

- platelet lysate and efficient use in cell culture [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 946: 349-362.
- [24] McGrath M, Tam E, Sladkova M, et al. GMP-compatible and xeno-free cultivation of mesenchymal progenitors derived from human-induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10 (1): 11.
- [25] Chase L G, Lakshmiathy U, Solchaga L A, et al. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2010, 1 (1): 8.
- [26] Devireddy L R, Myers M, Screven R, et al. A serum-free medium formulation efficiently supports isolation and propagation of canine adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells [J]. *PLoS One*, 2019, 14 (2): e0210250.
- [27] Liu Z, Screven R, Boxer L, et al. Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Serum-Free Medium [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2018, 24 (7): 399.
- [28] Schubert S, Brehm W, Hillmann A, et al. Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture [J]. *Cytometry A*, 2018, 93 (1): 60-72.
- [29] Lee M S, Youn C, Kim J H, et al. Enhanced cell growth of adipocyte-derived mesenchymal stem cells using chemically-defined serum-free media [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (8): E 1779.
- [30] Ben Azouna N, Jenhani F, Regaya Z, et al. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3 (1): 6.

## • 基础研究 •

# MiR-194 过表达和抑制表达对肝癌细胞株 Hep-3b 中侧群细胞增殖的影响

福建医科大学附属肿瘤医院 福建省肿瘤医院 福建省肿瘤生物治疗重点实验室 (福州 350014) 许扬梅  
龚福生 刘沁颖 刘施佳 黄丽洁 郑秋红<sup>1</sup>

**【摘要】目的** 研究 MicroRNA-194 (miR-194) 过表达和抑制表达对细胞株 Hep-3b 中侧群细胞增殖功能影响。**方法** 构建 miR-194 过表达和抑制表达慢病毒并感染 Hep-3b 细胞。流式细胞仪鉴定各感染组 SP 侧群比例, QPCR 检测各组细胞 miR-194-5p 表达, CCK-8 法检测各组细胞增殖能力, 软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。**结果** 流式细胞仪鉴定发现 miR-194 过表达 Hep-3b 组 SP 细胞含量与 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组差异具有统计学意义 ( $LSD-t=3.550$ ,  $P=0.012$ )。QPCR 检测显示 miR-194 过表达 Hep-3b 组 miR-194-5p 水平高于 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组 ( $LSD-t=4.680$ ,  $P=0.007$ )。CCK-8 实验表明 miR-194 过表达 Hep-3b 组和 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组细胞增殖能力差异有统计学意义 ( $LSD-t=5.621$ ,  $P=0.002$ )。软琼脂克隆形成实验显示 miR-194 过表达 Hep-3b 组比 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组形成细胞克隆少 ( $LSD-t=5.849$ ,  $P=0.001$ )。**结论** 成功构建了 miR-194 过表达和抑制细胞株, miR-194 抑制组显示明显的干细胞特征, 其含有更多 SP 细胞, 具有更强的细胞增殖能力和自我更新能力。

**【关键词】** 微小 RNA; 慢病毒载体; 肝癌; 干细胞

**【中图分类号】** R735.7 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2019)06-0141-05

**Influence of miR-194 up and down-expression on liver cancer stem cells** XU Yangmei, GONG Fusheng, LIU Qinying, LIU Shijia, HUANG Lijie, ZHENG Qihong. *Fujian Provincial Key Laboratory of Tumor Biotherapy, Fujian Medical University Cancer Hospital & Fujian Cancer Hospital, Fuzhou, Fujian 350014, China*

**【Abstract】Objective** To study the influence of miR-194 up and down-expression Hep-3b cell lines on the proliferation ability of SP cells. **Methods** Hep-3b was used to construct miR-194 up and down-expression cell lines via lentivirus infection. Flow cytometry was applied to identify SP cells. QPCR assay was adopted to test the expression of miR-194-5p in those cell lines. CCK-8 assay was conducted to study the proliferation ability of cells and soft agar colony formation assay was conducted to test colony-forming ability. **Results** Each infected cell line maintained good growth. Flow cytometry analysis showed that the SP percentage were significantly different between miR-194 up and down-regulation Hep-3b groups ( $LSD-t=3.550$ ,  $P=0.012$ ). QPCR assay of miR-194-5p showed statistic difference between miR-194 up and down-regulation Hep-3b groups ( $LSD-t=4.680$ ,  $P=0.007$ ). CCK-8 assay showed different growth ability between miR-194 up and down-regulation Hep-3b groups ( $LSD-t=5.621$ ,  $P=0.002$ ). Soft agar colony formation assay results less colonies formed in miR-194 up-regulation Hep-3b

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2016J01436)

<sup>1</sup> 通信作者

group than miR-194 down-regulation Hep-3b group ( $LSD-t=5.849$ ,  $P=0.001$ ). **Conclusion** miR-194 up-regulation Hep-3b group than miR-194 down-regulation Hep-3b group were successfully constructed. miR-194 down-regulation Hep-3b group contains more SP cells, possess stronger growth ability and self-renewal ability, showing stronger proliferation and self-renewal ability.

**【Key words】** MicroRNA; lentivirus vector; liver cancer; stem cell

微小 RNA (MicroRNA, miRNA) 是一类内源性、进化保守的、非编码单链小 RNA 分子,它通过与目的基因的 3' 非翻译区结合抑制蛋白质翻译、调节目的基因表达。因此,miRNA 具有十分广泛的应用前景。miR-194 是当前 miRNA 研究的热点之一。已有研究表明,miR-194 与乳腺癌、肾癌、结直肠癌、前列腺、胃癌、肝癌、脑胶质瘤和黑色素瘤等多种肿瘤密切相关,还可作为辅助诊断和预测临床预后的标志物<sup>[1-8]</sup>。还有研究表明,miR-194 也与脂肪肝、HBV 感染肝炎等肝病有关系<sup>[9]</sup>。侧群细胞 (side population, SP) 是具有干细胞特征的细胞<sup>[10-11]</sup>。课题组前期在肝癌细胞株 Hep-3b 中证明了 SP 细胞的存在以及其肿瘤干细胞功能,而且发现 SP 细胞中 miR-194 低表达<sup>[12]</sup>。因此,本研究构建 miR-194 过表达和抑制表达慢病毒载体,以 Hep-3b 细胞为研究对象,观察慢病毒感染后细胞株生物学功能的变化,为研究 miR-194 调控肝癌 SP 细胞机制奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株、主要试剂与仪器:** 人肝癌细胞系 Hep-3b 购自中国科学院上海药物研究所,293T 细胞和 LipoFiter™ 脂质体转染试剂购自汉恒公司,DMEM 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自美国 Hyclone 公司,胰酶购自美国 Gibco 公司,嘌呤霉素购自美国 Sigma-Aldrich 公司,微小 RNA 第一链 cDNA 合成试剂盒和微小 RNA 荧光定量试剂盒购自天根公司,QPCR (型号为 ViiA™ Dx Realtime PCR) 是美国 AB 公司生产,流式细胞分选仪购自美国贝克曼公司。

### 1.2 miR-194-5p 过表达和抑制表达慢病毒载体构建及肝癌细胞株 Hep-3b 感染:

**1.2.1 细胞培养方法:** Hep-3b 在含体积分数为 10% FBS 的 DMEM 培养基中传代培养,经质量分数为 0.25% 的胰酶消化,1 500 r/min 离心 3 min ( $r=20$  cm),台盼蓝染色作活细胞计数。

**1.2.2 引物序列及合成:** miR-194-5p 上游引物 ATAG-GATCCGCGTTTCAAATCTACCAGTCCCTAA,下游引物为 ATAGAATTCAAATGAGAGTCCAAGTGACCACAAT。miR-194-5p sponge 上游引物 ACAGGATCCTCCACATG-GAGTTGCTGTACATATACTCCACATGGAGTTGCTG-TTACAACATCTCCACATG;下游引物 ATAGAATTCTG-TAACAGCAACTCCATGTGGATGAAGATG-TAACAGCAACTCCATGTGGAGATGTTGT

**1.2.3 制备重组克隆、慢病毒包装和感染 Hep-3b 细胞:** pHBLV-U6-Scramble-ZsGreen-Puro 载体 (汉恒公司) 用 EcoRI 和 BamHI (NEB 公司) 酶切,PCR 分别扩增 miR-194 和 miR-194 sponge 序列,分别回收,目的片段分别与载体连接,转化 DH5a 感受态细胞,平板挑菌,将阳性克隆菌液送测序公司测序。

慢病毒包装、收获及浓缩,按照汉恒公司的 LipoFiter™ 脂质体转染试剂方法分别将重组阳性克隆转染 293T 细胞,转染后 48 h 和 72 h 分别两次收集病毒上清, -80 °C 保存。

检测前 1 d,293T 细胞铺 96 孔板,每一种慢病毒设 8 个梯度孔,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养;2 d,每孔加入 100 μL 稀释好的病毒液培养 24 h;72 h 后,荧光显微镜下观察选取荧光比例 10%~30% 进行病毒滴度计算。病毒滴度 (TU/mL) = 感染效率 × 感染时细胞数 × 10<sup>3</sup> / 病毒原液体积 (μL)。慢病毒感染 Hep-3b 细胞,Hep-3b 细胞接种至 6 孔板,3 × 10<sup>5</sup> 个/孔,培养 24 h 后加入 6 × 10<sup>8</sup> TU/mL 病毒 20 μL,感染复数 (MOI) 为 20,24 h 后更换为 3 mL,10% FBS+DMEM 培养基,并加入嘌呤霉素 5 μg/mL。每天更换培养基,4~6 d 待单克隆细胞生长至一定量后转入细胞瓶内培养建系。

**1.3 QPCR 检测 miR-194-5p 表达:** 用 Trizol 进行总 RNA 提取及质检。按照 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒方法进行第一链合成,采用微小 RNA 荧光定量试剂盒,并在 QPCR 仪上将各样品进行目的 miRNA-194-5p 和内参 U6 实时定量扩增。数据采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法进行分析。引物设计如下 miR-194-5p 上游引物为 GCCGCTGTAACAGCAACTCC-AT,下游引物为 GTGCAGGGTCCGAGGT;U6 上游引物为 CTCGCTTCGGTCCGCGAGCAGCATATACT,下游引物为 CGCTTCACGAATTTGCGT GT。

**1.4 流式细胞术 SP 细胞的标记、检测和分选:** 取对数生长期贴壁细胞,分别制备成浓度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL 的单细胞悬液,加入 5 μg/mL 的荧光染料 Hoechst 33342 作为实验组,对照组为 5 μg/mL 的荧光染料 Hoechst 33342 + 50 μM 异搏定,置于 37 °C 水浴锅孵育 90 min,每隔 30 min 震荡混匀 1 次。检测前加碘化丙啶染色标记死亡细胞。实验重复 3 次。采用 Moflo XDP 流式细胞分选仪,运用 355 nm 紫外激发光检测,Hoechst 33342 阴性或弱阳性为 SP 细胞,Hoechst 33342 阳性为非 SP (NSP) 细胞。并按照操作步骤检测 SP 和 NSP 细胞<sup>[12]</sup>。

**1.5 CCK-8 法检测人肝癌细胞系 Hep-3b 细胞增殖能力:** 按 1 × 10<sup>3</sup> 个/孔的浓度接种细胞于 96 孔板,每组设 5 个复孔,另设 5 个复孔,只加 DMEM 培养液和 CCK-8 液做调零孔。接种 6 h 后吸去培养液,加入新鲜的培养基 100 μL,于细胞接种后 12、24、48、72 和 96 h,每孔避光加入 CCK-8 10 μL,避光培养 3.5 h 后,测定波长 450 nm 处吸光度值。以检测时间为 X 轴,A<sub>450</sub> 值为 Y 轴绘制细胞增殖曲线。

**1.6 软琼脂克隆形成实验检测人肝癌细胞系 Hep-3b 细胞克隆形成能力:** 以 0.6% 琼脂和 10% FBS 的 DMEM 培养基作为底层,0.3% 琼脂和 10% FBS 的 DMEM 培养基作为上层,与 104 个单细胞在 6 孔板中混合培养。每组同时做 6 个

平行孔, 14 d 后显微镜下拍照。计数大于 50 个细胞的克隆, 取其平均值。

**1.7 统计学方法:** 采用 SPSS 11.5 对数据进行统计学处理。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用单因素多样本方差分析, 多组间的两两比较方差齐性采用 LSD-*t* 法检验, 方差不齐性采用 Dunnett's T3 法检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

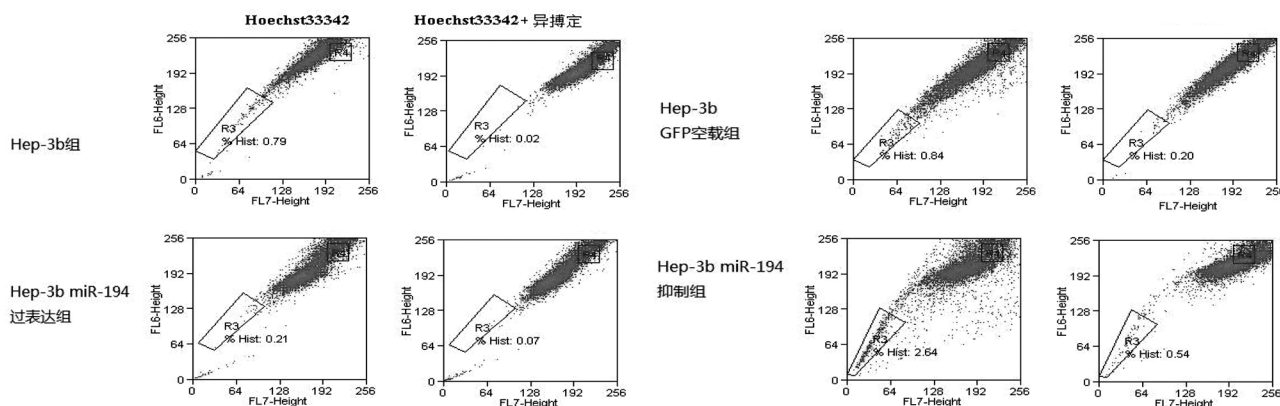
## 2 结果

**2.1 慢病毒感染细胞 Hep-3b 形成稳定感染细胞株:** 各感染组细胞生长状态良好, 发绿色荧光, 见图 1 (见封四)。MiR-194 过表达 Hep-3b 组、miR-194 抑制表达 Hep-3b 组和 Hep-3b GFP 空载组感染效率分别为 91.20%、98.50% 和 99.10%。

**2.2 QPCR 检测各组细胞 miR-194-5p 表达:** Hep-3b 组、Hep-3b GFP 空载组、miR-194 过表达 Hep-3b 组、miR-194 抑制表达 Hep-3b 组 miR-194-5p 表达水平分别为  $1.00 \pm 0.07$ 、 $1.03 \pm 0.08$ 、 $3.36 \pm 0.29$ 、 $0.53 \pm 0.05$ , 4 组间比较差异有统计学意义 ( $F=16.486$ ,  $P=0.005$ )。多组间的两

两比较比较显示, 与 Hep-3b GFP 空载组相比, miR-194 过表达 Hep-3b 组 miR-194-5p 水平升高 (LSD- $t=4.550$ ,  $P=0.009$ ), miR-194 抑制表达 Hep-3b 组降低 ( $t=1.937$ ,  $P=0.036$ ), miR-194 过表达 Hep-3b 组 miR-194-5p 水平高于 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组 ( $t=4.680$ ,  $P=0.007$ )。

**2.3 流式细胞术检测各组 SP 细胞:** Hep-3b 组、Hep-3b GFP 空载组、miR-194 过表达 Hep-3b 组、miR-194 抑制表达 Hep-3b 组 SP 细胞含量分别为  $(0.74 \pm 0.10)\%$ 、 $(0.72 \pm 0.13)\%$ 、 $(0.29 \pm 0.08)\%$  和  $(2.53 \pm 0.57)\%$ , 4 组间比较差异有统计学意义 ( $F=6.200$ ,  $P=0.034$ , 图 2)。多组间的两两比较比较显示, 与 Hep-3b GFP 空载组相比, miR-194 过表达 Hep-3b 组 SP 细胞含量下降 ( $t=3.013$ ,  $P=0.023$ ), miR-194 抑制表达 Hep-3b 组含量增加 ( $t=3.179$ ,  $P=0.021$ ); miR-194 过表达 Hep-3b 组 SP 细胞含量与 miR-194 抑制表达组差异具有统计学意义 ( $t=3.550$ ,  $P=0.012$ ), 即 miR-194 表达越低, SP 细胞含量越高。

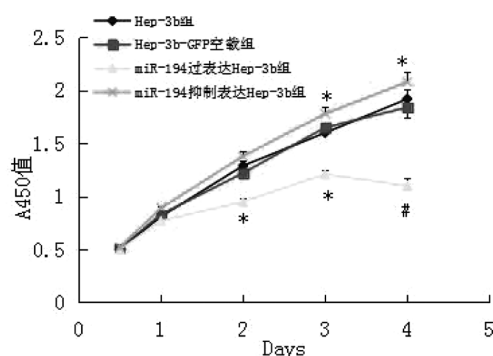


注: R3 区域是 SP 细胞, R4 区域是选取部分非 SP 细胞。当 Hoechst 33342+异搏定同时作用, 可以使 SP 细胞不被检测出来。

图 2 流式细胞术检测各组 SP 细胞

**2.4 miR-194 过表达和抑制表达 Hep-3b 细胞增殖能力变化:** 图 3 示, 细胞接种 72 h 后, Hep-3b 组、Hep-3b GFP 空载组、miR-194 过表达 Hep-3b 组、miR-194 抑制表达 Hep-3b 组增殖 A 值分别为  $1.61 \pm 0.08$ 、 $1.65 \pm 0.07$ 、 $1.22 \pm 0.03$ 、 $1.79 \pm 0.12$ , 4 组间比较差异有统计学意义 ( $F=12.394$ ,  $P=0.009$ )。多组间的两两比较比较显示, 与 Hep-3b GFP 空载组相比, miR-194 过表达 Hep-3b 组和 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组增殖能力差异均具有统计学意义 ( $t=1.882$ ,  $P=0.040$ ;  $t=3.621$ ,  $P=0.012$ ); miR-194 过表达和抑制表达 Hep-3b 组增殖能力差异具有统计学意义 ( $t=5.621$ ,  $P=0.002$ ), 表明 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组增殖能力增强, miR-194 过表达 Hep-3b 组增殖能力减弱。

**2.5 miR-194 过表达和抑制表达 Hep-3b 组细胞组软琼脂形成能力变化:** 图 4 示, 14 d 后, Hep-3b 组、Hep-3b GFP 空载组、miR-194 过表达 Hep-3b 组、miR-194 抑制表达 Hep-3b 组克隆数分别为  $21 \pm 2.31$ 、 $21 \pm 1.99$ 、 $15.97 \pm 3.25$  和  $33.61 \pm 2.41$ , 4 组间比较差异有统计学意义 ( $F=38.476$ ,  $P=0.013$ )。miR-194 过表达 Hep-3b 组和 miR-194 抑制表



注: 与 Hep-3b GFP 空载组比较, \*  $P<0.01$ , #  $P<0.001$ 。

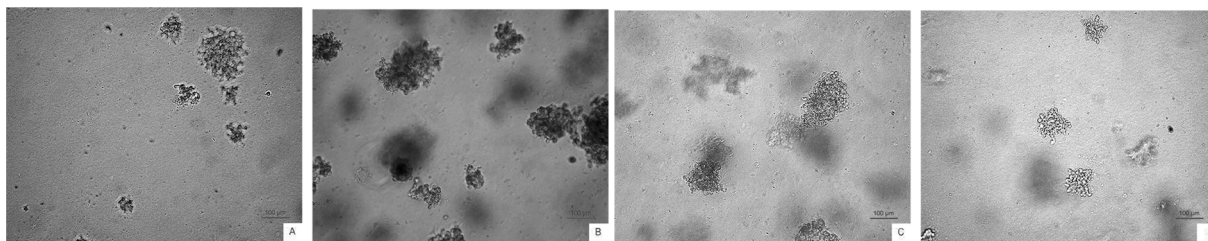
图 3 miR-194 过表达和抑制表达 Hep-3b 组细胞增殖能力变化比较

达 Hep-3b 组差异均具有统计学意义 ( $t=5.849$ ,  $P=0.001$ ), 表明 miR-194 过表达 Hep-3b 组比 miR-194 抑制表



达 Hep-3b 组形成细胞克隆少, 提示 miR-194 抑制表达 Hep-

3b 组细胞具有更强的增殖和自我更新能力。



注: A 为 miR-194 过表达 Hep-3b 组; B 为 miR-194 抑制表达 Hep-3b 组; C 为 Hep-3b 组; D 为 Hep-3b GFP 空载组。

图 4 miR-194 过表达和抑制表达 Hep-3b 组软琼脂形成能力 (×100)

### 3 讨论

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在恶性肿瘤中居第 3 位。长期以来肝癌的治疗手段难以达到满意的疗效。实验研究表明肿瘤干细胞是肿瘤发生、发展、复发转移的根本原因<sup>[12]</sup>。研究肝癌干细胞能为我们治疗肝癌提供很好的思路。miR-194 是肝脏高表达的 miRNAs 之一, 且特异性的表达于肝上皮细胞。肿瘤干细胞和 miRNAs 都可以成为肿瘤分子靶向治疗的潜在靶点。我们前期研究通过基因芯片检测肝癌 SP 和 NSP 细胞差异表达的 miRNA, 筛选了 27 个肝癌干细胞特异性 miRNA, 并在另外两个细胞株中验证, 找到了 3 个细胞株 SP 细胞共同低表达的 miR-9\* 和 miR-194<sup>[12]</sup>。因此我们推测 miRNA-194 对于肝癌干细胞的调控起着重要的作用, 但对它的具体功能和调控机制并不清楚。

本研究以 Hep-3b 细胞为研究对象, 构建 miR-194 过表达和抑制慢病毒载体。慢病毒载体具有构建方法简单、目的基因表达稳定及感染效率高等优点。流式细胞仪检测表明细胞感染率均>90%, 为实验的准确性提供了保证。

SP 法是研究干细胞一个非常重要的方法, SP 细胞具有干细胞特性, 这些年国内外已经有很多文章报道<sup>[10-12]</sup>。SP 法的原理依赖细胞膜表面 ABC 转运子蛋白将染料泵出细胞外, 所以 Hoechst33342 染色阴性; 加入异搏定, 抑制钙泵活动, 细胞无法外排 Hoechst33342, SP 群大量减少或消失, 从而进一步证明 SP 法原理。本实验经过一系列 Hoechst33342 和异搏定浓度测试, 选定了最优染色方案: 5 μg/mL Hoechst 33342 + 50 μM 异搏定。流式细胞检测显示 miR-194 表达量越低, 则 SP 细胞含量越高, 这与前期实验结果 SP 细胞中 miR-194 表达量低是相呼应的, 此结果提示 miR-194 可调控 SP 细胞含量。目前还未见其他相关报道, 这是本研究重要的创新点。研究组还推测其机制可能在于 miR-194 的潜在靶标之一 BMI1。BMI1 能使肿瘤细胞不断更新成为肿瘤干细胞, 其表达水平与肿瘤的发生、发展、侵袭、预后等病理指标相关<sup>[13]</sup>。Zhang 等<sup>[14]</sup>在胶质瘤的研究中也发现 miR-194 是通过 BMI1 来调控胶质瘤细胞的上皮间质变。

CCK-8 法和软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆形成能力实验显示, miR-194 抑制表达组具有明显的干细胞特征: 具有更高的细胞增殖能力和更强的克隆形成能力。这进一步证明了 miR-194 的调控功能, 与 SP 细胞的功能一致。Zhao 等<sup>[6]</sup>研究发现在 Hep-3b 细胞系中过表达 miR-194 能抑制细

胞增殖, 与本研究结果是一致的。张杨等<sup>[15]</sup>运用瞬时转染方法在 HepG2 肝癌细胞株中也上调和下调了 miR-194 水平, 但他们的研究结果是过表达 miR-194 促进细胞增殖。导致结果不一致的原因很多, 可能在于肝癌细胞株的不同, 又或者是 miR-194 转染方式不同。项目组后期将在更多的肝癌细胞株中验证研究结果。

综上所述, 本研究采用慢病毒感染技术, 建立了 miR-194 过表达及抑制表达稳定细胞株, 并证明 miR-194 能抑制肝癌细胞干细胞特征。今后项目组准备运用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-194 和 BMI1 的结合及 BMI1 功能等一系列实验, 以构建在肝癌细胞株中 miR-194 的调控通路。

### 参考文献

- [1] Yang F, Xiao Z, Zhang S. Knock down of miR-194-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion in breast cancer by regulating the Wnt/β-catenin signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42 (6): 3355-3363.
- [2] Nofech-Mozes R, Khella H W, Scorilas A, et al. MicroRNA-194 is a marker for good prognosis in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Med*, 2016, 5 (4): 656-664.
- [3] Li C F, Li Y C, Wang Y, et al. The effect of xLncRNA H19/miR-194-5p axis on the epithelial-mesenchymal transition of colorectal adenocarcinoma [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50 (1): 196-213.
- [4] Gao S, Zhao Z, Wu R, et al. MicroRNA-194 regulates cell viability and apoptosis by targeting CDH2 in prostatic cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11 (14): 4837-4844.
- [5] Zhao X, Hou Y, Tuo Z, et al. Application values of miR-194 and miR-29 in the diagnosis and prognosis of gastric cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15 (5): 4179-4184.
- [6] Zhao Y, Li F, Zhang X, et al. MicroRNA-194 acts as a prognostic marker and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting MAP4K4 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (10): 12446-12454.
- [7] 滕浩, 薛一雪, 王萍, 等. miR-194 对人脑胶质瘤 U87 细胞恶性生物学行为的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2018, 47 (8): 673-677.
- [8] 王永晶, 李娜. MiR-194 在葡萄膜黑色素瘤细胞系中的表达及对细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响 [J]. *眼科新进展*, 2018, 38 (11): 1033-1036.
- [9] Gao X, Zhao P, Hu J, et al. MicroRNA-194 protects against

- chronic hepatitis B-related liver damage by promoting hepatocyte growth via ACVR2B [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22 (9): 4534-4544.
- [10] Mahkamova K, Latar N M, Aspinall S, et al. Side population cells in anaplastic thyroid cancer and normal thyroid [J]. Exp Cell Res, 2019, 374 (1): 104-113.
- [11] Hotfilder M, Mallela N, Seggewi J, et al. Defining a characteristic gene expression set responsible for cancer stem cell-like features in a sub-population of ewing sarcoma cells CADO-ES1 [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (12): E3908.
- [12] Xu Y, Xie Y, Wang X, et al. Identification of cancer stem cells from hepatocellular carcinoma cell lines and their related microRNAs [J]. Oncol Rep, 2013, 30 (5): 2056-2062.
- [13] Huang K, Zhu Y, Ma Y, et al. BMI1 enables interspecies chimerism with human pluripotent stem cells [J]. Nat Commun, 2018, 9 (1): 4649.
- [14] Zhang X, Wei C, Li J, et al. MicroRNA-194 represses glioma cell epithelial to mesenchymal transition by targeting Bmi1 [J]. Oncol Rep, 2017, 37 (3): 1593-1600.
- [15] 张杨, 杨琰, 曹钧. 微小 RNA-194 对肝癌细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2018, 35 (5): 842-844.

## • 基础研究 •

# HPLC-MS/MS 法测定人血浆中利伐沙班的浓度

福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院药学部 (福州 350001) 陈 敏 高红瑾 阳丽梅

**【摘 要】 目的** 建立人血浆中利伐沙班 (rivaroxaban) 的高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 法测定的方法, 并对其进行方法学验证。**方法** 血浆样品采用乙腈直接沉淀, 选择盐酸氨溴索作为内标物。采用菲罗门 Kinetex 2.6u C18 100A (50×2.10 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈: 水 (30: 70) 用甲酸调 pH 至 3.0, 流速 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 电喷雾离子源 (ESI) 正离子检测方式, 选择多重反应监测模式进行测定, 用于定量的离子对分别为利伐沙班质荷比 (m/z) 436.0/144.9、盐酸氨溴索 m/z 379.0/263.9。**结果** 利伐沙班在 2.5~500 ng/mL 范围内呈良好的线性关系 ( $r=0.9999$ ), 定量下限是 2.5 ng/mL; 日内、日间相对标准偏差 (RSD) 0.29%~2.38%, 相对误差 (RE) -0.59%~0.90%, 基质效应 97.76%~100.41%, 提取回收率为 98.64%~102.84%。血浆样品在室温放置 24 h、-20 °C 反复冻融 3 次以及 -80 °C 冷冻 30 d, 不影响利伐沙班含量测定。**结论** 本研究建立的 HPLC-MS/MS 法测定利伐沙班血药浓度, 具有简便、快速、准确, 适用于临床常规监测及药动力学研究等特点。

**【关键词】** 利伐沙班; HPLC-MS/MS 法; 血药浓度

**【中图分类号】** R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)06-0145-04

**Determination of rivaroxaban concentration in human plasma by HPLC-MS/MS** CHEN Min, GAO Hongjin, YANG Limei. Department of Pharmacy, Fujian Provincial Hospital, Provincial Clinical Medical College of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

**【Abstract】 Objective** To establish a HPLC-MS/MS method to determinate rivaroxaban concentration in human plasma, and the method was verified by methodology. **Methods** Plasma samples by acetonitrile precipitation were to be determined by using ambroxol hydrochloride as Internal Standard (IS). The chromatographic column was Kinetex 2.6u C18 100A (50×2.10 mm, 1.8 μm), and the mobile phase using water (adjust pH to 3.0 with formic acid)-acetonitrile (70: 30) with flow rate of 0.3 mL/min. The mass spectrometer was operated in positive electron spray ionization (ESI) and multiple response monitoring patterns, m/z 436.0/144.9 and m/z 379.0/263.9 were used for the measurement of rivaroxaban and ambroxol hydrochloride, respectively. **Results** Rivaroxaban was linear in the range of 2.5 to 500 ng/mL, and the quantification lower limit of rivaroxaban was 2.5 ng/mL. The intra-day and inter-day precisions (relative standard deviation, RSD) were 0.29% to 0.38%, the accuracy was between -0.59% and 0.90%. The matrix effect was in the range of 97.76% to 100.41%, and the absolute recovery was in the range of 98.64% to 102.84%. The plasma samples were stable under conditions including placing at room temperature for 24 h, repeated freezing and thawing at -20 °C for 3 times, and freezing at -80 °C for 30 days. **Conclusion** The HPLC-MS/MS method established in our study is convenience, accurate and rapid for the determination of rivaroxaban in blood, which is applicable for the routine monitoring and PK study of rivaroxaban.

**【Key words】** rivaroxaban; HPLC-MS/MS; plasma drug concentration

利伐沙班 (rivaroxaban) 即 5-氯-N-(((5S)-2-氧代-3-噻吩-2-甲酰胺, 属于直接 Xa 因子抑制剂, 由拜耳医药保健有限公司开发用于抗凝治疗, 预防血栓形成, 与传统抗凝药