

参考文献

- 1 Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, *et al.* Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 304 - 306
- 2 黄平. 轮状病毒感染的研究现状 [J]. 中国热带医学, 2004, 4 (4): 678 - 680
- 3 Luz CR, Mascarenhas JD, Gabbay YB. Rotavirus serotypes and electrophoretotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2005, 47 (5): 287 - 293
- 4 于秋丽, 刘京生, 韩占英, 等. 河北省 2006 年婴幼儿腹泻轮状病毒

- 的基因分型研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17 (12): 2270 - 2272
- 5 王建阳, 沈晓晴, 李梦磊, 等. 河南省婴幼儿轮状病毒腹泻病原研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23 (5): 46 - 48
- 6 徐锦, 孙家娥, 丁韵珍, 等. 2001 至 2005 年上海市 1450 份住院患儿 A 组轮状病毒分子流行病学研究 [J]. 中国循证儿科杂志, 2007, 2 (2): 102 - 107
- 7 包其郁, 陈韶, 朱丽丹, 等. 2462 例婴幼儿急性腹泻轮状病毒感染情况调查 [J]. 温州医学院学报, 2002, 32 (1): 5 - 6

(收稿: 2010 - 07 - 13)

siRNA 靶向慢病毒对人喉癌 Hep - 2 细胞系 FAK 基因的沉默效应

徐 炜 顾栋桦 陈英武 平金良 姚根有

摘 要 **目的** 探讨 siRNA 靶向慢病毒对人喉癌 Hep - 2 细胞系 FAK 基因的沉默效应, 以期探索喉鳞癌基因治疗的新途径。**方法** Western Blot 检测人喉鳞状细胞癌细胞系 Hep - 2 中的 FAK 蛋白表达水平。用 FAK - RNAi 慢病毒转染 Hep - 2 细胞, 同时监测转染效率。半定量 RT - PCR 检测 FAK 基因被 FAK - siRNA 沉默后 mRNA 的表达水平。Western - blotting 检测 FAK 基因被 FAK - siRNA 沉默后蛋白质的表达水平。采用荧光 PI 染色检测凋亡细胞数目, MTT 法检测细胞体外增生能力。**结果** Western blot 结果显示 Hep - 2 细胞中 FAK 的 3 个蛋白片段表达量较高。多次重复 western blot 检测转染前后 Hep - 2 细胞的 FAK 基因蛋白表达发现, FAK - RNAi 慢病毒对目的基因在 Hep2 细胞中具有显著 knockdown 作用。使用 RT - PCR 技术检测 FAK - siRNA 干扰 Hep - 2 细胞系前后 FAK mRNA 的表达发现, FAK - RNAi 慢病毒对目的基因, 在 mRNA 水平有明显 knockdown 作用。PI 染料染色后, 可见 FAK - RNAi 组 30% ~ 35% 的肿瘤细胞凋亡。MTT Assay 结果显示, FAK - siRNA 慢病毒转染 Hep2 细胞后, Hep2 细胞活力明显下降。**结论** 经用慢病毒载体介导的 FAK - siRNA 在喉鳞癌细胞中可获得高效转染, 并能产生特异性的基因沉默效应。

关键词 喉肿瘤 RNA 干扰 黏着斑激酶 基因沉默

Silencing Effect of siRNA on FAK Geng of Human Laryngeal Carcinoma Hep - 2 Cell Line. Xu Wei, Gu Donghua, Chen Yingwu, *et al.* Department of Pathology, Huzhou Central Hospital, Zhejiang 313000, China

Abstract **Objective** To investigate the inhibitory effect of gene silencing mediated by FAK - siRNA for laryngeal carcinoma hep - 2 cell line, and try to look for a new approach of gene therapy of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) by synthesizing and filtrating effective FAK - siRNA *in vitro*. **Methods** The level of FAK protein expression in Hep - 2 cells was analyzed with the Western Blot technique. FAK - siRNA lentivirus were transfected into Hep - 2 cells. Efficiency of transfection was detected by counting cells. Semi - quantitative analysis of the level of FAK - mRNA expression was performed using RT - PCR. The level of FAK protein expression was analyzed with Western Blot. Cell proliferation viability was tested by MTT assay. **Results** Western blotting results showed overexpression of three protein fragments of FAK in the Hep - 2 cells. The content of protein and mRNA of FAK in the FAK - siRNA lentivirus transfected Hep - 2 cells was obviously reduced compared with blank control cells. PI staining in the FAK - siRNA lentivirus transfected cell showed 30% ~ 35% of apoptotic cells in Hep - 2 cells. Comparing with the parental Hep2 cells, the transfected cells exhibited a slower growth rate. **Conclusion** Eligible FAK - siRNAs synthesized *in vitro* mediated with lentiviral vector can be highly effectively transfected into LSCC

基金项目: 潮州市科技计划资助项目 (2008GS07)

作者单位: 313000 浙江省湖州市中心医院病理科 (徐炜、顾栋桦、平金良); 五官科 (陈英武); 310058 杭州, 浙江大学医学院形态中心 (姚根有)

通讯作者: 顾栋桦, 电子信箱: huzhou_xuwei@126.com

cells, and induce post-transcriptional gene silencing.

Key words Laryngeal neoplasm; RNA interference; Focal adhesion kinase, FAK; Gene silence

RNAi 技术作为一个全新的抑制基因表达的技术,为肿瘤研究提供了新的策略和技术平台,尽管目前还处于探索阶段,但也取得了一些令人振奋的结果。RNA 干扰在哺乳动物细胞如人乳腺癌、宫颈癌等细胞中能成功地诱导特异性基因沉默,并在不同程度上有效地抑制肿瘤细胞的增生^[1,2]。

肿瘤细胞的侵袭性生长是一个多步骤的复杂过程,有多种生物化学因子参与其中。肿瘤细胞必须黏附于细胞外基质,通过促进依赖于 PTK 激酶活性的细胞外基质信号转导,进而影响细胞的黏附、运动与迁移。局部黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)介导的信号转导系统就是其中最为重要的细胞信号转导途径之一。FAK 是一种胞质内非受体酪氨酸蛋白激酶,在很多类型的组织细胞当中都有表达,对肿瘤的发生、发展、侵袭转移等起重要的调节作用^[4-8]。本研究通过构建 FAK 基因 RNAi 慢病毒载体,探讨其对 FAK 基因的沉默效应。

材料与方法

1. 细胞系与培养条件:人喉鳞状细胞癌细胞株 Hep-2 取自中科院上海细胞所,细胞在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养。

2. FAK-RNAi 慢病毒构建:根据哺乳动物真核细胞 siRNA 的 Tuschl AA-19nt 的设计原则,从 FAK 基因的 mRNA 序列中筛选 1 条 siRNAs 靶序列,并合成相应的正义和反义 DNA 链模板(上海吉凯)。利用 Ambion siRNA 在线软件设计了针对 FAK 的 siRNA: siFAK: 5'-GGGCAGACGAGACCACACTGA-3'; 错义对照序列: 5'-GCATCTAAGGTATCGTTG TGGCTC-3'。经 Blast 比对证实与人其他基因无同源性后构建合成 siRNA 表达载体,双启动子 U6 和 H1 之间插入人 FAK 及错义 siRNA 靶序列。用慢病毒载体介导的 siRNA 体内表达法合成 21nt 的双链 siRNAs,阳性克隆 PCR 鉴定,并挑选阳性克隆 FAK 菌液送测序。将慢病毒包装系统中 3 种质粒 DNA [pGCL-GFP 载体 20μg, pHelper 1.0 (gag/pol 元件)载体 15μg, pHelper 2.0 (VSVG 元件)载体 10μg],按上述比例制备成转染复合物,转染 293T 细胞,收集转染后 48h 的 293T 细胞上清液,将慢病毒的收获及浓缩,使用逐孔稀释效价测定法,测定慢病毒效价。FAK-RNAi 慢病毒转染 Hep-2 细胞,同时监测转染效率。

3. 实验分组:实验在 24 孔板中进行 RNAi 病毒感染实验。①PC 为未加任何处理的 Hep-2,不加病毒感染的细胞组;②FAK-NC 加 FAK-NC 病毒感染的细胞组;③FAK-RNAi 为加 FAK-RNAi 病毒感染的细胞组。

4. Hep2 细胞培养、传代和感染优化:①弃去旧培养液,加入 5ml 灭菌 PBS 溶液,轻轻晃动,洗涤细胞生长面,然后弃去 PBS 溶液;②加入 2ml 胰酶消化液,消化 1~2min 直到细胞完全消化下来;③加入含 10% 胎牛血清和 100U/ml 双抗的 1640 培养基 5ml,用刻度吸管吹打数次,将瓶壁上的细胞冲洗下来;④混匀细胞后分至两个新的培养瓶中,继续培养;⑤整个培养过程中,注意保持良好的细胞状态,细胞状态很大程度上影响了 Lentivirus 对于目的细胞的感染效率;⑥感染前一天,以 30%~40% 的融合度进行目的细胞的接种培养。感染当天,细胞融合度约为 60%~70%,加入 40μl(效价为 2×10⁸ TU/ml)的病毒;⑦12h 后观察细胞状态,如果没有明显的细胞毒性作用,待到 48h 以后更换为正常培养基。如果有明显的细胞毒性作用,12h 以后马上更换为正常培养基;⑧感染 3 天后首先观察报告基因绿色荧光蛋白 GFP 的表达情况,感染优化效率(荧光显微镜下一个视野中荧光细胞的个数/光学显微镜下一个视野中细胞的个数)大于 70%,收集总蛋白进入后续 Western Blot 的实验。

5. Western Blot 检测 FAK 蛋白的表达:①加入适量预冷的 6×Lysis Buffer;②用预冷的刮刀将细胞刮下,冰上裂解细胞 10~15min;③超声破碎仪破碎细胞(200W 共 4 次,每次 5s,间隔 2s);④4℃,12000g,离心 15min;⑤取上清,测蛋白浓度后,调整为 2μg/μl 的蛋白终浓度,取 20~40μg 蛋白,加入 6Xloading 上样缓冲液,100℃煮 5~10min;⑥SDS-PAGE:根据目的蛋白大小及表达丰度,取一定量蛋白总样品进行相应分离胶浓度的 SDS-PAGE。采用 Bio-Rad 电泳装置将总蛋白进行分离;⑦电转移:电泳结束后,使用转移电泳装置,在 4℃,400mA 恒流条件下电转移 120min,将蛋白样品转移到 PVDF 膜上;⑧封闭:用 TBST(TBS+0.05% Tween20)加 5% 牛奶配制封闭液。室温封闭 PVDF 膜 1h 或 4℃过夜;⑨一抗孵育:用含 5% 牛奶的 TBST 分别稀释内参 Actin 一抗。室温下与封闭好的 PVDF 膜孵育 2h 或 4℃过夜;⑩洗膜:TBST 洗膜 3 次,每次 10min;⑪二抗孵育:用含 5% 牛奶的 TBST 稀释与一抗相应的辣根过氧化物酶抗兔二抗。于室温下孵育 2h;⑫洗膜:TBST 洗膜 3 次,每次 10min。TBS 洗膜 1 次,10min;⑬ECL:采用 Amersham 公司 ECL+plusTM Western blotting system 试剂盒进行显色反应;⑭于暗房中曝光、显影、过水、定影。X 线片晾干待分析。

6. RT-PCR 检测 FAK 在 mRNA 水平的变化:总 RNA 抽提根据 Invitrogen 公司的 Trizol 操作说明书进行,均为 Rnase-free 操作。转染后的 35mm 细胞培养盘加入 1ml 的 Trizol;室温放置 5min;加入 200μl 氯仿,用力震荡 1min,室温 5min;4℃,12000r/min,20min 离心;从每管中吸取上清至另一 1.5ml eppendorf 管,加入 1/2 体积-20℃预冷的异丙醇,混匀后-20℃沉淀 20min;4℃,13000r/min 离心 20min 后,去上清;加

入 1ml 4℃ 预冷的 75% 乙醇,洗涤沉淀及离心管壁;4℃,13000r/min 离心 5min,弃上清;加入 50μl RNase-free 水,至完全溶解,进行紫外分析测定;样品 RNA 浓度均调整为 1μg/μl。RT-PCR 检测 FAK 的 mRNA 表达水平变化根据 Promega 公司的 M-MLV 操作说明书进行,均为 RNase-free 操作。RT-PCR 反应体系:1μl Oligo dT(0.5μg/μl) + 2μl Total RNA (1μg/μl) + 6μl DEPC-H₂O;上游引物:5'AGCGAGGAGTTGAATGGTG 3',下游引物:5'GACTGCTTGTGGCTGTGG 3',目的片段大小:150 bp。实验重复 3 次。

7. MTT Assay 检测凋亡细胞水平:病毒感染 5 天后,取出 96 孔培养板。加 15μl MTT 母液(浓度为 5mg/ml),37℃ 孵育 3h,将培养板倒扣在准备好的纸巾上,让培养基流下,用加样器将剩余的培养基吸干去除上清,每孔加 200μl DMSO 溶解紫色结晶。并同时加注 9 个空白孔(无细胞组),用作空白对照;振动培养板,使得 formazan 产物充分溶解。5min 后进行吸光值测定 OD490nm;预热酶标仪,一般在 30min 左右。将培养板放在酶标仪中,读取测试孔在 490nm 处的吸光值;490nm 测定

吸光值,进行数据分析和统计差异分析。

8. PI Staining 检测凋亡细胞数目:配制 10mg/ml 的荧光 PI 染色母液,以 1:1000 的比例稀释加入到细胞中去,将细胞置于 37℃ 二氧化碳培养箱中继续培养;待 PI 染料与凋亡细胞核结合 30min 后,从培养箱中取出细胞,用 PBS 洗 3 次,每次 10min;荧光显微镜 488nm 激发光下检测凋亡细胞细胞核着色情况,并拍照计数,进行统计分析。

9. 统计学处理:采用 SPSS 11.5 统计软件处理数据,各组比较均采用 *t* 检验。

结 果

1. Hep-2 细胞感染效率优化:Hep-2 细胞在正常培养基中就被 Lentivirus GFP 病毒感染,用含 5μg/ml Polybrene 的 Eni.S 代替培养基,可以提高感染效率 2~3 倍。图 1 所示 MOI = 10 时,细胞感染效率在 80% 左右,MOI = 20 时,细胞感染效率基本达到 100%,而且细胞亮绿,GFP 过量表达。

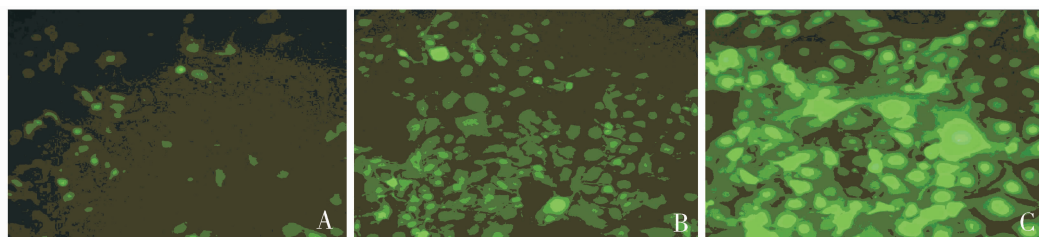


图 1 荧光显微镜观察优化 Hep-2 细胞的感染条件的模式图(×400)

A. MOI = 1; B. MOI = 10; C. MOI = 20

2. Western Blot 检测 FAK 蛋白的变化:Western Blot 检测转染前后 Hep-2 细胞的 FAK 蛋白表达发现,与不加慢病毒感染的细胞组相比,RNAi 慢病毒转染的细胞组中的 FAK 基因剪切体 1 蛋白表达明显减弱,其他 FAK 基因剪切体 2、3 蛋白无明显变化。NC 慢病毒感染的细胞组与不加慢病毒感染的细胞组相比,FAK 基因 3 个剪切体蛋白表达无明显变化,对照 β-Actin 蛋白在 3 组中没有变化,与多次重复实验中 FAK-RNAi 慢病毒对目的基因在 Hep2 细胞中始终具有显著 knockdown 作用(图 2)。

3. RT-PCR 检测 FAK 的 mRNA 表达:使用 RT-PCR 技术检测 FAK-siRNA 干扰人喉鳞状细胞癌细胞株(Hep-2)前后 FAK mRNA 的表达发现,NC 慢病毒感染的细胞组不论慢病毒的效价高低均与不加慢病毒感染的细胞组的 FAK mRNA 表达水平相近,RNAi 慢病毒感染的细胞组在慢病毒的高低两个效价下 FAK mRNA 表达量明显降低。GAPDH 在 3 组中的表达亮度无变化,说明 FAK-siRNA 慢病毒和阴性对照组对 3-磷酸甘油醛脱氢酶无干扰作用,

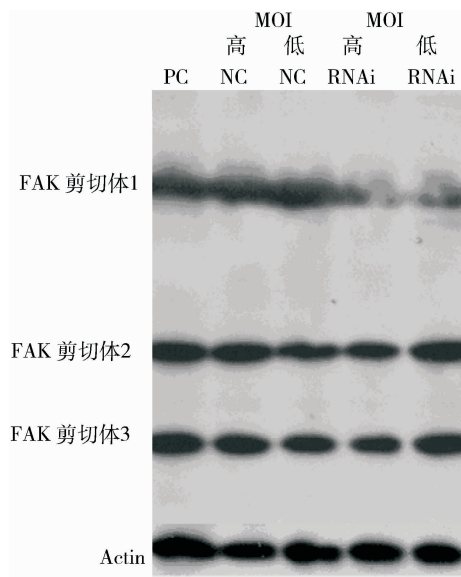


图 2 Western blot 检测 FAK-siRNA 干扰前后 FAK 蛋白的表达

与多次重复实验中,FAK-siRNA 慢病毒对目的基因,在 mRNA 水平有明显 knockdown 作用(图 3)。

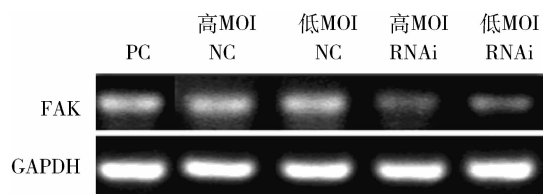


图3 RT-PCR 检测 FAK-siRNA 干扰前后 FAK mRNA 的表达

4. MTT Assay 检测细胞凋亡水平:细胞感染后,在荧光视野下可以看到所有细胞都带绿色荧光。由

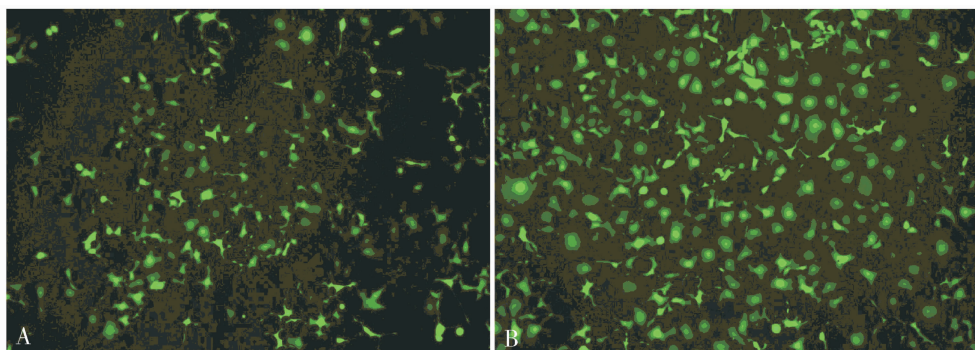


图4 荧光显微镜下观察($\times 200$)

A. FAK-siRNA 慢病毒感染 Hep-2 细胞;B. 阴性对照慢病毒感染 Hep-2 细胞

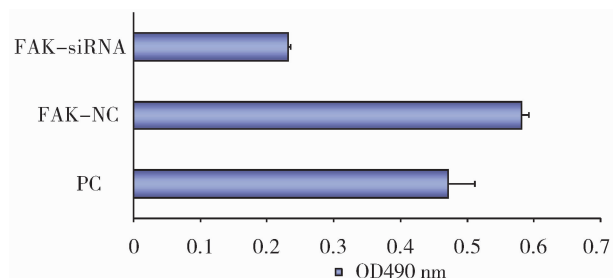


图5 各组吸光值 OD490nm 测定

力明显下降。

5. PI 染色检测细胞凋亡:PI 染料染色后,在激光共聚焦荧光显微镜 488nm 激发光下,可以看到 FAK-RNAi 组约 30% 细胞都带上了红色荧光,而空白对照组和阴性 RNAi 对照组的细胞红色荧光密度明显偏少(图 6)。两次平行实验,经过统计结果分析(每组 $n > 8$),可见 FAK-RNAi 组可以诱发 30% ~ 35% 的细胞进入凋亡(图 7)。

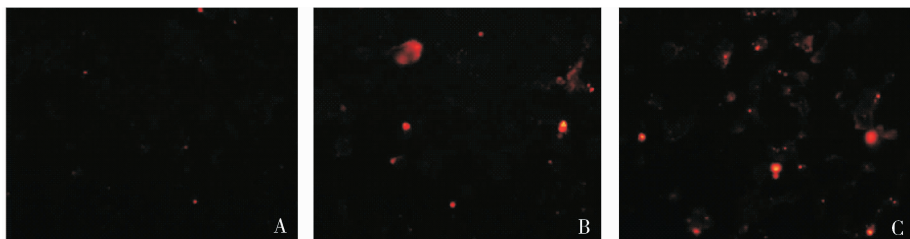


图6 激光共聚焦显微镜观察 PI 染色细胞凋亡($\times 200$)

A. PC 组;B. FAK-NC 组;C. FAK-siRNA 组

讨 论

黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)是 Hanks 等^[3]在 v-Src 转染的鸡胚细胞中发现的一种

胞质内非受体酪氨酸蛋白激酶,在很多类型的组织细胞当中都有表达,参与细胞的铺展、黏附、生长、迁移等生物学功能;在多种肿瘤中高表达或活性增强,对

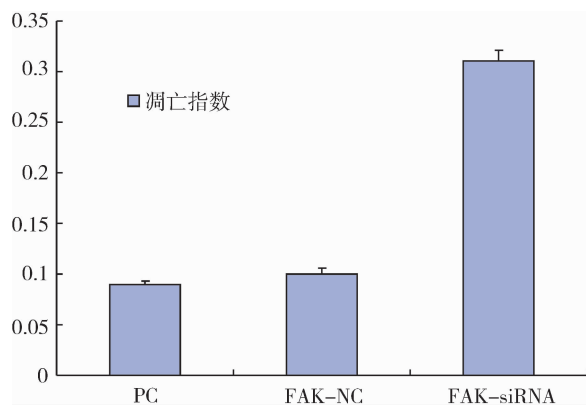


图 7 各组凋亡指数

肿瘤的发生、发展、侵袭转移等起重要的调节作用。用反义寡核苷酸、siRNA 或过表达 FAK 相关非激酶 (FAK-related nonkinase, FRNK) 抑制 FAK 的功能, 都可以使细胞的迁移、侵袭、生长和增生能力受到抑制^[5, 6]。Orr 等^[7]将 FAK Y397F 转染人内皮细胞, 由于 FAK 自主磷酸化部位 Y397 突变, 致使 FAK 无法活化, 从而起到阻断作用。有研究发现^[8], 在恶性的星型胶质瘤细胞 T98G 中, Y397 突变的 FAK 可以通过抑制 PI₃K 信号通路、激活 caspase-6 而促进细胞的凋亡。Leyton 等^[9]用蛙皮素处理非小细胞肺癌细胞 H1299, FAK 磷酸化程度增高且细胞的增生能力增强; 而反义 FAK 寡核苷酸处理后, 细胞的增生能力降低。FAK 在肿瘤细胞中是如何调节生长因子和整合素信号的具体机制还不完全清楚, 但可以肯定的是, 作为多种信号通路的枢纽, FAK 参与细胞多种功能的调节, 其表达量及活性的改变必然引起肿瘤细胞移动性、侵袭性、生长和增生能力的改变^[10-13]。

自从 2001 年 Elhashir 等^[14, 15]用 siRNA 在哺乳动物细胞中成功引发特异基因的沉默后, RNA 干扰技术以其高度的序列特异性、抑制基因表达的高效性、基因沉默的放大效应以及维持效应的长久性等优势特征, 广泛地应用于基因功能的研究领域。

本研究通过构建的针对人 FAK 靶向的 siRNA 慢病毒载体, 转染喉鳞状细胞癌细胞株 Hep-2, 从细胞的形态学、细胞的凋亡、基因的 mRNA 水平以及蛋白表达水平等几个方面进行干扰前、后的检测对比, FAK RNAi 组 30%~35% 的肿瘤细胞凋亡, 说明 FAK RNAi 干扰后导致 FAK mRNA 表达下调, 抑制了 FAK 蛋白表达则能降低细胞增生, 促进细胞凋亡, 使细胞具有去恶性的作用。而空白对照组及阴性对照组对 Hep-2 细胞生长无明显影响作用。干扰序列使

细胞中 FAK 蛋白表达减少, mRNA 水平减弱。这说明细胞的增生分裂与细胞中 FAK 蛋白表达及其 mRNA 水平密切相关, 同时也说明 FAK 基因在细胞的分裂增生以及细胞的凋亡过程中同样也起到关键的作用。实验结果显示针对人 FAK 靶向的 siRNA 对 FAK mRNA 具有敲低作用, 为说明 siRNA 干扰作用的特异性, 实验设计了阴性对照和不同剪切体, 即把设计干扰序列的 siRNA 序列中的碱基顺序打乱, 碱基的构成比未改变, 该序列扩增的 PCR 产物转染入细胞后未表现出对细胞生长的抑制作用。

本实验将 FAK-siRNA 慢病毒转染入 Hep-2 细胞, FAK-siRNA 慢病毒载体在 Hep-2 细胞中可获得高效转染, 并能产生特异性的基因沉默效应, 明显抑制 Hep-2 细胞的活力和阻滞细胞增生, 造成细胞裂亡可能是其抑制细胞增生的主要原因, 与 FAK 被抑制后 MMP-2 分泌减少和相关的信号传导系统可能也参加了这一调节过程。其继发反应及其相关信号网络的关系等仍需通过基因芯片等技术进行 RNA 组学的深入研究, 方能更详尽了解其作用机制。

参考文献

- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAi in mammalian cells. *Science*, 2002, 296: 550
- Garg M, Kanojia D, Suri S, Suri A. Small interfering RNA-mediated down-regulation of SPAG9 inhibits cervical tumor growth. *Cancer*, 2009, 115(24): 5688-5699
- Hanks SK, Ryzhova L, Shin NY, et al. Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci*, 2003, 8: d982-d996
- Hu W, Myers C, Kilzer J, et al. Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr Biol*, 2002, 12: 1301-1306
- Tomar A, Schlaepfer DD. A PAK-activated linker for EGFR and FAK. *Dev Cell*, 2010, 16: 18(2): 170-172
- Schwock J, Dhani N, Hedley DW. Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(1): 77-94
- Orr AW, Pallero MA, Xiong WC, et al. Thrombospondin induces RhoA inactivation through FAK-dependent signaling to stimulate focal adhesion disassembly. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 4883-4892
- Sakurai S, Sonoda Y, Koguchi E, et al. Mutated focal adhesion kinase induces apoptosis in a human glioma cell line T98G. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 26, 293(1): 174-181
- Leyton J, Garcia-Marín LJ, Tapia JA, et al. Bombesin and gastrin releasing peptide increase tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*, 2001, 162(1): 87-95

- 10 Huang J, Zheng DL, Qin FS, *et al.* Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 223 - 241
 - 11 Schwock J, Dhani N, Hedley DW. Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis. *Expert Opin Ther Targets*, 2010, 14(1): 77 - 94
 - 12 Zheng Y, Lu Z. Paradoxical roles of FAK in tumor cell migration and metastasis. *Cell Cycle*, 2009, 8(21): 3474 - 3479
 - 13 Hao H, Naomoto Y, Bao X, *et al.* Focal adhesion kinase as potential target for cancer therapy. *Oncol Rep*, 2009, 22(5): 973 - 979
 - 14 Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21 - and 22 - nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, 15(2): 188 - 200
 - 15 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21 - nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494 - 498
- (收稿: 2010 - 07 - 29)
(修回: 2010 - 09 - 25)

结直肠癌患者血清中可溶性 CD44V9 监测的意义

卢 敏 陈晓晴 叶乐驰 李宝清 徐永强 刘长宝

摘 要 目的 探讨结直肠癌患者血清中可溶性 CD44V9 的表达和临床意义。方法 应用 ELISA 法检测比较 27 例结直肠癌患者、13 例结肠腺瘤患者、20 例正常人血清中的可溶性 CD44V9 的水平。结果 结直肠癌患者血清中的可溶性 CD44V9 水平高于正常对照组, $P=0.012$; 腺瘤组与正常对照组无显著性差异, $P=0.108$ 。伴有远处转移的Ⅲ、Ⅳ期结直肠癌患者血清中可溶性 CD44v9 水平高于没有远处转移的Ⅰ、Ⅱ期结直肠癌患者, $P=0.015$ 。低分化、黏液腺癌的结直肠癌患者血清中可溶性 CD44v9 水平明显高于高中分化的结直肠癌患者, $P=0.018$ 。结论 血清中可溶性 CD44V9 是一种结直肠癌的诊断、有无转移及预后的较好指标。

关键词 结直肠癌 可溶性 CD44V9

The Significance of Soluble CD44V9 in the Patients with Colorectal Carinoma. Lu Min, Chen Xiaogin, Ye Lechi, *et al.* The Coloproctological Dept. of the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027

Abstract Objective To discuss the expression of serum soluble CD44V9 in the patients with Colorectal Carinoma and its significance. **Methods** The levels of soluble CD44V9 were determined by ELISA in 27 cases of colorectal carcinoma, 13 cases of colonic adenoma, and 20 cases of healthy controls. **Results** Serum soluble CD44V9 of colorectal carcinoma was much higher than of healthy control ($P=0.012$). Serum soluble CD44V9 of colonic adenoma was not significantly different from healthy controls ($P=0.108$). **Conclusion** The level of serum soluble CD44V9 is a good target in diagnosis, transfer judgement and prognosis predicting of the patients with colorectal carcinoma.

Key words Colorectal carcinoma; Soluble CD44V9

CD44 是一种细胞表面黏附分子, 已知其参与细胞和细胞、细胞与基质之间的特异性黏附过程。与细胞运动、肿瘤的发生、浸润和转移有密切的关系^[1]。CD44V9 是变构体之一, 由外显子 v9 编码, 目前有关 CD44V9 与大肠癌之间关系的研究较少, 本文就结直肠癌患者血清中可溶性的 CD44V9 的含量变化与大肠癌浸润、转移的关系做一探讨。

材料与方法

1. 标本来源: 所有的 27 例结直肠癌和 13 例结肠腺瘤患

者均为笔者医院住院的患者, 均经病理证实。其中结直肠癌中, 男性 21 例, 女性 6 例; 年龄 40 ~ 85 岁, 平均 63.07 ± 8.22 岁; 结肠腺瘤中, 男性 11 例, 女性 2 例; 年龄 29 ~ 70 岁, 平均 59.31 ± 6.5 岁; 20 例正常人标本由笔者医院体检中心提供。其中, 男性 10 例, 女性 10 例, 年龄 24 ~ 74 岁, 平均 44.6 ± 9.76 岁。

2. 主要试剂和仪器: 可溶性 CD44V9 试剂盒从上海蓝基生物科技有限公司购买。酶标仪为美国的 Biol - TEK ELX 808IU 型。

3. 检测方法: 所有标本都是清晨空腹下抽取患者的外周血, 迅速分离血清, -20°C 冻存。ELISA 操作按照试剂盒说明书, 将收集到的标本和试剂盒提供的标准品一次性检测, 同时设立复孔空白对照、阴性对照、阳性对照。根据标准品定值和吸光度值绘制标准曲线。测定管由标准曲线中查得含量。

基金项目: 温州市科技计划资助项目 (Y20100128)

作者单位: 325027 温州医学院第二附属医院肛肠科

通讯作者: 刘长宝, 电子信箱: wzlumin@163.com