

·专题·儿童肝胆肿瘤治疗·

let-7b 通过靶向调控 SALL4 影响肝母细胞瘤
细胞增殖能力的机制研究

全文二维码 开放科学码

程继文¹ 赵 璞² 杨薇粒¹ 郑百俊¹
潘伟康¹ 龚 伟¹ 余 强¹ 李 鹏¹

【摘要】 目的 初步研究 let-7b 和 SALL4 在肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 细胞恶性行为中的作用及二者间的相互作用机制。 **方法** 采用 qRT-PCR 检测 let-7b 在正常肝细胞 (HL-7702) 与 HB 细胞系、HB 组织及癌旁组织中的表达水平,采用免疫组化法检测 SALL4 在 HB 组织及癌旁组织中的表达水平,并分析 HB 组织中 let-7b 与 SALL4 表达水平的相关性。通过 MTT、细胞周期和凋亡等实验方法上调或抑制 HB 细胞中 let-7b 的表达水平,观察 let-7b 对 HB 细胞生物学功能的影响;通过生物信息学预测软件、双荧光素酶报告系统、qRT-PCR 和 western blot 等实验,从体外水平验证 let-7b 与 SALL4 的靶向关系。采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析不同 let-7b 与 SALL4 表达水平的肝母细胞瘤患者总体生存率的差异。 **结果** 与癌旁组织相比,let-7b 在 HB 组织中表达量显著降低,而 SALL4 表达量显著升高;let-7b 在肝母细胞瘤组织中的表达水平与 PRETEXT 分期存在相关性 ($P=0.002$),且 HB 组织标本中 let-7b 与 SALL4 的表达水平存在负相关性 ($r=-0.716, P<0.001$)。let-7b 低表达组 HB 患者的总体生存率显著低于 let-7b 高表达组 ($P=0.017$)。SALL4 阳性组 HB 患者的总体生存率显著低于 SALL4 阴性和弱阳性组 ($P=0.034$)。MTT、细胞周期和凋亡实验结果显示,let-7b 可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,促进细胞的凋亡。而抑制内源性的 let-7b 可促进 HepG2 细胞增殖,抑制细胞的凋亡。生物信息学软件预测及构建双荧光报告载体荧光检测等实验结果显示,let-7b 与 SALL4 存在一定的靶向关系。 **结论** let-7b 和 SALL4 可作为肝母细胞瘤不良预后的潜在标记物;let-7b 作为抑癌基因可以靶向调控 SALL4 的表达,抑制 HB 细胞的增殖。

【关键词】 let-7b; 肝肿瘤; SALL4; 细胞增殖

【中图分类号】 R726 R735.7

Let-7b modulates the proliferation of hepatoblastoma cells by targeting SALL4. Cheng Jiwen¹, Zhao Pu², Yang Weili¹, Zheng Baijun¹, Pan Weikang¹, Gong Wei¹, Yu Qiang¹, Li Peng¹. 1. Department of Pediatric Surgery, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Department of Neonatology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China.

【Abstract】 Objective To explore the role and mechanism of let-7b and SALL4 in the malignant behaviors of hepatoblastoma (HB) cells. **Methods** Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was employed for detecting the expression of let-7b in normal liver cells (HL-7702), HB cell lines, HB tissues and adjacent normal tissues. Immunohistochemistry was applied for measuring the expression levels of SALL4 in HB tissues and paracancerous tissue and analyzing the correlation between the expression levels of SALL4 in HB tissues. Up-regulating or inhibiting the let-7b expression level in HB cells was used for examining the effects of let-7b on the biological function of HB cells by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, cell cycle and apoptosis. The targeting relationship between let-7b and SALL4 was assessed through dual-luciferase reporter system, qRT-PCR, Western blot and in vitro immunohistochemical staining. **Results** let-7b

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2020.05.006

基金项目:陕西省创新人才推进计划-青年科技新星项目(编号:2018KJXX-050);西安交通大学中央高校基本科研业务项目(编号:XTT2018126, YT(ZD)201704)

作者单位:1. 西安交通大学第二附属医院小儿外科(陕西省西安市, 710004); 2. 陕西省人民医院新生儿科(陕西省西安市, 710068)

通信作者:李鹏, Email: sienafiat@hotmail.com

became markedly down-regulated in HB tissues and HB cells (e. g. HepG2 & HuH6) while SALL4 protein was frequently up-regulated in HB tissues. The expression of let-7b was correlated with PRETEXT stage ($P = 0.002$). A significant negative correlation existed between let-7b and SALL4 expression level in HB tissue samples ($r = -0.761, P < 0.001$). Through the detection of proliferative activity, cell cycle and cell apoptosis, let-7b could regulate the proliferating capability of HepG2. The dual-luciferase reporter assays revealed that SALL4 was a novel target of let-7b. **Conclusion** Serving as a tumor suppressor gene, let-7b suppresses the HepG2 cells growth by targeting SALL4.

【Key words】 let-7b; Liver Neoplasms; SALL4; Cell Proliferation

肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 是儿童最常见的肝脏恶性肿瘤, 约占儿童肝脏原发性恶性肿瘤的 80%^[1]。随着新生儿重症监护技术的不断进步, 极低出生体重儿存活率得到了显著提高, 而肝母细胞瘤的年发病率也呈上升趋势^[2]。近年来, 手术切除 + 新辅助化疗的联合治疗模式极大地提高了肝母细胞瘤患儿的长期生存率 (5 年生存率已达 80% 以上), 但肝母细胞瘤晚期或化疗耐药的患儿预后仍然很差^[3]。虽然铂类药物治疗肝母细胞瘤的疗效显著, 但容易造成长期不良反应 (如耳毒性和肾毒性), 给肝母细胞瘤患儿家庭造成沉重的经济和心理负担^[1,4]。迄今, 肝母细胞瘤的病因及发病机制仍不明确, 寻找肝母细胞瘤早期的发病机制及潜在治疗靶点对于肝母细胞瘤患儿早期诊疗及预后改善至关重要。

2017 年发表在 *Hepatology* 杂志上的一项研究显示, SALL4 基因在肝母细胞瘤组织中的表达水平较癌旁正常肝组织呈显著升高趋势, 非编码 RNA 中 let-7 家族的表达水平则呈显著下降趋势, 其中以 let-7b 最为显著。此外该研究还发现 SALL4 基因的高表达及 let-7b 的低表达与肝母细胞瘤的不良预后及高发病风险密切相关^[4]。尽管如此, 国内外针对 let-7b 在肝母细胞瘤中的可能作用机制的研究仍比较罕见, 因此本研究通过体外实验, 初步分析 let-7b 在肝母细胞瘤中的可能作用及作用机制。

材料与方 法

一、患者标本及相关病理资料的收集

从西安交通大学第二附属医院病理科收集 31 对肝母细胞瘤及对应的癌旁正常肝组织蜡块, 标本制作时间从 2010 年 1 月至 2018 年 1 月, 均为接受手术切除治疗后经 10% 中性福尔马林固定得到的石蜡标本, 并经过病理学检查证实。于本院病案室查阅入选患者相关临床病理学资料, 具体包括: 性别、年龄、肿瘤直径大小、血清甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 水平、病理类型和 PRETEXT 分期等。

二、细胞培养

HL-7702 正常肝细胞与肝母细胞瘤细胞株 (HepG2 和 HuH6) 的培养环境为含 10% FBS 及 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基, 37℃, 5% CO₂, 每 2~3 d 换液 1 次。let-7b 抑制剂由上海吉玛制药技术有限公司合成。

三、PCR 检测 let-7b 的表达水平

根据石蜡 RNA 提取试剂盒 (美国 omega 公司) 说明书中操作步骤提取总 RNA。逆转录 let-7b, 引物为: 5'-GTCGTATCCAGTGCCTGCTGGAGTCGGC AATTGCACTGGATACGACAACCACA-3'; 逆转录反应体系: 5 × primer Script Buffer 2 μL, RT Enzyme Mix 0.5 μL, let-7b 逆转录引物 0.5 μL, RNA (200 ng/μL) 1 μL, RNAase free ddH₂O 6 μL。反应条件: 42℃ 15 min × 3 cycles; 85℃ 5 sec。逆转录得到 cDNA, 并测定其浓度, 然后稀释至 50 ng/μL, -20℃ 冻存。Real-time PCR 反应部分, let-7b 引物为: F: 5'-ATC-CAGTGCCTGCTCGTG-3'; R: 5'-TGCTTGAGGTAGTAG-TTG-3'。Real-time PCR 反应体系: SYBR premix ExTaqTM II (2 ×) 10 μL, F-let-7b-primer 1 μL, R-let-7b-primer 1 μL, cDNA (100 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 7 μL。反应条件: 第一步, 95℃ 30 s; 第二步, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 cycles 循环完成后绘制溶解曲线。

四、MTT 法检测细胞增殖

转染 let-7b/anti-let-7b 和 miR-ctrl/miR-CN 的 HepG2 细胞, 在转染后 24 h、48 h 及 72 h, 于避光条件下每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液。4 h 后弃掉旧培养基, 每孔加入 DMSO 150 μL, 室温下缓慢震荡约 10 min, 用酶标仪于 490 nm 处检测各孔的 OD 值, 并记录结果。

五、双荧光素酶报告基因实验

通过 TargetScan (<http://targetscan.org/>) 预测到 let-7b 和 SALL4 具有良好的靶向关系。对 SALL4 的 3'-UTRs 种子区突变两个碱基位点, 使之成为突变型序列 (图 1)。

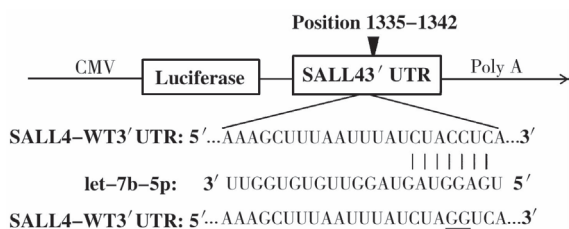


图1 SALL4 野生型和突变型碱基序列

Fig.1 SALL4 wild/mutant type base sequences

实验分为四组:无处理细胞组、let-7b 与空载体共转染组、let-7b 与 SALL4-WT 共转染组、以及 let-7b 与 SALL4-MT 共转染组;将 HEK 293 细胞接种于 96 孔板中,采用脂质体 (lipofectamine) 2000 试剂盒进行转染。

双荧光素酶报告基因的检测:待培养 24 h 后,每孔更换新鲜的完全培养基 75 μ L。每孔加入 75 μ L Dual-Glo Luciferase Buffer 与 Dual-Glo Luciferase Reagent 的混合液,室温下静置 10 min 后于化学发光仪中检测荧光。每孔加入 75 μ L Dual-Glo stop Buffer 与 Dual-Glo stop Reagent 的混合液,室温下静置 10 min 后于化学发光仪中检测荧光。

六、统计学处理

所有数据均采用 SPSS17.0 进行统计学分析,由于本研究中的计量资料基本服从或近似服从正态分布,故采用 $(\bar{x} \pm s)$ 进行统计描述,两组样本间的比较采用独立样本 t 检验。采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法分析 let-7b 与肝母细胞瘤临床病理常数的关联性;采用 Spearman 秩相关分析 let-7b 与 SALL4 表达水平之间的相关性。采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析不同 let-7b 与 SALL4 表达水平组肝母细胞瘤患者总体生存率的差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、纳入研究的肝母细胞瘤患儿基本情况

纳入本研究的 31 例肝母细胞瘤患儿中,男 20 例,女 11 例,年龄 1 个月至 12 岁,平均年龄 (1.46 ± 0.72) 岁。PRETEXT 分期: I 期 3 例、II 期 9 例、III 期 13 例、IV 期 6 例。23 例 (74.2%) 以腹部包块就诊,临床表现 4 例 (12.9%) 为纳差、腹胀,2 例 (6.5%) 为腹痛,2 例 (6.6%) 为黄疸、消瘦,其余无特殊症状。病理类型:上皮型 24 例 (其中胎儿型 12 例、胚胎型 10 例、粗大小梁型 1 例、混合上皮型 1 例),混合型 7 例。低危组 8 例,中危组 12 例,高危

组 11 例。

let-7b 表达水平与肝母细胞瘤患者的年龄、性别、病理类型、AFP、危险度等病理参数之间无显著关联性,但是 let-7b 在肝母细胞瘤组织中的表达水平与 PRETEXT 分期存在统计学关联 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 let-7b 与肝母细胞瘤患者临床基本特征的关联性分析

Table 4 Correlation analysis of let-7b and basic clinical characteristics of children with hepatoblastoma

变量	let-7b ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		χ^2 值	P 值
	≤ 1 (n = 21)	> 1 (n = 10)		
年龄 (例)	< 3 岁	18	0.111	1.000
	≥ 3 岁	3		
性别 (例)	男	15	1.359	0.244
	女	6		
病理类型 (例)	上皮型	17	0.465	0.652
	混合型	4		
AFP (ng/mL)	≥ 1000	18	1.072	0.358
	< 1000	3		
PRETEXT 分期 (例)	I + II	4	10.608	0.002
	III + IV	17		
发病风险等级 (例)	高风险	7	0.284	0.868
	中风险	8		
	低风险	6		

二、let-7b 在肝母细胞瘤组织和肝母细胞瘤细胞中的表达水平

采用 qRT-PCR 检测 let-7b 在正常肝细胞 (HL-7702)、HB 细胞系 (HuH-6 clone-5 和 HepG2) 及 31 例 HB 组织标本中的表达情况,结果显示 let-7b 在 HB 细胞系及 HB 组织中的表达显著下调 (图 2A, 2B)。let-7b 在 2 种肝母细胞瘤细胞系中,在 HepG2 中的表达水平最低,因此选择 HepG2 进行后续的功能研究实验。

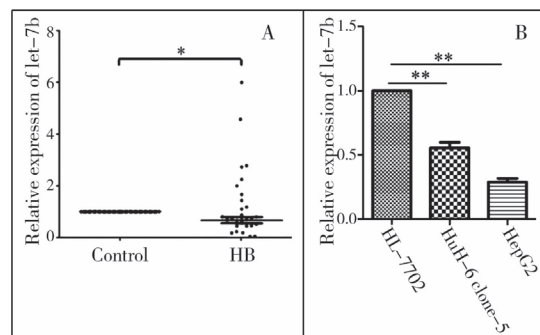


图 2A let-7b 在 HB 组织中的表达下调 图 2B let-7b 在 HB 细胞系中的表达降低

Fig. 2A Expression level of let-7b in HB tissue Fig. 2B Expression level of let-7b in HB cell lines

三、SALL4 在肝母细胞瘤组织中的表达水平呈显著上调趋势

采用免疫组化法检测 SALL4 在肝母细胞瘤组织及对应的瘤旁正常肝组织中的表达水平, SALL4 在肝母细胞瘤组织中的表达水平较瘤旁正常肝组织明显升高。图 3A 可见 SALL4 蛋白主要表达于瘤细胞胞浆内, 呈棕褐色颗粒状, 以弥漫性分布为主, 图 3B 可见 SALL4 蛋白在正常肝组织中基本不表达。

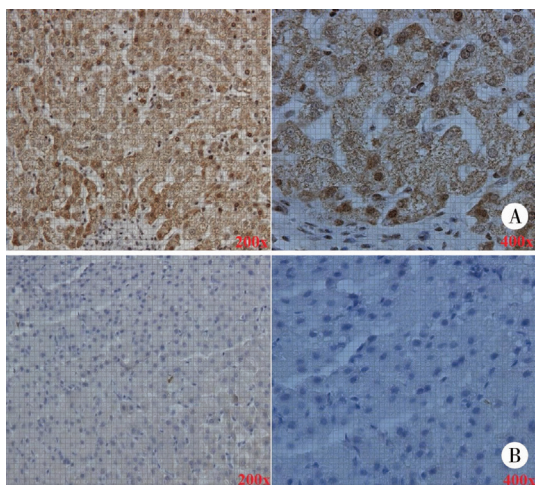


图 3A SALL4 在 HB 组织中的表达 图 3B SALL4 在瘤旁正常肝组织中的表达

Fig. 3A Expression of SALL4 protein in hepatoblastoma tissue

Fig. 3B Expression of SALL4 protein in adjacent non-tumor tissues

四、let-7b 对 HepG2 细胞增殖的影响

与对照组相比, 上调 let-7b 的 HepG2 细胞增殖活性在 48 h 和 72 h 时均明显受到抑制。抑制内源性 let-7b 的表达后, 与 miR-ctrl 组相比, HepG2 细胞的活性在 48 h 和 72 h 时有明显升高 ($P < 0.05$), 提示 let-7b 能够抑制 HepG2 细胞的增殖活性。

五、let-7b 对 HepG2 细胞凋亡的影响

采用流式细胞仪检测各组转染后 HepG2 细胞凋亡情况。let-7b 过表达组和 miR-ctrl 组相比, let-7b 组早期凋亡率显著高于对照组 ($P < 0.01$)。抑制剂 anti-miR let-7b 组和 anti-NC 组相比, 早期凋亡率无明显差异 ($P > 0.05$)。

六、let-7b 与 HepG2 细胞周期 S 期/G2 期转变的关系

采用流式细胞仪检测转染后各组 HepG2 细胞系所处的周期情况。对 HepG2 细胞分别转染 let-7b 和空质粒载体, 24 h 后采用流式细胞仪检测两组细胞周期改变情况, 结果显示转染 let-7b 的 HepG2 细胞 S 期/G2 期受到显著阻滞 ($P = 0.016$)。将 let-7b

抑制剂转染至 HepG2 细胞, 可见其周期 S 期的细胞比例较对照组有所下降, 而 G2 期/M 期的细胞比例升高 ($P > 0.05$)。

七、let-7b 对 SALL4 野生型和突变型报告基因荧光活性的影响

如图 4 所示, 经过共转染 let-7b 和 SALL4-WT 重组质粒的 HEK293 细胞荧光活性显著降低 ($P = 0.015$), 而共转染 let-7b 和 SALL4-MT 组的 HEK293 细胞荧光活性无显著变化 ($P > 0.05$), 提示 let-7b 能够直接结合 SALL4 的 3'-UTRs 区域, 发挥潜在的靶向调控作用。

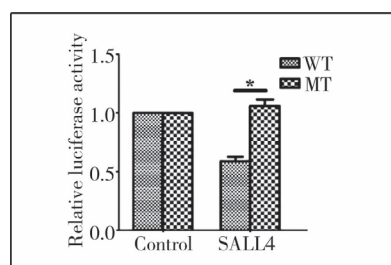


图 4 HEK293 细胞中的荧光活性检测结果

Fig. 4 Activity of luciferase assay in HEK293 cells

八、let-7b 与 SALL4 表达水平的相关性分析

采用半定量积分法, 每张切片随机选取 5 个视野, 高倍镜下计数 500 个细胞, 参照 Axiotis 等^[5]制定的标准, 由 2 名病理医生采用双盲法分别对同一切片的染色进行评分, 对结果进行复核。31 例肝母细胞瘤患者中 let-7b 在瘤组织中的表达下调 20 例; SALL4 蛋白在肝母细胞瘤组织中表达强阳性 15 例, 阳性 8 例、弱阳性 7 例、阴性 1 例。let-7b 在 HB 组织标本中与 SALL4 的表达存在统计学负相关 ($r = -0.716$, $P < 0.001$), 随着 let-7b 的表达水平降低, SALL4 的蛋白表达水平呈现逐渐升高趋势。

九、let-7b 对 SALL4 蛋白表达水平的影响

在肝母细胞瘤细胞系 HepG2 中上调 let-7b 的表达水平后, SALL4 蛋白的表达水平呈明显下降趋势, 而抑制内源性的 let-7b 后, SALL4 蛋白的表达水平较对照组呈上升趋势, 提示在 HepG2 细胞中 let-7b 对 SALL4 蛋白的表达水平有显著抑制作用 (图 5)。

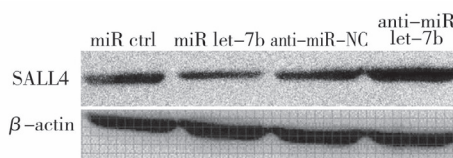


图 5 SALL4 蛋白在 HepG2 细胞中的表达水平

Fig. 5 Expression level of SALL4 protein in HepG2 cells

十、肝母细胞瘤组织中 let-7b 和 SALL4 的表达水平与肝母细胞瘤患儿生存预后的关系

如图 6A 所示,let-7b 低表达组 HB 患儿的总体生存率显著低于 let-7b 高表达组 ($P=0.017$)。如图 6B 所示,SALL4 阳性组 HB 患者的总体生存率显著低于 SALL4 阴性和弱阳性组 ($P=0.034$)。

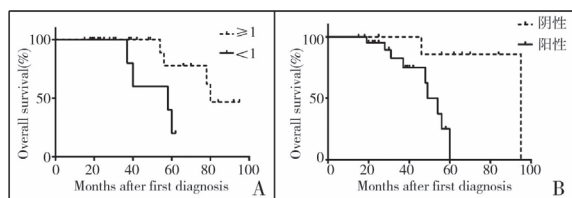


图 6A let-7b 低表达与高表达组 HB 患者的生存曲线 图 6B SALL4 低表达与高表达组 HB 患者的生存曲线

Fig. 6A Survival curves of low versus high let-7b expression in HB patients Fig. 6B Survival curves of low versus high SALL4 expression in HB patients

讨论

本研究结果显示在肝母细胞瘤组织中 let-7b 的表达水平较瘤旁组织呈显著下降趋势,而 SALL4 的蛋白水平呈显著上调趋势,与 Sumazin 等^[4]筛查得到的结果一致。我们检测了 let-7b 在肝母细胞瘤细胞 (HepG2 和 Huh6) 和正常肝细胞 (HL-7702) 中的表达水平差异,也发现 let-7b 在肝母细胞瘤细胞中的表达水平显著低于正常肝细胞,且 let-7b 在 HepG2 中的表达水平最低,因此我们选择 HepG2 细胞进行后续的功能及机制验证探索实验。本研究首次发现 let-7b 在肝母细胞瘤组织中的表达水平与 PRETEXT 分期存在统计学相关性,let-7b 低表达组肝母细胞瘤患者的总体生存率显著低于 let-7b 高表达组。Sumazin 等^[4]发现 let-7b 的低表达与肝母细胞瘤的不良预后密切相关。本研究发现 PRETEXT III/IV 期肝母细胞瘤患者中 let-7b 降低的比例 (17/19) 较 PRETEXT I/II 期患者 (4/12) 更高。而 PRETEXT III/IV 期肝母细胞瘤患者较 PRETEXT I/II 期患者预后不佳这一结论已经基本明确,这也能从侧面证明 let-7b 的低表达与肝母细胞瘤的不良预后密切相关^[4]。但纳入本研究的肝母细胞瘤患者总样本数仅 31 例,故后续仍需要进一步扩大临床样本量来验证。

研究发现 let-7 家族 (包括 let-7b) 在肝癌等恶性肿瘤的发生及发展过程中发挥着抑癌基因样作用^[6-8],且 let-7b 表达下调与前列腺癌、肝母细胞瘤的不良预后密切相关^[4,9]。let-7 过表达可抑制肝癌

干细胞增殖、体外成球及体内成瘤能力,而下调 let-7 的表达水平有促进肝癌干细胞增殖的作用^[10]。上调 let-7b 的表达水平还可抑制胶质瘤干细胞样细胞的自我更新能力和干细胞特性的维持^[11]。本研究结果表明上调 let-7b 的表达水平,可通过促进 HepG2 细胞早期凋亡,进而显著抑制 HepG2 细胞的增殖活性。抑制内源性 let-7b 的表达,可促进细胞的增殖,抑制细胞的凋亡。

为进一步研究 let-7b 抑制 HepG2 细胞增殖活性的机制,我们利用生物学信息软件预测得知 SALL4 与 let-7b 存在潜在的靶向关系。2013 年发表在新英格兰医学杂志上的一项研究发现:SALL4 高表达的肝细胞癌具有更强的侵袭性,通过敲除 SALL4 或阻断 SALL4 的表达水平,可促进肝癌细胞凋亡及抑制其肿瘤形成^[12]。SALL4 可作为胚胎干细胞的特异性标记物,参与调节肿瘤细胞的恶性生物学表型^[13]。研究发现 SALL4 在肝母细胞瘤组织中表达水平异常增高,且与肝母细胞瘤的不良预后密切相关^[4,14]。本研究中通过免疫组化法,检查 SALL4 蛋白在肝母细胞瘤组织中的表达水平,发现与瘤旁组织相比,SALL4 蛋白在肝母细胞瘤组织中的表达水平呈显著上调趋势,SALL4 阳性组肝母细胞瘤患者的总体生存率显著低于 SALL4 阴性和弱阳性组 ($P=0.034$),与上述研究结果一致。本研究结果还提示肝母细胞瘤组织中 let-7b 的表达水平与 SALL4 的表达水平呈显著负相关,双荧光素酶报告基因实验结果也证实 let-7b 与 SALL4 有良好的靶向关系。我们上调 HepG2 细胞中 let-7b 的表达水平后,SALL4 蛋白的表达水平可被显著下调,而抑制 let-7b 的表达水平后则可以逆转这个现象。本研究结果提示在肝母细胞瘤中 let-7b 可能通过靶向调控 SALL4 的表达水平影响其恶性生物学行为。SALL4 与转录因子包括 SOX2、Oct3/4、Nanog 等,这些因子相互作用共同维系了肿瘤干细胞 (cancer stem cell, CSC) 的多功能性,是维持 CSC 无限增殖、自我更新、多向分化的重要调控基因^[15]。Bmi-1 和 PTEN 已被证实是 SALL4 下游的直接靶基因^[16,17]。而 SALL4 具体通过下游的哪条通路在肝母细胞瘤中发挥作用尚需要我们进一步研究。

现有的研究表明肝母细胞瘤可表现出不同的组织学表型和临床行为,可能是由不同分化程度的肝干细胞或早期肝前体细胞增殖产生^[4]。肝母细胞瘤中也被证实存在肿瘤干细胞样细胞 (也称侧群细胞, side population cells, SP) 的存在,接种到小鼠体

内后与主群细胞(main polulation cells, MP)相比有更强的成瘤能力^[18]。let-7b 和 SALL4 均为干细胞标记物,在肝母细胞瘤中 let-7b 是否可以通过靶向调控 SALL4 影响肝母细胞瘤干细胞生物学特性,进而影响肝母细胞瘤的恶性表型还需要进一步研究。

参考文献

- 1 Spector LG, Birch J. The epidemiology of hepatoblastoma [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2012, 59 (5) : 776 - 779. DOI: 10.1002/pbc.24215.
- 2 Bissig-Choisat B, Kettlun-Leyton C, Legras XD, et al. Novel patient-derived xenograft and cell line models for therapeutic testing of pediatric liver cancer[J]. *J Hepatol*, 2016, 65 (2) : 325 - 333. DOI:10.1016/j.jhep.2016.04.009.
- 3 Hooks KB, Audoux J, Fazli H, et al. New insights into diagnosis and therapeutic options for proliferative hepatoblastoma [J]. *Hepatology*, 2018, 68 (1) : 89 - 102. DOI: 10.1002/hep.29672.
- 4 Sumazin P, Chen Y, Treviño LR, et al. Genomic analysis of hepatoblastoma identifies distinct molecular and prognostic subgroups[J]. *Hepatology*, 2017, 65 (1) : 104 - 121. DOI:10.1002/hep.28888.
- 5 Axiotis CA, Monteagudo C, Merino MJ, et al. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein in endometrial adenocarcinoma[J]. *Am J Pathol*, 1991, 138 (4) : 799 - 806.
- 6 Wang Z, Xu L, Hu Y, et al. miRNA let-7b modulates macrophage polarization and enhances tumor-associated macrophages to promote angiogenesis and mobility in prostate cancer [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25602. DOI:10.1038/srep25602.
- 7 Tian Y, Hao S, Ye M, et al. MicroRNAs let-7b/i suppress human glioma cell invasion and migration by targeting IK-BKE directly[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458 (2) : 307 - 312. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.01.105.
- 8 Han X, Chen Y, Yao N, et al. MicroRNA let-7b suppresses human gastric cancer malignancy by targeting ING1 [J]. *Cancer Gene Ther*, 2015, 22 (3) : 122 - 129. DOI:10.1038/cgt.2014.75.
- 9 Saffari M, Ghaderian SMH, Omrani MD, et al. The Association of miR-let 7b and miR-548 with PTEN in Prostate Cancer [J]. *Urol J*, 2019, 16 (3) : 267 - 273. DOI: 10.22037/uj.v0i0.4564.
- 10 Jin B, Wang W, Meng XX, et al. Let-7 inhibits self-renewal of hepatocellular cancer stem-like cells through regulating the epithelial-mesenchymal transition and the Wnt signaling pathway [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16 (1) : 863. DOI: 10.1186/s12885-016-2904-y.
- 11 Tian Y, Hao S, Ye M, et al. MicroRNAs let-7b/i suppress human glioma cell invasion and migration by targeting IK-BKE directly [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458 (2) : 307 - 312. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.01.105.
- 12 Yong KJ, Gao C, Lim JS, et al. Oncofetal gene SALL4 in aggressive hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368 (24) : 2266 - 2276. DOI:10.1056/NEJMc1308785.
- 13 Tatetsu H, Kong NR, Chong G, et al. SALL4, the missing link between stem cells, development and cancer [J]. *Gene*, 2016, 584 (2) : 111 - 119. DOI: 10.1016/j.gene.2016.02.019.
- 14 Zhou S, Venkatramani R, Gomulica E, et al. The diagnostic and prognostic value of SALL4 in hepatoblastoma [J]. *Histopathology*, 2016, 69 (5) : 822 - 830. DOI:10.1111/his.13005.
- 15 Tanimura N, Saito M, Ebisuya M, et al. Stemness-related factor Sall4 interacts with transcription factors Oct-3/4 and Sox2 and occupies Oct-Sox elements in mouse embryonic stem cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (7) : 5027 - 5038. DOI:10.1074/jbc.M112.411173.
- 16 Yang J, Chai L, Liu F, et al. Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (25) : 10494 - 10499. DOI: 10.1073/pnas.0704001104.
- 17 Liu C, Wu H, Li Y, et al. SALL4 suppresses PTEN expression to promote glioma cell proliferation via PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Neurooncol*, 2017, 135 (2) : 263 - 272. DOI:10.1007/s11060-017-2589-3.
- 18 Hayashi S, Fujita K, Matsumoto S, et al. Isolation and identification of cancer stem cells from a side population of a human hepatoblastoma cell line, HuH-6 clone-5 [J]. *Pediatr Surg Int*, 2011, 27 (1) : 9 - 16. DOI:10.1007/s00383-010-2719-x.

(收稿日期:2019-09-01)

本文引用格式:程继文,赵璞,杨薇粒,等. let-7b 通过靶向调控 SALL4 影响肝母细胞瘤细胞增殖能力的机制研究[J]. *临床小儿外科杂志*, 2020, 19 (5) : 404 - 409. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2020.05.006.

Citing this article as: Cheng JW, Zhao P, Yang WL, et al. Let-7b modulates the proliferation of hepatoblastoma cells by targeting SALL4 [J]. *J Clin Ped Sur*, 2020, 19 (5) : 404 - 409. DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2020.05.006.