

·基础研究·

慢病毒介导靶向 PRL-3 基因的 siRNA 抑制肝癌细胞的侵袭性

黄德好, 张琪, 李华, 陈伟, 陈规划*

(中山大学附属第三医院肝移植科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨肝再生磷酸酶-3(PRL-3)的表达对肝癌细胞侵袭能力的影响。【方法】设计、合成4对针对PRL-3基因 siRNA的寡核苷酸序列,分别构建质粒,转染293T细胞,据其对PRL-3的抑制率,筛选最有效的PRL-3基因RNAi靶序列,设计并合成其 siRNA的双链DNA Oligo,与含绿色荧光蛋白(GFP)编码基因的pGCL-GFP线性化载体连接产生重组慢病毒质粒LV-PRL3-SiRNA,并行PCR和测序鉴定。将LV-PRL3-SiRNA, pHelper 1.0和pHelper 2.0三种质粒DNA共转染293T细胞,包装产生慢病毒,以293T细胞GFP蛋白的表达水平经孔稀释法测定病毒滴度。重组慢病毒感染肝癌SMCC7721细胞,行real time-PCR和western-blot验证PRL-3基因的沉默效果。用Transwell侵袭试验检测SMCC7721细胞体外侵袭力的改变。【结果】成功构建PRL-3基因RNA干扰慢病毒载体并获得相应的慢病毒,浓缩病毒悬液的滴度为 6×10^8 Tu/mL。和对照组相比,RNA干扰组SMCC7721细胞PRL-3基因的mRNA水平和蛋白水平的抑制率分别为75%和63%;其穿过人工基底膜的平均数(14.2 ± 0.8)明显少于空白对照组(33.0 ± 1.6)及非特异性siRNA感染组(31.2 ± 0.8),侵袭抑制率为58% ($P < 0.01$)。【结论】降低PRL-3的表达可抑制肝癌细胞的侵袭能力。

关键词: RNA干扰; 慢病毒; PRL-3; 肝细胞癌

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)03-0309-06

Lentiviral-mediated siRNA against PRL-3 Suppresses Invasion Potency of Human Hepatocellular Carcinoma Cells

HUANG De-hao, ZHANG Qi, LI Hua, CHEN Wei, CHEN Gui-hua*

(Department of Liver Transplantation, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To construct recombinant lentiviral vector expressing siRNA targeting PRL-3 gene and explore its influence on invasive potency of infected hepatocellular carcinoma cell line SMCC7721. 【Methods】 Four sequences of siRNA targeting PRL-3 gene were designed, of which both sense and anti-sense DNA Oligo were designed, synthesized and corresponding plasmids were constructed. The most effective sequence of siRNA was screened by efficiency of PRL-3 gene knock-down in transfected 293T cells and its DNA Oligo was cloned into the pGCL-GFP vector, which contained coding gene of green fluorescent protein (GFP). The resulting recombinant lentiviral vector expressing siRNA targeting PRL-3 gene was called LV-PRL3-SiRNA, and it was confirmed by PCR and DNA sequencing. 293T cells were co-transfected with LV-PRL3-SiRNA, pHelper 1.0 and pHelper 2.0 and the lentivirus was produced. The titer of virus was tested according to the expression level of GFP in 293T cells. SMCC7721 cells were infected with recombinant lentivirus and the silencing effect of PRL-3 gene was assessed by real-time PCR and western-blot. The invasive activity of infected SMCC7721 cells was analyzed by Transwell invasion assay. 【Results】 Recombinant lentiviral vector expressing siRNA targeting PRL-3 gene was successfully established and confirmed by DNA sequencing. The recombinant lentivirus with the most effective PRL-3 gene knock-down were harvested from 293T cells with a viral titer of 6×10^8 Tu/mL. Results of real-time PCR and Western blot showed that compared with control group, PRL-3 expression in SMCC7721

收稿日期: 2009-07-19

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(国家973规划,2009CB522404)

作者简介: 黄德好,博士,主治医师,E-mail: zssyhdh@126.com; *通信作者: 陈规划,教授,博士生导师,E-mail: chgh1955@263.net

cells infected with LV-PRL3-SiRNA decreased by 75% and 63% at mRNA and protein level respectively. After PRL-3 gene was knocked down, invasion potency of SMCC7721 cells was significantly suppressed. 【Conclusions】 Down-regulation of PRL-3 expression can weaken invasion potency of hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

Key words: RNA interference; lentiviral; PRL-3; hepatocellular carcinoma

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(3):309-314]

早期血行播散及术后复发是肝细胞癌(HCC)预后不良的主要原因^[1]。关于 HCC 转移复发的具体机制尚未完全明了,因此寻找与其恶性进展密切相关的分子标志物显得意义重大。蛋白酪氨酸的磷酸化与去磷酸化分别受蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinases, PTKS)和蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTPs)的调节,是细胞生长、分化等生命活动的重要调节方式,这两种酶的作用失衡可导致蛋白酪氨酸的磷酸化水平异常,从而引起癌症等疾病的发生^[2]。PRL-3 属于 PTP 家族成员,近年研究发现它与人类多种恶性肿瘤的转移复发及不良预后有关^[3-5]。但 PRL-3 与 HCC 生物学行为间的关系尚未见报导。本研究通过慢病毒介导的 RNA 干扰技术抑制肝癌细胞中 PRL-3 的表达,观察肝癌细胞体外侵袭能力的改变,探讨 PRL-3 表达水平与肝细胞癌恶性生物学行为间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞 SMCC-7721、293T 细胞及大肠杆菌 DH5 α 由本院中心实验室保存。慢病毒包装系统由 pGC-LV 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体三质粒组成,购自吉凯公司,限制性内切酶 Age I 和 EcoR I、琼脂糖凝胶回收试剂盒及 T4 连接酶购自 New England Biolabs (NEB) 公司, PRL-3 鼠抗人多克隆抗体(ab503276)及鼠抗人 β -actin 单克隆抗体(英国 ABCAM 公司),HRP 标记羊抗鼠二抗、BCA 蛋白质定量试剂盒(美国 PIERCE 公司),胎牛血清(美国 GIBCO 公司),大量质粒 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司,细胞总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),SYBR Prime ScriptTM RT-PCR Kit(大连宝生物工程公司),细胞可溶性总蛋白提取试剂盒(美国 CST 公司),dNTP 及 Rnase Inhibitor 购自 Promega 公司。Oligo dT 购自上海生工,RNase-free 的物品都购自 Axygen。Matrigel (BD Pharmingen,

Bedford, USA), Transwell chambers (Corning, NY, USA)。

1.2 方法

1.2.1 构建表达 shRNA 慢病毒载体 选择 GeneBank 中人 PRL-3 基因编码区序列(NM-032611)作为分析序列。设计、合成 4 对针对 PRL-3 基因 siRNA 的寡核苷酸序列,使用 BLAST (Basic local alignment search tool)将选择的干扰序列和相应的基因组数据(人、小鼠、大鼠等)进行序列比对,确信所选序列与其他的基因不具有同源性。分别构建各干扰序列的表达质粒,转染 293T 细胞,据其对 PRL-3 基因的抑制率,确定最有效靶序列为:5'-GCTCACCTACCTGGAGAAA-3',设计并合成(上海吉凯基因化学技术公司)其 siRNA 的 DNA Oligo:5'-CCGGCAGCTCACCTACCTGGAGAAATTCAAGAGATTTCTCCAGGTAGGTGAGCTGTTTTTG-3'。阴性对照的核心序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3',以下称为 NC 序列,其 DNA Oligo:5'-GATCCCCTTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTT-3'。寡核苷酸经退火形成双链 DNA,经 T4 连接酶与 Age I 和 EcoR I 双酶切后的 pGCL-GF 线性化载体连接,形成表达 shRNA 的重组慢病毒质粒载体,并行酶切鉴定。用氯化钙制备新鲜的大肠杆菌感受态细胞,转化 DH5 α 大肠杆菌,挑取重组阳性克隆行 PCR 筛选,并作测序分析(上海吉凯基因化学技术有限公司)。PCR 鉴定阳性克隆的引物:上游引物:5'-CCTATTTCCCATGATTCCTTCATA-3';下游引物:5'-GTAATACGGTTATCCACGCG-3'。

1.2.2 慢病毒包装及滴度测定 以 Qiagen 公司的质粒抽提试剂盒对慢病毒包装系统中 3 种质粒即:表达最有效靶序列 siRNA 的重组慢病毒质粒载体 pGC-LV, pHelper 1.0, 及 pHelper 2.0, 分别进行高纯度无内毒素 DNA 抽提,质粒 DNA 溶于除菌的 TE 中,以紫外光吸收法测定其浓度及纯度,保证所提质粒 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间。按 Invitrogen 公司 Lipofectamine 2000 使用说明进行共转染 293T 细胞,转染后 8 h 更换为完全培养

基,培养48 h后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液,以293T细胞GFP蛋白的表达水平经孔稀释法测定病毒滴度。

1.2.3 SMCC-7721细胞分组及感染 细胞分为3组:SMCC771-CON,空白对照组(CON),未感染慢病毒的细胞;SMCC7721-NC,阴性对照组(NC),即阴性对照慢病毒LV-PRL3-SiRNA-neg感染的细胞组;SMCC7721-KD,基因敲除组(KD),被RNAi靶点病毒LV-PRL3-SiRNA感染的SMCC7721细胞。处于对数生长期的靶细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液将细胞悬液(细胞数约为 2×10^4)接种于12孔板中,37.0℃,体积分数为5% CO₂培养箱培养,待细胞融合度达到约30%,根据MOI值,按实验设计的组别分别加入RNAi慢病毒颗粒进行目的细胞的感染实验。待感染时间达到5 d后收集细胞抽提RNA及蛋白分别进行Real time PCR及western blot检测实验,进而判断靶点的干扰效果。

1.2.4 Real time PCR 收集上述3组SMCC-7721细胞,用PBS洗3次,按照试剂盒操作手册提取总RNA,用紫外分光光度法定量RNA。将等量的RNA反转录为cDNA第1链。SYBR Prime Script RT-PCR Kit(两步法)反转录反应条件如下:37.0℃ 15 min,85.0℃ 5 s。PRL-3上游引物:5'-GATGGC ATCACCGTTGTGGA-3',下游引物:5'-CGTACTTC ATCCCGCTCTCAAT-3',以 β -actin基因为内对照,上游引物:5'-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3',下游:5'-AGGGGCCGACTCGTCATACT-3'。将PCR反应液加入Real Time PCR用反应管中:95.0℃ 15 s,1个循环;95.0℃ 5 s,60.0℃ 30 s,45个循环。定量的方法以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (C_t 代表循环阈值)表示基因的表达量,以加阴性对照病毒LV-PRL3-SiRNA-neg感染的细胞为对照细胞,公式如下: $\Delta\Delta C_t = (C_{t(\text{target gene})} - C_{t(\beta\text{-actin})})_{\text{感染细胞}} - (C_{t(\text{target gene})} - C_{t(\beta\text{-actin})})_{\text{对照细胞}}$,以上实验重复3次。

1.2.5 Western blot 细胞收集后加入RIPA裂解液及蛋白酶抑制剂PMSF,冰上孵育30 min,4℃ 14 000 × g,30 min离心,将上清移至一新的EP管中,Bradford法测定蛋白质浓度,并分装。取20 μg蛋白质,与2 × SDS上样缓冲液1:1混合,沸水煮10 min,置冰上2 min,行12% SDS-PAGE电泳。电泳完毕后,PAGE胶上的蛋白质用Bio-Rad微型电转移系统于4℃、100 mA电转移1.5 h至PVDF

膜上。PVDF膜用20 mL封闭液(含50 g/L脱脂奶粉的TBST)室温孵育1 h,倒去封闭液,加入兔抗人PRL-3多克隆抗体(1:1 000稀释)4℃孵育过夜,25 mL TBST洗膜3次,每次5 min,加入HRP标记的抗兔二抗室温孵育1 h,TBST洗膜3次,25 mL × 5 min。膜稍滴干后加入化学发光试剂孵育1 min,迅速用保鲜膜包好后置于暗盒内与KoDak X-胶片贴在一起曝光,曝光时间1 min。X线胶片经显影、定影后扫描记录。以 β -actin为内对照。以上实验重复3次。

1.2.6 体外Transwell侵袭实验 在每个Transwell小室的多聚碳酸酯膜(孔径为8 μm)上涂布35 μg(50 μL/孔)Matrigel,制成人工基底膜,并用PBS洗去多余的配体。各组SMCC-7721细胞用含5 mL/L胎牛血清的RPMI-1640培养基培养过夜后,胰酶消化并用无血清RPMI-1640培养基洗涤两次,然后用含5 mL/L胎牛血清的RPMI-1640培养基重悬成密度为 1.0×10^6 /mL的细胞悬液。每个Transwell小室的上室加入0.1 mL这种细胞悬液(约 1.0×10^5 个细胞),下室加入0.6 mL含100 mL/L胎牛血清的RPMI-1640培养基。按常规培养72 h,取出小室并丢弃上室液体,用棉签仔细擦去膜上未侵袭的细胞及人工基底膜胶,以40 g/L多聚甲醛液固定。Hematoxylin and eosin(HE)染色后,于显微镜下计数侵袭到膜下面的细胞。200倍光镜随机选择5个视野计数,取平均值。

1.2.7 统计学方法 应用SPSS 13.0统计分析软件,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm S$)表示,两个样本均数比较应用 t 检验,多个样本均数比较应用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PRL-3 shRNA 重组慢病毒载体PCR及DNA测序鉴定

PRL-3 shRNA重组慢病毒载体质粒转化DH5 α 大肠杆菌,挑取重组阳性克隆行PCR鉴定。阳性重组细菌克隆的PCR产物343 bp(从载体中切掉24 bp),以经双酶切后没有插入片段的pGC-L空载体PCR产物306 bp为对照,鉴定结果与预期相符(图1)。测序结果表明插入片段与设计的PRL-3 shRNA核苷酸序列完全一致,未发现有突

变、缺失、插入等异常存在,表明已经成功地构建 PRL-3 基因特异性 siRNA 的重组慢病毒载体并命名为 LV-PRL3-siRNA(图 2)。作为阴性对照的 PRL-3 基因非特异性 siRNA 重组慢病毒载体并命名为 LV-PRL3-siRNA-neg。

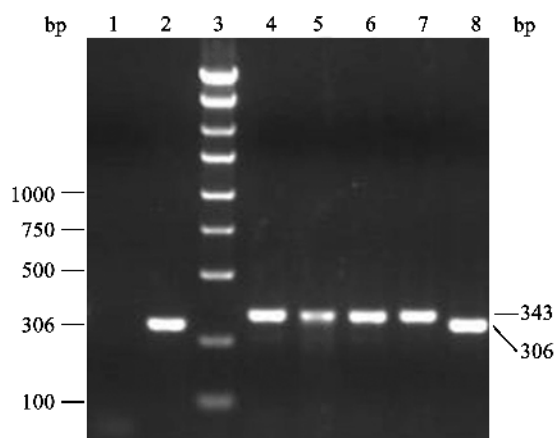


图 1 PCR 鉴定重组慢病毒干扰载体的细菌阳性克隆
Fig.1 Positive clones of recombinant lentivirus interference vector expressing siRNA targeting PRL-3 confirmed by PCR

1: Negative control (ddH₂O); 2: Control of empty vector (306 bp); 3: Marker; 4,5,6,7: positive clones (343 bp); 8: negative clone (306 bp)

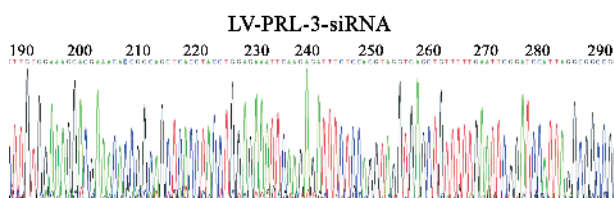


图 2 重组慢病毒干扰载体的 DNA 测序结果
Fig.2 Sequencing results of recombinant lentivirus interference vector

2.2 重组慢病毒滴度及 SMCC7721 细胞的感染

以 293T 细胞 GFP 蛋白的表达水平经孔稀释法测得慢病毒浓缩液滴度为 6×10^8 Tu/mL,说明有大量质粒转入 293T 细胞,病毒成功包装。在复感指数 MOI 为 20 时,根据绿色荧光显微镜下能发出绿色荧光的细胞比例判断,重组慢病毒对基因敲除组细胞(KD)及阴性对照组细胞(NC)感染率均在 95% 以上。空白对照组(CON)内未观察到绿色荧光蛋白表达阳性的细胞(图 3)。

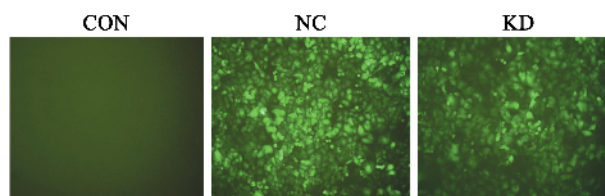


图 3 绿色荧光显微镜下的 SMCC7721 细胞
Fig.3 SMCC7721 cells of different groups observed under fluorescence microscope after infected by recombinant lentivirus or not

CON: control; NC: negative control; KD: knock down; Original magnification is $\times 100$

2.3 重组慢病毒感染 SMCC7721 细胞后 PRL-3 mRNA 的表达

荧光定量 PCR 的结果显示,基因敲除组细胞(KD)中 PRL-3 mRNA 表达量仅为阴性对照组细胞(NC)的 25%,即干扰率为 75%,而阴性对照组与空白对照组细胞(CON)之间的 PRL-3 mRNA 表达水平无统计学差异($P > 0.05$)。说明与阴性对照病毒 LV-PRL3-siRNA-neg 相比,RNAi 靶点病毒 LV-PRL3-siRNA 对 SMCC7721 细胞中 PRL-3 基因的表达有显著敲减效果($P < 0.05$,图 4)。

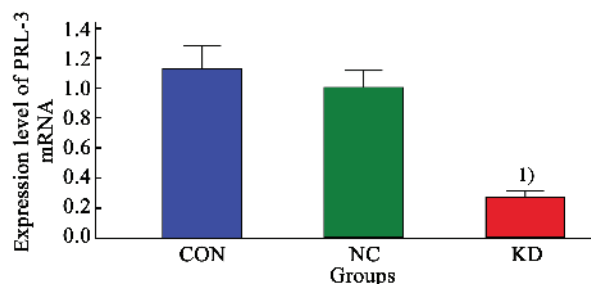


图 4 Real-time PCR 检测各组 SMCC7721 细胞中 PRL-3 mRNA 表达情况

Fig.4 PRL-3 mRNA expression in different cell lines of SMCC7721 analyzed by real-time PCR ($^1P < 0.05$)

CON: control; NC: negative control; KD: knock down; 1) $P < 0.05$ vs NC group

2.4 重组慢病毒感染 SMCC7721 细胞后 PRL-3 蛋白的表达

Western blot 结果与荧光定量 PCR 结果相一致,基因敲除组细胞(KD)中 PRL-3 蛋白表达量仅为阴性对照组细胞(NC)的 37.64%,即抑制率为 62.36%,而阴性对照组与空白对照组细胞(CON)之间的 PRL-3 蛋白表达水平无统计学差异($P > 0.05$)。说明与阴性对照病毒 LV-PRL3-siRNA-neg

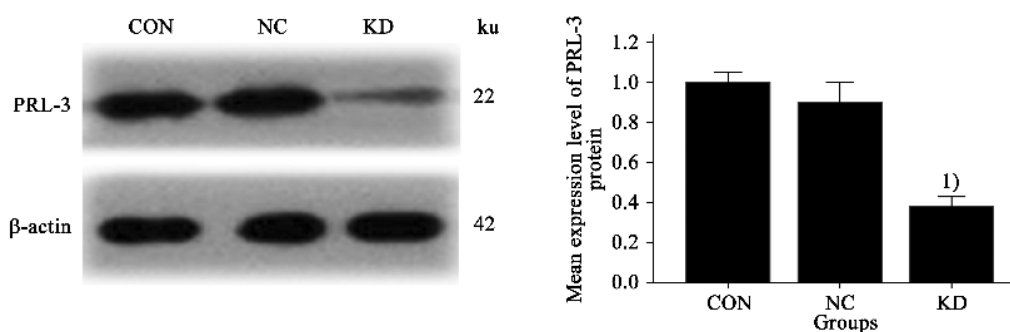


图5 Western Blot 检测各组 SMCC7721 细胞中 PRL-3 蛋白表达水平

Fig.5 PRL-3 protein expression in different cell lines of SMCC7721 analyzed by Western blot

CON: control; NC: negative control; KD: knock down; 1) $P < 0.05$ vs NC group

相比, RNAi 靶点病毒 LV-PRL3-siRNA 对 SMCC7721 细胞中 PRL-3 基因的蛋白水平表达有显著抑制效果 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.5 RNA 干扰对 SMCC-7721 细胞侵袭能力的影响

PRL-3 特异性 siRNA 感染的 SMCC-7721 细胞穿过人工基底膜的平均细胞数 (14.2, $S = 0.8$) 明显少于空白对照组 (33.0, $S = 1.6$) 及非特异性 siRNA 感染组 (31.2, $S = 0.8$), 侵袭抑制率为 58%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 6)。

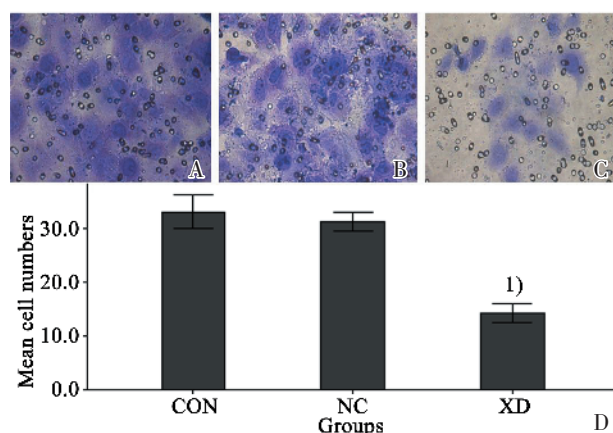


图6 RNA 干扰对 SMCC7721 细胞体外侵袭能力的影响

Fig.6 Impact of PRL-3 knock-down on invasion potency of SMCC7721 cells assayed using Transwell chambers

CON: control; NC: negative control; KD: knock down; Original magnification is $\times 200$, (1) $P < 0.05$. The SMCC7721-KD cells (Fig. C) showed significantly reduced invasiveness as compared with parental SMCC7721 (Fig. A) and SMCC7721-NC cells (Fig. B) ($P < 0.05$). Fig. D exhibited the mean number of cells which had migrated through the filters in different groups.

3 讨论

Saha 等^[6]首次发现 PRL-3 过表达与结直肠癌

的转移有关。他们用基因表达系列分析法 (serial analysis of gene expression, SAGE) 发现 PRL-3 在正常结直肠黏膜上皮不表达, 在进展期结直肠癌组织中中度表达, 而在结直肠癌肝转移灶中持续高度表达。后来的研究发现 PRL-3 过表达对胃癌淋巴结^[7]或腹膜转移^[5], 以及乳腺癌的远处淋巴结转移^[4]均有独立的预测价值。在卵巢癌中, PRL-3 过表达与肿瘤转移无关, 但与其分期密切相关^[8]。Wu 等^[9]发现 PRL-3 在肝癌组织中的表达明显高于正常肝组织, 但有关 PRL-3 表达水平对肝癌细胞生物学行为影响的研究尚未见报导。

PRL-3 过表达与肿瘤转移复发的关系在细胞水平也已得到验证。Zeng 等^[10]最先证明 PRL-3 过表达能提高细胞的致瘤性与转移能力。他们发现无转移特性的中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO) 在过表达 PRL-3 以后, 在体外表现出增强的迁移和侵袭能力, 而且经裸鼠尾静脉注射这种细胞能促进广泛的肺和肝转移瘤的形成。Wu 等^[9]发现 PRL-3 在高转移性的黑色素瘤细胞 B16-BL6 中高表达, 而在低转移性的黑色素瘤细胞 B16 中低表达。将 PRL-3 cDNA 转染到 B16 细胞, 发现 PRL-3 过表达 B16 细胞由上皮样变为纤维样, 表现出体外迁移、侵袭、扩散及增殖能力的增强, 并能在裸鼠体内促进黑色素瘤的生长和肝、肺转移瘤的形成。Qian 等^[11]用 RNA 干扰技术下调 B16-BL6 细胞中 PRL-3 表达水平后, 发现细胞的体外粘附及迁移能力明显降低; 体内实验发现 PRL-3 表达下调明显抑制了肿瘤的生长及局部淋巴结侵犯, 并延长了荷瘤鼠的生存时间。

RNA 干扰技术是近几年发现和发展起来的新兴基因阻断技术, 通过内外源性双链 RNA 触发同源性 mRNA 的降解, 从而使该基因表达沉默。基

因治疗的临床应用及其效果依赖于载体系统的优化及转染效率的提高。慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体,来源于人类免疫缺陷病毒(HIV-1),具有可感染分裂期与非分裂期细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点,因此成为携带干扰RNA理想载体^[12]。在本研究中,我们用慢病毒介导 PRL-3 特异性 siRNA 感染肝癌 SMCC7721 细胞后,PRL-3 在 mRNA 和蛋白水平的表达均明显下调。Matrigel 的成份类似于体内基底膜,为了评价 PRL-3 是否和肝癌细胞的侵袭能力有关,我们用 Transwell 体外侵袭试验检测 PRL-3 表达下降后细胞侵袭行为的改变。结果发现,与空白对照组及阴性对照组相比,PRL-3 特异性 siRNA 感染组细胞由于 PRL-3 表达水平下调而导致其体外侵袭能力明显下降。

本研究的结果初步提示我们 PRL-3 可能在肝细胞癌的侵袭转移过程中起重要作用。目前对 PRL-3 的作用底物及其促进癌细胞侵袭转移的机制尚未明了,有研究发现可能与 PI3K-Akt, STAT3-Rho, Csk/Src 及 p53 等信号传导通路有关^[13-16]。进一步研究 PRL-3 在肝癌中的作用及机制,将为其成为肝细胞癌转移复发的预测指标和治疗中的作用靶点提供理论基础。

参考文献:

- [1] Hsu HC, Wu TT, Wu MZ, et al. Tumor invasiveness and prognosis in resected hepatocellular carcinoma. Clinical and pathogenetic implications [J]. *Cancer*, 1988, 61(10): 2095-2099.
- [2] Li L, Dixon JE. Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases [J]. *Semin Immunol*, 2000, 12(1): 75-84.
- [3] Peng L, Ning J, Meng L, et al. The association of the expression level of protein tyrosine phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(9): 521-526.
- [4] Radke I, Gotte M, Kersting C, et al. Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(3): 347-354.
- [5] Li ZR, Wang Z, Zhu BH, et al. Association of tyrosine PRL-3 phosphatase protein expression with peritoneal metastasis of gastric carcinoma and prognosis [J]. *Surg Today*, 2007, 37(8): 646-651.
- [6] Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, et al. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer [J]. *Science*, 2001, 294(5545): 1343-1346.
- [7] Miskad UA, Semba S, Kato H, et al. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric carcinomas; close correlation with invasion and metastasis [J]. *Pathobiology*, 2004, 71(4): 176-184.
- [8] Polato F, Codegioni A, Fruscio R, et al. PRL-3 phosphatase is implicated in ovarian cancer growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(19 Pt 1): 6835-6839.
- [9] Wu X, Zeng H, Zhang X, et al. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(6): 2039-2054.
- [10] Zeng Q, Dong JM, Guo K, et al. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2716-2722.
- [11] Qian F, Li YP, Sheng X, et al. PRL-3 siRNA inhibits the metastasis of B16-BL6 mouse melanoma cells in vitro and in vivo [J]. *Mol Med*, 2007, 13(3-4): 151-159.
- [12] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(1): 76-85.
- [13] Fiordalisi JJ, Keller PJ, Cox AD, et al. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to promote invasion and motility [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3153-3161.
- [14] Liang F, Liang J, Wang WQ, et al. PRL3 promotes cell invasion and proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5413-5419.
- [15] Wang H, Quah SY, Dong JM, et al. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(7): 2922-2926.
- [16] Basak S, Jacobs SB, Krieg AJ, et al. The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(3): 303-314.

(编辑 徐杰)