

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.23.008

Smad7 对肝癌细胞增殖和迁移的影响及其临床意义 *

王玉林 董菁 王琳 高雪辰 沈怡敏[△]

(苏州大学附属第一医院临床检测中心 江苏 苏州 215006)

摘要 目的:探究 Smad7 对肝癌细胞增殖和迁移的影响及其临床意义。**方法:**通过转染 pcDNA3.1(+)-Smad7 质粒或 Smad7 的小干扰 RNA 使得 Smad7 在肝癌细胞系 HepG2 和 Huh7 中过表达或敲减,应用 MTT 法检测 Smad7 对肝癌细胞增殖的影响,采用细胞划痕实验以及 Transwell 实验探讨 Smad7 对肝癌细胞迁移的影响。采用 qRT-PCR 检测 9 例肝癌患者手术切除的组织样本中 Smad7 的表达。**结果:**过表达 Smad7 的肝癌细胞增殖能力与对照组相比有明显的下降,而敲减 smad7 能够促进肝癌细胞的增殖。过表达 smad7 的肝癌细胞穿过 Transwell 小室底膜的能力显著下降,而敲减 Smad7 能够促进这种能力。Smad7 在肝癌癌旁组织中的表达显著高于癌组织。**结论:**Smad7 能够在肝细胞肝癌的进展中发挥负向调控作用。

关键词:肝细胞肝癌;Smad7;增殖;迁移;负向调控作用

中图分类号:R735.7;Q74 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)23-4437-04

The Role of Smad7 in Hepatocellular Carcinoma Proliferation and Migration and Its Clinical Significance*

WANG Yu-lin, DONG Jing, WANG Lin, GAO Xue-chen, SHEN Yi-min[△]

(Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215006, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the role of Smad7 in the Hepatocellular carcinoma (HCC) migration and proliferation and its clinical significance. **Methods:** Through transfecting pcDNA3.1(+)-Smad7 or siRNA Smad7 to overexpress or knockdown the Smad7 expression in HCC cell lines HepG2 and Huh7. The MTT assays were used to test the role of Smad7 in proliferation of HCC cells. Transwell and wound-healing assays were used to detect the effect of Smad7 on migratory ability in both two cell lines. RT-PCR was used to test the Smad7 expression in 9 clinical HCC patients' specimens. **Results:** As the results, overexpression of Smad7 significantly inhibited the proliferation of cells compared with the control group, while knockdown Smad7 promoted the proliferation. At the same time, overexpression of Smad7 could inhibit the migratory ability of HCC cells compared with the control group, while knockdown smad7 could accelerate this ability. The expression of Smad7 in cancer tissue was significantly lower compared with normal mucosa tissue adjacent to cancer. **Conclusions:** Smad7 is a kind of anti-progressive molecule in HCC.

Key words: Hepatocellular carcinoma; Smad7; Proliferation; Migration; Negative regulation

Chinese Library Classification (CLC): R735.7; Q74 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)23-4437-04

前言

肝细胞肝癌(Hepatocellular, HCC)是世界范围内发病率与致死率均位居前列的恶性肿瘤^[1],发病过程经历炎症、纤维化、肝硬化等多个阶段,涉及复杂的生理病理过程。已有多种信号通路被证实与 HCC 的发生发展过程密切相关,然而有效的分子靶点以及分子治疗手段仍尚未完全阐明。转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF- β)通路被证实是 HCC 发生发展的关键节点^[2,3],这一信号通路在肝脏发生损伤时调控了肝脏细胞的增殖、分化、凋亡、炎症、血管新生、上皮间质化、细胞迁移以及侵袭等一系列生理病理过程^[4,5],在肝脏再生和代偿性增殖中扮演了重要角色,是肝脏疾病向恶性疾病转化的重要节

点^[6,7]。

Smad 蛋白家族是 TGF- β 受体激酶底物^[8],分为受体激活型 Smad1、2、3、5、8、9,通用型 Smad4 以及抑制型 Smad6、7,其形成复合物转导特异性信号,调节靶基因的转录^[9,10]。Smad7 作为 TGF- β 信号通路中较特殊的发挥负向调控功能的蛋白^[11],已被证实与多种鳞状上皮细胞肿瘤的进展相关^[12,13],但其在肝细胞肝癌中的作用机制尚不明确。本研究通过细胞实验和基因操纵的方式对其在肝细胞肝癌的进展中的功能和机制进行了深入研究。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

* 基金项目:江苏省卫生厅医学科研项目(Q201401);苏州市科技发展项目(SYSD2015078)

作者简介:王玉林(1973-),男,学士,主管技师,主要从事临床样本检测与疾病相关性研究,E-mail: wangyulin197310@163.com

[△] 通讯作者:沈怡敏(1971-),女,学士,副主任技师,主要从事临床样本检测与疾病相关性研究,

E-mail: shenyimin197101@163.com,电话:15546045382

(收稿日期:2016-12-08 接受日期:2016-12-30)

人肝癌细胞系 HepG2 和 Huh7 培养于含有 10 % 胎牛血清、pH 值为 7.2~7.4 的 DMEM 培养液 (100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素) 中, 于 37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂、饱和湿度的培养箱中常规培养。

1.2 实时定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)

采用 ABI 实时定量 PCR 试剂盒(美国)、特异的 smad7 及 β -actin 引物, 7500 实时定量 PCR 系统(ABI, Mannheim, 德国)进行实时定量 PCR。转染后细胞培养 24 h, 采用 Trizol 试剂盒(Invitrogen, 美国)提取 RNA, 采用 ABI 逆转录试剂盒(美国), 采用试剂盒中 Random 引物逆转录得到 cDNA, 后进入 PCR 实验。退火温度为 60 $^{\circ}$ C, β -actin 为内参。Smad7 定量引物上游: CGGAAGTCAAGAGGCTGTGT; 下游: TGGACAGTCAGTTG-GTTTGAGA。 β -actin 定量引物上游: TACCTCATGAAGATC-CTCACC; 下游: TTTCGTGGATGCCACAGGAC。

1.3 核苷酸合成及转染

人 smad7 siRNA 来自于 Gene Pharma 公司(中国, 上海), 人 Smad7 表达载体 pcDNA3.1(+)-Smad7 由公司构建。细胞均采用 Lipofectamine2000 转染试剂(life technologies, 中国)。HepG2 和 Huh7 细胞按照 2×10^5 的密度接种于 60 mm 培养皿, 融合度达到 60~70 % 时按照说明书剂量转染。

1.4 细胞迁移能力实验

HepG2 和 Huh7 细胞分别传代接种于培养皿中, 转染后 24 h 消化并计数, 取 1×10^5 细胞并用无血清培养基重悬接种于 transwell 小室上室, 控制液体量为 200 μ L, 下室加入有血清培养基 500 μ L, 培养 24 h 后, 将 transwell 小室取出, 擦去底膜上层细胞, 将底膜进行结晶紫(1 mg/mL)染色并对下层细胞进行计数统计。

1.5 细胞划痕实验

先用 Marker 笔在 3.5 厘米板背后均匀划横线以定位。将培养皿中接种细胞, 待细胞贴壁后, 进行转染。转染后 24 小时, 此时融合率接近 70%, 用已高压灭菌的枪头垂直横线做多条划痕, 倾斜培养皿, 用 PBS 小心清洗 3 次, 吸弃液体以除去细胞碎片, 加入新鲜培养基进行常规培养, 根据细胞生长速度, 按照 0 小时、24 小时、48 小时小时取相同位置拍照。

1.6 四唑盐(MTT)检测细胞增殖能力

HepG2 细胞及 Huh7 细胞传代过夜贴壁后转染 Control siRNA 和 Smad7 siRNA, 按 1×10^5 接种于 96 孔板中, 每组 6 个副孔, 置于 37 $^{\circ}$ C 细胞孵箱培养 48 小时。每孔加入 20 μ L MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 150 μ L DMSO, 震荡摇匀 10 min, 使用酶联免疫检测仪 OD490 nm 检测吸光度值, 结果以实验组 / 对照组数值呈现。

1.7 Western Blot

收集细胞采用含 PMSF 的细胞裂解液 RIPA 裂解收集蛋白, 采用 BCA 试剂盒定量, 标准化后进行 Western Blot 实验, 抗体 Smad7 (1:1000, R&D, USA), β -actin (1:4000, Cell Signal, USA)。

1.8 统计学分析

所有数据均为三次独立重复实验结果的平均值, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Graphpad Prism 5 软件进行统计分析, 组间比较采用 student-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 Smad7 显著抑制肝癌细胞的增殖

为探究过表达 Smad7 在肝癌细胞增殖中的作用, 我们选用 HepG2 和 Huh7 两种肝癌细胞进行细胞增殖能力实验。首先将细胞培养至对数生长期融合率约 70% 时, 转染 pcDNA3.1(+)-Smad7 及对照组质粒 Vector, 24 小时候后收集细胞提取 RNA 和蛋白, 并采用 qRT-PCR 及 western blot 的方法检测转染效率, 结果如图 1-A。实验结果表明过表达 Smad7 是成功的。

采用上述相同方法转染的细胞 24 小时后进行消化计数, 按每孔 1×10^5 接种于 96 孔板中, 每列接种 6 孔, 每种细胞两列, 采用完全培养基培养。48 小时后弃去培养液, 每孔加入 200 μ L 无血清培养基及 20 μ L MTT 溶液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。弃去培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO 溶液震荡溶解 10 min, 酶标仪 490 nm 检测吸光度值, 结果如图 1-B 所示。统计结果均来自三次独立重复试验。实验结果证明, 转染了 pcDNA3.1(+)-Smad7 的细胞, 其增殖速度明显低于对照组, 即过表达 Smad7 能够抑制肝癌细胞的增殖。

2.2 过表达 Smad7 抑制肝癌细胞的迁移

为检测 Smad7 对肝癌细胞迁移能力的影响, 我们采用转染过表达 Smad7 质粒的 HepG2 和 Huh7 细胞进行了细胞划痕实验。如图 2-A 和图 2-B 所示, 细胞进行划痕后 24 h 和 72 h 对划痕进行拍照并统计细胞迁移距离, 统计结果来自三次独立重复试验, 结果如图所示。实验结果显示过表达 Smad7 的细胞划痕愈合距离即细胞迁移距离明显小于对照组, 表明过表达 Smad7 能够抑制肝癌细胞的迁移。

2.3 敲减 Smad7 促进肝癌细胞的增殖和迁移

为了解敲减 Smad7 在肝癌细胞中的作用, 我们选用 HepG2 和 Huh7 两种肝癌细胞转染 Control siRNA 以及 Smad7 siRNA 后进行细胞增殖和细胞迁移实验。图 3-A 检测了敲减 Smad7 的转染效率, 实验结果证实敲减是成功的。MTT 结果如图 3-B 所示, 实验结果显示转染了 Smad7 siRNA 的细胞增殖能力明显高于对照组, 即敲减 Smad7 能够促进肝癌细胞的增殖。

为了进一步证实 Smad7 对于肝癌细胞迁移能力的影响, 我们选用 HepG2 细胞进行了另一种检测细胞迁移能力的实验, 即 Transwell 实验。将转染 Smad7 siRNA 及 Control siRNA 后 24 h 的 HepG2 细胞消化计数, 取 2×10^5 细胞重悬在 200 μ L 无血清培养基中, 接种于 Transwell 小室上室, 下室补充 500 μ L 完全培养基。常规培养 24 h 后, 将上室取出, 对穿过底膜的细胞进行结晶紫染色和计数, 结果如图 3-B 所示。实验结果证明, 敲减 Smad7 能够促进细胞的迁移。

以上三组实验结果均表明 Smad7 能够抑制肝癌细胞的增殖和迁移, 在一定程度上发挥了抑癌作用。

2.4 Smad7 在肝细胞肝癌患者中的临床意义

为了研究 Smad7 在临床肝癌患者组织中的表达情况及临床意义, 我们收集了 9 例肝癌患者手术切除的组织样本, 提取组织 RNA 并逆转录, 采用 qRT-PCR 的方法检测其中 Smad7 的表达量, 按癌旁正常组织 / 癌组织比值进行统计。实验结果显示: 在 9 个病例中, 癌组织 Smad7 的表达量低于癌旁正常组织的有 6 例, 如图所示。

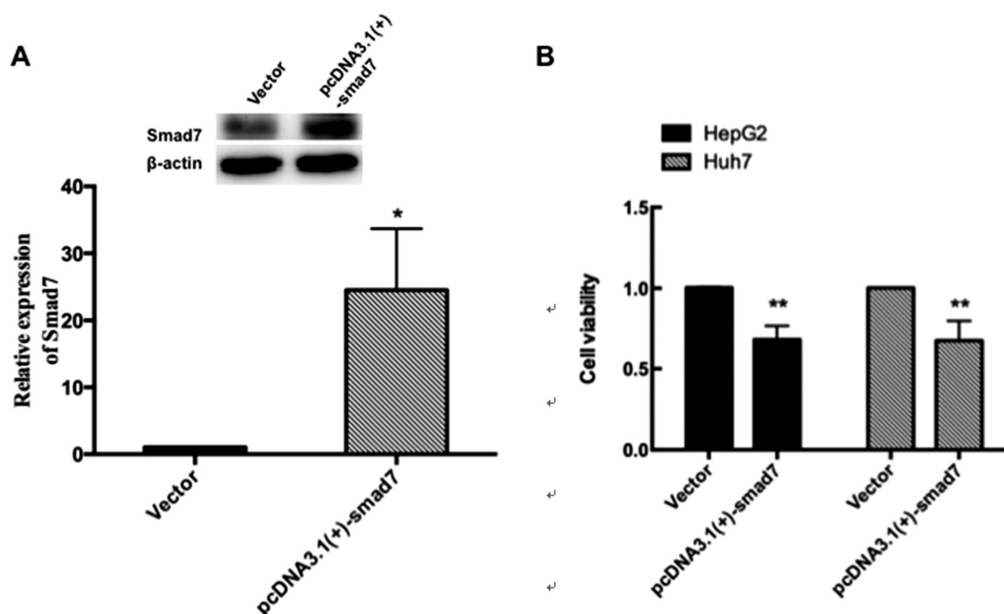


图1 过表达 Smad7 抑制肝癌细胞的增殖

A.过表达 Smad7 的转染效率;B. MTT 实验结果。

Fig.1 Overexpressed Smad7 inhibits the proliferation of HCC cells

A.The detection of the transfection efficiency; B. The result of MTT experiments.

Note: *P<0.05, ** P<0.01, compared with the vector group.

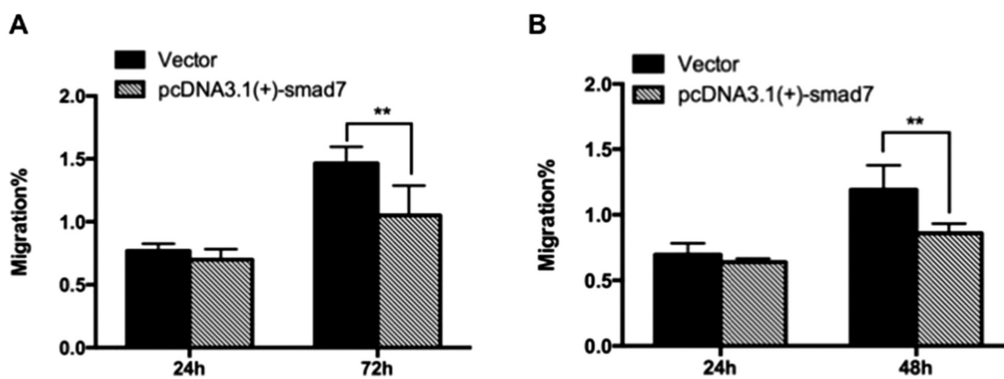


图2 过表达 Smad7 抑制肝癌细胞的迁移

A 和 B.分别在 HepG2 和 Huh7 细胞中进行细胞划痕实验,对细胞迁移距离进行统计分析。

Fig.2 Overexpression of Smad7 prohibited the migration of HCC

A and B. HepG2 and Huh7 cells were preceded by wound-healing assay respectively.

Note: *P<0.05, ** P<0.01, compared with the vector group.

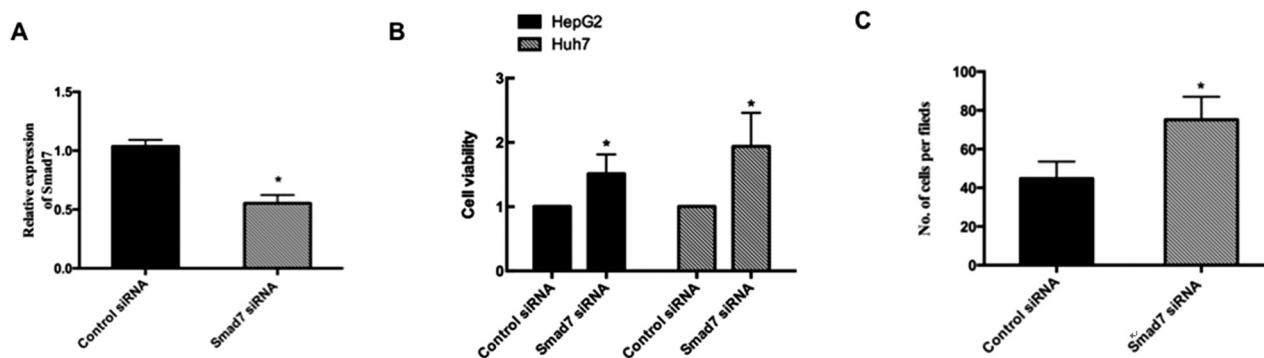


图3 敲减 Smad7 表达促进肝癌细胞的增殖和迁移

A.敲减 Smad7 效率验证;B 和 C. 敲减 Smad7 后进行 MTT 实验和 Transwell 实验。

Fig.3 Knock down Smad7 promoted the proliferation and migration of HCC cells

A. The efficiency of knocking down; B and C. The MTT and Transwell assay after knocking down Smad7.

Note: *P<0.05, ** P<0.01, compared with control group.

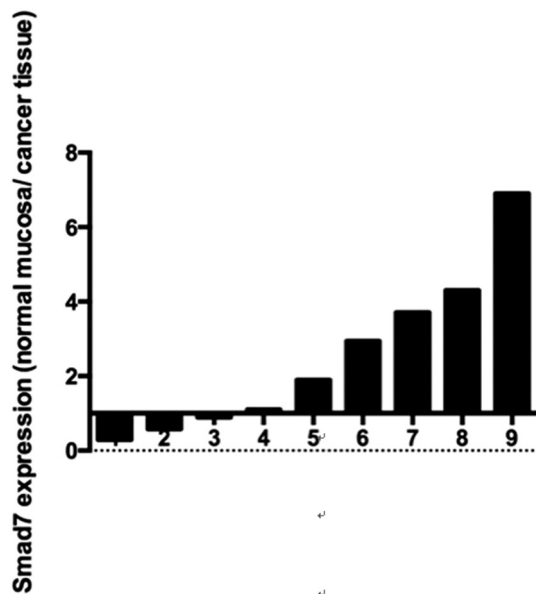


图4 Smad7 在临床患者样本中表达情况

Fig.4 The expression of Smad7 in clinical samples

由上述临床样本中 Smad7 检测结果可知,9 例中的 6 例肝癌患者,其肝癌组织中的 Smad7 的表达量显著高于正常肝脏组织。这一实验结果结合图 2 和图 3,从侧面证明 Smad7 发挥了抑制肝癌进展的作用,并可能在肝癌患者中发挥抑制肝癌转移的作用。

3 讨论

TGF- β 在肝细胞癌变初期可作为抑癌因子抑制细胞增殖,启动细胞分化或凋亡,而在肿瘤发展期则因某些原因丧失对 TGF- β 应答的敏感性,刺激血管生成、抑制免疫反应、促进上皮间质化,为肿瘤细胞的快速生长和转移提供良好的局部环境,反而成为促癌因子,扮演着肿瘤抑制基因和癌基因的双重角色^[14]。以往对 Smad 家族在肿瘤中调控作用的研究,主要集中在 Smad2/3 上,有研究证实它们在肿瘤进展中起到了促进作用^[15],而缺少 TGF- β 通路依赖 Smad 家族发挥双重调控作用的证据。在本研究中,我们对 Smad7 在肝癌中的功能进行了深入探讨,由结果图 1-B,图 3-B 可知,在过表达和敲减 Smad7 时,从正反两方面均可证实其在肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 中,发挥了抑制其细胞增殖的作用,与同家族成员在肿瘤中的调控功能相反,这可能是 TGF- β 信号通路作为抑癌因子发挥作用的机制之一,也进一步证明了 TGF- β 通路对肿瘤的调控是双向的^[16]。在现有的 TGF- β 对肿瘤双向调控的分子研究中,Smad7 多被认为与家族成员协同进行促癌调控作用^[17,18],然而在我们的研究中证实了 Smad7 作为 TGF- β 通路中具有重要的调控节点,在肝细胞肝癌进展过程在发挥了抑制肝细胞肝癌增殖和转移的作用,由图 2 以及图 3-C 可知,Smad7 不仅能够抑制肝癌细胞的增殖,还能抑制细胞的划痕愈合能力和穿过小室底膜的能力,这些证明了 smad7 能够在一定程度上抑制肿瘤的转移。导致这种结果的原因可能是因为 Smad7 具有时间节点依赖性的双重调节功能,而我们采用的细胞模型均为分化较差、增殖和转移能力较强的肝癌细胞的结果^[19,20]。图 4 结果显示,部分肝癌患者的正常组织中 Smad7 的表达量高于癌症组织,虽该实验

结果由于病例数较少以及个体差异等因素并无统计意义,但亦能在一定程度上说明 Smad7 在肝癌患者组织中确实存在差异表达,并具有一定的抑癌作用,也符合近年来在其他肿瘤疾病中对其的研究^[21]。在后续的研究中我们将进一步细化对 Smad7 双重调控机制的研究,采用不同分期的肝癌患者组织进行相关基因水平的检测和功能验证,并探究其下游关键靶分子,为不同期别肝癌的诊断与治疗提供新的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. International Journal of Cancer, 2015, 136 (5): E359-E386
- [2] Dooley S, Ten D P. TGF- β in progression of liver disease [J]. Cell and Tissue Research, 2012, 347(1): 245-256
- [3] Rojas A, Cromheecke J, Lee M H, et al. Abstract 2046: TGF- β drives tumor-progression via JAK/STAT3-signaling in advanced HCC [J]. Cancer Research, 2013, 73(8 Supplement): 2046-2048
- [4] CrosasMolist E, Bertran E, Fabregat I. Cross-talk between TGF- β and NADPH oxidases during liver fibrosis and hepatocarcinogenesis[J]. Current Pharmaceutical Design, 2015, 21(41): 5964-5976
- [5] Ma Y, Liu H, Zhang H, et al. The TGF- β signaling pathway induced EMT in breast cancer [J]. Acta pharmaceutica Sinica, 2015, 50(4): 385-392
- [6] Karkampouna S, Dijke P T, Dooley S, et al. TGF beta Signaling in Liver Regeneration[J]. Current Pharmaceutical Design, 2012, 18(27): 4103-4113
- [7] Laudisi F, Dinallo V, Di F D, et al. Smad7 and its potential as therapeutic target in inflammatory bowel diseases [J]. Current Drug Metabolism, 2015, 17: 999
- [8] ChiaLin Chen, Hidekazu Tsukamoto, JianChang Liu, et al. Reciprocal regulation by TLR4 and TGF- β in tumor-initiating stem-like cells[J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(7): 2832-2849
- [9] Gong W, Sun B, Zhao X, et al. Nodal signaling promotes vasculogenic mimicry formation in breast cancer via the Smad2/3 pathway [J]. Oncotarget, 2016
- [10] Chen Y K, Huang A H, Cheng P H, et al. Overexpression of Smad proteins, especially Smad7, in oral epithelial dysplasias [J]. Clinical Oral Investigations, 2013, 17(3): 921-932
- [11] Huang Q, Liu L, Liu C H, et al. Expression of Smad7 in cholangiocarcinoma: prognostic significance and implications for tumor metastasis [J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2012, 13 (10): 5161-5165
- [12] Zou C D, Ming-Juan W U, Qiang L I, et al. miR-125b Suppresses the Proliferation of Colon Cancer Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016
- [13] Reichl P, Haider C, Grubinger M, et al. TGF- β in epithelial to mesenchymal transition and metastasis of liver carcinoma [J]. Current Pharmaceutical Design, 2012, 18(27): 4135-4147
- [14] Rev C G F. TGF-beta signaling by Smad proteins [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2000, 11(2): 15-22
- [15] Chen Xi, Cao Xin-wei, Sun Xiao-hua, et al. Bcl-3 regulates TGF β signaling by stabilizing Smad3 during breast cancer pulmonary metastasis[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(12) (下转第 4461 页)

- [8] Eskandarpour M, Alexander R, Adamson P, et al. Pharmacological Inhibition of Bromodomain Proteins Suppresses Retinal Inflammatory Disease and Downregulates Retinal Th17 Cells [J]. *J Immunol*, 2017, 198(3): 1093-1103
- [9] Pueyo ME, Nicoletti A, Conzalez, et al. Angiotension II stimulate-endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappa B activation induced by intracellular oxidative stress [J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2000, 20(3): 645-651
- [10] Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, et al. SIRT2 regulates NF-kappa B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(24): 4251-4258
- [11] Huang B, Yang XD, Lamb A, et al. Posttranslational modifications of NF-kappa B: another layer of regulation for NF-kappa B signaling pathway[J]. *Cell Signal*, 2010, 22(9): 1282-1290
- [12] Gareus R, Kotsaki E, Xanthouleas S, et al. Endothelial cell-specific NF-kappa B inhibition protects mice from atherosclerosis [J]. *Cell Metab*, 2008, 8(5): 372-383
- [13] Pamukcu B, Lip GY, Devitt A, et al. The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease [J]. *Ann Med*, 2010, 42: 394-403
- [14] Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, et al. Canonical pathway of nuclear factor κ B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 5634-5639
- [15] McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, et al. A highly selective inhibitor of I kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48: 2652-2659
- [16] Wiggins JE, Patel SR, Shedden KA, et al. NF kappa B promotes inflammation, coagulation, and fibrosis in the aging glomerulus [J]. *J Am SocNephrol*, 2010, 21: 587-597
- [17] Jin B, Shen H, Lin S, et al. The mastermind-like 1 (MAML1) co-activator regulates constitutive NF-kappa B signaling and cell survival[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(19): 14356-14365
- [18] Chen LF, Mu Y, Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB[J]. *EMBO J*, 2002, 21(23): 6539-6548
- [19] Huang B, Yang XD, Zhou MM, et al. Brd4 coactivates transcriptional activation of NF-kappaB via specific binding to acetylated RelA [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(5): 1375-1387
- [20] Nicodeme E, Jeffrey KL, Schaefer U, et al. Suppression of inflammation by a synthetic histone mimic [J]. *Nature*, 2010, 468 (7327): 1119-1123
- [21] Gilham D, Wasiak S, Tsujikawa L, et al. MRVX-208, a BET-inhibitor for treating atherosclerotic cardiovascular disease, raises ApoA-I/HDL and represses pathways that contribute to cardiovascular disease[J]. *Atherosclerosis*, 2016, 247: 48-57
- [22] Zhang G, Liu R, Zhong Y, et al. Down-regulation of NF- κ B transcriptional activity in HIV-associated kidney disease by BRD4 inhibition[J]. *J BiolChem*, 2012, 287(34): 28840-28851
- [23] Zou Z, Huang B, Wu X, et al. Brd4 maintains constitutively active NF- κ B in cancer cells by binding to acetylatedRelA [J]. *Oncogene*, 2014, 33(18): 2395-2404
- [24] Xiao Y, Liang L, Huang M, et al. Bromodomain and extra-terminal domain bromodomain inhibition prevents synovial inflammation via blocking I κ B kinase-dependent NF- κ B activation in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes[J]. *Rheumatology*, 2016, 55(1): 173-184
- [25] Olejars W, Bryk D, Zapolska-Downar D, et al. Mycophenolic acid attenuates the tumour necrosis factor- α -mediated proinflammatory response in endothelial cells by blocking the MAPK/NF- κ B and ROS pathways[J]. *Eur J Clin Invest*, 2014, 44(1): 54-64
- [26] Jing Y, Zhang Z, Ma P, et al. Concomitant BET and MAPK blockade for effective treatment of ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(3): 2545-2554

(上接第 4440 页)

- [16] Hua Y P, Li S Q, Lai J M, et al. Changes in TGF-beta1/Smads signaling pathway in rats with chemical hepatocarcinogenesis [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2008, 28(10): 1848-1852
- [17] Duan Yingjun, Chen Qianxue. TGF- β 1 regulating miR-205/miR-195 expression affects the TGF- β signal pathway by respectively targeting SMAD2/SMAD7[J]. *Oncology Reports*, 2016, 36(4): 1837-1844
- [18] Luo L, Li N, Lv N, et al. SMAD7: a timer of tumor progression targeting TGF- β signaling[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(9): 8379-8385
- [19] Ji G Z, Wang X H, Miao L, et al. Role of transforming growth factor-beta1-smad signal transduction pathway in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12 (4): 644-648
- [20] Zhou J Y, Zheng S R, Liu J, et al. MiR-519d facilitates the progression and metastasis of cervical cancer through direct targeting Smad7 [J]. *Cancer Cell International*, 2016, 16(1): 1-12
- [21] Cao W, Hu C, Wu L, et al. Rosmarinic acid inhibits inflammation and angiogenesis of hepatocellular carcinoma by suppression of NF- κ B signaling in H22 tumor-bearing mice[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016