基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001042

siRNA抑制 Cyclophilin A 基因对喉鳞癌细胞 Hep-2 增殖和转移的影响

王致娟，张跃东，刘　舟，柏　露，周建荣
（重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究小干扰 RNA（small interfering RNA，siRNA）抑制亲环素 A（cyclopilin A，CypA）的表达对喉癌细胞株 Hep-2 增殖和侵袭迁移的影响及相关机制。**方法**：实验分为 3 组：化学合成的靶向 CypA 的 siRNA 转染喉癌细胞 Hep-2（CypA siRNA 组），转染阴性对照 NC siRNA 的细胞（NC siRNA 组）和对照组（control 组）。运用 real-time PCR（RT-PCR）检测 CypA 及 CD147 mRNA 的表达，Western blot 检测 CypA、CD147 的蛋白表达。MTT 法检测 CypA 对细胞生长曲线的影响；平板克隆形成实验检测 CypA在喉癌细胞增殖中的作用；Transwell 法检测 CypA 在喉癌细胞侵袭迁移中的作用。**结果**：CypA siRNA 转染后的喉癌细胞株 Hep-2 中 CypA、CD147 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低（P=0.000）。CypA siRNA 转染后的 Hep-2 细胞生长缓慢，克隆形成被抑制，control 组克隆数为（235.00±23.90）、NC siRNA 组为（240.67±10.07）、CypA siRNA 组为（129.33±14.22）（F=40.460，P=0.000）；转染后 Hep-2 细胞的迁移（F=497.124，P=0.000）、侵袭（F=129.787，P=0.000）能力明显降低。**结论**：CypA 表达下调后可抑制喉癌细胞株 Hep-2 的增殖和侵袭迁移能力，其机制可能与抑制 CD147 的表达有关。

【关键词】小干扰 RNA；亲环素 A；Hep-2 细胞株；增殖；侵袭
【中图分类号】R739.65　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-10-10

Effects of silencing Cyclophilin A by siRNA on proliferation and metastasis in Hep-2 cells

Wang Zhijuan, Zhang Yuedong, Liu Zhou, Bai Lu, Zhou Jianrong
(*Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of silencing cyclopilin A(CypA) expression on proliferation, migration and invasion of laryngeal carcinoma cell line Hep-2 and its mechanism. ***Methods***: siRNAs targeting CypA and negative control siRNA were transfected into Hep-2 cells. Real-time PCR(qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of CypA and CD147. Protein expression of CypA and CD147 was detected by Western blot. The impact of CypA on cell growth was detected by MTT assay. Colony formation assay was used to examine the role of CypA in cell proliferation. Transwell test was used to test the invasion and migration ability of Hep-2 cells. ***Results***: siRNA CypA markedly decreased both mRNA and protein expression of CypA and CD147(P=0.000). Knockdown of CypA significantly down-regulated the mRNA and protein expression of CD147(P=0.000). siRNA CypA reduced the proliferation and colony formation, and the number of colonies was significantly lower in CypA siRNA group(129.33 ± 14.22) than in control group(235.00 ± 23.90) and NC siRNA group(240.67 ± 10.07)(F=40.460, P=0.000); the migration(F=497.124, P=0.000) and invasion(F=129.787, P=0.000) ability of Hep-2 cells was distinctly decreased. ***Conclusion***: Down-regulation of CypA can inhibit the proliferation, migration and invasion ability of Hep-2 cells, which may due to the decrease of CD147.

【Key words】small interfering RNA; cyclopilin A; Hep-2 cell line; proliferation; invasion

作者介绍：王致娟，Email：465801437@qq.com，
研究方向：头颈肿瘤基础与临床。
通信作者：周建荣，Email：zhou1103@126.com。
基金项目：重庆市卫生局医学科研重点资助项目（编号：2012-1-024）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.1057.028.html
（2016-10-27）

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一，喉部鳞状细胞癌（laryngeal squamous cell carcinoma，LSCC）是其最主要的病理学类型，约占 99%[1-2]。LSCC 的发病率最近几年有所升高。目前针对 LSCC 的治疗策略包括手术治疗、放射治疗和化学疗法。LSCC 患者 5 年生存率得到一定程度的提高，然而复发在喉癌治疗过程中仍普遍存在[1-3]。局部复发、淋巴结转移和远处转移是影响患者预后的主要因素[4]。因此，探索对抗喉癌转移的新策略及药物靶点是十分必要的。

亲环素 A（cyclophilin A，Cyp A）是免疫抑制剂环孢素 A 的细胞内结合蛋白。CypA 具有肽脯氨酰顺反异构酶（peptidyl-prolyl cis-trans isomerase，PPIase）活性，辅助蛋白质的折叠和修复，在蛋白质的合成和功能发挥上起到重要作用[5-7]。CypA 还参与多种疾病的病理过程，包括病毒感染[8-9]、心血管疾病[10]及癌症等。近来研究发现，CypA 其在结肠癌、胰腺癌、肝癌等恶性肿瘤中高表达，参与肿瘤的发生发展[11-13]。

前期研究发现 CypA 在喉癌组织中的表达较正常癌旁组织明显升高，但在喉癌中的生物学作用及机制尚不清楚[14]。本实验研究利用 RNA 干扰技术沉默 Hep-2 细胞中 CypA 的表达，检测 CypA 其对Hep-2 细胞增殖、侵袭迁移等方面的影响及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人喉癌细胞株 Hep-2（中国科学院上海细胞库）；RPMI1640 培养基、胰酶、MTT（Sigma 公司），胎牛血清（Hyclone 公司）；Lipofectamine RNAiMAX 试剂、引物（Invitrogen 公司）；化学修饰的 CypA siRNA、阴性对照 siRNA（上海吉玛制药技术有限公司）；Total RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒（TaKaRa 公司）；CypA、CD147 抗体（Abcam 公司），β-actin 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG（欣博盛生物技术有限公司），RIPA 裂解液（碧云天公司）；Transwell 小室（Millipore 公司），Matrigel 基质胶（BD公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Hep-2 细胞在含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中，37 ℃，5% CO_2 饱和湿度条件下传代培养。

1.2.2 细胞转染 将喉癌细胞按 3×10^5 个/孔接种于 6 孔板内培养，待细胞融合度达到 60%~80%后，按照转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX 操作说明进行转染 siRNA。CypA siRNA 序列正义链为 5'-GUCCCAAAGACAGCAGAAATT-3'，反义链为 5'-UUUCUGCUGUCUUUGGGACTT-3'；NC siRNA 序列正义链为 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'，反义链为 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。4~6 h 后更换为含胎牛血清的 RPMI-1640 培养基继续培养 24~48 h 进行后续实验。实验分为 3 组：对照组（control 组）为未处理的 Hep-2 细胞；阴性对照组（NC siRNA 组）为 NC siRNA 转染的Hep-2 细胞；实验组（CypA siRNA 组）为 CypA siRNA 转染的Hep-2 细胞。

1.2.3 qRT-PCR 检测 Hep-2 细胞 CypA 及 CD147 mRNA 表达 使用 Trizol 法分别提取各组总 RNA，逆转录成 cDNA，采用 SYBR Green 法进行 qRT-PCR 检测 Hep-2 细胞 CypA 及 CD147 mRNA 的表达水平。分别设计 β-actin、CypA、CD147 引物。β-actin 上游：5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'，下游：5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'；CypA 上游：5'-GGTGTTTGGCAAAGTGAAAGAA-3'，下游：5'-TCCACAGTCAGCAATGGTGATC-3'；CD147 上游：5'-AGCAGAGGTGGGTGGGGG-3'，下游：5'-TGCTGGTGGTAGGTGGCGT-3'。反应体系为 5 μL 染料（SYBR® Premix Ex Taq Ⅱ），0.4 μL 上、下游引物，1 μL cDNA，3.2 μL DEPC。反应条件为：预变性 95 ℃ 30 s，之后 95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，共 40 个循环。目的基因 mRNA 的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta G}$ 计算公式。每个样本设置 3 个复孔，实验重复 3 次。

1.2.4 Western blot 检测 Hep-2 细胞 CypA 及 CD147 蛋白表达 用蛋白裂解液提取细胞总蛋白，BCA 法测定蛋白浓度。利用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白，将蛋白电转至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭后，加 β-actin（1∶2 000）、CypA（1∶500）、CD147（1∶1 000）抗体 4℃孵育过夜。1×TBST（1%Tween-20，TBS）漂洗 2 次，10 min/次，相应二抗（1∶2 000）37 ℃孵育 2 h。化学发光法显影，Image-Pro Plus 软件进行灰度值分析，目的蛋白的灰度值除以内参的灰度值以校正误差，所得结果代表目的蛋白相对含量。实验重复 3 次。

1.2.5 MTT 法检测细胞生长曲线 收集转染 24 h 的细胞，以每孔细胞数约为 2×10^3 个，体积 200 μL 接种于 96 孔板中，分别在培养 0、24、48、72、96、120 h 后每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），继续培养 4 h 后，吸去上清，每孔加入 150 μL DMSO，振荡 10 min，使产生的结晶完全溶解。于酶标仪 570 nm 波长处测定各孔的吸光度（absorbance，A）值。A 值为纵坐标，时间为横坐标，绘制细胞生长曲线。每样本设 6 个复孔，实验重复 3 次。

1.2.6 平板克隆形成实验检测细胞克隆数 收集转染 24 h 的细胞，以每孔 200 个/孔接种于 6 孔板中，设 3 个平行孔，37 ℃，5% CO_2 培养 14 d，4%多聚甲醛固定，结晶紫染色，显微镜拍摄，计数大于 50 个细胞的克隆数。实验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 实验检测细胞的迁移、侵袭能力 收集转染 24 h 的细胞，消化、离心，用无血清的 RPMI1640 培养基悬浮

并计数。迁移实验时，Transwell 小室中上室中加入 400 μL 含 5×10^4 个细胞的悬液，下室加入 600 μL 完全培养基。37 ℃，5% CO_2 培养 24 h。取出小室，4%多聚甲醛固定，结晶紫染色，显微镜拍摄，随机挑选 5 个视野计数，取平均值。实验重复 3 次。侵袭实验时，用冷冻的无血清 RPMI1640 培养基稀释 Matrigel 基质胶(1:9)后均匀铺于 Transwell 小室滤膜上表面，每孔 35 μL，37 ℃孵箱过夜。待其凝固后，用无血清 RPMI-1640 培养基水化 30 min。其余步骤同细胞迁移实验，37 ℃培养 50 h。取出小室，4%多聚甲醛固定，结晶紫染色，显微镜拍摄，随机挑选 5 个视野计数，取平均值。实验重复 3 次。

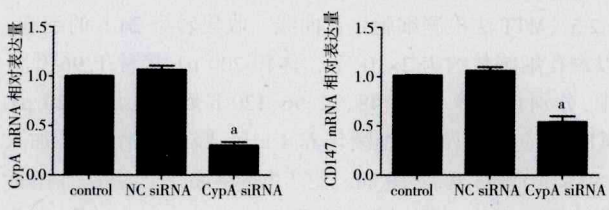
1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，qRT-PCR、Western blot、平板克隆及侵袭、迁移实验结果组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 Bonferroni 法；生长曲线结果采用重复测量方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 qRT-PCR 检测细胞 CypA、CD147 mRNA 的表达

qRT-PCR 结果显示，CypA mRNA 表达水平分别为：control 组(1.002 ± 0.001)，NC siRNA 组(1.065 ± 0.042)，CypA siRNA 组(0.299 ± 0.034)，3 组差异有统计学意义(F=570.628，P=0.000)。两两比较结果显示 CypA siRNA 组 CypA mRNA 表达水平相对于 control 组及 NC siRNA 组明显下降，差异具有统计学意义($P_{control}$=0.000，$P_{NC\ siRNA}$=0.000)；control 组和 NC siRNA 组差异无统计学意义(P=0.141)(图 1A)。CD147 mRNA 的表达情况为：control 组(1.012 ± 0.007)，NC siRNA 组(1.060 ± 0.039)及，CypA siRNA 组(0.542 ± 0.059)，3 组差异有统计学意义(F=147.355，P=0.000)。两两比较结果显示 CypA siRNA 组 CD147 mRNA 相对于 control 组及 NC siRNA 组明显降低，差异具有统计学意义($P_{control}$=0.000，$P_{NC\ siRNA}$=0.000)；control 组和 NC siRNA 组差异无统计学意义(P=0.589)(图 1B)。



A. CypA mRNA 相对表达量　　B. CD147 mRNA 相对表达量

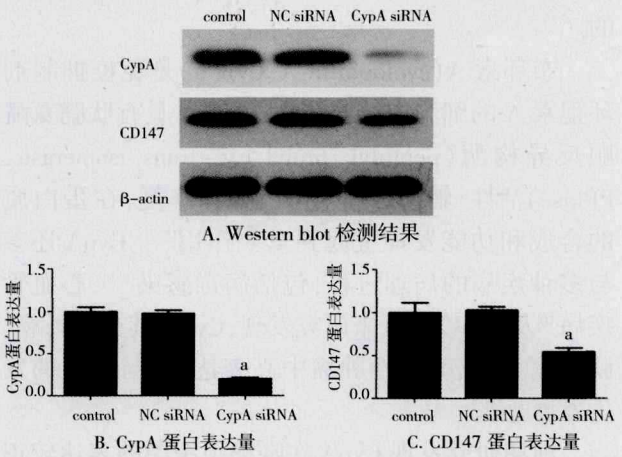
a：与 control 组及 NC siRNA 组相比，差异有统计学意义，$P<0.05$

图 1 CypA siRNA 对 Hep-2 细胞 CypA、CD147 mRNA 的影响

Fig.1 Effects of CypA siRNA on mRNA of CypA and CD147 in Hep-2 cells

2.2 Western blot 检测细胞 CypA、CD147 蛋白的表达

Western blot 检测结果显示，control 组、NC siRNA 组、CypA siRNA 组 CypA 蛋白表达水平分别为(0.997 ± 0.056)、(0.974 ± 0.041)、(0.200 ± 0.014)，3 组差异有统计学意义(F=371.983，P=0.000)。两两比较结果显示 CypA siRNA 组 CypA 蛋白表达水平较 control 组及 NC siRNA 组明显降低，差异具有统计学意义($P_{control}$=0.000，$P_{NC\ siRNA}$=0.000)；control 组和 NC siRNA 组差异无统计学意义(P=1.000)。CD147 蛋白表达水平分别为：control 组(1.000 ± 0.116)，NC siRNA 组(1.028 ± 0.041)，CypA siRNA 组(0.541 ± 0.050)，3 组差异有统计学意义(F=38.202，P=0.000)。两两比较结果显示 CypA siRNA 组 CD147 蛋白表达水平较 control 组及 NC siRNA 组明显降低，差异具有统计学意义(P_{contro}=0.001，$P_{NC\ siRNA}$=0.001)；control 组和 NC siRNA 组差异无统计学意义(P=1.000)(图 2)。



A. Western blot 检测结果

B. CypA 蛋白表达量　　C. CD147 蛋白表达量

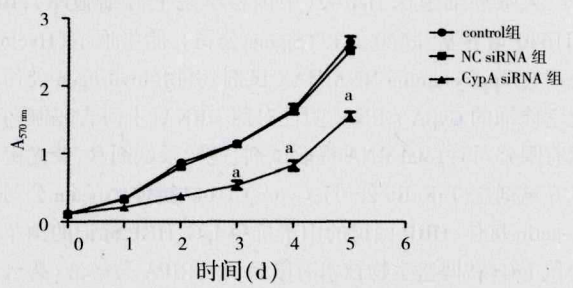
a：与 control 组及 NC siRNA 组相比，差异有统计学意义，$P<0.05$

图 2 抑制 CypA 表达后对 CypA、CD147 蛋白表达的影响

Fig.2 Effects of CypA specific siRNA on protein of CypA and CD147 in Hep-2 cells

2.3 MTT 法分析 CypA siRNA 转染对 Hep-2 细胞生长的影响

MTT 法分析了 control 组、NC siRNA 组、CypA siRNA 组 3 组细胞的增殖能力。结果如图 3 所示，CypA siRNA 组细胞的生长速度较 control 组(P=0.000)及 NC siRNA 组(P=0.000)明显减慢($F_{时间}$=1 163.392，P=0.000；$F_{组别}$=165.724，P=0.000；$F_{组别\times时间}$=34.035，P=0.000)；而 NC siRNA 和control 组细胞生长无明显差异(P=0.687)。



a：与 control 组及 NC siRNA 组相比，差异有统计学意义，$P<0.05$

图 3 CypA siRNA 抑制 Hep-2 细胞的增殖速率

Fig.3 CypA siRNA inhibits the growth of Hep-2 cells

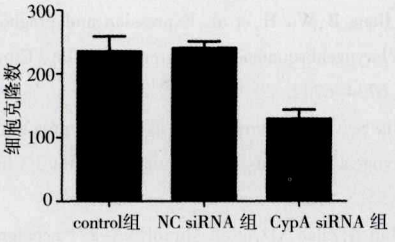
2.4 平板克隆结果分析 CypA siRNA 转染对 Hep-2 细胞克隆的影响

克隆形成结果显示，control 组、NC siRNA 组、CypA siRNA 组细胞克隆数分别为(235.00 ± 23.90)、(240.67 ± 10.07)、

(129.33 ± 14.22)，3 组差异有统计学意义(F=40.460，P=0.000)。两两比较结果显示 CypA siRNA 组细胞克隆数较 control 组及 NC siRNA 组明显减少，差异具有统计学意义($P_{control}$=0.001，$P_{NC\ siRNA}$=0.001)；control 组和 NC siRNA 组差异无统计学意义(P=1.000)(图 4)。



A. 平板克隆结果



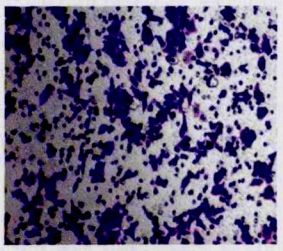
B. 细胞克隆数比较

图 4　CypA siRNA 抑制 Hep-2 细胞克隆形成

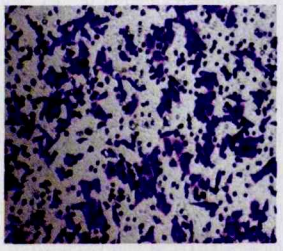
Fig.4　CypA siRNA inhibits the clone of Hep-2 cells

2.5　CypA siRNA 转染对 Hep-2 细胞迁移、侵袭能力的影响

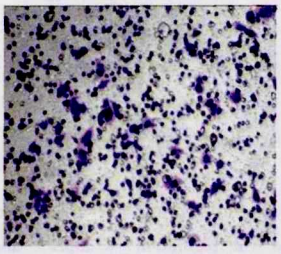
在 Transwell 迁移实验中，control 组、NC siRNA 组、CypA siRNA 组穿膜细胞数分别为(130.20 ± 3.70)、(135.40 ± 6.32)、(35.13 ± 2.50)，3 组差异有统计学意义(F=479.124，P=0.000)。两两比较结果显示 CypA siRNA 组的穿膜细胞数较 control 组及 NC siRNA 组明显减少，差异有统计学意义($P_{control}$=0.000，$P_{NC\ siRNA}$=0.000)，control 组和 NC siRNA 组差异无统计学意义(P=0.611)(图 5)。



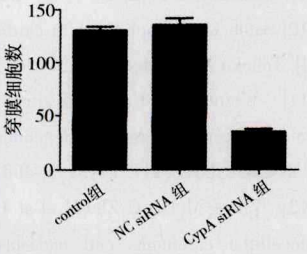
A. control 组



B. NC siRNA 组



C. CypA siRNA 组

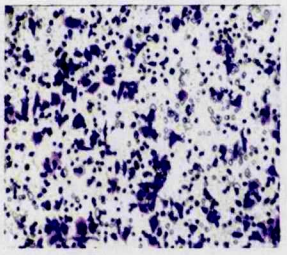


D. 3 组穿膜细胞数比较

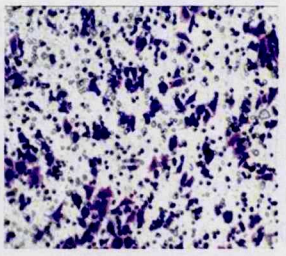
图 5　抑制 CypA 表达后抑制 Hep-2 细胞的迁移能力(200 ×)

Fig.5　CypA siRNA inhibits the ability of migration(200 ×)

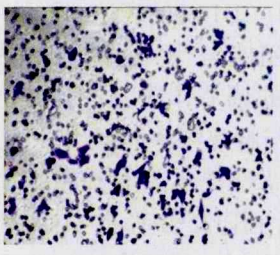
Transwell 侵袭实验中，各组穿膜细胞数分别为 control组(89.20 ± 7.47)，NC siRNA 组(86.40 ± 6.45)及 CypA siRNA 组(21.00 ± 2.42)，3 组差异有统计学意义(F=129.787，P=0.000)。两两比较结果显示 CypA siRNA 组的穿膜细胞数较 control 组及 NC siRNA 组明显减少($P_{control}$=0.000，$P_{NC\ siRNA}$=0.000)，control 组和 NC siRNA 组差异无统计学意义(P=1.000)(图 6)。



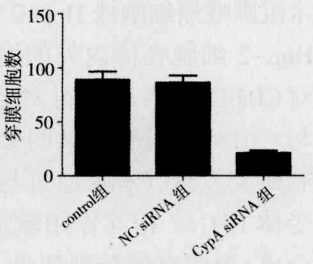
A. controll 组



B. NC siRNA 组



C. CypA siRNA 组



D. 3 组穿膜细胞数比较

图 6　抑制 CypA 表达后抑制 Hep-2 细胞的侵袭能力(200 ×)

Fig.6　CypA siRNA inhibits the ability of invasion (200 ×)

3　讨　论

CypA 是亲环素家族中的重要一员，也是最早被发现的。CypA 的 PPIase 活性，促进蛋白质的合成和功能的发挥，为细胞的增殖提供了物质保障[15]。CypA 作为分子伴侣，其过表达可参与损伤蛋白的修复，对细胞起到保护作用，这在肿瘤发展过程中起到重要作用[12-16]。CypA 在趋化性和分子信号级联反应方面的许多功能是通过其细胞表面受体 CD147 发挥作用的[17]。CD147 是一种跨膜糖蛋白，属于免疫球蛋白超家族，在许多恶性肿瘤中高表达并与肿瘤的发生发展有关。CD147 也叫作叫做细胞外基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases，MMPs)诱导因子，能诱导 MMPs 表达，促进肿瘤侵袭。CD147 其被发现在许多恶性肿瘤中高表达，且通过诱导成纤维细胞中 MMPs 的产生促进肿瘤侵袭[18-19]。

在前期研究中，通过比较蛋白质组学发现 CypA 在喉癌组织中的表达较正常癌旁组织明显升高，推断其可能与喉癌的发生或发展存在密切联系，但其

具体生物学作用及机制尚不清楚。本研究利用 RNA 干扰技术，将化学合成的靶向 CypA 的siRNA 转染喉癌细胞 Hep-2，并通过 qRT-PCR 和Western blot 检测 CypA 的表达，结果显示 CypA siRNA 在 mRNA 和蛋白水平均能明显抑制 CypA 的表达，为后续实验奠定了基础。

MTT 法检测细胞生长曲线、平板克隆实验结果表明下调 CypA 的表达可抑制喉癌 Hep-2 细胞生长，这提示 CypA 与喉癌细胞的增殖有关。本实验还通过 qRT- PCR 和 Western blot 检测下调 CypA 表达后 CD147 mRNA 和蛋白的表达情况，结果表明下调 CypA 的表达后，CD147 mRNA 和蛋白的表达也受到了明显的抑制。有实验证明，利用 RNAi 干扰技术沉默喉癌细胞株 Hep-2 中 CD147 的表达，降低了 Hep-2 细胞在体内外的增殖能力[20]。这说明CypA 对CD147 的表达起到一定的调节作用，同时 CypA 与 CD147 相互作用共同参与喉癌细胞的增殖过程。有研究发现，CypA 通过与恶性黑色素瘤细胞表面受体 CD147 相互作用激活 Erk1/2 途径和 DNA 的合成，形成有丝分裂效果，抑制包括平滑肌细胞和内皮细胞在内的多种细胞的凋亡，从而促进细胞增殖[18]。在胰腺癌中，CypA 通过 CD147 激活 Erk1/2 和 P38 信号途径促进肿瘤细胞增殖[17]。然而，CypA 与 CD147 相互作用调节喉癌细胞增殖的具体机制有待进一步研究。

大量研究证明，CypA 和 CD147 在肿瘤迁移、侵袭中发挥着重要作用。CypA 能够提高人肝癌多药耐药细胞株 SK-Hep1 细胞的粘附、运动、趋化能力，并促进癌症的肺转移[12]。HAb18G/CD147 与 annexin II 相互作用，促进 Rho/ROCK 信号通路及肝细胞癌细胞的阿米巴样运动[21]。然而 CypA- CD147 相互作用是否能促进喉癌细胞的侵袭迁移，还不得而知。为了获得答案，本实验研究将靶向 CypA 的 siRNA 转染喉癌细胞 Hep-2，利用 Transwell 法进行喉癌细胞的迁移及侵袭实验。研究发现随着 CypA 表达的降低，喉癌细胞的侵袭、迁移能力也随之减弱。这说明，CypA 与 CD147 相互作用共同调节喉癌细胞 Hep-2 的侵袭、迁移能力，而其调控侵袭的具体机制可能与 MMPs 的产生有关。CD147 能诱导 MMPs 的表达从而促进细胞外基质的降解，在肿瘤的发生和侵袭中发挥着重要作用[22]。在喉癌细胞 Hep-2中，干扰 CypA 后 CD147 的表达也受到了抑制，因此 MMPs 的表达及活性也随之降低，从而导致细胞侵袭能力减弱。

综上所述，本研究通过 RNAi 干扰技术抑制喉癌细胞 Hep-2 内源性 CypA 表达后，喉癌细胞的增殖和侵袭迁移能力均显著降低。其作用机制可能与下调 CypA 后抑制 CD147 的表达有关，而具体分子机制需要进一步深入研究。目前的研究结果为喉癌的进一步体内研究提供了实验基础，也预示着 CypA 是一个潜在的抗肿瘤治疗的药物靶点。

参 考 文 献

[1] Han L, Jiang B, Wu H, et al. Expression and prognostic value of MAGE-A9 in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(10): 6734-6742.

[2] Wu S, Jia S, Xu P. MicroRNA-9 as a novel prognostic biomarker in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 5523-5528.

[3] Sun X, Liu B, Zhao XD, et al. MicroRNA-221 accelerates the proliferation of laryngeal cancer cell line Hep-2 by suppressing Apaf-1[J]. Oncol Rep, 2015, 33(3): 1221-1226.

[4] Chen CC, Lin JC, Chen KW. Lymph node ratio as a prognostic factor in head and neck cancer patients[J]. Radiat Oncol, 2015, 10(1): 181-186.

[5] Lee J. Role of cyclophilin a during oncogenesis[J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(2): 181-187.

[6] Arora K, Gwinn WM, Bower MA, et al. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses[J]. J Immunol, 2005, 175(1): 517-522.

[7] Qian Z, Zhao X, Jiang M, et al. Downregulation of Cyclophilin A by siRNA diminishes non-small cell lung cancer cell growth and metastasis via the regulation of matrix metallopeptidase 9[J]. BMCmc Cancer, 2012, 12(1): 4421.

[8] Madan V, Paul D, Lohmann V, et al. Inhibition of HCV replication by cyclophilin antagonists is linked to replication fitness and occurs by inhibition of membranous web formation[J]. Gastroenterology, 2014, 146(5): 1361-1372.

[9] Kuang YQ, Liu HL, Zheng YT. The innate immune roles of host factors TRIM5α and Cyclophilin A on HIV-1 replication[J]. Med Microbiol Immunol, 2015, 204(5): 557-565.

[10] Satoh K. Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases [J]. Tohoku J Exp Med, 2015, 235(1): 1-15.

[11] Werneck MBF, Hottz E, Bozza PT, et al. Cyclosporin A inhibits colon cancer cell growth independently of the calcineurin pathway[J]. Cell Cycle, 2012, 11(21): 3997-4008.

[12] Zhang M, Dai C, Zhu H, et al. Cyclophilin A promotes human hepatocellular carcinoma cell metastasis via regulation of MMP3 and MMP9[J]. Mol Cell Biochem, 2011, 357(1-2): 387-395.

[13] Li M, Wang H, Li F, et al. Effect of cyclophilin A on gene expression in human pancreatic cancer cells[J]. Am J Surg, 2005, 190(5): 739-

基础研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001032

全生物可降解型封堵器封堵猪房间隔缺损的实验研究

牛云鹤[1]，罗　历[1]，李勇刚[2]，计晓娟[1]，白永虹[1]，王　洪[1]，蒲晓芳[1]，刘玲娟[3]，易岂建[1]

（1. 重庆医科大学附属儿童医院心血管内科；2. 重庆医科大学附属儿童医院心胸外科；3. 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室、儿童发育疾病研究教育部重点实验室，重庆　400014）

【摘　要】目的：评估全生物可降解型房间隔缺损（atrial septal defect，ASD）封堵器封堵猪 ASD 的疗效、组织覆盖情况、降解情况及生物相容性等。**方法**：15 只小型猪经外科开胸术后在心脏超声指引下行房间隔穿刺术，并置入全生物可降解 ASD 封堵器。术后行心脏超声检查观察封堵效果并测量封堵器大小，于 1 个月、3 个月、6 个月及 9 个月各处死 3 只，大体肉眼观察组织覆盖情况并测量覆盖面积与封堵器双盘面积；苏木素-伊红染色法（hematoxylin-eosin staining，HE）观察周围组织的炎症反应，酶联免疫吸附分析（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）测定猪血清白介素-6（interleukin-6，IL-6）水平。**结果**：除了 3 只建模失败，其余 12 只均建模成功并进行了 ASD 封堵；术中及术后未出现感染、封堵器脱落等并发症。超声结果显示封堵器位置良好，无残余分流。大体解剖标本可见置入 ASD 封堵器术后 1 月新生组织部分覆盖封堵器装置表面，术后 3 个月、6 个月及 9 个月均已完全覆盖。与降解前的封堵器扇面直径比较，术后 1 个月、3 个月及 6 个月均降低（$P<0.05$），且随时间延长降低明显，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与降解前的封堵器高度比较，除了术后 1 个月无明显差异（$P>0.05$），术后 3 个月、6 个月均降低（$P<0.05$）。与降解前封堵器双盘面积比较，术后 1 个月、3 个月、6 个月及 9 个月均降低（$P<0.05$），且随时间延长降低明显，差异有统计学意义（$P<0.05$）。术后 1 个月、3 个月封堵器周围组织炎症反应明显，在术后 6 个月、9 个月消失；术后 3 个月及 6 个月血清 IL-6 浓度较术前升高（$P<0.05$），术后 9 个月降至正常（$P>0.05$），差异有统计学意义。**结论**：全生物可降解型 ASD 封堵器在猪 ASD 模型封堵技术成功率高，组织覆盖迅速，生物相容性与降解效果良好，是一种比较理想的可降解封堵器。

【关键词】封堵器；生物可降解；房间隔缺损；聚乳酸；猪

【中图分类号】R725.4　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2016-01-28

作者介绍：牛云鹤，Email：niuyunhe1229@163.com，
研究方向：小儿心血管疾病诊治进展。

通信作者：易岂建，Email：qjyi2003@aliyun.com。

基金项目：重庆市卫生局重点资助项目（编号：2011-1-065）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.0931.008.html
（2016-10-27）

745.

[14] 冯明亮，周建荣，魏莲枝，等. MRP8 和亲环素 A 在喉鳞状细胞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志，2011，25(18)：834-839.

[15] Yang H，Chen J，Yang J，et al. Cyclophilin A is upregulated in small cell lung cancer and activates ERK1/2 signal[J]. Biochem Biophys Res Commun，2007，361(3)：763-767.

[16] Calhoun CC，Lu YC，Song J，et al. Knockdown endogenous CypA with siRNA in U2OS cells results in disruption of F-actin structure and alters tumor phenotype[J]. Mol Cell Biochem，2009，320(1-2)：35-43.

[17] Li M，Zhai Q，Bharadwaj U，et al. Cyclophilin A is overexpressed in human pancreatic cancer cells and stimulates cell proliferation through CD147[J]. Cancer，2006，106(10)：2284-2294.

[18] Chen X，Lin J，Kanekura T，et al. A small interfering CD147-targeting RNA inhibited the proliferation，invasiveness，and metastatic activity of malignant melanoma[J]. Cancer Res，2006，66(23)：11323-11330.

[19] Tang Y，Nakada MT，Rafferty P，et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by EMMPRIN via the PI3K-Akt signaling pathway[J]. Mol Cancer Res，2006，4(6)：371-377.

[20] Zhu C，Pan Y，He B，et al. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion，tumorigenicity and increases chemosensitivity to cisplatin in laryngeal carcinoma Hep-2 cells[J]. Oncol Rep，2011，25(2)：425-432.

[21] Zhao P，Zhang W，Wang SJ，et al. HAb18G/CD147 promotes cell motility by regulating annexin II-activated RhoA and Rac1 signaling pathways in hepatocellular carcinoma cells[J]. Hepatology，2011，54(6)：2012-2024.

[22] Siu A，Chang J，Lee C，et al. Expression of EMMPRIN modulates mediators of tumor invasion in oral squamous cell carcinoma[J]. J Calif Dent Assoc，2013，41(11)：831-838.

（责任编辑：冉明会）