

人前列腺癌细胞 *PFKFB4* 基因 RNA 干扰慢病毒构建与鉴定*

郝南 农德勇 李钻 林俊浩 黄桂海 李锡明 李伟

(广西壮族自治区人民医院泌尿外科二科, 广西 南宁 530021)

【摘要】 目的 构建人前列腺癌细胞 *PFKFB4* 基因短发夹 RNA(shRNA) 干扰慢病毒载体, 建立稳定干扰的人前列腺癌细胞株。方法 通过 GenBank 检索人 *PFKFB4* 基因序列, 根据 shRNA 引物设计原则, 设计并合成 *PFKFB4*-shRNA 序列, 并与携带绿色荧光蛋白序列的 LV3 载体连接, 获得的重组质粒与慢病毒包装质粒系统共转染 293T 细胞, 收集病毒。使用逐孔稀释滴度测定法对慢病毒滴度进行测定。将 LV3-*PFKFB4*-shRNA 慢病毒载体感染人前列腺癌细胞设置为空载的 LV3 Negative Control 组(LV3-NC 组)、空白对照组(Blank 组)和 LV3-sh*PFKFB4* 组。采用 RT-PCR 检测人前列腺癌细胞 *PFKFB4* mRNA 水平。结果 重组质粒测序结果显示 LV3-*PFKFB4*-shRNA 慢病毒载体构建成功, 通过荧光显微镜计数荧光细胞, 结合稀释倍数计算病毒滴度为 1×10^8 TU/mL。RT-PCR 结果显示, 与 LV3-NC 组和 Blank 组相比, LV3-sh*PFKFB4* 组 *PFKFB4* mRNA 水平显著降低($P < 0.001$), 而 LV3-NC 组与 Blank 组 *PFKFB4*-mRNA 水平比较差异无统计学意义($P = 0.271$)。结论 LV3-*PFKFB4*-shRNA 慢病毒载体构建成功, 同时获得稳定感染的人前列腺癌细胞株。

【关键词】 *PFKFB4* 基因; RNA 干扰; 短发夹 RNA; 慢病毒载体; 前列腺癌

【中图分类号】 R33; R69; R737.25 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.005

RNA interference of human *PFKFB4* gene in human prostate cancer cells

HAO Nan, NONG Deyong, LI Zuan, LIN Junhao, HUANG Guihai, LI Ximing, LI Wei

(Department of Surgical Urology 2, The People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China)

【Abstract】 **Objective** To construct a lentiviral vector for RNA interference of the human *PFKFB4* gene and establish a *PFKFB4* gene silencing on human prostate cancer cells. **Methods** According to the human *PFKFB4* sequence archived in the GenBank database, a shRNA targeting *PFKFB4* was designed, and cloned into a linear vector containing the green fluorescent protein (GFP) gene to produce a recombinant lentivirus plasmid. The recombinant plasmids and helper plasmids were transfected into 293T cells, and the titer of the virus was determined. PC-3 cells were infected with the constructed lentivirus, and the silencing effect on *PFKFB4* was accessed by real-time PCR (RT-PCR). **Results** The virus titer was calculated to be 1×10^8 TU/mL, RT-PCR results showed that the *PFKFB4* mRNA expression level of the LV3-*PFKFB4*-shRNA group was significantly lower than the negative control group and the blank group. **Conclusion** A lentivirus vector for RNA interference of human *PFKFB4* was successfully constructed and PC-3 cell lines with *PFKFB4* gene knockdown were manufactured, which will be useful for future research of *PFKFB4* function in prostate cancer cell models.

【Key words】 *PFKFB4* gene; RNA interference; Short hairpin RNA; Lentiviral vector; Prostate cancer

基金项目: 国家自然科学基金项目(81460387)

通信作者: 李伟, 医学博士, 主任医师, E-mail: liwei95_2000@163.com

引用本文: 郝南, 农德勇, 李钻, 等. 人前列腺癌细胞 *PFKFB4* 基因 RNA 干扰慢病毒构建与鉴定[J]. 西部医学, 2022, 34(8): 1115-1120. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.08.005

前列腺癌是全球男性发病率居第六位、死亡率居第九位的恶性肿瘤。据 WHO 国际癌症研究机构预测, 2020 年中国前列腺癌发病率约 15.6/10 万人, 在一线城市尤其高发, 每年死亡人数超过 5 万人, 并呈现显著的上升趋势^[1-2]。晚期转移或复发前列腺癌的一线治疗方案依然是去势治疗, 但随后的去势抵抗可

导致治疗失败并加速肿瘤的进展^[3-5]。因此,阐明去势抵抗的生物学机制,寻找有效的针对去势抵抗的治疗靶点对改善晚期前列腺癌预后具有重要意义。6-磷酸果糖-2-激酶/2,6-二磷酸果糖酸酶(6-phosphofructo-2-kinase-fructose-2,6-bisphosphatase, PFKFB)是糖酵解途径的关键限速酶调节剂,PFKFB 家族的成员包括 PFKFB1、PFKFB2、PFKFB3 和 PFKFB4。PFKFB 通过调控糖代谢参与肿瘤的进展、转移、血管形成和自噬^[6-8]。然而,不同疾病中 PFKFB 主要效应分子及其水平具有显著差异。我们的前期研究发现,在雄激素敏感的 LNCaP 细胞系中,PFKFB4 表达水平显著升高,可能是人前列腺癌细胞糖代谢的关键调控因子,但其具体生物学机制尚不清楚。本研究确定了 PFKFB4 基因过干扰序列,构建 PFKFB4 基因的 shRNA 慢病毒载体并鉴定其干扰效应,为阐明 PFKFB4 参与前列腺癌发生发展的生物学机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 慢病毒载体 LV3 (pGLV3/H1/GFP + Puro,货号 C06003)购自苏州吉玛基因股份有限公司,人前列腺癌 PC-3、293T 细胞购自上海中科院细胞库,

LB 培养基、RPMI 1640 培养基、澳洲胎牛血清购自 GIBCO 公司, DNase I (RNase-free)、Prime STARTM HS DNA 聚合酶、PCR 酶 (Ex TaqTM R-PCR ver. 2.1)、RNase 抑制剂、限制性内切酶 (BamH I、EcoR I)、DNA 琼脂糖凝胶电泳条带分析试剂盒、制备感受态试剂盒 (Competent cell preparation kit) 购自 Takara 公司,小量质粒抽提试剂盒、AMV RT (逆转录酶)、MgCl₂ 购自 Promega 公司, T4-DNA 连接酶购自 NEB 公司, Primer、脱氧核糖核苷三磷酸购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司,磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,胶回收试剂盒 (QIA quick Gel Extraction Kit (50)) 购自 Qiagen 公司, DMEM 培养基、Invitrogen-质粒提纯试剂盒购自 Thermo Fisher Scientific, Polybrene (聚凝胺) 购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 PFKFB4-shRNA 干扰序列的设计与合成 通过 GenBank 检索人 PFKFB4 基因序列,根据 shRNA 引物设计原则,设计并合成 PFKFB4-shRNA 序列,见表 1。

表 1 PFKFB4、PFKFB4-shRNA、转录产物和重组质粒预期序列

Table 1 Expected sequences of PFKFB4, PFKFB4-shRNA, transcription products and recombinant lentiviral plasmid

名称	序列
PFKFB4	GGACTTCATGAGGCGCATTGA
PFKFB4-shRNA	S GATCCGGACTTCATGAGGCGCATTGATTCAAGAGATCAATGCGCCTCATGAAGTCCTTTTTTG A AATTCAAAAAAGGACTTCATGAGGCGCATTGATCTCTTGAATCAATGCGCCTCATGAAGTCCG
转录产物	GGACTTCATGAGGCGCATTGATTCAAGAGATCAATGCGCCTCATGAAGTCCTT
LV3-PFKFB4-shRNA 质粒测序	TTGCAGTTATAAATACTGAATAATAAGATGACATGAACTACTACTGCTAGAGATTTTCCACACTG ACTGAAAGGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTCACACAACAGACGGGCACACACTACTTGAA GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAGCAGTGGGTTCCTAGTTAGCCAGAGAGCTCCCAGG CTCAGATCTGGTCTAACAGAGAGACCCAGTAGAAGCAAAAAGCAGAATCGAAGAATTCAAAAA <u>GGACTTCATGAGGCGCATTGATCTCTTGAATCAATGCGCCTCATGAAGTCCGGATCCAAGTGGTCT</u> CATAACAGAACTTATAAGATTCCCAAATCCAAAGACATTTACAGTCTTATGGTGATTTCCCAGAACAC ATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCTGCCAGGGCG CACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCTAGTGACACTGGGCCGCGATTTCCTGGAGCGGGTTGATGACGT CAGCGTTCCAATCTTGACATCGTTGGGAGTGAATTAGCCCTTCCAGTCCCCCTTTCTTTTAAAA AGTGGCTAAGATCTACAGCTGCCTTGTAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCAGGCGGGGAGGCGGCC CAAAGGGAGATCCGACTCGTCTGAGGGCGAAGGCGGAGACGCGGAAGAGGCCGAGAGCCGGCAGC AGGCCGCGGAAGGAAGTCCGCTGGATTGAGGGCGAAGGGACGTAGCAGAAGGACGTCCCAGCGC AGAATCCAGGTGGCAACACAGGCGAGCAGCCAAGGAAAGGACGATGATTTCCCCGACAACACCAG GAATTGTCAGTGCCCAACAGCCGAGCCCTGTCCAGCAGCGGCAAGGCAGGCGGCGATGAGTTCGG CCGTGGCAATAGGGAGGGGAAAGCGAAAGTCCGGGAAAGGAGCTGACAGGTGGTGGCAATGCC CAACCAGTGGGGTTGCGTACGAACACAGTGACACACGCACGTGTGACACGGACACACTCTCATA AAGAGACAGCACCAGGATTTATACAGA

注:划线序列为插入的 PFKFB4-shRNA 序列

1.2.2 LV3-PFKFB4-shRNA 载体构建 LV3 载体酶切:37℃下使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切 LV3 载体,随后将酶切所得载体片段做载体去磷酸化,切胶回收目标载体,-20℃保存用于后续实验。PFKFB4-shRNA 模板溶液制备:将 DNA oligo 用 TE(pH8.0) 溶解,浓度为 100 μM。取相应的正义链和反义链 oligo 溶液进行退火反应。退火处理后得到浓度为 10 μM 的 shRNA 模板,稀释 50 倍,获得终浓度为 200 nM 的模板溶液用于后续的连接反应。载体与 PFKFB4-shRNA 连接反应:22℃、1 h 条件下将目标载体片段与 shRNA 序列进行定向连接。转化感受态细胞:解冻感受态细胞,加入 10 μL 连接产物,加入 300 μL LB 培养基(不含抗生素)复苏细胞,随后取 100 μL 细胞和连接产物混悬液均匀涂布于含 50 μg/mL 氨苄青霉素 LB 平板,置于 37℃下培养 16 h。从培养好的平板上挑取克隆菌落,再培养 16 h 后,用质粒小提试剂盒抽提质粒,送测序。将测序结果与人 PFKFB4 基因序列进行比对,鉴定正确后继续培养相应克隆菌落,进行大量质粒抽提。

1.2.3 LV3-PFKFB4 干扰慢病毒包装和纯化 制备慢病毒穿梭质粒及其辅助包装原件载体质粒:本研究采用四质粒病毒包装系统,组成为 LV3,PG-p1-VSVG,PG-P2-REV,PG-P3-RRE。其中 LV3 能表达绿色荧光蛋白(GFP);PG-p1-VSVG,PG-P2-REV,PG-P3-RRE 含有病毒包装所必须的元件。四种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提用于后续实验。慢病毒包装与纯化:本研究使用 293T 细胞进行慢病毒包装、大肠杆菌菌株 DH5α 扩增慢病毒载体和辅助包装载体质粒。将对数生长期的 293T 细胞使用胰蛋白酶消化后重新接种于 10 cm 细胞培养皿(每个平皿接种细胞约为 2.5×10^6),培养至细胞密度达 60%~70% 时进行转染。各质粒溶液中加入 CaCl_2 (2.5 mol/L) 和 2×BBS 缓冲盐溶液,室温放置 20 min 后加入至单层 293T 细胞培养液中,培养 8 h 后弃去含有转染混和物的培养液,PBS 洗涤 3 次,加入含 10% 胎牛血清培养液,继续培养 48 h。收集转染后的 293T 细胞上清液,低速离心,0.45 μm 滤器过滤,低温超速离心 2 h,而后用预冷的 DMEM 培养液重悬沉淀,CsCl 密度梯度离心法纯化病毒悬液,使用透析袋收集密度在 1.30~1.40 g/mL 之间的病毒条带,收集病毒,保存于-80℃。病毒滴度测定:使用逐孔稀释滴度测定法对慢病毒滴度进行测定。293T 细胞培养至 80%~90% 融合,制备单细胞悬液,按 3×10^4 细胞/孔的浓度接种 96 孔板,将病毒原液 10 倍稀释 3 个浓度梯度,分别加

入到 96 孔板中培养 24 h。通过荧光显微镜计数荧光细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度。

1.2.4 慢病毒感染 PC-3 人前列腺癌细胞 PC-3 细胞准备:取对数生长期 PC-3 细胞,按 5×10^4 细胞/孔的浓度接种于 24 孔板中,每孔加入培养基 100 μL,培养至细胞融合度 70% 左右时进行病毒感染。感染细胞:取出 4℃ 保存的病毒,使用台式离心机离心 20 s;从培养箱中取出生长状态良好的 PC-3 细胞,换液后将 LV3-PFKFB4 基因干扰慢病毒以 5×感染复数(MOI)感染 PC-3 细胞,加入浓度为 8 μg/mL 的聚凝胺提高病毒的感染效率,混匀后放于二氧化碳培养箱(37℃、5%CO₂) 孵育过夜。观察感染后细胞生长状态,继续培养至第 6 天。收集稳定感染 PC-3 细胞株,在倒置荧光显微镜观察荧光,估计慢病毒感染目的细胞的效率。收集稳定感染的 sh-PFKFB4-PC-3 细胞,保存于-80℃。

1.2.5 RT-PCR 检测感染细胞 PFKFB4-mRNA 表达水平 设置空载的 LV3 Negative Control 组(LV3-NC 组)、空白对照组(Blank 组)和 LV3-shPFKFB4 组。Trizol 提取总 RNA,检测纯度和浓度后用于逆转录反应,反应体系:RNA 400 ng、5×PrimeScript™ Buffer 2 μL、RNase free 的 DEPC-H₂O 补足体积至 10 μL。逆转录条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ 10 min。qPCR 反应体系:2×Premix ExTaq™ 12.5 μL,10 μmol/L PCR 上游引物 1 μL,10 μmol/L PCR 下游引物 1 μL,cDNA 2 μL,ddH₂O 补足体积至 25 μL。PCR 反应条件:94℃ 预变性 1 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 45 s,共 35 次循环,反应结束后再 72℃ 延伸 10 min。采用相对定量法计算 PFKFB4 mRNA 表达水平。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。通过 One-way ANOVA 检验比较多组间 PFKFB4-mRNA 的相对表达量的差异,LSD 检验法进行多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LV3-shPFKFB4 鉴定 阳性克隆提取质粒测序结果显示,目的序列与预期序列一致,证实载体构建成功,测序结果见表 2。

2.2 LV3-shPFKFB4 慢病毒滴度检测结果 病毒感染时间均为 72 h,LV3-shPFKFB4 慢病毒浓度的检测结果为 1×10^8 TU/mL(图 1)。

2.3 重组慢病毒稳定感染 PC-3 人前列腺癌细胞 以 MOI 值为 8 的慢病毒感染 PC-3 细胞,在倒置荧光显微镜观察荧光,估计 LV3-NC 组、LV3-shPFKFB4 组慢病毒感染 PC-3 细胞的效率均超过 85%,见图 2。

表 2 PFKFB4、PFKFB4-shRNA、转录产物和重组质粒目的序列

Table 2 Sequences of PFKFB4, PFKFB4-shRNA, transcription products and recombinant lentiviral plasmid

名称	序列
PFKFB4	GGACTTCATGAGGCGCATTGA
PFKFB4-shRNA	S GATCCGGACTTCATGAGGCGCATTGATTCAAGAGATCAATGCGCCTCATGAAGTCTTTTTTGG A AATTCAAAAAAGGACTTCATGAGGCGCATTGATCTCTTGAATCAATGCGCCTCATGAAGTCCG
转录产物	GGACTTCATGAGGCGCATTGATTCAAGAGATCAATGCGCCTCATGAAGTCTTT
LV3-PFKFB4-shRNA 质粒测序	TTGCAGTTATAAATACTGAATAATAAGATGACATGAACTACTACTGCTAGAGATTTTCCACACTG ACTGAAAGGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCAGAGTCACACAACAGACGGGCACACACTACTTGAA GCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGGCTTAAGCAGTGGGTTCCTAGTTAGCCAGAGAGCTCCCAGG CTCAGATCTGGTCTAACAGAGAGACCCAGTAGAAGCAAAAAGCAGAATCGAAGAATTCAAAAA <u>GGACTTCATGAGGCGCATTGATCTCTTGAATCAATGCGCCTCATGAAGTCCGGATCCAAGTGGTCT</u> CATACAGAACTTATAAGATTCCCAAATCCAAAGACATTTACGTTTATGGTGATTTCCAGAACAC ATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCTGCCAGGGCG CACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCTAGTGACACTGGGCCGCGATTCCCTGGAGCGGGTTGATGACGT CAGCGTTCCAATTCTTGACATCGTTGGGAGTGAATTAGCCCTTCCAGTCCCCCTTTTCTTTTAAAA AGTGGCTAAGATCTACAGCTGCCTTGTAAGTCATTGGTCTTAAAGGTACCAGGCGGGGAGGCGGCC CAAAGGGAGATCCGACTCGTCTGAGGGCGAAGGGGAGACGCGGAAGAGGCCGAGAGCCGGCAGC AGGCCGCGGAAGGAAGTCCGCTGGATTGAGGGCGAAGGGACGTAGCAGAAGGACGTCCCGCGC AGAATCCAGGTGGCAACACAGGCGAGCAGCCAAGGAAAGGACGATGATTTCCCGACAACACCAG GAATTGTCAGTCCCAACAGCCGAGCCCCTGTCCAGCAGCGGGCAAGGCAGGCGCGATGAGTTCCG CCGTGGCAATAGGGAGGGGGAAAGCGAAAGTCCGGGAAAGGAGCTGACAGGTGGTGGCAATGCC CAACCAGTGGGGTTGCGTCAGCAACACAGTGACACACGCACGTGCTGACACGGACACACTCTCATA AAGAGACAGCACCAGGATTATACAGA

注:划线序列为插入的 PFKFB4-shRNA 序列

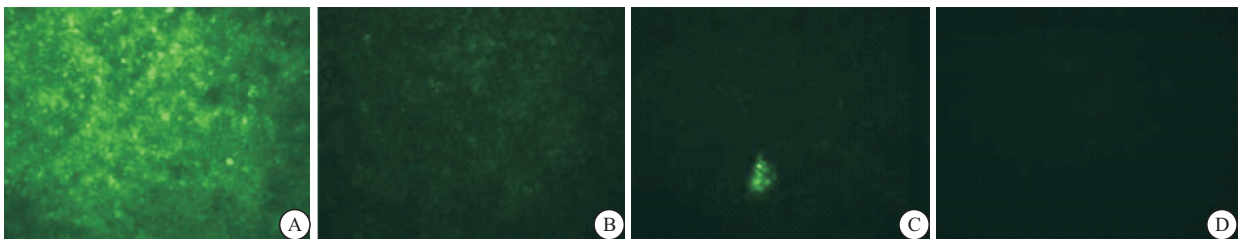


图 1 LV3-shPFKFB4 慢病毒感染 293T 细胞荧光检测病毒滴度结果

Figure 1 Packaging and titer of shPFKFB4 lentiviral recombinants

注: A. 原液; B. 稀释 10 倍; C. 稀释 100 倍; D. 稀释 1000 倍

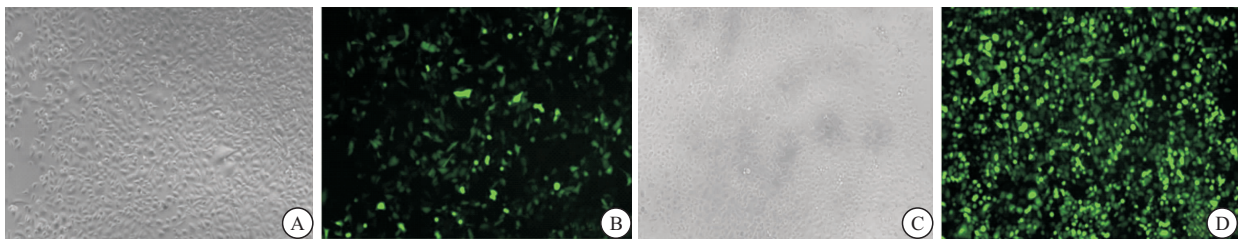


图 2 LV3-NC 组和 LV3- shPFKFB4 组慢病毒感染 PC-3 人前列腺癌细胞荧光结果(100×)

Figure 2 Transfection of PC3 cells with the pGreenPuro/PFKFB4 shRNA lentiviral plasmid

注: A. LV3-NC 组未显示荧光; B. LV3-NC 组显示荧光; C. LV3-shPFKFB4 组未显示荧光; D. LV3-shPFKFB4 组显示荧光

2.4 LV3-shPFKFB4 抑制 PC-3 人前列腺癌细胞 PFKFB4 mRNA 转录水平 RT-PCR 结果显示,与 LV3-NC 组和 Blank 组相比, LV3-shPFKFB4 组 PFKFB4 mRNA 水平显著降低($P < 0.001$),而 LV3-NC 组与 Blank 组 PFKFB4 mRNA 水平比较差异无

统计学意义($P = 0.271$),见图 3。

3 讨论

PFKFB4 是一种兼具催化合成(磷酸化)和水解的双功能酶,含有高度保守的核心结构,广泛存在于各种生物细胞中,在体内由缺氧诱导产生^[9-10]。PFKFB4

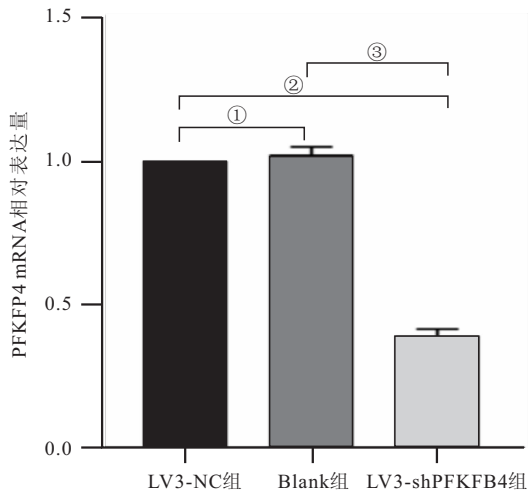


图 3 不同组 PC-3 人前列腺腺细胞 *PFKFB4*-mRNA 水平比较

Figure 3 Relative mRNA expression levels of *PFKFB4* in PC-3 cells of different groups

注:与 Blank 组比较,① $P > 0.05$;与 LV3-NC 组比较,② $P < 0.01$;与 Blank 组比较,③ $P < 0.01$

通过催化成果糖 2,6-二磷酸(F2,6-BP)促进糖酵解,在糖代谢过程中发挥重要的调控作用^[11-12]。同时,PFKFB4 也可以将 F2,6-BP 降解为果糖-6-磷酸和磷酸进而调控糖酵解水平^[13]。PFKFB4 作为关键酶调控细胞能量代谢是其参与多种肿瘤生物学过程如细胞增殖、细胞凋亡、自噬、分化和迁移等的基础^[14-18]。研究发现,在缺氧条件下,PFKFB4 在肝癌细胞中表达水平显著升高,并有助于癌细胞的增殖和存活^[14]。在乳腺癌细胞中,CD44 分解产物介导的 PFKFB4 过表达促进糖酵解是乳腺癌细胞维持干性的关键原因^[17]。我们的前期研究发现,CD44 的过表达增加了 LNCaP 人前列腺癌细胞和 PC-3 人前列腺癌细胞中的 *PFKFB4* 表达水平。与此同时,拮抗 CD44 可显著降低 PC-3 细胞的葡萄糖代谢水平和氧化应激水平,并增加 PC-3 细胞对多西紫杉醇的敏感性^[16-19]。最近的研究显示,PFKFB4 被发现与乳腺癌^[20-21]、胃癌^[22]、肝细胞癌^[23] 患者的总体生存率和无复发生存率相关。这些发现提示 PFKFB4 可能参与多种实体肿瘤发生、发展和治疗敏感性的关键调控机制,具有作为这些恶性肿瘤治疗新靶点和精准预后预测的潜力。特异性干扰 PFKFB4 活性的药物将有助于进一步深入了解驱动癌症的病理学机制,并最终为不同类型癌症的有效治疗提供更多选择。

RNA 干扰是肿瘤研究的常用技术方法,通过基因工程技术将 shRNA 或 small interfering RNA 等目标序列转染入真核细胞并抑制靶基因的表达^[24-26]。本研究设计、合成了 *PFKFB4* 干扰序列,全质粒测序结果提示与目标序列一致,提示 LV3-PFKFB4 慢病毒

载体构建成功。在本研究中,研究者通过主要使用低代次(第 3 代与第 4 代)的 293T 细胞用于慢病毒包装、转染 293T 细胞时使用了毒性较低的钙磷转染法等手段努力提升转染效率和病毒滴度。荧光显微镜下见转染后的 293T 细胞高表达绿色荧光蛋白,荧光分析显示所构建慢病毒载体病毒滴度为 1×10^8 TU/mL。进一步的研究显示,所构建 LV3-PFKFB4 慢病毒载体在为期 72 h 的动态观察中高效转染 PC-3 细胞。与未转染的 PC-3 细胞相似,LV3-PFKFB4 慢病毒转染后的 PC-3 细胞生长及传代不受影响,生长至对数期的转染 PC-3 胞质丰富,可见高亮绿色荧光。RT-qPCR 显示,本研究所构建 LV3-shPFKFB4 慢病毒载体干扰 PC-3 细胞效率约为 85%。本研究报道的高效干扰人前列腺癌细胞 *PFKFB4* 基因表达的慢病毒载体构建方法为进一步研究 *PFKFB4* 在前列腺癌发生与进展中的作用及其与 CD44 相关通路分子表达水平的调控机制奠定基础。

4 结论

本研究成功构建 *PFKFB4* 基因 RNA 干扰慢病毒载体,获得稳定沉默 *PFKFB4* 基因的 PC-3 人前列腺癌细胞株,为深入研究 *PFKFB4* 在前列腺癌防治中的作用及进一步阐明其具体的分子生物学机制奠定基础。

【参考文献】

- [1] LOWRANCE W T, BREAU R H, CHOU R, *et al.* Advanced Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline PART I [J]. J Urol, 2021, 205(1):14-21.
- [2] 中国抗癌协会泌尿男生殖系统肿瘤专业委员会前列腺癌学组. 前列腺癌筛查中国专家共识(2021 年版) [J]. 中国癌症杂志, 2021, 31(5): 435-440.
- [3] LOWRANCE W T, BREAU R H, CHOU R, *et al.* Advanced Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline PART II [J]. J Urol, 2021, 205(1):22-29.
- [4] PISANO C, TUCCI M, DI STEFANO R F, *et al.* Interactions between androgen receptor signaling and other molecular pathways in prostate cancer progression: Current and future clinical implications [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2021, 157:103185.
- [5] 陈坦, 赵硕, 温儒民, 等. 前列腺特异性抗原水平变化对接受联合疗法的去势敏感性前列腺癌患者预后的影响[J]. 现代泌尿外科杂志, 2021, 26(5): 400-404.
- [6] KOTOWSKI K, ROSIK J, MACHAJ F, *et al.* Role of PFKFB3 and PFKFB4 in Cancer: Genetic Basis, Impact on Disease Development/Progression, and Potential as Therapeutic Targets [J]. Cancers(Basel), 2021, 13(4):909.
- [7] 王鸣, 孙梯业. PFKFB4 对胃癌细胞侵袭和迁移能力的影响及其作用机制 [J]. 实用肿瘤学杂志, 2020, 34(1): 37-42.
- [8] 魏莱, 王喆, 梁后杰. 6-磷酸果糖-2-激酶在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(10): 983-989.

- [9] WONG K K L, LIAO J Z, VERHEYEN E M. A positive feedback loop between Myc and aerobic glycolysis sustains tumor growth in a tumor model [J]. *Elife*, 2019, 8:e46315.
- [10] 余朝军, 赵宁辉. 双功能酶 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-双磷酸酶 4(PFKFB4)在肿瘤中的作用与研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2020, 49(3): 166-170.
- [11] PILKIS S J, CLAUS T H, KURLAND I J, *et al.* 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme [J]. *Annual review of biochemistry*, 1995, 64: 799-835.
- [12] 李锡明, 李伟. PFKFB4 在肿瘤糖代谢中的作用及其机制的研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2018, 11(10): 1044-1048.
- [13] DASGUPTA S, RAJAPAKSHE K, ZHU B, *et al.* Metabolic enzyme PFKFB4 activates transcriptional coactivator SRC-3 to drive breast cancer [J]. *Nature*, 2018, 556(7700): 249-254.
- [14] SHEN C, DING L, MO H, *et al.* Long noncoding RNA FIRRE contributes to the proliferation and glycolysis of hepatocellular carcinoma cells by enhancing PFKFB4 expression [J]. *Journal of Cancer*, 2021, 12(13): 4099-4108.
- [15] ZHANG P, TAO W, LU C, *et al.* Bruceine A induces cell growth inhibition and apoptosis through PFKFB4/GSK3 β signaling in pancreatic cancer [J]. *Pharmacological research*, 2021, 169: 105658.
- [16] LI X, CHEN Z, LI Z, *et al.* The metabolic role of PFKFB4 in androgen-independent growth in vitro and PFKFB4 expression in human prostate cancer tissue [J]. *BMC urology*, 2020, 20(1): 61.
- [17] GAO R, LI D, XUN J, *et al.* CD44ICD promotes breast cancer stemness via PFKFB4-mediated glucose metabolism [J]. *Theranostics*, 2018, 8(22): 6248-6262.
- [18] GAO R, LIU Y, LI D, *et al.* PFKFB4 Promotes Breast Cancer Metastasis via Induction of Hyaluronan Production in a p38-Dependent Manner [J]. *Cellular physiology and biochemistry*, 2018, 50(6): 2108-2123.
- [19] 潜力, 符翠莉, 李锡明, 等. 多西他赛联合基质金属蛋白酶抑制剂 SB-3CT 对前列腺癌移植瘤生长的影响 [J]. *中国癌症防治杂志*, 2020, 12(2): 191-195.
- [20] CHEUNG R A, KRAFT A M, PETTY H R. Relocation of phosphofructokinases within epithelial cells is a novel event preceding breast cancer recurrence that accurately predicts patient outcomes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 321(4): C654-C670.
- [21] cAI y c, yANG h, sHAN H B, *et al.* PFKFB4 Overexpression Facilitates Proliferation by Promoting the G1/S Transition and Is Associated with a Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer [J]. *Dis Markers*, 2021, 2021:8824589.
- [22] WANG F, WU X, LI Y, *et al.* PFKFB4 as a promising biomarker to predict a poor prognosis in patients with gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(4):296.
- [23] ZHANG L, LI Y, DAI Y, *et al.* Glycolysis-related gene expression profiling serves as a novel prognosis risk predictor for human hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):18875.
- [24] UIJL E, MIRABITO COLAFELLA K M, SUN Y, *et al.* Strong and Sustained Antihypertensive Effect of Small Interfering RNA Targeting Liver Angiotensinogen [J]. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*, 2019, 73(6): 1249-1257.
- [25] YANG X, WU X, YANG Y, *et al.* Improvement of developmental competence of cloned male pig embryos by short hairpin ribonucleic acid(shRNA) vector-based but not small interfering RNA(siRNA)-mediated RNA interference(RNAi) of Xist expression [J]. *The Journal of reproduction and development*, 2019, 65(6): 533-539.
- [26] 吴磊, 李国庆, 赵宏伟. 沉默 CLDN4 增强前列腺癌细胞对多西他赛的敏感性 [J]. *现代泌尿外科杂志*, 2021, 26(5): 436-440.
(收稿日期:2021-08-05;修回日期:2022-06-04;编辑:黎仕娟)