

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.008

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190510.1552.022.html(2019-05-14)

波形蛋白在不同肝癌细胞系中的表达及其对肝癌增殖、侵袭及迁移的影响*

李国炜¹,李海洋^{2△},成超³,桑志山²,杨钦喜²,贾磊²,温欣慰²

(1.贵州省贵阳市第一人民医院肝胆外科 550002;2.贵州医科大学附属医院肝胆外科,贵阳 550004;3.四川大学华西广安医院肝胆外科,四川广安 638000)

[摘要] **目的** 探讨波形蛋白(VIM)在不同肝癌细胞系中的差异表达及其对肝癌细胞增殖、侵袭及迁移能力的影响。**方法** 体外培养两种不同转移潜能肝癌细胞系(MHCC97-H、MHCC97-L),Western blot 检测 VIM 在人肝癌细胞系 MHCC97-H、MHCC97-L 细胞中的表达水平。应用 siRNA 干扰技术沉默 VIM 基因的表达,通过 CCK-8、Transwell、细胞划痕实验,观察下调 VIM 后对肝癌细胞增殖、侵袭、迁移能力的影响。**结果** Western blot 检测 VIM 在 MHCC97-H 细胞中表达水平明显高于 MHCC97-L 细胞(1.20 ± 0.33 vs. 0.93 ± 0.29 , $P < 0.05$)。Western blot 及实时荧光定量 PCR(qPCR)检测显示在肝癌细胞系 MHCC97-H 和 MHCC97-L 中,VIM-siRNA 转染组 VIM 的表达水平明显抑制($P < 0.05$)。与阴性组和空白组比较,VIM-siRNA 转染的实验组细胞的增殖、侵袭、迁移能力明显降低($P < 0.05$)。**结论** 抑制 VIM 基因的表达可明显降低肝癌细胞的增殖和体外侵袭转移能力。

[关键词] 波形蛋白;癌,肝细胞;细胞增殖;侵袭;细胞运动**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)17-2913-05

Vimentin expression in different hepatocellular cell lines and its effect on their proliferation, invasion and migration*

LI Guowei¹, LI Haiyang^{2△}, CHENG Chao³, SANG Zhishan², YANG Qinxi², JIA Lei², WEN Xinwei²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the First People's Hospital of

Guiyang, Guiyang, Guizhou 550002, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, West China-Guang'an Hospital of Sichuan University, Guang'an, Sichuan 638000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of Vimentin(VIM) in different hepatocellular cell lines and investigate the effect on cell proliferation, invasion and migration in vitro. **Methods** Two different transfer potential of hepatocellular cell lines(MHCC97-H and MHCC97-L) were cultured in vitro. The expression of VIM in MHCC97-H and MHCC97-L cells were tested by Western blot. We used siRNA interference technology to silence VIM gene. The effects of VIM gene silencing on the proliferation, invasion and migration of MHCC97-H and MHCC97-L cells were analyzed by CCK-8, Transwell and cell scratch assay. **Results** Western blot showed that VIM expression is significantly higher in MHCC97-H cells than that in MHCC97-L cells (1.20 ± 0.33 vs. 0.93 ± 0.29 , $P < 0.05$). Western blot and qPCR showed that VIM-siRNA significantly decreased VIM expression in MHCC97-H and MHCC97-L cells. Compared with the negative group and the blank group, cell proliferation, migration and invasion of MHCC97-H and MHCC97-L cells in groups transfected with VIM-siRNA significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Inhibition of VIM gene expression can significantly inhibit the proliferation, in-vitro migration and invasion of hepatocellular cell lines.

[Key words] vimentin; carcinoma, hepatocellular; proliferation; invasion; cell movement

我国是全球肝癌的高发地区,其发病率和病死率均处于世界较高水平,预计未来的中国和世界肝癌发病人数和病死人数将逐渐增加^[1]。虽然目前的外科

技术有着突飞猛进的发展,肿瘤的介入治疗、放射治疗、靶向治疗、免疫治疗及生物治疗等在不断崛起。但是肝癌的治疗效果及预后仍不理想,术后肿瘤早期

复发和转移是影响患者预后的主要原因^[2]。由于肝癌发病隐匿,早期诊断困难,大多数患者发现时因出现转移而失去根治性治疗的机会。因此,进一步阐明肝癌侵袭、转移相关作用机制将具有重要临床意义。波形蛋白(vimentin, VIM)是一种丰富并高度保守的Ⅲ型中间纤维蛋白之一,近年的研究显示 VIM 在不同的生理及病理状态下显现出复杂的生物学功能,与肿瘤的侵袭转移能力关系密切^[3]。本课题组在前期的试验中证实波形蛋白的高表达与肝癌的恶性程度及预后相关。本研究希望通过 siRNA 干扰技术,探讨 VIM 与肝癌侵袭转移的关系,希望为治疗原发性肝癌提供理论基础及生物干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞 MHCC97-H、MHCC97-L 购于上海中乔新舟生物公司(来源 ATCC),胎牛血清(FBS)、胰酶消化液(EDTA)购自美国 Gibco 公司。高效 RIPA 细胞裂解液购自索莱宝,Trizol 试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司,VIM 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(H+L)、化学发光(ECL)试剂盒购自沈阳万类生物科技有限公司。VIM siRNA(h)(sc-29522)、siRNA Dilution Buffer、siRNA Transfection Reagent、Control siRNA-A(sc-37007)、siRNA Transfection Medium、Control siRNA(Fluorescein Conjugate)-A(sc-36869)均购自美国 Santa Cruz 公司。Transwell 小室购自美国 Nunclon Surface 公司。FastStart Unicursal SYBR Green Master(Rox)购自日本 Takara Bio 公司,cDNA 反转录、cDNA 合成(反转录)试剂盒购自美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司。VIM 引物由上海生工设计合成。CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自上海东仁化学科技有限公司。Matrigel 基底胶购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

培养所需培养基按 90% 达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)+10% FBS+1% 双抗配制,细胞培养条件为 37 °C、5% CO₂。根据细胞生长情况,1~3 d 更换培养基。待细胞生长至 85% 以上即可进行传代。

1.2.2 瞬时转染

实验分 3 组,实验组:转染特异性 VIM-siRNA 干扰;阴性对照组:转染非特异性 Control siRNA-A;空白对照组:未加任何转染。所需 VIM-siRNA 由美国 Santa Cruz 公司设计并合成,筛选出一条具有干扰效果的 VIM-siRNA 片段,其上游序列:5'-AUG GAA GAG AAC UUU GCC G-3',下游序列:5'-CGG CAA AGU UCU CUU CCA U-3'。按照 siRNA Transfection Reagent 试剂说明书进行操作。

1.2.3 Western blot

提取细胞总蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法测蛋白水平,取样品量与十二烷基硫酸钠-

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液 5X 按照 4:1 的比例加入 1.5 mL EPP 管混匀。置于 100 °C 沸水加热 5 min,以充分变性蛋白。按每孔 40 μg 总蛋白上样,经 10% SDS-PAGE 转膜、封闭,孵合一抗、二抗、ECL 发光,最后用 AX-II 型 X 射线摄影暗匣曝光。图片存于电脑,使用 Image J 软件处理,对结果进行灰度值分析,β-actin 作为内参对照,进行半定量分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qPCR)

提取细胞总 RNA 并进行 RNA 水平测定,按 cDNA 反转录试剂盒操作说明进行反转录 cDNA 合成。以 β-actin 为内参,根据 FastStart Unicursal SYBR Green Master 操作说明进行 PCR 反应,反应条件为:95 °C 预变性 10 min 变性 1 个循环,95 °C 变性 15 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 40 个循环,72 °C 再延伸 5 min 1 个循环,4 °C 保存。通过检测样本 CT 值进行统计,采用 2^{-ΔΔCT} 法计算出目的基因 mRNA 的相对表达水平。VIM 上游引物:5'-AGT CCA CTG AGT ACC GGA GAC-3',下游引物:5'-GGG TGT CGA GGG AAA AAT AGG-3',β-Actin 上游引物:5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3',下游引物:5'-GGG CCG GAC TCG TCA TAC-3'。

1.2.5 CCK-8 细胞增殖实验

细胞以 3×10³ 个/孔接种于 96 孔板中,各组设置 4 个时间点,0、24、48、72 h。在 4 个不同时间点各组加入总体积 10% 的 CCK-8 试剂,3 h 后酶标仪在下 450 nm 波长测定光密度(OD)值,将各测试孔 OD 值减去本底 OD 值(空白组对照,即只加培养基未接种细胞),按公式计算细胞存活率,存活率%=(实验组-空白组)/(对照组-空白组)×100%,并绘制细胞生长曲线。

1.2.6 Transwell 侵袭实验

细胞转染 24 h 后,经胰酶消化,用含 1% 牛血清清蛋白(BSA)的 DMEM 培养基配成单细胞悬液,将细胞密度调整为 5×10⁵ 个/mL。混匀按每孔加入 Matrigel 50 μL 铺胶于 Transwell 膜小室,置于 37 °C 30 min。取制备的细胞悬液 1×10⁵ 个/mL(配成 200 μL)加入 Transwell 小室上室,下室加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基 500 μL,置于 37 °C 培养箱常规培养 24 h。经磷酸盐缓冲液(PBS)适当清洗,多聚甲醛固定 30 min,风干。用 0.1% 结晶紫染色 15 min。PBS 清洗,于显微镜下选取 5 个视野直接镜下拍照观察穿膜细胞数,取平均值。

1.2.7 细胞划痕试验

将各组细胞按 1×10⁶ 个/孔接种到 6 孔板内,培养 24 h。用高压消毒后 100 μL 枪头垂直均匀地在培养板中划线。再 PBS 清洗划下脱落的细胞 3 次,每孔加入 2 mL 无血清培养液,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱继续培养,分别于 0、24、48 h 对细胞进行观察并拍照,划痕修复率=(0 h 划痕距离-24 h 或 48 h 划痕距离)/0 h 划痕距离×100%。

1.2.8 荧光显微镜观察转染情况

荧光对照组

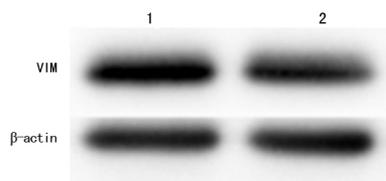
[Control siRNA (Fluorescein Conjugate)-A] 分别转染 MHCC97-H 细胞和 MHCC97-L 细胞 6 h 后,于荧光显微镜下观察转染情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS24.0 统计软件进行分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用配对样本检验,组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 检测 VIM 在不同转移潜能肝癌细胞中的表达 VIM 在 MHCC97-H 细胞中表达水平 (1.20 ± 0.33) 明显高于 MHCC97-L 细胞表达水平 (0.93 ± 0.29),两种细胞 VIM 表达水平比较差异有统

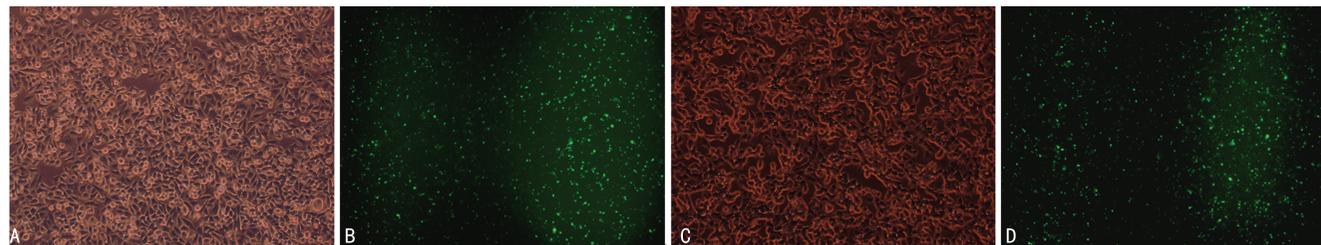
计学意义 ($P < 0.05$)。两种细胞 VIM 表达,见图 1。



1: MHCC97-H; 2: MHCC97-L

图 1 Western Blot 检测不同肝癌细胞 VIM 的表达

2.2 MHCC97-H 和 MHCC97-C 两株细胞转染情况 暗视野下可见已转染一包呈绿色荧光,同一视野明视野拍照对比,其转染均达 70% 以上,见图 2。



A: MHCC97-H 细胞; B: MHCC97-H 细胞转染 6 h 后; C: MHCC97-L 细胞; D: MHCC97-L 细胞转染 6 h 后

图 2 MHCC97-H 细胞和 MHCC97-L 细胞转染情况 ($\times 200$)

2.3 Western blot 检测转染后各组细胞 VIM 表达水平 转染后 MHCC97-H 细胞和 MHCC97-L 细胞实验组中 VIM 均有明显下调,其抑制率分别为 73.69% 和 69.43%,与相应的阴性组及空白组相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),见图 3、4。

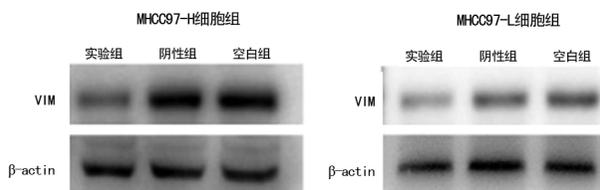
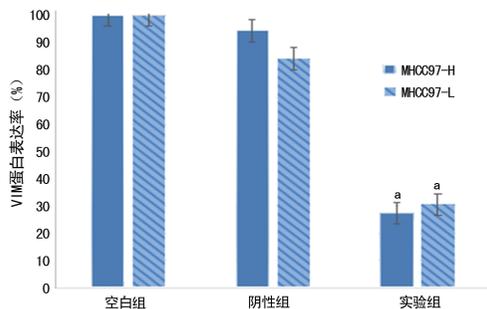


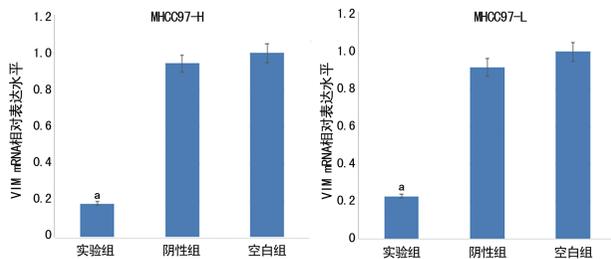
图 3 Western blot 检测 VIM 在各组细胞中的表达



$a: P < 0.05$, 与空白组和阴性组比较

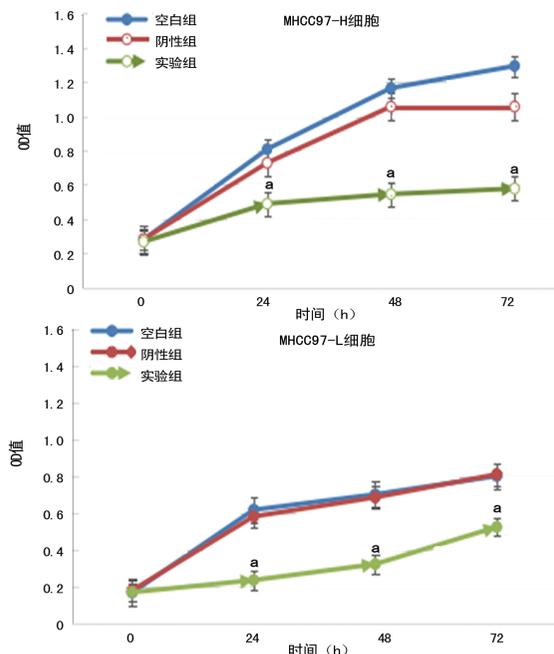
图 4 VIM 在各组细胞中的 VIM 表达水平比较

2.4 qPCR 检测转染后各组细胞 VIM mRNA 的相对表达水平 qPCR 检测结果显示,两种细胞实验组中 VIM mRNA 表达水平均明显下调,与阴性组及空白组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。VIM mRNA 在各组细胞中的相对表达水平比较,见图 5。



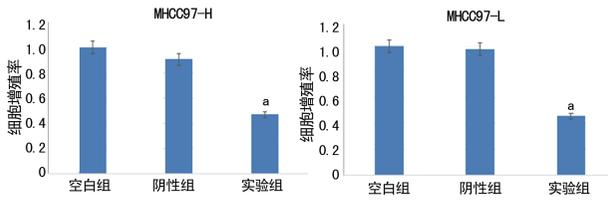
$a: P < 0.05$, 与阴性组和空白组比较

图 5 VIM mRNA 在各组细胞中的相对表达水平比较



$a: P < 0.05$, 与阴性组和空白组比较

图 6 两种肝癌细胞各组细胞增殖能力比较



a: $P < 0.05$, compared with negative and blank groups

图 7 48 h 时两种肝癌细胞各组细胞增殖率比较

2.5 两种细胞 CCK-8 细胞增殖实验结果比较 实

验组中 MHCC97-H 细胞和 MHCC97-L 细胞的增殖能力均有不同程度抑制,转染 24~48 h 时其抑制作用较为明显,与相应的阴性组和空白组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 6、7。

2.6 沉默 VIM 基因对各组细胞侵袭能力的影响

通过 siRNA 干扰技术沉默 VIM 基因后,两种细胞的侵袭能力均被明显抑制,实验组 VIM-siRNA 与阴性组和空白组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 8、9。

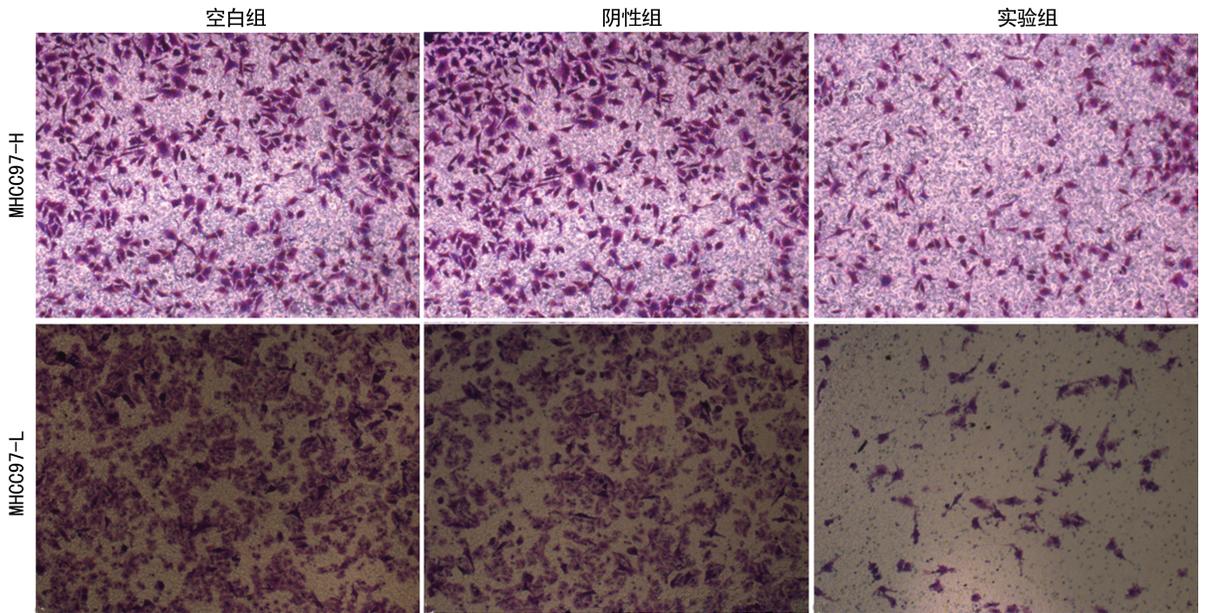
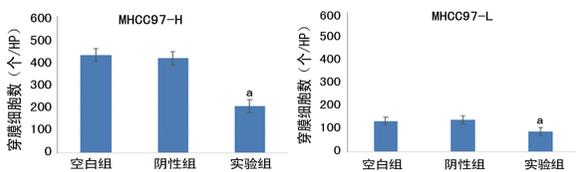


图 8 沉默 VIM 基因对 MHCC97-H、MHCC97-L 细胞侵袭能力的影响(Transwell×200)



a: $P < 0.05$, compared with negative and blank groups

图 9 各组细胞 Transwell 侵袭试验穿膜细胞数比较

2.7 各组细胞迁移能力比较

通过细胞划痕试验结果显示,在 MHCC97-H 细胞和 MHCC97-L 细胞中,沉默 VIM 后两种细胞迁移能力均受抑制,实验组与对应的阴性对照组、空白对照组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 10、11。

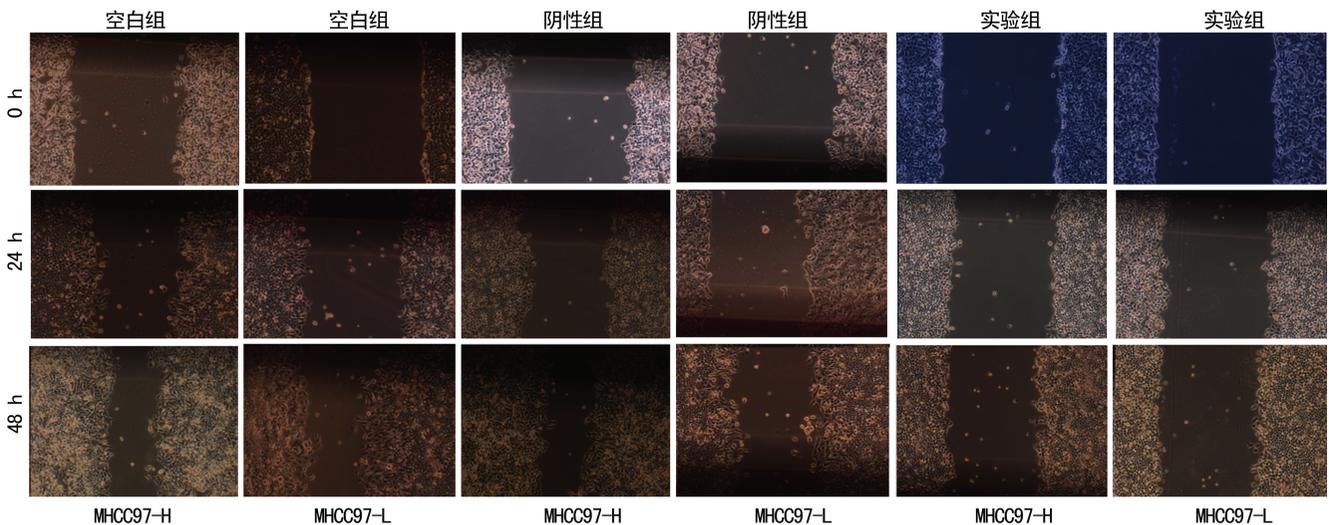
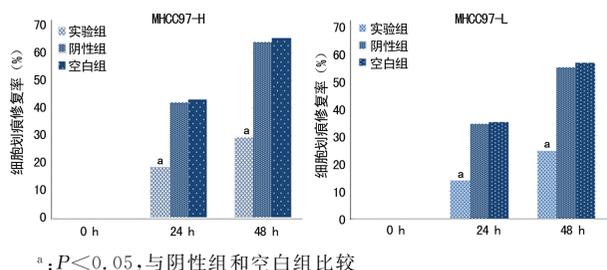


图 10 各组细胞划痕实验结果(×200)



a: $P < 0.05$, 与阴性组和空白组比较

图 11 各组细胞划痕修复率比较

3 讨论

我国是乙型病毒性肝炎(简称乙肝)大国,全球估计有 57% 的肝硬化和 78% 的肝细胞肝癌病例与乙肝或丙型病毒性肝炎(简称丙肝)病毒感染相关^[4]。尽管原发性肝癌的诊断和治疗已经取得了进展,但其预后仍然不尽人意。肝癌复发及转移仍是影响患者预后的主要原因。进一步弄清楚肝癌的发生、发展机制及侵袭转移相关作用机制具有重要临床意义。

在临床上,肿瘤的早期诊断及预测预后对其治疗至关重要。本课题组前期研究发现,VIM 在原发性肝癌组织中异常表达,癌组织中 VIM 表达远大于癌旁近、远组织(距癌组织 2~5 cm、>5 cm),其高表达与肝癌的 TNM 分期、病理分化、癌结节数量及转移情况密切相关^[5],本研究认为 VIM 的高表达对肝癌具有一定的促进作用,VIM 可以视为一种潜在的肿瘤标志物^[6-7]。关于这一点,在其他研究中也得到验证。有学者利用强效抗体 V9 抗原表位的精确测定 VIM,在恶性肿瘤中具有高度特异性,作为促进恶性肿瘤的诊断^[8]。通过血清学检测 VIM,对小肝癌的诊断具有 40.91% 的灵敏度和 87.50% 的特异度^[9]。

本研究选用两种不同转移潜能的肝癌细胞系,其转移潜能 $MHCC97-H > MHCC97-L$,MHCC97-H 肺转移能力为 100%,MHCC97-L 肺转移潜能为 40%^[10]。通过蛋白印迹实验提示 VIM 的高表达可能促进肝癌的侵袭转移。通过 siRNA 干扰技术能够有效沉默 VIM 基因在 MHCC97-H 和 MHCC97-L 细胞中的表达,而且两种细胞的增殖能力、侵袭能力和迁移能力明显下降,说明 VIM 的表达在肝癌的侵袭、转移过程中扮有重要的作用,并对肿瘤的靶向治疗具有一定的临床意义。关于其作用机制,目前尚不清楚。本课题组认为这一现象与 VIM 本身的生物学功能密切相关,如调控细胞的黏附、迁移、细胞凋亡、上皮-间质转化及血管生成等。

近年来,有研究显示 VIM 参与细胞黏附及迁移的调控,可解释在上皮细胞-间质转化过程中,细胞运动性增强、黏附性减弱及细胞形态改变,进而导致肿瘤侵袭能力的增强^[11]。此外,VIM 具有促进血管生成作用和介导内皮细胞收缩力的调节^[12-13],同时也可

参与调节血管生成的平衡^[14]。而部分信号分子是可以通过调节 VIM 来促进肝细胞癌中的细胞增殖和侵袭,如长的非编码 RNA GAS5^[15],说明 VIM 可以作为部分信号通路的信号分子参与肿瘤的发展过程。有学者认为,VIM 可能是通过鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEF) VAV2 介导的 Rac1 激活,促进黏着斑激酶(FAK)的稳定,使癌细胞更具运动性和侵袭性^[16]。

本研究结果表明,VIM 与肝癌侵袭转移的关系。VIM 的高表达与肝癌恶性程度及预后呈正相关,具有一定的临床指导意义。进一步阐明 VIM 与肝癌相关信号的作用机制,对于研究肿瘤的发生、发展及研发阻断肿瘤侵袭转移的靶向药物具有重要意义。

参考文献

- [1] 魏矿荣,彭侠彪,梁智恒,等. 全球肝癌流行概况[J]. 中国肿瘤,2015,24(8):621-630.
- [2] 何运,罗嘉,陈攀,等. 原发性肝癌患者 1 838 例预后因素分析[J]. 肿瘤学杂志,2017,23(9):789-793.
- [3] 李国炜,李海洋. 波形蛋白的生物学功能及相关病理的研究进展[J]. 医学综述,2018,24(7):1273-1278.
- [4] 李杰,庄辉. 病毒性肝炎流行病学进展[J]. 肝脏,2012,17(1):2-5.
- [5] 成超,李海洋,叶朝阳,等. 波形蛋白在原发性肝癌组织中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2017,46(33):4714-4717.
- [6] KARIM N A, ELDESSOUKI I, YELLU M, et al. A case study in advanced lung cancer patients with vimentin over expression[J]. Clin Lab, 2017, 63(10): 1575-1579.
- [7] SATELLI A, LI S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(18): 3033-3046.
- [8] TOMIYAMA L, KAMINO H, FUKAMACHI H, et al. Precise epitope determination of the anti-vimentin monoclonal antibody V9[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 3917-3921.
- [9] SUN S, POON R, LEE N, et al. Proteomics of hepatocellular carcinoma; Serum vimentin as a surrogate marker for small tumors[J]. J Proteome Res, 2010, 9(4): 1923-1930.
- [10] 施国明. 肝癌侧群细胞的特性及其在肝癌转移复发中的作用研究[D]. 上海:复旦大学,2008.
- [11] GAN Z, DING L, BURCKHARDT C J, et al. Vimentin intermediate filaments template microtubule networks to enhance persistence in cell polarity and directed migration [J]. Cell Syst, 2016, 3(3): 252-263.
- [12] JØRGENSEN M L, MØLLER C K, RASMUSSEN L, et al. An anti vimentin antibody promotes tube formation [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 3576-3584.
- [13] SELMA O M, STEFANIE R, MICHAEL W, et al. Plectin reinforces vascular integrity by me-(下转第 2922 页)

第二步,将 pAdTrack-CMV-hADRB3 Pme I 酶切线性片段电转化转入大肠埃希菌 BJ5183 感受态细菌,进而与其内部的 pAdEasy-1 骨架质粒进行同源重组。该方法明显提高了同源重组的成功率,缩短了实验周期,得到广泛应用^[15]。

目前尚鲜见应用腺病毒载体系统构建携带 hADRB3 基因重组腺病毒相关报道。本研究发现,应用 AdEasy-1 缺陷性腺病毒载体系统,能够成功构建重组腺病毒 Ad-hADRB3,获得的纯化重组腺病毒 Ad-hADRB3 经心包注射的方式可以有效感染 CHF 大鼠,hADRB3 可以在 CHF 大鼠心、肺、肝、脾、肾及小肠多器官组织中表达,证实以腺病毒为载体介导的外源 hADRB3 基因可在 CHF 大鼠体内有效表达,可为进一步研究人 β_3 -AR 在心力衰竭中的作用及具体机制,提供高效、高选择特异性的实验工具。

参考文献

[1] TAN S,CURTIS-PRIOR P B. Characterization of the beta-adrenoceptor of the adipose cell of the rat[J]. *Int J Obes*,1983,7(5):409-414.

[2] CANNAVO A,KOCH W J. Targeting β_3 -adrenergic receptors in the heart;selective agonism and β -blockade[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*,2017,69(2):71-78.

[3] ROZEC B,GAUTHIER C. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system;putative roles in human pathologies[J]. *Pharmacol Ther*,2006,111(3):652-673.

[4] NIU X,WATTS V L,CINGOLANI O H, et al. Cardio-protective effect of beta-3 adrenergic receptor agonism; role of neuronal nitric oxide synthase[J]. *J Am Coll Cardiol*,2012,59(22):1979-1987.

[5] ZHAO D,LIU J,WANG M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China; current features and implications[J]. *Nat Rev Cardiol*,2019,16(4):203-212.

[6] BRAUNWALD E,BRISTOW M R. Congestive heart failure; fifty years of progress[J]. *Circulation*,2000,102(20

Suppl 4):S14-23.

[7] STROBERG A D. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*,1997,37(1):421-450.

[8] MONIOTTE S,KOBZIK L,FERON O, et al. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardiums[J]. *Circulation*,2001,103(12):1649-1655.

[9] MORIMOTO A,HASEGAWA H,CHENG H J, et al. Endogenous beta3-adrenoreceptor activation contributes to left ventricular and cardiomyocyte dysfunction in heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2004,286(6):2425-2433.

[10] BUNDGAARD H,AXELSSON A,HARTVIG THOMSEN J, et al. The first-in-man randomized trial of a beta3 adrenoceptor agonist in chronic heart failure; the BEAT-HF trial[J]. *Eur J Heart Fail*,2017,19(4):566-575.

[11] BALLIGAND J L. Cardiac beta3-adrenergic receptors in the clinical arena; the end of the beginning[J]. *Eur J Heart Fail*,2017,19(4):576-578.

[12] GARDLIK R,PALFFY R,HODOSY J, et al. Vectors and delivery systems in gene therapy[J]. *Med Sci Monit*,2005,11(4):110-121.

[13] ST GEORGE J A. Gene therapy progress and prospects; adenoviral vectors[J]. *Gene Ther*,2003,10(14):1135-1141.

[14] ZENG M,SMITH S K,SIEGEL F, et al. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination[J]. *Biotechniques*,2001,31(2):260-262.

[15] REDDY P S,GANESH S,HAWKINS L, et al. Generation of recombinant adenovirus using the Escherichia coli BJ5183 recombination system[J]. *Methods Mol Med*,2007,130(1):61-68.

(收稿日期:2018-12-22 修回日期:2019-03-27)

(上接第 2917 页)

diating crosstalk between the vimentin and the actin networks[J]. *J Cell Sci*,2015,128(22):4138-4150.

[14] ROSE M L. Role of anti-vimentin antibodies in allograft rejection [J]. *Hum Immunol*,2013,74(11):1459-1462.

[15] CHANG L,LI C,LAN T, et al. Decreased expression of long non-coding RNA GAS5 indicates a poor prognosis and promotes cell proliferation and invasion in hepatocel-

lular carcinoma by regulating vimentin[J], *Mol Med Rep*,2016,13(2):1541-1550.

[16] HAVEL L S,KLINE E R,SALGUEIRO A M, et al. Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity[J], *Oncogene*,2015,34(15):1979-1990.

(收稿日期:2019-02-20 修回日期:2019-04-02)