

本文引文格式:张彩灵,覃小珊,黄赞松.苦参素通过上调 miR-204 对人肝癌 HepG2 细胞的上皮间质转化及细胞生物学特性的影响[J].右江民族医学院学报,2021,43(1):11-16.

【论著与临床报道】

苦参素通过上调 miR-204 对人肝癌 HepG2 细胞的上皮间质转化及细胞生物学特性的影响

张彩灵¹,覃小珊^{1,2},黄赞松^{1,2}

- (1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;
2. 右江民族医学院附属医院,广西肝胆疾病临床医学研究中心,广西 百色 533000)

摘要:目的 探究苦参素(OM)对转化生长因子- β 1(TGF- β 1)诱导人肝癌细胞 HepG2 上皮细胞间充质转化(EMT)过程的影响及其分子机制。方法 用 10 ng/ml TGF- β 1 诱导 HepG2 细胞建立 EMT 模型,将建模成功的肝癌细胞分为 5 组:模型组、OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组、OM 8 mg/ml 组,以未建模的 HepG2 细胞(空白组)作为对照组,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 HepG2 中 miR-204 表达情况,分别采用 CCK8 实验、划痕实验检测 HepG2 细胞增殖、迁移情况,蛋白免疫印迹(Western Blot)检测 HepG2 细胞中钙黏附蛋白-E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达情况。结果 模型组 HepG2 细胞呈现梭形和纺锤形,且细胞间隙变大、排列松散,表明建模成功。与空白组比较,模型组 HepG2 细胞中 miR-204 表达水平、HepG2 细胞生长抑制率、迁移能力及 Vimentin 表达水平高于空白组($P < 0.05$);与模型组相比,OM 4 mg/ml 组 HepG2 细胞中 miR-204 表达水平、HepG2 细胞增殖率、迁移能力及 Vimentin 表达水平降低,E-cadherin 表达水平升高($P < 0.05$)。结论 OM 可上调 HepG2 细胞中 miR-204 表达,进而抑制 TGF- β 1 诱导的人肝癌细胞 HepG2 EMT 过程。

关键词:苦参素;癌,肝细胞;miR-204;上皮间质转化;钙黏附蛋白-E;波形蛋白

中图分类号:R735.7;R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2021)01-0011-06
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.01.003

Effect of oxymatrine on epithelial-mesenchymal transition and cell biological characteristics of human hepatoma carcinoma cell line HepG2 by upregulating miR-204

Zhang Cailing¹, Qin Xiaoshan^{1,2}, Huang Zansong^{1,2}

- (1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;
2. The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Guangxi Clinical Medicine Research Center for Hepatobiliary Diseases, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of oxymatrine (OM) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in human hepatoma cell line HepG2 and related molecular mechanism. **Methods** 10 ng/ml TGF- β 1 was used to induce HepG2 cells to establish EMT model. The hepatoma carcinoma cells (HCC) successfully modeled were divided into 5 groups: the model

基金项目:广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118143);广西科技基地和人才专项(广西肝胆疾病临床医学研究中心研究课题)(桂科 AD17129025);2017 年度广西医药卫生自筹经费计划课题(Z20170224);2020 年右江民族医学院学术学位研究生创新计划项目(YXCXJH2020009)

第一作者简介:张彩灵(1989-),女,在读硕士研究生,研究方向:肝癌的基础及临床研究,E-mail:584497355@qq.com

通讯作者简介:黄赞松(1962-),男,医学硕士,三级教授,主任医师,硕士研究生导师,广西科协决策咨询专家库专家,广西高校优秀人才,研究方向:①肝癌的基础与临床研究;②幽门螺杆菌致病与耐药机制研究,E-mail:1019846481@qq.com

group, 1 mg/ml OM group, 2 mg/ml OM group, 4 mg/ml OM group, and 8 mg/ml OM group. Unmodeled HepG2 cells (blank group) were used as the control group. The expression of miR-204 in HepG2 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The proliferation and migration of HepG2 cells were detected by CCK8 experiment and scratch experiment, respectively. The expressions of E-cadherin and Vimentin in HepG2 cells were detected by Western Blot experiment. **Results** The HepG2 cells in the model group were characterized by fusiform and spindle shapes, and their cell gap was enlarged and loosely arranged, indicating the success of modeling. Compared with those of the blank group, the miR-204 expression, growth inhibition rate and migration ability of HepG2 cells and Vimentin expressions in the model group were higher than those in the blank group ($P < 0.05$). Compared with those of the model group, the miR-204 expression, proliferation rate and migration ability of HepG2 cells and Vimentin expressions in the 4 mg/ml OM group decreased, while the E-cadherin expression increased ($P < 0.05$). **Conclusion** OM can up-regulate the expression of miR-204 in HepG2 cells, thereby inhibiting the EMT process of human hepatoma HepG2 cells induced by TGF- β 1.

Key words: oxymatrine; carcinoma, hepatocyte; miR-204; epithelial-mesenchymal transition; E-cadherin; Vimentin

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的原发性肝癌,也是世界范围内最常见的癌症相关死亡原因之一^[1]。肝癌的主要治疗方法包括肝移植、手术切除和化疗,然而,肝癌易发生转移,多数患者确诊时已错过手术治疗的时机。即使是分子靶向治疗,一线化疗药应答率也很低^[1],而化疗具有化疗耐药性^[2],而部分肝癌患者甚至术后亦可能发生转移,因此,HCC的治疗已成为目前全世界面临的难题。研究表明上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)与恶性肿瘤的转移与侵袭密切相关^[3],还有研究表明^[4],miR-204在肿瘤细胞 EMT 过程中发挥了重要的作用。因此,探究能够有效抑制 EMT 过程的药物是控制细胞侵袭和转移的前提。苦参素(oxymatrine, OM),是传统中药苦参的主要生物活性成分,具有抗炎、抗过敏、抗纤维化、免疫调节及抗肿瘤等多种药理活性,我们实验组前期实验证明,其在抑制 HCC 的 EMT 作用中有明显作用^[5],然而 OM 抑制肝癌细胞 EMT 作用的机制尚未完全明确,因此本文将探究 OM 抑制肝癌细胞 EMT 作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞由右江民族医学院基础医学院廖长秀博士惠赠。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;OM 购自郑州卓峰制药有限公司(批号:国药准字 H20033744,规格 2ml:0.2g);CCK8 购自美国 MCE 公司;6 孔板、96 孔板购于美国 Thermo 公司,25 cm² 细胞培养瓶购于美国 Corning 公司,上皮转化因子- β 1(TGF- β 1)购于美国 PEPROTECH 公司,总 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus(Code No. 9108)、

逆转录试剂盒 miR-X TMII(Code No. RR820A)、氯仿、异丙醇、国产分析纯 75% 的乙醇,其中用 0.1% DEPC 水配制 75% 乙醇,将其放入 4℃ 冰箱保存;提取 RNA、逆转录及扩增过程中所用的枪头、EP 管等均购自 Axygen 公司,以防 RNA 降解使用前均去 RNA 酶处理。兔抗 E-Cadherin、Vimentin、GAPDH 购自美国 Cell Signal Technology 公司,辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白 G 购自 Affinity 公司;高效 RIPA 裂解液、蛋白标准品、蛋白 marker、BCA 法蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、P-ECL 化学发光检测试剂盒购自雅酶公司;SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液购自上海碧云天公司。

1.2 人肝癌细胞 HepG2 EMT 模型建立与实验分组

1.2.1 HepG2 细胞株的培养 人肝癌 HepG2 细胞株需在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 细胞培养液中,并在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养;细胞贴壁生长于 25 cm² corning 培养瓶中,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 人肝癌细胞 HepG2 EMT 模型建立 收集对数期 HepG2 细胞接种于 6 孔细胞培养板(100 微升/孔,每孔含 2×10^5 个细胞),根据文献^[6]的方法构建人肝癌细胞 EMT 模型,在细胞培养板中加入 TGF- β 1 使其终浓度为 10 ng/ml,以未用 TGF- β 1 培养的细胞作为对照组,将细胞培养板置于 37℃、5% CO₂ 的潮湿培养箱中培养 24 h,取出细胞培养板,在光学显微镜下观察对照组和模型组细胞的形态变化。

1.2.3 实验分组 处理实验分为 6 个组,空白组、模型组、OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组、OM 8 mg/ml 组,每组细胞均在 6 孔板中培养 48 h。

1.3 实验检测

1.3.1 CCK8 检测各组 OM 对已发生 EMT 作用的 HepG2 细胞的增殖抑制情况 取对数生长期细胞,胰酶消化成单细胞悬液,调整至合适的细胞密度,接种至 96 孔板,使每孔含 1×10^4 个细胞,实验分为:空白组、模型组、OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组、OM 8 mg/ml 组。次日,在模型组、OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组、OM 8 mg/ml 组中各加入浓度为 10 ng/ml 的 TGF- β 1,对照组加等量培养基,作用 24 h。第 3 天,OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组、OM 8 mg/ml 组各加入含 OM 浓度为 1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml 的完全培养基,作用 12 h、24 h、48 h、72 h 后,于 450 nm 波长检测各组吸光度值(A 值),实验重复 3 次取均值。抑制率计算公式:抑制率=[1-(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(阴性对照组 A 值-空白对照组 A 值)] \times 100%。

1.3.2 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 HepG2 细胞中 miR-204 表达水平 将对数期 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,除空白组外,OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组均使用 TGF- β 1 诱导 24 h,再使用 1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml OM 作用 48 h。采用 RNAiso Plus 提取 HepG2 细胞总 RNA,并用紫外分光光度计检测总 RNA 浓度;随后采用 Takara 公司 5 \times PrimeScript RT Master Mix 反转录试剂盒进行反转录获得总 cDNA,以 Takara 公司 2 \times SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒实时定量 PCR 检测上述不同组细胞样本中 miR-204,miR-204 引物由上海宝生物公司合成,引物序列为:TCCCTTGT-CATCCTATGCCTAA。反应体系:ddH₂O 9.5 μ l,SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,cDNA 模板 2 μ l。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共扩增 40 个循环。溶解曲线分析:95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,95 $^{\circ}$ C 30 s。U6 作为 miRNA 表达的内参照,使用 2 $^{-\Delta\Delta}$ 法分析结果。实验重复 3 次取均值。

1.3.3 划痕实验检测 HepG2 细胞迁移能力 将对数期 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,除空白组外,OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组均使用 TGF- β 1 诱导 24 h,再使用 1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml OM 作用 48 h。将各组 HepG2 细胞,制备单细胞悬液并调整细胞数目(1×10^6 /ml),接种至 96 孔板,细胞培养板每孔加入 1 ml 单细胞悬液,培养 24 h,细胞密度达 80%时,用灭菌过的 10 μ l 枪头划线,用 PBS 洗去划痕中的细胞,加入空白培养基,培养 24 h 后,计算创面愈合率。创面愈合率计算:愈合率=(原始创面面

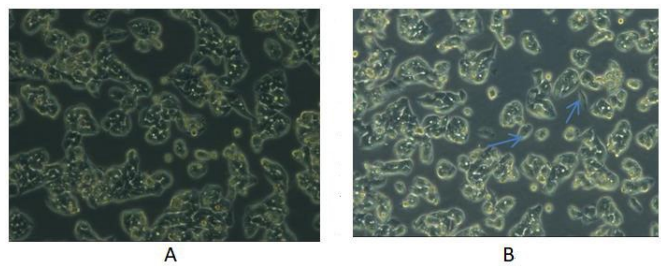
积-未愈合创面面积)/原始创面面积 \times 100%。实验重复 3 次取均值。

1.3.4 Western Blot 检测 HepG2 细胞中钙黏附蛋白-E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达情况 将对数期 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,除空白组外,OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组均使用 TGF- β 1 诱导 24 h,再使用 1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml OM 作用 48 h。经 OM 作用 48 h 后,提取各组总蛋白,BCA 法检测各组总蛋白浓度,100 $^{\circ}$ C 加热变性,取 30 μ g 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳反应,湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜,转膜时间根据各蛋白分子量设定,60~150 min 不等,加入无蛋白快速封闭液于室温封闭 10 min,洗膜 3 次,每次 5 min,然后分别加入相应的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗去膜上未结合的一抗,10 分/次,洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G,室温孵育 2 h,TBST 洗去未结合的二抗,10 分/次,共洗 3 次,之后加入 ECL 发光液进行曝光显影,使用 Image J 软件分析各条带灰度值,计算各蛋白表达量(目的蛋白条带吸光度值/内参照条带吸光度值)。实验重复 3 次取均值。

1.4 统计学方法 应用统计学软件 SPSS 23.0 分析数据并采用 GraphPad Prism 8 软件进行作图,计量资料符合正态分布且以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人肝癌 HepG2 细胞 EMT 模型建立 从图 1 可以看出,对照组人肝癌细胞 HepG2 多为抱团生长,细胞排列紧密,经 TGF- β 1 诱导后其形态发生变化;模型组人肝癌细胞 HepG2 呈现梭形和纺锤形,且细胞间隙变大、排列松散。表明人肝癌细胞 HepG2 EMT 模型构建成功。



注:A:对照组;B:模型组。

图1 TGF- β 1 诱导的人肝癌细胞 HepG2 EMT 过程(100 \times)

2.2 CCK8 实验检测 OM 对已发生 EMT 作用的人肝癌细胞 HepG2 的影响 图 2 结果显示,OM 对已发

生 EMT 作用的 HepG2 细胞增殖呈抑制作用,OM 浓度分别为 1 mg/ml、2 mg/ml、4 mg/ml、8 mg/ml,随着 OM 浓度的增加,其对已发生 EMT 作用的人肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制率增加,且组间抑制率差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。由于 OM 浓度为 8 mg/ml 时肝癌细胞存活较少,无法进行后续实验,故后面的实验将去掉 OM 8 mg/ml 组。

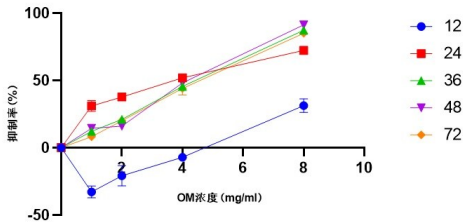
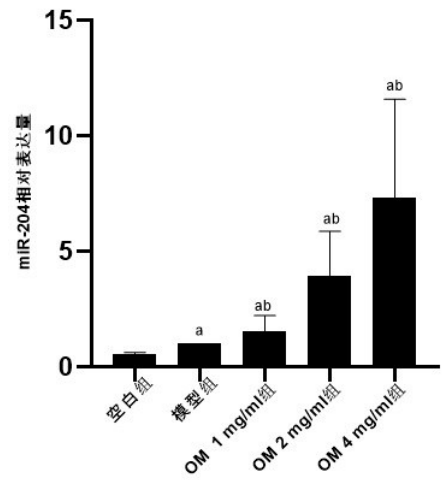


图 2 OM 对已发生 EMT 作用的人肝癌细胞 HepG2 抑制率的比较 ($n = 3$)

2.3 qRT-PCR 检测人肝癌细胞 HepG2 中 miR-204 表达水平 图 3 结果显示,模型组和 OM 组 HepG2 细胞中 miR-204 表达水平高于空白组 ($P < 0.05$);与模型组相比,OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4

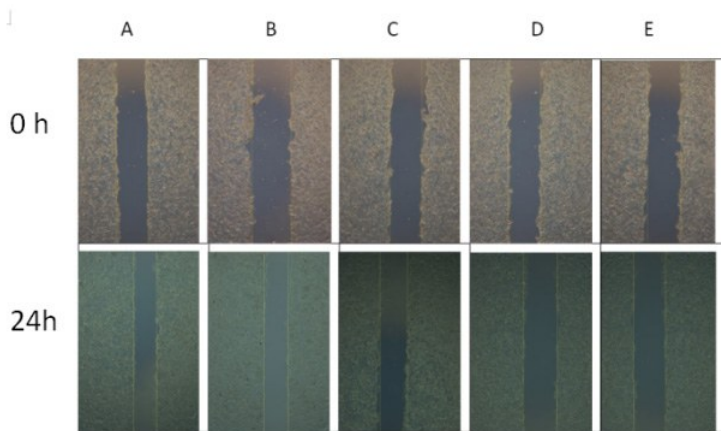
mg/ml 组 HepG2 细胞中 miR-204 表达水平增高 ($P < 0.05$)。



注:与空白组比较,a: $P < 0.05$; 与模型组比较,b: $P < 0.05$ 。

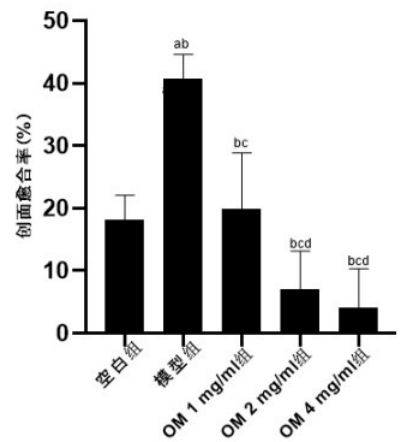
图 3 肝癌细胞 HepG2 中 miR-204 表达水平 ($n = 3$)

2.4 划痕实验检测人肝癌细胞 HepG2 迁移情况 图 4 结果显示,模型组 HepG2 细胞迁移能力高于空白组 ($P < 0.05$);与模型组相比,OM 4 mg/ml 组 HepG2 细胞迁移能力降低 ($P < 0.05$)。



注:A:对照组;B:模型组;C:OM 1mg/ml 组;D:OM 2mg/ml 组;E:OM 4mg/ml 组。

图 4 细胞划痕实验检测人肝癌细胞 HepG2 迁移能力(40×)



2.5 Western Blot 检测 HepG2 细胞中 E-cadherin、Vimentin 表达情况 图 5 结果显示,模型组 HepG2 细胞中 E-cadherin 表达水平低于空白组 ($P < 0.05$),而 Vimentin 表达水平升高 ($P < 0.05$);OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组 HepG2 细胞中 E-cadherin 表达水平高于模型组 ($P < 0.05$),而 Vimentin 表达水平降低 ($P < 0.05$)。

2.6 OM 作用 48 h 后,HepG2 细胞中 miR-204 的表达量与其增殖抑制率的相关性 经 Spearman 分析显

示,OM 作用 48 h 后,HepG2 细胞中 miR-204 的表达量与其增殖抑制率呈正相关 ($r = 0.965, P < 0.05$)。2.7 OM 作用 48 h 后,HepG2 细胞中 miR-204 的表达量与 E-cadherin、Vimentin 表达量的相关性 经 Spearman 分析显示,OM 作用 48h 后,HepG2 细胞中 miR-204 的表达量与其 E-cadherin 的表达呈正相关 ($r = 0.767, P < 0.05$),miR-204 的表达量与其 Vimentin 的表达呈负相关 ($r = -0.765, P < 0.05$)。

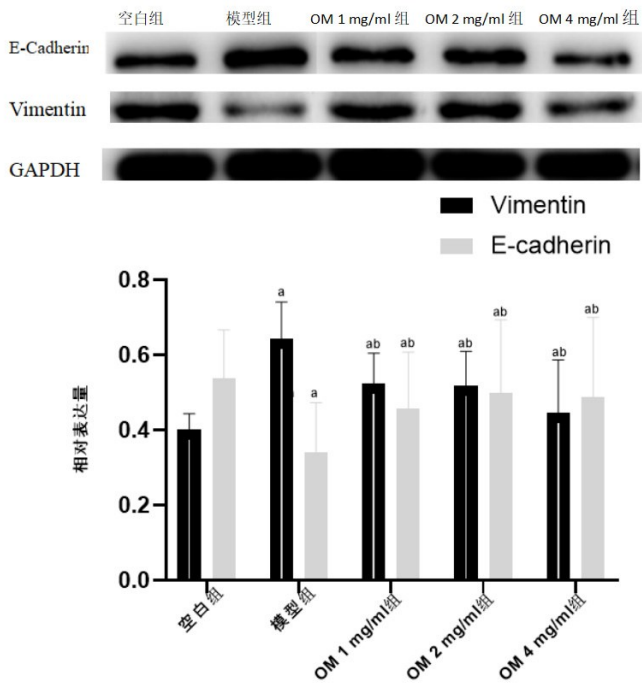


图 5 HepG2 细胞中 E-cadherin、Vimentin 相对表达量 ($n=3$)

3 讨论

我们的实验发现在建立 EMT 模型的基础上,使用不同浓度的 OM 处理 HepG2 EMT 模型,OM 可抑制 HepG2 EMT 模型的增殖并可以减弱已发生 EMT 的 HepG2 细胞的迁移能力;进一步的实验发现 OM 可以上调 HepG2 细胞中 miR-204 表达水平、提高 HepG2 细胞中 E-cadherin 表达水平和下调 Vimentin 表达水平。

肝癌是最常见的消化道肿瘤,在中国,肝癌在癌症相关死亡率中排名第二^[7]。肝癌易转移的特性给肝癌的治疗带来巨大的困难。EMT 是指上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞转化为更具迁移和侵袭能力的间质细胞的生物过程。有研究表明,EMT 在原发性肿瘤的侵袭和转移过程中发挥了重要的作用^[8-9],且 EMT 与肝癌细胞转移密切相关^[10-12],因而,抑制肝癌细胞的 EMT 过程对于肝癌的治疗和提高患者的生存率具有重要的意义。OM 是传统中药苦参的主要生物活性成分,具有抗炎、抗过敏、抗纤维化、免疫调节及抗肿瘤等多种药理活性。近年来有关中西药治联合疗肝癌的研究取得较大进展,OM 也成为临床实验研究热点之一。研究发现,氧化苦参碱具有抑制肿瘤细胞增殖^[13]、诱导肿瘤细胞分化凋亡^[14]、抑制肿瘤细胞黏性与浸润转移以及增强化疗药的作用^[15]。本课题组前期实验发现,OM 可抑制人肝 HepG2 细胞增殖,促进细胞凋亡^[14]。在进一步研究中证明,OM 可通过削弱人肝癌 HepG2 细胞的 EMT 作用,进而逆转肝癌细胞多药耐药^[5],证

明 OM 可以削弱肝癌细胞的 EMT 作用,但其作用的分子机制尚未完全明确。

本研究采用 TGF- β 1 诱导人肝癌细胞 HepG2 后,模型组细胞呈现梭形和纺锤形,且细胞间隙变大、排列松散,表明人肝癌细胞 EMT 模型构建成功;在建立 EMT 模型的基础上,使用不同浓度的 OM 处理 HepG2 EMT 模型,发现 OM 可抑制 HepG2 EMT 模型的增殖,且呈现剂量效应。除此之外,为了进一步了解 OM 作用于已发生 EMT 的 HepG2 细胞后,其迁移能力的变化,我们做了划痕检测,发现模型组的细胞迁移能力高于空白组,而 OM 1 mg/ml 组、OM 2 mg/ml 组、OM 4 mg/ml 组 HepG2 细胞迁移能力低于模型组,且迁移能力随着 OM 浓度的升高呈降低趋势,结果表明,OM 可以减弱已发生 EMT 的 HepG2 细胞的迁移能力。而为了在分子水平上进一步确认 OM 组的 HepG2 细胞是否发生 EMT 过程的减弱,本实验对 E-cadherin、Vimentin 这两个上皮间质转化的标志性蛋白进行检测,结果发现 OM 组 HepG2 细胞中 E-cadherin 表达水平高于模型组,Vimentin 表达水平低于模型组,表明 OM 能够逆转人肝癌细胞 HepG2 EMT 过程,且其作用与浓度呈正比。

文献报道^[16-21],miR-204 在其他肿瘤的发生发展中扮演着抑癌因子的角色,且其表达的变化可影响肿瘤细胞 EMT 作用。有研究发现^[22],miR-204 参与肝癌 EMT 过程,与肝癌的侵袭和转移密切相关,为明确 miR-204 在肝癌中与 HepG2 细胞的增殖以及 EMT 过程的关系,我们使用 qRT-PCR 对 miR-204 进行检测,结果发现,OM 作用 48 h 后,HepG2 细胞中的 miR-204 表达量增高,且 miR-204 的表达量随 OM 浓度的增高而增高,且 miR-204 的表达量与 HepG2 细胞增殖抑制率呈正相关,miR-204 的表达量与 HepG2 细胞中 E-cadherin 的表达呈正相关,miR-204 的表达量与 HepG2 细胞中 Vimentin 的表达呈负相关,随着 miR-204 的表达量的增高,HepG2 细胞的 EMT 作用呈削弱趋势,推测 OM 可上调 HepG2 细胞中 miR-204 的表达,并且 OM 可通过上调 miR-204 表达,减弱 HepG2 细胞的 EMT 作用,也可通过上调 miR-204 表达进而抑制 HepG2 细胞的增殖。

综上所述,我们的初步研究发现 OM 可上调 HepG2 细胞中 miR-204 表达,进而抑制 TGF- β 1 诱导的人肝癌细胞 HepG2 的增殖、迁移及削弱其 EMT 过程,其实验发现为 OM 治疗 HCC 提供了新的实验依据。

参考文献:

[1] Yang SF, Chang CW, Wei RJ, et al. Involvement of DNA

- damage response pathways in hepatocellular carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014; 153867.
- [2] Cox J, Weinman S. Mechanisms of doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepat Oncol*, 2016, 3(1): 57-59.
- [3] 惠起源, 魏晓萍. 上皮间质转化在肿瘤发生发展中的作用 [J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(3): 219-222.
- [4] Hou Z, Xu X, Zhou L, et al. The long non-coding RNA MALAT1 promotes the migration and invasion of hepatocellular carcinoma by sponging miR-204 and releasing SIRT1 [J]. *Tumor Bio*, 2017, 39(7): 1010428317718135.
- [5] 黎梨. LncRNA H19 影响肝癌细胞 HepG2/ADM 的多药耐药性及苦参素逆转肝癌耐药作用新机制研究 [D]. 百色: 右江民族医学院, 2019.
- [6] 陈淑卿, 葛飞敏, 华育晖. 塞来昔布下调 sirtuin 1 表达抑制转化生长因子- β 1 诱导人胃癌细胞 SGC-7901 上皮细胞-间充质转化过程的研究 [J]. *中国药师*, 2019, 22(6): 1020-1025.
- [7] Zhou MG, Wang HD, Zeng XY, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [8] Kiesslich T, Pichler M, Neureiter D. Epigenetic control of epithelial-mesenchymal-transition in human cancer [J]. *Mol Clin Oncol*, 2013, 1(1): 3-11.
- [9] Zhao R, Gong L, Li L, et al. nm23-H1 is a negative regulator of TGF- β 1-dependent induction of epithelial-mesenchymal transition. [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(5): 740-749.
- [10] 李为. miR-491 调控上皮间质转化抑制肝癌侵袭转移的影响 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2019.
- [11] 张露. RBM3 对肝癌细胞 EMT 的影响及其与肝癌预后的相关性研究 [D]. 重庆: 重庆大学, 2019.
- [12] 龚婷. 丙泊酚通过上调 miR-219-5p 抑制肝癌生长和转移的作用与机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [13] 邓通元, 黄桂柳, 黄赞松, 等. 苦参素对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响及机制 [J]. *山东医药*, 2018, 58(10): 5-8.
- [14] 黄桂柳, 黎梨, 黄赞松, 等. 苦参素促进肝癌 HepG2 细胞凋亡及其分子机制 [J]. *右江民族医院学报*, 2017, 39(1): 10-13.
- [15] 胡高裕, 黄赞松, 周喜汉, 等. 苦参碱增强顺铂抗人肝癌裸鼠移植瘤作用及其对 survivin/casp-ase-3 表达的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(9): 669-674.
- [16] 王甜, 尚牧禾, 王祥虎, 等. Linc-RoR/miR-204/MDM2 轴参与抑制食管鳞癌细胞凋亡的作用机制研究 [C]. 沈阳: 环境与健康学术会议——精准环境健康: 跨学科合作的挑战, 2018.
- [17] 郝军舰, 郝丽娟. miR-204-5p 通过靶向 HMGB1 抑制甲状腺乳头状癌 K1 细胞增殖、侵袭和迁移 [J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(16): 1559-1565.
- [18] 闫洪亮, 李杨, 靳翠平, 等. miR-204 靶向 BDNF 调控上皮性卵巢癌细胞抗失巢凋亡的实验研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2019, 28(9): 647-650, 656.
- [19] 苏珂, 杨旭光. miR-204 对乳头状甲状腺癌细胞增殖、迁移和凋亡能力的影响 [J]. *国际医药卫生导报*, 2019, 25(13): 2024-2026, 2034.
- [20] 王建民, 张加宾, 刘杰慧, 等. miR-204 过表达抑制视网膜细胞瘤细胞的增殖与侵袭及其可能的机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(8): 791-796.
- [21] 苏杰, 马春梅, 赵丽莉, 等. miR-204 通过内质网应激抑制视网膜母细胞瘤生长作用及机制的研究 [J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2019, 33(4): 105-108.
- [22] Liu ZK, Wang YF, Dou CG, et al. Hypoxia-induced up-regulation of VASP promotes invasiveness and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2018, 8(17): 4649-4663.

收稿日期: 2020-11-20; 修回日期: 2020-12-21

(上接第 5 页)

- [26] Li L, Feng R, Xu Q, et al. Expression of the β 3 subunit of Na⁺/K⁺-ATPase is increased in gastric cancer and regulates gastric cancer cell progression and prognosis via the PI3/AKT pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(48): 84285-84299.
- [27] Wheeler KP, Whittam R. The involvement of phosphatidylserine in adenosine triphosphatase activity of the sodium pump [J]. *J Physiol*, 1970, 207(2): 303-328.
- [28] Cornelius F. Cholesterol modulation of molecular activity of reconstituted shark Na⁺, K⁺-ATPase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1235(2): 205-212.
- [29] Haviv H, Cohen E, Lifshitz Y, et al. Stabilization of Na⁺, K⁺-ATPase purified from *Pichia pastoris* membranes by specific interactions with lipids [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(44): 12855-12867.
- [30] Kapri-Pardes E, Katz A, Haviv H, et al. Stabilization of the α 2 isoform of Na, K-ATPase by mutations in a phospholipid binding pocket [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(50): 42888-42899.
- [31] Habeck M, Kapri-Pardes E, Sharon M, et al. Specific phospholipid binding to Na, K-ATPase at two distinct sites [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(11): 2904-2909.
- [32] Wang SH, Wang KL, Yang WK, et al. Expression and potential roles of sodium-potassium ATPase and E-cadherin in human gastric adenocarcinoma [J]. *PLoS One*, 2017, 18(2): e0183692.

收稿日期: 2020-11-13; 修回日期: 2020-12-24