

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.006

• 基础研究 •

慢病毒介导的siRNA沉默Foxp1对肝癌细胞增殖、凋亡和迁移的影响



秦 婧, 王桂兰, 徐玉音, 陈 莉

Effects of Lentiviral-Mediated Foxp1 siRNA to Proliferation, Apoptosis and Migration of Hepatoma Carcinoma Cell

QIN Jing, WANG Guilan, XU Yuyin, CHEN Li

Department of Pathological Anatomy, Nantong University, Nantong 226001, China

Corresponding Author: CHEN Li, E-mail: bl1@ntu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the effects of Foxp1 on proliferation, apoptosis and migration of hepatoma carcinoma cells. **Methods** Small nucleic acid fragments which could interfere Foxp1 (siRNA Foxp1) were synthesized in vitro, and it was inserted into the transfer plasmid of the lentiviral three-plasmid system by recombinant techniques, using the packaging cells (293T) to assemble the three-plasmid system as a complete retrovirus lentivirus vector (lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA), which was used to infect hepatoma carcinoma cell lines with high expression of Foxp1; at the same time, the empty viral vector without the the Foxp1-siRNA sequence directly packaged by three-plasmid system was constructed as control group. The infected effect of lentiviral vector-mediated siRNA was detected by fluorescence microcopy. Expression of Foxp1 in hepatoma carcinoma cells were detected by western blot and real-time QPCR (RT-QPCR) at protein and mRNA levels. CCK-8 experiments, flow cytometry, the wound healing assay and transwell assay were used to investigate the changes in cell proliferation, apoptosis and migration. **Results** Compared with control group, expression of Foxp1 protein and mRNA significantly decreased in hepatoma carcinoma cells infected with lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA; meanwhile, the vitality of cells was notably inhibited, and the apoptosis strikingly increased, the migration in the two-dimensional space and three-dimensional space significantly decreased (respectively, $P<0.01$). **Conclusion** As a kind of multi functional transcription factor, Foxp1 could promote the proliferation and migration of hepatoma carcinoma cells, and inhibit its apoptosis.

Key words: Lentiviral; Foxp1; siRNA; Hepatoma carcinoma cell(7721 cell); Proliferation; Apoptosis; Migration

摘 要: 目的 探讨Foxp1对肝癌细胞增殖、凋亡和迁移的影响。**方法** 体外合成干扰Foxp1功能的小核酸片段 (siRNA Foxp1), 通过重组技术将其插入到慢病毒三质粒系统的转移质粒中, 利用包装细胞 (293T) 将三质粒系统组装为完整的反转录慢病毒载体 (lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA), 感染高表达Foxp1的肝癌细胞株。同时构建不含有Foxp1-siRNA序列的直接三质粒系统包装的空病毒载体对照组。荧光显微镜观察慢病毒载体介导siRNA感染细胞的效果。Western blot和Real-time QPCR (RT-QPCR) 分别检测肝癌细胞中Foxp1蛋白表达和mRNA水平。CCK-8实验、流式细胞仪、细胞划痕愈合实验和侵袭小室实验分别检测细胞增殖、凋亡和迁移的改变。**结果** 与对照组细胞比较, 肝癌细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后, 细胞中Foxp1蛋白和mRNA表达显著下降, 增殖活性受到显著抑制, 细胞凋亡明显增加, 在二维空间和三维空间的迁移细胞显著减少 (均 $P<0.01$)。**结论** Foxp1作为一种多功能转录因子, 促进肝癌细胞的增殖和迁移, 抑制其凋亡。

关键词: 慢病毒; Foxp1; siRNA; 肝癌细胞; 增殖; 凋亡; 迁移

中图分类号: R73-37; R735.7 文献标识码: A

收稿日期: 2012-12-13; 修回日期: 2013-04-04
基金项目: 2010年南通大学医学院资助课题(YXY2010-08); 2012年南通大学资助课题(12Z006); 江苏省优势学科资助课题
作者单位: 226001江苏南通, 南通大学医学院病理学系
通信作者: 陈莉, E-mail: bl1@ntu.edu.cn
作者简介: 秦婧 (1982-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事肿瘤病理研究

0 引言

原发性肝细胞肝癌 (以下简称肝癌) 是世界范围内常见的恶性肿瘤之一, 每年全世界新增约63万例肝癌患者, 死亡人数约60万人, 确诊的患者大多在一年内死亡^[1-2]。如何安全有效地治疗肝癌, 成为该研究领域关注的热点。随着人们对肝

癌发病机制的深入认识和基因治疗技术的逐步成熟，肝癌的基因治疗有望成为新的治疗方法^[3]。目前，人们已经从分子生物学水平对其进行了大量研究，如相关癌基因的激活、抑癌基因的失活等。Foxp1（forkhead box p1）基因是新近发现的一种转录因子，属于FOX家族的P亚族，该家族是一个庞大的转录因子家族，功能广泛，涉及胚胎的正常发育、细胞凋亡和细胞周期、糖类和脂类代谢、生物老化、免疫调节等多种生物学过程^[4]，并且在多种肿瘤中均有表达^[5]，其蛋白产物在不同的肿瘤中具有不同的生物学作用^[6-9]。

RNAi现象是生物体内双链RNA（double stranded RNA, dsRNA）在Dicer酶的作用下特异性地被裂解为21~23 nt的dsRNA，即干扰性小RNA（small interfering RNA或short interfering RNAs, siRNA），进而形成沉默复合体（RNA-induced silencing complex, RISC）诱导同源靶基因mRNA发生特异性降解，从而导致基因沉默^[10]。但是siRNA引起的基因沉默必须在靶细胞内实现，哺乳动物细胞不接受裸露的、没有细胞穿透能力（不管是否经过化学修饰）的siRNA序列。所以如何将siRNA序列转入细胞内引起特异序列的基因沉默是细胞执行siRNA的关键。由反转录病毒构建的慢病毒载体为不含致病基因、无复制能力，但能感染几乎所有体细胞^[11-12]，所以本文拟通过构建具有三质粒分装系统的慢病毒载体将体外合成的干扰Foxp1功能的核酸片段（siRNA Foxp1）感染高表达Foxp1的肝癌细胞，通过检测细胞内Foxp1表达水平来评估慢病毒载体的功能，并探讨Foxp1对癌细胞增殖、凋亡和迁移的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株和试剂

四株肝癌细胞株（7721、7402、97H、HepG2）、感受态大肠杆菌（TOP10）、人肾胚细胞（293T）、慢病毒三质粒（pLL3.7、pMD2.G、psPAX2）均购于百奥迈科生物技术有限公司。DMEM培养液、胎牛血清、脂质体Lipofectamine 2000、Trizol试剂均购自美国Invitrogen公司。PVDF膜购自美国Pharrnacai公司。人抗鼠Foxp1抗

体、β-actin 抗体和HRP偶联的二抗均购于美国Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 筛选高表达Foxp1 mRNA的肿瘤细胞

将四株肝癌细胞分别置于含10%胎牛血清的DMEM培养液中，于37℃、5%CO₂培养箱内培养。分别采用TRIzol试剂盒提取四种细胞的总RNA，反转录成cDNA，其步骤如下：RNA 4 μl、oligo dT 1 μl、dNTP 1.5 μl，70℃ 5 min，立即置冰上5 min；5×M-MLV反转录酶Buffer 9 μl、M-MLV反转录酶0.3 μl、Rnase InHibiter 1 μl、DEPC H₂O 9.5 μl，42℃ 60 min，95℃ 30 s。实时荧光定量PCR（real time Q-PCR，RT- QPCR）检测四种细胞中Foxp1 mRNA表达水平，反应体系为：cDNA 1 μl、2×QPCR master mix 12.5 μl、引物F 0.5 μl、H₂O 9.5 μl。Foxp1引物（序列为F：5'-TCAGAGATTACGAAGATGAATTCAAGAGATTCATCTTCGTAATCTCTGTTTTTTC-3'，55 bp；R：5'-TCGAGGAAAAACAGAGATTACG AAGATGAATCTCTTGAATTCATCTTCGTAATCTCTGA-3'，60 bp），GAPDH为内参（序列为F：5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'，19 bp；R：5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'，20 bp）均由百奥迈科生物技术有限公司合成。反应条件：95℃预变性3 min后，95℃变性45 s，60℃退火45 s，72℃延伸30 s，共35个循环，72℃再延伸7 min。收集RT- QPCR反应荧光信号，进一步做产物熔解曲线分析，检测qPCR产物的特异性。qPCR数据用2^{-ΔΔCt}法进行分析^[13]，用7721细胞做均一化，得到目的基因Foxp1在不同细胞中的相对表达量。筛选高表达Foxp1 mRNA的癌细胞用于后续实验研究。

1.2.2 靶向Foxp1 mRNA的siRNA序列筛选

设计分别靶向Foxp1基因823、1 015和2 516碱基位的三对siRNA序列，见表1。进行序列比对（BLAST），确定与人类其他基因组没有同源性，并注意了G/C的百分比为50%以上，避免选取高G含量或连续G区段。三条siRNA序列均由百奥迈科生物技术有限公司协助合成。将高表达Foxp1的癌细胞接种于24孔培养板中进行培养，当细胞生长融合达到80%时参照Lipofectamine 2000转染

表1 靶向Foxp1基因823、1 105和2 516碱基位的siRNA序列

Table1 siRNA sequences of targeted Foxp1-823, 1 015 and 2 516

siRNA	Sense(5'-3')	Antisense(5'-3')
Foxp1-1015-siRNA	CUGGAAAACAGCCUAAAGAdTdT	UCUUUAGGCUGUUUCCAGdTdT
Foxp1-823-siRNA	CAGAGAUUACGAAGAUGAAdTdT	UUCAUCUUCGUAUCUCUGdTdT
Foxp1-2516-siRNA	CUAUGAUGACACCUCAAGUdTdT	ACUUGAGGUGUCAUCAUAGdTdT

试剂操作说明将上述三对siRNA靶序列分别转染培养细胞。转染后48 h提取总RNA，RT-QPCR检测Foxp1 mRNA表达水平，GAPDH（Glycoraldelyde-3-phosphate dehydrogenase）为内参。反应条件同上。筛选较高抑制能力的siRNA序列用于构建靶向Foxp1的siRNA慢病毒载体。

1.2.3 构建靶向Foxp1的siRNA慢病毒载体

将带有绿色荧光蛋白（green fluorescence protein, GFP）有利于细胞转染后跟踪观察的质粒pLL3.7由内切酶Hpa I、Xho I进行双酶切后，用DNA连接酶将体外合成的具有较高特异性siRNA Foxp1序列插入到慢病毒的转移质粒中连接成环状，构建pLL3.7- siRNA Foxp1重组质粒，见表2。转化感受态大肠杆菌TOP10，在LB琼脂平板上培养后，挑取白色单菌落，用特异引物进行PCR扩增，反应条件同上。以重组成功的pLL3.7质粒作为对照标准样品。电泳检测扩增产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序，验证其准确性。

病毒颗粒的复制由三质粒系统转染人胚肾293T细胞产生。将新制备的含有Foxp1-siRNA序列pLL3.7重组质粒和另外两个质粒pMD2.G、psPAX2，按如下比例：20 μg pLL3.7-Foxp1，12 μg psPAX2和5 μg pMD2.G溶于转染试剂（Gibco-BRL, Gaithersburg, MD）室温静置30 min组成慢病毒三质粒系统，待293T细胞生长融合达到50%时轻轻加入慢病毒三质粒系统。4~6 h后换新鲜培养液，72 h后收集，低速离心（800 r/min，5 min）去杂质，1 ml磷酸盐缓冲液重悬沉淀物，储存于-80℃。用RNA抽提试剂盒提取培养液样品中病毒内的RNA，再反转录成cDNA与供参照的标准样品（重组成功的pLL3.7质粒）同时进行RT-QPCR检测，反应体系和反应条件同上，构建靶向Foxp1的siRNA慢病毒载体（lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA）（MOI值为20）。同时构建不含有Foxp1-siRNA序列的直接三质粒系统包装的空病毒载体作为对照组，步骤同前。

1.2.4 检测lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA感染细胞后Foxp1的表达

将高表达Foxp1的癌细胞以2×10⁵/孔接种于6孔培养板，培养24 h后加入lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA

继续培养，分别在24、48、72 h，荧光显微镜下观察细胞中siRNA Foxq1序列的荧光信号。并在培养72 h后，分别进行RT-QPCR检测Foxp1 mRNA表达水平（反应条件同上）和Western blot检测细胞中Foxp1蛋白的表达。Western blot采用常规方法操作：细胞经lenti-pLL3.7-siRNA Foxp1处理48 h后提取各组细胞蛋白，用胰蛋白酶消化细胞，PBS洗涤一次，每孔细胞以15 μl PBS悬浮。改良Lowry法测定蛋白浓度，调整平衡蛋白量。样品与2×SDS上样缓冲液[0.1 mol/L Tris-HCl（pH6.8），4%SDS，20%甘油，0.1%溴酚蓝，5%β-巯基乙醇]等体积混合，95℃水浴5 min变性，每孔上样量为15 μg蛋白，等量上样于10%聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE电泳）。电泳结束后，采用半干转印仪（BIO-RAD公司）以15V恒压转印1 h，将凝胶中蛋白质转移到PVDF膜上，用5%的脱脂牛奶封闭后，加TBST稀释的鼠抗人Foxp1抗体（1:400）中，4℃孵育过夜；加经辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠IgG抗体（1:1 000）室温反应2 h，于暗室中显影，显色采用ECL化学发光剂（super signal west pieo chemiluminescent substrate, Cat NO34077, PIERCE）Kadak曝光显影。以β-actin作为内参。

1.2.5 CCK-8法检测细胞增殖活力

将高表达Foxp1的癌细胞以5×10³/孔接种于96孔培养板，用含10%胎牛血清的DMEM基础培养液孵育24 h后加入lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA，分别再培养24、48、72 h后，每孔加入CCK-8溶液10 μl，继续孵育1.5 h，选择450 nm波长，在酶标仪上测定各孔吸光度值（OD值），记录结果，绘制细胞生长曲线。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

在培养的高表达Foxp1的癌细胞中加入lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后继续培养48 h，收集细胞，0.01M PBS洗涤2次，加入500 μl结合缓冲液制成细胞悬液，与5 μl Annexin V、5 μl PI（propidium iodide）共同孵育15 min，上机检测，CellQuest软件进行分析。

1.2.7 检测细胞迁移能力

（1）检测细胞二维空间迁移的划痕愈合实

表2 构建慢病毒载体的核酸序列
Table2 Nucleotide sequence of the recombinant lentiviral vector

HpaI	Sense	Loop	Antisense	Terminator	Xho I
5'- T	CAGAGATTACGAAGATGAA	TTCAAGAGA	TTCATCTTCGTAATCTCTG	TTTTTTC	-3'
3'- A	GTCTCTAATGCTTCTACTT	AAGTTCTCT	AAGTAGAAGCATTAGAGAC	AAAAAAGAGCT	-5'

验：将高表达Foxp1的癌细胞以 2×10^4 /孔接种于24孔培养板，培养24 h后加入lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA，继续培养48 h。待细胞融合后，用10 μ l移液器垂直培养板底部呈“一”字形划痕，镜下记录划痕区相对距离，DMEM培养液洗涤后，用100 μ l无抗DMEM FCS培养液继续培养。划痕后24、48 h，倒置显微镜下观察细胞从划线处向外爬出的数量与距离，随机选取5个视野（ $\times 40$ ），用软件（Image-ProPlus, version 4.5.1, 美国）测量，计算均值。（2）检测细胞三维空间迁移的细胞侵袭小室实验：将高表达Foxp1的癌细胞以 2×10^4 /孔接种于24孔培养板，培养24 h后加入lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA，继续培养72 h。2.5%胰酶消化后重悬于不含血清的DMEM培养液中，细胞浓度为 1×10^6 。将200 μ l细胞悬液加于上室，下室为600 μ l DMEM培养液（含10%胎牛血清），在37℃、5%CO₂条件下培养24 h。擦去膜上层细胞，取膜经甲基紫染色后，镜下可见穿膜细胞呈紫色。每孔随机计数5个视野，取其均值。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件包，数据表示用均数 $\pm$ 标准差（ $\bar{x}\pm s$ ），计数资料比较采用方差分析和t检验。率的比较用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 选择高表达Foxp1 mRNA的肝癌细胞

RT-QPCR检测四种不同的肝癌细胞中Foxp1 mRNA的结果显示：7721细胞中Foxp1 mRNA的表达分别明显高于其他三株细胞7402、97H和HepG2细胞的9倍、2.01倍和5.1倍，差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ），见图1。因此选用7721细胞作为高表达Foxp1的细胞用于后续研究。

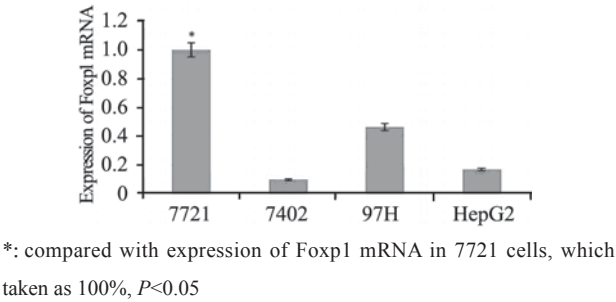


图1 四种肝癌细胞中Foxp1 mRNA的表达（RT-QPCR）
Figure1 Expression of Foxp1 mRNA in the four different hepatoma carcinoma cells（RT-QPCR）

2.2 选择有效的针对Foxp1的siRNA靶序列

设计针对Foxp1的三对siRNA靶序列被分别转染入7721细胞，RT-QPCR检测细胞中Foxp1 mRNA表达，与单纯转染脂质体组比较，Foxp1 mRNA的沉默效率分别为Foxp1-823-siRNA: 78.23%、Foxp1-1015-siRNA: 55.7%和Foxp1-2516-siRNA: 54.29%，Foxp1-823-siRNA较其他两对siRNA具有更高的抑制效率（ $P<0.05$ ），而Foxp1-1015-siRNA和Foxp1-2516-siRNA的抑制效率差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），见图2。

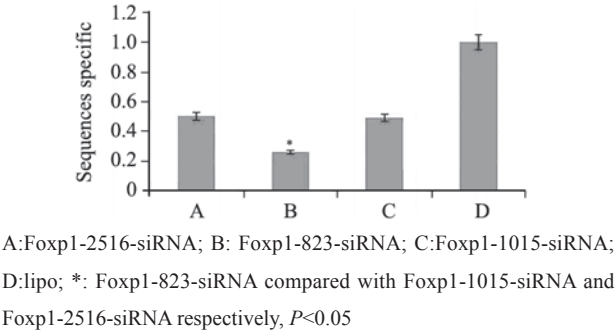


图2 Foxp1 siRNA靶序列筛选结果（RT-QPCR）
Figure2 Screening of siRNA Foxp1 target sequences（RT-QPCR）

2.3 Lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA的测序结果

测序结果证实插入序列完全正确，lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA构建成功。分别在lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA感染后24、48、72 h，荧光显微镜下均可见绿色荧光信号，且信号强度随时间推移逐渐增强，见图3，表明细胞中持续表达siRNA。

2.4 Lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA下调7721细胞中Foxp1的表达

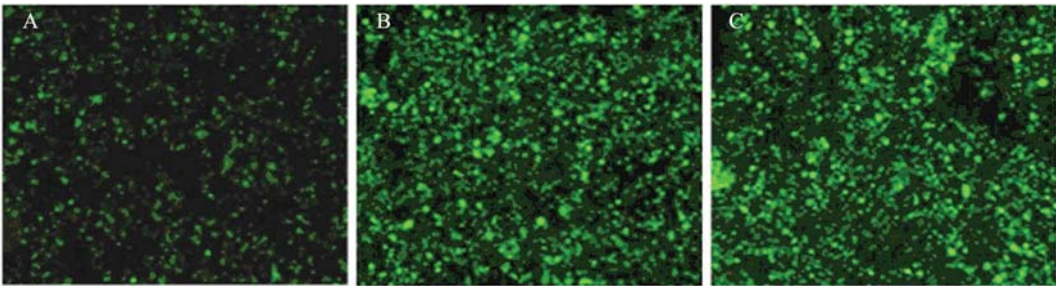
RT-QPCR和Western blot检测结果均显示7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后，与空病毒载体对照组比较，Foxp1 mRNA和蛋白表达均显著减少（ $P<0.05$ ），见图4。

2.5 7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后增殖受抑

CCK-8法检测细胞增殖活力的生长曲线显示：7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后48 h和72 h，细胞增殖明显低于空病毒载体对照组，尤以72 h明显（ $P<0.05$ ），见图5。

2.6 7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后凋亡增加

流式细胞仪检测结果显示7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA 48 h后，凋亡细胞的比例明显增加，与空病毒载体对照组比较差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），见图6。



A:24 h;B:48 h;C:72 h

图3 Lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA感染7721细胞后荧光显微镜下检测结果

Figure3 The result of infecting 7721 cells with lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA observed by fluorescence microscopy

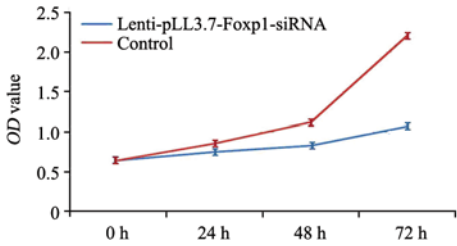


图5 7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后的生长曲线

Figure5 Growth curve of 7721 cells infected with lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA for 24, 48 and 72h

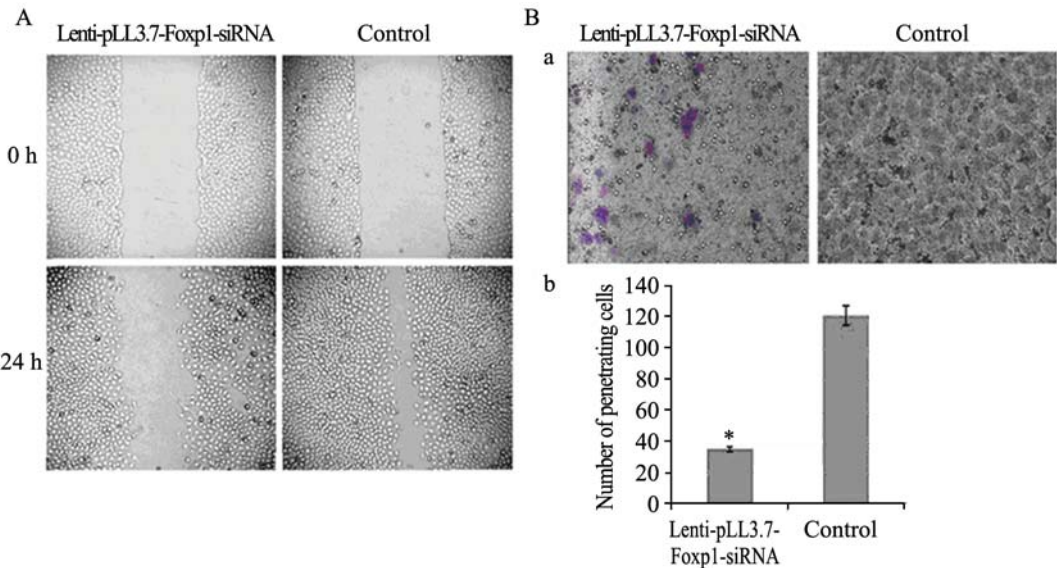
2.7 7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后迁移能力下降

检测划痕愈合实验和细胞侵袭小室实验结果均显示：细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后细胞二维空间迁移水平在24和48 h均明显低于空病毒载体对照组（均 $P<0.05$ ），见图7A。感染48 h

后细胞的三维空间迁移能力也受到明显抑制，穿膜细胞均数（ 38.49 ± 6.17 ）较空病毒载体对照组（ 124.61 ± 15.22 ）明显减少（ $P<0.05$ ），见图7B。

3 讨论

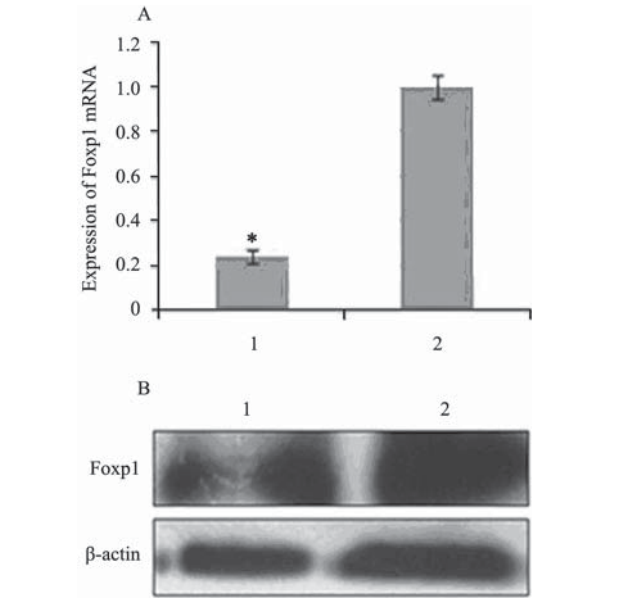
Foxp1基因位于染色体3p14.1，而3号染色体短臂（3p）的杂合性缺失是很多恶性肿瘤常见的基因事件^[14-15]提示Foxp1可能是一个肿瘤抑制基因。但又有许多肿瘤中Foxp1的过表达造成患者预后不佳，如不同类型的淋巴瘤等，提示Foxp1可能具有某种癌基因的作用^[16]。Datta等^[17]研究表明：Foxp1是microRNA-1（miR-1）基因的作用靶点之一；在人原发性肝癌中miR-1的表达显著下调，使其靶向抑制Foxp1的能力下降，导致Foxp1过表达，并与癌恶性生物学行为有关。当miR-1的表达水平升高时，通过诱导细胞凋亡和抑制细胞周期进程可以



A: Wound healing assay; B: Transwell assay; a: penetrating cells observed by microscopy; b: counting statistics of penetrating cells; *: compared with control of the empty viral vector, $P<0.05$

图7 7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后的细胞迁移情况

Figure7 Migration of 7721 cells infected with lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA



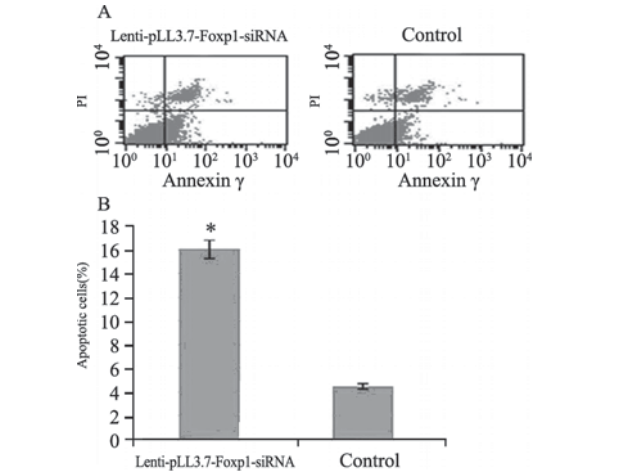
A: Foxp1 mRNA level(RT-QPCR); B: Foxp1 protein level(Western blot); 1:Lenti-PLL3.7-Foxp1-siRNA;2: control: the empty viral vector; *: comparaed with the control of the empty viral vector, $P<0.05$

图4 7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后Foxp1的表达
Figure4 Expression of Foxp1 in 7721 cells infected with lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA

使肝癌细胞的生长受到明显抑制，而此时Foxp1的表达是减少的。因此，作者推断Foxp1可能参与了肝癌的发生。

本研究发现不同的肝癌细胞中均有Foxp1的表达，但表达水平不一，其机制可能与癌不同的生物学行为有关（另文研究）。本文选择高表达Foxp1基因的7721肝癌细胞作为研究Foxp1功能的细胞，通过下调Foxp1的表达进一步探讨该基因对肝癌增殖、凋亡和迁移的影响。本文设计了针对Foxp1的siRNA靶序列，尝试使用慢病毒载体介导的RNAi技术来下调Foxp1的表达。

siRNA是由短dsRNA作用于同源RNA序列，在细胞内核酸酶的作用下使得与dsRNA有同源序列的mRNA降解，从而使目的基因的表达得到抑制。该方法是抑制基因表达的有效工具，目前已经成为研究基因功能以及进行基因治疗的新手段。但实验室常用的方法利用脂质体等转染将siRNA递达到细胞中发挥作用，但在体内研究表明脂质体等载体对细胞存在较大毒性、转染效率低、瞬时转染不能长期沉默基因等缺点，限制了siRNA技术在体内的研究。基于人免疫缺陷病毒（HIV-1）的慢病毒家族能够感染分裂及非分裂细胞、转移基因片段容量大、目的基因表达时



A: after been stained by Annexin V-FITC and propidium iodide(PI), the normal live cells were not stained(lower left); the apoptosis cells at early stage were only stained by Annexin V-FITC and the PI staining was negative(lower right), such cells in lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA group were significantly more than those in control group; the necrotic cells and apoptotic cells at later staged could be stained both by Annexin V-FITC and PI(upper right). The detection error within tolerance range was showed in upper left; B: the histogram of apoptosis comparing of two groups; *: comparaed with control of the empty viral vector, $P<0.05$

图6 7721细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后48h凋亡增加

Figure6 Increased apoptosis of 7721 cells infected with lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA for 48h

间长、免疫反应小等优点，使慢病毒家族能成为理想的基因转移载体^[11-12]。正如本文构建不含有Foxp1-siRNA序列的直接三质粒系统包装的慢病毒载体对照组感染细胞后，因其为不含致病基因、在细胞内无复制能力，未产生明显的细胞毒作用，表明慢病毒载体对细胞是安全的。

本文构建的靶向Foxp1的siRNA慢病毒载体（lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA）感染7721细胞24、48、72 h，荧光显微镜下均可见绿色荧光信号，且信号强度随时间推移逐渐增强，表明细胞中持续表达siRNA，证明慢病毒载体能有效的将Foxp1-siRNA 递达到细胞中。RT-PCR和western blot检测结果显示Foxp1 mRNA和蛋白的表达水平显著降低，说明siRNA在细胞内发挥的降解Foxp1 mRNA的作用，进而使Foxp1蛋白合成减少。肝癌细胞感染lenti-pLL3.7-Foxp1-siRNA后能有效抑制其增殖，促进其凋亡，同时抑制细胞迁移。研究结果提示Foxp1作为一种多功能转录因子，可能参与肝癌的演进，发挥癌基因的作用与肝癌细胞恶性生物学行为有关。进一步研究Foxp1促进肝癌演进的作用机制有可能为肝癌的发病学增添新的理论依

据，Foxp1基因有可能成为肝癌基因治疗的新靶点，从而为肝癌的基因治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] Yuen MF, Hou JL, Chutaputti A. Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region[J]. J Gastroenterol Hepatol,2009, 24(3): 346-53.

[2] Amarapurkar D, Han KH, Chan HL, *et al.* Application of surveillance programs for hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific Region[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(6): 955-61.

[3] Mendizabal M, Reddy KR. Current management of hepatocellular carcinoma[J]. Med Clin North Am,2009, 93(4): 885-900.

[4] Jepsen K, Gleiberman AS, Shi C, *et al.* Cooperative regulation in development by SMRT and FOXP1[J]. Genes Dev,2008, 22(6): 740-5.

[5] Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of Forkhead box (Fox) proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(11): 847-59.

[6] Bates GJ, Fox SB, Han C, *et al.* Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with that of estrogen receptor-beta in primary invasive breast carcinomas[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 111(3): 453-9.

[7] Rayoo M, Yan M, Takano EA, *et al.* Expression of the forkhead box transcription factor FOXP1 is associated with oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and improved survival in familial breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(10): 896-902.

[8] Takayama K, Horie-Inoue, Ikeda K, *et al.* FOXP1 is an androgen-responsive transcription factor that negatively regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 374(2): 388-93.

[9] Toma MI, Weber T, Meinhardt M, *et al.* Expression of the Forkhead transcription factor FOXP1 is associated with tumor grade and

Ki67 expression in clear cell renal cell carcinoma[J]. Cancer Invest, 2011, 29(2): 123-9.

[10] Chen L, Qin J, Zhu YY. The progress of RNA interference research in the field of medicine[J]. Yao Wu Sheng Wu Ji Shu, 2009, 16(1): 83-9. [陈莉,秦婧,朱远源.在医药领域中RNA干扰研究进展[J]. 药物生物技术, 2009, 16(1): 83-9.]

[11] Ding ZY, Liang HJ. Advance in RNAi mediated with lentivirus-based vectors[J].Yi Xue Yan Jiu Za Zhi, 2009, 38(4): 15-6. [丁震宇, 梁后杰. 慢病毒载体介导RNAi的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(4): 15-6.]

[12] Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy[J]. Gene Ther, 2006, 13(6): 553-8.

[13] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-8.

[14] Pariani MJ, Spencer A, Graham JM, *et al.* A 785kb deletion of 3p14.1p13, including the FOXP1 gene, associated with speech delay, contractures, hypertonia and blepharophimosis[J]. Eur J Med Genet, 2009, 52(2-3): 123-7.

[15] Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer[J]. Cancer Cell, 2010, 18(1): 11-22.

[16] Brown PJ, Ashe SL, Leich E, *et al.* Potentially oncogenic B-cell activation induced smaller isoforms of FOXP1 are highly expressed in the activated B cell like subtype of DLBCL[J]. Blood, 2008, 111(5): 2816-24.

[17] Datta J, Kutay H, Nasser MW, *et al.* Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis[J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5049-58.

[编辑：周永红；校对：刘红武]