

·基础研究·

## 慢病毒携带 shRNA 抑制 CR-1 基因表达对 CNE-2 细胞特性的影响

吴正蓉<sup>1</sup>, 吴立蓉<sup>3</sup>, 姚开泰<sup>2\*</sup>

(南方医科大学 1. 南方医院病理科//基础医学院病理学系//教育部广东省共建人类重大疾病转录组学和蛋白组学重点实验室//广东省分子肿瘤病理重点实验室, 2. 基础医学院肿瘤研究所, 广东 广州 510515; 3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006)

**摘要:**【目的】应用慢病毒介导的 RNA 干扰(RNAi)技术,有效沉默鼻咽癌细胞 CNE-2 的 CR-1 基因表达,研究 CR-1 对鼻咽癌细胞生物学行为的影响。【方法】构建针对 CR-1 的 siRNA 慢病毒表达载体 [含 H1 启动子和绿色荧光蛋白(GFP)]。利用包装细胞 293FT 生产慢病毒,感染鼻咽癌细胞 CNE-2, 流式筛选 GFP 阳性细胞。应用荧光定量 PCR、Western blot 检测病毒感染后 CNE-2 细胞中 CR-1 基因的 mRNA 和蛋白表达,获得干扰 CR-1 基因的细胞群。并用 MTT 法、平板克隆形成实验及 Boyden 侵袭小室观察 CR-1 干扰后对 CNE-2 细胞生物学行为的影响。【结果】PCR 和测序证实,成功构建了 CR-1 shRNA 的慢病毒载体 pLVTHM-shCR-1。荧光定量 PCR 和 Western blot 结果表明,所获得的细胞中 CR-1 mRNA 及蛋白表达水平较阴性对照组、空白对照组均显著降低( $P < 0.05$ )。CR-1 干扰后的细胞生长明显减慢,克隆形成能力减弱,侵袭运动能力下降。【结论】通过 RNAi 技术阻断 CR-1 的表达,可抑制 CNE-2 细胞的生长、增殖、迁徙,提示 CR-1 在鼻咽癌的发生、发展过程中起重要作用。

**关键词:** RNA 干扰; 慢病毒; CR-1; 鼻咽癌

**中图分类号:** R739.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2009)06-0671-06

### Inhibition of CR-1 Expression by Lentivirus Mediated shRNA Modulates Biological Features of Human Nasopharyngeal Carcinoma CNE-2 Cells

WU Zheng-rong<sup>1</sup>, WU Li-rong<sup>3</sup>, YAO Kai-tai<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pathology, Nanfang Hospital // Department of Pathology, School of Basic Medicine // Key Laboratory of Transcriptome and Proteome for Human Major Diseases supported by the Ministry of Education and Guangdong Province // Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Tumor Pathology, 2. Institute of Cancer Research, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 3. Department of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the effect of CR-1 down-regulation by lentivirus-mediated RNA interference (RNAi) silencing technique on the biological features of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2. 【Methods】 A lentiviral vector for RNAi of CR-1, which contained H1 promoter and green fluorescent protein (GFP) was constructed. Package cells 293FT was used to produce virus stocks. Then CNE-2 cells were infected with the recombinant lentivirus and the cells with CR-1 knock-down were selected by FACS for GFP expression. CR-1 expression in the cells was determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. The proliferative and invasive ability of CNE-2 cells were evaluated by MTT methods, the colony-forming unit assay and transwell migration assay, respectively. 【Results】 PCR and DNA sequencing demonstrated that the lentivirus RNAi vector of cripto-1 (pLVTHM-shCR-1) was constructed successfully. Clones of CNE-2 cells infected with the recombinant

收稿日期: 2009-03-21

基金项目: 国家自然科学基金省部联合基金(1060006)

作者简介: 吴正蓉, 博士研究生, 讲师, 主要从事分子病理学研究, E-mail: wuzr@yahoo.cn; \* 通信作者, 姚开泰, 院士, E-mail: ktyao@fimmu.com

lentivirus were selected and exhibited substantial knock-down of *CR-1* mRNA and protein expression compared with the control groups. The proliferation, colony-forming ability and invasive ability of treated CNE-2 cells were inhibited *in vitro*. [Conclusion] The lentivirus-mediated shRNA of *CR-1* is efficient in down-regulating *CR-1* expression and diminishing the growth, proliferation and invasiveness of CNE-2 cells, suggesting that *Cripto-1* might have an oncogene role in the tumorigenesis and progression of NPC.

**Key words:** RNA interference; lentivirus, *CR-1*; nasopharyngeal carcinoma

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2009, 30(6): 671-676]

人 *CR-1* (*Cripto-1*), 是表皮生长因子-CFC (epidermal growth factor-*Cripto-1*/FRL1/cryptic, *Cripto* in humans, FRL1 in *Xenopus*, and cryptic in mice, EGF-CFC) 家族成员, 不仅在肿瘤中过表达, 而且通过促进细胞增殖、迁移、侵袭、上皮-间质转化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 和血管形成等在肿瘤的发生、发展中发挥癌基因的重要作用<sup>[1-3]</sup>。我们前期发现相对于永生鼻咽上皮细胞 NP69, 鼻咽癌细胞株中 *CR-1* 表达水平均上调; 不同鼻咽癌细胞株间, 其表达在高分化鳞状细胞癌细胞系 CNE-1 中最低, 在低分化但高转移能力的 CNE-2 及 C666-1 细胞中最高。鼻咽癌组织中 *CR-1* 的阳性表达率无论在 mRNA 水平还是蛋白水平均明显高于慢性鼻咽炎组 ( $P < 0.05$ )。提示鼻咽癌与其他癌组织一样存在 *CR-1* 高表达, 且 *CR-1* 基因表达可能与鼻咽癌的转移及分化程度有关, 说明 *CR-1* 在鼻咽癌发病过程中可能发挥作用 (结果另文报道)。但 *CR-1* 在鼻咽癌中确切的作用机制还不清楚, 因此本研究中, 我们应用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术, 选用鼻咽癌细胞株 CNE-2 作为研究对象, 构建 *CR-1* shRNA 的慢病毒表达载体, 将其转染至 CNE-2 细胞内, 观察 shRNA 对 *CR-1* 基因有无阻抑作用, 并探讨其对 CNE-2 细胞生物学行为的影响及可能的作用机制, 探寻 *CR-1* 与鼻咽癌病变发生发展之间的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 细 胞 鼻咽癌细胞株 CNE-2 为南方医科大学肿瘤研究所保存。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; DNase I 购自 Roche 公司; 逆转录及荧光定量试剂盒购自大连宝生物 (TaKaRa) 工程有限公司。慢病毒包装系统 (由肖广辉教授惠赠) 包括

pLVTHM、psPAX2 和 pMD2.G 质粒, 其中 pLVTHM 含有能持续表达小 RNA 的元件, 同时能表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP), psPAX2 和 pMD2.G 含有病毒包装所必须的元件。Lipofectmine™ 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA marker、质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 质粒中提试剂盒购自 Qiagen 公司; *CR-1* 抗体购自美国 R&D 公司,  $\beta$ -actin 抗体及 HRP 标记的抗鼠二抗购自武汉博士德公司; 增强型化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司; 其它常规试剂均购自北京鼎国生物技术有限公司; 大肠杆菌 JM109、病毒包装细胞 293FT 均由本室保存。

### 1.2 方 法

1.2.1 引物及干扰片段的设计与合成 *CR-1* 及内参  $\beta$ -actin 基因 PCR 引物采用 Primer 5.0 软件设计, 由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列: *CR-1* 上游引物 5'-GATACAGCACAGTAAGGAGC-3', 下游引物 5'-TAGTCTGGAGTCCTGGAAG-3', 目的产物 286 bp;  $\beta$ -actin 上游引物 5'-CACCCAGCACAATGAAGAT-3', 下游引物 5'-CAAATAAGCCATGCCAAT-3', 目的产物 255 bp。人工合成一对针对 *CR-1* 基因的 (*CR-1* mRNA nt190, GenBank NM\_003212) 互补并编码相应短发夹状 siRNA 的寡核苷酸链 (由上海英骏生物技术有限公司合成): 正义链 5'-CGCGTCGCAATGACTCTGAATTAAAGTTCAAGAGACTTTAATTCAGAGTCATTGTTT TTGCCAT-3' 和反义链 5'-CGATGGCCAAAAA CAATGACTCTGAATTAAGTCTCTTGAACCTTAAAT TCAGAGTCATTGCCA-3' (内含 *Mlu* I 和 *Cla* I 酶切位点)<sup>[4]</sup>。

1.2.2 慢病毒表达载体 pLVTHM-sh*CR-1* 的构建与鉴定 针对 *CR-1* 基因 shRNA 的 DNA Oligo 寡核苷酸序列, 经退火形成双链 DNA, 与经 *Mlu* I 和 *Cla* I 双酶切后的 pLVTHM 载体在 T4 DNA 连接

酶作用下于 16 °C 连接过夜。连接产物转化 JM109 大肠杆菌,挑取重组阳性克隆行 PCR 及测序鉴定(北京华大生物技术有限公司)。PCR 鉴定阳性克隆的上游引物:5'-GTGTCAGTACGGCGGAACAC-3';下游引物:5'-TTATCCCATGCGACGGTATC-3'。阳性重组细菌克隆的 PCR 产物为 273 bp(插入片段为 63 bp),而阴性克隆(双酶切后但没有插入片段的 pLVTHM 空载体)的 PCR 产物为 210 bp。

1.2.3 慢病毒包装 用胰蛋白酶消化对数生长期的 293FT 细胞,将  $2 \times 10^6$  的细胞数重新接种于 10 cm 的培养皿,于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,细胞密度达 60% ~ 70% 时用脂质体 Lipofectmine™ 2000 介导转染以获得重组的慢病毒。转染 6 ~ 8 h 后弃去含有转染混和物的培养液,换完全培养基,继续培养 48 h,收集转染 72 h 后的 293FT 细胞上清液,于 4 °C  $4\,000 \times g$  离心 10 min,将病毒悬液以 0.45 μm 滤器过滤分装后置于 -80 °C 冰箱中保存。

1.2.4 病毒滴度测定 参照文献[5]测定病毒滴度。

1.2.5 筛选稳定干扰 CR-1 表达的细胞克隆  $2 \times 10^5$  CNE-2 细胞接种于 6 孔板,待其融合达 30% ~ 50%,用慢病毒感染细胞,以含无关干扰片段的慢病毒为阴性对照,48 h 后倒置荧光显微镜下观察绿色荧光。2 周后采用流式细胞分选术(fluorescence activated cell sorter, FACS)获得 GFP+ 细胞。分选的细胞用荧光定量 PCR 和 Western blot 方法鉴定,CR-1 稳定表达沉默的细胞亚系命名为 CNE-2/GFP+/CR-1<sup>-</sup>,阴性对照亚系命名为 CNE-2/GFP+/mock。

1.2.6 荧光定量 PCR 方法检测 mRNA 表达 待细胞长至状态良好,铺满瓶壁后,用预冷的 PBS 洗 2 遍,加入 Trizol 试剂常规提取细胞总 RNA,提取的 RNA 用 DNase I 去除痕量基因组 DNA。按照 TaKaRa(PrimeScript™ RT Reagent Kit)逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应。以 β-actin 为内对照,检测干扰前后靶基因表达变化。应用 Mx3000P 定量 PCR 仪进行 Real-time quantitative RT-PCR 实验,检测各模板的 Ct 值,阴性对照以 DNase/RNase-free H<sub>2</sub>O 为模板。以  $Folds=2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示实验组与对照组目的基因表达的倍比关系,公式如下:  
 $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{target gene}) - Ct(\beta\text{-actin})]$  转染细胞-

$[Ct(\text{target gene}) - Ct(\beta\text{-actin})]$  对照细胞。干扰率 =  $1 - 2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$ 。重复 3 次实验,计算平均值。

1.2.7 Western blot 方法检测蛋白表达 参照文献[2]检测 CR-1 的蛋白。

1.2.8 MTT 检测细胞生长曲线的变化 消化下实验组与对照组细胞,按  $3 \times 10^3$  /孔的数量接种于 96 孔培养板,设 7 个时间点(1、2、3、4、5、6、7 d),每个点设 6 个复孔,RPMI1640 培养液(含体积分数 10% 胎牛血清,无抗生素) 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下培养。至各时间点,每孔加入 0.5 g/L 噻唑蓝溶液(MTT)溶液 20 μL,继续孵育 4 h,吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO),酶标仪 490 nm 吸光度读取数值  $[D(490 \text{ nm})]$ 。以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线。重复实验 3 次。

1.2.9 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力 将对数生长期的细胞经胰蛋白酶消化成单个细胞悬液并计数,调整细胞数为  $1 \times 10^5$  /mL,以 200 个/孔接种于 6 孔板,并使细胞分散均匀。实验分为 CNE-2/GFP+/CR-1 组、CNE-2/GFP+/mock 对照组和 CNE-2 空白组。每组设 3 个复孔,置 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,静止培养 14 d 至 6 孔板出现肉眼可见的克隆。PBS 洗涤后加纯甲醇 1 mL 固定 15 min,吉姆萨液染色。将培养板置于显微镜低倍数下计数大于 50 个细胞的克隆数,按公式计算克隆形成率:克隆形成率(%) = 克隆数/接种数  $\times 100\%$ 。

1.2.10 Boyden 侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力 将浓度为 0.5 g/L Matrigel 人工基质胶 20 μL 铺于 Transwell 侵袭小室聚碳酸酯微孔膜(孔径 8 μm)的上表面,37 °C 放置 30 min 使其凝聚。Transwell 上室中分别加入已消化重悬的各组细胞 100 μL ( $1 \times 10^8$  /L),下室中分别加入 600 μL 对应的条件培养上清液。37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h 后取出,PBS 洗涤,棉签去除滤膜上层细胞,将已经侵入并贴附于微孔膜下层的细胞固定并用吉姆萨液染色,显微镜下直接观察穿过膜的细胞数。随机计数 5 个视野,计数每个视野内穿过 8 μm 微孔的细胞数。以侵袭细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。重复实验 3 次。

### 1.3 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 15.0 统计软件

进行单因素方差分析,采用 SNK 法进行两组间比较。

## 2 结 果

### 2.1 阳性克隆的 PCR 鉴定

PCR 鉴定阳性克隆,鉴定结果与预期相符(图 1)。测序结果表明合成的 CR-1shRNA 寡核苷酸链序列插入正确(109 ~ 171),此时命名慢病毒重组载体为 pLVTHM-shCR-1。

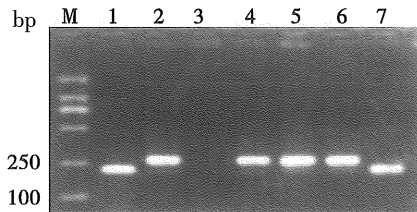


图 1 重组质粒 pLVTHM-shCR-1 的筛选

Fig.1 The screening of recombinant pLVTHM-shCR-1 plasmid

M: Marker; Lane 1: clone transfected by pLVTHM (control, 210 bp); 2,4-6: positive clones of pLVTHM-shCR-1(273 bp); 7: negative clones of pLVTHM-shCR-1(210 bp)

### 2.2 慢病毒载体的包装及滴度测定

将包装好的慢病毒颗粒梯度稀释后转染 293FT 细胞,倒置荧光显微镜下可见 GFP 的表达,观察各孔中表达 GFP 的 293FT 阳性细胞数,病毒滴度为表达 GFP 的细胞数乘以相应稀释倍数,测定滴度为  $4.2 \times 10^5$  TU/mL。

### 2.3 慢病毒感染 CNE-2 细胞

感染后 48 h 倒置荧光显微镜下可见 GFP 的

表达,2 周后 FACS 分选 GFP<sup>+</sup> 细胞,分选后细胞纯度达到 98% 以上(图 2)。

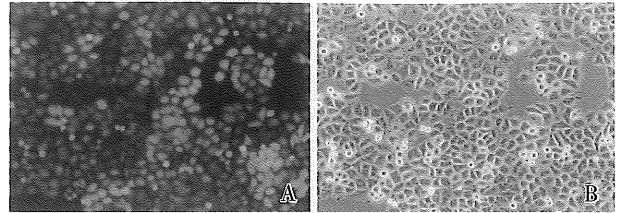


图 2 FACS 分选后慢病毒感染的 CNE-2 细胞图

Fig.2 CNE-2 cells after lentivirus transfection displaying green fluorescence after FACS

A: fluorescent microscope; B: light microscope; Original magnification,  $\times 200$

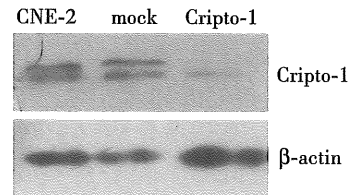


图 3 Western blot 检测干扰后 CR-1 蛋白表达情况

Fig.3 Expression of CR-1 protein after RNAi detected by Western blot analysis

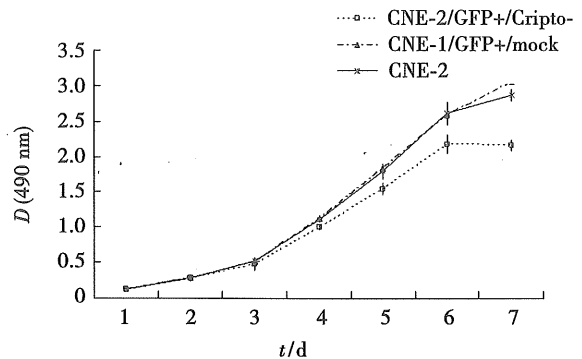


图 4 各组细胞的生长曲线

Fig.4 Growth curves of 3 cell lines

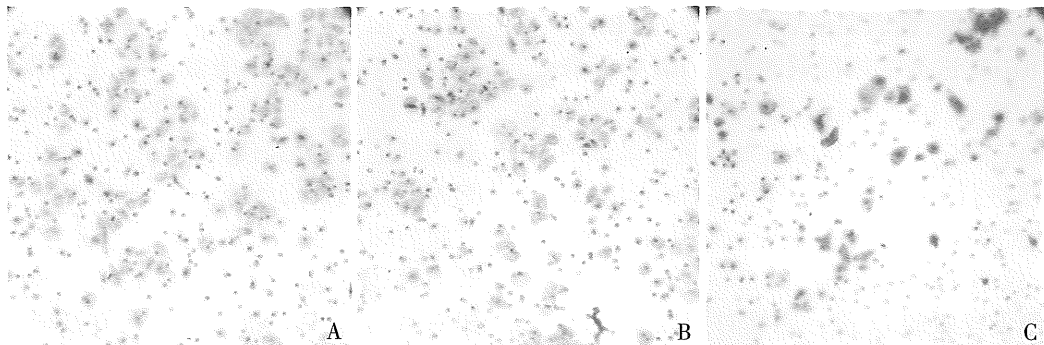


图 5 Boyden 小室检测细胞体外侵袭能力

Fig.5 Cell invasions detected with modified Boyden chambers

A: CNE-2; B: CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock; C: CNE-2/GFP<sup>+</sup>/Cripto-1<sup>-</sup>; toluidine blue staining, Original magnification,  $\times 200$

## 2.4 荧光定量 PCR 检测

荧光定量 PCR 的结果显示, 熔解曲线分析未见杂峰, 说明扩增产物单一-特异, 没有非特异性扩增。通过公式计算, 干扰细胞的 CR-1 mRNA 表达量仅为对照的 13.76%, 即干扰效率为 86.24%。将干扰细胞命名为 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup>, 将阴性对照病毒感染细胞命名 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock。

## 2.5 Western blot 检测

CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 细胞 CR-1 蛋白的表达明显低于两对照组 ( $P < 0.01$ ), 而两对照组之间 CR-1 蛋白的表达无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。进一步表明合成的针对 CR-1 基因的 shRNA 片段, 能特异性下调 CNE-2 细胞的 CR-1 蛋白表达(图 3)。

## 2.5 MTT 细胞生长曲线的变化

经 MTT 检测, 与 CNE-2 和 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock 细胞相比, CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 细胞的增殖速度明显减慢, 三组差异有统计学意义 ( $F = 19.932, P = 0.00$ ), CR-1 表达抑制后细胞生长受抑(图 4)。

## 2.6 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

3 组细胞培养 2 周后均有克隆形成, CNE-2 组克隆形成率为  $(67.0 \pm 2.8)\%$ ; CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock 组克隆形成率分别为  $(72.3 \pm 4.9)\%$ ; CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 组克隆形成率为  $(51.7 \pm 3.1)\%$ 。CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 组克隆形成率较对照组明显减少, 差异有显著意义 ( $F = 25.475, P = 0.001$ ), CNE-2 和 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock 组之间无明显差异。表明 CR-1 表达下调后降低了 CNE-2 细胞克隆形成能力, 细胞增殖活性受抑。

## 2.7 Boyden 侵袭小室模型测定细胞体外侵袭能力

3 组细胞在 Boyden 侵袭小室中 24 h 穿膜细胞数比较, CNE-2 组、CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock 组与 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 组穿膜细胞数分别为  $101.4 \pm 4.5$ 、 $99.6 \pm 4.0$ 、 $41.6 \pm 5.9$ , 与另两组比较, CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 组穿膜细胞数明显减少 ( $F = 240.723, P < 0.01$ ; 图 5), 而 CNE-2 和 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock 组比较无统计学差异, 表明抑制 CR-1 表达后可降低 CNE-2 细胞的体外侵袭能力。

## 3 讨论

目前认为遗传因素、爱波斯坦-巴尔病毒 (Epstein Barr virus, EBV) 感染、某些环境化学促癌

物和/或致癌物因素与鼻咽癌的发生发展有关<sup>[6]</sup>。由于鼻咽癌是一种低分化、高转移性恶性肿瘤, 侵袭和转移仍是导致鼻咽癌患者死亡的主要原因, 且治疗后 5 年生存率始终在 60% 以下, 因此探索鼻咽癌病因及其癌变的分子机制具有重要意义。我们前期的工作证实鼻咽癌与其他已报道癌组织一样存在 CR-1 高表达, 但其在鼻咽癌中确切的作用及机制还不清楚。本研究中, 我们首先成功构建了含有 GFP 报告基因、特异性干扰 CR-1 基因的慢病毒载体。重组病毒颗粒感染 CNE-2 后, 利用流式分选 GFP<sup>+</sup> 细胞筛选出稳定干扰 CR-1 表达的鼻咽癌细胞亚系, 经 mRNA 和蛋白水平验证后, 命名为 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup>。这为进一步了解 CR-1 在鼻咽癌发生发展中可能的作用, 提供了有效工具。

多项体内及体外实验均显示 CR-1 主要是通过促进细胞增殖、生存、迁徙及侵袭, 在肿瘤发生发展中发挥重要的癌基因作用。过表达 CR-1 的人 MCF-7 乳腺癌细胞生长速率增快及软琼脂克隆形成能力增加<sup>[7]</sup>; 在鼠乳腺组织中过表达人 CR-1 基因导致乳腺发生增生和腺癌的改变<sup>[2]</sup>。本研究中, 相对于 CNE-2 和 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock, CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 的生物学行为发生了明显的变化。MTT 实验及平板克隆形成实验结果显示, 在抑制内源性 CR-1 表达后, 细胞生长减慢; 克隆形成能力下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示 CR-1 可促进鼻咽癌细胞的生长和增殖。

作为公认的癌基因, CR-1 不仅在肿瘤中表达, 而且与肿瘤转移潜能密切相关<sup>[8]</sup>。Giardiello 等<sup>[9]</sup>报道在原发结肠癌及肝脏转移中 Cripto-1 mRNA 的表达率分别是 68.2% (30/44) 和 61.8% (21/34), 而在正常组织则仅为 1.5% (1/65)。此外, 相对于原发瘤, 在淋巴结转移中 CR-1 的表达水平亦明显增加。Strizzi 等<sup>[10]</sup>报道 CR-1 在促进和增加 EMT 相关标志物及信号分子的表达上起重要作用。有研究发现 Wnt/b-catenin/Lef-1 信号通路可能和 CR-1 信号通路存在相互作用, 从而调节细胞黏附和迁移<sup>[11]</sup>。本研究中, 体外 Boyden 侵袭小室 24 h 穿膜细胞数比较, 相对于 CNE-2 组和 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock 组, 在 CR-1 表达受到抑制后, CNE-2/GFP<sup>+</sup>/CR-1<sup>-</sup> 细胞的侵袭能力显著下降, 而 CNE-2 和 CNE-2/GFP<sup>+</sup>/mock 组比较无统计学差异, 表明 CR-1 能促进肿瘤细胞的运动、迁徙、侵袭

能力。

尽管 *CR-1* 与肿瘤发生发展密切相关,但其中的确切机制还不清楚。在胚胎发生时,*CR-1* 主要是作为转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 家族成员 Nodal 的共受体, 激活 Nodal/ALK4/ALK7/Smad-2 信号通路而发挥作用。而作为癌基因,*CR-1* 还可通过 Nodal 非依赖的信号通路, 促进细胞生存、增殖、运动、侵袭及肿瘤血管发生。已经证实的 Nodal 非依赖的信号通路主要有两条: ras/raf/mitogen-activated protein kinase (MAPK) 通路和 phosphatidylinositol 3' kinase (PI3K)/Akt 通路<sup>[12]</sup>。通过和硫酸类肝素蛋白多糖: 磷脂酰肌醇聚糖-1 (glypican-1) 的结合, *CR-1* 激活酪氨酸激酶、c-Src 进而触发 MAPK 和 Akt 这两条胞内信号通路。此外, 还有文献报道 *CR-1* 的表达与整合素、转录因子 Snail 的活性之间亦存在正向关联<sup>[11,13]</sup>。

上述实验结果表明, *CR-1* 参与了鼻咽癌的发生及演进, 抑制其表达可抑制 CNE-2 细胞的生长、克隆形成及侵袭能力。这为深入理解鼻咽癌发病的分子机制、寻找分子治疗靶标提供了实验依据和新线索。对于 *CR-1* 在鼻咽癌中的发挥作用所涉及的信号通路我们将利用有效沉默其表达的 CNE-2/GFP+/*CR-1*- 细胞进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Bianco C, Normanno N, Salomon DS, et al. Role of the Cripto (Egf-Cfc) family in embryogenesis and cancer [J]. Growth Factors, 2004, 22(3): 133-139.
- [2] Sun Y, Strizzi L, Raafat A, et al. Overexpression of human Cripto-1 in transgenic mice delays mammary gland development and differentiation and induces mammary tumorigenesis [J]. Am J Pathol, 2005, 167(2): 585-597.
- [3] Bianco C, Strizzi L, Ebert A, et al. Role of human Cripto-1 in tumor angiogenesis [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(2): 132-141.
- [4] Gray PC, Shani G, Aung K, et al. Cripto binds transforming growth factor beta (Tgf-Beta) and inhibits tgf-beta signaling [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(24): 9268-9278.
- [5] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors [J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 241-245.
- [6] 宗永生, 吴秋良, 林素暇, 等. Eb 病毒相关性疾病病理学研究的进展 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(5): 481-487.
- [7] Normanno N, De Luca A, Bianco C, et al. Cripto-1 overexpression leads to enhanced invasiveness and resistance to anoikis in human mcf-7 breast cancer cells [J]. J Cell Physiol, 2004, 198(1): 31-39.
- [8] Strizzi L, Bianco C, Normanno N, et al. Cripto-1: A multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis [J]. Oncogene, 2005, 24(37): 5731-5741.
- [9] Ciardiello F, Kim N, Saeki T, et al. Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(17): 7792-7796.
- [10] Ertoy D, Ayhan A, Sarac E, et al. Clinicopathological implication of cripto expression in early stage invasive cervical carcinomas [J]. Eur J Cancer, 2000, 36(8): 1002-1007.
- [11] Strizzi L, Bianco C, Normanno N, et al. Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from Mmtv-Cripto-1 transgenic mice [J]. J Cell Physiol, 2004, 201(2): 266-276.
- [12] Ebert AD, Wechselberger C, Frank S, et al. Cripto-1 induces phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent phosphorylation of akt and glycogen synthase kinase 3beta in human cervical carcinoma cells [J]. Cancer Res, 1999, 59(18): 4502-4505.
- [13] Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, et al. Emerging roles of nodal and cripto-1: from embryogenesis to breast cancer progression [J]. Breast Dis, 2008, 29(8): 91-103.

(编辑 徐杰)