AntagomiR-103 协同阿霉素对 TGF-β1 诱导的 HepG2 细胞转化及生长的影响*

王金利[1]，张 敏[2**]
（1. 无锡市惠山区人民医院，江苏 无锡 214187；2. 贵州医科大学，贵州 贵阳 550004）

［摘 要］**目的**：探讨 antagomiR-103 协同阿霉素（ADM）对 TGF-β1 诱导肝癌细胞（Hep G2）发生上皮－间质细胞转化（EMT）及 Hep G2 细胞存活率的影响。**方法**：Hep G2 细胞体外培养，设为 control 组、TGF-β1 组、TGF-β1 + ADM 组、TGF-β1 + microRNA inhibitor N. C 组、TGF-β1 + ADM + microRNA inhibitor N. C 组、TGF-β1 + antagomiR-103 组、TGF-β1 + ADM + antagomiR-103 组及使用 western-blot 检测 EMT 标志蛋白 N-Cadherin、E-Cadherin、vimentin 的表达水平；设 control 组、TGF-β1 组、antagomiR-103 组、TGF-β1 + antagomiR-103 组，用不同浓度的 ADM 作用于各组细胞 24 h，使用 MTT 法检测细胞存活率，并计算 IC50。**结果**：与 control 组相比，antagomiR-103 + ADM 组 E-Cadherin 表达上调，N-Cadherin、Vimentin 表达下调；细胞存活率随 ADM 浓度的增高而逐渐降低；在 ADM 浓度相同的条件下，不同药物预处理组之间进行比较，当 ADM 浓度为 25 mg/L 时，antagomiR-103 + ADM 组的细胞存活率明显低于其他组。**结论**：antagomiR-103 联合 ADM 可抑制 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活。

［关键词］药物疗法，联合；肝肿瘤；细胞；antagomiR-103；阿霉素；上皮细胞－间充质细胞转换；TGFβ-1
［中图分类号］R329.25；R575.2 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707(2016)12-1424-06
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.12.013

Effects of AntagomiR-103 and ADM on TGF-β1 Induced EMT and Growth of Hep G2 Cell

WANG Jinli[1], ZHANG Min[2]
(*1. the People's Hospital of Huishan District, Wuxi 214187, Jiangsu, China; 2. Department of Pharmacology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To investigate the effect of antagomir-103 synergized by ADM on epithelial mesenchymal transition (EMT) in Hep G2 induced by TGF-β1 and on the cell survival rate of and Hep G2 cells. **Methods**: Hep G2 cells were cultivated in DMEM with 10% fetal calf serum and divided into the control group, the TGF-β1 group, TGF-β1 + ADM group, TGF-β1 + microRNA inhibitor N. C group, TGF-β1 + ADM + microRNA inhibitor N. C group, the TGF-β1 + antagomiR-103 group, and the TGF-β1 + ADM + antagomiR-103 group. Western-blot was adopted to detect the expression level of EMT, E-cadherin, vimentin and N-cadherin in all these groups. On the other hand, the Hep G2 cells were also divided into the control group, TGF-β1group, antagomiR-103 group, TGF-β1 + antagomiR-103. With different concentrations of ADM on each above group for 24 h, MTT method was used to detect cell survival rate, and IC 50 was calculated. **Results**: Compared with control group, the expression of E-cadherin was up-regulated in antagomiR-103 + ADM group, while N-cadherin, vimentin expression was down regulated. The cell survival rate decreased with the increase of ADM concentration. The cell survival rate of antagomiR-103 + ADM group was significantly lower than that of the

*［基金项目］贵阳市科技局基金项目［(2011103)17 号］
**通信作者 E-mail：1071632869@qq.com
网络出版时间：2016－12－15 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161215.1534.010.html

other groups at the same ADM concentration and when the ADM concentration was 25 mg/L. **Conclusion**: antagomiR-103 combined with ADM can inhibit transformation of TGF-β1 induced EMT and growth of Hep G2 cell.

[**Key words**] drug therapy, combination; liver neoplasms; cells; antagomiR-103; adriamycin; epithelial-mesenchymal transitions; TGFβ-1

目前临床上治疗肝癌一般采取手术为主,辅以化疗的综合治疗方案[1],化疗药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡而达到治疗效果,但肿瘤细胞容易对化疗药物产生多药耐药性导致化疗失败[2]。临床常用于治疗肝癌的化疗药物阿霉素(doxorubicin, ADM)是一种周期非特异性抗癌化疗药,对各期细胞均有很强的细胞毒性作用,其作用机制是通过插入并解开 DNA 的双螺旋链,改变 DNA 的模板性质,抑制 DNA 聚合酶,从而抑制细胞 DNA 和 RNA 合成[3-4]。邓立力等[5]发现,ADM 可以促进细胞表面死亡受体的表达,诱导肝癌细胞凋亡,肝癌患者在长期使用 ADM 后很容易产生耐药性。有研究发现,在肿瘤发生上皮-间质细胞转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)过程中,miRNA 作为具有调控功能的小分子 RNA 与肿瘤对化疗药物的反应有密切联系[6]。本实验通过微小 RNA(microRNA, miRNA)干扰技术,设计合成 miRNA-103 的阻断试剂 antagomiR-103,对肝癌细胞(Hep G2)进行干预,将 antagomiR-103 与 ADM 共同作用于 Hep G2 细胞,观察两者对肿瘤细胞存活率的影响,检测 EMT 标志蛋白 N-Cadherin、E-Cadherin、vimentin 的表达变化。

1　材料与方法

1.1　材料与设备

人肝癌细胞系 Hep G2 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库,胎牛血清为 HyClone 公司产品,DMEM 培养基为 Gibco 公司产品,胰蛋白酶为美国 Ameresco 公司产品,antagomiR-103、antagomiRNA-MUT、has-miR-103、microRNA mimics N. C、microRNA inhibitor N. C 由上海吉玛制药技术有限公司设计合成,阿霉素为深圳万乐药业有限公司产品,E-Cadherin、N-CadherinBioworld 和 Vimentin 抗体均购自 Bioworld 生物科技有限公司,其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。超净工作台(SW-CJ-2FD,苏州净化设备有限公司),倒置显微镜(CKX41,日本 Olympus 公司),超低温冰箱(MDF-382E,日本 SANYO 公司),恒温 CO2 培养箱(Model 310,美国 Thermo 公司),全自动雪花制冰机(IMS-40,常熟市雪科电器有限公司)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　人肝癌细胞株 HepG2 使用 10% 胎牛血清(FBS)+DMEM 培养基混合液,置于 37 ℃、CO_2 体积分数为 5% 孵箱中培养,将 2×10^7/mL 的 Hep G2 细胞接种于 6 cm 培养皿中,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 置于 5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后,更换无酚红无血清的 DMEM 培养 2 h,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM,继续培养 24、48 h 后收集细胞,完成后续试验。

1.2.2　EMT 标志蛋白 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 检测　将体外培养的 Hep G2 细胞分为 control 组、TGF-β1 组、TGF-β1 + ADM 组、TGF-β1 + microRNA inhibitor N. C 组、TGF-β1 + ADM + microRNA inhibitor N. C 组、TGF-β1 + antagomiR-103 组及 TGF-β1 + ADM + antagomiR-103 组;收集培养细胞,加入全细胞裂解液每皿 80 μL, -20 ℃、14 000 r/min离心 20 min;收集上清,BCA 法测定蛋白浓度,取 30 μg 总蛋白行 SDS-PAGE 电泳,在 300 mA、1 h 的条件下将蛋白转移至 PVDF 膜,用 5 g/L脱脂奶粉 TBST 稀释液封闭 1 h 后用 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 和 GAPDH 抗体 4 ℃孵育过夜,用 TBST 洗涤后加入相应二抗孵育 2 h 后 ECL 法进行显影,检测 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 蛋白的表达。

1.2.3　细胞增殖能力　对数生长期的 Hep G2 细胞用 0.25% 的胰酶消化后,以细胞浓度为 8×10^3/mL 接种于 96 孔板内,每张板设空白调零组、阴性对照组、ADM 组、ADM + TGF-β1 组、ADM + antagomiR-103 组及 ADM + TGF-β1 + antagomiR-103 组;ADM 设 8 个药物浓度(C_1~C_8)分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.56、0.78 mg/L; ADM + TGF-β1 组为加入上述 C_1~C_8 的 ADM 和 5 μg/L TGF-β1,ADM + antagomiR-103 组为加入上述 C_1~C_8 的 ADM 和 100 nmol/L antagomiR-103,ADM + TGF-β1 + antagomiR-103 组为加入上述 C_1~C_8 的 ADM 和 100 nmol/L antagomiR-103 及 5 μg/L TGF-

β1;每组均设 6 个复孔。细胞加药后继续培养 48 h,弃去培养液,向各孔加入 MTT 液,使细胞与 0.25% MMT 在 37 ℃、5% CO_2孵箱中继续培养 4 h,弃去上清液,加入 DMSO 200 μL 低速振荡 10 min,结晶震荡溶解后,通过酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔光密度,计算 IC_{50}值。

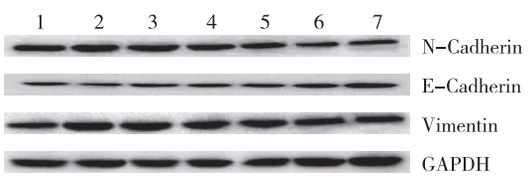
1.3 统计学分析

实验重复 3 次,对实验结果使用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析。实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较用 1way ANOVA,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 N-Cadherin、E-Cadherin、vimentin 表达

western-blot 结果显示,与 control 组细胞相比,TGF-β1 组中 N-Cadherin、Vimentin 表达上调、E-Cadherin 表达下调;与 TGF-β1 组细胞相比,TGF-β1 + antagomiR-103 组中 N-Cadherin、Vimentin 表达下调、E-Cadherin 表达上调;TGF-β1 + ADM + antagomiR-103 组中 N-Cadherin、Vimentin 表达下调、E-Cadherin 表达上调;差异有统计学意义($P < 0.05$)。这些结果说明 antagomiR-103 与 ADM 共同作用于 TGF-β1 诱导的 Hep G2 细胞,可以明显抑制细胞发生 EMT。



注:1 为 control 组,2 为 TGF-β1 组,3 为 TGF-β1 + ADM 组,4 为 TGF-β1 + microRNA inhibitor N. C 组,5 为 TGF-β1 + ADM + microRNA inhibitor N. C 组,6 为 TGF-β1 + antagomiR-103 组,7 为 TGF-β1 + ADM + antagomiR-103 组

图 1　各实验组 EMT 相关蛋白的表达(western blot)

Fig. 1　Expression of EMT related protein in each experimental group

2.2 ADM 对 Hep G2 细胞存活率的影响

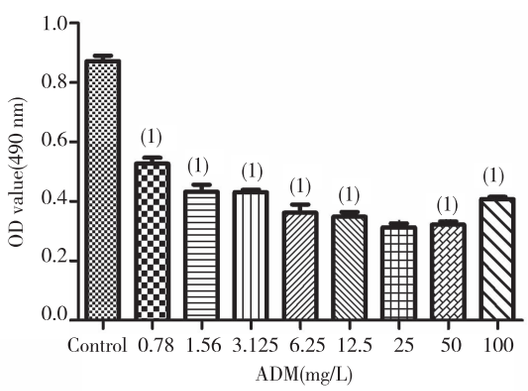
将 Hep G2 细胞分为 control 组、8 个不同浓度 ADM 组,体外培养 24 h 后,使用 MTT 法检测不同浓度 ADM 对 Hep G2 细胞存活率的影响。结果显示,与 control 组细胞相比,随着 ADM 浓度的增高,细胞存活率随之显著减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。当 ADM 浓度增高至 50、100 mg/L 时,HepG2 细胞存活率与其他剂量组相比略有增高,原因不明。经统计学分析计算得出 ADM 的半数抑制浓度(IC_{50})为 6.699 mg/L,见图 2。

表 1　ADM 对 Hep G2 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 1　The negative effect of ADM on Hep G2 cell survival

组别	ADM(mg/L)	OD_{490}	Survival ratio(%)
control	0.00	0.871 7 ± 0.046 1	100.0
ADM	0.78	0.527 3 ± 0.047 4	60.5 ± 8.9(1)
	1.56	0.433 2 ± 0.055 6	49.7 ± 6.8(1)
	3.13	0.431 3 ± 0.020 4	49.5 ± 1.5(1)
	6.25	0.361 7 ± 0.068 7	41.5 ± 7.5(1)
	12.50	0.348 7 ± 0.038 7	40.0 ± 3.6(1)
	25.00	0.313 0 ± 0.032 3	35.9 ± 2.3(1)
	50.00	0.322 5 ± 0.024 7	37.0 ± 4.0(1)
	100.00	0.407 8 ± 0.019 6	46.8 ± 4.6(1)

(1) 与 control 组比较,$P < 0.01$



注:(1) 与 control 组比较,$P < 0.01$

图 2　ADM 对 Hep G2 细胞存活率的影响

Fig. 2　The negative effect of ADM on Hep G2 cell survival

2.3 ADM 对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响

用 TGF-β1(5 μg/L)诱导 Hep G2 细胞发生 EMT,同时给予不同浓度 ADM 处理细胞 24 h,MTT 法检测 ADM 对细胞存活率的影响。结果显示,与 TGF-β1 组相比,细胞存活率明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。经统计学分析计算,ADM 的 IC_{50}为 8.698 mg/L,是 ADM 作用于未发生 EMT 的 Hep G2 细胞的 IC_{50}的 1.3 倍,提示 ADM 对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞的作用减弱,促进细胞凋亡的能力降低,当 ADM 浓度增高至 50、100 mg/L 时,细胞存活率与其他剂量组相比

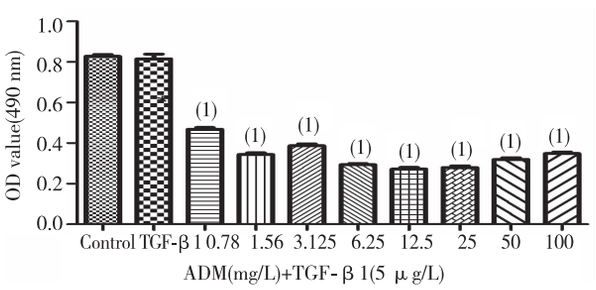
略有增高,见图 3。

表 2　ADM 对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 2　The negative effect of ADM on TGF-β1 induced EMT's Hep G2 cell survival

Group	ADM(mg/L)	OD_{490}	Survival ratio(%)
control	0	0.815 8 ± 0.055 3	100.0
TGF-β1(5 μg/L)	0	0.827 8 ± 0.228 9	102.2 ± 1.0
ADM + TGF-β1	0.78	0.467 5 ± 0.023 6	57.3 ± 6.0(1)
(5 μg/L)	1.56	0.343 5 ± 0.020 1	42.1 ± 2.3(1)
	3.13	0.387 5 ± 0.021 7	47.5 ± 3.0(1)
	6.25	0.293 7 ± 0.014 7	36.0 ± 2.3(1)
	12.50	0.271 7 ± 0.021 7	33.3 ± 3.4(1)
	25.00	0.279 8 ± 0.020 4	34.3 ± 2.7(1)
	50.00	0.319 3 ± 0.021 8	37.5 ± 3.6(1)
	100.00	0.349 2 ± 0.017 8	42.8 ± 5.1(1)

注:(1)与 control 组比较,$P<0.01$



注:(1)与 control 组比较,$P<0.01$

图 3　ADM 对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响

Fig. 3　The negative effect of ADM on TGF-β1 induced EMT's Hep G2 cell survival

2.4　antagomiRNA-103 与 ADM 共同作用对 Hep G2 细胞存活率的影响

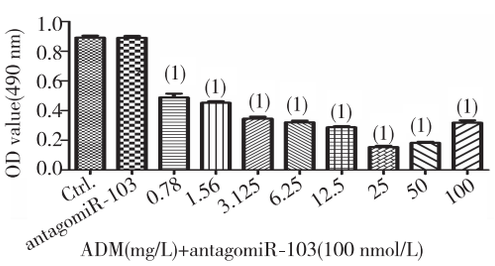
用 antagomiR-103(100 nmol/L)和 8 个不同浓度的 ADM 共同作用于 Hep G2 细胞 24 h,MTT 法检测 ADM 对 Hep G2 细胞存活率的影响。结果显示,与 antagomiR-103 组相比,ADM + antagomiR-103 组的细胞存活率明显下降($P<0.01$),见表 3。经统计学分析计算,ADM 和 antagomiR-103 共同作用于 Hep G2 细胞,其 IC_{50} 为 3.826 mg/L,与 ADM 单独作用于 Hep G2 细胞的 IC_{50} 相比明显降低,ADM 组中 ADM 的 IC_{50} 是 ADM + antagomiR-103 组中 ADM 的 IC_{50} 的 1.75 倍,ADM + TGF-β1 组中 ADM 的 IC_{50} 是 ADM + antagomiR-103 组中 ADM 的 IC_{50} 的 2.27 倍,见图 4。提示 antagomiR-103 可以促进 ADM 诱导的细胞凋亡,两者有协同作用。当 ADM 浓度增高至 50、100 mg/L 时,细胞存活率与其他剂量组相比略有增高。

表 3　antagomiR-103 与 ADM 共同作用对 Hep G2 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 3　The negative effect of antagomiR-103 and ADM on Hep G2 cell survival

Group	ADM(mg/L)	OD_{490}	Survival ratio(%)
control	0	0.892 5 ± 0.032 6	100.0
antagomiR-103 (100 nmol/L)	0	0.890 5 ± 0.030 3	99.8 ± 4.2
ADM + antagomiR-103(100 nmol/L)	0.78	0.489 0 ± 0.063 7	54.8 ± 7.0(1)
	1.56	0.452 7 ± 0.025 7	50.7 ± 3.8(1)
	3.13	0.346 3 ± 0.033 2	38.8 ± 4.4(1)
	6.25	0.321 3 ± 0.027 9	36.0 ± 4.2(1)
	12.50	0.288 3 ± 0.018 3	32.3 ± 2.4(1)
	25.00	0.154 5 ± 0.019 9	17.3 ± 2.3(1)
	50.00	0.183 0 ± 0.018 7	20.5 ± 2.2(1)
	100.00	0.318 5 ± 0.038 6	35.7 ± 5.3(1)

(1)与 antagomiR-103 组相比,$P<0.01$



(1)与 antagomiR-103 组相比,$P<0.01$

图 4　antagomiR-103 与 ADM 共同作用对 Hep G2 细胞存活率的影响

Fig. 4　The negative effect of antagomiR-103 and ADM on Hep G2 cell survival

2.5　antagomiR-103 与 ADM 共同作用对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响

用 antagomiR-103(100 nmol/L)和 8 个不同浓度的 ADM 共同作用于 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞 24 h,MTT 法检测 antagomiR-103 与 ADM 对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响。结果显示,与 control 组、antagomiR-103 + TGF-β1 组相比,ADM + antagomiR-103 + TGF-β1 组的细胞存活率明显下降($P<0.01$),见表 4。经统计学分析计算,ADM 和 antagomiR-103 共同作用于 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞,ADM 的 IC_{50} 为 3.913 mg/L,与 ADM 单独作用

于 Hep G2 细胞时 ADM 的 IC_{50} 相比明显降低，ADM 组中 ADM 的 IC_{50} 是 ADM + antagomiR-103 + TGF-β1 组中 ADM 的 IC_{50} 的 1.71 倍；ADM + TGF-β1 组中 ADM 的 IC_{50} 是 ADM + antagomiR-103 + TGF-β1 组中 ADM 的 IC_{50} 的 2.22 倍，见图 5。提示 antagomiR-103 与 ADM 共同作用于 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞，可以促进细胞凋亡，两者有协同作用。当 ADM 浓度增高至 50、100 mg/L 时，细胞存活率与其他剂量组相比略有增高。

表 4　antagomiR-103 与 ADM 共同作用对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Tab. 4　The negative effect of antagomiR-103 and ADM on TGF-β1 induced EMT's Hep G2 cell survival

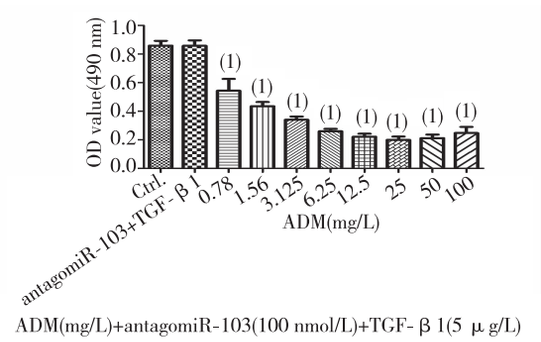
Group	ADM(mg/L)	OD_{490}	Survival ratio(%)
control	0	0.858 7 ± 0.033 2	100.0
antagomiR-103 (100 nmol/L) + TGF-β1(5 μg/L)	0	0.857 7 ± 0.037 4	99.9 ± 6.3
ADM + antagomiR-103(100 nmol/L) + TGF-β1(5 μg/L)	0.78	0.543 3 ± 0.081 9	63.3 ± 9.3(1)
	1.56	0.434 5 ± 0.029 2	50.6 ± 2.4(1)
	3.13	0.339 3 ± 0.022 7	39.5 ± 3.0(1)
	6.25	0.258 5 ± 0.017 7	36.0 ± 3.5(1)
	12.50	0.221 2 ± 0.021 3	30.1 ± 3.6(1)
	25.00	0.198 8 ± 0.022 9	23.2 ± 3.3(1)
	50.00	0.211 3 ± 0.024 6	24.6 ± 2.8(1)
	100.00	0.246 8 ± 0.042 5	28.7 ± 5.7(1)

(1) 与 antagomiR-103 + TGF-β1 组相比，$P < 0.01$

3　讨论

EMT 的发生与多种因素有关，受到多种细胞调控因子的调控，如 TGF-β[7]、FGF[8]、EGF[9] 等，可以诱导 EMT 的发生，也可以引起肿瘤细胞的增殖。Akhurst RJ[10] 研究发现，肿瘤细胞系被转入外源性 TGF-β1 后都出现不同程度的上皮表型缺失，获得侵袭特征，阻碍 TGF-β 受体可以阻止 EMT 的发生和肿瘤细胞侵袭。ADM 是一种广谱、高效抗肿瘤的蒽环类化合物，对各期细胞有很强的细胞毒性作用，可破坏细胞膜的结构和功能，可以通过 *p*53 依赖或 *p*53 非依赖的途径来诱导细胞凋亡[11]，这可能是 ADM 引起细胞存活率下降的原因之一。

在本实验中，TGF-β1 诱导发生了 EMT 的 Hep G2 细胞存活率与对照组相比无明显差异，原因可



(1) 与 antagomiR-103 + TGF-β1 组相比，$P < 0.01$

图 5　antagomiR-103 与 ADM 共同作用对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 5　The negative effect of antagomiR-103 and ADM on TGF-β1 induced EMT's Hep G2 cell survival

能是 EMT 的抗凋亡作用，推测发生 EMT 的细胞激活了抗凋亡的信号通路或抗凋亡的因子生成，如 *Wnt*/β-连环素信号通路下游靶基因 *survivin*、*eyelin-DI*，可促进细胞周期进程、引起细胞增殖和抑制细胞凋亡[12]。但是细胞由上皮细胞表型转化为间质细胞表型，可能也是抗凋亡的一个关键因素。TGF-β1 可诱导肝脏实质细胞发生凋亡，存活下来的细胞发生 EMT，获得一定的抗凋亡活性[13]。

在本实验中，ADM 单独作用于 TGF-β1 诱导的 Hep G2 细胞，与 control 组、TGF-β1 组相比，EMT 的标志性蛋白 E-Cadherin、N-Cadherin 及 Vimentin 表达变化不明显，差异无统计学意义；antagomiR-103 与 ADM 共同作用于 TGF-β1 诱导的 Hep G2 细胞，与 TGF-β1 组相比，N-Cadherin 表达下调、E-Cadherin 表达上调、Vimentin 表达下调，差异有统计学意义（$P < 0.05$），这些结果表明，ADM 对 TGF-β1 诱导的 Hep G2 细胞发生 EMT 未表现出抑制作用，antagomiR-103 与 ADM 共同作用于 TGF-β1 诱导的 Hep G2 细胞，对细胞发生 EMT 有抑制作用。antagomiR-103 联合化疗药物 ADM 共同作用于 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞，使用 MTT 法检测 ADM 对 Hep G2 细胞存活率的影响，结果显示，细胞存活率随着 ADM 浓度的增高而降低，ADM 对 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞存活率的影响；细胞存活率随着 ADM 浓度的增高而降低，但与单独使用 ADM 组相比，在相同浓度 ADM 作用下，细胞存活率变化并无明显差异，可能与 TGF-β1 的增殖和诱导 EMT 的作用有关，an-

tagomiR-103 与化疗药物 ADM 共同作用于 Hep G2 细胞对其存活率的影响。结果显示,细胞存活率随着 ADM 浓度的增高而明显降低,在 ADM 浓度为 25 mg/L 时,与单独使用 ADM 组、单独使用 antagomiR-103 组细胞存活率相比明显降低($P<0.01$),有统计学意义;antagomiR-103 与 ADM 共同作用于 TGF-β1 诱导发生 EMT 的 Hep G2 细胞,MTT 检测细胞存活率,结果还显示,与 control 组、antagomiR-103 + TGF-β1 组相比,ADM + antagomiR-103 + TGF-β1 组的细胞存活率明显下降($P<0.01$)。

综上所述,antagomiR-103 对 TGF-β1 诱导的 Hep G2 细胞 EMT 的发生有抑制作用,与 ADM 共同作用于 Hep G2 细胞也明显引起细胞存活率降低,使 ADM 半数抑制浓度明显降低,这些结果的发现考虑可能与其它信号通路或 miRNA 协同、拮抗作用相关,但是具体的作用机制本实验尚未深入探讨,将在今后的实验中继续深入研究。利用 miRNA 的基因干预调控阻断肝癌细胞的 EMT,同时辅以化疗药物治疗肝癌具有很高的可行性,将对临床肝癌转移、复发的防治具有重大意义。这可能为揭秘肿瘤侵袭和转移的机制提供更为可靠的理论依据,为肿瘤患者的治疗带来新的希望。

4　参考文献

[1] 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2011(11):1141 - 1159.

[2] Philip J, Johnson. Systemic chemotherapy of liver tumors [J]. Semin Surg Oncol, 2000(2):116 - 124.

[3] Tomris O. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer[J]. FEBS Lett, 2006(12): 2903 - 2909.

[4] Perez EA. Impact, mechanisms, and novel chemotherapy strategies for overcoming resistance to anthracyclines and taxanes in metastatic breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2009(2):195 - 201.

[5] 邓立力,吕慧芳,王文秀,等. 阿霉素对肝癌细胞增殖及 TRAIL 受体表达影响的实验研究[J]. 中国肿瘤, 2011(7):515 - 520.

[6] 薛逸茎,曹雪涛. RNA 异常与肿瘤调控研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2013(1):1 - 12.

[7] Tanahashi T, Osada S, Yamada A, et al. Extracellular signal-regulated kinase and Akt activation play a critical role in the process of hepatocyte growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. [J]. Int J Oncol, 2013(2): 556 - 564.

[8] Nguyen L, Fifis T, Malcontenti-Wilson C, et al. Spatial morphological and molecular differences within solid tumors may contribute to the failure of vascular disruptive agent treatments. [J]. BMC Cancer, 2012(12):522.

[9] Alipio ZA, Jones N, Liao W, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) induced by bleomycin or TFG-β1/EGF in murine induced pluripotent stem cell-derived alveolar Type II-like cells[J]. Differentiation, 2011(2): 89 - 98.

[10] Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer-a double-edged sword[J]. Trends Cell Biol, 2001(11):44 - 51.

[11] Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, et al. MiR-122/cydinG1 interaction modulates p53 activity and afects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells [J]. Cancer Res, 2009(14):5761 - 5767.

[12] Robson EJ, Khaled WT, Abell K, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition confers resistance to apoptosis in three murine mammary epithelial cell lines[J]. Differentiation, 2006(5):254 - 264.

[13] Del Castillo G, Murillo MM, Alvarez-Barrientos A, et al. Autocrine production of TGF-beta confers resistance to apoptosis after an epithelial-mesenchymal transition process in hepatocytes: Role of EGF receptor ligands [J]. Exp Cell Res, 2006(15):2860 - 2871.

(2016-08-29 收稿,2016-11-06 修回)
中文编辑:刘　平;英文编辑:刘　华

(上接第 1423 页)

[11] Ganapathi SB, Wei SG, Zaremba A, et al. Functional regulation of ClC-3 in the migration of vascular smooth muscle cells[J]. Hypertension, 2013(1): 174 - 179.

[12] Zhang J, Liu J, Liao YJ, et al. ClC-3 is Involved in NPPB-Induced Apoptosis in DU145 Prostate Cancer Cells [J]. J MolBiomarkDiagn S, 2016(2): 245.

[13] Rohrbough J, Lamb FS, Nguyen HN. Regulation of ClC-3 Cl-/H + Transport and "Gating" Transients by Chloride Pathway Residues and External Protons[J]. Biophysical Journal, 2015(2): 440 - 441.

[14] Larrouture QC, Nelson DJ, Robinson LJ, et al. Chloride - hydrogen antiportersClC-3 and ClC-5 drive osteoblast mineralization and regulate fine - structure bone patterning in vitro [J]. Physiological reports, 2015 (11): e12607.

(2016-09-12 收稿,2016-11-26 修回)
中文编辑:刘　平;英文编辑:赵　毅