

# 靶向Pokemon基因shRNA重组质粒的构建及其对HepG2细胞生长的影响

王波, 张全乐, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安

## ■背景资料

肝细胞癌(HCC)的发生是多步骤、多阶段的过程, 此过程的实现需要多个癌基因的激活。近年来研究发现的Pokemon基因控制着细胞突变的整个过程。

王波, 张全乐, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

国家自然科学基金资助项目, No. 30800968

作者贡献分布: 王波与张全乐对此文所作贡献均等; 此课题由张全乐、王波、刘梅及田德安设计; 研究过程由张全乐、晏维及夏丽敏完成; 数据分析由张全乐完成; 论文书写由王波与田德安完成。

通讯作者: 田德安, 主任医师, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。

tiandeanwh@medmail.com.cn

电话: 027-83663611

收稿日期: 2009-08-18 修回日期: 2009-09-23

接受日期: 2009-09-28 在线出版日期: 2009-10-28

## Short hairpin RNA-mediated downregulation of the Pokemon gene suppresses proliferation and promotes apoptosis in HepG2 cells

Bo Wang, Quan-Le Zhang, Wei Yan, Li-Min Xia, Mei Liu, De-An Tian

Bo Wang, Quan-Le Zhang, Wei Yan, Li-Min Xia, Mei Liu, De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30800968

Correspondence to: De-An Tian, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. tiandeanwh@medmail.com.cn

Received: 2009-08-18 Revised: 2009-09-23

Accepted: 2009-09-28 Published online: 2009-10-28

## Abstract

**AIM:** To construct recombinant plasmids containing short hairpin RNA (shRNA) targeting the Pokemon gene and investigate the effects of shRNA-mediated downregulation of the Pokemon gene on the proliferation and apoptosis of HepG2 cells.

**METHODS:** Three shRNAs were designed according to the coding sequence of the Pokemon gene and used to construct recombinant plasmids. The recombinant plasmids were trans-

ected into HepG2 cells using Lipofectamine 2000. The expression of Pokemon mRNA and protein was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. Cellular proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Apoptosis was analyzed by flow cytometry. The expression of H-ras and  $\beta$ -catenin genes was detected by RT-PCR.

**RESULTS:** Three recombinant plasmids were successfully constructed. The expression of Pokemon mRNA and protein was obviously downregulated in HepG2 cells transfected with the recombinant plasmids. The best silencing effect was achieved in cells transfected with the pshRNA2 plasmid. The expression levels of Pokemon mRNA and protein were downregulated by 75.2% and 72.61%, respectively. MTT assay indicated that pshRNA2 transfection could inhibit cellular proliferation and promote apoptosis. After pshRNA2 transfection, the expression of H-ras mRNA was downregulated ( $P < 0.05$ ) in HepG2 cells though no significant change was observed in  $\beta$ -catenin expression.

**CONCLUSION:** The recombinant plasmids containing shRNA targeting the Pokemon gene can specifically downregulate Pokemon expression. The Pokemon protein can promote proliferation and inhibit apoptosis in HepG2 cells possibly via downregulation of H-ras expression.

**Key Words:** Pokemon; Short hairpin RNA; Cell proliferation; Apoptosis; H-ras

Wang B, Zhang QL, Yan W, Xia LM, Liu M, Tian DA. Short hairpin RNA-mediated downregulation of the Pokemon gene suppresses proliferation and promotes apoptosis in HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(30): 3128-3133

## 摘要

**目的:** 观察携带shRNA的重组质粒对肝癌细胞HepG2增殖及凋亡的影响, 并初步探讨其分子机制。

## ■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

**方法:** 设计3对针对Pokemon基因不同位点的shRNA片段的真核表达载体, 脂质体介导转染肝癌细胞株HepG2细胞. RT-PCR及Western blot检测转染前后Pokemon mRNA及蛋白质的表达, MTT和流式细胞仪分析转染后细胞增殖及凋亡的变化, RT-PCR检测其可能的下游因子 $\beta$ -catenin及H-ras的表达.

**结果:** 成功构建含shRNA片段的重组质粒, 依次命名为pshRNA1、2、3. 转染HepG2细胞后, Pokemon基因的mRNA及蛋白质表达水平明显下调, 以pshRNA2最强, 抑制率分别为75.2%(RNA水平)和72.61%(蛋白质水平). MTT显示pshRNA2可明显抑制细胞增殖; 流式细胞仪测定转染后细胞凋亡增加; RT-PCR显示下游因子H-ras的表达明显降低( $P<0.05$ ), 而 $\beta$ -catenin的表达没有变化( $P>0.05$ ).

**结论:** 采用RNAi技术可以特异性阻断Pokemon基因的表达; Pokemon基因有促进肝癌细胞株增殖及抑制其凋亡的作用, 该效应可能与下调其下游因子H-ras的表达有关.

**关键词:** Pokemon; 短发夹状RNA; 细胞增殖; 细胞凋亡; H-ras

王波, 张全乐, 晏维, 夏丽敏, 刘梅, 田德安. 靶向Pokemon基因shRNA重组质粒的构建及其对HepG2细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(30): 3128-3133  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3128.asp>

## 0 引言

Pokemon基因, 又称POK红系髓性致癌因子(POK erythroid myeloid ontogenic factor). 作为POK家族转录抑制因子的一员, 他不仅与胚胎发育和细胞分化有关, 而且在某些组织的细胞恶性转化过程中起着关键作用. 近年来研究表明, Pokemon基因在淋巴瘤、乳腺癌及非小细胞肺癌中均有很高的表达<sup>[1-3]</sup>. 我们前期的研究结果显示, 原发性肝癌患者癌组织中Pokemon基因的表达明显上调. 在此基础上, 本实验拟构建靶向Pokemon基因的shRNA重组质粒, 观察其对肝癌细胞株HepG2增殖和凋亡的影响, 并初步探讨其可能的机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人肝癌细胞株HepG2由本实验室保存; DMEM培养液购于Invitrogen公司; 100 mL/L胎牛血清购于Clark公司; 兔抗人Pokemon多克隆抗体购于ABCAM公司; 脂质体Lipofectamine

2000购于Invitrogen公司; pGenesil-2载体购于武汉晶赛公司; 限制性内切酶BamH I 和HindIII 购于TaKaRa公司; 超纯质粒小量提取试剂盒购于北京博大泰克公司; MTT购于Sigma公司; 人Annexin V-FITC试剂盒购于晶美公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 靶向Pokemon基因的shRNA重组质粒的构建:** 根据NCBI GenBank上公布的Pokemon基因(NM\_015898)全长序列, 遵循shRNA的设计原则, 利用Promega公司的shRNA在线软件筛选出3条19 nt的序列交由上海生工生物技术有限公司合成, 分别为: shRNA1, (5'-CAGCAGAACGTGTACGAGA-3', 干扰位点为363-381); shRNA2, (5'-GCTGGACCTTGATAGTCAA-3', 干扰位点为578-596); shRNA3, (5'-GCACAGACACCTCAGAAA-3', 干扰位点为1595-1613). 所选择的序列通过BLAST在GenBank上比对, 证明所选择的序列与其他基因没有同源性. 阴性对照序列为ACTACCGTTGTTATAGGTG, 此序列不与任何人类基因序列同源. 序列两端分别引入BamH I 及HindIII酶切位点. 将上述寡核苷酸序列克隆到载体上. 重组质粒转化感受态细胞, 卡那霉素抗性的LB培养液恒温摇床过夜, 送北京诺赛基因公司测序, 质粒测序结果通过Chromas软件进行分析, 证实插入的shRNA片段的碱基序列与设计序列完全一致.

**1.2.2 细胞培养和脂质体转染:** HepG2细胞在含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 置于50 mL/L培养箱, 37℃恒温培养. 取对数生长期的细胞, 接种于6孔板及96孔板内, 待细胞达到85%-90%的融合, 按照质粒: 脂质体比例为4  $\mu$ g: 10  $\mu$ L加入Lipofectamine 2000及质粒复合物转染细胞, 4 h后换上新鲜的培养液. 实验设立重组质粒组(pshRNA1、2、3)、对照质粒组及脂质体空白对照组.

**1.2.3 Pokemon基因表达的检测:** 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测Pokemon基因RNA的表达. 收集转染后48 h的HepG2细胞提取总RNA. Pokemon基因引物的上游序列5'-GGTCGCAGAAGGTGGAGA-3', 下游序列5'-GGTCGTAGTTGTGGGCAAA-3';  $\beta$ -actin引物上游序列5'-GTTGCGTTACACCTTTCTTG-3', 下游序列5'-GACTGCTGTACCTTCACCGT-3'. PCR的反应体系为25  $\mu$ L: 逆转录产物1  $\mu$ L, 10 $\times$ Taq酶反应缓冲液2.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ L, dNTP 1  $\mu$ L, 上下游引物各1  $\mu$ L, Taq酶1  $\mu$ L, 去离子水补足25  $\mu$ L.

## ■ 研发前沿

Pokemon基因与人类肿瘤关系的研究尚处于起步阶段, 人们对其在肿瘤尤其是实体瘤中的作用及机制知之甚少. 由于Pokemon基因控制着细胞突变的整个过程, 其作为上游基因可以激活其他癌基因, 加速肿瘤进展, 所以抑制Pokemon基因的表达可以影响其他癌基因的表达, 减缓肿瘤发展, 提高肿瘤的治疗效果.

## ■创新盘点

由于Pokemon-ARF-Hdm2-P53-P21通路在实体肿瘤的发生中频繁缺失,所以Pokemon基因在HCC中的信号传导通路尚不十分清楚。本研究发现其可能通过特异性的诱导下游分子H-ras的表达来调控HCC细胞的生长过程。

循环参数: 95℃, 5 min后, 94℃, 40 s, 57.7℃, 40 s, 72℃, 40 s, 共30个循环, 最后72℃ 10 min. 扩增后的产物取5 μL进行2%的琼脂糖凝胶电泳, 然后在紫外凝胶成像仪上进行拍照, 利用相关图像分析软件分析电泳条带的灰度值, mRNA表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/β-actin条带的灰度值。

1.2.4 Pokemon蛋白表达的检测: 采用免疫印迹法(Western blot)检测Pokemon蛋白的表达。收集转染后48 h的HepG2细胞, 用细胞裂解液抽提细胞总蛋白, Bradford法检测总蛋白浓度, 取40 μg总蛋白进行电泳。10% SDS-PAGE中蛋白分离完毕后将凝胶中的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%的封闭液封闭2 h, 加入一抗(兔抗人Pokemon蛋白多克隆抗体, 1:200), 4℃过夜; 洗膜, 再加入二抗(羊抗兔IgG-HRP, 1:10 000)孵育1 h, 洗膜后进行ECL显色。利用相关图像分析软件扫描分析条带的灰度值。Pokemon蛋白表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/β-actin条带的灰度值。

1.2.5 细胞增殖活性的检测: 采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞的增殖活性。将转染处理组及空白对照组处于对数生长期的细胞以4000个/孔接种96孔板, 分别于24、48、72、96及120 h分别弃去培养基, 每孔加入5 g/L的MTT溶液继续培养4 h, 弃去MTT, 各孔加入150 μL的DMSO, 室温下震荡10 min, 在酶标仪A<sub>490nm</sub>处测定各孔的吸光度值(A值), 绘制细胞的生长曲线, 并计算细胞的生长抑制率。细胞生长抑制率 = (阴性对照组A值-转染组A值)/阴性对照组A值×100%。

1.2.6 细胞凋亡的检测: 采用流式细胞术检测细胞的凋亡。取对数生长期HepG2细胞以1×10<sup>6</sup>接种24孔板, 于转染后培养48 h, 胰酶消化收集细胞, PBS洗涤2次, 取100 μL的细胞悬液于5 mL流式管中, 加入5 μL Annexin V-FITC和10 mg/L的碘化吡啶, 轻轻混匀, 避光室温反应15 min, 加入300 μL的结合缓冲液后上机检测。以各组中凋亡细胞占总计数细胞的百分比计算凋亡率。

1.2.7 β-catenin及H-ras的检测: TRIzol法提取各组细胞中的总RNA, 经逆转录合成cDNA。β-catenin上游引物5'-CCAAGTGGGTGGTATAGAGG-3', 下游引物5'-GCTGGGTATCCTGATGTGC-3', 退火温度为59℃, PCR产物长度为329 bp; H-ras上游引物5'-TGCCATCAACAACACCAAG-3', 下游引物5'-CTCATCAGGAGGGTTCAGC-3', 退火温度为54℃, PCR产物长度为283 bp。PCR的反应体系为25 μL: cDNA 1 μL, 10×Taq酶反应缓冲

液2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL, dNTP 1 μL, 上下游引物各1 μL, Taq酶1 μL, 去离子水16 μL。β-catenin的循环参数为: 95℃, 5 min, 94℃, 40 s, 59℃, 40 s, 72℃, 40 s, 共30个循环, 最后72℃ 10 min。H-ras的循环参数为: 95℃, 5 min, 94℃, 40 s, 54℃, 40 s, 72℃, 40 s, 共30个循环, 最后72℃ 10 min。扩增产物在紫外凝胶成像仪上进行拍照, 利用相关图像分析软件分析电泳条带的灰度值, mRNA表达的相对强度 = 目的条带的灰度值/β-actin条带的灰度值。

**统计学处理** 采用SPSS13.0分析软件进行统计学处理, 根据数据性质, 分别采用非参数检验及Fishers精确分析法进行分析,  $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 重组质粒pshRNA的鉴定 测序结果显示, 所插入的shRNA1, shRNA2及shRNA3片段正确的连入pGenesil-2载体中, shRNA重组质粒构建成功。

2.2 shRNA重组质粒对Pokemon基因表达的抑制作用

2.2.1 RT-PCR检测Pokemon mRNA的表达: RT-PCR检测各组细胞中Pokemon及β-actin mRNA的表达。以目的条带的灰度值/β-actin条带的灰度值作为Pokemon mRNA表达的相对含量, 并计算抑制率。抑制率 = 阴性对照组Pokemon的相对表达量-转染重组质粒组Pokemon的相对表达量/阴性对照组Pokemon的相对表达量。结果显示, 转染pshRNA重组质粒的细胞Pokemon的表达较阴性对照组明显减弱( $P<0.05$ ), 而转染阴性对照质粒的细胞与空白组相比, Pokemon的表达没有明显变化( $P>0.05$ ), 此结果显示转染shRNA重组质粒能够明显抑制Pokemon基因的表达。3个shRNA质粒转染组之间进行对比, pshRNA-2转染组Pokemon基因的表达量明显低于其他2组( $P<0.05$ ), 而pshRNA-1组与pshRNA-3组之间无显著差异性( $P>0.05$ , 表1)。

2.2.2 Western blot检测Pokemon蛋白的表达: 提取各组细胞的总蛋白, western blot检测各组细胞中Pokemon及β-actin蛋白的表达。以目的条带的灰度值/β-actin条带的灰度值作为Pokemon蛋白表达的相对含量, 并采用上述方法计算抑制率, 取3次实验结果进行统计学分析。结果显示转染pshRNA重组质粒后, 细胞Pokemon蛋白条带较对照组明显减弱( $P<0.05$ ), 而转染阴性对照质粒的细胞与空白组相比, Pokemon的表达没有明显变

表 1 转染shRNA重组质粒后各组细胞Pokemon mRNA的表达及抑制率

分组	pshRNA1组	pshRNA2组	pshRNA3组	阴性对照组	空白对照组
灰度比值	0.453 ± 0.023 <sup>a</sup>	0.214 ± 0.011 <sup>c</sup>	0.478 ± 0.020 <sup>a</sup>	0.863 ± 0.036	0.904 ± 0.006
抑制率(%)	47.51	75.20	44.61	—	—

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 阴性对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs pshRNA1及pshRNA3组。

表 2 转染shRNA重组质粒后各组细胞Pokemon蛋白的表达及抑制率

分组	pshRNA1组	pshRNA2组	pshRNA3组	阴性对照组	空白对照组
灰度比值	0.547 ± 0.023 <sup>a</sup>	0.246 ± 0.017 <sup>c</sup>	0.568 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.898 ± 0.018	1.006 ± 0.023
抑制率(%)	40.09	72.61	36.75	—	—

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 阴性对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs pshRNA1及pshRNA3组。

表 3 各组细胞在不同时间的4值

分组	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
空白对照组	0.442 ± 0.027	0.580 ± 0.016	0.678 ± 0.069	0.731 ± 0.018	0.895 ± 0.025
阴性对照组	0.421 ± 0.013	0.556 ± 0.007	0.663 ± 0.016	0.712 ± 0.024	0.873 ± 0.019
pshRNA2组	0.335 ± 0.011	0.313 ± 0.003	0.360 ± 0.012	0.411 ± 0.013	0.431 ± 0.014

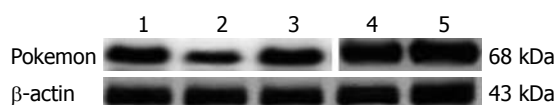


图 1 Western blot检测各组细胞中Pokemon基因的蛋白表达。1: shRNA1组; 2: shRNA2组; 3: shRNA3组; 4: 阴性对照组; 5: 空白对照组。

化( $P > 0.05$ )。3个shRNA质粒转染组之间进行对比, pshRNA-2转染组Pokemon蛋白的表达量明显低于其他2组( $P < 0.05$ ), 而pshRNA-1组与pshRNA-3组之间无显著差异性( $P > 0.05$ , 图1, 表2)。

**2.3 pshRNA-2质粒对HepG2细胞生长活性的抑制作用** MTT法显示, 与阴性对照及空白组相比, 转染pshRNA-2质粒能够明显抑制HepG2细胞的生长活性, 阴性对照组及空白组的细胞生长曲线之间无明显差异(表3, 图2)。

**2.4 pshRNA-2质粒对HepG2细胞凋亡的影响** 转染48 h后, 通过流式细胞仪检测及分析软件显示, pshRNA-2质粒转染组细胞凋亡率( $45.09\% \pm 1.62\%$ )显著增加, 明显高于阴性对照组的凋亡率( $8.33\% \pm 0.64\%$ ,  $P < 0.05$ ), 而阴性对照组与空白组细胞的凋亡率( $6.43\% \pm 0.49\%$ )无显著差异性( $P > 0.05$ , 图3-4)。

**2.5  $\beta$ -catenin及H-ras的表达**  $\beta$ -catenin在shRNA质粒转染组、阴性对照组及空白组中的表达

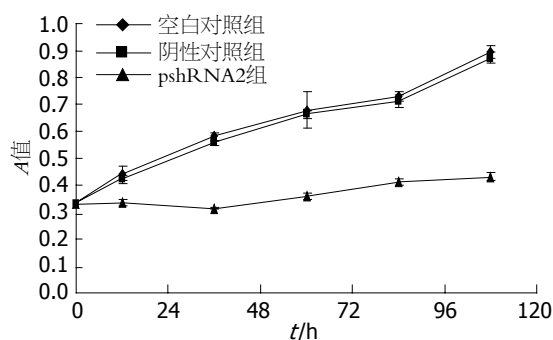


图 2 转染Pokemon shRNA2重组质粒对HepG2细胞增殖的影响。

均无差异性; 而H-ras在shRNA质粒转染组中的表达显著减少, 明显低于阴性对照组及空白组( $P < 0.05$ ); 阴性对照组及空白对照组中的H-ras表达无差异性(表4)。

### 3 讨论

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见恶性肿瘤之一, 其死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第3位, 仅次于胃癌和食管癌。HCC起病隐匿, 患者早期缺乏典型症状, 多数患者就诊时病情已处于晚期, 治疗效果差, 死亡率高。因此, 探索新的治疗HCC的方法势在必行, HCC的基因治疗正成为目前的探索热点。RNAi技术有效

### ■应用要点

本研究对Pokemon进行的研究有助于HCC发生机制的阐明, 并可能为HCC的治疗及预防提供新的靶点。

### ■同行评价

本文采用RNAi技术,构建了靶向Pokemon基因的shRNA,并初步观察了其肝癌细胞株HepG2增殖和凋亡的影响,内容新颖,有一定理论意义及应用价值。

表 4 各组细胞中 $\beta$ -catenin及H-ras的表达

类别	pshRNA1组	pshRNA2组	pshRNA3组	阴性对照组	空白对照组
$\beta$ -catenin	$0.892 \pm 0.120$	$0.932 \pm 0.032$	$0.924 \pm 0.232$	$0.963 \pm 0.136$	$0.978 \pm 0.013$
H-ras	$0.212 \pm 0.032^a$	$0.113 \pm 0.019^a$	$0.297 \pm 0.047^a$	$0.924 \pm 0.003$	$0.937 \pm 0.011$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 阴性对照组。

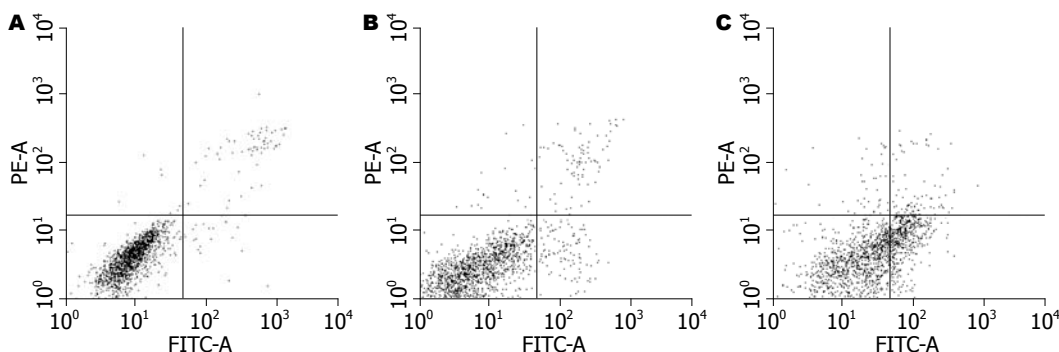


图 3 转染Pokemon shRNA2重组质粒对HepG2细胞凋亡的影响。A: 空白对照组; B: 阴性对照组; C: shRNA-2质粒转染组。

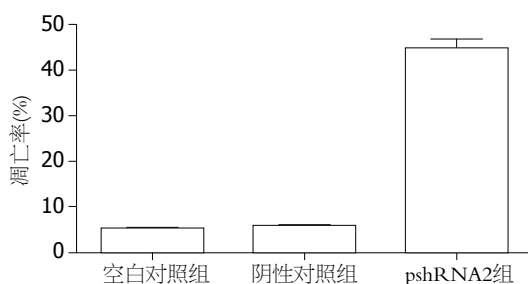


图 4 转染Pokemon shRNA2重组质粒对HepG2细胞凋亡的影响。

沉默靶基因的表达,在动物实验中已经证实他可以通过静脉或局部注射进入瘤体内而发挥良好的抗肿瘤作用<sup>[4]</sup>。构建siRNA表达载体与化学合成siRNA相比,更有利于进行稳定表达siRNA和长效抑制的研究。转染到细胞的DNA模板中,在体内转录得到siRNAs,从而不需要直接进行RNA的操作,能提高siRNA的稳定性,并可使siRNA在体内维持较长时间的基因沉默<sup>[5]</sup>。

Pokemon基因起初是作为结合于人类免疫缺陷病毒I型(human immunodeficiency virus type I, HIV- I)的启动子元件而被发现的,继而作为前髓细胞性白血病锌指(promyelocytic leukaemia zinc finger, PLZF)的同系物而被克隆<sup>[1]</sup>。2005年Maeda *et al*报道Pokemon作为原癌基因,能够特异性地抑制抑癌基因ARF,促进肿瘤的发生发展,从而引起人们的广泛关注<sup>[6]</sup>。但是迄今为止,关于Pokemon基因在HCC形成过

程中的作用及其机制国内外报道较少。我们既往的研究发现, HCC组织中Pokemon mRNA及蛋白的表达均高于癌旁组织, Pokemon基因表达的上调仅与患者的瘤体直径有关,而与患者年龄,肿瘤分化程度以及TNM分期等无关。提示Pokemon与HCC的发生发展密切相关,我们的实验结果与国内报道基本一致<sup>[7]</sup>。那么Pokemon在HCC的形成过程中究竟发挥怎样的作用呢?

为了阐述这个问题,我们构建了如下的实验体系:首先,检测发现HCC细胞株HepG2中Pokemon呈强表达(结果未显示);其次,成功构建并筛选靶向Pokemon基因的重组质粒,并导入HepG2中,分别于RNA和蛋白质水平证实它能够有效抑制Pokemon基因的表达。该体系的建立为我们体外研究Pokemon基因的功能奠定了良好的基础。

细胞的增殖和凋亡在HCC发生发展中起着重要的作用<sup>[8-9]</sup>。我们发现,转染Pokemon shRNA表达载体后,细胞的增殖率明显低于对照组,呈非时间依赖性,说明Pokemon基因在细胞增殖过程中起到重要的作用。流式细胞术检测显示干扰组细胞的凋亡率明显高于对照组。表明靶向Pokemon的shRNA表达载体可以通过促进细胞凋亡的方式来调控细胞的生长过程。该结果为我们整体试验过程中观察到的Pokemon基因的上调只与瘤体直径有关的现象提供了可靠的试验依据。



Maeda *et al*<sup>[6]</sup>认为, Pokemon是通过直接抑制癌基因ARF促进某些类型淋巴瘤发生发展的, 近年来也有报道认为Pokemon主要是通过更下游的分子即ARF-Hdm2-P53-P21通路发挥作用<sup>[10]</sup>. 但由于ARF/P53通路在实体肿瘤的发生中频繁缺失, 所以该基因在HCC中的信号传导通路尚不十分清楚. 本研究基于以下理由初步选择H-ras及 $\beta$ -catenin作为其下游因子进行检测: (1)与H-ras单独转染相比, H-ras与Pokemon基因联合转染成纤维细胞株MEFs时, 细胞出现明显增殖特性, 并能抵抗单独转染所引起的细胞衰老或者凋亡<sup>[1]</sup>; (2) $\beta$ -catenin是与Pokemon同一家族成员并且功能相似的Kaiso基因的下游因子<sup>[11-12]</sup>, 而关于Pokemon与 $\beta$ -catenin的关系至今为止尚无相关报道. 我们的研究表明, 干扰组细胞中H-ras表达量与对照组相比明显减少, 而 $\beta$ -catenin的表达量则无明显变化. 因此我们推测Pokemon基因可能通过特异性的诱导下游分子H-ras的表达来调控肿瘤细胞的生长过程. 至于Pokemon及H-ras二者之间具体的信号传导通路尚有待进一步研究.

总之, 本实验成功构建了靶向Pokemon的shRNA表达载体, 并初步探讨了其对肝癌细胞株HepG2生长的影响及其可能的机制. 结合前期的整体试验结果, 我们相信Pokemon将有可能成为人类HCC治疗的一个新靶点.

#### 4 参考文献

- 1 Maeda T, Hobbs RM, Pandolfi PP. The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 8575-8578
- 2 Agrawal A, Yang J, Murphy RF, Agrawal DK. Regulation of the p14ARF-Mdm2-p53 pathway: an overview in breast cancer. *Exp Mol Pathol* 2006; 81: 115-122
- 3 Apostolopoulou K, Pateras IS, Evangelou K, Tsantoulis PK, Liontos M, Kittas C, Tiniakos DG, Kotsinas A, Cordon-Cardo C, Gorgoulis VG. Gene amplification is a relatively frequent event leading to ZBTB7A (Pokemon) overexpression in non-small cell lung cancer. *J Pathol* 2007; 213: 294-302
- 4 Romano PR, McCallus DE, Pachuk CJ. RNA interference-mediated prevention and therapy for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3857-3865
- 5 Lu PY, Xie F, Woodle MC. In vivo application of RNA interference: from functional genomics to therapeutics. *Adv Genet* 2005; 54: 117-142
- 6 Maeda T, Hobbs RM, Merghoub T, Guernah I, Zelent A, Cordon-Cardo C, Teruya-Feldstein J, Pandolfi PP. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression. *Nature* 2005; 433: 278-285
- 7 吴阳, 张水军, 丁月超. Pokemon基因在原发性肝癌组织中的表达及意义. *山东医药* 2008; 48: 92-93
- 8 Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 513-520
- 9 Feo F, Frau M, Pascale RM. Interaction of major genes predisposing to hepatocellular carcinoma with genes encoding signal transduction pathways influences tumor phenotype and prognosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6601-6615
- 10 Choi WI, Jeon BN, Yun CO, Kim PH, Kim SE, Choi KY, Kim SH, Hur MW. Proto-oncogene FBL-1 represses transcription of p21CIP1 by inhibition of transcription activation by p53 and Sp1. *J Biol Chem* 2009; 284: 12633-12644
- 11 Pan KF, Liu WG, Zhang L, You WC, Lu YY. Mutations in components of the Wnt signaling pathway in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1570-1574
- 12 Wanitsuan W, Kannnurn S, Boonpipattanapong T, Sangthong R, Sangkhathat S. Overall expression of beta-catenin outperforms its nuclear accumulation in predicting outcomes of colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6052-6059

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》栏目设置

**本刊讯** 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (科学编辑: 李军亮 2009-10-28)