

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.013

SW620 细胞 RACK1 稳定 RNA 干扰细胞系的构建与鉴定 *

张秉栋¹ 薛勇敢¹ 田 博² 王白石³ 张加金³ 贾宝庆^{3△}

(1 解放军医学院 北京 100853; 2 陕西中医学院附属医院肿瘤外科 陕西 咸阳 710000; 3 解放军总医院肿瘤外科 北京 100853)

摘要 目的:为研究 RACK1 在结肠癌发生发展中的作用,构建结肠癌 RACK1 基因稳定 RNA 干扰(RNAi)细胞系。**方法:**根据人 Gnb211 cDNA 序列,运用干扰原则选择 5 个干扰位点并合成相应干扰片段,定向克隆入 pLentilox3.7 干扰载体鼠 U6 启动子后并测序验证。用干扰及对对照质粒分别转染 HEK293T 细胞 48 小时后,RT-PCR 鉴定干扰效率,选出干扰效率较高的质粒包装慢病毒感染人结肠癌细胞 SW620,流式无菌分选出荧光阳性的细胞扩增培养,RT-PCR 及 Western blotting 鉴定慢病毒干扰效率。使用慢病毒构建的 SW620 RACK1 稳定 RNAi 细胞系及对照组进行 MTT 实验初步研究 RACK1 对 SW620 增殖的影响。**结果:**酶切和测序证实 RACK1shRNA 质粒构建正确,产生能同时表达绿色荧光蛋白(EGFP)和 RACK1 shRNA 的慢病毒载体质粒。慢病毒转导 SW620 并流式无菌分选扩增培养后,与空载体组相比,2 个 RNAi 组均不同程度抑制 RACK1 表达,RACK1shRNA5 抑制作用最明显,RACK1 干扰组细胞增殖得到了抑制。**结论:**SW620 细胞 RACK1 稳定 RNAi 细胞系构建成功,为深入研究 RACK1 在结直肠癌发生发展中的作用奠定了基础。

关键词:慢病毒;结肠癌;RNA 干扰;Gnb211 基因;SW620

中图分类号:Q75;R-33;R735.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)19-3651-06

Construction and Identification of Stable RACK1-RNAi SW620 Cell Lines*

ZHANG Bing-dong¹, XUE Yong-gan¹, TIAN Bo², WANG Bai-shi³, ZHANG Jia-jin³, JIA Bao-qing^{3△}

(1 Chinese PLA Medical School, Beijing, 100853, China;

2 Department of surgical oncology, Affiliated Hospital, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 710000, China;

3 Departments of Surgical Oncology, Chinese PLA General Hospital, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To construct stable RACK1-RNAi SW620 cell lines and lay a foundation for further research on the role of RACK1 in the occurrence and development of colon cancer. **Methods:** Following the principle of RNA interference, five interference sites were selected according to human Gnb211 cDNA sequence. These five interference fragments according to the five interference sites were synthesized and cloned into the site after mouse U6 promoter of pLentilox3.7 vector. After the plasmids were extracted and sequenced, they were subsequently transfected into HEK293T cells for 48 hours. The interference efficiency of the plasmids on the target gene was detected by RT-PCR. Two efficient plasmids were selected, then the control plasmid and the two selected plasmids were subsequently packaged into lentiviral viruses to infect human colon cancer cell line SW620. The interference efficiency of the lentiviral viruses was detected by RT-PCR and Western blotting. The impact of RACK1 RNAi on the proliferation of cell lines was assessed by MTT used the SW620 transfected with lentiviral virus. **Results:** The results of restriction enzyme analysis and DNA sequence analysis confirmed RACK1shRNA plasmids were constructed correctly, could express green fluorescent protein (EGFP) and RACK1 shRNA at the same time. SW620 cell lines transfected with lentiviral viruses were sorted by flow cytometry and amplified. Compared to control group, the RACK1 mRNA expression were suppressed in two experimental groups(RACK1Ri3,RACK1Ri5), especially RACK1Ri5 obviously suppressed the RACK1 mRNA expression. The proliferation of RACK1 RNAi group was inhibited. **Conclusion:** Stable RACK1-RNAi SW620 cell lines have been constructed successfully. This greatly facilitates the further studies on the role of RACK1 in the occurrence and development of colon cancer.

Key words: Lentiviral virus; Colon cancer; RNA interference; Gnb211 gene; SW620

Chinese Library Classification(CLC): Q75;R-33;R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3651-06

前言

活化的蛋白激酶 C 受体 1(RACK1)是活化的蛋白激酶 C

受体家族(RACKs)的一员,是一种胞浆内游离的支架蛋白,大小为 36kDa 拥有 7 个 WD40 结构域^[1-4],可以结合多种胞浆蛋白或亚细胞结构,参与多条代谢通路,现有研究表明 RACK1

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81171901)

作者简介:张秉栋(1987-),男,硕士研究生,主要研究方向:结直肠癌发生发展的分子机制

△通讯作者:贾宝庆,电话:010-66937598,E-mail:baopingjia@126.com

(收稿日期:2014-12-23 接受日期:2015-01-18)

表达异常与许多肿瘤的发生和发展有关^[5]。其中 RACK1 与结肠癌发生发展的关系仍有争议,有报道 RACK1 可通过对促凋亡蛋白 Fem1b 的抑制来发挥自己促进结肠癌细胞生成及增殖的作用^[6],也有研究发现 RACK1 的表达量与结肠癌的分化程度与淋巴结转移的转移相关,与癌旁组织相比,结肠癌组织中 RACK1 高表达,分化差的癌组织中 RACK1 表达相对较高,有淋巴结转移的患者的癌组织中 RACK1 表达相对较高^[7],相反 Mamidipudi 等人证明 RACK1 可以在细胞周期中的 G(1)期以及各有丝分裂调定点处抑制酪氨酸激酶 Src 的活性从而阻止细胞周期的进程,以发挥抑制癌细胞形成与增殖的作用^[8],也有报道称 RACK1 在大肠癌中的表达量与癌组织的分化程度成正相关,分化程度越低,RACK1 表达量越低^[9]。因此 RACK1 在结肠癌发生发展中的作用仍需要进一步研究。现有常用的结肠癌细胞种类很多,例如:SW480,SW620,DLD-1,HCT116,HT29 等。根据 ATCC 提供资料,SW480 和 SW620 来自于同一名 50 岁结肠癌患者,SW480 来自原发灶,SW620 来自淋巴结转移灶^[10-13],因此 SW480 和 SW620 为一组研究结肠癌增殖转移的良好模型。与 SW480 相比,SW620 中 RACK1 表达量相对较高^[6]。基于上述认识及现状,本课题拟构建 SW620 的 RACK1 稳定 RNAi 细胞系,为进一步研究 RACK1 在结肠癌发生发展中的作用提供有效的工具。

1 材料与方法

1.1 主要材料、细胞培养条件及主要实验设备

SW620 和 HEK293T 细胞系,携带绿色荧光蛋白的慢病毒载体 pLentiLox3.7,慢病毒包装质粒 VSVG,RSV-REV 和 pRRE,大肠杆菌 DH5 α 均由本实验室保存。限制性内切酶 *Hpa*I, *Xho*I, *Xba*I 和 *Sol*ution I 购自 TaKaRa 公司,逆转录试剂盒购自 TIANGEN 公司,质粒小量抽提试剂盒、核酸胶回收、质粒大量抽提试剂盒和 VigoFect 购自 Vigorous 公司,DMEM、L15、胰酶、胎牛血清购自 Gibco 公司。本实验中所用到的引物由上海生工合成。兔抗 RACK1 多克隆抗体,小鼠抗 β -actin 单克隆抗体均购自 Sigma 公司。HEK293 细胞系用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃,5%CO₂ 条件下培养,SW620 细胞系用含 10%胎牛血清的 L15 培养基在 37℃,无 CO₂ 条件下培养。

主要实验设备包括:PCR 扩增仪 PE 公司;电泳槽 Amer-

sham Pharmacia Biotech;恒温孵育箱 Stuart Scientific;分光光度计 Amersham Pharmacia Biotech;凝胶成像系统 Amersham Pharmacia Biotech;恒温摇床 哈尔滨东联公司;倒置荧光显微镜 Nikon 公司;低温高速离心机 Beckman 公司;超净工作台 Jouan 公司;CO₂ 培养箱 SANYON 公司;流式细胞仪 BD 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 RACK1 干扰载体质粒的构建 以人 Gnb211 cDNA 序列(GI: 83641897)为模板,按照干扰序列设计原则,通过 Blast 排除特异性差的序列,选取 5 条干扰序列,序列如下:

1,5'-CAGGGATGAGACCAACTAT-3' (位于人源 RACK1 mRNA 的 +244-+262 nt);

2,5'-AGCTGAAGACCAACCACAT-3' (位于人源 RACK1 mRNA 的 +654-+672 nt);

3,5'-CCATCATCATGTGGAAACT-3' (位于人源 RACK1 mRNA 的 +222-+240 nt);

4,5'-CTGACCAGGGATGAGACCA-3' (位于人源 RACK1 mRNA 的 +239-+257 nt);

5,5'-GCCATCCAGTGCCATCCTC-3' (位于人源 RACK1 mRNA 的 +55-+73 nt);

根据所选靶序列,末端引入 *Hpa*I 和 *Xho*I 酶切位点,中段引入能形成 Loop 的片段,设计出能够转录具有发卡结构的双链 siRNA 的 DNA 序列:

RACK1Si-1Forward:5'-TCAGGGATGAGACCAACTATTTCAAGAGAATAGTTGGTCTCATCCCTGTTTTTTC-3'

RACK1Si-1Reverse:5'-TCGAGAAAAAACAGGGATGAGACCAACTATTTCTCTTGAAATAGTTGGTCTCATCCCTGA-3'

RACK1Si-2Forward:5'-TAGCTGAAGACCAACCACATTTCAAGAGAATGTGGTTGGTCTTCAGCTTTTTTTC-3'

RACK1Si-2Reverse:5'-TCGAGAAAAAAGCTGAAGACCAACCACATTTCTCTTGAAATGTGGTTGGTCTTCAGCTA-3'

RACK1Si-3Forward:5'-TCCATCATCATGTGGAAACTTTCAAGAGAAGTTTCCACATGATGATGGTTTTTTC-3'

RACK1Si-3Reverse:5'-TCGAGAAAAAACCATCATCATGTGGAAACTTCTCTTGAAAGTTTCCACATGATGATGGA-3'

RACK1Si-4Forward:5'-TCTGACCAGGGATGAGAC-CATTCAAGAGATGGTCTCATCCCTGGTCAGTTTTTTC-3'

RACK1Si-4Reverse:5'-TCGAGAAAAAAGTACCAGGGATGAGACCATCTCTTGAAATGGTCTCATCCCTGGTCAGA-3'

RACK1Si-5Forward:5'-TGCCATCCAGTGCCATCCTCTTCAAGAGAGAGGATGGCACTGGATGGCTTTTTTTC-3'

RACK1Si-5Reverse:5'-TCGAGAAAAAAGCCATCCAGTGCCATCCTCTCTTGAAAGAGGATGGCACTGGATGGCA-3'

用 *Hpa*I+*Xho*I 过夜双酶切 pLentiLox 3.7 载体。将公司合成的两条 Oligo 序列用去离子水分别配成浓度为 25mM 的溶液。分别取对应的 Oligo 溶液各 10 微升混匀,100℃煮沸变性 5-10 分钟,然后缓慢退火到室温,将适量此产物与双酶切回收的 pLentiLox 3.7 载体连接。将构建的重组载体转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在 37℃培养 14 小时挑出单克隆,将单克隆培养扩增,提取质粒 *xba*I+*xho*I 双酶切鉴定,酶切鉴定正确

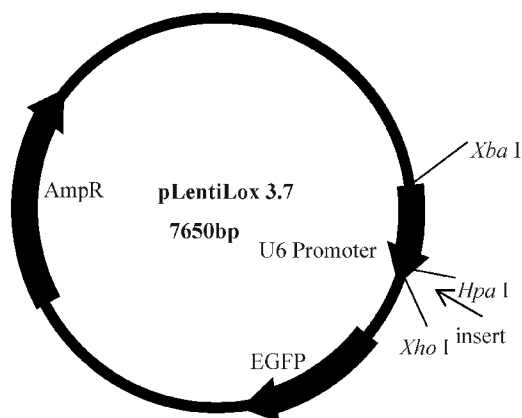


图 1 pLentiLox 3.7 质粒结构示意图

Fig. 1 Plasmid maps of pLentiLox 3.7

的质粒送上海生工测序得到 pLentiLox 3.7/ RACK1 的正确克隆。测序为引物: Mouse U6 Promoter; 5'-CAG TGC AGG GGA AAG AAT AGT AGA C-3'。

1.2.2 病毒包装 应用转染试剂 VigoFect, 使 Si3/Si5 重组干扰载体和空载体 pLentiLox3.7 分别与病毒包装质粒 VSVG、RSV-REV 和 pRRE 共同转染 HEK293T 细胞(转染比例为 2:1:1)进行病毒包装。于转染后 12 小时后换 1%FBS 的 DMEM 完全培养基, 换液后 36 小时收取培养基。

1.2.3 重组干扰载体对结肠癌细胞的转染及检测 在 100 mm 培养皿用 L15 培养基培养 SW620 细胞, 细胞密度达到 60% 时换用含有慢病毒的 DMEM 培养基 7 mL 和 3 mL L15, 感染 36 小时后换用 L15。继续培养 72 小时, 用激光共聚焦显微镜观察感染效果。然后用流式细胞仪无菌分选绿色荧光细胞并扩增培养。采用 RT-PCR 和 Western blotting 检测 RACK1 RNAi 效果。RACK1 RT-PCR 引物为上游 5'-GCT CTG CCA TAA ACT TCT AGC GTG TGC-3' 和下游 5'-CTG TGC TTC TGG AGG CAA GGA TGG CCA-3'^[10], GAPDH 引物为上游 5'-AAC GTG TCA GTG GTG GAC CTG-3' 和下游 5'-AGT GGG TGT CGC TGT TGA AGT-3'。反应条件为① 94 °C 5min; ② 94 °C 30 s, 54 °C 30 s,

72 °C 35 s, 24 cycles。RT-PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳 40 min, 在紫外线下观察结果。Western blotting 检测 RACK1 蛋白表达: 收获慢病毒稳定感染的细胞系样品, 提取蛋白, 测定蛋白浓度, 以每孔 10 μg, 140V 浓缩胶电泳, 160V 分离胶电泳, 直至溴酚兰带到达底部。恒流 300 mA 电转膜 2 h。10% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 1 h, 一抗 4 °C 过夜, 二抗 37 °C 1 h, 加 GE 曝光底物, 暗室中胶片曝光。

1.2.4 MTT 将待测细胞以合适的数量(2000 个/孔)接种到 96 孔细胞培养板中; 接种后每 24 小时测量一次: 取出一个 96 孔板, 向培养基中加入 MTT 20 μL, 继续培养 4 小时; 小心吸干全部培养基, 向每个培养孔中加入 150 μL DMSO, 溶解紫色结晶。将培养板放在摇床轻微摇动 15 分钟。在酶标仪上读取 630 nm (参考波长) 和 570 nm 的吸光值。每个样品做 4 个重复孔, 计算平均值。连续测量 5 天, 得到不同细胞的生长曲线。

1.2.5 流式细胞仪无菌分选 将贴壁生长的 SW620 细胞胰酶消化重悬于 PBS 中, 加 1%FBS, 用流式细胞仪无菌分选, 分选后将所得细胞以每孔 10⁵ 个重新铺于 6 孔板, 加 2% 双抗 L15 培养基培养。筛选条件如(图 2)。

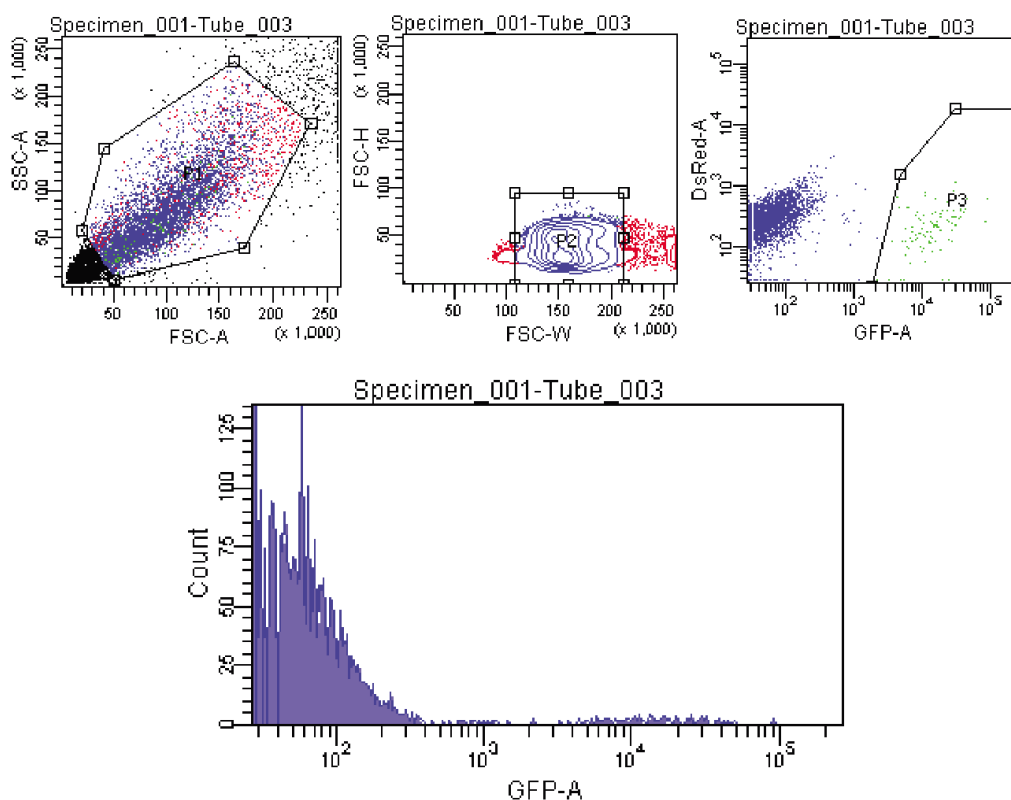


图 2 流式细胞仪无菌细胞无菌分选参数设定

Fig. 2 Settings of sorting cells by flow cytometry

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行分析。组间比较采用独立样本 T 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酶切鉴定及测序

重组载体转化大肠杆菌后提取的质粒经 Xba I+ Xho I 双

酶切, 有插入序列的片段大小为 379 bp, 空质粒切下的片段为 334 bp, 相差 45 bp, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳 1 h, 有插入序列的样品所切片段与空质粒切下片段明显分离(图 3, 4)。上述结果表明设计片段已插入 pLentiLox3.7 空载体。DNA 测序结果表明五个重组载体(pLentiLox3.7-RACK1)序列与合成的干扰载体框架完全一致, 进一步说明重组载体构建是成功的。

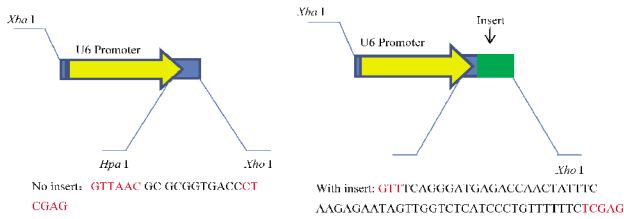


图 3 Xba I+Xho I 双酶切所得片段的示意图

Fig. 3 The fragments from double digestion (Xba I+Xho I)

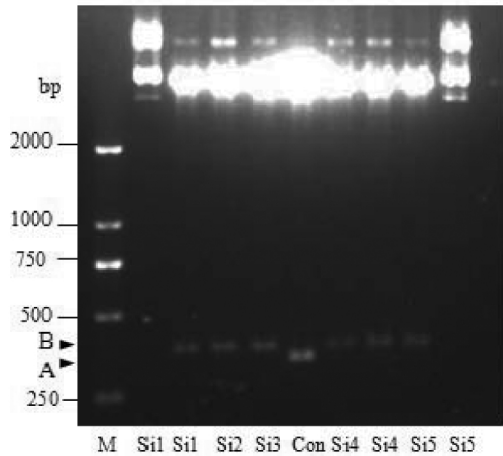


图 4 A 为 pLentiLox 3.7 空质粒双酶切(Xba I+Xho I)得到的片段(334 bp);B 为有插入序列载体双酶切(Xba I+Xho I)得到片段(379) bp

Fig. 4 Fragment A came from pLentiLox3.7 no insert digested by two enzymes (Xba I+Xho I); Fragment B came from pLentiLox3.7 with insert digested by two enzymes (Xba I+Xho I) M: marker. Plasmids Si1, Si2, Si3, Si4 and Si5 with Fragment B were Positive and others were negative. Con was Control

2.2 重组干扰载体对 HEK293T 的转染及有效干扰载体的筛选

五组重组载体及空白载体转染 HEK293T 后, GFP 于转染 12 h 开始表达, 以后表达逐步增强(图 5), 转染 72 h 后提取细胞 RNA, 采用 RT-PCR 方法检测 RACK1 表达, 筛选干扰效率最高的重组载体, 如图 Si3 和 Si5 为干扰效率最高的重组载体(图 6,7)。

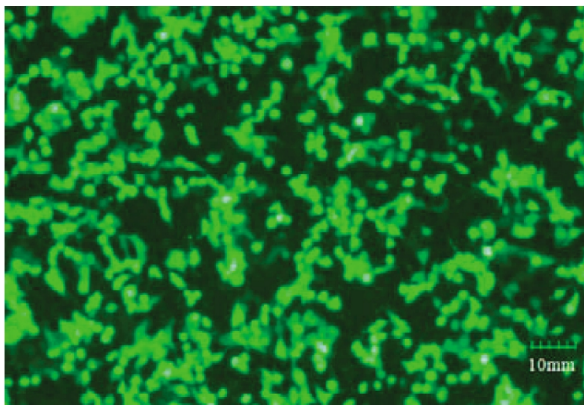


图 5 重组载体转染 HEK293T 细胞 24 小时后在荧光显微镜下见大量绿色荧光(× 100)

Fig. 5 EGFP expression in HEK293T cells transfected with the recombinant vectors under fluorescence microscope(× 100)

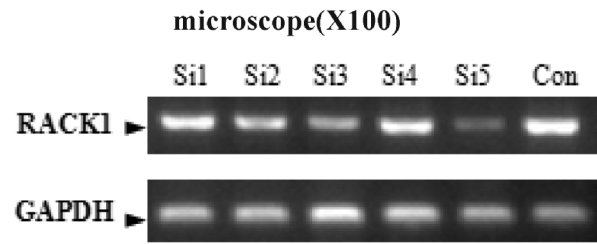


图 6 RT-PCR 检测各组中 RACK1mRNA 含量

Fig. 6 Downregulation of RACK1 mRNA of HEK293T detected with RT-PCR

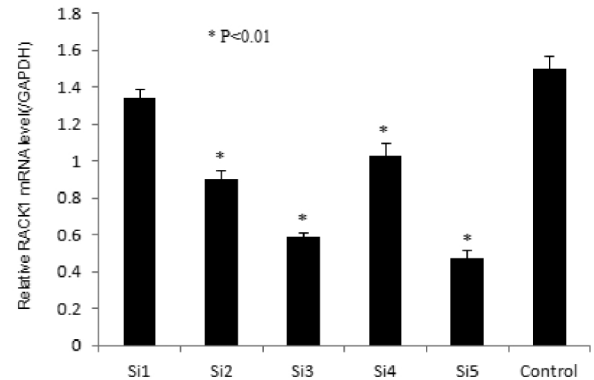


图 7 RT-PCR 检测各组中 RACK1mRNA 含量

Fig. 7 Downregulation of RACK1 mRNA of HEK293T detected with RT-PCR. (Quantified Fig.6 by ImageJ)

2.3 SW620 RACK1 干扰细胞系的建立及鉴定

使用 HEK293T 细胞将 Si3, Si5 和 pLentiLox 3.7 空载体包装慢病毒, 感染 SW620 细胞后 72 小时观察到 GFP 表达, 将 SW620 细胞进行无菌分选, 得到 3 株稳定感染细胞系(图 8)。收取细胞系蛋白及 RNA 分别用 Western blotting 和 RT-PCR 鉴定细胞系中 RACK1 的干扰效率, 结果表明 SW620 细胞中 RACK1 表达量显著降低, 重组载体 Si5 对 SW620 细胞中 RACK1 进行了有效干扰(图 9)。

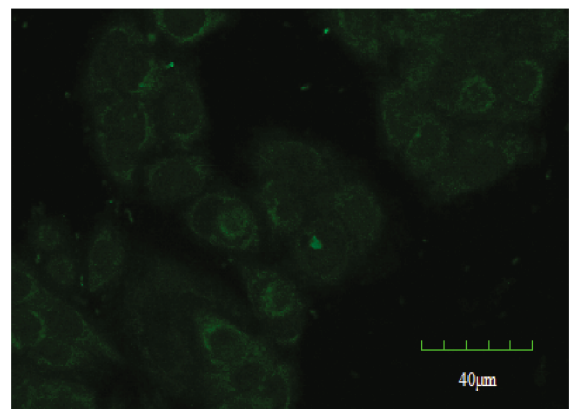


图 8 流式细胞仪无菌分选并扩增后的慢病毒转导 SW620 细胞在荧光显微镜下见大量绿色荧光(× 1000)

Fig. 8 After sorted by flow cytometry and amplified, EGFP expressed in SW620 transfected with lentiviral virus under fluorescence microscope (× 1000)

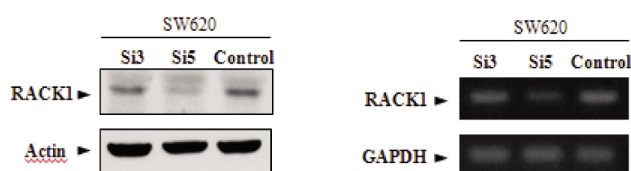


图9 Western blotting 及 RT-PCR 检测 SW620Si3 和 SW620Si5 细胞系中 RACK1 表达水平下调

Fig. 9 Downregulation of RACK1 expression in SW620Si3 and SW620Si5 detected by Western blotting

2.4 RACK1 干扰对 SW620 增殖的影响

用构建 SW620Si5 和 SW620Control 细胞系进行细胞增殖实验,观察 RACK1 对细胞生长的影响。实验结果发现干扰内源性 RACK1 抑制 SW620 细胞的增殖(图 10)。

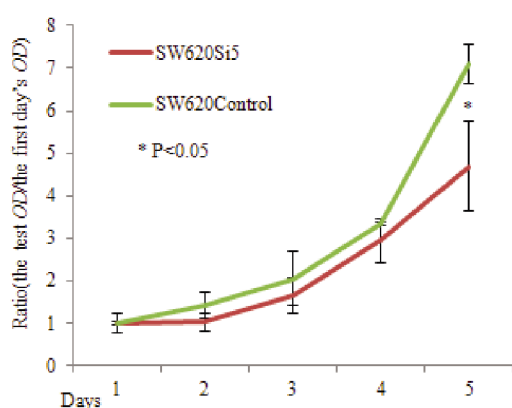


图 10 SW620Si5 第 5 天增殖倍数显著小于对照组

Fig. 10 On the fifth day, the proliferation ratio of SW620Si5 was significantly lower than that of the control group

3 讨论

目前研究基因功能的方法主要有大规模、高通量分析基因功能借助表达序列标签(expressed sequence tag, EST)法、基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)法、蛋白质组学分析方法、反向遗传学技术、生物信息学技术以及微阵列或 DNA 芯片技术、基因敲除、RNA 干扰和转基因技术等,通过这些方法将有可能在短时间内获得大量与基因功能相关的信息。其中 RNAi 技术能够在体外细胞研究达到基因敲除的类似效果,是细胞水平基因功能研究的重要方法^[14]。RNAi 技术的实现有多种方法:目标 RNA 的直接导入、目标 siRNA 表达载体的导入和 siRNA 表达框架的导入。这些序列的导入都受到目的细胞质粒转染效率的影响,如果目的细胞的质粒转染效率较低(低于 70%),则目标 RNA 的直接导入和 siRNA 表达框架的导入就不能够得到满意的干扰效果,这就需要构建腺病毒或慢病毒载体,利用病毒载体的高感染率、高表达特性,更好地开展 RNA 干扰主体实验。结肠癌细胞系 SW480、SW620 的质粒转染效率都相对较低,通过构建腺病毒或慢病毒载体来构建过表达或 RNAi 的细胞系能够较好地解决这一难题。

慢病毒感染 SW620 细胞后,表达 EGFP 的细胞所占比例相对较低,且表达强度不同(图 2),通过流式细胞仪筛选可以

得到形态及 EGFP 表达量相对一致的细胞,EGFP 稳定表达率达到 100%。这为后续功能试验排除了转染效率不同,转染不稳定的干扰因素,增强了试验的可信度。

RACK1 在不同的肿瘤中可能发挥着不同甚至相反的作用。乳腺癌中,RACK1 通过与 DLC 1 形成复合体介导 Bim 的降解,从而阻止细胞的正常凋亡过程,促进肿瘤的产生^[15],通过与 RHBDLF1 相互作用抑制 RACK1 辅助的非氧气依赖型 HIF1 α 的降解,促进肿瘤的进展与转移^[16];肺癌中,RACK1 表达与肿瘤的转移与分化相关^[17];胃癌中,RACK1 通过稳定 β -连环蛋白破坏复合体抑制 Wnt 信号通路而抑制胃癌的发生^[18];与正常卵巢上皮细胞相比 RACK1 在卵巢上皮癌细胞中相对高表达^[19];前列腺癌中,RACK1 能够促进癌细胞的增殖、侵袭与转移^[20];肝癌中,RACK1 可通过在与活化的 PKC 结合来介导 ADAM12 向细胞膜的转运,从而发挥自己促进肿瘤细胞生成的作用^[21],通过促进 MKK7/JNK 的活性促进肝癌细胞的增殖以及对 TRAIL 和 Fas 介导的细胞凋亡的抵抗^[22]。然而,在结肠癌中,RACK1 的作用一直存在分歧。为了阐明 RACK1 在结肠癌发生发展中的具体作用,本研究成功构建并筛选出了 SW620 的 RACK1 稳定干扰细胞系,为进一步的研究工作奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Dell E J, Connor J, Chen S, et al. The betagamma subunit of heterotrimeric G proteins interacts with RACK1 and two other WD repeat proteins[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 49888-49895
- [2] Chen S, Spiegelberg B D, Lin F, et al. Interaction of Gbetagamma with RACK1 and other WD40 repeat proteins[J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2004, 37(2): 399-406
- [3] Thornton C, Tang K C, Phamluong K, et al. Spatial and temporal regulation of RACK1 function and N-methyl-D-aspartate receptor activity through WD40 motif-mediated dimerization [J]. The Journal of biological chemistry, 2004, 279(30): 31357-31364
- [4] Wang L, Berndt P, Xia X, et al. A seven-WD40 protein related to human RACK1 regulates mating and virulence in Ustilago maydis[J]. Molecular microbiology, 2011, 81(6): 1484-1498
- [5] Berns H, Humar R, Hengeler B, et al. RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas[J]. FASEB J, 2000, 14(15): 2549-2558
- [6] Subauste M C, Ventura-Holman T, Du L, et al. RACK1 downregulates levels of the pro-apoptotic protein Fem1b in apoptosis-resistant colon cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2009, 8(23): 2297-2305
- [7] Jin S, Mu Y, Wang X, et al. Overexpressed RACK1 is positively correlated with malignant degree of human colorectal carcinoma[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(5): 3393-3399
- [8] Mamidipudi V, Zhang J, Lee K. C, et al. RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(15): 6788-6798
- [9] 朱薇, 贺修胜, 肖志强, 等. RACK1 在大肠癌癌变过程中的表达和意义[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33(1): 22-27
Zhu Wei, He Xiu-sheng, Xiao Zhi-qiang, et al. Expression of RACK1 in carcinogenic process of colorectal adenocarcinoma and its significance[J]. Int J Pathol Clin Med, 2013, 33(1): 22-27
- [10] Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, et al. Classification of

- human colorectal adenocarcinoma cell lines[J]. *Cancer Res*, 2004, 36 (12): 4562-4569
- [11] Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, et al. Validation of a model of colon cancer progression[J]. *J Pathol*, 2000, 192(4): 446-454
- [12] Huerta S, Heinzerling JH, Anguiano-Hernandez Y-M, et al. Modification of gene products involved in resistance to apoptosis in metastatic colon cancer cells: roles of Fas, Apaf-1, NFkappaB, IAPs, Smac/DIABLO and AIF[J]. *J Surg Res*, 2007, 142(1): 184-194
- [13] Li J, Guo Y, Feng X, et al. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1): a regulator for migration and invasion in oral squamous cell carcinoma cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2012, 138(4): 563-571
- [14] 纪宗玲, 刘继中, 陈苏明. 基因功能的研究方法 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(1): 117-120
- Ji Zong-ling, Liu Ji-zhong, Chen Su-ming. Strategies of Functional Analysis of New Genes[J]. *Chin J Biotech*, 2002, 18(1): 117-120
- [15] Zhang W, Cheng G Z, Gong J, et al. RACK1 and CIS mediate the degradation of BimEL in cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(24): 16416-16426
- [16] Zhou Z, Liu F, Zhang Z S, et al. Human rhomboid family-1 suppresses oxygen-independent degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha in breast cancer [J]. *Cancer research*, 2014, 74 (10): 2719-2730
- [17] Zhong X, Li M, Nie B, et al. Overexpressions of RACK1 and CD147 Associated with Poor Prognosis in Stage T1 Pulmonary Adenocarcinoma[J]. *Annals of surgical oncology*, 20(3): 1044-1052
- [18] Deng Y Z, Yao F, Li J J, et al. RACK1 suppresses gastric tumorigenesis by stabilizing the beta-catenin destruction complex[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 812-823 e15
- [19] Lin Y, Cui M, Teng H, et al. Silencing the receptor of activated C-kinase 1 (RACK1) suppresses tumorigenicity in epithelial ovarian cancer in vitro and in vivo[J]. *International journal of oncology*, 2014, 44(4): 1252-1258
- [20] Shen F, Yan C, Liu M, et al. RACK1 promotes prostate cancer cell proliferation, invasion and metastasis[J]. *Molecular medicine reports*, 2013, 8(4): 999-1004
- [21] Bourd-Boittin K, Le Pabic H, Bonnier D, et al. RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(38): 26000-26009
- [22] Guo Y, Wang W, Wang J, et al. Receptor for activated C kinase 1 promotes hepatocellular carcinoma growth by enhancing mitogen-activated protein kinase kinase 7 activity[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 140-151

(上接第 3623 页)

参考文献(References)

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90
- [2] Archie V, Kauh J, Jones DV Jr, et al. Gastric cancer: standards for the 21st century[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006, 57(2): 123-131
- [3] Penning TM. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, doi: 10.1016/j.cbi.2014.09.024
- [4] Chen M, Jin Y, Penning TM. The rate-determining steps of aldo-keto reductases (AKRs), a study on human steroid 5beta-reductase (AKR1D1)[J]. *Chem Biol Interact*, 2014, doi:10.1016/j.cbi.2014(12) 004
- [5] Rizner TL, Penning TM. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism[J]. *Steroids*, 2014, 79: 49-63
- [6] Matsunaga T, Hojo A, Yamane Y, et al. Pathophysiological roles of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 202(1-3): 234-242
- [7] Rizner TL. Enzymes of the AKR1B and AKR1C Subfamilies and Uterine Diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2012, 3: 34
- [8] Chien CW, Ho IC, Lee TC. Induction of neoplastic transformation by ectopic expression of human aldo-keto reductase 1C isoforms in NIH3T3 cells[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(10): 1813-1820
- [9] Stoddard FR 2nd, Brooks AD, Eskin BA, et al. Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: evidence for an anti-estrogen effect of iodine[J]. *Int J Med Sci*, 2008, 5(4): 189-196
- [10] Endo S, Nishiyama A, Suyama M, et al. Protective roles of aldo-keto reductase 1B10 and autophagy against toxicity induced by p-quinone metabolites of tert-butylhydroquinone in lung cancer A549 cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2014[Epub ahead of Print]
- [11] Ji Q, Aoyama C, Chen PK, et al. Localization and altered expression of AKR1C family members in human ovarian tissues [J]. *Mol Cell Probes*, 2005, 19(4): 261-266
- [12] Pau NIB, Zakaria Z, Muhammad R, et al. Gene expression patterns distinguish breast carcinomas from normal breast tissues: the Malaysian context[J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(4): 223-228
- [13] Hsu NY, Ho HC, Chow KC, et al. Overexpression of dihydroadiol dehydrogenase as a prognostic marker of non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2727-2731
- [14] Yoon SY, Kim JM, Oh JH, et al. Gene expression profiling of human HBV- and/or HCV-associated hepatocellular carcinoma cells using expressed sequence tags[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(2): 315-327
- [15] Hlavac V, Brynychova V, Vaclavikova R, et al. The role of cytochromes p450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2014, 93(28): e255
- [16] Nakarai C, Osawa K, Akiyama M, et al. Expression of AKR1C3 and CNN3 as markers for detection of lymph node metastases in colorectal cancer[J]. *Clin Exp Med*, 2014[Epub ahead of Print]
- [17] Modesto JL, Hull A, Angstadt AY, et al. NNK reduction pathway gene polymorphisms and risk of lung cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2014 [Epub ahead of Print]
- [18] Bauman DR, Steckelbroeck S, Penning TM. The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action [J]. *Drug News Perspect*, 2004, 17(9): 563-578
- [19] Pallai R, Simpkins H, Chen J, et al. The CCAAT box binding transcription factor, nuclear factor-Y (NF-Y) regulates transcription of human aldo-keto reductase 1C1 (AKR1C1) gene[J]. *Gene*, 2010, 459 (1-2): 11-23
- [20] Matsunaga T, Yamaguchi A, Morikawa Y, et al. Induction of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) abolishes the efficacy of daunorubicin chemotherapy for leukemic U937 cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(8): 868-877
- [21] Chen CC, Chu CB, Liu KJ, et al. Gene expression profiling for analysis acquired oxaliplatin resistant factors in human gastric carcinoma TSGH-S3 cells: the role of IL-6 signaling and Nrf2/AKR1C axis identification[J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86(7): 872-887
- [22] Matsunaga T, Hojo A, Yamane Y, et al. Pathophysiological roles of aldo-keto reductases (AKR1C1 and AKR1C3) in development of cisplatin resistance in human colon cancers [J]. *Chem Biol Interact*, 2013, 202(1-3): 234-242