

[文章编号] 1007-385X(2008)02-0134-05

## 慢病毒介导的 RNAi 对卵巢癌细胞增殖及间皮素表达的影响

王 莉<sup>1</sup>, 李 娜<sup>2</sup>, 吴小华<sup>2\*</sup> (1. 河北医科大学 临床医学院 河北省人民医院 妇产科; 2. 河北医科大学 附属第四医院 妇产科 石家庄 050011)

**[摘要]** 目的: 构建间皮素(mesothelin, MSLN) RNAi 重组慢病毒质粒, 探讨其对卵巢癌 OVCAR-3 细胞 MSLN 的表达及细胞增殖的影响。方法: 根据 MSLN 基因信息, 设计了 4 个小干扰序列和 1 个阴性对照序列, 利用慢病毒质粒载体 pRNAT-U6.2/Lenti 构建了 5 个重组质粒并进行了慢病毒包装, 分别为 LV-MSLN-negative、LV-MSLN-shRNA2、LV-MSLN-shRNA3、LV-MSLN-shRNA4; 感染 OVCAR-3 细胞后, Western blotting 和荧光免疫组化检测干扰效率, 选择干扰效率高的质粒载体进行慢病毒大量包装; 感染卵巢癌细胞 OVCAR-3 后, 用细胞增殖实验和平板克隆形成实验检测细胞增殖的变化。结果: 测序结果证明 5 种质粒载体的插入序列完全正确, 鉴定证明慢病毒包装成功。慢病毒感染 OVCAR-3 细胞后, Western blotting 证实重组慢病毒 LV-MSLN-shRNA4 的干扰效率最高, 对 MSLN 蛋白表达的抑制率达 90%。荧光免疫组化的共聚焦照片显示干扰组(OVC-shRNA)定位于细胞膜的 MSLN 蛋白表达明显弱于阴性对照组(OVC-neg)和空白对照组(OVC)。OVC-shRNA 组细胞增殖  $[(11.2 \pm 1.3) \times 10^5]$  显著慢于 OVC-neg 组  $[(20.5 \pm 2.5) \times 10^5]$  和 OVC 组  $[(21.9 \pm 2.3) \times 10^5]$  ( $P < 0.05$ )。OVC-shRNA 组克隆形成率为  $(15.2 \pm 2.1)\%$ , 明显低于 OVC-neg 组  $(27.9 \pm 2.5)\%$  和 OVC 组  $(28.8 \pm 3.1)\%$  ( $P < 0.05$ )。结论: 成功构建 MSLN RNAi 重组慢病毒质粒 LV-MSLN-shRNA4, 它能有效抑制卵巢癌 OVCAR-3 细胞的 MSLN 表达及细胞增殖, 为进一步研究 MSLN 应用于肿瘤基因治疗奠定了基础。

**[关键词]** 间皮素; RNA 干扰; 慢病毒; 卵巢肿瘤; 细胞增殖

**[中图分类号]** R737.31; R730.54 **[文献标志码]** A

## Lentivirus mediated RNA interference inhibits mesothelin expression in ovarian cancer cells and cell proliferation

WANG Li<sup>1</sup>, LI Na<sup>2</sup>, WU Xiao-hua<sup>2\*</sup> (1. Department of Obstetrics and Gynecology, Hebei General Hospital, Clinical Medical College, Hebei Medical University, 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a recombinant lentivirus plasmid of RNA interference targeting (*MSLN*) gene and to observe its effect on MSLN expression in human ovarian cancer cell line OVCAR-3 and its effect on cell proliferation. **Methods:** According to the Genbank information of MSLN, four RNA interfering sequences and a negative sequence were designed and inserted into plasmid pRNAT-U6.2/Lenti and 5 kinds of plasmids were packaged: LV-MSLN-negative, LV-MSLN-shRNA1, LV-MSLN-shRNA2, LV-MSLN-shRNA3, and LV-MSLN-shRNA4; and they were used to transfect OVCAR-3 cells. Western blotting and indirect immunofluorescence were then used to investigate the interfering efficiency. The plasmid with high interfering efficiency was packaged. The cell proliferation test and clone-forming test was used to assess the changes in cell proliferation. **Results:** DNA sequencing showed that the sequences of 5 recombinant lentivirus plasmids were correct. Lentivirus packaging was successfully done. Western blotting analysis confirmed that LV-MSLN-shRNA4 had the highest interfering efficiency (90%). MSLN specifically bound to cytomembrane of OVCAR-3 cells. Expression of MSLN in the interfered cells (OVC-shRNA) was weaker than that in the control cells (OVC-neg, OVC). OVC-shRNA cells  $[(11.2 \pm 1.3) \times 10^5]$  grew slowly compared to OVC-neg cells  $[(20.5 \pm 2.5) \times 10^5]$  and OVC cells  $[(21.9 \pm 2.3) \times 10^5]$  ( $P < 0.05$ ). There was a significant reduction in clone forming rate of OVC-shRNA cells  $(15.2 \pm 2.1)\%$  in comparison with OVC-neg cells  $(27.9 \pm 2.5)\%$  and OVC cells  $(28.8 \pm 3.1)\%$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** We have successfully constructed MSLN RNAi recombination plasmid LV-MSLN-shRNA4, which can

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30572093); 河北省自然科学基金资助项目(No. C2005000804)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30572093); the Natural Science Foundation of Hebei Province(No. C2005000804)

**[作者简介]** 王 莉(1972-), 女, 汉族, 河北省保定市人, 博士生, 主要从事妇科肿瘤防治方面的研究

\* Corresponding author. E-mail: xiaohuawu65@yahoo.com

effectively inhibit *MSLN* expression and cell proliferation, which paves a way for studying *MSLN* function and gene therapy.

[ **Key words** ] mesothelin; RNA interference; lentivirus; ovarian neoplasms; cell proliferation

[ Chin J Cancer Biother, 2008, 15(1): 134-138 ]

卵巢癌很难早期发现,手术和化疗的疗效欠佳,在妇科恶性肿瘤中预后最差,5年生存率仅为30%左右。本课题组前期研究用cDNA微阵列方法分析了卵巢上皮性癌和正常卵巢皮质的基因表达谱,发现间皮素(mesothelin, *MSLN*)基因是卵巢上皮性癌组织中表达上调最显著的基因。随后证实<sup>[1]</sup>卵巢上皮性肿瘤组织中 *MSLN* 和 *CA125* 表达有显著的一致性。国外实验大多集中在 *MSLN* 的免疫靶向治疗和作为肿瘤标志物研究<sup>[2-5]</sup>,国内也开始了这方面的研究<sup>[6]</sup>,而关于 *MSLN* 的功能研究较少,有研究表明 *MSLN* 与细胞黏附功能有关<sup>[7]</sup>。本研究通过针对 *MSLN* 基因的 RNA 干扰(RNA interference RNAi)慢病毒重组质粒的构建和包装,以期获得基因长期沉默的工具来进一步研究 *MSLN* 的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

人卵巢浆液性囊腺癌细胞系 OVCAR-3 由河北医科大学第四医院科研中心提供,人胚肾 293T 细胞购自中科院细胞库。慢病毒质粒 pRNAT-U6.2/Lenti 购自 Genscript 公司,连接试剂盒购自 Epicentre 公司,凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司,制备感受态试剂盒购自 Biosciences 公司,Taq 聚合酶购自 Promega 公司,质粒抽提试剂盒购自 Axygen 公司, Qiagen 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司,慢病毒包装试剂盒购自上海比昂生物。小干扰序列和引物由上海比昂生物公司合成。蛋白质提取试剂盒、考马斯亮蓝检测试剂盒等购自北京赛百盛生物公司。*MSLN* 鼠抗人单克隆抗体 K1 购自美国 ZYMED 公司,罗丹明标记羊抗鼠多抗、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠多抗、GAPDH 抗体、ECL 试剂盒购自中杉金桥生物公司。激光共聚焦显微镜为 ZEISS 公司 LSM510 型。

### 1.2 慢病毒质粒载体的构建、测序及包装

根据 *MSLN*(GENEBANK 号 NM\_005823)基因信息,设计 shRNA1、shRNA2、shRNA3、shRNA4 4 条针对 *MSLN* 基因的 RNAi 序列;同时设计 1 条阴性(negative)序列用于对照组实验,通过 BLAST 软件验证该阴性序列对于任何基因无干扰效果。5 条序列如下: negative, TTCTCCGAACGTGTCACGT;

shRNA1, CACCTAACATTTCCAGCCT; shRNA2, GTG-GAGAAGACAGCCTGTC; shRNA3, AACATTTCCAGCCTCTCCC; shRNA4, GCTCTCAACAGAGCAGCTG。根据上述 5 条序列设计 5 对互补的单链 DNA,包括 RNAi 的正义链和反义链,互补单链中间连有 loop 环,两端为 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的黏性末端,形成一条可直接与酶切后的载体进行连接反应的单链。设计好的序列送比昂生物公司合成。载体 pRNAT-U6.2/Lenti 的 U6.2 启动子后的 *Bam*H I (GGATCC)和 *Xho* I (CTCGAG)之间为插入位点,该载体带有氨卞西林、G418 筛选标记和 GFP 荧光蛋白标记。用设计合成好的 5 条单链 DNA 片段构建 5 个质粒: p*MSLN*-negative、p*MSLN*-shRNA1、p*MSLN*-shRNA2、p*MSLN*-shRNA3、p*MSLN*-shRNA4。方法如下:(1)将合成好的单链 DNA 进行稀释和退火;(2)对空载体 pRNAT-U6.2/Lenti 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切,将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,并进行回收;(3)根据凝胶回收试剂盒说明书将退火后稀释产物和回收好的双酶切载体进行连接反应;(4)根据制备感受态试剂盒说明书制备感受态细菌;(5)根据连接试剂盒说明书将连接产物转化大肠杆菌,涂布 Amp<sup>+</sup> LB 平板,37℃ 过夜培养;(6)挑取平板中单菌落,使用载体多克隆位点两端的引物进行 PCR 扩增检测阳性菌落;(7)挑取阳性菌落接种于 5 ml Amp<sup>+</sup> LB 液体培养基中,37℃、250 r/min 摇床培养过夜;(8)使用质粒抽提试剂盒提取质粒,送比昂生物公司测序;(9)六孔板培养 293T 细胞,按照比昂慢病毒包装试剂盒说明书进行慢病毒包装;(10)待测病毒液和标准病毒液做梯度稀释分组同时转染 293T 细胞,测定病毒液滴度。

### 1.3 病毒感染

(1)感染前 1 d 将 OVCAR-3 细胞接种到六孔细胞培养板中,每孔接种  $5 \times 10^5$  个细胞,放于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养。六孔板中细胞培养 24 h 后,细胞密度为 70%~80% 时,进行感染。(2)加入培养基 1 ml/孔,再分别加入稀释病毒液各 100 μl (MOI 值相当于 5),培养 24 h 后换液,继续培养 72 h 后进行后续实验。

1.4 Western blotting 检测重组慢病毒介导的 RNAi 对 *MSLN* 蛋白表达的影响

(1)实验分为6组,其中A组为空白阴性对照组(OVC组),用于检测细胞中MSLN基因的本底表达量;B组(LV-MSLN-negative组)为慢病毒阴性对照组,用于检测慢病毒是否影响MSLN基因的表达;C~F组即是LV-MSLN-shRNA1~LV-MSLN-shRNA4组,用于检测对MSLN的干扰效率;(2)取病毒感染后96h的细胞;(3)蛋白质提取试剂盒提取培养细胞的总蛋白,考马斯亮蓝检测试剂盒蛋白定量,12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,4℃冷库恒流150mA、3h电转移至PVDF膜,奶粉封闭后加入1:50稀释的MSLN单抗K1或1:200稀释的GAPDH抗体4℃过夜,漂洗后1:5000稀释辣根过氧化物酶标记羊抗鼠多抗37℃、2h,按照ECL产品说明书,暗室中曝光X线底片1~2min,水洗后放入定影液中,直至底片完全透明,水洗后烘干。GAPDH作为内参照。图像扫描仪扫描(中国清华紫光A600),定量软件分析系统(美国Image公司FOTODYNE60-2107型)测定每一样本条带的灰度值,目的条带与内参照GAPDH条带灰度值之比为该样本中蛋白的相对含量。干扰效率(%)=蛋白表达下调值/空白对照组蛋白表达值×100%。

### 1.5 间接免疫荧光染色法检测重组慢病毒介导的RNAi对MSLN基因表达的影响

干扰组OVC-shRNA为LV-MSLN-shRNA4慢病毒感染组;阴性对照组OVC-neg为LV-MSLN-negative慢病毒感染组;空白对照组OVC为未加病毒组。取出细胞爬片,丙酮固定,羊血清封闭抗原37℃1h,加1:100稀释的MSLN单抗K1,37℃孵育1h,以后各步均避光操作,滴加1:100稀释罗丹明标记二抗,37℃孵育1h,甘油封片,激光共聚焦显微镜观察荧光强度,罗丹明激发波长为543nm,PBS代替一抗作阴性对照观察干扰效果。

### 1.6 细胞增殖实验和克隆形成实验测定RNAi对肿瘤细胞增殖能力的影响

1.6.1 细胞增殖实验 实验分组同1.5。OVCAR-3细胞以 $2 \times 10^5$ 个/孔接种于6孔板,培养至细胞贴壁后加入感染复数MOI为5的慢病毒,每组设5个复孔,24h后换成正常培养液,继续培养96h后胰酶消化,锥虫蓝染色并计数活细胞。

1.6.2 平板克隆形成实验 感染24h后的细胞制备细胞悬液,将细胞悬液作梯度倍数稀释,以每孔100个细胞的密度接种于6孔培养板中。加10ml预温37℃培养液,然后以十字方向轻轻晃动培养皿,使细胞分散均匀,将6孔培养板静止培养2周。出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去培养液,加

甲醇5ml固定15min,0.1%结晶紫染色30min,然后流水缓慢洗去染色液,空气干燥。在显微镜下计数大于50个细胞的克隆数。计算细胞的克隆形成率:克隆形成率(%)=克隆数/接种细胞数×100%。以上实验均重复3次。

### 1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5软件进行t检验。

## 2 结果

### 2.1 携带干扰序列的慢病毒的制备

RNAi合成片段酶切连接后转化大肠杆菌,用大肠杆菌扩增质粒,挑取大肠杆菌单菌落,PCR扩增检测,PCR片段321bp或322bp,为载体构建成功的阳性菌落(图1)。5种序列慢病毒质粒载体测序结果证明插入序列完全正确,慢病毒质粒载体构建成功。重组慢病毒质粒和慢病毒包装质粒混合物共转染293T细胞24h后的荧光强度高,细胞生长良好,表明病毒包装成功。收集上清过滤后进行病毒液浓缩,测定病毒滴度为 $5.1 \times 10^8$ CFU/ml。慢病毒质粒转染OVCAR-3细胞,观察各组OVCAR-3细胞中荧光细胞的数量,显示转染效率为80%~92%。

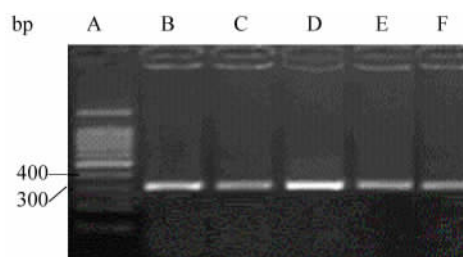


图1 慢病毒质粒pMSLN-shRNA PCR产物电泳

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR products of lentivirus plasmids

A:Marker(100 bp ladder); B:pMSLN-negative(322 bp); C:pMSLN-shRNA1(322 bp); D:pMSLN-shRNA2(321 bp); E:pMSLN-shRNA3(321 bp); F:pMSLN-shRNA4(322 bp)

### 2.2 慢病毒介导的RNAi对卵巢癌细胞MSLN蛋白表达的抑制

感染慢病毒的B组、C~F组的OVCAR-3细胞中MSLN蛋白表达量同对照组A组细胞中的表达量相比下调了10%、9%、53%、84%、90%,以LV-MSLN-shRNA4的干扰效率为最高,达90%(图2)。LV-MSLN-shRNA4慢病毒载体能有效抑制MSLN蛋白的表达,故该组进行病毒的大包装。

间接免疫荧光染色结果可以看出MSLN在

OVCAR-3 细胞的定位表达,MSLN 标记为红色荧光,主要分布在细胞膜。OVC-shRNA 组的 MSLN 蛋白荧光强度明显低于 OVC、OVC-neg 两组,说明慢病毒感染后 OVCAR-3 细胞 MSLN 的表达明显降低(图 3)。

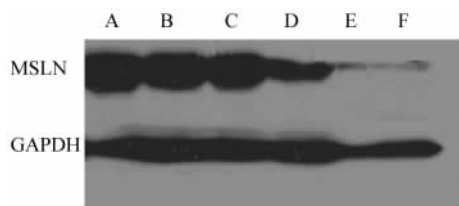


图 2 Western blotting 检测重组慢病毒 RNA 干扰后 OVCAR-3 细胞 MSLN 蛋白表达的变化

Fig.2 MSLN protein expression in OVCAR-3 cells infected by recombinant lentivirus of RNA interference detected by Western blotting

A: Control; B: Negative; C:shRNA1; D:shRNA2; E:shRNA3; F: shRNA4

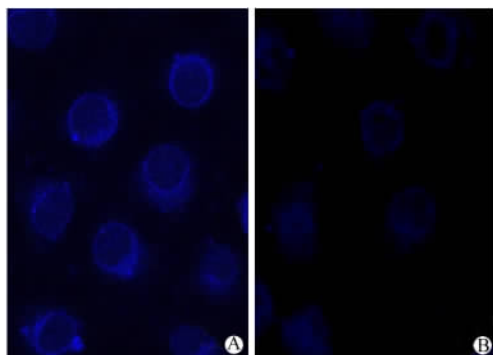


图 3 重组慢病毒 RNA 干扰后各组细胞中 MSLN 蛋白的表达( TRITC, ×600 )

Fig.3 MSLN protein expression cells infected by recombinant lentivirus of RNA interference detected by indirect immunofluorescence( TRITC, ×600 )

A:OVC-neg;B:OVC-shRNA

### 2.3 慢病毒介导的 RNAi 对卵巢癌细胞增殖能力的抑制

细胞增殖实验结果表明:慢病毒感染后 96 h,干扰组(OVC-shRNA)、阴性对照组(OVC-neg)和空白对照组(OVC)的细胞个数分别为  $(11.2 \pm 1.3) \times 10^5$ 、 $(20.5 \pm 2.5) \times 10^5$ 、 $(21.9 \pm 2.3) \times 10^5$ ,干扰组细胞增殖速度显著慢于阴性对照组和空白对照组( $P < 0.05$ ),两对照组之间无明显差别。

克隆形成实验结果表明:干扰组克隆形成率为  $(15.2 \pm 2.1)\%$ ,明显低于阴性对照组的  $(27.9 \pm 2.5)\%$ 和空白对照组的  $(28.8 \pm 3.1)\%$ ( $P < 0.05$ )。阴性对照组和空白对照组之间无明显差别。说明慢

病毒介导 RNAi 明显抑制了肿瘤细胞的克隆形成和增殖能力(图 4)。

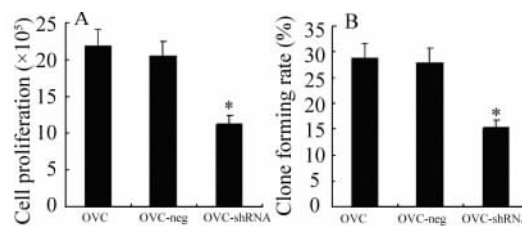


图 4 LV-MSLN-shRNA4 对卵巢癌细胞 OVCAR-3 细胞增殖和克隆形成能力的影响

Fig.4 Analysis of proliferation and clone formation in OVCAR-3 cells infected by recombinant LV-MSLN-shRNA4

A: Cell proliferation; B: Clone formation

\*  $P < 0.05$  vs OVC or OVC-neg

### 3 讨论

卵巢上皮癌的主要转移方式是在腹腔间皮表面种植转移,很少向远处转移,这可能与卵巢癌细胞和间皮细胞间的相互黏附作用有关。MSLN 是一种黏蛋白,它最初以相对分子质量 70 000 的前体形式产生,溶蛋白性裂解导致 32 000 分子量溶解性片段的释放入血或退化,剩余的 40 000 分子量片段通过糖基磷脂酰肌醇锚定于细胞表面<sup>[7]</sup>。通常所指的 MSLN 是锚定于细胞表面的 40 000 片段,仅表达在腹膜腔、胸膜腔和心包腔的间皮细胞,但在恶性胸膜间皮瘤、胰腺癌和卵巢癌等恶性肿瘤中过表达<sup>[8-9]</sup>。可溶性间皮素相关蛋白分子(soluble mesothelin-related protein SMRP)的结构与 MSLN 基本相同,只是羧基端没有锚定于细胞膜,从而释放入血<sup>[7,10]</sup>,因而可以作为恶性胸膜间皮瘤和卵巢癌等恶性肿瘤的标志物<sup>[11-13]</sup>。

Chang 等<sup>[7]</sup>最早发现 MSLN 与细胞黏附有关,转染 MSLN 的卵巢癌细胞较对照组有更强的黏附力。Rump 等<sup>[14]</sup>认为 MSLN 是 CA125 的配子,MSLN 和 CA125 共同参与细胞黏附,并且具有很高的亲和力;体外研究证实 CA125 与 MSLN 共同作用可调控癌细胞与间皮细胞的黏附,有可能两者在卵巢上皮性癌的腹腔转移过程中起关键作用<sup>[15]</sup>。MSLN 的功能还不十分清楚,MSLN 在肿瘤发生和转移中所起的作用值得深入探索。

RNA 干扰是一种由小双链 RNA 有效地作用于同源 RNA 序列,经细胞内核酸酶作用使与双链 RNA 有同源序列的信使 RNA 被降解,从而抑制了基因的表达,现在已经成为探索基因功能和恶性肿

瘤基因治疗的新手段。但是 RNA 干扰序列传统的化学合成直接导入和利用质粒转染内源性合成等方法存在着对细胞和动物毒性大、转染效率低、瞬时转染不能长期沉默基因等缺点。近来,人免疫缺陷病毒(HIV-1)为代表的慢病毒有望成为理想的基因转移载体。慢病毒是假病毒,没有自我复制和传播的能力。研究<sup>[16]</sup>表明,以 HIV-1 为基础构建的这类慢病毒载体具有可感染非分裂细胞,目的基因随病毒整合至靶细胞基因组长期表达、免疫反应小等优点,能同时提供高效的基因转移、长期稳定的基因表达及生物安全性。

本实验设计的 *MSLN* 的 4 个重组慢病毒质粒中,携带干扰序列 4 的质粒 p*MSLN*-shRNA4 的干扰效率较高。预实验发现重组慢病毒质粒载体在没有慢病毒包装之前的脂质体转染效率只有 40% 左右,但在慢病毒包装之后,感染细胞的效率可以增加至 80% 以上,且不需要脂质体包裹。重组慢病毒质粒经过包装后,不仅转导效率大大提高,而且携带的干扰序列可以通过病毒感染整合到细胞基因组中,并随细胞分裂而传代,子代细胞的基因沉默效果更明显。如果用这种细胞筛选出稳转细胞株后进行 *MSLN* 的功能研究,可非常方便地进行长时间的观察和动物实验。

本研究中发现,*MSLN* 蛋白表达被下调后,除了黏附能力下降外(另文发表),细胞的生长特性也发生了变化,细胞的增殖能力下降,形成细胞克隆的能力下降。说明 *MSLN* 除了影响细胞黏附功能外,还能影响细胞的生长。结果提示此病毒载体应用于基因治疗的潜在价值,如果用于活体能减少肿瘤细胞黏附种植于腹膜并影响肿瘤生长,那将对肿瘤治疗非常有利。Bera 等<sup>[17]</sup>用新霉素抗药基因取代 *MSLN* 从而灭活 *MSLN*,敲除 *MSLN* 的小鼠同正常小鼠相比,该小鼠无 *MSLN* mRNA 和蛋白表达,未显示任何解剖学和组织学病理变化,证实 *MSLN* 不是小鼠发育繁殖所必须。*MSLN* 在人体的分布仅限于腹膜、胸膜等间皮细胞,因而本研究制备的 *MSLN* RNA 干扰慢病毒为卵巢癌、恶性间皮瘤、胰腺癌等 *MSLN* 高表达恶性肿瘤的基因治疗创造了条件。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 吴小华,王小玲,张立芳,等. 卵巢上皮性肿瘤组织中间皮素和 CA125 表达及相关性研究[ J ]. 中华妇产科杂志, 2005, 40 ( 10 ): 709-711.
- [ 2 ] Filipula D, Yang K, Basu A, *et al.* Releasable PEGylation of mesothelin targeted immunotoxin SS1P achieves single dosage com-

plete regression of a human carcinoma in mice[ J ]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18( 3 ): 773-784.

- [ 3 ] Hung CF, Calizo R, Tsai YC, *et al.* A DNA vaccine encoding a single-chain trimer of HLA-A2 linked to human mesothelin peptide generates anti-tumor effects against human mesothelin-expressing tumors[ J ]. *Vaccine*, 2007, 25( 1 ): 127-135.
- [ 4 ] Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, *et al.* Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12 ( 2 ): 447-453.
- [ 5 ] Huang CY, Cheng WF, Lee CN, *et al.* Serum mesothelin in epithelial ovarian carcinoma: a new screening marker and prognostic factor[ J ]. *Anticancer Res*, 2006, 26( 6C ): 4721-4728.
- [ 6 ] 陈书成,刘雅坤,吴小华等. 抗人可溶性间皮素相关蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[ J ]. 细胞与分子免疫杂志, 2007, 23( 3 ) 293-296.
- [ 7 ] Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93( 1 ): 136-140.
- [ 8 ] Ordonez NG. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma[ J ]. *Mod Pathol*, 2003, 16( 3 ): 192-197.
- [ 9 ] Hassan R, Kreitman RJ, Pastan I, *et al.* Localization of mesothelin in epithelial ovarian cancer[ J ]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2005, 13( 3 ): 243-247.
- [ 10 ] Shaw DR, Muminova ZE, Strong TV. Mesothelin: a new target for immunotherapy[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10( 15 ): 3937-3942.
- [ 11 ] Di Serio F, Fontana A, Loizzi M, *et al.* Mesothelin family proteins and diagnosis of mesothelioma: analytical evaluation of an automated immunoassay and preliminary clinical results[ J ]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45( 5 ): 634-638.
- [ 12 ] Creaney J, Yeoman D, Naumoff LK, *et al.* Soluble mesothelin in effusions - a useful tool for the diagnosis of malignant mesothelioma [ J ]. *Thorax*, 2007, 62( 7 ): 569-576.
- [ 13 ] Huang CY, Cheng WF, Lee CN, *et al.* Serum mesothelin in epithelial ovarian carcinoma: a new screening marker and prognostic factor[ J ]. *Anticancer Res*, 2006, 26( 6C ): 4721-4728.
- [ 14 ] Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, *et al.* Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion[ J ]. *J Biol Chem*, 2004, 279( 10 ): 9190-9198.
- [ 15 ] Gubbels JA, Belisle J, Onda M, *et al.* Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors[ J ]. *Mol Cancer*, 2006, 5 ( 1 ): 50-58.
- [ 16 ] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[ J ]. *Nat Genet*, 2003, 33( 3 ): 401-406.
- [ 17 ] Bera TK, Pastan I. Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction[ J ]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20( 8 ): 2902-2906.

[ 收稿日期 ] 2008 - 01 - 09

[ 修回日期 ] 2008 - 02 - 20

[ 本文编辑 ] 韩 丹