

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)05-0473-04

慢病毒和质粒作为 shRNA 载体沉默人卵巢癌 RhoA 基因效果的比较

杨文娟¹, 康佳丽^{1*}, 王小霞¹, 刘启才², 聂妙玲¹¹广州医学院附属广州市第一人民医院妇产科, 广东 广州 510180; ²广州医学院中心实验室, 广东 广州 510182)

[摘要] 目的 研究慢病毒和质粒作为 RNA 干扰载体在沉默卵巢癌 RAS 同源基因家族成员 A (RhoA) 基因表达方面的差异。方法 分别将慢病毒及质粒载体携带的针对 RhoA 基因的 siRNA 序列感染或转染卵巢癌 HO8910 细胞, 经过嘌呤霉素筛选建立稳定沉默 RhoA 基因的细胞株。通过荧光显微镜观察、实时荧光定量 PCR、Western blot 法、血管形成实验、细胞划痕实验研究两种载体随着细胞培养代数的增加在抑制卵巢癌 RhoA 基因表达及侵袭和转移能力上的差异。结果 采用质粒载体及慢病毒载体分别建立人 RhoA 基因稳定沉默卵巢癌细胞株, 通过荧光显微镜观察, 质粒组细胞绿色荧光蛋白的表达率随培养代数的增加而下降; 第 15 代、第 25 代时表达率分别为 70%、45%, 而慢病毒组细胞绿色荧光蛋白表达率维持在 95% 以上, 实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法发现质粒组和慢病毒组细胞在第 3 代时 RhoA mRNA 及蛋白的表达无明显差异; 随培养代数的增加, 慢病毒组 RhoA mRNA 及蛋白持续低表达, 而质粒组 RhoA mRNA 及蛋白的表达逐渐增高; 细胞划痕实验及血管形成实验表明慢病毒较质粒作为载体介导 siRNA 对 RhoA 基因沉默更能持续稳定地抑制卵巢癌细胞的侵袭、转移 ($P < 0.05$)。结论 慢病毒较质粒作为载体介导 RNA 干扰能更好沉默目标基因的表达。

[关键词] 慢病毒; 质粒; RNA 干扰; RhoA 基因; 卵巢癌; 侵袭和转移

[中图分类号] R392-33, Q782 **[文献标志码]** A

Comparison between lentivirus and plasmid as shRNA vector targeting RhoA gene of ovary cancer cell line HO8910

YANG Wenjuan¹, KANG Jiali^{1*}, WANG Xiaoxia¹, LIU Qicai², NIE Miaoling¹¹Department of Gynaecology and Obstetrics, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou 510180; ²Central Laboratory, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China

[Abstract] **Objective** To compare the different effects of lentivirus and plasmid as shRNA vector targeting RAS homologue gene-family member A (RhoA) of ovary cancer cell line HO8910. **Methods** Lentivirus and plasmid vectors carrying siRNA targeting RhoA gene were respectively transferred into HO8910 cells. The transferred cells were screened with puromycin for the ones stably silencing RhoA gene. As passaging went on, the two types of vectors were compared in the ability of silencing RhoA gene expression by means of fluorescence microscopy, real-time quantitative PCR and Western blotting, and in the inhibitory effects on the invasion and metastasis of cells by scratch wound migration assay and tube formation assay. **Results** Two groups of stable RhoA-knockdown cell lines were established with lentivirus and plasmid as RNAi vectors, respectively. Detected by fluorescence microscopy, the expression rate of GFP decreased in the plasmid group as the culture generation increased; it was 70% and 45% at the 15th and 25th generations respectively. The expression rate of GFP in the lentivirus group maintained above 95%. Both real-time quantitative PCR and Western blotting indicated that the expression of RhoA mRNA and protein had no significant difference in the two groups at the 3rd generation; but as the culture generation increased, the expression of RhoA mRNA and protein in the lentivirus group kept at the lower level, while it increased in the plasmid group. The scratch wound migration assay and tube formation assay revealed that lentivirus as RNAi vector suppressed more stably and persistently the invasion and metastasis of ovary cancer cell line HO8910 as compared with the plasmid group ($P < 0.05$). **Conclusion** Lentivirus as RNAi vector can suppress the RhoA gene expression more stably as compared with the plasmid; the plasmid is more suitable for transient transfection studies.

[Key words] lentivirus; plasmid; RNAi; RhoA gene; ovary cancer; invasion and metastasis

收稿日期: 2012-12-07; 接受日期: 2013-01-06

基金项目: 广东省科技计划资助项目(2010B031600185)

作者简介: 杨文娟(1986-), 女, 安徽合肥人, 硕士研究生

Tel: 020-81048209; E-mail: ywjshiharen@126.com

*Corresponding author, 康佳丽, E-mail: kangjiali1961@21cn.com

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是在转录后 mRNA 水平阻断相应基因表达的一种基因沉默技术^[1],在基因功能研究、基因治疗方面显示了良好的前景^[2],质粒载体及病毒是进行 RNA 干扰的常用工具,然而,关于这两种载体在基因沉默效果及稳定沉默持续时间方面系统实验研究较少,本实验利用慢病毒及质粒作为载体通过 RNAi 技术建立人 RAS 同源基因家族成员 A(RAS homologue gene-family member A, RhoA)基因稳定沉默卵巢癌细胞株,观察及检测随培养时间的延长其在基因沉默效率及肿瘤侵袭转移能力上的差异,以期为个性化选择载体进行基因功能的研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人卵巢癌细胞株 HO8910 购自中山大学实验动物中心,培养于含 100 mL/L 胎牛血清,100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素混合液, RPMI1640 培养基中;重组干扰质粒 psiHIV-U6-RhoA-shRNA 及慢病毒 Lenti-psiHIV-U6-RhoA-shRNA(干扰序列为 gaagcagagatattggca)由本课题组构建及包装, Lipofactamine™ 2000、TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司;两步法实时荧光定量试剂盒购自 TaKaRa 公司, MTT 购自 Sigma 公司, Matrigel 胶购自 BD 公司, RIPA 裂解液购自北京百泰克公司; Fermentas PageRuler® Prestained Protein Ladder、Pierce BCA Protein Assay Kit、Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate 均购自 Thermo Scientific 公司,兔抗人 RhoA 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗及山羊抗兔二抗均购自 Bioworld 公司。

1.2 方法

1.2.1 脂质体介导质粒 psiHIV-U6-RhoA-shRNA 转染卵巢癌细胞 HO8910 提前 1 d 将 5×10^5 个 HO8910 细胞接种于 6 孔板中培养至密度为 80%~90%, PBS 清洗并更换为 opti-MEN 培养基,取 4 μg psiHIV-U6-RhoA-shRNA 重组质粒及 10 μg 脂质体分别溶于 250 μL opti-MEN 培养基中,室温静置 5 min 后将二者混合,静置 20 min 后将混合物加入 6 孔板中,37℃,50 mL/L CO₂ 培养 6 h 后换为完全培养基继续培养至 48 h,于荧光显微镜下观察绿色荧光的表达情况,由此判断转染效率。

1.2.2 慢病毒 Lenti-psiHIV-U6-RhoA-shRNA 感染卵巢癌细胞 HO8910 提前 1 d 将 5×10^5 个细胞种于 6 孔板培养过夜,取 10 μL 病毒 Lenti-psiHIV-U6-sh2 溶于 2 mL 完全培养基并向其中加入 Polybrene 使其终浓度为 5 μg/mL,将 6 孔板放入 4℃ 冰箱,2 h 后取出,放入 37℃、50 mL/L CO₂ 饱和度培养箱培养 14 h 后,更换为完全培养液。培养 48 h 后于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况,由此判断转染效率。

1.2.3 RNAi 稳定沉默 RhoA 基因细胞系的建立 两组细胞转染或感染后 72 h 后接 1:20 进行稀释,非选择培养液培养 24 h 后向其中加入嘌呤霉素,终浓度为 1.5 μg/mL(已经预实验测出嘌呤霉素对 HO8910 细胞的最小致死量为 1.5 μg/

mL),隔 3 d 更换含有筛选剂的培养基,并观察细胞生长的状况,待耐嘌呤霉素的细胞克隆形成后,在荧光显微镜下挑取完全表达绿色荧光蛋白的单克隆细胞集落,于 6 孔板中进行扩大培养,以下实验均以质粒组及慢病毒组表示所建立的细胞株。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 RhoA 基因的表达 用 TRIzol 试剂分别提取各组第 3 代、第 15 代、第 25 代细胞的总 RNA,用逆转录试剂盒将 RNA 转化为 cDNA;然后用 Stratagene 荧光定量 PCR 仪进行 FQ-real-time PCR 扩增。RhoA 上游引物为 5'-TTCCATCGACAGCCCTGATAGTTTA-3',下游引物为 5'-CACGTGGGACAGAAATGCTTG-3'; GAPDH 上游引物为 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物为 5'-TGCTGAAGACGCCAGTGG-3';以上两步实验均按照两步法实时荧光定量试剂盒 SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit 说明书进行(95℃ 30 s,1 个循环;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环)。扩增过程、荧光信号检查、数据存储和分析均由 Stratagene 型 PCR 仪及 SDS 2.2.2 软件自动完成,所获数据导入 EXCEL 进行计算和分析。

1.2.5 Western blot 法检测 RhoA 蛋白的表达 Western blot 法检测细胞内 RhoA 蛋白表达。两组细胞分别收集第 3 代、第 15 代、第 25 代细胞提取蛋白并用紫外分光光度法测定蛋白质含量。细胞内蛋白提取:用胰酶消化细胞,制备单细胞悬液,1 000 r/min 离心 10 min,以 PBS 洗涤细胞,沉淀后重复离心,沉淀以 0.2 mL RIPA 液(含 100 mg/L PMSF)重悬混匀后冰上放置 1 h 以裂解细胞,4℃ 12 000 r/min ($r=15$ cm)离心 15 min,取上清,Bradford 定量蛋白浓度(以 BSA 参照)。取 50 μg 蛋白上样,经 100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至硝酸纤维素膜,50 g/L 脱脂奶 37℃ 封闭 1 h;分别加 1:1 000 稀释的兔抗人 RhoA 抗体和小鼠抗人 β-actin 抗体 4℃ 过夜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗及山羊抗小鼠二抗(1:5 000 稀释)孵育。采用 Labworks 软件测定蛋白条带的吸光度(A)值,取其与 β-actin A 值的百分比分析。实验重复 3 次。相对蛋白含量: $A_{目的蛋白}/A_{\beta-actin} \times 100\%$ 。

1.2.6 体外血管形成实验检测血管形成能力 将 Matrigel 放入 4℃ 冰箱过夜解冻,以 100 μL/孔包被 48 孔板,37℃ 孵育 30 min。实验分为质粒组、慢病毒组及 HO8910 组,3 组细胞均取第 25 代经行消化重悬,每孔以 250 μL(2×10^5 /mL)接种;37℃、50 mL/L CO₂ 饱和度培养箱培养 24 h,倒置显微镜下观察两组细胞的形态、细胞管状、环状排列情况;于镜下随机取上、下、左、右中心 5 个视野计算形成封闭小管的个数,取平均值。

1.2.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 实验分为质粒组、慢病毒组及 HO8910 组。质粒和慢病毒组均取培养第 25 代细胞经消化、完全培养基重悬、计数后以 2×10^5 个细胞接种于 24 孔板;37℃、50 mL/L CO₂ 饱和度培养箱中孵育,待细胞达到 90% 汇合度时换为无血清的 RPMI1640 培养基培养 24 h;以 10 μL 吸管的尖端划痕,PBS 漂洗 3 次,去除划下细胞,加入无血清的 PRIM1640 培养基培养,24 h 后倒置显微镜下观察测量。实验重复 3 次。

1.2.8 统计学分析 实验结果采用 SPSS 13.0 软件处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒 psiHIV-U6-RhoA-sh2 成功转染及慢病毒 Lenti-pHIV-U6-RhoA-sh2 成功感染卵巢癌细胞 HO8910 质粒 psiHIV-U6-RhoA-sh2 转染卵巢癌细胞 HO8910 24 h 后可见较多死亡细胞, 48 h 后荧光显微镜下观察荧光蛋白表达率为约为 30%; 慢病毒 Lenti-pHIV-U6-RhoA-sh2 感染卵巢癌细胞 HO8910 24 h 细胞死亡较质粒组明显减少, 细胞生长良好, 细胞形态无明显改变, 感染 48 h 后荧光蛋白表达率约为 50%。

2.2 RNAi 介导 RhoA 基因沉默细胞株的成功建立

无论是质粒或是慢病毒其转染效率都较低, 需进行嘌呤霉素压力筛选提高绿色荧光蛋白的表达效率, 嘌呤霉素压力筛选 20 d 左右稳定表达绿色荧光蛋白的细胞克隆集落形成。扩大培养, 质粒组细胞随培养代数增加绿色荧光蛋白的表达率逐渐下降, 第 3 代、第 15 代、第 25 代绿色荧光蛋白的表达率分别为 95%、70%、45%, 而慢病毒组绿色荧光蛋白的表达率未见明显下降, 表达率保持在 95% 以上。表明慢病毒作为干扰载体较质粒能更稳定持久地整合于靶细胞的基因组实现干扰序列长期稳定的表达。

2.3 慢病毒作为介质能更持久稳定地抑制 HO8910

RhoA mRNA 的表达 实时荧光定量 PCR 结果显示 (表 1), 质粒组第 3 代 RhoA mRNA 的相对表达量与慢病毒组无明显差异 ($26.98\% \pm 5.0\%$ vs $28.52\% \pm 4.0\%$, $P > 0.05$); 质粒组第 15 代及第 25 代 RhoA mRNA 的相对表达量逐渐增加, 分别为 ($49.31 \pm 1.0\%$)、($63.28 \pm 1.5\%$), 均高于同代数的慢病毒组 ($33.27 \pm 3.2\%$)、($33.92 \pm 3.7\%$) ($P < 0.05$); 慢病毒组各代数之间 RhoA 蛋白的表达未见明显差异 ($P > 0.05$)。表明质粒组随细胞培养代数的增加 RhoA 基因 mRNA 抑制效率逐渐降低, 慢病毒组能持续稳定地抑制卵巢癌细胞 HO8910 RhoA mRNA 的表达。

表 1 慢病毒及质粒组培养第 3 代、第 15 代及第 25 代时 RhoA mRNA 的表达

组别	RhoA Ct 平均值	GAPDH Ct 平均值	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
慢病毒组					
第 3 代	30.1 ± 1.34	20.06 ± 0.87	10.04 ± 1.12	1.81 ± 0.13	0.2852 ± 0.04
第 15 代	29.5 ± 1.13	19.68 ± 0.92	9.82 ± 0.34	1.59 ± 0.21	0.3327 ± 0.32
第 25 代	26.9 ± 0.77	17.11 ± 1.34	9.79 ± 0.67	1.56 ± 0.27	0.3392 ± 0.37
质粒组					
第 3 代	29.86 ± 2.11	19.74 ± 0.84	10.12 ± 0.46	1.89 ± 0.07	0.2698 ± 0.05
第 15 代	25.03 ± 1.67	15.78 ± 0.69	9.25 ± 0.94	1.02 ± 0.14	0.4931 ± 0.01*
第 25 代	23.33 ± 1.17	14.44 ± 1.25	8.89 ± 1.13	0.66 ± 0.21	0.6328 ± 0.15*
HO8910	25.70 ± 0.17	14.82 ± 0.02	8.23 ± 0.27	0.00 ± 0.11	1.00 ± 0.04

* $P < 0.05$ vs 同代慢病毒组。

2.4 慢病毒作为介质能更持久稳定地抑制 HO8910 RhoA 蛋白的表达 采用 Western blot 法检测质粒组及慢病毒组结果显示 (图 1), 质粒组第 3 代 RhoA 蛋白的相对表达量与慢病毒组无明显差异 (18.34% vs 19.03% , $P > 0.05$); 质粒组第 15 代及第 25 代 RhoA 蛋白的相对表达量逐渐增加, 分别为 58.75% 、 77.06% , 均高于同代数慢病毒组 21.58% 、 20.87% ($P < 0.05$); 慢病毒组各代数之间 RhoA 蛋白的表达未见明显差异 ($P > 0.05$); 表明质粒组随细胞培养代数的增加 RhoA 基因抑制效率逐渐降低, 而慢病毒组抑制效率未见明显改序长期稳定的表达。

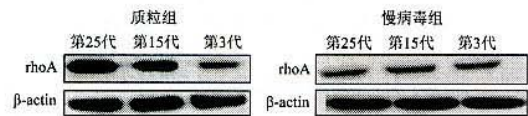
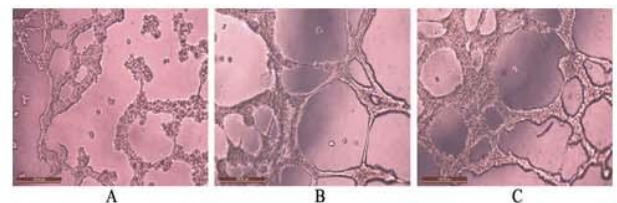


图 1 慢病毒组及质粒组培养第 3 代、第 15 代及第 25 代时 RhoA 蛋白的表达

2.5 慢病毒作为介质能更持久稳定地抑制血管的形成

慢病毒转染细胞结构松散, 形成的平行管状结构较少, 数目为 8.4 ± 1.28 个, 相比质粒组 18.8 ± 1.12 个及对照组 HO8910 21.2 ± 2.24 个 (图 2, $P < 0.05$); 质粒组与对照组 HO8910 组相比 ($P > 0.05$)。表明慢病毒作为载体较质粒能更持久稳定的抑制 RhoA 基因表达, 从而抑制卵巢癌细胞血管的形成。



A: 慢病毒组; B: 质粒组; C: HO8910 组。

图 2 培养第 25 代时慢病毒组及质粒组细胞血管形成能力的区别 ($\times 100$)

2.6 慢病毒作为介质能更持久稳定地抑制卵巢癌细胞 HO8910 的转移

划痕实验模仿体内创伤愈合时细胞向创伤处迁移的过程。划痕后培养 24 h, 对照组 HO8910 细胞向划痕边缘爬行的速度快, 划痕的宽度明显变窄, 细胞几乎填满划痕区域; 慢病毒组细胞爬行速度慢, 愈合百分比仅为 $44.28\% \pm 3.38\%$, 明显低于质粒组 ($75.22 \pm 6.74\%$) 和对照组 ($89.52 \pm 3.26\%$) (图 3, $P < 0.05$); 质粒组与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 表明慢病毒作为载体较质粒能更持久稳定的抑制 RhoA 基因表达, 从而抑制卵巢癌细胞的转移能力。

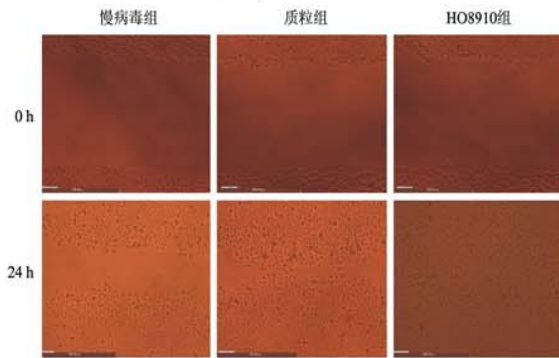


图3 培养第25代时慢病毒组及质粒组细胞迁移能力(相差显微镜, $\times 100$)

3 讨论

近年来 RNA 干扰技术应用于肿瘤的治疗成为新热点^[3], 与其他基因抑制方法相比, RNAi 具有抗干扰性、高特异性、高效性及可遗传性^[4-5]。质粒和病毒是 RNAi 技术的常用工具, 本实验中分别利用质粒及慢病毒作为载体进行靶向 RhoA 基因的 RNA 干扰, 观察及检测随培养时间的延长两种载体在基因沉默效率及抑制肿瘤侵袭转移能力上的差异。

实验表明: 慢病毒细胞毒性较质粒小: 实验中观察到脂质体的细胞毒性大, 转染 24 h 后细胞大量死亡, 而慢病毒感染后细胞死亡少; 慢病毒的基因沉默效果较质粒稳定持久: 慢病毒感染细胞 48 h 后绿色荧光蛋白的表达率为 50%, 稍高于质粒, 经嘌呤霉素压力筛选后, 慢病毒绿色荧光蛋白持续高表达, 为 95% 以上, 不随培养代数的增加而改变, 经过多次冻融后绿色荧光蛋白的表达仍在 95% 以上, 而质粒绿色荧光蛋白表达率逐渐降低, 培养第 15 代和第 25 代时绿色荧光蛋白的表达率分别为 70%、45%。实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测结果均表明, 质粒组随培养代数的增加, 其 RhoA 基因沉默效率逐渐降低, 第 25 代时 RhoA 基因 mRNA 表达率为 63.28%, 高于慢病毒 23.33%; 第 25 代时 RhoA 蛋白的相对含量为 77.06%, 明显高于慢病毒 20.87%。慢病毒作为载体能持久稳定抑制细胞侵袭和转移: RhoA 蛋白具有调控细胞的形态和运动的功能^[6-8], 与肿瘤的转移和侵袭密切相关^[9-11], 细胞划痕实验中质粒组细胞迁移能力明显强于慢病毒组; 肿瘤的生长和转移依赖血管的生成^[12], 当 RhoA 基因抑制减弱时, VEGF 分泌增加, 促进血管的形成^[13-14]。血管形成实验中, 质粒组形成的平行管腔结构多于慢病毒组 (18.8 ± 1.12 vs 8.4 ± 1.28)。与文献报道结果相符^[15-16], 慢病毒激发免疫反应的作用弱, 干扰效率高, 能与宿主基因组发生整合而实现长期稳定表达。

慢病毒载体也存在一些不足^[17-19]: 首先实验所用的慢病毒载体改建于野生型慢病毒, 存在一定安全性问题, 即有可能产生复制全能性病毒; 其次, 慢病毒有发生插入突变的可能; 再次, 不是所有的靶细胞都能被感染。所以慢病毒载体还需要不断完善其安全性才能应用于临床。质粒介导的 RNAi 有一定的局限性, 然而, 质粒组在培养第 3 代时无论在 RhoA 基因 mRNA 或蛋白的表达上均与慢病毒组相近, 表明其短期干扰效果与慢病毒组相近, 加之其具有制备简易、省时、费用低, 不需要包装细胞, 滴度不受限制, 因而其更适用于瞬时转染的实验研究^[20-22]。

综上所述, 慢病毒作为 RNAi 载体能更持久稳定地抑制目的基因的表达, 适用于长期多次实验、动物实验及某些难以转染的原代细胞如神经细胞等; 质粒载体抑制基因表达的作用较弱, 持续时间较短, 更适用于瞬时转染的实验研究。

参考文献:

- [1] Micklem DR, Lorens JB. RNAi screening for therapeutic targets in human malignancies[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2007, 8(6): 337-343.
- [2] Huang C, Li M, Chen C, et al. Small interfering RNA therapy in cancer; mechanism, potential targets, and clinical applications[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12(5): 637-645.
- [3] Martin SE, Caplen NJ. Applications of RNA interference in mammalian systems[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2007, 8: 81-108.
- [4] 赵恩昊, 金鑫, 沈志勇, 等. RNAi 沉默 Notch1 基因对胃癌 BGC-823 细胞增殖和迁移及侵袭能力的影响[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2012, 15(12): 1296-300.
- [5] Paliwal S, Ho N, Parker D, et al. CtBP2 promotes human cancer cell migration by transcriptional activation of Tiam1[J]. *Genes Cancer*, 2012, 3(7-8): 481-490.
- [6] Wang JL, Zhang JL, Chen W, et al. Roles of small GTPase Rac1 in the regulation of actin cytoskeleton during Dengue virus infection [J/OA]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 31(4): e809.
- [7] Kardash E, Reichman-Fried M, Maitre JL, et al. A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility *in vivo* [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(1): 47-53.
- [8] Jeon H, Kwak D, Noh J, et al. Phospholipase D2 induces stress fiber formation through mediating nucleotide exchange for RhoA [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(8): 1320-1326.
- [9] Rosman DS, Phukan S, Huang CC, et al. TGFBR1 6A enhances the migration and invasion of MCF-7 breast cancer cells through RhoA activation [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1319-1328.
- [10] Gadea G, de Toledo M, Anguille C, et al. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices [J]. *J Cell Biol*, 2007, 178(1): 23-30.

(下转 480 页)

(Me), Arg8]-vasopressin 阻断, 而不被 V2 受体阻滞剂 desglycinamide-[d(CH₂)₅, D-Ile², Ile⁴, Arg⁸]-vasopressin 阻断。考尼伐坦为血管加压素 V1a/V2 受体拮抗剂, 本研究发现 10⁻⁷ mol/L AVP 可促进 CFs 细胞增殖, 促进其 COL1A1、COL3A1 mRNA 和蛋白表达, 与既往研究结果一致, AVP 促进 CFs 细胞增殖和胶原表达的效应可部分被考尼伐坦抑制, 心脏组织中不存在 AVP-V2 受体, 考尼伐坦可能通过阻断心脏成纤维细胞膜上的 AVP-V1a 受体抑制细胞增殖, 减少胶原表达。本研究可为新药开发和药物的新作用研究提供一些参考依据, 但 AVP 促进心肌纤维化的胞内信号分子转导机制、AVP 与其他神经激素之间的相互作用有待进一步阐明。

参考文献:

- [1] 杨学东, 赵连友, 李雪, 等. 精氨酸加压素诱导大鼠心脏成纤维细胞胶原合成的作用[J]. 心脏杂志, 2000, 12(3): 169 - 173.
- [2] Meekert PC, Rivello HG, Vighiano C, et al. Endomitosis and polyploidization of myocardial cells in the periphery of human acute myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2005, 67(1): 116 - 123.
- [3] Cavalcante JL, Khan S, Gheorghade M. EVEREST study: Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure Outcome Study with Tolvaptan[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2008, 6(10): 1331 - 1338.
- [4] Koren MJ, Hamad A, Klasen S, et al. Efficacy and safety of 30-minute infusions of conivaptan in euvoletic and hypervolemic hyponatremia[J]. Am J Health Syst Pharm, 2011, 68(9): 818 - 827.
- [5] Li H, Liu D, Zhao CQ, et al. High glucose promotes collagen synthesis by cultured cells from rat cervical posterior longitudinal ligament via transforming growth factor-β1[J]. Eur Spine J, 2008, 17(6): 873 - 881.
- [6] 赵连友, 陈永清, 田建伟, 等. 蛋白激酶 C 抑制剂对精氨酸升压素调控心脏成纤维细胞增殖及 p27 蛋白表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5): 421 - 424.
- [7] Schulze LE, Kohler M, Fees H. Divergent effects of arginine vasopressin and angiotensin II on proliferation and expression of the immediate early genes c-fos, c-jun and Egr1 in cultured rat glomerular mesangial cells[J]. J Hypertens, 1993, 11(2): 127 - 134.
- [8] 谢永进, 王升启, 陈劲松, 等. 醛固酮对人胎儿心脏成纤维细胞增殖以及胶原表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(4): 386 - 388.
- [9] Chen K, Chen J, Li D, et al. Angiotensin II regulation of collagen type I expression in cardiac fibroblasts; modulation by PPAR-gamma ligand pioglitazone[J]. Hypertension, 2004, 44(5): 655 - 661.
- [10] Mondritzki T, Kolkhof P, Sabbah HN, et al. Differentiation of arginine vasopressin antagonistic effects by selective V2 versus dual V2/V1a receptor blockade in a preclinical heart failure model[J]. Am J Ther, 2011, 18(1): 31 - 37.
- [11] Fujiwara Y, Tanoue A, Tsujimoto G, et al. The roles of V1a vasopressin receptors in blood pressure homeostasis; a review of studies on V1a receptor knockout mice[J]. Clin Exp Nephrol, 2012, 16(1): 30 - 34.
- [12] He YP, Zhao LY, Zheng QS, et al. Mitogenic effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast; involvement of PKC-ε/2 pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2008, 52(1): 72 - 81.
- [13] Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression[J]. Front Biosci, 2011, 16(1): 2561 - 2571.
- [14] Delli Carpini J, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, cervical cancer[J]. Angiogenesis, 2010, 13(1): 43 - 58.
- [15] Mateus AR, Seruca R, Machado JC, et al. EGFR regulates RhoA GTP dependent cell motility in E-cadherin mutant cells[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(13): 1639 - 1647.
- [16] Chakravarty D, Roy SS, Babu CR, et al. Therapeutic targeting of PELP1 prevents ovarian cancer growth and metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(8): 2250 - 2259.
- [17] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference[J]. J Virol, 2003, 77(16): 8957 - 8961.
- [18] Baka K, Goto-Koshino Y, Mizukoshi F, et al. Inhibition of the replication of feline immunodeficiency virus by lentiviral vector-mediated RNA interference in feline cell lines[J]. J Vet Med Sci, 2008, 70(8): 777 - 783.
- [19] Ikawa M, Tanaka N, Kao WW, et al. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors; a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy[J]. Mol Ther, 2003, 8(4): 666 - 673.
- [20] Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral mediated delivery of siRNAs for antiviral[J]. Gene Ther, 2006, 13(6): 553 - 558.
- [21] Singer O, Verma IM. Applications of lentiviral vectors for ShRNA delivery and transgenesis[J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(6): 483 - 488.
- [22] Williams PD, Kinston PA. Plasmid-mediated gene therapy for cardiovascular disease[J]. Cardiovasc Res, 2011, 91(4): 565 - 576.
- [23] Hu X, Su F, Qin L, et al. Stable RNA interference of ErbB-2 gene synergistic with epirubicin suppresses breast cancer growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 346(3): 778 - 785.
- [24] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550 - 553.

(上接 476 页)