

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.010

· 基础研究 ·

RNAi 沉默 hTERT 基因诱导大肠癌 SW480 细胞凋亡

蔡艳玲¹, 罗小玲¹, 葛连英², 刘爱群², 谢裕安¹(1. 广西医科大学 附属肿瘤医院 生物治疗科, 广西壮族自治区 南宁 530021; 2. 广西医科大学 附属肿瘤医院 内镜室, 广西壮族自治区 南宁 530021)

[摘要] 目的: 探讨 RNA 干扰人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的表达对大肠癌细胞 SW480 凋亡的影响。方法: 构建携带 hTERT 小发夹干扰 RNA(small hairpin RNA, shRNA)的重组表达载体 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA(简称 hTERT-shRNA 质粒), 脂质体法转染 SW480 细胞, RT-PCR 法检测不同转染时间点 SW480 细胞中 hTERT mRNA 的表达。TRAP-PCR-ELISA 法检测转染后 48 h SW480 细胞的端粒酶活性, 透射电镜观察转染后 48 h SW480 细胞超微结构。结果: hTERT-shRNA 质粒转染 48 h 时, hTERT-shRNA 组 SW480 细胞 hTERT mRNA 表达的抑制率显著高于空白组、脂质体组、NC-shRNA 组(75.0% vs 39.2%、33.3%、28.0%, $P < 0.05$)。hTERT-shRNA 转染组 SW480 细胞端粒酶活性显著低于空白组、脂质体组、NC-shRNA 组(2.242 ± 0.285 vs 2.756 ± 0.089 、 2.693 ± 0.225 、 2.691 ± 0.120 , $P < 0.05$)。hTERT-shRNA 质粒转染后的 SW480 细胞体积明显缩小、细胞核固缩、染色质不均匀地沿核膜下聚集、空泡形成增多, 出现典型的凋亡形态。结论: RNAi 可有效沉默 SW480 细胞中 hTERT 的表达, 降低 SW480 细胞端粒酶活性, 诱导 SW480 细胞凋亡。

[关键词] RNA 干扰; 大肠癌; hTERT; 端粒酶; 凋亡

[中图分类号] R735.3⁺4; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)01-0046-05

RNA interference-based hTERT gene silence induces apoptosis of colorectal cancer SW480 cells

CAI Yan-ling¹, LUO Xiao-ling¹, GE Lian-ying², LIU Ai-qun², XIE Yu-an¹(1. Department of Biological Therapy, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxizhuang Autonomous Region, China; 2. Endoscopic Room, Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxizhuang Autonomous Region, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of RNA-mediated interference of hTERT (human telomerase reverse transcriptase) expression on the apoptosis of colorectal cancer cell line SW480. **Methods:** Small hairpin RNA (shRNA) targeting hTERT was synthesized and recombinant plasmid pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA (named hTERT-shRNA plasmid) containing hTERT-shRNA was constructed. SW480 cells were transfected with hTERT-shRNA plasmid by liposome method, and the expression of hTERT mRNA in SW480 cells was detected by RT-PCR analysis at different time points. The telomerase activity of SW480 cells was examined by TRAP-PCR-ELISA analysis. The ultrastructure of SW480 cells was examined by TEM (transparent electron microscope) 48 h after hTERT-shRNA transfection. **Results:** The inhibitory rate of hTERT mRNA expression in SW480 cells of hTERT-shRNA group was significantly higher than those of blank group, liposome group, and NC-shRNA group (75.0% vs 39.2%, 33.3%, 28.0%, $P < 0.05$). Telomerase activity in SW480 cells of hTERT-shRNA group was significantly decreased compared with those of blank group, liposome group, and NC-shRNA group (2.242 ± 0.285 vs 2.756 ± 0.089 , 2.693 ± 0.225 , 2.691 ± 0.120 , $P < 0.05$). SW480 cells in hTERT-shRNA group showed smaller cell size, nuclear condensation, uneven aggregation of chromatin along the nuclear membrane, and increased vacuolization. **Conclusion:** RNA interference can effectively silence hTERT expression, reduce

[基金项目] 广西自然科学基金资助项目(No. 2010GXNSFA013238); 广西卫生厅重点课题(No. Z200971)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guangxi (No. 2010GXNSFA013238), and the Key Science Foundation of Health Bureau of Guangxi (No. Z200971)

[作者简介] 蔡艳玲(1982-), 女, 黑龙江人, 硕士, 主要从肿瘤分子生物学研究。E-mail: cylvcomeon@yahoo.com.cn

[通信作者] 葛连英(GE Lian-ying, corresponding author), E-mail: gelianying@hotmail.com

[网络出版] 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1120.016.html>

telomerase activity, and induce apoptosis of SW480 cells.

[**Key words**] RNA interference; colon cancer; hTERT; telomerase; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 46-50]

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤之一,在欧美国家居恶性肿瘤死因的第2位^[1-2]。在我国,随着饮食结构、生活习惯和环境的改变,其发病率逐年上升^[3],严重地危害着人们的身体健康。50%左右大肠癌患者死于转移和复发,因此迫切地需要寻求新的有效的治疗方法。端粒酶已被公认为已知的最广谱的肿瘤标志物之一,在多种肿瘤中均有不同程度的表达^[4]。端粒酶全酶由端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR)、端粒酶相关蛋白(telomerase related protein, TPI)和人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)三部分组成。hTR 和 TPI 在正常组织和肿瘤组织均有表达,与端粒酶活性无相关性,而 hTERT 则伴随着细胞永生过程中端粒酶激活而表达的,其激活对端粒酶来说是一个限速步骤^[5]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术为肿瘤的分子生物治疗开辟了新的途径^[6]。本研究通过 RNAi 技术,以高表达端粒酶活性的人大肠癌 SW480 细胞株为研究对象,构建携带 hTERT 基因的 shRNA 真核表达载体 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA,观察转染后 SW480 细胞内 hTERT mRNA 表达、端粒酶活性和 SW480 细胞的凋亡情况,探讨 hTERT 基因作为大肠癌基因靶向治疗的潜在价值。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠癌 SW480 细胞株购自上海细胞库,大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存,L-15 培养基和胎牛血清为美国 Gibco 公司产品。PCR-TRAT-ELISA 端粒酶活性检测试剂盒为德国 Roche 公司产品,TRIzol 购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自 MBI 公司。限制性内切酶(*Bam*H I, *Pst* I, *Bbs* I)及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司,Lambda/Eco130I marker 购自 MBI 公司,质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 公司。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所。

1.2 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 真核表达载体的构建

针对人 hTERT 基因的 mRNA 为 Gene bank: NM-198253.2,按照 Tuschl 原则设计^[7],由吉玛公司设计合成,化学合成 3 条靶向 hTERT 基因的 siR-

NA,转染大肠癌细胞 SW480,48 h 后采用 RT-PCR 方法筛选出一条对 hTERT mRNA 有明显抑制作用 siRNA。将筛选出的 siRNA 设计并合成 shRNA 寡核苷酸片段(hTERT-shRNA),同时设置无义 siRNA 序列(NC-shRNA),分别退火形成双链,并接入线性化质粒载体 pGPU6/GFP/Neo,构建 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA(简称 hTERT-shRNA)和 pGPU6/GFP/Neo-NC-shRNA(简称 NC-shRNA)载体。转化大肠杆菌 DH5 α 后,挑取阳性克隆,按碱裂解法抽提质粒(按说明书进行操作),用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Pst* I 分别酶切鉴定,并委托上海英骏生物技术有限公司进行质粒的序列分析。

1.3 hTERT-shRNA 质粒转染 SW480 细胞

SW480 细胞用含有 10% 小牛血清、100 μ g/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 L-15 培养基,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。当细胞融合度达 80%~90%时,以 0.25% 胰酶消化,将细胞接种至 6 孔板,每孔(3~8) $\times 10^5$ 个细胞,加入适量 L-15 培养液常规培养,当细胞的融合度达到 90% 时开始转染。实验分为 4 个组,即空白组、脂质体组、NC-shRNA 组及 hTERT-shRNA 组,每组设 3 个复孔。转染前 2 h 换无血清、无双抗的 L-15 培养基继续培养,按照脂质体 2000 提供的操作方法进行转染操作。用无血清、无双抗的 L-15 培养基稀释脂质体 2000、NC-shRNA 和 hTERT-shRNA,然后按照质粒 DNA:脂质体 = 1:2.5 的比例混合成转染混合物,室温放置 20 min,再将混合物加入到细胞中,轻轻混匀,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中进行常规培养。

1.4 RT-PCR 法检测 SW480 细胞中 hTERT mRNA 的表达

hTERT 基因的引物(上游为 5'-GCTGCTCAG-GTCTTTCTTTTATG-3',下游引物为 5'-CGACGTAGTCCATGTTACAA-3';扩增片段长 252 bp)和内参照 GAPDH(上游引物为 5'-CTCAGACACCATGGG-GAAGGTGA-3',下游引物为 5'-ATGATCTTGAGGCT-GTTGTCATA-3';扩增片段长 450 bp)由上海生物工程公司合成。分别收集空白组、脂质体组、NC-shRNA 组及 hTERT-shRNA 组的转染后 24、48、72 h 的 SW480 细胞,采用 TRIzol 试剂提取各组各时间段的细胞总 RNA,各取 2 μ g RNA 逆转录 cDNA,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25 μ l,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C

预变性 4 min,94 ℃ 变性 45 s,57 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,进行 30 个循环,72 ℃ 末次延伸 10 min,扩增结束后取产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,每次实验至少重复 3 次。结果用 Quantityone 462 凝胶成像图像分析软件进行相对表达量分析。mRNA 表达相对抑制率(%) = (对照组 - 实验组) / 对照组 × 100%。

1.5 TRAP-PCR-ELISA 法检测 SW480 细胞端粒酶活性

端粒酶重复序列扩增 - 聚合酶链反应 - 酶联免疫吸附实验(telomeric repeat amplification-polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay, TRAP-PCR-ELISA)检测法原理:抽提转染后的细胞蛋白,行 PCR 扩增后,将产物变性,按照试剂盒说明加入地高辛标记的可与扩增产物的重复片段特异结合的探针,杂交产物上的生物素与固定在微孔板上的抗生物素蛋白相结合,而探针上的地高辛与过氧化物酶标记的抗地高辛抗体结合,然后加入底物,显色后用酶标仪测定。在本实验中,分别收集空白组、脂质体组、NC-shRNA 组及 hTERT-shRNA 组转染 48 h 后的 SW480 细胞,每组取约 5×10^6 培养细胞,1 000 × g 离心 10 min,细胞沉淀加入裂解液,提取细胞的核蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量。稀释各组蛋白浓度至 5 mg/ml,按照 PCR-TRAT-ELISA 试剂盒的说明进行端粒酶活性检测。酶标仪检测 D 值

代表端粒酶活性强度, $D = \text{端粒酶 } D_{450} - \text{端粒酶 } D_{630}$ 。

1.6 透射电镜观察转染后 SW480 细胞的超微结构

收集转染后 48 h 的 SW480 细胞于 10 ml 离心管中,加入 4 ℃ 预冷的 PBS,并用吸管轻轻吹打均匀,然后 2 000 × g 离心 20 min。吸弃上清液,细胞经 3% 戊二醛固定,0.1 mol/L PBS 清洗 3 次,锇酸固定,0.1 mol/L PBS 清洗 3 次,乙醇各梯度(50%、70%、80%、90%)脱水 15 min,乙醇丙酮 1:1(体积分数为 90%)脱水,100% 丙酮脱水 3 次,每次 10 min,用包埋剂渗透包埋,烘箱烤制后超薄切片,用有支持膜的铜网捞片,醋酸铀、枸橼酸铅染色,透射电镜下观察细胞形态及其内部结构的变化。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 hTERT-shRNA 质粒的测序鉴定结果

重组质粒 shRNA 编码序列与设计的片段完全一致,表明载体构建正确,片段插入部位为 246 ~ 305,见图 1。shRNA 序列为 CACCGCGGTGTGCACCAACATCTATTCAAGAGATAGATGTTGCTGCACACCGTTTTTTTG。

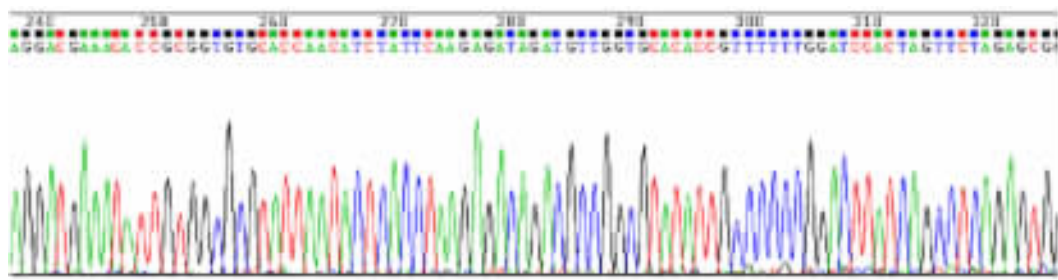


图 1 重组 hTERT-shRNA 质粒测序图谱

Fig.1 Gene sequence of hTERT-shRNA recombinant plasmid

2.2 hTERT-shRNA 转染下调 SW480 细胞中 hTERT mRNA 的表达

hTERT-shRNA 转染后 24、48、72 h,SW480 细胞 hTERT mRNA 表达均下调,以转染后 48 h 最显著 ($P < 0.05$)。hTERT-shRNA 转染 48 h 时,hTERT-shRNA 组 hTERT mRNA 表达的抑制率为 75.0%,与空白对照组、脂质体对照组、NC-shRNA 组比较(抑制率分别是 39.2%、33.3%、28.0%)差异有统计学

意义 ($P < 0.05$),结果见表 1、图 2。

2.3 hTERT-shRNA 转染对 SW480 细胞端粒酶活性的抑制

空白组、脂质体组、NC-shRNA 组和 hTERT-shRNA 组的 SW480 细胞转染后 48 h,用 TRAP-PCR-ELISA 检测各组端粒酶活性。转染后 48 h 各组 SW480 细胞端粒酶活性比较如下:空白组 D 值为 2.756 ± 0.089 ,脂质体组 D 值为 2.693 ± 0.225 ,NC-

shRNA 组 *D* 值为 2.691 ± 0.120 , 这 3 组 SW480 细胞端粒酶活性降低不明显, 3 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); hTERT-shRNA 组 *D* 值为 2.242 ± 0.285 , SW480 细胞端粒酶活性明显降低, 与其他 3 组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 hTERT-shRNA 转染后各组 SW480 细胞中 hTERT mRNA 的相对表达量

Tab. 1 Relative expression levels of hTERT mRNA in SW480 cells in different groups after hTERT-shRNA transfection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	hTERT mRNA/GAPDH mRNA		
	24 h	48 h	72 h
Blank	0.53 ± 0.03	0.53 ± 0.03	0.50 ± 0.04
Liposome	0.49 ± 0.01	0.48 ± 0.08	0.47 ± 0.07
NC-shRNA	0.48 ± 0.03	0.45 ± 0.06	0.46 ± 0.07
hTERT-shRNA	$0.46 \pm 0.43^*$	$0.32 \pm 0.03^{**}$	$0.43 \pm 0.06^*$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank group

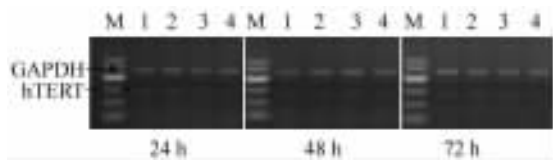


图 2 RT-PCR 检测各组 SW480 细胞中 hTERT mRNA 的表达水平

Fig. 2 hTERT mRNA expression levels in SW480 cells in different groups as detected by RT-PCR

M: DNA marker; 1: Blank group; 2: Liposome group; 3: NC-shRNA group; 4: hTERT-shRNA group

2.4 hTERT-shRNA 转染诱导 SW480 细胞凋亡

转染 hTERT-shRNA 质粒 48 h 后的 SW480 细胞, 电镜下可见细胞体积明显缩小, 细胞核固缩, 表面突起和微绒毛减少, 甚至消失。细胞器结构尚完整, 致密的染色质不均匀地沿细胞核膜下聚集, 细胞核呈环状(图 3A); 有的细胞中还可可见细胞核呈新月体状、环状或碎块状(图 3B), 内质网扩张, 空泡形成增多(图 3C)。空白组(图 3D)、脂质体组(图 3E)和 NC-shRNA 组(图 3F)细胞形态饱满, 较大未见明显变化, 呈圆形或梭形, 细胞核染色均匀, 细胞透明, 颗粒较少。因此, 转染 hTERT-shRNA 质粒后, SW480 细胞出现凋亡前期形态学改变, 对照组细胞生长良好, 未见到细胞凋亡的超微结构变化。

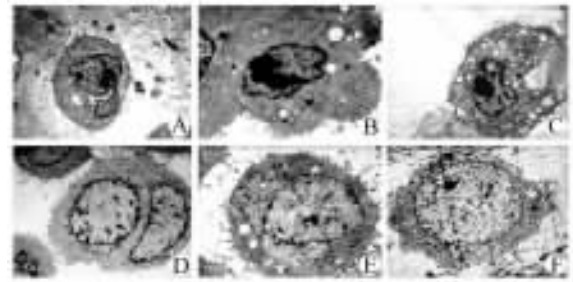


图 3 hTERT-shRNA 转染诱导 SW480 细胞凋亡(×3 800)

Fig. 4 hTERT-shRNA transfection induced apoptosis of SW480 cells(×3 800)

A-C: hTERT-shRNA group cells; D: Blank group cells; E: Liposome group cells; F: NC-shRNA group cells

3 讨论

自 1994 年 Kim 等^[8]建立了端粒重复片段扩增法检测端粒酶活性以来, 研究^[9-11]表明, 肿瘤组织呈端粒酶阳性表达, 而正常组织为阴性, 因此端粒酶可以作为癌症筛选的标志物。端粒酶是自身携带模板的逆转录酶, 能校正真核染色体的末端缩短。端粒酶是一种核糖核蛋白(ribonucleoprotein), 由端粒酶 RNA(hTR)、端粒酶相关蛋白(TPI)和端粒酶逆转录酶(hTERT)三部分组成。研究^[12]证实, 在编码端粒酶 3 个亚单位 mRNA 中, 只有端粒酶亚单位 hTERT mRNA 表达与端粒酶活性显著相关, 因此, 检测 hTERT mRNA 表达, 可反映端粒酶活性。端粒酶不仅和细胞的增殖、分化和衰老有关, 而且与细胞的恶性转化、肿瘤的发生发展相关^[13-14]。

Shoji 等^[15]认为, 高活性端粒酶可能是结直肠癌肝转移的危险因素。端粒酶活性和 hTERT 在结直肠癌组织中的表达率明显提高, 低分化结直肠癌组织中的端粒酶和 hTERT 表达率明显高于中、高分化结直肠癌, 伴淋巴结转移的结直肠癌其阳性表达率亦明显增高^[16]。本课题组前期研究也表明, 在大肠癌细胞中端粒酶的活性明显提高, 并认为端粒酶活性与肿瘤恶性程度呈正相关, 可作为大肠癌的恶性进展标志之一^[17-18]。因此将端粒酶作为大肠癌治疗靶点的研究极有意义。

RNA 干扰作为一种新的强有力的研究工具, 在功能基因组学中具有重要的地位^[19]。RNA 干扰是指靶基因序列特异性的转录后基因沉默, 它已经发展成为高效、特异阻断目的基因表达的有效工具^[20-21]。为此, 本研究设计和构建了有效靶向 hTERT 基因的质粒 hTERT-shRNA。将 hTERT-shRNA 转入到 SW480

细胞中,抑制细胞中 *hTERT* 基因的表达,研究 *hTERT* 对 SW480 细胞凋亡的影响。结果显示,与空白组、脂质体组、NC-shRNA 组相比,转染 *hTERT*-shRNA 质粒后的 SW480 细胞在 24、48、72 h 时 *hTERT* mRNA 表达水平均下调,以转染后 48 h 最为显著 ($P < 0.05$)。

TRAP-PCR-ELISA 法可有效检测端粒酶的表达^[22-23]。本研究采用 TRAP-PCR-ELISA 法检测转染 *hTERT*-shRNA 质粒 48 h 后,SW480 细胞端粒酶的活性,结果显示,与其他 3 组比较,*hTERT*-shRNA 组 SW480 细胞端粒酶活性明显降低 ($P < 0.05$)。本研究采用较为精确的透射电镜,当 *hTERT*-shRNA 质粒转染 SW480 细胞 48 h 后,透射电镜下可见细胞体积明显缩小、细胞核固缩、表面凸起减少、细胞膜球状突起、细胞表面的微绒毛断裂等细胞凋亡前期形态学改变,而对照组细胞生长良好,未见到细胞凋亡的超微结构变化。

本研究提示, RNA 干扰技术通过 dsRNA 产生序列特异性的转录后 *hTERT* 基因沉默,阻断 SW480 细胞 *hTERT* mRNA 的表达,抑制端粒酶的活性,促进 SW480 细胞凋亡,为大肠癌的个体化评价及基因治疗提供了新思路。但是, Masutomi 等^[24]报道, siRNA 抑制 *hTERT* 基因表达虽可降低端粒酶活性,但细胞端粒缩短并不明显。考虑端粒复制存在两种机制,除了端粒酶活性之外,细胞还可以通过一个特殊的 DNA 重组机制进行端粒复制^[9]。所以,为明确 *hTERT* 基因是否是大肠癌的理想的治疗靶点,还需进一步实验研究。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.

[2] Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006 [J]. Ann Oncol, 2007, 18(3): 581-592.

[3] 王双双, 关景明, 范玉晶. 大肠癌发病的相关因素 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 534-536.

[4] Guilleret L, Yah P, Grange F, et al. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) gene correlates with telomerase activity [J]. Int J Cancer, 2002, 101(4): 335-341.

[5] Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic of telomerase [J]. Science, 1997, 276(5312): 561-567.

[6] Fraser A. RNA interference human genes hit the big screen [J]. Nature, 2004, 428(6981): 375-378.

[7] Tuschl T. Expanding small RNA interference [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(5): 446-448.

[8] Blasco MA, Lee HW, Hande MP, et al. Telomere shortening and

tumor-formation by mouse cells lacking telomerase RNA [J]. Cell, 1997, 91(1): 25-34.

[9] Ng LJ, Cropley JE, Pickett HA, et al. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(4): 1152-1159.

[10] Saldanha SN, Andrews LG, Tollefsbol TO, et al. Analysis of telomerase activity and detection of its catalytic subunit *hTERT* [J]. Anal Biochem, 2003, 315(1): 1-21.

[11] Topolcan O, Holubec L, Polivkova V, et al. Tumor markers in pleural effusions [J]. Anticancer Res, 2007, 27(4): 1921-1924.

[12] Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human [J]. Science, 1997, 277(5328): 955-959.

[13] Hannon GJ. RNA interference [J]. Nature, 2002, 418(6894): 244-251.

[14] Liang QL, Shi HZ, Qin XJ, et al. Diagnostic accuracy of tumor markers for malignant pleural effusion: A meta-analysis [J]. Thorax, 2008, 63(1): 35-41.

[15] Shoji Y, Yoshinaga K, Inoue A, et al. Quantification of telomerase activity in sporadic colorectal carcinoma: Association with tumor growth and venous invasion [J]. Cancer, 2000, 88(6): 1304-1309.

[16] 谢裕安, 葛莲英, 刘剑仑, 等. 端粒酶在大肠癌组织中表达的临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(2): 186-188.

[17] 葛莲英, 刘剑仑, 黎丹戎, 等. 端粒酶活性和端粒长度在大肠癌组织中的表达及其意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(12): 1488-1489.

[18] 葛莲英, 刘剑仑, 张贵年. 大肠癌与端粒酶活性相关性的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19(6): 516-517.

[19] 张娇, 陈爱平, 戚玉言, 等. 靶向 EGFR 的干扰 RNA 对卵巢癌耐药细胞凋亡的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(6): 619-623.

[20] de Fougères A, Vornlocher HP, Maraganore J, et al. Interfered with disease: A progress report on siRNA-based therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discovery, 2007, 6(6): 4432-4453.

[21] 尤振兵, 何敬东, 喻晓娟. 生存素 siRNA 表达质粒对结肠癌细胞侵袭和增殖能力的抑制作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(7): 471-475.

[22] Wang SZ, Sun J-H, Zhang W, et al. Telomerase activity in cervical intraepithelial neoplasia [J]. Chin Med J, 2004, 117(2): 202-206.

[23] Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, et al. Telomerase activity in the female reproductive tract and neoplasm [J]. Gynecol Oncol, 1998, 68(2): 145-149.

[24] Masutomi K, Yu EY, Khurts S, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells [J]. Cell, 2003, 114(2): 241-253.

[收稿日期] 2010-11-08

[修回日期] 2010-12-18

[本文编辑] 韩丹