

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0511-05

肿瘤相关抗原线粒体蛋白 12 基因的 RNA 干扰对 HeLa 细胞的抑制作用

丁永霞,王树军,张 勇,张惠珍,王 颖,金 姝,沈天伟,葛 瑜,葛海良*(上海交通大学医学院 上海市免疫学研究所,上海 200025)

[摘 要] 目的:探讨肿瘤相关抗原线粒体蛋白质 12 基因(tumor-associated antigen mitochondrial protein 12 gene, *TAMP12*) 表达变化对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用。方法:利用计算机辅助设计并化学合成 3 对针对 *TAMP12* 的 siRNA 片段,通过脂质体法将 siRNA 转染于 *TAMP12* 高表达的 HeLa 细胞中,筛选有效的 siRNA 片段。以 RT-PCR、实时定量 PCR 及流式细胞术(FCM)检测肿瘤细胞 *TAMP12* mRNA 及蛋白表达的变化。以激光扫描共聚焦显微镜(confocal lyser scanning microscope, CLSM)观察双色荧光标记蛋白的亚细胞定位和定量表达。以 ³H-TdR 掺入实验和 FCM 检测阻断 *TAMP12* 基因表达对 HeLa 细胞增殖和凋亡的影响。结果:CLSM 检测显示 *TAMP12* 蛋白主要表达在 HeLa 细胞线粒体中。转染 siRNA-*TAMP12* 的肿瘤细胞中 *TAMP12* mRNA 及蛋白的表达显著降低,与对照组对比,抑制率分别为 81% 和 87%($P < 0.01$);转染细胞的 DNA 合成受抑制,抑制率达 42%($P < 0.01$);转染 siRNA-*TAMP12* 肿瘤细胞的凋亡率由对照细胞的 8.14% 上升到 15.59%($P < 0.01$)。结论:RNA 干扰可阻断 *TAMP12* 基因的表达,从而对人宫颈癌 HeLa 细胞产生抑制作用。

[关键词] 肿瘤相关抗原线粒体蛋白 12 基因;siRNA;HeLa 细胞;线粒体;凋亡

[中图分类号] R737.33

[文献标志码] A

Inhibitory effects of tumor-associated antigen mitochondrial protein 12-targeted RNA interference on HeLa cells

DING Yong-xia, WANG Shu-jun, ZHANG Yong, ZHANG Hui-zhen, WANG Ying, JIN Shu, SHEN Tian-wei, GE Yu, GE Hai-liang*(Shanghai Institute of Immunology, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the inhibitory effects of tumor associated antigen mitochondrial protein 12 gene (*TAMP12*) on human cervical cancer cell line HeLa. **Methods:** Three pairs of *TAMP12*-specific small interference RNA (siRNA) fragments were designed and synthesized. The siRNA fragments were transfected into HeLa cells highly expressing *TAMP12* gene *via* liposome and the effective siRNA fragment was selected. The expression of *TAMP12* mRNA and protein was detected by RT-PCR and flow cytometry (FCM). The subcellular localization and quantification of *TAMP12* protein labeled with double fluorescein were observed under laser scanning confocal microscope (CLSM). ³H-TdR incorporation and FCM were used to analyze the proliferation and apoptosis of HeLa cells after interference of the *TAMP12* gene expression. **Results:** CLSM observation showed that *TAMP12* protein was mainly expressed in mitochondria of HeLa cells. Cells transfected with siRNA-*TAMP12* significantly suppressed the expression of *TAMP12* mRNA and protein(the inhibitory rates were 81% and 11.23%, respectively)and DNA synthesis *in vitro*(the inhibitory rate was 42%). Moreover, transfection with siRNA-*TAMP12* increased the apoptosis rate from 8.14% in the control group to 15.59%. **Conclusion:** Blocking the *TAMP12* gene expression may inhibit the growth of HeLa cells.

[Key words] tumor-associated antigen mitochondrial protein 12 gene; siRNA; HeLa cell; mitochondria; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 511-515]

寻找新的肿瘤抗原及其基因,分析其蛋白功能和致瘤机制,是当前肿瘤免疫学研究的核心问题,近年来在这一研究领域已经取得了很大进展^[1]。本实验室应用重组 cDNA 表达文库血清分析(serological analysis of recombinant cDNA expression library, SEREX)技术^[2-3],从自行构建的人卵巢癌 cDNA 表达文库中筛选获得一种新的肿瘤相关蛋白,该蛋白

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30572117);上海市科委资助项目(No. 05 ZR14056)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30572117); the Shanghai Science and Technology Committee Program (No. 05ZR14056)

[作者简介] 丁永霞(1979 -),女,江苏省泰州市人,硕士生,主要从事肿瘤免疫学方面的研究

* Corresponding author. E-mail: Gehailiang@yahoo.com

的相对分子质量为 12 000 左右,生物信息学预测该蛋白含有线粒体定向序列,在某些肿瘤细胞株和组织中呈高表达现象^[4],即命名为肿瘤相关抗原线粒体蛋白 12(tumor-associated antigen mitochondrial protein 12, TAMP12)。

RNA 干扰(RNAi)是指外源双链 RNA(dsRNA)导入细胞后,会引起细胞内源性的同源 mRNA 发生降解,从而使目的基因发生沉默^[5],该现象被认为是生物界的一种自我保护和调节机制。合成的小干扰 RNA(shRNA/siRNA)针对靶基因的抑制效果强,而且持续时间长^[6],RNAi 不仅成为基因治疗的新手段(抗肿瘤、抗病毒、遗传病),并已成为基因功能研究的重要技术。本研究利用 RNAi 技术,通过转染 3 对化学合成的小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA),筛选能高效而特异地阻断 TAMP12 基因表达的序列,初步探讨目的基因表达下调与肿瘤细胞生长和凋亡的关系,为进一步研究 TAMP12 与肿瘤发生、发展的关系奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Trizol RNA 抽提试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自 Promega 公司,SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time)购自宝生物工程有限公司。特异引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成,siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成,转染试剂 Lipofect AMINE 2000 购自 Amerco 公司,³H-TdR 购自上海原子能研究所,BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit 购自 BD 公司,Annexin-V FITC Apoptosis Kit 购自 BioSource 公司,MitoTracker Deep Red 633 和 Alexa Fluoro conjugated to goat anti-rabbit IgG 购自普飞公司,胎牛血清、TritonX-100、DMEM 和 Opti-MEM 购自 Gibco 公司。兔抗 TAMP12 蛋白血清由本实验室自制。人宫颈癌 HeLa 细胞株由本室保存。

1.2 特异性 siRNA 的设计及合成

特异性 siRNA 参照 www. oligoengine. com 提供的软件进行设计。选择 TAMP12 基因序列中 391 ~ 409 bp、507 ~ 525 bp 以及 750 ~ 768 bp 的编码序列为合适的 RNAi 靶点,利用 BLAST 软件进行同源性分析。同时设计 4 个错配碱基序列作为阴性对照(negative control, NC),选择已报道的有很强抑制效果的 GAPDH-siRNA 作为阳性对照(positive control, PC),送公司合成。候选片段的序列: 391: Sense 5'-AGGTGACTTCGCCTGTGAT-3', 507: Sense 5'-

GGAGGCTGGCTGGAATAAA-3', 750: Sense 5'-GAT-TCTTAAGTTCTGCTAT-3', NC: Sense 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3', PC: Sense 5'-GTATGACAA-CAGCCTCAAG-3'。

1.3 siRNA 的细胞转染和筛选

转染前 1 d,接种 HeLa 细胞于 6 孔培养板中。待生长至 30% ~ 50% 汇合时,取 siRNA 100 pmol、LipofectAMINE 2000 5 μ l,分别经 opti-MEM 稀释至 250 μ l,于室温中作用 5 min 后将两者缓缓混合,静置 20 min,加入 HeLa 细胞中摇晃混匀。培养 6 h 后,换含 100 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养液,继续培养 24 ~ 96 h,收集细胞作为 siRNA-TAMP12 组;以转染 siRNA-NC 的 HeLa 细胞为阴性对照,转染 siRNA-PC 的 HeLa 细胞为阳性对照,转染其他 oligo-siRNA-TAMP12 的 HeLa 细胞为干扰组。转染 oligo-siRNA-TAMP12 的同时,转染绿色荧光(FAM)标记的 siRNA-NC,培养 48 h 后在荧光显微镜下观察 siRNA 的转染效率。

1.4 半定量 RT-PCR 检测肿瘤细胞转染后 TAMP12 mRNA 的表达

分别提取对照细胞和干扰细胞总 RNA,经 M-MLV 逆转录合成 cDNA。采用特异引物进行 PCR 扩增,引物的设计如下:扩增 GAPDH 基因的引物序列: Sense: 5'-GGATTTGGTTCGATTGGG-3', Anti-sense: 5'-GGAAGATGGTGATG GGATT-3'; 扩增 TAMP12 基因的引物序列: Sense: 5'-ACTTCGCCTGTGATGGACTT-3', Antisense: 5'-AGGCTCTT AGGTTCCAGGCAGTT-3'。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延长 1 min,共 30 个循环后再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳及条带灰度扫描,计算 TAMP12 mRNA 条带与内参照 GAPDH 条带的灰度相对值,作为 TAMP12 mRNA 的表达水平值。

1.5 实时 RT-PCR 检测肿瘤细胞转染后 TAMP12 基因表达

取对照细胞和干扰细胞的总 RNA,经 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA,参照 Light Cycler(Roche Diagnostics 公司)实时 PCR 扩增仪的操作方法,以合成的特异性引物进行两步法行实时 PCR 分析。扩增 GAPDH 基因的引物序列同上;扩增 TAMP12 基因的引物序列: Sense: 5'-AGGAGGCTGGC TCGAATAAAGGTA-3', Antisense: 5'-GTAA TGACAGCAGGGCAGGAGATG-3'。干扰细胞中 TAMP12 相对表达量的变化 = $2^{-\Delta\Delta CT}$, 其中 $\Delta\Delta CT = \Delta CT_1 - \Delta CT_0$ ($\Delta CT_1 = \Delta CT_{\text{oligo-siRNA}}$, $\Delta CT_0 = \Delta CT_{\text{HeLa}}$)。

1.6 FACS 检测肿瘤细胞转染后 TAMP12 蛋白表达

采用细胞内因子测定的方法,检测细胞中 TAMP12 蛋白表达的变化。分别收集对照细胞和干扰细胞,以 $1 \times \text{Perm}/\text{Wash}$ buffer 洗涤后,加入 $50 \mu\text{l}$ $1 \times \text{Cytotfix}/\text{Cytoperm}$ Solution,于 4°C 避光破膜 30 min;以 1 ml $1 \times \text{Perm}/\text{Wash}$ buffer 洗涤 2 次后,加入 $50 \mu\text{l}$ 兔抗 TAMP12 抗血清(1:250 稀释),于 37°C 孵育 45 min。以 PBS 洗涤 2 次,加入 $50 \mu\text{l}$ 山羊抗兔 IgG-FITC(1:500 稀释),于 37°C 避光孵育 50 min;以 PBS 洗涤 2 次,加 PBS $300 \mu\text{l}$,上机检测。

1.7 激光扫描共聚焦显微镜对 TAMP12 蛋白胞内定位和定量分析

圆形盖玻片灭菌后以 0.1 g/L 的多聚赖氨酸孵育 5 min。将处理过的玻片置 12 孔培养板的中央,接种生长状态良好的 HeLa 细胞培养。待细胞生长至 30% ~ 50% 汇合时,转染 siRNA,同时设阴性对照孔,方法同前。转染后培养 48 h,弃去培养液,加含 500 nmol/L 线粒体探针的 DMEM 培养液,于 37°C 染色 45 min。用培养液洗涤玻片 3 次,加 3.7% 甲醛于 37°C 固定 15 min。以 PBS 洗 3 次,加含 2 ml/L 的 TritonX-100 的 PBS 于室温静置 5 min,以 PBS 洗 3 次,加抗 TAMP12 兔抗血清(1:500 稀释)于 37°C 孵育 1 h。以 PBS 洗 3 次,加 Alexa Fluro 标记的山羊抗兔 IgG(1:500 稀释)于 37°C 染色 1 h。以 PBS 洗 3 次,将玻片倒置,通过激光扫描共聚焦显微镜(confocal lyser scanning microscope, CLSM)观察,进行 TAMP12 蛋白分析。

1.8 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测 siRNA-TAMP12 对 HeLa 细胞 DNA 合成的影响

将 HeLa 细胞培养于 6 孔培养板中,于转染后 24 h 再接种于 96 孔细胞培养板中, 3×10^4 /孔,设 5 个复孔,培养过夜。加入 $^3\text{H-TdR}$ $1 \mu\text{L}/\text{孔}$,继续培养 24 h 后收集细胞,用 β -液闪仪测定 cpm 值,观察转染 siRNA-TAMP12 对细胞 DNA 合成的影响。

1.9 流式细胞术检测 siRNA-TAMP12 转染对细胞凋亡的诱导作用

将 HeLa 细胞培养于 6 孔培养板中,转染后 36 h,于细胞上清中加入抗肿瘤药物 5-FU(25 mg/L),培养 18 h。离心收集沉淀细胞,以 PBS 洗涤 2 次,加 Annexin-V binding buffer 重悬($2.5 \times 10^6/\text{ml}$),按 $100 \mu\text{l}/\text{管}$ 分装,分别加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin-V FITC 和 $10 \mu\text{l}$ Propidium Iodide (PI) buffer,室温避光孵育 15 min。每管加入 $400 \mu\text{l}$ Annexin-V binding buffer,1 h 内上流式细胞仪检测,检测 siRNA-TAMP12 转染对

细胞凋亡的诱导作用。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 软件分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 siRNA 转染后 HeLa 细胞 TAMP12 mRNA 的表达

以特异性引物进行 PCR 扩增后,得到大小约 345 bp 的 TAMP12 mRNA 片段和大小约 220 bp 的内参照 GAPDH mRNA 片段。图像经扫描并软件分析,转染 NC-siRNA、oligo750-siRNA、oligo507-siRNA、oligo391-siRNA 的 HeLa 细胞中 TAMP12 mRNA 灰度扫描相对值分别为 41.70%、13.92%、6.84% 和 40.06%,其中转染 oligo507-siRNA 的细胞中 TAMP12 mRNA 的水平下调最明显,降低了 83.6%,表明 oligo507-siRNA 可降低目的基因 mRNA 水平的表达(图 1)。

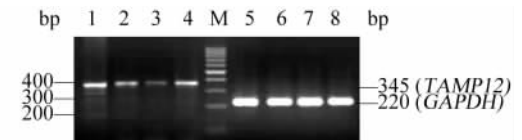


图 1 RT-PCR 检测转染 HeLa 细胞中 TAMP12 mRNA 的表达
Fig. 1 Detection of TAMP12 mRNA expression in transfected HeLa cells by RT-PCR

M:100 bp DNA marker; 1, 5: NC-siRNA; 2, 6:Oligo750-siRNA-TAMP12; 3, 7:Oligo507-siRNA-TAMP12; 4, 8:Oligo391-siRNA-TAMP12.

2.2 实时 PCR 检测转染 siRNA 后 HeLa 细胞中 TAMP12 基因表达

采用实时 PCR 定量法检测转染 siRNA 的 HeLa 细胞中 TAMP12 基因的表达变化,结果显示,HeLa 细胞 $\Delta\text{CT}_0 = 18.26 - 12.48 = 5.78$,NC-siRNA 转染的细胞 $\Delta\text{CT}_1 = 18.20 - 12.53 = 5.67$,oligo507-siRNA-TAMP12 转染的细胞 $\Delta\text{CT}_2 = 20.70 - 12.51 = 8.19$, $\Delta\Delta\text{CT}_1 = -0.11$, $\Delta\Delta\text{CT}_2 = 2.41$,表明 oligo507-siRNA-TAMP12 可使 TAMP12 mRNA 的水平明显下降。与未干扰组相比,NC-siRNA 转染的细胞中 TAMP12 mRNA 为 1.08 ± 0.088 ,oligo507-siRNA-TAMP12 转染细胞中 TAMP12 mRNA 表达量为 0.19 ± 0.026 ,mRNA 表达的抑制率约达 81% ($P < 0.01$)。

2.3 FACS 检测转染后肿瘤细胞中 TAMP12 蛋白的表达

FACS 检测结果显示,转染 NC-siRNA 的细胞中 TAMP12 蛋白表达率为 87.59%,转染 oligo-507-

siRNA的细胞中 TAMP12 蛋白的表达率仅为 11.23% (图 2), 表明 oligo507-siRNA 可有效地抑制 TAMP12 蛋白的表达, 蛋白抑制率达 87%。

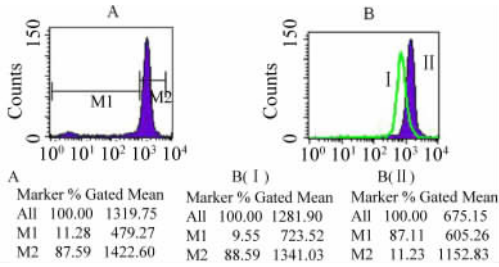


图 2 HeLa 细胞转染后 TAMP12 蛋白表达的 FACS 分析
Fig. 2 Analysis of TAMP12 protein expression intranuclear HeLa cells by FACS

A: HeLa cells transfected with NC-siRNA; B: HeLa cells transfected with NC-siRNA and oligo507-siRNA, NC-siRNA(I), Oligo507-siRNA(II)

2.4 各组细胞中 TAMP12 蛋白的定位和定量

激光共聚焦显微镜检测显示, FITC 绿色荧光 (Ch2-T1) 标记的 TAMP12 蛋白, 均匀地分布在细胞核的周围; 红色荧光 (ChS1-T2) 为特异性的线粒体探针, 可显示线粒体的位置所在, 两者叠加, 在整合后的完整图像中, 红色荧光与绿色荧光重叠部分显示为黄色, 两者的共定位指数 (overlap coefficient) 为 0.8~0.9, 可见 TAMP12 主要表达在线粒体中 (图 3)。与对照细胞相比, 干扰细胞中目的蛋白的表达水平明显下调 (表 1), 表明 oligo507-siRNA 对肿瘤

细胞线粒体中 TAMP12 蛋白的表达具有明显的抑制作用。

2.5 siRNA-TAMP12 对 HeLa 细胞 DNA 合成的影响

³H-TdR 掺入实验表明, 与对照细胞相比, 干扰组细胞 DNA 合成的能力明显降低, DNA 合成抑制率达 42% (P < 0.01, 图 4)。

表 1 TAMP12 蛋白在 HeLa 细胞线粒体中的定位及定量
Tab. 1 Localization and quantification of TAMP12 protein in mitochondria of HeLa cells (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

Group	Ch2-T1 intensity	ChS1-T2 intensity	Overlap coefficient
HeLa cells	574 ± 32	445 ± 23	0.90 ± 0.07
NC-siRNA HeLa	516 ± 37	505 ± 22	0.80 ± 0.06
507-siRNA HeLa	130 ± 15	414 ± 18	0.80 ± 0.05

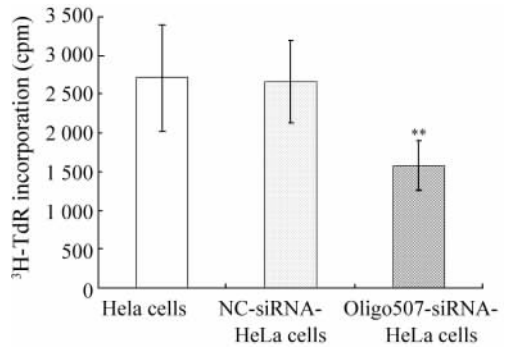


图 4 ³H-TdR 掺入法检测 HeLa 细胞中 DNA 合成的变化
Fig. 4 Detection of DNA synthesis in HeLa cells by ³H-TdR incorporation

** P < 0.05 vs HeLa cells or NC-siRNA HeLa cells

2.6 siRNA-TAMP12 对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用

siRNA 转染 HeLa 细胞 36 h 后, 以 5-FU (25 mg/ml) 作用细胞 18 h, Annexin V/PI 双染细胞的凋亡结果见表 2。与对照细胞相比, 干扰组细胞的凋亡率明显升高 (P < 0.01), 表明阻断 TAMP12 基因的表达可明显增强对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用。

3 讨论

线粒体作为机体细胞内的重要细胞器, 参与了能量产生、细胞凋亡、肿瘤发生及衰老等多种病理生理的代谢过程^[7-8]。近年来, 线粒体 DNA 的突变与肿瘤的关系受到极大关注, 大量的研究证实线粒体与肿瘤发生发展^[9-12]和细胞凋亡密切相关^[13-15]。本实验室应用 SEREX 方法从人卵巢癌 cDNA 表达文

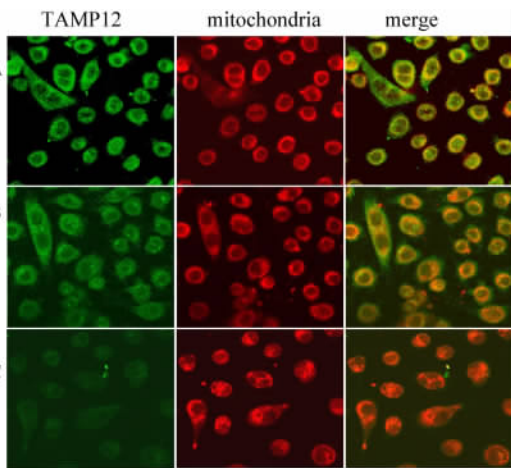


图 3 激光共聚焦显微镜 (CLSM) 分析 HeLa 细胞线粒体中 TAMP12 蛋白的表达 (×200 倍)

Fig. 3 Detection of TAMP12 protein in mitochondria in HeLa cells by CLSM (×200)

A: HeLa cells; B: HeLa cells transfected with NC-siRNA; C: HeLa cells transfected with Oligo507-siRNA

库中筛选的 TAMP12 蛋白为一种主要表达于线粒体的肿瘤相关抗原^[4],研究其功能及免疫学特性,对肿瘤研究具有重要意义,为寻找新的肿瘤抗原提供一条新的途径。

表 2 siRNA-TAMP12 干扰前后 HeLa 细胞凋亡率的比较

Tab. 2 Comparison of apoptotic rates of HeLa cells before and after interference of siRNA-TAMP12($n=3$, $\bar{x} \pm s$, %)

Group	Early	Late
	apoptosis rate	apoptosis rate
HeLa cells	7.5 ± 1.31	13.6 ± 0.92
NC-siRNA HeLa	8.1 ± 0.99	12.9 ± 1.07
507-siRNA HeLa	15.6 ± 2.28**	21.1 ± 1.19**

** $P < 0.01$ vs HeLa cell group or NC-siRNA HeLa group

TAMP12 基因可在多种肿瘤组织和肿瘤细胞株中表达,特别在 HeLa 细胞中呈稳定高表达。因此,本研究以 HeLa 细胞作为 TAMP12 功能研究的靶细胞,利用 RNAi 技术,设计并合成了 3 对针对 TAMP12 基因的 siRNA 片段,以其转染 HeLa 细胞后,筛选其中有效的 siRNA 片段,用传统的 RT-PCR 检测干扰中细胞 TAMP12 mRNA 水平的变化。结果显示,oligo507-siRNA-TAMP12 阻断的效果最明显,能使 TAMP12 mRNA 的表达降低约达 85%。为了更精确地反映 TAMP12 mRNA 水平的变化,进一步采用快速而灵敏的实时定量 PCR 进行了检测。结果显示,转染 oligo507-siRNA-TAMP12 的细胞中 mRNA 水平的阻断率约达 81% ($P < 0.01$)。FCM 和 CLSM 观测的结果均显示,蛋白水平上的 TAMP12 的平均阻断率约达 80%。同时,用 CLSM 观测蛋白定位、定量同步分析的结果表明,TAMP12 主要表达于线粒体中,两者共定位指数为 0.8 ~ 0.9,证明本实验已经从 3 对 siRNA 中成功地筛选出最有效的干扰序列,能够阻断 TAMP12 基因的表达。

Spankuch-Schmitt 等^[16-17]报道,用 RNAi 阻断特异性基因 PLK1(polo-like kinase-1)表达后,肿瘤细胞的增殖明显受到抑制,并发生凋亡。TAMP12 作为一种新的肿瘤相关抗原,可能与肿瘤的生物学功能有关。³H-TdR 掺入、Annexin V/PI 检测的结果显示,瞬间阻断线粒体蛋白 TAMP12 可抑制细胞的增殖,促进细胞凋亡,提示 TAMP12 与肿瘤的相关性可能涉及肿瘤的生长及凋亡的调控过程。TAMP12 是一个新发现的位于线粒体内,且与肿瘤细胞增殖、凋亡相关的蛋白,其生物学功能可能还涉及诸多未知的因素,阐明其与肿瘤发生、发展的关系尚需进一步

深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Visster KE, Eichten A, *et al.* Paradoxical roles of the immune system during cancer development[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 24-37.
- [2] Sahin U, Tureci O, Schmitt H, *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(25): 11810-11813.
- [3] Jäger D. Potential target antigens for immunotherapy identified by serological expression cloning (SEREX)[J]. Methods Mol Biol, 2007, 360: 319-326.
- [4] 尤 强,程琳玲,王 颖,等. 一种新的肿瘤相关蛋白 - OVA12 和抗体制备及其初步应用[J]. 中国实验诊断学, 2004,8(2):135-139.
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998,391(6669):806-811.
- [6] Bertrand JR, Pottier M, Verkris A, *et al.* Comparison of antisense oligonucleotides and siRNA in cell culture and *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(4): 1000-1004.
- [7] Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(11): 870-879.
- [8] Boldogh IR, Pon LA. Mitochondria on the move[J]. Trends Cell Biol, 2007,17(10): 502-510.
- [9] 金 姝,葛海良. 线粒体异常与肿瘤关系[J]. 国外医学:肿瘤学分册,2005,32(11):823-825.
- [10] Modica-Napolitano JS, Kulawiec M, Singh KK. Mitochondria and human cancer[J]. Curr Mol Med, 2007, 7(1): 121-131.
- [11] Jakupciak JP, Dakubo GD, Maragh S, *et al.* Analysis of potential cancer biomarkers in mitochondrial DNA[J]. Curr Opin Mol Ther, 2006, 8(6):500-506.
- [12] Baysal BE. Role of mitochondrial mutations in cancer[J]. Endocr Pathol, 2006, 17(3): 203-12.
- [13] van Raam BJ, Verhoeven AJ, Kuijpers TW. Mitochondria in neutrophil apoptosis[J]. Int J Hematol, 2006, 84(3): 199-204.
- [14] Gogvadze V, Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. Chem Biol Interact, 2006,163(1-2): 4-14.
- [15] Pinkoski MJ, Waterhouse NJ, Green DR. Mitochondria, apoptosis and autoimmunity[J]. Curr Dir Autoimmun, 2006, 9: 55-73.
- [16] Spankuch-Schmitt B, Bereiter-Hahn J, Kaufmann M, *et al.* Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells[J]. J Natl Cancer Inst, 2002, 94(24): 1863-1877.
- [17] Zamora-Avila DE, Franco-Molina MA, Trejo-Avila LM, *et al.* RNAi silencing of the WT1 gene inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the B16F10 murine melanoma cell line[J]. Melanoma Res, 2007, 17(6): 341-348.

[收稿日期] 2007 - 08 - 10

[修回日期] 2007 - 10 - 29

[本文编辑] 韩 丹