

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.011

· 基础研究 ·

靶向 XIAP 的 siRNA 抑制结肠癌 LoVo 细胞体内外的增殖

杜利力^{1*}, 韩春山¹, 于晓丽¹, 程晓峰²(1. 青岛市商业医院 肿瘤内科, 山东 青岛 266001; 2. 青岛市立医院 神经外科, 山东 青岛 266071)

[摘要] 目的:研究 siRNA 干扰 X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)基因表达对结肠癌细胞 LoVo 体内外增殖的影响。方法:构建 XIAP 真核表达干扰载体 pSil2.1-shXIAP1 和 pSil2.1-shXIAP2,脂质体转染结肠癌细胞株 LoVo, G418 筛选出稳定转染 LoVo-shXIAP2 细胞。RT-PCR 和 Western blotting 方法检测 XIAP mRNA 和蛋白的表达。MTT 法和平板克隆形成实验检测 LoVo 细胞的增殖;流式细胞仪检测细胞的凋亡;裸鼠移植瘤模型观察 XIAP 表达下调对结肠癌体内增殖活性的影响。结果:LoVo-shXIAP2 细胞中 XIAP mRNA 和蛋白表达水平均显著下调。相对于对照组细胞,LoVo-shXIAP2 细胞的增殖和克隆形成率显著降低($P < 0.01$),凋亡率显著增加($P < 0.01$)。LoVo-shXIAP2 移植瘤组织中 XIAP 蛋白表达明显下调,LoVo-shXIAP2 移植瘤生长显著抑制(均 $P < 0.05$)。结论:pSil2.1-shXIAP2 能够抑制结肠癌 LoVo 细胞中 XIAP 蛋白的表达,抑制 LoVo 细胞体内外的增殖,有望成为结肠癌免疫治疗的新手段。

[关键词] 结肠癌;RNA 干扰;X 连锁凋亡抑制蛋白;增殖;凋亡

[中图分类号] R735.3⁺5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0479-05

XIAP-targeting siRNA inhibits proliferation of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*

DU Li-li^{1*}, HAN Chun-shan¹, YU Xiao-li¹, CHENG Xiao-feng²(1. Department of Oncology, Qingdao Commercial Hospital, Qingdao 266071, Shandong, China; 2. Department of Neurosurgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266001, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein)-targeting siRNA on the proliferation of LoVo colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The XIAP-targeting siRNA pSil2.1-shXIAP1 and pSil2.1-shXIAP2 eukaryotic vectors were constructed and were transfected into LoVo cells using Lipofectamine; the stable transfectants LoVo-shXIAP2 were selected by G418. The expressions of XIAP mRNA and protein were determined by RT-PCR and Western blotting. The proliferation of LoVo cells was determined by MTT and colony formation assay. Cell apoptosis was examined by FCM. The influence of XIAP knockdown on the proliferation of LoVo cells *in vivo* was observed in LoVo-bearing nude mice. **Results:** The expressions of XIAP mRNA and protein in LoVo-shXIAP2 cells were significantly down-regulated in LoVo-shXIAP2 cells. Compared with un-transfected LoVo cells, the proliferation and colony formation abilities of LoVo-shXIAP2 cells were significantly inhibited ($P < 0.05$); the apoptosis rate of LoVo-shXIAP2 cells was significantly increased ($P < 0.05$). The expression of XIAP protein in LoVo-shXIAP2 implanted tumors was down-regulated and the growth of tumors was significantly inhibited (all $P < 0.05$). **Conclusion:** pSil2.1-shXIAP2 plasmid can down-regulate the expression of XIAP in LoVo cells and inhibit proliferation of LoVo cells *in vitro* and *in vivo*, making XIAP-targeting siRNA a potential new agent in immune therapy of colorectal cancer.

[Key words] colorectal cancer; RNA interference; XIAP; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(5): 479-483]

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病率占胃肠道肿瘤的第3位。尽管该病在早期诊断和临床治疗上取得了很大进步,但在全世界每年仍然有超过52 000例结肠癌患者死亡,占全部肿瘤死亡人数的10%^[1]。因此,深入研究结肠癌发生、发展的分子机制,有助于结肠癌临床治疗的改进。凋亡抑制

蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)是一类在结构上具有同源性的凋亡抑制蛋白,通过抑制

[作者简介] 杜利力(1963-),女,山东青岛人,副主任医师,主要从事消化系统肿瘤的生物治疗研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: dull_qingdao@yahoo.com.cn

caspase 参与 TNF 等介导的信号转导途径, 发挥抗凋亡作用, 与恶性肿瘤、神经系统病变等密切相关^[2]。X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP) 是 IAPs 家族中最重要的 caspase 抑制物^[3]。XIAP 蛋白在多种肿瘤组织中高表达, 与肿瘤的发生、发展密切相关^[4]。研究^[5]发现 XIAP 在结肠癌组织中高表达, 在临床不同病理分级之间存在显著的表达差异。因此推测 XIAP 基因的高表达可能和结肠癌的发生有着密切的关系, XIAP 有望成为结肠癌的一个新的标志物。然而, XIAP 基因在结肠癌发生、发展过程中的作用并不完全清楚。鉴于此, 本研究拟通过 siRNA 干扰的方法下调结肠癌细胞中 XIAP 基因, 观察 XIAP 表达下调后对结肠癌细胞体内、外增殖的影响, 为结肠癌临床治疗探索新的分子靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、细胞株与小鼠

结肠癌 LoVo 细胞株购于中国科学院上海细胞研究所, 用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基, 置 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。pSilencer2.1-U6neo 质粒、脂质体转染试剂盒(LipofectaminTM 2000 Reagent)、TRIzol 均购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I、T4DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒均为大连 TaKaRa 生物公司产品。质粒小抽提试剂盒、柱离心式胶回收试剂盒均购自美国 Promega 公司。小牛血清、DMEM 培养基购于 Gibco 公司。四甲基偶氮唑盐(MTT) 购于 Sigma 公司。XIAP 的一抗为美国 Millipore 公司产品, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自北京中杉生物公司。PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成。实验用裸鼠(雌雄各半, 4~6 周龄, 25~30 g) 购于山东大学医学院动物研究所(鲁动质字: 200001031), 并在无菌、恒温、恒湿(45%~50%) 的 SPF 层流罩中饲养, 所有饲料、饮用水及垫料经高压灭菌处理。

1.2 构建针对 XIAP 基因的真核表达干扰载体

利用 siRNA 设计软件, 从人 XIAP mRNA 编码区(GenBank NM U45880) 的起始密码下游寻找以“AA”二连序列开始的序列, 设计两条长度为 19 碱基的干扰序列 1(shXIAP1) 和 2(shXIAP2), 同时设计非特异性对照序列 non-specific shRNA(NS), 人工合成以上寡核苷酸 DNA 单链, 并退火成双链, 然后与线性化质粒 pSilencer2.1-U6neo 连接, 重组载体转化感受态大肠杆菌 JM109, 在含 Amp 抗性的 LB 培养液中培养过夜, 提取质粒。阳性克隆质粒用

*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切分析, 并送上海生工生物技术公司进行测序, 验证序列的正确性。

1.3 细胞转染与稳定筛选

细胞转染前 24 h, 将对数生长期的 LoVo 细胞接种于 6 孔板中, 待贴壁细胞达 90% 融合度后进行质粒转染。转染按 LipofectaminTM 2000 脂质体说明书进行操作。转染 48 h 后, 加入 600 μg/ml 质量浓度的 G418, 筛选 14 d 后, 以 400 μg/ml 质量浓度的 G418 维持、扩增细胞。

1.4 RT-PCR 检测 XIAP mRNA 的表达

使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA 并进行逆转录反应。PCR 引物, XIAP: 5'-GGCCATCTGAGACACATG-CAG-3'(上游), 5'-GCATTCAGTAGATCTGCAACC-3'(下游), 扩增产物 281 bp; 内参 GAPDH: 5'-GAAGGT-GAAGGTCGGAGTC-3'(上游); 5'-GAAGATGCTGATGG-GATTT-3'(下游), 扩增产物 226 bp。PCR 条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s; 57 °C 30 s; 72 °C 1 min(循环 30 次)。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 Western blotting 检测 XIAP 蛋白的表达

取各组细胞 6 × 10⁶ 个, PBS 洗涤后, 提取胞质蛋白, BCA 法蛋白定量, 与等体积的 2 × SDS 上样缓冲液混合。每泳道 50 μg 蛋白上样进行 SDS-PAGE, 电转移至硝酸纤维素膜后封闭, XIAP 单克隆抗体(1:500 稀释)和 GAPDH 单克隆抗体(1:500 稀释) 4 °C 孵育过夜, 洗涤后, 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000 稀释)室温孵育 3 h, ECL 检测、曝光和显影。

1.6 MTT 法检测 LoVo 细胞的增殖

按 150 μl/孔(1 × 10⁴ 个未转染的或者稳定转染的 LoVo 细胞)接种于 96 孔培养板内, 每组 3 个复孔。加入无血清培养液 12 h, 使细胞同步化。更换含 10% 胎牛血清的培养液, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 72 h。每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μl, 继续培养 4 h, 弃培养液, 加入 150 μl 的 DMSO, 酶联免疫检测仪检测各孔 D 值, 检测波长 490 nm, 连续观察 5 d, 记录并绘制细胞生长曲线。

1.7 平板克隆形成实验检测细胞的克隆形成能力

将未转染的或者稳定转染的 LoVo 细胞 1 × 10⁷ 个接种于 35cm 平皿中, 置 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的环境下培养 2~3 周。当培养皿中出现肉眼可见的克隆时终止培养。弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次。加纯甲醇固定 10 min, 然后去固定液, 加适量结晶紫染色液染 10~30 min, 然后用流水缓慢洗去染色液, 空气干燥。在显微镜(低倍镜)计数大于 10 个细胞的克隆数。

1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡

采用 AnnexinV/PI 双染色法检测细胞凋亡。消化收集各组细胞, PBS 重悬细胞。按照试剂盒说明进行操作, 流式细胞仪进行检测。图中左下象限为细胞碎片组; 右下象限为早期凋亡细胞组; 右上象限为晚期凋亡细胞组; 左上象限为死亡细胞组。连续测定 3 次, 计算各组细胞的平均凋亡率, 凋亡率按照下列公式计算: 凋亡率(%) = (凋亡细胞数/总细胞数) × 100%。

1.9 裸鼠成瘤实验

将未转染的或者稳定转染的 LoVo 细胞以 1×10^7 个/ml 的密度接种, 每只裸鼠皮下 0.5 ml, 每组动物 8 只。每隔 3 d 用游标卡尺测量各组裸鼠瘤体长(a)、宽(b)、高(c), 按下式计算瘤体积: 瘤体积(V) = $\pi/6 \cdot abc$, 并绘制裸鼠肿瘤体积变化曲线图。30 d 后处死动物剖取瘤组织, 提取组织蛋白, Western blotting 检测 XIAP 蛋白表达情况。

1.10 统计学处理

采用统计学软件 SPSS13.0, 采用完全随机分组两因素析因设计与方差分析来比较各组间差异。

2 结果

2.1 XIAP 特异性 shRNA 的序列设计和重组质粒的成功构建

shXIAP1: 正义链, 5'-GATCT TAAGGAAGAAG AATTTGTA7TCAAGAGATACAAAT-TCTTCTTCCTTAAG A-3'; shXIAP2: 正义链, 5'-GATCT GTGGTAGTCCT-GTTTCAGC TTCAAGAGAGCTGAAACAGGACTCCACAG A-3'; Non-specific shRNA(NS): 正义链, 5'-GATCT TTTGCACGTCCGATGGTTG7TCAAGAGACAACC ATCG-GACGTGCAAAAAG A-3'。以上各序列中画横线部分为正义及反义序列, 斜体部分为 shRNA 的 loop 环区序列, 两端的框中为 BamHI 和 HindIII 部分酶切残基, 退火成双链后能够形成酶切位点的黏性末端, 可与线性质粒相应的黏性末端连接。构建好的质粒重组体分别命名为: pSil2.1-shXIAP1, pSil2.1-shXIAP2 以及阴性对照 pSil2.1-NS。稳定转染的 LoVo 细胞株分别命名为: LoVo-shXIAP1, LoVo-shXIAP2 和 LoVo-NS。

2.2 shXIAP 对 XIAP 基因表达的抑制作用

RT-PCR 结果显示: 相对于未转染的 LoVo 细胞, LoVo-shXIAP2 细胞的 XIAP mRNA 表达抑制了(47.8 ± 2.3)%, 而 LoVo-shXIAP1 和 LoVo-NS 细胞的 XIAP mRNA 表达无显著性变化(图 1)。Western blotting 结果显示: 相对于未转染的 LoVo 细胞,

LoVo-shXIAP2 细胞的 XIAP 蛋白表达抑制了(59.3 ± 1.7)%, 而 LoVo-shXIAP1 和 LoVo-NS 细胞的 XIAP 蛋白表达无显著性变化(图 2), 与 RT-PCR 结果一致。因此选择 LoVo-shXIAP2 细胞进行后续实验。

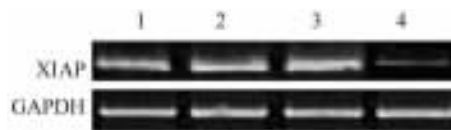


图 1 shRNA 质粒转染后 LoVo 细胞中 XIAP mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of XIAP mRNA in LoVo cells transfected with shRNA Plasmids

1: LoVo; 2: LoVo-NS; 3: LoVo-shXIAP1; 4: LoVo-shXIAP2



图 2 shRNA 质粒转染后 LoVo 细胞中 XIAP 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of XIAP protein in LoVo cells transfected with shRNA plasmids

1: LoVo; 2: LoVo-NS; 3: LoVo-shXIAP1; 4: LoVo-shXIAP2

2.3 shXIAP 抑制 LoVo 细胞的增殖

连续 5 d 测定各组细胞(LoVo, LoVo-NS 和 LoVo-shXIAP2)光密度值, 绘制细胞生长曲线。结果(图 3)显示: 相对于 LoVo 和 LoVo-NS 细胞, LoVo-shXIAP2 细胞增长趋势明显被抑制, 第 5 天时最大抑制率达到(47.3 ± 3.2)%($t = 5.343, P < 0.05$)。14 d 后, 在显微镜下(低倍镜)计数大于 10 个细胞的克隆数, 结果显示: LoVo-shXIAP2 细胞平均克隆形成数为 343 ± 26 , 而 LoVo 和 LoVo-NS 细胞平均克隆形成数分别为 893 ± 43 和 811 ± 34 , 说明 shXIAP2 明显抑制 LoVo 细胞的克隆形成($P < 0.01$)。

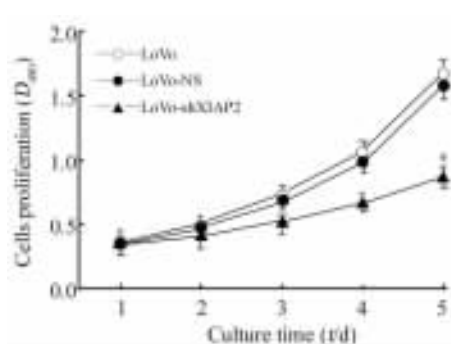


图 3 shXIAP2 抑制 LoVo 细胞的增殖

Fig. 3 shXIAP2 inhibited proliferation of LoVo cells

* $P < 0.05$ vs LoVo or LoVo-NS

2.4 shXIAP 促进 LoVo 细胞的凋亡

如 Annexin V-PI 流式细胞仪检测结果(图 3)所示:LoVo-shXIAP2 细胞凋亡率为(22.3 ± 2.1)% ,而

LoVo 和 LoVo-NS 细胞的凋亡率分别为(4.3 ± 1.2)%和(5.5 ± 0.8)% (均 $P < 0.05$)。

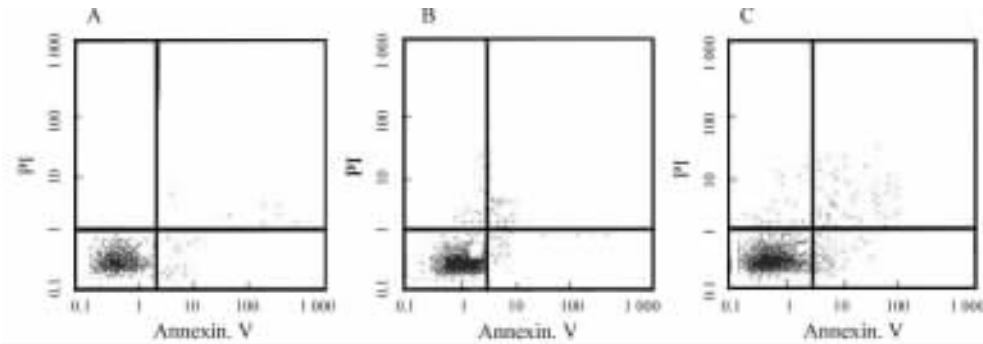


图 4 shXIAP2 促进 LoVo 细胞的凋亡

Fig.4 shXIAP2 increased apoptosis of LoVo cells

A: LoVo cells; B: LoVo-NS cells; C: LoVo-shXIAP2 cells

2.5 shXIAP 对 LoVo 细胞移植瘤增殖活性的抑制

通过裸鼠皮下移植瘤实验分析 XIAP 表达下调对 LoVo 细胞体内增殖活性的影响,结果显示,随着时间延长,LoVo-shXIAP2 组移植瘤生长速度明显慢于 LoVo 和 LoVo-NS 组。30 d 后处死动物,分离瘤体组织并测量体积,结果显示:LoVo-shXIAP2 组移植瘤的平均瘤体体积为(261.8 ± 28)mm³,而 LoVo 和 LoVo-NS 组移植瘤的平均瘤体体积分别为(468.8 ± 16)mm³和(433.7 ± 19)mm³(图 5B)。提示 XIAP 表达下调能够显著抑制 LoVo 细胞移植瘤的增殖。瘤体组织进行 Western blotting 检测 XIAP 蛋白的表达,结果显示:相对于对照组,LoVo-shXIAP2 细胞移植瘤组织 XIAP 蛋白显著被抑制,抑制率为(65.7 ± 4.4)% (图 5A)。

癌、乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌等,并且其表达水平和肿瘤的侵袭性、放化疗抗性密切相关^[9-12]。虽然 XIAP 在结肠癌中高表达,但其功能并不完全清楚。本课题通过干扰 XIAP 表达观察其对结肠癌细胞体内、外增殖的影响,进一步探讨 XIAP 在结肠癌发生、发展过程中的作用。

3 讨论

IAPs 是一类在结构上具有同源性的凋亡抑制蛋白,主要包括 survivin、Livin、c-IAP1、c-IAP2、XIAP 等^[6]。IAP 家族蛋白分子主要有 3 种结构域:即杆状病毒 IAP 重复序列(baculoviral IAP repeats, BIR)、RING 和 CARD 结构域,其中 BIR 序列为 IAP 抑制细胞凋亡所必需的,也是所有 IAP 家族蛋白共有的结构域^[7]。IAPs 是内源性半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶(caspase)抑制物,与细胞的凋亡密切相关。其中 XIAP 蛋白是 IAPs 家族中最强的 caspase 抑制物,也是分子结构研究得最清楚的 IAPs 家族成员^[8]。XIAP 的抗凋亡作用是通过结合并抑制 caspase-3、caspase-7 和 caspase-9 活性而实现的。目前已经证实,XIAP 在多种肿瘤组织中高表达,包括肝细胞肝

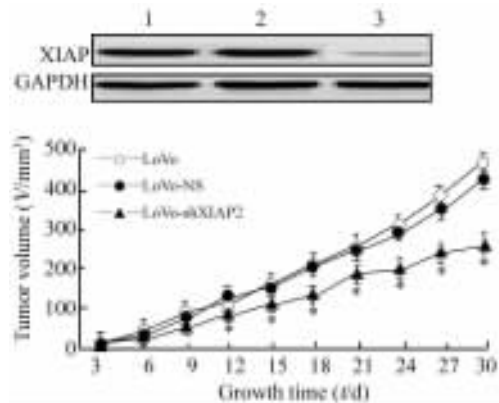


图 5 shXIAP2 抑制 LoVo 细胞的体内增殖

Fig.5 shXIAP2 inhibited proliferation of LoVo cells *in vivo*

A: XIAP expression in LoVo-shXIAP2 implanted tumors
1: LoVo; 2: LoVo-NS; 3: LoVo-shXIAP2.

B: shXIAP2 inhibited the proliferation of LoVo cells

* $P < 0.05$ vs LoVo or LoVo-NS

RNA 干扰是一种由双链 RNA 诱发的基因沉默技术,是近年来发展起来的一项用于基因表达、调控相关研究的新技术,已经广泛应用于新基因功能研究和信号转导通路的研究^[13-18]。相对于传统的反义核酸技术,RNA 干扰技术具有稳定性好、特异性

强、细胞毒性低以及作用更持久等众多优点,因此使得其成为病毒性疾病和肿瘤等研究领域的热点^[19]。研究^[20-24]表明 RNA 干扰技术可特异地封闭癌基因、凋亡相关基因及放化疗抗性基因,从而达到抑制肿瘤的目的。因此, RNA 干扰与其他疗法如化疗、放疗和免疫治疗等结合,有望为肿瘤的治疗开辟一条新的途径和模式。

本研究采取 RNA 干扰的方法,以 XIAP 为靶点,构建 shRNA 质粒表达载体从而特异性地下调 XIAP 的表达。为了获得理想和可靠的结果,本研究筛选了稳定表达 shXIAP 的结肠癌细胞株用于功能性分析和检测,避免由于转染效率带来的实验误差。另外,针对 XIAP 基因构建了 2 个质粒干扰载体,只有 pSil2.1-shXIAP2 能够显著下调 XIAP 蛋白的表达,而 pSil2.1-shXIAP1 则无影响。通过 RT-PCR 和 Western blotting 检测, XIAP mRNA 和蛋白表达分别被下调了(47.8 ± 2.3)% 和 (59.3 ± 1.7)% ,表明了 shRNA 表达载体是干扰 XIAP 表达的有效手段。通过 MTT 和平板克隆形成试验,发现 XIAP 表达下调可显著抑制结肠癌细胞的增殖和克隆形成。同时稳定表达 LoVo-shXIAP2 细胞的凋亡率显著增加。裸鼠皮下移植瘤实验进一步表明: shXIAP2 介导的 XIAP 表达下调能够显著降低结肠癌细胞体内成瘤能力。本研究结果提示, XIAP 基因有望成为结肠癌生物治疗的一个新靶点,同时为联合应用化疗、放疗治疗临床中晚期结肠癌提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2006 [J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.
- [2] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins: suppressors of apoptosis [J]. Genes Dev, 1999, 13(3): 239-252.
- [3] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, *et al.* X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases [J]. Nature, 1997, 388(6639): 300-304.
- [4] 王 翔, 高文信. XIAP 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 口腔医学杂志, 2005, 21(3): 338-340.
- [5] 李 斌, 张阳德, 田步宁. 结肠直肠癌组织中 XIAP 的表达及其意义 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(11): 1746-1748.
- [6] Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice [J]. Cancer Res, 2004, 64(20): 7183-7190.
- [7] Miller L. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs [J]. Trends Cell Biol, 1999, 9(8): 323-328.
- [8] Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, *et al.* A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases [J]. J Biol Chem, 1998, 273(14): 7787-7790.
- [9] Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka Y, *et al.* Overexpression of X-linked inhibitor of apoptosis in human hepatocellular carcinoma [J]. Int J Mol Med, 2003, 12(5): 705-708.
- [10] Shi Z, Liang YJ, Chen ZS, *et al.* Overexpression of Survivin and XIAP in MDR cancer cells unrelated to P-glycoprotein [J]. Oncol Rep, 2007, 17(4): 9699-9676.
- [11] Burstein DE, Idrees MT, Li G, *et al.* Immunohistochemical detection of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in cervical squamous intraepithelial neoplasia and squamous carcinoma [J]. Ann Diagn Pathol, 2008, 12(2): 85-89.
- [12] Krajewska M, Krajewski S, Banares S, *et al.* Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostate cancer [J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(13): 4914-4925.
- [13] 杨安安. RNA 干扰技术在基础医学中的研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2008, 4(2): 32-34.
- [14] Dykxhoom DM. RNA interference as an anticancer therapy: a patent perspective [J]. Expert Opin Ther Pat, 2009, 19(4): 475-491.
- [15] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(10): 850-862.
- [16] Hokaiwado N, Takeshita F, Banas A, *et al.* RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics [J]. IDrugs, 2008, 11(4): 274-278.
- [17] Aigner A. Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies *in vivo* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2007, 76(1): 9-21.
- [18] Cejka D, Losert D, Wacheck V. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic [J]? Clin Sci, 2006, 110(1): 47-58.
- [19] Bass BL. Double-stranded RNA as a temp late for gene silencing [J]. Cell, 2000, 101(3): 235-238.
- [20] 胡亚华, 陈维进, 候晓华. RNAi 及其抗肿瘤应用研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2007, 15(1): 98-101.
- [21] 赵小强, 孙 玲, 刘小转, 等. c-myc 特异性 siRNA 对 HL-60 细胞作用的研究 [J]. 肿瘤基础与临床, 2006, 19(2): 90-92.
- [22] Li GH, Wei H, Chen ZT, *et al.* STAT3 silencing with lentivirus inhibits growth and induces apoptosis and differentiation of U251 cells [J]. J Neurooncol, 2009, 91(2): 165-174.
- [23] Zhao P, Zhang Y, Sun M, *et al.* Reversion of multidrug resistance in human glioma by RNA interference [J]. Neurol Res. 2008, 30(6): 562-566.
- [24] Lazzarini R, Moretti S, Orecchia S, *et al.* Enhanced antitumor therapy by inhibition of p21waf1 in human malignant mesothelioma [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5099-5107.

[收稿日期] 2009 - 07 - 12

[修回日期] 2009 - 08 - 27

[本文编辑] 徐红梅