

## RNA 干扰 Heparanase 基因表达 对胆囊癌侵袭性影响的体外研究

李三红<sup>1</sup>, 刘会春<sup>1</sup>, 周少波<sup>2</sup>, 金浩<sup>1</sup>

**[摘要]**目的:利用 RNA 干扰技术沉默人胆囊癌 GBC-SD 细胞中乙酰肝素酶(heparanase, HPA) 基因的表达,探讨抑制 HPA 基因后对 GBC-SD 细胞侵袭性的影响。方法:构建靶向人 HPA 基因 miRNA 重组质粒,采用脂质体转染法将质粒转染入人胆囊癌 GBC-SD 细胞,RT-PCR 检测转染前后 HPA mRNA 表达情况,选出对 HPA 基因沉默效果最佳的质粒。通过划痕损伤试验和 Transwell 侵袭试验检测干扰沉默 HPA 表达后对人胆囊癌 GBC-SD 细胞侵袭性的影响。结果:质粒 pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-HPA-2 沉默人胆囊癌 GBC-SD 细胞 HPA mRNA 表达的效果最好。划痕损伤试验中胆囊癌 GBC-SD 细胞的迁移距离在 12 h、24 h pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-HPA-2 组均低于阴性对照组和空白组( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-HPA-2 组中穿过 Transwell 小室基质的胆囊癌 GBC-SD 细胞数均明显低于阴性对照组和空白组( $P < 0.01$ )。结论:靶向人 HPA 基因 miRNA 重组质粒能有效抑制 HPA 基因的表达,抑制人胆囊癌 GBC-SD 细胞的侵袭能力。

**[关键词]** 胆囊肿瘤; RNA 干扰; 乙酰肝素酶; 肿瘤侵袭

**[中国图书资料分类法分类号]** R 735.8 **[文献标识码]** A

### Effects of heparanase gene silencing by RNA interference on invasion of gallbladder carcinoma *in vitro*

LI San-hong<sup>1</sup>, LIU Hui-chun<sup>1</sup>, ZHOU Shao-bo<sup>2</sup>, JIN-hao<sup>1</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of heparanase(HPA) gene silencing by miRNA interference on invasion and migration of GBC-SD cells of gallbladder carcinoma. **Methods:** Four pairs of single-stranded recombinant plasmid miRNA oligo-DNA targeting human HPA gene sequence were synthesized and transfected into GBC-SD cells by lipofectamine<sup>TM</sup> 2000. HPA mRNA expression was detected by RT-PCR before and after transfection, the recombinant plasmid which showed the best silencing effect for further experiments was selected. Transwell invasion assays and wound scarification assays were performed to examine the migration and invasive ability of GBC-SD cells. **Results:** Recombinant plasmid pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-HPA-2 showed the best silencing effects. The migration distance in wound scarification assays of GBC-SD cells transfected with recombinant plasmid pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR-HPA-2 at 12h 24h was significant shorter than negative control and blank groups( $P < 0.05 - P < 0.01$ ). The invasive ability of GBC-SD cells transfected with pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-HPA-2 was decreased significantly when compared with negative control and blank groups( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** The GBC-SD cells transfected with recombinant plasmid pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR showed decreased HPA mRNA expression as well as inhibited invasion and migration *in vitro*.

**[Key words]** gallbladder neoplasms; RNA interference; heparanase; tumor invasion

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象,本研究通过 RNAi 沉默乙酰肝素酶(HPA)<sup>[1]</sup>基因的表达,观察其对胆囊癌 GBC-SD 细胞侵袭性的影响,进一步验

证 RNAi 的价值,为临床肿瘤治疗寻找新的方法提供实验依据。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胆囊癌 GBC-SD 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物细胞库。

1.1.2 试剂 DMEM 高糖培养基购于 Hyclone 公司,无支原体胎牛血清(FBS)购于杭州四季青生物有限公司,感受态细菌 DH5a、大观霉素(Spectinomycin)、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Transfection

[收稿日期] 2011-03-10

[基金项目] 安徽省高等学校自然科学研究资助项目(KJ2009A163)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 肝胆外科,安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院第二附属医院 普外科,安徽 蚌埠 233040

[作者简介] 李三红(1981-)女,硕士。

[通讯作者] 刘会春(1964-)硕士研究生导师,主任医师,教授。E-mail: doctorlhc2000@yahoo.com.cn

Reagent 试剂盒、Opti-MEM 培养基、Trizol、pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR-HPA-1 (HPA1)、pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR-HPA-2 (HPA2)、pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR-HPA-3 (HPA3)、pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR-HPA-4 (HPA4) 质粒及阴性对照质粒均购于 Invitrogen 公司,Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒 TIANGEN,基质胶 Matrigel 购于美国 BD 公司,Transwell 碳酸酯膜孔径 8  $\mu\text{m}$  3422 购自美国 Costar 公司,RT-PCR 引物系列购于上海捷瑞公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR-HPA 真核表达

载体的构建及鉴定 根据 Gene ID: 10855 基因序列,由 Invitrogen 公司设计 miRNA 干扰载体干扰靶基因 Homo sapiens HPA,合成 4 对 miRNA 寡聚单链 DNA 和一对阴性对照(见表 1)。将寡聚单链 DNA 退火成双链。将 4 对双链 miRNA oligo 分别插入到 miRNA 表达载体 pcDNA 6.2-GW/EmGFPmiR 中 (Invitrogen, Catalog no. K4936-00),构建 miRNA 表达载体,并转化至感受态细菌 DH5a,用含终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的大观霉素 LB 培养基,37  $^{\circ}\text{C}$ ,250 r/min 摇床摇菌,质粒中抽(去内毒素)试剂盒抽提质粒,并由 Invitrogen 测序,构建好的重组质粒系列全部正确。

表 1 miRNA 寡聚单链 DNA 序列

oligo 名称	寡聚单链 DNA 序列 5'~3'
MR120-1-F	TGC TGT TAT CCA GCC ACA TAA AGC CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TGG CTT TAT GGC TGG ATA A
MR120-1-R	CCT GTT ATC CAG CCA TAA AGC CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGG CTT TAT GTG GCT GGA TAA C
MR120-2-F	TGC TGA ATA CTT GCC TCA TCA CCA CTG TTT TGG CCA CTG ACT GAC AGT GGT GAA GGC AAG TAT T
MR120-2-R	CCT GAA TAC TTG CCT TCA CCA CTG TCA GTC AGT GGC CAA AAC AGT GGT GAT GAG GCA AGT ATT C
MR120-3-F	TGC TGA AAG CTG GCA AGC CCA GTG AAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TTC ACT GGT TGC CAG CTT T
MR120-3-R	CCT GAA AGC TGG CAA CCA GTG AAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TTC ACT GGG CTT GCC AGC TTT C
MR120-4-F	TGC TGA AGA GCA GTA GTC CAG GAG CAG TTT TGG CCA CTG ACT GAC TGC TCC TGC TAC TGC TCT T
MR120-4-R	CCT GAA GAG CAG TAG CAG GAG CAG TCA GTC AGT GGC CAA AAC TGC TCC TGG ACT ACT GCT CTT C
Negative-F	TGC TGA AAT GTA CTG CGC GTG GAG ACG TTT TGG CCA CTG ACT GAC GTC TCC ACG CAG TAC ATT T
Negative-R	CCT GAA ATG TAC TGC GTG GAG ACG TCA GTC AGT GGC CAA AAC GTC TCC ACG CGC AGT ACA TTT C

1.2.2 细胞培养及质粒转染 人胆囊癌 GBC-SD 细胞用含 10% FBS 的 DMEM 高糖型培养基(不加抗生素)置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、95% 空气、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度细胞培养箱培养,细胞 2~3 天传代 1 次,试验均取对数生长期细胞。转染前 1 天,细胞以  $5 \times 10^5$  密度接种到 6 孔培养板,24 h 细胞达到 80%~95% 融合,转染步骤按照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 试剂盒操作说明书进行。

### 1.2.3 RT-PCR 检测 HPA 基因 mRNA 的表达变化

转染 48 h 后,提取各组细胞总 RNA,使用 Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒检测,加样顺序严格按照试剂盒说明书进行,内参照为  $\beta$ -actin。HPA 检测引物:正向 5'-TTC GAT CCC AAG AAG GAA TCA AC-3';反向 5'-GTA GTG ATG CCA TGT AAC TGA ATC-3'。 $\beta$ -actin 检测引物:正向 5'-AAC AGA GGC ATC CTC ACC CT-3';反向 5'-TAC ATG GCT GGG GTG TTG AA-3'。反应条件为,反转录反应 50  $^{\circ}\text{C}$  30 min,PCR 初始变性 94  $^{\circ}\text{C}$  2 min,变性 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s,退火 54.2  $^{\circ}\text{C}$  45 s,延伸 65  $^{\circ}\text{C}$  1 min;共 35 个循环,最终延伸 65  $^{\circ}\text{C}$  10 min。HPA 与  $\beta$ -actin 扩增片段分别为

585 bp 和 218 bp。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,天能 GIS 凝胶图像处理系统进行灰度值分析。计算 HPA/ $\beta$ -actin 的比值,比较 4 组干扰质粒转染细胞、阴性对照转染细胞和未转染细胞间 HPA mRNA 基因表达的差异。筛选出干扰效果最强质粒,供下一步试验,试验重复 3 次。

1.2.4 划痕损伤试验 细胞以每孔  $8 \times 10^4$  种入 24 孔板,待细胞呈现单层贴壁生长时划痕,并划好标记,用无血清 DMEM 洗细胞 2 次,尽量将划掉细胞清洗出,换无血清培养基,继续培养。于 0 h、12 h、24 h 在相差显微镜下随机选择 5 个 40 倍视野内测量划痕内面垂直距离。在图像分析软件 Scion Imagev4.0.2 (Scion Corp. Frederick, MD) 界面下,计算划痕两侧细胞迁移距离<sup>[2]</sup>,每组设 3 个复孔,试验重复 3 次。计算细胞迁移率 = [(修复前划痕内面垂直距离 - 修复后划痕内面垂直距离) / 修复前划痕内面垂直距离]  $\times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 侵袭试验 按 18 稀释 matrigel 胶,取 50  $\mu\text{l}$  在 Transwell 上室制备人工基膜,将细胞稀释成密度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$  的悬液,100  $\mu\text{l}$  细胞悬液

加入上室,下室加 600  $\mu$ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 42 h。取出小室,用棉签擦净上室附着细胞和基膜胶,PBS 漂洗后用甲醇固定,Giemsa 染色 20 min,超纯水冲洗晾干,显微镜下计数,每张膜中间和周围部分各随机取 5 个视野,计数每个视野内穿过的细胞数,取其均值,以侵袭细胞的数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力,每组设 3 个复孔,试验重复 3 次。

1.3 统计学方法 采用方差分析和  $q$  检验。

## 2 结果

2.1 重组质粒的测序 重组克隆中插入片段序列与设计的 oligo 序列完全一致。

2.2 质粒转染效果 转染 24 h 后,利用构建质粒载体能表达 GFP 的特点,经荧光相差倒置显微镜观察和计数成功转染的细胞,GBC-SD 细胞转染效率大约为 85% (见图 1)。

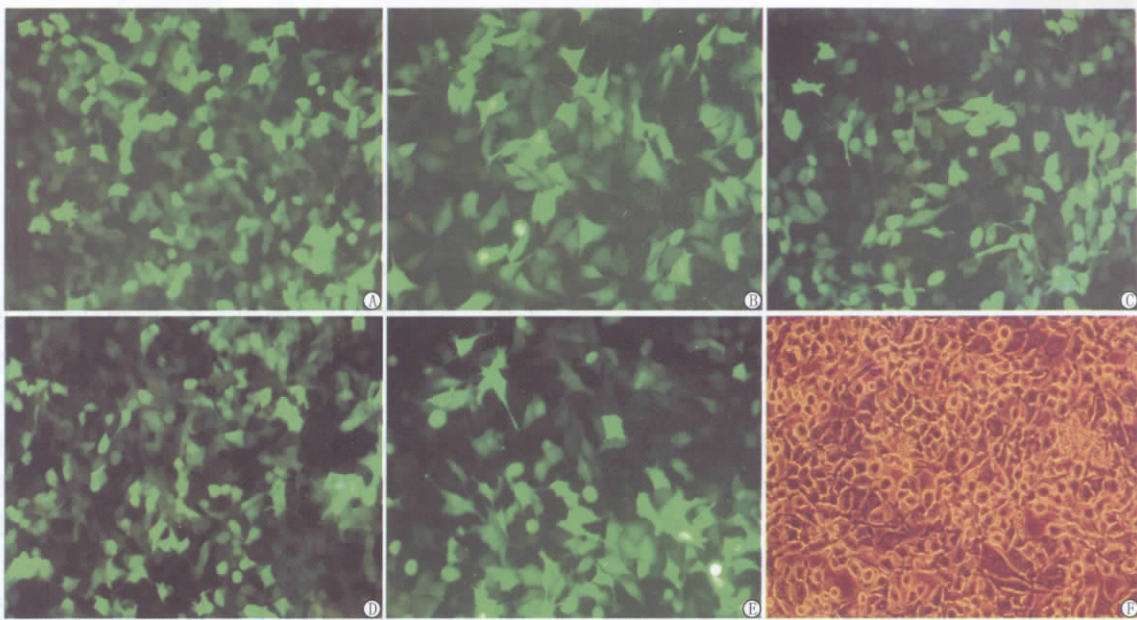


图1 各组GBC-SD细胞转染  
A: HPA1组转染24 h后; B: HPA2组转染24 h后; C: HPA3组转染24 h后; D: HPA4组转染24 h后; E: 阴性对照组转染24 h后; F: 空白组

2.3 各组细胞 HPA mRNA 基因表达的情况 以  $\beta$ -actin 作为内参照,细胞转染 48 h 后空白组、阴性对照组、HPA1、HPA2、HPA3、HPA4 组,HPA mRNA 表达量分别为  $0.96 \pm 0.08$ 、 $0.90 \pm 0.07$ 、 $0.30 \pm 0.04$ 、 $0.24 \pm 0.05$ 、 $1.06 \pm 0.06$ 、 $0.36 \pm 0.09$ ,差异有统计学意义 ( $F = 93.03$ ,  $P < 0.01$ ,  $MS_{组内} = 0.005$ ); RT-PCR 结果显示 HPA3 组、空白组与阴性对照组无干扰效果,条带较亮(见图 2)。HPA2 组质粒干扰人胆囊癌 GBC-SD 细胞 HPA mRNA 基因表达效果最强。因此,选取 HPA2 组质粒作为沉默效果最佳的质粒载体,进行后续试验。

2.4 RNAi 沉默 HPA 基因表达在划痕损伤试验中对细胞迁移能力的影响 划痕损伤试验结果显示,HPA2 组细胞 12 h 和 24 h 迁移距离均低于空白组、阴性对照组 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ),而空白组与阴性对照组细胞迁移距离差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 2)。

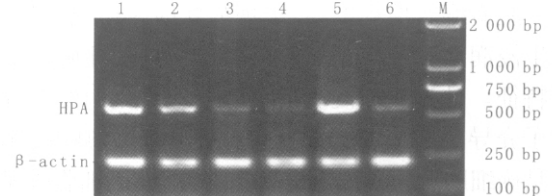


图2 RT-PCR检测各组GBC-SD细胞HPA mRNA基因的表达  
1: 空白组; 2: 阴性对照组; 3: HPA1组; 4: HPA2组; 5: HPA3组; 6: HPA4组; M: Marker

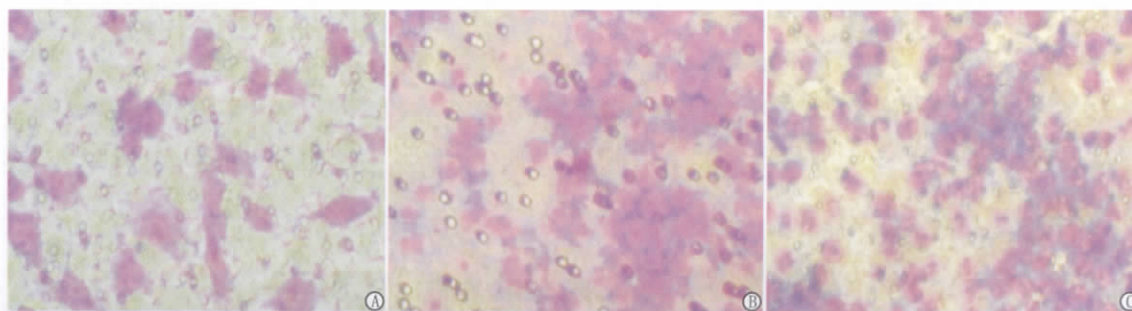
表2 划痕损伤试验各组人胆囊癌 GBC-SD 细胞在不同时间点的迁移率 (%) 比较 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

分组	12 h 迁移率	24 h 迁移率
HPA2 组	0.302 9 $\pm$ 0.017 2 <sup>*</sup> #	0.430 9 $\pm$ 0.008 1 <sup>**</sup> ##
阴性对照组	0.476 5 $\pm$ 0.073 8	0.787 1 $\pm$ 0.036 8
空白组	0.481 2 $\pm$ 0.064 4	0.800 5 $\pm$ 0.020 7
<i>F</i>	9.39	213.972
<i>P</i>	<0.05	<0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	0.003	0.001

$q$  检验: 与空白组比较\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与阴性对照组比较#  $P < 0.05$  ##  $P < 0.01$

### 2.5 RNAi 沉默 HPA 基因表达在 Transwell 侵袭试验中对人胆囊癌 GBC-SD 细胞侵袭力的影响

Transwell 侵袭试验结果显示,HPA2 组中穿过小室基质的胆囊癌 GBC-SD 细胞数在显微镜下均低于阴性对照组和空白组 ( $P < 0.01$ ),而阴性对照组与空白组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 3、图 3)。



A:HPA2组; B:阴性对照组; C:空白组  
图3 Transwell小室进行的基质侵袭试验

表3 Transwell 侵袭试验不同组穿出细胞数比较( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

分组	Transwell 侵袭	F	P	MS <sub>组内</sub>
HPA2 组	23 ± 6 <sup>**</sup>			
阴性对照组	98 ± 14	45.72	<0.01	133.667
空白组	104 ± 13			

q 检验:与空白组比较<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ;与阴性对照组比较<sup>##</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

RNAi 是指由短双链 RNA 诱导的同源 mRNA 的降解过程,可使基因的表达受到抑制。miRNA 也参与 RNAi 的过程,miRNA 是近年来在多种真核细胞及病毒中发现的一类长度约为 21 ~ 25 个核苷酸的参与基因转录后水平调控的非编码小分子单链 RNA,在进化上具有高度的保守性,能通过与其靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或抑制其翻译,从而对基因进行转录后的表达调控。

胆囊癌恶性程度高,出现症状时多已属晚期,已发生浸润和转移<sup>[3-4]</sup>。侵袭和转移是恶性肿瘤的重要特征。肿瘤实现浸润、转移,第一步是由细胞黏附分子介导的肿瘤细胞彼此之间的黏附力减弱;第二步是癌细胞与基膜的紧密附着;第三步是细胞外基质的降解;第四步是癌细胞的移出。即癌细胞借助于自身的阿米巴运动通过被溶解的基膜的缺损处游出。

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖是细胞外基质和基膜的主要结构成分,是由一个核心蛋白和数个与之共价连接的线性硫酸乙酰肝素(HS)侧链组成。其中 HS 侧链通过特殊的结合位点与细胞外基质和基膜的主要蛋白成分如四型胶原、层黏连蛋白和纤维黏连蛋白相互结合。因此,HS 在维持细胞外基质和基膜的自身结构、不溶性和屏障性中是关键成分。

人类 HPA 有 2 种基因亚型,HPA1 和 HPA2,最早从血小板和胎盘中克隆出来的是 HPA1,是指通常 HPA,其定位 4q21.3 上,由 1 756 个单核苷酸编码的 543 个氨基酸所组成。HPA 是哺乳动物细胞

内唯一具有降解位于细胞表面、细胞外基质及基膜的 HSPG 的多糖侧链-HS 功能的酶。能特异性地水解 HS 的结构,削弱细胞间质的屏障功能,促进肿瘤细胞侵入基质和血管壁,与肿瘤的侵袭、转移密切相关。近年来研究<sup>[5-7]</sup>发现,越来越多的癌症组织中有 HPA 的表达上调,其表达与肿瘤的局部侵犯和远处转移呈正相关,与术后的生存率呈负相关,而使用 HPA 抑制剂等降低 HPA 表达的方法可以有效地减少转移的发生、改善预后,提示 HPA 作为预后标志物的可能。

本研究发现 HPA 在人胆囊癌 GBC-SD 细胞中也是高表达的,这一结果与 Chang 等<sup>[8]</sup>研究结果相一致。应用 miRNAi 沉默技术可抑制人胆囊癌 GBC-SD 细胞 HPA mRNA 的表达,并进一步通过体外划痕损伤试验和 Transwell 侵袭试验显示,干扰组 HPA2 与空白组、阴性对照组差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),而阴性对照组与空白组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。这与 Mikami 等<sup>[9-10]</sup>的研究结果一致,即用 siRNA 干扰沉默肿瘤细胞中 HPA 的表达,可明显抑制肿瘤细胞的侵袭与迁移。这表明 HPA 参与人胆囊癌 GBC-SD 细胞的侵袭和转移。我们预测 HPA 可能会成为预防和治疗胆囊癌侵袭、转移的新靶点。采用 RNAi 技术沉默肿瘤细胞中的靶基因为胆囊癌治疗提供了一条新方法。

#### [参 考 文 献]

- [1] Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, et al. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis [J]. Nat Med, 1999, 5(7): 803-809.

(下转第 1295 页)

体膜电位,使氧化磷酸化脱偶联;另一方面,可导致 AIF(一种与细胞凋亡有关的因子)的释放。由于线粒体基质渗透压高,水分可通过开放的 PT 孔进入线粒体内,导致线粒体的肿胀。膜电位下降的细胞将不可避免的发生凋亡<sup>[11]</sup>。本研究结果显示,大鼠染锰 30 d 后,与对照组比较,线粒体 PT 孔、线粒体膜肿胀度光密度,膜电位光密度下降。线粒体膜电位是维持线粒体功能和结构的根本,也是评价线粒体功能的敏感指标,它的改变将会造成线粒体膜发生一系列的功能和状态的改变,最终导致机体 ATP 合成障碍。锰对呼吸链酶复合体活性有影响,且随着染锰剂量增加,4 种线粒体复合体活性明显降低<sup>[12]</sup>。本研究结果表明,中、高剂量锰引起 SDH 活性降低,细胞色素 C 增加,线粒体是氧化磷酸化合成 ATP 的关键部位,而 SDH 和细胞色素 C 是线粒体内膜呼吸链的关键酶,其活力直接影响线粒体的氧化磷酸化过程。同时过量锰引起氧化损伤诱导产生过量的活性氧物质(ROS) OH·,OH·引起脂质过氧化,从而对生物膜产生有害影响,正常情况下,机体主要依靠抗氧化酶如 SOD、CAT 和 GSH-PX 等清除 ROS,这对维持体内氧化还原状态的平衡至关重要,而 GSH-PX 直接反映线粒体内抗氧化系统功能的水平。本研究中发现,GSH-PX 活性降低,无法清除毒性强的 OH·,使得不饱和脂肪酸水平降低,脂质过氧化反应增强。从而使细胞膜中的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,造成生物膜结构发生一系列变化,生物酶活性丧失,线粒体、溶酶体等细胞器发生裂解,导致细胞死亡。

综上所述,过量锰可使肝线粒体 PT 孔开放,膜电位下降,导致线粒体氧化应激,阻碍线粒体正常能

量代谢,使线粒体结构的完整性受到破坏,降低电子传递链的活性,引起线粒体的氧化损伤。

#### [参 考 文 献]

- [1] 王建军,贾克.牛磺酸和环孢素 A 对氯化锰致大鼠肝脏线粒体氧化损伤作用的影响[J].蚌埠医学院学报,2010,35(12):1217-1219.
- [2] Clark JB,Nicklas WJ. The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization [J]. J Biol Chem,1970,245(18):4724-4731.
- [3] Lowry OH,Rosebrough NJ,Farr A,et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biol Chem,1951,193(1):193-265.
- [4] 钱涛,高维娟,丛斌,等.益肾降浊汤对小鼠脑缺血再灌注后线粒体功能的改善作用[J].山东医药,2005,45(10):16-18.
- [5] Kristal BS,Brown AM. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition [J]. J Biol Chem,1999,274(33):23169-23175.
- [6] Emaus RK,Grunwald R,Lemasters JJ. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondrial: spectral and metabolic properties [J]. Biochem Biophys Acta,1986,850(3):436-448.
- [7] 陈月开,黄登宇,强玉丰,等.细胞色素 C 的快速测定研究[J].山西大学学报,2003,26(1):64-66.
- [8] 沈立,沈伏,薛雅静,等.杏花雨对外源性高钙致大鼠脑线粒体损伤的保护作用[J].河北医药,2006,28(4):249-251.
- [9] 关坤,徐兆发.镉对线粒体损伤机制的研究进展[J].毒理学杂志,2009,23(4):156-158.
- [10] 袁凌燕,陆爱云.线粒体 PT 孔参与运动诱导细胞凋亡机制的探讨[J].上海体育学院学报,2005,29(1):26-29.
- [11] 赵峰,李国君,褚金花.锰染毒对老年大鼠心肌细胞线粒体功能的影响[J].环境与职业医学,2003,20(3):151-153.
- [12] 张杰,李洁,吴萍.氧化应激在锰神经毒性中的作用[J].首都医科大学学报,2008,10(29):664-666.

(本文编辑 章新生)

(上接第 1292 页)

- [2] 梁光波,张国平,金惠铭,等.体外定量测定细胞迁移方法的建立及应用[J].中国病理生理学杂志,2004,20(2):175-179.
- [3] Furlan A,Ferris JV,Hosseinzadeh K,et al. Gallbladder carcinoma update: multimodality imaging evaluation, staging, and treatment options [J]. AJR,2008,191(5):1440-1447.
- [4] Zhu AX,Hong TS,Hezelb AF,et al. Current management of gallbladder carcinoma [J]. Oncologist,2010,15(2):168-181.
- [5] Ben-Azhak O,Kaplan-Cohen V,Ilan N,et al. Heparanase expression in malignant salivary gland tumors inversely correlates with long-term survival [J]. Neoplasia,2006,8(10):879-884.
- [6] Mahtouk K,Hose D,Raynaud P,et al. Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1 and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma [J]. Blood,2007,109(11):4914-4923.
- [7] Basche M,Gustafson DL,Holden SN,et al. A phase I biological

and pharmacologic study of the heparanase inhibitor PI-88 in patients with advanced solid tumors [J]. Clin Cancer Res,2006,12(18):5471-5480.

- [8] Chang XZ,Wang ZM,Yu JM,et al. Isolation of a human gallbladder cancer cell clone with high invasive phenotype in vitro and metastatic potential in orthotopic model and inhibition of its invasiveness by heparanase antisense oligodeoxynucleotides [J]. Clin Exp Metastasis,2007,24(1):25-38.
- [9] Mikami S,Oya M,Shimoda M,et al. Expression of heparanase in renal cell carcinomas: implications for tumor invasion and prognosis [J]. Clin Cancer Res,2008,14(19):6055-6061.
- [10] Zhang ZH,Chen Y,Zhao HJ,et al. Silencing of heparanase by siRNA inhibits tumor metastasis and angiogenesis of human breast cancer in vitro and in vivo [J]. Cancer Biol Ther,2007,6(4):587-595.

(本文编辑 刘璐)