

连翘苷经 PI3K/Akt 信号通路干预肾细胞癌的机制研究

吴林斌, 吴元肇, 李晓丹, 陈立, 黄来剑

温州市人民医院, 浙江 温州 325000

摘要:目的 探讨连翘苷抑制人肾细胞腺癌 786-0 细胞生长、迁移及侵袭的作用机制。方法 体外培养 786-0 细胞, 在其中加入不同浓度连翘苷进行干预。MTT 法检测细胞生存活力, AO/EB 法检测细胞凋亡, 划痕实验与 Transwell 实验分别考察细胞迁移、侵袭能力。Western blotting 法检测细胞内 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、FOXO3a、p-FOXO3a、p21、p27、FasI、Bim、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达情况。结果 连翘苷可有效抑制肾癌细胞生长、促进凋亡, 干扰细胞周期, 上调 p21、p27、FasI 及 Bim 表达水平, 与对照组比较差异明显 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与对照组比较, 不同浓度连翘苷可明显抑制肾癌细胞迁移与侵袭, 减少 MMP-2、MMP-9 合成 ($P < 0.05$ 、 0.01); 同时连翘苷能明显抑制 PI3K、Akt、FOXO3a 磷酸化 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈浓度依赖性。结论 连翘苷可通过 PI3K/Akt 信号通路调控 786-0 细胞凋亡与细胞周期、抑制肾癌细胞生长; 同时连翘苷经 PI3K/Akt 通路可有效削弱肾癌细胞迁移与侵袭能力。

关键词: 连翘苷; 肾细胞癌; PI3K; Akt; FOXO3a

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2377-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.018

Effect of forsythin in inhibiting renal cell carcinoma via PI3K/Akt signaling pathway

WU Lin-bin, WU Yuan-zhao, LI Xiao-dan, CHEN Li, HUANG Lai-jian

Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of forsythin in inhibiting the growth, migration and invasion of human renal cancer cells (786-0). **Methods** Human renal cancer cells (786-0) were cultured *in vitro*, and different concentrations of forsythin were added. Cell viability was detected by MTT assay, cell apoptosis was detected by AO/EB assay, cell migration and invasion abilities were respectively investigated by wound healing and transwell migration assays. The expression levels of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, FOXO3a, p-FOXO3a, p21, p27, FasI, Bim, MMP-2, and MMP-9 were detected by Western blotting. **Results** In 786-0 cells, forsythin effectively inhibited the growth of renal cancer cells, promoted apoptosis, interfered with cell cycle, and upregulated expression levels of p21, p27, FasI, and Bim, when compared with control group ($P < 0.05$, 0.01); Compared with the control group, different concentrations of forsythin can significantly inhibit the migration and invasion of renal cancer cells, and reduce the synthesis of MMP-2 and MMP-9 ($P < 0.05$, 0.01). Meanwhile, forsythin can significantly inhibit the phosphorylation of PI3K, Akt and FOXO3a in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Forsythin can regulate apoptosis and cell cycle, and inhibit the growth of renal cancer cells by down-regulating the PI3K/Akt signaling pathway. At the same time, forsythin can effectively inhibit the ability of renal cell migration and invasion through the PI3K/Akt pathway.

Key words: forsythin; renal cell carcinoma; PI3K; Akt; FOXO3a

肾细胞癌起源于肾实质泌尿小管上皮系统, 是泌尿系统中仅次于前列腺癌与膀胱癌的常见恶性肿瘤, 具有发病率高、转移性强及预后差等特点^[1-2]。肾细胞癌发病机制较为复杂, 而高血压、吸烟以及肥胖是其公认的诱因^[3]。调查结果表明, 全球每年新增患者约 27.1 万例, 死亡约 11.6 万例, 保持逐年

增长态势^[4]。肾细胞癌对传统化疗药物不敏感, 且手术治疗后仍有高于 30% 的复发率。而同时针对肾细胞癌复发或转移的治疗药物选择有限, 因此发展新策略用于肾细胞癌的治疗迫在眉睫。已有研究显示, 中医药在改善肾细胞癌相关临床症状、延长生命、提高患者生活质量方面具有确切疗效^[5-6]。连翘

收稿日期: 2018-10-18

作者简介: 吴林斌 (1984—), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为泌尿外科, 擅长泌尿系结石、前列腺增生的微创治疗。

Tel: 13600648954 E-mail: wulinbin1@126.com

为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 具有清热解毒、消肿散结等功效, 常用于痈疽、瘰癧、乳痈等治疗^[7]。连翘苷是连翘中重要质控成分, 具有抗氧化、抗炎、调脂、抗肺癌等作用^[8-9], 然而对于其在肾细胞癌方面的研究尚未见报道。本实验通过在人肾透明细胞腺癌 786-0 细胞中给予连翘苷进行干预, 观察连翘苷对肾癌细胞的增殖活性及细胞迁移、侵袭等方面的影响, 为肾细胞癌等肿瘤疾病的治疗与连翘苷的研究开发提供科学依据。

1 材料

1.1 药物及试剂

连翘苷 (批号 110821-201213), 购自中国食品药品检定研究院; 胎牛血清, 购自美国 Gibco 公司; DMEM 培养基, 购自美国 HyClone 公司; 二甲基亚砜, 购自美国 Amresco 公司; ECL 化学发光液, 购自美国 Thermo Fisher 公司; AO/EB 试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒, 购自南京碧云天生物科技有限公司; β -Tubulin、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、FOXO3a、p-FOXO3a、p21、p27、Fasl、Bim、MMP-2 及 MMP-9 抗体, 购自美国 CST 公司。

1.2 实验仪器

CH20-BIM 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Direct-Q 超纯水仪, 美国 MILLIPORE 公司; 蛋白电泳、半干转膜系统, 上海天能科技有限公司; 5810R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 摇床, 德国 IKA 公司; Synergy HT 酶标仪, 美国 BioTeK 公司; CO₂ 细胞恒温培养箱 (CB150), 德国 Binder 公司; 全自动图像分析系统, 美国 GE 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

人肾透明细胞腺癌 786-0 细胞, 由中国科学院上海细胞库提供, 用 DMEM 培养基 (10% FBS+1% P/S) 进行重悬, 随后置于 37 °C、5% CO₂ 的恒湿孵育箱中进行培养, 每 2~3 天进行传代。

2.2 细胞活力检测

取对数生长期 786-0 细胞, 加入 DMEM 重悬稀释至 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ L, 孵育过夜后更换无血清培养基 90 μ L。待饥饿培养 24 h, 各孔分别加入 10 μ L 不同浓度连翘苷 (0.1、1、10 μ mol/L), 对照组给予等量无血清培养基, 每组 6 个复孔。24 h 后每孔加 MTT 溶液 20 μ L, 4 h 后吸弃上清液并更换 DMSO 溶液 200 μ L, 震荡

摇匀后置于酶标仪 (波长 490 nm 处) 检测吸光度 (A) 值。

2.3 Transwell 法检测细胞侵袭力

首先将 Transwell 侵袭小室进行铺胶, 随后放在恒温培养箱中进行固化处理。在上室中加入 100 μ L 786-0 细胞悬液 (1×10^5 个/mL), 过夜孵育后加入连翘苷 (0.1、1、10 μ mol/L) 进行给药干预, 而在下室中加入完全培养基进行培养。24 h 后孵育完毕取出小室, 轻柔刮去基质胶与细胞。小室底面穿过的细胞以 0.1% 结晶紫染液进行染色, 20 min 后于倒置显微镜进行观测, 并计算穿过的细胞总数。

2.4 细胞划痕实验

取对数生长期 786-0 细胞, 加入 DMEM 重悬稀释至 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板, 每孔 2 mL, 孵育过夜后更换无血清培养基 1.8 mL。待饥饿培养 24 h, 用灭菌的 1 mL 枪头垂直于孔板制造细胞划痕, 各孔分别加入 200 μ L 不同浓度连翘苷 (0.1、1、10 μ mol/L), 对照组给予等量无血清培养基。将培养板放入培养箱培养, 每隔 6 h 取出, 用倒置显微镜对划痕间隙的宽度进行测量。

2.5 AO/EB 法观察细胞凋亡

取 786-0 细胞, 加入 DMEM 重悬稀释至 1×10^5 个/mL 并接种于含无菌玻片的 24 孔板, 设 3 个复孔, 每孔 500 μ L, 孵育过夜后更换无血清培养基 450 μ L。待细胞贴壁后采用连翘苷 (0.1、1、10 μ mol/L) 进行孵育, 对照组给予等量无血清培养基。24 h 后取出玻片, 根据试剂盒说明书在玻片上滴加 4 μ L AO/EB 混合溶液, 加盖片后通过荧光显微镜进行观测。

2.6 Western blotting 法检测相关蛋白表达水平

取对数生长期 786-0 细胞, 加入 DMEM 重悬稀释至 1×10^5 个/mL, 接种于 6 孔培养板, 每孔 2 mL, 孵育过夜后更换无血清培养基 1.8 mL。待饥饿培养 24 h, 各孔分别加入 200 μ L 不同浓度连翘苷 (0.1、1、10 μ mol/L), 对照组给予等量无血清培养基。24 h 后经处理并收集细胞裂解液, 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜。分别加入 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、FOXO3a、p-FOXO3a、p21、p27、Fasl、Bim、MMP-2 及 MMP-9 一抗低温过夜孵育。随后加入二抗进行常温孵育 30 min, 经 ECL 化学发光、显影, 扫描分析相应条带灰度值。

2.7 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS V17.0 软件

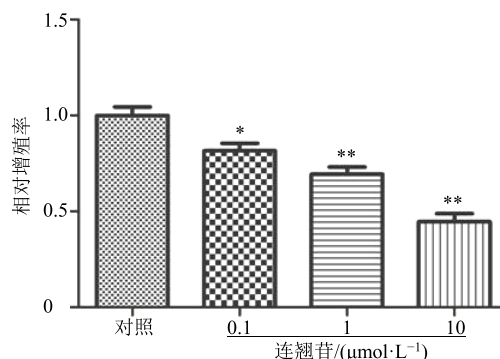
包进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 786-0 细胞增殖及凋亡的影响

经检测, 对照组中 786-0 细胞增殖明显, 细胞活力较强。在加入不同浓度连翘苷后, 细胞增殖能力随连翘苷浓度增加而降低。统计分析发现, 连翘苷可抑制 786-0 细胞增殖活力, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 1。

经检测, 对照组中 786-0 细胞形态无异常, 未见橘黄色荧光。在加入不同浓度连翘苷后, 细胞凋亡情况随连翘苷浓度增加而明显。统计分析发现, 连翘苷可促进 786-0 细胞中凋亡细胞比例, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 2。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as below

图 1 连翘苷对 786-0 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of forsythoside on proliferation of 786-0 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

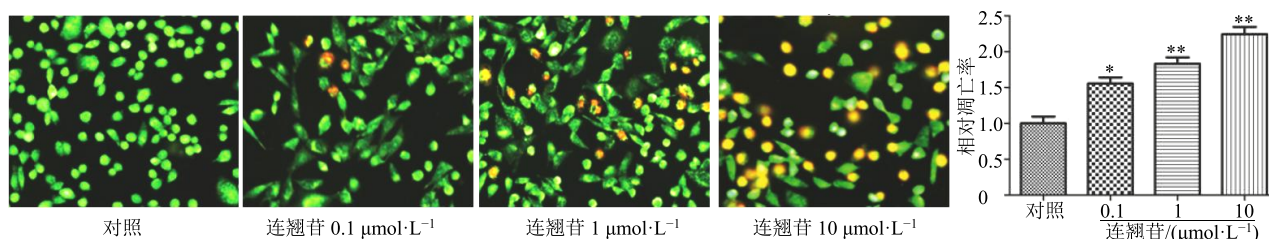


图 2 连翘苷对 786-0 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of forsythoside on apoptosis of 786-0 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 对 786-0 细胞侵袭与迁移的影响

Transwell 法检测后发现, 对照组中侵袭的细胞数量较多, 经连翘苷干预后, 侵袭细胞数量骤减。经统计分析发现, 连翘苷可有效抑制 786-0 细胞侵袭能力, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈浓度依赖性, 其中以 $10 \mu\text{mol/L}$ 连翘苷抑制能力最强。结果见图 3。

细胞划痕实验检测表明, 对照组中划痕愈合速度较快, 经连翘苷干预后, 有效抑制了细胞划痕的愈合能力, 表明连翘苷可有效抑制 786-0 细胞迁移。数据统计后发现, 与对照组比较, 连翘苷可明显削弱 786-0 细胞迁移能力, 抑制划痕愈合 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其

中以 $10 \mu\text{mol/L}$ 连翘苷抑制能力最强。结果见图 4。

3.3 对 786-0 细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 不同浓度连翘苷可明显抑制 PI3K、Akt 及 FOXO3a 的活化 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且表现出浓度梯度。在 p-PI3K 表达方面, 以 $10 \mu\text{mol/L}$ 连翘苷的抑制能力最强; 在 p-Akt 表达方面, 0.1 、 1 、 $10 \mu\text{mol/L}$ 连翘苷均有较强的抑制能力; 在 p-FOXO3a 表达方面, $10 \mu\text{mol/L}$ 连翘苷表现出最强的抑制作用。提示连翘苷可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路, 继而发挥其促进 786-0 细胞凋亡、抑制其迁移与侵袭的能力。结果见图 5。

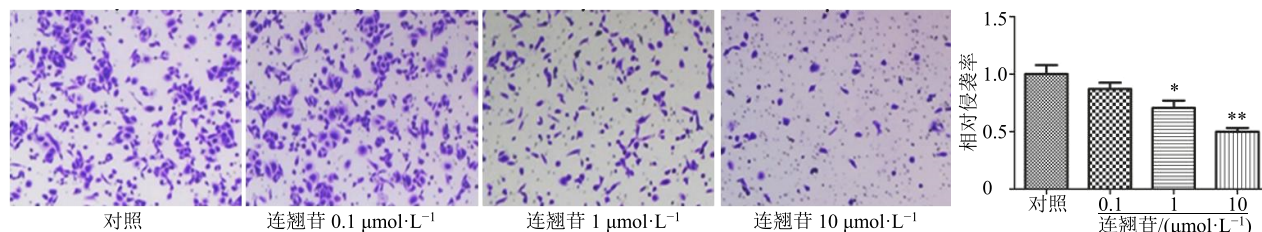
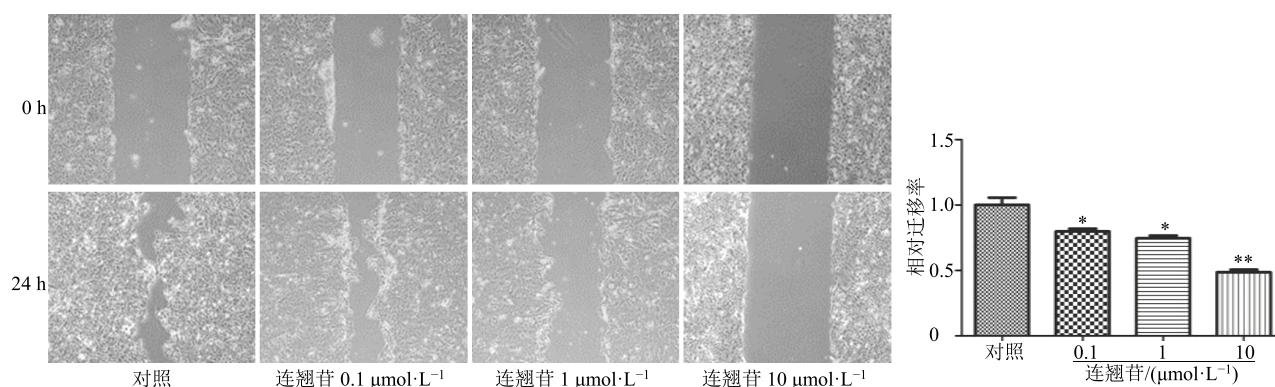
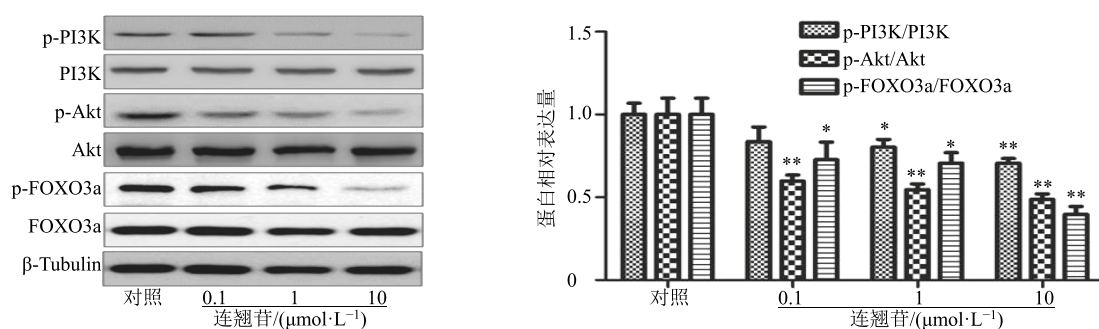


图 3 连翘苷对 786-0 细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of forsythoside on invasion of 786-0 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图 4 连翘苷对 786-0 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effect of forsythin on migration of 786-0 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 5 连翘苷对 786-0 细胞中 PI3K、Akt 及 FOXO3a 活化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of forsythin on activation of PI3K, Akt, and FOXO3a ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

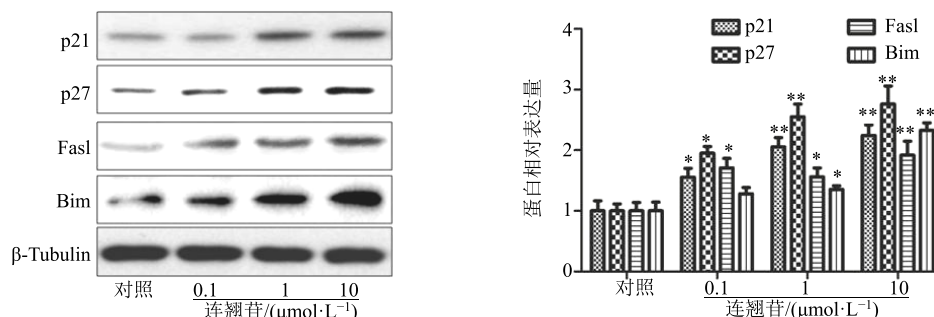
3.4 对 786-0 细胞中细胞周期与凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 不同浓度连翘苷可明显促进 p21、p27、FasI 及 Bim 的表达 ($P < 0.05, 0.01$), 且呈浓度依赖性。在 p21 表达方面, 以 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷的促进能力最强; 在 p27 表达方面, 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷均具有较强的促进能力; 在 FasI 表达方面, 10 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷的促进能力较为突出; 在 Bim 表达方面, 仍以 10 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷的促进能力较为突出。提示连翘苷可能通过促进 p21、p27、FasI

及 Bim 的表达, 干扰 786-0 细胞的细胞周期, 促进细胞凋亡。结果见图 6。

3.5 对 786-0 细胞中基质金属蛋白酶蛋白表达的影响

与对照组比较, 不同浓度连翘苷可明显抑制 MMP-2 及 MMP-9 的表达 ($P < 0.05, 0.01$), 且表现出浓度依赖性。在 MMP-2 表达方面, 以 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷的抑制能力最强; 在 MMP-9 表达方面, 1、10 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷均具有较强的抑制能力。提示连翘苷可能通过抑制 MMP-2、MMP-9 的表达, 发挥其抗 786-0 细胞迁移与侵袭的作用。结果见图 7。

图 6 连翘苷对 786-0 细胞中 p21、p27、FasI 及 Bim 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effects of forsythin on protein expression of p21, p27, FasI, and Bim ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

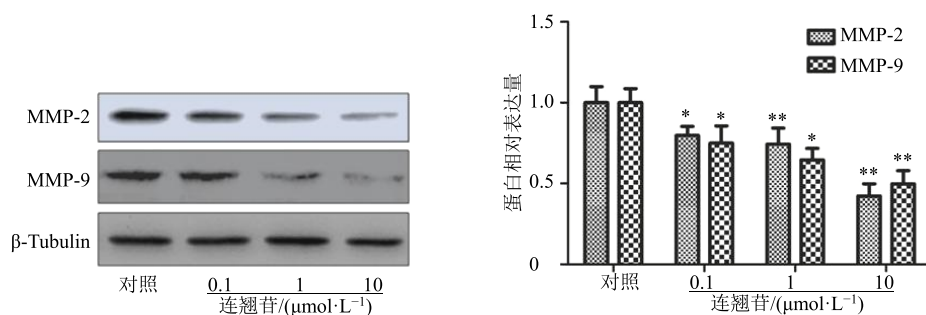


图 7 连翘苷对 786-0 细胞中 MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of forsythoside on protein expression of MMP-2 and MMP-9 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

肾细胞癌发病率占肾癌的 90%~95%，其中肾透明细胞癌占 60%~85%。由于肾细胞癌发病初期症状不明显，因此其中约 1/3 患者在确诊时已发生转移^[10]。常规肾切除手术对早期患者具有一定的疗效，但对转移性肾癌表现欠佳，对此临床常辅以放疗、化疗及免疫疗法进行治疗，但效果仍不明显，由此导致晚期患者预后差、死亡率高。传统中药在肾癌临床中具有良好表现，中药可有效巩固患者免疫功能，同时减少其复发、提高生存率、改善预后等^[11]。中医认为肾癌具有腰痛、血尿、肿块等症状，属“腰痛”“血尿”“积聚”范畴，故常采用健脾益肾、清热利湿、活血化瘀等治法^[12-13]。连翘具有清热解毒、消肿散结、疏散风热之功效，用于治疗痈疽、瘰疬、热淋涩痛等证^[7]。其成分主要包括挥发油类、苯乙醇苷类、木脂素类和三萜类等，具有良好的抗氧化、抗菌、抗炎、抗病毒、抗肿瘤等作用^[14]。连翘苷作为连翘中重要成分之一，其药理活性有待深入挖掘。本实验体外培养人肾细胞腺癌 786-0 细胞并给予不同浓度连翘苷进行干预，从而探讨其抗肾细胞癌的作用及机制。

已知 PI3K/Akt 信号通路在多种恶性肿瘤的发生、发展进程中占据着重要角色。近年来研究发现，PI3K/Akt 信号通路在肾癌细胞中广泛活化，已成为肾癌研究热门靶点^[15]。叉头蛋白 FOXO3a 是 Akt 下游信号分子，与肿瘤之间关系密切，可通过 T32 位点被 Akt 激酶磷酸化^[16]。活化的 FOXO3a 可被 14-3-3 蛋白结合，继而从细胞核内转出，失去效应。已有研究发现，FOXO3a 可通过转录活性，干扰并阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡^[17]。因此，可通过抑制 PI3K/Akt 信号传导，防止 FOXO3a 磷酸化、促进其转录，继而阻滞肾癌细胞周期并促进其凋亡。

研究表明，连翘苷可有效抑制 PI3K、Akt 及 FOXO3a 的活化。由此提示，连翘苷可能具有阻滞肾癌细胞周期、诱导细胞凋亡的潜在活性。细胞周期是促进细胞分裂的关键，FOXO3a 可通过增加细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 (CDKIs)，如 p21 及 p27 的转录，从而发挥阻断细胞周期的作用^[18-19]。另外，FOXO3a 可加快死亡受体的配体蛋白 FasL 以及凋亡前体蛋白 Bim 的转录，而 FasL 和 Bim 可分别结合死亡受体 Fas 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2，从而通过外源性与内源性两方面同时诱导细胞凋亡^[17,20]。实验结果发现，连翘苷可抑制肾癌细胞的增殖活性，加剧其凋亡；同时 Western blotting 结果发现连翘苷可促进 p21、p27、FasL 及 Bim 的转录与表达。由此证实，连翘苷可通过调控 PI3K/Akt 信号通路，干预细胞周期及促进细胞凋亡。然而肿瘤的侵袭与转移与细胞外基质降解有关，基质金属蛋白酶 (MMPs) 作为降解细胞外基质的关键酶，受 PI3K/Akt 信号通路正向调控，而 MMP-2 及 MMP-9 表达增加可提高肿瘤侵袭能力^[21-22]。结果表明，连翘苷可有效减少 MMP-2 及 MMP-9 表达，从而抑制肾癌细胞迁移与侵袭。由此提示，连翘苷可通过调控 PI3K/Akt 信号通路，削弱肾癌细胞的迁移与侵袭能力。

综上所述，连翘苷可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路，发挥抑制肾细胞腺癌 768-0 细胞增殖活力、干预细胞周期、促进细胞凋亡、抑制细胞迁移与侵袭的能力，从而表现出抗肾细胞癌的作用。本实验研究为肾细胞癌的治疗提供了潜在策略，同时为连翘及其复方制剂的临床应用补充实验数据。

参考文献

- [1] Motzer R J, Agarwal N, Beard C, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: Kidney cancer [J]. *J Natl Comprhens Cancer Network Jncn*, 2009, 7(8): 838-881.

- [2] Ljungberg B, Hanbury D C, Kuczyk M A, *et al.* Guidelines on renal cell carcinoma [J]. *Europ Urol*, 2007, 51(6): 1502-1510.
- [3] 赵振威, 李延江. 肾细胞癌流行病学研究进展 [J]. *山东医药*, 2013, 53(7): 95-97.
- [4] 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.
- [5] 刘 睿, 邓跃毅. 肾癌术后的中医药治疗体会 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(7): 629.
- [6] 周小海. 浅谈中医治疗肾肿瘤 [J]. *医学信息*, 2014(27): 527-527.
- [7] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [8] 郑 末, 姜忠敏. 连翘苷对 Lewis 肺癌 VEGF 和内皮抑素表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(1): 167-171.
- [9] 王恩力, 姚景春, 刘 铮. 连翘苷元对大鼠免疫性肝纤维化的影响 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(2): 161-164.
- [10] Janzen N K, Kim H L, Figlin R A, *et al.* Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease [J]. *Urol Clin North Amer*, 2003, 30(4): 843-852.
- [11] 吕双喜, 曾凡雄, 邵魁卿, 等. 中医药治疗肾细胞癌概述 [J]. *河北中医*, 2017, 39(3): 473-476.
- [12] 周微红, 奚 颖. 周维顺治疗肾癌经验 [J]. *江西中医药*, 2012, 43(2): 12.
- [13] 崔虎军. 中医药治疗肾癌浅探 [J]. *实用中医内科杂志*, 2008, 22(3): 39-40.
- [14] 孟祥乐, 李俊平, 李 丹, 等. 连翘的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. *中国药房*, 2010(43): 4117-4119.
- [15] Sourbier C, Lindner V, Lang H, *et al.* The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: A new target in human renal cell carcinoma therapy [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(10): 5130-5142.
- [16] Myatt S S, Lam W F. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(11): 847-859.
- [17] Stahl M, Dijkers P F, Kops G J, *et al.* The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2 [J]. *J Immunol*, 2002, 168(10): 5024-5031.
- [18] Medema R H, Kops G J, Bos J L, *et al.* AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1 [J]. *Nature*, 2000, 404(6779): 782-787.
- [19] Seoane J, Le H V, Shen L, *et al.* Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation [J]. *Cell*, 2004, 117(2): 211.
- [20] Brunet A, Bonni A, Zigmond M J, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor [J]. *Cell*, 1999, 96(6): 857-868.
- [21] Tang S W, Yang T C, Lin W C, *et al.* Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 138-145.
- [22] Kawata N, Nagane Y, Hirakata H, *et al.* Significant relationship of matrix metalloproteinase 9 with nuclear grade and prognostic impact of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 for incidental clear cell renal cell carcinoma [J]. *Urology*, 2007, 69(6): 1049-1053.