

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0545-05

小干扰 RNA 抑制宫颈癌 Hela 细胞株 HPV18 E6、E7 基因的表达

王雪莲¹, 逯晓波², 安春丽^{1*}, 姜 晶¹, 尹香菊¹(1. 中国医科大学 基础医学院 病原生物学教研室, 沈阳 110001; 2. 中国医科大学 公共卫生学院 毒理学教研室, 沈阳 110001)

[摘 要] 目的: 以人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)18 型 E6 基因为靶点, 研究小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)对宫颈癌 Hela 细胞株 HPV18 基因组中恶性转化基因 E6、E7 的抑制作用及对细胞内 P53 蛋白表达的影响。方法: 实验分细胞培养液阴性对照组(阴性对照组), 无关序列 siRNA 对照组(无关序列对照组)及转染 HPV18 E6-siRNA 实验组(siRNA 实验组)。设计并合成 HPV18 E6-siRNA 及无关序列 siRNA, 转染 Hela 细胞后, RT-PCR 检测转染后 48、120 h 细胞内 HPV18 E6、E7 mRNA 的变化, Western blotting 检测转染后 48 h 细胞内 HPV18 E7 和 P53 蛋白的变化。结果: siRNA 转染 Hela 细胞的效率约为 85%。siRNA 转染后 48 h, 实验组细胞内 HPV18 E6、E7 mRNA 及 E7 蛋白含量降低, 其含量分别为阴性对照组的 33.33%、36.78% 及 33.84%; 实验组细胞内 P53 蛋白含量增加, 其含量为阴性对照组的 2.194 倍。siRNA 转染后 120 h, 实验组细胞 HPV18 E6、E7 mRNA 含量恢复为阴性对照组的 90.91%、101.60%。结论: HPV18 E6-siRNA 体外能明显抑制宫颈癌 Hela 细胞 HPV18 E6、E7 基因的表达, 增加细胞内肿瘤抑制因子 P53 蛋白的水平。

[关键词] 小干扰 RNA; 宫颈癌细胞; 人乳头瘤病毒; E6 基因; E7 基因; P53

[中图分类号] R737.33; R730.54

[文献标志码] A

Small interfering RNA inhibits expression of human papillomavirus 18 E6 and E7 gene in cervical cancer Hela cells

WANG Xue-lian¹, LU Xiao-bo², AN Chun-li^{1*}, JIANG Jing¹, YIN Xiang-ju¹(1. Department of Medical Microbiology Parasitology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Toxicology, College of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of small interfering RNA (siRNA), targeting human papillomavirus (HPV) 18 E6 gene, on expression of E6, E7 gene of HPV 18 and on P53 protein expression in cervical cancer Hela cells. **Methods:** The investigation consisted of 3 groups, namely, the medium-treated group (negative control group), irrelevant sequence siRNA group (irrelevant sequence control group) and HPV18 E6-siRNA transfected group (siRNA group). The HPV18 E6-siRNA and irrelevant sequence siRNA were synthesized and transfected into Hela cells. RT-PCR was performed to determine the changes of HPV E6 and E7 mRNA at 48 h and 120 h after transfection. The changes of HPV E7 and P53 protein were determined by Western blotting analysis. **Results:** It was showed that the transfection efficiency of siRNA was about 85%. The HPV E6, E7 mRNA and HPV E7 protein of siRNA-transfected Hela cells were decreased and were 33.33%, 36.78%, and 33.84% those of the negative control group, respectively; P53 protein was 2.194 folds that of the negative control group. At 120 h after transfection, the levels of HPV E6, E7 mRNA restored to 90.91% and 101.6% those of the negative control group, respectively. **Conclusion:** Synthesized HPV18 E6-siRNA can inhibit the expression of HPV E6, E7 gene and upregulate the level of P53 tumor suppressor in Hela cells.

[Key words] small interfering RNA (siRNA); cervical cancer cells; human papilloma virus (HPV); E6 gene; E7 gene; P53

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 545-549]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30670916); 沈阳市科技局科技计划项目(No. 1063315-1-00). Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30670916); the Science and Technology Program of Shenyang(No. 1063315-1-00)

[作者简介] 王雪莲(1974-), 女, 辽宁省沈阳市人, 博士, 讲师, 主要从事病毒相关疾病基因及免疫治疗的研究, Email: wxlcmu@hotmail.com

* Corresponding author. Email: cmucl@126.com

宫颈癌是女性最常见的生殖道恶性肿瘤,其病死率居女性癌症的第2位。研究证实,高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)是导致宫颈癌的主要原因^[1-2]。HPV16、HPV18是最常见的型别^[2]。HPV18高表达的宫颈癌具有浸润性强、淋巴转移率高^[3]、复发率和病死率高^[4]等特点,目前临床常用治疗方法的疗效不够理想。随着宫颈癌发病的年轻化和患者对治疗后生活质量要求的提高,寻求一种不良反应小、可以根治肿瘤的新方法势在必行。

Hela细胞为人宫颈腺癌细胞株,细胞内有HPV18基因组^[5]。研究证实,高危型HPV18基因组中E6、E7基因是恶性转化基因,具有细胞转化功能,其编码的E6、E7蛋白同时表达是恶性转化、恶性表型维持的关键^[2,6]。因此,通过抑制或清除高危型HPV E6、E7基因来治疗子宫颈癌成为近年来的研究热点。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术是近年迅速发展起来的新型基因阻断技术,已被广泛用于包括HIV^[7]、HBV^[8]在内的多种病毒的基因功能及基因治疗研究,并取得了令人欣喜的效果。Jiang^[9]、Niu^[10]等应用RNAi技术进行HPV16 E6基因的抑制作用研究,取得了较好的抑制效果。但有关RNAi抑制HPV18 E6基因抑制后细胞内恶性转化基因、细胞周期调控因子变化的研究较少。本实验针对HPV18 E6设计siRNA序列,体外合成siRNA后转染宫颈癌Hela细胞,通过降解细胞内E6/E7 mRNA,减少细胞内癌蛋白E6、E7的表达,从而阻断或逆转细胞永生,达到防治宫颈癌的目的。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

宫颈癌Hela细胞株由本教研室保存,RPMI 1640购自美国Sigma公司,新生牛血清为天津生物技术有限公司产品。HPV-siRNA(5'-ACC GUU GAA UCC AGA AGA ATT-3',5'-UUC UUC UGG AUU CAA CGG UTT-3')。无关序列-siRNA(5'-GCA CGU CCG UAU ACG UAA ATT-3',5'-UUU ACG UAU ACG GAC GUG CTT-3')及FAM-siRNA(5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3',5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3')由上海吉玛公司合成,siPORT NeoFX转染剂购自Ambion公司,Trizol及RT-PCR试剂盒购自Takara公司。PCR引物由大连宝生物公司合成,序列如下:HPV18 E6(上游引物:5'-AAG ATT TAT TTG TGG TGT-3',下游引物:5'-

GCT GGA TTC AAC GGT TTC-3'),E7(上游引物5'-TAT GCA TGG ACC TAA GGC-3',下游引物5'-CAG CCA TTG TTG CTT ACT-3'), β -actin(上游引物5'-AAATCGTGC GTGACATTAA-3',下游引物5'-CTCGT-CATACTCCTGCTTG -3')。HPV18 E7、P53、 β -actin抗体、二抗均购自Santa Cruz公司。

1.2 细胞培养

RPMI 1640培养液中含10%新生牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 μ g/ml、碳酸氢钠2 g/L。常规方法复苏冻存的Hela细胞,置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的饱和湿度培养箱内培养。用含0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)的0.25%胰酶消化传代。

1.3 细胞转染

转染前1 h常规消化Hela细胞,用含血清的RPMI 1640中止消化并悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10^5 /ml,置37 $^{\circ}$ C培养箱中备用。用不含血清和抗生素的RPMI 1640 25 μ l与siNeoFX 1.5 μ l混合,室温孵育10 min;25 μ l RPMI 1640与2.5 μ l HPV-siRNA(20 μ mol/L)混合;两种混合物再混合后室温孵育10 min,加至24孔细胞培养板中,加入细胞450 μ l,混匀。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中继续培养细胞。取转染后细胞进行检测分析。

1.4 实验分组及细胞转染效率观察

实验分3组,细胞生长液阴性对照组(阴性对照组),无关序列siRNA对照组(无关序列对照组),转染HPV18 E6-siRNA实验组(siRNA实验组)。

取转染FAM-siRNA 24 h后的细胞,RPMI 1640洗3次,倒置荧光显微镜下计数10个200倍视野中有荧光的细胞数及总细胞数,计算荧光细胞占总细胞的百分率,即转染效率。

1.5 RT-PCR检测细胞内HPV18 E6、E7 mRNA的变化

按Trizol使用说明书提取细胞总RNA,分光光度仪测定RNA浓度。取RNA逆转录为cDNA。逆转录反应体系为:MgCl₂ 4 μ l,10 \times RT Buffer(25 mmol/L)2 μ l,dNTP(各10 mmol/L)2 μ l,RNase Inhibitor(40 U/ μ l)0.5 μ l,AMV Reverse Transcriptase(5 U/ μ l)1 μ l,Random 9 mers(50 pmol/ μ l)1 μ l, RNA 1 000 ng,RNase Free dH₂O补足体积为20 μ l。反应程序为30 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 30 min,99 $^{\circ}$ C 5 min,5 $^{\circ}$ C 5 min。PCR反应体系为:逆转录cDNA 5 μ l,5 \times PCR Buffer 5 μ l,Ex Taq HS(5 U/ μ l)0.125 μ l,E6、E7、 β -actin上下游引物(2 μ mol/L)各2.5 μ l,无菌双蒸水补足体积为20 μ l。反应程序为E6:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35个

循环,72 °C 10 min。E7:94 °C 5 min,94 °C 30 s,52 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环,72 °C 10 min。 β -*actin*:94 °C 5 min,94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,35 个循环,72 °C 10 min。取 5 μ l PCR 产物加样至 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像后,用 Gel Pro Analyzer 软件进行条带灰度扫描分析。

1.6 Western blotting 检测细胞内 HPV18 E7、P53 蛋白的变化

收集转染 72 h 的细胞,加入预冷的裂解液(10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L PMSF, 0.1 mmol/L EDTA),冰上孵育 15 min。超声(100 ~ 200 W)3 s,2 次。4 °C 下 12 000 $\times g$ 离心 15 min。

取少量上清用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。每道 50 μ g 上样,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,经电转移将蛋白带转移至硝酸纤维素膜上。牛血清封闭液封闭过夜后,与 1:1 000 稀释的一抗(羊抗 HPV18 E7、P53 IgG 抗体)共同温育 1 h。TBS-T 洗膜 3 次,5 min/次。再与 1:1 000 倍稀释的磷酸酶标记抗羊 IgG 抗体共同温育 1 h。TBS-T 洗膜后,蒸馏水漂洗,置磷酸酶显色液中显色,用水漂洗终止反应。计算机采集硝酸纤维素膜上蛋白质条带,并用 Gel Pro Analyzer 软件进行灰度扫描分析。

2 结果

2.1 宫颈癌 HeLa 细胞转染 FAM-siRNA 的效率

HeLa 细胞转染 FAM-siRNA 后倒置荧光显微镜观察,转染 FAM-siRNA 细胞呈绿色荧光,转染效率约为 85%(图 1)。

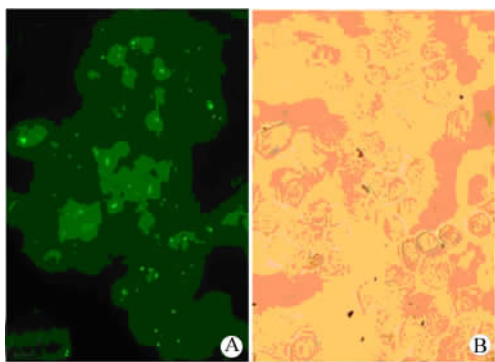


图 1 荧光显微镜观察转染 FAM-siRNA 的 HeLa 细胞($\times 200$)

Fig. 1 FAM-siRNA transfected HeLa cells under fluorescent microscope ($\times 200$)

A: HeLa cells under fluorescent light;

B: HeLa cells under ordinary light

2.2 HPV-siRNA 对肿瘤细胞内 HPV18 E6、E7 mRNA 的影响

RT-PCR 扩增片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳,转染后 48 h 凝胶电泳结果显示 siRNA 实验组 HPV18 E6 扩增片段(196 bp)、HPV18 E7 扩增片段(332 bp)亮度低于阴性对照组和无关序列对照组,而各组 *actin* 扩增片段(473 bp)亮度基本一致(图 2A)。转染后 120 h 凝胶电泳结果显示,各组 HPV18 E6 扩增片段、HPV18 E7 扩增片段及 *actin* 扩增片段亮度基本一致(图 2B)。

计算机采图,灰度分析软件分析灰度,分别以阴性对照组 E6、E7 与 *actin* 的灰度比为 100%,其他各组灰度比与阴性对照组灰度比相比较。结果显示,转染后 48 h,无关序列对照组 HPV18 E6、E7 mRNA 含量分别为阴性对照组的 106.50%、105.60%; siRNA 实验组 HPV18 E6、E7 mRNA 含量分别为阴性对照组的 33.33%、36.78%。转染后 120 h,无关序列对照组 HPV18 E6、E7 mRNA 含量分别为阴性对照组的 91.92%、104.70%; siRNA 实验组 HPV18 E6、E7 mRNA 含量分别为阴性对照组的 90.91%、101.60%。

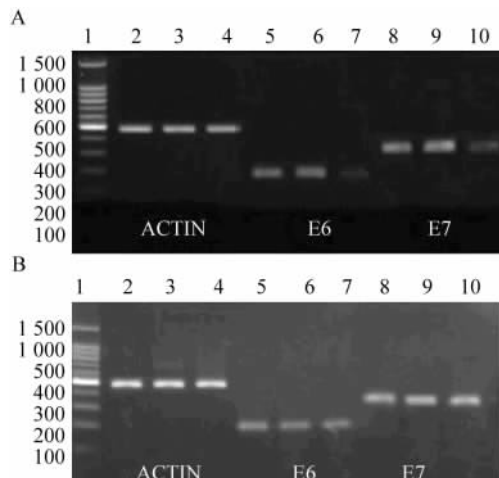


图 2 siRNA 对细胞内 HPV18 E6、E7 mRNA 的影响

Fig. 2 Effects of siRNA on HPV18 E6, E7 mRNA

A: 48 h after transfection; B: 120 h after transfection

1: DNA Marker 2,5,8: Amplified fragment of negative control

group 3,6,9: Amplified fragment of specific control group

4,7,10: Amplified fragment of siRNA group

2.3 HPV-siRNA 对肿瘤细胞内 HPV18 E7、P53 蛋白的影响

Western blotting 结果显示,各组 ACTIN 蛋白条带灰度基本一致,siRNA 实验组 HPV E7 蛋白条带灰度低于阴性对照组和无关序列组,而 P53 蛋白条

带灰度高于阴性对照组和无关序列组(图3,4)。计算机采图,灰度分析软件分析灰度,以阴性对照组 E7、P53 蛋白条带灰度与 ACTIN 的灰度比为 100%,其他各组灰度比与阴性对照组灰度比相比较显示,无关序列对照组 HPV E7、及 P53 蛋白含量分别为阴性对照组的 97.94% 及 103.70%, siRNA 实验组 HPV E7 及 P53 蛋白含量分别为阴性对照组的 33.84% 及 219.40%。

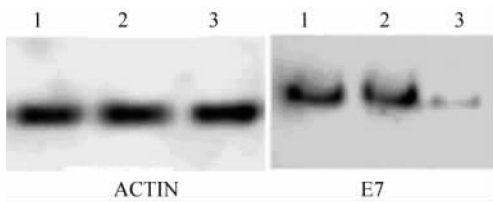


图3 siRNA 对细胞内 HPV18 E7 蛋白的影响

Fig. 3 Effect of siRNA on HPV18 E7 protein

1. Negative control group; 2. Specific control group;
3. siRNA group



图4 siRNA 对细胞内 P53 蛋白的影响

Fig. 4 Effect of siRNA on P53 protein expression

1. Negative control group; 2. Specific control group;
3. siRNA group

3 讨论

研究证实,高危型 HPV E6、E7 基因为癌基因^[2],其编码的产物 HPV E6、E7 蛋白除本身具有细胞恶性转化作用^[11-12]外,还可与细胞周期调控因子 P53、pRB 相互作用。P53 是细胞内重要的肿瘤抑制因子,可诱导正常细胞出现细胞周期 G₁ 停滞,促进 DNA 修复和细胞凋亡^[13]。高危型 HPV E6 蛋白与野生型 P53 具有高度亲和性,两者极易结合,使 P53 快速降解,从而使 P53 失去对细胞生长周期的正常调控而引起细胞无限增殖并向恶性转化^[14-15]。pRB 是另一种重要的生长抑制蛋白,可通过抑制转录因子 E₂F 活性而达到抑制细胞增殖目的。高危型 HPV E7 与 pRB 亲和力高,这种高亲和力使 pRB-E₂F 复合物解离,E2F 游离出来,发挥转录因子的作

用,从而导致细胞周期失控,发生永生^[15-16]。因此,HPV E6、E7 基因成为 HPV 阳性宫颈癌基因治疗的理想靶标。

研究者应用核酶剪切 E6、E7 癌基因,成功地逆转了 HPV 阳性宫颈癌细胞的恶性表型,诱导了凋亡,并增加了肿瘤细胞对免疫细胞的敏感性^[17-19]。还有使用反义寡核苷酸抑制 E6、E7 转录,在肿瘤细胞中上调 P53 及 P53 反应蛋白,诱导凋亡的报道^[20-21]。然而,上述两种方法存在费时、费力、抑制效率不高、而且存在对细胞造成非特异性毒性等问题。而采用 RNAi 方法干扰病毒恶性转化基因,可达到较高的抑制效率,且不引起宿主细胞产生非特异反应。本研究 RT-PCR 及 Western blotting 结果显示,以 E6 为靶标的 siRNA 转染 HeLa 细胞 48 h 后,细胞内 HPV18 E6、E7 mRNA 及 E7 蛋白含量分别减少至阴性对照组的 33.33%、36.78% 及 33.84%。提示 HeLa 细胞内确实存在 RNAi 现象,针对细胞内病毒癌基因的 siRNA 对癌基因的表达具有高效抑制作用。由于高危型 HPV18 E6/E7 mRNA 是由相同的启动子转录形成的双顺反子 mRNA,可表达 E6、E7 两种蛋白^[22-23]。因而针对 HPV18 E6 的 siRNA 不仅能够靶向 HPV18 E6,降低 E6 mRNA 水平,同时由于 E6、E7 基因转录及翻译特点,使得 E7 mRNA 及蛋白水平也降低。

大部分宫颈癌细胞中含有野生型 p53 基因,其表达的 P53 蛋白与细胞内 E6 蛋白结合后被降解,因而通过抑制 E6 基因表达可恢复细胞中 P53 蛋白表达及其细胞增殖抑制功能。本实验 Western blotting 结果显示,siRNA 实验组 P53 蛋白水平增加,其可能原因是由于 siRNA 抑制 E6 基因表达,细胞内 E6 蛋白的含量降低,因而导致 P53 蛋白降解减少,细胞内 P53 蛋白水平增加。进一步的细胞增殖特性研究表明,siRNA 可恢复 P53 蛋白对细胞生长周期的调控功能,诱导细胞出现 G₁ 期阻滞^[24]。

目前,有 3 种方法可以获得 siRNA,其中化学合成方法具有可直接产生高质量 RNA 片段,可在较短时间内完成实验的优点。本实验采用了该方法合成 siRNA,其 3' 末端对称悬挂 2 个 T,以减少细胞内 RNase 对 siRNA 的降解,实验结果证实这种形式的 siRNA 可有效降解靶基因的表达。siRNA 转染后 48 h,细胞内 HPV18 E6、E7 mRNA 含量较阴性对照组明显降低,表明化学合成的 siRNA 可有效降解靶基因的表达。但是 siRNA 转染 120 h 后,细胞内 HPV18 E6、E7 mRNA 水平基本恢复正常,可能是由于细胞不断分裂,细胞内 siRNA 浓度降低,加之 siR-

NA 被细胞内 RNase 降解,因而对靶基因的抑制作用降低。

本研究进一步证实 HeLa 细胞内存在 RNAi 现象,针对细胞内病毒癌基因 E6 为靶标的 RNAi 技术抑制效果确切,针对性强。随着转染方式的改进,表达载体的更新,RNAi 可望成为基因治疗宫颈癌的有效手段。

[参考文献]

- [1] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide [J]. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12-19.
- [2] zur Hausen H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996,1288(2):F55-F78.
- [3] Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, *et al.* Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(19): 1361-1368.
- [4] Walker J, Bloss JD, Liao SY, *et al.* Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix [J]. *Obstet Gynecol*, 1989, 74(5): 781-785.
- [5] Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, *et al.* A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer[J]. *EMBO J*, 1984, 3(5): 1151-1157.
- [6] zur Hausen H. immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes[J]. *Semin Cancer Biol*, 1999, 9(6): 405-411.
- [7] Hayafune M, Miyano-Kurosaki N, Park WS, *et al.* Silencing of HIV-1 gene expression by two types of siRNA expression systems [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2006, 17(5): 241-249.
- [8] Ying RS, Zhu C, Fan XG, *et al.* Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice[J]. *Antiviral Res*, 2007,73(1): 24-30.
- [9] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA-interference[J]. *Oncogene*, 2002, 21(39): 6041-6048.
- [10] Niu XY, Peng ZL, Duan WQ, *et al.* Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference *in vitro* and *in vivo*[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(2): 743-751.
- [11] Sasagawa T, Kondoh G, Inoue M, *et al.* Cervical/vaginal dysplasias of transgenic mice harbouring human papillomavirus type 16 E6-E7 genes[J]. *J Gen Virol*, 1994, 75(Pt11): 3057-3065.
- [12] Song S, Pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic ani-

mals[J]. *J Virol*, 1999, 73(7): 5887-5893.

- [13] Soussi T. p53 alterations in human cancer: more questions than answers[J]. *Oncogene*, 2007, 26(15): 2145-2156.
- [14] Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, *et al.* The human papilloma-virus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate P53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/ p300[J]. *J Virol*, 1999, 73(8): 6209-6219.
- [15] Boulet G, Horvath C, Vanden Broeck D, *et al.* Human papillomavirus; E6 and E7 oncogenes[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(11): 2006-2011.
- [16] Hwang SG, Lee D, Kim J, *et al.* Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein- independent manner[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(4): 2923-2930.
- [17] Zheng Y, Zhang J, Rao Z. Ribozyme targeting HPV16 E6 E7 transcripts in cervical cancer cells suppresses cell growth and sensitizes cells to chemotherapy and radiotherapy[J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(11): 1129-1134.
- [18] Lu D, Chatterjee S, Brar D, *et al.* Ribozyme-mediated *in vitro* cleavage of transcripts arising from the major transforming genes of human papillomavirus type 16[J]. *Cancer Gene Ther*, 1994, 1(4): 267-277.
- [19] Chen Z, Kamath P, Zhang S, *et al.* Effectiveness of three ribozymes for cleavage of an RNA transcript from human papillomavirus type 18[J]. *Cancer Gene Ther*, 1995, 2(4): 263-271.
- [20] Sima N, Wang S, Wang W, *et al.* Antisense targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 genes contributes to apoptosis and senescence in SiHa cervical carcinoma cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 106(2): 299-304.
- [21] von Knebel Doeberitz M, Rittmüller C, zur Hausen H, *et al.* Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA[J]. *Int J Cancer*, 1992, 51(5): 831-834.
- [22] Schneider-Gadicke A, Schwarz E. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes[J]. *EMBO J*, 1986, 5(9): 2285-2292.
- [23] Stacey SN, Jordan D, Snijders PJ, *et al.* Translation of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from bicistronic mRNA is independent of splicing events within the E6 open reading frame [J]. *J Virol*, 1995, 69(11): 7023-7031.
- [24] 王雪莲,尹香菊,王冬冬,等. HPV-siRNA 对 HeLa 细胞生长抑制作用的实验研究[J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(3): 30-34.

[收稿日期] 2007 - 09 - 12

[修回日期] 2007 - 11 - 04

[本文编辑] 郁晓路

《中国肿瘤生物治疗杂志》欢迎投稿、欢迎订阅