

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.05.007

RNAi 沉默 *RON* 基因对人结肠癌 HT-29 细胞侵袭和耐药性的抑制作用

毛联钢¹, 李克强¹, 卓文莹², 戴晓宇², 余永明², 冯伟云¹, 乐东海¹ (1. 宁波市第二医院 肿瘤分子生物学实验室, 浙江宁波 315010; 2. 宁波市第二医院 肛肠科, 浙江宁波 315010)

[摘要] **目的:**探讨 RNAi 沉默酪氨酸激酶受体 *RON* (recepteur d'origine nantais) 基因对人结肠癌 HT-29 细胞侵袭和对抗肿瘤药物敏感性的影响。**方法:**构建 *RON* 基因的 RNAi 慢病毒载体 Lv-*RON*-siRNA。Real-time PCR 和 Western blotting 检测 *RON* 基因的沉默效率及 *RON* 蛋白表达水平; Transwell 侵袭实验和 ATP-TCA (ATP-tumor chemosensitivity assay) 检测 *RON* 基因对 HT-29 细胞侵袭和对药物敏感性的影响。**结果:**慢病毒载体 Lv-*RON*-siRNA 感染 HT-29 细胞对 *RON* 基因的沉默效果达到 70%。Lv-*RON*-siRNA 感染后, HT-29 细胞侵袭力较对照组明显降低 (0.97 ± 0.072 vs 1.29 ± 0.076 , $P < 0.05$)。Lv-*RON*-siRNA 感染后, HT-29 细胞对 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 的 IC_{90} 值和 IC_{50} 值分别为 (14.28 ± 1.34)、(8.93 ± 1.20) $\mu\text{g/ml}$, 顺铂 (cisplatin, DDP) 的 IC_{90} 值和 IC_{50} 值分别为 (1.91 ± 0.22)、(0.64 ± 0.07) $\mu\text{g/ml}$, 均明显低于对照组 ($P < 0.01$)。**结论:**沉默 *RON* 基因表达能抑制 HT-29 细胞的侵袭力, 提高细胞对 5-FU 和 DDP 的敏感性。

[关键词] *RON* 基因; HT-29 细胞; RNAi; 侵袭; 耐药

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)05-0502-06

Silencing *RON* gene expression via RNA interference inhibits human colon carcinoma HT-29 cell invasion and drug resistance

MAO Lian-gang¹, LI Ke-qiang¹, ZHUO Wen-ying², DAI Xiao-yu², YU Yong-ming², FENG Wei-yun¹, LE Dong-hai¹ (1. Key Laboratory of Tumor Molecular Biology, Ningbo No. 2 Hospital, Ningbo 315010, Zhejiang, China; 2. Department of Anus & Intestine Surgery, Ningbo No. 2 Hospital, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of receptor tyrosine kinase recepteur d'origine nantais (*RON*) gene silencing on the invasion and anticancer drug resistance of human colon carcinoma HT-29 cells. **Methods:** RNAi lentiviral vector targeting *RON* gene (Lv-*RON*-siRNA) was constructed. The efficiency of Lv-*RON*-siRNA on *RON* gene silence and *RON* protein level in HT-29 cells were detected by real-time PCR and Western blotting, respectively. The effects of Lv-*RON*-siRNA on invasion and drug resistance of HT-29 cells were observed by Transwell assay and ATP-TCA (ATP-tumor chemosensitivity assay). **Results:** The silencing effect of Lv-*RON*-siRNA on *RON* gene expression in HT-29 cells reached 70%. Compared with the control group, the invasion of HT-29 cells in Lv-*RON*-siRNA infection group was decreased (0.97 ± 0.07 vs 1.29 ± 0.08 , $P < 0.05$). The values of IC_{90} and IC_{50} of HT-29 cells infected with Lv-*RON*-siRNA to 5-FU were (14.28 ± 1.34) $\mu\text{g/ml}$ and (8.93 ± 1.2) $\mu\text{g/ml}$, respectively. The IC_{90} and IC_{50} of HT-29 cells infected with Lv-*RON*-siRNA to cisplatin (DDP) were (1.91 ± 0.22) $\mu\text{g/ml}$ and (0.64 ± 0.07) $\mu\text{g/ml}$, respectively, and were significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Silencing *RON* gene expression can decrease the invasion ability of HT-29 cells and increase the sensitivity of HT-29 cells to 5-FU and DDP.

[Key words] *RON* gene; HT-29 cell; RNAi; invasion; drug resistance

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(5): 502-507]

[基金项目] 宁波市自然科学基金资助项目 (No. 2008A610082)。Project supported by the Natural Science Foundation of Ningbo City (No. 2008A610082)。

[作者简介] 毛联钢 (1981 -), 男, 浙江省宁波市人, 主管检验师, 主要从事肿瘤分子生物学研究。E-mail: kiven_118@163.com

[通信作者] 李克强 (LI Ke-qiang, corresponding author), E-mail: chasejxmc@163.com

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,居全球恶性肿瘤发病率第3位,其发病率在我国呈逐年上升趋势,是癌症死亡原因中仅次于肺癌的第二大原因^[1-2]。在我国,结肠癌的治愈率较低,其主要原因是结肠癌的化疗耐药和转移复发。在结肠癌的整个病程中,约有40%的结肠癌发生肝转移,其中同时性肝转移为15%~25%,异时性肝转移为20%。

肝转移是结肠癌主要的死亡原因之一^[3-4]。另外,临床发现,越来越多的肿瘤对抗肿瘤药物出现不同程度的耐药,肿瘤细胞的耐药性成为临床抗肿瘤治疗的重大阻力。因而对结肠癌转移和耐药的分子机制的研究,有利于寻找干预、阻断结肠癌转移的环节,并对临床抗肿瘤药物的选择提供理论依据。酪氨酸激酶受体 *RON* (recepteur d'origine nantais) 蛋白是受体型酪氨酸激酶 (receptor tyrosine kinase, RTK) 家族中 *c-Met* 家族的一员,其生物学效应主要是通过与其配体巨噬细胞刺激蛋白 (macrophage stimulating protein, MSP) 结合而活化。*RON* 通过许多细胞内信号级联反应,导致细胞增殖、移动和基质侵袭^[5]。*RON* 在包括结肠癌在内的许多人类肿瘤中过表达,并与结肠癌进展密切相关^[6-8]。临床研究^[9]表明,*RON* 过表达与肿瘤患者预后不良和转移有关。本研究通过构建靶向 *RON* 基因的 RNAi 慢病毒载体,探讨 RNAi 沉默 *RON* 基因对人 HT-29 结肠癌细胞侵袭力和对肿瘤药物敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人 HT-29 结肠癌细胞株购于中国科学院上海细胞所,细胞培养基、胎牛血清为 Gibco 公司产品。慢病毒实验系统购于上海吉凯公司,重组 *RON* 基因 RNA 干扰慢病毒由上海吉凯公司制备。胰蛋白酶、Lipofectmaine™ 2000 试剂为 Invitrogen 公司产品,SYBR® Premix Ex Taq™ II 及 RNA 逆转录试剂盒均购于 TaKaRa 公司,8.0 μm Transwell 培养板、细胞培养皿等耗材均购于 Corning 公司,Matrigel 购于 BD 公司,ATP-TCA 试剂盒及其相关试剂购自北京金晶生物医药技术有限公司。化疗药物均为本院临床使用的药物,药物均用 0.9% 的氯化钠溶液配制成储存液,-20℃保存,药物配制浓度参考各药物说明书上的血浆峰值浓度 (plasma peak concentration, PPC)。

1.2 Lv-*RON*-siRNA 慢病毒的制备

根据 GeneBank 报道的人 *RON* 基因信息,查找其 mRNA 序列 (NM_002447.2) 信息,使用在线 siR-

NA 序列设计软件 (参照 Ambion 公司的 siRNA Target Finder),按照 siRNA 序列设计原则,设计 siRNA 序列:5'-GGTCAAGGATGTGCTGATT-3',并合成含干扰序列的双链 DNA Oligo F: 5'-CCGGGAGGTCAAGGATGTGCTGATTTTCAAGAGAAATCAGCACAT CCTTGACCTCTTTTTG-3'; R: 5'-AATTCAAAAAGAGGTCAAGGATGTGCTGATTTCTCTTGAATAATCAGCACAT CCTTGACCTC-3'。合成的 shRNA-Oligo DNA 两端分别含 Age I、EcoR I 酶切位点黏端,与酶切后线性化的 pGCSIL-GFP 载体连接。将连接好的产物转入 DH5α 感受态细胞,37℃培养过夜。从平板上挑取 3 个单菌落,37℃过夜培养,提取质粒 DNA。使用 PCR 的方法进行阳性克隆鉴定,PCR 引物使用载体多克隆位点两端引物 F:5'-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3'; R:5'-GTAATACGGTTATCCACGCG-3'。测序鉴定阳性的克隆即为构建成功的 *RON*-RNAi 慢病毒载体。

使用 Qiagen 公司的去内毒素质粒抽提试剂盒制备编码慢病毒颗粒的重组病毒质粒及其两种辅助包装原件载体质粒。感染前 24 h,用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞,以含 10% 血清的 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^5 /ml,重新接种于 15 cm 细胞培养皿,37℃、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h,使细胞融合度达 70%~80%。感染前 2 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。取制备好的质粒 DNA 溶液,参照 Lipofectmaine™ 2000 感染试剂说明书操作。感染后 48 h,镜下观察感染率,收集细胞上清,进行 Lv-*RON*-siRNA 滴度检测。使用比例稀释法进行滴度测定。

1.3 Lv-*RON*-siRNA 感染 HT-29 细胞

Lv-*RON*-siRNA 感染 HT-29 细胞,参照预实验确定的最佳条件进行感染:病毒感染前 1 d 取对数生长期细胞,按 5.0×10^4 /孔细胞量接种到 6 孔培养板,感染当天加入 Lv-*RON*-siRNA 慢病毒颗粒进行 HT-29 细胞感染实验,其中 pGCSIL-GFP 载体带绿色荧光蛋白 GFP 标记。成功感染 HT-29 细胞后,显微镜下可见 GFP 荧光,感染 3 d 后荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,确定感染率。感染 5 d 后收集细胞传代,获得 Lv-*RON*-siRNA 慢病毒沉默 *RON* 的 HT-29 细胞。

1.4 Real-time PCR 检测 HT-29 细胞 RNA 干扰前后 *RON* 基因的表达

按照 Invitrogen 公司的 TRIzol 操作说明书进行 RNA 抽提,按照 TaKaRa 公司 RNA 逆转录操作说明书逆转录成 cDNA。使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II

试剂盒检测内参基因 β -actin 和目的基因 *RON*。 β -actin 引物: F 5'-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3', R 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3', 产物长度 202 bp; *RON* 引物: F 5'-CCAGTTCATCCGCTCACC-3', R 5'-CGCCATCCACTTCACAGG-3', 产物长度 256 bp。扩增参数: 95 °C 15 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 共 45 个循环。PCR 反应结束后增加溶解曲线, 95 °C 变性 1 min, 然后冷却至 55 °C, 使 DNA 双链充分结合。从 55 °C 开始到 95 °C, 每一步增加 0.5 °C, 同时读取光密度值。相对定量的结果则通过 Δ Ct (Δ Ct = *RON* Ct 值 - β -actin Ct 值) 法来进行解析。

1.5 Western blotting 检测 HT-29 细胞 RNA 干扰前后 *RON* 蛋白的表达

细胞培养 72 h 后, RIPA 裂解法裂解 HT-29 细胞提取细胞总蛋白, BCA 定量法检测蛋白质浓度。灌制 10% SDS-PAGE 凝胶, 每孔上样 50 μ g, 电泳分离。电泳后, 采用湿式电转印法将蛋白转印到 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入鼠抗人 *RON* 单克隆抗体 (1:5 000, GAPDH 为 1:5 000) 4 °C 过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 Ig (1:10 000), 室温孵育 1 h, 最后用 ECL 化学发光试剂显影, X 线胶片暗室曝光。

1.6 Transwell 实验检测 Lv-*RON*-siRNA 对 HT-29 细胞体外侵袭力的影响

Lv-*RON*-siRNA 和空质粒感染的 HT-29 细胞分别进行侵袭力检测: (1) 取 50 μ l 200 μ g/ml 的 Matrigel 加入 Transwell 小室, 覆盖整个聚碳酸酯膜, 37 °C, 培养箱孵育 30 min, 使 Matrigel 聚合成胶; (2) 取对数生长期的 Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞和空质粒感染的 HT-29 细胞, 实验前 12 h 用无血清 DMEM 培养基培养过夜, 用 2 ml 0.1% BSA 培养液制成 1×10^5 /ml 单细胞悬液; (3) 在 Transwell 下室加入 600 μ l 含趋化因子的 10% 胎牛血清 DMEM 培养液, Transwell 培养板小室内加入 100 μ l 细胞悬液, 重复 3 孔, 37 °C, 5% CO₂ 培养 20 h; (4) 取出 Transwell 小室, 棉签擦去小室内的基质胶和细胞, 甲醛固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 10 min, 用蒸馏水冲洗, 晾干。高倍显微镜下观察膜的上、下、左、右、中 5 个不同视野的细胞数; (5) 小心将膜切下, 放入 200 μ l 10% 醋酸中反复冲洗, 检测光密度值 D_{570} 。

1.7 ATP-TCA 生物荧光肿瘤体外药物敏感性实验 (ATP-tumor chemosensitivity assay, ATP-TCA) 检测 Lv-*RON*-siRNA 对 HT-29 细胞药物敏感性的影响

分别取 Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞和空

质粒感染的 HT-29 细胞的单细胞悬液, 接种 96 孔培养板, 1×10^4 /孔, 加入抗肿瘤药物, 包括 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU)、顺铂 (cisplatin, DDP)、紫杉醇 (paclitaxel, PTX)、多西他赛 (docetaxel, TXT)、多柔比星 (doxorubicin, ADM)、草酸铂 (oxaliplatin, L-OHP) 和盐酸伊立替康 (irinotecan hydrochloride, CPT-11)。每种药物设 6 个测试浓度, 每个浓度设 3 个平行孔, 这 6 个浓度分别为 200% PPC、100% PPC、50% PPC、25% PPC、12.5% PPC、6.5% PPC; 另外设 3 个无药对照孔。培养板在 37 °C、5% CO₂ 中培养 3~4 d 后, 各孔加入 ATP 提取液 100 μ l, 混匀后室温下放置 30 min, 取 50 μ l 细胞提取液于检测板中, 加入荧光素-荧光素酶 50 μ l 混匀。然后将检测板置于荧光分析仪进行检测, DCS 软件系统进行数据分析, 计算出各种药物 IC₅₀ (50% inhibitory concentration) 值和 IC₉₀ (90% inhibitory concentration) 值。

1.8 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS15.0 统计软件, 两组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Lv-*RON*-siRNA 慢病毒载体的鉴定

PCR 反应结束后, 取产物 5 μ l, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 接入 shRNA 片段重组 *RON* 慢病毒质粒的 PCR 产物为 343 bp, 经双酶切后没有插入片段的空载体 PCR 产物为 306 bp, 鉴定结果与预期相符 (图 1)。测序结果与实验要求的 DNA 序列完全一致 (图 2)。证明将合成的 *RON*-siRNA 寡核苷酸序列插入到 pGCSIL-GFP 载体中, 成功构建了重组 Lv-*RON*-siRNA 慢病毒。

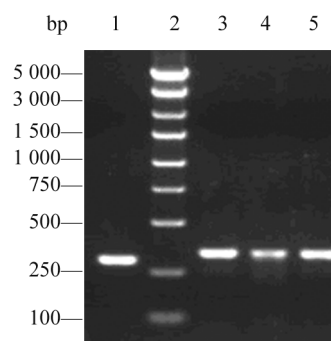
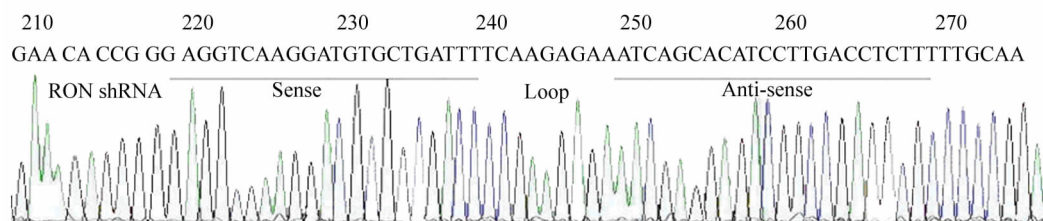


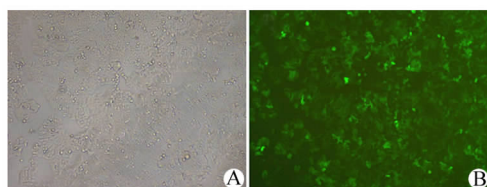
图 1 Lv-*RON*-siRNA 质粒 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of Lv-*RON*-siRNA plasmid
1: Empty plasmid; 2: Maker; 3-5: Lv-*RON*-siRNA

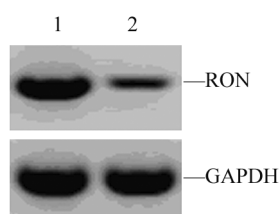
图2 Lv-*RON*-siRNA 质粒测序结果Fig. 2 Sequencing result of Lv-*RON*-siRNA plasmid

2.2 HT-29 细胞 Lv-*RON*-siRNA 感染率和 *RON* 基因及蛋白的表达

荧光显微镜下观察,HT-29 细胞的 Lv-*RON*-siRNA 感染率 >80% (图 3)。Real-time PCR 测定 *RON* 基因和 β -*actin* 基因, Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞对 *RON* 基因的沉默效果达到 70%。Western blotting 检测结果显示, *RON* 蛋白的表达水平也受到明显抑制(图 4)。

图3 Lv-*RON*-siRNA 感染 HT-29 细胞(×200)Fig. 3 HT-29 cells infected by Lv-*RON*-siRNA(×200)

A: Light microscope; B: Fluorescence microscope

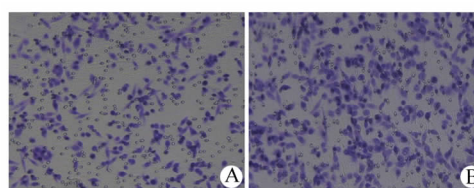
图4 Lv-*RON*-siRNA 感染后 HT-29 细胞中 *RON* 蛋白的表达Fig. 4 Expression of *RON* protein in HT-29 cells after infection with Lv-*RON*-siRNA

1: Empty plasmid; 2: Lv-*RON*-siRNA

2.3 Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞体外侵袭力下降

结晶紫染色后在高倍显微镜下观察 Lv-*RON*-siRNA 感染和空质粒感染的 HT-29 细胞的侵袭力, Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞侵袭能力明显下降(图 5)。将膜用 10% 醋酸脱色,检测光密度值

D_{570} , 结果显示, Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞的侵袭能力较空质粒感染的 HT-29 细胞明显降低 [(1.29 ± 0.08) vs (0.97 ± 0.07) , $P < 0.05$]。

图5 Lv-*RON*-siRNA 感染后 HT-29 细胞的侵袭力(×200)Fig. 5 Invasion capacity of HT-29 cells after infection with Lv-*RON*-siRNA(×200)

A: Empty plasmid; B: Lv-*RON*-siRNA

2.4 Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞对 5-FU、DDP 的敏感性增强

ATP-TCA 结果(表 1)显示, 5-FU 对 Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞的 IC_{90} 、 IC_{50} 分别为 (14.28 ± 1.34) 、 (8.93 ± 1.20) $\mu\text{g/ml}$, 明显低于空质粒感染的 HT-29 细胞 [(42.00 ± 2.55) 、 (19.04 ± 1.77) $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$]; DDP 对 Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞的 IC_{90} 、 IC_{50} 分别为 (1.91 ± 0.22) 、 (0.64 ± 0.07) $\mu\text{g/ml}$, 明显低于空质粒感染的 HT-29 细胞的 [(3.25 ± 0.28) 、 (1.43 ± 0.16) $\mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$]。由此可见, 沉默 *RON* 基因的 HT-29 细胞比空质粒感染的 HT-29 细胞对 5-FU 和 DDP 敏感性明显提高。但 Lv-*RON*-siRNA 感染的 HT-29 细胞对紫杉醇、多西他赛、多柔比星、草酸铂、盐酸伊立替康的敏感性无明显变化。

3 讨论

RON 由 20 个外显子和 19 个内含子组成, 定位于染色体 3p21, 该区域在许多肺癌和肾癌组织中经常发生缺失。成熟的 *RON* 为 180 000 Da 大小的异源二聚体结构, 由 40 000 Da 的 α 链和 145 000 Da

的 β 链组成。其中 α 链完全位于细胞膜外; β 链包含三个部分, 一部分暴露于细胞膜外, 一小段跨膜, 另一具有酪氨酸激酶活性的部分位于胞质内^[10-11], 其 C 末端的信息分子结合位点是保持 RON 激酶活性必不可少的, 同时也是转导 RON 信息的结构保证^[12]。RON 在正常上皮细胞来源细胞中表达水平较低^[13]。有研究^[14]揭示, RON 在人类肿瘤包括乳腺癌、结肠癌、肺癌、肝癌、肾癌、卵巢癌、胃癌、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌等组织中过表达。RON 过表达与肿瘤的转移密切相关。Maggiara 等^[15]研究发

现, RON 在 47% 乳腺肿瘤中过表达, 并且 RON 基因表达与肿瘤细胞的侵袭能力紧密相关。Lee 等^[16]报道, RON 在乳腺癌组织中过表达与患者无瘤生存率的降低和乳腺癌转移的升高密切相关。这些研究证明 RON 过表达是乳腺癌转移的一个诱发因素。RON 基因在正常肠道黏膜中中度表达, 在结肠癌组织中表达量显著增高^[17]。Jing 等^[18]研究显示, RON 在结肠癌的侵袭和远处转移过程中发挥重要作用。因此, 探讨 RON 基因在结肠癌侵袭中的作用及其机制具有重大意义。

表 1 Lv-RON-siRNA 感染后 HT-29 细胞对不同抗肿瘤药物的敏感性

Tab.1 Sensitivity of HT-29 cells to different anticancer drugs after infection with Lv-RON-siRNA

Drug	IC ₉₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	Empty plasmid	Lv-RON-siRNA	Empty plasmid	Lv-RON-siRNA
5-FU	42.00 \pm 2.55	14.28 \pm 1.34 **	19.04 \pm 1.77	8.93 \pm 1.20 **
ADM	1.75 \pm 0.13	1.77 \pm 0.15	0.70 \pm 0.06	0.67 \pm 0.08
TXT	11.02 \pm 0.97	12.00 \pm 1.27	5.34 \pm 0.54	5.33 \pm 0.66
PTX	11.59 \pm 0.99	11.57 \pm 1.03	5.33 \pm 0.50	5.32 \pm 0.59
DDP	3.25 \pm 0.28	1.91 \pm 0.22 **	1.43 \pm 0.16	0.64 \pm 0.07 **
L-OHP	1.93 \pm 0.20	1.75 \pm 0.19	1.01 \pm 0.13	0.85 \pm 0.10
CPT-11	2.84 \pm 0.28	2.65 \pm 0.28	1.19 \pm 0.13	1.11 \pm 0.13

** $P < 0.01$ vs empty plasmid group

RNAi 技术因具有高特异性、高效性、高稳定性等特点, 广泛应用于肿瘤生物学研究中^[19]。本研究通过慢病毒载体介导 RNAi 表达技术, 利用 RNAi 沉默人 HT-29 结肠癌细胞中的 RON 基因。获得 Lv-RON-siRNA 慢病毒沉默 RON 的 HT-29 细胞, 利用 Real-time PCR 和 Western blotting 技术检测 Lv-RON-siRNA 感染的 HT-29 细胞中 RON mRNA 及蛋白的表达水平, 显示 Lv-RON-siRNA 慢病毒感染 HT-29 细胞后, RON mRNA 及蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。Transwell 侵袭实验发现, 沉默 RON 基因后, HT-29 细胞侵袭能力与对照组比较明显下降($P < 0.05$)。说明沉默 RON 基因可以显著抑制 HT-29 细胞的侵袭能力, RON 基因的表达可能参与了 HT-29 细胞的侵袭过程。

体外肿瘤药物敏感性实验结果显示, 沉默 RON 基因的 HT-29 细胞对 5-FU 和 DDP 敏感性明显提高($P < 0.01$)。有报道^[20]显示, 沉默 RON 信号转导, 可抑制胰腺癌细胞异体种植瘤的生长, 并增强其对二氟脱氧胞嘧啶核苷的敏感性。Yao 等^[21]研究显

示, RON 单克隆抗体可抑制体内肿瘤细胞的生长, 增强化疗药物对结肠癌细胞的细胞毒性。

本研究应用 RNAi 技术特异性沉默人 HT-29 结肠癌细胞株的 RON 基因, 抑制了 HT-29 细胞的侵袭能力, 增强了肿瘤细胞对部分抗肿瘤药物的敏感性。因此, 针对 RON 基因的分子靶向治疗策略可能成为结肠癌治疗新的突破点。本研究为进一步探讨 RNAi 分子靶向治疗的机制研究提供了实验依据, 为临床肿瘤耐药问题的研究开辟了新途径。

[参 考 文 献]

[1] Parkin DM. Global cancer statistic in the year 2000 [J]. Lancet Oncol, 2001, 2(9): 533-543.
 [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008 [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
 [3] Boring CC, Squires TS, Tong T, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 1993, 43(1): 7-26.
 [4] Sail F, Beyer HG. The value of follow-up of curative surgery of colorectal carcinoma [J]. Cancer Detect Prev, 1993, 17(3): 417-424.

- [5] Wang MH, Zhou YQ, Chen YQ. Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: Potential regulators of macrophage inflammatory activities [J]. Scand J Immunol, 2002, 56 (6): 545-553.
- [6] 孟庆勇, 卓文莹, 俞吉霞, 等. RON 与转化生长因子- β 在大肠癌中的表达及意义 [J]. 中国消化杂志, 2007, 27(8): 552-553.
- [7] 卓文莹, 何超, 王达, 等. 大肠癌组织中酪氨酸激酶受体 RON 的表达及意义 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(4): 807-809.
- [8] 宋先旭, 王璇, 宋国权. 结肠癌组织中 RON 和 β -catenin 的表达及相关性研究 [J]. 中华现代外科学杂志, 2010, 7(6): 325-328.
- [9] 胡景岚. 大肠癌组织中酪氨酸激酶受体 RON 蛋白的表达及意义 [J]. 中国实用医刊, 2009, 36(4): 73-74.
- [10] Ronsin C, Muscatelli F, Mattei MG, et al. A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the Met family [J]. Oncogene, 1993, 8(5): 1195-1202.
- [11] Wang MH, Ronsin C, Gesnel MC, et al. Identification of the RON gene product as the receptor for the human macrophage stimulating protein [J]. Science, 1994, 266 (5182): 117-119.
- [12] Lu Yi, Yao HP, Wang MH. Significance of the entire C-terminus in biological activities mediated by the RON receptor tyrosine kinase and its oncogenic variant RON160 [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2008, 27(1): 5501-5512.
- [13] Gaudino G, Follenzi A, Naldini L, et al. RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP [J]. EMBO J, 1993, 13(15): 3524-3532.
- [14] Thangasamy A, Rogge J, Ammanamanchi S. Recepteur d'origine nantais tyrosine kinase is a direct target of hypoxia-inducible factor-1 α -mediated invasion of breast carcinoma cells [J]. J Biol Chem, 2009, 284(21): 14001-14010.
- [15] Maggiora P, Marchio S, Stella MC, et al. Overexpression of the RON gene in human breast carcinoma [J]. Oncogene, 1998, 16 (22): 2927-2933.
- [16] Lee WY, Chen HH, Chow NH, et al. Prognostic significance of co-expression of RON and Met receptors in node-negative breast cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(6): 2222-2228.
- [17] Zhou YQ, He C, Chen YQ, et al. Altered expression of the RON receptor tyrosine kinase in primary human colorectal adenocarcinomas: Generation of different splicing RON variants and their oncogenic potential [J]. Oncogene, 2003, 16(22): 186-197.
- [18] Wang J, Rajput A, Kan JL, et al. Knockdown of Ron kinase inhibits mutant phosphatidylinositol 3-kinase and reduces metastasis in human colon carcinoma [J]. J Biol Chem, 2009, 284(16): 10912-10922.
- [19] 王海伦. RNAi 及其在肿瘤生物学研究中的应用 [J]. 湖南省环境生物职业技术学院学报, 2011, 17(3): 20-23.
- [20] Logan-Collins J, Thomas RM, Yu P, et al. Silencing of RON receptor signaling promotes apoptosis and gemcitabine sensitivity in pancreatic cancers [J]. Cancer Res, 2010, 70(3): 1130-1140.
- [21] Yao HP, Zhou YQ, Ma Qi, et al. The monoclonal antibody Zt12 targeting RON receptor tyrosine kinase as potential therapeutics against tumor growth-mediated by colon cancer cells [J]. Mol Cancer, 2011, 10(1): 82-94.
- [收稿日期] 2012-06-16 [修回日期] 2012-08-22
- [本文编辑] 韩丹, 周玲琳

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358-93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司	封二
上海医元生物基因发展有限公司	封三
碧迪医疗器械有限公司	封四