

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.06.012

· 基础研究 ·

VEGFR-3 siRNA 对人结肠癌细胞黏附力和侵袭性的抑制作用

贾如江¹, 侯丽艳², 刘奇^{1*}, 冯运章¹ (1. 邯郸市中心医院 普外二科, 河北 邯郸 056002; 2. 邯郸市中心医院 ICU 科, 河北 邯郸 056002)

[摘要] 目的: 探讨 VEGFR-3 对人结肠癌细胞黏附力和侵袭性的影响。方法: 构建携靶向 VEGFR-3 基因 siRNA (small interfering RNA) 表达载体, 转染人结肠癌 LoVo 细胞, 半定量 RT-PCR 和 Western blotting 检测转染前后 LoVo 细胞 VEGFR-3 mRNA 和蛋白表达的变化, 基质-黏附实验检测细胞转染后的黏附能力, 细胞侵袭实验检测转染后肿瘤细胞侵袭性的改变。结果: 携靶向 VEGFR-3 基因 siRNA 的表达载体成功构建, RT-PCR 检测转染 siRNA 后 LoVo 细胞 VEGFR-3 mRNA 表达水平降低; Western blotting 检测转染 siRNA 后 72 h LoVo 细胞 VEGFR-3 蛋白表达下降, 其表达相对值由 (1.26 ± 0.19) 降至 (0.39 ± 0.12) ($P < 0.05$)。转染 siRNA 72 h 后 LoVo 细胞的黏附能力显著下降 [(0.626 ± 0.047) vs (0.407 ± 0.029) , $P < 0.05$]; LoVo 细胞穿膜细胞数 (6.38 ± 3.25) 明显低于空白对照组 (24.82 ± 3.44) 、非特异性对照组 (23.58 ± 3.73) ($P < 0.05$)。结论: siRNA 能够在 LoVo 细胞中引发 RNA 干扰效应, 下调 VEGFR-3 基因的表达, 进而抑制 LoVo 细胞的黏附能力和侵袭性。

[关键词] RNA 干扰; 血管内皮生长因子受体-3 (VEGFR-3); 结肠癌细胞; 黏附能力; 侵袭能力

[中图分类号] R735.3+5; R730.54 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2008)06-0561-05

Inhibitory effect of VEGFR-3-targeted siRNA against adherence and invasion of human colon cancer cells

JIA Ru-jiang¹, HOU Li-yan², LIU Qi^{1*}, FENG Yun-zhang¹ (1. The Second Department of Surgery, The Center Hospital of Handan, Handan 056001, Hebei, China; 2. ICU, The Center Hospital of Handan, Handan 056001, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a small interfering RNA (siRNA) expression vector (psiRNA-VEGFR-3) targeting vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) and to investigate the effects of VEGFR-3 siRNA on the adherence and invasion of human colon cancer cells. **Methods:** A siRNA expression vector (psiRNA-VEGFR-3) targeting VEGFR-3 were constructed and was used to transfect LoVo cells via lipofectamine 2000. The mRNA and protein expression of VEGFR-3 were examined after transfection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting, respectively. The tumor adhesion ability was detected by cell-matrix adhesion experiment and the invasion ability of tumor cells was evaluated by millicell chamber model. **Results:** The VEGFR-3 siRNA expression vector was successfully constructed. The expression of VEGFR-3 mRNA and protein was inhibited after psiRNA-VEGFR-3 transfection. Seventy-two hours after psiRNA-VEGFR-3 transfection, Western blotting assay showed that the expression of VEGFR-3 protein was decreased from (1.26 ± 0.19) to (0.39 ± 0.12) ($P < 0.05$), the adhesion ability of LoVo cells was also significantly decreased compared with the untransfected group and negative control group (0.407 ± 0.029 vs 0.626 ± 0.047 , 0.621 ± 0.068 , $P < 0.01$). The invasion assay demonstrated that the number of LoVo cells penetrating the membrane in the transfection group was significantly lower than those in the untransfected and negative control group (6.38 ± 3.25 vs 24.82 ± 3.44 , 23.58 ± 3.73 , $P < 0.05$). **Conclusion:** The siRNA of VEGFR-3 gene can effectively inhibit the mRNA and protein expression of VEGFR-3 in LoVo cells, therefore restraining the adhesion and invasion ability of LoVo cells.

[Key words] RNA interference; vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3); colon cancer cell; adhesion ability; invasion ability

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(6): 561-565]

[作者简介] 贾如江(1974-)男, 河北省邯郸市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤方面的研究

* Corresponding author. E-mail: peliuqi@163.com

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由小分子干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)介导的一种进化上保守的细胞防御机制,它能够特异而有效地引起转录后基因沉默^[1]。RNAi 具有稳定、特异、细胞毒性低以及作用持久、强大等优点, RNAi 技术在肿瘤研究中展现出良好的应用前景。血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)属于酪氨酸激酶受体家族,是成熟淋巴管内皮细胞的特异性标志物,主要通过与其配体 VEGF-C、VEGF-D 结合后,促进淋巴内皮细胞的增殖、分化,诱导淋巴管生成,促进肿瘤细胞的侵袭和转移。本实验拟构建靶向 VEGFR-3 基因 siRNA 的表达载体,并探讨这一载体是否能在人结肠癌细胞株 LoVo 细胞中引发 RNAi 效应,观察其对结肠癌细胞黏附能力和侵袭能力的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人结肠癌 LoVo 细胞株、小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。pSUPER 质粒由荷兰莱顿大学医学中心人类遗传学系 Yvonne D Krom 教授惠赠。DH5a 大肠杆菌、HindⅢ和 BglⅡ限制性内切酶、T4DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、RNA Extraction Kit 购自 TaKaRa 公司(中国),质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生工公司, RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物制品有限公司,脂质体 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司, TaKaRa One Step RNA PCR Kit 购自 TaKaRa 公司(中国),兔抗人 VEGFR-3 多克隆抗体、羊抗兔生物素标记二抗为 Sigma 公司产品,鼠抗人 β -actin 抗体、HRP 标记羊抗鼠抗体 IgG2 为 Caltag 公司产品, SABC、DAB 显色试剂盒均为武汉博士德公司产品, Matrigel 为 BD 公司产品。

1.2 VEGFR-3 siRNA 表达载体的构建

(1) VEGFR-3 基因寡核苷酸链的设计:采用文献[2]报道有效序列 5' CGGGAGGTGTGTATAGATG3' 作为靶序列。另设计了可形成发夹结构短链 RNA 的对照序列,此序列的 19 个核苷酸与靶序列碱基组成相同,但是顺序不同,以此作为阴性对照组。寡核苷酸序列由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成。(2) siRNA 表达载体的构建:按照文献[2]构建重组质粒 pSU-siRNA 和阴性对照质粒 pSU-SCR。

1.3 LoVo 细胞的培养及转染

LoVo 细胞采用含 100 ml/L 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 °C、5% CO₂ 孵箱内培养,每 3 d 更换培养液,细胞长满时用 2.5 g/L 胰酶消化传代。将生长良好、处于对数生长期的细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板,等细胞融合达 80% ~ 90% 时,参照 Lipofectamine2000 使用说明书进行转染。实验分为以下 3 组:(1)空白对照组;未经任何处理的大肠癌细胞;(2)转染 SCR 组,非特异性对照组;(3) siRNA 组,转染后于不同时间收获细胞,进行以下实验。

1.4 RT-PCR 检测转染后 LoVo 细胞 VEGFR-3 的表达水平

于转染 24、48、72、96、120 h 后,收获各组细胞 1×10^6 个,按 TRIzol 的操作说明提取总 RNA,按反转录试剂盒操作方法获得单链 cDNA,以此为底物用 PCR 检测 VEGFR-3 的表达。VEGFR-3 上游引物 5' AGCCATTCATCAACAAGCCT3', 下游引物 5' GGCAACAGCTGGATGTCATA 3'(扩增片段长度为 298 bp);内参照 β -actin 上游引物 5' CCAAGGC-CAACCGCGAGAAGATGAC3', 下游引物 5' AGGG-TACATGGTGGTGCCGCCAGAC3'(扩增片段长度为 587 bp), PCR 引物均由捷瑞生物工程(上海)有限公司合成。扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳, YLN-2000 凝胶成像分析系统测定各条带的光密度值(D),每个条带测定 10 次。

1.5 Western blotting 检测 LoVo 细胞 VEGFR-3 蛋白表达的变化

分别取转染 72 h 后各组细胞,冰 PBS 漂洗 2 次,立即加入 500 μ l/孔裂解缓冲液,静置 30 min,收集细胞,4 °C、12 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清考马斯亮蓝测定总蛋白浓度。取 50 μ g 蛋白进行 7.5% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,按预染蛋白相对分子质量标志物标记,切取相对分子质量在 120 000 ~ 215 000 和 36 000 ~ 47 000 之间的凝胶,电转移至醋酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭。转移上 120 000 ~ 215 000 之间蛋白的醋酸纤维素膜加入 1:100 稀释的兔抗人 VEGFR-3(180 000)多克隆抗体,1:200 稀释的羊抗兔生物素标记抗体和 SABC 孵育;转移上 36 000 ~ 47 000 之间蛋白的醋酸纤维素膜加入 1:400 稀释的鼠抗人 β -actin(42 000)抗体、1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠抗体,洗膜后 DAB 显色。

1.6 基质-黏附实验检测 VEGFR-3 siRNA 对 LoVo 细胞黏附能力的影响

以无血清 RPMI 1640 培养液稀释 Matrigel 至 100 μ g/L,按 50 μ l/孔加入 96 孔细胞培养板,置于

超净台过夜风干,临用前按 100 μ l/孔加入无血清 RPMI 1640 培养液,室温静置 90 min 后吸取液体以除去未结合的 Matrigel。使用转染后 72 h 的各组细胞制备成个 3×10^7 个/L 的细胞悬液,按每孔 100 μ l 加入黏附系统,每组设 5 个复孔;对照组加入等量未经处理过的细胞,37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 孵箱培养 2 h, PBS 洗去未黏附的细胞,按 100 μ l/每孔加入 5 g/L 结晶紫染色,染色 10 min。用 PBS 洗涤,37 $^{\circ}$ C 干燥。按 100 μ l/孔加入 10 ml/L 醋酸乙醇溶液,混合后静置 10 min。酶标仪 570 nm 测量光密度值 (D),表示细胞-基质黏附能力。

1.7 小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞的培养

NIH3T3 细胞采用无血清 RPMI 1640 培养液于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 孵箱内培养,每 3 d 更换培养液,细胞长满时用 2.5 g/L 胰酶消化传代。

1.8 细胞体外侵袭实验

转染 LoVo 细胞 72 h,用 2 g/L 胰蛋白酶消化、收集,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^9 /L。将 Millicell 培养小室(直径 8 μ m,装有聚碳酸酯微孔膜,附有人工基质 Matrigel)放入 24 孔板中,各取细胞悬液 200 μ l 加入 Millicell 小室,在小室的下室加入 400 μ l 无血清培养 24 h 的小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞上清液,每处理组各设 3 个复孔。培养 8 h 后取出小室,用棉签轻擦净小室内的细胞,并小心切取微孔膜,95% 酒精固定,苏木精伊红染色。随机于 400 倍显微镜下取上、下、左、右、中心共 5 个视野计数穿膜细胞数,取各视野的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.9 统计学处理

用 SPSS10.0 统计学软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 psiRNA- VEGFR-3 表达载体的成功构建

合成的 64 nt 寡核苷酸退火后,将其插入 *Hind* III 和 *Bgl* II 双酶切后的 pSUPER 载体,该载体原有的 *Bgl* II 酶切位点被破坏。酶切鉴定结果显示:空 pSUPER 载体被 *Bgl* II 单酶切成线形质粒,阳性重组质粒 siRNA 和 SCR 不能被 *Bgl* II 酶切(图 1),DNA 测序结果也证实重组质粒中已插入目的片段,构建 psiRNA-VEGFR-3 表达载体成功。

2.2 转染后 LoVo 细胞 VEGFR-3 mRNA 表达的变化

RT-PCR 检测结果显示,空白对照组、非特异性对照组 VEGFR-3 mRNA 表达差异无统计学意义。

转染 siRNA 组细胞的 VEGFR-3 mRNA 表达则明显下降,转染后 24、48、72、96、120 h,VEGFR-3 mRNA 较空白对照组细胞分别下降了(28.15 \pm 1.98)%、(85.76 \pm 0.46)%、(79.46 \pm 0.59)%、(45.31 \pm 2.04)%、0%,转染后 48 ~ 72 h 下降最多,转染后 120 h 已没有 mRNA 表达的抑制(图 2)。

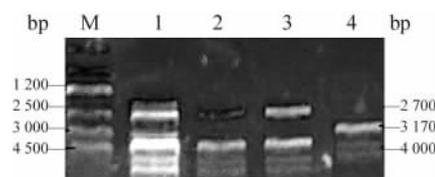


图 1 重组质粒酶切鉴定图

Fig. 1 Identification of recombinant vectors by endonucleases

M:Marker; 1:pSUPER empty plasmid; 2:pSU-siRNA; 3:pSU-SCR;4:pSUPER was *Bgl* II digestion into a single line

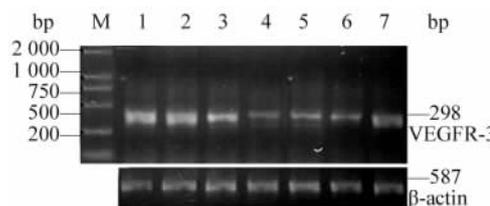


图 2 转染后 LoVo 细胞 VEGFR-3 mRNA 的表达

Fig. 2 Detection of VEGFR-3 mRNA in LoVo cells

M:Marker; 1: Control group;2: Non-specific control group; 3:24 h after transfection;4:48 h after transfection; 5:72 h after transfection;6:96 h after transfection; 7:120 h after transfection.

2.3 各组细胞 VEGFR-3 蛋白表达的变化

Western blotting 检测结果显示,空白对照组、非特异性对照组 VEGFR-3 蛋白表达无明显差异。转染 siRNA 72 h 后,LoVo 细胞的 VEGFR-3 蛋白表达则明显下降,其表达的相对值由(1.26 \pm 0.19)降至(0.39 \pm 0.12) ($P < 0.05$,图 3)。

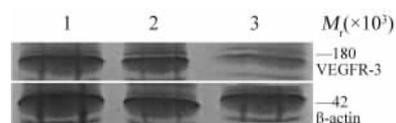


图 3 LoVo 细胞 VEGFR-3 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of VEGFR-3 protein in LoVo cells

1: Control group; 2: Non-specific control group; 3: LoVo cells 72 h after transfection with siRNA

2.4 VEGFR-3 siRNA 对 LoVo 细胞黏附能力的抑制

基质-黏附实验检测结果显示,空白对照组、非

特异性对照组平均光密度值 D 分别为(0.626 ± 0.047)和(0.621 ± 0.068), 细胞黏附能力无明显差异。转染 siRNA 72 h 后, LoVo 细胞的平均光密度值 D 为(0.407 ± 0.029), 低于空白对照组和非特异性对照组, 与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 VEGFR-3 siRNA 对 LoVo 细胞侵袭能力的抑制

细胞体外侵袭实验显示, 3 组细胞均能穿过附有 Matrigel 胶的滤膜, 空白对照组、非特异性对照组和转染 siRNA 组的穿膜细胞数分别为(24.82 ± 3.44), (23.58 ± 3.73)和(6.38 ± 3.25)。转染 siRNA 72 h 后, LoVo 细胞穿膜细胞数明显低于空白对照组、非特异性对照组($P < 0.05$), 而空白对照组和非特异性对照组之间细胞数目无明显差异(图 4)。

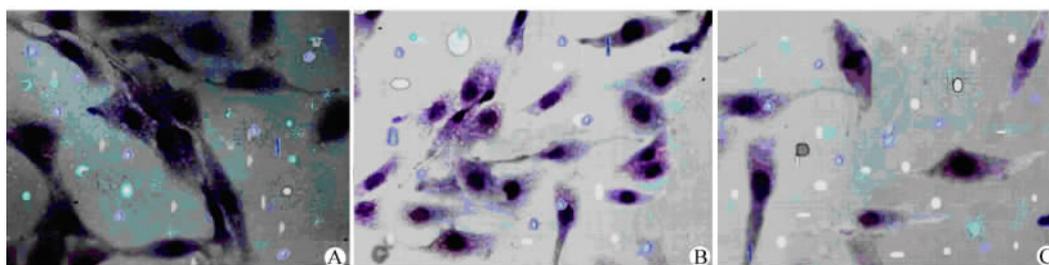


图 4 siRNA 转染对 LoVo 细胞侵袭能力的影响(H-E, $\times 400$)

Fig. 4 Effect of siRNA on LoVo cells invasion (H-E, $\times 400$)

A :Control group; B: Non-specific control group; C: Experimental group

3 讨 论

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要生物学特征, 是导致手术、放疗、化疗等手段失败和患者死亡的最主要原因。肿瘤的侵袭和转移是一个极其复杂、多步骤的过程。主要包括: 癌细胞从原发部位脱落, 结合并降解基底膜; 癌细胞侵入血管、淋巴管; 癌细胞在循环中运行和滞留, 最后穿出血管、淋巴管并增殖形成转移灶。VEGFR-3 是 VEGF 家族成员 VEGF-C 的受体, 是第 1 个被发现的淋巴管内皮标志物, 特异地表达于淋巴管内皮细胞, 亦表达于某些血管内皮^[3]。现有研究表明, VEGFR-3 在多数肿瘤细胞上也有相应表达^[4,5], VEGF-C/VEGFR-3 在肿瘤周边的新生淋巴管内皮细胞呈高表达, 与肿瘤的淋巴结转移呈高度相关^[6]。研究发现, VEGF-C 通过受体 VEGFR-3 的信号转导诱导淋巴管生成, 促进肿瘤的侵袭和淋巴转移^[4], 阻断 VEGF-C 的受体 VEGFR-3 的信号转导可抑制肿瘤的淋巴管生成和淋巴结转移, 而对其他现有的淋巴管功能无任何影响^[7]。VEGF-C 与 VEGFR-3 结合, 引起 VEGFR-3 自身磷酸化, 通过 PI3K 引起 AKT 的 Ser473、Thr308 磷酸化, 激活 PI3K/AKT(磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B)信号转导通路。PI3K/AKT 信号转导通路广泛存在于细胞中, 是参与调节细胞生长、增殖、分化的信号转导通路。近年来研究表明, PI3K/AKT 信号转

导通路在恶性肿瘤的增殖、血管新生和侵袭转移中起着重要作用。PI3K/AKT 信号转导通路促进恶性肿瘤转移的机制主要为: 增加肿瘤细胞的运动能力、对生长因子受体的调节、降低细胞间的黏附力^[8]、对细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的影响、增加核转录因子的活性使基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2), 基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)产量增加, 使组织降解, 有利于细胞转移^[9-10]。研究表明胃癌细胞通过 VEGF-C 与 VEGFR-3 相互作用, 可调节自身生长, 促进增殖、抑制凋亡, 从而具有更高的增殖活性及浸润性^[11]。

siRNA 可以高效、特异地阻断体内同源基因表达, 促使同源 mRNA 降解, 诱使细胞表现出特定基因缺失的表型, 称为 RNA 干扰(RNA interference RNAi)。体外实验证实 siRNA 与反义 RNA 相比, 具有稳定性高、抑制作用强、细胞摄取相对容易等不可比拟的优点^[12], siRNA 较单链反义 DNA、反义 RNA 有更高效率的表达基因抑制效果。与其他基因敲除技术相比, 此项技术具有高效性、高特异性、高稳定性、可传播性和可遗传性的分子生物学特征, 已成为肿瘤基因治疗领域新的热点^[13]。在肿瘤基因治疗中, 通过人工合成靶向特定癌基因的 siRNA 或构建 siRNA 的表达载体, 并将它导入肿瘤细胞中, 可以特异性地抑制目的基因的表达^[14]。

本研究采用 RNA 干扰技术,针对 VEGFR-3 构建了可在体内表达 siRNA 的真核表达载体;设计、合成了 VEGFR-3 编码基因的反向重复序列,通过实验观察到 siRNA 可有效抑制 LoVo 细胞中 VEGFR-3 mRNA 的表达,转染后 48 h 抑制率达到最高,而后抑制率则逐渐下降,转染后 120 h 已没有 VEGFR-3 mRNA 的表达抑制。而 VEGFR-3 蛋白的表达在转染 siRNA 72 h 后明显下降。目前已有的关于 RNAi 的报道表明,外源性的 siRNA 引发的 RNA 干扰仅为短时效应,在绝大多数哺乳动物细胞中转染人工合成的短片段 RNA 后,进行基因抑制检测的高峰时间在转染后的 48 ~ 72 h^[15]。从本实验结果也可以看到,基因抑制基本遵循上述的规律。

本实验结果显示,转染 siRNA 72 h 后 LoVo 细胞黏附能力和侵袭能力明显下降,提示 VEGFR-3 基因表达下调能显著降低 LoVo 细胞的黏附能力和侵袭能力。推测可能是通过降低 LoVo 细胞 VEGFR-3 的表达,继而抑制 VEGFR-3 所介导的 PI3K/AKT 信号通路发挥作用^[16-17]。但其在结肠癌侵袭转移过程中的具体功能仍不清楚,相信随着今后研究的进展,会成为结肠癌侵袭转移的治疗新的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806-811.
- [2] 贾如江,侯丽艳,张有成,等. VEGFR-3 siRNA 体外对人结肠癌细胞生长的抑制作用[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(16):1797-1801.
- [3] Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors[J]. Cancer, 1999, 86(11): 2406-2412.
- [4] van Iterson V, Leidenius M, von Smitten K, *et al.* VEGF-D in association with VEGFR-3 promotes nodal metastasis in human invasive lobular breast cancer[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 128(5): 759-766.
- [5] 张明仪,吴建农,张建新,等. VEGFR-3 在胃癌细胞中表达的意义[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(1): 32-35.
- [6] Roberts N, Kloos B, Cassella M, *et al.* Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2 [J]. Cancer Res, 2006, 66(5): 2650-2657.
- [7] Pytowski B, Goldman J, Persaud K, *et al.* Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody[J]. J Natl Cancer Inst. 2005 ,97(1):14-21.
- [8] Sithanandam G, Smith GT, Masuda A, *et al.* Cell cycle activation in lung adenocarcinoma cells by the ErbB3/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. Carcinogenesis, 2005, 24(10):1581-1592.
- [9] Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(20): 10983-10985.
- [10] Cheng JC, Chou CH, Kuo ML, *et al.* Radiation-enhanced hepatocellular carcinoma cell invasion with MMP-9 expression through PI3K/Akt/NF-kappaB signal transduction pathway[J]. Oncogene, 2006, 25(53): 7009-7018.
- [11] Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(1): 250-256.
- [12] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836):494-498.
- [13] 杨彤涛,李存孝,高杰,等. 靶向 survivin 的 siRNA 对骨肉瘤细胞 MG63 的抑制作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2008,15(2):125-128.
- [14] Bulk E, Hascher A, Liersch R, *et al.* Adjuvant therapy with small hairpin RNA interference prevents non-small cell lung cancer metastasis development in mice[J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1896-1904.
- [15] Carl DN, Michael FM, Derek MD, *et al.* siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection[J]. Nature Med, 2002, 8(7):681-386.
- [16] Tammela T, Petrova TV, Alitalo K. Molecular lymphangiogenesis: new players[J]. Trends Cell Biol, 2005, 15(8): 434-441.
- [17] Su JL, Yang PC, Shih JY, *et al.* The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells[J]. Cancer Cell, 2006, 9(3): 209-223.

[收稿日期] 2008 - 09 - 08

[修回日期] 2008 - 10 - 01

[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358 - 93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X ,也不用 Mean 或 M ;(2)标准差用英文小写 s ,不用 SD;(3)标准误用英文小写 s_x ,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希腊小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希腊小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n ;(10)概率用英文大写 P ;(11)以上符号 \bar{x} 、 s 、 s_x 、 t 、 F 、 χ^2 、 r 、 ν 、 n 、 P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)