doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.008

线粒体分裂蛋白 FIS1 通过诱导上皮间质转化促进肝癌侵袭与迁移*

耿西林¹ 邢国强² 张 煜¹ 海 军¹ 张智勇¹ 杜立学¹⁄₄ (1陕西省人民医院肝胆外科 陕西西安710068;2 渭南市第一医院普通外科 陕西 渭南 714000)

摘要目的:研究线粒体分裂蛋白 1(Mitochondrial fission protein 1,FIS1)介导的线粒体分裂对肝癌细胞侵袭与迁移的调控作用与 机制。方法:采用免疫组化实验比较 10 对肝癌原发灶与转移灶组织中 FIS1 表达,以明确 FIS1 与肝癌转移的关系。通过 siRNA 干 扰 FIS1 的表达后,用 Transwell 实验检测肝癌细胞迁移与侵袭能力的变化,qPCR 与 Western Blot 检测上皮间质转化标志分子上 皮型钙黏蛋白 (epithelia cadherin,E-cadherin)、紧密连接蛋白 (zonula occludens-1,ZO-1)、神经型钙黏蛋白 (neural cadherin, N-cadherin)、波形蛋白 Vimentin 的表达。结果:肝癌转移灶组织中 FIS1 的表达显著高于原发灶组织。干扰 FIS1 表达后,肝癌细胞 迁移和侵袭能力均明显下降,细胞上皮间质转化标志蛋白 E-cadherin 和 ZO-1 的表达上调,而 N-cadherin 和 Vimentin 的表达下 调。结论:线粒体分裂蛋白 FIS1 在肝癌转移灶组织中高表达,并可能通过调节细胞上皮间质转化促进肝癌细胞转移。 关键词:线粒体分裂;FIS1;上皮间质转化;转移;肝癌

中图分类号:R-33; R735.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)32-6242-05

Mitochondrial Fission 1 Protein(FIS1) Promotes the Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma by inducing Epithelial-mesenchymal Transition*

GENG Xi-lin', XING Guo-qiang², ZHANG Yu¹, HAI Jun¹, ZHANG Zhi-yong¹, DU Li-xue^{$I\Delta$}

(1 Department of Hepatobiliary Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

2 Department of General Surgery, First Hospital of Weinan City, Weinan, Shaanxi, 714000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and underlying mechanisms of mitochondrial fission protein FIS1 on the migration and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods:** Immunohistochemistry analysis was used for evaluating the expression levels of FIS1 in 10 cases of primary tissues and paired metastatic lesions of HCC to analyze the correlation of expression of FIS1 with the metastasis of HCC. Transwell assays was used to detect the changes of migration and invasion capability of HCC cells after FIS1 was knocked down by RNA interference. In addition, expressions of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) markers of E-cadherin, ZO-1, N-cadherin and Vimentin were detected by qPCR and Western blot after FIS1 was knocked down by RNA interference. **Results:** FIS1 was highly expressed in the primary tissues of HCC compared to the paired metastatic lesions. Knockdown of FIS1 inhibited the migration and invasion of HCC cells. In addition, knockdown of FIS1 repressed the expressions of epithelial markers of E-cadherin and ZO-1, while activated the expressions of mesenchymal markers of N-cadherin and Vimentin in HCC cells. **Conclusions:** Mitochondrial fission protein FIS1 was highly expressed in the metastatic tissues of HCC and promoted the migration and invasion of HCC cells.

Key words: Mitochondrial fission; FIS1; Epithelial-mesenchymal transition; Metastasis; Hepatocellular carcinoma

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 Document code:A Article ID: 1673-6273(2017)32-6242-05

前言

线粒体是真核生物细胞内重要的细胞器,在细胞能量代谢 与凋亡调控中发挥重要作用。以往研究显示线粒体并非以单个 游离的形式存在于细胞中,而是处在不间断的融合与分裂动态 平衡中。线粒体融合与分裂通过调控线粒体的形态、大小和空 间分布,参与线粒体生理功能的的调控^[1]。目前,多种神经退行 性疾病与心血管疾病均被证实与线粒体融合与分裂异常显著 相关^[23]。线粒体融合与分裂异常在肿瘤进展中的作用直到近年 来才逐步被关注。研究表明结肠癌、肺癌、乳腺癌及脑胶质瘤等 多个恶性肿瘤中均存在线粒体融合分裂的异常,表现为线粒体 分裂的显著增强,导致线粒体变短,多个调控线粒体融合分裂 的关键蛋白表达发生异常,进而抑制细胞凋亡而促进细胞增殖 ^[4]。有关肝癌的研究也显示肝癌细胞线粒体分裂增强并最终促 进肿瘤生长^[5]。然而,线粒体分裂增强在肿瘤转移中的研究相对 较少,尤其在肝癌转移中的作用尚不清楚。

上皮间质转化 (Epithelial-mesenchymal transition, EMT)是 上皮来源肿瘤获得恶性迁移和侵袭能力的主要过程,在肿瘤转

*基金项目:陕西省自然科学基础研究计划项目(2016CG-08)

作者简介:耿西林(1981-),硕士,主治医师,主要从事肝胆疾病的研究,E-mail: gengxilin_xa@163.com

[△] 通讯作者:杜立学(1963-),博士,教授,主要从事肝胆疾病的研究, E-mail: lixuedu_xa@163.com

⁽收稿日期:2017-04-26 接受日期:2017-05-20)

移中发挥重要的促进作用¹⁰。但目前,线粒体分裂在肝癌上皮间 质转化与转移中的作用尚不清楚。本研究旨在探讨线粒体分裂 关键蛋白 FIS1 介导的线粒体分裂在肝癌转移中的作用与机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系、组织与试剂

1.1.1 细胞系 人肝癌细胞 Bel-7402 购自中科院上海细胞库。 1.1.2 **肝癌原发灶与转移灶组织** 共收集 10 例肝癌患者原发 灶与转移灶肿瘤组织,其中男性患者 7 例,女性 3 例。所有患者 病理诊断明确、临床资料完善,事先均签署了知情同意,手术取 得组织后立即置于液氮中保存。

1) 共设计三条靶向 FIS1 的 siRNA 干扰片段,其 1.1.3 试剂 中,1号干扰片段 (si-FIS1#1) 正义链序列为:5' -AAC-GAGCUGGUGUCUGUGGAG-3',2号干扰片段(si-FIS1#2)正 义链序列为:5' -CCGGCUCAAGGAAUACGAGAA-3',3号 干扰片段 (si-FIS1#3) 正义链序列为:5' -AGGCAU-GUGCUGCUCGAGdTdT-3', 对照干扰片段序列为:5'-UU-CUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。干扰片段委托上海吉玛生 物公司合成。2)E-cadherin, ZO-1, N-cadherin, Vimentin 及内参 基因磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase,GAPDH)引物委托华大基因合成,E-cadherin 引物序列为 (5'-3'): ATTTTTCCCTCGACACCCGAT, TCCCAGGCGTA-GACCAAGA。ZO-1 引物序列为(5'-3'):CACGCAGTTAC-GAGCAAG, TGAAGGTATCAGCGGAGG。N-cadherin 引物序 列为(5'-3'):AGCTCCATTCCGACTTAGACA,CAGCCTGAG-CACGAAGAGTG。Vimentin 引物序列为 (5' - 3'):GACGC-CATCAACACCGAGTT, CTTTGTCGTTGGTTAGCTGGT。

GAPDH 引物序列为:AATGGACAACTGGTCGTGGAC,CC-CTCCAGGGGATCTGTTTG。3)FIS1(货号10956-1-AP)与上皮 间质转化标志分子 E-cadherin (货号20874-1-AP)、ZO-1 (货号 21773-1-AP)、N-cadherin(货号13769-1-AP)及Vimentin(货号 10366-1-AP)抗体均购自武汉三鹰生物公司;线粒体荧光染料 Mito-Tracker Green(M7514)购自Invitrogen;染色 RNA 提取试 剂盒(货号 R6834)来自 OMEGA 生物公司;cDNA 反转录试剂 盒(货号 D2680A)来自 TaKaRa 生物公司;RIPA 裂解液(货号 P0013B)与 BAC 蛋白定量试剂盒(货号 P0009)均来自碧云天生 物公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 免疫组织化学染色 首先,将原发灶与转移灶肿瘤组织 用福尔马林固定 24 h。随后,将组织用石蜡包埋并切片(厚度为 4μm)。染色开始前,切片需依次经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、 柠檬酸高压修复、过氧化氢处理与 BSA 抗原封闭。之后,加入 FIS1 抗体(1/100 稀释)并在 4℃条件下孵育过夜,之后加入二抗 并于 28℃条件下反应 25 min,一二抗反应后均使用 PBS 在摇 床上洗 3次(每次 6 min)。最后,用新鲜配制的 DAB 进行显色 与苏木精复染。最后,将切片依次置于梯度酒精与二甲苯中脱 水透明后,进行封片,晾干后于显微镜下对结果进行判定。将 FIS1 染色强度划分为 4 个等级,分别为:阴性(-),弱阳性(+),中 等阳性(++),强阳性(+++)。

1.2.2 FIS1 表达的 siRNA 干扰 细胞转染 (脂质体 lip2000

法):首先,收集细胞并计数,以 2.5× 10⁵ 个细胞/孔的密度接种 Bel-7402 细胞至 6 孔板中,细胞常规培养过夜(37℃,5% CO₂)。 转染操作严格按 lip2000 说明书进行:首先,分别将 siRNA 干 扰片段与脂质体 lip2000 用不含血清的 DMEM 培养液稀释。室 温静置 5 min 后将二者混合,并于室温下放置 25 min。随后将 100 µL 的脂质体与干扰片段的混合液加入 6 孔板中,培养 6 h 后更换新鲜的达尔伯克(氏)改良伊格尔(氏)培养基(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)(含 10%胎牛血清)继续培养 24 h,之后可分别进行细胞总 RNA 与蛋白的提取,以及 Transwell 实验。

1.2.3 线粒体荧光染色 首先,将干扰 FIS1 处理的 Bel-7402 细胞接种激光共聚焦显微镜专用培养皿(Confocal Dish)并过夜 培养,弃去细胞培养液并用 PBS 洗两次,加入 37℃预热过的线 粒体荧光染色液(Mito-Tracker Green)后 37℃孵育 15 min,随后 弃去染色液并用 PBS 洗三次(每次 5 min)。最后,在激光共聚焦 显微镜下对结果进行拍照观察。

1.2.4 qPCR 事先在 Bel-7402 细胞中对 FIS1 表达进行干扰 处理后,提取细胞 Total RNA 并反转录为 cDNA, qPCR 反应条 件为,第一步:94℃ 3 min;第二步 (35 个循环):94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min;第三步:72℃ 5 min;第四步:4℃ forever。结果计算采用 2^{** a}法。

1.2.5 Western Blot 事先在 Bel-7402 细胞中对 FIS1 表达进 行干扰处理,随后用裂解液(含蛋白酶抑制剂)裂解细胞并提取 总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度后加入 loading buffer 并煮沸 5 min,将各组样品浓度按 BCA 定量结果调整一致后上样并开始 电泳,电泳结束后将凝胶中蛋白转移至 PVDF 膜,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗于 4℃下孵育过夜,二抗于 28℃下孵育 2 h, 一二抗孵育结束后均用含 0.1%吐温的 PBS 洗 3 次 (每次 5min),最后用 ECL 化学发光法对结果进行检测。

1.2.6 侵袭与迁移实验 事先在 Bel-7402 细胞中对 FIS1 表达 进行干扰处理,用 Transwell 实验分别对细胞侵袭与迁移进行 检测。侵袭实验所用小室需提前用基质胶包被。首先,向小室底 部加入 500 μL 含胎牛血清的 DMEM 培养液,随后放入小室 并加入 50 μL 浓度为 10 g/L 的 BSA(用无血清 DMEM 培养液 稀释),之后加入 200 μL 密度为 2.5× 10⁵ 个 /mL 的细胞。最 后,将小室置于细胞培养箱常规培养 24 h(迁移实验)或 48 h (侵袭实验)。用棉签小心擦去小室内测底部细胞,4%中性甲醛 固定 10 min 后用 Giemsa 染色 10 min。最后,在显微镜下对结 果进行观察。

1.3 统计学分析

实验数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件,多组间差异比较 采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以 P<0.05 定义 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FIS1 在转移灶肝癌组织中高表达

采用免疫组织化学对 10 对肝癌原发灶与转移灶中 FIS1 表达进行分析,结果显示:FIS1 在 6 例肝癌原发灶中呈阳性表 达,阳性率为 60%(6/10),而在所有 10 例肝癌转移灶中均呈阳 性表达,阳性率为 100%(10/10);FIS1 在 8 对肝癌转移灶中表达 均高于原发灶,其余2对肝癌肝癌原发灶与转移灶中FIS1表达无显著差异。图1A为FIS1在肝癌原发灶与转移灶中免疫组

化的典型染色结果,图 1B 为 10 对肝癌原发灶与转移灶中 FIS1 染色强度的统计分析。



A.FIS1 在肝癌组织中 IHC 典型染色结果 B.肝癌原发灶与转移灶组织中 FIS1 染色强度统计分析(N=10) Fig. 1 Expression of FIS1 in Primary and Metastatic tumor tissues of HCC. A. Representative IHC staining of FIS1 in tumor tissues of HCC. B. Comparison of FIS1 staining intensity between primary and metastatic tumor tissues of HCC(N=10)

2.2 干扰 FIS1 可显著抑制肝癌细胞线粒体分裂

为研究 FIS1 介导的线粒体分裂在肝癌转移中作用,我们 首先合成了三个特异性靶向 FIS1 的 siRNA 干扰片段并对其在 Bel-7402 细胞中的干扰效率进行 Western Blot 分析。结果如图 2 所示:干扰片段 #1 和 #3 干扰效果明显,我们在后续实验中 选用 #1 和 #3 进行 FIS1 表达干扰。

为进一步确认干扰 FIS1 是否可抑制 Bel-7402 细胞中线 粒体分裂,我们通过用线粒体荧光染料 Mito-Tracker 对线粒体 染色后对线粒体形态进行了观察,结果发现:干扰 FIS1 后线粒 体显著变长 (图 3),由此证实干扰 FIS1 可显著抑制肝癌 Bel-7402 细胞的线粒体分裂。



图 2 FIS1 干扰效率的 Western Blot 分析 Fig. 2 Western Blot analysis for FIS1 interference efficiency



图 3 干扰 FIS1 对线粒体分裂影响的 Mito-Tracker 染色分析 Fig. 3 Analysis for effects of FIS1 knockdown on mitochondrial fission by Mito-Tracker staining

2.3 FIS1 介导的线粒体分裂促进肝癌细胞迁移和侵袭

为研究 FIS1 介导的线粒体分裂在肝癌细胞转移中作用, 我们在 FIS1 表达被干扰后,用 Transwell 实验对 Bel7402 细胞

的迁移与侵袭能力进行了分析。结果如图 4 所示:干扰 FIS1 表达后,迁移(4A)与侵袭(4B)至小室膜底面的 Bel7402 细胞数均 明显减少。



图 4 干扰 FIS1 对肝癌细胞迁移(A)与侵袭(B)的影响 Fig. 4 The effects of FIS1 konckdown on cell migration (A) and invasion (B) of HCC cells

2.4 FIS1 介导的线粒体分裂可促进肝癌细胞上皮间质转化

上皮间质转化(EMT)是上皮来源肿瘤获得恶性迁移和侵袭能力的主要过程,为研究 FIS1 是否通过诱导 EMT 而促进肝癌细胞转移,我们用 qPCR 及 Western blot 实验,在干扰 FIS1 后对肝癌细胞中上皮间质转化标志分子的表达进行了检测,结

果如图 5 所示:干扰 FIS1 表达后,上皮细胞标志分子 E-cadherin 和 ZO-1 在 mRNA 和蛋白水平的表达均升高,而间质细 胞标志分子 N-cadherin 和 Vimentin 在 mRNA 和蛋白水平的表 达均降低,5A 与 5B 分别为 mRNA 与蛋白表达结果。



图 5 干扰 FIS1 对上皮间质转化标志分子表达的影响

A:qPCR 检测干扰 FIS1 对上皮间质标志分子 mRNA 表达水平的影响

B:Western blot 检测干扰 FIS1 对上皮间质标志分子蛋白表达水平的影响。

Fig. 5 The effects of FIS1 konckdown on the expression levels of Epithelial-mesenchymal transition(EMT)markers

A. The mRNA levels of EMT markers were analysised after knockdown of FIS1.

B. The protein levels of EMT markers were analysised after knockdown of FIS1.

3 讨论

线粒体在细胞能量代谢与凋亡过程中发挥关键调控作用。 线粒体并非以单个游离的形式存在于细胞中,而是通过不断的 融合与分裂调控自身形态、大小与空间分布,进而调控线粒体 生理功能的发挥^[1]。以往大量研究证实,线粒体融合分裂异常与 多种神经退行性疾病和心血管疾病的发生与进展显著相关^[23]。 近年来研究显示线粒体融合分裂异常在肿瘤进展中同样发挥 重要的促进作用,多种恶性肿瘤细胞中线粒体分裂与融合发生 异常,激活细胞增殖而抑制细胞凋亡,最终促进肿瘤生长^[4]。目 前,肝癌领域内多个研究证实,肝癌组织与细胞系中线粒体分 裂均显著增强,通过激活细胞增殖、抑制细胞凋亡而促进肿瘤 的生长。Huang 等研究证实,肝癌中增强的线粒体分裂可通过 激活细胞内 ROS 及下游 AKT 信号而促进肿瘤存活^[5]。Zhan 等 的研究得出与之相类似的结果,她们发现线粒体分裂调控关键 分子 DRP1 可通过调控 p53 与 NF-K B 的相互作用而促进肝癌 的增殖与生长^[7]。此外,Wang 等发现肝癌组织与细胞中线粒体 融合关键分子 MFN2 表达降低,MFN2 介导的线粒体融合可通 过使钙离子由内质网流向线粒体而诱导肝癌细胞凋亡^[8]。Zhou 等进一步发现 MicroRNA-761 高表达是导致肝癌组织与细胞 中 MFN2 表达下调的直接因素,利用小分子抑制剂抑制 MicroRNA-7611 可上调 MFN2 表达,进而抑制肝癌生长^[9]。乙型肝 炎病毒感染是我国肝癌的主要发病因素之一,Kim 等研究证实 乙肝病毒可通过诱导肝癌细胞线粒体分裂而抑制肝癌细胞的 凋亡^[10],Kim 等在随后的研究中又进一步发现丙型肝炎病毒同 样可通过激活肝细胞线粒体分裂而抵抗细胞凋亡,进而在肝炎 与肝癌等慢性肝脏疾病的发生与进展中发挥作用^[11]。

然而,以往线粒体分裂在肿瘤中的研究主要集中于其在肿 瘤细胞增殖、凋亡与生长中的作用,其在肿瘤转移中的研究相 对较少。Zhao J 等在乳腺癌中首次发现除参与乳腺癌生长调控 外,线粒体分裂还通过促进板状伪足的形成促进乳腺癌转移 ^[12]。Han XJ 等在乳腺癌中进一步证实,线粒体分裂在缺氧诱导 的乳腺癌转移与化疗抵抗中发挥重要作用^[13]。此外,Che TF 等 在非小细胞肺癌中也证实表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)信号可通过诱导线粒体分裂而促进肿瘤 细胞的侵袭与转移^[14]。M Cecilia Caino 等发现在以磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)为靶点的肿瘤治疗 中,细胞通过线粒体融合介导的线粒体变长而对治疗产生抵抗 并促进肿瘤转移^[15]。以上研究均提示线粒体分裂在肿瘤转移中 发挥重要调控作用。但在肝癌转移中,线粒体分裂异常的作用 却尚不清楚。本研究首次在肝癌中证实线粒体分裂关键分子 FIS1 所介导的线粒体分裂可促进肝癌细胞的侵袭与转移。

大部分人类癌症起源于器官的上皮层细胞,由于具有极性和粘附性强等特点,上皮层细胞往往不具备活动能力,而肿瘤细胞则通过增加运动相关蛋白表达并同时抑制细胞紧密连接相关蛋白的表达,使原本不具备活动能力的上皮细胞转化为运动能力较强的间质细胞,该过程被定义为上皮间质转化(epithe-lial-mesenchymal transition,EMT)。EMT发生过程中,除发生细胞骨架重排外,肿瘤细胞内多种 EMT 相关转录因子与细胞表面受体分子表达也随之发生改变,细胞骨架重排与上述 EMT 相关分子表达的变化共同促进了 EMT 表型的产生^[16-18]。EMT 是目前公认的肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的主要过程^[19]。本研究结果显示 FIS1 介导的线粒体分裂可诱导肝癌细胞发生上皮间质转化 (EMT),提示 FIS1 介导线粒体分裂可能通过诱导EMT 发生而促进肝癌的迁移与侵袭。

线粒体的分裂和融合过程是由多个位于线粒体内膜与外膜上蛋白质精确调控完成的。线粒体融合主要受位于线粒体外膜的线粒体融合蛋白 1/2(mitofusin1/2,MFN1/2)与位于线粒体内膜的视神经萎缩症蛋白(optic atrophy 1, OPA1)的调控。线粒体分裂则主要受位于胞浆中的动力样蛋白 DRP1 (dynamin-related protein 1) 与位于线粒体外膜的线粒体分裂蛋白 FIS1(Fission1)分子的调控。DRP1 与 FIS1 调控线粒体分裂的基本过程

为:首先,位于细胞质中的动力样蛋白 DRP1 被活化后,受线粒体外膜中定位的线粒体分裂分子 Fis1 的招募而转位至线粒体并定位于潜在分裂位点,随后二者协同形成环状结构而促进线粒体分裂^[20]。Zhao J等在乳腺癌中的研究证实 DRP1 介导的线粒体分裂通过诱导板状伪足形成而促进乳腺癌细胞转移^[12],与我们的研究结论相一致,共同提示线粒体分裂可促进肿瘤细胞转移。但与该研究相比,我们的研究存在如下的不同:首先,两项研究的肿瘤类型不同(乳腺癌与肝癌)。其次,两项研究中介导线粒体分裂的分子不同(DRP1 与 FIS1)。再次,介导线粒体分裂促进肿瘤转移的机制不同(板状伪足与 EMT)。因此,Zhao J等的研究与我们的研究又共同提示,不同线粒体分裂分子所介导的线粒体分裂在不同类型肿瘤中促转移的机制可能不同。那么,与 FIS1 相比,DRP1 介导的线粒体分裂在肝癌转移中的调控作用与机制有何不同? 这将是我们未来关注的问题之一。

复发与转移是肿瘤治疗的核心环节,也是肿瘤治疗失败的 首要原因^[21]。本研究首次证实了 FIS1 介导的线粒体分裂在肝 癌转移中的促进作用,并对其机制进行了初步探索,将为以转 移为靶点的肿瘤治疗提供新策略。

参考文献(References)

- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death
 [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2010, 11(12): 872-884
- [2] Gao J, Wang L, Liu J, et al. Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases[J]. Antioxidants, 2017, 6(2): 25
- [3] Marin-Garcia J, Akhmedov AT. Mitochondrial dynamics and cell death in heart failure[J]. Heart failure reviews 2016, 21(2): 123-136
- [4] Trotta AP, Chipuk JE. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology. Cellular and molecular life sciences [J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(11): 1999-2017
- [5] Huang Q, Zhan L, Cao H, et al. Increased mitochondrial fission promotes autophagy and hepatocellular carcinoma cell survival through the ROS-modulated coordinated regulation of the NFKB and TP53 pathways[J]. Autophagy 2016, 12(6): 999-1014
- [6] Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer[J]. Nature medicine 2013, 19(11): 1438-1449
- [7] Zhan L, Cao H, Wang G, et al. Drp1-mediated mitochondrial fission promotes cell proliferation through crosstalk of p53 and NF-kappaB pathways in hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget 2016, 7 (40): 65001-65011
- [8] Wang W, Xie Q, Zhou X, et al. Mitofusin-2 triggers mitochondria Ca²⁺ influx from the endoplasmic reticulum to induce apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer letters 2015, 358(1): 47-58
- [9] Zhou X, Zhang L, Zheng B, et al. MicroRNA-761 is upregulated in hepatocellular carcinoma and regulates tumorigenesis by targeting Mitofusin-2[J]. Cancer science, 2016, 107(4): 424-432
- [10] Kim SJ, Khan M, Quan J, et al. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis[J]. PLoS pathogens, 2013, 9(12): e1003722
- [11] Kim SJ, Syed GH, Khan M, et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(17): 6413-6418

(lactic-co-glycolic) acid composite bone cement: A viable tunable drug delivery system[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 59: 92-101

- [9] Guo Zhong-shang, Bi Long, YangMin, et al. Study on Cytotoxicity of Vancomycin/Calcium Phosphate Cement Composite Materials [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(20): 3813-3816
- [10] Leung AH, Hawthorn BR, Simpson AHRW. Suppl 1: M14: The effectiveness of local antibiotics in treating chronic osteomyelitisin a cohort of 50 patients with an average of 4years follow-up [J]. Open Orthop J, 2015, 9: 372-378
- [11] Kankilic B, Bilgic E, Korkusuz P, et al.Vancomycincontaining PLLA/beta-TCP controls experimental osteomyelitisin vivo [J]. J OrthopSurg Res, 2014, 9: 114
- [12] Yang Di-cheng, Zhong Jian, Tao Liu, et al. Preparation of brushite calcium phosphate cement for controlled drug delivery and its property of drug loading [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(3): 427-433
- [13] Edin M L, Miclau T, Lester G E, et al. Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro [J]. ClinOrthopRelat Res, 1996, (333): 245-251
- [14] Piazzolla A, De Giorgi G, Solarino G. Vertebral body recollapse without trauma after kyphoplasty with calcium phosphate cement[J]. MusculoskeletSurg, 2011, 95(2): 141-145
- [15] Masala S, Nano G, Marcia S, et al. Osteoporotic vertebral compression fractures augmentation by injectable partly resorbable ceramic bone substitute (Cerament?|SPINE SUPPORT): a prospective nonrandomized study[J].Neuroradiology, 2012, 54(6): 589-596
- [16] Kiaer S. Hip arthroplasty with acrylic prosthesis [J]. ActaOrthopScand, 1952, 22(2): 126-140
- [17] Haboush E J. A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast-setting dental acrylic, and other considerations[J]. Bull Hosp Joint Dis, 1953, 14(2): 242-277
- [18] Koh BT, Tan JH, Ramruttun AK, et al. Effect of storage temperature and equilibration time on polymethyl methacrylate (PMMA) bone

cement polymerization in joint replacement surgery[J]. J Orthop Surg Res, 2015, 17(10): 178

- [19] Chen C, Li D, Wang Z, et al. Safety and Efficacy Studies of Vertebroplasty, Kyphoplasty, and Mesh-Container-Plasty for the Treatment of Vertebral Compression Fractures: Preliminary Report [J]. Plosone, 2016, 11(3): e151492
- [20] SM Lim, AUJ Yap, CSL Loo, et al. Comparison of cytotoxicity test models for evaluating resin-based composites [J]. Human and Experimental Toxicology, 2016, 1-10
- [21] Cimatti B, Santos MA, Brassesco MS, et al. Safety, osseointegration, and bone ingrowth analysis of PMMA-based porous cement on animal metaphyseal bone defect model [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017[Epub ahead of print]
- [22] Kurt A, Erkose-Genc G, Uzun M, et al. The antifungal activity and cytotoxicity of silver containing denture base material[J]. Niger J Clin Pract, 2017, 20(3): 290-295
- [23] Hoess A, Ló pez A, Engqvist H, et al. Comparison of a quasi-dynamic and a static extraction method for the cytotoxic evaluation of acrylic bone cements [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016, 62: 274-282
- [24] R Dhivya, J Ranjani, PK Bowen, et al. Biocompatible curcumin loaded PMMA-PEG/ZnO nanocomposite induce apoptosis and cytotoxicity in human gastric cancer cells [J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 80: 59-68
- [25] Gupta P, SarkarS, DasB, et al. Biofilm, pathogenesis and prevention-a journey to break the wall: a review[J]. Arch Microbiol, 2016, 198(1): 1-15
- [26] Wentao Zhang, Guangyu Lei, Yang Liu, et al. Approach to osteomyelitis treatment with antibiotic loaded PMMA [J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 102: 42-44
- [27] Yilin Cao. Tissue engineering[M]. BeiJing: Science Press, 2008
- [28] Zou Ying, Wang Wen-mei, Zhu Yan-an, et al. In vitro evaluation the cytotoxicity of dental bonding agents through CCK-8 assay [J]. Journal of Oral Science Research, 2011, 27(8): 673-675

(上接第 6246 页)

- [12] Zhao J, Zhang J, Yu M, et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells [J]. Oncogene, 2013, 32 (40): 4814-4824
- [13] Han XJ, Yang ZJ, Jiang LP, et al. Mitochondrial dynamics regulates hypoxia-induced migration and antineoplastic activity of cisplatin in breast cancer cells [J]. International journal of oncology, 2015, 46(2): 691-700
- [14] Che TF, Lin CW, Wu YY, et al. Mitochondrial translocation of EGFR regulates mitochondria dynamics and promotes metastasis in NSCLC[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 37349-37366
- [15] Caino MC, Altieri DC. Cancer cells exploit adaptive mitochondrial dynamics to increase tumor cell invasion[J]. Cell cycle, 2015, 14(20): 3242-3247
- [16] Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer

dissemination[J]. Connective tissue research, 2015, 56(5): 403-413

- [17] Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. Molecular oncology, 2017, 11(1): 28-39
- [18] Matysiak M, Kapka-Skrzypczak L, Jodlowska-Jedrych B, et al. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer [J]. Archives of gynecology and obstetrics, 2017, 295 (4): 817-825
- [19] Pasquier J, Abu-Kaoud N, Al Thani H, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective [J]. Journal of oncology, 2015, 2015: 792182
- [20] van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion [J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013, 5(6)
- [21] Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms[J]. Cell, 2011, 147(2): 275-292