

• 实验研究 •

短发夹 RNA 沉默促肝细胞再生磷酸酶-3 基因表达对乳腺癌 MCF-7 细胞生长和侵袭能力的影响

钟琰 吴爱国 纪术峰 沈三弟

【摘要】 目的 构建以促肝细胞再生磷酸酶-3(PRL-3)为靶基因的短发夹状小干扰 RNA(short hairpin RNA, shRNA)表达载体,并探讨 PRL-3-shRNA 表达载体对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡和侵袭能力的影响。**方法** 构建 PRL-3 基因特异性 shRNA 表达载体,使用脂质体法将 PRL-3-shRNA 表达载体转染入 MCF-7 细胞。采用 Real-time PCR 和 Western blot 分别检测转染后 MCF-7 细胞中 PRL-3 基因 mRNA 和蛋白的表达;运用四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法检测转染后 MCF-7 细胞的增殖水平,用流式细胞仪检测细胞凋亡的情况;采用 Transwell 小室法检测细胞侵袭力变化。计量资料采用单因素方差分析或重复测量方差分析。**结果** 酶切鉴定和测序分析证实 PRL-3-shRNA 表达载体成功构建。转染成功后,shRNA-1 ~3 组 PRL-3 基因 mRNA 表达分别为 (0.31 ± 0.27) 、 (0.15 ± 0.14) 和 (0.31 ± 0.03) ,与空白组和阴性组 (1.00 ± 0.00) 、 (0.98 ± 0.18) 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。PRL-3-shRNA-2 组 PRL-3 蛋白的表达量明显低于阴性组和空白组 $(0.50 \pm 0.02$ 比 0.91 ± 0.03 和 0.89 ± 0.02 , $P < 0.05$); PRL-3-shRNA-2 转染入 MCF-7 细胞后能明显降低其增殖水平($P < 0.05$); PRL-3-shRNA-2 组凋亡率明显高于空白组和阴性组 $[(8.37 \pm 1.85)\%$ 比 $(1.60 \pm 1.58)\%$ 和 $(0.16 \pm 0.05)\%$, $P < 0.05$]; Transwell 小室侵袭实验显示, PRL-3-shRNA-2 组穿膜细胞数明显低于阴性组和空白组($P < 0.05$)。**结论** 沉默 PRL-3 基因表达可抑制 MCF-7 细胞的增殖,促进凋亡,抑制其侵袭能力。

【关键词】 乳腺肿瘤;促肝细胞再生磷酸酶-3;短发夹状小干扰 RNA;基因治疗

【中图分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Effect of shRNA silencing PRL-3 gene expression on the growth and invasiveness of breast cancer MCF-7 cells ZHONG Yan, WU Ai-guo, JI Shu-feng, SHEN San-di. Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Corresponding author: WU Ai-guo, E-mail: wagtyz@sina.com

【Abstract】 Objective To study the effect of short hairpin RNA (shRNA) targeting phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3) gene on the proliferation, apoptosis, and invasiveness of breast cancer MCF-7 cells. **Methods** The PRL-3 specific shRNA expression vector was constructed and confirmed by sequencing analysis. PRL-3-shRNA expression vector was transfected into MCF-7 cells via lipofectamine™ 2000. The expression level of mRNA and protein after transfection were determined by Real-time PCR and Western bolt respectively. Flow cytometry

and MTT assay were performed to assess the effects of the PRL-3-shRNA on the proliferation and apoptosis of MCF-7 cells. Invasion capability of stably transfected MCF-7 cells was evaluated by transwell chamber model assay *in vitro*. Comparison between quantitative data was performed using one-way ANOVA or repeated measures ANOVA. **Results** PRL-3-shRNA expression vector was successfully constructed and transfected into MCF-7 cells. The PRL-3 mRNA levels in the groups of shRNA-1 ~3 were respectively reduced to (0.31 ± 0.27) , (0.15 ± 0.14) and (0.31 ± 0.03) after transfection, and were significantly lower than both the blank group (1.00 ± 0.00) and the negative group (0.98 ± 0.18) ; the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The PRL-3 protein level in the group of shRNA-2 (0.50 ± 0.02) was also significantly lower than both the blank group (0.89 ± 0.02) and the negative group (0.91 ± 0.03) , with statistically significant difference ($P < 0.05$). MTT results showed that the growth of MCF-7 cells after PRL-3-shRNA-2 transfection was decreased markedly ($P < 0.05$). The apoptotic rate in the PRL-3-shRNA-2 group $(8.37 \pm 1.85\%)$ was increased significantly compared with the blank group $(1.60 \pm 1.58\%)$ and the negative group $(0.16 \pm 0.05\%)$ ($P < 0.05$). Transwell chamber model assay showed that the trans-membrane cell numbers in the PRL-3-shRNA-2 group were greatly decreased compared with the blank group and the negative group ($P < 0.05$). **Conclusions** Silencing the expression of PRL-3 gene can effectively suppress the proliferation and invasion capability, and promote the apoptosis of MCF-7 cells.

【Key words】 breast neoplasms; phosphatase of regenerating liver-3; shRNA; gene therapy

促肝细胞再生磷酸酶-3(phosphatase of regenerating liver-3, PRL-3)是 PRL 蛋白家族中的一员,是一种具有促进细胞生长、浸润和迁移的蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP 酶),PRL-3 在肠癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤中高表达,并且与肿瘤转移密切相关,在肿瘤细胞侵袭和转移过程中起重要作用,导致细胞恶变并增强肿瘤细胞的增殖、浸润和转移能力^[1-5]。本实验构建 PRL-3 的短发夹状小干扰 RNA(short hairpin RNA, shRNA)表达载体,使用脂质体法将其转染入乳腺癌 MCF-7 细胞,观察其对 MCF-7 细胞中 PRL-3 表达以及侵袭能力的影响,为 PRL-3 应用于乳腺癌基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院上海细胞生物研究所;载体 pGenesil-1.1、阴性对照质粒 pGenesil.1-NC 购自武汉晶赛公司;T₄ DNA 连接酶、Ec031 I 酶、Sac II 酶、cDNA 第 1 链合成试剂盒购自 Takara 公司;Real-time PCR 通用试剂盒购自上海吉玛公司;Trizol 试剂和脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司;MEM 培养基和 10%胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司;辣根

过氧化物酶(HRP)标记的猪抗兔 IgG 抗体购自 Thermo 公司;兔抗人 PRL-3 多克隆抗体和四甲基偶氮唑蓝(MTT) 购自 Sigma 公司;Transwell 小室购自 Biorad 公司。PRL-3-shRNA 表达载体测序由上海英俊生物有限公司完成。

1.2 靶向 PRL-3-shRNA 表达载体的设计及合成

PRL-3 mRNA 序列来自 GenBank, 编号为 NM_032611, 利用 Ambion 公司和 Genescript 公司的在线设计软件设计 3 条长度为 19 bp 的靶向序列, 根据表达质粒 pGenesil-1.1 的酶切位点要求合成 shRNA, 引物结构: CACC + Sense + Loop + Antisense + 终止信号 + Sac I (分别命名为 PRL-3-shRNA-1、PRL-3-shRNA-2、PRL-3-shRNA-3)。其序列如下: PRL-3-shRNA-1 正义链 5'-CACCA CAAACACATGCGCTTCCTCATTCAAGACGTGAGGAAGCGCATGTGTTTGT TTTTTTG-3', 反义链 5'-AGCTCAAAAAACAAACACATGCGCTTCCTCACG TCTTGAATGAGGAAGCGCATGTGTTTGT -3'; PRL-3-shRNA-2 正义链 5'-C ACCGCGTGTGTGTGAAGTGACCTATTCAAGACGTAGGTCACTTCACACAC ACGCTTTTTTTG-3', 反义链 5'-AGCTCAAAAAAGCGTGTGTGTGAAGTGACC TACGTCTTGAATAGGTCACTTCACACACACGC -3'; PRL-3-shRNA-3 正义链 5'-CACCACCGTTGTGGACTGGCCGTTTCTATGGACAAAACGGCCAGTCCAC AACGGTTTTTTTG-3', 反义链 5'-AGCTCAAAAAACCGTTGTGGACTGGCC GTTTTGTCCATAGAAACGGCCAGTCCACAACGGT -3'; 阴性对照 正义链 5'-CACC GGTGGCTTCCGACGTCATTGTTTCAAGACGACAATGACGTCGGAAG CCACCTTTTTTTG-3', 反义链 5'-AGCTCAAAAAAGGTGGCTTCCGACGTCAT TGTCGTCTTGAAACAATGACGTCGGAAGCCACC-3'。合成的 2 条互补寡核苷酸链在退火缓冲液作用下退火, 形成双链结构。质粒 pGenesil-1.1 经 Eco31 I 酶切线性化, 在 T₄ DNA 连接酶作用下与退火后形成的双链结构连接, 形成重组载体, 分别命名为 pGenesil-1.1-PRL-3-shRNA-1、pGenesil-1.1-PRL-3-shRNA-2 和 pGenesil-1.1-PRL-3-shRNA-3, 连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 分别涂布于含 Kana^r (终质量浓度为 30 μ g/ml) 抗性的 LB 平板上, 提取重组质粒用 Sac I 做酶切鉴定及测序鉴定。作为对照的通用阴性对照质粒 pGenesil-1.1-NC 为不针对任何靶基因的非特异性重组载体, 所有序列都经过 BLAST 比对, 与人、鼠基因库无明显同源。

1.3 Realtime PCR 法检测 shRNA 转染后 PRL-3mRNA 表达的变化

实验分为 5 组, 其中 4 组在脂质体 lip2000 介导下, 分别将重组质粒 pGenesil-1.1-PRL-3-shRNA-1 (PRL-3-shRNA-1 组)、pGenesil-1.1-PRL-3-shRNA-2 (PRL-3-shRNA-2 组)、pGenesil-1.1-PRL-3-shRNA-3 (PRL-3-shRNA-3 组)、pGenesil-1.1-NC (阴性组) 转染 MCF-7 细胞, 另一组未转染的 MCF-7 细胞为空白组。细胞转染 72 h, 上述 5 组各取 1×10^6 个细胞, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。加入 0.8 ml

Trizol, 将细胞原位裂解后, 吸到 EP 管中, 漩涡震荡 20 s。加入 200 μ l Tris-酚/氯仿抽提, 离心吸取上清液, 再加入等体积异丙醇沉淀, 用 75% 预冷乙醇漂洗、沉淀, 自然风干, 最后用 20 μ l 0.1% 焦碳酸二乙酯(diethylprocarbonate, DEPC) 水溶解沉淀, 用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA。PRL-3 引物序列为: 上游引物 5'-TTGTGGACTG GCGTTTGAC-3', 下游引物 5'-AACCGCAGCCTCTGTTTGG-3'; 内参照基因 GAPDH 引物序列为: 上游引物 5'-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3', 下游引物 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'。然后按照试剂盒说明书配制反应体系, 进行 RT-PCR 扩增和检测, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s 扩增 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s。PRL-3 基因 mRNA 的表达结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示, C_t 值代表在 PCR 扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时, 所经过的扩增循环次数, 公式: $\Delta\Delta C_t = (C_t \text{ 处理组目的基因} - C_t \text{ 处理组内参基因}) - (C_t \text{ 对照组目的基因} - C_t \text{ 对照组内参基因})$ 。

1.4 Western blot 检测 shRNA 转染后 PRL-3 蛋白表达的变化

根据上述实验结果, 取 PRL-3-shRNA-2 组、阴性组和空白组转染 72 h 后的细胞用 PBS 漂洗, 每孔细胞加 100 μ l 的裂解液, 冰上裂解 20 min, 低温离心, 取上清液, 用 Bradford 微量分析法检测蛋白浓度。通过电转移法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜, 染色, 洗脱, 封闭, 室温下封闭 2 h, 加兔抗人 PRL-3 抗体(1:500)、 β -actin 抗体(1:5000, 作为内参), 4 $^{\circ}$ C 培育过夜, 用 TBST (Tris-Buffered Saline with Tween-20) 溶液在脱色摇床上摇动、洗膜 3 次, 加入过氧化物酶标记的猪抗兔 IgG 二抗(1:2000)培育 2 h, 增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色, 上机, 用 Image-proplus 软件分析灰度值, 比较各组蛋白表达量。

1.5 MTT 比色法检测 shRNA 转染后细胞增殖的变化

将 PRL-3-shRNA-2 组、阴性组和空白组细胞培养至 90% 融合率后进行铺板(6 孔板), 每孔铺细胞 25 万个细胞。在 6 孔板中培养 16 h, 然后用 PRL-3-shRNA-2 组质粒进行转染, 阴性片段质粒作为对照。转染方法同上。转染后 12 h 开始接种细胞。转染后的 MCF-7 细胞, 制备成单细胞悬液, 细胞数为 1×10^5 /ml; 将细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μ l, 每个时间点设 4 个平行孔; 每隔 24 h 检测 1 次, 检测时: 每孔加入新鲜配制的 10 mg/ml MTT 10 μ l, 继续培养 4 h; 弃上清液, 每孔再加入 0.02 ml 新配置的二甲基亚砷 (DMSO), 振摇 10 min; 用全自动酶联免疫检测仪测定, 于波长 570 nm 条件下, 测定每孔吸光度(D)值, 以不含细胞的培养液作空白对照, 绘制生长曲线。细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组}[D] \text{值} / \text{空白组}[D] \text{值}) \times 100\%$ 。

1.6 流式细胞仪检测 shRNA 转染后细胞凋亡率的变化

实验分组同上, 细胞培养至 90% 融合率后进行铺板(6 孔板), 每孔铺 25 万个

细胞。在 6 孔板中培养 16 h,然后用质粒进行转染,阴性片段质粒作为对照。加入质粒和脂质体的比例改为 $6\ \mu\text{g} : 6\ \mu\text{l}$,其余操作同上。转染后 48 h,用胰酶消化细胞,PBS 洗 1 次,然后用 75%乙醇 $4\ ^\circ\text{C}$ 固定过夜,不少于 16 h。第 2 天,固定完成后,用 PBS 洗 2 次, $3000\times g$ (离心机半径为 6 cm)离心 5 min。用碘化丙啶(propidium iodide,PI)染料($0.5\ \text{mg/ml}$)进行染色,按 1 : 10 的比例加到重悬与 PBS 的细胞中,弹匀,避光反应 5 min。 $3000\times g$ (离心机半径为 6 cm)离心 5 min 后,吸去上清液,用 PBS 洗 1 次,然后用 $500\ \mu\text{l}$ PBS 重悬,上流式细胞仪进行分析。

1.7 Transwell 小室侵袭实验

实验分组同上,Transwell 小室底部为 $8\ \mu\text{m}$ 孔径乙烯滤膜,预先铺上 Matrigel 凝胶($1\ \text{mg/ml}$) $100\ \mu\text{l}$,将小室置于 24 孔板内,超净台内风干 4 h。转染后 6 h,用倒置荧光显微镜观察细胞完全成功后,常规收集细胞,3 组均以无血清 Opti-MEM 制成 $2\times 10^5/\text{ml}$ 细胞液。各取 $100\ \mu\text{l}$ 移入小室。小室外加入各 $200\ \mu\text{l}$ 的条件培养和完全培养液,置 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱内孵育 48 h 后取出。以棉签小心刮除滤膜上室面的细胞,吸净 24 孔板内培养液。侵袭并黏附至下室面和 24 孔板内的细胞以 10%甲醛固定,常规 HE 染色。在 200 倍高倍镜下,取中间及周边 5 个视野进行细胞计数,以其平均值作为穿膜细胞数。

1.8 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计算各组统计量的偏度系数和峰度以检验其正态性,同时行 Levene's Test 方差齐性检验。两个样本均数之间的比较采用两独立样本 t 检验,3 个及以上样本均数之间的比较采用单因素方差分析,多重比较时,如果方差齐选用 LSD 法,方差不齐选用 Dunnett's T3 法,MTT 检测结果组间比较采用重复测量方差分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

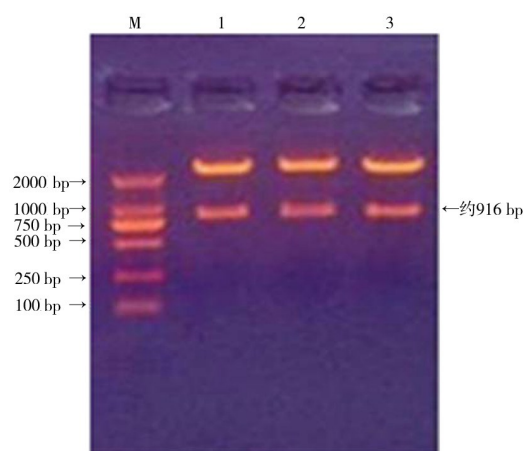
2.1 PRL-3 基因特异性 shRNA 重组质粒的鉴定

在转染了重组质粒的细菌平板中随机挑取 5 个菌落,使用质粒提取试剂盒提取重组质粒,经 Sac I 酶切后,行 1%琼脂糖电泳鉴定。在 2 个插入的目的基因片段里分别设计了一个 Sac I 酶切位点,而质粒 pGenesil-1.1 中本身也含有一个 Sac I 酶切位点,因此如果连接正确,重组质粒就能被 Sac I 酶切出 1 条约 916 bp 的 DNA 小条带。酶切鉴定证明 3 条重组质粒均符合设计要求(图 1),测序结果与理论序列一致(上海英俊生物有限公司测序)。

2.2 shRNA 转染后 PRL-3 mRNA 的表达

转染 72 h 后,采用 RealTime PCR 检测 PRL-3 基因 mRNA 的表达。结果显示,PRL-3-shRNA-1 组、PRL-3-shRNA-2 组和 PRL-3-shRNA-3 组分别与空白组和

阴性组比较, PRL-3 基因 mRNA 表达差异有统计学意义($P < 0.05$); 5 组中 PRL-3-shRNA-2 组干扰效果最好(表 1, 图 2)。因此, 在后续实验均采用重组质粒 pGenesil-1.1-PRL-3-shRNA-2 进行。



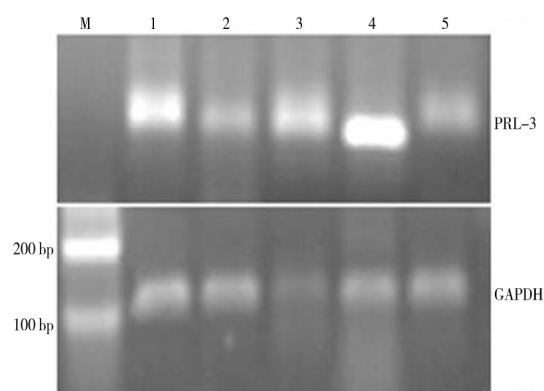
M: DL2000 标记条带; 1: PRL-3-shRNA-1; 2: PRL-3-shRNA-2; 3: PRL-3-shRNA-3

图 1 重组载体的酶切鉴定图

表 1 转染后 72 h 各组 PRL-3 mRNA 相对表达量

组别	<i>n</i>	PRL-3 mRNA
空白组	5	1.00 ± 0.00
阴性组	5	0.98 ± 0.18
PRL-3-shRNA-1 组	5	0.30 ± 0.27 ^a
PRL-3-shRNA-2 组	5	0.15 ± 0.14 ^a
PRL-3-shRNA-3 组	5	0.31 ± 0.03 ^a
<i>F</i> 值		1339.99
<i>P</i> 值		0.00

a: $P < 0.05$, 分别与空白组和阴性组比较



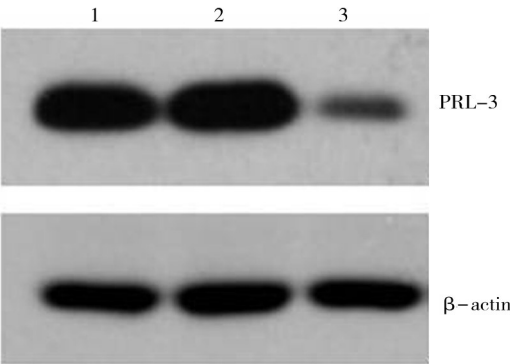
M: 标记条带; 1: PRL-3-shRNA-3 组; 2: PRL-3-shRNA-2 组; 3: PRL-3-shRNA-1 组; 4: 空白组; 5: 阴性组

图 2 Real-time PCR 检测 PRL-3 mRNA 的表达

2.3 PRL-3 蛋白表达的变化

Western bolt 检测结果表明, 各组的内参照 β -actin 表达一致, 而 PRL-3-

shRNA-2 组细胞 PRL-3 蛋白明显弱于阴性组和空白组,经 Image-proplus 软件分析,PRL-3-shRNA-2 组的相对灰度值与阴性组、空白组间差异有统计学意义($P<0.05$,图 3,表 2)。



1:空白组; 2:阴性组; 3:PRL-3-shRNA-2 组

图 3 各组 PRL-3 蛋白的表达

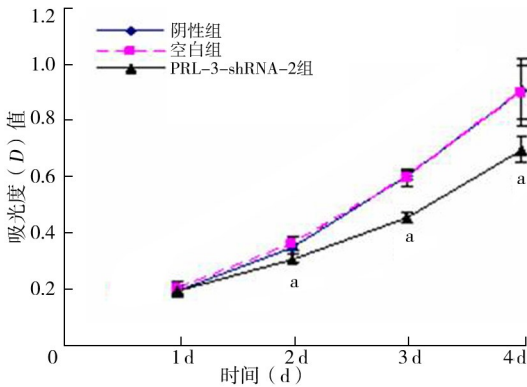
表 2 各组 MCF-7 细胞 PRL-3 蛋白的相对灰度值比较

组别	<i>n</i>	PRL-3 蛋白相对灰度值
阴性组	5	0.91±0.03
空白组	5	0.89±0.02
PRL-3-shRNA-2 组	5	0.50±0.02 ^a
<i>F</i> 值		608.26
<i>P</i> 值		0.00

a: $P<0.05$,分别与空白组和阴性组比较

2.4 瞬时转染 PRL-3 对 MCF-7 细胞增殖的影响

shRNA 表达质粒转染后,PRL-3-shRNA-2 组、阴性组及空白组间 MCF-7 细胞增殖水平的差异有统计学意义($P<0.05$);阴性组和空白组的生长曲线基本重叠,而 PRL-3-shRNA-2 组的生长曲线明显右偏(图 4)。PRL-3-shRNA-2 组第 2、3、4 天的增殖抑制率分别为 14.44%、23.96%、21.41%,而阴性组和空白组的体外增殖能力差异无统计学意义($P>0.05$,表 3)。



a: $P<0.05$,与空白组比较

图 4 各组细胞的增殖能力比较

表 3 转染后各组细胞的吸光度值比较

组别	1 d	2 d	3 d	4 d
阴性组	0.19±0.03	0.35±0.01	0.61±0.02	0.91±0.10
空白组	0.20±0.02	0.36±0.02	0.60±0.03	0.90±0.12
PRL-3-shRNA-2 组	0.19±0.02	0.31±0.02 ^a	0.45±0.02 ^a	0.70±0.05 ^a

a: $P < 0.05$, 与阴性组和空白组比较

2.5 shRNA 转染后 MCF-7 细胞凋亡的变化

PRL-3-shRNA-2 组细胞的凋亡率明显高于阴性组和空白组 ($P < 0.05$, 表 4, 图 5), 而后 2 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 4)。细胞周期中 PRL-3-shRNA-2 组的 G_1 期增高, S 期降低。

表 4 细胞周期分布情况

(%)

组别	G_1	S	G_2	凋亡率
阴性组	38.58±2.41	34.84±4.56	26.49±4.80	0.16±0.05
空白组	53.50±5.46	35.18±1.67	23.82±0.63	1.60±1.58 ^b
PRL-3-shRNA-2 组	40.67±1.16 ^a	20.79±7.75 ^a	25.70±9.08	8.37±1.85 ^a
F 值	15.89	7.25	0.16	29.06
P 值	0.00	0.03	0.86	0.00

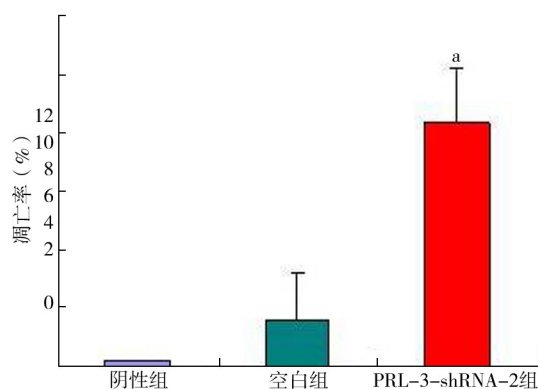
a: $P < 0.05$, 分别与阴性组和空白组比较; b: $P > 0.05$, 与阴性组比较a: $P < 0.05$, 分别与阴性组和空白组比较

图 5 各组细胞的凋亡率比较

2.6 Transwell 小室侵袭实验结果

PRL-3-shRNA-2 组穿膜细胞数明显低于阴性组和空白组 (P 均 < 0.05), 而阴性组与空白组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 5)。

表 5 各组穿膜细胞数比较

组别	穿膜细胞数(个)
阴性组	8.00±1.41 ^a
空白组	7.25±0.96
PRL-3-shRNA-2 组	1.25±0.96 ^b
F 值	42.85
P 值	0.00

a: $P > 0.05$, 与空白组比较; b: $P < 0.05$, 与阴性组和空白组比较

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,在中国部分大中城市已经超过宫颈癌,成为女性肿瘤死亡的第一位原因。乳腺癌的基因治疗是继手术、放射治疗、化疗和内分泌治疗之后发展的一种新的治疗手段,目前已有一些研究成果应用于临床,并取得了显著的疗效。例如赫赛汀(trastuzumab)是一种经过高纯度重组 DNA 衍生的单克隆抗体,已被美国食品药品监督管理局(FDA)用于临床治疗 HER-2 过度表达的转移性乳腺癌。乳腺癌的基因治疗虽然取得了初步的成功,但还有许多问题亟待解决,比如用于临床治疗的基因靶点比较单一,缺乏高效性、特异性、导向性治疗基因载体,通过靶向沉默明显降低癌细胞转移的目的基因更加匮乏等^[6],因此,寻找新的靶点基因也就显得尤为重要。

PRL-3 是一种相对分子质量为 20 000 的蛋白磷酸酶,属于 PRL 家族(该家族包括 PRL-1、PRL-2、PRL-3),其同源性达 76%~87%。PRL-3 又被称为 PTP4A3,其基因位于染色体 8q24.3 上,一级结构由 173 个氨基酸组成,二级结构有 4 个 α 螺旋、5 个 β 折叠和一个 P 环构成^[7]。而蛋白酪氨酸磷酸酶是通过调节蛋白质分子酪氨酸残基的磷酸化和去磷酸化过程实现对蛋白质活性的调控,参与各种细胞生命活动^[8]。新近研究表明,PRL-3 在一些肿瘤中高表达,并且与肿瘤转移密切相关,导致细胞恶变并且增强肿瘤细胞的增殖、浸润、移动和迁移^[9-11]。Fiordalisi 等^[12]已证实其机制是通过激活 Rho 信号传导通路促进肿瘤的运动与转移。运用 RNAi 技术沉默恶性肿瘤细胞中 PRL-3 表达的相关研究已经取得了一些成果。例如,钱立平等^[13]研究借助 RNAi 技术,以合成的 PRL-3 基因 siRNA 转染处理大肠癌细胞 HCT116,从体内外观察其对癌细胞侵袭的影响。实验结果显示,运用小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默 PRL-3 基因表达可明显抑制大肠癌细胞的体内外侵袭能力。Matsukawa 等^[14]沉默胃癌 SH101-P4 细胞中 PRL-3 基因,体内和体外实验结果均发现可以抑制胃癌细胞的增殖和侵袭能力。

本实验针对 PRL-3 基因设计 3 条具有干扰效果的 DNA 片段,经过退火处理后得到 shRNA 模板,经酶切和 DNA 测序鉴定完全正确,说明成功构建了短发夹结构的 PRL-3-shRNA,并成功转染入体外培养的人乳腺癌 MCF-7 细胞中,Realtime-PCR 和 Western bolt 分别从基因和蛋白水平验证了经 shRNA 转染的 MCF-7 细胞 PRL-3 表达明显受到抑制。用 MTT 法和流式细胞仪检测 MCF-7 细胞的增殖和凋亡,结果显示 PRL-3-shRNA-2 组的增殖抑制和凋亡率均高于阴性组、空白组,PRL-3-shRNA-2 组的生长曲线明显右偏,说明其生长速度减慢,细胞周期中 PRL-3-shRNA-2 组的 G_1 期增高,S 期降低,提示 PRL-3-shRNA-2 组的 G_1 期较慢进入 S 期,表明通过沉默 PRL-3 基因表达,可有效地抑制乳癌 MCF-7 细胞的增殖,促进其凋亡及降低侵袭力。

综上所述,合成的靶向 PRL-3 特异性 shRNA 转染入 MCF-7 细胞后,可有效抑制 PRL-3 的表达、抑制细胞生长、促进细胞凋亡,并能降低 MCF-7 细胞的侵袭力。这为下一步以 PRL-3 为靶基因进行肿瘤基因治疗的实验研究奠定了基础,并且 PRL-3 也有望成为乳腺癌基因治疗的新靶点,对乳腺癌生物学行为、预后和指导治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] Guzińska Ustymowicz K, Pryczynicz A. PRL-3, an emerging marker of carcinogenesis, is strongly associated with poor prognosis [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(1): 99-100.
- [2] Polato F, Codegoni A, Fruscio R, et al. PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19 Pt 1): 6835-6839.
- [3] Wang L, Peng L, Dong B, et al. Overexpression of phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: association with a poor clinical outcome [J]. *Ann Oncol*, 2006, 17(10): 1517-1522.
- [4] Miskad UA, Semba S, Kato H, et al. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas: close correlation with invasion and metastasis [J]. *Pathobiology*, 2004, 71(4): 176-184.
- [5] 吴玫,龙飞,李姝玉,等. PRL-3 在乳腺癌中的表达及意义[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15(4): 410-415.
- [6] 吴爱国. 乳腺癌基因治疗研究现状[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2008, 2(5): 561-570.
- [7] Kozlov G, Cheng J, Ziomek E, et al. Structural insights into molecular function of the metastasis-associated phosphatase PRL-3 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(12): 11 882-11 889.
- [8] Hunter T. Signaling-2000 and beyond [J]. *Cell*, 2000, 100(1): 113-127.
- [9] Al Aidaroos AQ, Zeng Q. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(5): 1087-1098.
- [10] Zheng P, Liu YX, Chen L, et al. Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(10): 4897-4905.
- [11] Bardelli A, Saha S, Sager J A, et al. PRL-3 expression in metastatic cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(15): 5607-5615.
- [12] Fiordalisi J J, Keller P J, Cox A D. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3153-3161.
- [13] 钱立平,范钰,陈坚,等. RNAi 沉默 PRL-3 基因对大肠癌细胞侵袭的抑制[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(7): 767-770.
- [14] Matsukawa Y, Semba S, Kato H, et al. Constitutive suppression of PRL-3 inhibits invasion and proliferation of gastric cancer cell *in vitro* and *in vivo* [J]. *Pathobiology*, 2010, 77(3): 155-162.

(收稿日期:2011-03-02)

(本文编辑:罗承丽)

钟琰,吴爱国,纪术峰,等. 短发夹 RNA 沉默促肝细胞再生磷酸酶-3 基因表达对乳腺癌 MCF-7 细胞生长和侵袭能力的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志:电子版*, 2011, 5(3): 313-322.