

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.03.007

rAAV-Slug-siRNA 载体的构建及其抗胰腺癌的实验

崔海宁,余壮明,于飞,顾冠宏

Construction and Identification of Recombinant Adeno-associated Virus-2 Expression Vector Mediated Slug-siRNA and Its Effect on Growth of Pancreatic Cancer

CUI Hai-ning, YU Zhuang-ming, YU Fei, GU Guan-hong

Department of General Surgery, The Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 517010, China

Abstract: Objective To conduct a recombinant adeno-associated virus-2 carrying Slug-siRNA (rAAV2-Slug-siRNA), and to study the effect and mechanism of Slug-siRNA on AsPC-1 cells. **Methods** The targeting sequence of Slug gene which can be effectively silenced in RNA interference was confirmed in our previous study. The DNA containing both sense and antisense Oligo DNA fragments of the targeting sequence was designed, synthesized and cloned into the pDC316-EGFP vector. The insert was confirmed by PCR and sequencing. EGFP-Slug-siRNA sequence was amplified and PCR product was obtained by *EcoR* I and *Sal* I digestion. pSNAV2.0-lacZ- α plasmids was digested, and ligated with EGFP-Slug-siRNA. Transformation of DH5 α with recombinant plasmids and identification of bacterial colonies containing recombinant plasmids by LB-agar plate were conducted, and pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA were extracted purified and verified. pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA was transfected into BHK cells by means of lipofectamine. Using G418 Selection from mixed cells, BHK-Slug-siRNA was isolated, which was capable of Slug-siRNA expression, and was subsequently infected with recombinant herpes simplex virus1(HSV1-rc/ Δ UL2), which was able to pack the rAAV2-Slug-siRNA to form a functional and infectious virus. After purification, the packaged rAAV2-Slug-siRNA was obtained. Western blot and RT-PCR methods was used to detect the expression of slug and PUMA after being infected AsPC-1 cells by Slug-siRNA for 48h, MTT and Annexin V/EGF methods was used to detect inhibition rate and apoptosis of AsPC-1 cells. **Results** The recombinant adeno-associated virus-2 vector carrying Slug-siRNA was constructed successfully, using RT-PCR and restriction enzyme digestion, the destination gene was detected. BHK-Slug-siRNA was subsequently infected with recombinant herpes simplex virus1(HSV1-rc/ Δ UL2) able to pack the rAAV2-Slug-siRNA to form a functional and infectious virus. The recombinant viral titer was 9.23×10^{10} (puf). Slug-siRNA inhibited the expression of Slug, at the same time, the proliferation of AsPC-1 cells was suppressed and the apoptosis was increased, significantly. Otherwise, with the decrease of Slug, the expression of PUMA was increased. **Conclusion** The constructed, high titer, recombinant adeno-associated virus-2 vector carrying Slug-siRNA was constructed successfully. RNAi-mediated Slug gene with rAAV silencing could transfect to pancreatic cancer cells and silence Slug effectively and selectively, which resulted in the growth and proliferation inhibition in pancreatic cancer cells. The mechanism of Slug silencing in the growth and proliferation inhibition may be through upregulating expression of PUMA.

Key words: Slug gene; Small interfering RNA; Recombinant adeno-associated virus; Pancreatic cancer; Apoptosis

摘要:目的 构建并制备携带目的基因的 rAAV-EGFP-Slug-siRNA(Slug-siRNA)病毒载体,探讨 Slug 干扰抗胰腺癌作用。**方法** 首先构建 pDC316-EGFP-Slug-siRNA 质粒,以 PCR 鉴定正确的 pDC316-EGFP-Slug-siRNA 克隆为模板扩增 EGFP-Slug-siRNA 片段,*EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切回收 PCR 产物;

收稿日期:2009-10-12;修回日期:2010-06-07

作者单位:517010 海口,海南医学院附属医院普外科

作者简介:崔海宁(1969-),男,硕士在读,主治医师,主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究

酶切 pSNAV2.0-lacZ- α 载体质粒,并与上述产物进行连接;转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,得到重组质粒 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA,酶切和测序对其进

行鉴定。建立载体细胞株 BHK/Slug-siRNA, 大规模制备 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 并对其纯化、鉴定和滴度测定。将体外培养的胰腺癌细胞株 AsPC-1 转染 Slug-siRNA 和 pSNAV2.0-EGFP 空载体。Western blot 及 RT-PCR 方法鉴定转染前后 AsPC-1 细胞内 PUMA 及 Slug 蛋白及 mRNA 表达, MTT 比色法检测细胞存活率, TUNEL 检查细胞凋亡。**结果** 携带编码靶向 Slug 的小发夹状干扰 RNA 序列的腺相关病毒载体质粒 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA, 经 PCR、酶切和测序鉴定, 质粒构建正确。将构建成功的载体质粒与重组 I 型单纯疱疹病毒 HSV1-rc/ Δ UL2 共转染包装细胞 BHK-2, 成功复制和包装出重组腺相关病毒 Slug-siRNA, 经检测目的片段插入成功, 滴度为 9.23×10^{10} (puf)。Slug-siRNA 有效抑制 AsPC-1 细胞内 Slug 表达, 抑制体外细胞增殖, 促进细胞凋亡, 同时, 伴随着 Slug 表达的下降, 细胞内 PUMA 表达明显增加。**结论** 成功制备出高滴度携带目的基因的 Slug-siRNA 病毒载体。干扰 Slug 表达抑制胰腺癌细胞增殖, 促进细胞凋亡, 其机制可能通过解除 Slug 对 PUMA 基因的抑制有关。

关键词: Slug; 小干扰; 腺相关病毒; 胰腺癌; 凋亡

中图分类号: R73-3; R735.9 **文献标识码:** A

文章编号: 1000-8578(2011)03-0265-05

0 引言

Slug 是转录因子 Snail 家族中编码锌指蛋白的基因, 并在多种恶性肿瘤细胞中过度表达。Pérez-Mancera 等^[1]报道了 Slug 转染可诱导实验鼠恶性间充质细胞瘤的发生(如白血病、肉瘤), 说明 Slug 高表达与肿瘤发生有关。Hotz 等^[2]最近报道, Slug 在 AsPC-1、Capan-1 等高转移特性的胰腺癌细胞及转移性胰腺癌组织中高表达, 而在正常胰腺组织及非转移胰腺癌组织中无表达或低表达, 提示 Slug 与胰腺癌的发生、发展有关。

Wu 等^[3]发现, Slug 是 PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) 的强烈抑制基因, 干扰 Slug 可解除 Slug 对 PUMA 的抑制。有研究发现^[4], AsPC-1 细胞内 PUMA 蛋白表达明显降低, 恢复 AsPC-1 内 PUMA 表达后, AsPC-1 细胞及其裸鼠皮下移植瘤的增殖明显被抑制。我们推测, 高表达 Slug 的胰腺癌细胞可能抑制了 PUMA 基因的表达, 从而拮抗了 PUMA 的促凋亡作用, 因此, 抑制 Slug 基因表达后, 可解除对 PUMA 的抑制, 发挥 PUMA 的作用。

基于以上系列研究基础, 我们拟构建 rAAV-siRNA-Slug 载体干扰 AsPC-1 细胞内 Slug 基因表达, 研究 Slug 干扰对胰腺癌细胞的作用, 并探讨 Slug 干扰的作用是否与 PUMA 功能的恢复有关。

1 材料和方法

1.1 主要材料

AsPC-1 购自中科院上海细胞所, 细胞用含 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养, 细胞培养条件为 37°C 恒温、5% CO₂ 饱和湿度, 指数生长的细胞为实验对象。腺病毒 E1 区转化人胎肾细胞株 HEK293 购自 STRATAGENE 公司, 常规培养于含 10% 的胎牛血清完全培养液 DMEM 培养液中, 培养条件为 37°C、CO₂ 浓度为 5%, 根据细胞生长情况, 每 2~3 天用 0.25% 的胰酶消化, 进行传代培养。

pDC316-EGFP 载体质粒、pSNAV2.0-LacZ- α 载体质粒、pSNAV2.0-EGFP-si-cdc2-U6 质粒、HSV1-rc/ Δ UL2 购自北京元阳基因公司、金黄地鼠胚胎肾细胞 BHK-21 (ATCC)、*Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Sal* I、*Pyrob*est 酶购自 Takara 公司、感受态大肠杆菌 DH5 α 购自武汉晶赛生物工程技术公司、限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、T4 连接酶为 Promega 公司产品, Slug 多克隆抗体及 G3PDH 抗体为 Santa Cruz 公司产品、二抗为北京中山公司产品, LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品。其他试剂和材料来源文献^[4-6]。

1.2 pDC316-EGFP-Slug-siRNA 质粒构建及鉴定

根据 GenBank 中 Slug 的基因序列设计, siRNA 靶点, sense: 5'-gatccgcaaatgtaccaatgatattcaag agatatcattgggtacattgtcttttta-3', antisense: 5'-agcttaaaaaagcaaatgtaccaatgatattctctggaatcattgggtacattgctgG-3' 序列最有效。在序列的上游加入 *Bam*H I 位点, 下游加入 *Hind* III 位点, 双链退火。酶切 pDC316-EGFP-U6 质粒, 回收酶切片段; 连接、转化感受态大肠杆菌 DH5 α ; PCR 鉴定 pDC316-EGFP-Slug-siRNA 质粒。

1.3 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA 构建

PCR 扩增 EGFP-Slug-siRNA 片段, 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 40 s, 共 30 个循环, 72°C 5 min。产物经 1% 琼脂糖凝胶 10V/cm 电泳, 回收目的 DNA 片段。*Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切回收的 PCR 产物, 37°C 水浴酶切 3 h。酶切 pSNAV2.0-lacZ- α 载体质粒, 并与前面的产物进行连接, 转化细菌, 然后对构建的质粒进行 PCR、酶切和测序鉴定。

1.4 载体细胞株 BHK/Slug-siRNA 的建立

将 2×10^5 金黄地鼠肾细胞 BHK-2 接种至六孔板中, 含 10% FBS 的 RPMI1640 培养液。37°C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h 后待细胞长满至 90%。用无血清 RPMI1640 培养液洗细胞两次。同时用无血清 Opti-MEM[®] I 培养液分别稀释 5 μ g pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA 质粒及 10 μ l LipofectamineTM 2000 至 250 μ l, 室温孵育 5 min 后将两者轻轻混合, 室温下静置 20 min。将上述 DNA-脂质体混合液滴

加至细胞上,轻轻混匀。37℃、5%CO₂ 饱和湿度培养 5 h。弃转染液,加入 2 ml 含 15%FBS 的 RPMI1640 培养液继续培养 24 h。细胞按 1:4 传代,加 800 μg/ml G418 选择培养。待抗性细胞克隆形成并生长至孔底面积的 1/2 左右时,用胰酶消化,继续用 G418 选择培养直至细胞长满。传代后换用不含 G418 的培养液。将此混合细胞株命名为 BHK/Slug-siRAN。

1.5 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 的大规模制备

将 BHK/Slug-siRNA 移至转瓶培养,培养液为每个转瓶 200 ml 含 15%FBS 的 RPMI1640 培养液。细胞长满后(约为 8×10⁸ 个细胞)将培养液倾出,加 HSV1-rc/ΔUL2(MOI = 1.0),低速转动吸附病毒 2 h。每个转瓶加 200 ml 无血清 RPMI1640 培养液 37℃低速转动培养。24 h 后将每个转瓶中的液体弃去 100 ml,继续培养 24 h,待细胞完全病变、容易脱落。盖紧瓶盖剧烈振摇,将瓶壁上的细胞全部洗脱至培养液中,2 000 r/min 离心 10 min 去细胞碎片,所得病毒命名为 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA。上清液分装至 500 ml 的三角烧瓶中,250 ml/瓶,进行下一步纯化。

1.6 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 的纯化

将收集的上清液加入 25 ml 的氯仿,置于 37℃ 摇床中剧烈振摇 1h。加入终浓度为 1M 的固体氯化钠,振摇溶解,4℃,12 000 r/min 离心 15 min。弃氯仿和沉淀,取上层水相,加终浓度为 1μM NaCl (w/v)PEG8000,振摇溶解,冰浴 1h,11 000 r/min 离心 15 min。弃上清液,用 5 ml PBS 将离心管管底和管壁上的沉淀吹打洗脱下来分装至 1.5 ml 塑料离心管中(0.6 ml/管)。加入终浓度为 1 μg/ml 的 DNase 和 RNase,室温消化 30 min。加等体积的氯仿,4℃,12 000 r/min 离心 5 min。无菌操作下小心吸出上层水相,即为浓缩和纯化的 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 病毒液。

取 10 μl rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 病毒样品,煮沸 5 min,冰浴。扩增条件:94℃ 5min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 40 s,共 30 个循环;72℃ 7 min;4℃ 维持。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶 10V/cm 电泳,紫外成像。Slug 和 PUMA mRNA 检测参见文献^[4,7]。rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 滴度测定按照文献^[4]进行。

1.7 MTT 测定

三组处理细胞在 12、24、36、48 h 各时间点取每组细胞进行下述步骤,每组设 3 个复孔。加入 5 mg/ml 的 MTT 液(20 μl/孔),继续培养 4 h,培养条件同前。吸出孔内培养液后,加入 DMSO 液(150 μl/孔),将培养板置于微孔板振荡器上振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪检测各孔 A₅₇₀ 值,绘制连续 5d 的细胞生长曲线。

1.8 Annexin V/EGF 双染检测凋亡

收集 12、24、36、48 h 的三组细胞,每组设三个复孔。用去离子水按 1:4 稀释结合缓冲液。用 4℃ 预冷的 1×PBS 洗细胞两次,用 250 μl 结合缓冲液重悬细胞,调节其浓度为 1×10⁶/ml。取 100 μl 的细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V/FITC 和 10 μl 的 PI(20 μg/ml)溶液。混匀后于室温避光孵育 15 min。在反应管中加入 400 μl PBS,混匀,流式细胞仪(FACS)分析,激发光波长用 488 nm,用一波长为 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光,另一波长大于 560 nm 的滤器检测 PI。

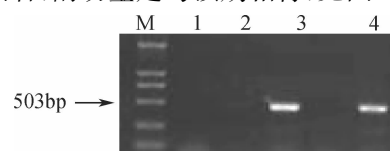
1.9 统计学方法

采用 SAS 9.0 统计软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数的比较采用 SNK-*q* 检验或配对 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同质粒的鉴定结果

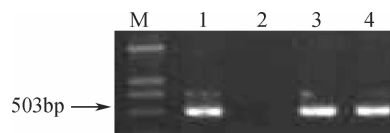
PCR 鉴定 pDC316-EGFP-Slug-siRNA 和 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA PCR 质粒均能获得 503bp 的条带,结果与预期相符,见图 1、2。pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA 质粒经 *Sma* I 酶切能获得 4 810bp + 1 113bp + 1 009bp + 768bp + 692bp 的条带,经 *Sal* I + *Eco*R I 酶切获得 7.1kb 和 1.38kb,从电泳图看,酶切鉴定与预期相符,见图 3。



M:DL2000 marker; 1:negative control; 2~4:PCR product

图 1 pDC316-EGFP-Slug-siRNA PCR 鉴定

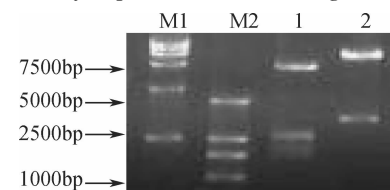
Figure 1 Analysis pDC316-EGFP-Slug-siRNA by PCR



M:DL2000 marker; 2:negative control; 1,3,4:PCR product

图 2 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA PCR 鉴定

Figure 2 Analysis pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA by PCR

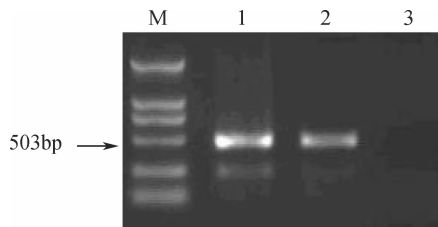


M1:DL15000 marker;M2:DL2000 marker;1:*Sma* I for pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA; 2:*Sal* I + *Eco*R I for pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA

图 3 pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA 酶切鉴定

Figure 3 Analysis pSNAV2.0-EGFP-Slug-siRNA by restriction enzyme digestion

对 pSNAV2. 0-EGFP-Slug-siRNA 测序发现, 所测结果与设计的 shRNA 转录模板序列完全相同, 证实编码 shRNA 的序列已完全正确的插入载体中。用 RNAi-ID-F 和 RNAi-ID-R 引物对 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 进行 PCR 测定应能特异性扩增出 503bp 左右的 EGFP-Slug-siRNA-U6 片段, 电泳证明该重组腺相关病毒携带目的基因 EGFP-Slug-siRNA, 见图 4。经测定, rAAV2-EGFP-Slug-siRNA 的滴度为 9.23×10^{10} (puf), 能够满足体内实验需要。



M: DNA Marker; 1: experimental group; 2. negative control; 3: blank control

图 4 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA PCR 鉴定

Figure 4 Analysis pSNAV2. 0-EGFP-Slug-siRNA by PCR

2.2 Slug 蛋白及 mRNA 表达的检测

空白对照组 AsPC-1 细胞内 Slug 蛋白和 mRNA 表达明显, 细胞转染 Slug-siRNA 48h 后, 细胞内 Slug 蛋白和 mRNA 表达明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Neg-siRNA 转染组 Slug 蛋白和 mRNA 无明显改变, 说明实验组细胞内 Slug 被抑制。

2.3 PUMA 蛋白及 mRNA 表达的检测

空白对照组 AsPC-1 细胞内 PUMA 蛋白和 mRNA 表达较弱。细胞转染 Slug-siRNA 48h 后, 细胞内 PUMA 蛋白和 mRNA 表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Neg-siRNA 转染组 PUMA 蛋白和 mRNA 表达无明显改变。

2.4 MTT 检测

空白对照和 Neg-siRNA 两组细胞生长能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而实验组的生长能力较低, 细胞增殖明显滞后于前两组细胞, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 Annexin V/EGF 双染检测凋亡

实验组细胞的凋亡率逐渐增高。而阴性对照组和空白对照组细胞的凋亡率尽管也增高, 但增高幅度较小, 与实验组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但阴性对照组和空白对照组之间细胞凋亡率的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

胰腺癌具有隐匿性和高度侵袭性特点, 因此早期即可发生转移, 而胰腺癌早期症状不典型, 确诊时大多已处于晚期, 大多数患者是外科手术不能治愈的, 3 年生存率不足 10%, 5 年生存率低于 5%, 迄今为止, 胰腺癌仍然是临床治疗最为困难的消化道恶性肿瘤之一^[8]。胰腺癌对目前的手术、化疗和放疗等治疗方法效果不佳, 因此对基因治疗给予了厚望。

分子靶向是针对肿瘤细胞里面的某一个蛋白质分子、一个核苷酸的片段或者一个基因产物进行治疗。它利用肿瘤组织或细胞所具有的特异性结构分子作为靶点, 使用某些能与这些靶分子特异结合的抗体、配体等达到直接治疗或导向治疗目的^[9]。分子靶向治疗是以病变细胞为靶点的治疗, 相对于手术、放化疗三大传统治疗手段更具有“治本”功效。人类基因组计划和人类癌症基因组解剖计划以及高通量技术的应用(包括基因芯片及蛋白质芯片技术等), 在短短的数年内分离和鉴定了大量的靶分子, 许多靶点药物已进入临床前和临床研究。但是, 靶点药物中只有少数药物对某些肿瘤效果显著。分子靶向药物对胰腺癌的治疗作用不明显, 塞来昔布是靶向 COX-2 的药物, 目前与吉西他滨联合治疗的 II 期临床试验, 只有 17% 的患者获部分缓解。肿瘤分子靶向治疗虽然取得了一定的疗效, 但面临更多的是挑战: 疗效差, 只有 10% 左右患者取得客观反应; 有效期不长, 需持续不断用药, 停药复发进展; 所有靶向药物缓解时间有限; 靶向药物不可能完全选择性作用于肿瘤细胞, 不可能对机体没有毒性; 临床前及临床开发研究成本高昂。除此之外, 目前大部分肿瘤的分型学分子仍不健全或空白, 但分子靶向治疗超前于分子分型诊断。上述存在的各种原因使靶向药物的应用受到了限制。

基因治疗是肿瘤靶向治疗的重要策略之一, 基因靶向治疗就是将影响肿瘤细胞生长或恶性表型的关键基因靶向导入特定的组织细胞中, 并在细胞中靶向表达, 从而最大限度地杀伤肿瘤细胞, 而不损伤正常细胞。因此, 寻找理想的靶基因是肿瘤基因治疗的前提。目前有 70% 的基因治疗已开始进行临床试验, 但目前仅有 I/II 期临床试验的结果证实其安全有效, 极少 III 期临床试验资料^[10]。

Pérez-Mancera 等^[1]报道, 转染 Slug 基因可导致实验鼠肿瘤的发生。由此推测, 抑制 Slug 基因表达可能抗肿瘤作用。Hotz 等^[2]最近报道, Slug 在正常胰腺组织中无表达, 而在胰腺癌组织中的阳性表达率为 50%, 浸润转移的组织中 Slug 表达更明显, 所以, 胰腺癌发生发展与 Slug 上调有关, 干扰 Slug

表达可能起到抗胰腺癌作用。

抑制基因表达有多种方法, RNA 干扰可使突变基因稳定沉默, 而不影响正常基因的表达, 且具有简易性、特异性及高效性的特点, 在肿瘤的研究及治疗上有着无可比拟的优势。但将 RNAi 技术应用于肿瘤基因治疗仍存在着难题, 其中最关键的环节就是如何高效地将 siRNA 导入靶组织或细胞使之发挥长期、稳定的抑制作用。rAAV 对于肿瘤的基因治疗是理想的载体: 对人体无毒害作用, 免疫反应小, 有效转导非分裂细胞, 它可携带较短的基因序列, 可定点整合至人的 19 号染色体上, 产生长期基因表达, rAAV 自身具有抗肿瘤活性。rAAV 是一种用于基因治疗的安全而有效的病毒载体, 它的专一性强, 对肿瘤细胞有嗜性, 近年来已成为肿瘤治疗领域中很有希望的方法。

基于上述理论, 本实验构建了携带编码靶向 Slug 的小发夹状干扰 RNA 序列的腺相关病毒载体质粒 pSNAV2. 0-EGFP-Slug-siRNA, 经 PCR、酶切和测序鉴定, 质粒构建正确。pSNAV2. 0-EGFP-Slug-siRNA 质粒全长 8 496bp。将构建成功的载体质粒与重组 I 型单纯疱疹病毒 HSV1-rc/ Δ UL2 共转染包装细胞 BHK-2, 成功复制和包装出重组腺相关病毒 rAAV2-EGFP-Slug-siRNA, 经检测目的片段插入成功, 滴度为 9.23×10^{10} (puf)。

我们进一步检测了 Slug 基因表达抑制后对体外培养的胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响, 结果表明, 干扰 Slug 表达后, 可明显抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。由于 Slug 是 PUMA 的抑制基因, 而 PUMA 明显促进胰腺癌细胞增殖, 为验证 Slug 干扰是否与解除对 PUMA 的抑制有关, 我们检测了 PUMA 的表达。结果发现, 随着 Slug 表达的抑制, PUMA 表达逐渐增加。实验表明, Slug 干扰后的细胞增殖抑制作用与 Slug 解除对 PUMA 的抑制相关。

本实验证实, 干扰 Slug 表达可解除 Slug 对 PUMA 基因的抑制, 抑制胰腺癌增殖, 因此, Slug 是胰腺癌基因治疗的有效靶点, 该研究为胰腺癌的基因治疗提供了理论和实践基础。

参考文献:

- [1] Pérez-Mancera PA, González-Herrero I, Pérez-Caro M, et al. SLUG in cancer development [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (19): 3073-3082.
- [2] Hotz B, Arndt M, Dullat S, et al. Epithelial to mesenchymal Transition: expression of the regulators snail, slug and twist in pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (16): 4769-4776.
- [3] Wu WS, Heinrichs S, Xu D. Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma [J]. *Cell*, 2005, 123(4): 641-653.
- [4] 张克君, 李德春. p53 正向凋亡调节因子(PUMA)重组腺病毒载体的构建及对体内外胰腺癌增殖的影响 [J]. *中华微生物学与免疫学杂志*, 2009, 25(1): 109-114.
- [5] 张克君, 李德春, 朱新国, 等. 外源野生型 p53 正向细胞凋亡调控因子基因对人胰腺癌细胞生长的作用 [J]. *中华消化杂志*, 2006, 26(11): 778-779.
- [6] 莫小虹, 张克君, 李德春. PUMA 对胰腺癌增殖的影响及机制的探讨 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 12(8): 123-125.
- [7] Vannini I, Bonafe M, Tesi A, et al. Short interfering RNA directed against the SLUG gene increases cell death induction in human melanoma cell lines exposed to cisplatin and fotemustine [J]. *Cell Oncol*, 2007, 29(4): 279-287.
- [8] Löhr JM. Medical treatment of pancreatic cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2007, 7(4): 533-544.
- [9] Ko EC, Wang X, Ferrone S. Immunotherapy of malignant diseases. Challenges and strategies [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003, 132(4): 294-309.
- [10] Bhattacharyya M, Lemoine NR. Gene therapy developments for pancreatic cancer [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2006, 20(2): 285-298.

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]