

慢病毒载体介导 RNA 干扰体外抑制人胰腺癌细胞增殖诱导配体的表达

王 峰¹, 陈 琳², 邵建国^{3*}, 毛振彪⁴

- 1. 南通大学附属医院检验科, 南通 226001
- 2. 南通市第三人民医院检验科, 南通 226006
- 3. 南通市第三人民医院消化内科, 南通 226006
- 4. 南通大学附属医院消化内科, 南通 226001

[摘要] **目的:**观察慢病毒表达载体介导的 RNA 干扰(RNAi)对人胰腺癌细胞株 CFPAC-1 增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)表达的影响,为后续的以 APRIL 基因为靶点的胰腺癌基因治疗研究奠定基础。**方法:**应用基因工程技术,筛选出 3 条针对 APRIL 基因的 RNAi 靶序列,分别与 pGCL-GFP 载体连接,构建 3 个重组慢病毒表达载体 LV-APRIL shRNA1、LV-APRIL shRNA2、LV-APRIL shRNA3;将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞,经 PCR 筛选阳性克隆、测序鉴定。将 LV-APRIL shRNA、pHelper 1.0、pHelper 2.0 共转染 293T 细胞,包装产生慢病毒颗粒并测定病毒滴度。将包装产生的 3 种重组慢病毒分别感染 CFPAC-1 细胞,实时定量 PCR 和 Western 印迹检测 CFPAC-1 细胞 APRIL mRNA 和蛋白的表达,并与未转染及空转染细胞进行比较。**结果:**3 个慢病毒载体 PCR 和测序结果与预期结果一致,经包装产生的病毒滴度分别为 5×10^7 、 6×10^7 、 4×10^7 TU/ml。感染 CFPAC-1 细胞后,APRIL 基因 mRNA 和蛋白的表达量与未感染慢病毒的细胞组及空载体感染组相比均明显下降($P<0.05$),其中 LV-APRIL shRNA1、LV-APRIL shRNA2 作用较明显,使 mRNA 表达分别下降 73%和 68%,蛋白表达分别下降 66%和 59%($P<0.05$);而未感染慢病毒的细胞组与空载体组相比无统计学差异。**结论:**成功构建针对 APRIL 基因的 3 个慢病毒载体 LV-APRIL shRNA,体外感染 CFPAC-1 细胞后可有效抑制 APRIL 基因和蛋白的表达。

[关键词] 增殖诱导配体;RNA 干扰;慢病毒;胰腺癌
[中图分类号] R 735.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0053-06

Inhibitory effects of lentiviral vector-mediated RNA interference on proliferation-inducing ligand expression in human pancreatic cancer *in vitro*

WANG Feng¹, CHEN Lin², SHAO Jian-guo^{3*}, MAO Zhen-biao⁴

- 1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China
- 2. Department of Laboratory Medicine, The 3rd People's Hospital of Nantong, Nantong 226006
- 3. Department of Gastroenterology, The 3rd People's Hospital of Nantong, Nantong 226006
- 4. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of lentiviral vector-mediated RNA interference on expression of human APRIL (a proliferation-inducing ligand) gene in human pancreatic cancer cell line CFPAC-1, so as to pave a way for APRIL gene-targeted gene therapy of pancreatic cancer. **Methods:** Gene engineering technique was used to screen 3 RNA interference sequences targeting APRIL gene; the sequences were separately cloned into the pGCL-GFP vector to construct LV-APRIL shRNA1, LV-APRIL shRNA2 and LV-APRIL shRNA3, which were subsequently confirmed by PCR and DNA sequencing analysis. The titer of lentivirus was determined after 293T cells were cotransfected with LV-APRIL shRNA, pHelper 1.0 and pHelper 2.0. The 3 kinds of recombinant lentiviruses were injected into CFPAC-1 cells and the APRIL mRNA and protein expression were examined by real-time RT-PCR and Western blotting, respectively, and the result was compared with those of the non-transfected and blank vector transfected CFPAC-1 cells. **Results:** PCR analysis and DNA sequencing confirmed that the 3 APRILshRNA sequences were successfully inserted into the lentiviral vectors. The titers of concentrated virus were 5×10^7 TU/ml,

[收稿日期] 2007-09-10 **[接受日期]** 2007-12-06

[基金项目] 江苏省社会发展基金资助项目(BS2005029). Supported by Social Development Foundation of Jiangsu Province (BS2005029).

[作者简介] 王 峰, 硕士, 检验技师. E-mail: orange303@tom.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0513-85116115, E-mail: shaojianguo4144@yahoo.com.cn

6×10^7 TU/ml and 4×10^7 TU/ml, respectively. APRIL expression in CFPAC-1 cells was significantly inhibited at both mRNA and protein levels compared with the non-transfected and empty vector transfected CFPAC-1 cells ($P < 0.05$). After transfection with LV-APRIL shRNA1 and LV-APRIL shRNA2, APRIL mRNA expression decreased by 73% and 68%, APRIL protein expression decreased by 66% and 59% ($P < 0.05$), respectively; there was no significantly difference between the non-transfected and empty vector transfected CFPAC-1 cells. **Conclusion:** Three lentiviral RNAi vectors of APRIL gene have been successfully constructed, and they can effectively inhibit the expression of APRIL gene in CFPAC-1 cells *in vitro*.

[KEY WORDS] a proliferation-inducing ligand; RNA interference; lentivirus; pancreatic cancer

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 53-58]

增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)是肿瘤坏死因子超家族的成员之一。已有研究^[1-2]证实结肠癌、胰腺癌、胃癌等消化系统肿瘤中 APRIL 呈高表达,在这些肿瘤细胞培养基中加入可溶性的 APRIL,可发现肿瘤细胞明显增殖,且增殖程度与剂量呈正比。这些结果提示 APRIL 在体内和体外均能刺激肿瘤细胞生长,说明其与消化系统肿瘤的发生、发展密切相关。

我们的前期研究^[3-5]发现胰腺癌组织中 APRIL 蛋白阳性率为 90%,明显高于正常胰腺组织;进一步对多株人胰腺癌细胞 APRIL 基因进行筛选,发现人胰腺癌细胞 CFPAC-1 高表达 APRIL 基因,并成功制备出靶向 CFPAC-1 细胞 APRIL 的小干扰 RNA。为进一步探讨 APRIL 基因在胰腺癌发生、发展以及转移过程中的作用机制,本研究在前期研究的基础上,构建针对 APRIL 基因 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)的慢病毒表达载体,观察其感染人胰腺癌细胞株 CFPAC-1 后对 APRIL 基因表达的影响,为后续的以 APRIL 基因为靶点的胰腺癌基因治疗研究奠定基础。

1 材料和方法

1. 1 主要材料及试剂 慢病毒载体系统 pGCL-GFP 载体、pHelper 1.0 (gag/pol 元件)载体、pHelper 2.0(VSVG 元件)载体三质粒购自 Qiagen 公司;293T 细胞、人胰腺癌细胞株 CFPAC-1 细胞、DH5 α 大肠杆菌菌株由上海吉凯基因技术公司提供。限制性内切酶 *Hpa* I 和 *Xho* I (New England Biolabs 公司);T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、胰蛋白酶、SYBR Master Mixture(TaKaRa 公司);Fetal bovine serum、DMEM、Opti-MEM (Gibco 公司);Lipofectamine 2000、TRIzol (Invitrogen 公司);M-MLV 逆转录酶和 dNTP (Promega 公司);APRIL 抗体 (Prosci 公司);RIPA 细胞裂解液、二抗 (Santa Cruz 公司);质粒抽提试剂盒及 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1. 2 携带针对 APRIL 的 shRNA 慢病毒表达载体

的构建与鉴定

1. 2. 1 靶序列的设计 应用 Ambion 公司的在线设计软件,设计、合成 3 条针对 APRIL 基因(NM 172088.1)的 shRNA 寡核苷酸序列,3 条靶序列分别是:5'-TCC AGG ATG CTG GAG TTT A-3'(起始位置 1 210 位点),5'-GCC TTA TCC TAC GTC CTT C-3'(1 604 位点),5'-TCC AGA ACA GCA CCA CCA T-3'(1 754 位点)。经 BLAST 检索确认与 APRIL 以外的人类已知基因序列无同源性。每条 19 nt 的寡核苷酸序列以正反向组合,中间添加 loop 结构,使寡核苷酸可以形成发夹结构,每对寡核苷酸两端分别带有 *Hpa* I 和 *Xho* I 酶切位点。由此合成各自靶序列的 oligo DNA(上海吉凯基因技术有限公司合成)。APRIL shRNA1(1 210 位点):正义链 5'-TAA TCC AGG ATG CTG GAG TTT ATT CAA GAG ATA AAC TCC AGC ATC CTG GAT TTT TTT TC-3';反义链 5'-TCG AGA AAA AAA ATC CAG GAT GCT GGA GTT TAT CTC TTG AAT AAA CTC CAG CAT CCT GGA TTA-3'。APRIL shRNA2(1 754 位点):正义链 5'-TAA GCC TTA TCC TAC GTC CTT CTT CAA GAG AGA AGG ACG TAG GAT AAG GCT TTT TTT TC-3';反义链 5'-TCG AGA AAA AAA AGC CTT ATC CTA CGT CCT TCT CTC TTG AAG AAG GAC GTA GGA TAA GGC TTA-3'。APRIL shRNA3(1 604 位点):正义链 5'-TCA TCC AGA ACA GCA CCA CCA TTT CAA GAG AAT GGT GGT GCT GTT CTG GAT GTT TTT TC-3';反义链 5'-TCG AGA AAA AAC ATC CAG AAC AGC ACC ACC ATT CTC TTG AAA TGG TGG TGC TGT TCT GGA TGA-3'。

1. 2. 2 APRIL shRNA 慢病毒表达载体的构建 设计好的 oligo DNA 进行退火形成双链 DNA。DNA 模板单链稀释到 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,退火反应体系如下:DNA 模板正义链 5 μl ,DNA 模板反义链 5 μl ,5 $\times$ universal buffer 20 μl ,ddH₂O 70 μl 混匀,90 $^{\circ}\text{C}$ 温育 4 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min,缓慢冷却至室温。用非变

性 PAGE(12%)凝胶检测双链形成效率。将退火产物与经 *Hpa* I 和 *Xho* I 酶切线性化处理的 pGCL-GFP 载体片段连接,连接体系如下:线性化载体 (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 1 μl , 退火的双链 DNA (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$) 1 μl , 10 $\times$ T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μl , T4 DNA 连接酶 1 μl , ddH₂O 7 μl , 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 h 连接反应。最后将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞,涂布平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

1. 2. 3 PCR 鉴定 挑选重组阳性克隆行 PCR 鉴定,使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增,扩增出来的是插入 APRIL 基因 shRNA 的 DNA 片段。引物根据 Primer Premier 5. 0 软件设计, Primer 1: 5'-GTG TCA CTA GGC GGG AAC AC-3'; Primer 2: 5'-TTA TTC CCA TGC GAC GGT ATC-3'。PCR 体系如下: 10 $\times$ buffer 2 μl , *Taq* 酶 (2. 5 U/ μl) 0. 2 μl , dNTP (2. 5 mmol/L) 0. 8 μl , Primer 1 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0. 4 μl , Primer 2 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 0. 4 μl , 菌落裂解液 1 μl , ddH₂O 16. 2 μl 。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (30 个循环), 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (30 个循环), 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (30 个循环), 72 $^{\circ}\text{C}$ 6 min。PCR 产物 5 μl 上样, 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1. 2. 4 DNA 测序鉴定 挑选 PCR 鉴定与预期相符的重组阳性克隆,接菌,过夜培养后,质粒抽提试剂盒提取质粒;抽提好的质粒使用载体上的引物送测序 (Invitrogen 公司 3730 型测序仪测序分析)。

1. 3 携带 APRIL shRNA 的慢病毒重组体的包装、鉴定及滴度检测

1. 3. 1 慢病毒重组体的包装 转染前 24 h,用胰酶消化对数生长期的 293T 细胞,以含 10% 血清的培养基调整细胞密度为 $1. 2 \times 10^7/20 \text{ ml}$ 。待细胞汇合率达 70%~80% 时即可用于转染。转染前 2 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。将各质粒 DNA 溶液 (pGCL-GFP 载体 20 μg , pHelper 1. 0 载体 15 μg , pHelper 2. 0 载体 10 μg), 与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀,调整总体积为 2. 5 ml,在室温下温育 5 min。取 100 μl Lipofectamine 2000 在另一管中与 2. 4 ml Opti-MEM 混合,在室温下温育 5 min。把稀释后的 DNA 与稀释后的 Lipofectamine 2000 进行混合,在室温下温育 20 min 形成转染复合物。将转染复合物转移至 293T 细胞的培养液中,培养箱中培养 8 h 后倒去含有转染混和物的培养基,再加入 PBS 液洗涤。最后加入含 10% 血清的细胞培养基 25 ml,于培养箱内继续培养 48 h。收集上清液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 4 000 $\times g$ 离心 10 min,以 0. 45 μm 滤器过滤上清液于超速离心管中,4 000 $\times g$ 离心至需要的病毒浓缩

体积,行病毒滴度测定。

1. 3. 2 病毒滴度检测 使用逐孔稀释滴度测定法:测定前 1 d,为测定滴度所需的 293T 细胞铺板,每个 96 孔中加 4×10^4 个细胞,体积为 100 μl 。根据病毒的预期滴度,对其进行倍比稀释。吸去细胞孔中 90 μl 培养基。加入稀释好的病毒溶液,放入培养箱培养。24 h 后,加入新鲜培养基 100 μl 。4 d 后,观察绿色荧光蛋白表达情况。数出荧光细胞比例在 10% 左右的孔中的荧光细胞数。将得到的数值除以相应的稀释倍数就得到了病毒原液的滴度值。

1. 4 实时定量 PCR 法检测重组慢病毒颗粒感染后 CFPAC-1 细胞 APRIL 基因的表达 培养生长状态良好的 CFPAC-1 细胞 $2 \times 10^6/\text{ml}$,病毒感染前 1 d 将细胞分入 6 孔培养板培养,感染当天按实验设计的分组情况加入不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的 RNAi 慢病毒颗粒进行目的细胞的感染实验。感染 4 d 后荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,取慢病毒感染效率在 80% 以上的目的细胞,提取总 RNA,然后逆转录为 cDNA,采用实时定量 PCR 法检测 APRIL 基因 mRNA 表达情况,进而判断不同靶点的干扰效果。APRIL 基因上、下游引物序列分别为: 5'-GGT ATC CCT GGC AGA GTC-3', 5'-CTG TCA CAT CGG AGT CAT C-3', 产物 174 bp; 内参照 β -actin 的上、下游引物序列分别为: 5'-GTG GAC ATC CGC AAA GAC-3', 5'-AAA GGG TGT AAC GCA ACT A-3', 产物 302 bp。将待测样品的目的基因及 β -actin 进行 PCR 扩增,其产物进行梯度稀释作为标准样品。标准品与待测样品分别进行实时定量 PCR 检测,反应体系: SYBR Master Mixture 10 μl , 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的上、下游引物各 1. 0 μl , cDNA 1. 0 μl , H₂O 7. 5 μl 。置于 Bio-Rad 公司的 iQ5 Real-time PCR 仪上反应。设定程序为两步法: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 之后每一步变性 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s, 退火延伸 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 共进行 40 个循环。检测结果行标准曲线分析,每个样品的 APRIL 基因表达浓度除以对应 β -actin 浓度,即为 APRIL 基因校正后的相对表达水平。

1. 5 Western 印迹检测重组慢病毒颗粒感染后 CFPAC-1 细胞 APRIL 蛋白的表达 提取感染 4 d 后 CFPAC-1 细胞的总蛋白,常规行 Western 印迹,一抗 1: 1 000 稀释,二抗行 1: 5 000 稀释。以 β -actin 蛋白为内参照,以 BandScan 图像分析软件进行光密度分析。每个样品的 APRIL 蛋白光密度值除以其 β -actin 蛋白的光密度值,即为 APRIL 蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 统计软件行单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAGE 凝胶检测 oligo DNA 双链形成效率 鉴定结果表明:3 条靶序列的 oligo DNA 双链退火正确,可以进入与载体的连接程序(图 1)。

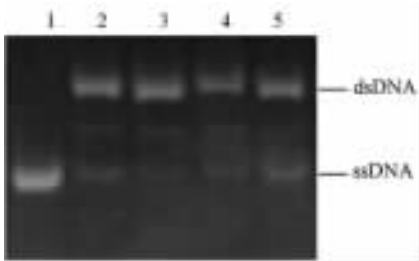


图 1 PAGE 凝胶检测 oligo DNA 双链形成效率
Fig 1 Examining efficiency of oligo DNA forming dsDNA by PAGE gel
1:ssDNA control; 2:dsDNA control; 3: dsDNA formed by APRIL shRNA1; 4: dsDNA formed by APRIL shRNA2; 5: dsDNA formed by APRIL shRNA3

2.2 阳性克隆的 PCR 鉴定结果 退火形成的双链 DNA 分别与 *Hpa* I 和 *Xho* I 经酶切的 pGCL-GFP 载体连接,构建 3 个慢病毒表达载体:LV-APRIL shRNA1、LV-APRIL shRNA2、LV-APRIL shRNA3;将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞,对阳性克隆行 PCR 鉴定,结果发现各组阳性克隆的鉴定结果与预期一致(图 2)。

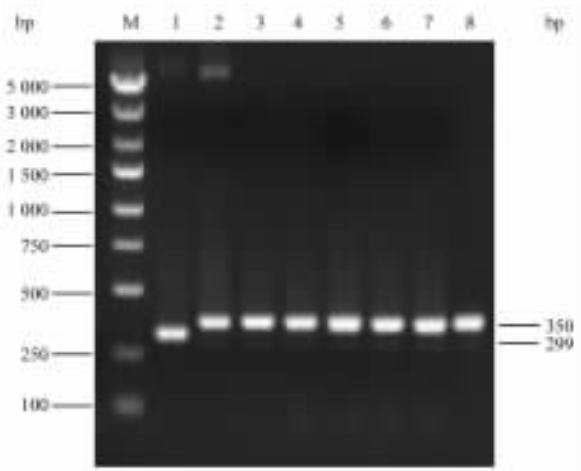


图 2 重组慢病毒载体阳性克隆的 PCR 鉴定
Fig 2 Identification of positive lentiviral vectors by PCR
M:Marker;1: Negative control of empty vector; 2: Positive control; 3,4: Two positive clones of LV-APRIL shRNA1;5, 6: Two positive clones of LV-APRIL shRNA2; 7,8: Two positive clones of LV-APRIL shRNA3

2.3 阳性克隆的 DNA 测序鉴定结果 挑取上述 3 组中阳性克隆标本,进行 DNA 测序,测序结果与实验要求的 DNA 序列完全一致(图 3)。

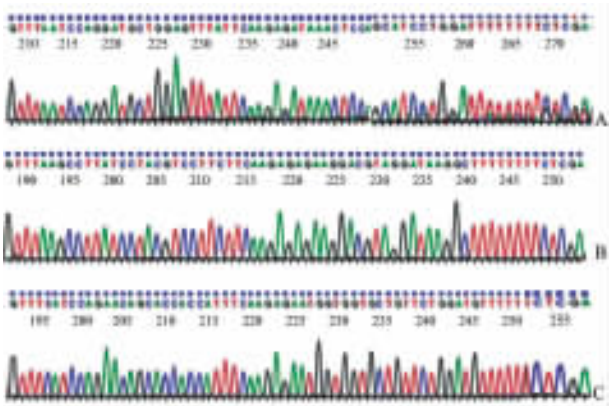


图 3 重组慢病毒载体阳性克隆的 DNA 测序鉴定
Fig 3 Identification of positive lentiviral vectors by DNA sequencing
A: LV-APRIL shRNA1; B: LV-APRIL shRNA2; C: LV-APRIL shRNA3

2.4 重组慢病毒载体的包装及鉴定 将慢病毒包装质粒分别与构建好的 3 个慢病毒表达载体混合后共转染 293T 细胞,转染后 24 h,荧光显微镜下见荧光强度强烈,细胞生长良好,表明病毒包装成功;转染后 48 h 收集合成的慢病毒液,进行病毒滴度检测,经包装产生的 3 个表达载体的病毒滴度分别为 5×10^7 TU/ml、 6×10^7 TU/ml、 4×10^7 TU/ml。

2.5 实时定量 PCR 检测重组慢病毒颗粒感染 CF-PAC-1 细胞后 APRIL 基因的表达 结果发现,构建的 3 个慢病毒表达载体 LV-APRIL shRNA1、LV-APRIL shRNA2、LV-APRIL shRNA3 感染 CF-PAC-1 细胞后 APRIL 基因的 mRNA 表达与未感染慢病毒的细胞组及空载体感染组相比均有下降,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);其中 LV-APRIL shRNA1 与 LV-APRIL shRNA2 基因沉默效果较明显,表达量分别下降了 73% 和 68%,而未感染慢病毒的细胞组与空载体感染组无统计学差异(图 4)。

2.6 Western 印迹检测重组慢病毒颗粒感染 CF-PAC-1 细胞后 APRIL 蛋白的表达 Western 印迹检测发现,构建的 3 个慢病毒表达载体 LV-APRIL shRNA1、LV-APRIL shRNA2、LV-APRIL shRNA3 感染 CFPAC-1 细胞后 APRIL 蛋白的表达与未感染慢病毒的细胞组及空载体感染组相比均有下降,差异具有统计学意义 ($P<0.05$);其中 LV-APRIL shRNA1 与 LV-APRIL shRNA2 基因沉默效

果较明显,蛋白表达量分别下降了 66%和 59%,而未感染慢病毒的细胞组与空载体感染组相比无统计学差异(图 5)。

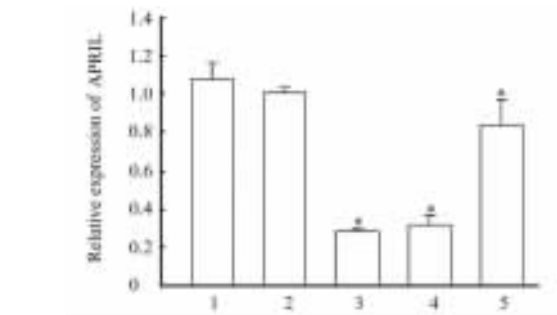


图 4 LV-APRIL shRNA 感染 CFPAC-1 细胞对 APRIL mRNA 表达的影响

Fig 4 Expression of APRIL mRNA after

CFPAC-1 cells infected by LV-APRIL shRNA

1:Non-infected cells; 2: Cells infected by empty vector; 3: Cells infected by LV-APRIL shRNA1; 4:Cells infected by LV-APRIL shRNA2; 5:Cells infected by LV-APRIL shRNA3. * $P<0.05$ vs non-infected cells



图 5 LV-APRIL shRNA 感染 CFPAC-1 细胞对 APRIL 蛋白表达的影响

Fig 5 Expression of APRIL protein after

CFPAC-1 cells infected by LV-APRIL shRNA

1:Non-infected cells;2:Cells infected by empty vector;3:Cells infected by LV-APRIL shRNA1; 4: Cells infected by LV-APRIL shRNA2;5:Cells infected by LV-APRIL shRNA3

3 讨论

APRIL 是肿瘤坏死因子超家族的新成员,在正常组织中表达很弱,但在多种肿瘤细胞系及肿瘤组织中却有高水平表达^[1,6]。国内外研究^[7-9]表明 APRIL 可以通过自分泌、内分泌及旁分泌的形式与靶细胞表面受体(穿膜蛋白复合物、B 细胞成熟抗原)结合,激活 NF-κB 途径,从而促进肿瘤细胞增殖,抑制肿瘤细胞凋亡,在肿瘤形成的过程中起重要作用。

RNAi 是将与靶基因序列同源的双链 RNA 导入细胞,经过一系列作用与靶基因 mRNA 结合,并迅速使其特异性降解,从而抑制该基因的表达。近年来, RNAi 技术被广泛应用于基因功能分析、信号转导通路和基因治疗的研究^[10-12]。质粒介导 RNAi 有一定的局限性,如转染率低、基因抑制表达作用弱、持续时间短、不适合体内实验等^[13-14]。而慢病毒

属逆转录病毒家族,为非致癌性病毒,能够感染非分裂期和分裂期细胞,且病毒内的遗传物质能够整合到宿主的基因组,是潜伏期长、持续时间长的慢性感染。慢病毒独特之处在于其在逆转录酶基因和包膜基因之间以及 3'端包膜蛋白基因区含有开放性读码框^[15-16],可能会成为未来 RNAi 介导肿瘤基因治疗中最常用的载体^[17]。

本研究所采用的慢病毒载体系统由 pGCL-GFP 载体、pHelper1.0 (gag/pol 元件)载体、pHelper2.0 (VSVG 元件)载体三质粒组成。pGCL-GFP 载体含有 U6 启动子,能够在宿主细胞中持续表达有干扰作用的小 RNA,同时该质粒能表达由 CMV 启动子驱动的荧光蛋白 GFP。pHelper 1.0 和 pHelper 2.0 含有病毒包装所必须的元件。pHelper 1.0 质粒中含有 HIV 病毒的 gag 基因,编码病毒主要的结构蛋白;pol 基因编码病毒特异性的酶;rev 基因编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子。pHelper 2.0 质粒中含有单纯疱疹病毒来源的 VSVG 基因,提供病毒包装所需要的衣壳蛋白。

本研究构建了 3 个人 APRIL 基因 RNA 干扰慢病毒表达载体(LV-APRIL shRNA1、LV-APRIL shRNA2、LV-APRIL shRNA3),并经 PCR 及测序鉴定。结果证实病毒载体构建成功,经包装产生的慢病毒具有较高滴度。3 种慢病毒载体感染 CFPAC-1 细胞后, APRIL 基因 mRNA 和蛋白的表达量均明显下降,其中 LV-APRIL shRNA1、LV-APRIL shRNA2 抑制作用较明显,使 mRNA 表达分别下降 73%和 68%,蛋白表达分别下降 66%和 59%($P<0.05$)。此结果说明本研究构建的慢病毒 RNAi 表达载体在胰腺癌 CFPAC-1 细胞内能持续、高效、特异地抑制 APRIL 基因表达,为后续的以 APRIL 基因为靶点的胰腺癌基因治疗研究奠定了基础,也为异常表达 APRIL 的肿瘤防治提供新的思路。

(志谢 本研究得到复旦大学生命科学院黄伟达教授等的技术支持和无私帮助,在此一并表示感谢!)

[参考文献]

[1] Hahne M, Kataoka T, Schröter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer J L, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth[J]. J Exp Med, 1998, 188: 1185-1190.

[2] Mhawech-Fauceglia P, Kaya G, Sauter G, McKee T, Donze O, Schwaller J, et al. The source of APRIL up-regulation in human solid tumor lesions[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80: 697-704.

[3] 王唯一,毛振彪,潘正平,黄介飞,邵建国. 人胰腺癌组织中增殖

诱导配体蛋白的表达及意义[J]. 第二军医大学学报,2007,28: 214-215.

[4] 邵建国,毛振彪,谭 畅,黄介飞,王唯一,黄伟达. 消化系肿瘤增殖诱导配体高表达细胞株的筛选[J]. 胰腺病学,2006,6:289-291.

[5] 毛振彪,邵建国,王唯一,谭 畅,黄伟达,黄介飞. 靶向胰腺癌细胞株增殖诱导配体基因小干扰 RNA 的制备及纯化[J]. 第二军医大学学报,2007,28:827-832.

[6] Kelly K,Manos E,Jensen G,Nadauld L,Jones D A. APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death[J]. Cancer Res,2000,60:1021-1027.

[7] Chiu A,Xu W,He B,Dillon S R,Gross J A,Sievers E, et al. Hodgkin lymphoma cells express TACI and BCMA receptors and generate survival and proliferation signals in response to BAFF and APRIL[J]. Blood,2007,109:729-739.

[8] Mackay F,Schneider P,Rennert P,Browning J. BAFF AND APRIL:a tutorial on B cell survival[J]. Annu Rev Immunol, 2003,21:231-264.

[9] Endo T,Nishio M,Enzler T,Cottam H B,Fukuda T,James D F,et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF-kappaB pathway[J]. Blood,2007,109:703-710.

[10] Liu F,Xie Z H,Cai G P,Jiang Y Y. The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30: 2279-2283.

[11] Froehlich H,Fellmann M,Sueltmann H,Poustka A,Beissbarth T. Large scale statistical inference of signaling pathways from RNAi and microarray data[J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 386.

[12] Ma Y,Chan C Y,He M L. RNA interference and antiviral therapy[J]. World J Gastroenterol,2007,13:5169-5179.

[13] Jazag A,Ijichi H,Kanai F,Imamura T,Guleng B,Ohta M, et al. Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta[J]. Oncogene,2005,24:662-671.

[14] Imamura T,Kanai F,Kawakami T,Amarsanaa J,Ijichi H, Hoshida Y,et al. Proteomic analysis of the TGF-beta signaling pathway in pancreatic carcinoma cells using stable RNA interference to silence Smad4 expression[J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,318:289-296.

[15] Romano G. Current development of lentiviral-mediated gene transfer[J]. Drug News Perspect,2005,18:128-134.

[16] Dann C T. New technology for an old favorite:lentiviral transgenesis and RNAi in rats[J]. Transgenic Res, 2007, 16: 571-580.

[17] Wiznerowicz M,Trono D. Conditional suppression of cellular genes:lentivirus vector- mediated drug-inducible RNA interference[J]. J Virol,2003,77:8957-8961.

[本文编辑] 贾泽军



• 消 息 •

第二军医大学基础部胡以平教授 1 篇论文入选首届“中国百篇最具影响优秀国际学术论文”

以第二军医大学基础部细胞生物学教研室李文林博士为第一作者,细胞生物学教研室主任胡以平教授为通讯作者,发表在 *Stem Cells* 杂志上题为“Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse”的论文被评为首届“中国百篇最具影响优秀国际学术论文”。

“中国百篇最具影响优秀国际学术论文”评选,其主旨是促进我国高影响、高质量科技论文的发表,引导我国科技论文增长模式由重视数量向重视质量转变。我国于 2007 年首次开展此项活动,由中国科学技术信息研究所具体组织实施。论文每年评选一次,国际论文源为前一年被 SCI 收录的中国论文,国内论文源为前一年被中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)收录的国内论文。根据发表论文的期刊水平、文献类型、热点论文、论文的合作强度、参考文献数量和论文的完整性等 6 项文献计量指标进行评定。