, PDGFA, FGF18, MAP3K7, FGF3, CSDA, NF1, RAP1A, HSPA1A, LAMTOR3) were decreased, and the expression levels of 4 genes (DUSP5, PRAS2, CDC42, DUSP2) were increased. The correlation between dbpA and MAPK signaling pathway was found to be the maximal. The five genes related to MAPK signaling pathway, i. e. RAP1A, TAK1 (MAP3K7), DUSP5, CDC42 and ZAK, were selected for conducting the Westernblot verification, which indicated that the DUSP5 expression level was significantly up-regulated ($P < 0.05$). The expression levels of RAP1A, TAK1 and ZAK were decreased, which of RAP1A and TAK1 were decreased significantly. dbpA could regulate the occurrence of colorectal cancer cells possibly through MAPK pathway. **Conclusion** The target genes and signal further studies in multi-cell and animal experiments are needed to reveal the relationship between dbpA down-regulation pathways and the role of CDC42 in the development of colorectal cancer.

[Key words] gene chip; colorectal cancer; DbpA; GO analysis; KEGG analysis

Y-box 结合蛋白家族从微生物到脊椎动物均具有高度保守性核酸结合区域,称为冷休克区域,多项研究表明,Y-box 家族成员[包括 Y-box binding 蛋白-1 和 DNA 结合蛋白 A(DNA binding protein A, dbpA)]在基因调控中具有至关重要的作用^[1-2]。dbpA 表达水平与肿瘤进展相关,有研究证实,dbpA 在胃癌发生、发展中发挥了积极作用^[3],dbpA 可能参与了肿瘤的发生、发展。众所周知,结直肠癌是世界范围内最严重的恶性肿瘤之一^[4]。结直肠癌的发生通常与癌基因和抑癌基因失衡有关^[5]。最近有研究表明,dbpA 在结直肠癌组织样品和 SW620 细胞株中明显过表达^[6],即与结直肠癌细胞的增殖相关。本研究采用基因芯片技术探讨 dbpA 沉默的 SW620 细胞中的基因表达谱。通过基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 途径对结直肠癌的 dbpA 潜在分子机制进行 GO 富集分析,希望通过寻找 dbpA 介导的基因用于进一步研究更有效地治疗结直肠癌的药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂、仪器设备

人基因表达谱芯片 (Affymetrix) 包括 Agilent RNA 6000 Nano Kit、GeneChip 3' IVT Express Kit、GeneChip Hybridization Wash and Stain Kit、Thermo Nanodrop 2000、Agilent 2100 Bioanalyzer、GeneChip Hybridization Oven 645、GeneChip Fluidics Station 450、GeneChip Scanner 3000 等。吉凯基因包括 Thermo、Agilent、affymetrix、Thermo、Agilent、affymetrix、affymetrix、affymetrix 等。

1.1.2 主要细胞系

人结直肠癌细胞系 LoVo、SW480、SW620、RKO、HT-29、DLD-1、SW1463 和人结直肠黏膜上皮细胞系 FHC 细胞委托吉凯基因购自 ATCC 细胞库;委托吉凯基因构建慢病毒载体 dbpA-短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA)-1 转染 SW620 细胞。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

取液氮中冻存的人结直肠癌细胞系 LoVo、SW480、SW620、RKO、HT-29、DLD-1、SW1463 和人结直肠黏膜上皮细胞系 FHC 立即置 37℃ 恒温水浴箱中快速解冻,随后在超净工作台内将解冻的细胞转移到 15 mL 离心管中,并加入 10 mL RPMI-1640 完全培养基 (含 10% 胎牛血清),1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,用培养基重悬后倒入细胞培养瓶中置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中隔天换液连续培养 10 d。

1.2.2 构建慢病毒载体

在 dbpA shRNA 序列的设计及合成后进行 dbpA-shRNA 双链模板合成,慢病毒载体双酶切,质粒的纯化及割胶回收,重组质粒转化,抽提重组质粒,进行病毒包装、浓缩和滴度测定。

1.2.3 慢病毒载体 dbpA-shRNA-1 转染 SW620 细胞

将生成状态良好的 SW620 细胞铺到 96 孔板中,细胞密度为 5×10^3 /孔。12 h 后换液,每孔先加入 90 μ L 无血清培养基,同时将病毒原液冰上解冻,取 10 μ L 于无菌 EP 管中按上述操作梯度稀释后加入到 96 孔板中,置于培养箱中继续培养。24 h 后观察细胞生长状态,并更换培养基。72 h 后荧光显微镜下观察

荧光,确定最佳感染复数值(病毒颗粒数/细胞数)。实验分组为:正常细胞对照组(CON 组);阴性对照细胞组(NC 组);RNA 干扰细胞组(KD 组)。

1.2.4 cDNA 探针制备及杂交

RNA 样品进行质控分析后采用 GeneChip 3'IVT Express Kit 进行第一链的合成得到 cDNA,再通过二链的合成得到双链 DNA。将获得的 DNA 模板进行反转录后得到带有生物素标记的扩增 RNA。对扩增 RNA 进行纯化和片段化后与芯片探针进行杂交。洗染芯片,进行图片与数据的分析处理。

1.2.5 基因表达的定量反转录聚合酶链反应(re-

verse transcription- polymerase chain reaction, RT-PCR)验证分析

采用定量 RT-PCR 检测 3 份样品特异性引物和探针随机选自 10 个有显著差异表达的基因(CXCL1、VLDLR、ACVR2B、EREG、ASNS、WNT11、CEACAM6、CD24、FGFBP1、SERPINF1 等)。cDNA 的合成采用随机引物上标 II 逆转录酶。扩增条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 20 s 30 个循环。采用软件 Primer 5.0 进行引物设计。引物的目标基因见表 1。GAPDH 为 PCR 反应中的 cDNA 内参控制。结果计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

表 1 用于微阵列基因表达验证的引物

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物长度(bp)
CXCL1	AACGACGAGAAGACCTGCTG	GCGTGCTGGTAGGTGTACTT	118
VLDLR	GGCTACTTGATGTGGCGGAA	CAAAGCTGACTTACTGCTGGG	158
ACVR2B	AATCAAGGGGGAATGGGCAAA	AGCAGTTCAGTCAAAGTGGGG	127
EREG	CTGGTGTCGATGTGAACACT	AACCACACTGACTTACCATCTG	149
ASNS	AGATTCTCTGGCGACCAAAAG	AGCTCTGCATCCAAACTGTCTTA	148
WNT11	GTGAAGGACTCGAACTCGT	AGTGACCCTTTCCCACCAAG	126
CEACAM6	GGCCTCAATAGGACCACAGT	GGTTCAGGGGAGAATTTGGGA	173
CD24	GGAGAGAATCTTGCTTAGCTGAC	TGGGTGAAAAGTGGGGAAGTAGTC	199
FGFBP1	GCCACTTCTCACTCCACCAA	ACCCAGTCATTTCTCACGGC	99
SERPINF1	TTCCTGCCCTGAAAAGTGAC	CACCAAGAGCGAAAGGGTCT	199
GAPDH	TGGTATGAGAGCTGGGGAATG	CCTCCCCACCTTGAAAGGAA	142

1.2.6 数据处理及分析

通过图像分析软件对图像进行定位和排列,对杂交点进行确定,对背景噪音进行过滤处理,根据 chi-squared test 对数据进行统计分析找到有差异的基因进行分析。基因表达有显著差异的筛选标准为必须符合 $|FC| > 2$,且 $P < 0.05$ 。利用 WEGO 分析工具对上调倍数小于 2 及大于 2 的基因功能进行聚类分析,并对富集的基因进行 KEGG 细胞信号通路分析,找到关键的调节基因和涉及的通路。

1.3 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件进行数据分析,每组实验重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对样本 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RNA 质检结果

5S、18S、28S 3 条带出现,说明已提出 RNA。见图 1。5S 条带较模糊,在胶的最前端,剩余的 2 条带均没有观察到弥散现象的出现,28S 核糖体 RNA 亮度大约是 18S 核糖体 RNA 亮度的 2 倍,并且加样孔附近没有条带表明产物中未混有 DNA,说明 RNA 没被降解。所抽提的组织或细胞总 RNA 质量浓度均在 900 ng/ μ L 以上,A260/A280 1.8~2.0,说明浓度及纯度符合实验要求。RNA 完整度(RIN)值均在 9 以

上,并且除 5S、18S、28S 3 个峰值外,未检测到其他杂峰。见图 2、表 2。说明 RNA 样品的质量检测结果符合实验要求。

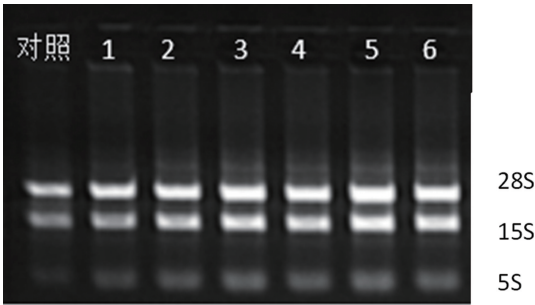


图 1 RNA 琼脂糖凝胶电泳结果

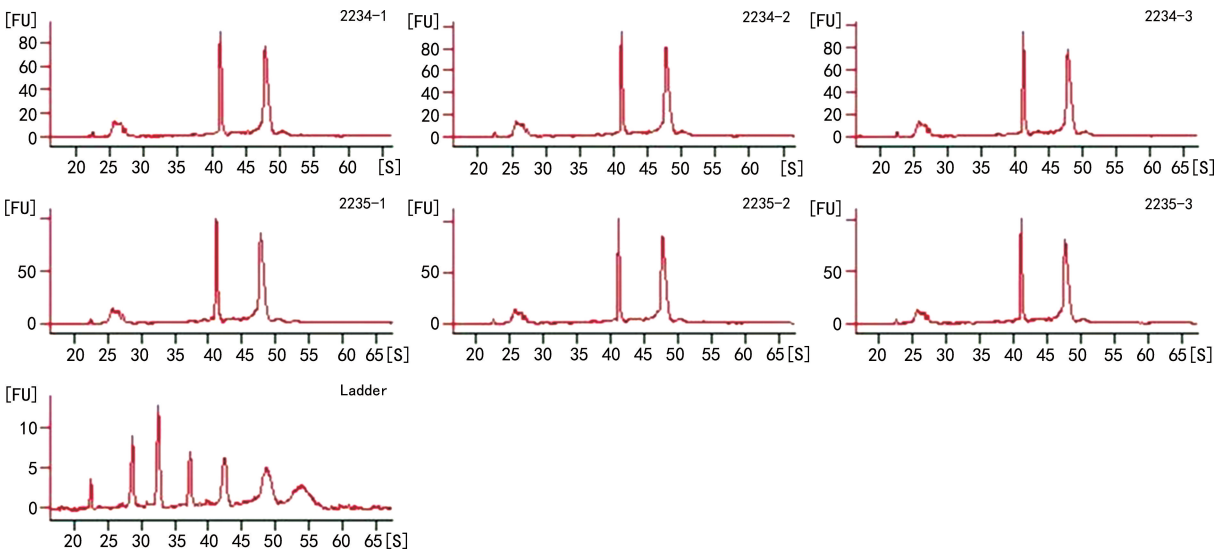
2.2 差异基因的芯片数据分析

dbpA 敲除后对 SW620 细胞基因表达水平产生了很大影响。基因芯片检测差异表达的基因有 578 条,其中 181 条上调,397 条下调。显著上调 60 个基因,显著下调 60 个基因,显著上调基因包括 CFL2、C12orf39、EREG、SESN2、CXCL3、CXCL1、VLDVR、DDIT4、INHBE 等。显著下调基因包括 PRDM10、PCDH19、SRSF8、FGFBP1、TFF2、MTDH、TCF7、EHHADH、WDR77、CEACAM6 等。

2.3 RT-PCR 验证结果

KD 组检测基因 mRNA 表达水平与 NC 组比较,

差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。而且这种变化趋势与基因芯片分析结果一致,证明基因芯片分析结果是可靠的。



图中编号对应表 2 中样本编号。

图 2 Agilent2000 评价 RNA 质量结果

表 2 RNA 质检结果报告

序号	样本编号	样本名称	Thermo NanoDrop 2000		Agilent 2100 生物分析仪		结果
			浓度 (ng/ μ L)	A260/A280	RIN	28 S/18 S	
1	2234-1	NC	912.7	2.04	9.3	1.7	合格
2	2234-2	NC	914.3	2.04	9.3	1.7	合格
3	2234-3	NC	911.7	2.04	9.3	1.8	合格
4	2235-1	KD	995.0	2.04	9.3	1.9	合格
5	2235-2	KD	986.3	2.02	9.4	1.8	合格
6	2235-3	KD	953.4	2.03	9.4	1.8	合格

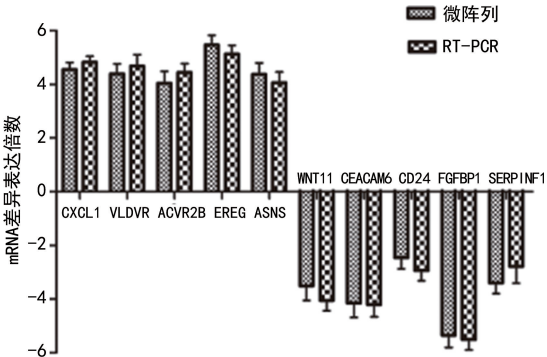


图 3 RT-PCR 分析结果

2.4 GO 分析

差异基因共分为 3 个类别,即细胞成分、分子功能、生物过程。dbpA 敲除后 SW620 细胞中与肿瘤形成有关的通路主要与生物过程有关。

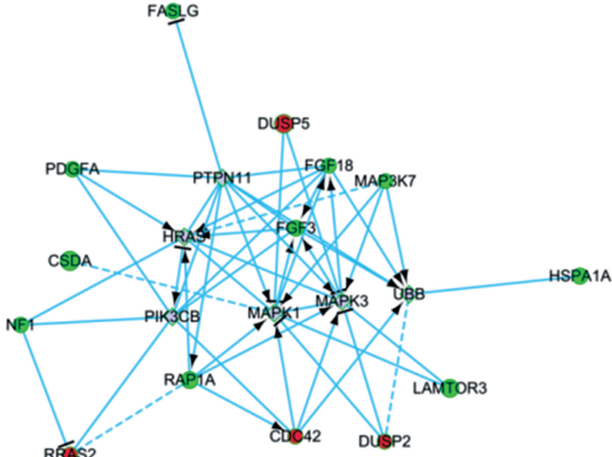
2.5 差异基因深入分析

2.5.1 通路分析

与肿瘤形成有关的通路包括丝裂原活化蛋白激酶信号通路、癌症途径、NOD 样受体信号通路、趋化因子信号通路、粘着斑、基底细胞癌、Wnt 信号通路等。

2.5.2 基因网络图

有 10 个基因表达水平下降 (FASLG、PDGFA、FGF18、MAP3K7、FGF3、CSDA、NF1、RAP1A、HSPA1A、LAMTOR3 等), 4 个基因表达水平上升 (DUSP5、PRAS2、CDC42、DUSP2 等)。dbpA 与 MAPK 信号通路相关性最大。见图 4。

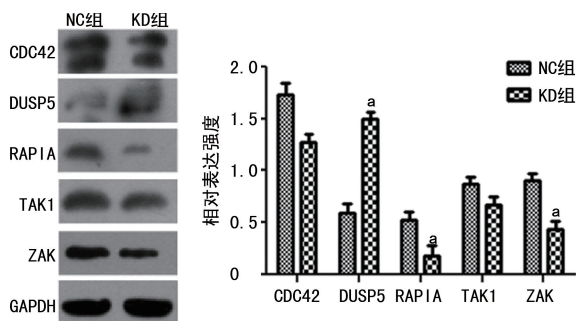


绿色代表基因芯片下调基因,红色代表基因芯片上调基因,灰色代表系统添加的关联基因;圆点越大 KD 组和 NC 组基因表达差异越大。

图 4 基因网络图

2.6 下游基因 Western blot 验证

综合以上生物信息学分析,推测目的基因 dbpA 可能通过调节以上基因的表达在结直肠癌中发挥作用,因此,选择 KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY 通路中的 5 个相关基因,即 RAP1A、TAK1 (MAP3K7)、DUSP5、CDC42、ZAK 进行 Western blot 验证。DUSP5 表达水平在 KD 组明显上调 ($P < 0.05$),RAP1A、TAK1、ZAK 在 KD 组表达水平下降, RAP1A、TAK1 下降明显 ($P < 0.05$)。见图 5。与预期结果相符。CDC42 在 SW620 细胞中检测到目的条带, KD 组相对于 NC 组有所下调,与预期结果不符。



^a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较。

图 5 Western blot 灰度分析

3 讨论

基因芯片分析方法已广泛用于越来越多的基因分析领域^[7]。以往文献报道已通过微矩阵方法证实了 dbpA 敲除后对人类肝癌形成有很大的关系^[8]。本研究结果显示, dbpA 被敲除后在 SW620 细胞中发现 CFL2 是上调表达最显著的基因, CFL2 是普遍存在于细胞内的小蛋白,并对癌细胞的迁移和侵袭具有重要的调控作用。EREG 属上皮生长因子家族,以往有研究表明, EREG 的表达与恶性胶质瘤细胞的分化、迁移和黏附具有显著的相关性^[9]。SES2 作为调解 p53 的 SES2 家族一员,在自噬信号通路中具有重要作用。以往有文献报道, ESN2 的下调与结直肠癌患者的不良预后有关,并可作为癌症治疗的一个新的靶点^[10]。CXCL3、CXCL1 在不同类型的肿瘤细胞迁移和侵袭中均扮演着重要角色^[11-12]。VLDLR 作为体内能量的来源,主要功能是调节脂肪酸代谢。DDIT4 也称为 REDD1,在 DNA 损伤和细胞内的压力增大时会显著上调,并参与调节肿瘤细胞增殖和侵袭^[13]。INHBE 作为转化生长因子 β 超家族的一员,参与了调节人类肿瘤的形成过程^[14]。高表达的组织蛋白酶抑制剂 CSTA 在细胞的生长、分化和黏附中具有重要作用,并可在肺癌^[15]、鼻咽癌^[16] 的发生中起重要作用。本研究还发现, dbpA 敲除后 SW620 细胞中 C12orf39 表达水平上调了 6.9 倍之多。在此之前并未有 C12orf39 参与肿瘤形成的相关文献报道。

在 397 个显著下调的基因中, PRDM10 被认为是抑制未分化多型瘤细胞迁移的重要肿瘤抑制因子。

PCDH19 被认为是肿瘤抑制因子,并且与胶质癌患者的不良预后有关^[17]。SRSF8 作为 SR 蛋白家族一员,在诱导大肠癌细胞周期停滞和凋亡中具有重要作用。FGFBP1 与胚胎期血管渗透性的形成有关^[18],并在人类肿瘤发生中增强血管生成的活性^[19]。TFF2 作为胃黏膜分泌的小肽段,在结直肠癌的发生中表达水平显著上调^[20]。MTDH 作为重要的致癌基因通过调节信号传导通路参与恶性肿瘤的发生、发展过程^[21]。有相关文献报道, TCF7 与结直肠癌患者的不良预后有关。WDR77/p44 作为类固醇受体共激活剂在卵巢癌的发生、发展过程中具有调节激素分泌的作用^[22]。CEACAM6 在人类肿瘤细胞的迁移和血管生成过程中也具有调节作用^[23-24]。

本研究发现, dbpA 沉默是主要原因用于改变 sw620 细胞系的整体基因表达谱。dbpA 可能会通过激活 MAPK 促进结直肠癌发展的信号通路,可为寻找结直肠癌治疗的新靶点提供可靠的证据。有研究已证实, CDC42 的激活与侵袭性相关转移、细胞分裂和各种癌症的进展,如黑色素瘤、结直肠癌和乳腺癌有关^[25]。本研究发现, dbpA 敲除后 MAPK 信号通路中的相关基因 RAP1A、TAK1 (MAP3K7)、DUSP5、CDC42、WNT11 表达水平均发生了显著变化,与相关研究结果一致^[26]。因此,推测结直肠癌中 CDC42 下调 dbpA 沉默更有说服力和合理性。通过 GO 和 KEGG 富集分析进一步证明有 MAPK 信号通路等 8 个 KEGG 通路参与了 dbpA 调节结直肠癌发展的过程。为验证此假设,还需要进一步在多细胞和动物实验中研究揭示 dbpA 下调通路之间的关系及 CDC42 在结直肠癌发展中的作用。

参考文献

- [1] PANFERTSEV E A, BARANOVA E V, MOCHALOV V V, et al. Construction of recombinant strain Brevibacillus choshinensis for chimeric borrelia Dbpa antigen production[J]. Klin Lab Diagn, 2018, 63(7): 450-454.
- [2] JIANG X, KETO-TIMONEN R, SKURNIK M, et al. Role of DEAD-box RNA helicase genes in the growth of Yersinia pseudotuberculosis IP32953 under cold, pH, osmotic, ethanol and oxidative stresses[J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0219422.
- [3] WANG G R, ZHENG Y, CHE X M, et al. Up-regulation of human DNA binding protein A (dbpA) in gastric cancer cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30(10): 1436-1442.
- [4] SUNKARA V, HEBERT J R. The colorectal cancer mortality-to-incidence ratio as an indicator of global cancer screening and care[J]. Cancer, 2015,

- 121(10):1563-1569.
- [5] BOGAERT J, PRENEN H. Molecular genetics of colorectal cancer [J]. *Ann Gastroenterol*, 2014, 27(1):9-14.
- [6] LIU R T, WANG G R, LIU C, et al. RNAi-mediated downregulation of DNA binding protein A inhibits tumorigenesis in colorectal cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(3):703-712.
- [7] WANG Y, ZHANG Q J, WANG H S, et al. Genome-wide microarray analysis identifies a potential role for striatal retrograde endocannabinoid signaling in the pathogenesis of experimental L-DOPA-induced dyskinesia [J]. *Synapse*, 2014, 68(8):332-343.
- [8] HARADA M, KOTAKE Y, OHHATA T, et al. YB-1 promotes transcription of cyclin D1 in human non-small-cell lung cancers [J]. *Genes Cells*, 2014, 19(6):504-516.
- [9] KOHSAKA S, HINOHARA K, WANG L, et al. Epiregulin enhances tumorigenicity by activating the ERK/MAPK pathway in glioblastoma [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(7):960-970.
- [10] WEI J L, FU Z X, FANG M, et al. Decreased expression of sestrin 2 predicts unfavorable outcome in colorectal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(3):1349-1357.
- [11] SEE A L, CHONG P K, LU S Y, et al. CXCL3 is a potential target for breast cancer metastasis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14(3):294-309.
- [12] LE ROLLE A F, CHIU T K, FARA M, et al. The prognostic significance of CXCL1 hypersecretion by human colorectal cancer epithelia and myofibroblasts [J]. *J Transl Med*, 2015, 13:199.
- [13] WANG Y, HAN E, XING Q, et al. Baicalein up-regulates DDIT4 expression which mediates mTOR inhibition and growth inhibition in cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2015, 358(2):170-179.
- [14] ANSARI D, ANDERSSON R, BAUDEN M P, et al. Protein deep sequencing applied to biobank samples from patients with pancreatic cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(2):369-380.
- [15] CAI Y, LI J, LU A, et al. Increased serum levels of macrophage inflammatory protein-3 α and cystatin A predict a poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2014, 93(22):e123.
- [16] HOFVANDER J, TAYEBWA J, NILSSON J, et al. Recurrent PRDM10 gene fusions in undifferentiated pleomorphic sarcoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4):864-869.
- [17] KUOKAWA K, AKAIKE Y, MASUDA K, et al. Downregulation of serine/arginine-rich splicing factor 3 induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells [J]. *Oncogene*, 2014, 33(11):1407-1417.
- [18] RAY P E, AL-ATTAR A, LIU X H, et al. Expression of a secreted fibroblast growth factor binding protein-1 (FGFBP1) in angioproliferative kaposi sarcoma [J]. *J AIDS Clin Res*, 2014, 5(6):309.
- [19] YU G, JIANG P, XIANG Y, et al. Increased expression of protease-activated receptor 4 and Trefoil factor 2 in human colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0122678.
- [20] SHI X, WANG X. The role of MTDH/AEG-1 in the progression of cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4):4795-4807.
- [21] GUO H Q, YE S, HUANG G L, et al. Expression of activating transcription factor 7 is correlated with prognosis of colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Ther*, 2015, 11(2):319-323.
- [22] ZHANG Y, ZANG M, LI J, et al. CEACAM6 promotes tumor migration, invasion, and metastasis in gastric cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46(4):283-290.
- [23] BALK-MOLLER E, KIM J, HOPKINSON B, et al. A marker of endocrine receptor-positive cells, CEACAM6, is shared by two major classes of breast cancer: luminal and HER2-enriched [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(4):1198-1208.
- [24] SHIMIZU T, NAKAGAWA K. Novel signal transduction pathways; the molecular basis for targeted cancer therapies in Hedgehog/Notch/Wnt pathway [J]. *Nihon Rinsho*, 2015, 73(8):1342-1348.
- [25] YE H, ZHANG Y, GENG L, et al. Cdc42 expression in cervical cancer and its effects on cervical tumor invasion and migration [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(2):757-763.
- [26] LIU R, WANG G, LIU C, et al. Gene expression profile analysis of dbpA knockdown in colorectal cancer cells [J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(12):1280-1293.