

# 晚期糖基化终末产物受体在胰腺癌细胞增殖及成瘤过程中的作用\*

陈巍巍<sup>1</sup>, 郭强<sup>2</sup>, 张肇达<sup>1</sup>, 胡伟明<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西医院 胰腺外科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 血管外科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖及转染后接种裸鼠在成瘤过程中的作用。方法 构建 RAGE 短发夹 RNA (shRNA), 即 shRNA RAGE-1、-2、-3 质粒, 转染胰腺癌 PANC-1 细胞后, 采用八肽胆囊收缩素(CCK-8)法、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western blot 检测 shRNA RAGE 对细胞增殖、RAGE 表达的影响, 筛选干扰效果最好的 shRNA RAGE 质粒; 将转染了 shRNA RAGE 质粒的 PANC-1 细胞接种于裸鼠皮下, 观察成瘤时间, 并测量计算肿瘤体积; 采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 shRNA RAGE 对 RAGE、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2 和 9(MMP-2 和 MMP-9)、核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的 mRNA 及蛋白表达的影响, 并采用免疫组化方法对肿瘤进行微血管计数, 计算微血管密度。结果 转染 shRNA RAGE 24 h 后 CCK-8 检测细胞的吸光度(A)值低于对照组( $P < 0.05$ ), 且在转染 48 h 时最明显。RT-PCR 和 Western blot 检测显示, shRNA RAGE-2 质粒转染后下调 RAGE 表达效果最好。转染 shRNA RAGE-2 质粒的 PANC-1 细胞接种于裸鼠后, 裸鼠成瘤时间、肿瘤体积低于 shRNA RAGE-1、-3, 裸鼠肿瘤组织 RAGE、MMP-2、NF- $\kappa$ B、MMP-9、VEGF mRNA 及蛋白表达低于 shRNA RAGE-1、-3( $P < 0.05$ ), 其微血管密度也低于 shRNA RAGE-1、-3( $P < 0.001$ )。结论 RAGE 参与了胰腺癌的发生发展过程。RAGE 可影响胰腺癌肿瘤生长及微血管形成。

**【关键词】** 晚期糖基化终末产物受体 胰腺癌 RNA 干扰

**Effects of RAGE on Cell Proliferation and Tumor Growth in Pancreatic Cancer** CHEN Wei-wei<sup>1</sup>, GUO Qiang<sup>2</sup>, ZHANG Zhao-da<sup>1</sup>, HU Wei-ming<sup>1△</sup>. 1. Department of Pancreatic Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Vascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: rosebud-1@163.com

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of receptor for advanced glycation end products (RAGE) on cell proliferation and tumor growth in nude mice with pancreatic cancer. Methods PANC-1 cells were transfected with shRNA RAGE-1, -2, -3 to down-regulate the expression of RAGE. Cholecystokinin octapeptide-8 (CCK-8), real-time PCR and Western blot were performed to test the impact of shRNA RAGE on the expressions of mRNAs and proteins of RAGE, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), and vascular endothelial growth factor (VEGF). Tumor growth and microvessel density in the nude mice implanted with shRNA RAGE transfected PANC-1 cells were observed using immunohistochemistry. Results The shRNA RAGE-1, -2, -3 transfected cells had lower absorbance values than the controls 24 h after transfection, and the absorbance value reached the lowest at 48 h. The specific shRNA sequences significantly inhibited the expressions of mRNA and protein of RAGE. The mice implanted with shRNA RAGE-2 had lower tumor volume and microvessel density than shRNA RAGE-1, -3. The expressions of mRNAs and proteins of RAGE, MMP-2, NF- $\kappa$ B, MMP-9 and VEGF were lower in the cells transfected with shRNA RAGE-2 compared with shRNA RAGE-1, -3. Conclusion RAGE is involved in the progression of pancreatic cancer *in vitro* and *in vivo*. The RAGE expression could influence the process of tumor angiogenesis.

**【Key words】** RAGE Pancreatic cancer RNA interference

胰腺癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤, 严重

威胁人类的生命健康<sup>[1]</sup>。根据最新癌症数据, 胰腺癌发病数位于所有肿瘤的第 10 位, 而死亡数位于所有肿瘤的第 7 位<sup>[2]</sup>。胰腺癌预后较差的原因除了其与血管关系紧密这一特殊解剖特征有关外, 还与其

\* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2013FZ0020)资助

△ 通信作者, E-mail: rosebud-1@163.com

生物学特性有关<sup>[1]</sup>。晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 是高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 的主要受体, 它是一种跨膜蛋白, 属免疫球蛋白家族成员之一, 由胞内区、胞外区、单次跨膜区构成。RAGE 在内皮细胞、平滑肌细胞、单核细胞等细胞中表达。RAGE 参与了糖尿病、动脉粥样硬化以及阿尔茨海默病等疾病的发病过程<sup>[3-5]</sup>。近年研究<sup>[6]</sup>表明, HMGB1/RAGE 参与了肿瘤的发生、发展, 并促进肿瘤的浸润和转移, 改变肿瘤微环境。但目前国内外关于 HMGB1/RAGE 在胰腺癌中的作用研究较少, 其对胰腺癌生物学行为的影响以及作用机制较少报道。因此, 本研究拟通过构建 RAGE 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 后转染胰腺癌 PANC-1 细胞, 检测接种转染的癌细胞体内成瘤情况, 探讨 RAGE 在胰腺癌细胞增殖及成瘤过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物、主要试剂及仪器

BALB/c 雌性裸鼠, SPF 级, 体质量 15~17 g。饲养环境: 26 °C, 70% 相对湿度, 光照周期 12/12 h,

无菌, 自由接触水和食物。PANC-1 细胞由四川大学华西医院移植免疫实验室保种保存。DMEM 培养基、胰酶、小牛血清 (Gibco), Lipofectamine2000 (Lip)、Opti-MEM (Invitrogen), 八肽胆囊收缩素 (CCK-8) 试剂盒 (上海博谷生物)。基因引物设计及合成由 IDT 公司完成。兔抗人 RAGE 多克隆抗体 (Abcam), 基质金属蛋白酶 (MMP) 2 和 9 (MMP-2 和 MMP-9)、核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、血管内皮生长因子 (VEGF) 抗体、CD31 抗体 (Abcam), 绿色荧光蛋白载体 (北京诺赛基因组研究中心有限公司), 恒温水浴箱 (上海跃进医疗器械厂), 图像分析仪 (Alpha Innotech), 光学显微镜 (Nikon), Real-time PCR 仪 (ABI), 凝胶成像系统、酶标仪 (Bio-Rad), 高速离心机、超净工作台、紫外分光光度计 (Thermo), CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (Sanyo)。

### 1.2 方法

**1.2.1 shRNA RAGE 的合成** 按照 shRNA 设计原则, 分别设计合成 3 对 shRNA RAGE 及 1 对无义序列对照 shRNA (shRNA RAGE-con), 其序列见表 1。shRNA RAGE 质粒由广州复能基因有限公司合成并测序。

表 1 shRNA 序列

Table 1 shRNA sequence

| shRNA                    | Sequence   |
|--------------------------|--|
| shRNA RAGE-1 sense       | 5'-GATCCCAAGCCGAAATTGTGAATCCTTCAAGAGAAGGATTACAATTTCCGGCTTT<br>TTTTGGAT-3'    |
| shRNA RAGE-1 antisense   | 5'-AGCTATCCAAAAAAGCCGAAATTGTGAATCCTTCTCTTGAAGGATTACAATTTCC<br>CGGCTTGG-3'    |
| shRNA RAGE-2 sense       | 5'-GATCCCAAGGACTGAAGCTTGAAGGTTTCAAGAGAACCTTCCAAGCTTCAGTCCTTTT<br>TTTTGGAT-3' |
| shRNA RAGE-2 antisense   | 5'-AGCTATCCAAAAAAGGACTGAAGCTTGAAGGTTCTCTTGAACCTTCCAAGCTTCA<br>GTCCTTGG-3'    |
| shRNA RAGE-3 sense       | 5'-GATCCCCACCTCTGATTCTGATGGCTTCAAGAGAGCCATCAGGAATCAGAGGTTTT<br>TTGGAAA-3'    |
| shRNA RAGE-3 antisense   | 5'-AGCTTTTCCAAAAAACCCTCTGATTCTGATGGCTCTCTTGAAGCCATCAGGAATCA<br>GAGGTGGG-3'   |
| shRNA RAGE-con sense     | 5'-GATCCCAATTCCAGTGGCCATCGTATTCAAGAGATACGATGGCCACTGGAATTTT<br>TTTA-3'        |
| shRNA RAGE-con antisense | 5'-AGCTTAAAAAATTCCAGTGGCCATCGTATCTCTTGAATACGATGGCCACTGGAAT<br>TGGG-3'        |

### 1.2.2 预实验筛选 shRNA RAGE 质粒

**1.2.2.1 筛选 shRNA RAGE 转染时质粒量与 Lip 量的比例** 预实验以不同浓度的 shRNA RAGE 质粒 (shRNA RAGE-1、shRNA RAGE-2、shRNA RAGE-3、shRNA RAGE-con 质粒) 和 Lip 转染 PANC-1 细胞, 24 h 后荧光显微镜下计数阳性细胞, 观察转染效率, 结果显示各 shRNA RAGE 质粒的质粒量为 0.05  $\mu$ g 和 Lip 量为 0.25  $\mu$ L 时转染效果最佳 (转染细胞阳性率为 95%)。因此, 后续实验质粒转染以此量进行。

**1.2.2.2 不同 shRNA RAGE 质粒对 PANC-1 细胞增殖的影响** 实验分组为: 不同 shRNA RAGE 质粒转染组 (shRNA RAGE-1、shRNA RAGE-2、shRNA RAGE-3、shRNA RAGE-con), 并设空白对照组 (不转染质粒), 采用 CCK-8 法检测 PANC-1 细胞增殖活性。分别记录转染 0 h、24 h、48 h、72 h 时各组细胞的吸光度 (A) 值, 绘制细胞生长曲线图。

**1.2.2.3 不同 shRNA RAGE 质粒对 PANC-1 细胞 RAGE mRNA 表达的影响** 实验分组为: 不同 shRNA RAGE 质粒组 (shRNA RAGE-1、shRNA

RAGE-2、shRNA RAGE-3、shRNA RAGE-con, 质粒量均为 0.05  $\mu\text{g}$  和 Lip 量为 0.25  $\mu\text{L}$ )、空白对照组(不转染质粒)以及单纯 Lip 转染组。PANC-1 细胞转染质粒 48 h 后, 采用 Real-time PCR (RT-PCR) 检测不同质粒转染细胞后对 RAGE mRNA 表达的影响。RNA 提取采用 TRIzol 法, 经逆转录后得到 cDNA, 然后采用 Real-time PCR 仪进行基因片段扩增。反应条件: 37  $^{\circ}\text{C}$  15 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 4  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 共 40 次循环, 反应结束后作熔解曲线。扩增曲线上设定循环基线和阈值, GAPDH 为内参照, 以目的基因 Ct 值减去内参照 Ct 值为  $\Delta\text{Ct}$ , 最终以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  值计算 RAGE mRNA 的相对表达量。

**1.2.2.4 不同 shRNA RAGE 质粒对 PANC-1 细胞 RAGE 蛋白表达的影响** 分组同 1.2.2.3。采用 Western blot 法检测不同 shRNA RAGE 对 PANC-1 细胞 RAGE 蛋白表达的影响。PBS 洗涤细胞 2 次, 再加入细胞裂解液 RIPA 裂解细胞, 提取胞内总蛋白, 小部分用 BCA 法测定蛋白浓度。经电泳、电转、封闭后分别与 RAGE 及 GAPDH 的一抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗作用, 最后采用化学发光法检测目的条带, 用凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值。凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值, 以目的条带与 GAPDH 灰度值的比值为目的蛋白的相对含量。

### 1.3 shRNA RAGE 质粒转染对 PANC-1 细胞接种裸鼠成瘤的影响

在 75  $\text{cm}^2$  培养瓶中培养转染 Lip、根据预实验结果筛选的质粒(接种质粒转染后特异性沉默 RAGE mRNA 和蛋白表达效果最好、最适浓度的 RAGE shRNA 质粒)和 shRNA RAGE-con 质粒的 PANC-1 细胞, 48 h 后, 加入胰酶消化, 收集细胞。用生理盐水配置 PANC-1 细胞密度为  $10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。24 只裸鼠分为 3 组, 每组 8 只。3 组分别接种转染 Lip 的 PANC-1 细胞(A 组), 接种转染 shRNA RAGE-con 质粒的 PANC-1 细胞(B 组)和接种转染 shRNA RAGE 质粒的 PANC-1 细胞(C 组)。接种时, 酒精消毒裸鼠右侧肩背部, 将 0.2 mL 肿瘤细胞接种于裸鼠右侧肩背部皮下, 接种过程中尽量避免液体渗出, 轻揉皮丘使其慢慢吸收。以接种时为起始时间, 观察成瘤时间并每周测量瘤体径 1 次。根据公式  $V = ab^2/2$  ( $V$ : 肿瘤体积,  $a$ : 肿瘤长径,  $b$ : 肿瘤短径) 计算肿瘤体积。接种后第 6 周处死裸鼠, 剥离瘤块。

### 1.4 shRNA RAGE 质粒转染对 PANC-1 细胞接种裸鼠成瘤中相关基因、蛋白表达和微血管密度的

## 影响

分组同 1.3。采用 RT-PCR 法及 Western blot 分别检测 shRNA RAGE 对裸鼠接种肿瘤 RAGE、MMP-2 和 MMP-9、NF- $\kappa\text{B}$ 、VEGF mRNA 表达及蛋白表达的影响。各基因片段扩增反应条件见文献<sup>[3,7-10]</sup>, 结果判定方法同 1.2.2.3 和 1.2.2.4。采用常规免疫组化方法(以 CD31 标记微血管), 对肿瘤进行微血管计数(每张切片在 200 倍显微镜下计数微血管), 计算微血管密度(MVD-CD31)。

### 1.5 统计学方法

连续变量以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验分析; 分类变量采用卡方检验和 Fisher 确切概率法分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同 shRNA RAGE 质粒对 PANC-1 细胞增殖的影响

细胞生长曲线图见图 1。转染 shRNA RAGE 24 h 后 CCK-8 检测细胞的 A 值低于两个对照组 ( $P < 0.05$ ), 且在转染 48 h 时最明显。shRNA RAGE-2 与 shRNA RAGE-1、-3 相比干扰效果更好 ( $P < 0.05$ )。

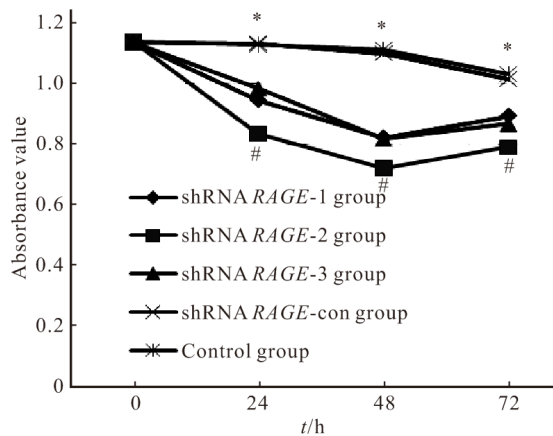


图 1 不同 shRNA RAGE 质粒转染 PANC-1 细胞的增殖

Fig 1 Proliferation of PANC-1 cells after transfected with different shRNA RAGE plasmids

\*  $P < 0.05$ , vs. shRNA RAGE-1, -2, -3 groups at the same time point; #  $P < 0.05$ , vs. shRNA RAGE-1, -3 groups at the same time point

### 2.2 不同 shRNA RAGE 质粒对 PANC-1 细胞 RAGE mRNA 和蛋白表达的影响

RT-PCR 检测结果显示, shRNA RAGE-1、shRNA RAGE-2、shRNA RAGE-3 质粒转染后, PANC-1 细胞 RAGE mRNA 相对表达量分别为:  $0.232 \pm 0.006$ 、 $0.083 \pm 0.007$ 、 $0.214 \pm 0.009$ , 低于空白对照组 ( $0.485 \pm 0.014$ )、Lip 组 ( $0.473 \pm$

0.007) 和 shRNA RAGE-con 组 ( $0.436 \pm 0.011$ ) ( $P$  均  $< 0.001$ )。Western blot 检测结果显示, shRNA RAGE-1、shRNA RAGE-2、shRNA RAGE-3 质粒转染后 PANC-1 细胞 RAGE 蛋白表达分别为:  $0.198 \pm 0.014$ 、 $0.073 \pm 0.002$ 、 $0.213 \pm 0.013$ , 低于空白对照组 ( $0.575 \pm 0.019$ )、Lip 组 ( $0.542 \pm 0.027$ ) 和 shRNA RAGE-con 组 ( $0.393 \pm 0.011$ ) ( $P$  均  $< 0.001$ ), 见图 2。由此可见, 转染特异性 shRNA RAGE 的 3 种质粒对 PANC-1 细胞均可以抑制 RAGE mRNA 和蛋白的表达, 其中以 shRNA RAGE-2 干扰效果最好, 后续实验选用 shRNA RAGE-2 质粒转染。

### 2.3 转染 shRNA RAGE-2 质粒对肿瘤生长的影响

以 shRNA RAGE-2 质粒  $0.05 \mu\text{g}$  和 Lip  $0.25 \mu\text{L}$  的最适浓度转染 PANC-1 细胞, 并将转染后的细胞接种于裸鼠体内, 接种后每周测量瘤体径 1 次。结果显示, A 组裸鼠 (转染 Lip) 平均成瘤时间为 7 d, B 组裸鼠 (转染 shRNA RAGE-con 质粒) 为 8 d, C 组裸鼠 (转染 shRNA RAGE-2 质粒) 为 11 d。A 组和 B 组裸鼠在各时间点肿瘤体积无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 而 C 组裸鼠在各时间点肿瘤体积均低

于前 2 组 ( $P < 0.001$ ), 见图 3 和表 2。

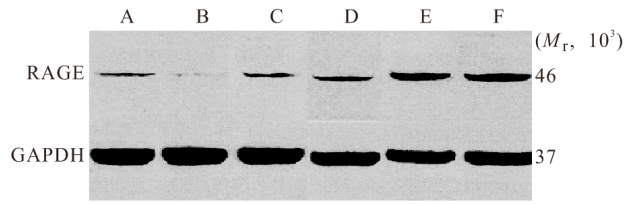


图 2 RAGE 蛋白在各组 PANC-1 细胞的表达

Fig 2 Expression of RAGE protein in PANC-1

A: shRNA RAGE-1 group; B: shRNA RAGE-2 group; C: shRNA RAGE-3 group; D: shRNA RAGE-con group; E: Lip group; F: Control group

### 2.4 shRNA RAGE 质粒转染对裸鼠成瘤组织中相关基因、蛋白表达和微血管密度的影响

见图 4。RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示, A、B 组裸鼠肿瘤组织 RAGE、MMP-2、NF- $\kappa$ B、MMP-9、VEGF mRNA 及蛋白表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 而 C 组裸鼠肿瘤组织上述基因及蛋白的表达均低于前 2 组, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。A ( $41 \pm 17$ )、B ( $39 \pm 19$ ) 组裸鼠肿瘤组织微血管计数差异无统计学意义, 而 C 组微血管数量 ( $9 \pm 4$ ) 低于前两组 ( $P < 0.001$ )。

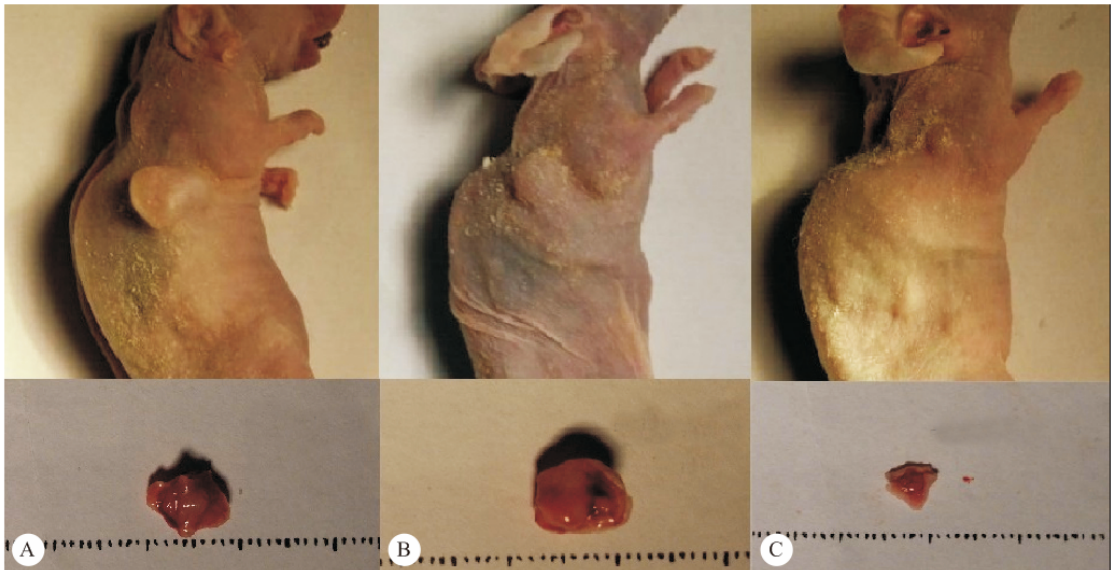


图 3 各组荷瘤鼠在第 6 周时肿瘤大小的比较

Fig 3 Tumor size in each group at sixth week

A: Control group; B: shRNA RAGE-con group; C: shRNA RAGE group

表 2 各组荷瘤鼠在各时间点肿瘤体积变化/ $\text{mm}^3$ ,  $\bar{x} \pm s$

Table 2 Tumor volume changes of three groups of nude mice at different time points/ $\text{mm}^3$ ,  $\bar{x} \pm s$

| Group          | 2 weeks     | 3 weeks     | 4 weeks      | 5 weeks      | 6 weeks      |
|----------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Control        | $10 \pm 4$  | $18 \pm 5$  | $64 \pm 26$  | $179 \pm 34$ | $228 \pm 41$ |
| shRNA RAGE-con | $9 \pm 3$   | $16 \pm 5$  | $75 \pm 14$  | $162 \pm 33$ | $201 \pm 38$ |
| shRNA RAGE     | $4 \pm 2^*$ | $8 \pm 4^*$ | $18 \pm 8^*$ | $30 \pm 8^*$ | $32 \pm 9^*$ |

\*  $P < 0.001$ , vs. control group and shRNA RAGE-con group

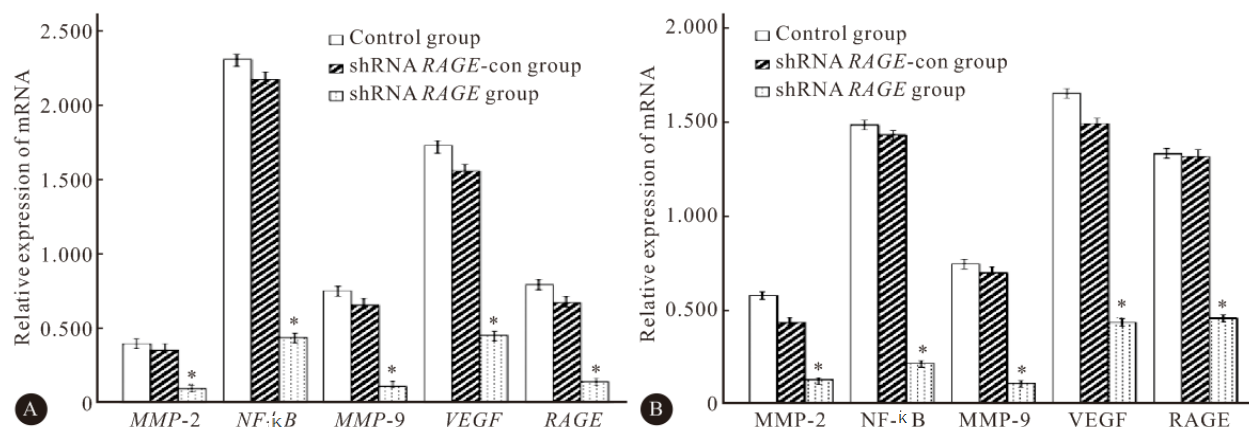


图 4 各组荷瘤鼠肿瘤组织 RAGE、MMP-2、NF-κB、MMP-9、VEGF mRNA(A)和蛋白(B)的表达

Fig 4 Expressions of RAGE, MMP-2, NF-κB, MMP-9, VEGF mRNAs (A) and proteins (B)

\*  $P < 0.05$ , vs. control and shRNA RAGE-con groups

### 3 讨论

胰腺癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率及死亡率一直较高<sup>[11]</sup>。胰腺癌确诊时往往已到晚期,丧失手术机会,放化疗也不能显著改善预后<sup>[12-13]</sup>。以胰腺癌相关基因及信号通路研究为基础的分子靶向治疗为其治疗提供了新的策略。本研究探讨 HMGB1 主要受体 RAGE 在胰腺癌发生、发展中的作用,揭示其作用途径,探索将 RAGE 作为胰腺癌基因治疗新策略的可行性。

HMGB1/RAGE 通路最早被认识是由于其在炎症反应中的作用<sup>[14]</sup>。RAGE 的激活能引起 NF-κB 及 MAP 激酶信号通路的开始,导致炎症反应的扩展和持续<sup>[15]</sup>。另外,RAGE 基因敲除后的肿瘤细胞会导致凋亡的增加、自噬的减少以及肿瘤细胞存活降低,而过表达 RAGE 则会引起自噬的增加、凋亡的减少以及肿瘤细胞生存能力的提高<sup>[16]</sup>。另外有研究显示 RAGE 表达在胰腺癌早期肿瘤生成过程中通过调节线粒体 STAT3 通路来提高自噬水平<sup>[17]</sup>。但其对胰腺癌生物学行为的影响以及具体机制较少报道。

本研究结果显示,构建的 3 种 shRNA RAGE 质粒以不同浓度转染胰腺癌 PANC-1 细胞后并检测其转染效率,结果显示各 shRNA 质粒的质粒量为 0.05 μg 和 Lip 量为 0.25 μL 时转染效果最佳,与文献<sup>[18]</sup>结果一致;转染 shRNA RAGE 质粒 24 h 后 CCK-8 检测细胞的 A 值低于对照组( $P < 0.05$ ),且在转染 48 h 时最明显,说明 shRNA RAGE 质粒可抑制 PANC-1 细胞体外增殖。RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,转染 shRNA RAGE

的 3 种质粒后 PANC-1 细胞中 RAGE mRNA 和蛋白表达均下调,其中以 shRNA RAGE-2 干扰效果最好,后续实验选用 shRNA RAGE-2 质粒转染。

以 shRNA RAGE-2 转染 PANC-1 细胞,并于裸鼠皮下接种转染的癌细胞,结果发现转染 shRNA RAGE 组裸鼠成瘤时间长于 shRNA RAGE-1,-3,在各时间点肿瘤体积也均低于 shRNA RAGE-1,-3。RT-PCR 及 Western blot 检测肿瘤组织中相关基因和蛋白的表达,结果显示,shRNA RAGE 组裸鼠肿瘤组织 RAGE、MMP-2、NF-κB、MMP-9、VEGF mRNA 及蛋白低于 shRNA RAGE-1,-3 ( $P < 0.001$ ),其微血管数量也低于 shRNA RAGE-1,-3 ( $P < 0.001$ ),证实转染 shRNA RAGE-2 能抑制肿瘤微血管生成。

肿瘤血管越丰富,肿瘤进入循环系统转移的可能性越大<sup>[19]</sup>,并且肿瘤组织的血管基膜通透性较高,肿瘤组织穿透性极强;另外,肿瘤血管生成还能加强肿瘤组织氧和营养的补充<sup>[20]</sup>。VEGF、MMP-2、MMP-9 均参与了肿瘤血管生成,本实验证实了 RAGE 干扰后能抑制肿瘤微血管生成。

综上所述,本研究为胰腺癌基因治疗新策略提供了实验依据,初步证实了构建的 shRNA RAGE 质粒可抑制 PANC-1 细胞增殖,下调肿瘤组织中相关基因和蛋白的表达,抑制肿瘤微血管生成,说明 RAGE 可影响胰腺癌肿瘤生长及微血管生成,它参与了胰腺癌的发生发展过程。因此,RAGE 或可作为一个分子治疗的靶点。

### 参 考 文 献

[1] RYAN DP, HONG TS, BARDEESY N. Pancreatic

- adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 2014, 371(11):1039-1049.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [3] ZHU Y, SHU T, LIN Y, *et al.* Inhibition of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protects pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 404(1):159-165.
- [4] SALEH A, SMITH DR, TESSLER L, *et al.* Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) activates divergent signaling pathways to augment neurite outgrowth of adult sensory neurons. *Exp Neurol*, 2013(249):149-159 [2016-06-21]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.08.018>.
- [5] SONG JS, KANG CM, PARK CK, *et al.* Inhibitory effect of receptor for advanced glycation end products (RAGE) on the TGF- $\beta$ -induced alveolar epithelial to mesenchymal transition. *Exp Mol Med*, 2011, 43(9):517-524.
- [6] KANG R, TANG D, SCHAPIRO NE, *et al.* The HMGB1/RAGE inflammatory pathway promotes pancreatic tumor growth by regulating mitochondrial bioenergetics. *Oncogene*, 2014, 33(5):567-577.
- [7] CARBONE C, MELISI D. NF- $\kappa$ B as a target for pancreatic cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*, 2012(Suppl 2): S1-S10 [2016-06-21]. <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2011.645806>.
- [8] PENG YP, ZHANG JJ, LIANG WB, *et al.* Elevation of MMP-9 and IDO induced by pancreatic cancer cells mediates natural killer cell dysfunction. *BMC Cancer*, 2014(14):738 [2016-06-21]. <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-738>. doi: 10.1186/1471-2407-14-738.
- [9] XU L, DING X, TAN H, *et al.* Correlation between B7-H3 expression and matrix metalloproteinases 2 expression in pancreatic cancer. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1):81. <http://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2867-13-81>. doi: 10.1186/1475-2867-13-81.
- [10] JIANG W, CUI J, XIE D, *et al.* Sp/KLF family and tumor angiogenesis in pancreatic cancer. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(17):2420-2431.
- [11] FERLAY J, SHIN HR, BRAY F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [12] CANTO MI, HARINCK F, HRUBAN RH, *et al.* International Cancer of the Pancreas Screening (CAPS) Consortium summit on the management of patients with increased risk for familial pancreatic cancer. *Gut*, 2013, 62(3):339-347.
- [13] FERRONE CR, PIERETTI-VANMARCKE R, BLOOM JP, *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma: long-term survival does not equal cure. *Surgery*, 2012, 152(3 Suppl 1): S43-S49.
- [14] GEBHARDT C, RIEHL A, DURCHDEWALD M, *et al.* RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J Exp Med*, 2008, 205(2):275-285.
- [15] LILIENSIEK B, WEIGAND MA, BIERHAUS A, *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest*, 2004, 113(11):1641-1650.
- [16] KANG R, TANG D, SCHAPIRO NE, *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ*, 2010, 17(4):666-676.
- [17] KANG R, TANG D, LOTZE MT, *et al.* AGER/RAGE-mediated autophagy promotes pancreatic tumorigenesis and bioenergetics through the IL6-pSTAT3 pathway. *Autophagy*, 2012, 8(6):989-991.
- [18] LIANG H, ZHONG Y, ZHOU S, *et al.* Knockdown of RAGE expression inhibits colorectal cancer cell invasion and suppresses angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett*, 2011, 313(1):91-98.
- [19] LIOTTA LA, SAIDEL MG, KLEINERMAN J. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res*, 1976, 36(3): 889-894.
- [20] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(1):4-6.  
(2016-05-13 收稿, 2016-10-17 修回)