

# miRNA-30/SMAD2 信号通路抑制非小细胞肺癌 对厄洛替尼敏感性的机制

宁志强<sup>1</sup>, 徐宝余<sup>2</sup>, 陈超<sup>1</sup>, 倪芳英<sup>1</sup>, 束永前<sup>3</sup>, 陆海林<sup>1</sup>

1. 江苏省苏州市吴江区第一人民医院肿瘤内科, 江苏 苏州 215200;

2. 南京医科大学基础医学院人体解剖学实验室, 江苏 南京 210029;

3. 南京医科大学第一附属医院肿瘤科, 江苏 南京 210029

**摘要:** **目的** 研究微小 RNA-30 (miR-30) 在人非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的表达情况和对肺癌细胞增殖、迁移能力和厄洛替尼耐药性的影响。**方法** 30 例肺癌组织和癌旁组织标本由江苏省人民医院提供, 人 NSCLC 细胞株 PC9 和 PC9G 由南京医科大学病理与病生实验室提供。首先, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 量化 miR-30 在 30 对 NSCLC 组织和癌旁组织中的表达水平, 以及 miR-30 在肺癌细胞系 PC9 和 PC9G [酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 耐药株] 中的表达量, 并计算其表达差异; 在 PC9G 细胞中转染 miR-30 过表达试剂, PC9 细胞系转染 miR-30 抑制剂, 并各自设立阴性对照组; qRT-PCR 检测转染效率; 通过 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖活性, 克隆形成试验、Transwell 侵袭试验、流式细胞仪测定 miR-30 对细胞增长、侵袭和凋亡等的影响; 荧光素酶报告基因检测和 Western blot 鉴别磷酸化细胞信号转导分子 (SMAD2) 是否 miR-30 的靶基因。**结果** miR-30 在 NSCLC 组织中表达量明显低于癌旁组织 ( $P < 0.05$ ), 在耐药株 PC9G 中, miR-30 表达量明显低于 PC9 细胞 ( $P < 0.01$ ); 在 PC9G 细胞中过表达 miR-30 可以减少细胞增殖和迁移, 逆转细胞对厄洛替尼的耐药性。相反, 抑制 miR-30 在 PC9 细胞中的表达可显著增加 PC9 细胞的增殖和迁移能力, 并促使其产生对厄洛替尼的耐药性。**结论** miR-30 在人 NSCLC 组织中呈低表达, 过表达 miR-30 可以抑制 PC9G 细胞的增殖迁移能力并逆转其对厄洛替尼的耐药性。此外, SMAD2 可能为新的 miR-30 靶基因, 在肺癌的发生发展中起着重要作用。

**关键词:** 肺癌, 非小细胞; 厄洛替尼; 微小核糖核酸; 耐药; PC9, PC9G; 磷酸化细胞信号转导分子

**中图分类号:** R 734.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)06-0830-05

## Mechanism of miRNA-30/SMAD2 signal pathway inhibiting the sensitivity of non-small cell lung cancer to erlotinib

NING Zhi-qiang\*, XU Bao-yu, CHEN Chao, NI Fang-ying, SHU Yong-qian, LU Hai-lin

\* Department of Oncology, First People's Hospital of Wujiang District, Suzhou, Jiangsu 215200, China

Corresponding author: LU Hai-lin, E-mail: 18609656511@sohu.com

**Abstract: Objective** To investigate the expression of microRNA-30 (miR-30) in human non-small cell lung cancer (NSCLC) and its effect on proliferation, migration and erlotinib resistance of lung cancer cells. **Methods** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to quantify the expression level of miR-30 in 30 pairs of NSCLC tissues and adjacent tissues, and the expression level of miR-30 in lung cancer cell lines PC9 and PC9G (TKI resistant strains), and to calculate the difference of expression. The miR-30 overexpression reagents were transfected into PC9G cells, and inhibitors of miR-30 were transfected into PC9 cells. Negative control groups were set up respectively. The transfection efficiency was detected by qRT-PCR. CCK-8 kit was used to detect cell proliferation activity, clone formation test, Transwell invasion test and flow cytometry to determine the effects of miR-30 on cell growth, invasion and apoptosis. Luciferase reporter gene detection and Western blot confirmed that SMAD2 may be the target gene of miR-30. **Results** The expression of miR-30 in non-small cell lung cancer was significantly lower than that in adjacent tissues ( $P < 0.05$ ). In PC9-resistant strain PC9G, the expression of miR-30 was significantly lower than that in PC9 cells ( $P < 0.01$ ). Overexpression of miR-30 in PC9G cells could reduce cell proliferation and migration and reverse cell resistance to

erlotinib. Inhibiting the expression of miR-30 in PC9 cells can significantly increase the proliferation and migration ability of PC9 cells, and endow them with resistance to erlotinib. SMAD2 was the target gene of microRNA-30, which played an important role in the development of lung cancer. **Conclusion** Overexpression of miR-30 can inhibit the proliferation and migration of PC9G cells and reverse their resistance to erlotinib.

**Key words:** Lung cancer, non-small cell; Erlotinib; microRNA; Drug resistance; PC9, PC9G; SMAD2

**Fund program:** The Second batch of "Science and Education Promoting Health" Projects in Wujiang District (WWK201610); Hospital-level Issues of the First People's Hospital of Wujiang District (201607)

近年来,以厄洛替尼为代表的酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 靶向治疗药物的出现可谓是肺癌治疗史上的里程碑,但不可避免的是依然会出现原发性和获得性的耐药现象。原发性耐药指的是患者本身除了拥有表皮生长因子受体 (EGFR) 敏感突变以外还存在着其他的 EGFR 突变或者通路异常。而对于 EGFR-TKI 的获得性耐药,目前已知的耐药机制有 EGFR 二次耐药突变(如 T790M 的出现)、EGFR 下游信号分子活化、旁路激活和表型转化,还有某些细胞存活/凋亡相关基因的相互作用等。临床上用 TKI 治疗 EGFR 突变的肺癌患者可获得较好的疗效,而获得性 TKI 耐药者则无效。肿瘤细胞对化疗药物产生抵抗性是化疗失败的主要原因,有资料 90% 的恶性肿瘤患者死于肿瘤耐药。随着研究的不断深入,越来越多的证据显示显示微小核糖核酸 (miRNA, miR) 可能会影响肺癌的进展以及对化疗的耐药性<sup>[1-3]</sup>。

miRNA 是一种小分子非编码 RNA,长度约 22 个核苷酸,广泛存在于各种生物体中。它主要与靶信使 RNA (mRNA) 的 3' 端非编码区域结合,降解靶 mRNA 或抑制其翻译过程从而调控下游相关基因的表达。在肺癌组织中,一些 miRNA 水平升高,而一些下调。它们充当“致癌基因”或“肿瘤抑制基因”。本研究小组在 miRNA 方面做了大量工作,发现 miRNA 可以通过作用下游靶基因来影响癌细胞对化疗药物的敏感性。例如,miRNA181b 可以通过作用于 bcl-2 而调控胃癌及肺癌细胞对化疗药物的多药耐药现象<sup>[4]</sup>, miR-21 可通过作用于第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因 (PTEN) 来调节肺癌细胞对顺铂的敏感性<sup>[5]</sup>,外周血 miR-21 表达水平亦可以作为非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者个体化治疗的分子标志物<sup>[6]</sup>, miR-7 及 miR-31 对维持非小细胞肺癌细胞的干细胞样活性及化疗抵抗起到一定作用,以上结果说明 miRNA 在调节肿瘤细胞对药物敏感性方面起着重要的作用。

据报道,miR-30 在许多肿瘤如乳腺癌、胰腺癌、肺癌中异常表达,主要与肿瘤细胞的增殖和转移有关<sup>[7-8]</sup>,但 miR-30 在肺癌耐药方面的研究并不多。

Garofalo 等<sup>[9]</sup>研究发现,在 NSCLC 由 EGFR 和上皮间质转化因子 (MET) 受体介导的 TKI 抵抗的过程中, miR-30b、miR-30c、miR-221 和 miR-222 的表达增加,诱导 NSCLC 对 TKI 的耐药性增加。说明 miR-30 与 NSCLC 患者对 TKI 的敏感性可能存在某种内在联系。本研究通过比较人 NSCLC 细胞株 PC9 和 PC9G 中 miR-30 表达量的差异,以及对肺癌细胞转染 miR-30 过表达试剂和抑制剂,检测其对厄洛替尼的敏感性以及凋亡相关蛋白和靶基因的变化,从而探索 miR-30 与肺癌厄洛替尼化疗耐药性的相关性及其可能机制。

## 1 材料与方法

1.1 材料 30 例肺癌组织标本和癌旁组织标本由江苏省人民医院提供。RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (PBS, Gibco 公司,美国), RNA 抽提剂 (TRIzol, TaKaRa 公司,日本)。miR-30 模拟物、miR-30 抑制剂和阴性对照试剂 (美国伊维图根公司)。脂质体 3000 转染试剂 (美国)。荧光素酶报告系统 (PROMEGA, 美国), PCR Kit (Vazyme, 南京,中国)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC9、PC9G 细胞在含有 10% FBS 的 RPMI-1640 中培养。培养细胞在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 和相对饱和湿度下培养。

1.2.2 瞬时转染 首先,在转染前 24 h 将对数生长期的 PC9、PC9G 细胞按  $3 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 6 孔板上,当细胞融合达到 60% ~ 70% 后再进行细胞转染。按照 Lipo3000 转染试剂说明书的要求,将 miR-30 模拟物 (200 nM) 和阴性对照试剂 (200 nM) 转染入 PC9G 细胞 (PC-9G/miR-30 细胞、PC-9G/miR-NC 细胞), miR-30 抑制剂 (200 nM) 和阴性对照剂 (200 nM) 转染入 PC9 细胞 (PC-9/miR-30-inhibitor 细胞、PC-9/miR-NC-inhibitor 细胞),转染后的细胞放在 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续孵育,进行下一步相关实验。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 用 TRIzol 提取培养细胞的总 RNA 并纯化,逆转录为

cDNA 后再进行 qRT-PCR。PCR 试剂使用 AQQ SYBR Master Mix 试剂盒 (Vazyme, 南京, 中国), 采用 U6 作为内参, 重复 3 次独立样本的 PCR 检测, 通过比较 Ct 值的方法 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) 相对定量计算 miR-30 的水平。以第 50 百分位值为界值将结果分为高和低 miR-30 表达量。

1.2.4 CCK-8 测定 细胞活力使用 CCK8 试剂盒进行细胞计数, 用于评估细胞增殖活力以及存活率。在 96 孔板中每孔接种 2 000 个细胞, 转染后培养 48 h, 测定前每孔补充 CCK-8 试剂并进一步温育 1~2 h, 在 450 nm 波长处读取吸光度值。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 将转染的细胞 ( $5 \times 10^4$ ) 加到含有无血清 RPMI-1640 的上层孔中, 在下层孔加入含 10% FBS 的 RPMI-1640。16~20 h 后, 除去未侵入的细胞 (顶部孔); 侵入细胞 (底部孔) 固定后用 0.1% 结晶紫染色 (多聚甲醛)。在 3 个随机选择的高倍视野中捕获显微照片。空气干燥后, 将膜用 33% 乙酸 ( $300 \mu\text{l}/\text{孔}$ ) 在室温下处理 15 min, 并将所得溶液转移至 96 孔板中。记录波长 570 nm 的吸光度值。

1.2.6 克隆形成实验 将各组细胞按每孔 1 000 个细胞数接种至 6 孔板, 分布均匀, 培养 10 d, 当出现肉眼可见的明显菌落后停止培养, 用 0.1% 结晶紫染色 (多聚甲醛), 洗净晾干, 拍照记录。

1.2.7 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 采用 Western blot 法收集总蛋白量, 首先利用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解总蛋白 30 min, 冰上操作, 并用 BCA 法测定总蛋白质量。然后通过 10% SDS-PAGE 胶分离等量的蛋白质, 电泳后转膜, 磷酸化细胞信号转导分子 (SMAD2) 抗体和磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 在 4 °C 温育过夜。

1.2.8 荧光素酶报告基因测定 TargetScan 网站用来预测 miR-30 结合位点。通过 PCR 克隆 SMAD2 的 3' 端非编码区片段和预测的 miR-30 结合位点。SMAD2 (UGUUUAC) 的 3' 端非编码区中的互补片段突变为 UCAUAUC。用 SacI 和 Hind III 切割 PCR 产物, 克隆后插入 pMIR-REPORTER 中, 并通过 DNA 测序验证。然后将构建好的质粒与 miR-30 或 miR-NC 共转染到 24 孔板中的 PC9G 细胞中 24 h, 然后用双荧光素酶报告基因测定系统进行荧光素酶测定。

1.2.9 细胞凋亡测定 用 Annexin V 和碘化丙啶进行染色, 流式细胞仪计数并评估细胞凋亡率。数据处理采用 FlowJo 软件。

1.3 统计学方法 每组数据来自 3 个独立重复实验, 并用 GAPPAD PRISM5 处理。Spearman 秩和检验

评估 miR-30 水平与 SMAD2 水平在人肺癌中的相关性。组间比较采用 *t* 检验。采用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验评估 miR-30 水平与无病生存期 (DFS) 的相关性。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

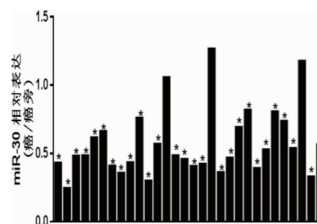
## 2 结果

2.1 miR-30 在肺癌组织中表达明显下调 qRT-PCR 结果显示, 与癌旁正常组织标本相比, miR-30 在肺癌组织中表达明显下调 (图 1)。

2.2 miR-30 在 PC9G 细胞中的过表达抑制肿瘤侵袭性、逆转厄洛替尼的耐药性 为了模拟肺癌患者长期暴露于厄洛替尼的环境, 笔者建立了一个体外模型: 将 PC9 和 PC9G 细胞暴露于较低浓度的厄洛替尼, 持续 24 周。结果显示, 耐药 PC9G 细胞中 miR-30 的表达量明显比 PC9 细胞系低 (图 2a)。因此, 笔者在 PC9G 细胞中过表达 miR-30 作为实验组, 转染 miR-NC 作为阴性对照组, 发现过表达 miR-30 的 PC9G 细胞增殖减少 (图 2b、2c)。miR-30 过表达显著降低了 PC9G 细胞的迁移能力, 并促进了细胞凋亡, 细胞存活率下降 (图 2d~f)。

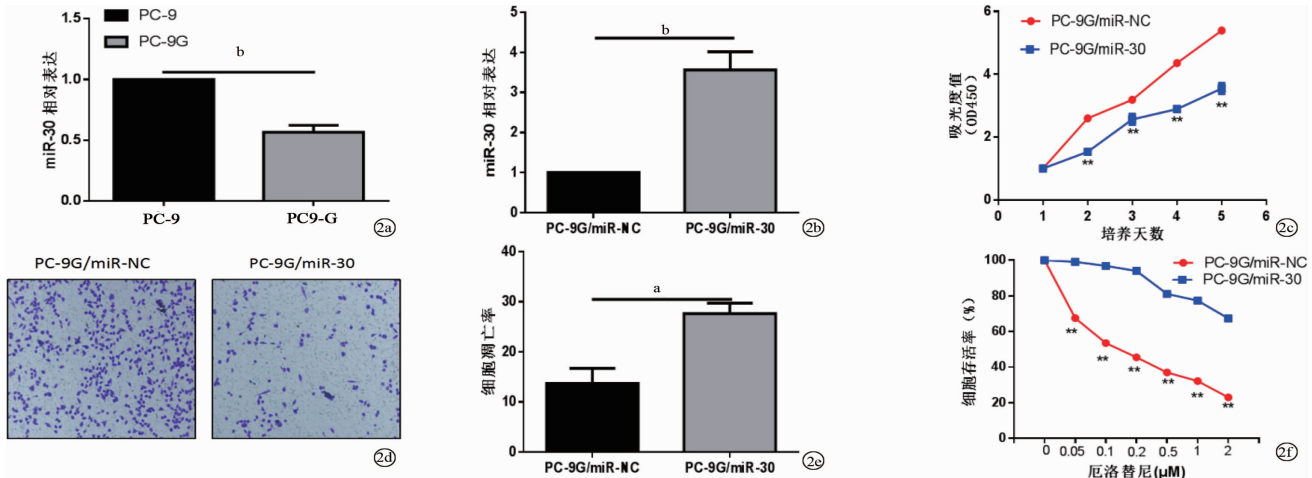
2.3 PC9 细胞中低表达 miR-30 显著促进细胞生长和迁移, 并增强对厄洛替尼的耐药性 如上所述, PC9 细胞中 miR30 表达量较高, 用 miR-30 抑制剂转染 PC9 细胞评估细胞的生长情况。在 PC9 细胞系中沉默 miR-30 后, miR-30 水平降低, 导致 PC9 细胞增殖增加 (图 3a、3b)。促进肺癌细胞的迁移能力 (图 3c), 细胞凋亡减少, 细胞存活率上升 (图 3d、3e)。

2.4 SMAD2 是 miR-30 的直接靶标 为了探讨 miR-30 在肺癌发生发展中的作用机制, 笔者仔细搜索了数据库 TargetScan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)), 发现 SMAD2 基因 3' 端非编码区含有 miR-30 的结合位点, 可能为 miR-30 的靶基因。SMAD2 在正常组织生长和分化中具有关键性作用。基于在 SMAD2 基因 3' 端的 miR-30 可能的结合位点, 我们最初构建了两种含有荧光素酶报告基因的 SMAD2 质粒, 即野生型和突变型 SMAD2 质粒, 并与 miR-30 模拟物和抑制剂共转染



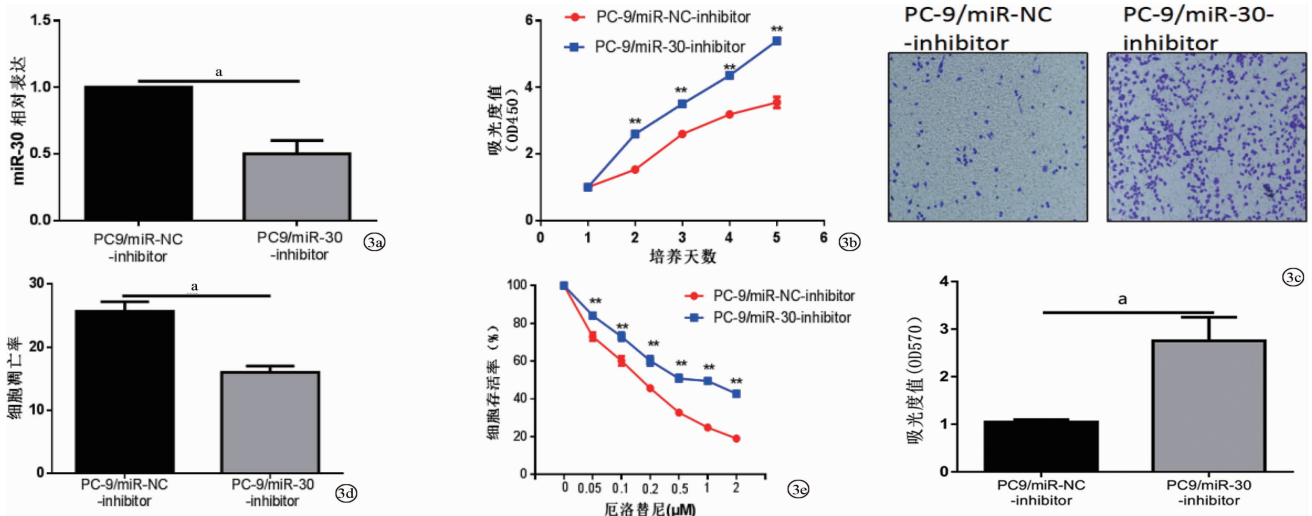
注: \* 代表相对表达量  $< 1.0$ 。

图 1 miR-30 在肺癌组织中明显下调



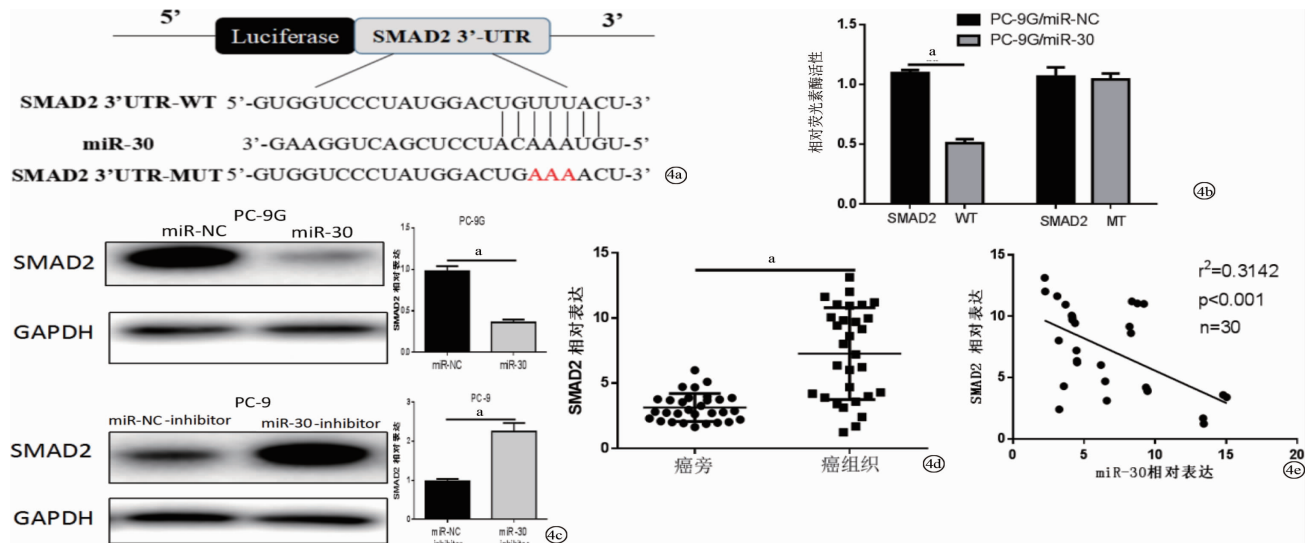
注:2a:miR-30 在 PC9、PC9G 细胞中的表达量;2b:qT-PCR 量化转染 miR-30 模拟物后 PC9G 细胞中的 miR-30 量;2c:CCK8 测定用 miR-30 或 miR-NC 转染后 PC9G 细胞的增殖活力;2d:实验组和对照组细胞进行 Transwell 试验 ( $\times 100$ );2e:对实验组和对照组细胞进行细胞凋亡测定;2f:通过 CCK-8 测定 PC9G/miR-NC 和 PC9G/miR-30 细胞存活率;a 和 b 分别表示  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ 。

图 2 miR-30 在 PC9G 细胞中的过表达抑制肿瘤侵袭性、逆转厄洛替尼的耐药性。



注:3a;qT-PCR 量化转染 miR-30 抑制剂后 PC9 细胞中的 miR-30 表达量;3b:用 CCK8 法测定 PC9 细胞经 miR30 抑制剂或 miR-NC 转染后的增殖活性;3c:对实验组和对照组细胞进行 Transwell 测定 ( $\times 100$ );3d:对实验组和对照组细胞进行细胞凋亡测定;3e:通过 CCK-8 测定 PC9G/miR-NC 和 PC9G/miR-30 细胞存活率。a 表示  $P < 0.01$ 。

图 3 PC9 细胞中低表达 miR-30 显著促进细胞生长和迁移并增强对厄洛替尼的耐药性



注:4a:构建基于 miR-30 预测人 SMAD23'-UTR 结合位点的质粒;4b:荧光素酶报告系统在 PC9G 细胞系上验证进行测定;4c:Western blot 法测定 SMAD2 基因在细胞中的蛋白表达量;4d;qRT-PCR 计算人肺癌和癌旁组织标本中 SMAD2 的表达量;4e:确定 SMAD2 量和 miR-30 水平的相关性;数据为 3 次重复实验的  $\bar{x} \pm s$ 。a 表示  $P < 0.01$ 。

图 4 SMAD2 是 miR-30 的直接靶标

PC9G 细胞。结果表明,在野生型 SMAD2 组中,与 miR-30 模拟物共转染的细胞的荧光素酶活性明显降低,而与 miR-30 抑制剂共同转染的细胞的荧光素酶活性显著增加。而在突变组中,荧光素酶活性没有变化(图 4a、b)。

蛋白质免疫印迹实验证明在 miR-30 过表达处理的 PC9G 细胞中 SMAD2 蛋白量减少,而在 miR-30 沉默的 PC9 细胞后蛋白量增加(图 4c)。此外,对人类肺癌标本和癌旁正常组织中 SMAD2 基因的表達量的评估显示,癌组织中的 SMAD2 表达明显上调(图 4d)。Spearman 等级相关性评估结果表明,在人肺癌标本中 SMAD2 含量和 miR-30 水平呈负相关( $r = -0.5605$ )(图 4e)。

### 3 讨论

miRNA 是近年来分子生物学和表观遗传学研究的热点,其在人类肿瘤中的异常表达可能通过参与多种肿瘤相关信号通路,在促进癌症或抑制癌症中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。NSCLC 的发生涉及遗传和表观遗传改变,本研究探讨了 miR-30 在肺癌中的作用以及潜在的分子机制。

近年来,越来越多的研究表明 miR-30 在多种癌症中发挥肿瘤抑制因子的作用<sup>[11]</sup>。如上所述,miR-30 在肺癌样本中呈低表达,在耐药组 PC9G 细胞中的表达量相比 PC9 细胞更低。在 PC9G 细胞中过表达 miR-30,导致 PC9G 细胞的生长和迁移减少,同时诱导细胞凋亡;相反,PC9 细胞中抑制 miR-30,则显著促进细胞生长和迁移,并抑制 PC9 细胞的凋亡。本研究首次揭示 miR-30 在肺癌化疗敏感性中的作用,这些发现可能有助于开发肺癌的新型治疗策略。

Smad 蛋白早期被发现是转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号通路中的下游蛋白,它可以通过结合两种跨膜受体 TGF- $\beta$  受体 I 型和 II 型从而被调控<sup>[12-13]</sup>。TGF- $\beta$  受体信号通路参与各种生物学过程,并且在各种肿瘤发生过程中发挥着复杂的作用<sup>[14]</sup>。在本篇文章中,SMAD2 基因被证实为新的 miR-30 靶标。首先,荧光素酶报告基因测定表明 miR-30 直接识别 SMAD2 mRNA 的 3' 端非编码区。另外,在稳定的 miR-30 过表达后,SMAD2 水平显著降低。最后,SMAD2 和 miR-30 在临床标本中呈负相关。总之,这些发现表明 SMAD2 是新的 miR-30 靶标。

综上所述,本研究结果证实了 miR-30 可以通过靶向负性调控 SMAD2 来抑制肺癌细胞生长,应用于对厄洛替尼耐药的肺癌患者,可能为肺癌的个体化治疗提供一个新策略。然而,大多数临床样本没有经

历 EGFR 突变评估,因此,在这些患者身上观察到的反应是否能归因于 EGFR 突变尚不确定。另一方面,miR-30 还可能存在其他的 miR-30 靶点,这些也可能影响肺癌的进展。因此,需要进一步的研究来确定 miR-30 调控的其他靶点和信号途径。

### 参考文献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Yang FM, Ning ZQ, Ma L, et al. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts [J]. Mol Cancer, 2017, 16: 148.
- [3] 顾桑, 邵欣宇, 邹晓平. microRNA-10b 与胰腺癌吉西他滨耐药的相关性及机制研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(7): 830-835.
- [4] Zhu W, Shan X, Wang TS, et al. MiR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines [J]. Int J Cancer, 2010, 127(11): 2520-2529.
- [5] Gao W, Lu X, Liu LX, et al. MiRNA-21: a biomarker predictive for platinum-based adjuvant chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(5): 330-340.
- [6] Wei J, Gao W, Zhu CJ, et al. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer [J]. Chin J Cancer, 2011, 30(6): 407-414.
- [7] Tsukasa K, Ding Q, Miyazaki Y, et al. MiR-30 family promotes migratory and invasive abilities in CD133<sup>+</sup> pancreatic cancer stem-like cells [J]. Human Cell, 2016, 29(3): 130-137.
- [8] Ouzounova M, Vuong T, Ancey PB, et al. MicroRNA miR-30 family regulates non-attachment growth of breast cancer cells [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 139.
- [9] Garofalo M, Romano G, Di Leva G, et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers [J]. Nat Med, 2011, 18(1): 74-82.
- [10] Yang FM, Wei K, Qin ZQ, et al. MiR-598 suppresses invasion and migration by negative regulation of derlin-1 and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(1): 245-256.
- [11] 王鹤, 刘志利, 德伟, 等. microRNA-335 对人非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2012, 32(6): 795-799.
- [12] Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: Differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF- $\beta$  signaling [J]. J Cell Biochem, 2007, 101(1): 9-33.
- [13] Yoshida K, Murata M, Yamaguchi T, et al. TGF- $\beta$ /Smad signaling during hepatic fibro-carcinogenesis (Review) [J]. Int J Oncol, 2014, 45(4): 1363-1371.
- [14] Sun R, Luo Y, Li J, et al. Ammonium chloride inhibits autophagy of hepatocellular carcinoma cells through SMAD2 signaling [J]. Tumour Biol, 2015, 36(2): 1173-1177.