

干扰 CD147 表达抑制白血病 细胞 SHI-1 增殖及移行

涂燕^{1,2}, 李振江¹, 汤爱平¹, 费妍¹, 李慧慧¹, 李剑¹, 贺文凤¹

(1. 南昌大学第二附属医院血液科 江西省血液重点实验室, 江西 南昌 330006;

2. 浙江大学金华医院血液科, 浙江 金华 321000)

摘要:目的 构建针对细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(CD147)的慢病毒干扰载体,探讨干扰CD147表达后对白血病细胞系 SHI-1 细胞体外增殖、侵袭、转移能力的影响。方法 设计针对CD147的干扰序列片段,构建于慢病毒载体 pGCSIL-GFP 上,重组慢病毒载体与包装载体共转染 293T 细胞,收集病毒上清,测定病毒滴度。病毒上清感染 SHI-1 细胞,RT-PCR 法检测 CD147、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达,Western blotting 法检测 CD147 蛋白水平;MTT 法检测细胞体外增殖能力,体外 SHI-1 细胞与骨髓基质细胞共培养跨 Matrigel 基质胶检测 SHI-1 细胞的体外侵袭能力。结果 成功构建慢病毒干扰载体,获得重组慢病毒,滴度达 1×10^9 TU/mL。病毒感染 SHI-1 细胞后,SHI-1/CD147i 细胞的 CD147 mRNA 较感染阴性对照病毒的 SHI-1/NC 细胞下调 86.7%,CD147 蛋白表达下降 91%,SHI-1/CD147i 细胞 MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达较 SHI-1/NC 细胞分别下降 78.3% 和 70.6%。SHI-1/CD147i 细胞体外增殖能力较 SHI-1/NC 及 SHI-1 细胞明显下降;与骨髓基质细胞共培养 24 h 后,SHI-1、SHI-1/NC、SHI-1/CD147i 细胞移行至 Transwell 下层的细胞占接种细胞数比例分别为 $(18.2 \pm 2.5)\%$ 、 $(16.5 \pm 2.7)\%$ 、 $(4.5 \pm 1.2)\%$,SHI-1/CD147 细胞移行能力显著低于 SHI-1 和 SHI-1/NC 细胞。结论 干扰 SHI-1 细胞的 CD147 表达后,通过下调 MMPs 表达抑制 SHI-1 细胞体内外增殖及移行能力,CD147 可能成为治疗急性白血病的靶点。**关键词:**急性单核细胞白血病细胞株;细胞外基质金属蛋白酶诱导因子;RNA 干扰;基质金属蛋白酶;细胞增殖;细胞移行

中图分类号:R733.7

文献标志码:A

RNAi-mediated silencing of CD147 inhibits the proliferation and invasion of leukemic cells SHI-1

TU Yan^{1,2}, LI Zhenjiang¹, TANG Aiping¹, FEI Yan¹, LI Huihui¹, LI Jian¹, HE Wenfeng¹

(1. Department of Hematology, Second Hospital Affiliated to Nanchang University, Key Laboratory of Hematology in Jiangxi Province, Nanchang 330006, Jiangxi, China;

2. Department of Hematology, Jinhua Hospital of Zhejiang University, Jinhua 321000, Zhejiang, China)

Abstract: Objective To construct lentivirus vector for RNA interference (RNAi) targeting extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and to investigate the role of CD147 gene on the proliferation and infiltration of a human monocytic leukemic cell line SHI-1. **Methods** The complementary shRNA targeting CD147 was synthesized, and connected with pGCSIL-GFP vector. The 293T cells were transfected with recombinant viral vector, packing plasmid pHelper 1.0 and pHelper 2.0 using Lipfectamine 2000. Then the recombinant lentiviruses were collected and infected the SHI-1 cells. The expressions of CD147, MMP-2 and MMP-9 in SHI-1 cells were detected by real time PCR. The protein

of CD147 was detected by Western blotting. The capability of proliferation and infiltration of SHI-1 cell were examined by MTT and trans-matrigel invasion assay co-cultured with leukemia BMSCs *in vitro*. **Results** The lentivirus containing the CD147 shRNA was constructed successfully. The titer of recombinant virus was 1×10^9 TU/mL. The mRNA and protein of CD147 in SHI-1/CD147i cells decreased by 86.7% and 91% respectively after the SHI-1 cells were infected by the lentivirus containing the CD147 siRNA. The proliferation capability of SHI-1/CD147i cells significantly decreased compared with that of SHI-1 and SHI-1/NC cells. The mRNA expressions of MMP-2 and MMP-9 in SHI-1/CD147i cells were significantly lower than that in SHI-1/NC and SHI-1 cells. The SHI-1/CD147i cells demonstrated significantly lower invasion rate than SHI-1 cells and SHI-1/NC cells when co-cultured with BMSCs. **Conclusion** CD147 plays important roles in the leukemia cell proliferation and infiltration. CD147 should be a potential target for the treatment of acute leukemia.

Key words: Acute monocytic leukemia cell line; Extracellular matrix metalloproteinase inducer; RNA interference; matrix metalloproteinase; Cell proliferation; Cell invasion

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN 或 CD147),是一种单链跨膜糖蛋白,具有多种生物学功能,在肿瘤组织中能诱导基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的分泌,直接参与了肿瘤的转移等过程^[1-2]。白血病及骨髓造血微环境中的骨髓基质细胞均表达有 CD147,而 CD147 功能阻断抗体能有效抑制白血病细胞体外移行能力^[3],有关 CD147 在急性髓细胞白血病中的作用尚需进一步研究。本研究构建了针对 CD147 的慢病毒干扰载体,干扰其在人急性单核细胞性白血病细胞株 SHI-1 细胞中的表达,探讨 CD147 在 SHI-1 细胞体外增殖及移行能力中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 SHI-1 细胞株由江苏省血液研究所薛永权教授惠赠,胎牛血清及 IMDM 培养基购自美国 Gibco 公司, Trizol 及 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, Age I 和 EcoR I 限制性内切酶、总 RNA 逆转录试剂盒及实时定量 PCR 检测试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司 7300 型, PCR 引物及 shRNA 寡核苷酸片段由上海生物工程有限公司合成, 兔抗人 CD147 及 GAPDH 抗体购自美国 Santa 公司, Matrigel 基质胶购自美国 R&D 公司, Millicell 小室购自美国 Millipore 公司, DNA 回收试剂盒购自美国 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒干扰载体的构建

1.2.1.1 shRNA 片段的设计 依据 RNA 干扰(RNAi)序列设计原则选择针对 CD147 基因的干扰序列 GTCGTCAGAACACATCAACT, 根据慢病毒

载体上的多克隆位点设计并合成其 shRNA 寡核苷酸片段, 正义链: CCGGAAGTCGTCAGAACACATCAACTTTCAAGAGAAGTTGATGTGTTCTGACGACTTTTTTTT; 反义链: AATTCAAAAAAGTCGTCAGAACACATCAACTTCTCTTGAAAGTTGATGTGTTCTGACGACTT, 经退火形成双链 DNA。同时设计阴性对照序列, 构建重组慢病毒。

1.2.1.2 重组载体构建 用限制性内切酶 Age I 和 EcoR I 双酶切使 pGCSIL-GFP 载体线性化, 酶切产物经 1% 琼脂糖电泳, 线性化载体片段用 DNA 回收试剂盒纯化回收, 纯化的载体与双链 DNA 经 T4 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 TG1, 转化后的 TG1 均匀涂布于含氨苄青霉素的琼脂平板上, 37 °C 培养过夜。

1.2.1.3 阳性克隆 PCR 及测序鉴定 取少量转化产物长出的细菌, 溶于 10 μ L LB 培养基中, 混匀取 1 μ L 作为模板; 引物正义链: 5'-CCTATTTCCATGATTCCTCATA-3', 反义链: 5'-GTAATA-CGGTTATCCACGCG-3', PCR 反应条件如下: 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 30 次; 72 °C 延伸 6 min, PCR 产物于 1% 琼脂糖电泳, 挑选阳性克隆测序验证。

1.2.1.4 慢病毒包装 取测序正确的慢病毒载体 20 μ g, pHelper1.0 载体 15 μ g, pHelper 2.0 载体 10 μ g 及 100 μ L Lipofectamine 2000 混合, 形成转染复合物, 将转染复合物转移至 293T 细胞培养液中, 混匀, 培养 8 h 后弃去含有转染复合物的培养基, 加入含 10% 血清培养基培养, 48 h 后收集 293T 细胞上清液, 离心收集病毒上清, -80 °C 保存。

1.2.1.5 慢病毒滴度测定 将 293T 细胞接种于 96 孔板中, 4×10^4 个/孔细胞, 体积 100 μ L, 将病毒上清 10 倍倍比稀释, 吸取 96 孔板中培养基 90 μ L, 加入稀释好的病毒 90 μ L 培养 24 h, 加入完全培养

基 100 μL , 4 d 后在荧光倒置显微镜计数绿色荧光的细胞数, 将得到的数值除以相应的病毒稀释倍数为病毒原液的滴度值。

1.2.2 细胞培养及慢病毒感染

1.2.2.1 SHI-1 细胞培养及病毒感染 SHI-1 细胞于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基培养, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的条件下培养。取对数生长期 SHI-1 细胞, 用高效感染试剂重悬(含 5% 胎牛血清), 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 加入 1 μL 聚凝胺(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 培养 1 h, 感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)为 80 加入病毒上清, 用重组慢病毒感染的 SHI-1 细胞为 SHI-1/CD147i 细胞, 阴性对照病毒感染 SHI-1 细胞为 SHI-1/NC 细胞, 24 h 后观察细胞状态并传代。

1.2.2.2 骨髓基质细胞培养 经患者知情同意, 取初诊急性非淋巴细胞白血病患者骨髓, 用 Ficoll 淋巴细胞分离液分离单个核细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 接种于含 10% 胎牛血清 IMDM 培养基中培养, 培养 24 h 后, 去除未贴壁细胞, 每 2 d 半量换液 1 次, 约 10 ~ 14 d, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代, 取第 1 和第 2 代细胞进行后续实验。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 CD147、MMP-2、MMP-9 的表达 按 Trizol 一步法抽提细胞总 RNA。取 2 μg 总 RNA 用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。应用 SYBR Green 荧光法同时检测 CD147、MMP-2、MMP-9 及 β -Actin 的表达, CD147 引物正义链: 5'-TTCCTACCGTAGAAGACCTTGGC-3', 反义链: 5'-GACGACTTCACAGCCTTCACTCT-3'; MMP-2 引物正义链: 5'-GCTATGGACCTTGGG-AGAA-3', 反义链: 5'-TGGAAGCGGAATGGAAAC-3'; MMP-9 引物正义链: 5'-TCCCTGGAGACCTG-AGAACC-3', 反义链: 5'-CGGCAAGTCTTCCGAG-TAGTTT-3'; β -Actin 引物正义链: 5'-AGCGAG-CATCCCCAAAGTT-3', 反义链: 5'-GGGCACGA-GGGCTCATCATT-3'。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共 45 个循环。得到各基因扩增的 Ct 值(各个基因均设立复孔, 取平均值), 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析法对数据进行分析。

1.2.4 Western blotting 法检测 CD147 蛋白的表达

收集 SHI-1、SHI-1/NC、SHI-1/CD147i 细胞, 提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 取 30 μg 蛋白, 经 10% SDS-PAGE 电泳后, 电转至 PVDF 膜, 10% 脱脂牛奶封闭过夜; 兔抗人 CD147 蛋白抗体(1:500)作为一抗室温孵育 PVDF 膜 1 h, TBST 洗

膜后与辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 IgG (1:5000) 二抗结合孵育 1 h; 洗膜后 ECL 试剂盒曝光显影, GAPDH 蛋白作为对照。

1.2.5 细胞增殖能力的检测 SHI-1/CD147i、SHI-1/NC、SHI-1 细胞均以 1×10^6 个/mL 接种于 96 孔板内, 每孔 100 μL , 复种 5 孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度条件下培养, 于 24、48、72、96 h 加入 15 μL MTT, 培养 4 h 后, 可见蓝紫色结晶形成, 再加入 150 μL 二甲基亚砷充分溶解蓝紫色结晶, 于酶联免疫检测仪 490 nm 波长测定吸光度值(OD 值)。

1.2.6 体外跨 Matrigel 侵袭实验 将 Matrigel 基质胶用无血清 IMDM 以 1:1 稀释, 取含 8 μm 孔径的 Millicell 小室, 将 50 μL Matrigel 基底胶加入 Millicell 小室的上层, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 成胶状。再将 Millicell 小室置于 24 孔板内, 下层加入 0.6 mL 含 10% 胎牛血清的 IMDM, 上层加入 0.3 mL 混合细胞, 含 2×10^4 个 BMSCs 和 2×10^5 个 SHI-1 细胞或 SHI-1/NC、SHI-1/CD147i, 设立单独细胞对照, 共培养 24 h 后, 用血球计数板计数跨 Matrigel 胶移行到下层的细胞数, 细胞侵袭比例 = (移行至下层细胞数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 t 检验, 多样本均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒载体的构建 pGCSIL-GFP 质粒经 Age I 和 EcoR I 双酶切后被线性化, 电泳为一条明亮的条带, 而未酶切的原始载体呈现出 2 条带, 见图 1A。酶切后的 pGCSIL-GFP 质粒与 shRNA 双链 DNA 连接, 转化大肠杆菌后, 取菌落进行 PCR 扩增, 阳性克隆的片段大小为 343 bp, 空载体 PCR 产物片段为 306 bp, 见图 1B; 阳性克隆经测序检测插入片段与设计相符, 质粒构建成功。

2.2 慢病毒包装及滴度测定 将构建成功的重组 pGCSIL-GFP 载体与包装 pHelper 1.0、2.0 经脂质体 2000 共转染 293T 细胞, 48 h 后收集并浓缩 293T 细胞上清, 此上清含有具备感染能力的完整病毒。经逐孔稀释法感染 293T 细胞, 检测病毒滴度, 感染 4 d 后, 在加入 $1\text{E}-6$ μL 病毒上清的孔中观察到 1 个带有荧光的细胞, 则该病毒的滴度等于带有荧光的细胞数除以病毒原液量, 为 1×10^9 TU/mL (TU/mL 表示具有生物活性的病毒颗粒数)。阴性对照病毒

滴度为 2×10^9 TU/mL。

2.3 CD147、MMP-2、MMP-9 mRNA 检测 SHI-1/CD147i 细胞的 CD147、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 较 SHI-1/NC

细胞表达分别下降 86.7%、78.3% 及 70.6%，SHI-1 细胞与 SHI-1/NC 细胞的 CD147、MMP-2 及 MMP-9 mRNA 表达无明显差异 ($P > 0.05$)。

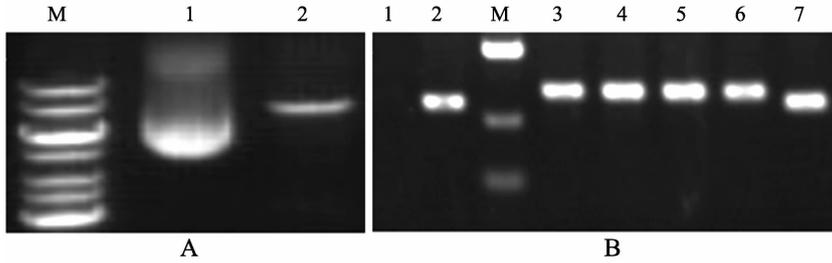


图 1 pGCSIL-GFP 质粒酶切电泳图(A)及阳性克隆细菌 PCR 鉴定(B)

A: M: DNA Marker; 1: 未经酶切的质粒 pGCSIL-GFP; 2: 经 *Age* I 和 *Eco* R I 酶切后线性化的质粒; B: M: DNA Marker, 自上而下分别为 500、250、100 bp; 1: 阴性对照; 2: 空载体组; 3~6: 含 pGCSIL-GFP 与 vshRNA 成功连接产物的 TG1; 7: 不含成功连接产物的 TG1。

Fig. 1 The electrophoresis of pGCSIL-GFP (A) and the identification of the positive TG1 (B)

A: M: DNA marker; 1: Intact pGCSIL-GFP; 2: The pGCSIL-GFP digested by *Age* I and *Eco* R I; B: M: DNA marker; 1: Negative control; 2: The PCR production amplified by pGCSIL-GFP; 3-6: The PCR production amplified by TG1 with positive ligation production; 7: The PCR production amplified by TG1 with the negative ligation production.

2.4 CD147 蛋白的表达 SHI-1/CD147i 细胞的 CD147 蛋白较 SHI-1/NC 细胞表达下降 91% ($P < 0.05$), SHI-1 细胞与 SHI-1/NC 细胞无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 2。

力显著低于 SHI-1 及 SHI-1/NC 细胞 ($P < 0.05$)。

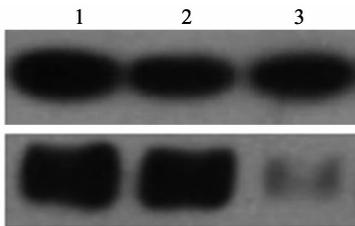


图 2 CD147 蛋白的表达

1: SHI-1 细胞; 2: SHI-1/NC 细胞; 3: SHI-1/CD147i 细胞。

Fig. 2 The expression of CD147 protein

1: SHI-1 cells; 2: SHI-1/NC cells; 3: SHI-1/CD147i cells.

2.5 细胞增殖能力的检测 见表 1。由表 1 可见, 体外培养 48、72、96 h 时, 发现 SHI-1/CD147i 细胞增殖活

2.6 体外跨 Matrigel 侵袭 单独 SHI-1、SHI-1/NC、SHI-1/CD147i 细胞及 BMSCs 在 Millicell 小室上层中均匀分布, 均无明显跨 matrigel 胶的移行能力, 24 h 后小室下层偶见细胞穿过, 无法计数。当与 BMSCs 共培养时, SHI-1、SHI-1/NC、SHI-1/CD147i 细胞围绕骨髓基质细胞呈条索状分布, 24 h 后可见 SHI-1 细胞跨 Matrigel 移行至 Millicell 小室下层, 移行至下层的细胞占接种细胞数的比例分别为 SHI-1 + BMSCs 15% ~ 21%, 平均 $(18.2 \pm 2.5)\%$, SHI-1/NC + BMSCs 13.5% ~ 19.5%, 平均 $(16.5 \pm 2.7)\%$, SHI-1/CD147i + BMSCs 3% ~ 6%, 平均 $(4.5 \pm 1.2)\%$, SHI-1 细胞和 SHI-1/NC 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 SHI-1/CD147i 细胞跨 Matrigel 基质胶侵袭能力显著下降, 与 SHI-1 细胞和 SHI-1/NC 细胞相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 干扰 CD147 表达抑制 SHI-1 细胞增殖活性 ($\bar{x} \pm s$)

细胞	24 h	48 h	72 h	96 h
SHI-1	0.45 ± 0.07	0.76 ± 0.01	0.92 ± 0.03	1.12 ± 0.04
SHI-1/NC	0.50 ± 0.06	0.82 ± 0.04	0.96 ± 0.03	1.13 ± 0.02
SHI-1/CD147i	0.41 ± 0.02	0.61 ± 0.08*	0.73 ± 0.09*	0.90 ± 0.11*

* $P < 0.05$ vs SHI-1 细胞和 SHI-1/NC 细胞。

3 讨论

RNA 干扰是一种反向遗传学手段, 常用于基因功能研究^[4-5]。体外合成 siRNA 因转染效率差、半衰期短、对靶基因抑制时间短等缺点, 在使用中受到一定限制^[6-7], 而慢病毒干扰载体具有感染能力强、

安全性高、表达稳定及特异性抑制基因表达能力强等优点, 是一种较好的研究基因功能的工具。本实验成功构建了慢病毒干扰载体, 获得高病毒滴度的慢病毒, 高效的感染了 SHI-1 细胞, 有效敲减了 SHI-1 细胞中 CD147 表达, 为后续实验奠定基础。

本实验结果显示, 干扰 CD147 表达后, SHI-1/CD147i 细胞增殖能力较 SHI-1/NC 及 SHI-1 细胞

下降,表明 CD147 是影响 SHI-1 细胞增殖的一个重要因素;而在共培养体外侵袭系统中,单独 SHI-1 细胞并不能跨 Matrigel 基质胶侵袭到 Millicell 下层,当与 BMSCs 共培养时,BMSCs 能显著诱导 SHI-1、SHI-1/NC 细胞跨 Matrigel 移行。相比之下,BMSCs 并不能显著提高 SHI-1/CD147i 细胞侵袭能力,表明 CD147 在 SHI-1 细胞侵袭中发挥重要作用。前期实验发现,SHI-1 与 BMSCs 均表达 CD147,SHI-1 与骨髓基质细胞共培养能诱导 MMP-2、9 的合成^[3],促进 SHI-1 细胞移行。本实验干扰 SHI-1 细胞 CD147 表达后,SHI-1/CD147i 细胞 MMP-2、9 mRNA 表达下降,是共培养系统中 SHI-1/CD147i 细胞跨 Matrigel 基质胶的移行能力下降的重要原因。黄灵芝等^[8]对 U937 细胞的研究中发现,CD147 抗体通过抑制 MMP-2、9 的分泌,阻断 U937 细胞移行。肿瘤微环境中的肿瘤细胞与非肿瘤性细胞如成纤维细胞等均表达 CD147,不同细胞间的 CD147 能相互作用诱导 MMPs 表达,促进肿瘤细胞的移行^[9]。

临床研究发现,CD147 参与了多种恶性血液病的临床过程,急性髓细胞白血病骨髓中 CD147 及血管内皮生长因子表达显著高于正常对照,是急性髓细胞白血病的独立预后不良因素^[10]。而在初治的儿童急性 B 淋巴细胞白血病患者中 CD147 的 mRNA 高表达预示着高复发风险^[11]。高 CD147 的表达与更高的非霍奇金淋巴瘤的分期相关^[12]。骨髓瘤细胞过度表达 CD147,干扰 CD147 的表达能有效抑制骨髓瘤浆细胞的增殖^[13]。而以 CD147 为靶点的靶向治疗成为肿瘤转移治疗的新方法,HAb18 单抗通过阻断 CD147 来抑制肝癌细胞的侵袭和转移,并应用于临床^[14]。

本实验结果显示,干扰 SHI-1 细胞 CD147 表达后,能抑制 SHI-1 细胞的增殖能力,并通过下调 MMP-2、9 表达,抑制体外移行能力,表明 CD147 在白血病的增殖及移行中起重要作用,可能为白血病治疗的一个新的靶点。

参考文献:

[1] Stenzinger A, Wittschieber D, von W M, et al. High extracellular matrix metalloproteinase inducer/CD147 expression is strongly and independently associated with poor prognosis in colorectal cancer [J]. *Human pathology*, 2012, 43 (9): 1471-1481.

[2] Zeng W, Su J, Wu L, et al. CD147 promotes melanoma progression through hypoxia-induced MMP2 activation [J]. *Curr Mol Med*, 2014, 14(1): 163-173.

[3] Li Z J, Chen Z X, Cen J N, et al. Direct contact with bone marrow stromal cells promote the invasions of SHI-1 leukemia cells[J]. *Chin Med J*, 2013, 126 (14): 2731-2735.

[4] Froehlich H, Fellmann M, Sueltmann H, et al. Large scale statistical inference of signaling pathways from RNAi and microarray data[J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8: 386-400.

[5] Ma Y, Chan C Y, He M L. RNA interference and antiviral therapy[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13 (39): 5169-5179.

[6] Jazag A, Ijichi H, Kanai F, et al. Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor- β [J]. *Oncogene*, 2005, 24(4): 662-671.

[7] Imamura T, Kanai F, Kawakami T, et al. Proteomic analysis of the TGF- β signaling pathway in pancreatic carcinoma cells using stable RNA interference to silence Smad4 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318 (1): 289-296.

[8] 黄灵芝,赵敬湘,刘淑静,等. CD147 对白血病细胞 U937 生长和肿瘤形成的影响[J]. *生物技术通讯*. 2008, 19(2): 203-206.

HUANG Lingzhi, ZHAO Jingxiang, LIU Shujing, et al. The effect of CD147 on growth and tumorigenicity of leukemic U937 cells[J]. *Letters in Biotechnology*. 2008, 19 (2): 203-206.

[9] Nabeshima K, Suzumiya J, Nagano M, et al. Emmprin, a cell surface inducer of matrix metalloproteinases (MMPs), is expressed in T-cell lymphomas [J]. *J Pathol*, 2004, 202(3): 341-351.

[10] Fu J F, Fu J F, Chen X Q, et al. CD147 and VEGF co-expression predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2010, 40 (11): 1046-1052.

[11] Beesley A H, Cummings A J, Freitas, et al. The gene expression signature of relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: implications for mechanisms of therapy failure[J]. *Br J Haematol*, 2005, 131(4): 447-456.

[12] Thorn C S, Noack F, Feller A C, et al. Application of newly developed tissue-arrays to study EMMPRIN (CD147) expression in malignant Non-Hodgkin lymphoma [J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2004, 1(1): 45-52.

[13] Arendt B K, Walters D K, Wu X, et al. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) in multiple myeloma: role in regulation of myeloma cell proliferation [J]. *Leukemia*, 2012, 26 (10): 2286-2296.

[14] Xu J, Shen Z Y, Chen X G, et al. A randomized controlled trial of Licartin for preventing hepatoma recurrence after liver transplantation [J]. *Hepatology*, 2007, 45(2): 269-276.