

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.004

靶向 VEGF 的不对称 siRNA 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖

王立花, 李鹏, 夏雪飞, 樊燕蓉 (南京理工大学环境与生物工程学院, 江苏南京 210094)

[摘要] **目的:**探讨靶向血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因的 siRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制效果。**方法:**设计靶向 VEGF 的 4 种小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA), 包括对称 siRNA(siRNA21/21, siRNA23/23)与不对称 siRNA(asymmetric siRNA, aiRNA; aiRNA21/23, aiRNA19/21)。siRNA 转染入 MCF-7 细胞后, MTT 及流式细胞术检测 MCF-7 细胞增殖及凋亡情况, RT-PCR、ELISA 法检测 MCF-7 细胞中 VEGF 基因和蛋白的表达。**结果:**与对照组相比, aiRNA21/23、siRNA23/23、aiRNA19/21、siRNA21/21 这 4 种 siRNA 都能有效抑制 VEGF mRNA 的表达[(71.4 ± 5.01)%、(40.0 ± 3.11)%、(37.2 ± 2.79)%、(11.1 ± 0.99)% vs (2.4 ± 0.11)%], $P < 0.01$], 且抑制 MCF-7 细胞的增殖[(44.7 ± 5.38)%、(38.5 ± 5.67)%、(33.6 ± 2.18)%、(33.1 ± 3.18)% vs (2.2 ± 0.28)%], $P < 0.01$], 其中以不对称 aiRNA21/23 的抑制效果最明显。与对照组比较, aiRNA21/23 显著促进 MCF-7 细胞的凋亡[(49.9 ± 4.02)% vs (4.7 ± 0.91)%], $P < 0.01$]**结论:**靶向 VEGF 基因的 siRNA 可抑制 MCF-7 细胞的增殖、促进细胞凋亡, 尤以不对称 siRNA 的效果最明显。

[关键词] 乳腺癌; MCF-7 细胞; RNA 干扰; 不对称 siRNA; 血管内皮生长因子; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)03-0252-05

Asymmetric siRNA targeting VEGF inhibits proliferation of breast cancer MCF-7 cells

WANG Li-hua, LI Peng, XIA Xue-fei, FAN Yan-rong (School of Environmental and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of siRNA targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) gene on proliferation of breast cancer MCF-7 cells. **Methods:** Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF, including 2 siRNAs (siRNA21/21, siRNA23/23) and 2 asymmetric siRNAs (aiRNA) (aiRNA19/21, aiRNA21/23) were designed and synthesized. The siRNA was transfected into MCF-7 cells, and cell proliferation was detected by MTT method, and the apoptosis was analyzed by flow cytometry. VEGF protein and mRNA expression levels of MCF-7 cells were detected by ELISA and RT-PCR. **Results:** Compared with the control group, the 4 siRNAs effectively inhibited VEGF mRNA expression ([71.4 ± 5.01]%, [40.0 ± 3.11]%, [37.2 ± 2.79]%, [11.1 ± 0.99]%) vs [2.4 ± 0.11]%, $P < 0.05$), and the proliferation of MCF-7 cells ([44.7 ± 5.38]%, [38.5 ± 5.67]%, [33.6 ± 2.18]%, [33.1 ± 3.18]%, [2.2 ± 0.28]%, $P < 0.05$), with aiRNA21/23 of the best RNA interference effect. Compared with the control group, the apoptotic rate was significantly increased ([49.9 ± 4.02]%) vs [4.7 ± 0.91]%, $P < 0.05$). **Conclusion:** siRNA targeting VEGF can inhibit proliferation and induce apoptosis of MCF-7 cells, with asymmetric siRNA showing best effects.

[Key words] breast cancer; MCF-7 cell; RNA interference; asymmetric siRNA; vascular endothelial growth factor; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(3): 252-256]

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为促血管生长因子之一,在肿瘤的发生、发展过程中起到关键作用^[1-2]。不同的血管生成因子往往在肿瘤发展过程的不同阶段表达,但是作为促血管生长的关键因子,VEGF在肿瘤发展过程中可全程表达^[3]。许多研究^[4-5]表明,VEGF的表达水平与乳腺癌的大小呈正相关,且 VEGF 的高表达可促进乳腺癌的转移。RNAi 作为高效的、特异的

[基金项目] 国家重大新药创制项目资助(No. 2009ZX09103-635)。Project supported by the National Significant New Drug Creation Project (No. 2009ZX09103-635)

[作者简介] 王立花(1986-),女,河北省石家庄市人,硕士生,主要从事肿瘤血管生长因子的研究。E-mail:wanglihua.110@163.com

[通信作者] 樊燕蓉(FAN Yan-rong, corresponding author), E-mail: yr_fan@sina.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120529.1636.005.html>

基因表达调节技术,已被广泛应用于恶性肿瘤治疗的研究^[6-10]。基于以上研究基础,本研究针对人 VEGF 基因设计合成 4 种小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA),包括普通的对称 siRNA 与不对称 siRNA (asymmetric RNA, aiRNA),对称 siRNA 由长度相等的两条链组成,aiRNA 则由长度不相等的两条链组成,将 siRNA 以及 aiRNA 通过脂质体转染的方法转染入乳腺癌 MCF-7 细胞,观察其对 VEGF 基因表达及细胞增殖的影响,旨在筛选对 MCF-7 细胞增殖抑制效果及 VEGF 基因表达抑制效果较好的 siRNA。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

Lipofectamine™ 2000 及 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,总 RNA 提取试剂购自 Sunshine Bio 公司,RIPA 裂解液购自武汉博士德生物工程有限公司, RNA PCR 试剂盒 (AMV) 购自 TaKaRa 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检验试剂盒购自 Key Gen 公司,人 VEGF 检测 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司。Opti-MEM 购自 Gibco 公司,DMEM/HIGH 培养基购自南京生兴生物技术有限公司,新生牛血清购自 Hyclone 公司。乳腺癌 MCF-7 细胞株购自上海细胞研究所。

1.2 化学合成小干扰 RNA 片段

实验所用的化学合成的 siRNA 由锐博生物有限责任公司合成:靶向人 VEGFA (即 VEGF 家族 7 个成员之一,是 VEGF 家族发现最早、在组织和细胞中含量最丰富、功能最强的成员) (GenBank NM001171630.1) 146~164 的 aiRNA 17+2/19+2 (aiRNA 19/21) 和 siRNA 19+2/19+2 (siRNA21/21),以及同时靶向人 VEGFA (GenBank NM001171629.1) 1419~1439 和鼠 VEGFA (GenBank NM001110268.1) 709~729 的 aiRNA 19+2/21+2 (aiRNA 21/23) 和 siRNA 21+2/21+2 (siRNA23/23) 见表 1。

1.3 MTT 检测 siRNA 转染后 MCF-7 细胞的增殖

取对数生长期的 MCF-7 细胞,调整细胞密度后接种 96 孔板,培养 24 h,待细胞汇合度达到 30%~50% 时开始转染。设 Black 组 (只加 MEM)、阴性对照组 (Control)、人鼠组 (aiRNA21/23、siRNA23/23) 和人组 (aiRNA19/21、siRNA21/21)。各组设 6 个复孔,实验组每孔各加 2 μmol/L siRNA 1 μl 与 0.35 μl Lipofectamine™ 2000 形成的脂质体复合物 50 μl,4 h 后补加含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 150 μl/

孔。转染 48 h 后每孔中加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μl,4 h 后小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μl DMSO,轻度震荡 10 min,测定 490 nm 处的光密度 (D_{490}) 值。重复上述步骤 3 次,计算 siRNA 对 MCF-7 细胞的生长抑制效果。细胞增殖抑制率 (%) = $1 - (\text{实验组 } D_{490} / \text{空白对照组 } D_{490}) \times 100\%$ 。

表 1 化学合成 siRNA 的序列

Tab. 1 Sequences of chemical synthesized siRNA

siRNA	Sequence
aiRNA19/21	5'-AUCAAGAAGUGGUGAAGdTdT-3' 3'-dTdTAGUAGUGCUUACCACUUC-5'
siRNA21/21	5'-UCAUCACGAAGUGGUGAAGdTdT-3' 3'-dTdTAGUAGUGCUUACCACUUC-5'
aiRNA21/23	5'-GUGAAUGCAGACCAAAGAdTdT-3' 3'-dTdTUACACUUACGUCUGGUUUCU-5'
siRNA23/23	5'-AUGUGAAUGCAGACCAAAGAdTdT-3' 3'-dTdTUACACUUACGUCUGGUUUCU-5'

1.4 ELISA 法检测细胞上清及细胞内 VEGF 蛋白的表达

取对数生长期的 MCF-7 细胞,调整细胞密度,接种 6 孔细胞培养板。按照上述方法以 siRNA 转染 MCF-7 细胞,转染 48 h 后分别收集细胞上清液及细胞裂解液,采用 ELISA 法检测 450 nm 波长处的光密度 (D_{450}) 值。以 D_{450} 代表 VEGF 蛋白表达的水平,计算蛋白表达的抑制率。蛋白表达抑制率 (%) = $(1 - \text{实验组 } D_{450} / \text{空白对照组 } D_{450}) \times 100\%$ 。

1.5 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 表达变化

细胞接种 6 孔细胞培养板,转染 48 h 后,一次性抽提总 RNA,以 β -actin 为内参。扩增 VEGF 基因上游引物序列为:5'-GGGCAGAATCATCACGAAGT-3',下游引物序列为:5'-TGGTGATGTTGACTCCTCA-3',扩增产物为 187 bp。扩增内参照 β -actin 基因的上游引物为:5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3',下游引物为:5'-GCCGATCCACACGGACTACT-3',扩增产物 101 bp。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 1 min;循环参数:94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环;最后 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统观察并扫描记录图像,以 VEGF 条带灰度值/内参条带灰度值的相对值表示 VEGF mRNA 的表达水平。根据以上实验筛选得到

对 MCF-7 细胞增殖抑制效果较好的一种 siRNA, 转染后在细胞培养系统上观察细胞增殖情况。

1.6 流式细胞术检测 MCF-7 细胞的凋亡

将对数生长期的 MCF-7 细胞接种 6 孔板, 待细胞密度达到 30% ~ 50% 时开始转染筛选得到的抑制效果较好的 siRNA。转染 72 h 后收集 5×10^5 细胞, 加入 500 μ l 的结合缓冲液悬浮细胞, 加入 5 μ l Annexin V-FITC 混匀, 再加入 5 μ l PI, 混匀, 室温、避光下反应 5 ~ 15 min。用流式细胞仪检测 (Ex = 488 nm, Em = 530 nm) 细胞凋亡的情况。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 软件版本采用 *t* 检验对数据进行分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF siRNA 抑制 VEGF mRNA 的表达

琼脂糖凝胶电泳显示, 各实验组 VEGF mRNA 的表达较阴性对照组与空白对照组都有明显的减弱 (图 1), 各组相应的内参照 β -actin 条带基本一致。运用美国伯乐凝胶成像系统的分析软件对各条带进行灰度扫描, 结果显示, 与对照组相比, 转染 aiRNA21/23、siRNA23/23、aiRNA19/21、siRNA21/21 组 MCF-7 细胞中 VEGF mRNA 的表达均受到了明显的抑制 [(71.4 \pm 5.01)%、(40.0 \pm 3.11)%、(37.2 \pm 2.79)%、(11.1 \pm 0.99)% vs (2.4 \pm 0.11)% , $P < 0.01$]。因此, 人鼠组 siRNA 较人组 siRNA 对 VEGF mRNA 表达的抑制效果强, 尤以人鼠组中 aiRNA21/23 的效果最明显。

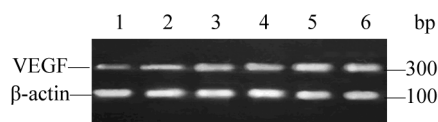


图 1 转染 48 h 后 MCF-7 细胞中 VEGF mRNA 的表达

Fig. 1 VEGF mRNA expression in MCF-7 cells after being transfected for 48 h

1: aiRNA21/23; 2: siRNA23/23; 3: aiRNA19/21; 4: siRNA21/21; 5: Control; 6: Black

2.2 VEGF siRNA 抑制 MCF-7 细胞上清及细胞内 VEGF 蛋白的表达

收集转染 48 h 后的 MCF-7 细胞上清液及细胞裂解液, ELISA 法检测 VEGF 蛋白的表达情况。结果 (图 2) 显示, 靶向人鼠组 siRNA 对 VEGF 蛋白的抑制效果比人组 siRNA 明显, 尤以 aiRNA21/23 对

VEGF 蛋白表达的抑制效果最好。aiRNA21/23、siRNA23/23、aiRNA19/21、siRNA21/21 对 VEGF 表达的抑制率在细胞裂解液中为 (91.6 \pm 6.12)%、(75.8 \pm 4.33)%、(40.5 \pm 4.38)%、(22.8 \pm 3.11)% ; 在细胞上清中为 (42.9 \pm 3.18)%、(31.2 \pm 3.01)%、(27.2 \pm 1.98)%、(19.4 \pm 1.43)% , 故选择 aiRNA21/23 做后续实验。

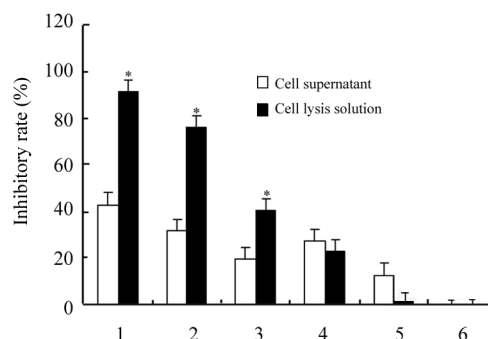


图 2 siRNA 对 MCF-7 细胞上清液及细胞中 VEGF 蛋白表达的抑制

Fig. 2 Inhibitory effect of siRNA on VEGF protein expression in MCF-7 cells and supernatant

1: aiRNA21/23; 2: siRNA23/23; 3: aiRNA19/21; 4: siRNA21/21; 5: Control; 6: Black
* $P < 0.05$ vs cell supernatant

2.3 siRNA 对 MCF-7 细胞增殖的影响

通过 MTT 法检测实验组、阴性对照组及空白对照组对 MCF-7 细胞增殖的抑制情况, 结果 (表 2) 显示, 人鼠组较人组的抑制效果明显, 且人鼠组中不对称的 aiRNA21/23 较对称的 siRNA23/23 对 MCF-7 细胞增殖的抑制效果明显, aiRNA21/23 对 MCF-7 细胞增殖的抑制率达到 (44.7 \pm 5.38)%。

表 2 siRNA 对 MCF-7 细胞增殖的抑制效果

Tab.2 Inhibitory effect of siRNA on proliferation of MCF-7 cells

Group	Inhibitory rate
aiRNA21/23	44.7 \pm 5.38 **
siRNA23/23	38.5 \pm 5.67 **
aiRNA19/21	33.6 \pm 2.18 **
siRNA21/21	33.1 \pm 3.18 **
Control	2.2 \pm 0.28
Black	0

** $P < 0.01$ vs control group

2.4 aiRNA21/23 转染对 MCF-7 细胞增殖的影响

利用活体细胞培养系统将 aiRNA23/21 转染 0~48 h 的 MCF-7 细胞状态进行拍照,以记录各组细胞在转染后不同时间的细胞个数以及细胞状态。结果(图 3)显示,与对照组相比,aiRNA21/23 转染

后 48 h 的细胞在数量上没有明显的增长,且形态上细胞明显皱缩、圆化、体积变小。计算细胞在这 48 h 内的增殖速率,结果(图 4)显示,aiRNA21/23 转染组细胞的增殖速率明显低于对照组。

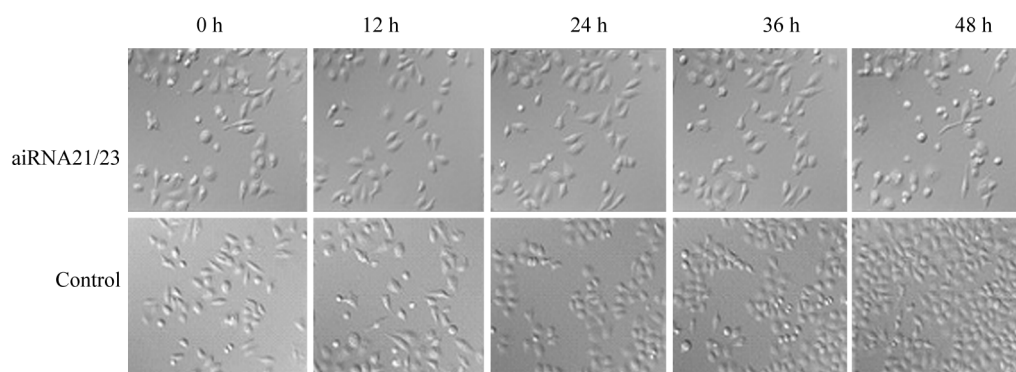


图 3 aiRNA21/23 转染对 MCF-7 细胞生长的影响(×200)

Fig.3 Effect of aiRNA21/23 transfection on growth of MCF-7 cells (×200)

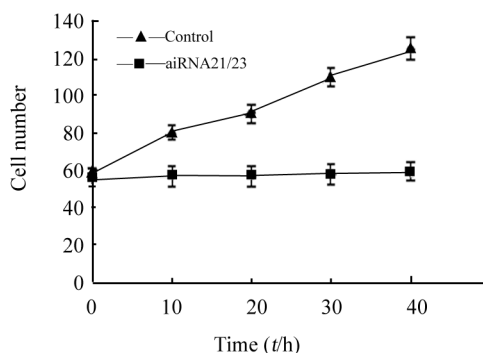


图 4 aiRNA21/23 转染后 MCF-7 细胞的增殖情况

Fig. 4 Proliferation of MCF-7 cells after being transfected by aiRNA21/23

2.5 aiRNA21/23 对 MCF-7 细胞凋亡的影响

在 MCF-7 细胞转染 aiRNA21/23 后 72 h,利用流式细胞术检测 aiRNA21/23 对 MCF-7 细胞的促凋亡。结果(表 3)显示,与对照组相比,aiRNA21/23 转染可以有效促进 MCF-7 细胞的凋亡[(49.6 ± 5.65)% vs (4.47 ± 0.91)% ,P<0.01]。

表 3 aiRNA21/23 促进 MCF-7 细胞的凋亡(n=3, %)

Tab.2 aiRNA21/23 promoted apoptosis of MCF-7 cells (n=3, %)

Group	Cell apoptosis		
	Early	Late	Total
aiRNA21/23	7.2 ± 0.68 **	42.4 ± 4.97 **	49.6 ± 5.65 **
Control	2.1 ± 0.17	2.3 ± 0.74	4.5 ± 0.91

** P<0.01 vs control group

术之一,由于其缺乏有效的载体系统,虽然在实验室中有效地抑制了目的基因的表达,但离应用到临床还有一段漫长的道路。近年来关于 RNAi 在乳腺癌基因治疗领域中的研究^[11]越来越多,主要研究的是将结构对称的 siRNA 转染到乳腺癌细胞,检测其对乳腺癌细胞增殖的抑制效果,而有关结构不对称的 siRNA 的研究很少。

虽然不对称 siRNA 与对称 siRNA 干扰作用机制相同,但是 siRNA 解旋为两条链后,反义链与靶 mRNA 结合引起基因沉默的同时,在细胞内正义链也有可能和序列特异性的 mRNA 结合,从而引起脱靶效应(off-target)。与对称 siRNA 相比,aiRNA 是由长度不相等的两条链组成,一般采用正义链比反义链长度少 2~6 nt 的结构。aiRNA 解旋成长度不等的两条单链,15 nt 或小于 15 nt 的单链 RNA 与 mRNA 的结合能力降低,从而可以有效减少脱靶效

3 讨论

近年来乳腺癌的发病率逐年增高,严重威胁着女性的身体健康。目前传统的癌症治疗手段即放疗和化疗不能从根本上治愈癌症,肿瘤的基因治疗已成为研究热点。RNAi 技术作为基因治疗的重要技

应。Sun 等^[12]设计采用正义链长度为 12~17 nt、反义链为 19 nt 的 aiRNA, 将此 aiRNA 转入哺乳动物细胞。结果显示, aiRNA 可以有效地抑制靶基因的表达, 这种抑制效果比相应的对称 siRNA 更加明显, 且可以有效降低正义链的脱靶效应。另外很多研究^[13-14]发现, siRNA 在发挥干扰作用的时候, 链的选择也与 5'端的热稳定性有关。Sano 等^[15]研究发现, 链末端的结构决定了链的选择, 这种不对称的结构更有利于反义链与 RISC 结合, 反义单链 3'端 2 nt 的突出结构比双链都突出更有效, 反义链更加偏好与 RISC 结合, RNA 干扰效果更好。

在肿瘤细胞能够分泌的众多血管生长因子中, VEGF 是最重要的。一般认为 VEGF 促血管增殖、增加血管的通透性以及抑制细胞凋亡是通过与其受体结合而发挥其作用的, 近年来研究发现, 乳腺癌^[16]、胃癌^[17]、食管鳞癌^[18]等细胞上均有 VEGF 受体的表达, 并且证实了在这些细胞中, VEGF 可以通过与细胞上表达的 VEGF 受体结合发挥其生物学效应。VEGF 通过增加微血管通透性, 刺激血管内皮增殖, 从而促进肿瘤的微血管生成。

本项研究合成了 4 种靶向 VEGF 的 siRNA 片段, 包括由两条长度相等的链组成的 siRNA21/21、siRNA23/23, 及由两条长度不等的链组成的 aiRNA19/21、aiRNA21/23。将化学合成的 siRNA 以脂质体 LipofectamineTM 2000 包裹后转染入乳腺癌 MCF-7 细胞, 结果显示, 靶向人鼠组 siRNA 较靶向人组 siRNA 具有更好的 VEGF 表达抑制效应。与对称的 siRNA 相比, 不对称的 siRNA 显示出更好的靶基因沉默效果, 这与 Sun 等^[12]的研究结果一致。在本实验的 4 种 siRNA 中, 尤以 aiRNA21/23 对 MCF-7 细胞增殖抑制及 VEGF 基因表达抑制的效果最为明显。

[参 考 文 献]

[1] 孙天骏, 韩焱福. VEGF 基因治疗与血管化作用的研究进展 [J]. 中国美容医学, 2010, 19(2): 288-290.
 [2] 蔡源源, 李光早. 血管内皮生长因子的调控及其作用研究进展 [J]. 组织工程与重建外科杂志, 2010, 7(1): 51-54.
 [3] Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, et al. Regulation of distinct steps of angiogenic molecules [J]. Int J Oncol, 1998, 12(4): 749-757.

[4] 王官成, 白桂芝, 袁江勇, 等. 乳腺癌组织中 VEGF 的表达变化及意义 [J]. 山东医药, 2010, 50(30): 90-91.
 [5] Toi M, Bando H, Ogawa T, et al. Significance of vascular endothelial growth factor(VEGF)/soluble VEGF receptor relationship in breast cancer [J]. Int J Cancer, 2002, 98(1): 14-18.
 [6] 魏星, 邢丽娜. shRNA 干扰 VEGF 的表达对宫颈癌 SiHa 细胞凋亡的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(5): 385-387.
 [7] 孙建清, 黄桂香. VEGFR 及受体在子宫内膜癌中的表达意义 [J]. 包头医学院学报, 2010, 26(6): 23-24.
 [8] 张会勇, 刘景晶, 张笑岩, 等. VEGF165 过表达小鼠乳腺癌及肿瘤周边皮肤血管生成模式的影响研究 [J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2010, 38(3): 115-118.
 [9] Wang YH, Liu S, Zhang G, et al. Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibition MCF-7 breast tumor cells growth *in vitro* and *in vivo* [J]. Breast Cancer Res, 2005, 7(2): 220-228.
 [10] Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, et al. Short interfering RNA-mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: Effects on cellular proliferation in colon cancer cells [J]. Arch Surg, 2006, 141(4): 367-374.
 [11] 邓清华, 刘国文, 刘磊, 等. RNAi 及沉默通路调控研究进展 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(1): 92-95.
 [12] Sun XG, Rogoff HA, Li CJ. Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(12): 1379-1382.
 [13] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias [J]. Cell, 2003, 115(2): 209-216.
 [14] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex [J]. Cell, 2003, 115(2): 199-208.
 [15] Sano M, Sierant M, Miyagishi M, et al. Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection [J]. Nucl Acids Res, 2008, 36(18): 5812-5821.
 [16] 岳昌武, 刘坤祥, 程晓明, 等. siRNA 技术及其在乳腺癌治疗中的应用 [J]. 遵义医学院学报, 2008, 3(5): 532-536.
 [17] 陈国庭, 牛宪萍, 张辉, 等. RNA 干扰靶向抑制胃癌细胞血管内皮生长因子 C 表达的实验研究 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2010, 13(1): 64-68.
 [18] 张元松, 赵晖. RNA 干扰抑制食管鳞癌 VEGF 表达的实验研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(17): 1292-1297.

[收稿日期] 2012-03-13 [修回日期] 2012-04-17
 [本文编辑] 韩丹