

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00553

连环蛋白 p120 shRNA 重组慢病毒载体构建及鉴定

林士波¹,程张军^{1,2*},石欣¹,沈锋²

1. 东南大学附属中大医院普通外科,南京 210009

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院,上海 200438

[摘要] **目的** 构建连环蛋白 p120 特异性 shRNA 重组慢病毒载体,感染胰腺癌 PANC-1 细胞,鉴定干扰效果。**方法** 针对 p120ctn mRNA 设计合成 3 对 shRNA 序列,连接入酶切线性化的慢病毒载体 pGCSIL-GFP,PCR 鉴定及测序正确后与构建成功的含 p120ctn 基因的载体 pGC-FU-p120ctn-3FLAG 共转染 293T 细胞,蛋白质印迹分析筛选有效 shRNA 序列,包装慢病毒,测定病毒滴度。重组慢病毒感染胰腺癌 PANC-1 细胞,实时定量 PCR 及蛋白质印迹分析鉴定干扰效果。**结果** PCR 及测序证实成功构建出 p120ctn-shRNA-LV 慢病毒载体,病毒滴度达到 3×10^9 TU/ml。重组慢病毒感染 PANC-1 细胞后,实时定量 PCR 提示 PANC-1 细胞 p120ctn mRNA 表达下降 82.6% ($P < 0.05$),蛋白质印迹分析提示 p120ctn 蛋白表达较转染前显著下降。**结论** 成功构建出 p120ctn 基因 shRNA 慢病毒载体,为进一步研究 p120ctn 在胰腺癌浸润及转移中的作用奠定了基础。

[关键词] 连环蛋白 p120; RNA 干扰; 慢病毒; 胰腺肿瘤

[中图分类号] R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0553-05

Construction and identification of recombinant lentiviral vector expressing shRNA of p120 catenin gene

LIN Shi-bo¹, CHENG Zhang-jun^{1,2*}, SHI Xin¹, SHEN Feng²

1. Department of General Surgery, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

2. Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To construct the recombinant lentiviral vector expressing specific shRNA of p120 catenin gene, and to identify the RNA interference efficiency by infecting PANC-1 cells. **Methods** Three pairs of shRNA targeting p120ctn mRNA were designed, synthesized and ligated into enzyme-digested and linearized pGCSIL-GFP lentiviral vectors. The recombinant lentiviral vectors were co-transfected with the pGC-FU-p120ctn-3FLAG containing p120ctn gene into 293T cells after identification by PCR and sequencing analysis. Western blotting analysis was applied to select the most effective shRNA. Recombined lentivirus was packaged and the concentration of the virus titer was measured. Real-time PCR and Western blotting analysis were used to identify the interference efficiency after infection of the PANC-1 cells by recombined lentivirus. **Results** PCR and DNA sequencing analysis confirmed that p120ctn-shRNA-LV was successfully constructed and the concentration of the virus titer was 3×10^9 TU/ml. Real-time PCR showed that expression of p120ctn mRNA was decreased by 82.6% in PANC-1 cells infected with the recombined lentivirus ($P < 0.05$). Western blotting analysis showed that the expression of p120ctn protein was also greatly decreased after infection. **Conclusion** We have successfully constructed lentiviral vector expressing shRNA of p120 catenin gene, and this lays a foundation for studying the role of p120ctn in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma.

[Key words] p120 catenin; RNA interference; lentivirus; pancreatic neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):553-557]

连环蛋白 p120(p120-catenin, p120ctn)最初是作为 Src 癌蛋白的底物而被发现,它通过与 E-钙粘蛋白(E-cadherin)胞内段近膜端松散可逆地结合,延长 E-cadherin 的半衰期,维持其在膜上的数量,介导细胞间的黏附。新近研究发现,胰腺癌组织中 p120ctn 表达及定位常发生异常,表现为细胞

质和细胞核的异位分布及表达上调,并与胰腺癌的增殖、浸润及恶性程度密切相关^[1-2]。我们的前期实验发现,p120ctn 在胰腺癌多个细胞株中较胰腺星状细胞均有不同程度的异常高表达,并与胰腺癌细胞的侵袭迁移能力及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达密切

[收稿日期] 2009-10-19 **[接受日期]** 2010-03-09

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30700801)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30700801)。

[作者简介] 林士波,硕士生。E-mail: lin.shibo@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 025-83272196, E-mail: chengzhangjun2003@hotmail.com

相关^[3]。因此我们推测,p120ctn表达上调、胞质胞核异位分布后除参与基础表达水平的介导细胞间黏附功能外,还可能通过某种途径改变胰腺癌浸润及转移表型。本研究通过RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术构建p120ctn特异性短双链RNA(short hairpin RNA, shRNA)慢病毒载体,下调胰腺癌PANC-1细胞中胞质异常高表达的p120ctn蛋白,为进一步探索p120ctn在胰腺癌浸润及转移中的作用及后续的基因治疗创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料及主要试剂

胰腺癌PANC-1细胞株由东南大学临床医学院实验中心保存;大肠杆菌DH5 α 、293T细胞、pGC-FU-GFP-3FLAG及pGCSIL-GFP质粒购自上海吉凯基因化学技术有限公司;含有目的基因p120ctn的重组质粒pBluescriptR-p120ctn购自美国OPEN公司并经上海吉凯基因化学技术有限公司修正突变位点;限制性内切酶Age I、Nhe I、EcoRI及T₄DNA连接酶购自美国New England Biolabs公司;质粒抽提试剂盒购自德国Qiagen公司;In-Fusion试剂盒购自美国BD公司;LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司;兔抗人p120ctn抗体购自美国Sigma公司,鼠抗FLAG抗体、GAPDH抗体、羊抗兔及羊抗鼠二抗均购自美国Santa Cruz公司。

1.2 基因过表达载体的构建及鉴定

1.2.1 p120ctn目的基因的扩增

PCR扩增pBluescriptR-p120ctn质粒p120ctn基因片段,PCR上游引物:5'-GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG GAC GAC TCA GAG GTG-3',下游引物:5'-TCA TCC TTG TAG TCG CTA GCA ATC TTC TGC ATG GAT GG-3',PCR扩增条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,68℃ 6 min,共30个循环,最后68℃延伸10 min。进行0.7%琼脂糖凝胶电泳后切取目的片段。

1.2.2 制备重组p120ctn基因表达克隆

酶切线性化载体DNA(pGC-FU-GFP-3FLAG,100 ng/ μ l) 2 μ l,纯化的PCR产物(100 ng/ μ l) 2 μ l,10 \times In-Fusion交换酶缓冲液2 μ l, In-Fusion交换酶0.5 μ l,ddH₂O 13.5 μ l,23℃ 15 min,再42℃ 15 min后,转化感受态细胞DH5 α ,PCR鉴定阳性克隆;pGC-FU-p120ctn-3FLAG。p120ctn上游引物5'-GTT CGA GCA GCA GCA CTT G-3',下游引物5'-AGC GTA AAA GGA GCA ACA TAG-3',产物大小626 bp。PCR扩增条件:94℃ 30 s,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共30个循环,最后72℃延伸6 min。挑取阳性克隆转染293T细胞,蛋白质印迹分析检测p120ctn蛋白表达(一抗为鼠抗FLAG抗体),p120ctn阳性表达的克隆送上海美季生物技术有限公司测序。

1.3 p120ctn shRNA慢病毒载体构建

1.3.1 shRNA序列设计

自GenBank获得p120ctn基因全长mRNA序列,设计3个shRNA序列。shRNA1(靶点2519~2537):5'-CCG GCA GCC AGA GGT GGT TCG GAT ATT CAA GAG ATA TCC GAA CCA CCT CTG GCT GTT

TTT G-3';shRNA2(靶点803~821):5'-CCG GCA GGA TCA CAG TCA CCT TCT ATT CAA GAG ATA GAA GGT GAC TGT GAT CCT GTT TTT G-3';shRNA3(靶点3003~3021):5'-CCG GCA GCA CTT GTA TTA CAG ACA ATT CAA GAG ATT GTC TGT AAT ACA AGT GCT GTT TTT G-3'。设计无关的shRNA作为阴性对照,经BLAST检验,与人类已知基因无明显同源性,序列为5'-CCG GCA TTC TCC GAA CGT GTC ACG TTT CAA GAG AAC GTG ACA CGT TCG GAG AAT GTT TTT G-3',由上海吉凯基因化学技术有限公司合成后送上海美季生物技术有限公司测序。

1.3.2 shRNA慢病毒载体的构建

酶切线性化载体DNA(pGCSIL-GFP)100 ng、退火的双链DNA(shRNA)100 ng、10 \times T₄DNA连接酶缓冲液1 μ l、T₄DNA连接酶1 μ l、ddH₂O 16 μ l,16℃连接过夜后,转化感受态细胞DH5 α ,挑取阳性克隆进行PCR鉴定。PCR上游引物5'-CCT ATT TCC CAT GAT TCC TTC ATA-3',下游引物5'-GTA ATA CGG TTA TCC ACG CG-3',反应条件:94℃ 30 s,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,共30个循环,最后72℃延伸6 min。连接入shRNA片段的阳性克隆PCR片段大小为343 bp,空载体克隆PCR片段大小为306 bp。选取阳性克隆(pGCSIL-shRNA)送上海美季生物技术有限公司测序。

1.4 293T细胞共转染实验筛选有效shRNA

转染前1 d将293T细胞按1 \times 10⁴/ml接种于24孔板中;待细胞生长至80%~90%融合时,换成400 μ l的Opti-MEM1。每孔载体的量均为0.5 μ g,每孔LipofectamineTM2000体积均为2 μ l,将质粒和LipofectamineTM2000分别溶解于Opti-MEM1中,混匀,室温静置5 min。将稀释好的质粒和LipofectamineTM2000混匀,室温静置20 min。把质粒DNA与LipofectamineTM2000的混合液加入293T细胞中,37℃ 5%CO₂培养箱中培养6~8 h,换成新鲜的含10%胎牛血清的完全培养液。转染后24 h荧光显微镜下观察预估转染率,蛋白质印迹分析检测目的基因表达水平(一抗为鼠抗FLAG抗体),并根据蛋白质印迹分析结果选取有效shRNA进行慢病毒包装。

1.5 慢病毒包装

取对数生长期的293T细胞,转染前2 h将细胞培养液更换为无血清培养液。向一灭菌离心管中加入所制备的各DNA溶液(pGCL-LV载体20 μ g,pHelper1.0载体15 μ g,pHelper2.0载体10 μ g),与相应体积的Opti-MEM混合均匀,调整总体积为2.5 ml,室温下温育5 min。将LipofectamineTM2000轻柔摇匀,取100 μ l LipofectamineTM2000在另一管中与2.4 ml Opti-MEM混合,室温下温育5 min。把稀释后的DNA与LipofectamineTM2000混合,室温下温育20 min,形成转染复合物。将DNA与LipofectamineTM2000混合液转移至293T细胞的培养液中,混匀,培养8 h后倒去含有转染混合物的培养液,PBS洗涤后,加入细胞培养液继续培养48 h后离心收集病毒,分别命名为p120ctn-shRNA-LV及NC-LV(阴性对照病毒,含有上述无关shRNA序列)。

1.6 慢病毒滴度测定及体外感染效率的测定

1.6.1 病毒滴度测定(逐孔稀释滴度测定法) 将 p120ctn-shRNA-LV 病毒原液按不同比例稀释,取 10 μ l 感染 96 孔板培养的 293T 细胞,继续培养 24 h 后加入完全培养液 100 μ l, 4 d 后观察荧光表达情况。计算病毒滴度(TU/ml)=荧光细胞数/病毒原液量,并根据标准品校正。

1.6.2 慢病毒体外感染效率的测定(MOI 试验) PANC-1 细胞以 5 000 个/孔接种于 96 孔板,培养至 60%~70% 融合时,分别以 MOI 为 1、2、4 的 p120ctn-shRNA-LV 100 μ l 感染细胞,8 h 后换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养,48 h 后荧光显微镜下计数(绿色荧光在激发波长 450~490 nm,检测波长 505 nm,500 nm 滤光片下观察),随机计算 3 个表达 GFP 的细胞数占视野中所有细胞的百分比,其均值代表 MOI 值。

1.7 实时定量 PCR TRIzol 法抽取细胞总 RNA, RNA 反转录获得 cDNA(根据 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书进行,引物为 oligo dT),应用 TaKaRa 公司的 TP800 Real-time PCR 仪行实时定量 PCR,每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。p120ctn 上游引物 5'-GGC TCG TGA TAT GGA CCT TAC-3',下游引物 5'-ACT CAA TAT GGC GTG GCT TAC-3'; β -actin 上游引物 5'-GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3',下游引物 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3';反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s,之后每一步变性 95 $^{\circ}$ C 5 s,退火延伸 60 $^{\circ}$ C 30 s,共 45 个循环。每次在延伸阶段读取光密

度。实时定量 PCR 数值分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法,以 β -actin 为内参,计算 p120ctn mRNA 的相对表达量。

1.8 蛋白质印迹分析 取出细胞,弃去细胞培养液,PBS 洗涤 2 次,加入适量预冷的细胞裂解液,刮下细胞,将样品转入 Ep 管中,冰上裂解细胞 10~15 min,超声破碎仪破碎细胞,4 $^{\circ}$ C 12 000 $\times g$ 离心 15 min,取上清。调整蛋白终浓度均为 2 μ g/ μ l,加入相同体积的 2 \times 上样缓冲液,混匀,沸水浴煮 5 min,10% SDS-PAGE 后转膜,封闭。加入一抗(兔抗人 p120ctn 抗体 1:1 000,鼠抗人 GAPDH 抗体 1:5 000,鼠抗 Flag 抗体 1:5 000),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入相应的二抗孵育 PVDF 膜 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加 ECL 发光剂,显影、定影。

1.9 统计学处理 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析,多组均数间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 SNK 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 p120ctn 目的基因重组克隆的鉴定 pGC-FU-p120ctn-3FLAG 阳性克隆 PCR 鉴定结果(图 1)提示,1、3、4、5 及 7 号克隆为阳性克隆。阳性克隆转染 293T 细胞后蛋白质印迹分析结果(图 2)提示共 3 个阳性克隆表达 p120ctn,其中 3、4 号克隆均表达 p120ctn 亚型 1A 及 3A。基因测序结果提示 4 号克隆序列完全正确,故选择 4 号克隆进行后续实验。

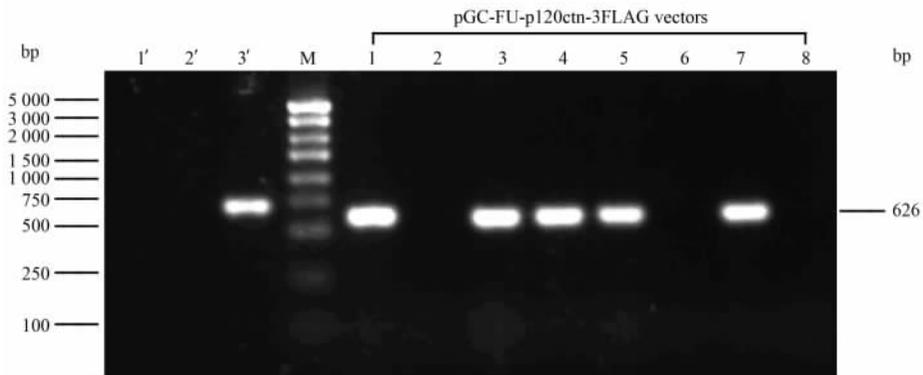


图 1 pGC-FU-p120ctn-3FLAG 阳性重组克隆 PCR 鉴定

Fig 1 Identification of positive recombinant pGC-FU-p120ctn-3FLAG vectors by PCR

1': Negative control(ddH₂O); 2': Negative control of empty vector; 3': Positive control (GAPDH, 721 bp); M: Marker

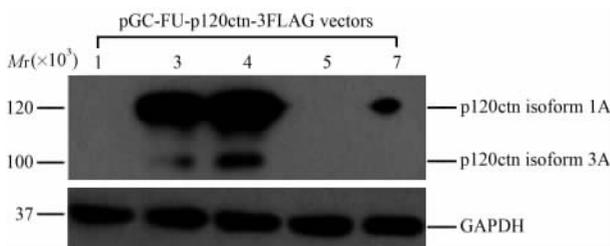


图 2 pGC-FU-p120ctn-3FLAG

阳性克隆转染 293T 细胞后蛋白质印迹分析

Fig 2 Identification of five positive pGC-FU-p120ctn-3FLAG vectors transfected into 293T cells by Western blotting analysis

2.2 p120ctn 特异性 shRNA 慢病毒载体构建及外源性鉴定 pGCSIL-shRNA 阳性克隆 PCR (图 3) 提示重组质粒 pGCSIL-shRNA1~3 均构建成功,测序结果证实 3 对 shRNA 序列完全正确。pGC-FU-p120ctn-3FLAG 质粒及 pGCSIL-shRNA 质粒共转染 293T 细胞蛋白质印迹分析检测结果(图 4)表明,pGCSIL-shRNA1 对 p120ctn 亚型 1A 及 3A 的敲减效果均较好,故选择 pGCSIL-shRNA1 包装慢病毒。

2.3 重组慢病毒滴度测定 扩增、纯化后 p120ctn-shRNA-LV 病毒滴度为 3×10^9 TU/ml, NC-LV 病毒滴度为 4×10^9 TU/ml。

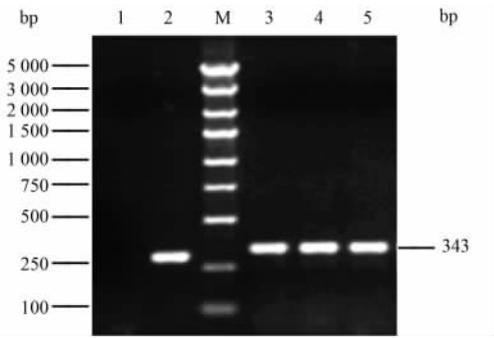


图3 pGCSIL-shRNA 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig 3 Identification of positive pGCSIL-shRNA clones

1: Negative control(ddH₂O); 2: Negative control of empty vector (306 bp); M: Marker; 3: pGCSIL-shRNA1; 4: pGCSIL-shRNA2; 5: pGCSIL-shRNA3

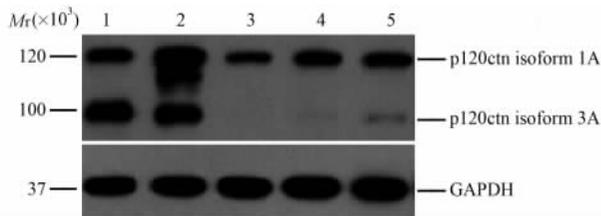


图4 pGC-FU-p120ctn-3FLAG4 与

pGCSIL-shRNA 共转染 293T 细胞后 p120ctn 蛋白表达

Fig 4 Expression of p120ctn after pGC-FU-p120ctn-3FLAG4 and pGCSIL-shRNA co-transfection in 293T cells

1: Empty control; 2: Negative control of shRNA; 3: pGCSIL-shRNA1; 4: pGCSIL-shRNA2; 5: pGCSIL-shRNA3

2.4 MOI 实验结果 随着 MOI 值的加大,重组慢病毒在 PANC-1 细胞内感染率逐渐增加,当 MOI=1 时,其感染效率约为 40%(图 5 A);当 MOI=2 时,其感染效率达到 80%而无明显细胞中毒现象(图 5B);当 MOI=4 时,其感染率约 90%,但细胞脱落、变圆、漂浮,呈现慢病毒过量中毒状态(图 5C)。本实验均采用 MOI=2 进行。NC-LV 感染胰腺癌 PANC-1 细胞后,感染效率接近 80%(图 5D)。PANC-1 细胞被含有有效 shRNA 的慢病毒感染后称为敲减组细胞(Knock down PANC-1, KD-PANC-1),被含无关 shRNA 的慢病毒感染后称为阴性对照组细胞(Negative control PANC-1, NC-PANC-1)。

2.5 重组慢病毒感染 PANC-1 细胞后 p120ctn mRNA 及蛋白表达 实时定量 PCR 结果(图 6A)表明,KD-PANC-1 p120ctn mRNA 相对表达量为 PANC-1 的 17.4%,与 PANC-1、NC-PANC-1 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。NC-PANC-1 mRNA 相对表达量为 PANC-1 的 93.8%,与 PANC-1 相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白质印迹分析检测结果(图 6B)显示,PANC-1 及 NC-PANC-1 细胞中的 p120ctn 蛋白表达无明显差异,感染 p120ctn-shRNA-LV 的 KD-PANC-1 p120ctn 蛋白表达较感染前明显减少。

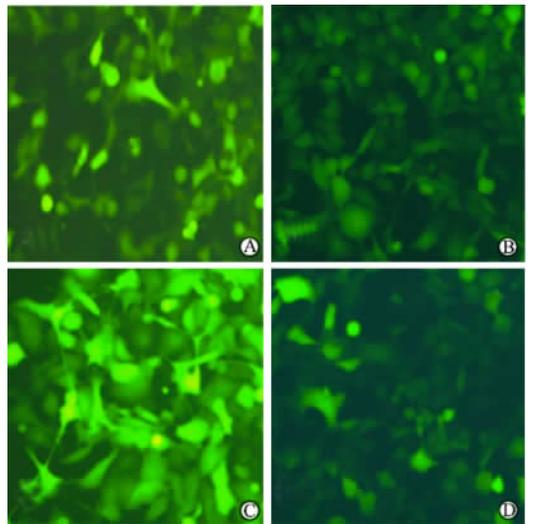


图5 不同 MOI 慢病毒感染 PANC-1 细胞的 GFP 表达

Fig 5 Expression of GFP in PANC-1 cells after lentivirus infection at different MOI

MOI: Multiplicity of infection. A: MOI=1; B: MOI=2; C: MOI=4; D: Infection with NC-LV at MOI=2. Original magnification; $\times 100$

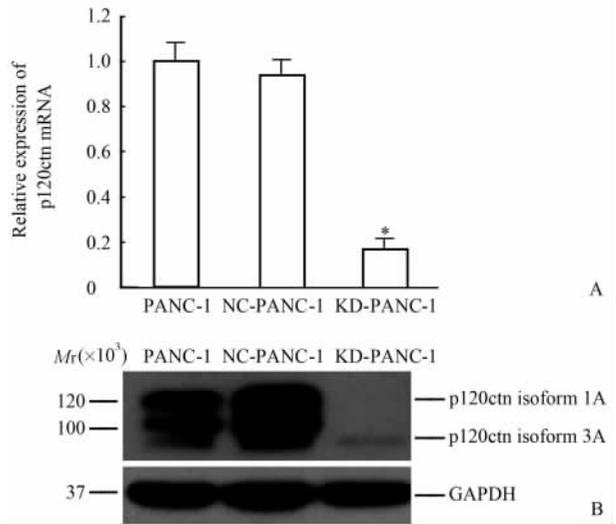


图6 p120ctn-shRNA-LV 感染

PANC-1 细胞后 p120ctn mRNA 及蛋白的表达

Fig 6 Protein expression of p120ctn in PANC-1 cells infected with p120ctn-shRNA-LV

KD-PANC-1: Knock down PANC-1; NC-PANC-1: Negative control PANC-1. A: Real-time PCR; B: Western blotting. * $P < 0.05$ vs PANC-1 and NC-PANC-1. $n=3; \bar{x} \pm s$

3 讨论

胰腺癌是消化系统常见的恶性肿瘤,恶性程度高,早期发现困难,侵袭及转移发生早,手术切除率低,5年总体生存率仍低于 5%^[4]。侵袭及转移是导致胰腺癌患者病死的主要原因,是多因素共同作用的结果,具体机制仍不明确。已有研究表明,p120ctn 的表达及定位异常与非小细胞肺癌^[5]、结肠癌^[6]及胃食管交界处肿瘤^[7]侵袭及转移密切相关,但其在

胰腺癌侵袭转移中的作用及机制尚不清楚,胰腺癌细胞株中 p120ctn 定量、定位表达异常的原因亦不明确。我们的前期实验发现,不同表型的胰腺癌细胞株间 p120ctn 的表达量存在差异,并与 VEGF 的表达相关^[3],而 VEGF 的过表达与胰腺癌的浸润及转移密切相关^[8-9],提示除参与细胞间黏附外, p120ctn 还可能在 VEGF 诱导血管生成过程中发挥着某种作用。因此,通过 RNAi 调控胰腺癌细胞 p120ctn 的表达,观察胰腺癌细胞的生物学功能改变及相关信号通路的表达变化,可望为 p120ctn 在胰腺癌浸润及转移中的作用研究提供有效的平台。

shRNA^[10]是一段具有紧密发卡环的 RNA 序列,常被用于 RNA 干扰,沉默靶基因的表达,其发卡结构在细胞内可被切割生成 siRNA,抑制细胞内与其序列同源的基因 mRNA 表达,而达到特异的沉默效果。外源性 shRNA 需通过特定的载体转染进入细胞后才能发挥特定的沉默效果,本研究采用的慢病毒载体具有毒性低、感染效率高、可感染分裂相及非分裂相细胞,并能将目的基因整合到宿主细胞染色体中,提供安全、有效及长时间的稳定转染^[11]。通过慢病毒载体将 p120ctn 特异的 shRNA 转染进入胰腺癌细胞,能对 p120ctn 的表达产生持续的抑制,为研究其生物学功能提供了可能。由于慢病毒包装耗时且成本较高,本实验将构建成功的 p120ctn RNAi 慢病毒载体与含 p120ctn 基因的 pGC-FU-p120ctn-3FLAG 真核表达载体通过脂质体 LipofectamineTM 2000 共转染 293T 细胞,蛋白质印迹分析筛选出干扰效能最大的 shRNA,并将其包装成慢病毒,体外转染胰腺癌 PANC-1 细胞,实时定量 PCR 及蛋白质印迹分析结果提示筛选的 shRNA 序列对 PANC-1 细胞的 p120ctn mRNA 及蛋白的表达均具有较强的抑制作用,提示该实验路线是完全可行的,能节约实验时间及费用,具有一定的应用价值,为后续实验验证 p120ctn 对胰腺癌细胞生物学行为的影响及其在胰腺癌浸润及转移中的作用奠定了基础,并为寻找胰腺癌基因治疗的潜在靶点提供了可能。

[参考文献]

[1] Mayerle J, Friess H, Büchler M W, Schnakenburger J, Weiss F U, Zimmer K P, et al. Up-regulation, nuclear import, and tumor

growth stimulation of the adhesion protein p120 in pancreatic cancer[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124: 949-960.

- [2] Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A. E- and N-cadherin differ with respect to their associated p120ctn isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23: 5532-5542.
- [3] 葛梓,程张军,石欣,费阳,严伟,倪健琦. 连环蛋白 p120 在胰腺癌细胞株中的表达及其意义[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14: 496-499.
- [4] Jacobs N L, Que F G, Miller R C, Vege S S, Farnell M B, Jatoi A. Cumulative morbidity and late mortality in long-term survivors of exocrine pancreas cancer [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2009, 40(1-2): 46-50.
- [5] Liu Y, Li Q C, Miao Y, Xu H T, Dai S D, Wei Q, et al. Ablation of p120-catenin enhances invasion and metastasis of human lung cancer cells[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100: 441-448.
- [6] Bellovin D I, Bates R C, Muzikansky A, Rimm D L, Mercurio A M. Altered localization of p120 catenin during epithelial to mesenchymal transition of colon carcinoma is prognostic for aggressive disease [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 10938-10945.
- [7] Wijnhoven B P, Pignatelli M, Dinjens W N, Tilanus H W. Reduced p120ctn expression correlates with poor survival in patients with adenocarcinoma of the gastroesophageal junction [J]. *J Surg Oncol*, 2005, 92: 116-123.
- [8] Tang R F, Itakura J, Aikawa T, Matsuda K, Fujii H, Korc M, et al. Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2001, 22: 285-292.
- [9] Von Marschall Z, Scholz A, Stacker S A, Achen M G, Jackson D G, Alves F, et al. Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer[J]. *Int J Oncol*, 2005, 27: 669-679.
- [10] McIntyre G J, Fanning G C. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors[J]. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 1.
- [11] Neschadim A, McCart J A, Keating A, Medin J A. A roadmap to safe, efficient, and stable lentivirus-mediated gene therapy with hematopoietic cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, 13: 1407-1416.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群