

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000265

慢病毒介导 shRNA 特异性沉默促肝细胞再生磷酸酶 1 基因表达抑制舌癌细胞迁移侵袭能力

时恩来, 季平, 刘平, 潘丽, 徐望

(重庆医科大学附属口腔医院, 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

【摘要】目的:探讨特异性沉默促肝细胞再生磷酸酶 1(phosphatase of regenerating liver cell-1, PRL-1) 基因表达对舌癌细胞迁移、侵袭能力的影响。**方法:**设计、合成 5 条针对 PRL-1 基因的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 干扰序列, 构建于慢病毒载体质粒中, PCR 电泳及基因测序验证。转染 293T 细胞, Western blot 筛选最佳干扰序列, 包装产生慢病毒。转染 TCA8113 细胞, 筛选、建立稳定转染细胞株; real-time PCR 检测 PRL-1 基因沉默效率; 划痕实验和 Transwell 实验分别比较慢病毒转染细胞(KD 组)、空病毒转染细胞(NC 组)及 TCA8113 细胞(CON 组)迁移、侵袭能力变化。**结果:**PCR 电泳及基因测序证实 5 条 shRNA 序列定向插入慢病毒载体质粒中。Western blot 筛选出 PRL-1-shRNA-1 基因沉默效率最高, 包装获得慢病毒滴度为 7×10^8 TU/ml。通过转染、筛选, 建立了 TCA8113 细胞稳定转染细胞株; real-time PCR 测得 PRL-1 基因 mRNA 表达明显下降($F=809.120$, $P=0.000$); PRL-1 基因沉默后细胞迁移能力降低, 穿过人工基底膜的细胞数 KD 组(25.5 ± 0.4)明显少于 NC 组(81.5 ± 2.0)和 CON 组(88.5 ± 2.3)($F=1\,092.970$, $P=0.000$)。**结论:**沉默 PRL-1 基因表达能有效抑制舌癌细胞迁移、侵袭能力。

【关键词】慢病毒载体; 短发夹 RNA; 促肝细胞再生磷酸酶 1; TCA8113; 迁移; 侵袭

【中图分类号】R739.86

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-12-18

Suppressing migration and invasion potencies of tongue carcinoma cells by lentiviral vector mediated shRNA specially silencing of phosphatase of regenerating liver cell-1 gene expression

Shi Enlai, Ji Ping, Liu Ping, Pan Li, Xu Wang

(The Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences)

【Abstract】Objective: To study the effect of specially silencing of phosphatase of regenerating liver cell-1 (PRL-1) gene expression on migration and invasion potencies of tongue carcinoma cells. **Methods:** Five interfering sequences of shRNA targeting PRL-1 gene were designed, synthesized and constructed in corresponding plasmids and were confirmed by PCR electrophoresis and DNA sequencing. The most effective sequence of shRNA was screened by Western blot and the lentivirus was produced and packaged. TCA8113 cells were infected with recombinant lentivirus and the stably transfected cells were filtered and obtained. The silencing efficiency of PRL-1 gene was assessed by real-time PCR. The migration and invasion potencies of PRL-1 gene silenced cells were analyzed by wound healing and Transwell invasion assay. **Results:** PCR electrophoresis and DNA sequencing revealed that 5 shRNA sequences were directionally constructed in plasmids. PRL-1-shRNA-1 was the most effective interference sequence selected by Western blot. The stably infected TCA8113 cells were established after interfering and filtering. The expression of PRL-1 gene mRNA was decreased significantly ($F=809.120$, $P=0.000$). After silencing the PRL-1 gene expression, the migration and invasion potencies of TCA8113 cells were significantly suppressed ($F=1\,092.970$, $P=0.000$). **Conclusion:** Silencing of PRL-1 gene expression can inhibit the migration and invasion potencies of TCA8113 cells significantly.

【Key words】 lentiviral vector; shRNA; phosphatase of regenerating liver cell-1; TCA8113; migration; invasion

作者介绍: 时恩来, Email: shienlai1@163.com,

研究方向: 口腔头颈部肿瘤临床及基础研究。

通信作者: 季平, Email: jiping_62@hotmail.com。

基金项目: 重庆市卫生局重点资助项目 (编号: 2013-1-030)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000265.html>

侵袭和转移是恶性肿瘤最显著的生物学特征,作为口腔癌中最常见的舌癌,因舌体具有丰富的淋巴管和血液循环,加以舌的机械运动频繁,故常发生早期颈淋巴结转移。舌癌浸润转移的程度是影响预后的主要因素,也是临床上致死的主要原因,但是舌癌侵袭转移的具体分子机制目前仍不清楚。

促肝细胞再生磷酸酶 1(phosphatase of regenerating liver cell-1, PRL-1)是促肝细胞再生磷酸酶因子(phosphatase of regenerating liver, PRLs)家族中的一员,该蛋白家族包括 PRL-1、PRL-2、PRL-3 3 个成员。近年来,该家族蛋白在恶性肿瘤侵袭、转移中的作用受到广泛关注,已有报道表明 PRL-3 高表达与多种恶性肿瘤的淋巴转移相关,如胃癌、乳腺癌、卵巢癌、肺癌等^[1],与 PRL-3 相比,目前对 PRL-1 研究相对较少。PRLs 蛋白的表达存在组织特异性,PRL-1 会优先表达在各类发育中的消化上皮细胞中^[2]。Liu 等^[3]研究发现 PRL-1 和 PRL-3 mRNA 的高表达与食管癌的淋巴转移密切相关,且 PRL-1 的高表达更具特异性。PRL-1 在舌癌中的表达是否存在同样趋势,实验团队前期进行了研究,发现与正常舌体组织相比,PRL-1 基因在舌癌组织及 TCA8113 细胞中均高表达,且 PRL-1 基因表达强度与舌癌的淋巴转移呈正相关^[4],可见 PRL-1 基因的高表达可能促进了舌癌的侵袭及转移,但尚未见相关研究报道。故本实验应用慢病毒载体介导 shRNA 特异性沉默 TCA8113 细胞 PRL-1 基因的表达,研究 PRL-1 基因沉默后 TCA8113 细胞侵袭能力的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞系及主要试剂:TCA8113 细胞购买于重庆医科大学

生命科学研究院。Age I、EcoR I、T4 DNA ligase 均于自美国 NEB 公司。大肠杆菌 DH5 α 、293T 细胞、慢病毒载体系统(pGC-LV 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体)购于上海吉凯基因技术有限公司。QIAGEN Plasmid 大提 Kit 购于 QIAGEN, Lipofectamine2000 购于 Invitrogen。蛋白提取试剂盒购自凯基。PRL-1 一抗购于 Abgent 公司。Taq 聚合酶、RNA 裂解液、一步法逆转录试剂盒、SBGreen 一步法荧光定量试剂盒购于大连宝生物(TaKaRa)公司等。shRNA 核苷酸序列合成及基因测序由上海吉凯基因技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 shRNA 慢病毒载体重组质粒构建 按 RNA 干扰序列设计原则,设计 5 条针对 PRL-1 基因(NM_003463)CDS 区的干扰序列,同时设计一条公认的无义阴性对照(NC negative control)(序列号:TTCTCCGAACGTGTCACGT)。每组序列均按短发卡结构模式设计,在其两端设计酶切位点黏端(表 1)。合成含干扰序列的 oligo DNA,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,退火成双链 DNA,并与经 Age I 和 EcoR I 双酶切的 pGC-LV 慢病毒载体质粒(框架结构:hU6-MCS-Ubiquitin-EGFP-IRES-puromycin)连接。转入感受态大肠杆菌中,挑取阳性克隆,进行 PCR 电泳及测序鉴定。

1.2.2 Western blot 外源筛选最佳干扰序列并行慢病毒包装及滴度检测 以 293T 细胞为工具细胞,PRL-1 基因过表达质粒 OE(前期实验获得)为阳性对照,无义链质粒 NC 为阴性对照,不转染任何质粒的 293T 细胞为 CON 组,将载有 shRNA 的 5 组慢病毒载体重组质粒随机分配为 KD1~KD5 (分组见表 2)。按照 Lipofectamine2000 使用说明,根据上述分组共转染生长状态良好的 293T 细胞,24 h 后荧光显微镜下观察预估转染率,36 h 后收集细胞,提取各组细胞总蛋白进行 Western blot 检测。将筛选获得的载有最佳干扰 shRNA 的慢病毒载体重组质粒与慢病毒系统辅助包装质粒 pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体按比例借 Lipofectamine2000 系统共转染 293T 细胞,8 h 后更换为完全培养基,培养 48 h 后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,0.45 μm 滤器过滤,4 000 g 离心,得到慢病毒浓缩液。取 1 μl 病毒原液,采用 10 倍有限稀释法依次转染 293T 细胞,根据 GFP 荧光计算病毒

表 1 5 组 shRNA 干扰序列构建框架

Tab.1 Structure of shRNA interfering sequences of five groups

shRNA序列编号	5' 端	shRNA茎部 (STEM)	shRNA环部 (LOOP)	shRNA茎部 (STEM)	3' 端
PRL-1-shRNA-3-a	CCGG	ACGGTCATAGAAACAACCTGTT	CTCGAG	AACAGTTGTTTCTATGACCGT	TTTTTG
PRL-1-shRNA-3-b	AATTCAAAA	ACGGTCATAGAAACAACCTGTT	CTCGAG	AACAGTTGTTTCTATGACCGT	
PRL-1-shRNA-2-a	CCGG	AGATTGTTGATGACTGGTTAA	CTCGAG	TTAACCAGTCATCAACAATCT	TTTTTG
PRL-1-shRNA-2-b	AATTCAAAA	AGATTGTTGATGACTGGTTAA	CTCGAG	TTAACCAGTCATCAACAATCT	
PRL-1-shRNA-5-a	CCGG	GCAACTTATGACACTACTCTT	CTCGAG	AAGAGTAGTGTCTATAAGTTGC	TTTTTG
PRL-1-shRNA-5-b	AATTCAAAA	GCAACTTATGACACTACTCTT	CTCGAG	AAGAGTAGTGTCTATAAGTTGC	
PRL-1-shRNA-4-a	CCGG	CCACCTCTTCATACCAGTTTA	CTCGAG	TAAACTGGTATGAAGAGGTGG	TTTTTG
PRL-1-shRNA-4-b	AATTCAAAA	CCACCTCTTCATACCAGTTTA	CTCGAG	TAAACTGGTATGAAGAGGTGG	
PRL-1-shRNA-1-a	CCGG	CAATCCAACCAATGCGACCTT	CTCGAG	AAGGTGCGATTGGTTGGATTG	TTTTTG
PRL-1-shRNA-1-b	AATTCAAAA	CAATCCAACCAATGCGACCTT	CTCGAG	AAGGTGCGATTGGTTGGATTG	

表 2 Western blot 外源筛选最佳干扰序列实验分组

Tab.2 Groups of selecting the best interfering sequence by Western blot

1	2	3	4	5	6	7	8
OE	CON	OE+NC	OE+KD1	OE+KD2	OE+KD3	OE+KD4	OE+KD5

注: KD1: PRL-1-shRNA-2; KD2: PRL-1-shRNA-1; KD3: PRL-1-shRNA-4; KD4: PRL-1-shRNA-3; KD5: PRL-1-shRNA-5

滴度。

1.2.3 shRNA 慢病毒转染 TCA8113 细胞获得稳定转染细胞株 将对数期的 TCA8113 细胞经胰酶消化后离心重悬,以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板中过夜培养,待细胞贴壁融合度达到 30%~50% 时转染病毒。按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值 100 计算分别加入干扰病毒和空病毒,以及聚凝胺 (polybrene)、感染增强液混匀后放入 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。6~8 h 后更换为含 10% 血清完全培养基继续培养 72 h, 观察荧光。96 h 后更换为含有 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 嘌呤霉素培养基继续培养,每 2 d 更换 1 次液,待单细胞克隆群形成,挑取克隆球进行扩增培养以获得稳定转染细胞株。

1.2.4 Real-Time PCR 检测 TCA8113 细胞 PRL-1 基因沉默效率 分别收集约 5×10^6 个 shRNA 慢病毒稳定转染的 TCA8113 细胞、空病毒转染的 TCA8113 细胞及未做任何处理的 TCA8113 细胞,按 TaKaRa 提取 RNA 说明书提取各组细胞总 RNA。所得 RNA 溶液,采用 TaKaRa 逆转录试剂盒,逆转录为 cDNA 备用。Real-Time PCR 采用 TaKaRa 公司 SYBR green 一步法, 95°C 预温 5 min, 95°C 5 s 和 52°C 30 s 共 39 个循环,延伸 65°C 5 s。上下游引物序列: PRL-1 上游引物 5'-GGGTGCCTAATGCTACTG-3', PRL-1 下游引物 5'-GAGGTTGCCAAATCTGTC-3'; GAPDH 上游引物 5'-TGAC-TTCAACAGCGACACCCA-3', GAPDH 下游引物 5'-CACC-CTGTTGCTGTAGCCAAA-3'。结果以 CT 值形式表示,以 GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算基因的相对表达量,实验重复 3 次。

1.2.5 划痕实验 分别将 TCA8113、稳定转染细胞及空病毒转染细胞悬液 (每组约 5×10^5 个/ml) 接种于含培养基的 6 孔板中,待细胞贴壁并充满 6 孔板后,1ul 枪头在细胞中央做划痕, PBS 清洗脱落细胞, 37°C , 5% CO_2 培养箱继续培养。分别于 0、24、48 h 观察划痕愈合情况,实验重复 3 次。

1.2.6 体外 Transwell 侵袭实验 Transwell 小室放置于 24 孔板内, 20% 血清 RPMI1640 培养液 600 μl 加入小室下室内, 37°C 培养箱静置 2 h, 分别将 shRNA 慢病毒稳定转染细胞、空病毒转染细胞及 TCA8113 细胞悬液 (每组约 5×10^5 个/ml) 200 μl 加入上室,置 37°C , 5% CO_2 培养箱孵育 22 h。多聚甲醛固定,苏木精 37°C 染色 30 min,棉签擦去小室上室面未穿膜的细胞,风干小室。200 $\times$ 光镜下随机选取 5 个视野,计数整个视野内穿过膜至下室面的细胞数,计算平均值。以穿过膜的细胞数目的多少来评估其迁移能力。

1.3 数据分析

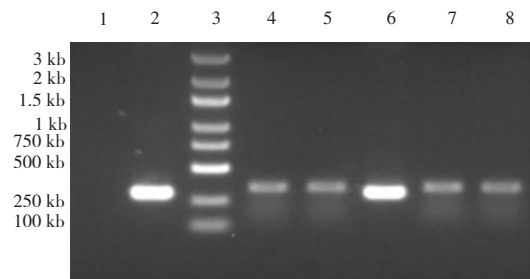
所得数据用 SAS 9.2 统计学软件进行分析,各组数据以

均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较应用方差分析,用 SNK 法进行两两组间比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 成功构建 shRNA 慢病毒载体重组质粒

成功接入 shRNA 片段的阳性克隆 PCR 电泳片段大小为 343 bp, 没有接入 shRNA 片段的空载体克隆 PCR 电泳片段大小为 307 bp, PCR 电泳示 shRNA 片段成功连接于载体中 (图 1)。选取连接成功的克隆进行测序分析,结果表明设计的 5 组 shRNA 片段均已定向插入慢病毒载体质粒中。



1. 阴性对照 (ddH₂O); 2. 阴性对照 (空载自连对照组); 3. Marker; 4~8. 转化子鉴定

图 1 重组质粒 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of the recombinant plasmids

2.2 Western blot 筛选出最佳干扰序列,并获得高滴度病毒液

5 组载有不同 shRNA 的慢病毒载体重组质粒、阴性对照质粒和过表达质粒按上述分组转染 293T 细胞后,荧光观察,转染率 > 80%。Western blot 检测结果表明 KD2 (PRL-1-shRNA-1) 对 PRL-1 基因沉默效率最高 (图 2)。将载有 KD2 的慢病毒载体重组质粒进行包装,提纯获得病毒液,10 倍有限稀释法测得病毒滴度为 7×10^8 TU/ml。

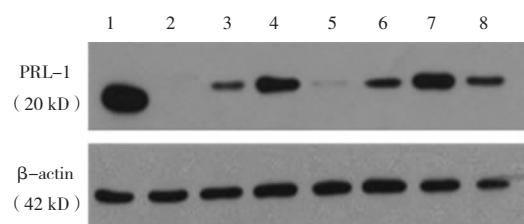


图 2 Western blot 检测各组 PRL-1 蛋白表达情况

Fig.2 Expression of PRL-1 protein in every group detected by Western blot

2.3 TCA8113 细胞稳定转染细胞株建立

shRNA 慢病毒转染 TCA8113 细胞 72 h 后, 荧光观察 90% 以上细胞转染成功(图 1)。转染 96 h 后, 更换为含有 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的完全培养基, 每 2 d 更换 1 次培养基, 培养 15 d 左右可见单细胞克隆群形成(图 3), 挑取克隆群进行扩增培养, 获得稳定转染细胞株。

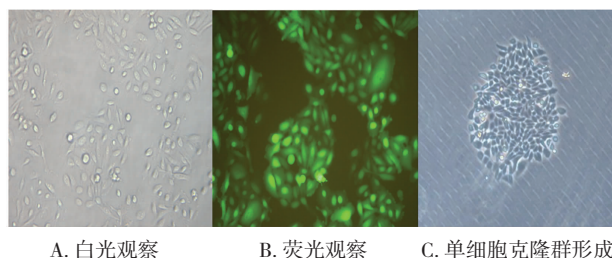


图 3 转染 72 h 后观察 (200 ×)

Fig.3 Observation at 72 h after the transfection (200 ×)

2.4 KD 组细胞 PRL-1 基因 mRNA 表达明显下降

Real-time PCR 测得慢病毒载体转染 KD 组 PRL-1 mRNA 相对表达量 0.36 ± 0.00 , 明显低于 NC 组 (1.00 ± 0.01) 和 CON 组 (1.27 ± 0.05), 差异具有统计学意义 ($F=809.120$, $P=0.000$)。与 NC 组相比, KD 组 PRL-1 基因在 mRNA 水平表达下降达 64% ($P<0.05$) (图 4)。

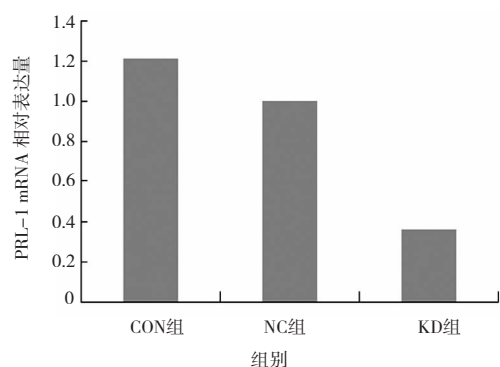


图 4 各组 PRL-1 mRNA 相对表达量

Fig.4 Relative expression of PRL-1 mRNA in every group

2.5 PRL-1 基因沉默后细胞迁移能力下降

24 h 后 KD 组移至划痕处细胞明显少于 CON 组和 NC 组。48 h 后, CON 组和 KD 组细胞基本充满划痕区, 而 KD 组细胞划痕区域仍较明显。可见 KD 细胞迁移能力明显降低。

2.6 PRL-1 基因沉默后细胞侵袭能力受到显著抑制

Transwell 侵袭实验测得穿过人工基底膜的平均细胞数 PRL-1 基因沉默 KD 组 (25.5 ± 0.4), 明显少于 NC 组 (81.5 ± 2.0) 及 CON 组 (88.5 ± 2.3), 差异有统计学意义 ($F=1092.970$, $P=0.000$)。与 NC 组相比, KD 组 TCA8113 细胞侵袭抑制率达 68% ($P<0.05$)。可见 PRL-1 基因表达沉默后, TCA8113 细胞侵袭能力明显减弱(图 6)。

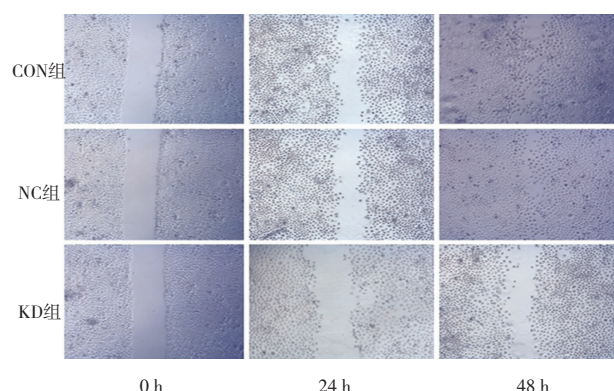


图 5 划痕实验检测各组细胞迁移能力

Fig.5 Cell migration ability detected by wound healing assay in every group

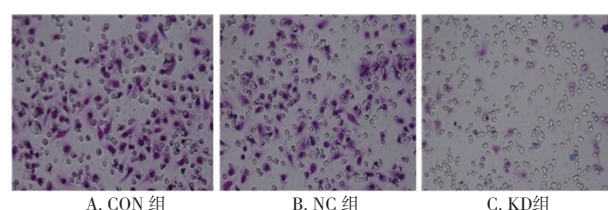


图 6 Transwell 侵袭实验检测各组细胞侵袭能力

Fig.6 Cell invasion ability detected by Transwell invasion assay in every group

3 讨论

RNA 干扰技术 (RNA interference, RNAi) 是通过内外源性双链 RNA 触发同源性 mRNA 的降解, 从而使该基因表达沉默。目前该技术发展比较成熟, 主要应用于目的基因的研究及基因治疗。RNAi 主要通过两类长度均为 21~23nt 的 RNA 分子引发效应^[5]: 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 和小分子 RNA (microRNA, miRNA)。类似于 siRNA 的 shRNA 也可引起靶 mRNA 的降解, 并且 shRNA 有降解效率更高、更稳定的优点^[6]。本次试验, 通过公共软件设计选择 5 条沉默 PRL-1 基因的干扰序列, 并均设计为短发夹结构, 为获取最佳干扰序列打下基础。通过 PCR 及基因测序证实设计的干扰片段均定向插入载体中, 表明慢病毒重组载体质粒构建成功。本实验以 PRL-1 过表达质粒为阳性对照, 通过 Western blot 检测 PRL-1 基因沉默后蛋白表达的变化, 能客观反映出 PRL-1 基因沉默效果, 方便选出最佳干扰序列。

RNA 干扰技术的应用及其效果依赖于载体系统的优化及转染效率的提高。慢病毒载体是一种复

制缺陷型逆转录病毒载体,来源于人类免疫缺陷病毒,具有可感染分裂期与非分裂期细胞、转移基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点,因此成为携带干扰 RNA 理想载体^[7-8]。本次实验以慢病毒为载体,将含最佳干扰 shRNA 的载体质粒进行慢病毒包装,提纯,获得病毒液滴度高达 7×10^8 TU/ml,为成功转染 TCA8113 细胞做好准备。以慢病毒作为载体能获得较高的转染率,并能获得长期转染效果。本实验通过荧光观察,预估 TCA8113 细胞转染率达 90% 以上。通过药物筛选,建立了 PRL-1 基因稳定转染的 TCA8113 细胞株。且基因沉默效率较高,real-time PCR 测得 PRL-1 基因在 mRNA 水平沉默效率达 64%。

蛋白酪氨酸磷酸酶(proteintyrosinephosphatase, PTP) 在蛋白磷酸化和去磷酸化平衡中起着重要的作用,这一平衡维持着机体的正常生理活动,平衡一旦被打破,会导致一些炎症性疾病或者肿瘤的发生^[9]。PRLs 作为 PTPs 的一个亚类蛋白,因其在恶性肿瘤侵袭、转移中扮演重要角色而成为近几年研究的热点^[10-11]。PRL-1 最先作为小鼠肝脏再生生长的早期刺激应答因子而被发现^[12],随后发现了 PRL-2 和 PRL-3,三者之间的同源信达 75%~85%^[13]。Zeng 等^[14]首次证实了 PRL-1 在细胞迁移、侵袭中发挥重要作用,发现无转移特性的中国仓鼠卵巢细胞通过质粒转染使 PRL-1 基因过表达后,该细胞在体外表现出增强的迁移及侵袭能力,而且经裸鼠尾静脉注射该细胞能促进裸鼠肝肺转移瘤的形成。Nakashima 和 Lazo 等^[15]研究发现 PRL-1 基因过表达增强了肺癌细胞的迁移、侵袭能力,而采用 siRNA 特异性沉默 PRL-1 基因表达后,肺癌细胞的迁移、侵袭能力随之降低。本实验结果与上述结果一致,发现特异性沉默 PRL-1 基因的表达,会降低 TCA8113 细胞的迁移、侵袭能力。可见 PRL-1 基因在舌癌的侵袭过程中起着重要作用。但其促进舌癌细胞侵袭的内在机制尚未明了,将在后续实验中进一步研究。

综上所述,本研究成功构建了 PRL-1 基因特异性沉默慢病毒载体,该载体能有效沉默 TCA8113 细胞 PRL-1 基因的表达;并且成功建立了 PRL-1 基因稳定沉默的 TCA8113 细胞株,为后续研究 PRL-1 基因在舌癌发生、发展中的作用及其内在机制奠定了基础。另外,首次证实沉默 PRL-1 基因能有效抑制舌癌细胞的迁移、侵袭能力,可见 PRL-1 基因在

舌癌的侵袭、转移中发挥重要作用,本实验也将为 PRL-1 成为舌癌转移的预测指标和治疗中的作用靶点提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Bessette DC, Qiu D, Pallen CJ. PRL PTPs; mediators and markers of cancer progression[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(2): 231-252.
- [2] Kong W, Swain GP, Li S, et al. PRL-1 PTPase expression is developmentally regulated with tissue-specific patterns in epithelial tissues[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(3): 613-621.
- [3] Liu YQ, Li HX, Lou X, et al. Expression of phosphatase of regenerating liver 1 and 3 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2008, 132(8): 1307-1312.
- [4] 漆小娟, 季平, 潘丽, 等. PTP4A1 在舌鳞癌组织及 TCA8113 细胞中的表达及意义[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(8): 854-858.
- [5] Deiters A. Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathway[J]. *AAPS J*, 2010, 12(1): 51-60.
- [6] Sliva K, Schnierle BS. Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA[J]. *Virology*, 2010(7): 248.
- [7] Nishitsuji H, Ikeda T, Miyoshi H, et al. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells[J]. *Microbes Infect*, 2004, 6(1): 76-85.
- [8] Couto LB, High KA. Viral vector-mediated RNA interference[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(5): 534-542.
- [9] Alonso A, Sasin J, Bottini N, et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome[J]. *Cell*, 2004, 117(6): 699-711.
- [10] Al-Aidaros AQ, Zeng Q. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(5): 1087-1098.
- [11] Stephens BJ, Han H, Gokhale V, et al. PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(11): 1653-1661.
- [12] Mohn KL, Laz TM, Hsu JC, et al. The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes[J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(1): 381-390.
- [13] Zhao Z, Lee CC, Monckton DG, et al. Characterization and genomic mapping of genes and pseudogenes of a new human protein tyrosine phosphatase[J]. *Genomics*, 1996, 35(1): 172-181.
- [14] Zeng Q, Dong JM, Guo K, et al. PRL-3 and PRL-1 promote cell migration, invasion, and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(11): 2716-2722.
- [15] Nakashima M, Lazo JS. Phosphatase of regenerating liver-1 promotes cell migration and invasion and regulates filamentous actin dynamics[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 334(2): 627-633.

(责任编辑:唐宗顺)