

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.06.004

· 基础研究 ·

## siRNA 沉默 *EphB2* 表达对胰腺癌 CFPAC-1 细胞增殖和凋亡的影响

欧阳华强, 谢广茹, 潘战宇, 陈冲, 李玲(天津市肿瘤防治重点实验室, 天津医科大学附属肿瘤医院 中西医结合科, 天津 300060)

[摘要] 目的:应用慢病毒介导的 RNA 干扰技术,靶向沉默人胰腺癌 CFPAC-1 细胞中的 *EphB2* 基因的表达,观察 *EphB2* 对 CFPAC-1 细胞增殖和凋亡的影响。方法:构建靶向 *EphB2* 基因的 siRNA 干扰质粒,通过 Lipofectamine™ 2000 将干扰质粒转染进 293T 细胞,筛选出能有效抑制 *EphB2* 蛋白表达的干扰序列。构建含有效序列的慢病毒载体 pLentiGFP-*EphB2*,感染 CFPAC-1 细胞,筛选出稳定干扰 *EphB2* 蛋白表达的 CFPAC-1 细胞系。定量 PCR、Western blotting 检测 CFPAC-1 细胞中 *EphB2* mRNA 和蛋白的表达,CCK8 法和流式细胞术检测 *EphB2* 下调对 CFPAC-1 细胞增殖和凋亡的影响。结果:成功构建了 *EphB2* 慢病毒干扰载体 pLentiGFP-*EphB2*,获得稳定转染 pLentiGFP-*EphB2* 的 CFPAC-1 细胞(CFPAC-1 *EphB2* RNAi)。CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞中 *EphB2* mRNA 和蛋白表达较空载体组显著降低,*EphB2* mRNA 的沉默效率为 63%。与空载体组和未转染组相比,pLentiGFP-*EphB2* 感染显著促进 CFPAC-1 细胞的增殖( $1.89 \pm 0.17$  vs  $1.63 \pm 0.13$ 、 $1.71 \pm 0.22$ ,  $P < 0.05$ ),抑制细胞的凋亡[( $7.02 \pm 1.27$ )% vs ( $13.37 \pm 1.89$ )%、( $15.71 \pm 2.35$ )%,  $P < 0.05$ ]。结论:pLentiGFP-*EphB2* 可有效下调胰腺癌 CFPAC-1 细胞中 *EphB2* 的表达,促进 CFPAC-1 细胞增殖和抑制其凋亡。

[关键词] *EphB2*;RNA 干扰;胰腺癌;CFPAC-1 细胞;增殖;凋亡

[中图分类号] R735.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)06-0605-06

## Effect of siRNA silencing *EphB2* expression on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer CFPAC-1 cells

OUYANG Hua-qiang, XIE Guang-ru, PAN Zhan-yu, CHEN Chong, Li Ling( Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy of Tianjin, Department of Integrative Medicine, Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China )

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *EphB2* on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer CFPAC-1 cells by target-silencing *EphB2* expression using lentivirus-mediated RNA interference technique. **Methods:** The recombinant interfering plasmid targeting *EphB2* gene was constructed and transfected into 293T cells by Lipofectamine™ 2000, and the most effective interfering sequence was screened from inhibiting expression of *EphB2* protein. The effective interference sequence was cloned into the pLentiGFP vector to construct lentivirus pLentiGFP-*EphB2*, and then transfected into CFPAC-1 cells. Stable cell line with down-regulated expression of *EphB2* protein was obtained. Real-time PCR and Western blotting analysis were performed to determine the expression of *EphB2* at mRNA and protein levels. Moreover, the effect of downregulation of *EphB2* on proliferation and apoptosis of CFPAC-1 cells was detected by CCK8 and flow cytometry assay, respectively. **Results:** Recombinant lentivirus pLentiGFP-*EphB2* was successfully constructed and stably transfected CFPAC-1 cells (CFPAC-1 *EphB2* RNAi cells) were obtained. *EphB2* expression at mRNA and protein levels in CFPAC-1 *EphB2* RNAi cells were significantly lower than those at blank group, with silencing rate of *EphB2* was 63% in the pLentiGFP-*EphB2* group. In addition, the proliferation of CFPAC-1 *EphB2* RNAi cells was increased more than those of the other two groups ( $1.89 \pm 0.17$  vs  $1.63 \pm 0.13$ ,  $1.71 \pm 0.22$ ,  $P < 0.05$ ) and apoptosis was decreased

[基金项目] 天津市自然科学基金项目资助(No. 09JCZDJC21800)。Project supported by the Natural Science Foundation of Tianjin (No. 09JCZDJC21800)

[作者简介] 欧阳华强(1982-),男,湖南省岳阳市人,博士,讲师,主要从事胰腺肿瘤的临床与基础研究。E-mail: 042106341@fudan.edu.cn

[通信作者] 谢广茹(XIE Guang-ru, corresponding author),E-mail: xieguangru@126.com

[网络出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20111111.1119.007.html

[ ( 7.02 ± 0.01 )% vs ( 13.37 ± 0.02 )% , ( 15.71 ± 0.02 )% , P < 0.05 ). **Conclusion:** pLentiGFP-EphB2 can effectively silence EphB2 expression in pancreatic cancer CFPAC-1 cells and then promote the proliferation and inhibit cell apoptosis.

[ **Key words** ] *EphB2*; RNA interference; pancreatic cancer; CFPAC-1 cell; proliferation; apoptosis

[ Chin J Cancer Biother, 2011, 18(6): 605-610 ]

*Eph* 基因是酪氨酸激酶受体家族中最大的一个亚族<sup>[1]</sup>, 主要分为 *EphA* 和 *EphB* 两大亚类, *EphB2* 是其中之一, 为 Kiyokawa 等<sup>[2]</sup> 从构建的胃癌组织 cDNA 文库中筛选出来的新基因产物。 *EphB2* 基因在许多人类恶性肿瘤中呈异常表达, 提示它们可能参与肿瘤的形成<sup>[3,4]</sup>。 在结直肠癌中, *EphB2* 控制着两个主要信号通路, 其中一个促进正常上皮细胞增殖, 另一个则抑制癌细胞形成, 药物通过选择性抑制第一个信号通路而不影响另一个保护通路, 或可阻止肿瘤进展。 因此, *EphB2* 的表达水平被认为是结直肠癌重要的预后因素<sup>[5,6]</sup>。 研究<sup>[7-9]</sup> 表明, *EphB2* 在胰腺癌组织或细胞系中异常表达, 但其作用机制尚不清楚。 本研究利用慢病毒载体系统介导 *EphB2* siRNA 靶向沉默该基因, 并观察 *EphB2* 下调对人胰腺癌细胞系 CFPAC-1 增殖和凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和细胞株

人胰腺癌细胞 CFPAC-1<sup>[10]</sup> 及 293T 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库, 人胰腺癌 SW1990<sup>[11]</sup>、BxPC-3<sup>[12]</sup>、PANC-1<sup>[13]</sup> 细胞均购自 ATCC, 人胰腺癌 PC-3<sup>[14]</sup> 细胞购自中国医学科学院, 人胰腺癌高肝转移细胞系 SW1990HM<sup>[7]</sup> 购自复旦大学附属肿瘤医院中心实验室。 参照 ATCC 标准<sup>[10]</sup>, CFPAC-1 细胞置于含 10% 胎牛血清、丙酮酸钠、HEPES 的 IMDM 培养液中; 293T 细胞置于含 10% 胎牛血清、丙酮酸钠、HEPES 的 DMEM 培养液中。 所有细胞均在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 每 2 ~ 3 d 更换培养液 1 次。

真核表达载体 pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFPmiR、转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 及载体构建试剂盒 BLOCK-IT<sup>TM</sup> 均购自 Invitrogen 公司。 限制性内切酶购自 NEB 公司, *EphB2* 一抗( sc-1763 ) 购自 Santa Cruz 公司, HRP 标记的羊抗兔抗体 IgG 购自 Amersham 公司, 常用 DNA Marker 购自北京时代天为公司, 预染蛋白 Marker 购自 Rainbow 公司, 医用 Kodak X-感光片购自上海西巴斯技术公司, Western blotting 试剂盒购自 Amersco 公司。 连接试剂盒购自 Epicentre 公司, 小量质粒抽提试剂盒购自 Axygen 公司, 凝胶

回收试剂盒购自 Qiagen 公司, 制备感受态试剂盒购自 BD Biosciences 公司, 总 RNA 抽提试剂盒购自 Generay 公司, Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, ECL 试剂盒购自 Pierce 公司, CCK8 试剂盒购自 Dojindo 公司。 引物由上海生工公司合成。

### 1.2 针对 *EphB2* 基因的 RNAi 载体构建

从 GeneBank 中查询 *EphB2* 基因( NM\_017449.3 )的 mRNA 序列, 采用 Invitrogen 提供的在线 RNA 干扰位点设计软件选择 4 个不同干扰位点, 设计 4 条 siRNA 序列, 分别为 siRNA-1: TCGCCTCTGTGAA-CATCACCA; siRNA-2: CATGACCAACCAGGATGTA-AT; siRNA-3: CAAGTTCGGCCAAATTGTCAA; siRNA-4: ATGGCGCCATCTTCCAGGAAA。 进而合成 4 对互补的 siRNA 寡核苷酸链( oligo ), 将 4 对 oligo 退火成双链, 然后用载体构建试剂盒 BLOCK-iT<sup>TM</sup> 进行重组克隆, 将 4 对双链的 siRNA oligo 分别插入到 siRNA 表达载体 pcDNA<sup>TM</sup>6.2-GW/EmGFPmiR 中, 构建 4 个 siRNA 表达质粒, 并转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。 扩增并瞬时转染干扰质粒至 293T 细胞, 运用定量 PCR 和 Western blotting 检测各干扰质粒在 mRNA 和蛋白水平对目的蛋白的抑制, 确定抑制效果最佳的干扰质粒, 进一步构建慢病毒载体。

### 1.3 慢病毒表达载体 pLentiGFP-EphB2 的构建

使用 Gateway 重组技术将筛选到最有效的 siRNA 表达载体与 pDONR221 载体进行 BP 重组反应, 以获得含干扰序列的入门载体。 然后将该入门载体和慢病毒表达的目的载体 pLenti6/V5-DEST 进行 LR 重组反应, 获得含干扰序列的慢病毒表达载体 pLentiGFP-EphB2。

### 1.4 慢病毒 pLentiGFP-EphB2 的包装和滴度测定

取细胞状态良好、处于对数生长期的 293T 细胞, 细胞计数后, 每个直径 10 cm 的细胞培养皿接种 3 × 10<sup>6</sup> 个 293T 细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育过夜。 将 9  $\mu$ g Packaging Mix 和 3  $\mu$ g 上述重组慢病毒质粒加入 1.5 ml Opti-MEM( 37 °C 预热 ) 中, 然后加入 36  $\mu$ l Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 共转染 293T 细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养, 72 h 后收集病毒, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤, -80 °C 冻存。 取 6 孔培养板将 CFPAC-1 细胞培养至 30% ~ 50% 融合密度时, 分别加入

$1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6}$  不同浓度梯度的病毒溶液,同时加入 polybrene 至终质量浓度为  $6 \mu\text{g/ml}$ ,轻摇使混匀,37 °C 过夜培养。第 3 天,去除含慢病毒的培养基,加入 2 ml 完全培养基;第 4 天,在荧光显微镜下观察各孔中 GFP 表达量,计算病毒滴度。病毒滴度 (pfu/ml) = 每孔细胞数  $\times$  稀释倍数  $\times 10$ /加入的病毒溶液量 (ml)。同样按照上述方法制备含空载体的阴性病毒液。

### 1.5 CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞系的建立与鉴定

取 6 孔培养板将 CFPAC-1 细胞培养达 80% 融合密度,将病毒液以 MOI = 1 加入到细胞培养基中,以 polybrene 调整至终质量浓度为  $6 \mu\text{g/ml}$ ,并在培养液中加入杀稻瘟素 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) 进行筛选,连续筛选 14 d 后,建立 CFPAC-1 *EphB2* RNAi 稳定细胞系。采用 RT-PCR 及 Western blotting 法分别检测 *EphB2* 在 mRNA 及蛋白水平的抑制效果。将处于对数生长期的 CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞及其亲代细胞,TRIzol-离心柱法抽提总 RNA,紫外分光光度计定量,取总 RNA 作为反转录模板,反转录体系按试剂盒要求进行。设计 *EphB2* 引物如下:Up 5'-CAGG-TACATATCACGCCGACAG -3', Down 5'-GTAAACAAACCCAGATGCAGGA -3',扩增片段为 149 bp。以 *GAPDH* 作为内参照,其引物序列为:Up 5'-GG-GAGCCAAA AGGTCATCATCTC-3',Down 5'-CCATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC-3',扩增片段 353 bp。扩增条件:95 °C 5 min,继以 95 °C 10 s,60 °C 30 s,扩增 40 个循环。反应结束后采用双标准曲线法进行对比分析,每个实验组重复 3 次。同样取处于对数生长期的 CFPAC-1 *EphB2* RNAi 及其亲代细胞,加入蛋白裂解液裂解细胞后,按照试剂盒要求抽提总蛋白,制作浓缩胶及分离胶后,取不同组别的等量蛋白样品进行电泳,然后依次转膜、封闭、洗涤与显影(其中一抗的稀释度为 1:1 000,二抗的稀释度为 1:2 000)。显影后进行扫描、拍照,分析实验结果。

### 1.6 CCK8 法检测 *EphB2* RNAi 对细胞增殖的影响

于 96 孔板中按每孔  $0.5 \times 10^4/\text{ml}$  接种 CFPAC-1 细胞,分为 CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞组、空质粒对照组 CFPAC-1 RNAi 及未转染 CFPAC-1 细胞组,分别于第 1、2、3、4、5 天加入  $10 \mu\text{l}$ /孔的 CCK8,37 °C 孵育 1 h,在 450 nm 波长处测定各孔的光密度 *D* 值,连续检测 5 d,以时间为横坐标, $D_{450}$  为纵坐标,绘制细胞增殖曲线。每样品设 5 个平行孔,实验重复 3 次。

### 1.7 *EphB2* RNAi 对 CFPAC-1 细胞周期和细胞凋亡的影响

CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞、CFPAC-1 RNAi 细胞及未转染 CFPAC-1 细胞首先在无血清培养基的条件下培养 48 h,以使细胞大部分阻滞于  $G_0/G_1$ ;然后给以含有 10% FBS 的培养基继续培养 24 h;培养结束后,以预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,并以 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液;将其逐滴加入无水乙醇中,使其达到 75%;冰上固定 60 min,即刻流式细胞术检测。实验重复 3 次。

### 1.8 统计学处理

定量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 STATA 10.0 进行 *t* 检验分析, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人胰腺癌细胞系 CFPAC-1 高表达 *EphB2*

RT-PCR 与 Western blotting 结果(图 1)提示,与 SW1990、BxPC-3、PC-3、PANC-1、SW1990HM 等 5 株胰腺癌细胞系相比较,人胰腺癌细胞系 CFPAC-1 高表达 *EphB2*,该蛋白在其余 5 株胰腺癌细胞系中几乎不表达。

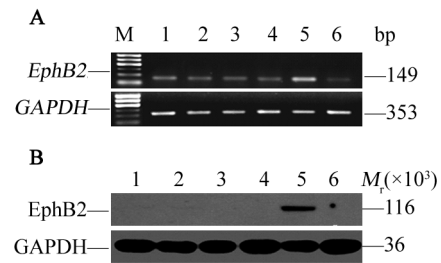


图 1 RT-PCR (A) 和 Western blotting (B) 检测 *EphB2* 在 6 株人胰腺癌细胞系中的表达

Fig. 1 Expression of *EphB2* in 6 pancreatic cancer cell lines as detected by RT-PCR (A) and Western blotting (B) assay

1: SW1990; 2: BxPC-3; 3: PC-3; 4: PANC-1; 5: CFPAC-1; 6: SW1990HM; M: Marker

### 2.2 慢病毒载体 pLentiGFP-*EphB2* 的包装、感染及稳定转染细胞系的鉴定

慢病毒表达载体 pLentiGFP-*EphB2* 转染 CFPAC-1 细胞 48 h 后,荧光显微镜下可观察到细胞中有较强的绿色荧光(图 2)。感染后第 5 天在荧光显微镜下观察,在  $1 \times 10^{-5}$  稀释度细胞孔中有 28 个荧光细胞,在  $1 \times 10^{-4}$  稀释度细胞孔中有 276 个荧光细胞。经测定,病毒的滴度为  $2.8 \times 10^6$  pfu/ml。荧光显微镜下观察计数感染阳性细胞达  $(72.4 \pm 6.6)\%$ 。

Western blotting 检测显示, 感染后 CFPAC-1 细胞 EphB2 蛋白表达明显下调, 在未转染组 CFPAC-1 细胞和感染空病毒载体的细胞中, EphB2 表达较高; 上述结果证明, 慢病毒成功感染 CFPAC-1 细胞。采用杀稻瘟素 (5 μg/ml) 加入感染后的 CFPAC-1 细胞中连续筛选 14 d 后, 未感染慢病毒的细胞均被杀灭, 获得稳定沉默 EphB2 的 CFPAC-1 EphB2 RNAi 细胞。荧光定量 PCR 提示, CFPAC-1 EphB2 RNAi 细胞中 EphB2 表达显著下调, 仅为 CFPAC-1 RNAi 细胞的 37% (图 3)。

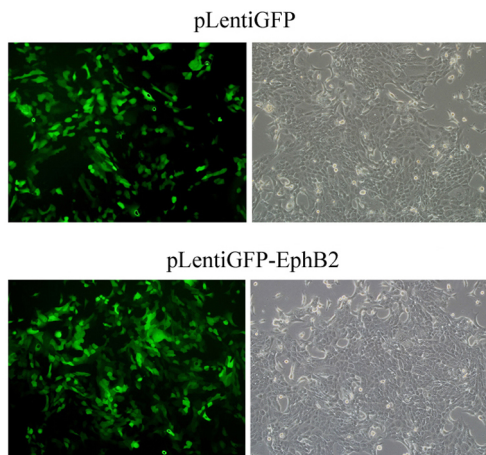


图 2 慢病毒 pLentiGFP-EphB2 感染 CFPAC-1 细胞 (×200)  
Fig. 2 CFPAC-1 cells infected by lentivirus pLentiGFP-EphB2 (×200)

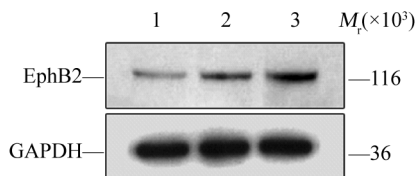


图 3 Western blotting 检测慢病毒 pLentiGFP-EphB2 对 EphB2 表达的抑制效果  
Fig. 3 Inhibitory effect of pLentiGFP-EphB2 on expression of EphB2 protein assessed by Western blotting  
1: CFPAC-1 EphB2 RNAi cells; 2: CFPAC-1 RNAi cells; 3: CFPAC-1 cells

2.3 pLentiGFP-EphB2 感染对 CFPAC-1 细胞增殖的影响

CCK8 实验结果 (图 4) 提示, pLentiGFP-EphB2 感染促进 CFPAC-1 EphB2 RNAi 细胞增殖, 与 CFPAC-1 RNAi 及亲代 CFPAC-1 细胞相比差异均有统计学意义 (1.89 ± 0.17 vs 1.63 ± 0.13, 1.71 ±

0.22; P < 0.05), 而 CFPAC-1 RNAi 与 CFPAC-1 细胞间差异无统计学意义 (1.63 ± 0.13 vs 1.71 ± 0.22, P > 0.05)。可见 EphB2 表达下调能显著促进 CFPAC-1 细胞的增殖。

2.4 pLentiGFP-EphB2 感染对 CFPAC-1 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果提示, 在用无血清培养基培养 CFPAC-1 细胞 48 h 后, 换用完全培养基继续培养 24 h, CFPAC-1 EphB2 RNAi 细胞和 CFPAC-1 RNAi 细胞均未进入 G<sub>2</sub>/M 期, 仅亲代 CFPAC-1 细胞有很少部分进入该期。就各组细胞凋亡率比较, CFPAC-1 与 CFPAC-1 RNAi 细胞凋亡率接近, 而 CFPAC-1 EphB2 RNAi 细胞凋亡率显著下降 (P < 0.05)。见表 1、图 5。

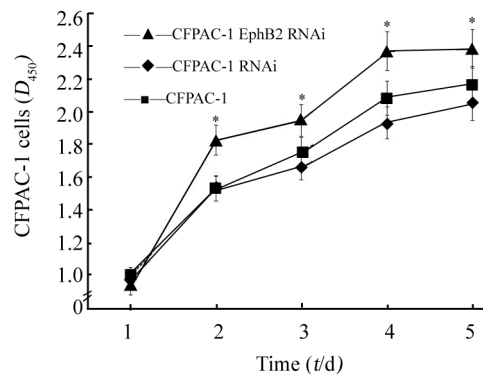


图 4 pLentiGFP-EphB2 促进 CFPAC-1 细胞的增殖  
Fig. 4 pLentiGFP-EphB2 promoted proliferation of CFPAC-1 cells  
\* P < 0.05 vs CFPAC-1 RNAi or CFPAC-1

表 1 pLentiGFP-EphB2 感染对 CFPAC-1 细胞周期的影响 (%)  
Tab. 1 Effect of pLentiGFP-EphB2 on cell cycle of CFPAC-1 cells (%)

Group	Cell cycle			Apoptosis rate
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
CFPAC-1	41.31	58.39	0.3	15.71
CFPAC-1 RNAi	40.40	59.60	0	13.37
CFPAC-1 EphB2 RNAi	39.15	60.85	0	7.02*

\* P < 0.05 vs CFPAC-1

3 讨论

Eph 基因由 Hira 等<sup>[1]</sup>首先报道。迄今已确认的 Eph 家族成员至少包括 14 个受体和 8 个配体。

Eph 亚族明显的结构特点是它们的胞外配体结合区含一个免疫球蛋白样重复序列,一个半胱氨酸富含区(有 20 个半胱氨酸残基),后面有两个 FN III(纤黏连蛋白 III 型)重复区,在胞质酪氨酸激酶区无激酶插入的序列阻断。*EphB2* 为该亚族中的成员之

一。*EphB2* 基因主要参与氨基酸磷酸化、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶信号转导途径、神经系统发育及肿瘤的进展。目前已在多种肿瘤中发现该基因的异常表达,*EphB2* 与肿瘤之间的关系也正逐步被阐明。

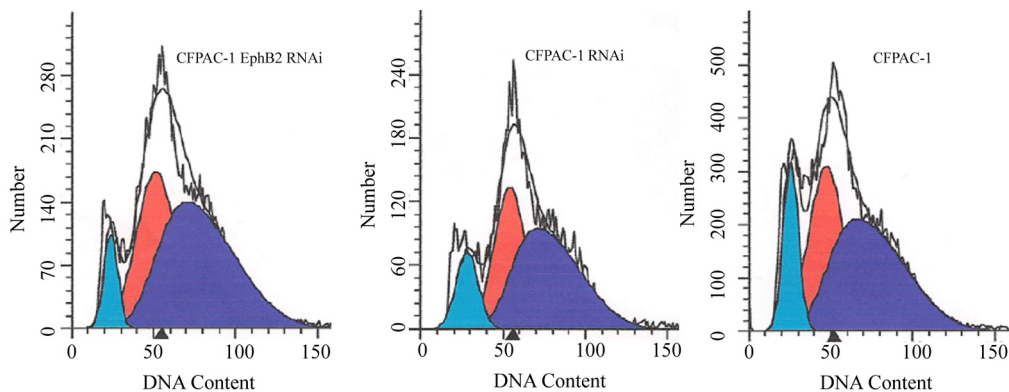


图 5 流式细胞术检测 pLentiGFP-EphB2 感染对 CFPAC-1 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of pLentiGFP-EphB2 on apoptosis of CFPAC-1 cells as detected by flow cytometry

*EphB2* 在某些正常上皮组织或肿瘤中有较高表达。Lugli 等<sup>[8]</sup>用基于组织芯片的免疫组化法检测了 76 种不同的正常组织、来源于 138 种不同肿瘤类型的 4 000 多个组织标本,发现结直肠癌及其正常上皮组织中 *EphB2* 阳性表达最高。Battle 等<sup>[15]</sup>检测了 *EphB2* 受体在正常肠隐窝干细胞、肠腺瘤、肠原位癌、肠癌淋巴结转移和肝转移癌细胞中的表达,发现其表达依次呈递减趋势。Oshima 等<sup>[16]</sup>指出,*EphB2* 低表达与结肠癌肝转移密切相关,可能是结肠癌伴肝转移患者的重要预后因素。另有作者<sup>[17]</sup>提出,*EphB2* 是结肠癌干细胞的标记基因,且能预测肿瘤复发。基于 *EphB2* 在结肠癌发生发展过程中的作用,其被许多学者定性为抑癌基因。

然而,*EphB2* 在其他肿瘤中的研究却得出了截然不同甚至完全相反的结论。Nakada 等<sup>[18-19]</sup>通过构建 *EphB2* 高表达质粒及酪氨酸激酶活性的 *EphB2* 质粒,并将其转染至人星形胶质细胞瘤细胞系 U251 中,证实高表达的 *EphB2* 能发生受体磷酸化,并通过下游的调控基因 *R-Ras* 降低神经胶质瘤细胞间的黏附性,增加其侵袭力,进而提示 *EphB2*/*R-Ras* 信号通路可能作为潜在的治疗靶点。*EphB2* 在前列腺癌、胃癌、乳腺癌、小细胞肺癌、胰腺癌中的表达也见于相关文献报道<sup>[20-22]</sup>,但具体作用机制尚不清楚。约 26% 的胰腺癌及 6% 的肺腺癌中检出 *EphB2*<sup>[8]</sup>,但相应正常组织中却无 *EphB2* 表达,*EphB2* 在此类肿瘤中的作用机制值得进一步探讨。

本研究首先对 6 株人胰腺癌细胞系进行了 *EphB2* 蛋白的检测,结果发现仅 CFPAC-1 细胞系高表达该蛋白。于是采用慢病毒介导的 RNA 干扰技术,用含 *EphB2* 有效干扰序列的病毒感染 CAPAC-1 细胞,得到 *EphB2* 低表达的人胰腺癌 CFPAC-1 细胞 (CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞),实现 RNA 干扰。本研究中病毒感染效率接近 90%,经荧光定量 PCR 和 Western blotting 鉴定,CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞对目的基因的最终干扰效率超过了 60%,有利于进一步开展 *EphB2* 功能的研究。

本研究进一步观察了 *EphB2* 对细胞增殖与凋亡的影响。结果提示,CFPAC-1 *EphB2* RNAi 细胞的增殖更迅速,而凋亡率显著下降,与 CFPAC-1 与 CFPAC-1 RNAi 细胞相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。上述结果表明,*EphB2* 表达下调能促进 CFPAC-1 细胞的增殖,并抑制其凋亡,提示 *EphB2* 可能具有抑制胰腺癌细胞生长,并诱导其发生凋亡的作用,其具体作用机制值得深入研究。

总之,本实验成功构建了靶向干扰 *EphB2* 表达的慢病毒载体,进而筛选和建立了慢病毒 CFPAC-1 *EphB2* RNAi 稳定感染细胞系,并初步证明了 *EphB2* 能显著抑制人胰腺癌细胞增殖,促进其发生凋亡,为深入阐明 *EphB2* 在人胰腺癌细胞系中的作用机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Hirai H, Maru Y, Hagiwara K, et al. A novel putative tyrosine

- kinase receptor encoded by the eph gene [ J ]. Science, 1987, 238( 4834 ): 1717-1720.
- [ 2 ] Kiyokawa E, Takai S. Overexpression of ERK, an Eph family receptor protein tyrosine kinase, in various human tumors [ J ]. Cancer Res, 1994, 54( 14 ): 3645-3650.
- [ 3 ] Hafner C, Schmitz G, Meyer S, et al. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers [ J ]. Clin Chem, 2004, 50( 3 ): 490-499.
- [ 4 ] Kumar SR, Seehnet JS, Ley EJ, et al. Preferential induction of EphB4 over EphB2 and its implication in colorectal cancer progression [ J ]. Cancer Res, 2009, 69( 9 ): 3736-3745.
- [ 5 ] Jubb AM, Zhong F, Bheddah S, et al. EphB2 is a prognostic factor in colorectal cancer [ J ]. Clin Cancer Res, 2005, 11( 14 ): 5181-5187.
- [ 6 ] Genander M, Halford MM, Xu NJ, et al. Dissociation of EphB2 signaling pathways mediating progenitor cell proliferation and tumor suppression [ J ]. Cell, 2009, 139( 4 ): 679-692.
- [ 7 ] Shi WD, Meng ZQ, Chen Z, et al. Identification of liver metastasis-related genes in a novel human pancreatic carcinoma cell model by microarray analysis [ J ]. Cancer Lett, 2009, 283( 1 ): 84-91.
- [ 8 ] Lugli A, Spichtin H, Maurer R, et al. EphB2 expression across 138 human tumor types in a tissue microarray: High levels of expression in gastrointestinal cancers [ J ]. Clin Cancer Res, 2005, 11( 18 ): 6450-6458.
- [ 9 ] 田海军, 马凯, 张绍军. EphB2 蛋白在胰腺癌组织中的表达及其临床意义 [ J ]. 沈阳医学院学报, 2009, 11( 3 ): 159-161.
- [ 10 ] Schoumacher RA, Ram J, Iannuzzi MC, et al. A cystic fibrosis pancreatic adenocarcinoma cell line [ J ]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87( 10 ): 4012-4016.
- [ 11 ] Kyriazis AP, McCombs WB 3rd, Sandberg AA, et al. Establishment and characterization of human pancreatic adenocarcinoma cell line SW-1990 in tissue culture and the nude mouse [ J ]. Cancer Res, 1983, 43( 9 ): 4393-4401.
- [ 12 ] Chambers JA, Harris A. Expression of the cystic fibrosis gene and the major pancreatic mucin gene, MUC1, in human ductal epithelial cells [ J ]. J Cell Sci, 1993, 105( Pt 2 ): 417-422.
- [ 13 ] Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, et al. Establishment of a continuous tumor-cell line ( panc-1 ) from a human carcinoma of the exocrine pancreas [ J ]. Int J Cancer, 1975, 15( 5 ): 741-747.
- [ 14 ] 崔全才, 陈杰, 顾长芳, 等. 一株人胰腺癌细胞系的建立及其特性 [ J ]. 基础医学与临床, 1992, 12( 6 ): 50-52.
- [ 15 ] Clevers H, Battle E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer [ J ]. Cancer Res, 2006, 66( 1 ): 2-5.
- [ 16 ] Oshima T, Akaike M, Yoshihara K, et al. Overexpression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer [ J ]. Int J Oncol, 2008, 33( 3 ): 573-577.
- [ 17 ] Zhang X. EphB2: A signature of colorectal cancer stem cells to predict relapse [ J ]. Protein Cell, 2011, 2( 5 ): 347-348.
- [ 18 ] Nakada M, Niska JA, Tran NL, et al. EphB2/R-Ras signaling regulates glioma cell adhesion, growth, and invasion [ J ]. Am J Pathol, 2005, 167( 2 ): 565-576.
- [ 19 ] Nakada M, Niska JA, Miyamori H, et al. The phosphorylation of EphB2 receptor regulates migration and invasion of human glioma cells [ J ]. Cancer Res, 2004, 64( 9 ): 3179-3185.
- [ 20 ] Robbins CM, Hooker S, Kittles RA, et al. EphB2 SNPs and sporadic prostate cancer risk in African American men [ J ]. PLoS One, 2011, 6( 5 ): e19494.
- [ 21 ] Fox BP, Kandpal RP. A paradigm shift in EPH receptor interaction: Biological relevance of EPHB6 interaction with EPHA2 and EPHB2 in breast carcinoma cell lines [ J ]. Cancer Genomics Proteomics, 2011, 8( 4 ): 185-193.
- [ 22 ] Yu G, Gao Y, Ni C, et al. Reduced expression of EphB2 is significantly associated with nodal metastasis in Chinese patients with gastric cancer [ J ]. J Cancer Res Clin Oncol, 2011, 137( 1 ): 73-80.
- [ 收稿日期 ] 2011-08-25 [ 修回日期 ] 2011-10-20  
[ 本文编辑 ] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示( pH 用正体除外),例如  $m$ (质量)、 $t$ (时间)、 $c$ (浓度)、 $V$ (体积)、 $p$ (压力)、 $F$ (力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如 kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的浓度或质量浓度时,一般使用 L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成 mg/kg/d 的形式,应写成 mg/(kg·d)或  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号  $\text{Å}$ (埃)已不用,应写作 0.1 nm;时间单位“小时”符号为 h(不是 hr)、“秒”符号为 s(不是 sec);转速单位符号为 r/min(不是 rpm);量浓度单位符号为 mol/L(不是 M、N,也不是 mol/mm<sup>3</sup>);力的单位“牛顿”符号为 N(不是 dyn(达因)、kgf(千克力),换算 1 dyn = 10<sup>-5</sup> N);热量单位“焦耳”符号为 J(不是 cal(卡)、kcal(千卡),换算 1 cal = 4.187 J);放射性活度单位符号为 Bq(不是 Ci(居里),换算 1 Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup> Bq)。

(本刊编辑部)