

siRNA沉默KAP-1表达抑制胰腺癌细胞PANC-1的侵袭能力

江建新, 詹磊, 黄洋, 何燕浙, 孙诚谊

江建新, 詹磊, 黄洋, 何燕浙, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550001

江建新, 副主任医师, 主要从事肝胆胰脾疾病的基础与临床研究。国家自然科学基金资助项目, No. 81160311

贵州省科教青年英才培养工程基金资助项目, No. 黔省专合字[2012]177号

贵州省科技厅2011年度社会攻关计划基金资助项目, No. 黔科合SY字[2011] 3007

贵州省肝胆胰疾病研究科技创新人才团队基金资助项目, No. 黔科合人才团队[2010]4010

作者贡献分布: 主要实验设计、资料收集分析、统计及文章撰写由江建新完成; 文章修改和审阅由孙诚谊完成; 样本处理、实验操作由詹磊、黄洋及何燕浙完成。

通讯作者: 孙诚谊, 教授, 550001, 贵州省贵阳市贵医街28号, 贵阳医学院附属医院肝胆外科。chengyisun@medmail.com.cn; 电话: 0851-6773083

收稿日期: 2013-02-18 修回日期: 2013-05-28

接受日期: 2013-06-05 在线出版日期: 2013-07-08

SiRNA-mediated silencing of KAP-1 expression inhibits invasion of human pancreatic cancer PANC-1 cells

Jian-Xin Jiang, Lei Zhan, Yang Huang, Yan-Zhe He, Cheng-Yi Sun

Jian-Xin Jiang, Lei Zhan, Yang Huang, Yan-Zhe He, Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160311; the Outstanding Young Training Project of Science and Education of Guizhou Province, No. [2012]177; the Foundation of Science and Technology Department of Guizhou Province, No. [2011] 3007; the Liver and Pancreatic Diseases Technological Innovation Talent Team Foundation of Guizhou Province, No. [2010]4010

Correspondence to: Yi-Cheng Sun, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, 28 Guiyi Street, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. chengyisun@medmail.com.cn

Received: 2013-02-18 Revised: 2013-05-28

Accepted: 2013-06-05 Published online: 2013-07-08

Abstract

AIM: To investigate the impact of small interfering RNA (siRNA)-mediated KAP-1 gene silencing on invasion of human pancreatic cancer PANC-1 cells, and to explore the feasibility of human KAP-1 gene as a therapeutic target for pancreatic cancer.

METHODS: Five KAP-1-specific siRNAs were

designed using online software to construct pGC-LV-siRNA-KAP-1 plasmid. Western blot was used to screen the efficient plasmid in 293T cells, and the most efficient one was packed into the recombinant lentivirus Lv-siRNA-KAP-1 in 293T cells. The titer of lentivirus was determined by hole-by-dilution titer assay. The silencing effect of Lv-siRNA-KAP-1 in PANC-1 cells was validated by real-time PCR. After PANC-1 cells were infected with Lv-siRNA-KAP-1, cell invasion was detected by Transwell chamber assay. Vimentin expression in cells was detected by Western blot.

RESULTS: Four KAP-1-specific siRNAs could silence the expression of KAP-1 at the protein level 48 h after transfection. The most efficient pGC-siRNA-3 plasmid was used to construct Lv-VIM-shRNA. The titer of lentivirus was 2×10^9 TU/mL. KAP-1 knockdown significantly inhibited invasion of human pancreatic cancer PANC-1 cells compared to blank control and negative control cells (97.3 ± 25.6 vs 253.3 ± 20.6 , 213.2 ± 19.4 , both $P < 0.05$). The expression of vimentin was down-regulated in PANC-1 cells infected with Lv-siRNA-KAP-1.

CONCLUSION: Lv-siRNA-KAP-1 could effectively inhibit the expression of KAP-1 gene in PANC-1 cells *in vitro*, cell invasion and Vimentin expression. KAP-1 might serve as a new target for gene therapy of pancreatic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Pancreatic carcinoma; KAP-1; RNA interference; Invasion

Jiang JX, Zhan L, Huang Y, He YZ, Sun CY. SiRNA-mediated silencing of KAP-1 expression inhibits invasion of human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(19): 1859-1865 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1859.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i19.1859>

摘要

目的: 观察siRNA沉默KAP-1基因表达对人胰腺癌PANC-1细胞侵袭能力的影响, 探求该基

■背景资料

胰腺癌的早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发是其致死的关键因素, 我们前期依据文献以MIA-PaCa2 (TIC^{high})与BxPc-3 (TIC^{low})作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞, 通过蛋白质组学筛选胰腺癌干细胞相关差异蛋白, 发现KAP-1在前者表达较后者高10倍多, 我们的研究也显示KAP-1在胰腺癌组织中高表达, 正常胰腺组织中几乎不表达; 且与胰腺癌的分化相关, 为了进一步研究KAP-1在胰腺癌中的作用, 本研究通过构建Lv-siRNA-KAP-1感染胰腺癌细胞株PANC-1, 检测其对胰腺癌细胞的侵袭能力影响, 探讨其可能的机制。

■同行评议者

李淑德, 教授, 第二军医大学长海医院消化内科

■研究前沿

KAP-1在胰腺癌细胞侵袭转移中的作用未见文献报道,该研究成功构建KAP-1的RNAi重组慢病毒表达系统,作为一种研究KAP-1的工具,感染PANC-1细胞能抑制其侵袭能力;其机制之一是下调与侵袭转移相关的波形蛋白表达,KAP-1有可能成为新的胰腺癌治疗靶点。

因作为治疗靶点的可行性。

方法: 针对KAP-1基因设计5条siRNA,构建真核表达载体,转染293T细胞筛选RNAi有效靶点,包装成重组慢病毒Lv-siRNA-KAP-1,感染胰腺癌细胞PANC-1成功后RT-qPCR检测RNA干扰沉默效果,Transwell小室检测细胞侵袭能力,Western blot检测波形蛋白表达。

结果: 转染48 h后,5条siRNA能显著抑制KAP-1的蛋白表达;其中最有效的1条siRNA包装成重组慢病毒Lv-siRNA-KAP-1,感染PANC-1细胞侵袭能力明显受到抑制;感染后细胞侵袭数目(178.6 ± 30.3)较空白对照组(253.3 ± 20.6)与阴性对照组(97.3 ± 25.6)明显减少,差异显著($P < 0.05$);感染后PANC-1细胞的波形蛋白表达下调。

结论: Lv-siRNA-KAP-1能显著抑制PANC-1细胞KAP-1的表达,抑制PANC-1细胞侵袭能力及波形蛋白表达,KAP-1基因有可能成为胰腺癌基因治疗的新靶点。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 胰腺癌; KAP-1; 小干扰RNA; 侵袭

核心提示: KAP-1在胰腺癌细胞中高表达,其表达与胰腺癌细胞的分化相关,KAP-1作为一种转录中介因子,可能通过调控其他蛋白来影响胰腺癌的生物学行为。该研究成功构建KAP-1的RNAi重组慢病毒表达系统,感染PANC-1细胞能抑制其侵袭能力;其机制之一是下调与侵袭转移相关的波形蛋白表达,KAP-1有可能成为新的胰腺癌治疗靶点。

江建新,詹磊,黄洋,何燕浙,孙诚谊. siRNA沉默KAP-1表达抑制胰腺癌细胞PANC-1的侵袭能力. 世界华人消化杂志 2013; 21(19): 1859-1865 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1859.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i19.1859>

0 引言

胰腺癌是高度恶性、预后最差的恶性肿瘤之一,其5年生存率不到5%^[1];大多数患者因确诊时伴有局部和/或远处侵袭转移而丧失手术时机^[2];即使临床手术根治性切除的胰腺癌患者术后也大多数因出现复发和远处转移预后极差,其原因为术前就有微转移灶形成及其化疗抵抗^[3];胰腺癌的早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发是其致死的关键因素。肿瘤干细胞理论

解释了上述现象。胰腺癌干细胞研究表明^[4]:在原发肿瘤里存在一个亚群细胞,这群细胞具有自我更新、分化潜能以及在异位重新成瘤能力;同时,这群细胞还具有侵袭转移和化疗抵抗特性。最新的研究表明:胰腺癌在形成之前通过上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)形成胰腺癌干细胞,是其早期发生转移、治疗抵抗、复发的根本原因^[5]。我们前期依据文献以MIA-PaCa₂(TIC^{high})与BxPc-3(TIC^{low})作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞^[6],通过蛋白质组学筛选胰腺癌干细胞相关差异蛋白,发现KAP-1(KAP-1, KRAB-associated protein 1; TRIM28, tripartite motif-containing 28; TIF1 β)在前者表达较后者高10倍多,并通过检索文献提示KAP-1与EMT和干细胞的“干性”相关^[7]。此外,我们也采用免疫组织化学方法显示KAP-1在胰腺癌组织中高表达,正常胰腺组织中几乎不表达;在低分化胰腺癌组织中表达最高,中分化胰腺癌组织中表达较高,高分化胰腺癌组织中低表达;采用Western blot显示KAP-1蛋白在低分化胰腺癌细胞株MIA-PaCa₂和Panc-1中蛋白表达高,来源于肝转移的胰腺癌细胞系CFPAC-1中表达较高,其余细胞系BxPC3、AsPC-1、SW1990、Capan-1和Capan-2中不表达(数据未显示)。KAP-1是一个97 kDa的核磷蛋白。人KAP-1基因位于19号染色体,位置是19q13.4,共16个外显子;小鼠KAP-1基因位于7号染色体,位置是7 A2,共17个外显子。KAP-1具有TIF1家族中常见的保守结构域: N端的RBCC(RING-B box-coiled-coil)结构域、C端保守的PHD型锌指和紧随其后的Bromodomain(BrD)结构域,中部是该家族内保守度最低的区域,一般情况下富含脯氨酸,甘氨酸和丝氨酸^[8]。为了进一步研究KAP-1在胰腺癌中的作用,本研究通过构建Lv-siRNA-KAP-1感染胰腺癌细胞株PANC-1,检测其对胰腺癌细胞的侵袭能力影响,探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株PANC-1, 293T细胞购自American Tissue Culture Collection(ATCC);慢病毒质粒pGC-LV、包装质粒pHelper 1.0和pHelper 2.0购自上海吉凯基因化学技术有限公司;限制性内切酶Age I、EcoR I、T4连接酶购自美国NEB公司;质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒均购自美国Promega公司;总RNA提取试剂盒购自Qiagen公司;Fugene HD转染试剂购

表 1 靶向TRIM28基因siRNA候选序列

名称	靶序列
siRNA-1	CTGAGACCAAACCTGTGCTTA
siRNA-2	GACCACCAGTACCAGTTCTTA
siRNA-3	GAGAATTATTTTCATGCGTGAT
siRNA-4	CCTGGCTCTGTTCTCTGTCCT
siRNA-5	GAGGACTACAACCTTATTGTT
NS-siRNA	TTCTCCGAACGTGTCACGT

自瑞士Roche公司; KAP-1定量PCR引物及qRT-PCR检测试剂盒购自美国GeneCopoeia公司; 兔抗人TIF1 β 单克隆抗体购自美国Cell Signaling公司; 小鼠抗Vimentin V9单克隆抗体购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 Lv-siRNA-KAP-1的构建与鉴定: 通过Ambion网站进行siRNA的设计, 根据人TRIM28基因(Genbank NM_005762.2)的编码序列设计5条不同的siRNA序列及1条阴性对照siRNA序列(表1), 病毒载体构建框架见表2, 所有siRNA由上海吉凯基因化学有限公司合成提供。通过Age I和EcoR I双酶切, T4连接酶连接上述siRNA序列到GV112载体(上海吉凯基因化学技术有限公司)上; 其产物转化细菌感受态细胞DH5 α , 进行菌落PCR鉴定, 阳性克隆鉴定, 大量提取慢病毒载体质粒pGC-LV-siRNA-KAP-1。以293T细胞为工具细胞进行目的基因KAP-1过表达及siRNA共转染; 转染后36-48 h收集细胞, 提取总蛋白进行Western blot检测KAP-1(抗体工作浓度1:200); 空白对照组: 转染KAP-1过表达质粒的293T细胞组; 阴性对照组: 转染KAP-1过表达质粒和阴性对照病毒载体质粒的293T细胞组; siRNA1-5组: 转染KAP-1过表达质粒和pGC-siRNA1-5的293T细胞组。外源靶鉴定最有效的siRNA, 包装成重组慢病毒。采用pGC-LV-KAP-1-RNAi慢病毒表达载体质粒、pHelper 2.0辅助质粒、pHelper 1.0包装质粒(VSVg, 外壳蛋白)在HEK 293FT细胞中进行慢病毒包装, 按照说明书提供的梯度稀释法测定病毒滴度。将PANC-1胰腺癌细胞分别常规培养, 感染复数(MOI)为5:1, 48 h后RT-qPCR方法在PANC-1细胞内验证LV-siRNA-KAP-1的干扰效果; 反应体系为20 μ L, 其中SYBR Green/ROX qPCR Master Mix为10 μ L, 2.5 μ mol/L的上下游引物各0.5 μ L, cDNA为1 μ L, ddH₂O为8 μ L。反应程序为: 预变性95 $^{\circ}$ C, 15 s;

之后每一步变性95 $^{\circ}$ C, 5 s; 退火延伸60 $^{\circ}$ C, 30 s; 共进行45个循环, 实验重复3次, 由随机附带软件LCS480 1.5.039计算Ct值和拷贝数, 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}分析法进行数值分析(管家基因GAPDH为内参)。KAP-1引物: 上游: 5'-AAGTCTCGGGATGGTGAACG-3', 下游: 5'-CAGACACCTGGCGGATTGA-3', 长度262 bp; GAPDH引物: 上游: 5'-TGACTTCAA-CAGCGACACCCA-3', 下游: 5'-CACCCTGTT-GCTGTAGCCAAA-3', 长度121 bp。(引物序列由软件Beacon designer 7设计, 上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。

1.2.2 Transwell小室侵袭实验: 生长状态良好的PANC-1细胞, Lv-siRNA-KAP-1感染PANC-1细胞, 48 h后GFP表达绿色荧光呈高峰。按说明书要求, 从-20 $^{\circ}$ C取出有基质胶的Transwell小室(购自德国BD Biosciences公司)恢复至室温, 将所需小室放入24孔培养板中, 在上下室各加入500 μ L 37 $^{\circ}$ C预温的无血清培养基, 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱放置2 h, 使基质胶再水化。再吸去剩余培养液。上室种入500 μ L(细胞数 2.5×10^4 个), 下室加入750 μ L含20%FBS的DMEM培养液500 μ L, 置于细胞培养箱中培养, 48 h后取出小室, 位于膜上层的非浸润的细胞用棉签轻轻擦去, 然后将膜经过甲醇固定30 min, 结晶紫染液染色5 min后, 置于显微镜下观察, 分别取5个视野计数。

1.2.3 Western blot检测KAP-1 siRNA对PANC-1细胞波形蛋白(Vimentin)表达的影响: Lv-siRNA-KAP-1感染PANC-1细胞, 48-72 h后收集细胞, 提取总蛋白, 按照上述方法进行Western blot检测波形蛋白(抗体工作浓度1:200)的表达, 实验重复3次, 条带密度采用QuantityOne Program(Bio-Rad)软件进行分析。目的蛋白的相对表达水平=目的蛋白的灰度值/ β -actin蛋白的灰度值, 取3次平均值。采用GAPDH为参照。

统计学处理 数据用mean \pm SD表示, 采用SPSS17.0对数据进行统计, 计数资料采用两个或多个样本的t检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 Lv-siRNA-KAP-1的构建与鉴定 构建的慢病毒载体质粒pGC-LV-siRNA-KAP-1阳性克隆测序结果显示重组质粒中插入的RNA干扰目的序列与软件设计中的序列一致, 没有碱基缺失或替换等, pGC-siRNA-3部分测序结果见图(1), 转染293T细胞显示融合绿色荧光蛋白的表达(图2), 表明其构建成功。将目的基因KAP-1过表达

■ 相关报道

Ho等采用蛋白质组学技术筛选KAP-1在乳腺癌中高表达, 且与乳腺癌侵袭转移相关。Takeshi等证实KAP-1在胃癌中高表达, 且和胃癌的腹腔播散及不良预后相关。Bingnan等发现KAP-1与化疗耐药相关, 且KAP-1的Ser824发生磷酸化。

■创新盘点

该研究成功构建KAP-1的RNAi重组慢病毒表达系统,证实了下调KAP-1的表达能抑制PANC-1细胞的侵袭能力;其机制之一是下调与侵袭转移相关的波形蛋白表达。

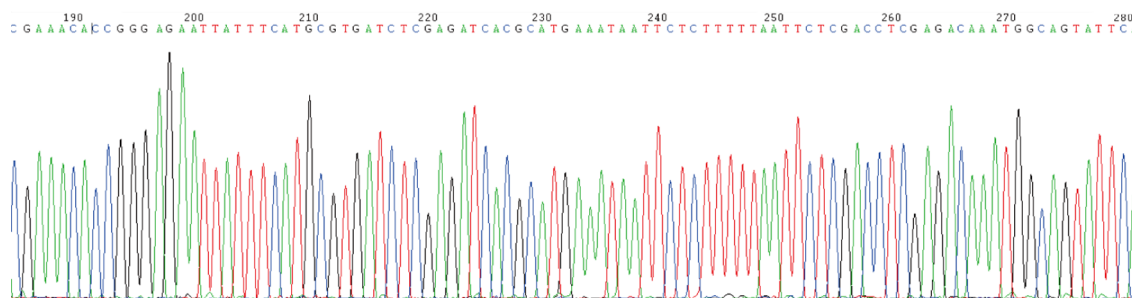


图1 重组慢病毒质粒载体pGC-siRNA-3部分测序图。

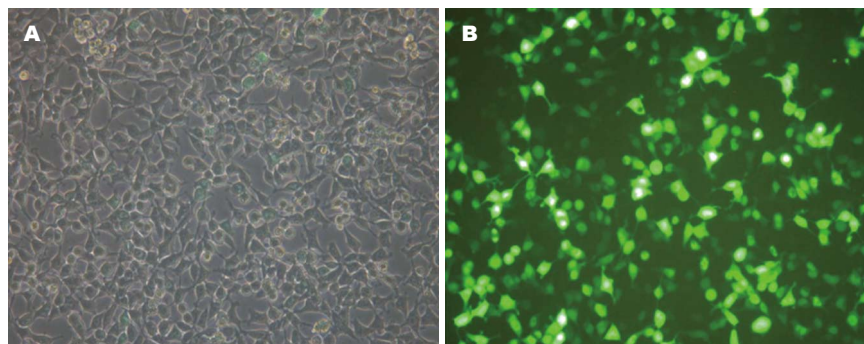


图2 重组慢病毒质粒载体pGC-siRNA-3感染的293T细胞48 h后的荧光图($\times 40$)。A: 明视野图; B: 绿色荧光图。

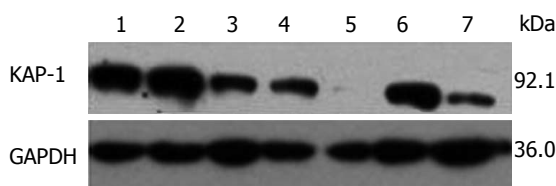


图3 Western blot外源筛靶鉴定最有效的siRNA。共转染KAP-1过表达质粒和慢病毒载体质粒pGC-siRNA与293T细胞, Western blot检测KAP-1的表达。1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: siRNA-1组; 4: siRNA-2组; 5: siRNA-3组; 6: siRNA-4组; 7: siRNA-5组。

质粒与基因敲除siRNA质粒共转染293T细胞, 通过Western blot外源筛靶实验, 5个干预组siRNA有4个能使KAP-1基因在蛋白水平表达明显下调($P < 0.05$), 具有明显KAP-1基因敲除作用的质粒pGC-siRNA-3进行病毒包装(图3)。筛选出的重组载体质粒与慢病毒包装质粒共转染293T细胞, 包装成慢病毒。根据公式计算慢病毒滴度为 1.5×10^9 TU/mL。成功包装的慢病毒命名为Lv-siRNA-KAP-1。RT-qPCR检测Lv-siRNA-KAP-1抑制胰腺癌细胞PANC-1的KAP-1表达, 结果显示siRNA具有显著的干扰KAP-1表达作用(图4), 表明Lv-siRNA-KAP-1包装成功, 可以作为研究工具使用。

2.2 Transwell小室侵袭实验 Transwell小室侵袭实验检测Lv-siRNA-KAP-1对PANC-1细胞侵袭能力的影响, 结果显示: 空白对照组侵袭细

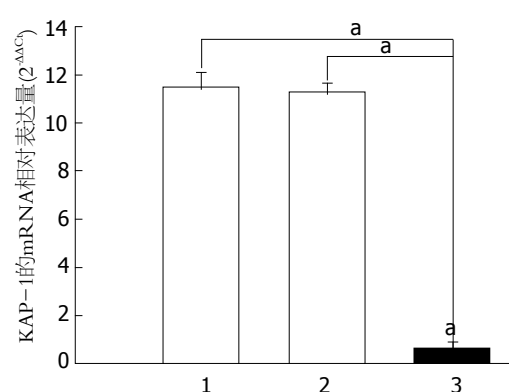


图4 RT-qPCR检测Lv-siRNA-KAP-1感染胰腺癌细胞PANC-1后KAP-1 mRNA的相对表达量。* $P < 0.05$ 。1: 空白对照组; 2: 实验对照组; 3: 实验组。

胞数目为 253.3 ± 20.6 个, 阴性对照组为 213.2 ± 19.4 个, 实验组为 97.3 ± 25.6 个, 表明干扰KAP-1表达能抑制PANC-1细胞的侵袭能力($P < 0.05$, 图5)。

2.3 RNAi抑制KAP-1表达对PANC-1细胞波形蛋白表达的影响 Western blot结果显示Lv-siRNA-KAP-1抑制KAP-1表达能下调PANC-1细胞波形蛋白表达, 与空白对照组和阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图6)。

3 讨论

KAP-1(又称TIF1 β 、TRIM28等)是一种转录中介因子, 在诸多转录调控复合体中起桥梁作用^[8]。

表 2 靶向TRIM28基因siRNA病毒载体合成序列

名称	病毒载体合成序列
siRNA-1-1	CcggCTGAGACCAAACTGTGCTTACTCGAGTAAGCACAGGTTTGGTCTCAGTTTTTg
siRNA-1-2	aattcaaaaaCTGAGACCAAACTGTGCTTACTCGAGTAAGCACAGGTTTGGTCTCAG
siRNA-2-1	CcggGACCACCAGTACCAGTTCTTACTCGAGTAAGAACTGGTACTGGTGGTCTTTTTg
siRNA-2-2	aattcaaaaaGACCACCAGTACCAGTTCTTACTCGAGTAAGAACTGGTACTGGTGGTC
siRNA-3-1	CcggGAGAATTATTTTCATGCGTGATCTCGAGATCACGCATGAAATAATTCTCTTTTTg
siRNA-3-2	aattcaaaaaGAGAATTATTTTCATGCGTGATCTCGAGATCACGCATGAAATAATTCTC
siRNA-4-1	CcggCCTGGCTCTGTTCTCTGTCTCTCGAGAGGACAGAGAACAGAGCCAGGTTTTTg
siRNA-4-2	aattcaaaaaCCTGGCTCTGTTCTCTGTCTCTCGAGAGGACAGAGAACAGAGCCAGG
siRNA-5-1	CcggGAGGACTACAACCTTATTGTTCTCGAGAACAATAAGGTTGTAGTCCTCTTTTTg
siRNA-5-2	aattcaaaaaGAGGACTACAACCTTATTGTTCTCGAGAACAATAAGGTTGTAGTCCTC

■应用要点

成功构建的KAP-1 RNAi重组慢病毒表达系统可以作为一种研究KAP-1的工具,为后续探讨KAP-1在胰腺癌干细胞中的作用及其作用机制研究提供一种工具。

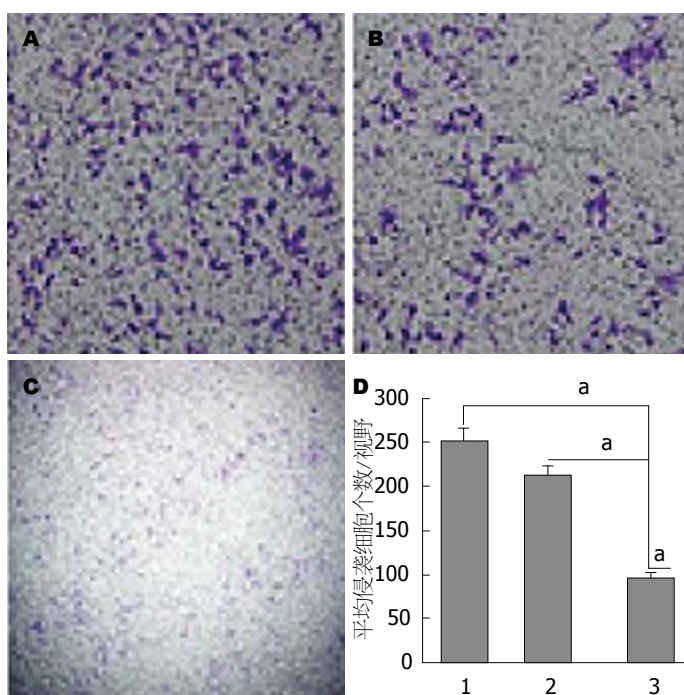


图 5 Transwell侵袭实验检测Lv-siRNA-KAP-1对PANC-1细胞侵袭能力的影响. A-C: 结晶紫染色图; D: 侵袭细胞平均计数图 (* $P < 0.05$). 1: 空白对照组; 2: 实验对照组; 3: 实验组.

他通过其N端RBCC结构域与含KRAB结构域的锌指蛋白、MDM2、MM1、C/EBP β 等相互作用;通过C端的PHD及BrD结构域与SETDB1、Mi-2 α 等分子相互作用,参与形成具有组蛋白甲基化酶或组蛋白去乙酰化酶活性的复合体;通过中间的HP1BD区域与HP1蛋白相互作用,进而与组蛋白相结合.许多研究表明,KAP-1在肿瘤细胞中高表达且与肿瘤的侵袭转移相关. Ho等^[9]采用蛋白质组学技术筛选KAP-1在乳腺癌中高表达,且与乳腺癌侵袭转移相关. Yokoe等^[10]证实KAP-1在胃癌中高表达,且和胃癌的腹腔播散及不良预后相关.此外,KAP-1参与EMT发生,与肿瘤的侵袭转移相关. Venkov等^[11]以SJL/J小鼠肾近端小管上皮细胞株MCT(mIMCD)为研究对象,采用凝胶迁移或电泳迁移率实验(EMSA)和

DNA亲和层析法及后续的质谱分析,在纤维母细胞特异性蛋白1(FSP1)的近端顺式作用子元件(FTS-1)域绑定的蛋白复合物中鉴定出两个蛋白质,分别为CBF-A和KAP-1. FSP1在人肿瘤细胞中称为S100A4,在EMT发挥重要作用;S100A4能增加肿瘤细胞的运动和侵袭能力,导致转移瘤的发生. 最近有研究表明^[12]:在人畸胎瘤细胞系NTera2D1中,KAP-1能在mRNA水平上激活许多EMT相关基因,如: *ACTA2*、*S100A4*、*SNAIL2*、*TJP1*、*TJP2*、*TWIST1*、*VIM*等. 上述这些研究充分表明KAP-1不仅在肿瘤的发生发展中发挥重要作用,而且与肿瘤的侵袭转移能力密切相关. 我们的实验结果也显示RNAi抑制KAP-1在胰腺癌细胞PANC-1的表达,能抑制PANC-1细胞的侵袭能力;其机制之一是下调与

■同行评价

本文内容紧密结合临床,研究方法先进,具有重要的临床指导意义和广阔应用前景。

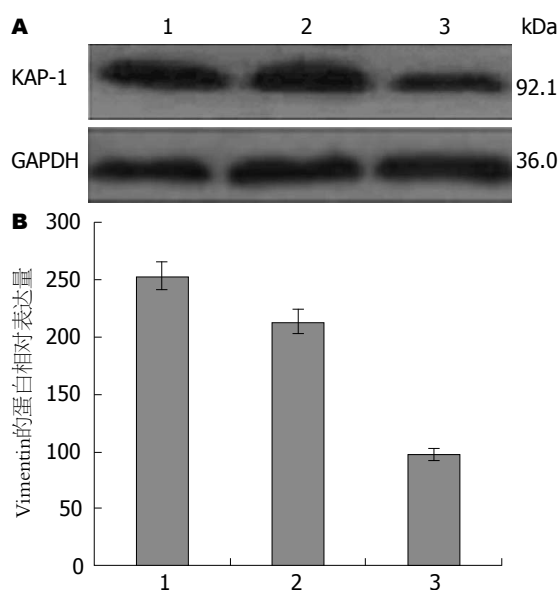


图6 Western blot检测Lv-siRNA-KAP-1对PANC-1细胞Vimentin表达的影响。A: Western blot检测Vimentin的表达水平; B: Vimentin的相对表达量。1: 空白对照组; 2: 实验对照组; 3: 实验组。

侵袭转移相关的波形蛋白表达。

波形蛋白是一种重要的细胞骨架蛋白,属中间丝中的波形纤维蛋白类,他在细胞的机械性和生物学功能,如细胞收缩、迁移、刚性以及增殖等方面有重要作用^[13]。正常分化的上皮细胞不表达波形蛋白,而上皮细胞来源的肿瘤细胞在其演进过程中获得侵袭转移能力时有波形蛋白表达,即上皮细胞间质转化;其主要特征是E-钙黏素表达缺失以及波形蛋白和纤维连接蛋白再表达^[14]。波形蛋白在肿瘤细胞中的表达有助于改变肿瘤细胞的生物学特性,有研究采用siRNA下调波形蛋白的表达证实其能抑制癌细胞生长和运动^[15]及抑制结肠癌和乳腺癌细胞的侵袭转移能力^[16]。逆转肿瘤细胞的间质特性,恢复上皮细胞的特性^[15];波形蛋白的过表达通过C-Src激酶调节促进激素非依赖性前列腺癌细胞侵袭转移^[17];在胰腺癌肝脏转移瘤中发现波形蛋白大量表达^[18]。这些研究表明波形蛋白与肿瘤包括胰腺癌细胞的侵袭转移能力密切相关。有些上调波形蛋白表达因素如血管内皮生长因子受体1的激活可以引起转录因子Snail、Twist和Slug的表达上升,增加波形蛋白和N-钙黏附蛋白等间质标志蛋白的表达^[19]。骨形态发生蛋白4处理胰腺癌细胞Panc-1,显示E-钙黏素表达下调,波形蛋白表达上升^[20]。我们的实验结果证明了KAP-1在胰腺癌细胞PANC-1中能下调与侵袭转移相关的波形蛋白表达,进而影响其侵袭能力。

总之,本研究成功构建KAP-1的RNAi重组慢病毒表达系统,经感染胰腺癌细胞PANC-1后,有效地下调KAP-1的表达,抑制PANC-1细胞的侵袭能力;其机制之一是下调与侵袭转移相关的波形蛋白表达。KAP-1有可能成为新的胰腺癌治疗靶点。

4 参考文献

- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29 [PMID: 22237781 DOI: 10.3322/caac.20138]
- Tuveson DA, Neoptolemos JP. Understanding metastasis in pancreatic cancer: a call for new clinical approaches. *Cell* 2012; 148: 21-23 [PMID: 22265397 DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.021]
- Lim KH, Chung E, Khan A, Cao D, Linehan D, Ben-Josef E, Wang-Gillam A. Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? *Oncologist* 2012; 17: 192-200 [PMID: 22250057 DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0268]
- Rasheed ZA, Matsui W. Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 15-18 [PMID: 22320910 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07015.x]
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012; 148: 349-361 [PMID: 22265420 DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.025]
- Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, Apel A, Beckermann BM, Groth A, Mattern J, Li Z, Kolb A, Moldenhauer G, Altevogt P, Wirth T, Werner J, Schemmer P, Büchler MW, Salnikow AV, Herr I. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signaling. *Gut* 2009; 58: 949-963 [PMID: 18829980 DOI: 10.1136/gut.2008.149039]
- 江建新, 高珊, 潘耀振, 孙诚谊. 蛋白组学分析胰腺癌干细胞相关差异蛋白的表达. *世界华人消化杂志* 2013; 21: 145-152
- Yang D, Jiang Y, He FC. [KAP-1, a scaffold protein in transcription regulation]. *Yi Chuan* 2007; 29: 131-136 [PMID: 17369165]
- Ho J, Kong JW, Choong LY, Loh MC, Toy W, Chong PK, Wong CH, Wong CY, Shah N, Lim YP. Novel breast cancer metastasis-associated proteins. *J Proteome Res* 2009; 8: 583-594 [PMID: 19086899 DOI: 10.1021/pr8007368]
- Yokoe T, Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 821-828 [PMID: 19898899 DOI: 10.1245/s10434-009-0795-8]
- Venkov CD, Link AJ, Jennings JL, Plith D, Inoue T, Nagai K, Xu C, Dimitrova YN, Rauscher FJ, Neilson EG. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007; 117: 482-491 [PMID: 17273560 DOI: 10.1172/JCI29544]
- Iyengar S, Ivanov AV, Jin VX, Rauscher FJ, Farnham PJ. Functional analysis of KAP1 genomic recruitment. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 1833-1847 [PMID: 21343339 DOI: 10.1128/MCB.01331-10]
- Wang N, Stamenovic D. Mechanics of vimentin

- intermediate filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 2002; 23: 535-540 [PMID: 12785103]
- 14 Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, Ringel MD. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2803-2808 [PMID: 17296934 DOI: 10.1073/pnas.0610733104]
- 15 Paccione RJ, Miyazaki H, Patel V, Waseem A, Gutkind JS, Zehner ZE, Yeudall WA. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2894-2903 [PMID: 18790770 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0450]
- 16 McInroy L, Määttä A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360: 109-114 [PMID: 17585878 DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.036]
- 17 Wei J, Xu G, Wu M, Zhang Y, Li Q, Liu P, Zhu T, Song A, Zhao L, Han Z, Chen G, Wang S, Meng L, Zhou J, Lu Y, Wang S, Ma D. Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation. *Anticancer Res* 2008; 28: 327-334 [PMID: 18383865]
- 18 Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4125-4133 [PMID: 15217949 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-0578-03]
- 19 Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Bauer TW, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2006; 66: 46-51 [PMID: 16397214 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3086]
- 20 Hamada S, Satoh K, Hirota M, Kimura K, Kanno A, Masamune A, Shimosegawa T. Bone morphogenetic protein 4 induces epithelial-mesenchymal transition through MSX2 induction on pancreatic cancer cell line. *J Cell Physiol* 2007; 213: 768-774 [PMID: 17516553 DOI: 10.1002/jcp.21148]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子 0.873

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2 144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。根据2011年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果,《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号。