

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201611189

## 去甲肾上腺素通过 PI3K/Akt 信号通路上调 Sox4 表达促进肝癌细胞增殖

杨大鹏,宦洪波,张亮,温旭东,吴黎雳,夏锋 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

**[摘要]** **目的** 探讨去甲肾上腺素对肝癌细胞自我更新能力的影响及其分子机制。**方法** 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测去甲肾上腺素对肝癌细胞(Huh7、PLC)中 CD133 表达水平的影响;肿瘤细胞球形成实验以及克隆形成实验检测去甲肾上腺素和哌唑嗪对肝癌细胞自我更新能力的作用;实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测去甲肾上腺素(10  $\mu\text{mol/L}$ )和哌唑嗪(5  $\mu\text{mol/L}$ )对肝癌细胞中干性相关基因表达的影响,并检测相关的信号通路。**结果** 去甲肾上腺素使 Huh7 和 PLC 肝癌细胞中的 CD133 表达升高;去甲肾上腺素处理 Huh7 和 PLC 肝癌细胞后的成球率较对照组明显上升,哌唑嗪处理后明显降低( $P < 0.05$ );在克隆形成实验中,去甲肾上腺素处理 Huh7 和 PLC 肝癌细胞的后,克隆形成率高于哌唑嗪组和对照组( $P < 0.05$ );与对照组和哌唑嗪组相比,去甲肾上腺素组中 Sox4 基因表达明显升高,同时 p-Akt 表达相较于哌唑嗪和对照组相比也明显上调( $P < 0.05$ )。**结论** 去甲肾上腺素激动肝癌细胞中  $\alpha$  肾上腺素能受体,通过激活 PI3K/Akt 信号通路上调肝癌细胞中 Sox4 基因表达,从而提高肝癌细胞自我更新的能力。

**[关键词]** 肝癌细胞增殖;去甲肾上腺素;Sox4;自我更新

**[中图分类号]** R730.23; R735.7; R977.11 **[文献标志码]** A

## Norepinephrine promotes proliferation of hepatocellular carcinoma cells through enhancing Sox4 expression via PI3K/Akt signal pathway

Yang Dapeng, Huan Hongbo, Zhang Liang, Wen Xudong, Wu Lili, Xia Feng (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of norepinephrine on self-renewal capacity in hepatocellular carcinoma (HCC) cells and investigate the molecular mechanism. **Methods** Quantitative RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression level of CD133 in the HCC cell lines Huh7 and PLC after the treatment of 10  $\mu\text{mol/L}$  norepinephrine. Sphere and clone formation assays were used to investigate the impact of norepinephrine on self-renewal capacity of HCC cells. The effects of norepinephrine (10  $\mu\text{mol/L}$ ) and prazosin (5  $\mu\text{mol/L}$ ) on the expression of stem related genes and signal pathways were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** Norepinephrine promoted the expression of CD133 in Huh7 and PLC cells. Norepinephrine facilitated sphere and clone formation in the 2 cell lines, and prazosin blocked the effect of norepinephrine ( $P < 0.05$ ). There were more sphere and clone formation in the cells after norepinephrine treatment than control cells and prazosin group ( $P < 0.05$ ). Higher level of Sox4 and up-regulation of p-Akt were observed in the norepinephrine-treated cells than prazosin-treated and control HCC cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Norepinephrine activates  $\alpha$ -adrenergic receptor and up-regulates Sox4 expression via activating PI3K/Akt signal pathway, and thus improves self-renewal capacity in HCC cells.

**[Key words]** proliferation in hepatocellular carcinoma cells; norepinephrine; Sox4; self-renew

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272224). Corresponding author: Xia Feng, E-mail: frankfxia@163.com

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81272224)

**[通信作者]** 夏锋, E-mail: frankfxia@163.com

**[优先出版]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20170228.1919.016.html>

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率在所有恶性肿瘤中居第2位<sup>[1]</sup>。肝癌起病隐匿,经各种治疗后转移、复发率高<sup>[2]</sup>,明确肝癌发生、发展的机制迫在眉睫,为指导临床治疗提供有力的帮助。肿瘤干细胞理论认为在肿瘤细胞中存在一小群具有干细胞特征的肿瘤细胞,肿瘤干细胞具有自我更新、分化和耐放化疗的能力,在肿瘤复发和转移的过程中起着关键作用。同时,Sox2<sup>[3]</sup>、Sox4<sup>[4]</sup>、Sox9<sup>[5]</sup>、Oct4<sup>[6]</sup>和c-myc<sup>[7]</sup>等基因在肿瘤干细胞干性的维持过程中起着重要作用。目前最新的研究认为交感神经在肿瘤的发生、发展中起着重要作用。先前的报道证实交感神经可以调控肿瘤的起始和发展<sup>[8]</sup>,而 $\alpha$ 肾上腺素能受体在此过程中起着至关重要的作用,可以调控多种肿瘤进程<sup>[9-11]</sup>。去甲肾上腺素是一种 $\alpha$ 肾上腺素能受体激动剂,对 $\beta$ 肾上腺素能受体几乎没有作用。 $\alpha$ 肾上腺素能受体与肿瘤细胞增殖密切相关<sup>[12]</sup>,然而 $\alpha$ 肾上腺素能受体影响肝癌细胞增殖的机制还不明确。因此,本研究旨在研究去甲肾上腺素激动 $\alpha$ 肾上腺素能受体对肝癌细胞增殖能力的影响及其相关机制,为临床肝细胞癌的治疗提供有效的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

DMEM/F12培养基、胎牛血清以及胰蛋白酶,B27、bFGF和EGF细胞因子等相关试剂购于Gibco公司。HGF购于Peprotech公司。RNA提取试剂TRIzol、反转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒购于TaKaRa公司。细胞裂解液购于Thermo公司。去甲肾上腺素和哌啶嗪购于Sigma公司。CD133、Sox4、p-Akt、Akt、STAT3等抗体购于Cell Signal Tech和Abcam公司。细胞培养孵育箱、高速离心机、倒置显微镜、Western blot显影仪等实验室相关仪器分别购于Thermo、Olympus和Bio-Rad公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养及去甲肾上腺素和哌啶嗪处理** 实验所用的人肝癌细胞株Huh7和PLC均来源于美国ATCC细胞库。培养基为含10%胎牛血清的DMEM。细胞培养于恒定37℃、5%CO<sub>2</sub>浓度的细胞培养箱。细胞每2天更换1次培养基,对数生长期传代。去甲肾上腺素和哌啶嗪处理浓度分别为10 $\mu$ mol/L和5 $\mu$ mol/L,哌啶嗪在去甲肾上腺素激动 $\alpha$ 受体1h后加入。

**1.2.2 蛋白质提取以及Western blot检测** 取 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞提取总蛋白质,BCA法检测各组中蛋白质浓度。在10%的SDS-PAGE凝胶充分电泳各

组蛋白质,转膜,封闭2h。用小鼠抗人CD133单抗(1:1 000稀释)、兔抗人Sox4单抗(1:1 000稀释)、p-Akt兔抗人单抗(1:1 000稀释)、Akt兔抗人单抗(1:1 000稀释)、STAT3(1:1 000稀释)和兔抗人GAPDH(1:2 000稀释),4℃中孵育过夜。洗涤后用相应的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗(1:5 000稀释)室温孵育2h,然后显影。

**1.2.3 细胞总RNA提取、反转录及实时定量荧光PCR检测** 取 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞,用TRIzol提取细胞总RNA,并检测RNA浓度、纯度和完整性,反转录为cDNA。用SYBR Green荧光染料,实时荧光定量PCR分别检测对照组、去甲肾上腺素、去甲肾上腺素+哌啶嗪和哌啶嗪组中Sox-2、Sox-4、Sox-9、Oct-4和c-myc表达水平。10 $\mu$ L反应体系:5 $\mu$ L SYBR Green + 3.4 $\mu$ L无酶水+0.8 $\mu$ L cDNA+0.4 $\mu$ L前引物+0.4 $\mu$ L后引物。PCR扩增条件:95℃解链30s,60℃退火10s,72℃延伸30s。引物序列:CD133:上游5'-CCAAGACTCCATAAAGCTGGA-3',下游5'-CTCAGG-TTGCACAGGGTAA-3';Sox2:上游5'-GCACAACTCG-GAGATCAGCA-3',下游5'-TTCATGTGCGGTAAC-TGC-3';Sox4:上游5'-GCACTAGGACGTCTGCCTTT-3',下游5'-ACACGGCATATTGCACAGGA-3';Sox9:上游5'-AGGAGAACCCCAAGATGCAC-3',下游5'-GAGGCG-TTTTGTCTTCGTC-3';Oct4:上游5'-CCTTCGCAAGC-CCTCATTTC-3',下游5'-CCCCACAGAACTCATACGG-3';c-myc:上游5'-CGTCCTCGGATTCTCTGCTC-3',下游5'-GCTGCGTAGTTGTGCTGATG-3'。Bio-Rad CFX Manager软件对各组基因表达水平进行分析。

**1.2.4 肿瘤细胞球形成实验** 将Huh7和PLC细胞通过流式细胞仪以20个/孔接种于低粘附96孔板,每组设置6个副孔,每孔加入100 $\mu$ L成球培养基(98 mL F12培养基,2 mL B27, 100 $\mu$ L EGF(20 $\mu$ g/mL), 100 $\mu$ L bFGF(20 $\mu$ g/mL)和100 $\mu$ L EGF(10 $\mu$ g/mL),混匀,4℃保存不超过1个月)。实验设定去甲肾上腺素、去甲肾上腺素加哌啶嗪为实验组,设定药物浓度分别为10、5 $\mu$ mol/L,用等体积PBS代替去甲肾上腺素和哌啶嗪为对照组。细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>浓度的培养箱中培养,每3天加1次培养基和药物。第14天在倒置显微镜下观察Huh7和PLC细胞成球情况,记录其成球数量,计算肿瘤细胞成球率(细胞球>75 $\mu$ m)。

细胞成球率=(细胞成球数/细胞接种数)×100%

**1.2.5 肿瘤细胞克隆形成实验** 将Huh7和PLC细胞通过流式细胞仪以200个/孔接种于24孔板,每组设置3个副孔,每孔加入500 $\mu$ L含10%FBS的

DMEM 培养基, 实验设定去甲肾上腺素、去甲肾上腺素加哌唑啉为实验组, 设定药物浓度分别为 10、5  $\mu\text{mol/L}$ , 用等体积 PBS 代替去甲肾上腺素和哌唑啉为对照组。细胞置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  浓度细胞培养箱中培养 14 d, 每 3 天换 1 次培养基。第 14 天在倒置显微镜下观察 Huh-7 和 PLC 细胞克隆形成情况(细胞数量 > 50 个记为 1 个克隆), 记录其克隆数量, 计算肿瘤细胞克隆形成率。

克隆形成率 = (细胞成球数/接种细胞数)  $\times$  100%

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本的组间比较采用 *t* 检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 去甲肾上腺素促进肝癌细胞表达 CD133

RT-PCR 检测对照组和去甲肾上腺素处理组中 Huh7 和 PLC 肝癌细胞中肝癌干细胞标记物 CD133 的表达水平, 结果发现去甲肾上腺素处理组中各个肝癌干细胞标记物水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ , 图 1A)。Western blot 实验进一步验证 RT-PCR 的结果, 去甲肾上腺素处理组中 CD133 表达水平均高于对照组(图 1B)。

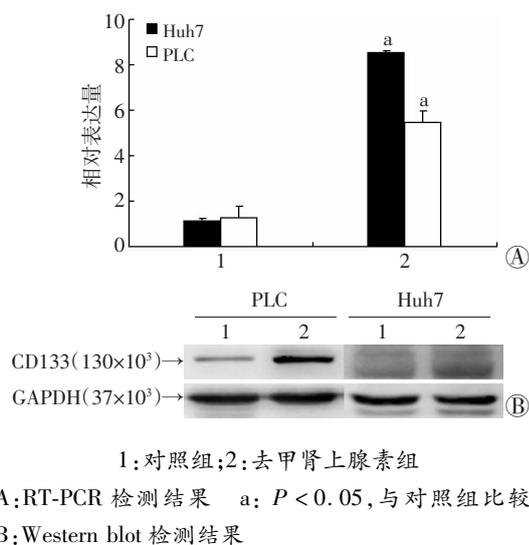
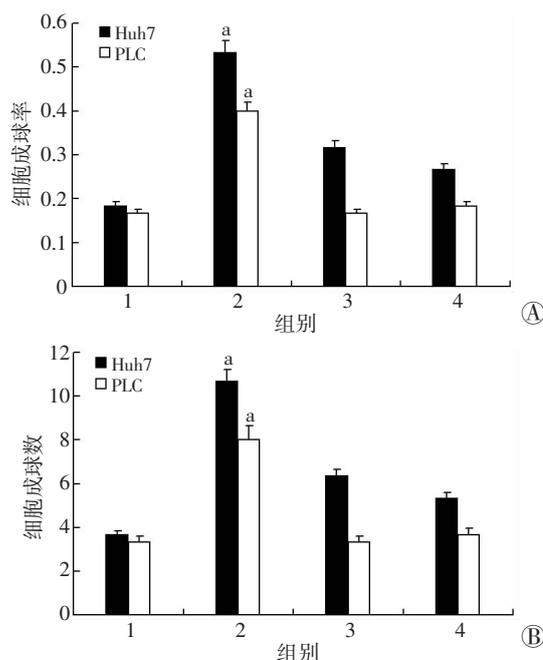


图 1 RT-PCR 和 Western blot 检测去甲肾上腺素对 Huh7 和 PLC 细胞 CD133 表达水平的影响

### 2.2 去甲肾上腺素促进肝癌细胞成球

各组在低黏附条件下培养 14 d, 去甲肾上腺素刺激后 Huh7 和 PLC 肝癌细胞的成球能力较对照组明显提高, 哌唑啉阻滞肝细胞成球能力减弱 ( $P < 0.05$ , 图 2)。



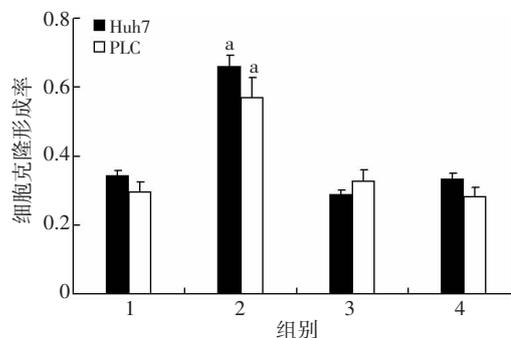
1: 对照组; 2: 去甲肾上腺素组; 3: 去甲肾上腺素 + 哌唑啉组; 4: 哌唑啉组 a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

A: 肿瘤细胞球形成率; B: 肿瘤细胞球形成数

图 2 肿瘤细胞球形成实验检测去甲肾上腺素对 Huh7 和 PLC 细胞球形成的影响

### 2.3 去甲肾上腺素提高肝癌细胞克隆形成能力

各组细胞培养 14 d, 去甲肾上腺素刺激后 Huh7 和 PLC 肝癌细胞的克隆能力较对照组明显提高, 哌唑啉阻滞肝细胞克隆形成能力减弱 ( $P < 0.05$ , 图 3)。表明去甲肾上腺素激动肝癌细胞的  $\alpha$  肾上腺素能受体可以增强肝癌细胞的自我更新能力, 促进肝癌细胞增殖。



1: 对照组; 2: 去甲肾上腺素组; 3: 去甲肾上腺素 + 哌唑啉组; 4: 哌唑啉组 a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图 3 细胞克隆实验检测去甲肾上腺素对 Huh7 和 PLC 细胞克隆形成的影响

### 2.4 去甲肾上腺素通过 PI3K/Akt 信号通路促进肝癌细胞中 Sox4 的表达

通过文献挑选出与肿瘤细胞干性相关的基因

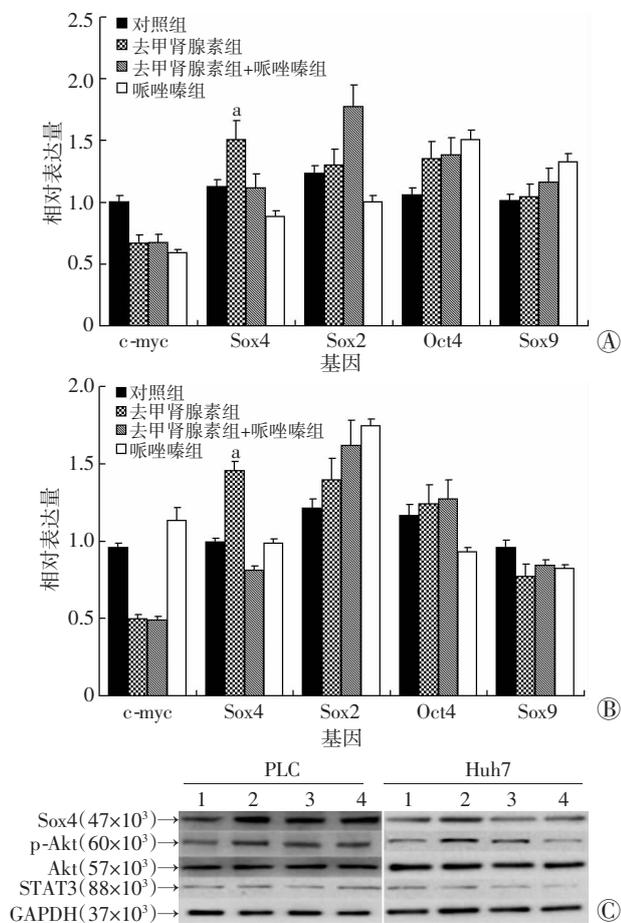
Sox2、Sox4、Sox9、Oct4 和 c-myc。在去甲肾上腺素和哌唑嗪浓度分别为 10  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  处理 Huh7 和 PLC 细胞,并在 24、48 h 后分别提取总 RNA 和总蛋白,用 RT-PCR 和 Western blot 检测 Huh7 和 PLC 肝癌细胞中干性相关基因的变化。结果显示,Sox4 基因在去甲肾上腺素激动  $\alpha$  受体后明显上调,哌唑嗪阻滞  $\alpha$  受体后表达减少 ( $P < 0.05$ , 图 4A、B)。Western blot 实验验证了 PCR 的结果(图 4C)。然后通过 Western blot 检测 p-Akt 和 STAT3 在各组中的表达水平,发现去甲肾上腺素能促进 p-Akt 表达上升,对 Akt 表达水平没有影响,而在哌唑嗪组中 p-Akt 表达水平降低(图 4C)。同时,STAT3 的表达水平在各组中均没有任何的变化(图 4C)。根据以上结果推断去甲肾上腺素可能是激动肝癌细胞中  $\alpha$  肾上腺素能受体激活 PI3K/Akt 信号通路上调 Sox4 的表达调控肝癌细胞自我更新能力,进而促进肝癌细胞增殖。

### 3 讨论

$\alpha$  肾上腺素能受体与多种肿瘤的发生、发展密切相关,包括增殖、凋亡、侵袭和转移<sup>[12-14]</sup>。去甲肾上腺素通过激动肿瘤细胞上的  $\alpha$  肾上腺素能受体影响多种肿瘤细胞功能<sup>[15]</sup>。本研究发现去甲肾上腺素激动肝癌细胞上的  $\alpha$  肾上腺素能受体后能够促进群体肝癌细胞中 CD133 表达升高;进一步研究发现去甲肾上腺素能增强肝癌细胞的自我更新能力。此外,去甲肾上腺素刺激肝癌细胞后 p-Akt 表达水平升高,同时 Sox4 表达上调。我们推测去甲肾上腺素促进肝癌细胞增殖可能是通过激动肝癌细胞膜上  $\alpha$  肾上腺素能受体,激活 PI3K/Akt 信号通路上调 Sox4 基因的表达。

自主神经系统在肿瘤发生、发展中的作用越来越受到关注,神经递质可以通过  $\alpha$  和  $\beta$  肾上腺素能受体信号通路影响多种肿瘤的发生和发展<sup>[8]</sup>。近年的相关报道发现,去甲肾上腺素可能在多种肿瘤的发生、发展起重要作用<sup>[15]</sup>,但其具体的机制还不明确,在肝癌中的作用更是研究甚少。本课题组前期研究发现,去甲肾上腺素可以激活 Kupffer 细胞上的  $\alpha 1$  肾上腺素能受体通过炎症信号通路促进肝癌的发生<sup>[16]</sup>。本研究发现去甲肾上腺素可以促进肝癌细胞中肝癌干细胞标记物 CD133 的上升。CD133<sup>+</sup> 的肝癌细胞具有干细胞特征,拥有更强的自我更新能力和成瘤能力<sup>[17]</sup>。因此,本研究结果表明去甲肾上腺素可能促进群体肝癌细胞中肿瘤干细胞增多。同时,去甲肾上腺素能够促进 Huh7 和 PLC 细胞 CD133 的表达,暗示去甲肾上腺素有可能提高肝癌细胞的自我更新能力。进一步研究发现 Huh7 和 PLC 肝癌细胞在经过 10  $\mu\text{mol/L}$  的去甲肾上腺素刺激后,肝癌细胞的成球能力和克隆形成能力较对照组明显上升,而哌唑嗪阻滞  $\alpha$  肾上腺素能受体后肝癌细胞的成球和克隆形成能力明显下降,并且单独使用哌唑嗪处理肝癌细胞后其成球能力和克隆形成较对照组没有明显的变化。说明去甲肾上腺素能够通过激动  $\alpha$  肾上腺素能受体调控肝癌细胞的自我更新能力,促进肝癌细胞增殖。

为了进一步探讨去甲肾上腺素促进肝癌细胞自我更新的分子机制,通过查阅文献,发现 Sox2、Sox4、Sox9、Oct4 和 c-myc 等基因在肿瘤细胞增殖以及干性的维持过程中承担重要的角色。因此,本研究检测了去甲肾上腺素对这些基因在肝癌细胞中表达水平的影



a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

A: Huh7 细胞 RT-PCR 检测结果; B: PLC 细胞 RT-PCR 检测结果; C: Western blot 检测结果 1: 对照组; 2: 去甲肾上腺素组; 3: 去甲肾上腺素 + 哌唑嗪组; 4: 哌唑嗪组

图 4 RT-PCR 和 Western blot 检测去甲肾上腺素影响 Huh7 和 PLC 细胞中干性基因表达以及相关的信号通路

响。去甲肾上腺素刺激 Huh7 和 PLC 肝癌细胞后, Sox4 基因较其他干性相关基因明显升高, 哌啶嗪阻滞 后 Sox4 表达下调。而单独使用哌啶嗪处理肝癌细胞 对各个基因表达水平并没有明显的影响, 说明去甲肾 上腺素激动肝癌细胞中  $\alpha$  肾上腺素能受体后能够特 异性的促进 Sox4 基因的表达。研究发现, PI3K/Akt 信号通路的激活可以诱导 Sox4 的表达, 促进前列腺癌 的发生<sup>[18]</sup>; STAT3 信号通路的激活可以诱导 Sox4 的 表达, 促进肝癌细胞的自我更新<sup>[19]</sup>。为了进一步明确 去甲肾上腺素激活  $\alpha$  肾上腺素能受体后促进肝癌细 胞中 Sox4 表达的机制, 本研究检测了去甲肾上腺素对 PI3K/Akt 和 STAT3 的影响, 发现去甲肾上腺素处理 Huh7 和 PLC 后, p-Akt 相较于 Akt 和 STAT3 表达明显 上升, 哌啶嗪阻滞后 p-Akt 表达下降, 而单独使用哌啶 嗪处理不影响肝癌 p-Akt 的表达水平。我们推测去甲 肾上腺素激动  $\alpha$  肾上腺素能受体可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进肝癌细胞中 Sox4 基因的表 达, 从而提高肝癌细胞自我更新的能力, 促进肝癌细胞 增殖。

Sox4 是 Sox 转录因子家族的成员, 在胚胎发育和 细胞分化中起着关键的作用, 特别是在肝脏、胰腺、中 枢神经系统的发育中起着至关重要的作用<sup>[20-21]</sup>。同 时 Sox4 在恶性肿瘤的发生发展中起着重要的作用, 如 乳腺癌<sup>[22]</sup>、宫颈癌<sup>[23]</sup>、皮肤癌<sup>[24]</sup>。Sox4 与膀胱癌干 细胞的干性以及膀胱癌的临床预后密切相关等<sup>[25]</sup>。

结合本研究的结果可以推断, 去甲肾上腺素进入 肝癌组织后, 激动肝癌细胞膜上的  $\alpha$  肾上腺素能受 体, 可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路上调 Sox4 基因 的表达, 从而提高肝癌细胞自我更新的能力, 促进肝癌 细胞的增殖。

#### 参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115 - 132. DOI:10.3322/caac.21338.
- [2] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893 - 2917. DOI:10.1002/ijc.25516.
- [3] Andoniadou C L, Matsushima D, Mousavy Gharavy S N, *et al.* Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential[J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(4): 433 - 445. DOI: 10.1016/j.stem.2013.07.004.
- [4] Ying Z, Li Y, Wu J, *et al.* Loss of miR-204 expression enhances glioma migration and stem cell-like phenotype [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 990 - 999. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-2895.
- [5] Roche K C, Gracz A D, Liu X F, *et al.* SOX9 maintains reserve stem cells and preserves radioresistance in mouse small intestine[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(6): 1553 - 1563. e10. DOI:10.1053/j.gastro.2015.07.004.
- [6] Chai S, Ng K Y, Tong M, *et al.* Octamer 4/microRNA-1246 signaling axis drives Wnt/ $\beta$ -catenin activation in liver cancer stem cells[J]. *Hepatology*, 2016, 64(6):2062 - 2076. DOI: 10.1002/hep.28821.
- [7] Zhou X, Tan M, Nyati M K, *et al.* Blockage of neddylation modification stimulates tumor sphere formation *in vitro* and stem cell differentiation and wound healing *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(21): E2935 - E2944. DOI: 10.1073/pnas.1522367113.
- [8] Ondicova K, Mravec B. Role of nervous system in cancer aetiopathogenesis [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(6): 596 - 601. DOI:10.1016/S1470-2045(09)70337-7.
- [9] Batty M, Pugh R, Rathinam I, *et al.* The Role of  $\alpha$ 1-Adrenoceptor Antagonists in the Treatment of Prostate and Other Cancers [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(8): 1339. DOI:10.3390/ijms17081339.
- [10] Lamkin D M, Sung H Y, Yang G S, *et al.*  $\alpha$ 2-Adrenergic blockade mimics the enhancing effect of chronic stress on breast cancer progression [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, 51: 262 - 270. DOI:10.1016/j.psyneuen.2014.10.004.
- [11] Yeo J H, Yoon S Y, Kim S J, *et al.* Clonidine, an alpha-2 adrenoceptor agonist relieves mechanical allodynia in oxaliplatin-induced neuropathic mice; potentiation by spinal p38 MAPK inhibition without motor dysfunction and hypotension [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(10): 2466 - 2476. DOI:10.1002/ijc.29980.
- [12] Morelli M B, Amantini C, Nabissi M, *et al.* Cross-talk between  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors and transient receptor potential vanilloid type 1 triggers prostate cancer cell proliferation [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14(1). DOI:10.1186/1471-2407-14-921.
- [13] Magnon C, Hall S J, Lin J, *et al.* Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression [J]. *Science*, 2013, 341(6142):1236361. DOI:10.1126/science.1236361.
- [14] Xia M, Tong J H, Zhou Z Q, *et al.* Tramadol inhibits proliferation, migration and invasion *via*  $\alpha$ 2-adrenoceptor signa-

- ling in breast cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(1): 157 – 165.
- [15] Fitzgerald P J. Is norepinephrine an etiological factor in some types of cancer[J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(2): 257 – 263. DOI:10.1002/ijc.24063.
- [16] Huan H B, Wen X D, Chen X J, *et al.* Sympathetic nervous system promotes hepatocarcinogenesis by modulating inflammation through activation of alpha1-adrenergic receptors of Kupffer cells[J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 59: 118 – 134. DOI:10.1016/j.bbi.2016.08.016.
- [17] Ma S, Chan K W, Hu L, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2542 – 2556. DOI:10.1053/j.gastro.2007.04.025.
- [18] Bilir B, Osunkoya A O, Wiles W G 4th, *et al.* SOX4 Is Essential for Prostate Tumorigenesis Initiated by PTEN Ablation[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(5): 1112 – 1121. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1868.
- [19] Chen Z Z, Huang L, Wu Y H, *et al.* LncSox4 promotes the self-renewal of liver tumour-initiating cells through Stat3-mediated Sox4 expression[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12598. DOI:10.1038/ncomms12598.
- [20] Yin C. Molecular mechanisms of Sox transcription factors during the development of liver, bile duct, and pancreas [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 63:68 – 78. DOI:10.1016/j.semcdb.2016.08.015.
- [21] Cheung M, Abu-Elmagd M, Clevers H, *et al.* Roles of Sox4 in central nervous system development[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 79(1/2): 180 – 191. DOI:10.1016/S0169-328X(00)00109-1.
- [22] Lee H, Goodarzi H, Tavazoie S F, *et al.* TMEM2 Is a SOX4-Regulated Gene That Mediates Metastatic Migration and Invasion in Breast Cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(17): 4994 – 5005. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-2322.
- [23] Sun R, Jiang B, Qi H, *et al.* SOX4 contributes to the progression of cervical cancer and the resistance to the chemotherapeutic drug through ABCG2 [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1990. DOI:10.1038/cddis.2015.290.
- [24] Foronda M, Morgado-Palacin L, Gomez-Lopez G, *et al.* Profiling of Sox4-dependent transcriptome in skin links tumour suppression and adult stem cell activation [J]. *Genomics Data*, 2015, 6: 21 – 24. DOI:10.1016/j.gdata.2015.07.030.
- [25] Shen H, Blijlevens M, Yang N, *et al.* Sox4 Expression Confers Bladder Cancer Stem Cell Properties and Predicts for Poor Patient Outcome[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(12): 1363 – 1375. DOI:10.7150/ijbs.13240.

(收稿:2016-11-22;修回:2017-02-07)

(编辑 邓强庭)