

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.07

· 基础研究 ·

反义端粒酶 RNA 对肝癌细胞黏附和侵袭的影响

文廷玉, 刘吉勇, 韩翠萍, 姜雅堃(山东大学附属省立医院 消化内科, 山东 济南 250021)

[摘要] 目的:探讨人反义端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR)对肝癌细胞系 BEL-7402 黏附和侵袭的影响及其机制。方法:利用前期实验成功转染端粒酶正、反义 RNA 基因的肝癌细胞,分为正义转染组(BEL-7402-hTR-EcoR I 细胞)、反义转染组(BEL-7402-hTR-BamH I 细胞)、空白对照组(BEL-7402 细胞)。黏附实验和侵袭实验检测反义 hTR 转染后 BEL-7402 细胞的黏附和侵袭能力,免疫细胞化学检测整合素 $\beta 1$ (integrin $\beta 1$, INT $\beta 1$)、上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cad)的表达水平,明胶酶谱法检测基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、-9 的活性变化。结果:与空白对照组和正义 hTR 转染组相比,反义 hTR 转染组 BEL-7402-hTR-BamH I 细胞的黏附、侵袭能力明显减低(0.204 ± 0.029 vs 0.505 ± 0.037 、 0.465 ± 0.029 , 34.80 ± 3.19 vs 71.47 ± 5.15 、 69.87 ± 3.11 , 均 $P < 0.05$), INT $\beta 1$ 表达降低(0.153 ± 0.016 vs 0.385 ± 0.008 、 0.375 ± 0.014 , $P < 0.05$), E-cad 表达增强(0.209 ± 0.020 vs 0.124 ± 0.018 、 0.134 ± 0.016 , $P < 0.05$), MMP-2 和 MMP-9 的活性受到明显抑制(2054.22 ± 138.52 vs 3105.56 ± 329.60 、 2923.22 ± 269.08 、 846.33 ± 104.66 vs 1538.89 ± 122.85 、 1453.33 ± 126.35 , 均 $P < 0.05$)。结论:人反义端粒酶 RNA 能明显减低肝癌 BEL-7402 细胞的黏附、侵袭能力,其机制可能与上调 E-cad 的表达、下调 INT $\beta 1$ 的表达,并抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性有关。

[关键词] 反义端粒酶 RNA; 逆转录病毒载体; 肝细胞癌; 黏附; 侵袭

[中图分类号] R735.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)02-0275-05

Effect of antisense telomerase RNA on adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells

WEN Ting-yu, LIU Ji-yong, HAN Cui-ping, JIANG Ya-kun (Department of Gastroenterology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of antisense human telomerase RNA (hTR) on adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cell line BEL-7402 and its mechanism. **Methods:** Our previous research had successfully transfected sense or antisense hTR gene into BEL-7402 cells. This study they were divided into 3 groups: the sense hTR transfected group (BEL-7402-hTR-EcoRI), the antisense hTR transfected group (BEL-7402-hTR-BamHI) and the blank control group (BEL-7402). The adhesion and invasion of BEL-7402 cells after antisense hTR transfection were observed with adhesion and invasive assay, respectively. The expressions of integrin $\beta 1$ (INT $\beta 1$) and epithelial cadherin (E-cad) were detected by immunocytochemistry, and galatin zymography was used to measure the activities of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9. **Results:** The adhesion and invasion abilities of antisense hTR transfected BEL-7402 cells were significantly weaker than those of the blank control and sense hTR transfected groups (0.204 ± 0.029 vs 0.505 ± 0.037 , 0.465 ± 0.029 ; 34.80 ± 3.19 vs 71.47 ± 5.15 , 69.87 ± 3.11 ; all $P < 0.05$). Meanwhile, the expression of INT $\beta 1$ was also significantly decreased (0.153 ± 0.016 vs 0.385 ± 0.008 , 0.375 ± 0.014 , $P < 0.05$), and E-cad was significantly increased (0.209 ± 0.020 vs 0.124 ± 0.018 , 0.134 ± 0.016 ; $P < 0.05$) in the antisense hTR transfected group. The activities of MMP-2 and MMP-9 were significantly inhibited in the antisense hTR transfected group (2054.22 ± 138.52 vs 3105.56 ± 329.60 , 2923.22 ± 269.08 ; 846.33 ± 104.66 vs 1538.89 ± 122.85 , 1453.33 ± 126.35 ; all $P < 0.05$). **Conclusion:** Antisense hTR can inhibit the adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma

[基金项目] 山东省医药卫生科研项目(No. 2001CA1DBA3)。Project supported by the Medical Science Research Foundation of Shandong Province (No. 2001CA1DBA3)

[作者简介] 文廷玉(1984-),女,河南省南阳市人,硕士生,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。E-mail:wwwtingyu@163.com

[通信作者] 刘吉勇(LIU Ji-yong, corresponding author), E-mail: liujiyong@medmail.com.cn

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110531.1700.010.html>

BEL-7402 cells, which may be related to the increase of E-cad expression, decrease of INTβ1 expression, and decrease of MMP-2 and MMP-9 activities.

[**Key words**] antisense telomerase RNA; retroviral vector; hepatocellular carcinoma; adhesion; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 275-279]

肝细胞肝癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度及病死率较高,发病率也有逐年增高的趋势,且发病年龄趋于年轻化^[1]。其主要生物学特性是侵袭性强、易复发转移,预后差。目前,手术、放疗、化疗等各种治疗方法由于各自的局限性效果都不甚理想。因此,探索出新的有效的抑制肝癌侵袭和转移的方法具有重要的临床意义。端粒酶是目前特异性较高、应用较广的肿瘤标志物之一^[2]。正常肝组织中无端粒酶活性,80%~90%肝癌组织表达端粒酶活性,端粒酶活性在肝癌侵袭、转移、复发及预后中起重要作用,可作为判断肝癌预后的指标^[3,4]。因此,以端粒酶为靶点成为目前抗癌治疗研究的热点。研究^[5,6]发现,上皮钙黏蛋白(epithelial cadherin, E-cad)、整合素 β1(integrin β1, INTβ1)基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2、-9与肿瘤的侵袭和转移密切相关。本研究应用逆转录病毒作为载体,将反义人端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR)基因导入人肝癌细胞系 BEL-7402 中,观察肝癌细胞黏附和侵袭能力的变化,及与肝癌细胞黏附和侵袭密切相关的蛋白 E-cad、INTβ1、MMP-2 和 MMP-9 的表达及活性变化,从而探讨反义 hTR 对肝癌细胞系 BEL-7402 黏附和侵袭的影响及其作用机制,为临床肝癌的治疗奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

人肝癌细胞系 BEL-7402 由山东省立医院中心实验室保存。转染正、反义端粒酶 RNA 基因肝癌细胞(BEL-7402-hTR-EcoR I)和(BEL-7402-hTR-BamH I)由刘吉勇教授构建^[7],由山东省立医院中心实验室保存。鼠抗人整合素 β1 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,鼠抗人上皮性钙黏附蛋白单克隆抗体、二步法免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,人工基质胶 matrigel 为美国 BD 公司产品,Transwell 侵袭小室为美国 Corning 公司产品,基质金属蛋白酶明胶酶谱法电泳分析试剂盒购自上海杰美基因公司。

1.2 细胞分组及培养

前期实验^[8]成功构建了携带正、反义人端粒酶 RNA 基因的真核表达质粒(PLXSN-hTR-EcoR I 和

PLXSN-hTR-BamH I),通过电穿孔法将质粒导入 PT67 包装细胞,重组逆转录病毒感染人肝癌细胞系 BEL-7402,获得稳定转染目的基因的人肝癌细胞克隆,分别命名为 BEL-7402-hTR-EcoRI 和 BEL-7402-hTR-BamH I 细胞^[7,9]。实验分为 3 组:(1)反义转染组(BEL-7402-hTR-BamH I);(2)正义转染组(BEL-7402-hTR-EcoR I);(3)空白对照组(BEL-7402)。3 组细胞均用含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,置于 37 °C 含 5% CO₂ 的孵箱内培养,待细胞密度达 80%~90% 时传代,取对数生长期细胞进行实验。

1.3 免疫细胞化学染色检测 INTβ1、E-cad 的表达水平

分别取对数生长期的 3 组细胞,以 1 × 10⁶/孔接种到预先放置灭菌盖玻片的 6 孔板中,每组设 3 复孔待细胞接近长满盖玻片,取出玻片,4% 多聚甲醛固定,采用通用型二步法,严格按照试剂盒要求操作。以 PBS 代替 INTβ1、E-cad 一抗作阴性对照。细胞质/细胞膜呈明显的棕黄色为阳性染色。结果以 Image-Pro Plus v 6.0 (IPP 6.0)进行图像分析,每组选取 5 张爬片,每张爬片选取 10 个视野,测定平均光密度。

1.4 Matrigel 黏附实验检测反义 hTR 对 BEL-7402 细胞黏附能力的抑制

96 孔板覆以 1:3 稀释的 matrigel, 20 μl/孔, 37 °C 聚合 1 h;3% BSA 的 RPMI 1640 于 37 °C 封闭 1 h。分别取对数生长期的 3 组细胞,以 2 × 10⁴/孔接种于 matrigel 包被的 96 孔板中,每组 3 个复孔,培养 1 h;弃培养液, PBS 洗去未黏附细胞,对照组不洗;每孔加新鲜无血清培养液 100 μl、MTT 50 μg(终质量浓度 5 mg/ml, 10 μl),继续孵育 4 h;弃培养液,每孔加 150 μl DMSO 振荡 10~20 min,酶标仪 490 nm 波长处测吸光度(D 值),计算抑制率。抑制率(%)=(对照组 D 值 - 实验组 D 值)/对照组 D 值 × 100%

1.5 体外侵袭实验检测反义 hTR 对 BEL-7402 细胞侵袭能力的抑制

在 Transwell 小室聚碳酸酯微孔滤膜(孔径为 8 μm)上均匀包被 1:3 稀释的 matrigel, 40 μl/膜, 37 °C 聚合 4 h;下室加入 600 μl 条件培养液;上室加各组细胞悬液 100 μl (1 × 10⁵ 个细胞),培养 24 h。

取出小室,用棉签擦去膜上未侵袭的细胞及 matrigel,4%多聚甲醛固定,H-E染色,切下滤膜,中性树脂胶封片。每张膜分别计数上、下、左、右、中5个视野的细胞数,取平均值。每组细胞设3个复孔。抑制率(inhibition rate, IR;%)=(对照组侵袭细胞数-实验组侵袭细胞数)/对照组侵袭细胞数×100%。抑制率达30%以上、 $P < 0.05$ 者为有抗侵袭性。

1.6 明胶酶谱法分析细胞 MMP-2 和 MMP-9 活性

各组细胞以 2×10^5 /孔接种在6孔板上,用含10% FBS的 RPMI 1640 培养基培养至80%汇合,换用含0.2% FBS的 RPMI 1640 培养基继续培养24 h,收集上清液,4℃ 10 000 ×g离心5 min去除细胞碎片,BCA法测蛋白浓度,分装,立刻进行酶谱分析或冻存于-80℃备用。均按试剂盒说明进行操作。每组细胞设3个平行样本,并多次重复实验。结果采用凝胶图像分析系统进行灰度扫描及图像分析,负染条带亮度和宽度反映了 MMP-2 和 MMP-9 的活性,以积分光密度(integral optical density, IOD)代表酶活性,进行半定量分析。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,多组均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),均数间的两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 反义 hTR 对 BEL-7402 细胞 INTβ1、E-cad 表达的影响

免疫细胞化学图像分析结果显示,转染反义 hTR 的 BEL-7402-hTR-BamH I 组细胞、转染正义 hTR 的 BEL-7402-hTR-EcoR I 组细胞、未转染 hTR 的 BEL-7402 组细胞 INTβ1 的表达水平分别为: 0.153 ± 0.016 、 0.375 ± 0.014 、 0.385 ± 0.008 ,反义转染组 INTβ1 的表达水平比正义转染组和空白对照组 INTβ1 表达水平明显降低($P < 0.05$,图1);转染反义 hTR 的 BEL-7402-hTR-BamH I 组细胞、转染

正义 hTR 的 BEL-7402-hTR-EcoR I 组细胞、未转染 hTR 的 BEL-7402 组细胞 E-cad 的表达水平分别为: 0.209 ± 0.020 、 0.134 ± 0.016 、 0.124 ± 0.018 ,反义转染组 E-cad 的表达水平明显增强($P < 0.05$,图2),正义转染组与空白对照组相比 INTβ1 和 E-cad 的表达均无明显差异($P > 0.05$),说明反义 hTR 能显著上调 E-cad 表达,并下调 INTβ1 的表达。

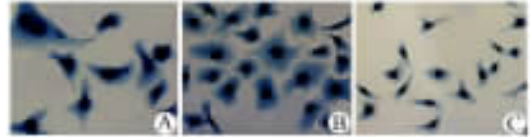


图1 反义 hTR 对 BEL-7402 细胞 INTβ1 表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 1 Effect of antisense hTR on INTβ1 expression in BEL-7402 cells (IHC, ×200)

A: BEL-7402; B: BEL-7402-hTR-EcoR I; C: BEL-7402-hTR-BamH I

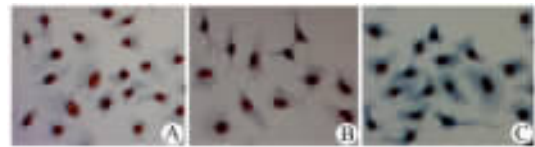


图2 反义 hTR 对 BEL-7402 细胞 E-cad 表达的影响(IHC, ×200)

Fig. 2 Effect of antisense hTR on E-cad expression in BEL-7402 cells (IHC, ×200)

A: BEL-7402; B: BEL-7402-hTR-EcoR I; C: BEL-7402-hTR-BamH I

2.2 反义 hTR 抑制 BEL-7402 细胞的黏附能力

MTT 检测各组细胞与 matrigel 的黏附能力,结果显示,转染反义 hTR 的 BEL-7402-hTR-BamH I 组细胞黏附能力受到明显抑制($P < 0.05$),转染正义 hTR 的 BEL-7402-hTR-EcoR I 组细胞和未转染 hTR 的 BEL-7402 组细胞与 matrigel 的黏附能力无明显差异($P > 0.05$,表1)。结果说明,反义 hTR 能明显抑制肝癌 BEL-7402 细胞的黏附能力。

表1 反义 hTR 抑制 BEL-7402 细胞的黏附和侵袭能力(%)

Tab. 1 Antisense hTR inhibited adhesion and invasion of BEL-7402 cells (%)

Group	Adhesion			Invasion	
	D_{490}	Adhesion rate	Inhibition rate	Invasion cell	Inhibition rate
BEL-7402	0.505 ± 0.037	79.50	-	71.47 ± 5.15	-
BEL-7402-hTR-EcoR I	0.465 ± 0.029	75.73	7.83	69.87 ± 3.11	2.24
BEL-7402-hTR-BamH I	$0.204 \pm 0.029^*$	48.75*	59.66**	$34.80 \pm 3.19^*$	51.31**

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs BEL-7402 or BEL-7402-hTR-EcoR I

2.3 反义 hTR 抑制 BEL-7402 细胞的侵袭力

Transwell 小室外模拟细胞侵袭力,结果显示,转染反义 hTR 的 BEL-7402-hTR-BamHI 组细胞穿膜细胞数明显少于转染正义 hTR 的 BEL-7402-hTR-EcoR I 组细胞和未转染 hTR 的 BEL-7402 组细胞 ($P < 0.05$),正义转染组和空白对照组穿膜细胞数无明显差异 ($P > 0.05$,图 3、表 1),表明反义 hTR 能明显抑制肝癌 BEL-7402 细胞的侵袭力。

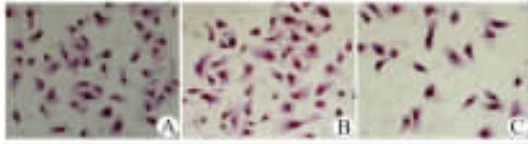


图 3 反义 hTR 抑制 BEL-7402 细胞的侵袭力(H-E, ×200)

Fig. 3 Antisense hTR inhibited invasion of BEL-7402 cells(H-E, ×200)

A: BEL-7402; B: BEL-7402-hTR-EcoR I ;
C: BEL-7402-hTR-BamH I

2.4 反义 hTR 抑制 BEL-7402 细胞 MMP-2、MMP-9 的活性

电泳后负染条带亮度强弱和面积大小可以半定量地反映明胶酶(MMP-2 和 MMP-9)活性大小,结果显示,3 组细胞上清中均能检测到 MMP-2 和 MMP-9 活性表达,通过 IOD 值可见转染反义 hTR 的 BEL-7402-hTR-BamHI 组细胞上清中 MMP-9 和 MMP-2 活性显著低于转染正义 hTR BEL-7402-hTR-EcoRI 组细胞和未转染 hTR 的 BEL-7402 组细胞 ($P < 0.05$),且各组细胞 MMP-2 活性表达均较 MMP-9 高,空白对照组和正义转染组酶谱分析结果无显著差异 ($P > 0.05$,图 4、表 2),说明反义 hTR 能明显抑制肝癌 BEL-7402 细胞 MMP-2 和 MMP-9 的活性。

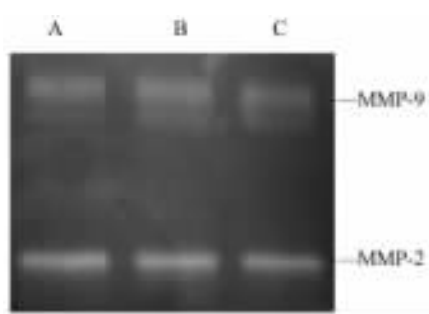


图 4 反义 hTR 抑制 BEL-7402 细胞 MMP-2、MMP-9 的活性

Fig. 4 Antisense hTR inhibited activities of MMP-2 and MMP-9 in BEL-7402 cells

A: BEL-7402; B: BEL-7402-hTR-EcoR I ;
C: BEL-7402-hTR-BamH I

表 2 反义 hTR 抑制 BEL-7402 细胞 MMP-2、MMP-9 的活性

Tab. 2 Antisense hTR inhibited activities of MMP-2 and MMP-9 in BEL-7402 cells

Group	IOD	
	MMP-2	MMP-9
BEL-7402	3 105.56 ± 329.60	1 538.89 ± 122.85
BEL-7402-hTR-EcoR I	2 923.22 ± 269.08	1 453.33 ± 126.35
BEL-7402-hTR-BamH I	2 054.22 ± 138.52*	846.33 ± 104.66*

* $P < 0.05$ vs BEL-7402 or BEL-7402-hTR-EcoR I

3 讨论

人端粒酶是一种由 RNA 和蛋白质组成的特殊的逆转录酶,能以自身 RNA 为模板逆转录合成端粒重复序列加到染色体的末端,延长端粒,使细胞逃避凋亡,获得永久生长的特性。多数成体细胞无端粒酶活性^[10],90% 以上恶性肿瘤细胞有明显的端粒酶活性^[11]。研究发现^[3],端粒酶活性的高低可能与恶性肿瘤细胞的侵袭、转移、预后有关,且恶性程度越高即越易转移的肿瘤其端粒酶的活性越高,端粒酶已成为抗癌治疗的理想靶点^[12]。端粒酶抑制主要是靶向端粒酶 RNA 和端粒酶逆转录酶,方法有反义核酸技术、RNA 干扰和免疫治疗等^[13],其中反义 RNA 技术是人工合成的小片段 RNA,能与靶基因 mRNA 特异性互补结合,干扰 mRNA 的功能,从而抑制相应蛋白的表达及功能。hTR 是端粒得以延长的模板,利用反义技术封闭 hTR,消除其模板作用,达到抑制端粒酶活性进而治疗肿瘤的目的^[14]。

本研究以逆转录病毒为载体,将反义 hTR 导入人肝癌 BEL-7402 细胞系,结果发现,反义 hTR 明显抑制了肝癌细胞的黏附、侵袭。端粒酶如何调节肿瘤的侵袭和转移,其机制尚不清楚。Sepideh 等^[15]研究发现,端粒酶通过调节细胞的糖酵解途径,促进肿瘤的侵袭和转移;同时推测肿瘤细胞永生使其在侵袭和转移中处于生长优势。本研究前期实验^[9]发现,反义 hTR 在体内、外均可诱导肝癌细胞凋亡,但需要经过多次细胞分裂,使端粒的长度缩短到一定程度才能引起细胞的凋亡。反义 hTR 即使没有很快诱导细胞凋亡,已明显抑制了肝癌细胞黏附、侵袭能力,推测其机制可能是反义 hTR 基因通过上调或下调一些与肿瘤侵袭和转移相关分子表达或活性。Liotta 等^[16]提出了肿瘤侵袭转移的 3 步假说:细胞黏附、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解和细胞的迁移运动,INTβ1、E-cad、MMP-2 和 MMP-9 在这一过程中具

有重要作用。

E-cad 是钙依赖跨膜蛋白,主要介导细胞间同种黏附,在正常细胞中表达稳定而在多种上皮性肿瘤中表达降低。有文献报道^[17],E-cad 与细胞分化程度正相关,与转移能力负相关。研究^[18]发现,肝癌组织中 E-cad 的表达明显低于正常肝组织;且分化越差即越易转移的肿瘤,其 E-cad 的表达越低。本研究发现,反义 hTR 使肝癌细胞 E-cad 的表达水平明显升高,细胞间的黏附性增强,从而抑制细胞脱落扩散,发生侵袭、转移。

整合素是由 α 和 β 亚基组成的跨膜糖蛋白,主要介导细胞与 ECM 的黏附,尚可调节 MMPs 活性和信号转导^[19]。国外学者^[20]发现,肝癌组织中 INT β 1 的表达明显高于正常肝组织。本研究发现,反义 hTR 下调 BEL-7402 细胞 INT β 1 表达水平,使肝癌细胞与 ECM 的黏附力下降,侵袭和转移能力减弱。

MMPs 是一类以酶原形式分泌的锌依赖性内分泌酶,激活后可水解 ECM 中几乎所有成分。MMP-2 和 MMP-9 作为 MMPs 家族重要成员,是降解基底膜和 ECM 中 IV 型胶原的主要酶。研究^[21]表明,MMPs 过表达与肿瘤侵袭和转移相关。本研究发现,反义 hTR 明显降低肝癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 的活性,使细胞不易穿过基底膜发生转移。

综上,反义 hTR 能明显抑制肝癌细胞 BEL-7402 的黏附、侵袭能力,其机制可能与上调 E-cad 表达、下调 INT β 1 表达,并降低 MMP-2 和 MMP-9 活性有关。但肿瘤的侵袭和转移是一个较为复杂的过程,涉及多种蛋白分子的作用,反义 hTR 也可能通过其他机制调节肝癌的侵袭、转移。随着对反义 hTR 作用机制的深入研究,反义 hTR 在肝癌的治疗方面将会有更好的应用前景。

[参考文献]

- [1] El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma: An epidemiologic view [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2002, 35(5 Suppl 2): S72-8.
- [2] Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 643-649.
- [3] Oh BK, Kim H, Park YN, et al. High telomerase activity and long telomeres in advanced hepatocellular carcinomas with poor prognosis [J]. *Lab Invest*, 2008, 88(2): 144-152.
- [4] Shan YS, Hsieh YH, Lin PW. Telomerase activity in tumor and remnant liver as predictor of recurrence and survival in hepatocellular carcinoma after resection [J]. *World J Surg*, 2007, 31(5): 1121-1128.
- [5] Gao ZH, Tretiakova MS, Liu WH, et al. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2006, 19(4): 533-540.
- [6] Zhao G, Cui J, Qin Q, et al. Mechanical stiffness of liver tissues in relation to integrin β 1 expression may influence the development of hepatic cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *J Surg Oncol*, 2010, 102(5): 482-489.
- [7] 马进财, 刘吉勇, 刘绍玲. 逆转录病毒载体介导的端粒酶抑制基因促进肝癌细胞凋亡 [J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14(10): 989-992.
- [8] 王丛笑, 刘吉勇, 赵跃然, 等. 正反义人端粒酶 RNA 组分 (hTR) 逆转录病毒真核表达载体的构建 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12(1): 51-54.
- [9] Liu JY, Zhu Q, Li J, et al. The retrovirus-mediated antisense human telomerase RNA (hTR) gene limits the growth of hepatocellular carcinoma growth in cell culture and animals [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(4): 1122-1130.
- [10] Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism [J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 564-579.
- [11] Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer [J]. *Curr Opin Oncol*, 1996, 8(1): 66-71.
- [12] Souiden Y, Bouraoui A, Chaieb K, et al. Telomeres and telomerase as targeted therapies in cancer treatment [J]. *Bull Cancer*, 2010, 97(9): 1087-1104.
- [13] Chen H, Li Y, Tollefsbol TO. Strategies targeting telomerase inhibition [J]. *Mol Biotechnol*, 2009, 41(2): 194-199.
- [14] Theimer CA, Feigon J. Structure and function of telomerase RNA [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2006, 16(3): 307-318.
- [15] Bagheri S, Nosrati M, Li S, et al. Genes and pathways downstream of telomerase in melanoma metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(30): 11306-11311.
- [16] Liotta LA. Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture [J]. *Cancer Res*, 1986, 46(1): 1-7.
- [17] Zhai B, Yan HX, Liu SQ, et al. Reduced expression of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(37): 5665-5673.
- [18] Du GS, Wang JM, Lu JX, et al. Expression of P-aPKC-iota, E-cadherin, and beta-catenin related to invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2009, 16(6): 1578-1586.
- [19] Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, et al. Cell adhesion molecules: Role and clinical significance in cancer [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(10): 1023-1037.
- [20] 赵刚, 崔静, 钦琦, 等. 肝硬化及肝癌组织中整合素 β 1 表达的差异 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2010, 18(5): 353-356.
- [21] Gialeti C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting [J]. *FEBS J*, 2011, 278(1): 16-27.

[收稿日期] 2011-02-20

[修回日期] 2011-04-30

[本文编辑] 韩 丹