

紫花前胡苷通过调控 CXCL5-ERK/MEK 信号轴发挥抗肝癌作用

王鹏利, 王国泰, 闫曙光, 李京涛, 罗璐, 白垚, 周小燕*

陕西中医药大学附属医院, 咸阳 712000

摘要: 本文探讨紫花前胡苷(nodakenin, NK)对肝癌细胞的作用及机制。不同浓度紫花前胡苷处理 HepG2 和 MHCC-97H 细胞, CCK-8 检测细胞增殖变化, 细胞划痕和 Trans-wells 实验观察细胞迁移和侵袭能力变化。紫花前胡苷能够显著抑制 HepG2 和 MHCC-97H 细胞增殖、体外迁移和侵袭; RNA-seq 分析紫花前胡苷给药前后各基因表达, qRT-PCR、Western blotting 和细胞免疫荧光进行验证分析, 结果表明紫花前胡苷给药后趋化因子 5(CXCL5)的表达显著降低, 同时 ERK 和 MEK 磷酸化被抑制。综上所述紫花前胡苷通过下调 CXCL5 抑制 ERK/MEK 信号通路从而发挥抗肝癌作用。

关键词: 紫花前胡苷; CXCL5; ERK/MEK; 肝癌

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)6-1014-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.6.014

Nodakenin exerts anti-hepatocellular carcinoma effects by regulating CXCL5-ERK/MEK signal axis

WANG Peng-li, WANG Guo-tai, YAN Shu-guang, LI Jing-tao, LUO Lu, BAI Yao, ZHOU Xiao-yan*

Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: This paper investigates the effect and mechanism of nodakenin (NK) on hepatocellular carcinoma cells. HepG2 and MHCC-97H cells were treated with different concentrations of NK. Cell proliferations were detected by CCK-8, and migration and invasion abilities were observed by cell scratch and Trans-wells experiments. NK significantly inhibited the proliferation, migration and invasion of HepG2 and MHCC-97H cells *in vitro*. RNA-seq was conducted to analyze the expression of each gene before and after the administration of NK. qRT-PCR, Western blotting and cellular immunofluorescence were used to verify the RNA-seq result. The results showed that the expression of chemokine 5 (CXCL5) was significantly decreased after administration of NK, and the phosphorylation of ERK and MEK was inhibited at the same time. In summary, it can be concluded that NK inhibits ERK/MEK signaling pathway by down-regulating CXCL5, thereby inhibiting hepatocellular carcinoma.

Key words: nodakenin; CXCL5; ERK/MEK; liver cancer

肝癌已经成为临床上常见的一类消化系统肿瘤疾病,其复杂的致病因素和发生机制导致较高的致死率,临床上目前多以手术切除为主要治疗方法^[1],但是很多患者术后生存期十分不理想,主要原因在于肝癌的高转移导致肿瘤复发^[2]。手术配合术后有效药物的治疗对提高肝癌患者的生存期具有重要意义,目前临床上治疗肝癌药物包括氟尿嘧啶等,但是其具有一定的毒副作用^[3]。传统中医药在治疗肝癌方面具有一定的辅助治疗作用且副作用

小,有研究指出“益气活血汤”可以有效延长肝癌患者术后生存期^[4]。本科室根据多年中药治疗肝癌经验对“益气活血汤”汤剂加入羌活进行加味改进,而羌活的主要活性物质是紫花前胡苷,已有研究证实紫花前胡苷对宫颈癌细胞具有抑制作用,其机制可能与自噬相关细胞凋亡有关^[5],但是尚无任何研究报道紫花前胡苷对肝癌的作用,因此本研究主要探讨紫花前胡苷对肝癌的作用及其可能的作用靶点和信号通路。

1 材料和方法

1.1 材料

HepG2 和 MHCC-97H 细胞由中科院上海细胞库提供;细胞裂解液(货号:P0013)、蛋白酶抑制剂

收稿日期:2021-08-26

接受日期:2022-03-22

基金项目:咸阳市 2019 年重点研发计划(2019k02-100)

* 通信作者 Tel:86-013571072407; E-mail:yu8108@126.com

(北京碧云天生物公司,货号:P1049)、Western blotting 试剂盒(货号:FFX052)购自北京碧云天生物公司;DMEM(货号:SH30285.03)、FBS(货号:SH30070.01)、胰蛋白酶消化液(货号:SV30031.01)购自HyClone公司;青链霉素混合液(武汉普诺赛,货号:PB180120);4%多聚甲醛(苏州新赛美,货号:N1012);0.1%结晶紫(西安科昊公司,货号:N54346);33%乙酸(西安科昊公司,货号:N15356);p-ERK1/2(货号:ab278538)、p-MEK(货号:ab96379)、ERK1/2(货号:ab32537)、MEK(货号:ab33918)、GAPDH(货号:ab8245)购自Abcam;Trans-well小室(美国Corning);si-NC和si-CXCL5由西安擎科生物有限公司合成。紫花前胡苷购自陶素生物(纯度98.93%,货号:T3872)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 检测细胞增殖

96孔板接种HepG2和MHCC-97H细胞,接种细胞密度5000个/孔,给予0、5、10、15、20、25 ng/ml不同浓度的紫花前胡苷,每个浓度3个复孔,分别于24、48、72 h时每孔加20 μ L CCK-8反应液,37 $^{\circ}$ C孵育2 h后酶标仪测定OD_{450 nm}。

1.2.2 免疫荧光

将HepG2和MHCC-97H细胞铺至含有0.1%胶原涂层的玻璃盖玻片上,待细胞密度60%左右,分别PBS和25 ng/mL紫花前胡苷给药24 h,随后用预冷的甲醇和丙酮混合液(1:1)进行固定,然后在1% TritonX-100/PBS中透化。洗片擦干后在4 $^{\circ}$ C冰箱中和CXCL5(1:1000)抗体孵育过夜。次日4%多聚甲醛固定4 h,用含15%蔗糖的PBS共孵育4 h,去离子水清洗玻片,使用激光共聚焦扫描分析切片。

1.2.3 细胞划痕

将HepG2和MHCC-97H细胞铺至6孔板上,待细胞密度60%左右,分别PBS和25 ng/mL紫花前胡苷处理24 h,处理前后用200 μ L枪头在细胞中间划痕,然后分别在0、24 h拍照记录细胞划痕愈合程度。

1.2.4 克隆形成实验

将HepG2和MHCC-97H细胞用胰蛋白酶消化,随后接种至无血清DMEM培养液中,分别PBS和25 ng/mL紫花前胡苷(NK)处理15天,15天后多聚甲醛固定2 h,33%结晶紫染色,室温风干,肉眼下对克隆形成数进行计数。

1.2.5 qRT-PCR

TRIzol和氯仿用来提取获得RNA,严格按照RNA逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。qRT-PCR仪器检测CXCL5相对GAPDH的表达水平。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性10 min,95 $^{\circ}$ C下退火10 s;60 $^{\circ}$ C下退火20 s并在72 $^{\circ}$ C下延伸35 s。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法用于计算目的基因的相对表达。引物如表1所示。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
CXCL5	F:TACCAGAATCTGTGTATGGGC R:GXACCCTGGTCTGGAGCCTA
GAPDH	F:CGTGAAGGTCGGAGTCAACG R:CAAAGTTGTCATGGATGHACC

1.2.6 Western blotting

采用RIPA细胞裂解液提取细胞总蛋白,BCA检测试剂盒进行蛋白定量并调整每孔蛋白上样量为30 μ g。100 V恒压进行SDS-PAGE蛋白电泳。分离后将蛋白电泳凝胶转移至PVDF膜上,取出PVDF膜用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,按照适当比例稀释p-ERK1/2、ERK1/2、p-MEK、MEK、CXCL5和GAPDH一抗并4 $^{\circ}$ C过夜孵育PVDF膜。次日,取出目的蛋白条带并回收一抗,TBST清洗目的条带7 min \times 3次;加入1:5000稀释的二抗室温孵育2 h,TBST洗涤7 min \times 3次;暗室采用化学发光仪检测目的蛋白的表达情况,凝胶成像系统进行灰度扫描分析。

1.2.7 细胞侵袭和迁移

1:9配制混匀BD胶和培养液,37 $^{\circ}$ C孵育5 h,随后水化基底膜30 min。Trans-well小室细胞铺板,上室每孔加入200 μ L无血清DMEM,且每孔加入 5×10^4 个HepG2和MHCC-97H细胞,下室正常加入含10%胎牛血清的DMEM培养液600 μ L。培养24 h后,PBS进行3次清洗,每次5 min;4%多聚甲醛固定15 min后小室室温风干。随后0.1%结晶紫染色15 min后用棉签擦去上层细胞,33%乙酸脱色,A_{570 nm}读值。细胞迁移:Trans-well小室细胞铺板,上室200 μ L无血清DMEM每孔加入 5×10^4 个HepG2和MHCC-97H细胞,下室正常加入含10%胎牛血清的DMEM培养液600 μ L,其余同上。

1.2.8 细胞转染

HepG2和MHCC-97H采用完全高糖DMEM培

培养基(含 10% FBS + 1% 青霉素混合液)于 37 ℃、5% CO₂ 条件进行培养。根据实验要求分别取 si-NC 和 si-CXCL5 混合液 200 μL 加入 6 孔板,37 ℃、5% CO₂ 转染 8 h,更换完全 DMEM 培养基继续培养 24 h 或 48 h,进行后续相关检测实验,同时设立阴性对照组。

1.2.9 RNA-seq

分别使用 PBS 和紫花前胡苷处理 HepG2,随后提取 RNA 检测样本质量,并建库利用 Illumina-HiSeq2500 和 HTSseq 测序平台对两组样本进行全基因和转录水平进行差异分析,筛选功能差异蛋白。

1.3 统计学分析

数据应用 SPSS 18.0 进行分析,计量资料均以

平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验,多组间比较用 *F* 检验,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 紫花前胡苷抑制肝癌细胞的增殖能力

明确紫花前胡苷对肝癌细胞的作用,0、5、10、15、20、25 ng/mL 不同浓度紫花前胡苷分别给药处理肝癌细胞 HepG2 和 MHCC-97H,随后 CCK-8 (见图 1A、1B)和细胞克隆实验(见图 1C、1D)检测细胞增殖能力。结果表明,与 PBS 给药组相比,紫花前胡苷可以有效抑制肝癌细胞 HepG2 和 MHCC-97H 增殖能力(*P* < 0.05),且 20 ng/mL 抑制作用最强,因此后续实验 20 ng/mL 作为 NK 实验给药浓度。

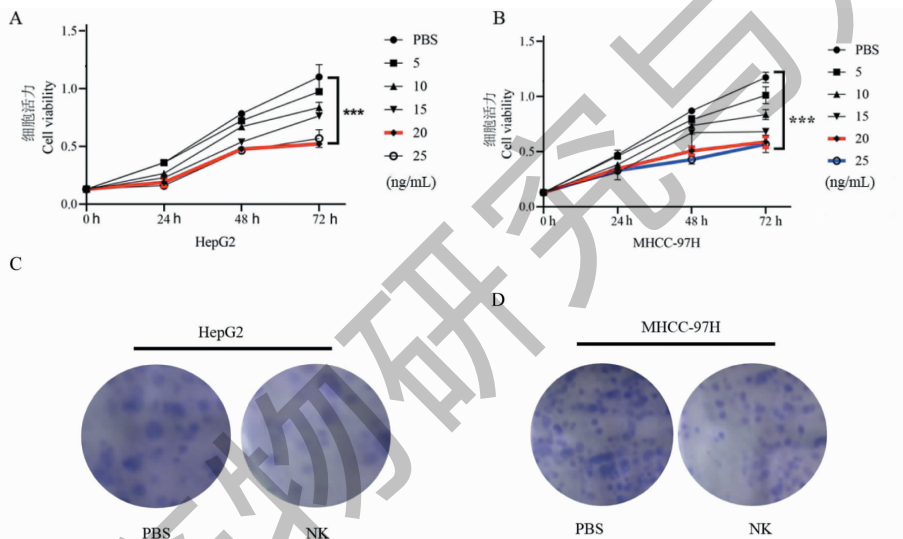


图 1 紫花前胡苷对肝癌细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of NK on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells

注:A:CCK-8 检测紫花前胡苷对 HepG2 细胞增殖影响;B:CCK-8 检测紫花前胡苷对 MHCC-97H 细胞增殖影响;C:克隆形成检测紫花前胡苷对 HepG2 细胞增殖影响;D:克隆形成检测紫花前胡苷对 MHCC-97H 细胞增殖影响。与 PBS 相比,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001;ns:无统计学意义。下同。Note:A:CCK-8 detects the effect of NK on the proliferation of HepG2 cells;B:CCK-8 detects the effect of NK on the proliferation of MHCC-97H cells;C:Clone formation detects the effect of NK on the proliferation of HepG2 cells;D:Clone formation detects the effect of NK on the proliferation of MHCC-97H cells. Compared with PBS,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001;ns:No statistically significant. The same below.

2.2 紫花前胡苷抑制肝癌细胞的迁移能力

细胞迁移能力是肿瘤细胞发生转移的重要因素,因此观察了紫花前胡苷对 HepG2 和 MHCC-97H 细胞迁移能力的影响。结果发现,与 PBS 给药组相比,紫花前胡苷可以有效抑制肝癌细胞 HepG2(见图 2A)和 MHCC-97H(见图 2B)的迁移能力。

2.3 紫花前胡苷抑制肝癌细胞的侵袭能力

细胞侵袭能力是肿瘤体内形成远端病灶的主要原因,因此观察了紫花前胡苷对 HepG2 和 MHCC-

97H 细胞侵袭能力的影响。结果发现,与 PBS 给药组相比,紫花前胡苷可以有效抑制肝癌细胞 HepG2(见图 3A)和 MHCC-97H(见图 3B)的侵袭能力,差异具有显著性(*P* < 0.05)。

2.4 紫花前胡苷抑制肝癌细胞内 CXCL5 表达

在前面研究基础上,进一步研究紫花前胡苷抑制肝癌恶性生物学行为的可能靶分子,RNA-seq 检测分析发现紫花前胡苷给药处理 HepG2 细胞后,CXCL5、ALYREF、SRPK2、IGF-1 和 RYR2 下调倍数

较大,其中 CXCL5 基因下调倍数最大;ING1、PTEN、BRCA1、NF-1 和 APC 上调倍数较高(见图 4)。随后通过 qRT-PCR(见图 5A)和免疫荧光(见图 5B)进

行进一步验证,发现紫花前胡苷给药处理后显著抑制 CXCL5 在 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中表达。

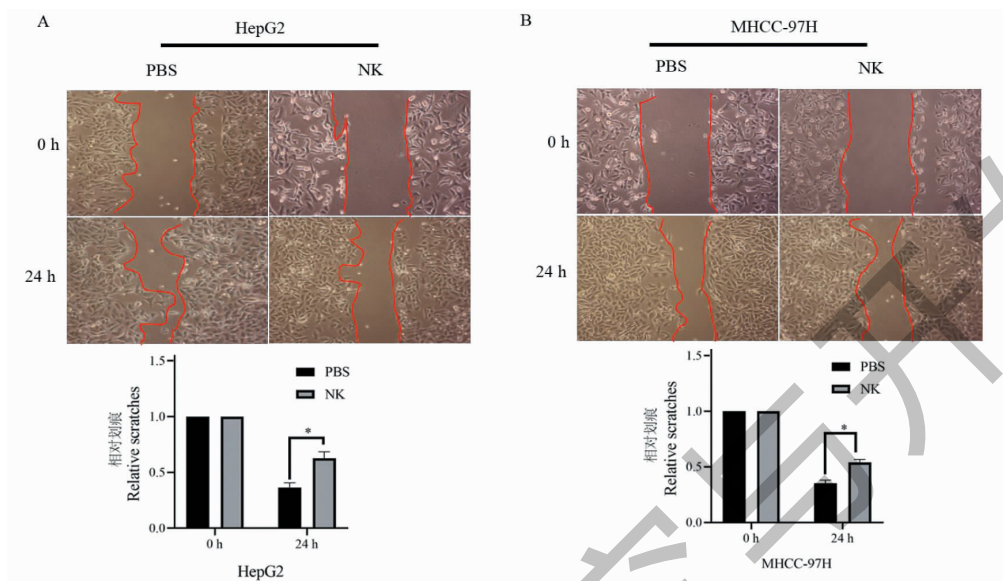


图 2 紫花前胡苷对肝癌细胞迁移能力的影响

Fig. 2 Effect of NK on the migration ability of hepatocellular carcinoma cells

注:A:紫花前胡苷对 HepG2 细胞迁移能力影响;B:紫花前胡苷对 MHCC-97H 细胞迁移能力影响。Note:A:The effect of NK on the migration ability of HepG2 cells;B:The effect of NK on the migration ability of MHCC-97H cells.

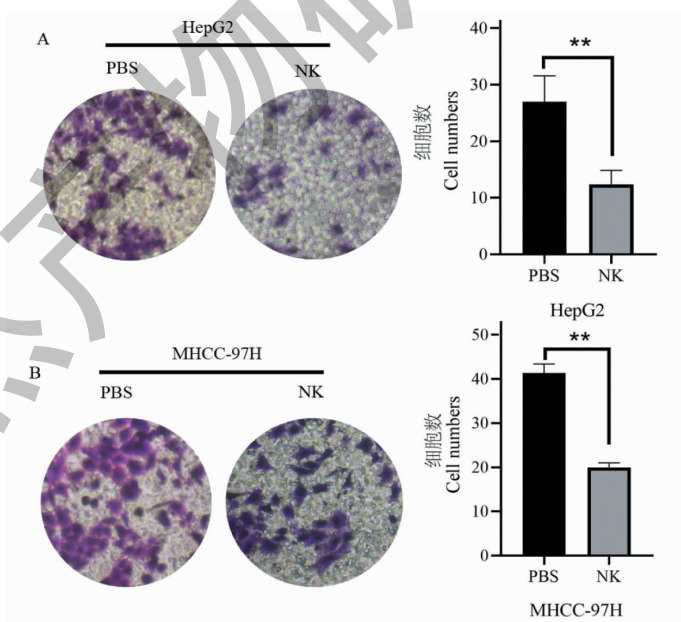


图 3 紫花前胡苷对 HepG2 和 MHCC-97H 细胞侵袭能力的影响

Fig. 3 Effect of NK on the invasion ability of HepG2 and MHCC-97H cells

2.5 紫花前胡苷通过 CXCL5 抑制 ERK/MEK 信号通路激活

CXCL5 的下游调控通路为 ERK/MEK 信号通

路^[6],为了进一步验证紫花前胡苷是否通过 CXCL5 抑制 ERK/MEK 信号通路激活有效抑制肝癌细胞,首先分别 si-RNA 沉默 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中

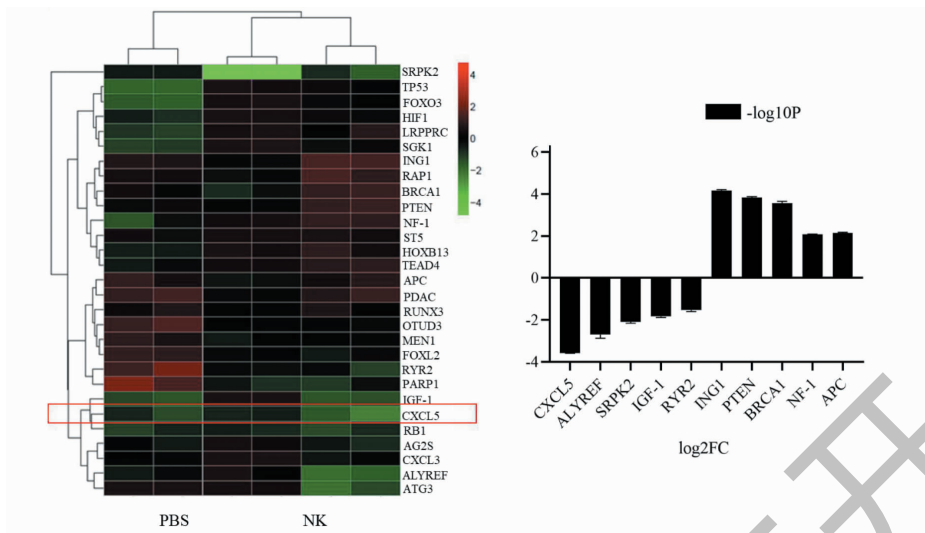


图4 RNA-seq 检测分析紫花前胡苷给药处理 HepG2 细胞后的差异基因

Fig. 4 RNA-seq detection and analysis of the different genes after the treatment of HepG2 cells with the administration of NK

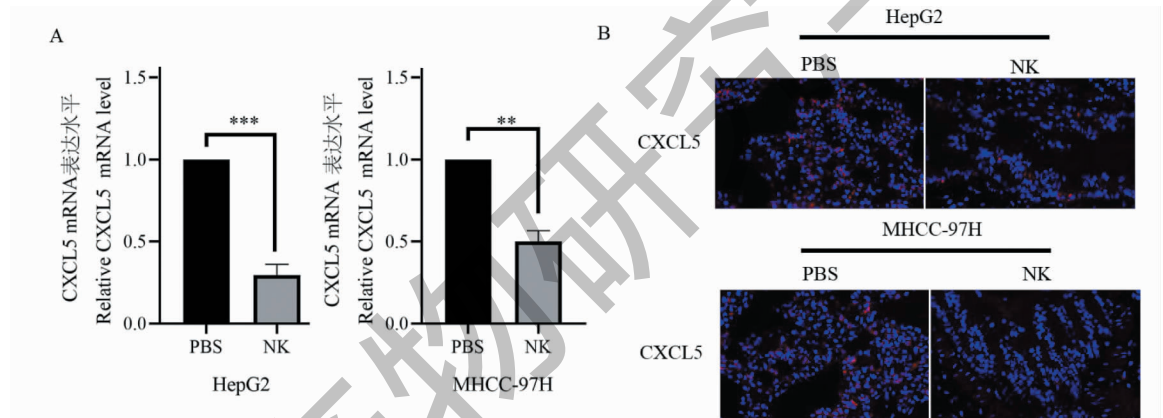


图5 CXCL5 在 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中的表达

Fig. 5 CXCL5 expression in HepG2 and MHCC-97H cells

的 CXCL5 表达,其次 PBS 和 NK 分别处理 HepG2 和 MHCC-97H 细胞未转染组和转染组。结果显示,与 PBS 给药组相比,紫花前胡苷有效抑制 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中 ERK1/2 和 MEK 的磷酸化,而沉默 CXCL5 后紫花前胡苷对 ERK1/2 和 MEK 的磷酸化抑制作用消失(见图 6),说明紫花前胡苷可能是通过 CXCL5 有效抑制 ERK/MEK 信号通路激活。

3 讨论与结论

肝癌已经成为临床常见的一种恶性肿瘤疾病^[7],其发病机制复杂^[8],治疗药物有限,目前临床上中晚期肝癌患者的治疗方法即行手术切除^[9],但是肝癌的高转移特性导致其在体内的高转移性和高复发率,造成患者术后预后差^[3]。有学者提出肝癌患者术后配合一定的药物治疗能够有效延长生存

期^[10]。传统中医药近些年来越来越受到中医药研究者的重视,特别是中药提取的单体有效物质对肿瘤的研究^[11]。本研究中紫花前胡苷是提取自传统中药羌活的一种单体药物^[12],目前紫花前胡苷对肿瘤作用相关研究较少,仅有少量文献报道了紫花前胡苷能够有效抑制宫颈癌细胞的增殖作用^[5]。本科室住院肝癌患者术后均配合“加味益气活血汤”进行一定的预后治疗,此汤剂中即含有中药羌活,因此本研究提出假设:羌活中的有效物质紫花前胡苷是否能够对肝癌发挥抑癌作用,其具体调控机制如何,将是本研究的重点。

本研究首先观察不同浓度紫花前胡苷对肝癌细胞的作用,发现 20 ng/mL 的紫花前胡苷对肝癌细胞 HepG2 和 MHCC-97H 抑制作用最强,说明紫花前胡

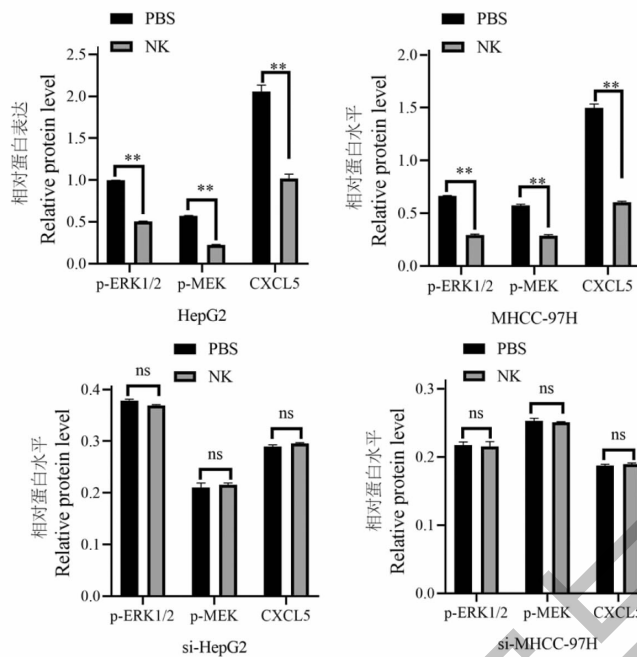


图6 紫花前胡苷给药处理后 ERK/MEK 信号通路相关蛋白的表达量

Fig. 6 The expression of ERK/MEK signal pathway related proteins after administration of NK

苷能够抑制肝癌细胞 HepG2 和 MHCC-97H 的增殖作用,同时克隆形成实验也进一步证明了这一点,这为下一步研究奠定了基础。迁移和侵袭能力是肝癌在体内转移的基础和关键,因此紧接着观察紫花前胡苷对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响,结果紫花前胡苷有效抑制 HepG2 和 MHCC-97H 细胞迁移和侵袭能力,这提示紫花前胡苷能够对肝癌发挥抑癌作用。为了进一步解释和阐明紫花前胡苷发挥抑癌的作用机制,通过 RNA-seq 进行差异基因分析,发现紫花前胡苷给药处理 HepG2 后,经过筛选,发现 CXCL5、ALYREF、SRPK2、IGF-1 和 RYR2 等基因下调位于前列,ING1、PTEN、BRCA1、NF-1 和 APC 等基因上调位于前列,其中 CXCL5 下调倍数最高。CXCL5 是一种上皮来源的中性粒细胞趋化因子,其通过与其特异性受体 CXCR2 结合,激活 ERK/MEK 信号通路促进血管新生,介导肿瘤的生长、浸润和转移。已有研究指出 CXCL5 在肝癌、胃癌、前列腺癌、非小细胞肺癌等肿瘤组织中的表达显著升高^[13],因此本研究接下来重点关注紫花前胡苷对肝癌细胞 CXCL5 的作用,结果发现紫花前胡苷给药处理后显著抑制 CXCL5 在 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中表达,提示紫花前胡苷可能的作用靶分子是 CXCL5。

CXCL5 是一种中性粒细胞来源的趋化因子,其

与肿瘤免疫调节信号密切相关^[14],有研究指出 CXCL5 的下游调控通路为 ERK/MEK 肿瘤免疫信号通路^[6],而 ERK/MEK 肿瘤免疫信号在多种肿瘤发生发展过程中发挥促癌作用^[15],为了进一步阐明紫花前胡苷对肝癌的抑癌机制,观察紫花前胡苷处理后 HepG2 和 MHCC-97H 细胞中 ERK/MEK 肿瘤免疫信号通路的变化,结果发现紫花前胡苷能够显著抑制 ERK 和 MEK 的磷酸化从而抑制 ERK/MEK 信号通路激活,而当 si-RNA 沉默 HepG2 和 MHCC-97H 中 CXCL5 的表达后,紫花前胡苷对 ERK 和 MEK 的磷酸化抑制作用几乎消失,说明紫花前胡苷很可能通过 CXCL5 调控 ERK/MEK 信号通路发挥抑癌作用。

以上研究结果提示紫花前胡苷对肝癌发挥抑癌作用,其可能的作用靶分子是 CXCL5,同时紫花前胡苷能够抑制肝癌细胞中肿瘤免疫信号通路 ERK/MEK 的激活,这些研究都为紫花前胡苷抗肝癌作用提供了一定的研究基础和理论依据。虽然本研究指出紫花前胡苷能够发挥抑癌作用,但是研究是以体外研究为主,接下来我们将进一步研究紫花前胡苷在体内对肝癌的作用,同时重点研究紫花前胡苷是如何调控 CXCL5,着重关注二者在肿瘤免疫方面的具体调控机制。

参考文献

- 1 Anwanwan D, Singh SK, Singh S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1):188314.
 - 2 Sia D, Villanueva A, Friedman SL, et al. Liver cancer cell of origin, molecular class, and effects on patient prognosis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152:745-761.
 - 3 He MK, Li QJ, Zou RH, et al. Sorafenib plus hepatic arterial infusion of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin *vs* sorafenib alone for hepatocellular carcinoma with portal vein invasion: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5:953-960.
 - 4 Hou Z, Ma XX, Yi XC. Imaging efficacy analysis of Yiqi Huoxue Decoction combined with interventional therapy for early primary liver cancer[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2011, 17(17):303-304.
 - 5 Fu Q, Yin JF, Yan AH. Study on the anti-cervical cancer cell effect of jujube glucosides[J]. *Anhui Med Pharm J(安徽医药)*, 2021, 25:858-862.
 - 6 Ruan P, Tan AL. The mechanism of chemokine CXCL5 inhibiting tumor immunity and promoting the deterioration of nasopharyngeal carcinoma by regulating ERK/MAPK signaling pathway[J]. *Chin J Immunol (中国免疫学杂志)*, 2020, 36:2613-2618.
 - 7 Kalasekar SM, Laguna IG, Evason KJ. Immune checkpoint inhibitors in combinations for Hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2021, 73:2591-2593.
 - 8 Torbenson MS. Hepatocellular carcinoma: making sense of morphological heterogeneity, growth patterns, and subtypes[J]. *Hum Pathol*, 2021, 112:86-101.
 - 9 Galle PR, Dufour JF, Markus PR, et al. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Future Oncol*, 2021, 17:1237-1251.
 - 10 Yue YX, Ning SK, Liu JB, et al. Comparative analysis of interventional therapy and combined targeted drug therapy for advanced primary liver cancer[J]. *Chin J Cancer Prev Treat (中华肿瘤防治杂志)*, 2021, 28:788-791.
 - 11 Wang WL, Liu XY, Liu FJ, et al. Review on molecular mechanism of active components from natural products against hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2021, 17:1237-1251.
 - 12 Gong ZH, Duan YQ, Fu XY, et al. Study on the pharmacological effects of Qianghuo[J]. *Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药)*, 2019, 15:192-194.
 - 13 Wang J, Hu T, Wang Q, et al. Repression of the AURKA-CXCL5 axis induces autophagic cell death and Promotes radiosensitivity in non-small-cell lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 509:89-104.
 - 14 Zhang W, Wang HS, Sun MY, et al. CXCL5/CXCR2 axis in tumor microenvironment as potential diagnostic biomarker and therapeutic target[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(2-3):69-80.
 - 15 Barbosa R, Acevedo LA, Marmorstein R. The MEK/ERK network as a therapeutic target in humancancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19:361-374.
- (上接第 1004 页)
- 19 An T, Gong Y, Li X, et al. USP7 inhibitor P5091 inhibits Wnt signaling and colorectal tumor growth[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 131:29-39.
 - 20 Bugter JM, Fenderico N, Maurice MM. Mutations and mechanisms of Wnt pathway tumour suppressors in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(1):5-21.
 - 21 Grandori C, Cowley SM, James LP, et al. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16:653-99.
 - 22 Elbadawy M, Usui T, Yamawaki H, et al. Emerging roles of c-Myc in cancer stem cell-related signaling and resistance to cancer chemotherapy: a potential therapeutic target against colorectal cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):23-40.
 - 23 Ren L, Zhou T, Wang Y, et al. RNF8 induces beta-catenin-mediated c-Myc expression and promotes colon cancer proliferation[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16:2051-2062.