

网络出版时间: 2018-5-23 14:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.002.html>

# 敲减 EEF1D 的人卵巢癌细胞的构建及其药物敏感性研究

汪慎燚 徐 怡 阮 昕 席 浩 王 鹏 陈 曦 秦宜德

**摘要** 目的 探讨 RNA 干扰真核生物翻译延长因子 1δ (EEF1D) 基因表达对人卵巢癌耐药细胞 DDP、PGIPN 敏感性的影响。方法 针对人 EEF1D 基因设计并筛选出下调基因表达效果最佳的 siRNA, 构建 shRNA 序列表达载体 pLJM1-shRNA。通过慢病毒表达载体构建稳定转染 pLJM1-shRNA-EEF1D 的 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞株。RT-PCR 和 Western blot 检测稳定转染细胞株 EEF1D 基因的表达情况, MTT 法测定 PGIPN、DDP、DDP/PGIPN 对稳定转染细胞株的增殖抑制率。结果 成功构建重组慢病毒载体 pLJM1-shRNA-EEF1D。RT-PCR 和 Western blot 法均证实在 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞中成功敲减 EEF1D 的表达。此外, MTT 结果显示 与对照组和非特异性转染组相比, DDP/PGIPN 细胞的增殖均明显受到抑制, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 通过敲减 EEF1D 基因表达可以明显增强人卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞对 DDP/PGIPN 的敏感性。

**关键词** RNA 干扰; 人卵巢癌; EEF1D; DDP; PGIPN

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0828-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.002

卵巢癌居妇科恶性肿瘤死亡原因的首位, 近年来卵巢癌的发病率有明显上升和年轻化趋势, 由于其发病隐匿, 缺乏普查和有效的早期诊断方法, 70% 以上的患者就诊时已属于晚期, 治疗及预后极差<sup>[1]</sup>。目前根治卵巢癌的主要方法仍是早期手术切除, 而晚期患者主要以顺铂 (cis-dichlorodiamine-platinum, DDP) 化疗为主, 患者易对其产生耐药性, 但卵巢癌是高频转移的恶性肿瘤, 术后极易复发, 所以, 控制复发和转移是当今卵巢肿瘤治疗的最大难题之一<sup>[2]</sup>。生物活性肽在肿瘤治疗中有增敏、增效和减毒的作用, 其逆转肿瘤细胞耐药的研究已取得一定的成果<sup>[3-6]</sup>。从牛酪蛋白酶产物中分离出的六肽 (Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn, PGIPN) 是具有免疫功

能的免疫调节肽<sup>[7]</sup>。已有报道<sup>[8]</sup>, 真核生物翻译延长因子 1δ (eukaryotic translation elongation factor 1 delta, EEF1D) 可能是 PGIPN 的结合靶点, EEF1D 的活性高低可能直接影响细胞的耐药性, 通过有效的 RNA 干扰诱导细胞内与其序列同源的靶基因 mRNA 降解而引起的转录后基因沉默, 已成为逆转肿瘤耐药的新策略。该研究旨在通过干扰 EEF1D 基因表达, 探讨 DDP/PGIPN 联合用药是否可增强抑制人卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 的生长, 观察人卵巢癌耐药细胞 DDP、PGIPN 敏感性的影响, 为寻求新的卵巢癌治疗方法提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株、菌株与载体** 人卵巢癌细胞 SKOV3、人卵巢癌耐药细胞 SKOV3/DDP 购自中国医学科学院北京肿瘤研究所; 293T 细胞由安徽医科大学生物化学与分子生物学实验室保存; 慢病毒载体系统 pLJM1-Δ8.91-pVSVG 由南京医科大学李建民教授惠赠。

**1.1.2 抗体及主要试剂** 相应蛋白的辣根酶标记二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 限制性内切酶 EcoR I、BamH I 和 T4 连接酶购自上海生工生物工程股份有限公司; 质粒 DNA 提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; Lipofectamine3000 购自美国 Invitrogen 公司; PCR 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; DMED 培养基购自美国 GIBCO 公司; 新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; ECL-增强化学发光检测试剂购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** SKOV3、SKOV3/DDP 细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM/高糖培养基培养。293T 细胞用含 10% 胎牛血清 DMEM/高糖培养基培养。37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养环境中培养。当细胞在对数生长期, 状态良好并且密度达到约 85% 时, 使用 0.4% 的胰酶消化后, 进行传代、冻存或其

2018-03-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81472448)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 汪慎燚, 男, 硕士研究生;

秦宜德, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yideqin@ahmu.edu.cn

他实验。

**1.2.2 EEF1D 的 siRNA 的设计和筛选** 针对人 EEF1D 基因设计三条 siRNA ,以 Scrambled siRNA 为对照 ,由上海生工生物工程股份有限公司合成。见表 1。将合成的 siRNA 用脂质体 (Lipofectamine 3 000) 瞬时转染至 SKOV3 和 SKOV3/DDP ,用 RT-PCR 筛选出下调 EEF1D 效果最佳的 siRNA。

表 1 人 EEF1D mRNA 靶点序列及阴性对照序列

| siRNA           | 序列(5'-3')             |
|-----------------|-----------------------|
| EEF1D siRNA1    | CCUUGCCCUACUGUACUUTT  |
| EEF1D siRNA2    | GGAGAUUCUACGACGAGUUTT |
| EEF1D siRNA3    | GGUUCGACAAGUCAAUATT   |
| Scrambled siRNA | UUCUCCGAACGUGUCACGUTT |

**1.2.3 慢病毒干涉载体构建及包装** 根据筛选出的 siRNA 设计并合成能表达其发卡结构的 shRNA 序列。见表 2。在其序列末端同时设计有 EcoR I 和 BamH I 酶切识别位点。由上海生工生物工程股份有限公司合成。合成的寡链核苷酸模板退火 ,与双酶切后回收的慢病毒载体 pLJM1-shRNA 连接。转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌、挑阳性克隆、提取质粒 ,由上海生工生物工程股份有限公司测序验证。

取成功构建的重组慢病毒载体 pLJM1-shRNA-EEF1D 及慢病毒包装辅助质粒(  $\Delta$ 8.91、pVSVG) 共转染 293T 细胞。转染前 2 h 将细胞培养基更换为 Opti-MEM I Reduced Serum Medium。转染后培养 6 h 更换为含血清的完全培养基培养。转染 48 h 后收集含病毒的上清液 ,3 000 r/min 离心 15 min ,0.45  $\mu$ m 的滤器过滤去除沉淀 , $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.4 孔稀释法测定病毒滴度** 测定前 1 天将对数期状态良好的 293T 细胞消化稀释至  $1.0 \times 10^5$  /ml ,加入 96 孔板 ,100  $\mu$ l/孔 ,每个病毒 6 个孔。感染当日将含有病毒的上清液 ,在 EP 管中做连续 6 个 10 倍梯度稀释。弃去 96 孔板中原有的培养基 ,将稀释好的病毒液 100  $\mu$ l/孔加到细胞孔中 ,继续培养 24 h 后 ,每孔加入 100  $\mu$ l 新鲜培养液。72 h 后观察荧光并计数最大稀释倍数孔中的带有荧光的细胞个数。病毒滴度( TU/ml = 荧光细胞个数)  $\times$  稀释倍数/病毒体积。

**1.2.5 慢病毒感染目的细胞及稳定筛选** 接种状

态良好的 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞至 6 孔板 ,待细胞融合度达到 70% 时开始感染病毒。同时向培养基中加入终浓度为 6  $\mu$ g/ml 的 Polybrene。6 h 后更换完全培养基。次日重复感染 1 次 ,72 h 在显微镜下观察感染情况 ,加入嘌呤霉素 2  $\mu$ g/ml 培养筛选培养 2 周 ,直至单克隆细胞群形成。

**1.2.6 细胞总 RNA 提取、逆转录和 RT-PCR** 使用 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA ,Nano-Drop 2 000 C 超微量分光光度计测定其浓度和光密度( optical density ,OD)  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值 ,并采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 质量进行快速分析。取 1  $\mu$ g 总 RNA ,使用 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 对 RNA 进行反转录成总 cDNA ,并稀释 10 倍作为 RT-PCR 模板。利用 Premix Taq<sup>TM</sup> ( TaKa-Ra Taq<sup>TM</sup> Version 2.0 plus dye) 进行 RT-PCR 检测 ,EEF1D 上游引物: 5'-GTATCTCCCATGCGCCAAGT-3'; 下游引物: 5'-ATCCAGCAGGATGGAGGACT-3'; 扩增长度 210 bp。 $\beta$ -actin 上游引物: 5'-ATCCAG-GCTGTGCTATCCCT-3'; 下游引物: 5'-TTGCCAATG-GTGATGACCTG-3'; 扩增长度 350 bp。反应体系 50  $\mu$ l ,每组样品设置 3 个重复; PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min、 $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s、 $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、 $72^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s 共 30 个循环 , $72^{\circ}\text{C}$  10 min。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

**1.2.7 细胞总蛋白提取和 Western blot** 收集细胞前 PBS 洗 2 次 ,加入 300  $\mu$ l RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min ,每隔 10 min 颠倒混匀 1 次  $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min。取上清加入上样缓冲液  $100^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min ,用 BCA 法进行蛋白定量。采用 12.5% 的 SDS-PAGE 分离胶电泳分离细胞总蛋白 ,电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h 后 ,与按要求稀释的一抗中  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日将 TBST 洗脱后的 PVDF 膜置于按要求稀释的二抗中 ,室温孵育 1 h 后 ,TBST 洗脱 ECL 显色。Quantity One 软件测定结果 ,采用  $\beta$ -actin 作为内参照 ,分别以相应蛋白与  $\beta$ -actin 光密度比值表示该蛋白质相对表达水平。

表 2 筛选的单链及 shScrambled DNA 序列

| 名称          | DNA 序列(5'-3')                                                                                                                    |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| shEEF1D-3   | F: GATCCGCCTTGCCCTACTGTTACTTCTCGAGAAGTAACAGTAGGGCAAGGTTTTTTC<br>R: AATTCCAAAAAACCTTGCCCTACTGTTACTTCTCGAGAAGTAACAGTAGGGCAAGGC     |
| shScrambled | F: GATCCGTTTCCGAACGTGTCTGACGTCTCGAGACGTGACACGTTTCGGAGAATTTTTTC<br>R: AATTCCAAAAAATCTCCGAACGTGTCTGACGTCTCGAGACGTGACACGTTTCGGAGAAC |

**1.2.8 MTT 检测** 用 0.4% 胰蛋白酶消化并收集对数生长期细胞,调整细胞密度,接种至 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ l。次日加入按要求配置的 DDP、PG-PIP<sub>N</sub>、PIPIP<sub>N</sub>/DDP 浓度,每一浓度设 6 个复孔,空白对照加入等体积的培养基,继续培养 48 h。每孔加入 MTT 液(5.0 mg/ml) 20  $\mu$ l,继续培养 4 h,弃培养液,每孔加入 DMSO 100  $\mu$ l,振荡混匀 5 min。在酶标仪上于 490 nm 波长处检测每孔 OD 值,上述实验重复 3 次。增值抑制率  $IR(\%) = (1 - \text{给药组平均 OD 值} / \text{对照组平均 OD 值}) \times 100\%$ 。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,Leven 检验方差齐性  $P < 0.05$  时,组间比较采用 Dunnett's  $T_3$  法;反之采用 SNK 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 瞬时转染后 EEF1D mRNA 表达水平** 通过 Quantity One 进行灰度分析,以 EEF1D 基因与内参照  $\beta$ -actin 的灰度值比值作为目的基因的 mRNA 相对表达量,结果显示与非特异性转染组 Scrambled siRNA 相比,siRNA3 处理后 EEF1D mRNA 转录明显减少( $P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 成功构建 pLJM1-shRNA-EEF1D 慢病毒载体

经双酶切的 pLJM1-shRNA 与退火后的 shRNA 连接重组形成慢病毒载体。由 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞转化,将转化成功的单个菌落接种于相应的含有氨苄青霉素抗生素的 LB 培养基,长出克隆后提取质粒,由上海生工生物工程股份有限公司测序证实插入序列正确,说明成功构建载体。见图 2、3。

**2.3 慢病毒包装和滴度测定并感染目的细胞** 重组慢病毒载体和 Negative control 表达载体分别和包装辅助质粒共转染 293T 细胞。采用孔稀释法测定慢病毒滴度为  $3.08 \times 10^7$  TU/ml,见图 4。将收集的慢病毒连续 2 次感染目的细胞,通过 puromycin 反复筛选得到稳定转染 pLJM1-shRNA-EEF1D 的 SK-OV3/DDP 细胞株。同样方法获得稳定转染 pLJM1-shRNA-Negative control 的对照组 SKOV3/DDP 细胞株。

**2.4 目的细胞中 RNA 干扰效果的检测** 提取非特异性转染组 SKOV3 shScrambled、非特异性转染组 SKOV3/DDP shScrambled、特异性转染组 SKOV3 shEEF1D、特异性转染组 SKOV3/DDP shEEF1D、对照组 SKOV3 与对照组 SKOV3/DDP 的总 RNA 和总

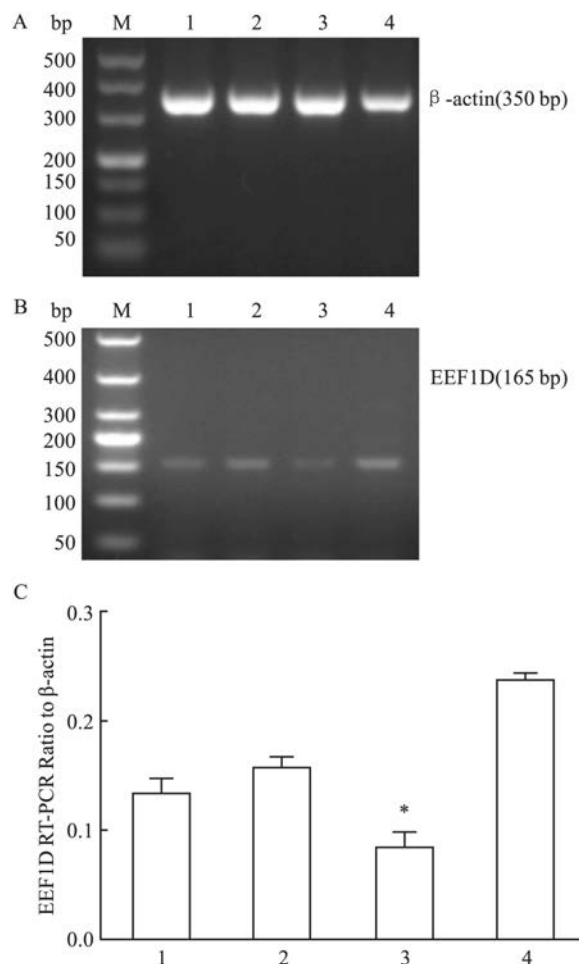


图1 3条 siRNA 瞬时转染后对 EEF1D mRNA 表达的影响

A: 瞬时转染后各组  $\beta$ -actin 的表达; B: 瞬时转染后各组 EEF1D 的表达; C: RT-PCR 灰度值分析瞬时转染效果; 1: EEF1D siRNA1; 2: EEF1D siRNA2; 3: EEF1D siRNA3; 4: Scrambled siRNA; M: Marker; 与非特异性转染组 Scrambled siRNA 相比较: \*  $P < 0.05$

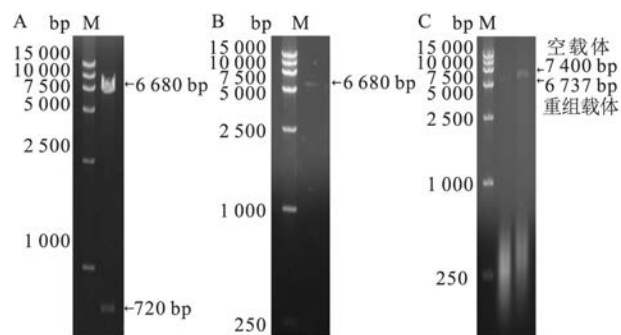


图2 慢病毒载体构建

A: 慢病毒载体质粒双酶切; B: 线性化质粒回收; C: 空载体与重组载体电泳; M: Marker

蛋白,RT-PCR 和 Western blot 分析结果显示 SKOV3 shEEF1D 与 SKOV3/DDP shEEF1D 中 EEF1D 的表达均受到干扰。在 mRNA 水平上,与 SKOV3

shScrambled、SKOV3/DDP shScrambled 相比 SKOV3 shEEF1D、SKOV3/DDP shEEF1D 明显敲减 EEF1D mRNA 的表达 ( $F = 95.94$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 5。在蛋白水平上, SKOV3 shEEF1D、SKOV3/DDP shEEF1D 组 EEF1D 表达量降低 ( $F = 133.96$ ,  $P < 0.05$ ), 见图 6。因此获得稳定敲减 EEF1D 基因的 SKOV3/DDP、SKOV3 细胞株用于下一步细胞实验分析。

## 2.5 MTT 检测 EEF1D 基因敲减前后细胞增殖的

影响 MTT 结果显示通过敲减 EEF1D 基因, DDP 和 DDP + PGIPN 对细胞均增强增殖抑制作用, DDP 联合 PGIPN 具有协同/相加作用, 与 SKOV3 shScrambled、SKOV3/DDP shScrambled 及对照组相比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且通过敲减 EEF1D 基因的 SKOV3/DDP 对 DDP 的敏感性更高。见图 7。

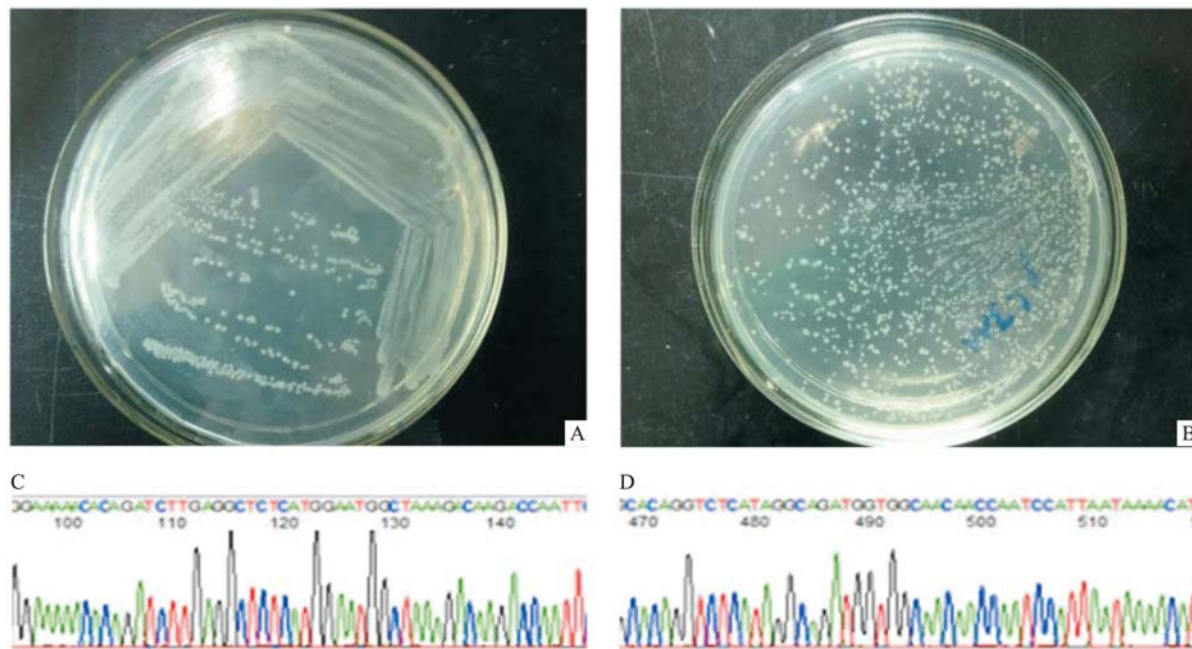


图3 感受态细胞转化与阳性克隆测序鉴定

A: DH5α 单克隆菌落; B: 转化成功的单个菌落; C: pLJM1-shRNA-EEF1D 测序图; D: pLJM1-shRNA-Scrambled 测序图

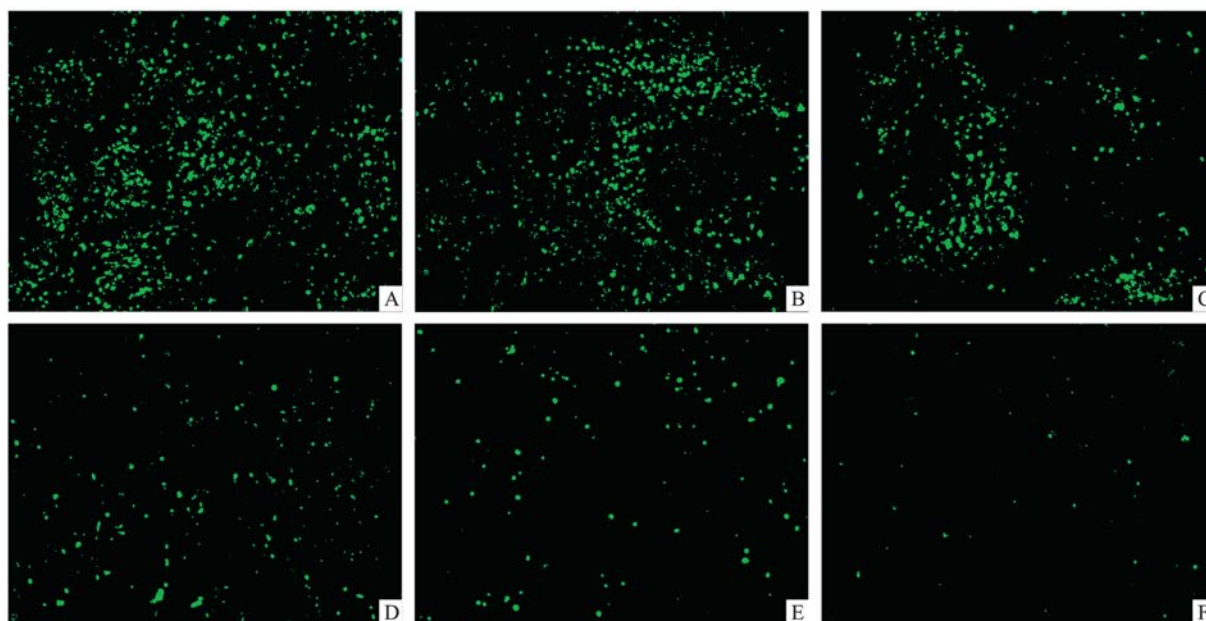


图4 GFP 阳性细胞数测定慢病毒滴度

A:  $10^0$ ; B:  $10^{-1}$ ; C:  $10^{-2}$ ; D:  $10^{-3}$ ; E:  $10^{-4}$ ; F:  $10^{-5}$

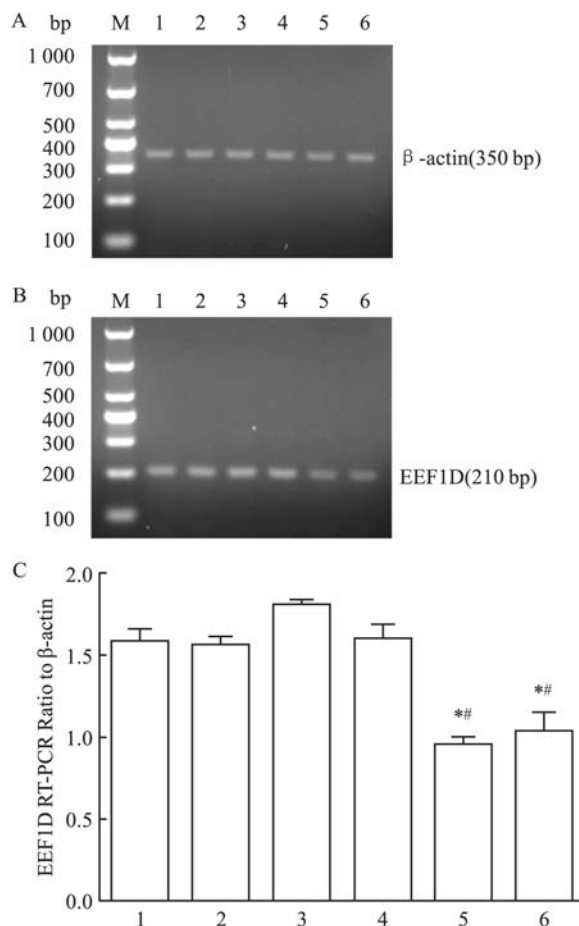


图5 RT-PCR 检测 RNA 干扰前后对细胞内 EEF1D 基因表达的影响

A: 稳定转染后各组  $\beta$ -actin 的表达; B: 稳定转染后各组 EEF1D 的表达; C: RT-PCR 灰度值分析稳定转染效果; 1: 对照组 SKOV3; 2: 对照组 SKOV3/DDP; 3: 非特异性转染组 SKOV3 shScrambled; 4: 非特异性转染组 SKOV3/DDP shScrambled; 5: 特异性转染组 SKOV3 shEEF1D; 6: 特异性转染组 SKOV3/DDP shEEF1D; M: Marker; 与非特异性转染组相比较: \*  $P < 0.05$ ; 与对照组比较: #  $P < 0.05$

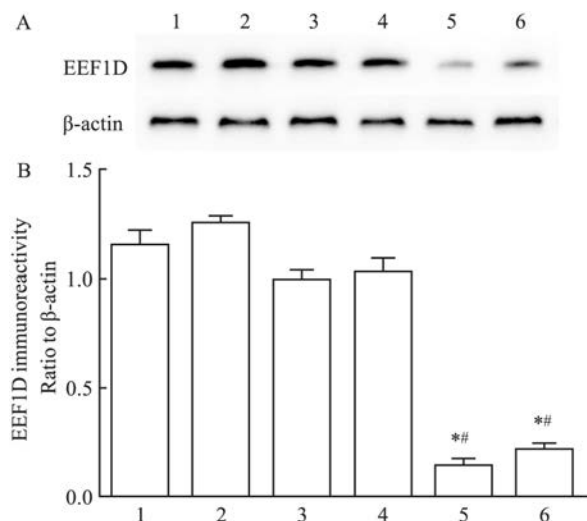


图6 Western blot 检测 RNA 干扰前后对细胞内 EEF1D 蛋白表达的影响

A: 稳定转染后细胞 EEF1D 和  $\beta$ -actin 的蛋白表达; B: Western blot 灰度值分析稳定转染效果; 1: 对照组 SKOV3; 2: 对照组 SKOV3/DDP; 3: 非特异性转染组 SKOV3 shScrambled; 4: 非特异性转染组 SKOV3/DDP shScrambled; 5: 特异性转染组 SKOV3 shEEF1D; 6: 特异性转染组 SKOV3/DDP shEEF1D; 与非特异性转染组相比较: \*  $P < 0.05$ ; 与对照组相比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

EEF1D 复合物由非核糖体蛋白酶因子组成,在其 GTP 结合形式中,通过将氨酰基 tRNA 分子募集到核糖体来介导蛋白质的合成<sup>[9]</sup>。有研究<sup>[10]</sup>表明,EEF1 家族的  $\delta$  可能在癌症中发挥作用。卵巢癌中 EEF1D 基因过度表达,同时体现在乳腺癌、肝癌、食管癌等其他恶性肿瘤中。Flores et al<sup>[11]</sup>发现,EEF1D 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)中过表达,并显

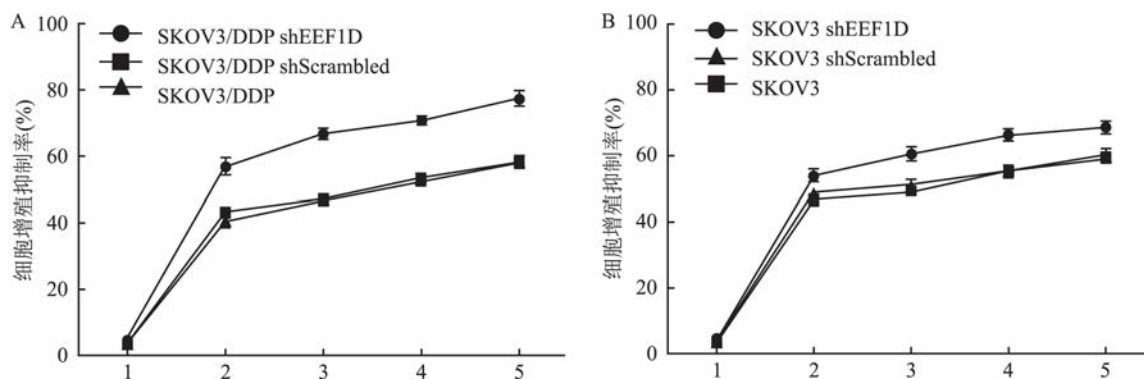


图7 MTT 检测 EEF1D 基因敲减前后细胞增殖的影响

1: PGPIPN; 2: DDP; 3: DDP + 低 PGPIPN; 4: DDP + 中 PGPIPN; 5: DDP + 高 PGPIPN; A: 各组对卵巢癌耐药细胞株 SKOV3/DDP 增殖的影响; B: 各组对卵巢癌细胞株 SKOV3 增殖的影响



示 EEF1D 和蛋白质相互作用促进激活细胞周期蛋白 D1 和波形蛋白,通过敲减 EEF1D 基因的表达,明显抑制 OSCC 增殖。另一方面,研究<sup>[12]</sup>通过 EEF1D 敲减使 SNAIL1, ZEB1 和 ZEB2 的表达下调直接激活上皮细胞-间充质转化(EMT)过程增强肿瘤细胞的迁移和侵袭,这说明通过下调 EEF1D 的表达可以缓解肿瘤的发生。提示着 EEF1D 在肿瘤的发生和发展中扮演了重要的角色,但是在卵巢癌细胞中,下调 EEF1D 对卵巢癌细胞的增殖和迁移是否起到抑制作用,国内尚未见报道。

卵巢癌的化疗耐药是制约卵巢癌治愈率提高的关键因素,卵巢癌化疗耐药是多基因调控的过程,其逆转机制较为复杂,目前研究尚处于探索阶段。有研究认为通过抑制多耐药基因 1(MDR1)的功能,可以逆转耐药。已有研究<sup>[13]</sup>显示一些生物活性肽能够逆转卵巢癌细胞的多药耐药性。乳源六肽 PG-PIP<sub>N</sub> 是一种生物活性肽,已有研究证明 PGPIP<sub>N</sub> 具有提高机体免疫功能、诱导免疫细胞分泌细胞活性因子和诱导肿瘤细胞凋亡等途径而具有抗卵巢癌功能。其机制可能是 EEF1D 是 PGPIP<sub>N</sub> 的结合靶点,间接沉默了 EEF1D 基因通过激活小 G 蛋白(Ras)而激活 MAPK 和/或 PI3K/Akt 信号转导通路,减弱了细胞修复和抗凋亡能力,进而减弱卵巢癌细胞的耐药性<sup>[14]</sup>。因此结合下调 EEF1D 的表达,PGPIP<sub>N</sub> 联合抗肿瘤药物用药是否使卵巢癌细胞增殖受到明显的抑制尚不清楚。

本研究通过特异性强、效率高的 RNA 干扰技术提供了一个逆向研究 EEF1D 基因在卵巢癌化疗耐药中作用的方法,而设计和构建敲减 EEF1D 基因的 shRNA 慢病毒表达载体是本实验的关键<sup>[15]</sup>。本研究成功构建的重组慢病毒表达载体,经过实验证明明显下调 SKOV3/DDP、SKOV3 细胞中 EEF1D 表达,经过嘌呤霉素筛选后获得稳定敲减 EEF1D 基因的 SKOV3/DDP、SKOV3 细胞模型。本研究显示对 EEF1D 敲减后,与对照组相比 DDP 增强了对细胞增殖抑制率,DDP + 高浓度的 PGPIP<sub>N</sub> 联合用药明显增强了药物作用,细胞增殖抑制率明显增高,其机制可能是 RNA 干扰的直接沉默与 PGPIP<sub>N</sub> 结合 EEF1D 靶点间接沉默的叠加结果。与 SKOV3 细胞相比,通过敲减 EEF1D 基因的 SKOV3/DDP 对 DDP 的敏感性更高,阐述了 EEF1D 能够在卵巢癌细胞耐药中起调节作用。该研究为进一步探索 EEF1D 在卵巢癌的化疗耐药中的作用奠定了基础。为乳源生

物活性肽抗癌及其逆转癌细胞耐药性带来了新的曙光。

## 参考文献

- [1] 杨念念,严亚琼,郑荣寿,等. 中国 2009 年卵巢癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤 2013 22(8): 617-21.
- [2] Avril N, Gourtsoyianni S, Reznick R. Gynecological cancers [J]. *Methods Mol Biol* 2011 727: 171-89.
- [3] Pelà M, Saxena P, Luciani R, et al. Optimization of peptides that target human thymidylate synthase to inhibit ovarian cancer cell growth [J]. *J Med Chem* 2014 57(4): 1355-67.
- [4] Sen Z, Zhan X K, Jing J, et al. Chemosensitizing activities of cyclotides from *Clitoria ternatea* in paclitaxel-resistant lung cancer cells [J]. *Oncol Lett* 2013 5(2): 641-4.
- [5] Foy K C, Miller M J, Moldovan N, et al. Immunotherapy with HER-2 and VEGF peptide mimics plus metronomic paclitaxel causes superior antineoplastic effects in transplantable and transgenic mouse models of human breast cancer [J]. *Oncoimmunology* 2012 1(7): 1004-16.
- [6] Radulescu R T. From the RB tumor suppressor to MCR peptides [J]. *Protein Pept Lett* 2014 21(6): 589-92.
- [7] Català-Clariana S, Benavente F, Giménez E, et al. Identification of bioactive peptides in hypoallergenic infant milk formulas by capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta* 2010 683(1): 119-25.
- [8] 魏彩, 秦宜德, 桂丽, 等. 乳源免疫调节肽体外抑制人卵巢癌细胞侵袭和转移 [J]. 中国药理学报 2013 29(1): 42-8.
- [9] Dever T E, Green R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 4(7): a013706.
- [10] De Bortoli M, Castellino R C, Lu X Y, et al. Medulloblastoma outcome is adversely associated with overexpression of EEF1D, RPL30, and RPS20 on the long arm of chromosome 8 [J]. *BMC Cancer* 2006 6: 223.
- [11] Flores I L, Kawahara R, Miguel MC, et al. EEF1D modulates proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma [J]. *Clin Sci (Lond)* 2016 130(10): 785-99.
- [12] Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K, et al. Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by deltaEF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF-beta [J]. *Mol Biol Cell* 2007 18(9): 3533-44.
- [13] Yan B X, Ma J X, Zhang J, et al. PSP94 contributes to chemoresistance and its peptide derivative PCK3145 represses tumor growth in ovarian cancer [J]. *Oncogene* 2014 33(45): 5288-94.
- [14] Cullis J, Meiri D, Sandi M J, et al. The RhoGEF GEF-H1 is required for oncogenic RAS signaling via KSR-1 [J]. *Cancer Cell* 2014 25(2): 181-95.
- [15] Morris K V, Rossi J J. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy [J]. *Gene Ther* 2006 13(6): 553-8.

网络出版时间: 2018-5-23 14:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.003.html>

## 载气吹扫尼古丁长期吸入对大鼠心血管功能、氧化应激和炎症水平影响

程攀<sup>1</sup>, 何庆<sup>2,3</sup>, 张晓宇<sup>2,3</sup>, 张永学<sup>1</sup>, 张文欣<sup>1</sup>, 汪志伟<sup>1</sup>, 赵庆中<sup>1</sup>, 高杉<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究载气吹扫尼古丁吸入对大鼠心血管功能、氧化应激和炎症水平的影响并初步探讨其机制。方法 将40只雄性健康SD大鼠随机均分为4组。实验组进行载气吹扫尼古丁法致大鼠吸入,每日分别定时暴露1、2、4h,确定为低、中、高剂量组。对照组在标准条件下饲养。90d后测定大鼠心功能、心、肺、血清中内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、白介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素10(IL-10)含量,血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量。结果 与对照组比较,暴露处理组血压明显

升高,血清SOD活性降低,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量升高,而MDA含量明显降低。心、肺血清IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-10含量均有不同程度的升高。结论 载气吹扫尼古丁吸入的大鼠血压升高,心功能存在障碍,机体氧化-抗氧化失衡并且心肺发生炎症反应,其机制可能与内皮细胞功能紊乱和交感、副交感系统的同时激活有关。

**关键词** 尼古丁; 心血管功能; 氧化应激; 炎症因子; 大鼠  
中图分类号 R 965.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0834-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.003

2018-02-27 接收

基金项目: 烟草化学安徽省重点实验室开放课题(编号: 2015034);  
科技部重大新药创制资助课题(编号: 2017ZX09301012)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学药理学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup> 烟草行业燃烧热解研究重点实验室(安徽中烟工业有限责任公司), 合肥 230088

<sup>3</sup> 烟草化学安徽省重点实验室(安徽中烟工业有限责任公司), 合肥 230088

作者简介: 程攀, 女, 硕士研究生;

高杉, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aydgs@126.com

尼古丁(nicotine)是一种无色的液态生物碱,最早从烟草中提取发现,故又名烟碱。烟碱性剧毒,小剂量可兴奋呼吸中枢,升高血压,而大剂量摄入将引起中枢神经系统的麻痹。研究<sup>[1]</sup>显示尼古丁在循环系统、呼吸系统、中枢神经系统、内分泌系统等中存在负性效应,其中对心血管功能的影响极为重要,通过损伤血管内皮,影响血脂代谢,诱发动脉粥样硬化的形成。同时尼古丁诱导细胞膜的损伤,干扰

## Construction of EEF1D stable knockdown human ovarian cancer cells and exploration of its drug sensitivity

Wang Shenyi, Xu Qia, Ruan Xin et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the effect of RNA interference eukaryotic translation elongation factor 1 $\delta$  (EEF1D) gene expression on the sensitivity of DDP and PGIPN in human ovarian cancer resistant cells. **Methods**

According to human EEF1D gene design and screen the best siRNA which can down regulate the gene expression and construct the shRNA expression vector pLJM1-shRNA. The SKOV3 and SKOV3/DDP cell lines stably transfected with pLJM1-shRNA-EEF1D were constructed by lentiviral expression vector. RT-PCR and Western blot were used to detect the expression of EEF1D gene in stable transfected cell line. MTT assay was used to determine the inhibitory rate of PGIPN, DDP, DDP/PGIPN on the proliferation of stable transfected cell lines. **Results** The results showed that the recombinant lentiviral vector pLJM1-shRNA-EEF1D was successfully constructed. RT-PCR and Western blot confirmed that EEF1D was knockdown in SKOV3 and SKOV3/DDP. Moreover, MTT results show that, compared with control group and nonspecific transfection group, the proliferation of DDP/PGIPN group was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The sensitivity of human ovarian cancer SKOV3/DDP cells to DDP/PGIPN is significantly enhanced by interfering with EEF1D gene expression.

**Key words** RNA interference; human ovarian cancer; EEF1D; DDP; PGIPN