

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.17.009

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190422.1606.018.html(2019-04-23)

hADRB3 重组腺病毒的构建及经心包注射后 hADRB3 在 CHF 大鼠体内的表达*

宋衍秋¹, 耿 华², 刘 珊¹, 薛向阳¹, 毛用敏¹, 徐美林², 秦 勤^{1,3}, 丛洪良^{1,3}

(1. 天津市心血管病研究所 300222; 2. 天津市胸科医院病理科 300222; 3. 天津市胸科医院心内科 300222)

[摘要] **目的** 构建携带人 β_3 -肾上腺素受体基因(hADRB3)的高滴度纯化重组腺病毒 Ad-hADRB3,并观察经心包注射后 hADRB3 在慢性心力衰竭(CHF)大鼠体内的表达。**方法** Hind III、Sal I 双酶切 hADRB3 cDNA 质粒获得 hADRB3 目的基因片段,应用 AdEasy-1 腺病毒载体系统构建 Ad-hADRB3,测定纯化后的病毒滴度。将 CHF 成模大鼠 10 只随机分为两组,观察组单次心包注射 2.50×10^{11} VP/mL NS Ad-hADRB3 100 μ L,对照组予以心包注射 0.90% NaCl 100 μ L,7 d 后免疫组织化学(IHC)检测 hADRB3 在 CHF 大鼠体内的表达情况。**结果** 成功构建重组腺病毒 Ad-hADRB3,纯化后滴度达到 5.20×10^{12} VP/mL。单次心包注射 Ad-hADRB3,CHF 大鼠心、肝、肺、肾、脾及小肠均检测到 hADRB3 的表达。**结论** 腺病毒介导的外源 hADRB3 基因经心包注射后,可在 CHF 大鼠多脏器中表达。

[关键词] β_3 -肾上腺素受体;腺病毒;慢性心力衰竭;病毒包装;心包注射

[中图分类号] R541.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)17-2918-05

Construction of recombinant adenovirus Ad-hADRB3 and its expression in rats with chronic heart failure by pericardial injection*

SONG Yanqiu¹, GENG Hua², LIU Shan¹, XUE Xiangyang¹, MAO Yongmin¹, XU Meilin², QIN Qin^{1,3}, CONG Hongliang^{1,3}

(1. Tianjin Cardiovascular Institute, Tianjin 300222, China; 2. Department of Pathology, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300222, China; 3. Department of Cardiology, Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300222, China)

[Abstract] **Objective** To construct high-titer purified recombinant adenovirus Ad-hADRB3 and observe its expression in chronic heart failure (CHF) rats by pericardial injection. **Methods** Hind III and Sal I digested hADRB3 cDNA plasmid to generate the target gene of hADRB3. Ad-hADRB3 was constructed by AdEasy-1 adenovirus vector system, and the purified virus titer was determined. 10 rats with CHF were randomly divided into two groups. The observation group received a single pericardial injection of 2.50×10^{11} VP/mL NS Ad-hADRB3 100 μ L, and the control group received a single pericardial injection of 0.90% NaCl 100 μ L. 7 d later, immunohistochemistry was used to detect the expression of hADRB3 in CHF rats. **Results** The recombinant adenovirus Ad-hADRB3 was successfully constructed, and the titer after purification reached 5.20×10^{12} VP/mL. After a single pericardial injection, the expression hADRB3 was detected in heart, liver, lung, kidney, spleen and small intestine of CHF rats. **Conclusion** Exogenous hADRB3 was effectively expressed in multiple organs in of rats with CHF by pericardial injection.

[Key words] adrenoceptor beta 3; adenovirus; chronic heart failure; virus packaging; pericardial injection

β_3 -肾上腺素受体(β -adrenergic receptors, β -ARs)是交感神经系统的重要成员,1983年 TAN 等^[1]首次发现除了传统的 β_1/β_2 -AR 之外,人类还存在另一种 β -AR,即 β_3 -AR, β_1 -AR、 β_2 -AR 与 β_3 -AR 都属于 G 蛋白偶联受体家族成员,三者氨基酸序列有 40%~50% 的同源性^[2]。人类心房和心室均已发现 β_3 -AR 的表达,不同于 β_1/β_2 -AR 在心脏产生的正性肌力作用, β_3 -AR 激动剂表现为负性肌力作用^[3],提示 β_3 -AR 可能

在心力衰竭的发生、发展过程中发挥一定的作用。有研究发现, β_3 -AR 激动剂较对照组可以明显提高胸主动脉缩窄心力衰竭小鼠左心室短轴缩短指数,降低左心室舒张末径,具有心脏保护作用^[4]。 β_3 -AR 有望成为治疗心力衰竭的新靶点。然而目前 β_3 -AR 与 β_1/β_2 -AR 氨基酸序列激动剂同源性较高,因此其激动剂特异选择性不高,往往兼具 β_1/β_2 -AR 激动作用,具有心动过速等不良反应。本研究旨在构建携带人 β_3 -

AR 基因(hADRB3)高滴度纯化重组腺病毒 Ad-hADRB3,并观察经心包注射后 hADRB3 在慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)大鼠体内的表达情况,为进一步研究 β_3 -AR 在心力衰竭中的作用及具体机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 Wistar 雄性大鼠 20 只,8 周龄,体质量 250~300 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。

1.1.2 质粒、菌种和细胞系 AdEasy-1 缺陷性腺病毒载体系统:穿梭质粒 pAdTrack-CMV、骨架质粒 pAdEasy-1 购自武汉森灵生物科技有限公司;hADRB3 cDNA 购自质粒 R&D Systems 公司;E. coli DH5 α 、E. coli BJ5183 购自天津心血管病研究所;AD293 细胞购自天津心血管病研究所。

1.1.3 主要试剂及仪器 限制性内切酶 Hind III、Sal I、BamH I、Pac I、Pme I 购自美国 Thermo 公司,Plasmid Midi Kit 购自德国 Qiagen 公司,LipofectamineTM LTX Reagent 购自美国 Invitrogen 公司,达尔伯克改良伊格格培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,0.25% Trypsin-乙二胺四乙酸(EDTA)、Penicilin-streptomycin 购自美国 Thermo 公司,ViraBindTM Adenovirus Miniprep Kit 购自美国 Cell Biolabs 公司,病毒裂解液[0.10%十二烷基硫酸钠(SDS)、10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、1 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)]、琼脂糖购自美国 Promega 公司,hADRB3 polyclonal antibody 购自美国 Abnova 公司。Multiporator 电穿孔仪、舒适型恒温混匀器台、Centrifuge 5415D 小型高速离心机、Centrifuge 5417R 台式高速冷冻离心机均购自德国 Eppendorf 公司,电泳仪购自北京六一生物科技有限公司,倒置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司,二氧化碳细胞培养箱购自美国 Thermo 公司,高速冷冻离心机购自美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 pAdTrack-hADRB3 重组质粒的构建与鉴定

Hind III、Sal I 双酶切 hADRB3 cDNA 质粒,1%琼脂糖凝胶平板电泳法检测双酶切产物,电洗脱回收 hADRB3 cDNA 片段。Hind III、Sal I 双酶切质粒 pAdTrack-CMV。电洗脱法回收 pAdTrack-CMV Hind III、Sal I 双酶切线性片段。T4 DNA Ligase 连接 hADRB3 cDNA 片段与 pAdTrack-CMV Hind III、Sal I 双酶切线性片段,连接产物转化 E. coli DH5 α 感受态细胞,经 Kan⁺ LB 培养基培养,碱裂解法小量提取重组质粒,Hind III、Sal I 双酶切鉴定重组质粒。碱性裂解法获取重组完全正确的 pAdTrack-hADRB3

重组质粒。

1.2.2 pAdEasy-hADRB3 重组质粒的构建与鉴定

pAdTrack-hADRB3 重组质粒经 Pme I 酶切,电洗脱回收线性片段,pAdTrack-hADRB3 Pme I 酶切线性片段电转法转入含 pAdEasy-1 的 E. coli BJ5183 电感受态细胞,转化产物经 Kan⁺ LB 固体培养基培养,碱性裂解法提取 pAdEasy-hADRB3 重组质粒,分别行 BamH I、Pac I 酶切鉴定,并对 pAdEasy-hADRB3 重组质粒行目的基因序列测定(Invitrogen)。应用 Plasmid Midi Kit 提取重组正确的 pAdEasy-hADRB3 重组质粒。

1.2.3 重组腺病毒 Ad-hADRB3 的包装与扩增

1.2.3.1 重组腺病毒 Ad-hADRB3 的包装 Pac I 酶切 pAdEasy-hADRB3 使其线性化。转染前 1 d,AD293 细胞种植于 60 mm 培养皿。转染时细胞密度 40%左右。5 μ g Pac I 线性化重组质粒 pAdEasy-hADRB3 片段转染 AD293 细胞,常规培养 7~10 d,每天观察细胞生长及细胞中绿色荧光蛋白(GFP)出现的情况。当 GFP 表达呈“彗星”状,并出现细胞病变效应(CPE)时,收集细胞于 15 mL 离心管中,经 -80 $^{\circ}$ C 冷冻,37 $^{\circ}$ C 融化-涡旋震荡,反复 4 次,使细胞裂解。离心 12 000 r/min \times 3 min,病毒上清液分装至 1.50 mL 离心管中,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3.2 重组腺病毒 Ad-hADRB3 的扩增 感染前 1 d,AD293 细胞植于 100 mm 培养皿,感染时细胞密度 80%左右。将 200 μ L Ad-hADRB3 病毒液加至 1.5 mL DMEM 完全培养液中,常规培养 90 min 后,加入 3.50 mL DMEM 完全培养液,常规培养。感染第 3 天,细胞出现明显 CPE 并伴有脱落,收集病毒。重复 100 mm 培养皿感染 3 次,第 4 次在 2 个 75 cm² 培养瓶中进行。

1.2.3.3 重组腺病毒 Ad-hADRB3 的纯化及滴度测定 应用 ViraBindTM Adenovirus Miniprep Kit 纯化重组腺病毒 Ad-hADRB3,严格按照试剂盒说明书操作。无菌超净台内用病毒裂解液稀释 Ad-hADRB3 病毒液,稀释度为 1:10、1:25、1:50,测定病毒稀释液的 OD₂₆₀,1:50 测定 2 次,1:25 和 1:10 测定 1 次,取 4 次测量结果的平均值作为最终结果。病毒滴度(V. P/mL)=OD₂₆₀ \times 病毒稀释度 \times 测定稀释度 \times 1.10 \times 10¹²。

1.2.4 重组腺病毒 Ad-hADRB3 的功能鉴定

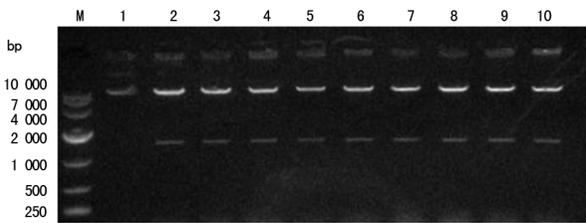
1.2.4.1 构建 CHF 大鼠模型及分组、给药方法 腹主动脉缩窄法构建 CHF 大鼠模型,用于后续实验。CHF 成模大鼠 10 只,将其分为观察组和对照组,每组 5 只,观察组心包注射 2.50 \times 10¹¹ VP/mL NS 重组腺病毒 Ad-hADRB3 100 μ L,对照组予以心包注射 0.90% NaCl 100 μ L;给予重组腺病毒 Ad-hADRB3

第 7 天后处死两组动物。

1.2.4.2 免疫组织化学(IHC)检测 hADRB3 在 CHF 大鼠多脏器中的表达 两组大鼠处死后,在心、肝、脾、肺、肾及小肠取材后,经固定、包埋、切片,IHC 染色,hADRB3 抗体稀释度为 1:50,二氨基联苯胺(DAB)法显色。

2 结果

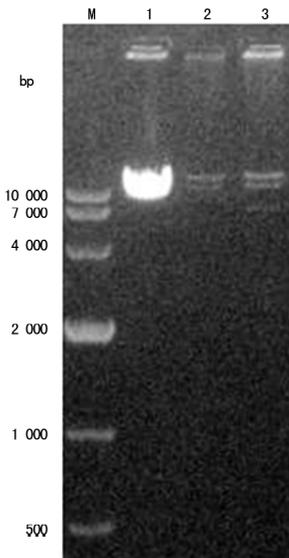
2.1 重组质粒 pAdTrack-hADRB3 的鉴定 经 Hind III、SalI 双酶切后 pAdTrack-hADRB3 可产生 1 285 bp 片段。2%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果,见图 1。



1~10:pAdTrack-hADRB3 双酶切;M:DL Marker
图 1 重组质粒 pAdTrack-hADRB3 Hind III、Sal I 双酶切鉴定电泳图

2.2 重组质粒 pAdEasy-hADRB3 的鉴定

2.2.1 BamH I 酶切鉴定 pAdEasy-hADRB3 重组质粒 由于 pAdEasy-1 质粒含有 2 个 BamH I 酶切位点,pAdTrack-CMV 和获得的 hADRB3 目的基因片段中各含有 1 个 BamH I 酶切位点,酶切后可产生 3 个片段(21.0、11.7、5.2 kb)。2%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果,见图 2。

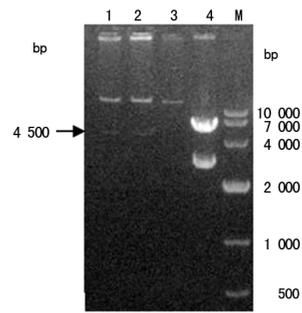


1:pAdTrack-CMV BamH I 酶切;2:pAdEasy-1 BamH I 酶切;3:pAdEasy-hADRB3 BamH I 酶切;M:DL Marker

图 2 重组质粒 pAdEasy-hADRB3 BamH I 酶切鉴定电泳图

2.2.2 Pac I 酶切鉴定 pAdEasy-hADRB3 重组质粒 穿梭质粒 pAdTrack-CMV 上有 2 个 Pac I 酶切位点,骨架质粒 pAdEasy-1 上有 1 个 Pac I 酶切位点,同源重组成功经 Pac I 酶切产生了 1 个较大片段和 1 个 4.5

kb 左右片段。2%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果,见图 3。



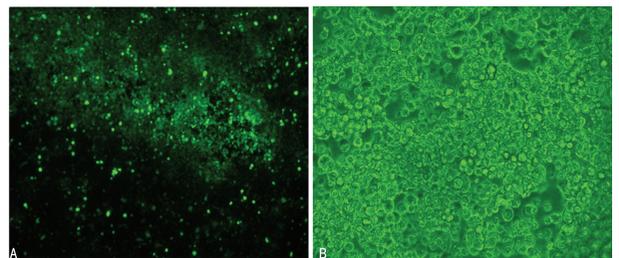
1、2:pAdEasy-hADRB3 Pac I 酶切;3:pAdEasy-1 Pac I 酶切;4:pAdTrack-CMV Pac I 酶切;M:DL Marker

图 3 重组质粒 pAdEasy-hADRB3 Pac I 酶切鉴定电泳图

2.2.3 测序鉴定 DNA 测序证实 pAdEasy-hADRB3 重组质粒中目的基因 hADRB3 未出现碱基的突变、错配等异常,与 Homo sapiens adrenoceptor beta 3 (ADRB3),mRNA(NM_000025.2)CDS 基因序列完全一致。

2.3 重组腺病毒 Ad-hADRB3 在 AD293 细胞中的包装与扩增

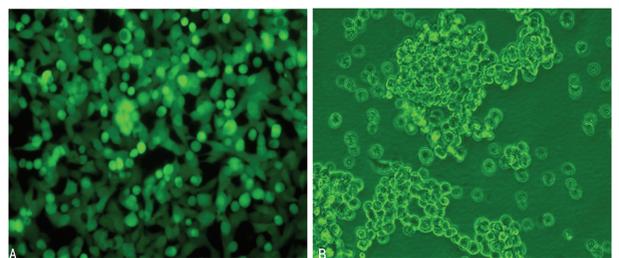
2.3.1 pAdEasy-hADRB3 Pac I 酶切线性片段转染 AD293 细胞 转染后第 2 天倒置荧光显微镜下即可见散在 GFP;转染后第 7 天,GFP 呈“彗星”状改变(图 4A);转染后第 9 天 AD293 细胞出现明显的 CPE,见图 4B。



A:转染后第 7 天(×40);B:转染后第 9 天(×200)

图 4 GFP 跟踪重组腺病毒 Ad-hADRB3 包装过程

2.3.2 重组腺病毒 Ad-hADRB3 感染 AD293 细胞 首次感染后第 2 天即可见 GFP 呈散在荧光分布;感染后第 3 天即出现明显 CPE,细胞呈“葡萄”串状改变。重复感染时,感染后第 2 天即可见 GFP 高强度表达(图 5A);感染后第 3 天 CPE 明显,大部分细胞脱落,见图 5B。



A:感染后第 2 天 GFP 表达;B:感染后第 3 天细胞形态

图 5 重组腺病毒 Ad-hADRB3 感染 AD293 细胞(×200)

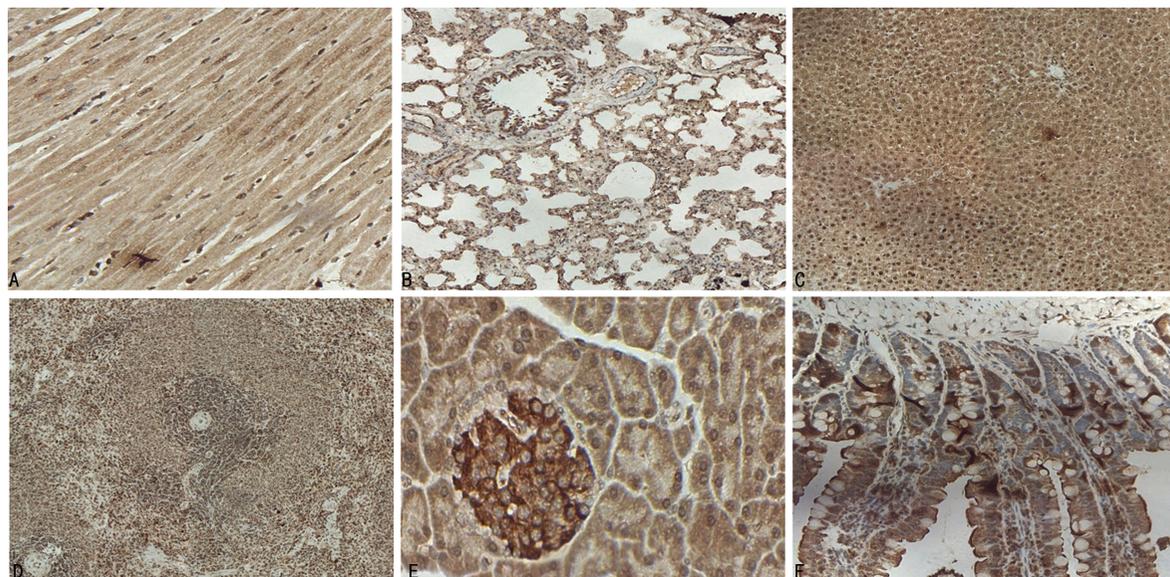


图 6 CHF 大鼠多脏器 hADRB3 表达 IHC 染色
A: 心肌细胞($\times 200$); B: 肺血管内皮细胞($\times 100$); C: 肝细胞($\times 100$); D: 脾细胞($\times 100$); E: 肾小球毛细血管内皮细胞($\times 200$); F: 肠黏膜上皮细胞($\times 200$)

图 6 CHF 大鼠多脏器 hADRB3 表达 IHC 染色

2.3.3 重组腺病毒 Ad-hADRB3 滴度测定 分光光度计测定 Ad-hADRB3 病毒滴度为 5.20×10^{12} VP/mL。

2.4 重组腺病毒 Ad-hADRB3 的功能鉴定 经心包注射方式给予重组腺病毒 Ad-hADRB3 感染 CHF 大鼠, CHF 大鼠心、肺、肝、脾、肾及小肠多器官组织切片 IHC 染色均检测出 hADRB3 的表达。在 CHF 大鼠的心肌细胞、肺细小支气管上皮及肺血管内皮细胞、肝细胞、脾细胞、肾小球毛细血管内皮细胞及肠黏膜上皮细胞细胞质内均可见 hADRB3 阳性颗粒, 见图 6。

3 讨 论

心力衰竭是各种心脏病的终末阶段, 是威胁全球性公众健康的主要原因, 不仅病死率高、预后差, 其医疗支出已经成为国家和国民巨大的经济负担。随着冠心病、高血压、糖尿病等疾病发病率的上升, 心力衰竭已经成为全球亟待解决的公共卫生问题^[5]。传统药物治疗, 虽能有效缓解心力衰竭的症状, 降低患者住院率, 但其 5 年病死率仍超过 50%^[6], 仍未达到理想的治疗效果。因此, 进一步探寻心力衰竭的发病机制及防治措施是当今心血管领域的热点。 β_3 -AR 是 β -ARs 的 1 个亚型, 属于 G 蛋白偶联受体家族。 β_3 -AR 在机体广泛分布, 如白色脂肪组织、棕色脂肪组织、骨骼肌、肠道平滑肌、呼吸系统等, 主要参与机体的代谢, 介导白色脂肪组织的脂肪分解和棕色脂肪组织的产热作用及胃肠道活动等^[7]。有研究在人类和动物模型中均证实衰竭心脏较非衰竭心脏 β_3 -AR 表达升高 2~3 倍, 负性肌力作用持续增强, 提示 β_3 -AR 可能在心力衰竭的发生、发展过程中发挥一定的作用^[8-9]。最新的一项关于 β_3 -AR 激动剂对 CHF 患者

作用的临床试验结果表明, 给药 6 个月, 米拉贝隆(β_3 -AR 激动剂)较安慰剂对心肌梗死后心力衰竭患者左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)无明显影响, 不良事件发生率也相似, 但探索性分析显示对于 LVEF<40% 的患者米拉贝隆可改善患者 LVEF^[10-11]。提示 β_3 -AR 激动剂可能成为治疗心力衰竭的一个新方向, 但同样不能忽视米拉贝隆兼具部分 β_1/β_2 -AR 激动作用。可见一种高效高选择性 β_3 -AR 激动剂对于探索 β_3 -AR 在心力衰竭中的作用及机制至关重要。

将外源性基因转移到细胞或组织稳定表达, 合适的载体是关键因素之一, 常用的载体有病毒载体和非病毒载体。病毒载体主要包括反转录病毒载体、腺病毒相关病毒载体、腺病毒载体等^[12]。腺病毒作为传输载体具有许多优点: (1) 宿主范围广, 对人致病性低。腺病毒可以感染一系列哺乳动物细胞, 因此在大多哺乳动物细胞和组织中均可用来表达重组蛋白。(2) 可以感染增殖和非增殖细胞, 对于心肌细胞、神经细胞等终末细胞而言, 腺病毒载体是最佳的外源性基因表达系统。(3) 外源性基因容量大, 可插入 8 kb 外源基因, 潜在容量可达 30 kb。(4) 不整合至宿主细胞基因组, 无插入致突变性。(5) 不需要辅助病毒, 能有效地进行增殖, 易于培养和纯化, 病毒滴度可高达 10^{12} pfu/mL, 适于进行基因治疗^[13]。由于 hADRB3 片段较大, 因此本实验选用腺病毒载体系统, 构建 Ad-hADRB3。

本研究应用 AdEasy-1 腺病毒系统采用两步转化法^[14]构建重组腺病毒。第一步先将 pAdEasy-1 骨架质粒转化进入大肠埃希菌 BJ5183, 制备含有 pAdEasy-1 骨架质粒的大肠埃希菌 BJ5183 感受态细菌; 第

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)