

【临床研究】

通信作者:谢裕安(1964-),男,广西贵港人,博士,教授,研究方向:肿瘤免疫与基因治疗;E-mail:gxxya@aliyun.com。

of GT genotype in group B; and there were 23 cases of GG genotype, 2 cases of TT genotype and 15 cases of GT genotype in group C. There was no significant difference in the distribution frequency of G and T alleles at rs1406 (G/T) locus of CCNE1 gene between the group A and group B ($P > 0.05$). There was significant difference in the distribution frequency of G and T alleles at rs1406 (G/T) locus of CCNE1 gene between the group (A + B) and group C (odd ratio = 3.639, 95% confidence interval was 1.533 – 8.637, $P < 0.05$). **Conclusion** The rs1406 (T) of CCNE1 gene is the risk genotype for hepatocellular carcinoma in Zhuang people in Fusui County, Guangxi province.

Key words: hepatocellular carcinoma; cyclin E1; single nucleotide polymorphism; genetic susceptibility

肝癌是严重影响人类生命健康的恶性肿瘤, 中国 2014 年统计的数据显示, 肝癌在新发恶性肿瘤中的比例及病死率均位居第 2 位, 西部地区肝癌发病人数、死亡人数最高^[1]。广西扶绥县是肝癌高发区, 2009 年数据显示, 扶绥县肝癌粗发病率达 69.99/10 万, 是全国平均水平的 2.44 倍, 有明显的家族聚集性^[2]。在原发性肝癌中, 肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是主要类型, 占 70% ~ 90%^[3]。HCC 的发生与遗传因素有较大关系, 米登海等^[4]研究显示, 遗传因素对 HCC 发病的贡献权重达 60%。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 在人群中具有最大的数量和最广泛的分布, 且易于分型, 是目前进行遗传变异与复杂性状研究中最重要研究对象^[5]。SNP 位点数量众多, 标签 SNP 是一套简化的 SNP, 集中了一定区域内的相关连锁不平衡, 可以减少所需研究的 SNP 的数量。为了便于进行功能验证, 可通过功能预测软件筛选出影响基因功能的标签 SNP 位点进行研究。细胞周期调控对于细胞正常的生理功能至关重要, 细胞分化与凋亡异常可导致不正常的细胞增殖, 与肿瘤发生密切相关。G₁/S 期细胞周期检查点控制着真核细胞是否通过 G₁ 期进入 DNA 合成 S 期。细胞周期蛋白 E1 (cyclin E1, CCNE1) 与周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinases 2, CDK2) 共同协作可加速细胞由 G₁ 期进入 S 期, 促进细胞增殖^[6], 在正常的细胞周期中, CCNE1 是 G₁/S 期转变的主要调节蛋白, CCNE1 表达水平被严格控制, 其表达失常可导致细胞生长失控, 与恶性肿瘤的发生密切相关^[7]。CCNE1 在结直肠癌^[8]、胃癌^[9]、肺癌^[10]等多种肿瘤中过表达, 并可作为治疗的靶点。也有研究发现, CCNE1 在 HCC 中表达上调, 与 HCC 的发生、发展及预后有关^[11-17], 约 70% 的预后不良的 HCC 患者存在 CCNE1 过表达^[18]。CCNE1 遗传多态性与 HCC 的关系尚未见有相关研究。本课题组前期生物信息学分析发现, CCNE1 的 rs1406 (G/T) 位点所在序列是 hsa-miR-299-3P 的结合部位, rs1406 (T) 基因型会阻止 hsa-miR-299-3P 结合 CC-

NE1 的 mRNA, 从而影响 CCNE1 的表达, 因此, 本研究采用病例-对照研究探讨广西扶绥壮族人群 rs1406 (G/T) 位点多态性与 HCC 高发家系遗传易感性的关系, 为分析广西扶绥县壮族人群 HCC 的高发原因、早期诊断及预防提供帮助。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采用病例-对照研究, 选择广西扶绥县壮族 HCC 高发家系和正常家系为研究对象。HCC 高发家系是指在连续 3 代有血缘的亲属中, 每代出现过至少 2 例 HCC 患者 (含先证者) 的家族。HCC 高发家系共 79 例, 壮族, 男 45 例, 女 34 例; 年龄 16 ~ 86 岁, 中位年龄 44 岁; 乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HbsAg) 阳性 50 例, 甲胎蛋白 (alpha fetoprotein, AFP) 阳性 14 例; 每日吸烟 ≥ 10 支 17 例, 饮酒每日 ≥ 100 g 64 例。将 HCC 高发家系分为 A 组 ($n = 20$) 和 B 组 ($n = 59$)。A 组为 2003 年 1 月至 2011 年 10 月在广西医科大学附属肿瘤医院进行外科手术治疗, 术后病理诊断为 HCC 者 (先证者), 患者术前未经放射、化学药物或生物治疗; B 组为 HCC 高发家系核心成员 (先证者亲属), HCC 高发家系核心成员是指 HCC 患者的一级亲属 (先证者的父母、子女、兄弟姐妹) 与二级亲属 (除一级亲属外与先证者有血缘关系的亲属, 如叔伯、堂兄弟、堂姐妹)。选择 10 个正常家系 (共 40 例) 作为对照 (C 组), 其中男 26 例, 女 14 例; 年龄 16 ~ 85 岁, 中位年龄 47 岁; 每日吸烟 ≥ 10 支 15 例, 每日饮酒 ≥ 100 g 17 例; 均为广西扶绥县医院体检健康者, 与肝癌家系各成员无血缘关系, 无肝炎病史, 肿瘤病史及遗传病史。3 组成员的年龄、性别比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。本研究经医院伦理委员会批准, 且所有研究对象签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器 血液、细胞、组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 购自北京天根生物科技有限公司; Iplex Gold Reagent Kit 购自美国 SEQUENOM 公司; 使用美国 Sequenom 公司 Genotyping Tools 及 MassARRAY Assay Design 软件设计待测 SNP 位点的聚合酶链

式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增引物及单碱基延伸引物,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成;MT09 质谱仪购自美国 SEQUENOM 公司,384 孔双头 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 标本采集 A 组患者术中取癌组织约 5 g, -80 ℃分装保存于广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部标本中心;B 组、C 组人群抽取外周静脉血 5 mL,置于乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)抗凝管中,摇匀,-80 ℃分装保存于广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部标本中心。

1.4 DNA 提取 A 组患者癌组织标本和 B 组、C 组受试者全血标本均按 DNA 提取试剂盒的流程提取 DNA,经 NanoDrop 2000 测定,所提取 DNA 在 260 nm 和 280 nm 波长处的吸光度比值为 1.70~2.08,浓度为 13.2~87.5 mg·L⁻¹,DNA 纯度合格。

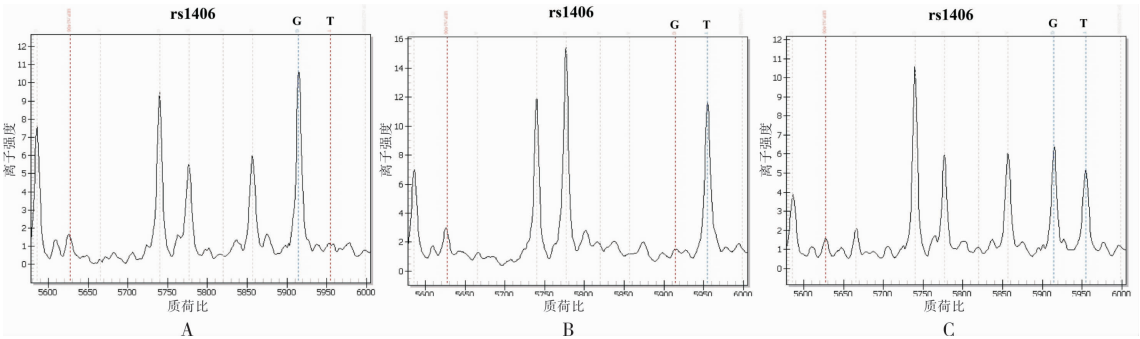
1.5 基因分型 采用美国 SEQUENOM 实验平台的基质辅助激光解吸附电离飞行时间质谱分析技术(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight,MALDI-TOF)对样品 DNA 进行 SNP 检测。使用 Typer4.0 软件分析实验数据,获得基因分型结果。引物设计及合成:使用 Sequenom 公司 Genotyping Tools 及 MassARRAY Assay design 软件设计待测 rs1406(G/T)位点的 2 条 PCR 扩增引物和 1 条延伸引物。rs1406(G/T)扩增上游引物序列为 5'-ACGTTGGATGCAAAGGCATTGTACACTGTC-3',下游引物序列为 5'-ACGTTGGATGCGTTGTGCAGAGC-CCATAG-3';延伸引物序列为 5'-ACTGATAATGTG-GAGAGG(G/T)-3',并交由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。SNP 等位基因分析:使用热启动 Taq 酶,常规扩增待测片段,每个反应体系总体积为

5 μL,94 ℃预变性 15 s;94 ℃变性 20 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,循环 45 次;72 ℃延伸 180 s。反应结束后,取 5 μL PCR 产物加入 2 μL(0.5 U)虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase,SAP)以去除体系中游离的脱氧核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphates, dNTP),反应条件:37 ℃,40 min;85 ℃,5 min。SAP 处理结束后,取 7 μL 反应液加入 2 μL 单碱基延伸反应液(按 Iplex Gold Reagent Kit 说明书配制)进行单碱基延伸反应。反应结束后树脂除盐纯化。将样品转移至 SpectroCHIP 芯片后,放入质谱仪进行检测^[19]。SNP 结果分析与处理:根据引物延伸反应产物质谱峰的位置确定其分子质量,从而得出 SNP 分型结果。若位点是纯合子,则仅有 1 个等位基因峰;若为杂合子,则有 2 个等位基因峰。

1.6 统计学处理 应用 V 1.07 版 PLINK 软件进行遗传关联分析。根据 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律进行吻合度检验;采用 χ^2 检验分析各家系人群基因型分布频率的差异,计算比值比(odd retio,OR)、双侧 95% 可信区间(confidence interval,CI);检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CCNE1 rs1406(G/T)基因分型结果 结果见图 1。rs1406(G/T)位点存在 GG、TT、GT 3 种基因型,其中 A 组 20 例标本中 GG 基因型 3 例、TT 基因型 3 例、GT 基因型 14 例;B 组 59 例标本中 GG 基因型 14 例、TT 基因型 14 例、GT 基因型 31 例;C 组 40 例标本中 GG 基因型 23 例、TT 基因型 2 例、GT 基因型 15 例。



A:GG 基因型;B:TT 基因型;C:GT 基因型。

图 1 CCNE1 rs1406 基因分型

Fig.1 Genotype of rs1406 in CCNE1 gene

2.2 CCNE1 rs1406 (G/T) 基因型频率吻合度检验 结果见表 1。A、B、C 组 rs1406 (G/T) 位点 GG、GT 和 TT 基因型频率的观察值与期望值符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律 ($P > 0.05$),说明样本具有良好的群体代表性。

表 1 CCNE1 基因 rs1406 (G/T) 位点基因型 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验

Tab.1 Hardy-Weinberg equilibrium test for genotype frequencies of rs1406 (G/T) locus in CCNE1 gene

组别	<i>n</i>	实际值	期望值	χ^2	<i>P</i>
A 组	20				
GG		3.0	5.0	3.200	0.074
GT		14.0	10.0		
TT		3.0	5.0		
B 组	59				
GG		14.0	14.8	0.153	0.696
GT		31.0	29.5		
TT		14.0	14.8		
C 组	40				
GG		23.0	23.3	0.050	0.822
GT		15.0	14.5		
TT		2.0	2.3		

2.3 CCNE1 rs1406 (G/T) 位点变异与 HCC 的相关性 结果见表 2。在校正性别、年龄、吸烟、饮酒、HBsAg、AFP 等因素后发现,在 CCNE1 rs1406 (G/T) 位点上 A 组与 B 组人群之间 G、T 分布频次比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。A 组与 B 组同属 HCC 高发家系人群,且 rs1406 (G/T) 位点上 2 组分布频率差异无统计学意义,将 A 组与 B 组人群 rs1406 (G/T) 分布频次合并后 (A + B 组) 与 C 组人群 rs1406 (G/T) 分布频次进行比较, A + B 组与 C 组人群 rs1406 (G/T) 等位基因 G、T 分布频率比较差异有统计学意义 ($OR = 3.639, 95\% CI: 1.533 \sim 8.637, P < 0.05$),判断 rs1406 (T) 为 HCC 发生的风险基因型。

表 2 各组 CCNE1 基因 rs1406 等位基因比较

Tab.2 Comparison of the allele of rs1406 of CCNE1 gene in each group

分组	等位基因	
	G/频次 (%)	T/频次 (%)
A 组	20 (50.0)	20 (50.0)
B 组	59 (50.0)	59 (50.0)
C 组	61 (76.3)	19 (23.7)
A + B 组	79 (50.0) ^a	79 (50.0) ^a

注:与 C 组比较^a $P < 0.05$ 。

3 讨论

广西扶绥县壮族人群 HCC 的发生与遗传易感性有关。CCNE1 基因 rs1406 (G/T) 位点上存在差

异,G 是 rs1406 祖先型等位基因,T 是新生型等位基因。CCNE1 基因上的 rs1406 (T) 基因型是广西扶绥县壮族人群 HCC 发生的危险因素。可能的原因是 CCNE1 基因上 rs1406 (G/T) 位点所在的序列表达的 mRNA (UCCCCCGAC [G] GGAGAGGUGUAA) 是 hsa-miR-299-3P 结合部位,rs1406 位点的突变 (G 变为 T),则可能导致 hsa-miR-299-3P 无法与该 mRNA 结合。目前,较多学者对 hsa-miR-299-3P 与肿瘤发生、发展的关系进行了研究,如 hsa-miR-299-3P 表达减少与甲状腺癌的发生有关^[20];在结肠癌中 hsa-miR-299-3P 通过抑制血管内皮生长因子 A 基因表达,从而抑制结肠癌细胞的增殖与侵袭,hsa-miR-299-3P 与结肠癌的发生呈负相关^[21];hsa-miR-299-3P 表达下调使 ATP 结合盒 E1 蛋白表达增加,导致肺癌细胞产生耐药性^[22];hsa-miR-299-3P 在肾透明细胞癌中表达下调^[23]。以上研究结果提示,hsa-miR-299-3P 主要起抑制肿瘤发生、发展的作用,是肿瘤抑制 microRNA。

CCNE 表达上调与 HCC 的发生密切相关^[24],其中 CCNE1 是最重要的促进 HCC 细胞周期中 G₁ 期向 S 期转变的因素^[7],CCNE1 与 CDK2 结合后引起下游底物的磷酸化,从而控制 DNA 的复制起始与 S 期的其他活动,CCNE1 持续高表达会导致细胞基因组的不稳定,通过加速细胞分裂促进肿瘤的形成^[25]。CCNE1 可作为 HCC 治疗的一个靶点,在一项利用 HepG2/C3A 细胞系进行的药物实验中发现,降低 CCNE1 水平可使 HCC 细胞停在 G₁ 期,从而抑制 HCC 细胞生长与增殖^[26]。HCC 的发生与慢性肝损伤及肝硬化有密切关系,研究发现,CCNE1 在肝细胞纤维化过程中可以激活肝星形细胞并维持其增殖,敲除 CCNE1 基因后,可以避免 CCl₄ 介导的肝纤维化^[27]。通过 miR-34 的介导,CCNE1 还可以与 p53 相互调节表达,CCNE1 敲除后,p53 表达增加;阻断 p53 后,CCNE1 表达增加^[28]。在 HCC 动物实验中发现,敲除 CCNE1 后瘤数量减少,瘤体积缩小,作为 HCC 早期分子标志物的热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 表达减少,CCNE1 表达增加对于 HCC 的起始与发展是必需的^[18]。多种因素可以上调 CCNE1 的表达从而促进 HCC 的发生,如长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) DBH-AS1 可以诱导 CCNE1 表达上调,从而加速细胞生长,促进 HCC 的发生。MicroRNAs 在基因转录后调控中起关键作用,miR-195 与 miR-497 表达

下调可使其靶基因 CCNE1 表达上调,促进 HCC 的发生^[29]。MiR-7 过表达后,CCNE1 表达减少使细胞周期停在 G₁ 期,可以抑制 HCC 的增殖与侵袭^[30]。在 HepG2 肝癌细胞中转录因子 E2F3b 可以转录激活 CCNE1 的表达^[11]。在儿童 HCC 病例中发现,Hippo 通路中的转录辅助因子 Yes 相关蛋白可通过增加其下游基因 CCNE1 表达,促进 HCC 的发生^[31]。本研究通过生物信息学分析发现,hsa-miR-299-3P 可结合 CCNE1 的 mRNA,推测其可抑制 CCNE1 蛋白表达,延迟细胞周期中的 G₁/S 期的转换,从而抑制细胞增殖,避免细胞恶性转化。hsa-miR-299-3P 调控 CCNE1 基因表达时需要结合在包含 rs1406(G)的序列上,而 HCC 高发家系中有更多个体此位点的碱基是 rs1406(T),这种变化导致 hsa-miR-299-3P 无法正常结合到 CCNE1 基因的 mRNA 上,无法对 CCNE1 进行转录后的表达负调控,CCNE1 表达失去控制,表达量增加,随之细胞周期中 G₁/S 期转换异常,细胞分裂加速,细胞生长失去控制,使具有 rs1406(T)位点的个体更易罹患 HCC。

本研究样本有限,CCNE1 的 rs1406(T)是 HCC 发生的危险因素这个结果仍需扩大样本在不同地域及人群中观察验证。同时下一步工作可通过单碱基基因编辑的方法在细胞及小鼠的层面上构建 rs1406(T)的模型,验证 rs1406(T)基因型与 HCC 的关系。

参考文献:

[1] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2018,27(1):1-14.

[2] 何明荣. 广西扶绥县 2009 年恶性肿瘤发病分析[J]. 中国肿瘤,2013(12):1001-1005.

[3] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics,2012[J]. *CA Cancer J Clin*,2015,65(2):87-108.

[4] 米登海,罗好曾,陈学鹏,等. 肝癌遗传模式与危险因素病例-对照研究[J]. 中国公共卫生,2006(7):849-850.

[5] SYVANEN A C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. *Nat Rev Genet*,2001,2(12):930-942.

[6] ZSCHEMISCH N H, LIEDTKE C, DIERSSEN U, *et al.* Expression of a cyclin E1 isoform in mice is correlated with the quiescent cell cycle status of hepatocytes in vivo[J]. *Hepatology*,2006,44(1):164-173.

[7] JIANG W, HUANG H, DING L, *et al.* Regulation of cell cycle of hepatocellular carcinoma by NF90 through modulation of cyclin E1 mRNA stability[J]. *Oncogene*,2015,34(34):4460-4470.

[8] CHEN M J, CHENG A C, LEE M F, *et al.* Simvastatin induces G1 arrest by up-regulating GSK3beta and down-regulating CDK4/cyclin

D1 and CDK2/cyclin E1 in human primary colorectal cancer cells [J]. *J Cell Physiol*,2018,233(6):4618-4625.

[9] OOI A, OYAMA T, NAKAMURA R, *et al.* Gene amplification of CCNE1, CCND1, and CDK6 in gastric cancers detected by multiplex ligation-dependent probe amplification and fluorescence in situ hybridization[J]. *Hum Pathol*,2017,61:58-67.

[10] YAO Y, LUO J, SUN Q, *et al.* HOXC13 promotes proliferation of lung adenocarcinoma via modulation of CCND1 and CCNE1[J]. *Am J Cancer Res*,2017,7(9):1820-1834.

[11] LU Y, LI W. Functional characterization of E2F3b in human HepG2 liver cancer cell line[J]. *J Cell Biochem*,2018,119(4):3429-3439.

[12] YANG H, ZHANG X, CAI X Y, *et al.* From big data to diagnosis and prognosis: gene expression signatures in liver hepatocellular carcinoma[J]. *Peer J*,2017,5(10):e3089.

[13] LEFKOWITCH J H, LAGANA S M, KATO T. Hepatocellular carcinoma in noncirrhotic liver with glycogenotic foci; basic science meets genomic medicine[J]. *Semin Liver Dis*,2015,35(4):450-456.

[14] GABA R C, GROTH J V, PARVINIAN A, *et al.* Gene expression in hepatocellular carcinoma: pilot study of potential transarterial chemoembolization response biomarkers[J]. *J Vasc Interv Radiol*,2015,26(5):723-732.

[15] LI W, ZENG X, LEE N P, *et al.* HIVID: an efficient method to detect HBV integration using low coverage sequencing [J]. *Genomics*,2013,102(4):338-344.

[16] 祝葆华,王兰天,李涛,等. HBsAg 阳性肝癌细胞基因组中 HBx 相关整合位点的探讨[J]. 中华肝病杂志,2012,20(6):468-471.

[17] SUNG W K, ZHENG H, LI S, *et al.* Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*,2012,44(7):765-769.

[18] EHEDEGO H, MOHS A, JANSEN B, *et al.* Loss of cyclin E1 attenuates hepatitis and hepatocarcinogenesis in a mouse model of chronic liver injury[J]. *Oncogene*,2018,37(25):3329-3339.

[19] 赵辉,王威,张清润,等. 高通量飞行时间质谱基因分型方法的研究[J]. 生物化学与生物物理进展,2005(7):667-672.

[20] LIU X, HE M, HOU Y, *et al.* Expression profiles of microRNAs and their target genes in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncol Rep*,2013,29(4):1415-1420.

[21] WANG J Y, JIANG J B, LI Y, *et al.* MicroRNA-299-3p suppresses proliferation and invasion by targeting VEGFA in human colon carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,93:1047-1054.

[22] ZHENG D, DAI Y, WANG S, *et al.* MicroRNA-299-3p promotes the sensibility of lung cancer to doxorubicin through directly targeting ABCE1[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(9):10072-10081.

[23] HE H, WANG L, ZHOU W, *et al.* MicroRNA expression profiling in clear cell renal cell carcinoma: identification and functional validation of key miRNAs [J]. *PLoS One*,2015,10(5):e125672.

ology and clinical characteristics in patients with nontraumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Res Med Sci*,2017,22(1):1-6.

[3] ZHAO D W, YU M, HU K, *et al.* Prevalence of nontraumatic osteonecrosis of the femoral head and its associated risk factors in the chinese population: results from a nationally representative survey [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2015, 128(21):2843-2850.

[4] SADILE F, BERNASCONI A, RUSSO S, *et al.* Core decompression versus other joint preserving treatments for osteonecrosis of the femoral head: a meta-analysis [J]. *Br Med Bull*, 2016, 118(1):33-49.

[5] PIERCE T P, JAUREGUI J J, ELMALLAH R K, *et al.* A current review of core decompression in the treatment of osteonecrosis of the femoral head [J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2015, 8(3):228-232.

[6] SHAH S N, KAPOOR C S, JHAVERI M R, *et al.* Analysis of outcome of avascular necrosis of femoral head treated by core decompression and bone grafting [J]. *J Clin Orthop Trauma*, 2015, 6(3):160-166.

[7] MIAO H, YE D, LIANG W, *et al.* Effect of osteonecrosis intervention rod versus core decompression using multiple small drill holes on early stages of necrosis of the femoral head: a prospective study on a series of 60 patients with a minimum 1-year-follow-up [J]. *Open Orthop J*, 2015, 9(1):179-184.

[8] 季卫锋, 丁伟航, 马镇川, 等. 三通道髓芯钻孔减压加 DBM、自体骨髓干细胞治疗早期股骨头坏死 [J]. *中国骨伤*, 2008, 21(10):776-778.

[9] 孙景东, 卢云, 陈文, 等. 微创开窗打压植骨联合细针钻孔减压治疗塌陷前期股骨头坏死 [J]. *骨科*, 2014, 5(4):206-210.

[10] 郑召民, 崔力扬. 髓芯减压术治疗成人股骨头坏死 [J]. *中国骨与关节杂志*, 2005, 4(2):117-119.

[11] 蔡振基, 邹国东, 刘俊波, 等. 微创减压加打压植骨治疗股骨头坏死的临床应用研究 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(56):30-33.

[12] ZALAVRAS C G, LIEBERMAN J R. Osteonecrosis of the femoral head: evaluation and treatment [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2014, 22(7):455-464.

[13] FERNÁNDEZFAIREN M, MURCIA A, IGLESIAS R, *et al.* Osteointegration of porous tantalum stems implanted in avascular necrosis of the hip [J]. *Acta Ortop Mex*, 2008, 22(4):215-221.

[14] VARITIMIDIS S E, DIMITROULIAS A P, KARACHALIOS T S, *et al.* Outcome after tantalum rod implantation for treatment of femoral head osteonecrosis [J]. *Acta Orthop*, 2009, 80(1):20-25.

[15] TANZER M, BOBYN J D, KRYGIER J J, *et al.* Histopathologic retrieval analysis of clinically failed porous tantalum osteonecrosis implants [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90(6):1282-1289.

[16] 毛文文, 茹江英. 羟基磷灰石类陶瓷在骨组织工程中的研究与更广泛应用 [J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(30):4855-4863.

[17] 鲁亚杰, 王臻, 卢霄, 等. 生物陶瓷系统微创治疗 ARCO II、Ⅲ期股骨头坏死 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2019(10):1291-1298.

[18] LI X, ZHAO Y, BING Y, *et al.* Biotemplated syntheses of macroporous materials for bone tissue engineering scaffolds and experiments *in vitro* and *vivo* [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2013, 5(12):5557-5562.

[19] CHEN Z, WU C, YUEN J, *et al.* Influence of osteocytes in the *in vitro* and *in vivo* β -tricalcium phosphate-stimulated osteogenesis [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2014, 102(8):2813-2823.

[20] 李博. β -磷酸三钙生物陶瓷棒系统治疗早期股骨头坏死的临床观察与生物力学研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2017.

[21] LU Y, LU X, LI M, *et al.* Minimally invasive treatment for osteonecrosis of the femoral head with angi conductive bioceramic rod [J]. *Int Orthop*, 2018, 42(4):1567-1573.

(本文编辑: 孟 月)

(上接第 341 页)

[24] JUNG Y J, LEE K H, CHOI D W, *et al.* Reciprocal expressions of cyclin E and cyclin D1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2001, 168(1):57-63.

[25] SPRUCK C H, WON K A, REED S I. Deregulated cyclin E induces chromosome instability [J]. *Nature*, 1999, 401(6750):297-300.

[26] BIAZI B I, ZANETTI T A, BARANOSKI A, *et al.* Cis-nerolidol induces endoplasmic reticulum stress and cell death in human hepatocellular carcinoma cells through extensive CYP2C19 and CYP1A2 oxidation [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017, 121(4):334-341.

[27] NEVZOROVA Y A, BANGEN J M, HU W, *et al.* Cyclin E1 controls proliferation of hepatic stellate cells and is essential for liver fibrogenesis in mice [J]. *Hepatology*, 2012, 56(3):1140-1149.

[28] POK S, WEN V, SHACKEL N, *et al.* Cyclin E facilitates dysplastic hepatocytes to bypass G₁/S checkpoint in hepatocarcinogenesis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(9):1545-1554.

[29] FURUTA M, KOZAKI K, TANIMOTO K, *et al.* The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e60155.

[30] ZHANG X, HU S, ZHANG X, *et al.* MicroRNA-7 arrests cell cycle in G1 phase by directly targeting CCNE1 in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(3):1078-1084.

[31] LAQUAGLIA M J, GRIJALVA J L, MUELLER K A, *et al.* YAP subcellular localization and hippo pathway transcriptome analysis in pediatric hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:30238.

(本文编辑: 孟 月)