

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.039.html>

ΔNp63α 基因过表达对人宫颈癌细胞 SiHa 基因表达谱的影响

韩晓慧¹, 赵卫东^{1,2}, 方慧英³

摘要 目的 分析 ΔNp63α 基因过表达时人宫颈癌细胞 SiHa 基因表达谱的变化, 筛选受 ΔNp63α 调控的潜在靶基因。方法 利用慢病毒转染技术构建稳定过表达 ΔNp63α 的转染组细胞株 SiHa-ΔNp63α 和对照组细胞株 SiHa-NC。应用基因芯片技术研究两组细胞株基因表达谱变化, 并进行生物学信息分析和实时荧光定量 PCR 验证。结果 基因芯片数据共筛选出差异倍数 1.5 倍以上的基因共 1 405 个, 其中 843 个基因在 SiHa-ΔNp63α 细胞中表达上调, 562 个表达下调。通过生物信息学分析显示这些基因主要参与细胞生长与周期、信号转导、细胞通讯、细胞黏附、细胞转移和侵袭等功能, 涉及的信号通路包括抗原加工提呈、细胞因子与受体相互作用、细胞黏附分子、补体系统等。结论 研究 ΔNp63α 调控的潜在靶基因或信号通路, 对探索宫颈癌发生发展的机制有重要意义。

关键词 宫颈癌; 基因表达谱; ΔNp63α; 实时荧光定量 PCR
中图分类号 R 737.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0181-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.006

子宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤, 近年来呈上升和年轻化趋势, 严重威胁女性生命健康^[1]。人乳头状瘤病毒 (human papillomavirus, HPV) 感染是宫颈癌及癌前病变的关键因素, 但其发生发展仍是一个多阶段、多步骤、涉及多基因的病理过程。ΔNp63α 是 p63 基因转录产物之一, 与宫颈癌的组织分化程度及预后相关, 低表达 ΔNp63α 的患者发生肿瘤转移和复发的危险性更高、预后也更差^[2]。该研究通过体外基因转染技术建立过表达 ΔNp63α 的宫颈癌细胞株, 应用基因芯片技术检测其基因表达谱差异情况, 同时利用生物信息学技术对相关基因和信号通路进行分析, 预测由 ΔNp63α 直接或者间接调控的潜在靶基因, 分析 ΔNp63α 在

宫颈癌发生发展过程中的作用及调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人宫颈癌细胞 SiHa 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心; DMEM 培养液和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; TRIzol Reagent 和 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司; 基因芯片为 Agilent 人 4 × 44K 芯片全基因组表达谱, ΔNp63α 的 cDNA 购自美国 ORIGENE 公司; 质粒 pHelper 1.0、质粒 pHelper 2.0 购自广州莱德爾生物科技有限公司; FastQuant RT Kit 购自北京 TIANGEN 公司; SYBR Premix Ex TaqTM 购自日本 TaKaRa 公司; Plasmid Midi Kit 购自德国 QIAGEN 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含 10% 胎牛血清、0.1% 青/链霉素的 DMEM 培养液, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中贴壁培养, 细胞在对数生长期时用胰酶消化传代。

1.2.2 过表达 ΔNp63α 宫颈癌细胞株的建立 扩增全长 ΔNp63α cDNA, 与经 Xho I 和 BamH I 双酶切的 pLVX-IRES-ZsGreen1 慢病毒载体进行连接, 构建重组慢病毒质粒 pLVX-IRES-ZsGreen1 + ΔNp63α, 送至基因公司进行测序鉴定。Plasmid Midi Kit 抽提高纯度无内毒素的重组病毒质粒 (或空载体) 及其两种辅助包装质粒, 使用 Lipofectamine 2000 共转染人肾胚 (human embryonic kidney, HEK) 293T 细胞, 转染后 8 h 更换培养基, 培养 48 h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 浓缩获得高滴度的慢病毒浓缩液。在 293T 细胞中测定并标定病毒滴度后, 感染 SiHa 细胞构建转染组细胞株 SiHa-ΔNp63α 及其对照组 SiHa-NC。

1.2.3 基因芯片检测 应用 TRIzol 试剂盒提取转染组和对照组的总 RNA 并纯化, 将 RNA 样品送至上海康成生物有限公司进行 RNA 质量检测及人基因组表达谱检测, 芯片扫描使用美国 Axon 公司芯片扫描仪 (Axon GenePix 4 000 B), 图像和数据处理使用美国 Axon 公司 GenePix Pro 6.0 软件。

1.2.4 基因芯片数据分析 使用 PANTHERFR (<http://www.pantherdb.org/>) 在线工具进行 GO (Gene

2016-09-09 接收

基金项目: 安徽省高等学校自然科学研究项目 (编号: KJ2015A375)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院妇产科, 合肥 230001

² 安徽省肿瘤医院妇科, 合肥 230031

³ 安徽人口职业学院, 池州 247099

作者简介: 韩晓慧, 女, 硕士研究生;

赵卫东, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: vic-torzhao@163.com

Ontology) 本体功能分析。Pathway 分析使用 DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/) 在线软件。利用 STRING(http://string.embl.de/) 在线工具对 Pathway 分析结果中的差异基因所编码的蛋白质之间的相互作用关系进行进一步研究。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 验证差异表达基因 TRIzol 抽提 SiHa-ΔNp63α 和 SiHa-NC 细胞的总 RNA,使用 FastQuant RT Kit 反转录成 cDNA,利用 SYBR Premix Ex Taq™ 进行 qRT-PCR 检测。使用 Primer 5.0 软件设计引物,送由华大基因科技股份有限公司有限公司合成。骨形态发生蛋白 7 (bone morphogenetic protein 7, BMP7) F:5'-AGTC-TATCAGGTGCTCCAGG-3', R: 5'-TTGCTGGTGGCT-GTGATG-3';白细胞分化抗原 74 (CD74) F:5'-CGG-GAAGATCAGAAGCCAGTC-3', R: 5'-GCGAGGAG-CAGAGTCACCAG-3'; ΔNp63α F: 5'-GACTCAATT-TACTGAGCCACACT-3', R: 5'-GCAATTGCCAG-TAGAGTTT-3';GAPDH F:5'-GGCACAGTCAAGGCT-GAGAATG-3', R:5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'。在 Roche LightCycler 480 仪器上使用以下条件进行 qRT-PCR 扩增:95 ℃、10 s 95 ℃、5 s 60 ℃、30 s 融解曲线温度范围:65 ~ 95 ℃ 40 个循环,每个样品重复 3 次,记录 Ct 值,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间计量资料采用两独立样 t 检验 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ΔNp63α 过表达后基因芯片分析结果 根据芯片数据,筛选 P < 0.05、差异倍数 > 1.5 或者 < 1 : 1.5 的差异基因进行分析。差异表达基因共 1 405 个,其中表达上调 843 个,表达下调 562 个。见图 1。

2.2 差异基因 GO 分析 利用 PANTHERFR 在线分析工具对上述基因进行 GO 分析。显示差异表达基因主要与细胞生长、细胞周期调控、信号转导、细胞转移侵袭、细胞黏附、细胞通讯等功能有关。按照 GO 分类的 3 个分支对其进行功能分类,结果见图 2 在生物过程分类中,细胞生理占 19.9%,代谢过程占 22.7%;在分子功能分类中,结合型基因占 32.3%,有催化活性基因占 27.1%;在细胞内定位分类中,细胞器蛋白占 22.6%,膜蛋白占 13.9%。

2.3 KEGG 通路分析 使用 DAVID 在线分析软件对芯片结果中的 1 405 个差异表达基因进行

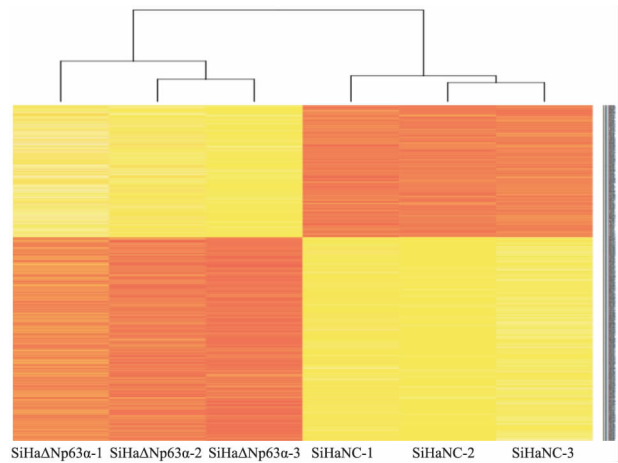


图 1 差异表达基因热图

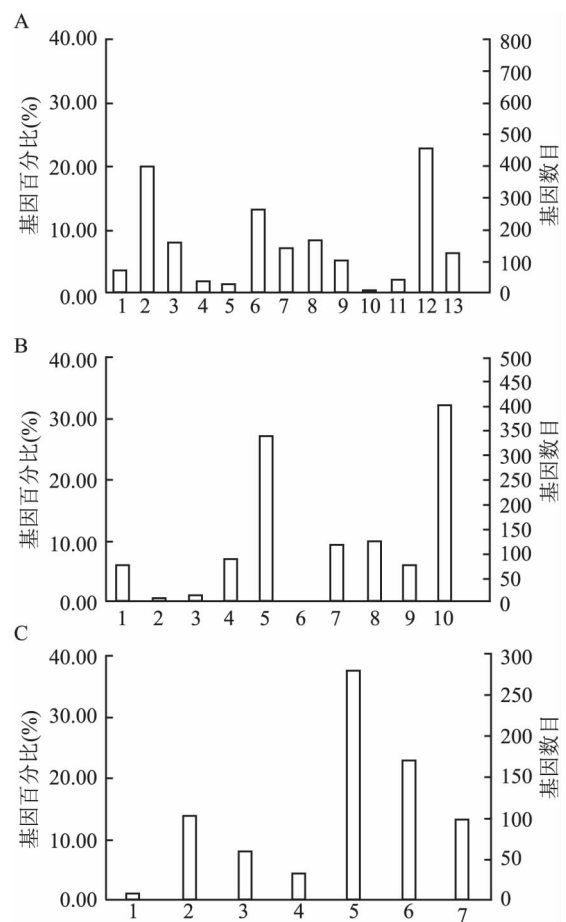


图 2 差异表达基因 GO 分析结果

A:生物过程(1:生物合成过程;2:细胞生理;3:定位过程;4:凋亡过程;5:细胞增殖;6:生物调节过程;7:应激;8:发展过程;9:多细胞生物体过程;10:转运;11:黏附过程;12:代谢过程;13:免疫系统过程);B:分子功能(1:转录因子活性;2:调节因子活性;3:蛋白结合转录因子活性;4:酶调节器活性;5:催化活性;6:信号转导活性;7:受体活性;8:核酸结合转录因子活性;9:分子结构活性;10:结合);C:细胞内定位(1:细胞连接区域;2:膜成分;3:大分子复合物;4:细胞外基质成分;5:细胞骨架;6:细胞器;7:细胞外区域)

表1 KEGG 通路分析结果

信号通路	数目	P 值	基因名称
Antigen processing and presentation	16	0.00	B2M CD74 CTSL HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G CIITA TAP1 TAP2 TAPBP
Viral myocarditis	14	0.00	CAV1 CD55 HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G ITGB2 EIF4G3
Rheumatoid arthritis	16	0.00	ANGPT1 CTSL CXCL1 HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 IL6 IL11 IL15 IL18 ITGB2 JUN LTB CCL20 TLR2 VEGFA
Phagosome	22	0.00	CD36 CTSL HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G ITGAM ITGB2 NCF2 OLR1 TAP1 TAP2 TLR2 EEA1 PLA2R1 PIKFYVE TUBB8
Graft-versus-host disease	10	0.00	HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G IL6
Allograft rejection	9	0.00	HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G
Type I diabetes mellitus	9	0.00	HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G
Staphylococcus aureus infection	10	0.00	CFB C1QB C1S C4B HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 CFI ITGAM ITGB2
Hematopoietic cell lineage	13	0.00	CD1A CD7 CD36 CSF3 CD55 HLA-DRA HLA-DRB5 IL4R IL6 IL11 ITGAM KITLG CD24
Cell adhesion molecules (CAMs)	17	0.00	ALCAM CNTN1 HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G ITGAM ITGB2 CLDN11 SDC4 NFASC JAM2
Complement and coagulation cascades	11	0.00	A2M CFB C1QB C1S C4B C6 CD55 F3 CFI PLAT THBD
Cytokine-cytokine receptor interaction	27	0.00	AMHR2 BMP7 CCR1 CSF3 EDA CXCL1 CXCL2 CXCL3 HGF IL4R IL6 IL11 IL15 IL15RA TNFRSF9 IL18 INHBB LIF LTB KITLG TNFRSF11B CCL20 CXCL11 VEGFA IL18R1 IL20 CXCL16
Autoimmune thyroid disease	9	0.00	HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 HLA-E HLA-F HLA-G
Focal adhesion	21	0.00	BIRC3 CAV1 CAV3 COL4A6 COL5A1 HGF TNC JUN LAMA3 LAMA4 MYL5 MYLK PPP1R12A PPP1CB VEGFA VTN PIK3R3 ITGA10 ROCK2 AKT3
Amoebiasis	13	0.00	COL4A6 COL5A1 CXCL1 IL6 ITGAM ITGB2 LAMA3 LAMA4 SERPIN2 SERPIN3 SERPIN4 TLR2 PIK3R3
Leishmaniasis	10	0.00	HLA-DPB1 HLA-DRA HLA-DRB5 ITGAM ITGB2 JUN NCF2 NFKBIB PTGS2 TLR2
Malaria	8	0.00	CD36 CSF3 HGF IL6 IL18 ITGB2 SDC4 TLR2

KEGG 通路分析。选择 $P < 0.05$ 的共 17 条通路进行研究,其中涉及的主要通路包括:抗原加工与处理、吞噬作用、病毒与细菌感染以及自身免疫性疾病和细胞黏附等,见表 1。

2.4 KEGG 通路结果中差异表达基因编码蛋白质之间的相互作用网络的构建分析 将 KEGG 通路分析结果中的 98 个基因以及 tp63 上传至 STRING 在线工具,对以上基因所编码的蛋白质之间的相互作用进行分析。结果见图 3,蛋白质相互作用主要集中在 JUN、IL6、IL11、B2M、ITGAM、VEGFA、CD74 及 BMP7 等蛋白之间。经过文献查阅,显示大部分基因涉及免疫相关机制,其中与 tp63 编码蛋白有直接相互作用的蛋白为 CD74 和 BMP7。

2.5 qRT-PCR 验证 针对上述与 tp63 编码蛋白有直接相互作用的蛋白(CD74 和 BMP7)的编码基因, GAPDH 作为内参对照,使用 qRT-PCR 对其表达差异进行验证。结果见图 4,在转染组细胞中,与对照组相比, $\Delta Np63\alpha$ 表达上调 (5.73 ± 0.23) 倍, BMP7 表达下调 (1.59 ± 0.06) 倍, CD74 表达下调

(2.65 ± 0.06) 倍,差异有统计学意义 ($t = 24.633$ 、 -6.839 、 -8.534 , $P < 0.05$)。

3 讨论

核转录因子 p63 是 p53 家族的重要成员,在上皮细胞增殖、分化、组织生长发育过程中起着关键性作用。tp63 基因 5' 端具有 P1 和 P2 2 个启动子,转录产物分别编码 N 端不同的 TAp63 和 $\Delta Np63$; 而 3' 端的可变剪切使得 TAp63 和 $\Delta Np63$ 分别具有 C 端不同的 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 亚型^[3]。在宫颈等鳞状上皮组织及相应肿瘤中, p63 主要表达 $\Delta Np63\alpha$ 亚型,并且集中在基底细胞中,副基底细胞也有少量表达;随着上皮分化、分层的进行, $\Delta Np63\alpha$ 表达逐渐降低直至消失^[2-4]。本课题组前期研究^[4]显示,宫颈癌组织中 $\Delta Np63\alpha$ 的表达水平与上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)显著相关。在宫颈癌细胞株中 $\Delta Np63\alpha$ 的表达水平也有所差异。其中, ME-180 细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 高表达, SiHa 细胞中低表达^[3]。因此,本研究在 SiHa 细胞中过表达

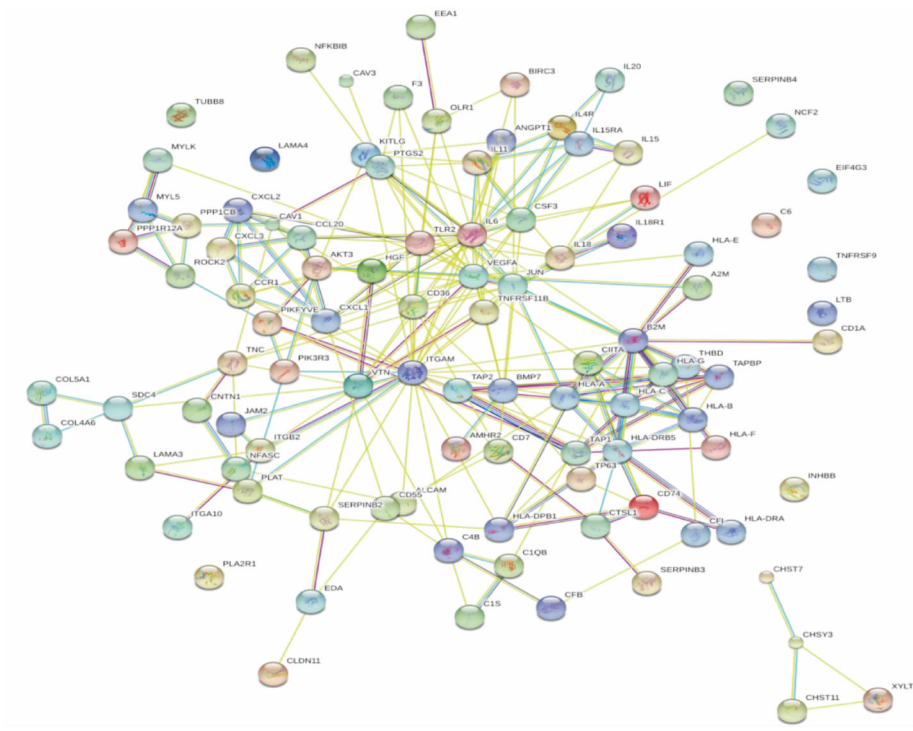


图3 KEGG 通路中差异基因编码蛋白相互作用网络分析

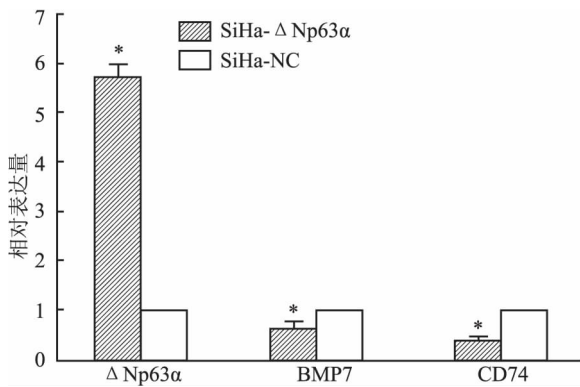


图4 ΔNp63α、BMP7 和 CD74 在两组细胞中的相对表达水平与 SiHa-NC 组比较: * P < 0.05

ΔNp63α 使用基因芯片检测其表达谱变化,筛选出差异倍数 > 1.5, P < 0.05 的基因共 1 405 个(上调基因 843 个,下调基因 562 个)。对以上基因进行 GO 聚类分析,结果显示其主要参与细胞生长与周期、信号转导、细胞转移和侵袭等功能。进一步进行 KEGG 通路分析,结果显示差异基因主要涉及免疫反应相关的信号通路。对 KEGG 通路分析结果中 98 个基因编码的蛋白质之间的相互关系进行分析,显示与 ΔNp63α 直接相关的基因编码蛋白为 BMP7 和 CD74,并进行 qRT-PCR 进行验证,结果与芯片结果一致。

BMP7 属于转化生长因子(TGF)-β 超家族的成

员之一,在多种上皮性肿瘤中显著表达,如乳腺癌、原发性黑色素瘤、食管癌和前列腺癌等,参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡等功能,尤其是细胞侵袭和转移^[5-8]。在乳腺癌细胞中 BMP7 可以作为 p53 家族蛋白下游靶基因^[5],在前列腺癌细胞中 BMP7 能诱导 EMT 的发生^[8],而在恶性黑色素瘤细胞中 BMP7 则可以促进间质-上皮转化过程^[6]。本研究显示,在 SiHa 细胞中过表达 ΔNp63α 可引起 BMP7 表达下调,同时细胞的 EMT 过程和侵袭转移能力受到抑制^[4]。而且在前期的 miRNA 表达谱数据中,ΔNp63α 的过表达引起了直接调控 BMP7 的 miR-22 表达上调(Fold change = 2.32, P < 0.05)^[4,9]。所以,miR-22/BMP7 能否介导 ΔNp63α 调控宫颈癌 EMT 的过程值得深入研究。

CD74 即 MHC-II 类分子相关恒定链,作为巨噬细胞移动因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)的高度亲和力受体,介导 MIF 调控的细胞生存信号^[10]。在乳腺癌、膀胱癌和宫颈癌等多种恶性肿瘤细胞中表达上调^[11-13]。CD74 可以与 MIF、CD44 形成复合物,激活 NF-κB 信号通路^[10],在宫颈癌组织中调控肿瘤的发生发展^[13]。而在表达谱数据中,上调 ΔNp63α 后 IL6、TLR2 等 NF-κB 相关因子分别下调 1.72 倍和 1.61 倍^[4]。因此 ΔNp63α 与 CD74 之间的调控关系值得进一步探讨。

本研究利用人类表达谱芯片分析 $\Delta Np63\alpha$ 过表达前后的基因表达差异情况,筛选出 CD74 和 BMP7 作为 $\Delta Np63\alpha$ 可能作用的候选基因,推论这两个基因可能与 $\Delta Np63\alpha$ 共同介导宫颈癌中免疫功能相关的信号通路,从而影响肿瘤的发展。因此,下一步实验将检测转染组和对照组细胞中 $\Delta Np63\alpha$ 、CD74 和 BMP7 在蛋白水平的表达情况,分别在两株细胞中过表达或沉默 CD74 和 BMP7,比较 $\Delta Np63\alpha$ 及其他免疫相关因子的变化,同时进行细胞增殖、侵袭和凋亡等功能实验,探究 CD74 和 BMP7 在宫颈癌细胞功能方面发挥的作用。以上这些研究将为进一步探讨 $\Delta Np63\alpha$ 在宫颈癌中的作用机制提供重要的思路和线索。

参考文献

- [1] Li S, Hu T, Lv W, et al. Changes in prevalence and clinical characteristics of cervical cancer in the People's Republic of China: a study of 10 012 cases from a nationwide working group [J]. *Oncologist*, 2013, 18(10):1101-7.
- [2] Zhou Y, Xu Q, Ling B, et al. Reduced expression of $\Delta Np63\alpha$ in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Clin Invest Med*, 2011, 34(3):E184-91.
- [3] Vanbokhoven H, Melino G, Candi E, et al. p63, a story of mice and men [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(6):1196-207.
- [4] Zhao W, Wang H, Han X, et al. $\Delta Np63\alpha$ attenuates tumor aggressiveness by suppressing miR-205/ZEB1-mediated epithelial-mesenchymal transition in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8):10621-32.
- [5] Alarino E L, Kallioniemi A. Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumorigenesis [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(2):R123-39.
- [6] Na Y R, Seok S H, Kim D J, et al. Bone morphogenetic protein 7 induces mesenchymal-to-epithelial transition in melanoma cells, leading to inhibition of metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11):2218-25.
- [7] Megumi K, Ishigami S, Uchikado Y, et al. Clinicopathological significance of BMP7 expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol* 2012, 19(6):2066-71.
- [8] Lim M, Chuong C M, Roy-Burman P. PI3K, Erk signaling in BMP7-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of PC-3 prostate cancer cells in 2- and 3-dimensional cultures [J]. *Horm Cancer*, 2011, 2(5):298-309.
- [9] Ji D, Li B, Shao Q, et al. MiR-22 suppresses BMP7 in the development of cirrhosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(3):1026-36.
- [10] Berkova Z, Tao R H, Samaniego F. Milatuzumab-a promising new immunotherapeutic agent [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(1):141-9.
- [11] Metodieva G, Nogueira-De-Souza N C, Greenwood C, et al. CD74-dependent deregulation of the tumor suppressor scribble in human epithelial and breast cancer cells 1, 2 [J]. *Neoplasia*, 2013, 15(6):660-8.
- [12] Choi J W, Kim Y, Lee J H, et al. CD74 expression is increased in high-grade, invasive urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Int J Urol*, 2013, 20(2):251-5.
- [13] Cheng R J, Deng W G, Niu C B, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor and CD74 in cervical squamous cell carcinoma [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21(6):1004-12.

Gene expression profiles in response to $\Delta Np63\alpha$ overexpression in human cervical cancer cell line SiHa

Han Xiaohui¹, Zhao Weidong^{1,2}, Fang Huiying³

¹Dept of Obstetrics and Gynecology Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001;

²Dept of Gynecologic Oncology, Anhui Provincial Cancer Hospital, Hefei 230031;

³Anhui Vocational Institute of Population Chizhou 247099)

Abstract Objective To analyze the gene expression profiles in response to $\Delta Np63\alpha$ overexpression, and screen the potential target genes or signal pathways regulated by $\Delta Np63\alpha$. **Methods** To generate $\Delta Np63\alpha$ overexpressed SiHa cells (SiHa- $\Delta Np63\alpha$) and the control cells (SiHa-NC), recombinant lentivirus transfection was performed. Microarray was applied to detect the change of gene expression profiles, and the results were analyzed with bioinformatic software. Quantitative real-time PCR was used to validate the expression levels of selected genes. **Results** Among the 1 405 differentially expressed genes which were statistically significant, >1.5 fold increase or reduce of gene expression, 843 were up-regulated and 562 were down-regulated in SiHa cells with $\Delta Np63\alpha$ overexpression. The genes were mostly involved in cell development, cycle regulation, signal transduction, communication, adhe-

PDX1 真核表达载体的构建及其对 PANC-1 细胞 PI3K/AKT 信号途径的影响

栾康, 金锐, 刘莉, 罗欣, 张胜权

摘要 目的 构建胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (PDX1) 基因真核表达载体并转染至 PANC-1 细胞, 观察其对 PI3K/AKT 信号途径的影响。方法 从 HeLa 细胞中提取总 RNA, 逆转后 PCR 扩增 PDX1 编码区片段, 然后将 PDX1 的 CDS 插入 PCMV6-Entry 质粒构建 PCMV6-Entry-PDX1 表达重组体。重组体转染至 PANC-1 细胞中通过 G418 筛选出稳定表达细胞株。Western blot 分析 PDX1 蛋白水平表达及 p-AKT 水平变化。结果 PDX1 基因成功在 PANC-1 中表达。利用 Western blot 检测验证获得了稳定的 PDX1 过表达细胞株。Western blot 结果显示: 过表达 PDX1 的细胞株 AKT 表达含量与正常细胞及对照细胞没有区别而 p-AKT 水平降低。结论 PDX1 基因过表达能够降低 PANC-1 细胞的 p-AKT 水平。

关键词 PDX1; 基因重组; PI3K/AKT 信号通路; PANC-1

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)02-0186-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.007

胰腺癌包括胰腺内分泌细胞和外分泌细胞肿瘤。90% 以上的胰腺肿瘤起源于导管上皮细胞, 通常这类肿瘤也被成为胰腺癌^[1]。在肿瘤相关死因中胰腺癌位列第 4 位, 预后较差, 5 年生存率约 5%^[2]。胰腺癌发病机制目前仍不清楚, 可能与慢性胰腺炎、糖尿病等危险因素有关^[3-4]。胰腺十二指肠同源框蛋白 1 (pancreas and duodenum homeobox1, PDX1) 是决定胚胎内胚层时期胰腺发育

的关键性转录因子^[5]。研究^[6-7]表明在人类和小鼠胚胎发育过程中缺少 PDX1 基因会导致胰腺导管、内分泌细胞和外分泌细胞发育异常, 进而导致胰腺发育不全。在成年胰腺组织中, PDX1 主要存在胰腺 β 细胞中维持其生存及增殖^[8]。有些胰腺癌细胞系不表达 PDX1 蛋白, 因此推测 PDX1 可能在胰腺癌的发生发展中发挥作用。该研究通过建立 PDX1 过表达 PANC-1 细胞模型进而观察 PDX1 对胰腺癌细胞 PI3K/AKT 信号途径的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细菌和细胞 PCMV6-Entry 质粒购自美国 Origene 公司; DH5α 感受态细菌购自北京天根生物公司; 人胰腺癌细胞 PANC-1 购自美国 ATCC 公司。

1.1.2 主要试剂 Asc I 和 Xho I 内切酶购自美国 NEB 公司; T4 连接酶、DNA Marker、TRIzol 试剂、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase with GC Buffer 购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物由上海英骏生物公司合成; 质粒抽提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自美国 Promega 公司; Lipofectamine 3000 Transfection Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; G418 和 DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 NCBI Genbank 序列提供的人 PDX1 mRNA 序列利用 prime 6.0 软件设计引物, 序列如下: 上游引物: 5'-TTGGCGGCCATGAACG-

2016-11-28 接收

项目基金: 国家自然科学基金 (编号: 81271748)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 栾康, 男, 硕士研究生;

张胜权, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: sqz36@yahoo.com

sion, metastasis and invasion, etc. The involved signal pathways consisted of antigen processing and presentation, cytokine-cytokine receptor interaction, cell adhesion, complement and coagulation cascades, and so on. **Conclusion** The research on the potential target genes or mediated signal pathways regulated by ΔNp63α could be helpful to explain the development of cervical cancer.

Key words cervical cancer; gene expression profiles; ΔNp63α; quantitative real-time PCR