

过表达乙酰肝素酶对胆囊癌细胞增殖及 PI3K/AKT 信号通路的影响

闻波, 刘子祥, 张子艳, 陈佳伟, 王郑林, 周少波

(蚌埠医学院第二附属医院 普外科, 安徽 蚌埠, 233000)

摘要: **目的** 探讨过表达乙酰肝素酶(HPSE)对胆囊癌细胞系 GBC-SD 细胞增殖及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K/AKT)信号通路的影响。**方法** 构建 HPSE 真核表达载体,然后获得转基因过表达 HPSE 的胆囊癌细胞株 GBD-SD。通过实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blot 分析 GBC-SD 和 GBD-SD 中 HPSE mRNA 和蛋白表达。通过集落形成实验、MTT 来评估各组细胞的增殖情况。采用 Western blot 分析 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白(p-PI3K、PI3K、p-AKT 和 AKT)的水平。**结果** 成功转染后的 GBD-SD 中 HPSE mRNA 水平和蛋白水平升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与正常表达 HPSE 的 GBC-SD 相比,过表达 HPSE 的 GBD-SD 细胞光密度(OD)值和集落形成能力提高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示,与 GBC-SD 细胞相比,过表达 HPSE 的 GBD-SD 组细胞 p-AKT、p-PI3K 蛋白表达水平、p-AKT/AKT 值和 p-PI3K/PI3K 值增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),而总 AKT 和总 PI3K 蛋白表达水平无明显变化。GBC-SD 细胞经 PI3K/AKT 通路特异性抑制剂 LY294002 处理 2 d 后,其增殖能力和 p-AKT/AKT 值降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 过表达 HPSE 能够促进 GBC-SD 细胞的增殖,这一效应可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词: 胆囊癌;乙酰肝素酶;细胞增殖;磷脂酰肌醇 3-激酶;蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶;信号通路

中图分类号: R 735.8, Q 344 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2022)02-056-06 **DOI:** 10.7619/jcmp.20213823

Effect of overexpression of heparanase on proliferation of gallbladder cancer cells and PI3K/AKT signaling pathway

WEN Bo, LIU Zixiang, ZHANG Ziyang, CHEN Jiawei, WANG Zhenglin, ZHOU Shaobo

(Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui, 233000)

Abstract: **Objective** To explore the effect of overexpression of heparanase (HPSE) on the proliferation of gallbladder cancer cell line GBC-SD and the phosphatidylinositol 3-kinase/protein serine-threonine kinase (PI3K/AKT) signaling pathway. **Methods** The HPSE eukaryotic expression vector was constructed, and then the gallbladder cancer cell line GBD-SD with transgenic overexpression of HPSE was obtained. The mRNA and protein expression of HPSE in GBC-SD and GBD-SD were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blot. The proliferation of cells in each group was assessed by colony formation assay and MTT. The protein levels of PI3K/AKT signaling pathway related proteins (p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT) were analyzed by western blot. **Results** The mRNA and protein levels of HPSE in GBD-SD after successful transfection were significantly increased ($P < 0.01$). Compared to GBC-SD with normal expression of HPSE, the optical density (OD) value and colony formation ability of GBD-SD cells with overexpression of heparanase were significantly increased ($P < 0.05$). The results of western blot showed that compared with GBC-SD cells, the expression levels of p-AKT, p-PI3K protein, p-AKT/AKT value and p-PI3K/PI3K value in GBD-SD cells with overexpression of HPSE were increased significantly ($P < 0.01$), but the expression levels of total AKT and total PI3K protein did not change obviously. After 2 days of

收稿日期: 2021-09-23

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目(KJ2020A0564); 2021 年度安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2021a012); 蚌埠医学院自然科学重点项目(BYKY2019130ZD)

通信作者: 周少波, E-mail: zhoushaobodocor@sina.com

treatment with specific inhibitor LY294002 for PI3K/AKT pathway, the proliferation ability and p-AKT/AKT value of GBC-SD cells were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Over-expression of HPSE can promote the proliferation of GBC-SD cells, which may be related to the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: gallbladder cancer; heparanase; cell proliferation; phosphatidylinositol 3-kinase; protein serine-threonine kinases; signaling pathway

胆囊癌是一种侵袭性强、致死率高的恶性肿瘤,其早期缺乏典型的体征和症状,多数患者确诊时已处于晚期^[1-2]。目前,手术是有效的治疗手段,对于不能通过手术切除的胆囊癌患者,5年生存率仅为10%左右^[3],而化疗或放疗对晚期患者并未产生明显的作用。胆囊癌的发生是在不同的进化阶段由连续的基因改变引起的,探索胆囊癌发病的分子机制对于建立胆囊癌新的治疗途径至关重要。乙酰肝素酶(HPSE)是一种内糖苷酶,可特异性地降解细胞外基质(ECM)成分硫酸乙酰肝素(HS),其与肿瘤的发生、生长、转移和化疗耐药等有关^[4]。临床研究^[5-7]发现,HPSE在乳腺恶性肿瘤、多发性骨髓瘤、肉瘤等多种肿瘤中表达升高。研究^[8]表明,HPSE过表达促进了人胆囊癌细胞GBC-SD的增殖和迁移,但其具体作用机制尚不完全清楚。研究结果^[9]显示,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K/AKT)信号通路在大部分肿瘤细胞中呈激活状态,从而促进细胞的增殖。为了解HPSE过表达在胆囊癌发生发展中的作用及PI3K/AKT通路对GBC-SD细胞生物学特性的影响,本研究利用脂质体法构建HPSE过表达的胆囊癌细胞系GBD-SD,应用PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002作用于GBC-SD细胞,探究其对胆囊癌细胞增殖的影响及其可能的分子机制,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人GBC-SD细胞株购自中国科学院细胞库(中国上海)。胎牛血清(FBS)、培养基RPMI-1640购自Gibco公司,质粒pcDNA3.1购自北诺生物科技有限公司(中国上海),PCR引物、Prime Script one step RT-PCR试剂盒购自Fermentas公司,胰酶、RIPA细胞裂解液购自Hyclone公司,BCA蛋白定量试剂盒、MTT试剂盒、SDS-PAGE凝胶以及ECL试剂盒均购自上海碧云天公司,Trizol试剂、Lipo-fectamin 2000购自美国Invitrogen公司,兔

抗人HPSE、PI3K、AKT、p-PI3K、p-AKT多抗、内参 β -actin抗体以及对应二抗购自美国Affinity公司,LY294002购自MCE公司。

1.2 方法

1.2.1 GBD-SD稳定转染细胞株的构建与鉴定:在美国生物技术信息中心(NCBI)中检索到HPSE基因序列ID为ENSG00000225609.1,经过变性、退火处理将合成的单链DNA变为双链DNA,将含有特定序列的pGPU6/GFP/Neo载体导入大肠埃希菌,在37℃的常温下培养12h,提取大肠埃希菌中的质粒,并确定该质粒的DNA序列。成功构建人HPSE基因过表达载体后,检测验证,最后将pcDNA3.1-HPSE载体转染到GBD-SD细胞中,并用抗生素筛选得到含有重组载体的稳定转染细胞株。

1.2.2 细胞培养、分组和转染:将GBC-SD细胞在添加10%胎牛血清的培养基RPMI-1640中培养,培养箱CO₂浓度为5%,温度为37℃。当单层贴壁的细胞铺满瓶底约80%时,加入胰酶于培养瓶中进行消化与传代。将细胞分为GBC-SD组(HPSE正常表达)和GBD-SD组(HPSE过表达)。GBC-SD组不给予任何处理,GBD-SD组按照Lipofectamine 2000转染试剂说明书将载体转染到GBC-SD中获得。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)测定细胞中HPSE的表达:细胞中总RNA用Trizol试剂提取,接下来将总RNA反向转录成cDNA。根据制造商说明书,采用SYBRGreen方法通过qRT-PCR扩增目标基因。HPSE引物:正向引物为5'-CCT-CAT-CCT-CCT-GGG-TTC-TC-3',反向引物为5'-AGG-AGG-CAT-TGC-TGA-TGA-TC-3', β -actin引物:正向引物为5'-AGC-GAG-CAT-CCC-CCA-AAG-TT-3',反向引物为5'-GGG-CAC-GAA-GGC-TCA-TCA-TT-3'。PCR热循环的条件:95℃下5min,接下来经历以下40个循环(95℃下45s,60℃下45s,72℃下60s)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定HPSE基因表达,所有PCR实验重复3次。

1.2.4 Western blot测定蛋白水平:使用RIPA

裂解液分离细胞总蛋白后通过 BCA 法定量。按步骤进行电泳、转膜和封闭(5%的脱脂牛奶),然后将膜与兔抗人的 HPSE(1: 1000)、PI3K(1: 1 000)、AKT(1: 1 000)、p-PI3K(1: 1 000)和 p-AKT(1: 1 000)一抗在 4 ℃ 下过夜。使用 TBST 清洗膜 3 次(每次清洗 10 min),而后在 25 ℃ 下孵育二抗(山羊抗兔 IgG, 稀释度 1: 5 000)60 min。最后对膜进行化学发光检测,并使用 Image J 软件定量条带强度,每个实验分别进行 3 次。

1.2.5 细胞增殖实验: ① MTT 法。将细胞以 2×10^3 个/孔的密度接种在 96 孔板上,每组设 5 个复孔。在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中分别培养 24、48、72 h,并向每孔中添加 MTT 溶液 5 mg/mL,再孵育 4 h。接下来倒出培养基,向每孔中添加 150 μL 的二甲基亚砷(DMSO),10 min 后晶体全部溶解,最后测量每孔的光密度(OD)值,每个实验进行 3 次。② 集落形成实验。将细胞以 1×10^3 个/孔的密度接种在 6 孔板上,每组设 5 个

复孔,在 RPMI-1640 培养基(含 10% FBS)中培养,以允许菌落形成。培养 14 d 后,采用 PBS 冲洗细胞集落 3 次,在室温下用 4% 多聚甲醛固定 25 min 后用结晶紫染色 15 min。最后,对染色的菌落进行成像和计数以反映每组细胞的增殖能力。

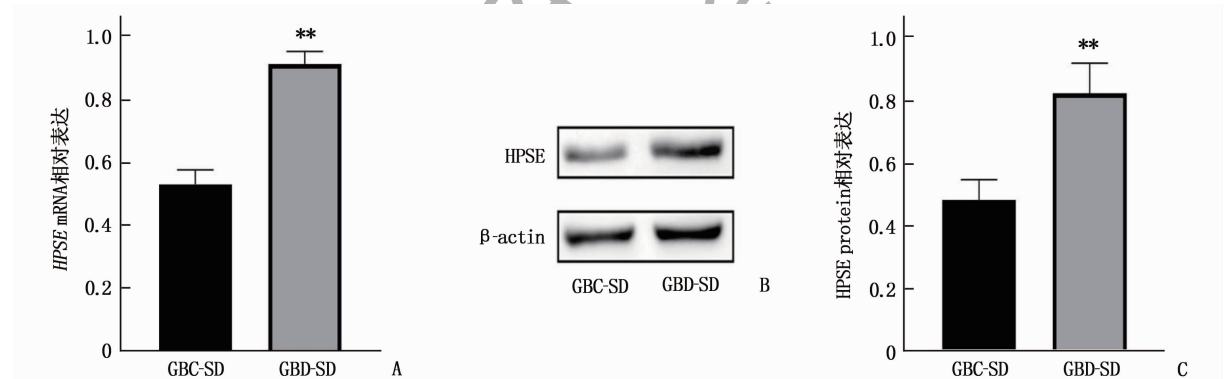
1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件和 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据,结果以均数 ± 标准差表示,采用 *t* 检验、单因素方差分析比较 2 组和多组间的差异。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPSE 在胆囊癌细胞系 GBC-SD 和 GBD-SD 中的表达

qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,经转基因过表达后的 GBD-SD 中 HPSE mRNA 和蛋白相对表达量较 GBC-SD 升高,差异有统计学意义(*P* < 0.01),见图 1。



A: qRT-PCR 检测结果; B: Western blot 检测结果; C: HPSE 蛋白的相对表达量。与 GBC-SD 比较, ***P* < 0.01

图1 HPSE 在胆囊癌细胞系 GBC-SD 和 GBD-SD 中的表达

2.2 HPSE 过表达对胆囊癌细胞系 GBC-SD 细胞增殖的影响

MTT 结果表明, GBC-SD 组细胞在 24、48、72 h 的 OD 值依次为(0.32 ± 0.03)、(0.45 ± 0.03)、(0.63 ± 0.02),而 GBD-SD 组细胞在 24、48、72 h 的 OD 值依次为(0.49 ± 0.04)、(0.64 ± 0.03)、(0.87 ± 0.04)。GBD-SD 组细胞的 OD 值高于 GBC-SD 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。集落形成实验显示, GBC-SD 组、GBD-SD 组细胞经培养 14 d 后集落形成数分别为(69.33 ± 2.52)、(152.33 ± 5.13),差异有统计学意义(*P* < 0.01),提示 HPSE 过表达后显著促进了胆囊癌细胞的增殖。见图 2。

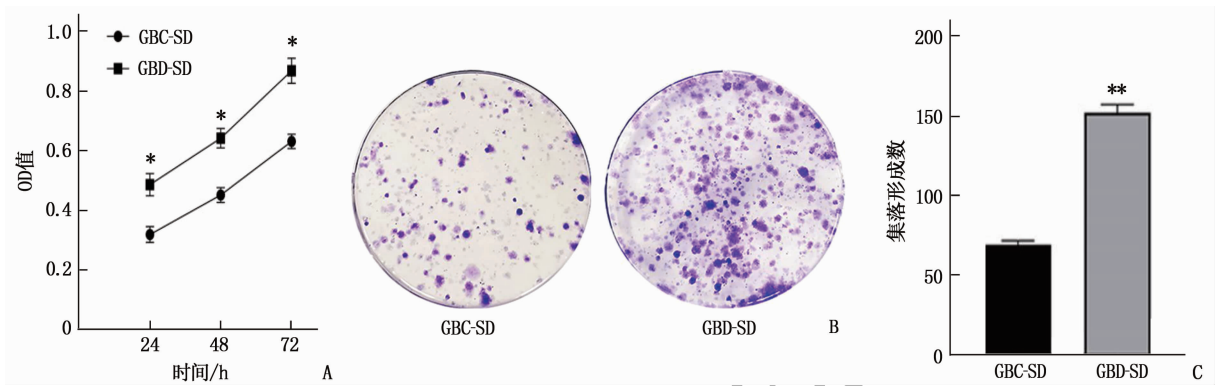
2.3 HPSE 过表达对 PI3K/AKT 信号通路的影响

通过 Western blot 检测发现,与 GBC-SD 组细

胞相比,GBD-SD 组细胞 p-AKT、p-PI3K 蛋白表达水平、p-AKT/AKT 值和 p-PI3K/PI3K 值增加,差异有统计学意义(*P* < 0.01),而总 AKT 和总 PI3K 蛋白表达水平无明显变化。上述结果提示上调 GBC-SD 细胞中 HPSE 基因的表达可以促进 PI3K/AKT 信号通路的活化。见图 3。

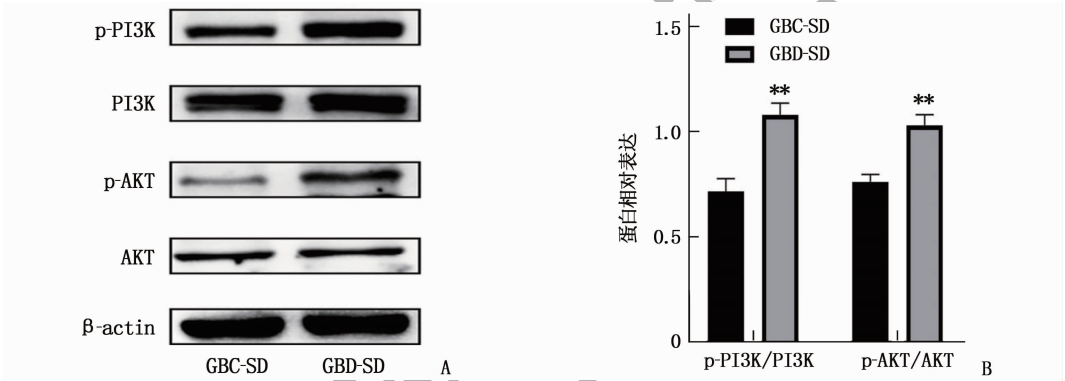
2.4 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 对胆囊癌细胞系 GBC-SD 细胞增殖的影响

为进一步探索 HPSE 是否通过 PI3K/AKT 信号通路促进胆囊癌细胞系 GBC-SD 细胞的增殖,本研究将 PI3K 特异性抑制剂 LY294002(10 μmol/L)处理 GBC-SD 细胞 2 d 后,通过 MTT 法和集落形成实验分析 GBC-SD 组和 LY294002 组细胞的增殖情况。结果显示, GBC-SD 组和 LY294002 组中细胞的 OD 值分别为(0.53 ± 0.05)、(0.32 ± 0.01),



A: MTT 检测结果; B: 细胞集落形成实验结果; C: 菌落计数结果。与 GBC-SD 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 HPSE 过表达对 GBC-SD 细胞增殖的影响



A: Western blot 检测结果; B: p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达情况。与 GBC-SD 比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 HPSE 过表达对 PI3K/AKT 信号通路的影响

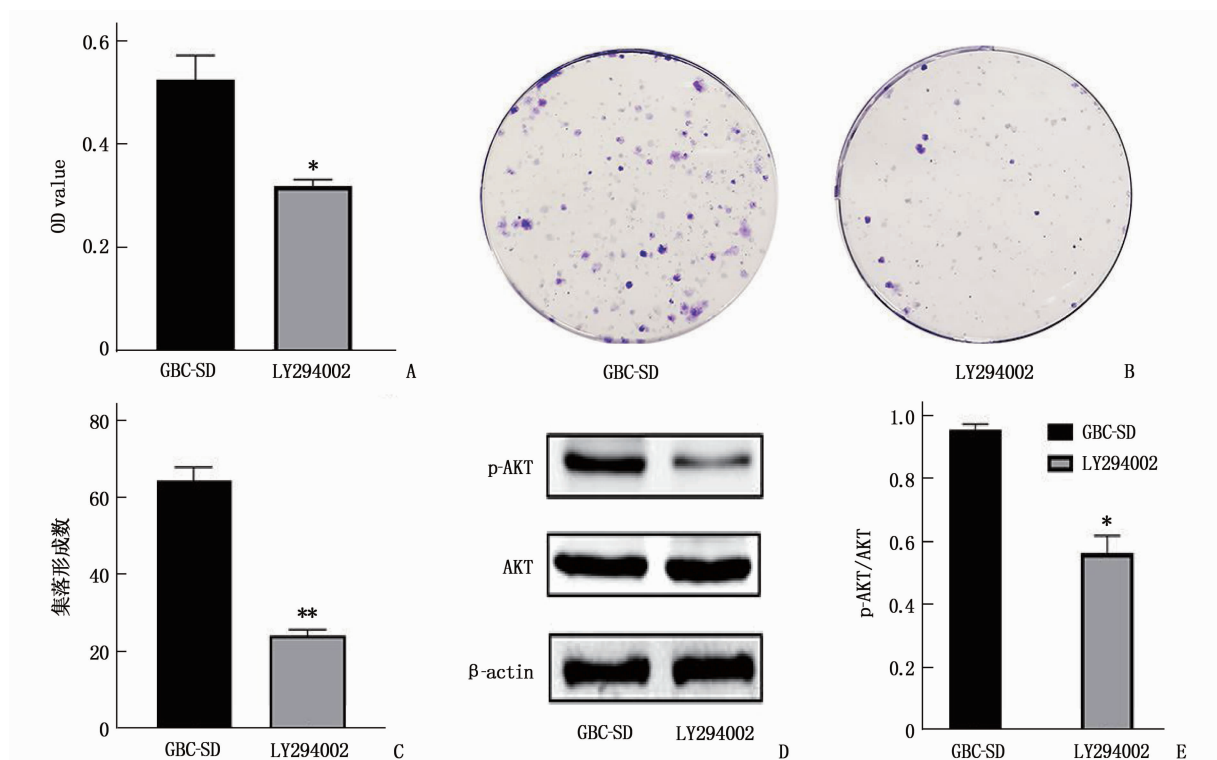
差异有统计学意义($P < 0.05$)。集落形成实验结果表明, GBC-SD 组和 LY294002 组中细胞在培养 14 d 后集落形成率分别为 (64.67 ± 3.51) 、 $(24.33 \pm 1.53)\%$, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。Western blot 检测 2 组细胞 p-AKT 和 AKT 蛋白表达情况, 结果显示 GBC-SD 组和 LY294002 组中细胞 p-AKT/AKT 分别为 (0.96 ± 0.02) 、 (0.57 ± 0.06) , 差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明, 抑制剂 LY294002 能够抑制 GBC-SD 细胞的增殖, HPSE 促进 GBC-SD 细胞的增殖可能与 PI3K/AKT 通路有关。见图 4。

3 讨论

目前, 胆囊癌在胆道恶性肿瘤中所占比率约为 90%, 其整体发病率约为 1%^[10]。积极寻找胆囊癌发生发展及侵袭转移的分子机制, 对于胆囊癌早期诊断、干预及治疗意义重大。HPSE 基因在正常人的组织内主要分布在胎盘、淋巴器官等免疫组织, 而在肿瘤尤其是恶性肿瘤组织中却有着广泛的分布。HPSE 是唯一的一种能够水解蛋白多糖的 HS 链的酶, 其特定的糖苷键是细胞外基质和细胞表面的关键组成部分^[11]。肿瘤细胞突破

由基底膜(BM)和 ECM 组成的天然屏障是其进展和转移的关键过程。

在肿瘤发生发展过程中, HPSE 对 HS 的降解与细胞表面和细胞外基质重塑以及 HS 结合信号分子的释放有关, 可促使癌细胞生长、迁移、侵袭和血管生成^[12]。研究^[13]表明, HPSE 基因表达与胃癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤等恶性肿瘤的生长有关, 例如 HPSE 在人膀胱的尿道上皮癌中过表达, 并且 HPSE 的表达水平与膀胱癌的复发相关^[14]。BARASH U 等^[15]研究发现 HPSE 的过度表达促进了胶质瘤细胞的侵袭和生长, 表明 HPSE 不仅具有促进胶质瘤细胞局部侵袭的酶活性, 而且还促进了胶质瘤病灶的生长。研究^[16-17]报道抑制 HPSE 的表达可抑制乳腺癌、肝癌、膀胱癌等肿瘤细胞的侵袭、迁移和黏附能力。PI-88^[18]、SST0001^[19]、M402^[20]等 HPSE 抑制剂为肿瘤的治疗提供了多种选择。研究^[8, 21]显示, HPSE 在胆囊癌组织中表达异常, 与胆囊癌的进展有关, 作者前期研究中发现上调 HPSE 基因可以显著促进胆囊癌细胞的增殖。但目前关于 HPSE 在胆囊癌增殖方面的调控机制并不明确, 揭示其潜在的分子机制对胆囊癌的诊断及针对基因方面的治疗具有重要意义。



A: MTT 检测结果; B: 细胞集落形成实验结果; C: 菌落计数结果; D: Western blot 检测结果; E: p-AKT/AKT 值。
与 GBC-SD 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 PI3K/AKT 信号通路抑制剂对 GBC-SD 细胞增殖的影响

近年来,研究^[22-24]显示 PI3K/AKT 通路是一种参与人体细胞周期调控的关键信号通路,细胞静止、增殖和癌细胞活力之间存在直接关系,该信号通路的过度激活已被证明有助于各种人类恶性肿瘤的增殖和进展。当 PI3K/AKT 信号通路被各种细胞因子和生长因子激活后作用于 PI3K 促进二磷酸腺苷转化为三磷酸肌醇,进而导致 PI3K/AKT 信号通路的下游作用因子 AKT 的激活,使得 p-AKT 比率升高,调控其下游分子,从而参与胰腺癌、乳腺癌、胃肠道肿瘤和黑色素瘤等多种肿瘤细胞的增殖和凋亡过程^[25-28]。成纤维细胞生长因子 2(FGF2)是上皮间质转换(EMT)的关键触发因子。作者前期研究^[8]已经证实 HPSE 通过其酶活性切割硫酸乙酰肝素蛋白多糖的 HS 侧链,刺激 FGF2 等生长因子和细胞因子的释放,进而诱导胆囊癌细胞发生 EMT,增强其增殖及迁移能力。有研究^[29-30]分析表明 HPSE 的上调可显著促进 FGF2 的表达,相反,观察到 HPSE 沉默介导 FGF2 的减少,HPSE 能够通过上调 FGF2 的表达而激活 PI3K/AKT 信号通路,诱导肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移。由此可见,FGF2 是联系 HPSE 和 PI3K/AKT 信号通路最重要的细胞生长因子,过表达 HPSE 可能通过 PI3K/AKT 信号通路促进肿瘤细

胞的增殖。

鉴于 PI3K/AKT 信号通路对癌细胞的生长、侵袭和转移至关重要,作者分析了过表达 HPSE 对 PI3K/AKT 信号通路的作用。本研究结果表明,与正常表达 HPSE 的 GBC-SD 细胞相比,过表达 HPSE 可显著提高 p-PI3K、p-AKT 的蛋白水平并促进了胆囊癌细胞的增殖,但 PI3K、AKT 总量无显著变化,提示 HPSE 可以激活 GBC-SD 细胞的 PI3K/AKT 通路。为了证实上述结果,作者使用 LY294002 处理 GBC-SD 细胞,观察到 LY294002 处理后对 p-PI3K、p-AKT 蛋白水平有明显的抑制作用。但与未经抑制剂处理的 GBC-SD 细胞相比,总 PI3K、AKT 的蛋白水平仍无显著变化。由此可见,HPSE 能够促进胆囊癌细胞的增殖,而 LY294002 可抑制 HPSE 的促增殖作用。

综上所述,本研究证实了 PI3K/AKT 信号通路在过表达 HPSE 促进人胆囊癌细胞系 GBC-SD 细胞增殖过程中起着关键的调控作用,为 HPSE 在人胆囊癌的治疗提供了新的分子靶点和用药新思路。

参考文献

- [1] 滕世峰,李新星,张言言,等. 胆囊癌组织中 TROP2、PTEN 和 p-AKT 的表达及其临床意义[J]. 肝胆胰外科杂

- 志, 2017, 29(1): 46–50.
- [2] MATSUSHITA S, ONISHI H, NAKANO K, *et al.* Hedgehog signaling pathway is a potential therapeutic target for gallbladder cancer[J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(3): 272–280.
- [3] ZONG H J, YIN B B, ZHOU H D, *et al.* Inhibition of mTOR pathway attenuates migration and invasion of gallbladder cancer via EMT inhibition[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4507–4512.
- [4] BARASH U, LAPIDOT M, ZOHAR Y, *et al.* Involvement of heparanase in the pathogenesis of mesothelioma: basic aspects and clinical applications[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2018, 110(10): 1102–1114.
- [5] HERMANO E, GOLDBERG R, RUBINSTEIN A M, *et al.* Heparanase accelerates obesity-associated breast cancer progression[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(20): 5342–5354.
- [6] PURUSHOTHAMAN A, SANDERSON R D. Heparanase: a dynamic promoter of myeloma progression[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1221: 331–349.
- [7] CASSINELLI G, LANZI C. Heparanase: a potential therapeutic target in sarcomas[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1221: 405–431.
- [8] 刘子祥, 周少波, 张子艳. 过表达乙酰肝素酶促进胆囊癌细胞系 GBC-SD 的增殖和迁移[J]. *基础医学与临床*, 2020, 40(2): 198–202.
- [9] POLIVKA J Jr, JANKU F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2): 164–175.
- [10] MILLER K D, GODING SAUER A, ORTIZ A P, *et al.* Cancer statistics for hispanics/latinos, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 425–445.
- [11] RIVARA S, MILAZZO F M, GIANNINI G. Heparanase: a rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases[J]. *Future Med Chem*, 2016, 8(6): 647–680.
- [12] GROULT H, COUSIN R, CHOT-PLASSOT C, *et al.* Λ -carrageenan oligosaccharides of distinct anti-heparanase and anticoagulant activities inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell migration[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(3): E140.
- [13] LIU L P, SHENG X P, SHUAL T K, *et al.* *Helicobacter pylori* promotes invasion and metastasis of gastric cancer by enhancing heparanase expression[J]. *World J Gastroenterol*, 2021, 27(22): 3138–3141.
- [14] TATSUMI Y, MIYAKE M, SHIMADA K, *et al.* Inhibition of heparanase expression results in suppression of invasion, migration and adhesion abilities of bladder cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): E3789.
- [15] BARASH U, SPYROU A, LIU P, *et al.* Heparanase promotes glioma progression via enhancing CD24 expression[J]. *Int J Cancer*, 2019, 145(6): 1596–1608.
- [16] LI Y, LIU H, HUANG Y Y, *et al.* Suppression of endoplasmic Reticulum stress-induced invasion and migration of breast cancer cells through the downregulation of heparanase[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(5): 1234–1242.
- [17] CHEN X P, LUO J S, TIAN Y, *et al.* Downregulation of heparanase expression results in suppression of invasion, migration, and adhesion abilities of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 241983.
- [18] LIU C J, CHANG J, LEE P H, *et al.* Adjuvant heparanase inhibitor PI-88 therapy for hepatocellular carcinoma recurrence[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(32): 11384–11393.
- [19] RITCHIE J P, RAMANI V C, REN Y S, *et al.* SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1382–1393.
- [20] ZHOU H, ROY S, COCHRAN E, *et al.* M402, a novel heparan sulfate mimetic, targets multiple pathways implicated in tumor progression and metastasis[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21106.
- [21] JIN H, CUI M. Gene silencing of heparanase results in suppression of invasion and migration of gallbladder carcinoma cells[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(7): 1116–1122.
- [22] JIN D, YANG J P, HU J H, *et al.* MCP-1 stimulates spinal microglia via PI3K/Akt pathway in bone cancer pain[J]. *Brain Res*, 2015, 1599: 158–167.
- [23] PETRULEA M S, PLANTINGA T S, SMIT J W, *et al.* PI3K/Akt/mTOR: a promising therapeutic target for non-medullary thyroid carcinoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(8): 707–713.
- [24] WANG L, GAO C, YAO S K, *et al.* Blocking autophagic flux enhances matrine-induced apoptosis in human hepatoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(12): 23212–23230.
- [25] EBRAHIMI S, HOSSEINI M, SHAHIDSALES S, *et al.* Targeting the Akt/PI3K signaling pathway as a potential therapeutic strategy for the treatment of pancreatic cancer[J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24(13): 1321–1331.
- [26] BAHRAMI A, KHAZAEI M, SHAHIDSALES S, *et al.* The therapeutic potential of PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer: rationale and progress[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 213–222.
- [27] DUAN Y, HAYBAECK J, YANG Z H. Therapeutic potential of PI3K/AKT/mTOR pathway in gastrointestinal stromal tumors: rationale and progress[J]. *Cancers*, 2020, 12(10): 2972.
- [28] PRAMANIK K C, KUDUGUNTI S K, FOFARIA N M, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester suppresses melanoma tumor growth by inhibiting PI3K/AKT/XIAP pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(9): 2061–2070.
- [29] VLODAVSKY I, BAR-SHAVIT R, ISHAI-MICHAELI R, *et al.* Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism[J]. *Trends Biochem Sci*, 1991, 16(7): 268–271.
- [30] CHEN X D, ZHAO H C, CHEN C Z, *et al.* The HPA/SDC1 axis promotes invasion and metastasis of pancreatic cancer cells by activating EMT via FGF2 upregulation[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(1): 211–220.