

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.34.001

MicroRNA-19a/b 与胃癌增殖、凋亡及临床病理特征的关系*

王 芳,王鹤臻,王晶晶,何 芳[△]

(宁夏医科大学总医院消化内科,银川 750004)

[摘要] **目的** 探讨 microRNA-19a/b(miR-19a/b)对人胃癌细胞的增殖和凋亡的影响及可能机制,并研究 miR-19a/b 的表达量与胃癌临床病理特征的关系。**方法** 建立稳定过表达 miR-19a/b 的 SGC7901 细胞系,以 MTT 比色法及平板克隆形成实验检测转染 miR-19a/b 后细胞增殖变化,Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡变化,Western blot 检测 ERK、p-ERK、AKT、p-AKT 及 PTEN 的蛋白表达变化,实时定量 PCR 方法检测分析 miR-19a/b 与胃癌组织分化程度、TNM 分期及淋巴结转移的关系。**结果** 在 SGC7901 细胞中过表达 miR-19a/b 后产生以下效应:细胞增殖能力增加,MTT 实验显示转染 miR-19a 及 miR-19b 后检测 72 h 的细胞增殖能力与对照组相比分别增加 2.2 倍和 1.6 倍,平板克隆实验显示转染 miR-19a 及 miR-19b 后细胞的克隆形成能力与对照组相比分别增加 3.6 倍和 3.0 倍;细胞凋亡减少,转染 miR-19a 及 miR-19b 后细胞的凋亡能力与对照组相比分别降低 53% 和 33%,与对照组相比, p-AKT、p-ERK 蛋白表达水平增加,PTEN 蛋白表达水平降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。在 58 例胃癌组织标本检测中,miR-19a/b 的 miRNA 表达水平与年龄、性别、分化程度无关($P > 0.05$),而与 TMN 分期、淋巴结转移成负相关($P < 0.05$)。**结论** miR-19a/b 可促进胃癌细胞增殖、抑制细胞凋亡,且与胃癌的 TMN 分期、淋巴结转移呈负相关。

[关键词] 胃肿瘤;细胞凋亡;细胞增殖;病理学;miR-19a/b**[中图分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)34-4753-04

The relation between microRNA-19a/b and proliferation,apoptosis and clinicopathological features of gastric cancer*

Wang Fang, Wang Wanzhen, Wang Jingjing, He Fang[△]

(Department of Gastroenterology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of miR-19a/b on proliferation, apoptosis of gastric cancer cells and elucidate its possible mechanism by infecting the human gastric adenocarcinoma cell line SGC7901. Then investigate the relation between the levels of miR-19a/b and the clinicopathological features of gastric cancer. **Methods** The stable cells which expressed miR-19a/b were stabled. The changes of cellular growth activity were detected by MTT and colony formation assay and the apoptosis were detected by flow cytometry. The expression of AKT, p-AKT, ERK, p-ERK and PTEN were examined by Western blot. By using Real-Time quantitative PCR, the expression of miR-19a/b were evaluated in gastric cancer tissues. To analyze the relationship of the miR-19a/b in degree of differentiation, lymph node metastasis, TNM stage in gastric cancer tissues. **Results** The miR-19a/b expression in stable cell lines were significantly increased much than that of the control group ($P < 0.05$) by using RT-PCR. Ectopic miR-19a/b expression in SGC7901 cell could produce the following effects: the proliferation increased ($P < 0.05$), the cell apoptosis decreased. And the Expression of the protein expressions of p-AKT and p-ERK upregulated, the expression of PTEN down regulated in miR-19a/b infected group than those in miR-NC group. Also we found that the expression of miR-19a or miR-19b in gastric cancer patients did not correlate with age, gender or cell differentiation, but correlated with TNM stage and lymph node metastatic in gastric cancer tissues. **Conclusion** We find that the expression of miR-19a/b are over-expressed in gastric cancer tissues, miR-19a/b up-regulation can promote the cellular proliferation and reduce apoptosis. The present study demonstrates that there is a close relationship between the levels of miR-19a/b and TNM stage and lymph node metastatic in the gastric cancer. Our date study suggests that miR-19a/b would be an effective clinical parameter to indicate the malignance of gastric cancer.

[Key words] stomach neoplasms; apoptosis; cell proliferation; pathology; miR-19a/b

胃癌是全球常见的第二大肿瘤,我国每年新发病例约 40 万例,占世界总发病例数的 42%^[1-2]。由于胃癌及癌前病变的症状具有隐匿性和无特异性,因此多数患者通过临床症状就诊时多为中晚期,治疗效果和预后较差。若能显著提高早期诊断的特异性,将极大提高患者的生存率和预后。目前已发现的血清肿瘤标志物对胃癌的诊断意义有限,因此继续探寻敏感性及特异度兼有的胃癌标志物对于提高胃癌的早期诊断率、改善胃癌患者预后具有非常重要的意义。通过上调人胃癌细胞

SGC7901 中 miR-19a/b 的表达,观察胃癌细胞增殖、凋亡变化,以及对 AKT、p-AKT、ERK、p-ERK 及 PTEN 蛋白表达变化,进一步探讨 miR-19a/b 在 SGC7901 细胞中的增殖和凋亡的作用机制及与胃癌临床病理特征的关系。

1 材料与方法**1.1 材料**

1.1.1 胃癌细胞 SGC7901 引自北京军事医学科学院,由宁夏医科大学总医院实验室保存,RPMI-1640 培养基及胎牛血清

(Hyclone 公司), hsa-miR-19a、hsa-miR-19b 及 has-miR-NC(上海吉凯基因化学技术有限公司)、聚凝胺(Santa 公司)、Trizol 及 RT-PCR 相关试剂(大连 TaKaRa 公司), 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, FITC-annexin V/PI 凋亡试剂盒(美国 BD), 四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司), AKT、p-AKT、ERK、p-ERK、PTEN 抗体[赛俊通(上海)生物试剂有限公司]。

1.1.2 石蜡病理标本 选择有电话随访的、在宁夏医科大学总医院住院行手术治疗的胃癌患者的癌组织及癌旁组织石蜡病理标本, 患者术前均未接受过放疗或化疗, 术后病理证实为胃癌。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞 SGC7901 接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 置于 37 °C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中传代培养, 收集对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞转染及鉴定 将 SGC7901 细胞接种于 6 孔培养板, 每孔接种细胞 1×10^5 个。在 37 °C CO₂ 培养箱中孵育过夜后吸净培养基, PBS 冲洗 3 次, 每孔加入无血清培养基 0.5 mL, 8 μg/mL 的聚凝胺, 2 μL 慢病毒包被的 hsa-miR-19a(miR-19a 组)、hsa-miR-19b(miR-19b 组)或空白载体(NC 组), 孵育 4~6 h 后每孔再加入含血清的培养基 2.5 mL 继续孵育, 转染后 72 h 荧光显微镜下观察 GFP 发光情况。

1.2.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测 转染后 72 h 收集转染细胞, 检测转染细胞 miR-19a/b 的表达以验证转染效果; 细胞转染后按照 Trizol 说明书提取总 RNA, 以特异性引物为模板, 应用 PrimeScript RT reagent Kit 催化合成 cDNA。应用 SYBR Premix Ex Taq II 进行实时定量 PCR, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。根据 Hsa-miR-19 的基因信息, 设计引物(1) miR-19a: 5'-TGT GCA AAT CTA TGC AAA ACT GA-3'; (2) miR-19b: 5'-TGT GCA AAT CCA TGC AAA ACT GA-3'; U6 为内参, 进行归一化。样品目的基因的相对表达率(Relative Expression, RQ)采用 $\Delta\Delta CT$ 方法计算。

1.2.4 细胞增殖能力的检测 (1) MTT 法检测各组细胞的增殖活性: 将对数生长期的稳定转染细胞接种于 96 孔培养板中, 分别在 24、48、72 h 每孔加入 MTT 20 μL (5 mg/mL), 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱继续培养, 4 h 后取出培养板, 弃上清液, 每孔加 150 μL DMSO 溶解甲瓊蓝紫色颗粒, 振荡 10 min, 酶联免疫检测仪检测波长为 490 nm 的吸光度值(A 值)。每组设 6 个平行孔, 取均值绘制细胞生长曲线。(2) 平板克隆形成实验: 对数生长期的转染细胞以胰酶消化成单细胞悬液, 每孔 200 个接种于 6 孔板中, 静止培养 2 周, 肉眼可见的克隆时终止培养, 磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后加甲醇 1 min, 吉姆萨液染色。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率 流式细胞仪检测细胞凋亡按 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒说明书操作。各组细胞加入 5-FU(终浓度为 15 μg/mL), 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h, PBS 洗涤 3 次, 加入 0.5 mL 结合缓冲液重悬细胞, 再加入 6 μL FITC-Annexin V 和 20 μL PI, 室温避光孵育 15 min, 离心弃上清液, 加入 300 μL 结合缓冲液, 流式细胞仪检测凋亡率, 计数 1×10^4 个细胞。实验重复 3 次。

1.2.6 蛋白质免疫印迹法(Western blot) 检测各组细胞 AKT、p-AKT、ERK、p-ERK 及 PTEN 的表达变化。将细胞裂解提取总蛋白, 进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),

并转至硝酸纤维素膜上, 常规封闭、一抗孵育过夜, 后孵育二抗, 用化学发光法显色, 凝胶成像系统采集成像。目的蛋白相对表达量=目的条带的灰度值/同一样本内参的灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计分析软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 Student-test 法分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定过表达 miR-19a/b 的 SGC7901 细胞系的建立 慢病毒包被的含荧光蛋白(GFP)的 hsa-miR-19a、hsa-miR-19b 及空白载体 hsa-miR-NC 分别感染亲本细胞 SGC7901, 荧光显微镜下观察发现慢病毒载体在表达特定 miRNA 的同时表达绿色荧光蛋白(图 1)。

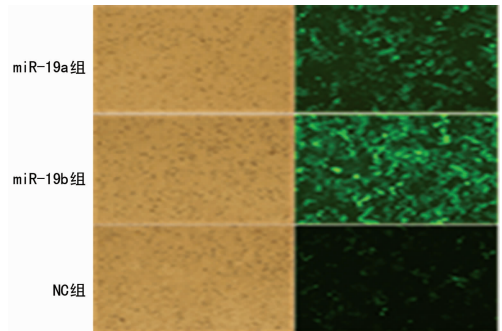


图 1 感染亲本细胞 SGC7901 后 72 h 在显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)情况($\times 10$)

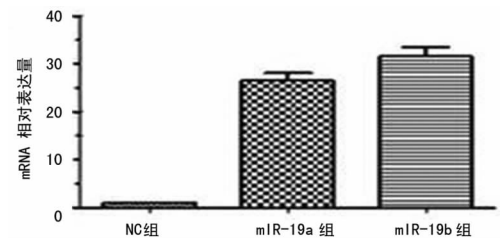


图 2 转染后 72 h RT-PCR 检测 miR-19a/b 组与 NC 组的 miRNA 表达水平差异

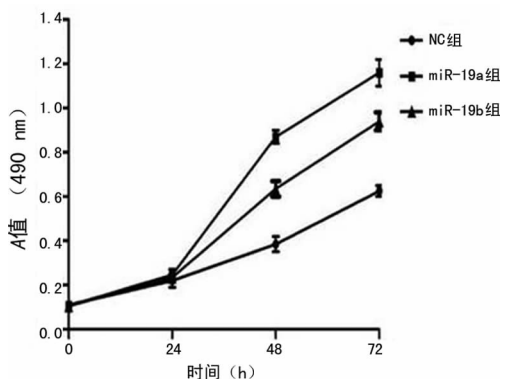


图 3 MTT 法检测不同时间段各组细胞增殖能力变化

2.2 RT-PCR 检测转染 miR-19a/b 后 miRNA 的表达变化 各组细胞转染 miR-19a/b 后提取总 RNA, 采用 Real-time-PCR 定量检测 miR-19a/b 表达情况。结果显示, 稳定转染 miR-19a/b 的细胞 miRNA 表达量与 NC 相比明显上调, 转染后 72 h 时检测 miR-19a 的 miRNA 水平较对照组增加 12.5 倍, miR-19b 的 miRNA 水平较对照组增加 15.0 倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 2。

2.3 MTT 检测细胞生长曲线 24、48、72 h 分别检测 miR-19a/b 细胞的增殖能力,结果显示转染 miR-19a 及 miR-19b 后细胞的增殖能力比 NC 组明显增高,72 h 转染 miR-19a 及 miR-19b 后细胞的增殖能力比 NC 组分别增加 2.2 倍和 1.6 倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。

2.4 平板克隆形成实验 稳定转染 miR-19a/b 后形成的克隆数明显高于 NC 组,转染 miR-19a 及 miR-19b 后细胞的克隆数与 NC 组相比分别增加 3.6 倍和 3.0 倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

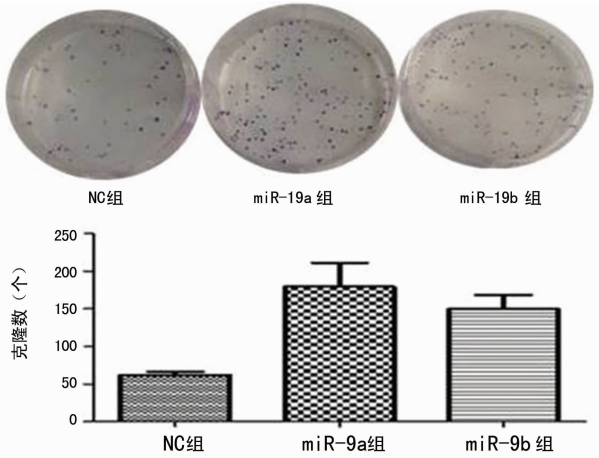


图 4 平板克隆形成实验检测 miR-19a/b 组与 NC 组相比细胞增殖能力变化

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡结果 各组细胞加入 5-FU(15 $\mu\text{g/mL}$)48 h 以后检测细胞凋亡率,转染 miR-19a 及 miR-19b 后细胞的凋亡能力与 NC 组相比分别降低 53% 和 33%,其差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

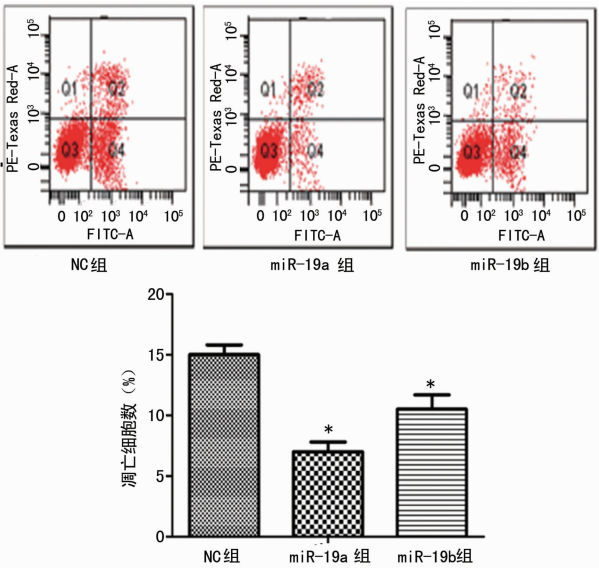


图 5 miR-19a/b 组与 NC 相比细胞凋亡情况

2.6 Western blot 检测结果 miR-19a/b 组与 NC 组相比 PTEN 蛋白水平明显降低, p-AKT、p-ERK 蛋白水平明显增加,见图 6。

2.7 58 例胃癌与癌旁组织标本中检测 miR-19a/b 的表达 结果显示 miR-19a/b 在癌组织中的表达明显高于癌旁组织,miR-19a 在癌组织的表达量是癌旁组织表达量的 3.6 倍,miR-19b 在癌组织的表达量是癌旁组织表达量的 4.5 倍,其差异有

统计学意义($P < 0.05$),见图 7。

2.8 58 例胃癌组织中 miR-19a/b 的表达与临床病理特征的关系 结果显示 miR-19a/b 的表达与年龄、性别、分化程度无关,与 TNM 分期、淋巴结转移呈负相关,见表 1。

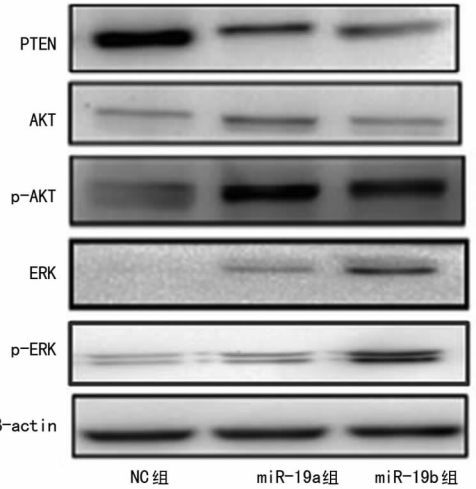


图 6 miR-19a/b 组与 NC 的 PTEN、AKT、p-AKT、ERK 及 p-ERK 的蛋白表达变化

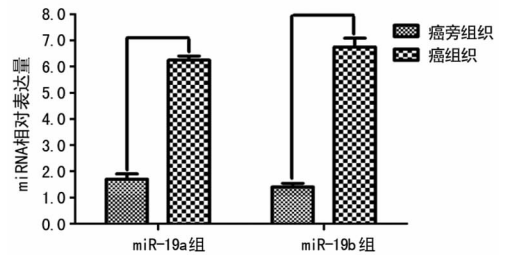


图 7 miR-19a/b 在胃癌和癌旁组织中的表达差异

表 1 胃癌组织中 miR-19a/b 的表达与临床病理特征的关系

| 项目 | 病例数 (n) | miR-19a | | miR-19b | |
|-----------|------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| | | $\bar{x} \pm s$ | P | $\bar{x} \pm s$ | P |
| 年龄(岁) | | | | | |
| ≥ 60 | 30 | 6.63 \pm 3.03 | 0.23 | 6.45 \pm 3.45 | 0.08 |
| < 60 | 28 | 5.51 \pm 4.17 | | 4.81 \pm 3.37 | |
| 性别 | | | | | |
| 男 | 47 | 6.63 \pm 2.96 | 0.27 | 6.40 \pm 3.41 | 0.30 |
| 女 | 11 | 5.45 \pm 4.12 | | 4.85 \pm 3.30 | |
| 分化程度 | | | | | |
| 高中分化 | 19 | 6.62 \pm 3.05 | 0.30 | 6.56 \pm 3.93 | 0.06 |
| 低分化 | 39 | 5.53 \pm 4.09 | | 4.71 \pm 3.29 | |
| TNM 分期 | | | | | |
| I/II | 26 | 3.29 \pm 3.51 | 0.02 | 3.87 \pm 1.95 | 0.04 |
| III/IV | 32 | 9.97 \pm 2.97 | | 6.62 \pm 4.74 | |
| 淋巴结转移 | | | | | |
| 无 | 22 | 3.51 \pm 2.78 | < 0.05 | 3.91 \pm 2.00 | < 0.05 |
| 有 | 36 | 9.44 \pm 3.33 | | 7.59 \pm 4.77 | |

3 讨 论

miRNAs 作为一种新的调节分子不仅参与生物的生长发育等多种生命过程,也可作为一种新的致癌基因或抑癌基因参

与肿瘤的发生、发展,影响肿瘤患者的预后。miRNA 的相关研究为胃癌等肿瘤的基因诊断、治疗提供了新靶点。

miR-17-92 基因簇为一种典型的含有多顺反子启动子的高度保守的基因簇,位于人染色体 13q31.3 处^[3],产生 miR-17-5p、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b-1、miR-92-1 共 6 个成熟的 miRNAs。根据基因簇成员间种子序列的不同,可将其成员分为 3 个家族,其中 miR-19 家族包括 miR-19a 和 miR-19b。

研究发现 miR-17-92 与肿瘤关系密切,具有癌基因和抑癌基因双重功能。miR-17-92 在多种恶性肿瘤如胃癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌等中过度表达^[4-5],作为致癌基因诱导肿瘤的发生。有相关文献报道,miR-17-92 在肺癌尤以进展期非小细胞肺癌中显著上调,可能通过抑制 PTEN 和 PGE2 这两个肿瘤抑制基因发挥癌基因的作用^[6]。最近有报道,miR-17-92 基因簇的成分 miR-20a 和 miR-17 在乳腺肿瘤中低水平表达,可能起到抑癌基因的作用^[7],这提示 miR-17-92 可作为肿瘤治疗的新靶点。

miR-19a/b 是 miR-17-92 基因簇中最重要的致癌 miRNAs。Zhang 等^[8]发现,miR-19a/b 负性调控靶基因的表达,与乳腺癌细胞株侵袭迁移能力呈负相关,可作为评估乳腺癌恶性程度的重要标志。Takakura 等^[9]发现,miR-19 靶向于 PTEN 发挥对甲状腺癌的促增殖作用。Ye 等^[10]研究发现,miR-19 在急性 T 淋巴细胞白血病中表达上调,可能作为癌基因发挥作用。本研究发现上调 miR-19a/b 的表达,细胞增殖能力明显增加,细胞凋亡率降低,结果表明 miR-19a/b 对胃癌细胞的增殖和凋亡有调控作用,起到癌基因的作用。

PTEN 是第一个被发现的具有磷酸酶活性的抑癌基因,调节细胞的增殖、分化、凋亡和物质代谢^[11-12],大多实体瘤中存在 PTEN 基因的突变或缺失^[13-15],被认为是一种重要的抑癌基因。如 PTEN 基因发生突变或缺失其抑癌功能将会减弱甚至丧失,最终导致肿瘤的发生、发展。对 miRNAs 的进一步研究发现很多的 miRNAs 通过靶向于 PTEN 而影响肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移、侵袭和耐药等。Liang 等^[16]报道 miR-19a/b 通过靶向于 PTEN 调节乳腺癌的多药耐药。Meng 等^[17]报道 miR-21 通过靶向于 PTEN 而影响肝细胞的生长发育,最终诱导肝癌发生。Huse 等^[18]报道了在胶质瘤患者中 miR-216 表达明显上调,并伴有 PTEN 明显下调。Yang 等^[19]报道卵巢癌细胞中 miR-214 低表达,且抑制 PTEN 的表达。

文献报道 PTEN 可负向调控包括 AKT 及 ERK 信号通路在内的多种细胞内信号传导通路,从而调节细胞的生长、发育及抑制肿瘤细胞增殖、黏附、转移。AKT 是丝/苏氨酸蛋白激酶,PI3K/AKT 信号转导通路是重要的“凋亡抑制”通路^[20]。AKT 的过度活化可以调节多种下游底物,参与调节细胞的生长、发育、分化、分裂等多种生理过程,是细胞内信号转导的枢纽分子之一。胞外信号调节激酶(ERK)是 RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路的重要成分,活化的 ERK(P-ERK)作用于其下游底物,促进多种癌基因及细胞周期调节相关基因的转录与表达,参与多种肿瘤的发生发展。

本实验表明,SGC7901 细胞转染 miR-19a/b 后 p-AKT、p-ERK 的表达水平增加,PTEN 表达水平降低,可能机制为 miR-19a/b 负向调控 PTEN 基因的表达,导致 p-AKT 及 p-ERK 的信号通路异常激活^[21-22],使细胞异常增殖及恶性转化,并促进肿瘤浸润、转移。

对 58 例石蜡包埋胃癌组织及相应癌旁组织中 miR-19a/b

的表达检测发现 miR-19a/b 在胃癌组织中过表达。在分析 miR-19a/b 表达与临床病理特征关系时,发现 miR-19a/b 的 miRNA 表达水平与年龄、性别、分化程度无关,与胃癌患者的临床分期、淋巴结转移有相关性($P < 0.05$),进一步证明了 miR-19 是成瘤基因,可能在胃癌发生、发展中起到癌基因的作用。

本研究发现,miR-19a/b 通过 PTEN/AKT/ERK 通路促进胃癌细胞增殖,降低细胞凋亡;通过临床组织标本检测发现 miR-19a/b 与胃癌临床分期及转移密切相关。以上实验表明 miR-19a/b 有望成为胃癌治疗的一个潜在干预靶点,并可作为诊断和基因治疗提供依据,为开发新的抗肿瘤药物及指导临床治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Archie V, Kauh J, Jones DV, et al. Gastric cancer: standards for the 21st century[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 57(2): 123-131.
- [2] 邹文斌, 李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2014, 4(4): 408-415.
- [3] Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(9): 3087-3095.
- [4] Petrocca F, Visone R, Onelli MR, et al. E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer[J]. Cancer Cell, 2008, 13(3): 272-286.
- [5] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2257-2261.
- [6] Krysan K, Kusko R, Grogan T, et al. PGE2-driven expression of c-Myc and oncomiR-17-92 contributes to apoptosis resistance in NSCLC[J]. Mol Cancer Res, 2014, 12(5): 765-774.
- [7] Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation[J]. Cancer Res, 2005, 65(21): 9628-9632.
- [8] Zhang X, Yu H, Lou JR, et al. MicroRNA-19 (miR-19) regulates tissue factor expression in breast cancer cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(2): 1429-1435.
- [9] Takakura S, Mitsutake N, Nakashima M, et al. Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells[J]. Cancer Sci, 2008, 99(6): 1147-1154.
- [10] Ye H, Liu X, Lv M, et al. MicroRNA and transcription factor co-regulatory network analysis reveals miR-19 inhibits CYLD in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(12): 5201-5214.
- [11] Maehama T. PTEN: its deregulation and tumorigenesis[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(9): 1624-1627.
- [12] 薛鹏, 周翡, 李宁, 等. 胃癌中 PTEN 和 p-AKT 蛋白的表达及其临床意义与预后分析[J]. 肿瘤, (下转第 4759 页)

成熟^[4]。Bhoopathi 等^[5]发现 Hes1 基因表达可以显著促进内源性 Stat3 的酪氨酸磷酸化水平,并且在表皮生长因子诱导下,Hes1 基因的表达使得 Stat3 更易转运进入细胞核,增加 DNA 与 Stat3 的结合活性。在作者前期研究中,同样发现作为 Notch1 信号通路靶基因,Hes1 通过类似途径促进 Stat3 磷酸化,从而激活 SAFE 信号通路,发挥强大的心肌保护作用。Hes1 无特异性抑制剂,特异性抑制 Hes1 并非易事,因此利用 RNAi 技术,针对特定 Hes1 蛋白构建相应干扰载体,可达到特异性抑制 Hes1 的作用。

RNA 干扰技术是一种由内源性或者外源性双链 DNA 介导的转录后水平的基因沉默技术^[6-7]。短发卡 RNA(short-hairpin RNA,shRNA)是根据 siRNA 设计的类似双链结构的 RNA,相比于 siRNA,其在随载体进入细胞时具有更高的内在稳定性,并且 shRNA 在细胞内可以由单个模板快速合成大量的 shRNA,其沉默作用更加持久^[8]。目前,用于目的基因转移的病毒载体主要包括腺病毒、腺相关病毒、反转录病毒和慢病毒载体^[9]。与其他基因载体系统相比,腺病毒载体具有宿主范围广、可感染静止及分裂期细胞、感染率高、靶细胞内多拷贝高效表达,理化性质稳定,遗传毒性较低,包装容量大及不整合等优点,已在基因载体领域应用广泛^[10]。因考虑后期研究涉及细胞及动物实验,对病毒感染效率要求高,因此作者采用腺病毒载体系统构建 Hes1 干扰载体。

在 Ad-Hes1-shRNA 构建过程中,作者先用合成 3 对 Hes1-shRNA 的寡核苷酸,退火形成双链后利用定向克隆技术,构建 HBAAd-U6-CMV-Hes1-shRNA,再与 pHBAAd-BHG 共转染 293T 细胞进行病毒包装,细胞出毒后收集第一代(P1)毒液,并以此为毒种进行第二代(P2)出毒及大量病毒扩增,病毒滴度测定后,再感染 H9c2 心肌细胞,以筛选干扰效果最佳的 Ad-Hes1-shRNA,从而为 Hes1 对缺血心肌细胞保护作用的机制研究奠定了实验基础。

参考文献

[1] Tian C, Tang YJ, Wang TT, et al. HES1 is an Independent prognostic factor for acute myeloid leukemia[J]. *Onco*

Targets Ther, 2015, 8(10):899-904.

- [2] Zhou XL, Wan L, Xu QR, et al. Notch signaling activation contributes to cardioprotection provided by ischemic preconditioning and postconditioning [J]. *J Transl Med*, 2013, 11(1):251.
- [3] Liu ZH, Dai XM, Du B. Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(3):353-359.
- [4] Rochais F, Dandonneau M, Mesbah K, et al. Hes1 is expressed in the second heart field and is required for outflow tract development [J]. *PLoS One*, 2009, 4(7):e6267.
- [5] Bhoopathi P, Chetty C, Dontula RA, et al. SPARC stimulates neuronal differentiation of medulloblastoma cells via the notch1/STAT3 pathway [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(14):4908-4919.
- [6] Sarisozen C, Salzano G, Torchilin VP. Recent advances in sirna delivery [J]. *Biomol Concepts*, 2015, 6(4):321-341.
- [7] Karlsson C, Rak J, Larsson J. RNA interference screening to detect targetable molecules in hematopoietic stem cells [J]. *Curr Opin Hematol*, 2014, 21(4):283-288.
- [8] Tan PH, Yu SW, Lin VC, et al. RNA interference-mediated gene silence of the NR1 subunit of the NMDA receptor by subcutaneous injection of vector-encoding short hairpin RNA reduces formalin-induced nociception in the rat [J]. *Pain*, 2011, 152(3):573-581.
- [9] Liu YP, Berkhout B. miRNA cassettes in viral vectors: problems and solutions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1809(11/12):732-745.
- [10] Janssen JM, Liu J, Skokan J, et al. Development of an AdEasy-based system to produce first- and second-generation adenoviral vectors with tropism for CAR- or CD46-positive cells [J]. *J Gene Med*, 2013, 15(1):1-11.

(收稿日期:2016-07-20 修回日期:2016-09-08)

(上接第 4756 页)

2012, 32(4):281-285.

- [13] Kolasa IK, Rembiszewska A, Janiec-Jankowska A, et al. PTEN mutation expression and LOH at its locus in ovarian carcinomas [J]. Relation to TP53, K-RAS and BRCA1 mutations. *Gynecol Oncol*, 2006, 103(2):692-697.
- [14] Zhu L, Loo WT, Louis WC. PTEN and VEGF: possible predictors for sentinel lymph node micro-metastasis in breast cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2007, 61(9):558-561.
- [15] Schmitz M, Grignard G, Margue C, et al. Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(6):1284-1292.
- [16] Liang Z, Li Y, Huang K, et al. Regulation of miR-19 to breast cancer chemoresistance through targeting PTEN [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(12):3091-3100.
- [17] Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer [J]. *Gastroenterology*,

2007, 133(2):647-658.

- [18] Huse JT, Brennan C, Hambarzumyan D, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(11):1327-1337.
- [19] Yang H, Kong W, He L, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(2):425-433.
- [20] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K-Akt 信号通路及肿瘤细胞凋亡关系的研究进展 [J]. *癌症*, 2008, 27(3):331-336.
- [21] Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma [J]. *Oncogene*, 2003, 22(20):3113-3122.
- [22] Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(22):13375-13378.

(收稿日期:2016-07-18 修回日期:2016-09-06)