分类号： 密级：



**硕** 士 研 究 生 学 位 论 文

论文题目（中文）As2O3 联合 AZT 作用对肝癌 HepG2 细胞迁移 和侵袭的影响

论文题目（外文）Effects of As2O3 combined with AZT on migration and invasion of hepatoma HepG2 cells

研 究 生 姓 名 韩丽

学 科、专 业 临床检验诊断学

研 究 方 向 肿瘤分子生物学

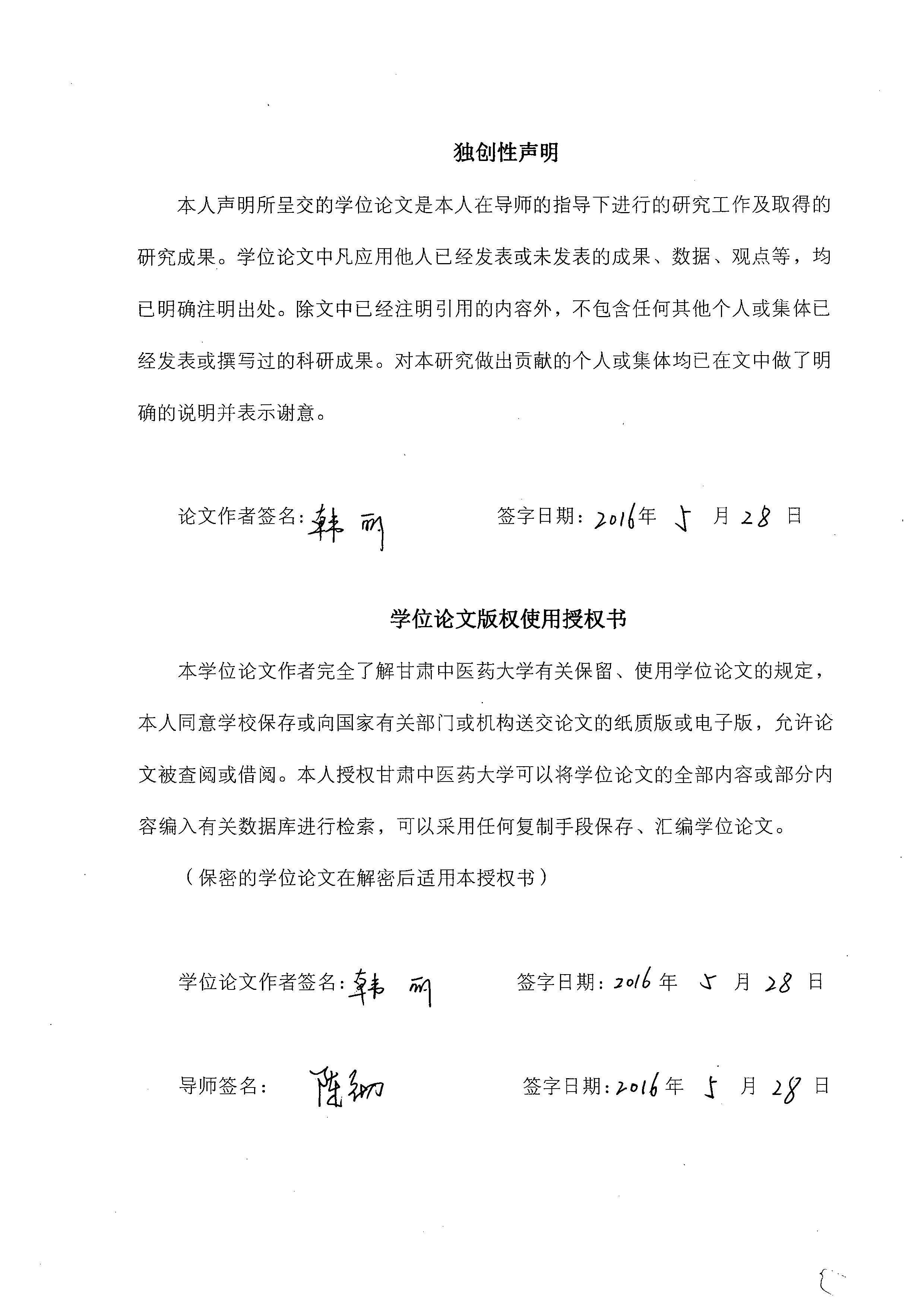
导师姓名、职称 陈彻 教授 论 文 工 作

起 止 年 月 2014 年 6 月 至 2016 年 3 月

论 文 提 交 日 期 2016 年 3 月

论文 答辩日 期 2016 年 5 月

学位 授予日 期 2016 年 6 月



目 录

[摘](#_Toc686135239)[要](#_Toc686135239) 3

[结论：](#_Toc686135240) 3

**[Abstract](#_Toc686135241)** 3

[缩略词 表](#_Toc686135242) 3

[前](#_Toc686135243)[言](#_Toc686135243) 4

[实验研究](#_Toc686135244) 4

**[1](#_Toc686135245)** [材料](#_Toc686135245) 4

**[1.1](#_Toc686135246)** [细胞](#_Toc686135246) 5

**[1.2](#_Toc686135247)** [实验药物及主要试剂](#_Toc686135247) 5

**[1.3](#_Toc686135248)** [主要实验仪器及设备](#_Toc686135248) 8

[酶标仪 Benchmark Plus美国伯乐公司](#_Toc686135249) 8

**[1.4](#_Toc686135250)** [主要试剂和药物的配制](#_Toc686135250) 9

**[2](#_Toc686135251)** [实验方法](#_Toc686135251) 9

**[2.1](#_Toc686135252)** [技术路线](#_Toc686135252) 9

**[2.2](#_Toc686135253)** [细胞培养](#_Toc686135253) 9

**[2.3](#_Toc686135254)** [划痕愈合实验检测](#_Toc686135254)**[As2O3](#_Toc686135254)**[和](#_Toc686135254)**[AZT](#_Toc686135254)**[作用后](#_Toc686135254)**[HepG2](#_Toc686135254)**[细胞的横向迁移能力](#_Toc686135254) 10

**[2.4](#_Toc686135255)****[Transwell](#_Toc686135255)**[迁移实验检测](#_Toc686135255)**[As2O3](#_Toc686135255)**[和](#_Toc686135255)**[AZT](#_Toc686135255)**[作用后](#_Toc686135255)**[HepG2](#_Toc686135255)**[细胞的纵向迁移能力](#_Toc686135255) 10

**[2.5](#_Toc686135256)****[Transwell](#_Toc686135256)**[侵袭实验检测](#_Toc686135256)**[As2O3](#_Toc686135256)**[和](#_Toc686135256)**[AZT](#_Toc686135256)**[作用后](#_Toc686135256)**[HepG2](#_Toc686135256)**[细胞的侵袭能力](#_Toc686135256) 10

**[2.6](#_Toc686135257)** [实时荧光定量](#_Toc686135257)**[PCR](#_Toc686135257)**[法检测](#_Toc686135257)**[As2O3](#_Toc686135257)**[和](#_Toc686135257)**[AZT](#_Toc686135257)**[处理](#_Toc686135257)**[HepG2](#_Toc686135257)**[细胞后](#_Toc686135257)***[MMP2](#_Toc686135257)***[、](#_Toc686135257)***[VEGF](#_Toc686135257)***[基因的表达](#_Toc686135257) 10

**[2.7](#_Toc686135258)****[Western blot](#_Toc686135258)**[检测](#_Toc686135258)**[As2O3](#_Toc686135258)**[和](#_Toc686135258)**[AZT](#_Toc686135258)**[作用后](#_Toc686135258)**[HepG2](#_Toc686135258)**[细胞中](#_Toc686135258)**[MMP2](#_Toc686135258)**[、](#_Toc686135258)**[VEGF](#_Toc686135258)**[、](#_Toc686135258)**[ERK1/2](#_Toc686135258)** [和](#_Toc686135258) 13

[离心管内，从TBST中取出PVDF膜放入其中摇床摇晃孵育2 h；](#_Toc686135259) 15

**[2.8](#_Toc686135260)** [实时荧光定量](#_Toc686135260)**[PCR](#_Toc686135260)**[法检测](#_Toc686135260)**[HL-7702](#_Toc686135260)**[和](#_Toc686135260)**[HepG 2](#_Toc686135260)**[细胞中](#_Toc686135260)***[PTK6](#_Toc686135260)***[基因的表达](#_Toc686135260) 15

[2.9 实时荧光定量](#_Toc686135261)**[PCR](#_Toc686135261)**[法检测](#_Toc686135261)**[As2O3](#_Toc686135261)**[和](#_Toc686135261)**[AZT](#_Toc686135261)**[作用后](#_Toc686135261)**[HepG2](#_Toc686135261)**[细胞中](#_Toc686135261)***[PTK6](#_Toc686135261)***[基因的表达于相差倒置显微镜下观察细胞的生长状态，待处于对数生长期时加入2 mL 0.25 %](#_Toc686135261) 15

**[2.10](#_Toc686135262)** [统计方法](#_Toc686135262) 15

[T3，](#_Toc686135263)*[P](#_Toc686135263)*[＜](#_Toc686135263)*[0.05](#_Toc686135263)*[为差异有统计学意义。](#_Toc686135263) 15

**[3](#_Toc686135264)** [实验结果](#_Toc686135264) 15

**[3.1](#_Toc686135265)****[As2O3](#_Toc686135265)**[联合](#_Toc686135265)**[AZT](#_Toc686135265)**[作用对](#_Toc686135265)**[HepG2](#_Toc686135265)**[细胞横向迁移能力的影响](#_Toc686135265) 15

**[3.2](#_Toc686135266)****[As2O3](#_Toc686135266)**[联合](#_Toc686135266)**[AZT](#_Toc686135266)**[作用对](#_Toc686135266)**[HepG2](#_Toc686135266)**[细胞纵向迁移能力的影响](#_Toc686135266) 15

**[3.3](#_Toc686135267)****[As2O3](#_Toc686135267)**[联合](#_Toc686135267)**[AZT](#_Toc686135267)**[作用对](#_Toc686135267)**[HepG2](#_Toc686135267)**[细胞侵袭能力的影响](#_Toc686135267) 16

**[3.4](#_Toc686135268)****[HepG2](#_Toc686135268)**[细胞的总](#_Toc686135268)**[RNA](#_Toc686135268)**[提取](#_Toc686135268) 16

**[3.5](#_Toc686135269)****[As2O3](#_Toc686135269)**[和](#_Toc686135269)**[AZT](#_Toc686135269)**[处理](#_Toc686135269)**[HepG2](#_Toc686135269)**[细胞后](#_Toc686135269)***[MMP2](#_Toc686135269)***[、](#_Toc686135269)***[VEGF](#_Toc686135269)***[基因的表达](#_Toc686135269) 16

**[3.6](#_Toc686135270)****[As2O3](#_Toc686135270)**[和](#_Toc686135270)**[AZT](#_Toc686135270)**[作用后](#_Toc686135270)**[HepG2](#_Toc686135270)**[细胞中](#_Toc686135270)**[MMP2](#_Toc686135270)**[、](#_Toc686135270)**[VEGF](#_Toc686135270)**[、](#_Toc686135270)**[ERK1/2](#_Toc686135270)**[和](#_Toc686135270)***[p](#_Toc686135270)*[-ERK1/2](#_Toc686135270)**[蛋白的表达](#_Toc686135270) 16

**[3.7](#_Toc686135271)****[HL-7702](#_Toc686135271)**[和](#_Toc686135271)**[HepG 2](#_Toc686135271)**[细胞中](#_Toc686135271)***[PTK6](#_Toc686135271)***[基因的表达](#_Toc686135271) 17

[A：两种细胞中](#_Toc686135272)*[PTK6](#_Toc686135272)*[的相对表达量，与正常人肝细胞HL-7702相比较，\*\*](#_Toc686135272)*[P<](#_Toc686135272)*[0.01 B：](#_Toc686135272)*[β-actin](#_Toc686135272)*[和](#_Toc686135272)*[PTK6](#_Toc686135272)*[扩增曲线](#_Toc686135272) 17

**[3.8](#_Toc686135273)****[As2O3](#_Toc686135273)**[和](#_Toc686135273)**[AZT](#_Toc686135273)**[处理](#_Toc686135273)**[HepG2](#_Toc686135273)**[细胞后](#_Toc686135273)***[PTK6](#_Toc686135273)***[基因的表达](#_Toc686135273) 17

**[4](#_Toc686135274)** [分析与讨论](#_Toc686135274) 17

**[4.1](#_Toc686135275)****[As2O3](#_Toc686135275)**[联合](#_Toc686135275)**[AZT](#_Toc686135275)**[对](#_Toc686135275)**[HepG2](#_Toc686135275)**[细胞迁移和侵袭能力的影响](#_Toc686135275) 18

**[4.2](#_Toc686135276)****[MMP2](#_Toc686135276)**[、](#_Toc686135276)**[VEGF](#_Toc686135276)**[、](#_Toc686135276)**[ERK1/2](#_Toc686135276)**[和](#_Toc686135276)***[p](#_Toc686135276)*[-ERK1/2 mRNA](#_Toc686135276)**[及蛋白表达的改变](#_Toc686135276) 18

**[4.3](#_Toc686135277)****[PTK6](#_Toc686135277)**[在](#_Toc686135277)**[HepG2](#_Toc686135277)**[细胞中的表达及](#_Toc686135277)**[As2O3](#_Toc686135277)**[联合](#_Toc686135277)**[AZT](#_Toc686135277)**[对其表达的影响](#_Toc686135277) 18

[结](#_Toc686135278)[语](#_Toc686135278) 18

[参考文献](#_Toc686135279) 19

[参考文献](#_Toc686135280) 23

[发表论文及获奖情况](#_Toc686135281) 25

摘 **要**

**目的：**观察三氧化二砷（Arsenic trioxide, As2O3）联合3’-叠氮-3'-脱氧胸腺核苷

（3'-azido-3'-deoxythymidine, Azidothymidine, AZT）即齐多夫定，对肝癌HepG2细胞侵袭和转移的影响，并探讨其可能的作用机制，为两药联合在肝癌的体内研究和临床治疗提供依据。

**方法：**

常规培养人肝癌HepG2细胞系，采用划痕愈合实验检测As2O3(2μmol/L)、AZT

（20μmol/L）及As2O3联合AZT（终浓度为2和20μmol/L）干预后HepG2细胞的横向迁移能力；Transwell迁移和侵袭实验观察As2O3、AZT及As2O3联合AZT干预后HepG2细胞的纵向迁移和侵袭能力；实时荧光定量PCR法检测两单药组和联合组干预HepG2细胞后*MMP2*、*VEGF*基因的表达水平；蛋白印迹法检测各组干预HepG2细胞后MMP2、VEGF、ERK1/2和*p*-ERK1/2蛋白的表达量。

常规培养人正常肝细胞系HL-7702，采用实时荧光定量PCR法检测HL-7702细胞和HepG2细胞中*PTK6*基因的表达水平，并检测经As2O3、AZT及As2O3联合AZT干预后HepG2细胞中*PTK6*基因的表达水平。

**结果：**

划痕实验结果显示，经As2O3联合AZT干预后HepG2细胞平面迁移到损伤区的细胞数明显少于单药组和空白对照组（*P*<0.01）。Transwell迁移及侵袭实验结果显示，

As2O3联合AZT干预组HepG2细胞趋化运动明显减少，穿膜的细胞较对照组及各单药组显著降低（*P*<0.01）。实时荧光定量PCR法发现，As2O3联合AZT干预组HepG2细胞中*MMP2*、*VEGF*基因的表达水平明显低于对照组和各单药组（*P*<0.01）。蛋白印迹结果显示联合给药组MMP2、VEGF和*p*-ERK1/2表达明显降低（*P*<0.01），ERK1/2无明显变化(*P*> 0.05)，*p*-ERK1/2与ERK1/2的比值明显降低（*P*<0.01）。

实时荧光定量PCR法发现，人肝癌HepG2细胞中*PTK6*基因的表达水平明显低于人正常肝细胞HL-7702（*P*<0.01），经As2O3联合AZT干预后HepG2细胞中*PTK6*的表达量明显高于空白对照组及单药组（*P*<0.01）。

结论：

（1）As2O3联合AZT能够协同抑制人肝癌HepG2细胞的迁移和侵袭。

（2）As2O3联合AZT抑制HepG2细胞的迁移和侵袭，其作用可能是通过调控ERK1/2信号通路的磷酸化以及下调MMP2和VEGF的表达来实现的。

（3）As2O3联合AZT对HepG2细胞迁移和侵袭的影响可能与PTK6密切相关。

**关键词：**肝癌；三氧化二砷； AZT； 迁移；侵袭

**Abstract**

**Objective:** To investigate the effects of arsenic trioxide (As2O3) combined with 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) on the migration and invasion of human hepatoma HepG2 cells and its possible mechanism. In support of experiment information for further *in vivo* study and clinical treatment against hepatoma.

**Methods:** Human hepatocelluar carcinoma HepG2 cells were cultured *in vitro*. The migration and invasion of the cells were measured by wound healing assay, transwell migration and invasion assay after treatment with As2O3, AZT and their combination, respectively. The expression levels of *MMP2* and *VEGF* mRNAs after treatment with As2O3, AZT and their combination were analyzed through quantitative Real-time PCR (qPCR).

Western blotting was used to examine the expression levels of MMP2、VEGF、ERK1/2 and

*P*-ERK1/2 proteins.

Human liver cells HL-7702 were cultured *in vitro*. The expression levels of *PTK6* mRNA in HL-7702 cells and HepG2 cells were analyzed through qPCR. Moreover, we examined the levels of *PTK6* mRNAs in HepG2 cells after treatment with As2O3, AZT and their combination.

**Result:** The result of wound healing assay indicated a significant decrease of migration ability in combination group than control group and As2O3 or AZT alone groups (*P*<0.01). A significant decrease was observed in the number of HepG2 cells per field permeating the artificial membrane in the combination group, compared with the control group and As2O3 or AZT alone groups (*P*<0.01) by means of transwell migration and invasion assay. As compared with the control, As2O3 and AZT alone groups, the mRNA expression levels of *VEGF* and *MMP2* in As2O3 combined with AZT group were down-regulated (all *P*<0.01), as well as the protein expression levels of MMP2, VEGF and *p*-ERK1/2 were also down-regulated (all *P*<0.01); but there was no obvious change in expression of ERK1/2 protein among four groups (*P*> 0.05).

The result of qPCR indicated a significant decrease of *PTK6* mRNA in HepG2 cells than HL-7702 cells (*P*<0.01). Moreover, the expression levels of *PTK6* mRNA in HepG2 cells was

Up-regrulated after treatment with As2O3, AZT and their combination (*P*<0.01).

**Conclusion:** As2O3 combination with AZT has synergistic effects on the migration and invasion inhibition in HepG2 cells. The effect may be associated with phosphorylation of ERK1/2 signal pathway and down-regulating the mRNA and protein expression levels of VEGF and MMP2. PTK6 maybe plays a role on the migration and invasion of HepG2 cells

And further study is needed.

**Key words:** Hepatoma; As2O3; AZT; HepG2 cells; Migration; Invasion

# 缩略词 表

缩略语英文全称中文全称

HCC Hepatocellular carcinoma肝细胞肝癌DMEM DuLbeccos modified eagle medium DMEM培养基As2O3 Arsenic trioxide 三氧化二砷

3'-叠氮-3'-脱氧胸腺

AZT Azidothymidine

核苷，齐多夫定

DMSO Dimethyl suLfoxide 二甲基亚砜

kDa Kilodalton 千道尔顿

bp Base pair 碱基对

cDNA Complementary DNA 互补 DNA

mRNA Messenger RNA 信使 RNA

BCA Bicinchoninic acid 二辛可酸

EB Ethidium bromide 溴化乙锭

A Absorbance value 吸光值

HCl Hydrochloric acid 盐酸

HRP Horseradish peroxidase 辣根过氧化物酶

Tris-HCl Tris (hydroxymethyl) aminomethane-Hydrochloric acid

三羟甲基氨基盐酸缓冲液

TBST Tris buffered saline with Tween20含吐温20的三羟甲基

氨基盐酸缓冲液

MMP2 Matrix metalloproteinase2基质金属蛋白酶2 VEGF Vascular endothelial growth factor 血管内皮生长因子ERK1/2 Extracellular regulated protein kinases 细胞外调节蛋白激酶*p*-ERK1/2 Phosphorylated ERK1/2 磷酸化的细胞外调节

蛋白激酶

前 **言**

原发性肝癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一，其发病率与死亡率分别位居世界第

5位及第3位[1-2]。原发性肝癌在组织学上分为三种类型：肝细胞型肝癌（hepatocellular

carcinoma，HCC）、胆管细胞型肝癌（cholangiocellular, CC）和肝细胞与胆管细胞混合型肝癌（combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma, cHCC-CC）。肝细胞型肝癌（简称肝癌）是最常见的肝癌类型，约占所有肝癌的90%以上。由于遗传、生活习惯和环境因素的影响，我国肝癌的发病率占到世界肝癌总数的50%以上，肝癌的死亡人数高达世界肝癌总死亡人数的40%[3-4]，严重威胁着全国人民的健康。肝癌发病隐匿，早期缺乏特异性的临床表现，手术切除和肝移植是唯一的治愈方法，而70%的患者到确诊时已到晚期或者发生了肝内外转移[5]，错过了最佳手术时间，再者肝癌术后的复发转移也是目前肝癌治疗的难点之一[6]。因此，寻找有效的手段抑制肝癌细胞的侵袭转移在抗癌治疗中具有重大意义。

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要生物学特性，也是恶性肿瘤特别是肝癌的最重要致死因素[7]。这是一系列多因素、多步骤复杂的动态病理过程。恶性肿瘤侵袭及转移主要受细胞黏附、细胞外基质降解、肿瘤血管生成、肿瘤转移基因与肿瘤转移抑制基因等因素影响。在肿瘤细胞实现侵袭的过程中，必须要有运动活力的细胞来穿透基底膜和基质间隙，而完成这一步骤必需合成及分泌大量的基质蛋白水解酶。基质金属蛋白酶类（matrix

metalloproteinase，MMPs）是目前研究较多的基质降解酶。而明胶酶类是截止目前发现的唯一可降解Ⅳ型胶原的蛋白水解酶。I型明胶酶MMP2作为MMPs家族中分布最广的酶类，与肝癌的侵袭转移密切相关[8]。肿瘤转移灶形成的必要条件是肿瘤细胞转移后在细胞因子的作用下生成新生血管。血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，

VEGF）作为迄今为止发现的一种最强的促进血管生长调节因子[9]，与肿瘤的发生发展密切相关。细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinases1/2, ERK1/2）是细胞质中一条重要的丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路，其在许多肿瘤的迁移和侵袭过程中发挥重要作用。肝癌的迁移侵袭和是一系列多因素复杂的过程，那么在明确此过程的分子机制后，探索有效的药物和作用机制来抑制侵袭转移，对减少复发转移及提高生存率都至关重要。

肝癌的治疗方法是手术以及放化疗，对于不适合手术治疗的大部分患者，放化疗就

显得尤为重要，所以化疗药物仍是目前研究的重点之一。很多临床资料显示，由于不良反应及副作用对常规化疗药物的限制，使得临床疗效并不理想[10-11]。而众多一直处于前期研究的化疗药物由于毒副作用大和安全剂量小，严重限制了临床应用。因此，近年来人们越来越重视毒副作用小、应用范围广的传统中药。而且分子生物技术的飞速发展对天然药物的成分研究和提取方面取得了不断突破，从中药里筛选出疗效好，毒副作用小的抗肿瘤单体药物是目前抗肿研究的热点。

三氧化二砷（arsenic trioxide, AST, As2O3）是中药砒霜的主要成份，作为传统中药已经有两千多年的药用史。上世纪30年代，Forkier运用亚砷酸钾治疗慢性粒细胞性白血病（CML）后获得成功。在20世纪70年代，As2O3就已经被用于临床治疗急性早幼粒细胞白血病（Acute Promyelocytic Leukemia, APL）[12-16]。目前，三氧化二砷注射液已作为一种我国的二类新药（国药准字号X19990119）正式上市。近期众多研究显示，

As2O3对实体肿瘤同样有抑制作用，包括胃癌[17]、乳腺癌[18]和卵巢癌[19]，尤其是肝癌，很多研究表明As2O3具有抑制肝癌细胞增殖和诱导肝癌细胞凋亡的作用[20-22]。在As2O3抗肿瘤的研究中发现，由于细胞内谷胱甘肽的影响以及相关抗氧化酶的活动，As2O3对实体肿瘤的敏感性低于APL，因为APL患者体内抗氧化能力相对低下。人们深入地研究As2O3在肝癌治疗中的效果发现，随着药物作用时间的延长以及浓度的增加，As2O3的毒副作用越来越强，即此药抗癌效力表现为剂量-时间效应关系。有研究报道，治疗

APL复发患者用As2O3 10 mg/d，总共47例复发患者且肝功能均正常，半个月后7例患者发生肝中毒，将近30%的患者有肝功能损害，这就说明应选择更小有效剂量的As2O3来治疗肝功能已经受损的肝癌患者[23]。因此为了实现低毒高效的理想治疗效果，As2O3的联合用药应得到重视。

端粒酶是一种核糖核蛋白复合物，在细胞中负责端粒延长，能以自身RNA为模板合成端粒DNA添加在真核细胞染色体末端，使缩短的端粒延长，有助于维持细胞染色体的稳定性[24]。端粒酶在正常组织中很少表达，仅在干细胞、造血细胞和生殖细胞等少数细胞中有极低的活性，而大部分肿瘤细胞中均表达较高的端粒酶活性，且表达水平与恶性肿瘤的发生、发展和预后密切关联[25]。齐多夫定，即3’-叠氮-3'-脱氧胸腺核苷

（3'-azido-3'-deoxythymidine, Azidothymidine, AZT）也称为叠氮胸苷，是一种端粒酶抑制剂，能通过抑制端粒酶的活性以及肿瘤细胞端粒的复制，从而发挥抑制肿瘤细胞增殖、

促其凋亡的作用[26-27]。有实验研究显示，在脑胶质瘤和宫颈癌的治疗研究中AZT可以增强射线对肿瘤细胞的杀伤力[28-29]。那么在肝癌的治疗中，AZT能否增强其它抗癌药物的敏感性，却鲜有相关文献报道。

我们课题组前期运用协同原理研究As2O3联合AZT对肝癌HepG2细胞增殖的协同抑制作用时发现，AZT能够通过激活Caspase-3通路增加As2O3对肝癌细胞治疗的敏感性，并能有效减少As2O3的使用剂量，提示二者有协同抑制人肝癌HepG2细胞增殖的作用[30-31]。

因此，本研究在此基础上进一步探讨As2O3和AZT联合作用对人肝癌HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响，并探索两药联合抗肝癌的作用机制，旨在为将来临床联合应用

As2O3和AZT提供有力的分子理论依据，为此联合方案的深入研究开发提供实验基础。概括为以下三个方面：

（1）As2O3联合AZT协同抑制人肝癌HepG2细胞的迁移和侵袭的作用；

（2）As2O3 联合AZ抑制HepG2细胞迁移和侵袭的可能机制；

（3）As2O3联合AZT对HepG2细胞迁移和侵袭的影响与PTK6的关系。

# 实验研究

# **1** 材料

## **1.1** 细胞

人肝癌HepG2细胞，人正常肝细胞HL-7702购自上海基尔顿生物科技有限公司。

## **1.2** 实验药物及主要试剂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| As2O3 | GB1256-77 | 水口ft矿务局衡阳实业总公司 |
| AZT | HOF263 | 美国 Sigma 公司 |
| DMEM 培养基 | NVJ0709 | 美国 GibcoBRL 公司 |
| 碳酸氢钠 | 20110516 | 天津益仁达化工有限公司 |
| 胎牛血清 | SH30070.03 | 美国 Hyclone 公司 |
| PBS 磷酸盐缓冲液 | ZLI-9062 | 北京中杉金桥生物技术有限公司 |
| 二甲基亚砜（DMSO） | D8371 | 北京索莱宝科技有限公司 |
| 胰蛋白酶 | SH30042.01 | 美国 Hyclone 公司 |
| DEPC | 4590 | 甘肃鹏程生物科技发展有限公司 |
| 异丙醇 | 13011000015 | 天津市富宇化工有限公司 |
| Trizol | 9109 | 日本 TaKaRa 公司 |
| 琼脂糖(Biowest Agarose) | A0009-100 | 西班牙 |
| 三氯甲烷 | 120100142 | 天津市耀华化学试剂有限责任公司 |
| 基质胶（Matrigel） | 356234 | 美国 BD 公司 |
| Tanswell 小室 | 3422 | 美国 Corning 公司 |
| Prestained Protein Ladder | 26616 | 美国赛默飞世尔科技公司 |
| 兔抗人 MMP2 单克隆抗体 | AF0577 | 美国 Affinity 公司 |
| 兔抗人 VEGF 单克隆抗体 | AF5131 | 美国 Affinity 公司 |
| 兔抗人 ERK1/2 单克隆抗体 | AF0155 | 美国 Affinity 公司 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 兔抗人 *p*-ERK1/2 单克隆抗体 | | AF1015 | 美国 Affinity 公司 |
| 兔抗人β-actin 单克隆抗体 | | AF7018 | 美国 Affinity 公司 |
| HRP 标记的ft羊抗兔 IgG 二抗 | | E030120-01 | 美国Earthox公司 |
| RIPA 裂解液 | P0013B | | 上海碧云天生物技术有限公司 |
| 蛋白酶抑制剂 | P7626 | | 美国 Sigma 公司 |
| 甲醇 | 121112 | | 天津市富宇精细化工有限公司 |
| 盐酸 | 111020 | | 天津市富宇精细化工有限公司 |
| 4×蛋白上样缓冲液 | P1015-10 | | 北京索莱宝科技有限公司 |
| 30%丙烯酰胺 | A1010-100 | | 北京索莱宝科技有限公司 |
| 十二烷基硫酸钠 | L-5750 | | 美国 Sigma 公司 |
| TEMED | T8133 | | 美国 Sigma 公司 |
| Tris | T8060 | | 北京索莱宝科技有限公司 |
| 甘氨酸 | G8200 | | 北京索莱宝科技有限公司 |
| SDS | S8010 | | 北京索莱宝科技有限公司 |
| ECL 化学发光液 | WBKLS0500 | | 美国默克密理博公司 |
| 脱脂奶粉 | BD232100 | | 美国 BD 公司 |
| BCA 定量试剂盒 | PA115-01 | | 天根生化科技北京有限公司 |
| 反转录试剂盒 | A5000 | | 美国 Promega 公司 |
| PCR 扩增试剂盒 | A6001 | | 美国 Promega 公司 |
| **1.3** 主要实验仪器及设备 |  | |  |
| 荧光倒置显微镜 | Motic220A | | 上海捷辰仪器有限公司 |
| 活细胞计数仪 | TC10 | | 美国伯乐公司 |
| 7500 荧光定量 PCR 仪 | ABI7500 | | 美国 ABI 公司 |
| 掌上离心机 | Mini G S025 | | 德国 IKA 公司 |
| 二氧化碳培养箱 | MCO-18AIC(UV) | | 日本三洋公司 |
| 超净工作台 | CJ-2S | | 天津市泰斯特仪器有限公司 |

## 酶标仪 Benchmark Plus 美国伯乐公司

制冰机 XB-70 宁波新芝生物科技股份有限公司凝胶成像仪 Chemi DOC XRS+ 美国伯乐公司

超声波清洗机 SG8200HDT 上海冠特超生仪器有限公司

精密电子秤 DV314C 美国 OHAUS 公司

磁力搅拌器 90-2 上海振荣实验设备有限公司

台式高速离心机 TGL-16G 上海安亭科学仪器厂

电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9073BS-Ⅲ 上海新苗医疗器械制造有限公司酸度计 PHS-3C 上海仪电科学仪器股份有限公司

梯度 PCR 仪 G8800A 美国安捷伦科技公司

移液器 Research 德国 eppdendorf 公司

温控摇床 ZHWY-110 30 上海智城分析仪器制造公司

漩涡振荡器 WH-2 金坛市城西晓阳电子仪器厂

核酸电泳仪 DYY-5 北京市六一仪器厂立式压力蒸汽灭菌器 MLS-3780 日本三洋公司

微量紫外分光光度计 Q5000 美国 Quawell 公司

电热恒温水浴箱 DK-S24 上海精宏实验设备有限公司

超纯水机 DV-35 莱特莱德-大连水处理设备供应商

蛋白印迹电泳仪 Power PacTM HC 美国伯乐公司

## **1.4** 主要试剂和药物的配制

#### （1）As2O3：用电子天平称量As2O3 0.634 g，20 mL PBS缓冲液溶解后配制成为1600

µmol/L的高浓度母液，继续用PBS缓冲液稀释为20μmol/L（即加药后终浓度为 2

μmol/L），–20℃避光保存备用。

#### （2）AZT：用电子天平称量AZT 0.171 g，20 mL DMEM溶解使其为3200µmol/L

的高浓度母液，然后用DMEM培养液稀释为200μmol/L（即加药后终浓度为20μmol/L），

–20℃避光保存备用。

#### （3）青霉素溶液：取4 mL灭菌注射用水加入80万单位的青霉素按剖瓶中，摇晃使充分溶解，用0.22µm的无菌滤膜过滤除菌，使用时向1000 mL的DMEM培养液中

加入0.5 mL，使青霉素工作浓度为100 kμ. L-1。

#### （4）链霉素溶液：取5 mL灭菌注射用水加入100万单位的链霉素按剖瓶中，充分溶解后用0.22µm无菌滤膜过滤除菌，使用时向1000 mL的DMEM培养液中加入0.5

mL，使链霉素工作浓度为100 kμ. L-1。

#### （5）0.25%胰蛋白酶消化液：用电子天平称量胰蛋白酶0.050 g，倒入180 mL盛有

PBS的烧杯中，置于磁力搅拌器上，低温低速搅拌至充分溶解，用pH计测量调整pH值至7.4，定容至200 mL于超净台中用0.22µm的无菌滤膜过滤后分装，-20℃储存备用。

（6）PBS：将1袋PBS粉剂倒入盛有1800 mL双蒸水的烧杯中，置于磁力搅拌器上搅拌至充分溶解，用pH计测量调整pH值为7.2~7.4后定容至2000 mL，分装为250 mL小瓶插入排气针高压灭菌，超净台内冷却至室温后，4℃储存备用。

（7）DMEM培养液：将1袋DMEM培养基干粉倒入装有800 mL双蒸水的烧杯中，把包装袋内剩余贴壁粉并用双蒸水冲洗2~3次，用电子天平称量3.7 g NaHCO3加入烧杯，置于磁力搅拌器搅拌使其充分溶解，将之前配制好的青链霉素液各取0.5 mL加入其中，使青链霉素的终浓度都为100单位/mL。用pH计测量调整pH值至7.2~7.4，定容至1000 mL，于超净台中用三层0.22µm无菌滤膜过滤除菌，4℃储存备用。

（8）5×TBE：在盛有1600 mL去离子水的烧杯中加入硼酸55 g, Tris 108g, 0.5 M的EDTA(pH 8.0) 40 mL，置于磁力搅拌器上充分搅拌溶解，用pH计测量调整pH值约为8.0~8.2，去离子水定容至2000 mL，4℃储存备用。

（9）4×Tris-HCl/SDS（PH 8.8）：用电子天平称量Tris碱18.2 g, SDS 0.4 g，加入80 mL去离子水，置于磁力搅拌器上低速搅拌使其充分溶解，用盐酸调整pH值为8.8后定容至100 mL，室温储存备用。

（10）4×Tris-HCl/SDS（PH 6.8）：用电子天平称量Tris碱6.05 g, SDS 0.2 g，加入80 mL去离子水，置于磁力搅拌器上低速搅拌使其充分溶解，用盐酸调pH值为6.8后去离子水定容至100 mL，室温储存备用。

（11）10% SDS：用电子天平称量SDS 10 g，加入80 mL去离子水，置于磁力搅拌器上低速搅拌使其充分溶解，用盐酸调pH值为7.2后去离子水定容至100 mL，室温储存备用。

（12）10%过硫酸铵（AP）：在1 mL去离子水中加入0.1 g过硫酸铵，混匀使其充分溶解，4℃储存备用且一周内有效。

（13）10×Tris-甘氨酸电泳缓冲液：在盛有800 mL去离子水的烧杯中加入甘氨酸188 g, Tris 30.3 g, SDS 10 g，置于磁力搅拌器上搅拌使其充分溶解，去离子水定容至1000

mL，室温储存且使用时10倍稀释。

（14）1×转膜缓冲液：用电子天平称量Tris碱5.8 g，甘氨酸2.9 g, SDS 0.37 g，加入700 mL去离子水，置于磁力搅拌器上搅拌使其充分溶解，继续加入200 mL甲醇后去离子水定容至1000 mL，室温储存备用，使用前需4℃预冷。

（15）TBST缓冲液：在盛有800 mL去离子水的烧杯中加入20 mL的1 M Tris-HCl

（PH8.0），8.8 g NaCl，置于磁力搅拌器上搅拌使其充分溶解，最后加入0.5 mL吐温20，定容至1000 mL，4℃储存备用。

# **2** 实验方法

## **2.1** 技术路线



## **2.2** 细胞培养

### **2.2.1** 细胞复苏

将HepG2细胞、HL-7702细胞迅速从液氮罐中取出，并把冻存管放入37℃恒温水浴箱中连续轻摇，观察有2/3的冻存液溶解后在超净台内用移液器将其转入离心管，并向其内立即加入含10%胎牛血清的DMEM完全培养液10 mL, 1000 rpm离心5 min，弃去上清液，加入含10%胎牛血清的DMEM完全培养液5 mL，将细胞沉淀轻轻吹打为均匀的单细胞悬液后移入细胞培养瓶中，做好相应的标记后放入培养箱中培养，培养箱条件设置为37℃、5% CO2、饱和湿度。

### **2.2.2** 细胞传代

将置于5% CO2、37℃饱和湿度培养箱中的HepG2细胞、HL-7702细胞，每天在相差倒置显微镜下观察生长状态并2~3天换液一次，等细胞生长融合达到80%时，即对数生长期，应进行细胞传代。传代过程在超净台内进行保持无菌操作。首先倒掉旧培养液，加入5 mL PBS磷酸盐缓冲液洗涤细胞以避免残存的胎牛血清影响胰酶的消化作用，弃去PBS加入2 mL浓度为0.25%胰蛋白酶消化液，将培养瓶放入培养箱等待1~2 min，在相差倒置显微镜下观察细胞的状态，待细胞间隙增大，胞质回缩贴壁触角消失胞体变圆后加入含10%胎牛血清的DMEM完全培养液5 mL来终止胰酶的消化。将消化下来的细胞悬液转入离心管，设置1000 rpm离心5 min，然后倒掉离心上清液，加入含10%胎牛血清的DMEM完全培养液，将细胞沉淀轻轻吹打为均匀的单细胞悬液，重悬后等量接种到新培养瓶中并将培养体系补充至5 mL，于37℃、5% CO2、饱和湿度继续培养。

### **2.2.3** 细胞冻存

在相差倒置显微镜下观察细胞生长状态等其生长融合达到80%时，即对数生长期，可进行细胞冻存。首先弃掉旧培养液，加入5 mL PBS磷酸盐缓冲液洗涤细胞后弃掉，加入2 mL浓度为0.25%胰蛋白酶消化液，将培养瓶放入培养箱使胰酶在最适温度下消化1~2 min，观察细胞发生变化后加入DMEM完全培养液5 mL来终止胰酶的消化，将

细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，然后弃去上清液，加入提前配制好的冻存液（DMEM培养液：胎牛血清：DMSO=7:2:1）轻轻吹打细胞沉淀重悬细胞，最后将其转入冻存管并封口做好标记，放入含异丙醇的程序降温盒然后将其置于-80℃冰箱，第二天把冻存管放在液氮罐口30 min后投入液氮罐中长期储存。

## **2.3** 划痕愈合实验检测**As2O3**和**AZT**作用后**HepG2**细胞的横向迁移能力

实验分为4组，分别是As2O（3 终浓度为2μmol/L）单药组、AZT（终浓度为20μmol/L）

单药组、As2O3联合AZT用药组（两药终浓度同单药组）以及空白对照组（仅加入等量的DMEM培养液）

（1）用记号笔在6孔板背面横穿过孔划线，每隔0.5 cm划1条横线，每孔穿过 6

条线。

（2）取对数生长期的HepG2细胞，弃掉旧的培养液加入5 mLPBS磷酸盐缓冲液洗涤细胞，取2 mL0.25 %的胰蛋白酶消化细胞，将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃去离心上清液，DMEM培养基（含10%胎牛血清）重悬细胞，细胞计数并调整密度为3.5×105个/ml，接种于6孔板每孔2 ml。

（3）培养12小时后细胞贴壁长满，用移液器10μL的枪头垂直对准背后的横线再次划痕，PBS磷酸盐缓冲液洗涤3次去除划下的细胞。

（4）加入无血清培养液和药物处理各组细胞，每组3个复孔。

（5）将六孔板放入细胞培养箱中继续培养，并在0 h、24 h和48 h后在同一视野下拍照。样片的划痕宽度运用Image Pro Plus软件测定，并计算出平均划痕愈合率。实验进行三次生物学重复。

划痕愈合率（%）＝（0 h划痕宽度－24h划痕宽度）/0 h划痕宽度×100。

## **2.4** **Transwell**迁移实验检测**As2O3**和**AZT**作用后**HepG2**细胞的纵向迁移能力

（1）将对数生长期的HepG2细胞换液，用无血清的DMEM培养基培养12小时。

（2）将饥饿培养12 h后的HepG2细胞弃掉旧的培养液，加入5 mL PBS磷酸盐缓冲液洗涤细胞，加入2 mL0.25 %胰蛋白酶消化，将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃掉离心上清液，DMEM培养基（不含10%胎牛血清）轻轻吹打细胞沉淀

使其重悬为均匀的单细胞悬液，计数并将密度调整为5×104个/ml。

（3）将600μl含20%胎牛血清的DMEM培养液加入Transwell下室，200μl细胞悬取液加入上室，注意观察避免上下室间产生气泡。分别加入相应的药物处理细胞，分组同2.2节。

（4）经过48 h从培养箱取出24孔板，弃去培养液后用棉签轻轻擦干净上室面的细胞，PBS洗涤2次，加入3.7%甲醛溶液固定15 min, PBS再次洗涤2遍，100%甲醇脱水2 min, PBS继续洗涤2次，结晶紫染色20 min。

（5）在相差倒置显微镜下观察迁移到下室面的细胞，随机选取中央及四周5个视野，计数附着的细胞数量。实验进行三次生物学重复。

## **2.5** **Transwell**侵袭实验检测**As2O3**和**AZT**作用后**HepG2**细胞的侵袭能力

（1）将Matrigel胶转移至4℃使其融为液态，移液枪头以及24孔板置于4℃预冷。

（2）将Matrigel胶用无血清DMEM培养液1: 8稀释，取40μl均匀地涂在Transwell上室聚碳酸酯膜（孔径为8μm）上，避免产生气泡。然后放入培养箱于37℃反应1 h成胶，置于超净台紫外线照射过夜。

（3）第二天使用前，将小室用无血清培养液于37℃水化30 min。

（4）将饥饿培养12 h后的HepG2细胞弃掉旧的培养液，加入5 mL PBS磷酸盐缓冲液洗涤细胞，加入2 mL0.25 %胰蛋白酶消化，将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃掉离心上清液，DMEM培养基（不含10%胎牛血清）轻轻吹打细胞沉淀使其重悬为均匀的单细胞悬液，计数并将密度调整为2×106个/ml。其余步骤同2.3节。实验进行三次生物学重复。

## **2.6** 实时荧光定量**PCR**法检测**As2O3**和**AZT**处理**HepG2**细胞后***MMP2***、***VEGF***基因的表达

### **2.6.1** 细胞样品的制备

于相差倒置显微镜下观察细胞的生长状态，待处于对数生长期时加入2 mL 0.25 %

胰蛋白酶消化，将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃掉离心上清液，DMEM

培养基（不含10%胎牛血清）轻轻吹打细胞沉淀使其重悬为均匀的单细胞悬液，调整细胞密约为1×105个/mL且于每个培养瓶中接种5 mL，待细胞贴壁后，加药物处理，实验分组同2.2节。待72 h后，用胰蛋白酶消化收集各组细胞，用Trizol法提取各组细胞的总RNA。

### **2.6.2** 总**RNA**提取

（1）弃去旧的培养液并取5 mL PBS磷酸盐缓冲液洗涤细胞，加入2 mL0.25 %胰蛋白酶消化，将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃掉离心上清液，用1 mL

DMEM培养基（不含10%胎牛血清）轻轻吹打重悬细胞，转移至EP管中，调整离心机

4℃，7000 rpm离心8 min。

（2）弃掉离心上清液，取1 mL Trizol试剂分别加入每个EP管中，轻轻吹打混匀后置于冰上静置5 min使细胞充分裂解。

（3）将0.2 mL氯仿分别加入每个样本，手持EP管剧烈振荡15 s使液态变为粉白色，将EP管置于冰上静置5 min，调整离心机4℃，12000 rpm离心15 min。

（4）此时看到EP管内明显分层，将上层透明水相转移到新EP管中（大约0.45

mL），注意不能碰到下层红色液体，然后在新EP管中继续加入等体积的异丙醇，手动轻轻颠倒5次，切忌用力过大，将EP管置于冰上静置10 min，调整离心机4℃，12000

rpm离心10 min。

（5）弃去离心上清液后取l mL 75%乙醇加入EP管中，轻轻摇晃使RNA沉淀漂浮起来，4℃，12000 rpm离心2 min。重复一次此步骤。

（6）弃去离心上清液，将EP管倒置于超净台干燥l0 min后，取20μL DEPC水溶解RNA沉淀。

（7）RNA浓度及质量测量利用微量紫外分光光度仪来分析，A260 nm/A280 nm比值在1.8~2.0之间且RNA电泳条带完整无杂带则可用于后续实验。

### **2.6.3** **cDNA**第一链合成反应：

#### （1）首先按照反转录试剂盒的说明步骤在EP反应管中加入以下试剂：

试剂体积

Total RNA (up to 5μg/reaction) 5000 ng

Oligo(dT) 15 Primer 1.0μL

Random Primer 1.0μL

Add Nuclease-Free Water up to 5.0μL

利用漩涡振荡器混匀，再用掌上离心机快速离心30 s去除贴壁液体，观察无气泡后放入PCR反应仪，设置反应条件：70℃，5 min，运行结束后将EP反应管置于冰上静置5 min；

#### （2）加入RT反应体系成分并进行变性退火反应：

试剂体积

MgCl2 2.0μL

GoScript™5X Reaction Buffer 4.0μL

Recombinant RNasin®Ribonuclease Inhibitor 0.5μL

PCR Nucleotide Mix 1.0μL

GoScript™Reverse Transcriptase 1.0μL

Add Nuclease-Free Water up to 15.0μL

（1）步骤结束后将其5.0μL反应体系与（2）中15.0μL反应体系充分混匀后，用掌上离心机快速离心30 s去除贴壁液体，放入PCR反应仪并设置条件如下：

温度时间

25℃5 min（退火）

42℃60 min（延伸）

70℃15 min（灭活反转录酶）

4℃Forever

### **2.6.4** 实时荧光定量**PCR**反应：

*MMP2*、*VEGF*和*β-actin*引物设计见表1:

表1 引物序列

Gene Primer sequence（5ˊ→3ˊ）

*MMP2*

*VEGF*

*β-actin*

Upstream: ATCTTTGCTGGAGACAAATTCTGGA

Downstream: GCTTCAGGTAATAGGCACCCTTGA Upstream: CCAAGGCCAGCACATAGGAG Downstream: CTCCAGGGCATTAGACAGCAG Upstream: GACTCCACTGGGCAAGCGTAA Downstream: GTGGGGCGCCCCAGGCACCA

#### （1）将合成的20μLcDNA按1:2稀释，即加入40μL RNase-free Water，反应模板则为60

μL，每个样本取2μL进行实时荧光定量PCR反应；

#### （2）将粉末引物瞬时离心，按说明书加入RNase-free ddH2O溶解引物，并按1: 9稀释引物，掌上离心机快速离心30 s混匀稀释的引物；

#### （3）按扩增说明书，依次加入下列成分至PCR反应管中使最终反应体系为20μL：

试剂体积

上游引物（10µmol/L）1.0μL

下游引物（10µmol/L）1.0μL

Go Taq qPCR Master Mix, 2×10μL

CXR 100×0.2μL

cDNA 2.0μL

ddH2O 5.8μL

#### （4）掌上离心机快速离心30 s反应液，去除挂壁液并混匀，观察有无气泡。

#### （5）PCR扩增反应条件设置：95℃预变性2 min；95℃变性15 s；60℃复性30 s；72℃

延伸30 s，共完成40个循环后分析溶解曲线。溶解曲线单峰则可判断无非特异性扩增。反应数据采用2–△△Ct法进行分析，ΔCt＝目的基因Ct值－内参基因的Ct值，ΔΔCt＝实验组ΔCt－空白对照组ΔCt，将空白对照组的表达量设为1并作为参考计算出其他组的相对表达量。实验进行三次生物学重复。

## **2.7** **Western blot**检测**As2O3**和**AZT**作用后**HepG2**细胞中**MMP2**、**VEGF**、**ERK1/2** 和

***p*-ERK1/2蛋白的表达**

### **2.7.1** 细胞样品制备

于相差倒置显微镜下观察细胞的生长状态，待处于对数生长期时加入2 mL 0.25%胰蛋白酶消化，将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃掉离心上清液，DMEM培养基（不含10%胎牛血清）轻轻吹打细胞沉淀使其重悬为均匀的单细胞悬液，调整细胞密约为1×105个/mL且于每个培养瓶中接种5 mL，待细胞贴壁后，加药物处理，实验分组同2.2节。待72 h后，用胰蛋白酶消化收集各组细胞，提取各组细胞的总蛋白。

### **2.7.2** 细胞总蛋白的提取

（1）配置细胞裂解液：按1: 100的比例配制蛋白酶抑制剂和RIPA裂解液，将两者混匀后备用。

（2）裂解细胞：弃去旧的培养液，5 mL PBS缓冲液洗涤细胞，加入2 mL0.25 %胰蛋白酶消化，将细胞悬液移至离心管，1000 rpm离心5 min，继续用PBS缓冲液洗涤细胞3遍，倒尽离心上清液，取1 mL细胞裂解液加入每个样本，轻轻吹打混匀，置于冰上30 min，期间混匀吹打几次保证细胞裂解充分。

（3）标记好新的EP管转入其内离心，条件设置为：12000 rpm，4℃，5 min。

（4）将离心后的上清液25μL进行蛋白定量，移出剩余上清液并加入4×SDS蛋白上样缓冲液，比例为3: 1，在漩涡振荡器上混匀，然后进行蛋白变性，即沸水浴煮5 min，放入高速离心机设置12000 rpm，4℃，1 min离心，最后分装储存于-80℃冰箱。

（5）蛋白定量：将2 mg/mL的BSA标准品按下表稀释：

Vial Volume of Diluent Volume and Source of BSA Final BSAConcentration

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| A | 700 μL | 100 μLof Stock | 250 | μg/mL |
| B | 400 μL | 400 μL of vial A diluent | 125 | μg/mL |
| C | 450 μL | 300 μL of vial Bdiluent | 50 | μg/mL |
| D | 400 μL | 400 μL of vial C diluent | 25 | μg/mL |
| E | 400 μL | 100 μL of vial D diluent | 5 | μg/mL |

F 400μL 0 0μg/mL=Blank

①在96孔板中各加入25μL A-F标准品及待测样品；

②取200μL Working Reagent加入各孔，充分震荡混匀30 s；

③在37℃条件下孵育96孔板30 min；

④室温放至冷却；

⑤在酶标仪上测量562 nm处的光吸收值，根据OD值绘制出标准曲线并算得待测样品的蛋白含量。

### **2.7.3** **SDS-**聚丙烯酰胺凝胶电泳（**SDS-PAGE**）

#### （1）组装制胶架：用吹风机将彻底清洗后的玻璃板烘干，检查玻璃板无污渍痕迹后把前后玻璃板对齐后放入卡槽内卡紧，最后将玻璃平板及0.75 mm垫片组装安置于制胶架上；

#### （2）配胶：分离胶和浓缩胶的配法如下表，试剂应依次加入；

试剂12%分离胶10 mL 5%浓缩胶3 mL

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 去离子水 | 3.3 mL | 2.1 mL |
| 30%丙烯酰胺 | 4.0 mL | 0.5 mL |
| 1.5 mol/LTris(pH=8.8) | 2.5 mL | \_ |
| 1.0 mol/LTris(pH=6.8) | \_ | 0.38 mL |
| 10% SDS | 0.1 mL | 0.03 mL |
| 10%过硫酸胺（AP） | 0.1 mL | 0.03 mL |
| TEMED | 0.006 mL | 0.003 mL |

（3）先配制分离胶，然后立即缓慢地注入玻璃胶槽中，注入量应以达到胶板高度的3/4

为准，为避免空气对凝胶聚合的抑制应在在胶上面均匀地注入去离子水，等待分离胶凝固后倒掉上层的去离子水，将残余水分用滤纸吸干，再缓慢注入浓缩胶（避免产生气泡），插入梳子后继续等待上层浓缩胶凝固；

（4）待胶凝固将胶板放入电泳槽，并使电泳缓冲液没过凝胶，垂直拔出梳子，检查上样孔是否完整和歪偏，用移液器轻轻吹打调整上样孔；

（5）蛋白上样：按蛋白浓度计算上样体积，每孔加入60μg蛋白，向上样孔中依次加入样品和Prestained Protein Ladder，并记录加入顺序；

（6）电泳：设置两个电压，初始电压S1为80 V，当指示剂溴酚蓝进入分离胶后，调整电压为S2挡120 V，终止电泳的指示为溴酚蓝抵达分离胶底部。

### **2.7.4** **Western Blotting**检测目的蛋白质

（1）SDS-聚丙烯酰胺电泳结束后将胶板浸泡于转膜缓冲液中，小心分离出凝胶，并根据Marker位置，切下目的条带；

（2）按照切取目的条带的大小提前准备适当大小的，切去右上角一小块作为标记，甲醇溶液浸泡PVDF膜1 min使其激活，然后将其放入转膜液中并同海绵及滤纸一起浸泡，放入4℃冰箱60 min提前进行预冷；

（3）安装转膜装置：按以下顺序依次组装转膜装置，塑料支架负极、海棉、滤纸、凝胶、PVDF膜、滤纸、海棉和正极支架，为避免影响转膜效果每放一层上述装置时均要排出气泡。固定好转膜装置后，将塑料支架卡紧放入电泳槽中（注意放置的正负极是否正确），从4℃冰箱取出转膜液加入槽中，为协助降温将一冰袋放入中间，开始转膜；

（4）接通电源以恒定电流200 mA，转膜1 h（分子量越大转膜时间越长）；

（5）封闭：转膜结束后，将PVDF膜置于5%脱脂奶粉封闭液中于摇床上摇晃2 h；

（6）一抗孵育：将一抗体按1: 500的比例用5%脱脂奶粉封闭液进行稀释，倒入50 mL离心管内，用镊子从封闭液中夹出PVDF膜放入其中，置于摇床上摇晃孵育1h后放入于4°C冰箱冷藏过夜，次日继续在摇床上孵育1 h；

（7）当一抗孵育结束后，用镊子夹出PVDF膜放入干净的培养皿中，倒入新配置的TBST洗涤3次，每次在摇床上摇晃10 min；

（8）二抗孵育：将二抗体按1: 5000的比例用5%脱脂奶粉封闭液进行稀释，倒入50 mL

## 离心管内，从TBST中取出PVDF膜放入其中摇床摇晃孵育2 h；

（9）当二抗孵育结束后，用镊子夹出PVDF膜放入干净的培养皿中，倒入TBST洗涤3次，每次在摇床上摇晃10 min；

（10）显色：洗涤结束后把PVDF膜表面多余的TBST用滤纸吸掉，配置ECL超敏化学发光工作液，即A液和B液等体积充分混匀后，用移液器将其均匀地涂于PVDF膜上并避光孵育3 min，然后将其放入伯乐凝胶成像仪中摄取图像信号（注意显色的整个过程避光避光进行）；

（11）图像分析：蛋白质条带灰度值分析采用Image Lab软件进行，并以目的蛋白与内参蛋白的灰度比值来表示蛋白质得相对表达量。实验进行三次生物学重复。

## **2.8** 实时荧光定量**PCR**法检测**HL-7702**和**HepG 2**细胞中***PTK6***基因的表达

取对数生长期的HL-7702细胞和HepG2细胞，不加任何处理因素，直接提取RNA后，进行反转录及实时荧光定量PCR，比较两种细胞中*PTK6* mRNA的表达量，步骤同2.5节。

PTK6引物序列（5ˊ→3ˊ）：上游：CAGGTGGCCATTAAGGTGATTTCT，下游：

GCTTCTTCATGGCCTGGATCTC；共82 bp。内参照β-actin引物序列同步骤2.5节。实验进行三次生物学重复。

## 2.9 实时荧光定量**PCR**法检测**As2O3**和**AZT**作用后**HepG2**细胞中***PTK6***基因的表达于相差倒置显微镜下观察细胞的生长状态，待处于对数生长期时加入2 mL 0.25 %

胰蛋白酶消化，将细胞悬液转移至离心管，1000 rpm离心5 min，弃掉离心上清液，DMEM培养基（不含10%胎牛血清）轻轻吹打细胞沉淀使其重悬为均匀的单细胞悬液，调整细胞密约为1×105个/mL且于每个培养瓶中接种5 mL，待细胞贴壁后实验分组和药物处理

与2.2节相同，其余步骤同2.5节。实验进行三次生物学重复。

## **2.10** 统计方法

应用SPSS17.0对数据进行统计学分析处理，各指标的结果采用均值±标准差来描述，两组均数之间比较采用独立样本t检验，多组均数组间比较用one-way ANOVA，先行方差齐性检验，当方差齐时组间两两比较用LSD，当方差不齐时，组间两两比较用Dunnett's

## T3，*P*＜*0.05*为差异有统计学意义。

# **3** 实验结果

## **3.1** **As2O3**联合**AZT**作用对**HepG2**细胞横向迁移能力的影响

划痕愈合实验结果（图1A，表2）显示，划痕24 h后4组细胞的划痕比较，单药组愈合明显慢于对照组，联合给药组又明显慢于单药组；划痕48 h后对照组的划痕基本愈合，各单药组相比24 h的划痕宽度稍有变窄，而联合组基本无变化。单因素方差分析结果显示，48 h时4组之间的细胞划痕愈合率差异有统计学意义（F＝206.337, *P<*0.01）。组间比较发现，AZT组、As2O3组和联合给药组的划痕愈合率都明显低于空白对照组，差异均具有统计学意义（*P*值均<0.01），AZT和As2O3联合给药组的划痕愈合率明显低于两个单药组，差异均具有统计学意义（*P*值均<0.01），而两个单药组之间差异无统计学意义（*P>* 0.05）。以上结果说明，As2O3联合AZT能够协同抑制HepG2 细胞的横向迁移能力。

## **3.2** **As2O3**联合**AZT**作用对**HepG2**细胞纵向迁移能力的影响

Transwell迁移实验结果（图1B，表2）显示，各组药物作用48 h后在倒置相差显微镜下计数HepG2细胞，单因素方差分析4组之间的穿膜细胞数差异具有统计学意义

（F＝163.208, *P<*0.01）。组间比较发现，AZT组、As2O3组和联合给药组的穿膜细胞数均明显少于对照组（*P*值均<0.01），联合给药组的细胞数又少于两个单药组（*P*值均

<0.01），而AZT组和As2O3组之间差异无统计学意义（*P>* 0.05）。以上结果说明，As2O3联合AZT能够协同抑制HepG2细胞的纵向迁移能力。

## **3.3** **As2O3**联合**AZT**作用对**HepG2**细胞侵袭能力的影响

Transwell侵袭实验检测结果（图1B，表2）显示，药物作用HepG2细胞48 h后，

AZT组、As2O3组和联合给药组的穿膜细胞数明显少于对照组（F＝78.849, *P*值均<0.01），联合给药组的穿膜细胞数又少于两个单药组（*P*值均<0.01），而AZT单药组和As2O3单药组之间差异无统计学意义（*P>* 0.05）。实验结果说明，As2O3联合AZT能够协同抑制HepG2细胞的侵袭能力。





Control: 加入等量的培养液，As2O3: 2µmol/L，AZT: 20µmol/L，As2O3+AZT: 2+20µmol/L；与对照组相比较，\*\**P<*0.01；与As2O3或AZT单药组相比较，△△*P<*0.01

图1：划痕愈合实验（A）以及Transwell迁移和侵袭实验（B）检测As2O3联合AZT作用对人肝癌HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响（×100）

表2 划痕愈合率、迁移及侵袭细胞数（ *X* ± s ，n=3）

组别 划痕愈合率（%） 迁移细胞数 侵袭细胞数 对照组 72.68±2.17 258.67±14.36 108.33±12.67

AZT组 43.26±2.51\*\* 132.00±12.77\*\* 44.34±7.51\*\*

As2O3组 41.15±2.78\*\* 116.02±8.89\*\* 43.66±3.06\*\*

联合组 26.29±1.80\*\*△△ 54.33±9.61\*\*△△ 16.00±2.65\*\*△△

与对照组相比较，\*\**P<*0.01；与As2O3或AZT单药组相比较，△△*P<*0.01

## **3.4** **HepG2**细胞的总**RNA**提取

RNA电泳结果：通过1.2%琼脂糖凝胶电泳评价RNA的完整性，一般RNA电泳28S亚基是18S亚基的两倍亮度，5S条带微弱可见则说明RNA完整性良好，可以用于后续实验，见图2。



1: 空白对照组2：AZT（20μmol/L）组3：As2O3（2μmol/L）组4：As2O3(2μmol/L) +AZT(20μmol/L)

图2 不同组HepG2细胞总RNA电泳图

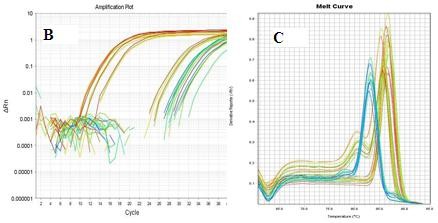
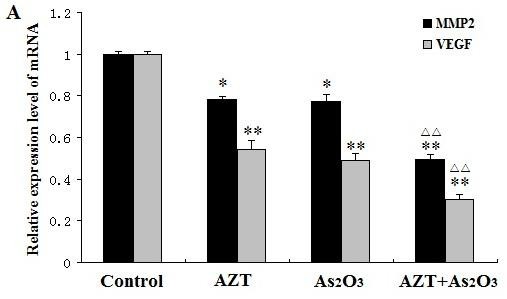
## **3.5** **As2O3**和**AZT**处理**HepG2**细胞后***MMP2***、***VEGF***基因的表达

实时荧光定量PCR检测结果（图3）显示，各组药物作用后HepG2细胞中*MMP2*

和*VEGF* mRNA的表达水平差异均有统计学意义（F＝53.176，*P<*0.01；F＝36.73，

*P<*0.01）。AZT 组、As2O3组和联合给药组的*MMP2*（*P<*0.05, *P<*0.05, *P<*0.01）和*VEGF*

（*P*值均<0.01）mRNA表达水平均低于对照组，联合给药组的*MMP2*（*P*值均<0.01）和VEGF(*P*值均<0.01) mRNA表达水平又明显低于各单药组，而AZT组和As2O3组之间MMP2（*P>* 0.05）和VEGF（*P*> 0.05）表达差异均无统计学意义。



A: 各组细胞中*MMP2*和*VEGF*的相对表达量；Control: 加入等量的培养液，As2O3: 2µmol/L，AZT: 20µmol/L，As2O3+AZT: 2+20µmol/L；

与对照组相比较，\**P<*0.05，\*\**P<*0.01；与As2O3或AZT单药组相比较，△△*P<*0.01;

B: *β-actin*、*MMP2*和*VEGF*扩增曲线；

C: *β-actin*、*MMP2*和*VEGF*溶解曲线。

图3 实时荧光定量PCR法检测As2O3联合AZT作用后人肝癌HepG2细胞中*MMP2*和*VEGF*

mRNA的表达量

## **3.6** **As2O3**和**AZT**作用后**HepG2**细胞中**MMP2**、**VEGF**、**ERK1/2**和***p*-ERK1/2**蛋白的表达

蛋白质印迹法检测结果（图4）显示，各组药物作用后HepG2细胞中MMP2、VEGF

和*p*-ERK1/2 蛋白的表达差异均有统计学意义（F＝32.61，*P<*0.01；F＝25.626，*P<*0.01;

F＝66.658，*P<*0.01）；AZT组、As2O3组和联合给药组的MMP2(*P<*0.01，*P<*0.05，

*P<*0.01）、VEGF（*P<*0.05, *P<*0.01, *P<*0.01）和*p*-ERK1/2(*P<*0.01, *P<*0.05, *P<*0.01)

蛋白表达水平均低于对照组，联合给药组MMP2(*P*值均<0.01)、VEGF（*P<*0.01, *P<*0.05）和*p*-ERK1/2（*P*值均<0.01）蛋白的表达水平又低于各单药组，而两个单药组之间这3种蛋白的表达差异均无统计学意义（*P*值均> 0.05）。ERK1/2蛋白的表达在各组之间均无明显差异（F＝0.548, *P>* 0.05），各组之间*p*-ERK1/2与ERK1/2的比值差异有统计学意义（F＝30.294, *P*值均<0.01）。



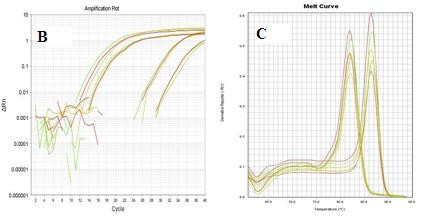
Control: 加入等量的培养液，As2O3: 2µmol/L，AZT: 20µmol/L，As2O3+AZT: 2+20µmol/L；与对照组相比较，\**P<*0.05，\*\**P<*0.01；与As2O3和AZT单药组相比较，△△*P<*0.01

图4 蛋白质印迹法检测As2O3联合AZT作用后人肝癌HepG2细胞中

MMP2、VEGF、ERK1/2和*p*-ERK1/2蛋白的表达

## **3.7** **HL-7702**和**HepG 2**细胞中***PTK6***基因的表达

实时荧光定量PCR结果（图5）发现，*PTK6* mRNA在肝癌HepG2细胞中的表达量明显低于人肝HL-7702细胞，差异具有统计学意义（t=5.92, *P<*0.01）。



## A：两种细胞中*PTK6*的相对表达量，与正常人肝细胞HL-7702相比较，\*\**P<*0.01 B：*β-actin*和*PTK6*扩增曲线

C: *β-actin*和*PTK6*溶解曲线

图5 实时荧光定量PCR法检测正常人肝HL-7702和人肝癌HepG2细胞中*PTK6* mRNA的表达量

## **3.8** **As2O3**和**AZT**处理**HepG2**细胞后***PTK6***基因的表达

各组药物作用后HepG2 细胞中*PTK6* mRNA的表达水平差异均有统计学意义（F＝

73.186，*P<*0.01）。AZT组、As2O3组和联合给药组的*PTK6*(*P*值均<0.01) mRNA表达水平均高于对照组，联合给药组*PTK6*（*P*值均<0.01）mRNA表达水平又明显高于各单药组，而AZT组和As2O3组之间*PTK6*（*P>* 0.05）的表达差异无统计学意义。





A: 各组细胞中*PTK6*的相对表达量；Control: 加入等量的培养液，As2O3: 2µmol/L，AZT: 20µmol/L，As2O3+AZT: 2+20µmol/L；\**P<*0.05，\*\**P<*0.01，与对照组相比较，△△*P<*0.01，与As2O3和AZT单药组相比较

B: *β-actin*和*PTK6*扩增曲线

C: *β-actin*和*PTK6*溶解曲线

图6 实时荧光定量PCR法检测As2O3联合AZT作用后人肝癌HepG2细胞中*PTK6* mRNA的表达量

# **4** 分析与讨论

有很多研究发现，As2O3作为中药砒霜的主要成分，可以通过多种途径抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡，如激活P38 MAPK信号通路[32]、影响还原性谷胱甘肽酶活性、活化

ROS系统[33]、激活Caspases途径、抑制NF-ĸB介导的多种肿瘤细胞[34]等。近年来研究发现，由于As2O3在对抗实体肿瘤中表现出的杀伤力，As2O3的联合用药也越来越被重视。Yang等[35]采用As2O3联合α-干扰素，通治疗22例中晚期肝癌患者，发现治疗效果较好，而且还可耐受不良反应，治疗后卡氏评分平均上升20分。伍婧等[36]研究发现，索拉非尼与As2O3可共同诱导线粒体膜电位下降以及抑制Raf/MEK/ERK信号通路来协同对抗肝癌。还有研究表明，As2O3与人参皂甙具有协同抗肝癌作用[37]，其作用机制可能与下调抑凋亡基因Bcl-2和上调促凋亡基因Bax的表达有关[38]。随着对As2O3研究的不断深入，人们发现其对于肿瘤的侵袭转移也有很强的抑制能力[39-40]，有望作为抗侵袭转移的临床用药。

端粒是位于真核生物染色体末端的重复DNA蛋白质复合体，它具有调节基因组完整性和维持染色体稳定性的功能。细胞每分裂一次，染色体复制一次，端粒即缩短30~200

bp，当缩到2-4kb时，细胞便进入衰老状态，这一现象被定义为“生命时钟”[41-42]。端粒酶是位于细胞核内的一种核糖核酸蛋白酶，其主要功能是催化染色体末端端粒DNA序列的合成，从而维持细胞的增殖和端粒长度。端粒酶由三部分组成，包括：RNA组分、端粒酶催化亚单位（逆转录酶组分）和端粒酶相关蛋白1。其中蛋白质组分能以自身的RNA为模板，催化亚单位可把合成的端粒DNA添加在染色体的末端，来阻止端粒随细胞分裂而缩短，这一生物学过程被认为是细胞获得永生化的途径之一，肿瘤的发生发展与此密切相关[43]。研究发现，正常组织中无端粒酶的表达，但在肿瘤细胞和永生化细胞系中检测到端粒酶活性的阳性率超过85%[44]. AZT作为一种端粒酶抑制剂，能够抑制永生化细胞的形成，并诱导细胞凋亡。其在抗肿瘤方面的优点表现为，首先端粒酶在肿瘤细胞中高表达而在正常细胞中几乎不表达，所以治疗靶点明确；其次，肿瘤细胞的端粒比正常细胞短，所以通过抑制端粒酶活性这一机理来抗肿瘤，有效性高，因为肿瘤细胞凋亡更快[45]；最后，肿瘤细胞对端粒酶抑制剂不易产生耐药性[46]，而这几乎是所有肿瘤化疗中的一大难题。

近年来为了防止耐药的产生以及达到增效、减毒的治疗效果，越来越多的研究将抗肿瘤的思路从原来的单药应用转为联合用药。众多研究发现，小分子化合物可协同端粒酶抑制剂来共同对抗肿瘤细胞的增殖[47-48]。有研究显示，AZT可增强紫杉醇对宫颈癌细胞化疗的敏感性，能成为一种增敏剂用于宫颈癌的化疗[49]。我们课题组前期研究发现，

大黄素联合AZT能够协同抑制肝癌和白血病KG-1a细胞的增殖以及诱导凋亡[50-52]。因此AZT也是很有前景的抗肿瘤药物，但目前还未见其抗肿瘤细胞迁移和侵袭的相关文献报道。本课题前期研究发现，As2O3和AZT两药具有协同作用[30]，尤其以20μmol/L AZT联合2μmol/L的As2O3效果最佳。因此，本研究继续以肝癌HepG2细胞为研究模型，观察As2O3和AZT联合对肝癌HepG2细胞迁移和侵袭的影响，初步探讨其可能的作用机制。

## **4.1** **As2O3**联合**AZT**对**HepG2**细胞迁移和侵袭能力的影响

癌细胞的侵袭和远处转移是一系列多因素、多步骤的复杂动态过程，其中癌细胞间粘附性改变、侵袭突破基膜、在血管和淋巴系统中迁移、运动以及在寄生灶中形成新生血管是几个最为关键的因素。同质型粘附，即肿瘤细胞与细胞间的粘附性降低，有利于瘤细胞从原发瘤体脱落，然后通过增强的异质型粘附，即瘤细胞通过其表面粘附分子及其受体与细胞外基质及基底膜的纤维粘连蛋白、层粘连蛋白产生特异性勃附，然后细胞外基质及基底膜再被瘤细胞分泌的各种蛋白水解酶和胶原酶降解，最后造成周围的组织破坏而有利于肿瘤细胞下一步向远处的迁移，肿瘤细胞通过以上步骤，从而完成局部侵袭和远处转移。

本研究采用迁移及侵袭实验检测As2O3、AZT单独给药及二者联合作用对HepG2细胞迁移和侵袭能力的影响。结果表明，两种药物均能减弱HepG2细胞的迁移和侵袭能力，尤以联合组的效果最佳。本研究所用的Transwell小室是研究肿瘤侵袭的良好工具，小室的上层包被Matrigel胶，下层以含20%胎牛血清的DMEM培养液作为趋化因子，可使高转移潜能的细胞向小室的下层方向移动。Matrigel胶是从富含细胞外基质蛋白的小鼠肿瘤中提取出来的基膜基质，含有层粘连蛋白、Ⅳ型胶原等，在37℃条件下呈胶冻状，具有转移潜能的细胞必须首先水解基底膜，才可迁移至聚碳酸脂滤膜的背面，其能够模拟体内细胞基膜的结构和物理特征，可作为研究肿瘤细胞侵袭特性的方法。而本课题运用的划痕愈合实验和Transwell迁移实验，又能观察肿瘤细胞横向及纵向迁移能力，所以通过这三个实验我们可得出As2O3联合AZT能够抑制HepG2细胞的迁移和侵袭能力。

## **4.2** **MMP2**、**VEGF**、**ERK1/2**和***p*-ERK1/2 mRNA**及蛋白表达的改变

肿瘤细胞的运动是其转移的首要条件[53-54]，肿瘤细胞从原位癌转变为侵袭性癌肿的这一过程，需要有运动活力的细胞来穿透基底膜和基质间隙，而完成这一步骤必需合成及分泌大量的基质降解酶。目前所知的基质降解酶主要包括，基质金属蛋白酶、纤维蛋白溶解酶和肝素酶。基质金属蛋白酶类MMPs是一类Zn离子依赖性蛋白酶家族，其在人体大部分正常组织中，如内皮细胞，MMPs以低水平量分泌和合成。但是在伤口愈合、妊娠和分娩、骨豁重建和塑型、乳腺组织的退化等过程中，MMPs多数起着生理性的降解作用，此过程均有着严格的调控机制，以避免对组织的破坏性。而在某些病理条件下，如肉芽形成或胶原血管疾病等，细胞外基质的降解失调，会对正常组织产生破坏性[55-56]。

大量研究显示，肿瘤细胞和基质细胞均可表达产生MMPs，其能够调节肿瘤发展过程中微环境的改变[57]，使基质异常降解，所以其活化被认为是癌细胞突破基膜以及细胞外基质降解的限速环节[58]。细胞外基质的基本骨架是Ⅳ型胶原蛋白，而MMP2和MMP9是截止目前发现的唯一可降解Ⅳ型胶原的两种蛋白水解酶。MMP2作为MMPs家族中分布最广的成员，是降解细胞外基质的重要酶类，其对明胶I、IV、V、Vn、X型胶原、弹性蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白等多种成分都有降解作用，能促使肿瘤细胞突破细胞外基质和基底膜的屏障，进入血管和淋巴管发生远处转移，故MMP2与恶性肿瘤的侵袭转移关系密切[59-61]。

本研究通过实时荧光定量PCR法检测各组药物作用后HepG2细胞中MMP2 和

VEGF的表达水平。实验结果表明，与空白对照组及两个单药组相比较，As2O3 联合

AZT给药能够明显抑制*MMP2*和*VEGF* mRNA的表达，这种表达抑制与划痕愈合实验和Transwell侵袭及迁移实验的结果一致，在分子水平上验证了As2O3与AZT联合给药能够抑制肝癌HepG2细胞的侵袭和转移，蛋白印迹法也证实了这一结果。

肿瘤的血管形成在肿瘤的生长代谢、侵袭转移过程中，起到了十分重要的作用。肿瘤形成的初期并无血管，只能通过周围组织的营养物质和氧气来供养肿瘤细胞的生长

[62]，所以为了避免肿瘤细胞的生长抑制以及发展为坏死灶，肿瘤细胞会分泌大量的血管

生成因子来促使肿瘤新生血管的生成。而血管内皮生长因子VEGF被认为是一种最强的促进血管生长调节因子[9]。它可以增加血管内皮细胞特异的有丝分裂原，通过与其特异性受体VEGFR结合，引起下游的信号转导，来刺激血管内皮细胞增殖和迁移达到促进

新生血管生成的目的。VEGF不仅在生理性血管生成中起到重要作用，更是病理性新生血管生成的关键因素。已有很多研究表明VEGF与肿瘤的发生发展密切相关。目前已发现其在多种肿瘤组织中高表达，如乳腺癌、卵巢癌、大肠癌、胃癌、肺癌、食道癌及膀腕癌[63-67]。研究发现VEGF在肝癌组织呈高表达，明显高于正常肝脏或肝硬化组织[68]。

Hirohashi等[69]研究发现，肝癌转移病灶的VEGF水平明显高于肝癌原发灶，说明VEGF在肝癌的转移中扮演着重要角色。Cui等[70]对30名肝癌术后患者的预后做了回顾性分析，发现肿瘤组织中VEGF表达水平与患者的术后复发及预后密切相关，说明VEGF的过表达是肝癌预后的危险因素。同样有研究表明，VEGF能预测肝癌化疗患者的预后状况，其与肝癌是否转移密切相关[71]，Yen等[72]和Kwon等[73]的研究也得出相同的结论，这些研究与本实验结果均相互一致。

细胞外调节蛋白激酶ERK由ERK1和ERK2组成，统称为ERK1/2，这种蛋白激酶由Boulton等[74]于上世纪90年代首先分离鉴定出。ERK1/2信号转导通路是细胞质中一条重要的丝裂原活化蛋白激酶MAPK信号通路，此通路的激活方式依赖于接受细胞外信号刺激，进而发生的磷酸化，从而将细胞外信号通过胞质传递到胞核内。如血清、生长因子等一些外界的刺激均能够激活ERK1/2通路。也有研究表明，一些细胞因子如G蛋白偶联受体和配体表达水平的改变可以激活ERK1/2信号通路，如癌细胞中VEGF高表达[75-76]. VEGF可引起KDR活化，活化的KDR通过自身磷酸化结合位点，与鸟苷酸交换蛋白结合，接近并活化RAS，然后进一步激活MAPK级联反应：Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2。大量研究表明ERK1/2通路在许多肿瘤的迁移和侵袭过程中起重要作用，例如：前列腺癌，口腔癌，肝细胞癌和肺癌[77-79]。大量的研究显示，抑制

ERK1/2信号通路，可以抑制肿瘤的发展。NF-κB是ERK信号通路的下游转录因子[80]，可调控MMP2的表达从而影响肿瘤的侵袭[81]。同样也有研究证实，ERK1/2信号通路的磷酸化能影响MMP2的表达，并且与癌细胞的侵袭和转移密切相关[82]。

以上这些研究结果在本研究中均得到不同程度的验证。我们用蛋白质印迹法同时检测ERK1/2和*p*-ERK1/2蛋白的表达量，结果表明，As2O3联合AZT能够降低肝癌HepG2细胞中*p*-ERK1/2蛋白的表达，而ERK1/2蛋白表达无明显改变。所以As2O3联合AZT能够抑制*p*-ERK1/2蛋白的表达，说明两药联合作用抑制了ERK1/2信号通路的磷酸化。可作出推测As2O3联合AZT可能是通过下调ERK1/2通路上游VEGF的表达，抑制

ERK1/2信号通路的磷酸化，从而抑制人肝癌HepG2细胞的侵袭和转移。

## **4.3** **PTK6**在**HepG2**细胞中的表达及**As2O3**联合**AZT**对其表达的影响

酪氨酸激酶6（protein tyrosine kinase 6, PTK6）又称为乳腺肿瘤激酶（breast tumor

kinase，Brk），是从转移性乳腺癌中发现的一种细胞内非受体型酪氨酸酶[83]。PTK6最初在小肠上皮细胞分化的相关研究中被发现，其由N端的SH3、中间的SH2和C端的酪氨酸激酶催化区域组成，结构类似于Src家族酪氨酸激酶，但其缺乏N端的豆蔻酰化位点，使PTK6不能定位于胞膜上而成为一类可溶性激酶[84]。PTK6目前在乳腺癌中研究较多，其在乳腺癌中高表达，并能促进乳腺癌细胞的增殖[85]，除此之外研究发现其在结肠癌和黑色素瘤中也呈高表达[86-87]. PTK6在肿瘤的发生与发展中有着重要作用，但在不同类型的肿瘤中PTK6分别有促癌或抑癌作用。在乳腺癌、卵巢癌、小细胞肺癌、鼻咽癌和前列腺癌的研究中发现，PTK6可促进肿瘤细胞迁移和侵袭[84,88-90]。而在结直肠癌、人骨肉瘤细胞和星形胶质细胞中，PTK6则抑制肿瘤细胞的分裂和增殖，并促进肿瘤细胞的凋亡[91-93]. Ono等[94]研究发现，在胰腺癌细胞中高表达的PTK6通过激活

ERK1/2信号通路诱导肿瘤细胞的迁移和侵袭。而有的研究表明，PTK6的低表达与喉鳞状细胞癌的不良预后密切相关，可作为预测其不良预后的指标[95]。由以上研究可知PTK6与癌症的侵袭转移密切相关。

本研究通过实时荧光定量PCR技术检测了人肝正常细胞HL-7702和肝癌HepG2细胞中*PTK6* mRNA的表达量，发现肝癌HepG2细胞中*PTK6*的表达明显低于正常肝细胞，而当用As2O3联合AZT处理HepG2细胞后，其表达量明显上升。这些结果说明，*PTK6*基因在肝癌中可能扮演着抑癌的作用，因此其在肝癌中呈低表达，而当用As2O3联合

AZT处理肝癌后，其表达量的升高，进一步说明两药联合对肝癌的抑制作用。很多研究表明PTK6是ERK1/2通路的上游调节因子，PTK6通过对下游ERK1/2的调节，会对癌症的侵袭转移产生影响[94, 96]。目前国内外还未见肝癌中PTK6的相关研究。我们猜想在肝癌中PTK6对下游ERK1/2也有一定的调节作用，其可能是肝癌治疗的重要靶点。本研究由于时间关系未做进一步证实。

结 **语**

本研究证实了小剂量As2O3联合AZT对肝癌HepG2的迁移和侵袭具有抑制作用，这一作用可能与下调VEGF的表达，进一步抑制ERK1/2通路的磷酸化以及抑制MMP2的表达有关。PTK6在肝癌HepG2细胞中低表达，联合给药后又呈高表达，说明低表达的PTK6与肝癌的迁移和侵袭有关。

**1．研究结论**

（1）As2O3联合AZT能够抑制肝癌HepG2细胞的迁移和侵袭。

（2）As2O3联合AZT协同抑制HepG2细胞迁移侵袭的作用可能与下调VEGF的表达，进一步抑制ERK1/2通路的激活以及抑制MMP2的表达有关。

（3）PTK6在肝癌HepG2细胞中低表达，其可能是ERK1/2通路的上游调控因子，具体机制有待进一步研究。

**2．研究结果的意义**

（1）本研究证实As2O3联合AZT在对HepG2细胞迁移和侵袭的抑制作用及初步的作用机理，将为这种联合方案的进一步研究开发与临床应用提供实验依据。

（2）研究结果不仅为抗肝癌化疗联合方案的选择提供了有价值的资料，也为肝癌

化疗的增效减毒目的及开发针对分子靶点的抗肿瘤新药提供了新的思路。

**3. 问题与展望**

（1）本实验系体外实验，由于机体内环境与肿瘤微环境很复杂，本实验所做的内容有待进行动物体内实验验证。

（2）本实验只是对As2O3联合AZT对HepG2细胞迁移和侵袭的抑制作用进行了初步探讨，但ERK1/2的上游因子PTK6对其有没有调控作用，以及是如何调控肝癌的侵袭转移的，还有待进一步研究。

参考文献

[1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.

[2] Grove I, Ahmad N, Amber B, *et al*. Hepatogastric Fistula following Transcatheter Arterial Chemoembolization of Hepatocellular Carcinoma [J]. *Case Rep Gastroenterol*, 2014, 8(3): 286-290.

[3] Li Y, Tian B, Yang J, *et al*. Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive characteristics [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130: 460-8.

[4] Ji XN, Ye SL, Li Y, *et al*. Contributions of lung tissue extracts to invasion and migration of human hepatocellular carcinoma cells with various metastatic potentials [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129: 556-64.

[5] Li S, Dong P, Wang J, *et al*. Icariin, a natural flavonol glycoside, induces apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells via a ROS/JNK-dependent mitochondrial pathway [J]. *Cancer Lett*, 2010, 298(2): 222-230.

[6] Wang X, Zhang A, Sun H. Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2013, 57(5): 2072-2077.

[7] Chen K, Zhang S, Ji Y, *et al*. Baicalein inhibits the invasion and metastatic capabilities of hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of the ERK pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72927.

[8] Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, *et al*. Clinical role of MMP/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(4): 425-431.

[9] Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J, *et al*. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 209-215.

[10] Abou-Alfa GK, Huitzil-Melendez FD, O Reilly EM, et al. Current management of advanced hepatocellular carcinoma [J]. *Gastrointest Cancer Res*, 2008, 2(2): 64-70.

[11] Thomas M. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol*, 2009, 44(19): 136-141.

[12] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, *et al*. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As2O3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As2O3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins [J]. *Blood*, 1996, 88(3): 1052-1061.

[13] Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2505-2515.

[14] Zhu HH, Wu DP, Jin J, *et al*. Oral tetra-arsenic tetra-sulfide formula versus intravenous arsenic trioxide as first-line treatment of acute promyelocytic leukemia: a multicenter randomized controlled trial [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(33): 4215-4221.

[15] Chen L, Wang J, Hu X, *et al*. Meta-analysis of all-trans retinoic acid-linked arsenic trioxide treatment for acute promyelocytic leukemia[J]. *Hematology*, 2014, 19(4): 202-207.

[16] Rock N, Mattiello V, Judas C, *et al*. Treatment of an acute promyelocytic leukemia relapse using arsenic trioxide and all-trans-retinoic in a 6-year-old child [J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2014, 31(2): 143-148.

[17] 杨鸿武, 杨贤东, 关宏伟. 三氧化二砷逆转人胃癌细胞SGC7901/ADR 耐药性的作用机制[J]. 肿瘤, 2006, 26(11): 994-996.

[18] Wang X, Gao P, Long M, *et al*. Essential role of cell cycle regulatory genes p21 and p27 expression in inhibition of breast cancer cells by arsenic trioxide [J]. *Med Oncol*, 2011, 28(4): 1225-1254.

[19] Dawn S, Shetal P, Fadi R, *et al*. Arsenic Trioxide induces a beclin-1 independent autophagic pathway via modulation of snon/skil expression in ovarian carcinoma cells [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(12): 1867-1881.

[20] Ma Y, Wang J, Liu L, *et al*. Genistein potentiates the effect of arsenic trioxide against human hepatocellular carcinoma: role of Akt and nuclear factor-κB [J]. *Cancer Lett*, 2011, 301(1): 75-84.

[21] Cheng B, Yang X, An L, *et al*. Arsenic trioxide-induced apoptosis of Hep-2 cell linethrough modulating intracellular glutathione (GSH) level [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2010, 37(1): 89-94.

[22] Oketani M, Kohara K, Tuvdendorj D, *et al*. Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth [J]. *Cancer Lett*, 2002, 183(2): 147-153.

[23] Cai X, Shen YL, Zhu Q, *et al*. Arsenic trioxide 2induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmem brane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia [J]. *Leukemia*, 2000, 14(2): 262-270.

[24] Uchida N, Buck DW, He D, *et al*. Direct isolation of human central nervous system stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26): 14720-14725.

[25] Yu S, Zhang JZ, Zhao CL, *et al*. Isolation and characterization of the CD133+ precursors from the ventricular zone of human fetal brain by magnetic affinity cell sorting [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(14): 1131-1136.

[26] Sharpless NE, Depinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer [J]. *Clin Invest*, 2004, 113(2): 160-168.

[27] Yu CC, Lo SC, Wang TC. Telomerase is regulated by protein kinase C zeta in human nasopharyngeal cancer cells [J]. *Biochem*, 2001, 335(4): 459-461.

[28] 周遵艳, 骆志国, 戴静, 等. 叠氮胸苷对人胶质瘤细胞辐射后DNA双链损伤修复的影响[J]. 实用癌症杂志, 2005, 20(5): 449-451.

[29] 高敏, 周福祥, 谢丛华, 等. 端粒酶抑制剂叠氮胸苷对HeLa细胞放射性DNA损伤修复的影响[J]. 癌变·畸变· 突变, 2007, 19(6): 448-452.

[30] 刘玉, 原凌燕, 楚慧媛, 等. As2O3联合AZT通过激活caspase-3通路抑制肝癌HepG2细胞的增殖[J]. 肿瘤, 2014, 34(8): 705-711.

[31] Chen C, Zhang Y, Wang Y, *et al*. Synergic effect of 3'-azido-3'-deoxythymidine and arsenic trioxide in suppressing hepatomacells [J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(5): 435-443.

[32] Yuan F, Xu J, Mi R, *et al*. The inhibitory effect of As2O3 combined with phorbol ester on the proliferation of Kasumi-1 cells and its mechanism [J]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2014, 35(6): 537-541.

[33] Zhao XY, Yang S, Chen YR, *et al*. Resveratrol and arsenic trioxide act synergistically to kill tumor cells in vitro and in vivo [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98925.

[34] Hoffman E, Mielicki WP. Arsenic trioxide: impact on the growth and differentiation of cancer cells and possible use in cancer therapy [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2013, 67: 817-27.

[35] Yang YM, Zhang SL, Song HY, *et al*. Arsenic trioxide combined with INF-αin the treatment of advanced primary liver cancer [J]. *Chinese Clinical Oncology*, 2002, 7(5): 355-358.

[36] 伍婧, 罗荣城, 张华, 等. 索拉菲尼联合三氧化二砷对肝癌细胞株的抑制作用[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(4): 639-645.

[37] He F, Zeng WT, Shen HX. Effect of Ginsenoside Rg3 Combined with Arsennic Trioxide on Tumor MVD and PCNA in Human Hepatic Carcinoma in Nude Mice [J]. *J Henan Univ Sci Tech*, 2007, 25(3): 167-170 .

[38] He F, He L. Combined Effect of Arsenic Trioxide and Ginseno-side Rg3 on the Induction of Apoptosis of Hepatoma Cells [M]. *Journal of Tropical Medicine*, 2009, 9(1): 29-31.

[39] Tingting R, Wei G, Changliang P. Arsenic trioxide inhibits osteosarcoma cell invasiveness via MAPK signaling pathway [J]. *Cancer Biol Thea*, 2010, 10(3): 251-257.

[40] Zhao XS, Song PL, Sun B. Arsenic trioxide inhibits metastatic potential of mouse hepatoma H22 cells in vitro and in vivo [J]. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int*, 2009, 8(5): 510-517.

[41] Robles-Espinoza CD, Velasco-Herrera Mdel C, Hayward NK, *et al*. Telomere-regμlating genes and the Telomere Interactome in familial cancers [J]. *Molecular Cancer Research*, 2014, 12(10): 1-30.

[42] Royle NJ, Mendez-Bermudez A, Gravani A, *et al*. The role of recombination in telomere length maintenance [J]. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37(3): 589-595.

[43] 刘仲娜, 鈡金城, 柴志欣. 端粒和端粒酶在癌症中的研究进展及意义[J]. 生命科学研究, 2014, 18(6): 260-264.

[44] Bravaccini S, Casadio V, Gunelli R, *et al*. Combining cytology, TRAP assay, and FISH analysis for the detection of bladder cancer in symptomatic patients [J]. *Annals of oncology*, 2011, 22(10): 2294-2298.

[45] Parkinson EK, Minty F. Anticancer Therapy Targeting Telomeres and Telomerase [J].

*BioDrugs*, 2007, 21(6): 375-385.

[46] Camarena FS, Serral GC, Santalo FS. Telomerase and telomere dynamics in ageing and cancer: current status and future directions [J]. *Clinical and Translational* Oncology, 2007, 9(3): 145-154.

[47] 张旭霞, 孙延庆, 魏小芳, 等. 大黄素对人慢性髓细胞性白血病K562细胞增殖与凋亡及c-myc基因表达的影响[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(20): 1541-1545.

[48] Lizzi AR, D Alessandro AM, Zeolla N, *et al*. The effect of AZT and chloroquine on the activities of ricin and a saporin–transferrin chimeric toxin [J]. *Biochemical pharmacology*, 2005, 70(4): 560-569.

[49] 邓守恒, 蔡晓军, 曹风军, 等. 叠氮胸苷体外增强紫杉醇对宫颈癌细胞化疗敏感性的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 334-336.

[50] 原凌燕, 陈彻, 楚惠媛, 等. 大黄素和叠氮胸苷对Egr -1siRNA转染的KG-1a细胞的增殖和凋亡的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(2): 386-391.

[51] 王丽娜, 李子坚, 席亚明, 等. 大黄素联合AZT对白血病KG－1a细胞的增殖及BCL-2、NF-κB、TGF-β表达的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(5): 1265-1271.

[52] 原凌燕, 陈彻, 刘玉, 等. 大黄素联合3’-叠氮-3'-脱氧胸腺核苷对人肝癌HepG2细胞增殖的协同抑制作用[J]. 遵义医学院学报, 2014, 37(3): 315-319.

[53] 方伟岗. 肿瘤细胞侵袭转移的分子生物学基础[J]. 中华医学杂志, 1994, 74(7): 447-450.

[54] Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis [J]. *Cancer Res*, 1978, 38(9): 2651-2660.

[55] Fisher JF, Mobashery S. Mechanism-based profiling of MMPs [J]. *Methods MolBiol*, 2010, 622: 471-487.

[56] Morley ME, Riches K, Peers C, *et al*. Hypoxic inhibition of human cardiac fibroblast invasion and MMP-2 activation may impair adaptive myocardial remodelling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(5): 905-907.

[57] Santos-Martinez MJ, Medina C, Jurasz P, *et al*. Role of metalloproteinases in platelet function [J]. *Thromb Res*, 2008, 121(4): 535-542.

[58] Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2245-2252.

[59] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metallo- proteinases and TIMPs [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(3): 562-573.

[60] 肖梅, 周宁新, 黄志强, 等. 肝门部胆管癌中MMP-2/TIMP-2比值半定量研究的临床意义[J]. 消化外科, 2003, 2(5): 310-313.

[61] 肖广发, 汤恢焕. 基质金属蛋白酶-2在胆管癌组织中的表达及与预后的关系[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(17): 1611-1613.

[62] Luiten RM, Fleuren GJ, Warnaar SO, *et al*. Target-specific activation of mast cells by immunoglobulin E reactive with a renal cell carcinoma-associated antigen [J]. *Lab Invest*, 1996, 74: 467-475.

[63] Langer C, Soria JC. The role of anti-epidermal growth factor receptor and anti-vascular endothelial growth factor therapies in the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2010, 11(2): 82-90.

[64] Flaherty KT, Puzanov I. Building on a foundation of VEGF and mTOR targeted agents in renal cell carcinoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5): 638-646.

[65] Hubbard J, Grothey A. Antiangiogenesis agents in colorectal cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 2010, 22(4): 374-380.

[66] Botelho F, Pina F, Lunet N. VEGF and prostatic cancer: a systematic review [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2010, 19(5): 385-392.

[67] 陈颖, 张嘉, 刘翔宇, 等. HIF-lα、VEGF和Sema4D蛋白在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(10): 786-788.

[68] Zhao A, Dou K, Li K, *et al*. The effects of the expression of VEGF and KDR on the angiogenesis, growth and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Surgery*, 2000, 38(6): 453-456.

[69] Hirohashi K, Yamamoto T, Uenishi T, *et al*. CD44 and VEGF expression in ext rahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepato-Gastroenterology*, 2004, 51(58): 1121-1123.

[70] Cui J, Dong BW, Liang P, *et al*. The influence of c-Myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients with tumor resection [J]. *Chung Hua Kan T sang Ping Ts a Chih*, 2004, 12(11): 660-662.

[71] Guo JH, Zhu X, Li XT, *et al*. Impact of serum vascular endothelial growth factor on prognosis in patients with unresectable hepatoccellular carcinoma after transarterial chemoembolization [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(1): 36-43.

[72] Yen CJ, Lin YJ, Yen CS, *et al*. Hepatitis B virus X protein upregulates mTOR signaling through IKKβto increase cell proliferation and VEGF production in hepatocelluar carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41931.

[73] Kwon SH, Jeong SW, Jang JY, *et al*. Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocelluar carcinoma [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2012, 18(3): 287-294.

[74] Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, *et al.* An insulin-stimulated-protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control [J]. *Science*, 1990, 249 (4964): 64-67.

[75] Schulze A, Lemann K, Jefferies HB, *et al*. Analysis of the transcriptional program induced by Rafin epithelial cells [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(8): 981-994.

[76] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, *et al*. The MAPK cascades: signaling components, nuclearroles and mechanisms of nuclear translocation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(9): 1619-1633.

[77] Murthy SR, Dupart E, Al-Sweel N, *et al*. Carboxypeptidase E promotes cancer cell survival, but inhibits migration and invasion [J]. *Cancer Lett*, 2013, 341(2): 204-213.

[78] Lin CW, Chen PN, Chen MK, *et al*. Kaempferol Reduces Matrix Metalloproteinase-2 Expression by Down-Regulating ERK1/2 and the Activator Protein-1 Signaling Pathways in Oral Cancer Cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80883.

[79] Lee SH, Jaganath IB, Manikam R, *et al*. Inhibition of Raf-MEK-ERK and Hypoxia pathways by Phyllanthus prevents metastasis in human lung (A549) cancer cell line [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2013, 13(1): 271.

[80] Yang XS, Liu SA, Liu JW, *et al*. Fucosyltransferase IV enhances expression of MMP-12

Stimulated by EGF via the ERK1/2, p38 and NF-κB pathways in A431 cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(4): 1657-1662.

[81] Felx M, Guyot MC, Isler M, *et al*. Endothelin-1(ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF-kappaB in human osteosarcoma [J]. *Clin Sci(Lond)*, 2006, 110(6): 645-654.

[82] Maeda-Yamamoto M, Suzuki N, Sawai Y, *et al*. Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(7): 1858-1863.

[83] Mitchell PJ, Baker KT, Marindale JE, *et al*. Cloning and characterization of cDNAs encoding a novel non-receptor tyrosine kinase, BRK, expressed in human breast tomurs [J]. *Oncogene*, 1994, 9(8): 2383-2390.

[84] Schmandt RE, Bennett M, Clifford S, *et al*. The BRK tyrosine kinase is expressed in high-grade serous cacinoma of the ovary [J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(9): 1136-1141.

[85] Harvey AJ, Crompton MR. Use of RNA interference to validate Brk as a novel therapeutic target in breast cancer: Brk promotes breast carcinoma cell proliferation [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 5006-5010.

[86] Barker KT, Jackson LE, Crompton MR. BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas [J]. *Oncogene*, 1997, 15: 799-805.

[87] Easty DJ, Mitchell PJ, Patel K, *et al*. Loss of expression of receptor tyrosine kinase family genes PTK7 and SEK in metastatic melanoma [J]. *Int J Cancer*, 1997, 71: 1061-1065.

[88] Ikeda O, Mizushima A, Sekine Y, *et al*. Involvement of STAP-2 in Brk-mediated phosphorylation and activation of STAT5 in breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(4): 756-761.

[89] Liu LN, Huang PY, Lin ZR, *et al*. Protein tyrosine kinase 6 is associated with nasopharyngeal carcinoma poor prognosis and metastasis [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 140.

[90] Zhao C, Chen Y, Zhang W, *et al*. Expression of protein tyrosine kinase 6 (PTK6) in nonsmall cell lung cancer and their clinical and prognostic significance [J]. *Onco Targets Ther*,

2013, 6:183-188.

[91] Gierut JJ, Mathur PS, Bie W, *et al*. Targeting protein tyrosine kinase 6 enhances apoptosis of colon cancer cells following DNA damage [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(11): 2311-2320.

[92] Lukong KE, Larocque D, Tyner AL, *et al*. Tyrosine phosphorylation of sam68 by breat tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression [J]. *Biol Chem*, 2005, 280(46): 38639-38647.

[93] Wang TC, Jee SH, Tsai TF, *et al*. Role of breast tumor kkinase in the in vitro differentiation of HaCaT cells [J]. *Br J Dermatol*, 2005, 153(2): 282-289.

[94] Ono H, Basson MD, Ito H. PTK6 promotes cancer migration and invasion in pancreatic cancer cells dependent on ERK signaling [J]. *Plos One*, 2014, 9(5): e96060.

[95] Liu XK, Zhang XR, Zhong Q, *et al*. Low expression of PTK6/Brk predicts poor prognosis in patients with laryngeal squamous cell carcioma [J]. *J Transl Med*, 2013, 11: 59.

[96] Zhao S, Li JC. Sphingosine-1-phosphate induces the migration of thyroid follicular carcinoma cells through the microRNA-17/PTK6/ERK1/2 pathyway [J]. *Plos One*, 2015, 10(3): e0119148.

**文献综述**

**肝癌侵袭及转移的分子机制研究进展**

恶性肿瘤最主要的生物学特性是侵袭转移，这也是恶性肿瘤特别是肝癌的重要致死因素[1]。侵袭转移是由多因素、多步骤一系列复杂的动态病理过程实现的。主要包括原发部位的肿瘤细胞间粘附性减弱脱离原发瘤，肿瘤细胞与细胞外基质粘附，肿瘤细胞降解细胞外基质从而侵袭穿越基底膜进一步向周围间质浸润性生长，穿越毛细血管或淋巴管壁侵入循环管腔，与血小板聚集或形成小瘤栓，通过血液或淋巴液输送至靶器官毛细血管，与靶器官的血管或淋巴管内皮细胞发生黏附，再经管壁和基底膜进入靶器官周围间质，在此部位定居并不断增殖形成肿瘤细胞转移灶。肿瘤细胞在靶器官定居后在细胞因子的作用下促进新生血管的生成也是转移灶形成的必要因素[2]。

原发性肝癌是消化系统最常见的一种恶性肿瘤，发病率和死亡率均居高[3-4]。手术切除和肝移植是唯一治愈方法。而70%的患者被确诊时已发展到晚期或者发生肝内外转移，术后的复发转移也是目前急需解决的一大难题[5-6]。因此对肝癌侵袭及转移机制的认识和研究是肝癌治疗的关键。恶性肿瘤侵袭及转移主要受细胞黏附性改变、细胞外基质降解、肿瘤血管生成等因素影响。因此，本文就肝癌细胞侵袭和转移的分子机制作一综述。 **1细胞粘附分子与肝癌的侵袭转移**

细胞粘附在恶性肿瘤的侵袭转移中发挥着重要作用，肝癌中存在多种粘附分子的异常表达，这些粘附分子会改变肿瘤细胞的黏附特性，使肿瘤细胞间粘附性降低，易从原位细胞群中解粘附脱离，而脱离后的肿瘤细胞则反而易粘附于细胞外基质，也就是影响了肿瘤细胞间的同质型黏附和肿瘤细胞与基质细胞间的异质型黏附。粘附分子是表达在细胞膜上的一种跨膜糖蛋白，正常上皮细胞间通过多种粘附分子而相互连接。钙黏蛋白、整合素及免疫球蛋白超家族CD24和CD44等是主要与肝癌相关的粘附分子。

1.1钙黏蛋白

钙黏蛋白（Cadherin）家族成员有N-cadherin、E-cadherin和P-cadherin三种。神经和肌肉组织中主要分布有N-cadherin，成人上皮细胞中主要是E-cadherin, P-cadherin则可见于胎盘和上皮组织。而与肝癌细胞的侵袭转移最相关的是E-cadherin[7]. E-cadherin

是一种钙离子依赖性的I型跨膜糖蛋白，主要功能包括维护上皮细胞极性、结构和形态完整并参与正常细胞的分化[8]。E-cadherin在结构上分为三部分，即胞内区（与细胞骨架蛋白相互作用）、胞外区（与邻近细胞以钙依赖方式相互作用）以及跨膜区。E-cadherin主要通过介导同质型细胞间的粘附作用来发挥信号传递、细胞间识别和诱导上皮细胞正常分化的作用[9]。研究发现，当E-cadherin过表达时可引起细胞间粘附性增强，肿瘤细胞中高表达E-cadherin者的粘附能力强于低表达者，而当肿瘤细胞几乎不表达E-cadherin时，可能会脱离原发病灶发生侵袭和转移[10]。E-cadherin在肝癌中的表达量与肝癌组织学分级负相关，表现为低表达者预后不良，生存率低[11]。当钙离子存在的前提下，E-cadherin还需要其胞内区与配体连接素（Catenin）结合为钙粘素-连接素复合体才能完全发挥作用，即细胞内的黏着复合体（cadherin catenin complex, CCC）。若CCC正常结构或功能被破坏则可引起细胞恶化，此结果可由任何分子的表达异常引起，其与肝癌细胞分化和侵袭转移密切相关[12]。检测E-cadherin与配体连接素的共同表达是判断癌细胞侵袭和转移的较好指标[13-14]，这已成为目前肿瘤侵袭转移的一大研究热点。

1.2整合素

整合素（Integrin）是分别由单个α和β亚单位通过非共价键结合而成的异二聚体跨膜糖蛋白大家族。迄今为止已确认有18种α亚单位和8种β亚单位，在理论上不同种类的α和β亚单位可由变性拼接而自由组合成上百种类型的异二聚体糖蛋白整合素，目前已有

20多种整合素被发现[15]。α和β亚单位分为三部分，同时包括一段结合配体的胞外域，单次跨膜域和一段短的无催化作用的胞内区域[16]。不同亚型整合素通过与其特异性配体结合（如细胞外基质和细胞间粘附分子）来介导肿瘤细胞间的同质型黏附和肿瘤细胞与基质细胞间的异质型黏附反应，并通过内向和外向两条信号途径来调节细胞的状态与功能。内向信号途径是向细胞内传递信号，前提必须有整合素与配体及相关基因的结合，而这些信息通常会影响细胞的生长和分化及相关基因的表达，如果发生异常信息的传递可能会导致肿瘤细胞失控性生长，主要有FAK-Ras-MAPK, FAK-PI3K等通路的传递

[17-18]。外向信号途径是将细胞内的信号传递到胞外，一般反应细胞本身功能状态的改变，

从而来调节整合素与配体的结合、整合素的聚集以及随后形成的黏着斑-细胞骨架蛋白与信号分子的复合物，来影响肿瘤细胞与基质间的异型性粘附作用[19]。通过整合素外向信号途径的调节，可促进肿瘤细胞脱离原发灶而发生远处转移[20]。研究表明，多种肿瘤

细胞的依赖性黏附生长、侵袭和转移受到整合素受体的调节作用[21]。整合素α3β1，α6β1，

α5β1和αv等与肝癌密切相关。Giannelli等[22]发现，TGF-β1可通过上调整合素α3β1来增强肝癌细胞的转移能力。研究表明，α6β1在肝癌中呈高表达，且其高表达与肝癌患者的预后呈负相关，表现为高复发率和低生存率[23-24]。

1.3 CD44

CD44是一类单链膜表面糖蛋白家族，它是具有高度异质性的单基因编码产物。其可介导同质型及异质型细胞粘附作用，参与了淋巴细胞的成熟归巢，伤口愈合，肿瘤的发生发展等过程，发挥着广泛的生物学功能。CD44基因位于11号染色体短臂，大约有

20余种外显子组成，在转录时靠近跨膜补的v区外显子可进行随机拼接，据此CD44可被分为标准型（CD44s）和变异型（CD44v）两类。Iizuka等[25]发现，发生门静脉瘤栓者的CD44表达率明显高于无门静脉瘤栓者，高出近2倍，可推测CD44在侵袭性肝癌中高表达，再对已发生转移的肝癌组织进行基因微阵列检测，同样表明其表达量与肝癌转移密切关联。Xie等[26]发现，利用RNA干扰技术使肝癌中的CD44的表达沉默时，可明显减低肝癌细胞的侵袭能力，同时可增加癌细胞的凋亡率和化疗敏感性。有学者认为

[27], CD44除了改变粘附作用而促进侵袭转移外，也可促进细胞外基质的降解，其机制可能是通过影响肿瘤细胞内某些信号传导来刺激其分泌蛋白水解酶，最终促进肿瘤的侵袭转移。研究表明，变异型CD44，即CD44v与肿瘤的侵袭转移密切相关。由于CD44对淋巴细胞的归巢有重要作用，因此肿瘤细胞中CD44v的表达可能是为了逃避宿主免疫系统的监控识别，而有利于肿瘤细胞粘附到细胞外基质，发生转移。研究显示，CD44的亚型CD44v6的高表达与肝癌的复发转移相关[28]。Jha等[29]发现，CD44v6阳性的肝癌患者表现为高转移、5年低生存率。Endo等[30]通过免疫组化学分析肝癌标本，发现

CD44v6在高转移倾向组的高表达，而在低转移倾向组明显低于前者，且低分化的肿瘤组织CD44表达增加，同时发现CD44v6的表达与肝癌的血管浸润及P53基因的过度表达密切关联。

1.4 CD24

CD24基因位于6q21染色体，由27个氨基酸组成，是一种高度糖基化的细胞表面蛋白。CD24具有典型的黏蛋白样结构，相对分子量小，被认为是一种黏附分子。CD24含有N和O连接的两个糖基化位点，O连接位点在分子顶端形成致密的葡聚糖链，而

在细胞膜的表面同时会有很多紧密排列的糖基化位点。CD24结构中的糖基可介导细胞间的同质型黏附和细胞与基质细胞间的异质型黏附[31]。由于P-选择素是CD24的唯一配体，CD24的糖链结构只能被内皮细胞和血小板表面的P-选择素特异性识别而结合[32]。单核细胞和中性粒细胞会黏附于表达了P-选择素的活化血小板和内皮细胞上，CD24可介导这一生理过程。研究表明，CD24与肿瘤的转移和预后相关，当肿瘤细胞中CD24呈阳性表达时，其易与血小板及内皮细胞产生黏附，表明CD24参与了肿瘤细胞的转移过程[33]。Woo等[34]检测肝癌组织、相应癌旁组织中CD24的表达量，发现肝癌组织显著高于癌旁组织，再结合临床资料进行分析得出，CD24与肝癌的转移及恶性程度密切相关，然后对手术治疗后复发的患者肝癌组织进行芯片分析，得出CD24可作为肝癌术后疗效及预后的预测指标。研究发现，抑癌基因NDRG2与CD24的表达量呈负相关，

NDRG2的上调能够下调CD24的表达量进而影响肝癌细胞的粘附，迁移和侵袭[35]。

**2基质降解酶类与肝癌的侵袭转移**

肿瘤细胞从原位癌转变为侵袭性癌肿的这一过程，需要有运动活力的细胞来穿透基底膜和基质间隙，而完成这一步骤必需合成及分泌大量的基质降解酶，来使肿瘤细胞通过缺损的细胞外基质进入血液淋巴循环。目前研究较多的与肝癌相关的基质降解酶主要是基质金属蛋白酶和丝氨酸蛋白酶。

2.1基质金属蛋白酶

基质金属蛋白酶类（matrix metalloproteinase, MMPs）是一类Zn2+依赖性蛋白酶家族，目前已证实有24种，人体中存在23种。MMPs在人体大部分正常组织中呈现低表达状态，其能发挥生理性的降解作用。为避免对组织的破坏性此过程是通过严格的调控机制来实现的，MMPs参与的生理性降解有伤口愈合、妊娠和分娩、骨豁重建和塑型、乳腺组织的退化等过程。而在病理状态下会出现细胞外基质的降解失调，对正常组织产生破坏性，比如肉芽形成和胶原血管疾病等病理条件[36-37]。根据作用底物的不同，可将

MMPs主要五大类：①胶原酶，主要降解蛋白多糖的核心蛋白和I、II、III型等多种类型胶原，包括中性粒细胞胶原酶（MMP8）、间质胶原酶（MMP1）和III型胶原酶（MMP13）；

②明胶酶，也叫Ⅳ型胶原酶，可降解明胶和IV、V、VII、X型基底膜胶原，包括明胶酶A和B（MMP2和MMP9）；③基质降解素即间质溶素，降解纤维连接蛋白（FN）、层黏蛋白（LN）、弹性纤维等基质糖蛋白和蛋白多糖的核心蛋白，包括MMP3、MMP7、

MMP10、MMP11；④膜型基质金属蛋白酶，不仅能降解细胞基质外也能活化其他MMPs包括MMP14、MMP15、MMP16、MMP17；⑤其他酶类，有MMP12、MMP18、MMP19等。大量研究证实，肿瘤细胞和基质细胞均可表达MMPs，其能够调节肿瘤发展过程中微环境的改变[38]，使基质异常降解，所以MMPs在癌细胞突破细胞外基质以及基底膜的过程中扮演了关键角色[39]。胶原蛋白是细胞外基质最重要的成分，Ⅳ型胶原蛋白的是其骨架蛋白，而明胶酶家族，即MMP2和MMP9是迄今为止发现的唯一可降解Ⅳ型胶原的蛋白水解酶，因此MMP2和MMP9被认为是与肿瘤侵袭转移关系最为密切的基质金属蛋白酶类。

大量研究表明，MMP2及MMP9的高表达与多种肿瘤细胞的侵袭转移具有相关性。研究证实，肝癌组织中MMP2及MMP9均呈过度表达状态，其与肿瘤的侵袭转移相关密切[40]。MMPs的抑制剂TIMPs（tissue inhibitors of metalloproteinase），能够抑制组织内MMPs的活性。有研究检测肝癌病人MMP2和TIMP2分别在原发性癌组织、转移灶及血清中的表达量，发现MMP2的表达主要集中在转移组织浸润的边缘，在血清和组织里肝癌转移和非转移者之间并无MMP2的差异表达，同时TIMP2在非转移患者血清和组织中的表达量明显高于已发生转移患者，并且高表达TIMP2患者的生存率是其低表达者的3倍[41]。Li等[42]发现，肝癌细胞的分化程度与MMP2的表达量负相关，并且

MMP2高表达患者的生存期较短。研究表明，MMP9能激活转化生长因子β1（transforming growth factorβ1, TGFβ1），而TGFβ1在肝癌中高表达且与肝癌的生长转化及分化程度相关，所以MMP9在肝癌的侵袭转移中有重要作用[43]。Zhou等[44]研究表明，Notch1的高表达可减弱肝癌细胞的侵袭转移能力，此过程是通过下调MMP2和MMP9来实现的。此前的研究证实，MMP9能诱导肝癌细胞分泌血管内皮生长因子，并且有众多研究发现其在肝癌患者血液中呈高浓度状态[45-47]。

Gayasaka等研究发现，MMP9与正常组织相比较不仅在肝癌组织中高表达[48]，甚至可作为检测原发性肝癌的新型标志物，MMP9的水平反映了肿瘤对血管的侵袭的程度。

2.2丝氨酸蛋白酶

纤维蛋白酶原激活因子（plasminogen activators, PAS），属于丝氨酸蛋白酶，可降解胶原类基质，其作用机制是催化无活性的胶原酶原向有活性的胶原酶转化，还可将纤溶酶原催化为纤溶酶，后者可降解大量的组织蛋白。现已证实PAS还能激活MMPs 参

与细胞外蛋白的水解。根据组织形态和结构，PAS可被分为组织型纤维蛋白酶原激活剂

（tissue type plasminogen activator, tPA）和尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂（urokinase type plasminogen activator, uPA）两种形式。其中uPA与细胞外基质降解和肿瘤的侵袭转移密切关联[49]。uPA在组织中最初以无活性的酶原形式存在，即Pro-uPA，当其与与细胞膜或间质中的uPA人特异性受体（uPAR）结合后，会被激活为双链活化形式，然后进一步激活纤溶酶，最终引起ECM和BM的降解。PAI是纤溶酶活性抑制剂，uPA、PAI及uPAR之间可通过复杂的相互作用共同参与完成对ECM的降解，实现最终的侵袭与转移。PAI由PAI-1和PAI-2组成，其中后者与肝癌的侵袭转移更为密切。有研究通过检测肝癌组织中uPA、uPAR、PAI-l的表达量，发现与对照组比较有显著性差异，而PAI-2的表达无明显差异，表明uPA、uPAR、PAI-l与肝癌的侵袭转移有关[50]。Zheng等[51]研究同样表明，uPA、uPAR能促进肝癌的侵袭转移，可作为评价预后的指标。Deli等[52]研究显示，PAI-l有抑制肝癌侵袭转移的作用，并且其与uPA的表达平衡在肝癌的侵袭转移中至关重要。 **3血管生成因子与肝癌的侵袭转移**

早在上世界70年代年学者Folkman[53]提出，实体肿瘤通常生长到1~2 mm3大小左右，如果没有供养自给的新生血管产生则无法继续生长而坏死。由此说明，抑制肿瘤新生血管的产生是抗肿瘤的另一途径。肿瘤形成的初期并无血管，只能通过周围组织的营养物质和氧气来供养肿瘤细胞的生长[54]，所以肿瘤细胞为了避免其自身受到生长抑制以及发展为坏死灶，会分泌大量的血管生成因子来促使肿瘤新生血管的生成。肿瘤灶中新生血管的形成在其生长代谢、侵袭转移的过程中，起到了十分重要的作用。肝癌是一种血管丰富极其的实体瘤，肿瘤细胞极易侵入肝组织血管内而进入血循环。这主要与肝癌组织内特殊的血管形态和结构有关。这些由癌细胞诱导产生的新生血管极不规则，部分无明显血管腔仅为数个内皮细胞团块，部分仅是一层内皮细胞且伴随薄而易断裂的裂隙状基底膜平滑肌层。所以不仅为肝癌细胞创造了侵袭和转移的有利条件，也是其可持续性生长的前提。因此新生血管的产生在肝癌的发生发展中起到了关键作用。

3.1血管内皮生长因子

血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）是迄今为止被认为最强、特异性最高的一种促进血管生长调节因子[55]。VEGF可以增加血管内皮细胞特异

的有丝分裂原，其促进新生血管生成的机制，是通过与特异性受体VEGFR结合，并引起下游的信号转导从而刺激血管内皮细胞增殖和迁移而实现的。VEGF不仅在生理性血管生成中起到重要作用，更是病理性新生血管生成的关键因素。已有很多研究表明VEGF与肿瘤的发生发展密切相关。目前已发现其在多种肿瘤组织中高表达，如乳腺癌、卵巢癌、大肠癌、胃癌、肺癌、食道癌及膀腕癌[56-60]. VEGF选择性地作用于血管内皮细胞膜上的VEGFR-1和VEGFR-2受体而发挥作用。研究报道，在肝癌中VEGF主要是通过VEGFR-2来起作用的[61]。缺氧条件和致癌基因的激活可诱导VEGF的表达水平上升。研究表明，低氧条件可刺激VEGF的高表达，进而促进肝癌新生血管的产生[62]，Yasuda等[63]发现缺氧诱导因子-1（HIF-1）在其中扮演着关键角色。研究发现VEGF在肝癌组织呈高表达，明显高于正常肝脏或肝硬化组织[64]。Hirohashi K等[65]研究发现，肝癌转移病灶的VEGF水平明显高于肝癌原发灶，说明VEGF在肝癌的转移中扮演着重要角色。

Cui等[66]对30名肝癌术后患者的预后做了回顾性分析，发现肿瘤组织中VEGF表达水平与患者的术后复发及预后密切相关，说明VEGF的过表达是肝癌预后的危险因素。同样有研究表明，VEGF能预测化疗后肝癌患者的预后状况，并与肝癌的转移密切相关[67]。

Zhao等[68]通过血清检测得出，VEGF在肝癌患者的表达量高于一般肝病患者和正常人，而其在发生转移的肝癌患者的表达高于未转移者。因此，VEGF可能是判断肝癌侵袭转移和治疗预后的一个重要预测指标。

3.2血管生成素

血管生成素（angiogenin, Ang）迄今为止共发现4个家族成员包括Ang-I、Ang-II、Ang-III、Ang-IV，这是一类能够发挥促进血管生成作用的细胞因子，来源于肿瘤组织的。它们具有共同受体即内皮细胞特异性的酪氨酸激酶受体Tie-2。其家族中与血管生成关系最为密切的是Ang-I、Ang-II. Ang-I主要调节血管成熟，抑制内皮细胞凋亡，减少血管的萎缩和退化，能够稳定血管结构，但对于血管内皮细胞的增殖并无作用。Ang-II是Ang-I的天然拮抗剂，竞争性抑制Ang-I形成不稳定的血管，其在肝癌组织中呈高表达状态[69]。Yoshiji等[70]利用小鼠肝癌模型证实了Ang-II和VEGF具有协同作用。实验证实Ang-II在VEGF等血管生成因子存在的条件下会促进血管的重塑和生成，而其缺乏时则会引起血管退化。研究显示VEGF/KDR和Ang-1/Tie-2两条信号通路在肿瘤血管生成中发挥着重要作用，其在肝癌患者体内均被激活，可作为判断肝癌预后及转移的重要

指标[71]。Chen等[72]研究显示，VEGF和Ang-II与肝癌的分化程度，微血管密度和侵袭性呈正相关，检测其表达水平可以判断肝癌的预后。

**4 MircoRNA与肝癌的侵袭转移**

MicroRNAs（miRNAs）是一类19~25个碱基长度的内源性非编码单链小分子RNA，可在转录后水平影响基因的表达。miRNA在胞浆内与RNA诱导的沉默复合体

（RNA-induced silencing complex, RISC）结合，以互补或者不完全互补的方式识别并且结合靶基因，使靶基因miRNA裂解或遏制蛋白的翻译。miRNA能够调节体内多种生命活动，既能作为致癌基因也能发挥抑癌作用，并且与很多肿瘤的发生发展密切相关[73-74]。已有研究表明miRNA与肝癌的发生发展紧密相关，预测其有可能成为早期诊断肝癌并进行预后监测的新型标志物和分子干预治疗的新靶点[75-76]。近年来，众多研究利用分子生物学技术鉴定出了一系列与肿瘤的发生发展相关的miRNA。

miR-122是肝脏特异性表达的miRNA，生理状态下可参与肝脏脂肪酸及胆固醇的。研究提示miR-122在肝癌预后不良的患者中显著下调，可能是抑制肝癌表型和癌细胞恶变侵袭能力的机制之一[77]。Tsai等[78]研究表明miR-122可靶向调控解聚素-金属蛋白酶

17来抑制肝内肿瘤的侵袭转移。miR-21在肝癌组织中的表达明显上调，被认为是一种促癌转移的miRNA，目前研究得出其促转移的机制可能是通过调节PTEN和PDCD4，进而上调磷酸化原癌基因c-jun, MMP2和MMP9来促进侵袭转移的[79-80]。有研究经过系统地筛选发现有20种miRNA可以作为预测肝癌的转移能力和术后复发率的检测指标，包括let-7g，miR-126，miR-207, miR-338等[81]。Auqello等[82]对包括肝癌各个分期的60例患者运用基因芯片进行了664种成熟miRNA的检测，得出结果4种属于C19MC

（chromosome 19 miRNA cluster）的miRNA明显升高，经进一步研究分析发现，C19MC升高与肝癌的恶性程度、侵袭转移能力、治疗后复发率和预后短期生存率呈正相关。**5小结**

肝癌的侵袭转移是个复杂且由多因素调控的动态过程，以上关于细胞粘附分子、基质降解酶、血管生成因子和MircoRNA的研究回顾从不同的环节不同程度地探讨了肝癌侵袭转移的分子机制。未来还需要更多深入的研究为临床上对抗肝癌侵袭转移的诊断检测和干预治疗提供新的方法和思路。

参考文献

[1] Chen K, Zhang S, Ji Y, *et al*. Baicalein inhibits the invasion and metastatic capabilities of hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of the ERK pathway [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e72927.

[2] 王杰军, 高勇, 许青. 肿瘤转移机制及诊疗进展[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 76-77.

[3] Ferlay J, Shin HR, Bray F, *et al*. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.

[4] Grove I, Ahmad N, Amber B, *et al*. Hepatogastric Fistula following Transcatheter Arterial Chemoembolization of Hepatocellular Carcinoma [J]. *Case Rep Gastroenterol*, 2014, 8(3): 286-290.

[5] Li S1, Dong P, Wang J, *et al*. Icariin, a natural flavonol glycoside, induces apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells via a ROS/JNK-dependent mitochondrial pathway [J]. *Cancer Lett,* 2010, 298(2): 222-230.

[6] Wang X, Zhang A, Sun H. Power of metabolomics in diagnosis and biomarker discovery of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2013, 57(5): 2072-2077.

[7] Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114( Pt 4): 629－641.

[8] Huber AH, Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recogni-tion by beta-catenin [J]. *Cell*, 2001, 105(3): 391-402.

[9] Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, *et al*. The epithelial-mesenchymal transition: New insights in signaling, development, and disease [J]. *J Cell Biol*, 2006, 172(7): 973-981.

[10] Hayashida Y, Honda K, Idogawa M, *et al*. E-cadherin regulates the association between beta-catenin and actinin-4 [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8836-8845.

[11] Ijayoshi J, Ichida T, Sugitani S, *et al*. Gross appearance of hepatocellular carcinoma reflects E-cadherin and risk of early recurrence after treatment [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(6): 673-677.

[12] Kohm AP, Miller SD. Role of ICAM-1 and P-selectin expression in the development and effector function of CD4+ CD25+ regulatory T cells [J]. *J Autoimmun*, 2003, 21(3): 261.

[13] Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers [J]. *Am J Path*, 1998, 153: 333-339.

[14] Pignatelli M, Vessey CJ. Adhension molecules: novelmolecular tools in tumorpathology [J]. *Hum Pathol*, 1994, 25: 849-856.

[15] AvraamidesCJ, Garmy-SusiniB, VarnerJA. Integrinsinangiogenesisand lymphangiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(8): 604-617.

[16] Van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interaction of integrins [J]. *Cell Tissue Res*, 2001, 305: 285-298.

[17] 张惠静, 卢晓, 蔡绍皙. 整合素与肿瘤[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29(5): 425-427.

[18] Damsky CH, Ilic D. Integrin signaling: It's where the action is [J]. *Curr Opin cell Biol*, 2002, 14(5): 594-602.

[19] 唐雪莲, 李静, 耿美玉. 整合素与肿瘤转移[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(10): 1164-1166.

[20] Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(2): 91-100.

[21] 李娜, 张贺龙. 整合素家族与肿瘤骨转移相关性研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(3): 579-582.

[22] Giannelli G, Fransvea E, Marinosci F, *et al*. Transforming growth factor-beta 1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha 3 beta 1 integrin [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(1): 183-193.

[23] Nejjria M, Hafdi Z, Dumortier J, *et al*. Theα6β1 integrin expression in hepatocarcinoma cell: regulation and role in cell adhesion andmigration [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83: 518-525.

[24] Torimura T, Ueno T, Kin M, *et al*. Coordinated expression of integrin α6β1 and laminin in hepatocellular carcinoma[J]. *Human Pathol*, 1997, 28: 1131-1138.

[25] Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, *et al*. Different molecular pathways determining extrahepatic and intrahepatic recurrences of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2006,

16(5): 1137-1142.

[26] Xie Z, Choong PF, Poon LF, *et al*. Inhibition of CD44 expression in hepatocellular carcinoma cells enhances apoptosis, chemosensitivity, and reduces tumorigenesis and invasion [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(6): 949-957.

[27] Zheng Q, Tang ZY, Xue Q, *et al*. Invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in relation to urokinase type plasminogen activator, its recepetor and inhibitor [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126 (11): 641.

[28] Yang GH, Fan J, Xu Y, *et al*. Osteopontin combined with CD44, a novel prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative resection [J]. *Oncologist*, 2008, 13: 1155-1165.

[29] Jha RK, Ma Q, Chen S, *et al*. Relationship of fibronectin and CD44v6 expression with invasive growth and metastasis of liver cancer [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27: 324-328.

[30] Endo K, Terada T. Protein expression of CD44 (standard and variant isoforms) in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinico-pathologic parameters, p53 expression, and patient survival [J]. *J Hepatol*, 2000, 32: 78-84.

[31] Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P, *et al*. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule [J]. *J Mol Histol*, 2004, 35(3): 255-262.

[32] Aigner S, Sthoeger ZM, Fogel M, *et al*. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells [J]. *Blood*, 1997, 89(9): 3385-3395.

[33] Friederichs J, Zeller Y, Hafezi-Moghadam A, *et al*. The CD24/P-selectin binding pathway initiates lung arrest of human A125 adenocarcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(23): 6714-6722.

[34] Woo HG, Park ES, Cheon JH, *et al*. Gene expression-based recurrence prediction of hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(7): 2056-2064.

[35] Zheng J, Li Y, Yang JD, *et al*. NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 251.

[36] Fisher JF, Mobashery S. Mechanism-based profiling of MMPs [J]. *Methods MolBiol*,

2010, 622: 471-487.

[37] Morley ME, Riches K, Peers C, *et al*. Hypoxic inhibition of human cardiac fibroblast invasion and MMP-2 activation may impair adaptive myocardial remodelling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(5): 905-907.

[38] Santos-Martinez MJ, Medina C, Jurasz P, *et al*. Role of metalloproteinases in platelet function [J]. *Thromb Res*, 2008, 121(4): 535-542.

[39] Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2245-2252.

[40] Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, *et al*. Clinical role of MMP/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(4): 425-431.

[41] Loughna S, Sato TN. Angiopoietin and Tie signaling pathways in vascular development [J]. *Matrix Biol*, 2001, 20(5-6): 319-325.

[42] Li ZW, Dai Y, Lu GE, *et al*. Relationship between VEGF expression, tumor angiogenesis and invasion, metastasis and prognosis ofhepatocellular carcinoma [J]. *China J Modern Med*, 2003, 13(16): 15-20.

[43] Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-βand promotes tumor invasion and angiogenesis [J]. *Gene & Development*, 2000, 14(2): 163-176.

[44] Zhou L, Zhang N, Li Q, *et al*. Associations between high levels of Notch1 expression and high invasion and poor overall survival in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumor Biology*, 2013, 34(1): 543-553.

[45] Yeh HC, Lin SM, Chen MF, *et al*. Evaluation of serum matrix metalloproteinase MMP-9 to MMP-2 ratio as a biomarker in hepatocellurar carcinoma [J]. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(97): 98-102.

[46] Kuyvenhoven JP, Van HB, Blom E, *et al*. Assessment of the clinical significance of serum matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in patients with various chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma [J]. *Thromb Haemost*, 20003, 89(4): 718-725.

[47] Kim KR, Bae JS, Choi HN, *et al*. The role of serum response factor in hepatocellular

Carcinoma: an association with matrix metalloproteinase [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(6): 1567-1572.

[48] Alpagot T, Suzara V, Bhattacharyya M. The associations between gingival crevice fluid matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and periodontitis in human immunodeficiency virus positive patients [J]. *J Periodont Res*, 2006, 41: 491-497.

[49] Killeen S, Hennessey A, Ei HY, *et al*. The urokinase plasminogen activator system in cancer: a putative therapeutic target [J]. *Drug News Perspect*, 2008, 21(2): 107-116.

[50] Zhou L, Hayashi Y, Itoh T, *et al*. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 and -2 in hepatocellular carcinoma [J]. *Pathol Int*, 2000, 50(5): 392-397.

[51] Zheng Q, Tang ZY, Xue Q, *et al*. Invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in relation to urokinase-type plasminogen activator, its receptor and inhibitor [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2000, 126(11): 641-646.

[52] Deli G, Jin CH, Mu R, *et al*. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in hepatocellular carcinoma and surrounding cirrhotic liver tissues [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(7): 960-963.

[53] Folkman J. Isolation of a Tumor Factor Responsible to Angiogenesis [J]. *J Exp Med*, 1971, 133(2): 275-288.

[54] Luiten RM, Fleuren GJ, Warnaar SO, *et al*. Target-specific activation of mast cells by immunoglobulin E reactive with a renal cell carcinoma-associated antigen [J]. *Lab Invest*, 1996, 74: 467-475.

[55] Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J, *et al*. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287: 209-215.

[56] Langer C, Soria JC. The role of anti-epidermal growth factor receptor and anti-vascular endothelial growth factor therapies in the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Clin Lung Cancer*, 2010, 11(2): 82-90.

[57] Flaherty KT, Puzanov I. Building on a foundation of VEGF and mTOR targeted agents in renal cell carcinoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(5): 638-646.

[58] Hubbard J, Grothey A. Antiangiogenesis agents in colorectal cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 2010, 22(4): 374-380.

[59] Botelho F, Pina F, Lunet N. VEGF and prostatic cancer: a systematic review [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2010, 19(5): 385-392.

[60] 陈颖, 张嘉, 刘翔宇, 等. HIF-lα、VEGF和Sema4D蛋白在卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(10): 786-788.

[61] Yoshiji H, Kuriyama S, Hicklin DJ, *et al*. KDR/Flk-1 is a Major Regulator of Vascular Endothelial Growth Factor Induced Tumor Development and Angiogenesis in Murine Hepatocellular Carcinoma Cells [J]. *Hepatology*, 1999, 30(2): 1179-1186.

[62] Marschall Z, Cramer T, Hocker M, *et al*. Dual Mechanism of Vascular Endothelial Growth Factor Upregulation by Hypoxia in Human [J]. *Hepatocellular Carcinoma*, 2001, 48(5): 87-96.

[63] Yasuda S, Arii S, Mori A, *et al*. Hexokinase II and VEGF Expression in Liver Tumors: Correlation with Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha and its Significance [J]. *Hepatol*, 2004, 40(1): 117-123.

[64] Zhao A, Dou K, Li K, *et al*. The effects of the expression of VEGF and KDR on the angiogenesis, growth and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Chinese Journal of Surgery*, 2000, 38(6): 453-456.

[65] Hirohashi K, Yamamoto T, Uenishi T, *et al*. CD44 and VEGF expression in ext- rahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepato-Gastroenterology*, 2004, 51(58): 1121-1123.

[66] Cui J, Dong BW, Liang P, *et al*. The influence of c-Myc, Ki-67, MMP-2 and VEGF expression on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients with tumor resection [J]. *Chung Hua Kan T sang Ping Ts a Chih*, 2004, 12(11): 660-662.

[67] Guo JH, Zhu X, Li XT, *et al*. Impact of serum vascular endothelial growth factor on prognosis in patients with unresectable hepatoccellular carcinoma after transarterial chemoembolization [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(1): 36-43.

[68] Zhao J, Hu J, Cai J, *et al*. Vascular endothelial growth factor expression in serum of

Patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116(5): 772-776.

[69] Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(26): 4241-4245.

[70] Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, *et al*. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development inmice [J]. *Gut*, 2005, 54(12): 1768-1775.

[71] Zhao ZC, Zheng SS, Wan YL, *et al*. The Molecular Mechanism Underlying Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma: the Imbalance Activation of Signaling Pathways [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2003, 2(4): 529-536.

[72] Chen ZB, Shen SQ, Ding YM, *et al*. The angiogenic and prognostic implications of VEGF, Ang-1, Ang-2, and MMP-9 for hepatocellular carcinoma with background of hepatitis B virus [J]. *Medical Oncology*, 2008, 26(3): 365-371.

[73] Zhang B, Pan X, Cobb GP, *et al*. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. *Dev Biol*, 2007, 302: 1-12.

[74] Mao Y, Chen H, Lin Y, *et al*. microRNA-330 inhibits cell motility by downregulating Sp1in prostate cancer cells [J]. *OncolRep*, 2013, 30(1): 327-333.

[75] Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104: 235-240.

[76] Imbeaud S, Ladeiro Y, Zucman-Rossi J. Identification of novel oncogenes and tumor suppressors in hepatocellular carcinoma [J]. *Semin Liver Dis*, 2010, 30: 75-86.

[77] Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, *et al*. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties [J]. *Oncogene*, 2009, 28: 3526-3536.

[78] Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, *et al*. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1571-1582.

[79] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, *et al*. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133: 647-658.

[80] Zhu Q, Wang Z, Hu Y, *et al*. miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27(5): 1660-1668.

[81] Budhu A, Jia HL, Forgues M, *et al*. Identification of metastasis related MicroRNAs in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2008, 47: 897-907.

[82] Auqello C, Vaira V, Caruso L, *et al*. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma [J]. *Liver int*, 2012, 32(5): 772-782.

致 **谢**

时光如水，三年的硕士研究生学习生活，一晃而过。回顾三年的点点滴滴，其中有困难、有汗水，但更多的是锻炼、是收获，是成长。值此论文完成之际，感慨至深，有多少可敬的师长、可爱的同学、善良的朋友给了我无言的帮助，在这里请接受我诚挚而真切的谢意。

首先，衷心感谢我的恩师陈彻教授，感谢他三年来对我工作、学习以及生活等各方

面给予的关怀，感谢他把无知的学生带入分子生物学的高级殿堂。本论文是在我的导师陈彻教授的悉心指导下完成的，从研究选题、实验设计、实验实施到最终论文撰写，恩师无不倾注了大量心血。恩师渊博的专业知识，严谨求实、一丝不苟的学风，扎实勤勉的工作作风，诲人不倦、严以律己的高尚师德，朴实无华、宽以待人的人格魅力和崇高风范，都将是我终生学习的楷范，并时刻激励着我不断进取。在此谨向陈老师表达我最诚挚的敬意和感谢！恩师的指导将使我终生受益！

然后，衷心感谢实验中心的楚惠媛老师，感谢她在生活、学习上给予的极大关怀和指导，感谢楚老师提供的高水平实验平台，在实验上给予了我全力的支持，使我能够顺利完成课题的实施，在此表示向楚老师表达最诚挚的谢意！

感谢医学技术学院教研室的李海龙老师，王晶老师，杨雅丽老师，王勇老师在实验和论文方面给予的无私指导和帮助！

感谢实验室的安方玉老师和程小丽老师在学习及实验中给予的帮助！

感谢我的同门师兄妹刘玉、梁永娟和李晶莹。感谢他们从实验设计、实验方法到论文的撰写以及生活等各个方面给予我的支持和鼓励。

感谢一起奋战在实验室的兄弟姐妹：张星华、陈凤琴、李清华、杨翼翼等同学。在这个小团队中，我们拥有良好的实验环境和学习氛围，大家的交流合作让我在今后的生活和工作中都会受益匪浅。

感谢我们宿舍的好姐妹在日常生活和学习当中对我的关照与支持。

衷心感谢我的家人一直以来给予我无私的奉献和帮助，你们是我最坚强的后盾，这永远是我克服困难继续前进的动力！

感谢所有关心和帮助过我的人！

最后衷心感谢在百忙之中参与此次论文评审和答辩的各位专家、教授，向你们致以我最崇高的敬意。

怀着感恩的心继续前进，谢谢！

## 发表论文及获奖情况

**课题来源**

甘肃省科技计划项目（1308RJZA169），AZT协同中药砷剂As2O3对肝癌细胞侵袭转移的影响极其机制研究

**发表论文**

1. 韩丽, 刘玉, 楚惠媛, 等. 微小RNA在肝癌的早期诊断、预后监测及治疗中的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2015,33(6): 457-459.

2. 韩丽, 陈彻, 楚惠媛, 等. As2O3联合AZT作用对肝癌HepG2细胞迁移和侵袭的影响[J].

肿瘤, 2015, 35(9): 982-989.