

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.007

· 基础研究 ·

siRNA 干扰胰岛素样生长因子 1 受体表达对缺氧环境下肝癌 HepG2 细胞周期及凋亡的影响

曾荣耀^a, 方雪兰^b, 苏育南^a, 王长志^a, 王朝阳^c (福建省医科大学附属第二医院 a. 急诊科; b. 重症医学科; c. 普通外科, 福建 泉州 362000)

[摘要] **目的:** 探讨 siRNA 技术干扰胰岛素样生长因子-1 受体 (insulin-like growth factors-1 receptors, IGF-1R) 表达对缺氧环境下肝癌 HepG2 细胞周期和凋亡的影响。**方法:** 采用氯化钴处理制备实验所需的肝癌缺氧细胞模型。设计并合成 3 对 siRNA 序列和 1 对阴性对照序列, 转染缺氧的肝癌 HepG2 细胞 24 h 后以荧光显微镜观察转染效果, 采用 WB 法检测 IGF-1R 蛋白表达筛选出干扰效率最高的 siRNA 序列。选用该序列再次转染缺氧肝癌细胞, 以流式细胞术、MTT 法检测细胞的周期、凋亡和增殖变化, 以 WB 法检测 HepG2 细胞中 CDK1、CDK2 和 Caspase-3 蛋白的表达。**结果:** 成功建立缺氧 HepG2 细胞模型, siRNA 转染缺氧 HepG2 细胞后以 IGF-1R-siRNA-2 转染效率最高且敲减 IGF-1R 表达最明显 (均 $P < 0.01$)。IGF-1R-siRNA-2 转染的 HepG2 细胞的增殖被明显抑制 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、细胞周期被阻滞在 G0/G1 ($P < 0.05$)、细胞凋亡率明显增加至 $(25.3 \pm 1.3)\%$ ($P < 0.01$), 同时发现敲减 IGF-1R 后缺氧 HepG2 细胞中 CDK1、CDK2 蛋白表达明显降低而 Caspase-3 表达则明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** siRNA 干扰 IGF-1R 表达通过调控细胞周期和凋亡相关蛋白而抑制缺氧环境中 HepG2 细胞的恶性生物学行为, IGF-1R 可能是 HCC 潜在的治疗靶点。

[关键词] 肝癌; HepG2 细胞; 缺氧; 小分子干扰 RNA; 胰岛素样生长因子-1 受体; 凋亡

[中图分类号] R735.7; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)03-0255-06

Effect of interfering IGF-1R by siRNA on cell cycle and apoptosis of hypoxic hepatocellular carcinoma HepG2 cells

ZENG Rongyao^a, FANG Xuelan^b, SU Yunan^a, WANG Changzhi^a, WANG Chaoyang^c (a. Department of Emergency; b. Department of Intensive Medicine; c. Department of General surgery, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of interfering insulin-like growth factors-1 receptors (IGF-1R) by small interfering RNA (siRNA) on cell cycle and apoptosis of hypoxic hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Methods:** The hypoxic hepatocellular carcinoma model was established *via* cobalt chloride treatment. Three siRNAs targeting IGF1R gene and one negative control siRNA were designed and synthesized. They were transfected into hypoxic HepG2 cells, and 24 h later, the transfection efficiency was detected by fluorescent microscopy. The protein expression of IGF-1R was detected with Western blotting (WB) to screen the siRNA with highest transfection efficacy. The selected siRNA was used to transfect hypoxic HepG2 cells. The proliferation of hypoxic HepG2 cells was determined by MTT assay. Cell cycle distribution and apoptosis were analyzed by Flow cytometry. WB was performed to detect the protein expressions of CDK1, CDK2 and Caspase-3 in HepG2 cells. **Results:** The hypoxic hepatocellular carcinoma model was successfully established. IGF-1R-siRNA-2 showed the most effective interference efficiency and the most significant knockdown of IGF-1R (all $P < 0.01$). The proliferation of HepG2 cells transfected with IGF-1R siRNA-2 was significantly suppressed ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the cell cycle was blocked at G0/G1 phase ($P < 0.05$), and the apoptosis rate was increased up to $(25.3 \pm 1.3)\%$ ($P < 0.01$). In the meanwhile, the expressions of CDK1 and CDK2 were decreased and the expression of Caspase-3 was increased in hypoxic HepG2 cells after IGF-1R knockdown ($P < 0.05$). **Conclusion:** Interfering IGF-1R by siRNA inhibits the malignant biological behaviors of hypoxic HepG2 cells via regulating cell cycle and apoptosis-related proteins. IGF-1R may be a potential target for the treatment of HCC.

[Key words] hepatocellular carcinoma; HepG2 cell; hypoxia; small interfering RNA (siRNA); insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R); apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 27(3): 255-260. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.03.007]

[基金项目] 福建省卫计委青年课题资助项目 (No. 2016-1-65); 福建医科大学附属第二医院苗圃基金资助项目 (No. 2017MP10)。Project supported by the Youth Foundation of Fujian Provincial Health Planning Commission (No. 2016-1-65), and the Nursery Fund of Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University (No. 2017MP10)

[作者简介] 曾荣耀 (1989-), 男, 硕士, 住院医师, 主要从事消化系肿瘤的急危重症治疗的研究, E-mail: 369788186@qq.com

[通信作者] 王朝阳 (WANG Chaoyang, corresponding author), 男, 副教授, 主任医师, 主要从事消化系肿瘤的综合治疗, E-mail: wcydoc123@163.com

肝细胞性肝癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤,恶性程度高,预后差。全球每年新发现的肝癌患者及死亡数中中国地区占比达一半以上^[1-2],我国肝癌的病死率高居肿瘤相关病死率的第3位^[1,3]。HCC早期多无明显症状,很多患者就诊时发现已处中晚期,手术切除比例低,局部消融难以治疗。肝动脉化疗栓塞(transarterial chemoembolization, TACE)虽是延缓HCC进展及治疗HCC最有效的方法之一^[4-6],但是TACE治疗往往因为动脉栓塞后造成HCC缺氧环境,而缺氧环境致缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)上调,进一步激活众多促血管生成因子^[7],促进血管生成,导致HCC进展、复发及转移。缺氧微环境下过度激活众多生长因子及受体,其多为信号转导途径成员,肿瘤的发生发展多与其过表达密切相关^[8]。上述众多生长因子中,胰岛素样生长因子-1受体(insulin-like growth factor-1 receptor, IGF-1R)因其介导IGFs信号通路而备受关注,其具有强大的抗凋亡作用,干扰细胞周期调节,促进细胞有丝分裂^[9],并影响细胞转化表型,诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)过表达,在肝癌的形成和发展中起重要作用^[10],因此IGF-1R可能成为肿瘤治疗的重要靶分子之一。本研究通过siRNA干扰IGF-1R基因表达,探讨其对缺氧环境下肝癌细胞周期及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肝癌HepG2细胞购自福州鼎国生物科技公司。DMEM、胎牛血清购自美国Gibco公司, Lipofectamine 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司。

1.2 以氯化钴处理制备缺氧肝癌细胞模型

人肝癌HepG2细胞培养于含10%小牛血清的高糖DMEM培养液中,于37℃饱和湿度、5%CO₂的培养箱中培养,采用LIU等^[11]介绍的缺氧肝癌培养方法取对数生长期细胞制作肝癌缺氧模型。将HepG2细胞配成单细胞悬浮液,接种在6孔板中,每孔细胞数约1×10⁶个,体积2 ml,24~48 h后观察细胞贴壁情况,贴壁良好后吸尽培养基,加入配置好的浓度为200 μmol/L氯化钴培养基2 ml,继续置入细胞恒温孵育培养箱中12 h。

1.3 siRNA序列的设计与合成

siRNA片段的设计从美国GeneBank中搜索IGF-1R基因组标准核苷酸序列,根据siRNA设计原则,在起始密码子下游寻找到适合本实验的IGF-1R mRNA靶位点的shRNA寡核苷酸序列,采用设计软件

shRNA Wizard™ 设计出针对靶序列的两条互补DNA序列,并进行荧光标记。通过BLAST序列分析证明,经所采用的序列与其他已知人类编码序列无同源性。根据以上原则,由上海吉玛生物科技公司设计及体外合成3条siRNA及1条阴性对照siRNA。序列如下:IGF-1R-siRNA-1: F为5'-GAACCUUCGUCUCAUCUUAdTdT-3', R为5'-UAAGAUGAGACGAAGGUUCdTdT-3'; IGF-1R-siRNA-2: F为5'-GGAAGAGUUCGAGACAGAAAdTdT-3', R为5'-UUCUGUCUCGAACUCUCCdTdT-3'; IGF-1R-siRNA-3: F为5'-GCUGUGUGUCUCUGAAAUdTdT-3', R为5'-AAUUUCAGAGACACACAGCdTdT-3', NC:F为5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', R为5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

1.4 IGF-1R-siRNA转染肝癌细胞

转染的前一天,取对数生长期的缺氧肝癌细胞传代于6孔板并继续培养24 h,等待细胞汇合达60%~70%时严格按照脂质体Lipofectamine 2000试剂说明书操作。分别用250 μl Opti-MEM培养基稀释siRNA-1、siRNA-2、siRNA-3、NC干扰试剂各4 μg,各组再加入常温保存5 min的250 μl Opti-MEM培养基和脂质体10 μl的混合液,即制成转染复合物。转染复合物并加入细胞中后分成4组:siRNA-1组、siRNA-2组、siRNA-3组和NC组(阴性对照组即转染阴性对照siRNA),每组均设3个复孔。为了检测siRNA是否转染导入人肝癌HepG2细胞,将各组部分转染24 h的HepG2细胞置激光共焦显微镜下观察并摄像。48 h后收集各组细胞,采用WB法检测IGF-1R蛋白表达情况,以筛选最佳siRNA。

1.5 流式细胞术检测RNA干扰IGF-1R对缺氧HepG2肝癌细胞凋亡和细胞周期的影响

在明确最佳siRNA后,再次采用最佳siRNA转染缺氧肝癌细胞,并设置阴性干扰组(NC)及空白对照组(CON),转染后48 h收集细胞。用胰酶消化并用PBS洗涤。然后按照Annexin-FITC/PI双染试剂盒说明要求依次加入Annexin-FITC结合液、Annexin-FITC及碘化丙啶染色液,并室温(20℃~25℃)避光孵育30 min,1 h内上流式细胞仪检测细胞凋亡。同时,采用-20℃预冷无水乙醇固定各组细胞(4℃固定24 h)。重悬细胞离心去上清后,依次按照试剂盒要求加入RNA酶及碘化丙啶染色液,于室温(20℃~25℃)避光孵育30 min。1 h内上机流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 WB法检测细胞周期相关蛋白CDK1、CDK2和Caspase-3的表达

分组同1.5,分别在转染后48 h收集细胞,溶于加

有蛋白酶抑制剂 PMSF 的细胞裂解液中 4 °C 裂解, 离心 10 min 后收集上清可得到细胞总蛋白提取物。安装电泳模具, 并依次配好分离胶及浓缩胶, 加入加热的蛋白样品及 Marker 进入样孔进行电泳。转膜 1 h, 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜。将膜放入培养皿中, 加入 CDK1、CDK2、Caspase-3 一抗室温反应 2 h, PBST 洗涤 3 次。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔相应抗体二抗, 室温反应 1 h, PBST 洗涤 3 次。ECL 显色, 曝光并观察记录结果。实验中以 β -actin 作为内参, 采用 Quantity-One 软件对条带灰度光密度值进行半定量分析。

1.7 MTT 法检测细胞增殖能力

分组同 1.5, 分别在转染后 72 h 收集细胞, 将 3 组细胞以每孔 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个接种于 96 孔板中, 每孔 200 μ l, 每组设 3 个复孔。分别于 24、48、72 和 96 h 加入 MTT 试剂 20 μ l, 37 °C 继续孵育 4 h 后每孔加入 150 μ l DMSO 终止反应, 在摇床上震荡 10 min, 测定

490 nm 波长的光密度 (D) 值, 并绘制细胞生长曲线。

1.8 统计学处理

siRNA 干扰转染、流式细胞术和 WB 检测、MTT 法实验均重复 3 次。应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 用 Graphpad Prism 5.0 软件绘制图片。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数间比较采用 t 检验, 多个样本均数间比较先行方差齐性检验后再行方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效果

荧光显微镜鉴定结果(图 1)显示, IGF-1R-siRNA-1、IGF-1R-siRNA-2、IGF-1R-siRNA-3 及其阴性对照 (NC) 组的转染效率分别为 $(90 \pm 2.6)\%$ 、 $(91 \pm 2.3)\%$ 、 $(89 \pm 2.7)\%$ 及 $(87 \pm 2.0)\%$, 各组转染效率均达到 85% 以上, 证实本实验转染成功。

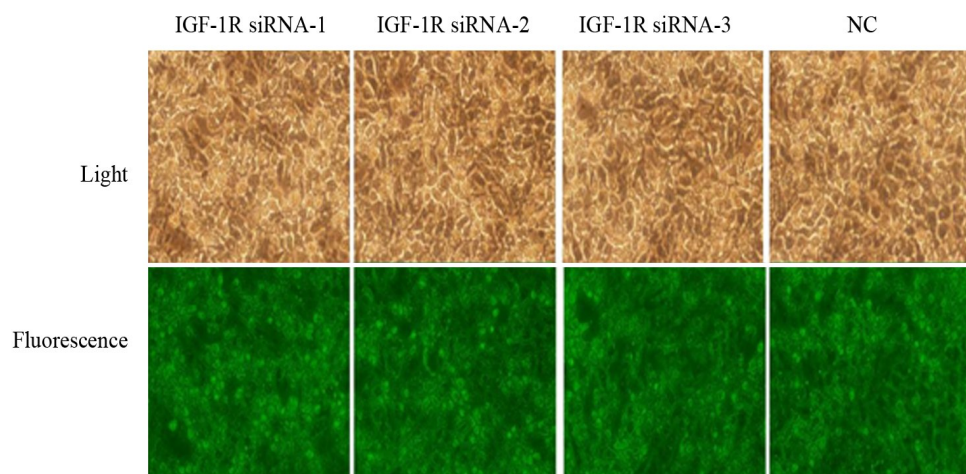


图 1 IGF-1RsiRNA 转染缺氧肝癌 HepG2 细胞的观察效果($\times 200$)

Fig.1 Observation of hypoxic HepG2 cells after IGF-1R-siRNA transfection ($\times 200$)

2.2 IGF-1R siRNA 转染明显抑制 HepG2 细胞中 IGF-1R 蛋白的表达

WB 法检测结果(图 2)显示, 与 NC 组相比, 转染 IGF-1R siRNA 的 3 组 IGF-1R 蛋白水平均明显下调 (0.38 ± 0.047 、 0.19 ± 0.021 、 0.59 ± 0.093 vs 0.87 ± 0.05 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中以转染 IGF-1R siRNA2 组的表达水平下调最明显。因此选择 IGF-1R siRNA2 组缺氧肝癌细胞进行后续实验。

2.3 敲减 IGF-1R 表达显著抑制缺氧环境下 HepG2 肝癌细胞的增殖

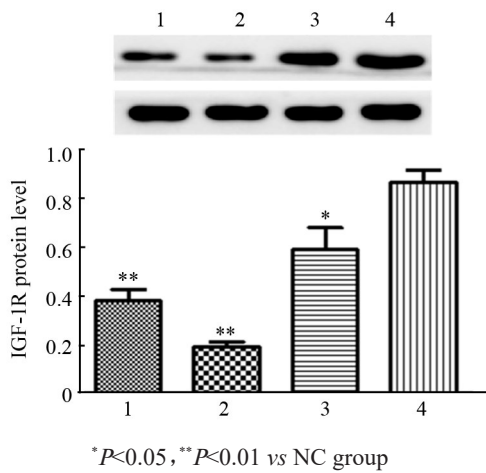
MTT 法检测结果(图 3)显示, 转染 72 及 96 h 后, IGF-1R siRNA-2 转染组 HepG2 细胞的增殖能力明显减弱(均 $P < 0.01$)。

2.4 敲减 IGF-1R 表达能使缺氧环境下的肝癌 HepG2 细胞阻滞于 G0/G1 期

流式细胞术检测结果(图 4)显示, IGF-1R-siRNA-2 组细胞 G0/G1 期占 $(60.03 \pm 1.2)\%$ 、G2/M 期细胞占比为 $(12.4 \pm 0.7)\%$, CON 组细胞 G0/G1 期为 $(48.59 \pm 2.1)\%$ 、G2/M 期为 $(11.5 \pm 2.8)\%$, NC 组 G0/G1 期为 $(48.37 \pm 1.2)\%$ 、G2/M 期为 $(11.7 \pm 2.2)\%$, IGF-1R-siRNA-2 细胞明显阻滞于 G0/G1 期($P < 0.05$)。

2.5 敲减 IGF-1R 表达使 HepG2 细胞凋亡率显著增高

流式细胞术检测结果(图 5)显示, CON 组和 NC 组细胞凋亡率分别为 $(1.8 \pm 0.2)\%$ 和 $(3.5 \pm 0.3)\%$, 而敲减 IGF-1R 组的细胞凋亡率明显高至 $(25.3 \pm 1.3)\%$ (均 $P < 0.01$)。



1: IGF-1R siRNA-1 group; 2: IGF-1R siRNA-2 group;
3: IGF-1R siRNA-3 group; 4: NC group

图2 IGF-1R siRNAs转染缺氧HepG2细胞后
WB法检测IGF-1R蛋白表达水平

Fig.2 Expression of IGF-1R protein in hypoxic HepG2 cells after transfection was detected by WB

2.6 敲减IGF-1R表达对缺氧下HepG2细胞CDK1、CDK2、caspase-3蛋白表达的影响

为观察IGF-1R siRNA对肝癌缺氧细胞周期及凋

亡相关蛋白的影响,进一步利用WB法检测各组转染后48 h CDK1、CDK2及caspase-3蛋白的表达情况。结果(图6)显示,与NC及CON组相比,IGF-1R siRNA-2组CDK1蛋白水平明显下调(0.20 ± 0.019 vs 0.71 ± 0.032 、 0.69 ± 0.052 ,均 $P < 0.01$),CDK2组蛋白水平明显下调(0.18 ± 0.021 vs 0.42 ± 0.013 、 0.42 ± 0.027 ,均 $P < 0.01$),Caspase-3组蛋白水平明显上调(0.38 ± 0.016 vs 0.18 ± 0.031 、 0.19 ± 0.023 ,均 $P < 0.01$)。

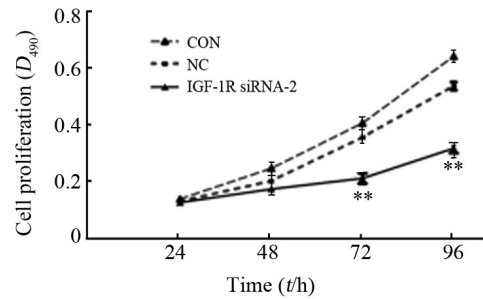


图3 MTT检测各组转染后缺氧肝癌
HepG2细胞增殖能力的变化

Fig.3 Change of the proliferation of hypoxic HepG2 cells in each group after transfection was detected by MTT

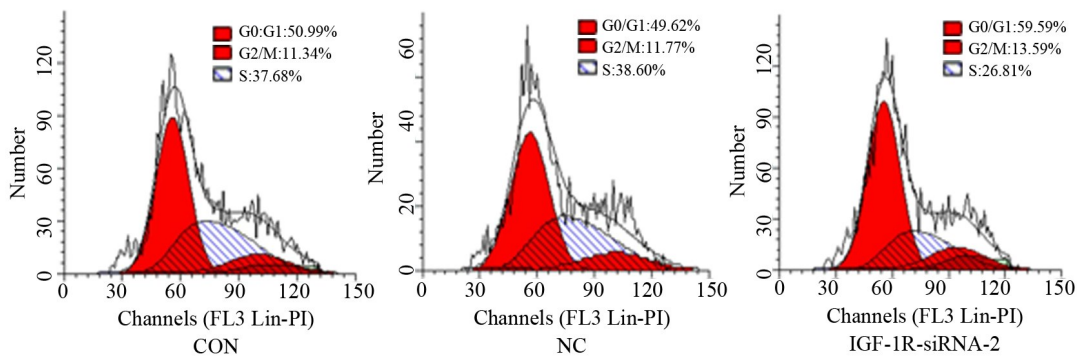


图4 流式细胞术检测各组缺氧肝癌HepG2细胞周期的变化

Fig.4 Change of cell cycle of hypoxic HepG2 cells in each group was detected by flow cytometry

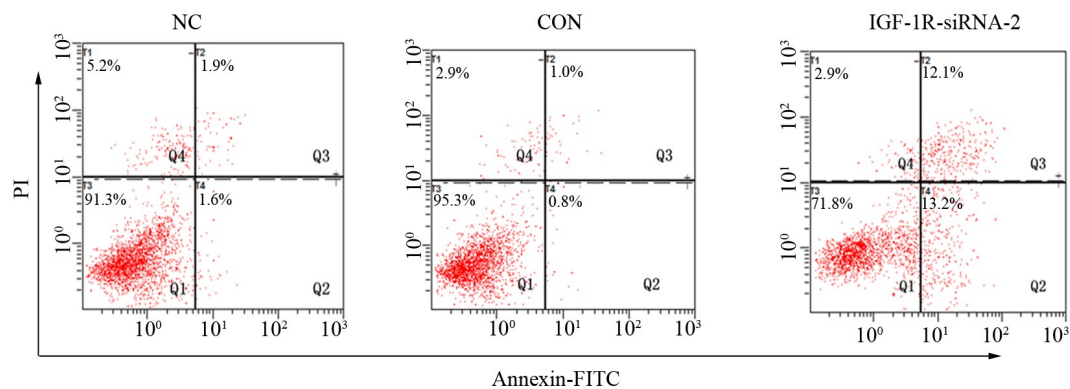
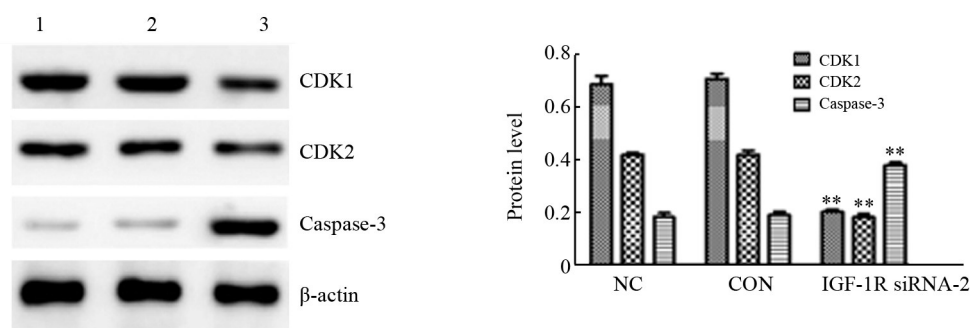


图5 流式细胞术检测各组缺氧下HepG2细胞凋亡情况

Fig.5 Apoptosis of hypoxic HepG2 cells in each group was detected by flow cytometry



** $P < 0.01$ vs NC or CON group

1: NC group; 2: CON group; 3: IGF-1R siRNA-2 group

图6 转染48 h后各组缺氧HepG2细胞CDK1、CDK2、Caspase-3蛋白表达情况

Fig.6 Protein expressions of CDK1, CDK2 and caspase-3 in hypoxic HepG2 cells in each groups 48h after transfection

3 讨论

HCC的TACE治疗通过栓塞癌灶的主要血供动脉造成癌灶局部的缺血及缺氧环境,达到坏死癌组织的目的。这种方式可以明显延缓肝癌进展、提高患者生存期。肿瘤在缺氧环境中会上调HIF-1 α ,进一步激活众多促血管生成因子,加速新生肿瘤血管形成,导致肿瘤复发或转移^[7]。研究^[12-14]认为,HCC发生及发展往往依赖多种受体或多条信号传递通道,影响HCC细胞增殖、细胞周期以及细胞凋亡,使之出现不可逆的严重后果。因此,针对缺氧环境下的信号通路研究已成为目前热点研究领域。IGF-1R在恶性细胞的生长、增殖中具有决定作用,很大程度参与调节恶性肿瘤细胞的增殖及代谢过程。IGF-1R使加速增殖、促进有丝分裂主要是通过自身磷酸化后激活下游的MAPK/ERK及PI3K通路,从而进一步加快肝癌进展,因此肝癌比正常细胞更加依赖IGF-1R介导的MAPK/ERK及PI3K通路^[15-16]。目前IGF-1R对缺氧细胞的增殖、凋亡、细胞周期的影响及其机制的研究鲜有报道。本研究通过构建缺氧模型细胞,利用RNA干扰技术,敲减IGF-1R表达能明显抑制缺氧HepG2细胞的增殖和诱导其凋亡,并使细胞阻滞于G0/G1期。

细胞周期及凋亡是人体细胞活动不可或缺的组成部分,且均受到多种基因或蛋白多层次的精细调控,而紊乱的细胞周期正是肿瘤恶性扩增的关键步骤^[17]。CDK1、CDK2是细胞周期依赖性蛋白激酶(CDKs)的主要成员,作为细胞周期转运的不可或缺的核心因子,在G1期向S期转换过程中起着重要促进作用^[18-19]。细胞凋亡是一种自主的程序性死亡,Caspase-3又是这一类蛋白酶中诱导凋亡的重要执行蛋白^[20-21],在多种恶性肿瘤中存在高度表达^[22],其启动

激活代表着细胞凋亡程序已步入难以逆转的过程^[23]。为了探讨IGF-1R影响缺氧肝癌细胞凋亡及细胞周期的机制,本研究采用WB技术检测CDK1、CDK2和Caspase-3的表达情况。发现缺氧HCC HepG2细胞中的CDK1、CDK2相对表达水平显著下降,而Caspase-3相对表达水平明显升高。MTT实验及细胞周期实验结果提示,敲减IGF-1R使肝癌细胞增殖明显抑制并使肝癌细胞周期阻滞在G0/G1期,其机制可能就是由于影响了CDK1、CDK2和Caspase-3蛋白的表达所造成。

综上所述,IGF-1R在缺氧肝癌进展过程中发挥着重要作用,敲减其表达可抑制缺氧HCC细胞增殖、促进细胞凋亡,其作用机制可能与CDK1、CDK2表达下调及Caspase-3表达升高有关。本实验只是在单一体外细胞水平的研究,还需要进一步在动物实验及临床试验论证。

[参考文献]

- [1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA: A Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] 中国医师协会肝癌专业委员会. 肝细胞癌合并门静脉癌栓多学科诊治中国专家共识(2018版)[J]. 中华消化外科杂志, 2019, 18(1): 8-15. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2019.01.002.
- [4] IKEDA M, KUDO M, AIKATA H, et al. Transarterial chemoembolization with miriplatin vs. epirubicin for unresectable hepatocellular carcinoma: a phase III randomized trial[J/OL]. J Gastroenterol, 2018, 53(2): 281-290[2019-11-06]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5846877/. DOI:10.1007/s00535-017-1374-6.
- [5] LENG J J, XU Y Z, Dong J H. Efficacy of transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma with portal vein thrombosis: a meta-analysis[J]. ANZ J Surg, 2016, 86(10): 816-820. DOI: 10.

- 1111/ans.12803.
- [6] HE M K, LE Y, LI Q J, et al. Hepatic artery infusion chemotherapy using mFOLFOX versus transarterial chemoembolization for massive unresectable hepatocellular carcinoma: a prospective non-randomized study[J/OL]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 83[2019-11-12]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC_5654007/. DOI: 10.1186/s40880-017-0251-2.
- [7] ADAMS J M, DIFAZIO L T, ROLANDELLI R H, et al. HIF-1: a key mediator in hypoxia[J]. *Acta Physiol Hung*, 2009, 96(1): 19-28. DOI: 10.1556/aphysiol.96.2009.1.2.
- [8] HIRATSUKA S. Vasculogenesis, angiogenesis and special features of tumor blood vessels[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2011, 16: 1413-1427. DOI: 10.2741/3796.
- [9] SVENDSEN A M, WINGE S B, ZIMMERMANN M, et al. Down-regulation of cyclin G2 by insulin, IGF-I (insulin-like growth factor 1) and X10 (AspB10 insulin): role in mitogenesis[J]. *Biochem J*, 2014, 457(1): 69-77. DOI: 10.1042/bj20130490.
- [10] KANG G H, LEE B S, LEE E S, et al. Prognostic significance of p53, mTOR, c-Met, IGF-1R, and HSP70 overexpression after the resection of hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Gut Liver*, 2014, 8(1): 79-87[2019-11-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916692/>. DOI:10.5009/gnl.2014.8.1.79.
- [11] LIU Q, XU Z, MAO S B, et al. Effect of hypoxia on hypoxia inducible factor-1 α , insulin-like growth factor I and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J/OL]. *Oncol Lett*, 2015, 9(3): 1142-1148[2019-11-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4315007/>. DOI:10.3892/ol.2015.2879.
- [12] YUAN Y L, ZHOU X H, SONG J, et al. Dual silencing of type I insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptors to induce apoptosis of nasopharyngeal cancer cells[J]. *J Laryngol Otol*, 2008, 122(9): 952-960. DOI:10.1017/S0022215107000606.
- [13] 尹东亮, 卢沛林, 尹润龙, 等. 过表达PRRX1通过p53介导的线粒体凋亡途径诱导肝癌SMMC7721细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(6): 662-668. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2019.06.008.
- [14] 黄健, 黄海欣, 黄东宁, 等. miR-144-3p通过靶向FZD4阻断Wnt/ β -catenin通路抑制肝癌Huh-7细胞的恶性生物学行为[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(10): 1101-1106. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.10.008.
- [15] DING Y, WANG B, CHEN X, et al. Staurosporine suppresses survival of HepG2 cancer cells through Omi/HtrA2-mediated inhibition of PI3K/Akt signaling pathway. [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(3): 1393395347. DOI: 10.1177/1010428317694317.
- [16] 汪群, 刘权焰, 刘志苏, 等. 慢病毒介导MAT2A及2B双重小干扰RNA对肝癌的抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(2): 184-186. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2009.02.017.
- [17] 詹启敏, 陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学[J]. *中国肿瘤临床*, 2014(1): 1-7. DOI:10.3969/j.issn.1000-8179.20132205.
- [18] ENDERS G H. Mammalian interphase cdks: dispensable master regulators of the cell cycle[J/OL]. *Genes Cancer*, 2012, 3(11/12): 614-618[2020-11-10]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC_3636753/. DOI:10.1177/1947601913479799.
- [19] MALUMBRES M, BARBACID M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(3): 153-166. DOI: 10.1038/nrc2602.
- [20] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease[J/OL]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015, 7(4): a026716[2019-11-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382736/>. DOI:10.1101/cshperspect.a026716.
- [21] COTTER T G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(7): 501-507. DOI: 10.1038/nrc2663.
- [22] PU X, STORR S J, ZHANG Y M, et al. Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival[J/OL]. *Apoptosis*, 2017, 22(3): 357-368[2019-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5306438/>. DOI: 10.1007/s10495-016-1323-5.
- [23] SNIGDHA S, SMITH E D, PRIETO G A, et al. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death[J/OL]. *Neurosci Bull*, 2012, 28(1): 14-24[2019-11-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3838299/>. DOI:10.1007/s12264-012-1057-5.

[收稿日期] 2019-11-25

[修回日期] 2020-02-16

[本文编辑] 阮芳铭