

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.04.014

siRNA 干扰鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制因子-1 的表达抑制黑素瘤细胞增殖

何玲, 韩钰, 刘梦瑶, 蔡富强, 王艳林(三峡大学分子生物学研究所, 湖北宜昌 443002)

[摘要] 目的: 研究 siRNA 干扰鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制因子-1(ornithine decarboxylase antizyme inhibitor-1, OAZI-1) 的表达对小鼠黑素瘤 B16-F1 细胞增殖的影响。方法: 构建 OAZI-1 特异性 siRNA 表达质粒 psilencer2.1-U6/OAZI-1 及对照 psilencer2.1-U6/scrambled 质粒, 脂质体转染法将质粒转入 B16-F1 细胞, Western blotting 和定量 PCR 检测 B16-F1 细胞中 OAZI-1 的表达。MTT 法和流式细胞术检测 psilencer2.1-U6/OAZI-1 对 B16-F1 细胞增殖和细胞周期的影响; MTT 法检测干扰 OAZI-1 表达后 B16-F1 细胞对抗肿瘤药物紫杉醇(docetaxel) 的敏感性。结果: 成功获得稳定转染 psilencer2.1-U6/OAZI-1 质粒的 B16-F1 细胞(B16/OAZI-1 细胞), B16/OAZI-1 细胞中 OAZI-1 mRNA 和蛋白表达分别为阴性对照 B16/scrambled 细胞的 25.0% 和 18.9%。干扰 OAZI-1 的表达抑制 B16-F1 细胞的增殖, G_0/G_1 期细胞比例增加[$(57.0 \pm 0.8)\%$ vs $(63.5 \pm 0.7)\%$, $P < 0.01$], 而 S 期和 G_2/M 期细胞比例减少[$(31.5 \pm 0.7)\%$ vs $(27.5 \pm 0.3)\%$, $P < 0.05$; $(11.5 \pm 0.3)\%$ vs $(9.1 \pm 0.6)\%$, $P < 0.01$]。干扰 OAZI-1 的表达能降低 B16-F1 细胞对紫杉醇的敏感性。结论: siRNA 干扰 OAZI-1 的表达能抑制黑素瘤 B16-F1 细胞的增殖, 并降低其对紫杉醇的敏感性。

[关键词] 鸟氨酸脱羧酶抗酶抑制因子-1; RNA 干扰技术; 黑素瘤细胞

[中图分类号] R739.5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)04-0414-05

siRNA interfering ornithine decarboxylase antizyme inhibitor-1 expression decreases proliferation of melanoma B16-F1 cells

HE Ling, HAN Yu, LIU Meng-yao, CAI Fu-qiang, WANG Yan-lin (Institute of Molecular Biology, Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of siRNA interference of ornithine decarboxylase antizyme inhibitor-1 (OAZI-1) expression on the proliferation of mouse melanoma B16-F1 cells. **Methods:** siRNA expression plasmid psilencer2.1-U6/OAZI-1 targeting OAZI-1 gene and control psilencer2.1-U6/scrambled plasmid were constructed and transfected into B16-F1 cells by Lipofect assay. Then the OAZI-1 expression in B16-F1 cells was examined by Western blotting analysis and real-time PCR. The effects of psilencer2.1-U6/OAZI-1 on proliferation and cell cycle of B16-F1 cells were detected by MTT and FCM, respectively. The sensitivity of B16-F1 cells to antitumor drug docetaxel was measured by MTT method after interfering OAZI-1 expression. **Results:** B16-F1 cells stably transfected with psilencer2.1-U6/OAZI-1 plasmid (B16/OAZI-1) were successfully obtained, and the expressions of OAZI-1 mRNA and protein in B16/OAZI-1 were 25% and 18.9% of those in control B16/scrambled cells, respectively. Interference of OAZI-1 expression inhibited the proliferation of B16-F1 cells, significantly increased the cells in G_0/G_1 phase ($[57.0 \pm 0.8]\%$ vs $[63.5 \pm 0.7]\%$, $P < 0.01$) and significantly decreased cells in S and G_2/M phases ($[31.5 \pm 0.7]\%$ vs $[27.5 \pm 0.3]\%$, $P < 0.05$; $[11.5 \pm 0.3]\%$ vs $[9.1 \pm 0.6]\%$, $P < 0.01$). Interference of OAZI-1 expression also decreased the sensitivity of B16-F1 cells to the antitumor drug docetaxel. **Conclusion:** Interfering OAZI-1 expression can suppress the proliferation of mouse melanoma B16-F1 cells and decrease their sensitivity to docetaxel.

[Key words] ornithine decarboxylase antizyme inhibitor-1; RNA interference; melanoma

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(4): 414-418]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30772590)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30772590)

[作者简介] 何玲, (1986 -), 女, 湖北省宜昌市人, 硕士生, 主要从事多胺代谢与肿瘤的研究。E-mail: xiaolingzhuxixi@163.com

[通信作者] 王艳林(WANG Yan-lin, corresponding author), E-mail: fzwangyl@ctgu.edu.cn

肿瘤细胞快速生长对多胺的依赖使多胺的代谢途径成为抗肿瘤治疗的靶点^[14]。在多胺代谢途径中,鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)是关键限速酶,该酶的活性直接调节着细胞内多胺的含量,因此 ODC 的酶活性受到精细的调节^[5-6]。在细胞内存在 ODC 的天然抑制蛋白——鸟氨酸脱羧酶抗酶(ornithine decarboxylase antizyme, OAZ)。OAZ 能特异性结合 ODC 单体,促进 ODC 降解^[7-10]。细胞中还存在着一种 OAZ 抑制蛋白——OAZ 抑制因子(ornithine decarboxylase antizyme inhibitor, OAZI),OAZI 能与 OAZ/ODC 的复合体中的 OAZ 结合,促进复合体中 ODC 的释放,上调 ODC 酶活性。有研究^[11-13]表明,多种恶性肿瘤细胞中 OAZI 的表达量显著升高,过表达 OAZI 能促进肿瘤细胞增殖及转化,下调 OAZI 的表达则抑制细胞增殖。黑素瘤是一种恶性程度很高的恶性肿瘤,目前尚缺乏有效的治疗手段。本研究利用 RNA 干扰技术,构建稳定干扰 OAZI-1 表达的小鼠 B16-F1 黑素瘤细胞株,再以此细胞株为模型研究 OAZI-1 对 B16 细胞增殖的影响,为黑素瘤的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

小鼠黑素瘤细胞株 B16-F1 购于中国典型培养物保藏中心。用含 10% 小牛血清及 100 U/ml 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基,在 5% CO₂、湿度 80%、37 °C 培养箱中培养。大肠杆菌菌株 DH5 α 、质粒 pSilencer2.1-U6 为本研究所保存。限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、dNTP、RT-PCR 及 PCR 试剂盒从 Fermentas 公司购入,TRIzol 试剂为 Invitrogen 公司产品,DNA 回收、纯化试剂盒为 Omega 公司产品,兔抗人 OAZI 多克隆抗体为 Protein Tech 公司产品,羊抗鼠 IgG-HRP、羊抗兔 IgG-HRP 均从北京中杉金桥公司购入。MTT 和 RPMI 1640 培养液购自 Sigma 公司,其它化学试剂来自 Invitrogen 公司和华美公司。Gel Logic-200 凝胶图像分析仪为 Kodak 公司产品,多元定量 PCR 仪为美国 MJ Research 公司产品,EPLCS XL 流式细胞分析仪为 Becton-Coulter 公司产品,全波长酶标仪为 Thermo 公司产品。寡聚核苷酸和 PCR 引物合成及 DNA 测序由上海生工公司完成。

1.2 psilencer2.1-U6/OAZI-1 质粒的构建

本实验所选择的 OAZI-1 特异性 siRNA 序列由 Ambion 公司网站提供的软件设计。寡核苷酸链序列为 5'-GATCCACTACTCCGTTGGCCTGTTCTCAA-

GAGAAACAGGCCAACGGAGTAGTTTTTTTGGAAA-3' 和 5'-AGCTTTTCCAAAAAACTACTCCGTTGGCCTGTTCTCTTGAGAACAGGCCAACGGAGTAGTG-3' (有下划线部分为靶向 OAZI-1 的序列)。上述两互补序列经退火后形成两端分别带有 BamH I 和 Hind III 酶切位点黏性末端的 DNA 双链。将此片段克隆入用相同酶切的 psilencer2.1-U6 真核表达载体后,构建重组质粒 psilencer2.1-U6/OAZI-1,转化入大肠杆菌 DH5 α ,含氨苄抗性琼脂平板筛选。阳性克隆放大培养后,提取质粒进行测序鉴定。

以相同的方法设计非特异性 scrambled 序列并构建 psilencer2.1-U6/scrambled 质粒用于实验阴性对照。对照 siRNA 序列为(下划线部分为 scrambled 序列)5'-GATCCACTACCGTTGTTATAGGTGTTCAA-GAGACACCTATAACAACGGTAGTTTTTTTGGAAA-3' 和 5'-AGCTTTTCCAAAAAA CTACCGTTGTTATAGGTGTTCTTGAACACCTATAACAACGGTAGG-3'。

1.3 psilencer2.1-U6/OAZI-1 质粒转染 B16-F1 细胞

生长密度 80%、生长状态良好的 B16-F1 细胞经无血清 RPMI 1640 培养 1 h 后,加入重组质粒 psilencer2.1-U6/OAZI-1 与 Lipofection 2000 脂质体混合液,37 °C 培养 5 h 后换含血清的 RPM 1640 培养 24 h,随后用 200 μ g/ml hygromycin 筛选阳性克隆。同时转染 psilencer2.1-U6/scrambled 质粒做对照。

1.4 实时定量 PCR 检测 B16-F1 细胞 OAZI-1 mRNA 的表达

收集 B16-F1 细胞,TRIzol 试剂提取总 RNA,其中 mRNA 经 M-MLV 逆转录酶逆转录为 cDNA。以此 cDNA 为模板,在 25 μ l PCR 体系下实时定量 PCR 检测 OAZI-1 mRNA 的表达。扩增上游引物为 5'-GAAGTTTGGCACTACTGAAG-3',下游引物为 5'-CCACCGATGTCTAACATGTTC-3'。PCR 扩增条件为 95 °C 5 min,94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,78 °C 1 s,30 个循环;72 °C 10 min。每个样品设 3 个复孔,Ct 取其均值,以 β -actin 作为内参照。OAZI-1 mRNA 表达的计算方法为: $\Delta CT = CT_{OAZI-1} - CT_{\beta-actin}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{处理组} - \Delta CT_{对照组}$ 。OAZI-1 mRNA 表达的相对差异量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

1.5 Western blotting 检测 B16-F1 细胞中 OAZI-1 蛋白的表达

稳定转染 psilencer2.1-U6/OAZI-1 或 psilencer2.1-U6/scrambled 质粒的阳性 B16-F1 细胞放大培养后收集细胞,用细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl、pH8.0,150 mmol/L NaCl,1% TritonX-100)裂解细胞,裂解液中的蛋白经 10% 的 SDS-PAGE 分离后,

电转至 PVDF 膜上。膜用 5% 脱脂牛奶-TBST(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0. 05% Tween-20、pH7. 4) 室温封闭 2 h 后, 先后与兔抗人 OAZI-1 抗体(1: 2 000) 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1: 4 000) 作用, ECL 法检测 OAZI-1 蛋白。实验中以 β -actin 为内参照蛋白。

1.6 MTT 法测定 B16-F1 细胞的增殖

取对数生长期 B16-F1 细胞, 胰酶消化后, 用 RPMI 1640 调整细胞浓度至 1×10^4 /ml, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ l。在设定的培养时间点弃去培养液, 加入含 200 μ g/ml MTT 的无血清 1640 培养液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h。去上清, 每孔加入 DMSO 200 μ l, 室温振摇 20 min 后于 570 nm 波长下检测每孔的光密度值(*D*), 绘制细胞生长曲线。

1.7 流式细胞术检测 B16-F1 细胞周期

收集对数生长期 B16-F1 细胞, PBS 洗 1 次, 用含 75% 乙醇和 0. 5 mmol/L EDTA 的 PBS 重悬细胞, 于 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min。2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗 1 次。用 500 μ l 含 0. 1% Triton X-100 和 50 μ g/ml RNase 的 PBS 混合液重悬细胞, 加入 90 μ l PI(0. 5mg/ml) 于 37 $^{\circ}$ C 避光保温 30 min, 流式细胞分析仪检测 B16-F1 细胞周期。

1.8 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 2. 0 软件进行统计分析, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 获得稳定干扰 OAZI-1 表达的 B16-F1 细胞株

重组质粒 psilencer2. 1-U6/OAZI-1 经脂质体转染法转染入 B16-F1 细胞, 抗生素 hygromycin 筛选获得稳定转染的细胞株 B16/OAZI-1。Western blotting 和实时定量 PCR 技术在蛋白和 mRNA 水平上的检测结果发现, B16/OAZI-1 细胞中 OAZI-1 蛋白表达水平显著性低于转染对照质粒 psilencer2. 1-U6/scrambled 的细胞株(B16/scrambled), 前者仅为后者的 18. 9% (图 1A)。B16/OAZI-1 细胞中 OAZI-1 mRNA 表达水平降至 B16/scrambled 细胞的 25. 0% (图 1B)。

2.2 干扰 OAZI-1 的表达抑制 B16-F1 细胞的增殖

MTT 法检测了干扰 OAZI-1 表达对 B16-F1 细胞增殖的影响(图 2)。从培养 48 h 开始, B16/OAZI-1 细胞生长速度显著低于 B16/scrambled 细胞($P < 0. 01$), 提示 siRNA 干扰 OAZI-1 的表达可抑制 B16-F1 细胞的增殖。

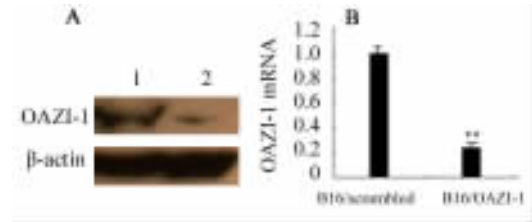


图 1 psilencer2. 1-U6/OAZI-1 质粒转染抑制 B16-F1 细胞中 OAZI-1 的表达

Fig. 1 Psilencer2. 1-U6/OAZI-1 plasmid transfection inhibited OAZI-1 expression in B16-F1 cells

A: Western blotting assay; B: Real-time PCR assay
1: B16/scrambled; 2: B16/OAZI-1
** $P < 0. 01$ vs B16/scrambled group

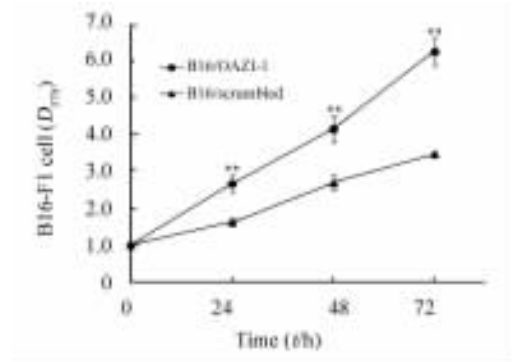


图 2 MTT 法检测 OAZI-1 对 B16-F1 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of OAZI-1 on proliferation of B16-F1 cells as detected by MTT assay

** $P < 0. 01$ vs B16/scrambled group

2.3 干扰 OAZI-1 的表达对 B16-F1 细胞周期的影响

收集细胞生长状态良好的 B16/OAZI-1 细胞及对照 B16/scrambled 细胞, 利用流式细胞仪检测 siRNA 干扰 OAZI-1 的表达对 B16-F1 细胞周期的影响。结果(图 3)发现, 与 B16/scrambled 细胞相比, B16/OAZI-1 细胞中 G_0/G_1 期细胞比例明显增加($57. 0 \pm 0. 8$ vs $63. 5 \pm 0. 7$, $P < 0. 01$), S 期和 G_2/M 期的细胞比例显著性减少($31. 5 \pm 0. 7$ vs $27. 5 \pm 0. 3$, $P < 0. 05$; $11. 5 \pm 0. 3$ vs $9. 1 \pm 0. 6$, $P < 0. 01$)。

2.4 干扰 OAZI-1 的表达降低 B16-F1 细胞对 docetaxel 的敏感性

用 MTT 法对比分析了 B16/OAZI-1 细胞及对照 B16/scrambled 细胞对抗肿瘤药物紫杉醇的敏感性。当用质量浓度为 0. 01、0. 05、0. 1、0. 2 μ g/ml 的紫杉醇处理细胞 48 h 时, B16/OAZI-1 细胞的增殖率均明显高于对照细胞, 提示 siRNA 干扰 OAZI-1 的表达降低 B16-F1 细胞对紫杉醇的敏感性。

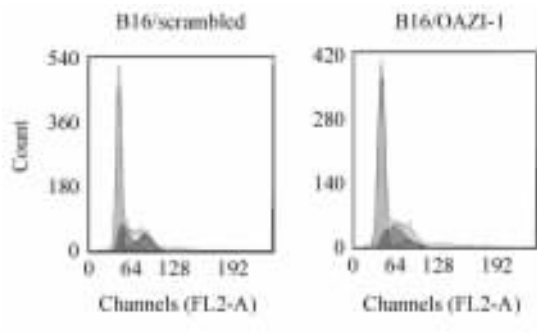


图3 流式细胞术检测 OAZI-1 对 B16-F1 细胞周期的影响

Fig. 3 Effect of OAZI-1 on cell cycle of B16-F1 cells as determined by flow cytometry

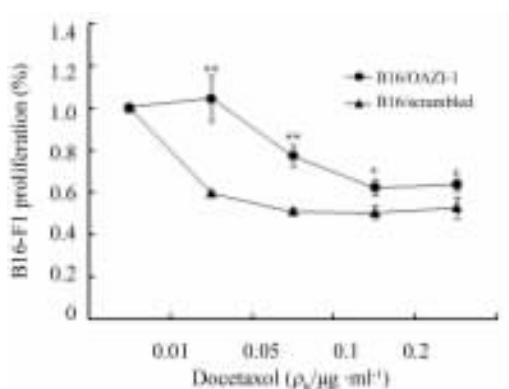


图4 干扰 OAZI-1 的表达降低 B16-F1 细胞对紫杉醇的敏感性

Fig. 4 Interfering OAZI-1 expression decreased sensitivity of B16-F1 cells to doxorubicin

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs B16/scrambled group

3 讨论

多胺是广泛存在于生物体组织中的一类带多价正电荷的脂肪族小分子化合物,能与带负电荷的大分子如 DNA、RNA 和蛋白质等结合从而影响着细胞的功能。细胞内多胺为肿瘤细胞快速生长所必需,多胺代谢途径逐渐成为抗肿瘤研究的新靶点^[14]。肿瘤细胞中存在多胺代谢关键酶的表达异常,其中以多胺合成途径中关键限速酶鸟氨酸脱羧酶(Ornithine decarboxylase, ODC)的活性升高最常见,多种肿瘤细胞中 ODC 的酶活性显著性升高^[5-6]。细胞内 ODC 以有活性的同源二聚体和无活性的 ODC 单体两种形式存在,二者间存在着动态平衡。ODC 活性直接影响细胞内多胺的水平,因此 ODC 活性受到严密调节。鸟氨酸脱羧酶抗酶 OAZ 是细胞内天然存在的 ODC 抑制蛋白,能高亲和性地与 ODC 单体结合,促使 ODC 快速被 26 s 蛋白酶体经非泛素依赖的

途径降解,降低细胞内 ODC 活性^[7]。

抗酶抑制因子 OAZI 是存在于细胞内的 OAZ 抑制蛋白^[8]。OAZI 与 OAZ 的亲合力高于 OAZ 与 ODC 的亲合力,故能在蛋白水平上竞争性结合 OAZ,释放 ODC/OAZ 复合物中的 ODC,增加 ODC 活性^[9-10]。OAZI 基因表达异常与肿瘤发生和发展密切相关性,OAZI 成为潜在的抗肿瘤治疗新靶点^[11-13]。1982 年 Fujita 等^[14]在大鼠的肝脏中发现 OAZI 蛋白,1995 年 Murakami 等^[15]克隆出大鼠的 OAZI-1 序列,其开放性阅读框序列有 1 347 bp,表达的蛋白质由 448 个氨基酸组成,相对分子量大约 50 000。进一步研究发现,OAZI 对 OAZ 蛋白家族的所有成员均具有抑制作用^[16],而 OAZI 本身也为一蛋白家族,其中 OAZI-1 是研究最为深入的家族成员^[17]。鉴于 OAZI 在调控多胺水平和细胞增殖中的重要作用^[18-20],OAZI 成为抗肿瘤研究的新靶点。

本研究利用 siRNA 干扰技术,获得稳定干扰 B16-F1 细胞中 OAZI-1 表达的细胞株,以此细胞株为模型,研究干扰 OAZI-1 表达对 B16-F1 细胞增殖的影响。结果显示,干扰 B16-F1 细胞中 OAZI-1 的表达能抑制 B16-F1 细胞的增殖,使 B16-F1 细胞中 G₀/G₁ 期细胞增多,S 期细胞减少,提示 OAZI-1 低表达对 B16-F1 细胞增殖的抑制作用发生在 G₁/S 转换期。

为研究 OAZI-1 表达水平的改变对抗肿瘤药物效果的影响,本研究进一步用抗肿瘤药物紫杉醇处理细胞,发现 OAZI-1 低表达的 B16-F1 细胞增殖率显著高于 B16/scrambled 对照细胞,提示干扰 OAZI-1 的表达能降低 B16-F1 细胞对紫杉醇的敏感性。前期研究^[21]中发现,B16-F1 细胞内高表达 OAZI-1,能增加 B16-F1 细胞对抗癌药物的敏感性,这与本研究中干扰 OAZI-1 的表达降低 B16-F1 细胞对紫杉醇敏感性的结论相符。推测紫杉醇可能促进微管蛋白聚合,降低微管的解聚,阻断细胞有丝分裂,抑制细胞增殖,从而增加对紫杉醇的敏感性。而本实验中通过干扰 OAZI-1 的表达引起 B16-F1 细胞生长速度减慢,对紫杉醇的敏感性下降。上述结果提示,OAZI 蛋白可能成为黑素瘤治疗的潜在靶点,干扰 OAZI 的表达降低细胞对紫杉醇的敏感性,这一现象也可为临床合理用药提供参考。

[参考文献]

- Agostinelli E, Marques MP, Calheiros R. Polyamines: Fundamental characters in chemistry and biology [J]. Amino Acids, 2010, 38(2): 393-403.
- Casero RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and func-

- tion in cancer and other hyperproliferative diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(5): 373-390.
- [3] Alm K, Oredsson S. Cells and polyamines do it cyclically [J]. Essays Biochem, 2009, 46: 63-76.
- [4] Evageliou NF, Hogarty MD. Disrupting polyamine homeostasis as a therapeutic strategy for neuroblastoma [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(19): 5956-5961.
- [5] Pegg AE. Regulation of ornithine decarboxylase [J]. J Biol Chem, 2006, 281(21): 14529-14532.
- [6] Shantz LM, Levin VA. Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: Mechanisms and therapeutic potential [J]. Amino Acids, 2007, 33(2): 213-223.
- [7] Kahana C, Asher G, Shaul Y. Mechanisms of protein degradation: An odyssey with ODC [J]. Cell Cycle, 2005, 4(11): 1461-1464.
- [8] Liu GY, Liao YF, Hsu PC. Antizyme, a natural ornithine decarboxylase inhibitor, induces apoptosis of haematopoietic cells through mitochondrial membrane depolarization and caspases' cascade [J]. Apoptosis, 2006, 11(10): 1773-1788.
- [9] Liu YC, Liu YL, Su JY. Critical factors governing the difference in antizyme-binding affinities between human ornithine decarboxylase and antizyme inhibitor [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19253.
- [10] Mangold U. The antizyme family: Polyamines and beyond [J]. IUBMB Life, 2005, 57(10): 671-676.
- [11] Kahana C. Regulation of cellular polyamine levels and cellular proliferation by antizyme and antizyme inhibitor [J]. Essays Biochem, 2009, 46(1): 47-61.
- [12] Kim SW, Mangold U, Waghorne C. Regulation of cell proliferation by the antizyme inhibitor: Evidence for an antizyme-independent mechanism [J]. Cell Sci, 2006, 119(12): 2583-2591.
- [13] Murakami Y, Suzuki J, Samejima K. The change of antizyme inhibitor expression and its possible role during mammalian cell cycle [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(13): 2301-2311.
- [14] Fujita K, Murakami Y, Hayashi S. A macromolecular inhibitor of the antizyme to ornithine decarboxylase [J]. Biochem J, 1982, 204(3): 647-652.
- [15] Murakami Y, Ichiba T, Matsufuji S. Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase [J]. J Biol Chem, 1996, 271(7): 3340-3342.
- [16] Mangold U, Leberer E. Regulation of all members of the antizyme family by antizyme inhibitor [J]. Biochem J, 2005, 385(1): 21-28.
- [17] Kahana C. Identification, assay, and functional analysis of the antizyme inhibitor family [J]. Methods Mol Biol, 2011, 720: 269-78.
- [18] Kahana C. Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(15): 2479-2488.
- [19] Keren-Paz A, Bercovich Z, Kahana C. Antizyme inhibitor: A defective ornithine decarboxylase or a physiological regulator of polyamine biosynthesis and cellular proliferation [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(2): 311-313.
- [20] Choi KS, Suh YH, Kim WH. Stable siRNA-mediated silencing of antizyme inhibitor: Regulation of ornithine decarboxylase activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328(1): 206-212.
- [收稿日期] 2011-03-28 [修回日期] 2011-05-10
[本文编辑] 王莹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

常见参考文献著录格式示例

1 专著

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 其他责任者(例如翻译者). 版本项(1 版不著录). 出版者: 出版地, 出版年: 起页-止页.

- [1] Abrams WB, Beers MH, Berkow R. 默克老年病手册 [M]. 陈灏珠, 王赞舜, 刘厚钰, 等. 译. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 22-25.

2 专著析出文献

著录格式: 析出文献主要责任者. 文献题名[文献类型标志]// 专著主要责任者. 专著题名. 出版地: 出版者, 出版年: 起页-止页.

- [1] Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms [M]// Soderman WA Jr, Soderman WA. Pathologic physiology: Mechanisms of disease. Philadelphia: Saunders, 1974: 457-472.

3 期刊文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页.

- [1] Nobles KN, Guan Z, Xiao K, et al. The active conformation of beta-arrestin 1: Direct evidence for the phosphate sensor in the N-domain and conformational differences in the active states of beta-arrestins 1 and -2 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(29): 21370-21381.

4 专利文献

著录格式: 专利申请者或所有者. 专利题名: 专利国别, 专利号[文献类型标志]. 公告日期或公开日期.

- [1] 钱其军, 李琳芳, 吴红平, 等. 一种多功能免疫杀伤转基因细胞(PIK)、其制备方法及应用: 中国, 2010101496839 [P]. 2010-10-14.

5 学位论文

著录格式: 责任者. 题名[文献类型标志]. 学位授予单位所在地: 学位授予单位, 年.

- [1] 曹新广. Cathepsin L 和 Cystatin B 的表达与大肠癌生物学行为的关系 [D]. 郑州, 郑州大学, 2007.

6 电子文献

著录格式: 主要责任者. 题名[文献类型标志/ 文献载体标志]. 刊名, 出版年, 卷号(期号): 起页-止页. (更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

- [1] Christine M. Plant physiology: Plant biology in the Genome Era [J/OL]. Science, 1998, 281: 331-332 [1998-09-23]. <http://www.sciencemag.org/cgi/collection/anatmorp>.
- [2] Hopkinson A. UNIMARC and metadata: Dublin Core [EB/OL]. [1999-12-08]. <http://www.ifla.org/IV/ifla64/138-161e.htm>.