恶性肿瘤的分子诊断 文章编号:0253-3626(2011)06-0641-04

shRNA干扰 PARG 对大肠癌 CT26 细胞粘附因子表达的影响

颜佳欣，王娅兰，吴伟强，潘 娟
（重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨小鼠大肠癌 CT26 株中聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[Poly(ADP-ribose)glycohydrolase，PARG]对细胞间粘附因子表达的影响及其可能的机制。方法：以慢病毒为载体对 CT26 细胞株中 PARG 基因进行 RNA 沉默干扰，并筛选出稳定表达株。Realtime-PCR 法检测沉默效果。Western blot 法检测 CT26 细胞 PARG、PARP、NF-κB 和 Pi-AKT(473)、ICAM-1、P-selectin 的蛋白表达。结果：实验组与对照组(包括阴性对照组、空载体对照组)相比，PARG、PARP、Pi-AKT(473)、NF-κB、ICAM-1、P-selectin 表达经统计学分析差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论：在大肠癌细胞株中，抑制 PARG 可以通过调节与 NF-κB 有关通路，进一步调节 ICAM-1、P-selectin 等细胞粘附因子。提示 PARG 在肿瘤癌栓形成过程中可能具有重要作用。

【关键词】PARG；慢病毒转染；AKT 磷酸化；细胞粘附
【中国图书分类法分类号】R364 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-02-20

Influence of shRNA interfering with PARG on the expression of cell adhesion fact

YAN Jia-xin, WANG Ya-lan, WU Wei-qiang, PAN Juan
(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clarify the possible mechanism of how PARG and PARP are to regulate intercellular adhesion factor through relevant signal pathways. *Methods*: Lentivirus carried shRNA interfered with the expression of PARG and steadily silenced cell lines. Realtime-PCR was used for testing the strength of shRNAi and Western blot was used to test the expressions of PARG, PARP, NF-κB, and Pi-AKT(473), and LY249002 was served as Pi-AKT inhibitor. *Results*: The expressions of PARG, PARP, and NF-κB, ICAM-1, P-selectin in shRNAi group were weaker than those in the control groups (blank control and transfected with empty vector control group); whereas Pi-AKT increased in the shRNAi group($P<0.05$). *Conclusion*: The results suggest that PARG gene silencing may regulate NF-κB related signaling pathway and the intercellular adhesion factors such as ICAM-1 and P-selectin, which are reduced.

【Key words】poly(ADP-ribose)glycohydrolase; lentiviral transfection; AKT phosphorylation; cell adhesion

聚(腺苷二磷酸核糖)[Poly(ADP-ribose)，PAR]化是一种由 DNA 损伤介导的引起的迅速的细胞化学反应。在这一过程中的主要生物学功能是由聚(腺苷二磷酸核糖)聚合酶[Poly(ADP-ribose)polymerase，PARP]调节形成 ADP 聚合物从而修复 DNA 损伤。ADP 聚合物形成之后，其中的糖苷键立即被聚(腺苷二磷酸核糖)水解酶[Poly(ADP-ribose)glycohydrolase，PARG]所分解。目前对 PARG 研究的文献较多集中在炎症调节方面，应用 PARG 抑制剂后能显著降低细胞因子的产生，明显改善脊髓创伤后的炎症反应，卒中、缺血等疾病[1,2]。先前的研究显示在大肠癌细胞 LOVO 株中，PARP 与大肠癌的侵袭、转移有着密切的联系[3]，用 5-AIQ 抑制小鼠大肠癌 CT26 细胞 PARP，可降低癌细胞上相关粘附因子的表达[4]。而在炎症过程中，应用 PARG 抑制剂丹宁酸不仅可以降低 PARG 的含量，同时也可降低 PARP 的含量[5]，我们先前的研究也证明了这一观点[6]，但在大肠癌中 PARG 如何影响癌细胞之间、癌细胞与正常细胞的粘附，乃至介导癌栓的形成，尚不清楚。

众所周知，磷脂酰肌醇-3-羟基激酶/丝氨酸，苏氨酸激酶(PI3K/AKT)是细胞向膜内信号转导的重要途径。AKT 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，属于 AGC 蛋白激酶超家族。包括 AKTl/PKBα、AKT2/PKBβ 和 AKT/PKBγ 3 个亚型。有文献报道，在多种肿瘤细胞中 PI3K/AKT 表达较正常细胞上调，提示 PI3K/AKT 可能在肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭、转移中扮演重要角色。有较多文献[7,8]中提到在病理状态下，PARP 抑制可通过 AKT 磷酸化(Phosphorylation-AKT，Pi-AKT)的形式来调节下游因子。然而在肿瘤中，抑制 PARG 对 Pi-AKT

作者介绍：颜佳欣(1982-)，男，硕士，
研究方向：大肠癌浸润转移机制。
通信作者：王娅兰，女，教授，Email：wangyalan074@126.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目(编号：NSFC30870946)。

的作用如何尚未有确切文献。

粘附分子是介导细胞与细胞或细胞与基质间结合的一类大分子。目前，众多的医学研究显示在炎症中细胞间粘附分子-1（Intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1）P 选择素（P-selectin）受核转录因子-κB（Nucleartranscript factor-κB，NF-κB）的调节。ICAM-1 是一种分子量为 76~114 kD 的单链跨膜糖蛋白，可识别并与附着其表面的特异性受体发生相互粘附现象，参与免疫调节及炎症反应等。Chen CC 等[9]的研究表明应用 NF-κB 的抑制剂 pentoxilline 可降低结肠癌细胞中 ICAM-1 的表达，并显著降低癌细胞与内皮细胞的粘附。Tozawa 等[10]用金硫葡糖抑制 NF-κB 后发现 ICAM-1 和选择素家族明显受到抑制。P-selectin 又称 CD62P、GMP-140，是一个分子量 140 kD 的富含半胱氨酸、高度糖化的整合蛋白质，其中主要由植物凝集素区（lectin 区）参与细胞之间粘附作用。然而在肿瘤中，抑制 PARG 对粘附因子表达的影响如何，还未见确切报道。

本研究对小鼠大肠癌细胞 CT26 株转染 PARG-shRNA 慢病毒，干扰其 PARG 的表达，以未转染的 CT26 细胞为对照，观察 PARG 抑制后 PARP、NF-κB 和 Pi-AKT 以及 ICAM-1、P-selectin 表达的变化，初步探讨小鼠大肠癌 CT26细胞中PARG 抑制对粘附分子表达的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

小鼠大肠癌细胞 CT26 株（四川大学魏于全教授惠赠）。慢病毒转染载体、TurboGFP、嘌呤霉素（Sigma 公司），Realtime-PCR 及逆转录试剂盒（Takara 公司），引物由北京赛百盛公司合成，辣根酶标记山羊抗兔、抗鼠二抗（北京中杉金桥生物技术公司），抗 PARG 抗体（Abcam 公司），抗 PARP 抗体（Santa Cruz 公司），抗 Pi-AKT 抗体（Santa Cruz 公司），抗 β-actin 抗体（博士德生物工程有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 小鼠大肠癌细胞 CT26 置于含有 10%小牛血清，100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640（Hyclone 公司）培养液中，37℃，5%CO_2 条件下培养。

1.2.2 CT26 细胞的转染 转染具体步骤按慢病毒转染试剂说明书（Sigma 公司）进行：取处于对数生长期的 CT26 细胞于 96 孔板中，每孔约 6×10^3 个，RPMI1640 培养液培养 1 d后约长满显微镜下 50%视野。此时将其分为实验组、空载体对照组。2 组均加入终浓度为 8 mg/L 的海锡溴铵（Hexadimethrine bromide）轻轻摇匀后，实验组孔中按 2 μl/ml 终浓度标准加入搭载 PARG-shRNA 的慢病毒，空载体对照组孔中亦按相同终浓度加入未搭载 PARG-shRNA 的慢病毒体外壳，48 h 后换液，嘌呤霉素终浓度 5 mg/L 筛选 3 次，待生长稳定后收集细胞检测 PARG 沉默效果并培养待用。

1.2.3 实验分组 取处于对数生长期的 CT26 细胞各 10^4 个于 6 孔板中，并设置 4 个分组：实验组（shRNAi）、空载体对照组（*Transfected with empty vector*）、未作任何处理的 CT26 细胞作为阴性对照组（Blank control）、实验组 CT26 细胞加 Pi-AKT 抑制剂LY294002作为Pi-AKT抑制组（shRNAi+LY249002）。shRNAi+LY294002 组与实验组处理暂时相同，待此组细胞长至 80%视野后，按终浓度 10 μmol/L 加入 LY294002。

1.2.4 CT26 细胞 PARG 沉默效果的检测 （1）采用 Realtime-PCR 法检测 PARG mRNA 的表达。步骤如下：以 NCBI GenBank 为索引设计 PARG 引物 Forward primer：5'-AACTTCTGCGCCGACTGCCT-3'；Reverse primer：5'-AACGAGGTGGCGTTGCCTCT-3'。选取 GAPDH 为内参，Forward primer：5'-CGTGAAGGTGGGTGTGAACGGA-3'；Reverse primer：5'-TGTTAGTGGGGTCTCGCTCCTG-3'。进行 BLAST 序列分析无误后委托合成（北京赛百盛公司）。按每组（5~6）$\times10^6$ 个细胞提取细胞总 RNA。凝胶电泳检测样品 RNA 无降解，然后测定光密度值确定样本中 RNA 含量。以此为模板 42℃下 15 min 逆转录合成 cDNA。PCR 反应按 Takara 公司试剂说明书上 25 μl 体系进行，取 cDNA 与试剂在冰盒上混匀，两步法设置反应条件：95℃ 30 s；39 个循环（95℃ 5 s；60℃ 30 s）。用 Bio-Rad MiniOpticon（Bio-Rad 公司）进行反应并由 CFX 软件生成扩增、溶解曲线。

（2）采用 Western blot 法检测 PARG 表达的变化。分组与上述相同分为阴性对照组、空载体对照组、实验组。其主要步骤为，每组培养瓶里收集 CT26 细胞约（5~6）$\times10^6$ 个，提取细胞总蛋白后采取 BCA 法测蛋白浓度。8%SDS-PAGE 凝胶垂直电泳，采用半干转法将蛋白转至硝酸纤维素膜上，5%脱脂奶粉封闭，分别加入抗 PARG、β-actin（浓度比分别为 1:1 000、1:500），4℃ 过夜，加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 或兔抗羊 IgG（根据不同的一抗），ECL 试剂检测膜上的免疫反应条带，凝胶成像仪下观察，并用图像分析软件（Quantity One）进行吸光值分析，在每种蛋白中（即同一条带中），以阴性对照组目的蛋白与相对应 β-actin 吸光度的比值校正为 100%标准。每项检测重复 3 次。

1.2.5 Western blot 法检测 NF-κB 的表达 孵育 NF-κB、β-actin 一抗时浓度比分别为：1:1 000、1:500。其余方法条件与上述相同。每项检测同样重复 3 次。

1.2.6 Western blot 法检测 PARP、Pi-AKT、ICAM-1、P-selectin 的表达 孵育 PARP、Pi-AKT（473）、ICAM-1、P-selectin、β-actin一抗时浓度比分别为：1:1 000、1:2 000、1:1 000、1:1 000、1:500。余与上同。

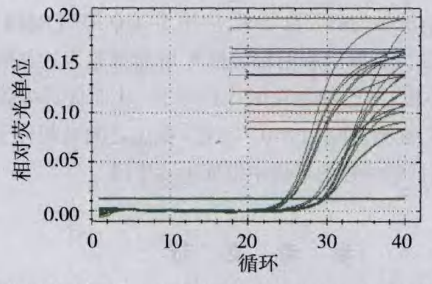
1.3 统计学方法

Realtime-PCR 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析，得出盒形图。各组基因 CT 值、Western blot 中蛋白吸光灰度值，在方差齐性的条件下，采取 LSD 法方差分析进行两两比较，以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。shRNAi+LY294002 组蛋白表达和实验组进行独立样本 t 检验。方差分析和 t 检验采用 SPSS13.0 统计分析软件对数据进行分析，$P<0.05$ 为差异具统计学意义。

2 结 果

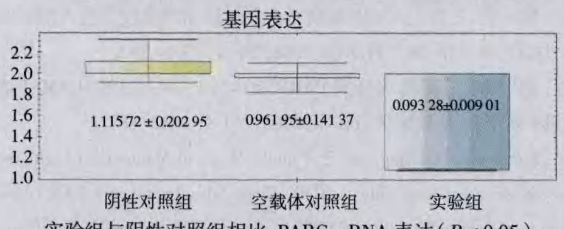
2.1 CT26 细胞沉默效果的鉴定

2.1.1 CT26 细胞转染筛选后 PARG mRNA 表达变化 阴性对照 CT26 细胞 PARG mRNA 表达量为 1.115 72±0.202 95，空载体转染组为 0.961 95±0.141 37，实验组为 0.093 28±0.009 01。实验组 PARG mRNA 表达与阴性对照组、空载体转染组比较，差异均有统计学意义（$P<0.01$），而空载体转染组 PARG mRNA 表达与阴性对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），表明 shRNA 慢病毒成功干扰 PARG 的表达，且慢病毒载体本身对 PARG mRNA 的表达无明显影响（如图 1、2 所示）。



黑色线段标注 1（×3）：阴性对照组 PARG mRNA；黑色线段标注 2（×3）：阴性对照组 GAPDH mRNA；蓝色线段标注 1（×3）：空载体对照组 PARG mRNA；蓝色线段标注 2（×3）：空载体对照组 GAPDH mRNA；红色线段标注 1（×3）：实验组 PARG mRNA；红色线段标注 2（×3）实验组 GAPDH mRNA

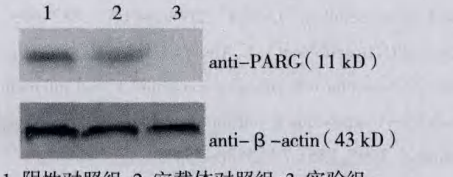
图 1 CT26 细胞 shRNAi 后各组 PARG mRNA 的扩增曲线



实验组与阴性对照组相比，PARG mRNA 表达（$P<0.05$），空载体对照组与阴性对照组相比（$P>0.05$）

图 2 CT26 细胞 shRNAi 后各组 PARG mRNA 的表达变化

2.1.2 CT26 细胞 shRNAi PARG 后蛋白表达量的变化 实验组 CT26 细胞 PARG 的表达与阴性对照组、空载体对照组相比显著降低（$P<0.05$），空载体对照组蛋白表达与阴性对照相比较无显著差异（$P>0.05$），表明慢病毒成功沉默 PARG 蛋白表达，且载体本身对 PARG 蛋白表达无明显影响（如表 1、图 3 所示）。

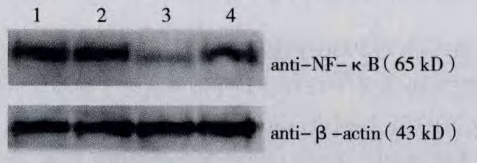


1. 阴性对照组；2. 空载体对照组；3. 实验组

图 3 shRNAi 组 PARG 表达量明显低于阴性对照组

2.2 CT26 细胞 PARG 沉默后 NF-κB 的变化

实验组 CT26 细胞其 NF-κB 的表达与阴性对照组、空载体对照组相比显著降低（$P<0.05$），空载体对照组蛋白表达与阴性对照比较，差异无统计学意义（$P>0.05$），表明慢病毒载体本身对 NF-κB 表达无明显影响。shRNAi+LY249002 组与实验组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）（如图 4、表 1 所示）。



1.阴性对照组；2.空载体对照组；3.实验组；4.shRNAi +LY294002 组

图 4 各组中 NF-κB 表达量的变化

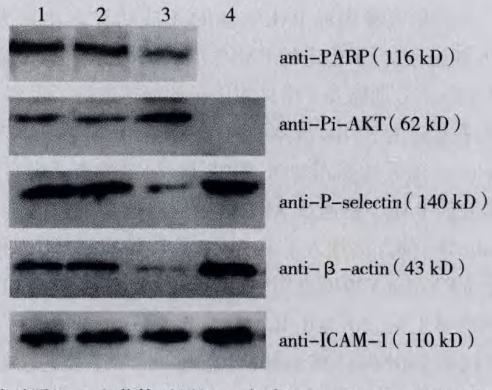
表 1 转染 PARG-shRNA 后，CT26 细胞 PARG，NF-κB 的表达（$\bar{x}\pm s$）

分组	PARG	NF-κB
阴性对照组	51.50 ± 3.32	38.40 ± 0.55
空载体对照组	48.89 ± 1.31	38.56 ± 0.39
实验组	1.63 ± 2.23	0.71 ± 0.47
shRNAi+LY294002组	-	23.75 ± 0.46

注：阴性对照组与空载体对照组相比，$P>0.05$；阴性对照组与实验组相比，$P<0.05$；实验组与 shRNAi+LY294002 组相比，$P<0.05$

2.3 CT26 细胞 PARG 沉默后 PARP、Pi-AKT、ICAM-1、P-selectin 的变化

实验组 PARP、Pi-AKT、ICAM-1、P-selectin 蛋白表达量与阴性对照组、空载体对照组比较均明显降低（$P<0.05$），空载体对照组蛋白表达与未转染组比较，无显著性差异（$P>0.05$），说明慢病毒载体本身对上述各蛋白表达无明显影响，shRNAi +LY294002 组各蛋白表达与实验组比较，均有显著性差异（$P<0.05$）（如图 5、表 2 所示）。



1.阴性对照组；2.空载体对照组；3.实验组；4.shRNAi +LY294002 组

图 5 各组细胞相关蛋白表达量的变化

3 讨 论

PARG 是细胞 PAR 化过程中极其重要的一种水解酶，可以瞬间降解 PAR，使失去活性的 PARP 恢复其活性，重新进入细胞 PAR 化的循环中。与 PARP 在细胞 PAR 化过程中呈

表 2 各组中各种蛋白表达量的变化

分组	PARP蛋白表达	Pi-AKT蛋白表达	P-selectin蛋白表达	ICAM-1蛋白表达
阴性对照组	40.84 ± 0.65	18.52 ± 0.55	27.22 ± 0.53	26.05 ± 0.29
空载体对照组	40.55 ± 0.58	18.64 ± 0.39	27.29 ± 0.37	26.17 ± 0.38
实验组	18.60 ± 0.91	52.17 ± 1.97	3.61 ± 0.7	3.57 ± 0.10
shRNAi+LY249002 组	-	10.68 ± 1.26	41.85 ± 0.46	44.18 ± 0.55

注：$P>0.05$ 空载体对照组与阴性对照组相比；$P<0.05$ 实验组与阴性对照组相比；$P<0.05$ 实验组与 shRNAi+LY249002 组相比

正反馈机制，对 PARP 的活性起着重要的调节作用。Chandak 等研究发现，应用 PARG 特异性抑制剂丹宁酸不仅可以降低 PARG 的含量，同时也可降低 PARP 的含量[11]。Frizzell 等[12]的研究表明：PARG 在对 PARP 的调节中起主要作用，并且能与 PARP 协同调节下游基因的表达，提示抑制 PARG 可以作为抑制 PARP 的一种有效的方法。在肺、肝及多器官损伤的炎症模型中，应用 5-AIQ 可抑制 PARP 的活性，并通过降低 NF-κB 活性，下调 NF-κB 依赖性基因 ICAM-1 的表达。而众多研究已表明，NF-κB 在肿瘤的发生发展中具有重要作用，在不同肿瘤组织尤其人类大肠癌细胞系中存在 NF-κB 的持续激活。在肿瘤中，激活的 NF-κB 可上调 ICAM-1、VEGF、MMP2、MMP9 等的表达，从而促进肿瘤细胞增殖，抑制其凋亡[12-14]。

既往的研究也表明，在人大肠癌细胞中，应用 5-AIQ 抑制 PARP，可抑制癌细胞 NF-κB 活性及大肠癌转移相关的NF-κB 依赖性基因 ICAM-1、MMP2、MMP9、VCAM-1、P-selectin 等的表达，同时在小鼠体内的实验证明抑制 PARP 可以有效抑制大肠癌脾移植肿瘤模型的肝转移[3,15]。而 Cuzzocrea S[16]的研究则表明，在大鼠中枢神经系统的缺血再灌注损伤模型中，在抑制 PARG 后可在血管内皮细胞中观察到 TNF 介导的I-CAM-1、P-selectin 的变化。但在肿瘤中，PARG 抑制是否可以通过 PARP 抑制 AKT 通路进而抑制 NF-κB 及其下游粘附因子的表达，尚未见文献报道。

本研究将慢病毒 PARG-shRNA 成功导入小鼠大肠癌 CT26 细胞，进行了稳定的 PARG 沉默干扰，并对其 PARG 的表达中间信号通路及下游粘附因子的表达进行了观察。结果显示，在稳定的 PARG 沉默细胞株中，PARP、NF-κB、ICAM-1、P-selectin 的表达受到抑制，同时，Pi-AKT 的表达增高。为进一步验证 PARG 是通过 AKT 信号通路调控下游因子，参照 Shkula 等[17]的方法加入了 Pi-AKT 的特异抑制剂LY294002，设立 shRNAi+LY294002 组，结果观察到实验组 Pi-AKT(473) 表达明显上升，NF-κB、ICAM-1、P-selectin 的表达下降，而与此同时 shRNAi+LY294002 组细胞 Pi-AKT 表达水平与其他各组细胞相比明显下降，NF-κB、ICAM-1、P-selectin 的表达却上调，这就证实了我们关于NF-κB 以及 ICAM-1、P-selectin 是处于 Pi-AKT 下游的设想。而已有大量文献报道 NF-κB 具有调控 ICAM-1、P-selectin 等因子的作用。综上所述，我们认为在小鼠大肠癌中，PARG 所扮演的角色可能与炎症过程类似，即 PARG 抑制可以下调 PARP 的表达，PARP 的变化通过上调 Pi-AKT 水平而调节NF-κB，NF-κB 作为整个信号通路中枢继而下调下游因子ICAM-1、P-selectin 的表达。Finzel[18]等在人小细胞肺癌细胞与血管内皮细胞粘附作用中的研究显示 ICAM-1 的表达可以增加肿瘤细胞的粘附性并能协助癌细胞逃脱细胞免疫的监视。Haznedaroglu 报道[19]：P-selectin 与淋巴瘤的转移高度相关，有文献报道，在血小板以及 T 淋巴细胞上均有选择素之配体 PSGL-1 与 I-CAM-1 之受体 LFA-1 表达[20,21]。

我们先前所做的研究也证实，应用 5-AIQ 抑制 PARP 可显著降低小鼠大肠癌细胞的侵袭性[4]。肿瘤细胞表达粘附因子，其与血小板、淋巴细胞粘附作用增强，从而促进癌栓形成，因此，我们推测，抑制 PARG 可减少细胞之间粘附分子表达，其可能在抑制癌栓的形成中发挥重要作用。

参 考 文 献

[1] Tikoo K, Bhatt D K, Gaikwad, et al. Differential effects of tannic acid on cisplatin induced nephrotoxicity in rats[J]. FEBS Lett, 2007, 581(10): 2027-2035.

[2] Min W, Wang Z Q. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) and its therapeutic potential[J]. Front Biosci, 2009, 1(14): 1619-1626.

[3] 黎 明，王娅兰. PARP 抑制对小鼠结肠癌细胞侵袭能力的影响[J]. 中山大学学报·医学科学版，2008，29(4)：388-392.

[4] 郝兰香，王娅兰. 大肠癌 PARP 表达与 P-selectin 和 ICAM-1 表达的相关性[J]. 基础医学与临床，2008，26(8)：882-887.

[5] Formentini L, Arapistas P, Pittelli M, et al. Mono-galloyl glucose derivatives are potent poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) inhibitors and partially reduce PARP-1-dependent cell death[J]. Br J Pharmacol, 2008, 155(8): 1235-1249.

[6] 李巧转，王娅兰，李 娴. 大肠癌细胞 PARG、PARP 与 AKT 磷酸化状态的关系[J]. 重庆医科大学学报，2010，35(3)：321-323.

[7] Tapodi A, Debreceni B, Hanto K, et al. Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition in oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2005, 280(42): 35767-35775.

[8] García S, Mera A, Gómez R J, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase suppression protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(5): 483-489.

[9] Chen C C, Rosenbloom C L, Anderson D C, et al. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-α phosphorylation [J]. J Immunol, 1995, 155(7): 3538-3545.

[10] Tozawa K, Kawai N, Hayashi Y, et al. Gold compounds inhibit adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells[J]. Cancer Lett, 2003,

恶性肿瘤的分子诊断 文章编号：0253-3626（2011）06-0645-05

探讨 Snail 调控上皮间质转化在结直肠癌侵袭、转移方面的作用及意义

代剑波，王继见，郝亚琴
（重庆医科大学附属第二医院普外科，重庆 400010）

【摘 要】目的：转录因子 Snail 能够抑制 E-cadherin（E-cad）的表达促进上皮间质转化（Epithelial to mesenchymal transition，EMT），从而促进肿瘤侵袭与转移。本研究通过检测 Snail 及 E-cad 在结直肠癌组织、癌旁组织及结肠癌 SW480 细胞中的表达，探讨 Snail 调控 EMT 在结直肠癌侵袭、转移方面的作用及意义。方法：免疫组化检测 40 例结直肠癌组织及癌旁组织中Snail、E-cad 的表达情况；siRNA 干扰 Snail 基因后将结肠癌 SW480 细胞分为对照组、空质粒组及 siRNA-Snail 转染组，RT-PCR 分别检测各组结肠癌 SW480 细胞 Snail、E-cad mRNA 表达；Transwell 小室基质侵袭实验和异质粘附实验分别检测各组结肠癌细胞侵袭与异质粘附能力。结果：结直肠癌组织细胞中 Snail、E-cad 阳性表达率分别为 57.5%、27.5%，癌旁组织细胞 10%、80%；2 种蛋白在结直肠癌组织细胞和癌旁组织细胞中的表达差异具有统计学意义（$P<0.05$），均与结直肠癌组织的分化程度及淋巴结转移具有相关性（$P<0.05$），而与性别、年龄无相关性（$P>0.05$），且二者的表达呈负相关（$P<0.05$）；RT-PCR 结果显示，与对照组相比，Snail、E-cad mRNA 表达在空质粒组差异无统计学意义（$P>0.05$），而转染组差异具有统计学意义（$P<0.05$）；基质侵袭实验和异质粘附实验结果显示，与对照组相比，转染组结肠癌细胞侵袭力和异质粘附力降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$），而空质粒组差异无统计学意义（$P>0.05$）。结论：Snail 调控 EMT 与结直肠癌的侵袭和转移密切相关，Snail、E-cad 可以作为判断结直肠癌侵袭和转移的指标。

【关键词】结直肠癌；上皮间质转化；Snail；E-cad
【中国图书分类法分类号】R735.3+4 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-05

作者介绍：代剑波（1985-），男，硕士，
研究方向：胃肠道肿瘤。
通信作者：王继见，男，教授，Email：Wangjj1963@163.com。

196（1）：93-100.

[11] Chandak P G，Gaikwad A B，Tikoo K.Gallotannin ameliorates the development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by preventing the activation of PARP[J].Phytotherapy Research，2009，23（1）：72-77.

[12] Nakajima H，Nagaso H，Kakui N，et al.Critical role of the automodification of poly（ADP-ribose）polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells[J].Biol Chem，2004，279（41）：42774-42786.

[13] Marin-Castaño M E，Elliot S J，Potier M，et al.Regulation of estrogen receptors and MMP-2 expression by estrogens in human retinal pigment epithelium[J].Invest Ophthalmol Vis Sci，2003，44（1）：50-59.

[14] Wang J H，Manning B J，Wu Q D，et al.Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappa B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism[J].J Immunol，2003，170（2）：795-804.

[15] 蔡 莉，王娅兰，林 晓.PARP 抑制剂 5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞 PARP/NF-κB 复合物和 NF-κB 活性的影响[J].基础医学与临床，2008，28（11）：1156-1159.

[16] Cuzzocrea S，Mazzon E，Genovese T，et al.Role of poly（ADP-ribose）glycohydrolase in the development of inflammatory bowel disease in mice[J].Free Radic Biol Med，2007，42（1）：90-105.

[17] Shukla S，Maclennan G T，Marengo S R，et al.Constitutive activation of PI3K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model[J].Prostate，2005，64（3）：224-239.

[18] Finzel A H，Reininger A J，Bode P A，et al.ICAM-1 supports adhesion of human small cell lung cracinoma to endothelial cells[J].Clin Exp Metastasis，2004，21（3）：185-189.

[19] Haznedaroglu I C，Bebekli M，Ozcebe O，et al.Serum L-selectin and P-seletin levels in lymphomas[J].Haematologia，2000，30（1）：27-30.

[20] Hirata T，Merrill S G，Aab M，et al.P-Selectin glycoprotein ligand 1（PSGL-1）is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration[J].The Journal of Experimental Medicine，2000，192（11）：1669-1676.

[21] Vandana S D，Wolfgang B，Heather A M，et al.Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo：role of P-selectin[J].Blood，2005，106（7）：2334-2339.

（责任编辑：冉明会）