

沉默 *BRCAAI* 基因对胃癌 MGC-803 细胞的抑制作用及其可能的机制

刘彬, 崔大祥*, 杜彤, 李智铭, 宋华, 杨浩, 鲍晨晨, 甘慧 (上海交通大学微纳科学技术研究院生物纳米工程研究室 微纳米制造技术国家重点实验室 薄膜与微细技术教育部重点实验室, 上海 200240)

[摘要] 目的: 研究沉默乳腺癌相关抗原 1 (breast cancer-associated antigen 1, *BRCAAI*) 基因对胃癌细胞株 MGC-803 的抑制作用及其可能的机制。方法: 构建 *BRCAAI* 基因 shRNA 载体, 将构建的 shRNA-*BRCAAI* 质粒与阴性对照质粒 shRNA-N 转染胃癌 MGC-803 细胞, 24 h 后用荧光显微镜观察转染效率, 实时定量 PCR 检测 *BRCAAI* 和 *GAPDH* 基因 mRNA 表达水平。MTT 法检测转染后 24、48 与 72 h 的细胞增殖水平, Annexin-V PE/7AAD 检测转染 24 h 后的细胞凋亡水平, Western blotting 检测转染 48 h 后细胞的凋亡相关蛋白表达水平。结果: *BRCAAI* siRNA 表达质粒转染 MGC-803 细胞 24 h 的转染效率为 $(81.2 \pm 2.6)\%$ 。转染后 48 h MGC-803 细胞的 *BRCAAI* mRNA 水平下降了 61.4%, MGC-803 细胞增殖的抑制率达 45.0%, 转染 siRNA 细胞的凋亡率明显高于未转染细胞和对照质粒转染细胞 $([14.4 \pm 1.6]\% \text{ vs } [5.4 \pm 2.0]\%, [4.4 \pm 2.5]\%, P < 0.05]$ 。转染 siRNA 细胞的凋亡相关蛋白 Rb 与 Bax 的表达量显著增加 $(P < 0.05)$, Bcl-2 的表达量显著减少 $(P < 0.05)$ 。结论: *BRCAAI* 基因的沉默可有效抑制人胃癌 MGC-803 细胞的增殖和诱导细胞凋亡, 其机制与其促进 Rb 和 Bax 蛋白表达、抑制 Bcl-2 蛋白表达有关。

[关键词] 乳腺癌相关抗原基因 1; shRNA; 胃癌细胞; 增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R735.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0522-05

Inhibitory effects of *BRCAAI* gene silencing on gastric cancer MGC-803 cells and its possible mechanism

LIU Bin, CUI Da-xiang*, DU Tong, LI Zhi-ming, SONG Hua, YANG Hao, BAO Chen-chen, GAN Hui (National Key Laboratory of Micro/Nano Fabrication Technology, Key Laboratory for Thin Film and Microfabrication Technology of Ministry of Education, Department of Bio-Nano Science and Engineering, Research Institute of Micro/Nano Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of breast cancer-associated antigen 1 (*BRCAAI*) gene silencing on gastric cancer MGC-803 cells and the related mechanism. **Methods:** Plasmid shRNA-*BRCAAI* and shRNA-N were constructed and transfected with FuGene HD into gastric cancer cell line MGC-803. The transfection efficiency was examined using fluorescent microscope 24 h later. The total RNAs was extracted 48 h after transfection and the expression of *BRCAAI* and *GAPDH* gene were analyzed by real-time PCR. The cell proliferation was assessed by MTT assay 24 h, 48 h, and 72 h after transfection. The cell apoptosis was determined by Annexin V-PE/7AAD. The expression of Rb, Bax, Bcl-2 and *BRCAAI* proteins was analyzed by Western blotting 48 h after transfection. **Results:** We found that the transfection efficiency of shRNA-*BRCAAI* was $(81.2 \pm 2.6)\%$ 24 h after transfection. Forty-eight hours after transfection with shRNA-*BRCAAI* the expression of *BRCAAI* mRNA decreased by 61.4%; the inhibition rate of MGC-803 cells growth was 45.0%. The cell apoptosis rate of shRNA-*BRCAAI* transfection group was significantly higher than those of untransfected group and mock plasmid transfected group $([14.4 \pm 1.6]\% \text{ vs } [5.4 \pm 2.0]\%, [4.4 \pm 2.5]\%, P < 0.05]$. Cells transfected with shRNA-*BRCAAI* had significantly increased expression of Rb and Bax proteins $(P < 0.05)$, and decreased expression of Bcl-2 protein $(P < 0.05)$. **Conclusion:** *BRCAAI* gene silencing can effectively inhibit the proliferation of MGC-803 cells and induce apoptosis, which might be related to the promotion of Rb and Bax proteins, and suppression of

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划资助项目(No. 2005CB723400-G); 国家高技术研究发展(863)计划重点项目(No. 2007AA022004); 国家自然科学基金资助项目(No. 30771075; No. 30672147); 上海市科委基金资助项目(No. 072112006-6)。Supported by the Major State Basic Research Development Program (973) of China (No. 2005CB723400-G); the National High Technology Research and Development Program (863) of China (No. 2007AA022004); the National Natural Science Foundation of China (No. 30771075; No. 30672147)

[作者简介] 刘彬(1985-), 男, 江苏省盐城市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤检测与治疗方面的研究

* Corresponding author. E-mail: dx cui@sjtu.edu.cn

Bcl-2 protein.

[**Key words**] breast cancer-associated antigen 1 (*BRCA1*) gene; shRNA; gastric cancer cell; proliferation; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 522-526]

乳腺癌相关抗原基因 1(breast cancer-associated antigen 1, *BRCA1*)是本实验室崔大祥教授等于 1999 年首次克隆到的与肿瘤有关的基因(Genbank AF208045. 2 GI: 20800446)。该基因全长 93 857 bp, 基因编码区域是从 45 bp 至 3 686 bp^[1-2]。 *BRCA1* 基因编码的蛋白由 1 214 个氨基酸组成, 相对分子质量为 136 800, 含有 10 个糖基化位点, 在 N 端第 740 ~ 750 位氨基酸处有最强的亲水性, 提示在此区域可能存在 α 螺旋结构, 此基因属于 ARID4B 家族^[1]。到目前为止, 实验发现此基因在乳腺癌、胃癌、胰腺癌等组织中高表达^[3-4], 但是, 此基因的作用信号途径仍不清楚。本研究构建了 *BRCA1* 的 shRNA 载体, 并对胃癌 MGC-803 细胞中 *BRCA1* 基因进行敲除, 在 mRNA 水平上检测 *BRCA1* 的表达量, 用 MTT 法检测基因敲除后细胞的增殖水平, Annexin V 检测细胞的凋亡水平, Western blotting 检测细胞中凋亡相关蛋白的表达情况, 为阐明 *BRCA1* 基因在胃癌细胞中的作用特点及其相应机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

胃癌细胞株 MGC-803 购自中科院细胞库, RPMI 1640 培养液、新生牛血清购自 Hyclone 公司, 质粒提取试剂盒购自北京天根公司, FuGENE HD Transfection Reagent 购自 Roche 公司, Rneasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司, ReverTra Ace 反转录试剂盒购自 Toyobo 公司, SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自 Takara 公司, Annexin V-PE 凋亡检测试剂盒购自 BD 公司, Western blotting 所用的一抗: 兔抗人 *BRCA1* 多克隆抗体(abcam 公司), 小鼠抗人 β -actin 多克隆抗体(Sigma 公司), 小鼠抗人 Rb 多克隆抗体(BD 公司), 兔抗人 Bax 多克隆抗体(Cell Signaling 公司), Western blotting 所用的二抗: 羊抗小鼠 IgG-HRP(PTG 公司), 羊抗兔 IgG-HRP(PTG 公司)。

1.2 siRNA 表达质粒的构建

pBRCA1(ARID4B) RNAi Plasmid 由德国 Freiburg 大学 Beate Brand-Saberi 教授帮助构建, 已被转入到 Ecoli DH5 α 中, 作为菌种保存。所用的干扰 RNA 序列为: 5' ATCCG CAAAG AGGAA TCTAA GATTT CAAGA GAATC TTAGA TTCCT CTTTG

CTTTTT TGAAT TCA 3', 5' AGCTT GAATT CAAAA AAGCA AAGAG GAATC TAAGA TTCTC TTGAA ATCTT AGATT CCTCT TTGCG 3'。另有乱序质粒作为对照组。所用质粒结构如图 1:

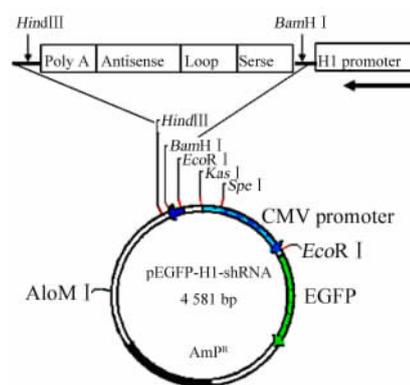


图 1 pARID4B RNAi 质粒结构图

Fig. 1 Construction route of pARID4B RNAi vector

该质粒中自带一个由 CMV 启动子诱导表达的 EGFP 报告基因, 人 H1 启动子负责诱导目的 shRNA 的转录, 质粒上还带有一个氨苄青霉素抗性基因。将带有质粒的菌种涂布在带有氨苄青霉素(50 μ g/ml)的固体 LB 琼脂糖平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑出单 clone 菌落培养 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜。按质粒提取试剂盒说明书提取质粒备用。

1.3 shRNA 质粒转染 MGC-803 细胞

胃癌 MGC-803 细胞培养于含 10% 新生牛血清、100 μ g/ μ l 青霉素、100 μ g/ μ l 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养。转染前 1 d, 用 0.25% 胰蛋白酶消化计数, 以 1×10^5 个/ml 制成细胞悬液, 接种到六孔板中, 每孔 2 ml 细胞悬液, 24 h 后进行细胞转染。按照 FuGENE HD Transfection Reagent 说明书上的方法进行转染, 每孔所用质粒为 2 μ g、FuGENE 4 μ l。转染后无需更换培养液。24 h 后用荧光显微镜观察转染效率。

1.4 实时定量 PCR 法检测 MGC-803 细胞 *BRCA1* mRNA 的表达

MGC-803 细胞分为未处理组(NT)、阴性对照组(shRNA-N)、实验组(shRNA)。转染 48 h 后用 PBS 洗 3 遍细胞, 用 Rneasy Mini Kit 提取细胞总 RNA, 用

Nano-Drop 测定 RNA 浓度。根据 ReverTra Ace 反转录试剂盒说明书用随机引物进行反转录。*BRCA1* 基因引物序列^[5]: up-5' ACCAAATCTCCCGCAAGG-3', down-5' CATATTTTCAGGTCCGACA-3'。GAPDH 内参基因引物序列^[6]: up-5' GAAGGTGAAG-GTCGGAGTC -3', down-5' GAAGATGGTGATGG-GATTTTC -3'。取 2 μl 反转录产物, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μl, SYBR Premix Ex Taq(2 ×) 12.5 μl, ddH₂O 补足至 25 μl。在 Bio-Rad iQ5 上进行两步法 PCR, 所得产物用 2% 琼脂糖进行电泳分析。*BRCA1* mRNA 表达的量以 GAPDH 表达量作为参照标准, 进行相对定量。荧光实时 PCR 数据采用比较 Ct 法进行分析处理, 计算公式如下: $2^{-\Delta\Delta Ct}$; $\Delta\Delta Ct = (\text{处理组 Ct} - \text{处理组 GAPDH Ct}) - (\text{对照组 Ct} - \text{对照组 GAPDH Ct})$ 。计算公式所得的结果表示干扰组目的基因 mRNA 表达量相对于对照组目的基因 mRNA 表达量的比值^[7]。

1.5 MTT 法检测 *BRCA1* 基因沉默后 MGC-803 细胞的增殖情况

用 MTT 法^[8]检测 *BRCA1* 基因敲除后 MGC-803 细胞的增殖情况。转染前 1 天用 0.25% 胰蛋白酶消化计数, 采用 96 孔细胞培养板, 以 1×10^4 个细胞/孔接种, 待细胞融合达 90% 以上进行转染。每组设 5 个复孔, 转染 24、48 h 后进行 MTT 实验, 每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml), 培养箱孵育 4 h 后轻轻吸出上清, 加入 0.05 ml/孔的二甲基亚砷(DMSO), 待孔底紫色结晶物完全溶解后在 PE 公司 Wallac Victor 多功能酶联检测仪上(570 nm)测定光密度(D_{570}), 实验结果取每组 5 个复孔的平均值, 细胞增殖抑制率(%) = $[1 - D_{570}(\text{处理组}) / D_{570}(\text{未处理组})] \times 100\%$, 绘制细胞生长曲线。

1.6 流式细胞术检测 *BRCA1* 基因沉默后 MGC-803 细胞的凋亡情况

BRCA1-shRNA 转染细胞后, 根据 BD 公司 Annexin V-PE 凋亡检测试剂盒中的说明书上的方法进行凋亡检测。收集转染 24 h、48 h 后的 MGC-803 细胞, 用偶联 Annexin V 的 PI 和 7AAD 进行双染。在流式细胞仪上, 585/42nm 处检测 Annexin V-PE, 650nm 处检测 7AAD。Annexin V-/7AAD-, Annexin V +/7AAD-, Annexin V +/7AAD + 分别表示活细胞、早期凋亡细胞、晚期凋亡细胞。凋亡细胞的比例由 CellQuest Pro 软件自动给出。

1.7 Western blotting 检测 MGC-803 细胞凋亡相关蛋白(Bcl-2、Rb、Bax)的表达

胃癌 MGC-803 细胞转染 48 h 后提取细胞总蛋

白。BCA 法测蛋白浓度, 取 20 μl 样本上样检测, 12% SDS-PAGE 胶分离蛋白, 分离后蛋白转移至硝酸纤维素膜上。加兔抗人 *BRCA1* 多克隆抗体(1:2 000)、兔抗人 Bax 多克隆抗体(1:2 000) 4 °C 下孵育过夜, 再与羊抗兔 IgG-HRP 二抗(1:1 000) 37 °C 孵育 1 h; 加小鼠抗人 β-actin 多克隆抗体(1:2 000)、小鼠抗人 Rb 多克隆抗体(1:2 000) 4 °C 下孵育过夜, 再与羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗(1:1 000) 37 °C 孵育 1 h。均采用 ECL 显色。实验选取 β-actin 作为内参蛋白。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 14.0 软件包进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数的比较采用 t 检验, 设定 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 表达质粒对胃癌细胞 MGC-803 的成功转染

转染 24 h 后, 在荧光显微镜下观察(图 2)和流式细胞仪分析后显示, 阴性对照组(shRNA-N)和实验组(shRNA)的转染效率分别达到(87.5 ± 3.3)%、(81.2 ± 2.6)%。由此表明干扰质粒载体已被显著转染进入细胞并得到高效表达。荧光图片如图 2。

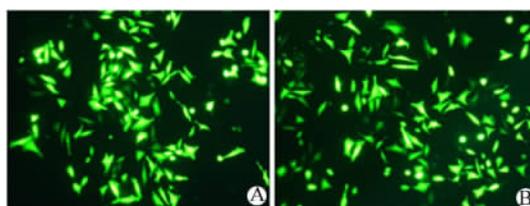


图 2 荧光显微镜观察 siRNA 表达质粒转染 MGC-803 细胞的效果

Fig. 2 EGFP expression in MGC-803 cells after transfected with siRNA vectors
A: shRNA-N; B: shRNA-BRCA1

2.2 siRNA 转染后 MGC-803 细胞中 *BRCA1* 基因 mRNA 的表达水平

转染 48 h 后分离各组细胞的总 RNA 进行 Real-Time PCR。结果显示, shRNA 组的 *BRCA1* 基因 mRNA 与 GAPDH 相比, 下降了 61.4%, 说明 *BRCA1* 基因已被显著抑制($P < 0.05$), 转染抑制效果较好(图 3)。

2.3 *BRCA1* 基因的沉默对人胃癌细胞 MGC-803 增殖的影响

BRCA1 基因 siRNA 转染 MGC-803 细胞后, 以

MTT 法检测细胞的增殖水平,细胞增殖曲线显示,与阴性对照组相比,shRNA 组作用 24 h 后的 MGC-803 细胞其增殖速度明显降低(43.2 ± 2.3)% ($P < 0.01$),其中,在 48 h 时对 MGC-803 细胞增殖抑制率最高(44.5 ± 2.6)% ($P < 0.01$)。相反,shRNA-N 组作用后 MGC-803 细胞增殖率(12.5 ± 1.9)% 无统计学意义($P > 0.05$,图 4)。

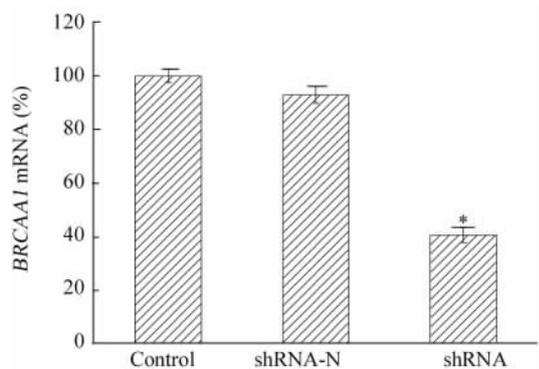


图 3 siRNA 转染对 MGC-803 细胞 *BRCA1* 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Expression of *BRCA1* mRNA in MGC-803 cells after transfection with siRNA vectors

* $P < 0.05$ vs shRNA-N or control

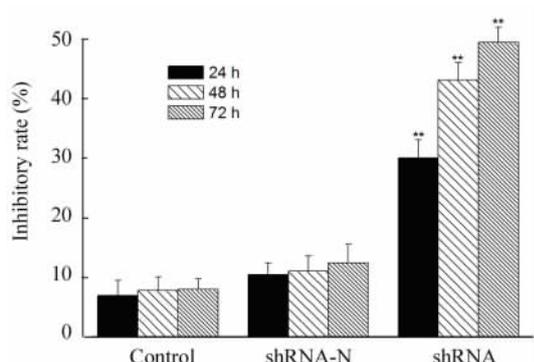


图 4 *BRCA1* 基因 siRNA 对人胃癌细胞株 MGC-803 细胞增殖的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of *BRCA1*-targeted siRNA vectors on proliferation of MGC-803 cells

** $P < 0.01$ vs control or shRNA-N

2.4 *BRCA1* 沉默对 MGC-803 细胞凋亡的影响

shRNA-*BRCA1* 实验组 MGC-803 细胞转染后 24、48 h 后的细胞凋亡率分别达到(7.9 ± 2.1)% 和 (14.8 ± 1.6)%,转染 48 h 后细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$);shRNA-N 组,转染后 24、48 h 后的凋亡率分别达到(5.64 ± 1.9)% 和(8.71 ± 2.3)%,转染 48 h 后细胞凋亡率无明显增加($P > 0.05$);未处

理组, MGC-803 细胞转染后 24、48 h 后的细胞凋亡率分别达到(4.47 ± 2.5)% 和(6.73 ± 2.0)%,转染 48 h 后细胞凋亡率无明显增加($P > 0.05$,图 5)。

2.5 *BRCA1* 基因沉默对 MGC-803 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

shRNA 转染 48 h 后提取总蛋白,通过 Western blotting 进行检测分析,与未处理组及阴性对照组对比后发现,实验组 MGC-803 细胞 Bcl-2 蛋白的表达量上升,而 Bax 蛋白却减少了(图 6)。

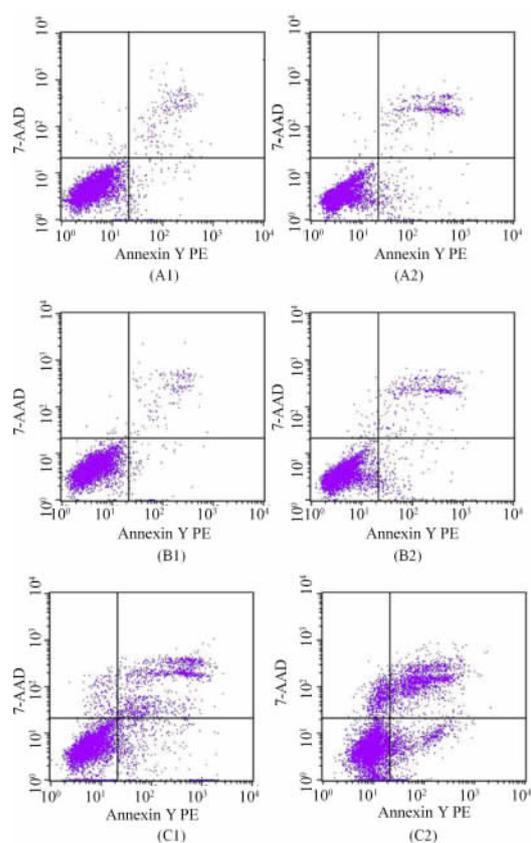


图 5 *BRCA1* siRNA 作用对 MGC-803 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of *BRCA1* siRNA vectors on MGC-803 cell apoptosis

A1, B1, C1: shRNA-N, control, shRNA-*BRCA1*; cells extracted after transfection 24 h; A2, B2, C2: shRNA-N, control, shRNA-*BRCA1*, respectively; cells extracted 48 h after transfection

3 讨论

胃癌是世界四大恶性肿瘤之一,据估计每年有 900,000 新增病例,预计到 2010 年全球胃癌患者将达 110 万^[9-12]。三分之二的胃癌发生在发展中国家,其中 42% 发生在中国^[13]。在中国,胃癌的死亡率高达 16/100 000,某些地区甚至达到 60/100 000,是癌症死亡的主要原因之一^[14]。但目前还没有有效针对胃癌的治疗手段,当务之急是找到有效的治

疗途径。

到目前为止,关于 *BRCAAI* 基因的研究还不是很多。Cui 等^[2]发现 *BRCAAI* 基因在胃癌组织中的表达水平显著高于正常胃黏膜,且与胃癌病理类型无关。杨浩等^[3]用 siRNA 封闭 *BRCAAI* 基因后,发现在乳腺癌细胞 MCF-7 中 *BRCAAI* 基因的表达下降引起 Rb 基因表达的上升。黄拓等^[4]发现 *BRCAAI* 蛋白的表达与胃癌的发生、发展、分化、转移相关。这表明 *BRCAAI* 基因可能是潜在的治疗靶向基因。

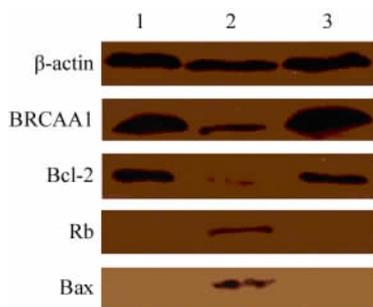


图 6 Western blotting 检测 MGC-803 细胞凋亡相关蛋白的表达

Fig. 6 Expression of apoptosis-related proteins in MGC-803 cells as examined by Western blotting

1: shRNA-N group, 2: shRNA-BRCAAI group, 3: Control group

本研究通过胃癌细胞 MGC-803 培养,结合 RNAi 技术^[15-16]将 MGC-803 细胞中 *BRCAAI* 基因敲除,(87.5 ± 3.34)%的转染效率表明 shRNA 质粒在细胞内得到有效表达,同时结合 Real-Time PCR 的结果表明 *BRCAAI* 基因得到了成功敲除;通过测定细胞转染 24 h、48 h 后的凋亡情况,发现转染 48 h 后与转染 24 h 后相比,实验组 MGC-803 细胞凋亡率为(14.4 ± 1.6)%,提高了 10.1%,而阴性对照组和阳性对照组无明显增加,此结果表明,抑制胃癌细胞中 *BRCAAI* 基因表达,可以诱导胃癌细胞凋亡;Western blotting 结果发现 *BRCAAI* 基因敲除后,Rb 蛋白的表达增加,这说明 *BRCAAI* 基因与 Rb 基因存在相互拮抗作用,*BRCAAI* 基因的敲除导致了 Rb 基因的启动,然后激活了细胞内的 Bax 基因的表达,而 Bax 基因可解除 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制,从而促进细胞凋亡的发生。由此认为 *BRCAAI* 基因在胃癌 MGC-803 细胞中通过抑制 Rb 蛋白与 Bax 蛋白的表达来促进胃癌细胞增殖,抑制胃癌细胞凋亡。*BRCAAI* 基因可能具有调控细胞增殖与凋亡的功能。结合我们组以前的工作,可以推断 *BRCAAI* 基因可能是一个十分重要的与胃癌的发生、发展密切

相关的基因,可能是一个非常有价值的胃癌标志物。进一步的研究将集中在 *BRCAAI* 基因引起细胞凋亡的具体详细机制,以及诱导细胞凋亡途径上。

[参考文献]

- [1] 崔大祥,高天文,金桂秋,等. *BRCAAI* 基因的克隆、染色体定位与特征性分析[J]. 自然杂志, 2003, 25(6): 326-328.
- [2] Cui D, Jin G, Gao T, et al. Characterization of *BRCAAI* and its novel antigen epitope identification[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(7):1136-1145.
- [3] 杨浩,崔大祥,李清,等. siRNA 封闭 *BRCAAI* 基因对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和 Rb 基因表达的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(3): 181-184.
- [4] 黄拓,崔大祥,李清,等. *BRCAAI* 蛋白在胃癌组织与不同分化细胞株中的表达及其临床意义[J]. 胃肠病学, 2007, 12(10): 616-619.
- [5] Gutala RV, Reddy PH. The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains[J]. J Neurosci Methods, 2004, 132(1): 101-107.
- [6] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res. 2001, 29(9):e45.
- [7] Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(14): e73.
- [8] Twentyman PR, Fox NE, Rees JK. Chemosensitivity testing of fresh leukaemia cells using the MTT colorimetric assay[J]. Br J Haematol, 1989, 71(1): 19-24.
- [9] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [10] Forman D, Pisani P. Gastric cancer in Japan--honing treatment, seeking causes[J]. N Engl J Med, 2008, 359(5): 453-62.
- [11] Cheung TK, Wong BC. Treatment of *Helicobacter pylori* and prevention of gastric cancer[J]. J Dig Dis, 2008, 9(1):8-13.
- [12] Tokunaga M, Ohyama S, Nunobe S, et al. Advanced gastric cancer with a duplicated hepatic artery: preoperative diagnostic value of multidetector-row computed tomography for surgical resection[J]. Gastric Cancer, 2007, 10(3):191-195.
- [13] Lochhead P, El-Omar EM. Gastric cancer[J]. Br Med Bull, 2008, 85: 87-100.
- [14] Fujimoto-Ouchi K, Sekiguchi F, Yasuno H, et al. Antitumor activity of trastuzumab in combination with chemotherapy in human gastric cancer xenograft models[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 59(6): 795-805.
- [15] Dai F, Yusuf F, Farjah GH, et al. RNAi-induced targeted silencing of developmental control genes during chicken embryogenesis[J]. Dev Biol, 2005, 285(1): 80-90.
- [16] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.

[收稿日期] 2008-09-08

[修回日期] 2008-10-01

[本文编辑] 王莹