

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.013

· 基础研究 ·

pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 对结直肠癌 SW480 细胞裸鼠移植瘤的抑制

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:** 研究靶向 *hTERT* 基因的重组质粒 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 对人结直肠癌 SW480 细胞裸鼠移植瘤的治疗作用。**方法:** 于裸鼠右侧腋下皮下注射人结直肠癌 SW480 细胞建立结直肠癌移植瘤动物模型, 随机分为生理盐水组 (NS 组)、pGPU6/GFP/Neo-NC-shRNA 组 (NC-shRNA 组) 和 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 组 (hTERT-shRNA 组), 各组连续进行相应治疗 6 次后, 观察肿瘤的生长状况, 测量肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线, H-E 染色观察肿瘤组织形态学变化, 免疫组织化学法检测移植瘤组织中 *hTERT* 蛋白的表达, TUNEL 法检肿瘤组织中细胞凋亡情况, RT-PCR 法检测瘤组织中 *hTERT* mRNA 的表达。**结果:** 与 NC-shRNA 组和 NS 组比较, hTERT-shRNA 组移植瘤体积增长速度减慢; hTERT-shRNA 组移植瘤组织中见肿瘤细胞形态明显改变, 凋亡细胞数明显增多 [$36.30 \pm 5.05\%$ vs $(5.25 \pm 1.06\%)$ 、 $(6.95 \pm 1.07\%)$, $P < 0.01$]; hTERT-shRNA 组 *hTERT* 的 mRNA 和蛋白表达均明显受到抑制 (171.42 ± 30.94 vs 146.89 ± 21.43 、 137.35 ± 25.49 , $P < 0.01$; 0.39 ± 0.09 vs 0.81 ± 0.335 、 0.750 ± 0.206 , $P < 0.05$)。**结论:** 重组质粒 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 通过下调 *hTERT* mRNA 和蛋白水平的表达促进肿瘤细胞的凋亡, 抑制结直肠癌移植瘤的生长。

[关键词] RNA 干扰; *hTERT* 基因; 结直肠癌; 裸鼠; 凋亡

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)01-0072-06

Inhibition of pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA on colorectal cancer SW480 cell xenograft in nude mice

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the treatment effect of recombinant plasmid pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA targeting *hTERT* gene on human colorectal cancer SW480 cell xenograft in nude mice. **Methods:** Human colorectal cancer SW480 cells were subcutaneously implanted under the skin of the right armpit to establish nude mice model of colorectal cancer, after the tumors grew to a definite size. The mice were randomly divided into three groups: normal saline (NS group), pGPU6/GFP/Neo-NC-shRNA group (NC-shRNA group) and pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA group (hTERT-shRNA group). After each group was treated for 6 consecutive times, the growth status of the tumor was observed, tumor volume was measured, tumor growth curve was drawn, tumor tissue morphology was observed with H-E staining, the expression of *hTERT* protein in the tumors was detected by immunohistochemistry, cell apoptosis was inspected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL), and the expression of *hTERT* mRNA was checked by RT-PCR. **Results:** The growth of tumor volume became slower in hTERT-shRNA group than did that in NS group and NC-shRNA group. Compared with NS group and NC-shRNA group, the tumor cell morphology changed obvious-

[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资助项目 (No. Z200971)。Project supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (No. 2010GXNSFA013238), and the Key Science Foundation of Health Bureau of Guangxi Zhuang Autonomous Region (No. Z200971)

[作者简介] 蔡艳玲 (1982 -), 女, 黑龙江省大庆市人, 硕士, 主要从事肿瘤分子生物学研究。E-mail: cylcomeon@yahoo.com.cn

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

ly and the number of apoptotic cells increased significantly in the transplanted tumor tissues in hTERT-shRNA group ($[36.3 \pm 5.05]\%$ vs $[5.25 \pm 1.06]\%$, $[6.95 \pm 1.07]\%$, $P < 0.01$). Compared with NS group and NC-shRNA group, the expression of hTERT protein was significantly inhibited in hTERT-shRNA group ($[171.42 \pm 30.94]$ vs $[146.89 \pm 21.43]$, $[137.35 \pm 25.49]$, $P < 0.01$). Compared with NS group and NC-shRNA group, the expression of hTERT mRNA was significantly inhibited in hTERT-shRNA group (0.39 ± 0.09 vs 0.81 ± 0.34 , 0.75 ± 0.21 , $P < 0.05$). **Conclusion:** Recombinant plasmid pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA promotes apoptosis of implanted human colorectal cancer by down-regulating the expression of hTERT mRNA and hTERT protein in tumor tissues, thus inhibiting the growth.

[**Key words**] RNA interference; hTERT gene; colorectal cancer; nude mice; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 72-76]

目前,肿瘤靶向基因治疗已经成为肿瘤治疗研究最活跃的领域之一,其优点是选择性杀伤或抑制肿瘤细胞而不损伤正常细胞。大量靶分子被分离和鉴定,如端粒酶、血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶等,其中端粒酶是所发现的恶性肿瘤最广谱的分子标志,在绝大多数恶性肿瘤中被激活,而在正常体细胞中表达一般为阴性^[1]。人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因在端粒酶阳性肿瘤细胞中高表达,利用此特点, hTERT 成为肿瘤基因治疗较为理想的靶点;构建用 hTERT 启动子调控其他抗肿瘤基因的表达载体,靶向杀伤肿瘤细胞已取得了较大进展^[2-3]。本课题应用 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术沉默 hTERT 基因,探讨其对入结直肠癌裸鼠移植瘤细胞凋亡及其生长的影响。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

人结直肠癌 SW480 细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心。BALB/c 雌性裸鼠(动物合格证号为 SCXK 桂 2009-0002)共 24 只,4~6 周龄,体重 18~20 g,由广西医科大学实验中心提供,SPF 级饲养。pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA(不含有目的基因的质粒)、pGPU6/GFP/Neo-NC-shRNA(含有目的基因的质粒)由本实验室大量扩增抽提获得^[4-5]。L15 培养基购自美国 Gibco 公司。TRIzol、cDNA 提取试剂盒均购自美国 Introvigen 公司。

1.2 SW480 结直肠癌裸鼠移植瘤动物模型的建立

取裸鼠,将对数生长期的 SW480 细胞经 0.25% 胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞最终密度至 2.5×10^8 个/ml,0.2 ml(含细胞数 5×10^7 个)接种于裸鼠右侧腋部皮下,待移植瘤直径达 5~7 mm 时将荷瘤裸鼠随机分为 3 组:(1)生理盐水组(NS 组),瘤体内多点注射生理盐水,每只 100 μ l。(2) NC-shRNA 组,瘤体内多点注射 pGPU6/GFP/Neo-

NC-ShRNA,每只注射 20 μ g 质粒。(3) hTERT-shRNA 组,瘤体内多点注射 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA,剂量同 NC-shRNA 组。隔 2 d 注射 1 次,共 6 次。

每日观察各组裸鼠的精神、饮食等一般情况,观察移植瘤的大体形态,隔日测量裸鼠体重、移植瘤大小,用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),按照公式($V = 1/2 \times ab^2$)计算瘤体体积,绘制肿瘤生长曲线。于最后 1 次治疗后的第 6 天,眼球放血处死裸鼠,分离肿瘤,行 H-E 染色、免疫组化、TUNEL 方法及 RT-PCR 方法分别检测各组肿瘤组织中细胞凋亡和 hTERT mRNA 表达情况等^[5-6]。

1.3 H-E 染色观察各组裸鼠肿瘤组织形态学变化

裸鼠肿瘤组织标本经 10% 中性甲醛脱水固定,然后石蜡包埋,切片(约 4 μ m)做 H-E 染色。步骤如下:(1)二甲苯 I \rightarrow 二甲苯 II \rightarrow 二甲苯 III 各 10 min;(2)梯度酒精各 5 min,于清水中浸泡 10 min;(3)苏木精染色 2~4 min,清水洗净;(4)盐酸酒精 3~5 s,清水洗净,60 $^{\circ}$ C 温水返蓝约 10 min;(5)伊红染色 20~30 s,清水洗净;(6)晾干后中性树脂胶封片,光镜下观察肿瘤组织学形态。

1.4 免疫组织化学法检测各组裸鼠肿瘤组织中 hTERT 蛋白的表达

裸鼠肿瘤组织常规固定、包埋后采用 MaxvisionTM 免疫组化法检测 hTERT 蛋白的表达,操作步骤按说明书^[7]进行,光镜下观察阳性染色细胞定位。由于 hTERT 蛋白激活情况下位于细胞核,故以胞核染成棕黄或棕黑色为阳性结果。

1.5 TUNEL 法检测各肿瘤组织中细胞凋亡

移植瘤组织切片按照常规方法脱蜡及水化,其余步骤按照 TUNEL 实验说明书进行,滴加 Streptavidin-HRP 工作液、DAB 显色等,苏木精复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片观察。采用 Leica 病理图像分析仪进行凋亡率计算分析,显微镜下观察拍照,细胞核中出现棕黄色颗粒即为阳性细

胞, 每张切片至少观察 3 个以上高倍视野, 计算每 100 个癌细胞内的阳性细胞数, 凋亡指数(apoptosis index, AI)(%) = 阳性细胞数/观察细胞总数 × 100%。

1.6 RT-PCR 检测各组荷瘤裸鼠肿瘤组织中 hTERT mRNA 的表达

瘤组织总 RNA 提取: 取瘤组织约 30 ~ 50 mg, 剪碎, 冰浴下匀浆, 加入 1 ml TRIzol 充分匀浆后提取 RNA、逆转录及扩增反应, 其详细步骤见文献 [7]。PCR 扩增 hTERT 基因的引物(上游: 5'-GCT-GCTCAGGTCTTTCTTTTATG-3'; 下游引物: 5'-CGACGTAGTCCATGTTACAA-3'; 扩增片段长 252 bp) 和内参照 GAPDH(上游引物: 5'-CTCAGACAC-CATGGGAAGGTGA-3'; 下游引物: 5'-ATGATCTT-GAGGCTGTTGTCATA-3'; 扩增片段长 450 bp) 由上海生物工程公司合成。扩增后取产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 每次实验至少重复 3 次。结果用 Quantity462 凝胶成像图像分析软件进行相对表达量分析。mRNA 表达抑制率(%) = (对照组 mRNA - 实验组 mRNA) / 对照组 mRNA × 100%。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数比较采用单因素方差分析(One-way Anova), 方差齐采用 LSD 法检验并进行两两组间比较, 方差不齐采用 Dunnett's 法检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 对裸鼠移植瘤生长的抑制

实验观察到, 治疗开始后, hTERT-shRNA 组裸鼠瘤体积增长速度慢于 NC-ShRNA 组, 而 NC-ShRNA 组与 NS 组裸鼠移植瘤体积呈持续增长趋势(图 1)。结果表明, hTERT-shRNA 可以有效地杀伤癌细胞, 减小瘤体积。

2.2 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 作用后 SW480 移植瘤病理学的改变

肿瘤组织切片经 H-E 染色, 在光镜下观察结果, hTERT-shRNA 组肿瘤组织出现局部大片坏死区, 细胞结构消失, 细胞崩解(图 2A)。NS 组和 NC-shRNA 组荷瘤裸鼠肿瘤组织的肿瘤细胞分布清晰可见, 坏死少见, 瘤细胞大、形态不规则, 核浆比例倒置, 可见病理性核分裂相, 核仁明显(图 2B)。可见, hTERT-shRNA 组 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 对 SW480 细胞裸鼠移植瘤产生了明显的抑制作用。

2.3 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 促进 SW480

细胞裸鼠移植瘤细胞的凋亡

TUNEL 法检测 SW480 细胞裸鼠移植瘤组织细胞凋亡, 结果(图 3)可见, 阳性染色主要分布在细胞核内, 与 NS 组和 NC-shRNA 组相比, hTERT-shRNA 组凋亡细胞数明显增多, 分布密集; NC-shRNA 组和 NS 组也有凋亡现象, 但凋亡细胞较少。pGPU6/GFP/Neo-hTERTshRNA 明显促进 SW480 移植瘤细胞凋亡[(36.3 ± 5.05)% vs (5.25 ± 1.06)%、(6.95 ± 1.07)% , P < 0.01)。NS 组和 NC-shRNA 组间无明显差异。

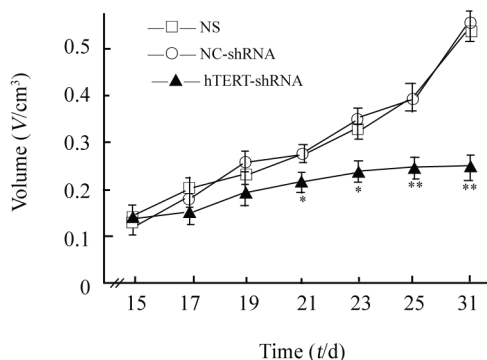


图 1 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 对裸鼠 SW480 移植瘤生长的抑制

Fig. 1 Inhibition on growth of SW480-implanted tumors in nude mice by pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs NS or NC-shRNA

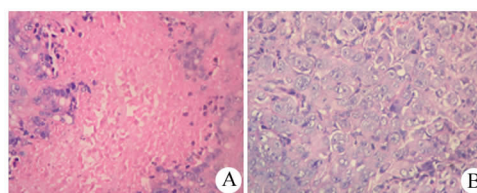


图 2 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 对 SW480 细胞移植瘤组织病理学的影响(H-E, ×200)

Fig. 2 Influence of pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA on pathology of SW480-implanted tumor tissues in nude mice (H-E, ×200)

A: hTERT-shRNA group; B: NC-shRNA group

2.4 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 抑制 SW480 细胞裸鼠移植瘤组织 hTERT 蛋白表达

采用免疫组织化学法检测 3 组肿瘤组织中 hTERT 蛋白表达水平。结果显示, hTERT-shRNA 组肿瘤组织中 hTERT 蛋白表达减少, hTERT 蛋白阳性细胞较少, 细胞呈浅棕黄色(图 3A)。NC-shRNA 组和 NS 组肿瘤组织 hTERT 蛋白表达较高, hTERT 蛋

白阳性细胞多,细胞的胞质和胞核呈深棕黄色(图4B,4C)。病理图像分析系统检测 hTERT 蛋白表达,结果显示,hTERT-shRNA 组与 NC-shRNA 组和 NS 组比较,差异有统计学意义(171.42 ± 30.94 vs 146.89 ± 21.43 、 137.35 ± 25.49 , $P < 0.01$),其后两组之间无明显差异。结果说明,hTERT-shRNA 组 SW480 细胞裸鼠移植瘤组织 hTERT 蛋白表达明显受到抑制,且 hTERT 蛋白表达水平改变与 hTERT mRNA 水平改变相符。

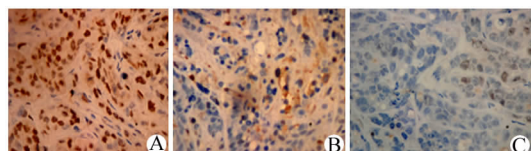


图3 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 抑制 SW480 细胞裸鼠移植瘤组织 hTERT 蛋白表达(Maxvision™, ×200)

Fig.3 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA inhibited the expression of hTERT protein in SW480-implanted tumor tissues in nude mice (Maxvision™, ×200)

A: hTERT-shRNA group; B: NC-shRNA group; C: NS group

2.5 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 抑制 SW480 裸鼠移植瘤细胞的 hTERT mRNA 表达

RT-PCR 检测 SW480 细胞裸鼠移植瘤细胞中 hTERT mRNA 表达,结果显示,在 hTERT mRNA 相对表达量中,hTERT-shRNA 组比 NS 组和 NC-shRNA 组显著降低(0.39 ± 0.09 vs 0.81 ± 0.34 、 0.75 ± 0.21 , $P < 0.05$)。hTERT mRNA 表达降低的结果与移植瘤生长抑制相一致。

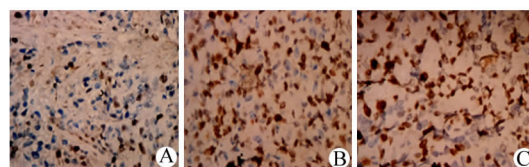


图4 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 促进 SW480 裸鼠移植瘤细胞凋亡(TUNEL, ×200)

Fig.4 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA promoted apoptosis of SW480-transplanted tumor cells in nude mice (TUNEL, X 200)

A: hTERT-shRNA; B: NC-shRNA; C: NS

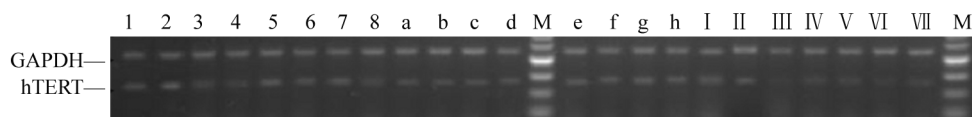


图5 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA 抑制 SW480 裸鼠移植瘤细胞中 hTERT mRNA 表达

Fig.5 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA inhibited hTERT mRNA expression in SW480-transplanted tumor cells in nude mice

M:100 bp DNA marker; Lane 1-8:NS group; Lane a-h:NC-shRNA group; Lane I -VII:hTERT-shRNA group

3 讨论

端粒是染色体末端独特的蛋白质-DNA 结构,在保护染色体的完整性和维持细胞的复制能力方面起着重要的作用。维持端粒酶活性必须的两个基因:一是组成性表达的人端粒酶 RNA 组分(human telomerase RNA,hTR),二是人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)。hTR 基因在所有细胞均有表达,而 hTERT 基因仅在大多数肿瘤和永生化细胞系中高表达,在成熟分化的正常体细胞中的表达处于关闭状态。因此,恶性肿瘤增殖失控的关键在于端粒酶的激活、永生化细胞和恶性肿瘤细胞通过激活端粒酶活性来维持端粒长度并阻止细胞死亡^[9-11]端粒酶的活性与 hTERT mRNA 的表达密切相关。因此,hTERT 基因的研究成为近

年来肿瘤研究的新靶点^[12]。

先前实验已构建了针对 hTERT 基因的重组质粒 pGPU6/GFP/Neo-hTERT-shRNA (hTERT-shRNA),并证实 hTERT-shRNA 载体可以有效地抑制 SW480 细胞中 hTERT 基因的表达,并可抑制 SW480 细胞在体外的增值。本研究显示,hTERT-shRNA 组裸鼠瘤体增长速度明显慢于 NC-shRNA 和 NS 组($P < 0.05$),NC-shRNA 组与 NS 组裸鼠移植瘤体积增长速度无明显差异,表明 hTERT 基因表达的沉默影响了瘤体的生长速度,这与先前的体外实验研究^[8]结果基本一致。

H-E 染色及凋亡检测发现,hTERT-shRNA 组的裸鼠肿瘤组织中出现局部大片坏死灶,而 NC-shRNA 组和 NS 组肿瘤性坏死少见,肿瘤细胞可见病理性核分裂相,核仁明显。且 hTERT-shRNA 组的凋

亡指数明显高于 NC-shRNA 组和 NS 组。产生这种作用的机制可能主要有两方面:一方面是质粒 shRNA 表达了 shRNA 的特异性,从而选择性地降解了 *hTERT* mRNA,导致 hTERT 蛋白合成减少,继而引起端粒酶活性下降,所以端粒较短的癌细胞因端粒未得到及时的补充,细胞增殖能力下降而发生凋亡。这与 RT-PCR 法和免疫组化证实的 shRNA 质粒分别下调 *hTERT* mRNA 和 hTERT 蛋白水平的结果相一致。另一方面, RNAi 可能同时直接诱导了干扰素等癌细胞凋亡促进物的产生而导致癌细胞凋亡^[12]。本实验结果足以说明, hTERT-shRNA 组 *hTERT* mRNA 和蛋白的表达受到了抑制,且肿瘤细胞出现了凋亡现象。

端粒酶的激活能使肿瘤细胞获得无限增殖的能力,这是肿瘤发展过程中的一个早期事件,也是肿瘤发生、发展的关键性步骤,可能与肿瘤的分化、复发、转移有关^[13],以 *hTERT* 基因为靶点的基因治疗一直是近年来的研究热点^[14]。目前, RNAi 用于基因治疗的最大障碍是 siRNA 导入细胞内的效率不高和 siRNA 的稳定性问题^[15]。本实验采用真核表达质粒作为载体,由于其不能在细胞内形成长期稳定的表达,给本实验结果带来一定的影响。为此,未来的研究将倾向于使用病毒载体,腺病毒载体以其高容量、感染细胞类型多、不会重组到宿主细胞的染色体组中、能够长时间表达外源基因等优点被广泛应用于哺乳动物 RNAi 的研究^[16-19]。采用腺病毒载体转染非小细胞肺癌细胞 NCI-H358,转染后的 NCI-H358 均显示出 80% 以上的转染效率和明显的凋亡现象,表明腺病毒载体将呈现良好的应用前景^[20]。

[参考文献]

- [1] 蔡艳玲, 罗小玲, 葛连英, 等. RNAi 沉默 hTERT 基因对大肠癌 SW480 细胞凋亡的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(1): 46-50.
- [2] 刘燕, 邓志华. 靶向人端粒酶逆转录酶启动子在肿瘤基因治疗中的研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(2): 150-152.
- [3] Ito H, Kanzawa T, Miyoshi T, et al. Therapeutic efficacy of PU-MA for malignant glioma cells regardless of p53 status [J]. Hum Gene Ther, 2005, 16(6): 685-698.
- [4] 葛连英, 刘爱群, 罗小玲, 等. 靶向人端粒酶逆转录酶基因的 shRNA 真核表达载体的构建及鉴定 [J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(10): 1441-1443.
- [5] 黎成金, 马庆久, 赖大年, 等. CD/5-FC 系统对结肠癌细胞的杀伤作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(5): 535-539.
- [6] 宋晖, 辛晓燕, 肖锋, 等. Survivin 基因 RNAi 对子宫癌裸鼠移植瘤生长与凋亡的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2009, 16(4): 374-378.
- [7] 王丽芳, 刘丽华, 马毓梅, 等. 香加皮三萜类化合物抑制食管癌 Eca109 细胞裸鼠成瘤及其机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(6): 620-624.
- [8] 饶华民, 罗庆丰, 高文. hTERT 蛋白在贲门癌及癌旁组织中表达的临床意义 [J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(1): 26-28.
- [9] Count ER, Hi RT, Bacchet TI, et al. Telomerase activity in human ovarian carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(8): 2900-2904.
- [10] Frías C, Morán A, de Juan C, et al. Telomere function in colorectal cancer [J]. World J Gastrointest Oncol, 2009, 1(1): 3-11.
- [11] Malaska J, Kunicka Z, Borsky M, et al. Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma [J]. Neoplasma, 2004, 51(2): 90-96.
- [12] 刘丹, 陶泽璋, 肖伯奎, 等. 短发夹 RNA 沉默 hTERT 基因对人喉癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用 [J]. 癌症, 2006, 25(1): 11-16.
- [13] Woo HJ, Choi YH. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity [J]. Int J Oncol, 2005, 26(4): 1017-1023.
- [14] Song MS, Jeong JS, Cho KS, et al. Gene expression responses *in vivo* by human telomerase reverse transcriptase (hTERT)-targeting trans-splicing ribozyme [J]. Exp Mol Med, 2007, 39(6): 722-732.
- [15] Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(4): 318-329.
- [16] 王德利. 腺病毒载体的研究进展 [J]. 海军总医院学报, 2004, 17(4): 54-62.
- [17] Frederik HE, Harm CA, Graat JE, et al. Replacement of native adenovirus receptor-binding sites with a new attachment moiety diminishes hepatic tropism and enhances bioavailability in mice [J]. Hum Gene Ther, 2008, 19(8): 783-794.
- [18] Hu PF, Chen H, Zhong W, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against PA I-1 mRNA ameliorates hepatic fibrosis in rats [J]. J Hepatology, 2009, 51(1): 102-113.
- [19] Narvaiza I, Aparicio O, Vera M, et al. Effect of adenovirus-mediated RNA interference on endogenous microRNAs in a mouse model of multidrug resistance protein 2 gene silencing [J]. J Virol, 2006, 80(24): 12236-12247.
- [20] Song JS. Activity of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter could be increased by the SV40 enhancer biosci [J]. Biotechnol Biochem, 2004, 68(8): 1634-1639.

[收稿日期] 2011-10-15 [修回日期] 2011-12-27

[本文编辑] 韩丹