

过表达 mi RNA-21 对肾小管上皮细胞 TGF-β/Smad 信号通路 Smad 7 蛋白的影响\*

史秋香<sup>1</sup>, 吴艳峰<sup>2</sup>, 谢丽华<sup>3</sup>

(1. 吉林省公安消防总队长春支队卫生队, 吉林 长春 130061; 2. 吉林大学白求恩第二医院 呼吸与危重症医学科, 吉林 长春 130022; 3. 中南大学湘雅三医院, 湖南 长沙 410013)

[摘要]目的: 探究 miRNA-21 过表达对 TGF-β/Smad 信号通路 Smad7 蛋白的影响。方法: 采用 miRNA-21 过表达慢病毒载体和慢病毒空载体分别感染高糖和低糖培养的人肾近端小管上皮细胞 HK-2 细胞, 根据培养基类型和是否感染病毒将细胞分组为高糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、低糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、高糖空载组、低糖空载组、高糖细胞组和低糖细胞组, 用荧光倒置显微镜观察感染后表达绿色荧光蛋白 (GFP) 细胞数, 通过流式细胞术检测转染率; 采用实时荧光定量 PCR 检测感染后细胞 miRNA-21 的表达量, 采用 Western blot 检测 Smad7 蛋白的表达。结果: 感染 miRNA-21 过表达慢病毒后, 荧光显微镜下 HK-2 细胞有明显绿色荧光 (约为 60%), 感染率结果显示转染率 > 60%, 实时荧光定量 PCR 结果显示感染 miRNA-21 过表达慢病毒后, 高糖转染组细胞 mi RNA-21 表达量高于高糖细胞组和高糖空载组 ( $P < 0.05$ ); Weston blot 结果显示高糖转染组 Smad 7 蛋白的表达低于高糖转染空载病毒组、低糖细胞组、高糖细胞组 ( $P < 0.05$ )。结论: miRNA-21 可以通过抑制 Smad7 蛋白的表达来调控 TGF-β/Smad 信号通路。

[关键词] TGF-β/Smad 信号通路; Smad7 蛋白; miRNA-21; 慢病毒表达载体; HK-2 细胞; 实时荧光定量 PCR

[中图分类号] R692.9; R34-33 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)10-1134-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.10.005

The Effect of mi RNA-21 on TGF-β/Smad Signaling Pathway  
Smad 7 Protein in Renal Tubular Epithelial Cells

SHI Qiuxiang<sup>1</sup>, WU Yanfeng<sup>2</sup>, XIE Lihua<sup>3</sup>

(1. Changchun Health Team of Jilin Public Security Fire Brigade, Changchun 130061, Jilin, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine of Jilin University Bethune Second Hospital, Changchun 130022, Jilin, China; 3. Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410013, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of mi RNA-21 overexpression on TGF-β/Smad signaling pathway Smad7 protein. Methods: The miRNA-21 overexpression lentiviral vector was used to infect HK-2 cells cultured with high glucose and low sugar respectively. According to the type of culture medium and whether or not the virus was infected, the cells were divided into high glucose miRNA-21 overexpression lentivirus group, low glucose miRNA-21 overexpression lentiviral group, high glucose and empty virus group, low sugar empty virus group, high glucose cell group and low glucose cell group. The expression of green fluorescent protein (GFP) cells (green fluorescence) after infection was observed by fluorescence inverted microscope, and the transfection rate was detected by flow cytometry. The expression of miRNA-21 in infected cells was detected by real-time quantitative PCR, and the expression of Smad7 protein was detected by Western blot. Results: When infected with miRNA-21 overexpressing lentivirus, HK-2 cells showed significant green fluorescence (about 60%) un-

\*[基金项目] 国家自然科学基金 (81660810)  
网络出版时间: 2017-10-17 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20171017.2231.027.html>

der fluorescence microscope. The infection rate showed that transfection rate was 60% or more. The results of real-time quantitative PCR showed that the expression of miRNA-21 in the high glucose transfection group was higher than that in the high glucose cell group as well as the high glucose and empty virus group after infection with miRNA-21 overexpression lentivirus ( $P < 0.05$ ). The results of Western blot showed that the expression of Smad 7 protein in high glucose transfection group was lower than that in high glucose empty virus group, low sugar cell group and high glucose cell group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miRNA-21 can regulate the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway by inhibiting the expression of Smad7 protein.

[**Key words**] TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway; Smad7 protein; miRNA-21; lentivirus expression vector; HK-2 cell; real-time fluorescence quantification PCR

TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在人和多种生物的组织中均有发现,其主要功能包括通过自分泌和旁分泌途径转导细胞表面复杂的受体信号,调节细胞生长、分化、凋亡及黏附等功能<sup>[1-2]</sup>。近年的研究发现,TGF- $\beta$  超家族生长分化因子在胚胎发育、创伤修复、免疫功能、炎症反应、纤维化、骨形成和重建等方面发挥重要的作用<sup>[3-4]</sup>。Smad 是与果蝇 MAD 蛋白以及线虫中 Smad 蛋白具有同源性的蛋白质家族,可与其他 DNA 结合蛋白相互作用共同调节靶基因的转录<sup>[5-7]</sup>。Smad7 是一种抑制性 Smad,在 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路中抑制负反馈,Smad7 主要通过干扰 R-Smad (Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8) 及其磷酸化而抑制信号转导<sup>[8]</sup>。miRNA 是一类长度为 22 个核苷酸左右的短序列非编码 RNA,通过诱导翻译抑制或降解转录本来负向调控基因表达<sup>[9-10]</sup>。目前有很多研究发现 miRNA 与 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路有着复杂的关系,其中关于 miRNA-21 报道最多,但 miRNA-21 参与 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路具体调控的机制尚未明确<sup>[11]</sup>。课题组前期的研究发现,miRNA-21 与抑制性 Smad 蛋白 Smad7 的关系密切,但 miRNA-21 对 Smad7 的表达是否有调控作用有待研究。本研究采用已经构建的 miRNA-21 过表达慢病毒转染肾小管上皮细胞,用实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-21 表达量,用 Western blot 检测感染后细胞中 Smad7 的表达量,为进一步探究 miRNA-21 对 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路 Smad 7 蛋白调控的作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验用人肾近端小管上皮细胞 HK-2 细胞由

本实验室保存,miRNA-21 过表达慢病毒、空载体病毒购于上海吉凯生物有限公司,PVDF 膜购于 Hyclone 公司,DMEM 购于 Gibco 公司,胎牛血清购于 Life Technologies 公司,anti-Smad7、鼠二抗及兔二抗购于 Santa Cruz 公司,anti-GAPDH 抗体购于 Proteintech 公司,PCR 引物由上海生工公司合成,其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 根据实验需要分别使用高糖 DMEM 和低糖 DMEM 培养基培养细胞,两种培养基均加入 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和青链霉素双抗,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养。待细胞生长状态良好,开始应用于以下研究。

**1.2.2 细胞分组** 根据转染的慢病毒类型和培养基的类型不同,将 HK-2 细胞分为 6 组:高糖细胞组、低糖细胞组、高糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、低糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、高糖空载体组及低糖空载体组,高糖细胞组和低糖细胞组分别采用高糖培养基和低糖培养基常规培养;高糖 miRNA-21 过表达慢病毒组和低糖 miRNA-21 过表达慢病毒组分别采用高糖培养基和低糖培养基培养后根据预实验确定的 MOI 加入适量 miRNA-21 过表达慢病毒感染;高糖空载体组和低糖空载体组分别采用高糖培养基和低糖培养基培养后根据预实验确定的 MOI 加入适量空载体病毒进行感染。

**1.2.3 慢病毒感染** 接种 HK-2 细胞于 24 孔板中,密度约为  $1.3 \times 10^5$ /孔,感染时采用不加血清的培养基与 polybrene 混合物稀释病毒,控制 polybrene 浓度为 8 mg/L,病毒浓度为  $1 \times 10^{11}$  TU/L。

**1.2.4 病毒滴度和转染效率** 接种 293T 细胞于 24 孔板中,待细胞贴壁密度为 60% 时开始进行感染,加入不同浓度病毒液感染细胞,感染 48 h 后,流式细胞术测细胞绿色荧光蛋白 (GFP) 表达,统计

GFP 表达的细胞数。病毒滴度计算公式为:病毒滴度(pfu/mL) = 感染效率 × 接种细胞数/病毒体积。HK-2 细胞按正常细胞培养和病毒感染流程操作,感染 72 h 后,胰酶消化细胞,取  $1 \sim 2 \times 10^6$  个细胞流式细胞术检测转染效率。

**1.2.5 miRNA-21 表达量** 采用实时荧光定量 PCR 检测,细胞消化后加入 TRIzol 试剂 1 mL,待裂解为黏稠状后加入氯仿 0.2 mL,振荡混匀后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 15 min。取离心后最上层液体加入等体积异丙醇,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  沉淀过夜,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 15 min 后留沉淀。70% 乙醇 500  $\mu\text{L}$  洗涤 2 次,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 10 min。待沉淀干燥后用 DEPC 水溶解。按照 GoScript TM Reverse Transcription System 说明书进行逆转录。用 SYBR Green Real time PCR Master Mix 进行 PCR 反应,条件为  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  15 s,  $62\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s, 进行 40 个循环;使用 IQ TM 5 Multicolor Real-time PCR Detection System 对报告荧光染料所发射的荧光进行实时监测。以 U6 作为内参来校正 Ct 值。miRNA-21 正向引物(forward primer):  $5' - \text{ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGAT} - 3'$ , miRNA-21 反向引物(reverse primer):  $5' - \text{ACTGGT-GTCGTGGAGTCG} - 3'$ , U6 正向引物(forward primer):  $5' - \text{CCTGCTTCGGCAGCACA} - 3'$ 。U6 反向引物(reverse primer):  $5' - \text{AACGCTTCACGAATTTGCGT} - 3'$ 。

**1.2.6 Smad7 蛋白表达** 采用 Western blot 检测,消化收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 2 次后加入适量细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂)于冰上裂解细胞 30 min。  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 12 000 r/min 离心 15 min。将制备好的蛋白样本与  $5 \times$  载样缓冲液混匀,沸水中煮 5 min。SDS-PAGE 电泳分离后,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 恒流 100 mA 转 PVDF 膜 1 h,将蛋白从胶上转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶(TBST 配置)孵育 2 h 封闭,一抗(anti-Smad7 或 anti-GAPDH 抗体)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗 3 次, 5 min/次;二抗(兔二抗或鼠二抗)室温孵育 45 min, TBST 洗 4 次, 10 min/次, ECL 显色系统检测目的蛋白,医用 X 胶片曝光,显影。

### 1.3 观察指标

荧光倒置显微镜下观察 miRNA-21 过表达慢病毒表达载体感染 HK-2 细胞感染效率,根据实验需要,将培养基的不同和感染病毒的不同将 HK-2 细胞分为 4 组,分别为高糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、低糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、高糖空载组、低糖空载组。

组、低糖空载组,感染 72 h 时采用流式细胞仪检测各组细胞转染效率;在病毒感染 72 h 后,采用实时荧光定量 PCR 检测 miRNA-21 的 mRNA 水平的表达;Western blot 检测转染后细胞 Smad7 蛋白的表达量。

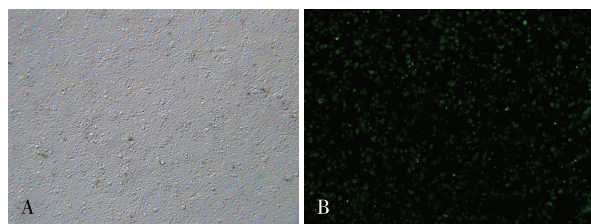
### 1.4 统计学分析

实验所得数据均采用 SPSS 19.0 统计软件分析,计数资料以平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据的显著性检验采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miRNA-21 过表达慢病毒表达载体感染 HK-2 细胞感染效率

通过荧光显微镜对 miRNA-21 过表达慢病毒表达载体感染 HK-2 细胞感染效率进行检测,结果如图 1 所示,感染成功的细胞可见绿色荧光,而未感染成功的细胞较暗,未见绿色荧光。约 60% 的 HK-2 细胞可见绿色荧光,说明 miRNA-21 过表达慢病毒表达载体具有较高的感染效率,可以继续后续研究。



注:A 为可见光,B 为绿色荧光

图 1 miRNA-21 过表达慢病毒感染 HK-2 细胞的感染效率( $\times 100$ )

Fig. 1 Infection rate of MiRNA-21 overexpression lentivirus in HK-2 cell

### 1.2 不同组别 HK-2 细胞的转染效率

根据实验需要,将培养基的不同和感染病毒的不同将 HK-2 细胞分为 4 组,分别为高糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、低糖 miRNA-21 过表达慢病毒组、高糖空载组、低糖空载组。感染 72 h 时采用流式细胞仪检测各组细胞转染效率,结果如图 2 所示,高糖 miRNA-21 过表达慢病毒组转染效率为 62%,低糖 miRNA-21 过表达慢病毒组转染效率为 60%,高糖空载组转染效率为 79%、低糖空载组转染效率为 72%。转染率均为 60% 以上,符合研究

要求。

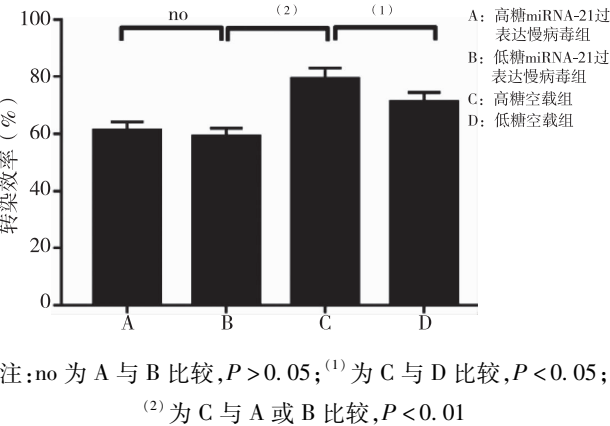


图 2 miRNA-21 过表达慢病毒和空载体病毒转染情况 (流式细胞)

Fig. 2 MiRNA-21 overexpression of lentiviral vector and no load vector virus transfection

2.3 mi RNA-21 表达

在病毒感染 72 h 后,收集细胞,提取 RNA,采用实时荧光定量 PCR 检测 mi RNA-21 的 mRNA 水平的表达。结果如图 3 所示,在高糖组的细胞中,高糖 mi RNA-21 过表达组 mRNA 水平显著高于高糖细胞组和高糖空载组 ( $P < 0.05$ )。

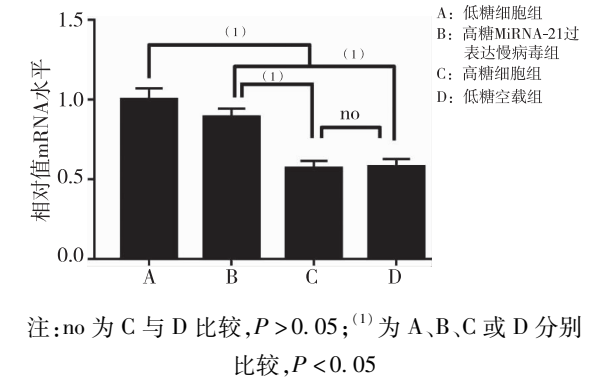


图 3 转染 mi RNA-21 过表达慢病毒后 mi RNA-21 表达

Fig. 3 mi RNA-21 expression of transfection of mi RNA-21 overexpression lentivirus

2.4 Smad7 表达

Western blot 检测转染后细胞 Smad7 蛋白的表达量,结果如图 4 所示,高糖 mi RNA-21 过表达组 Smad7 蛋白表达水平显著低于高糖细胞组、高糖空载组和低糖细胞组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

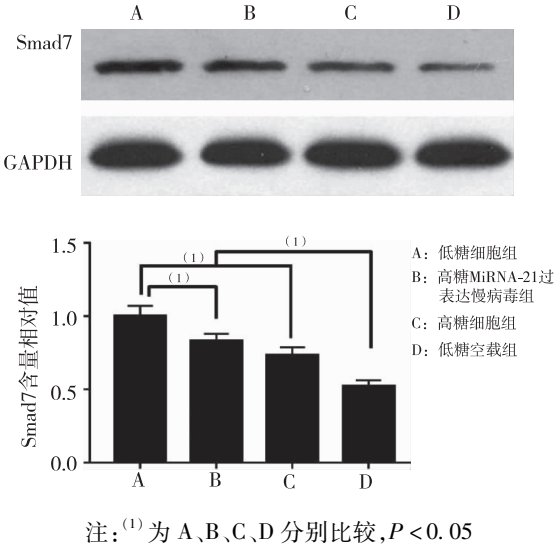


图 4 转染 mi RNA-21 过表达慢病毒对后 HK-2 细胞 Smad 7 蛋白表达的影响

Fig. 4 The effect on the expression of posterior HK-2 cell Smad 7 protein in transfection of mi RNA-21 overexpression lentivirus

3 讨论

在临床上,肾小管-间质纤维化 (tubulointerstitial fibrosis, TIF) 被认为是慢性肾脏疾病的终末期根本病理特征之一,也是导致肾脏疾病进展的决定性因素<sup>[8-12]</sup>。TIF 的过程有很多细胞因子的参与,如血管紧张素 II、内皮素-1、TGF-β1 等,其中 TGF-β1 是一种强致纤维化因子,在其中发挥重要作用<sup>[13-15]</sup>,但 TGF-β1 是如何诱发肾小管上皮细胞发生转分化还尚未明确。TGF-β/Smad 信号通路是一条经典的信号通路,其功能不仅包括影响细胞增殖、分化,还与胚胎发育、骨形成和重建以及细胞外基质形成等方面有关<sup>[16-18]</sup>。TGF-β1/Smad 信号通路主要包括 3 部分结构,即细胞外的 TGF-β1 蛋白、细胞膜上的 TGF-β1 受体蛋白 (TβR) 以及细胞内的 Smad 蛋白。根据信号传导的顺序,细胞外 TGF-β1 与细胞膜上 TβR 膜外结构域结合,丝/苏氨酸激酶激活,活化 I 型受体与胞内底物相互作用,将信号转导到细胞内。细胞内的受体底物主要是 Smad 蛋白家族,Smad 再发挥具体的功能<sup>[19]</sup>。细胞内的 Smad 蛋白家族有 9 种 Smad 蛋白,根据在 TIF 中发挥的作用不同而分为 3 类。第 1 类被称为受体活化型 Smad (R-Smads),主要包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8 和 Smad9,主

要功能是促进 TIF。第 2 类被称为共同通路型 Smad (Co-Smad), 只有一个成员: Smad4, 是 TGF- $\beta$ 1 信号传导过程共同需要的介质; 第 3 类是抑制性 Smad (I-Smad): 主要有 Smad6 和 Smad7, 其主要功能是抑制调节 TGF- $\beta$  家族蛋白信号转导, 在 TIF 的进展中起抑制作用。

RNA 干扰 (RNAi) 技术是指一段内源性或外源性 22 个核苷酸左右的双链 RNA 小分子, 诱导同源靶基因的 mRNA 发生特异性降解, 使该特异性基因的表达受到沉默<sup>[20-21]</sup>。RNAi 技术因其简便、快速、经济等特点而被广泛应用于基因组学、基因治疗和基因表达调控等领域中。有研究表明, miRNA-21 与抑制性 Smad 蛋白 Smad7 的关系密切, 但 miRNA-21 过表达是否能够通过调节 Smad7 来影响 TGF- $\beta$ 1 诱导的 TIF 尚未明确<sup>[22-25]</sup>。为了探究 miRNA-21 对 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路 Smad 7 蛋白调控, 本研究采用已经构建了的 miRNA-21 过表达慢病毒载体通过慢病毒感染的方式使 miRNA-21 在人肾近端小管上皮细胞 HK-2 细胞中过表达。感染后, 先通过荧光倒置显微镜观察感染情况, 结果显示有明显的 GFP 绿色荧光; 随后通过流式细胞术对 miRNA-21 过表达慢病毒的转染率进行检测, 结果显示在高糖和低糖细胞组中的转染率均 > 60%, 符合实验要求。随后通过 qPCR 检测转染 miRNA-21 的表达, 发现转染后肾近端小管上皮细胞 HK-2 细胞可以高表达 miRNA-21。最后用 Western blot 检测 Smad7 蛋白的表达, 发现感染高表达 miRNA-21 后的细胞 Smad7 蛋白表达明显降低。

综上, miRNA-21 的高表达可以抑制 Smad7 蛋白的表达, 进而调控 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路, 干扰 TGF- $\beta$  调控的 TIF 过程, 最终实现抑制 TIF。本实验初步证明了 miRNA-21 在抑制 TIF 过程中的分子机制, 为慢性肾脏疾病的预防和治疗提供思路。为了更好研究 TIF 的具体机制, 还有待进一步进行体内动物实验证实。

## 4 参考文献

- [1] 魏锦锦, 李佳鑫, 刘巨源. 肺间质纤维化中肌成纤维细胞的来源及调控因素[J]. 新乡医学院学报, 2009 (6): 633 - 636.
- [2] Böttinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. [J]. Seminars in Nephrology, 2007(3): 309.
- [3] 杨力, 李荟元. Smad 蛋白家族与 TGF- $\beta$  信号转导[J]. 中国美容医学杂志, 2001(6): 547 - 549.
- [4] Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Mechanisms of disease: Role of Transforming Growth Factor &#223; in human disease [J]. New England Journal of Medicine, 2000(18): 1350 - 1358.
- [5] Drummond A, Findlay J. Focus on TGF- $\beta$  signalling [J]. Reproduction, 2006(2): 177 - 178.
- [6] 杨秀华, 孟涛. TGF- $\beta$ 2 和 TGF $\beta$ R II 在子痫前期胎盘中的表达[J]. 贵阳医学院学报, 2016(2): 185 - 189.
- [7] Eulertaimor G, Heger J. The complex pattern of SMAD signaling in the cardiovascular system [J]. Cardiovascular Research, 2006(1): 15.
- [8] 邹崎葩. 甲基化抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷对瘢痕疙瘩成纤维细胞 TGF- $\beta$ /smad 信号通路的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [9] 黄静, 蔡颖, 朱丽华, 等. MicroRNA 在肿瘤 EMT 调控中的作用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2014(6): 420 - 423.
- [10] 高冬梅, 朱明玥, 唐努尔, 等. miRNA-196a 与宫颈癌的关系研究[J]. 贵阳医学院学报, 2014(4): 522 - 525.
- [11] 甄滢滢, 姚广涛, 金若敏, 等. miRNA-21 和 miRNA-34a 在环孢素 A 致大鼠肾损伤肾脏中的表达[Z]. 中国海南海口, 2015: 2.
- [12] 成学琴. 核心蛋白聚糖在肾小管间质损害中的作用 [D]. 南京: 南京医科大学, 2007.
- [13] 陈静, 覃远汉, 赵艳君, 等. PAX2 在单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质纤维化中的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2009(5): 355 - 357.
- [14] Wang B, Jha JC, Hagiwara S, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1-mediated renal fibrosis is dependent on the regulation of transforming growth factor receptor 1 expression by let-7b [J]. Kidney international, 2014(2): 352 - 361.
- [15] Ding Y, Choi ME. Regulation of autophagy by TGF- $\beta$ ; emerging role in kidney fibrosis [J] Seminars in nephrology. WB Saunders, 2014(1): 62 - 71.
- [16] 李莹莹. 转化生长因子  $\beta$ \_1 对子宫内膜腺癌细胞增殖、细胞周期、凋亡的影响[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [17] Zhang J, Zhang X, Xie F, et al. The regulation of TGF- $\beta$ /SMAD signaling by protein deubiquitination [J]. Protein & cell, 2014(7): 503 - 517.

- [6]王春雨,陈真.慢性非细菌性前列腺炎动物模型评析[J].药学与临床研究,2012(1):60-63.
- [7]潘秀芳,黎滨,王玉丰.前列腺液中白细胞、卵磷脂小体与慢性前列腺炎病情程度的相关性[J].贵阳医学院学报,2015(4):404-406.
- [8]琚保军.实验性慢性非细菌性前列腺炎大鼠血液流变学指标的表达式及意义[J].中国现代药物应用,2014(14):249-250.
- [9]宋春生,赵家有.慢性非细菌性前列腺炎的几种相关细胞因子[J].中国男科学杂志,2013(4):350-355.
- [10]李坚勇,杨晓勤,杨华,等.木熟胶囊对大鼠慢性非细菌性前列腺炎血清 IL-8 及病理变化的影响[J].四川医学,2013(7):911-913.
- [11]丁劲,张耀圣,闫博,等.除湿通淋颗粒治疗慢性非细菌性前列腺炎临床疗效及对 IL-2、IL-6、IL-8 影响观察[J].中国性科学,2015(5):587-589.
- [12]谢毓芳,杨荣华,陈红.宁泌泰胶囊治疗慢性非细菌性前列腺炎及对患者血清炎症因子的影响[J].中国性科学,2015(11):1012-1015.
- [13]李广森,常德贵,张培海,等.前泌通片基于 Th1/Th2 细胞平衡对大鼠慢性非细菌性前列腺炎的作用机理研究[J].中国男科学杂志,2015(8):490-492.
- [14]高卫军,王长海.良性前列腺增生合并慢性前列腺炎的研究进展[J].西北国防医学杂志,2012(4):453-455.
- [15]曹志彬,王元天,薛蔚,等.慢性前列腺炎患者前列腺液中 IL-17 的表达及与 TNF- $\alpha$ 、IL-8、IL-6、IL-10 相关性分析[J].中国男科学杂志,2014(2):189-194.
- [16]李响,郭和清,林凯,等.IL-6 在慢性前列腺炎患者精浆中的表达及其临床意义[J].现代泌尿外科杂志,2014(4):243-245,258.

(2017-06-18 收稿,2017-09-04 修回)

中文编辑:刘平;英文编辑:乐萍

(上接第 1138 页)

- [18]Wu TT, Lu J, Zheng PQ, et al. Yiqi Huayu Jiedu decoction inhibits the invasion and metastasis of gastric Cancer cells through TGF- $\beta$ /Smad Pathway [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017(19):1-8.
- [19]颜小明,张立婷,李敏,等. TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路在肝纤维化中的研究进展[J].现代生物医学进展,2016(9):1778-1781.
- [20]Poznansky M, Lever A, Bergeron L, et al. Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector [J]. Journal of Virology, 1991(1):532-536.
- [21]赖靖,訾聃,杨英捷.短发夹 RNA 干扰 CXCR4 表达对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡及侵袭能力的影响[J].贵州医科大学学报,2016(6):653-659.
- [22]Wang JY, Gao YB, Zhang N, et al. miR-21 overexpression enhances TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition by target smad7 and aggravates renal damage in diabetic nephropathy[J]. Molecular & Cellular Endocrinology, 2014(2):163-172.
- [23]Han M, Liu M, Wang Y, et al. Re-expression of miR-21 contributes to migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell characteristics in MCF-7 cells[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2012(1):427.
- [24]Han M, Wang Y, Liu M, et al. MiR-21 regulates epithelial-mesenchymal transition phenotype and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression in third-sphere forming breast cancer stem cell-like cells [J]. Cancer Science, 2012(6):1058-1064.
- [25]Costa PM, Cardoso AL, Custódia C, et al. MiRNA-21 silencing mediated by tumor-targeted nanoparticles combined with sunitinib: a new multimodal gene therapy approach for glioblastoma [J]. Journal of Controlled Release, 2015(207):31-39.

(2017-05-25 收稿,2017-08-22 修回)

中文编辑:吴昌学;英文编辑:乐萍