

网络出版时间: 2019-8-12 17:30 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190812.1006.001.html>

◇ 基础医学研究 ◇

Tenascin-C 对胃癌 SGC7901 细胞锚定非依赖性生长的影响

鲁梅芳¹, 黄浩¹, 刘小艳¹, 陈刘赠², 刘新华², 李洪¹

摘要 **目的** 探究肌腱蛋白 C (TNC) 对胃癌细胞 SGC7901 的锚定非依赖性生长的影响。**方法** 采用免疫组化和 Western blot 分别检测胃癌组织和胃癌细胞系中 TNC 的表达; 通过 CRISPR-Cas9 基因编辑技术敲除 SGC7901 细胞中的 TNC 基因并用软琼脂生长实验观察 SGC7901 和 SGC7901^{TNC-/-} 细胞的锚定非依赖性生长的情况; Western blot 和逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 用于分析细胞内促生长信号传导通路蛋白的表达情况。**结果** TNC 在检测的胃癌组织和细胞水平高表达; 在 SGC7901 细胞中敲除 TNC 引起软琼脂实验中集落形成缺陷; 对几种细胞内生长促进信号传导途径的分析表明, 在 SGC7901 细胞中 TNC 基因敲除后, c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 和蛋白激酶 B (AKT) 的磷酸化水平降低; 在 SGC7901^{TNC-/-} 细胞中, 发现整合素 $\beta 7$ (ITGB7) 在 mRNA 和蛋白质水平均显著下降。**结论**

TNC 在胃癌中特别是 SGC7901 细胞中高表达, 并且可能通过 ITGB7 介导的信号通路调节 SGC7901 细胞的锚定非依赖性生长。

关键词 肌腱蛋白 C; ITGB7; 锚定非依赖性生长

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1333-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.001

胃癌 (gastric cancer, GC) 是一种常见的胃肠道肿瘤, 是世界上第四大常见癌症。超过 90% 的 GC 是源自胃黏膜上皮的腺癌。目前, 手术仍然是早期疾病的唯一有效的治疗方法, 但因其早期症状不易察觉, 所以其早期诊断率较低^[1]。晚期 GC 患者在现有的治疗手段下预后不佳。因此确定 GC 用于早期诊断和靶向治疗的生物标志物变得越来越重要^[2]。肌腱蛋白 C (Tenascin-C, TNC) 是一种细胞外糖蛋白, 在细胞增殖和迁移及器官发生等过程中产生^[3-4], 已被广泛研究作为不同癌症的潜在生物

标志物。到目前为止 TNC 在 GC 中的功能还不清楚。TNC 可以与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、整合蛋白^[5-6] 相互作用来调节许多细胞内信号分子如局部粘着斑激酶、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 的活性, 从而在细胞活动中发挥多种作用^[7]。该研究采用免疫组化法检测 TNC 在 GC 组织和细胞系中的表达情况, 并进一步探讨了 TNC 在 SGC7901 细胞生长中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 样本 本实验中使用的标本是从解放军 105 医院手术取出的原发性 GC 和活组织检查中收集的。其中 10 例胃腺癌病例为男性, 8 例为女性, 年龄 39~80 (55.5 ± 8.6) 岁。患者在手术前均未接受化疗, 该研究均获得患者知情同意书, 并得到伦理委员会的批准。

1.2 实验材料及仪器 细胞培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); RPMI-1640 DMEM (美国 Hyclone 公司); 嘌呤霉素 (美国 sigma 公司); 抗磷酸化 AKT、抗 AKT Ser 473、抗 ERK、抗磷酸化 ERK、T202/Y204、抗-ITGB5、8 (美国 Cell Signaling 公司); TNC、通用型二抗 (英国 Abcam 公司); pSpac (BB)-2A-puro 载体 (北京质粒载体菌种细胞基因保藏中心); Lipofectamine 2000 (美国赛默飞公司); 抗磷酸-JNK、抗 JNK T183/Y185 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 抗 ITGB1、4、7 (武汉三鹰生物科技有限公司); 极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天生物科技有限公司); 总 RNA 提取试剂 (北京天根生化科技有限公司)

1.3 免疫组化 将石蜡样品制成 5 μm 切片, 用二甲苯和梯度乙醇脱蜡。然后通过浸泡在 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中进行抗原修复。之后将切片浸入 3% 过氧化氢中以阻断内源性过氧化氢酶。在室温下湿盒中用 5% 山羊血清封闭。一抗

2019-06-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 21572003)

作者单位: 安徽医科大学¹ 基础医学院组胚教研室、² 药学院, 合肥 230032

作者简介: 鲁梅芳, 女, 硕士研究生;

李洪, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hong.li@yale.edu

TNC(1 : 100) 4 ℃ 孵育过夜。洗涤 3 次后,二抗山羊抗兔(1 : 2 000) 37 ℃ 下孵育 1 h。之后切片洗涤并用苏木精复染,然后脱水并封片。

1.4 细胞培养 人胃癌细胞系 MGC803 SGC7901 NCI-N87 (102155)、MKN28 (338339) 和 AGS (102154) 购自北京北纳创联生物技术研究院。其中,GES-1 AGS NCI-N87 细胞用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养,其他细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 中培养。所有细胞都在维持 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.5 构建稳转细胞系 使用(<http://crispr.mit.edu>) 在线设计工具设计引导 RNA (guide RNA, gRNA), 选择具有高特异性的 3 对 gRNA, 见表 1。合成的引物退火,PCR 反应条件为 90 ℃、4 min; 75 ℃、5 min; 65 ℃、15 min; 25 ℃、20 min。然后用 BBSI 酶消化 pSpCas(BB) -2A-puro 载体。将酶切后的载体与退火的引物在 22 ℃ 下连接 2 h 或 16 ℃ 过夜。载体构建完成筛选正确后,通过 Lipofectamine 2000 将它们转染到 SGC7901 细胞中,然后用嘌呤霉素筛选 TNC 缺陷的 SGC7901 细胞系作为敲除(knock out, KO) 组。同时设计非靶向的空质粒转染 SGC7901 作为 MOCK 对照组,正常的 SGC7901 作为正常对照(control, CN) 组。筛选后,收集培养基用于 Western blot 验证。设计的 3 对 gRNA 中第 1 对具有最佳的敲除效果。

表 1 gRNA

引物名称	序列
TNC 1-F	CACCGTTTCCTTGCCCTCGCTACCGAGG
TNC 1-R	AAACCCTTCGGTAGCGAGGGCAAGGAAAC
TNC 2-F	CACCGTTACAACATCAAGCTGCCAGTGG
TNC 2-R	AAACCCACTGGCAGCTTGATGTTGTAAAC
TNC 3-F	CACCGTGCTGTCTCCAGCCTGCCACAGG
TNC 3-R	AAACCCTGTGGCAGGCTGGAGACAGCAC

1.6 Western blot 收集细胞和培养基并加入蛋白上样缓冲液以制备蛋白质样品。然后使用 10% SDS-PAGE 进行凝胶电泳分离蛋白质,并转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭,在室温下孵育 2 h 或在 4 ℃ 下孵育过夜。然后孵育一抗,抗磷酸化 AKT(Ser 473, 1 : 1 000); 抗 AKT(1 : 1 000); 抗磷酸化 JNK(T183/Y185) (1 : 500); 抗 JNK (1 : 500); 抗磷酸化 ERK(T202/Y204, 1 : 1 000); 抗 ERK(1 : 1 000); 抗整合素 β1、4、7(1 : 500); 抗-ITGB5、8(1 : 1 000) 用含 1% 牛奶的 TBST 稀释 4 ℃ 孵育过夜。然后加入足量的抗 IgG 二抗(抗小鼠或抗兔 IgG) ,

用 2.5% 脱脂牛奶 1 : 5 000 稀释于 TBST 中。将膜在室温下孵育 2 h 并用 TBST 洗涤,显影。

1.7 软琼脂生长实验 首先将 1.2% 琼脂糖凝胶与 2 × DMEM 以 1 : 1 的比例混合,并将 10 ml 混合物倒入 10 cm 培养皿中。冷却并凝固后,放入 CO₂ 培养箱备用。接下来将细胞培养至对数生长期,消化并轻轻吸打它们以制备单个细胞,进行活细胞计数。之后在无菌试管中以 1 : 1 的比例混合 0.7% 琼脂糖和 2 × DMEM,然后加入细胞悬浮液并充分混匀注入培养皿中,并逐渐形成双琼脂层。待上层琼脂固化后,将其置于 CO₂ 培养箱中培养约 2 周,每 2 ~ 3 d 加入培养基以防止其过于干燥。两周后用结晶紫染色。染色 2 h 后,用脱色液脱色直至克隆可见。

1.8 RT-PCR 选取 SGC7901^{TNC^{-/-}} 细胞系和对照组 SGC7901 细胞,用天根总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, RNA 提取后先逆转录成 cDNA, 之后进行 RT-PCR。PCR 中使用的引物见表 2。

表 2 PCR 引物

引物名称	序列
ITGB1-5	ATATGGAAGCTTTTAAATGA
ITGB1-3	TCATTTCCCTCATACTTCG
ITGB2-5	AAGGCTCTGATCCACCTG
ITGB2-3	ATTGGTGACATCCTCAAG
ITGB3-5	GTCTGTATCCAGCCGGGC
ITGB3-3	CAGGATGTGAGGGCCCTT
ITGB4-5	ACCATTGAATCCCAGGTG
ITGB4-3	AGTTTTGGAAGAAGTGTG
ITGB5-5	AAGTTTCAGAGCGAGCGA
ITGB5-3	TCTTCTCTGTGGTGCCTA
ITGB6-5	CACCTGTGACAGCTGGC
ITGB6-3	CATGATCATGGGAATGTT
ITGB7-5	AAGACACCATGCGAGAGA
ITGB7-3	GTGGTCTGCTCCCTTTTC
ITGB8-5	AGACAGGTGATACTACAA
ITGB8-3	ATGACCGTGACGAATTTG

1.9 统计学处理 采用 Graphpad 进行统计分析,组间差异采用单因素方差分析。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNC 在胃癌组织和细胞系中的表达 TNC 蛋白在正常和恶性胃黏膜组织中的表达状态。使用免疫组织化学染色方法检测了 18 个胃腺癌及其癌旁正常黏膜组织中的 TNC 蛋白。来自 12 个胃腺癌的组织显示较强的 TNC 染色信号并且主要集中在细胞外间隙。在相同条件下,在正常胃黏膜组织中未

检测到阳性 TNC 免疫染色信号,见图 1A、1B。研究结果表明 TNC 在胃癌中的表达增加,并且它可能促进 GC 的发展和进程,因为蛋白质的较高表达水平通常代表其在该肿瘤中促进肿瘤作用的线索。为了进一步了解 GC 中 TNC 的功能,研究了其在培养的胃癌细胞系中的行为,以确认其在细胞培养水平中的肿瘤促进作用。在正常胃上皮细胞系 GES-1 细胞中未检测到 TNC 蛋白,而在 5 种检测的 GC 细胞系中发现到其中有 4 个细胞系明显存在 TNC 蛋白,其中 SGC7901 细胞产生的蛋白质水平最高,因此用于以下实验,见图 1C。

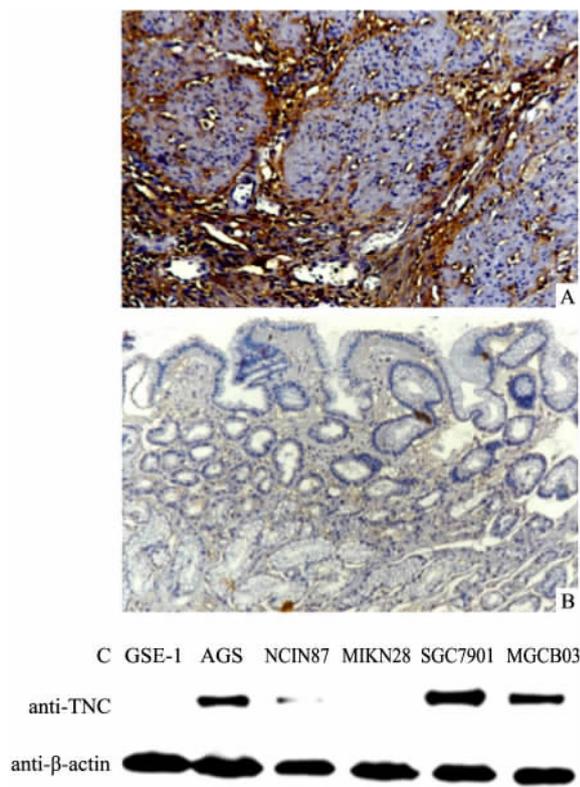


图1 TNC 在组织和细胞系中的表达情况 SP×200
A: GC 组织; B: 癌旁组织; C: 不同 GC 细胞和胃黏膜细胞

2.2 SGC7901 细胞的软琼脂生长依赖于 TNC 表达 将 SGC7901 和 SGC7901^{TNC-/-} 细胞均以每孔 10³ 个细胞的浓度接种到 6 孔板中的软琼脂中,并在接种 2 周后进行菌落计数。发现正常的 SGC7901 细胞每孔平均形成 126.37 个菌落,而即使延长观察,在培养良好的 SGC7901^{TNC-/-} 细胞中基本无菌落,见图 2。这些结果意味着 TNC 对 SGC7901 细胞的锚定非依赖性生长具有必要的作用。

2.3 TNC 敲除抑制了多种促进生长的信号传导途径 Western blot 结果显示在 SGC7901^{TNC-/-} 细胞中 AKT、JNK 和 ERK 的表达水平与 SGC7901 细胞中无

显著性差异,而 AKT 和 JNK 磷酸化蛋白的水平显著降低,见图 3。结果表明缺乏 TNC 导致关键蛋白的失活,从而抑制这些促进细胞生长的信号通路中蛋白的激活。

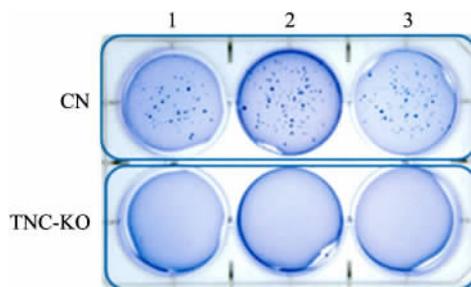


图2 敲除 TNC 组和对照组 SGC7901 软琼脂集落形成对比
1: 第 1 次实验结果; 2: 第 2 次实验结果; 3: 第 3 次实验结果

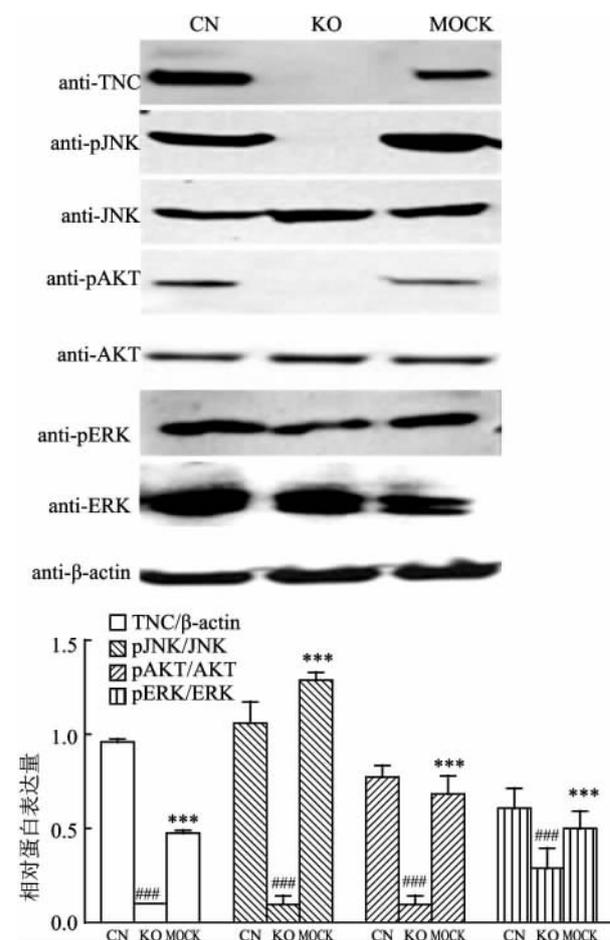


图3 JNK、AKT 和 ERK 蛋白总表达量和磷酸化蛋白量表达情况
CN: 正常 SGC7901 对照; KO: TNC 缺陷 SGC7901 细胞系 (SGC7901^{TNC-/-}); MOCK: 转染空载体质粒空白对照; 与 MOCK 组比较: *** P < 0.001; 与 CN 组比较: ### P < 0.001

2.4 TNC KO 降低 SGC7901 细胞中 ITGB7 的表达 Western blot 检测了 SGC7901 和 SGC7901^{TNC-/-} 细胞中整合素 β7 的所有 β 亚基的表达,发现整合素 β7 (integrin β7, ITGB7) 的蛋白表达明显降低,且通

过 RT-PCR 检测发现 ITGB7 mRNA 仅存在于 SGC7901 细胞中,但不存在于 SGC7901^{TNC^{-/-}} 细胞中,而整联蛋白其他 β 亚基在两种细胞系中 mRNA 水平中均未显示出显著性差异,Western blot 仅检测出 5 种整联蛋白。见图 4。

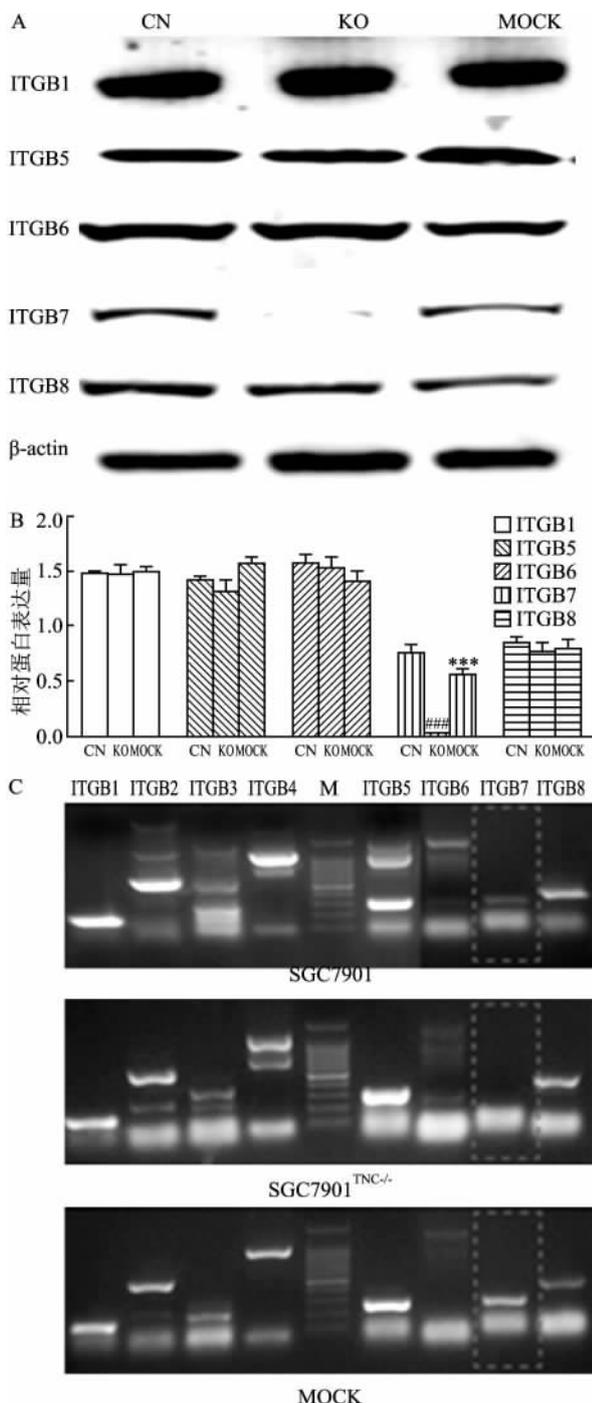


图 4 整合蛋白 β 亚型在蛋白和 mRNA 水平的表达量

A: 整合蛋白 β 亚型在蛋白水平的表达量; B: 蛋白条带灰度值的定量分析; C: 整合蛋白 β 亚型在 mRNA 水平的表达情况; CN: 正常 SGC7901 对照; KO: TNC 缺陷 SGC7901 细胞系 (SGC7901^{TNC^{-/-}}); MOCK: 转染空载体质粒空白对照; 与 MOCK 组比较: *** $P < 0.001$; 与 CN 组比较: ### $P < 0.001$

3 讨论

TNC 已被证明与许多不同的癌症有关,其过表达在癌症诊断和预后方面具有许多功能和临床意义^[8]。有研究^[9]表明 TNC 表达增加与 GC 预后呈正相关。本研究进一步证实了 GC 组织中的 TNC 表达量比癌旁组织中表达高。同时在培养的 GC 细胞培养基中检测到 TNC 蛋白,而未从正常的胃黏膜上皮细胞中检测到 TNC 蛋白。阳性表达通常提示为癌症的潜在标志物,因此该研究结果支持 TNC 作为早期检测 GC 的有价值的生物标志物。

作为多种细胞功能和表型的调节剂,TNC 可以调控多种细胞信号传导和基因表达。TNC 在不同类型的癌症中具有不同的作用,如乳腺癌、骨髓干细胞和胰腺癌等分别与生存、增殖、转移和迁移有关^[7,10-12]。为了研究 TNC 在 GC 细胞中的作用,使用基因编辑技术产生了 TNC 缺陷的 SGC7901 细胞系 (SGC7901^{TNC^{-/-}})。基因的缺失通常导致肿瘤细胞的生长缺陷,但是当在正常条件下培养 SGC7901^{TNC^{-/-}} 和正常 SGC7901 细胞时,没有观察到生长差异。因此,着重研究了 TNC 敲除对软琼脂中 SGC7901 细胞生长的影响。本研究主要发现胃癌 SGC7901 细胞中 TNC 敲除后导致其在软琼脂中的集落形成能力完全丧失,提示其功能是参与 GC 生长。正常的细胞一般需要依附在一定的基质上面才能生长,一旦脱离基质就会成为球状从而不能增殖,而肿瘤细胞和癌变转化细胞能够在这种状态下生长,而锚定非依赖性生长是恶性细胞的关键特征之一,因此 TNC 缺陷细胞在软琼脂中的生长缺陷说明了其在促进细胞增殖或维持恶性状态中的必要性。作为细胞外因子,可以通过治疗性抗体或其他药物有效的阻断 TNC 效应,因此开发 TNC 相关药物可能是发展 GC 新的诊断、治疗和生物工具的一种潜在途径。

研究^[12]发现许多细胞内生物级联反应参与激活 TNC 的致癌活性。例如,TNC 通过激活 JNK/c-Jun 信号通路^[10]诱导胰腺癌细胞的转移、抗凋亡和侵袭,并通过增强 AKT 磷酸化促进软骨细胞的存活等。假设 TNC 可以通过在这些生长促进途径上起作用来促进和维持 SGC7901 细胞的恶性特征,那么 TNC 的丧失将会导致 SGC7901 细胞在软琼脂中的生长缺陷。基于该假设,在 SGC7901 细胞中敲除 TNC 后,这些生长信号传导途径至少有一种会受到

影响。为了证实这一设想,通过 Western blot 分析了 SGC7901 和 SGC7901^{TNC-/-} 细胞中 AKT、JNK、ERK 及其相应的磷酸化同种型的表达。类似地,在 SGC7901 细胞中的结果表明,敲除 TNC 导致 AKT 和 JNK 的磷酸化显著降低,表明多种信号传导途径负责维持 TNC 致癌活性。TNC 含有表皮生长因子样重复序列和 N 末端多达 17 个纤连蛋白 III 型样重复序列的区域,它可以直接与整联蛋白和 EGFR 家族受体相互作用,以激活多种细胞内信号通路。考虑到 SGC7901^{TNC-/-} 细胞的生长缺陷归因于多种生长信号传导途径,首先关注到的是 EGFR 家族受体,因为它们在细胞增殖控制中起重要作用,然而在 SGC7901 细胞中未检测到 EGFR 家族受体表达异常。之后聚焦于是否 TNC 的缺失影响了整合素的表达。在 TNC 敲除的情况下,发现 ITGB7 的表达在蛋白质和 mRNA 水平均显著降低。虽然目前尚不清楚为什么 TNC 敲除导致 ITGB7 在 mRNA 和蛋白质水平上的下调,推测出 TNC 和 ITGB7 之间可能存在反馈回路,因此 TNC 的缺失可能导致 ITGB7 内吞作用进入细胞以抑制其转录水平的表达。虽然整合素是 TNC 信号的主要转导因子之一,但 ITGB7 是否介导 TNC 对胃癌 SGC7901 细胞的锚定非依赖性生长仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Carcas L P. Gastric cancer review [J]. *J Carcino*, 2014, 13: 14.
 [2] Lazăr D C, Tăban S, Cornianu M, et al. New advances in targeted gastric cancer treatment [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22

- (30): 6776–99.
 [3] Jones F S, Jones P L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling [J]. *Dev Dyn*, 2000, 218(2): 235–59.
 [4] Midwood K S, Hussenet T, Langlois B, et al. Advances in tenascin-C biology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(19): 3175–99.
 [5] Yoshida T, Akatsuka T, Imanaka-Yoshida K. Tenascin-C and integrins in cancer [J]. *Cell Adh Migr*, 2015, 9(1–2): 96–104.
 [6] Dan L, Jian D, Na L, et al. Crosstalk between EGFR and integrin affects invasion and proliferation of gastric cancer cell line, SGC7901 [J]. *Oncotargets Ther*, 2012, 5: 271–7.
 [7] Ding H, Jin M, Liu D, et al. Tenascin-C promotes the migration of bone marrow stem cells *via* toll like receptor 4 mediated signaling pathways: MAPK, AKT and Wnt [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(6): 7603–10.
 [8] Midwood K S, Orend G. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis [J]. *J Cell Commun Signal*, 2009, 3(3–4): 287–310.
 [9] Wiksten J P, Lundin J, Nordling S, et al. Tenascin-C expression correlates with prognosis in gastric cancer [J]. *Oncology*, 2003, 64(3): 245–50.
 [10] Cai J, Du S, Wang H, et al. Tenascin-C induces migration and invasion through JNK/c-Jun signalling in pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 74406–22.
 [11] Naik A, Al-Yahyaee A, Abdullah N, et al. Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin β 3 pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 533.
 [12] Jang J H, Chung C P. Tenascin-C promotes cell survival by activation of AKT in human chondrosarcoma cell [J]. *Cancer Lett*, 2005, 229(1): 101–5.

Effect of Tenascin-C on anchorage-independent proliferation in gastric cancer SGC7901 cells

Lu Meifang, Huang Hao, Liu Xiaoyan, et al

(Dept of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of Tenascin-C (TNC) on anchorage-independent proliferation in gastric cancer cell line SGC7901. **Methods** The expression of TNC in gastric cancer tissues and in gastric cancer cell lines was detected by immunohistochemistry and Western blot analysis, respectively. Knocking out TNC gene in SGC7901 cells (SGC7901^{TNC-/-}) by CRISPR-Cas9 gene editing techniques and the soft agar assays were used to determine the ability of anchorage-independent growth for SGC7901 and SGC7901^{TNC-/-} cells. Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to analyze the expression of proteins in the intracellular growth-promoting signaling pathways. **Results** High expression level of TNC in most of examined gastric adenocarcinomas and gastric cancer cell lines. Knock out of TNC in SGC7901 cells caused the deficiency of colony formation in soft agar. Analysis of several intracellular growth-promoting signaling pathways revealed that the phos-

慢病毒介导 shRNA 沉默大鼠肝 BRL-3A 细胞 PDZK1 对胆管侧膜 Bsep 表达的影响

杨方方¹, 刘萍², 程静², 彭德德², 雷亮², 吴涛², 宋红萍^{1,2}

摘要 目的 构建大鼠 PDZK1 基因 RNA 干扰慢病毒载体, 并观测其对大鼠 BRL-3A 细胞 PDZK1 的基因沉默效应对胆管侧膜胆盐输出泵(Bsep)的影响。方法 针对大鼠 PDZK1 基因序列, 筛选 3 个干扰靶点, 合成其 3 对小干扰 RNA, 将各对 siRNA 分别转入 BRL-3A 细胞, 采用 PCR 和 Western blot 方法从中筛选出最佳 siRNA; 设计合成针对最佳 siRNA 序列的 shRNA, 与载体 LV3 (H1/GFP&Puro) 连接, 共转染 293T 细胞, 包装成介导 PDZK1 基因沉默的 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒载体; 感染 BRL-3A 细胞, 荧光显微镜下观察经感染的 BRL-3A 细胞的 GFP 表达情况, 在 mRNA 和蛋白水平检测重组慢病毒 LV3/PDZK1 shRNA 对 BRL-3A 细胞的 PDZK1 基因的沉默效应对 Bsep 的影响。结果 筛选到 PDZK1 基因的最佳干扰靶点序列。经酶切与测序结果证实, 构建 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒载体成功。BRL-3A 细胞经 LV3/PDZK1 shRNA 慢病毒感染 48 h 后, PCR 检测 PDZK1 基因表达极低, Bsep 表达较弱; WB 检测显示 PDZK1、Bsep 蛋白表达均极弱。结论 成功构建大鼠 PDZK1 基因 RNA 干扰慢病毒载体, 该载体能有效沉默 BRL3A 细胞的 PDZK1 基因, 并抑制胆管侧膜 Bsep 表达。

关键词 PDZK1; 胆盐输出泵; RNA 干扰; 慢病毒载体; BRL-3A
中图分类号 R 966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1338-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.002

2019-03-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81503146)

作者单位: ¹ 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065

² 武汉市第四医院, 华中科技大学同济医学院附属普爱医院药学部, 武汉 430000

作者简介: 杨方方, 硕士研究生;

吴涛, 男, 博士, 副主任药师, 责任作者, E-mail: hydrinsk@sina.com;

宋红萍, 女, 主任药师, 责任作者, E-mail: goodgravity@fox-mail.com

肝细胞依靠细胞膜上的药物转运体实现摄取和分泌胆汁的功能。在病理状态下, 肝细胞药物转运体发生显著改变, 参与诱导胆汁淤积性肝病发生^[1]。胆管侧膜 ABC 转运体(ATP-binding cassette transporter, ABC transporter) 表达异常、功能下降是胆汁淤积性肝病的重要分子基础^[2]。PDZK1 (NHERF3) 蛋白能够调控多种药物转运体的表达和功能^[3]。近年来发现, PDZK1 表达抑制或者缺失, 可以导致其靶蛋白(转运体)的亚细胞定位异常、表达和功能下降。该研究筛选 PDZK1 基因的 RNA 最佳干扰靶点, 构建其慢病毒干扰载体 LV3/PDZK1 shRNA, 体外观测慢病毒介导的 shRNA 对 BRL-3A 细胞 PDZK1 的沉默效应对胆管侧膜胆盐输出泵(Bsep)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 BRL-3A 细胞株购自 ATCC; 3 个干扰靶点寡核苷酸序列及其对照序列的合成由武汉塞维尔生物提供; 质粒抽提试剂盒购自 Roche 公司; 限制性内切酶、DNA 内切酶、DNA 连接酶和 Taq 聚合酶购自加拿大 MBI Fermentas; 中量抽提试剂盒购自杭州爱思进生物技术有限公司; 凝胶回收试剂盒购自北京天根生化公司; LV3 (H1/GFP&Puro) 慢病毒载体购自上海吉玛公司; Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; PDZK1、Bsep 抗体购自英国 Abcam 公司; 最佳干扰靶点 DNA oligo 使用 Designer 3.0 (Genepharma) 软件进行设计, 合成引物由苏州吉玛基因提供。

1.2 方法

1.2.1 PDZK1 最佳 siRNA 靶点的设计与筛选

phorylation of JNK, ERK and AKT was reduced following TNC genes disruption in SGC7901 cells. ITGB7 was found to be decreased significantly in both mRNA and protein level in SGC7901^{TNC-/-} cells. **Conclusion** TNC is highly expressed in gastric cancer, particularly in SGC7901 cells and plays a necessary role in anchorage-independent growth of SGC7901 cells possibly via ITGB7 mediated signaling pathways.

Key words Tenascin-C; ITGB7; anchorage-independent growth