

miR-214 通过靶向调控 E2F3 抑制肝癌细胞的增殖

杜朝阳, 杨如玉, 李 超, 段丽娟

(河南省南阳市中心医院血液科, 河南 473001)

【摘要】 目的 探讨 miR-214 通过靶向调控 E2F 转录因子 3 (E2F3) 抑制肝癌细胞的增殖。**方法** RT-PCR 法检测细胞株 SMMC-7721、HepG2、SK-Hep-1 和 Huh 7 中 miR-214 的表达量, 并利用脂质体转染 miR-214 NC 及 miR-214 mimics。采用 MTT 法检测 miR-214 对肝癌细胞活力的影响; Hoechst 染色试剂盒检测 miR-214 对细胞凋亡的影响, 流式细胞术检测 miR-214 对细胞周期的影响; Western blot 及 RT-PCR 法检测 miR-214 对肝癌细胞中 E2F3 蛋白及 mRNA 表达量的影响, 并通过荧光素酶报告基因进行验证。**结果** SMMC-7721、SK-Hep-1、Huh 7 及 HepG2 中 miR-214 的表达量分别为 (0.83 ± 0.08) 、 (0.32 ± 0.03) 、 (0.33 ± 0.03) 、 (0.08 ± 0.01) , 其中 HepG2 中 miR-214 表达量最低, 因此选用 HepG2 作为后续实验细胞株。HepG2 细胞转染 miR-214 NC 及 miR-214 mimics, miR-214 mimics 组中 miR-214 表达量 (0.65 ± 0.06) 明显高于 miR-214 NC 组 (0.14 ± 0.01) , miR-214 mimics 组细胞活力 (0.35 ± 0.03) 明显低于 miR-214 NC 组 (0.69 ± 0.06) , miR-214 mimics 组细胞凋亡率 $(36.37 \pm 3.43)\%$ 明显高于 miR-214 NC 组 $(3.74 \pm 0.34)\%$, miR-214 mimics 组 G1 期明 (57.79 ± 5.78) 显长于 miR-214 NC 组 (45.319 ± 4.53) , miR-214 mimics 组中 E2F3 蛋白 $[(0.23 \pm 0.02)$ 、 $(0.24 \pm 0.02)]$ 及 mRNA 表达量明显低于 miR-214 NC 组 $[(0.98 \pm 0.09)$ 、 $(0.99 \pm 0.10)]$, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** miR-214 过表达能通过下调 E2F3 表达抑制肝癌细胞的增殖。

【关键词】 miR-214, 肝癌细胞; E2F3; 增殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0027-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.06.006

Inhibition of the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by miR-214 via regulation of E2F3 expression

DU Zhao-yang, YANG Ru-yu, LI Chao, DUAN Li-juan

(Department of Hematology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan Province 473001, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of inhibition of miR-214 expression on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells via regulation of E2F3 expression. **Methods** The expression of miR-214 in SMMC-7721, HepG2, SK-Hep-1 and Huh 7 cells was examined by RT-PCR. Hepatocellular carcinoma cells were transfected with miR-214 NC and miR-214 mimics with liposomes. The expression of miR-214 was detected by RT-PCR. The cell viability was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by Hoechst staining. Cell cycle was detected by flow cytometry. Western blot, RT-PCR and dual luciferase reporter gene assay were used to detect whether E2F3 was a downstream target gene of miR-214. **Results** The expression of miR-214 in SMMC-7721, HepG2, SK-Hep-1 and Huh 7 cells was 0.83 ± 0.08 , 0.32 ± 0.03 , 0.33 ± 0.03 , and 0.08 ± 0.01 , respectively. The expression of miR-214 in the HepG2 cells was the

lowest, so HepG2 cells were selected as the subsequent experimental cell line. Compared with the miR-214 NC group, the expression of miR-214 (0.65 ± 0.06 vs. 0.14 ± 0.01) was up-regulated, the cell viability (0.35 ± 0.03 vs. 0.69 ± 0.06) was decreased, cell apoptosis rate [$(36.37 \pm 3.43)\%$ vs. $(3.74 \pm 0.34)\%$] was increased, the G1 phase of the cell cycle (57.79 ± 5.78 vs. 45.319 ± 4.53) was prolonged, the expression of E2F3 protein (0.23 ± 0.02 vs. 0.98 ± 0.09) and mRNA (0.24 ± 0.02 vs. 0.99 ± 0.10) was significantly down-regulated in the miR-214 mimics group ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-214 mimics suppress the HepG2 cell proliferation via targeted down-regulation of E2F3 expression.

【Key words】 miR-214; Hepatocellular carcinoma; E2F3; Proliferation

原发性肝癌是肝细胞或肝内管细胞发生的恶性肿瘤,其中 90% 为肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC),是位居世界第五位及致死率第 3 位的肿瘤^[1,2]。目前,手术切除和肝移植是 HCC 最为有效的治疗方法,然而,临床研究表明超过 50% 的接受肝切除的 HCC 患者出现术后复发^[1,2]。因此,探讨肝癌的发生发展的相关机制,对于肝癌的诊断、治疗及预后具有重要的意义。

MicroRNA (miRNA) 是一类非编码小分子 RNA,能够结合于靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域,降解或者阻遏靶基因的翻译,从而抑制靶基因的表达。近些年大量研究证实 miRNA 在肿瘤的发生发展中起着重要的作用,包括肝癌^[3]。miRNA 微阵列研究显示,miR-214 在肝癌组织中的表达明显低于正常肝组织^[4]。同时恢复肝癌细胞中 miR-214 的表达,能显著的抑制细胞的增殖,但具体的作用机制未知。而 miRNA 对细胞生物学行为的调控作用,大部分源于其对靶基因的调控作用^[5,6]。研究表明 E2F 家族基因 E2F 转录因子 3 (E2F3) 在肝癌组织中高表达,并与肝癌的发生发展密切相关,且有研究显示 miR-214 与 E2F3 在多种病理情况下的表达具有相关性^[7,8],提示 miR-214 可能通过调控 E2F3 调控细胞的生物学行为。所以本研究将在此基础上,探讨 miR-214 在肝癌细胞株中的表达,及恢复其表达后对细胞的增殖、凋亡行为的影响及具体机制。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人 SK-Hep-1 购于中国科学院细胞库。人 HepG2、SMCC-7721、Huh 7 购于美国菌种保藏中心 (ATCC)。

1.2 试剂及主要仪器

四唑盐试剂 (MTT) (美国 Sigma 公司);兔抗 E2F3、GAPDH 单克隆抗体 (美国 Epitomics 公司);trizol

试剂盒 (美国 Corning 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L),Hoechst 染色试剂盒,细胞周期检测试剂盒 (碧云天生物技术研究);胎牛血清,DMEM 培养基,胰蛋白酶 (Gibco 公司);结晶紫 (Sigma 公司)。CO₂ 培养箱,超净工作台 (美国 Thermo Scientific 公司);TS100 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司);FACS Calibur 型流式细胞仪 (美国 BD 公司);迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪,ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 miRNA 合成、配制、存储及转染

在广州市锐博生物科技有限公司订购合成 miR-214 mimic 及对照 mimic negative control (miR-214 NC)。合成样品先离心,然后每 5 nmol miRNA 中加入 250 μ L DEPC 水稀释,配成 20 μ mol/L 母液,分装, -20℃ 保存备用。转染前 1 d,在无双抗培养基中接种细胞 (6 孔板,每孔加 2000 μ L,其他按比例增加或减少),转染时细胞的汇合度要达到 50%;用适量无血清 Opti-MEM® I 培养基稀释 miRNA (250 μ L),轻轻混匀。摇匀 Lipofectamine 2000,取适量用 Opti-MEM® I 稀释并轻轻混匀后室温孵育 5 min。将稀释的 Lipofectamine 2000 和稀释的 miRNA 轻轻混合,室温孵育 (20~30) min;将 miRNA/Lipofectamine 2000 复合物加入 6 孔板,前后轻轻摇动混合;6 h 以后换成含 10% 血清的 DMEM 培养基,于 37℃,CO₂ 培养箱培养,并用 RT-PCR 检测 miR-214 的表达。

1.4 MTT 检测细胞活力

将处于生长对数期的 HepG2 细胞消化,细胞浓度调整为 2×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,每孔 200 μ L,转染 48 h 后,加入 20 μ L 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 h 后,加 150 μ L 二甲基亚砷,震荡 10 min,采用酶标仪于 570 nm 处测吸光度 (A) 值,每个实验组三个平行复孔。

1.5 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将处于生长对数期的 HepG2 细胞接种于 6 孔

板,细胞浓度调整为 1×10^4 个/mL,接种于 6 孔板,每孔 1 mL,转染 48 h 后,用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞,4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,加入 Hoechst 33258 染色液避光染色 15 min, PBS 洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察并拍照。每个实验组三个平行复孔。

1.6 流式细胞术检测细胞周期

将处于生长对数期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,细胞浓度调整为 1×10^4 个/mL,接种于 6 孔板,每孔 1 mL,转染 48 h 后,按细胞周期检测试剂盒说明书进行检测:用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,离心,并重悬,接着加入 5 μ L 终浓度为 10 mg/mL 的 Rnase,37℃ 孵育 1 h,再加入 碘化丙啶染液,室温下避光染色 30 min,用流式细胞仪进行细胞周期检测分析。每个实验组三个平行复孔。

1.7 RT-PCR 验证 miR-214 在不同肝癌细胞株中的表达

参考 trizol 试剂盒使用说明书提取总 RNA,并用微量紫外分光光度计检测 RNA 的纯度,通过一步法 RT-PCR 试剂盒将逆转录 RNA,并进行 PCR 扩增,最后将扩增产物用于 2% 的琼脂糖胶电泳。引物分别加入 25 μ L PCR 反应体系中,反应条件为 94℃ 变性 45 s,59℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环。miR-214 上游引物:5'-GGACAGGACGCACAGTCA-3',下游引物:5'-CAGACGAGGCTCCGTGGT-3',E2F3 上游引物:5'-AGAAAGCGGTCAATCAGTACCT-3',下游引物:5'-TGGACTTCGTAGTGCAGCTCT-3',GAPDH 上游引物:5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3',下游引物:5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。

1.8 Western blot 检测 E2F3 的表达

将处于生长对数期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板,细胞浓度调整为 1×10^4 个/mL,接种于 6 孔板,每孔 1 mL,转染 48 h 后,刮下细胞,离心,后加入适量的 RIPA 裂解液,裂解 30 min,离心,小心吸取上清液,即可获得总蛋白。根据 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,后湿法转膜 30 min 左右。将膜浸入一抗溶液(兔抗 E2F3,GAPDH 单克隆抗体,稀释度 1:100)孵育,4℃ 过夜;次日二抗溶液(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L))中室温孵育 1~2 h。将膜取出漂洗,在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件统计分析各抗体条带灰度值。每个实验组

三个平行复孔。

1.9 荧光素酶报告基因表达分析

miR-214 及 E2F3 重组载体共转染到 HepG2 细胞中。分组如下:miR-214 mimics + Wt E2F3,miR-214 NC + Wt E2F3,miR-214 mimics + Mut E2F3,miR-214 NC + Mut E2F3。应用双荧光素酶检测系统检测转染好的荧光素酶活性,计算公式:相对荧光值 = 萤火虫荧光素酶荧光值/海肾荧光素酶荧光值。每个实验组三个平行复孔。

1.10 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四株肝癌细胞中 miR-214 的表达情况

如图 1,RT-PCR 结果显示,miR-214 在 SMMC-7721、SK-Hep-1、Huh 7 及 HepG2 细胞中的表达情况分别为 (0.83 ± 0.08) , (0.32 ± 0.03) , (0.33 ± 0.03) , (0.08 ± 0.01) ,其中 HepG2 中 miR-214 表达量最低,因此选用 HepG2 作为后续实验细胞株。

2.2 miR-214 mimics 对 HepG2 肝癌细胞中 miR-214 表达量的影响

如图 2 所示,RT-PCR 结果显示,miR-214 NC 及 miR-214 mimics 在 HepG2 细胞中的表达量分别为 (0.14 ± 0.01) , (0.65 ± 0.06) ,二者比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 miR-214 mimics 对肝癌细胞活力的影响

HepG2 细胞转染 miR-214 NC 及 miR-214 mimics,经 MTT 实验发现,二者细胞活力分别为 (0.69 ± 0.06) , (0.35 ± 0.03) ,二者比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 miR-214 mimics 对肝癌细胞凋亡情况的影响

如图 3 所示,HepG2 细胞转染 miR-214 NC 及 miR-214 mimics,经 annexin V/PI 流式细胞术检测发现,二者细胞凋亡率分别为 $(3.74 \pm 0.34)\%$, $(36.37 \pm 3.43)\%$,二者比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 miR-214 对肝癌细胞周期的影响

如图 4 所示,HepG2 细胞转染 miR-214 NC 及 miR-214 mimics,二者 G1 期细胞数目分别为 (45.319 ± 4.53) , (57.79 ± 5.78) ,二者比较,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 miR-214 对 HepG2 肝癌细胞中 E2F3 表达量的影响

如图 5 所示, HepG2 细胞转染 miR-214 NC 及 miR-214 mimics, 二者细胞中 E2F3 的 mRNA 及蛋白表达量分别为 (0.98 ± 0.09) , (0.24 ± 0.02) 及 (0.99 ± 0.10) , (0.23 ± 0.02) , 二者比较, 差异具有统计学意义 $(P < 0.01)$ 。

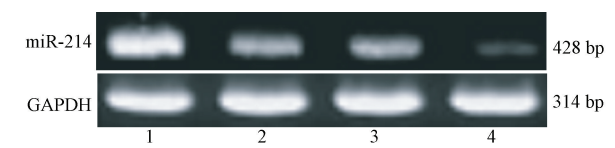
2.7 荧光素酶报告基因表达分析

将 miR-214 mimics、miR-214 NC 及野生型载体 pMir E2F3 3' UTR-Wt、及突变型载体 pMir E2F3 3' UTR-Mut 转入 HepG2 细胞中, 结果发现, miR-214 mimics 与野生型载体 pMir E2F3 3' UTR-Wt 共转染组的荧光信号强度明显弱于其它转染组, 差异具有

统计学意义 $(P < 0.01)$ 。而对于突变型载体 pMir E2F3 3' UTR-Mut 来说, 各组间荧光强度无任何差别 $(P > 0.05)$, 说明 E2F3 是 miR-214 下游靶基因。见图 6。

3 讨论

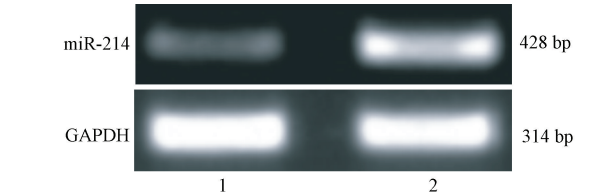
原发性肝癌在恶性肿瘤发病中居世界前五, 也是世界第三大致死性癌症^[1, 2]。研究表明, 在各种病理、生理过程, 包括癌症过程中, 许多 miRNAs 异常表达^[3]。miRNAs 作为一类新型的调节因子, 既可以作为原癌基因发挥作用, 也可以作为抑癌基因进而调节细胞的生物学特性^[3]。miR-214 是在小鼠、大鼠及鸡等种属中高度保守的非编码 RNA 分



注: 1: SMMC-7721; 2: SK-Hep-1; 3: Huh 7; 4: HepG2

图 1 四株肝癌细胞中 miR-214 的表达情况

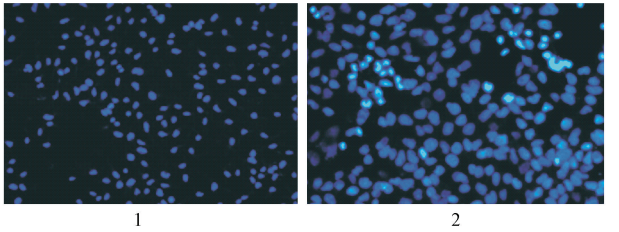
Fig. 1 Expression of miR-214 in the four hepatocellular carcinoma cells



注: 1: miR-214 NC; 2: miR-214 mimics

图 2 miR-214 mimics 对 HepG2 肝癌细胞中 miR-214 表达量的影响

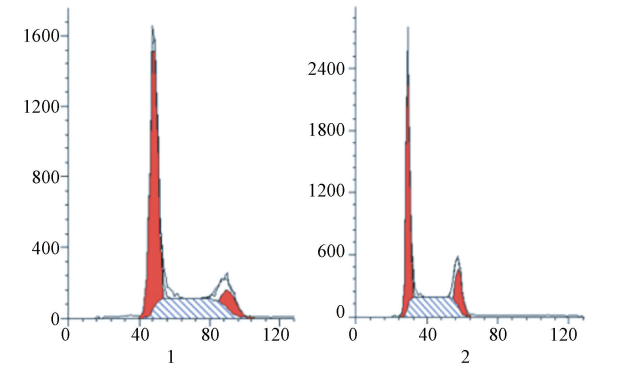
Fig. 2 Effect of miR-214 mimics on expression of miR-214 in the HepG2 cells



注: 1: miR-214 NC; 2: miR-214 mimics

图 3 miR-214 mimics 对 HepG2 肝癌细胞凋亡情况的影响 (×200)

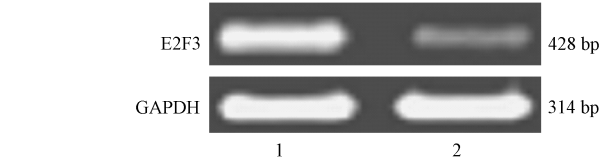
Fig. 3 Effect of miR-214 mimics on cell apoptosis in the HepG2 cells



注: 1: miR-214 NC; 2: miR-214 mimics

图 4 miR-214 mimics 对 HepG2 肝癌细胞周期的影响

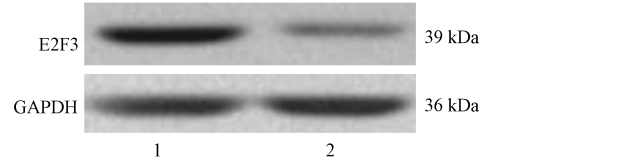
Fig. 4 Effect of miR-214 mimics on cell cycle in the HepG2 cells



注: 1: miR-214 NC; 2: miR-214 mimics

图 5 miR-214 mimics 对 HepG2 肝癌细胞中 E2F3 表达量的影响

Fig. 5 Effect of miR-214 mimics on expression of E2F3 in the HepG2 cells



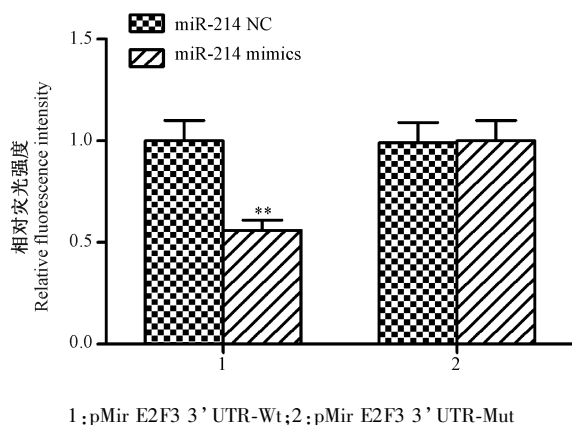


图 6 荧光素酶报告基因表达分析

Fig. 6 Luciferase reporter gene expression analysis

与 miR-214 NC 比较, ** $P < 0.01$

Compared with the miR-214 NC, ** $P < 0.01$

子,位于染色体 1q24.3。最初把 miRNAs 和癌症联系在一起是在慢性淋巴细胞白血病的[9]。后续 miRNA 微阵列进一步的证实肝癌组织中 miR-214 的表达低于癌旁组织[4]。提示 miR-214 在肝癌组织中是作为抑癌基因存在的,并参与肝癌的发生发展过程。因此本研究在此基础上首先通过 RT-PCR 法检测 4 株肝癌细胞株 SMMC-7721、SK-Hep-1、Huh 7 及 HepG2 中 miR-214 的表达,结果表明 miR-214 在 HepG2 的表达量最低,因而选为后续实验细胞株。接着通过 RT-PCR 法证实了 miR-214 NC 及 miR-214 mimics 成功转染 HepG2 细胞。所以进一步采用 MTT 法, Hoechst 染色法检测 miR-214 mimics 对 HepG2 细胞活力及凋亡情况的影响,结果表明 miR-214 mimics 能显著的降低细胞活力,并提高细胞凋亡率,与 Xu 等[5]在骨肉瘤细胞, Yang 等[6]在胃癌细胞株的研究结果一致,从而说明恢复 miR-214 的表达能显著的抑制 HepG2 的增殖,并诱导细胞凋亡。而肿瘤细胞的不可控制的生长增殖源于细胞周期的紊乱,其中细胞周期一般分为 G1、G2/M 及 S 期,且 G1 期及 G2 期是多数抗癌药物作用肿瘤细胞的靶点[10]。miR-214 能够通过调控细胞周期相关蛋白 Cyclin D1、CDK3 及 CDK6 的表达,从而使细胞周期阻滞于 G1 期,最后使肝癌细胞 DNA 复制及有丝分裂阻断,最终导致细胞增殖受阻[11, 12]。所以本研究采用流式细胞术检测 miR-214 mimics 对 HepG2 细胞周期的影响,结果与上述报道一致[11, 12], miR-214 mimics 能显著的延长 HepG2 细胞的 G1 期,使细胞周期阻

滞于 G1 期,最终导致细胞增殖阻断。

miRNAs 对肿瘤细胞生物学行为的影响,一般是通过调控靶蛋白表达量来实现的,有报道证实 1/3 蛋白的转录表达是由 miRNAs 所调控的[13]。E2F 家族最初是在腺病毒 E2 基因的研究中发现的,后面陆续发现了 8 个的 E2F 家族成员,这 8 个 E2F 家族成员,由于结构上的差异,导致了功能上的不同。其中 E2F3 属于激活的亚群,能够促使静息细胞快速的从 G1 期进入 S 期,在细胞的增殖与凋亡过程中发挥着重要的作用。同时研究已经显示 E2F3 在肝癌组织中高表达,且通过下调 E2F3 表达,能促使肝癌细胞周期阻滞在 G1 期[8, 14]。另外研究已经表明 miR-214 与 E2F3 在多种病理过程中的表达量具有相关性,且有研究也发现 E2F3 是 miR-214 的靶基因[14, 15]。所以本研究利用荧光素酶报告基因检测 E2F3 是否是 miR-214 的靶基因,结果表明野生型的 E2F3 活性被 miR-214 mimics 显著下调,提示 E2F3 是 miR-214 的靶基因,接着采用 western blot 检测 miR-214 mimics 对 E2F3 蛋白及 mRNA 表达量的影响,结果表明 miR-214 mimics 能显著的降低 E2F3 蛋白及 mRNA 的表达,进一步的证实了 E2F3 确实是 miR-214 的靶基因。

综上所述,提高肝癌细胞 HepG2 中 miR-214 的表达,能显著的降低细胞活力,提高细胞凋亡率,并使细胞周期阻滞在 G1 期,同时能够靶向的下调 E2F3 表达。

参考文献:

- [1] de Lope C R, Tremosini S, Forner A, *et al.* Management of HCC[J]. J Hepatol, 2012,56 Suppl 1:S75 – S87.
- [2] Finn R S. Advanced HCC: emerging molecular therapies[J]. Minerva Gastroenterol Dietol, 2012,58(1):25 – 34.
- [3] Mizuguchi Y, Takizawa T, Yoshida H, *et al.* Dysregulated miRNA in progression of hepatocellular carcinoma: A systematic review[J]. Hepatol Res, 2016,46(5):391 – 406.
- [4] Peveling-Oberhag J, Seiz A, Doring C, *et al.* MicroRNA Profiling of Laser-Microdissected Hepatocellular Carcinoma Reveals an Oncogenic Phenotype of the Tumor Capsule[J]. Transl Oncol, 2014,7(6):672 – 680.
- [5] Xu Z, Wang T. miR-214 promotes the proliferation and invasion of osteosarcoma cells through direct suppression of LZTS1[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014,449(2):190 – 195.
- [6] Yang T S, Yang X H, Wang X D, *et al.* MiR-214 regulate gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting PTEN[J]. Cancer Cell Int, 2013,13(1):68.
- [7] Katoh M. Cardio-miRNAs and onco-miRNAs: circulating

miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases[J]. Front Cell Dev Biol, 2014,2;61.

[8] Zeng X, Yin F, Liu X, *et al.* Upregulation of E2F transcription factor 3 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2014,31(3):1139 – 1146.

[9] Calin G A, Cimmino A, Fabbri M, *et al.* MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008,105(13):5166 – 5171.

[10] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. Cell Prolif, 2003,36(3):131 – 149.

[11] Wang P, Chen S, Fang H, *et al.* miR-214/199a/199a* cluster levels predict poor survival in hepatocellular carcinoma through interference with cell-cycle regulators[J]. Oncotarget, 2016,7

(1):929 – 945.

[12] Zhang L L, Guo Y J, Zhao C N, *et al.* Effects and mechanism of miR-214 on hepatocellular carcinoma[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015,8(5):392 – 398.

[13] 刘浩, 尹华斌, 纪方. MicroRNA 与肿瘤的相关研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012,12(7):1388 – 1390.

[14] Cao T, Li H, Hu Y, *et al.* miR-144 suppresses the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting E2F3[J]. Tumour Biol, 2014,35(11):10759 – 10764.

[15] Yang Y, Chang S, Zhao Z, *et al.* MicroRNA-214 suppresses the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by targeting E2F3[J]. Oncol Lett, 2015,10(6):3779 – 3784.

[修回日期]2016 – 10 – 26

(上接第 11 页)

[8] Johnson RA. Voluntary running-wheel activity, arterial blood gases, and thermal antinociception in rats after 3 buprenorphine formulations [J]. J Am Assoc Lab Animal Sci,2016, 55(3): 306 – 311.

[9] 杨勇, 郭曲练, 邹望远, 等. 鞘内注射氯胺酮对甲醛炎性疼痛大鼠脊髓背角蛋白激酶 C 表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(3): 461 – 464.

[10] 闫美灵, 李京波. PKC 在心血管疾病中的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(9): 7 – 9.

[11] Li SS, Zhang WS, Yang JL, *et al.* Involvement of protein kinase B/Akt in analgesic effect of dexmedetomidine on neuropathic pain [J]. Cns Neurosci Therap, 2013, 19(5): 364 – 366.

[12] 王一涵, 冷玉芳, 李娟, 等. 右美托咪啶对慢性神经病理性痛大鼠脊髓背角神经元凋亡的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(3): 353 – 357.

[修回日期]2016 – 11 – 23