

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.013

· 基础研究 ·

3TAT-DRBD 融合蛋白的原核表达及其 siRNA 结合活性与穿膜功能的鉴定

刁艳君, 刘家云, 马越云, 苏明权, 郝晓柯(第四军医大学附属西京医院全军临床检验医学研究所, 陕西西安 710032)

[摘要] **目的:** 构建 3TAT-DRBD 重组载体, 表达和纯化融合蛋白, 并对其 siRNA 结合活性和穿膜功能进行初步验证。**方法:** 采用基因合成技术获取靶基因 3TAT-DRBD, 并克隆到原核表达载体 pET-44b 中; 用 IPTG 诱导融合蛋白表达, 镍亲和凝胶层析柱纯化融合蛋白, 凝血酶切除标签, Western blotting 鉴定。凝胶迁移阻滞实验验证 DRBD 和 siRNA 的结合能力, 激光共聚焦显微镜观察 TAT 的穿膜能力。**结果:** 限制性酶切和基因测序表明重组质粒 pET-44b-3TAT-DRBD 构建成功; IPTG 诱导后 3TAT-DRBD 融合蛋白(含 Nus 标签和 S 标签)在大肠杆菌中高效表达, 可溶性蛋白占菌体总蛋白约 80%; 成功切除融合标签并纯化了无标签的融合蛋白, 经 Western blotting 鉴定其相对分子质量约为 17 000; 凝胶迁移阻滞实验证明, 融合蛋白 3TAT-DRBD 能有效结合靶向 survivin 基因的 siRNA(survivin-siRNA); 激光共聚焦显微镜下可见, 在 TAT 的介导下 survivin-siRNA 穿透胞膜进入前列腺癌 PC3 细胞的效率明显增高。**结论:** 成功表达并纯化了具有 siRNA 结合活性与穿膜功能的 3TAT-DRBD 融合蛋白, 为进一步 3TAT-DRBD 的功能研究及临床应用奠定了基础。

[关键词] TAT; DRBD; 融合蛋白; siRNA; 前列腺癌; 结合活性; 穿膜功能

[中图分类号] R737.25; R730.54; Q78

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0201-06

Prokaryotic expression of 3TAT-DRBD fusion protein and identification of its siRNA-binding activity and membrane-penetrating function

Diao Yanjun, Liu Jiayun, Ma Yueyun, Su Mingquan, Hao Xiaoke (Institute for Clinical Laboratory Medicine of PLA, Xijing Hospital Affiliated to Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a recombinant vector 3TAT-DRBD expressing purified fusion protein, and to preliminary validate its siRNA-binding activity and membrane-penetrating function. **Methods:** The target gene 3TAT-DRBD was obtained by gene synthesis and cloned to prokaryotic expression vector pET-44b. The expression of fusion protein was induced by IPTG. The fusion protein was purified by Ni-NTA agarose, and cut by thrombin and detected by Western blotting analysis. The binding activity of DRBD was tested by EMSA and the cytomembrane penetrating activity of TAT was observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **Results:** Restriction enzyme digestion and gene sequencing showed that the recombinant plasmid pET-44b-3TAT-DRBD was successfully constructed. The fusion protein (containing Nus and S tags) induced by IPTG was efficiently expressed in *E. coli*, with the soluble parts accounting for around 80% of the total proteins. The tags were successfully cut off and the fusion protein without tags was purified with a molecular weight of 17 000 Da identified by Western blotting. EMSA identified that the fusion protein 3TAT-DRBD could effectively bind siRNA targeting survivin gene (survivin-siRNA). The efficiency of survivin-siRNA penetrating into prostate cancer PC3 cells mediated by TAT was significantly increased under an observation of CLSM. **Conclusion:** 3TAT-DRBD fusion protein with siRNA-binding activity and cell membrane-penetrating function is successfully expressed and purified, lying a good basis for further functional research and clinical application of 3TAT-DRBD.

[Key words] TAT; DRBD; fusion protein; siRNA; prostate cancer; binding activity; membrane-penetrating function

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 201-206]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30973463, No. 81172446)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30973463, No. 81172446)

[作者简介] 刁艳君(1986-), 女, 山东省威海市人, 硕士生, 主要从事前列腺癌基因治疗的基础研究。E-mail: dyj2202010066@163.com

[通信作者] 郝晓柯(Hao Xiaoke, corresponding author), E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

RNAi 技术是一种序列特异的转录后基因沉默^[1], 可以抑制肿瘤基因的表达, 从而使肿瘤细胞增殖速度减慢, 恶性程度降低, 凋亡加快^[2,4]。但在自然状态下, 细胞对 siRNA 的摄取率低, siRNA 不易内化入靶细胞^[5-7], 选择一种有效的细胞内转运工具携带 siRNA 进入细胞是解决问题的关键。

Survivin 作为一种重要的肿瘤相关基因, 集抗凋亡、促进有丝分裂、调节细胞周期、参与血管形成和化疗耐受等功能于一身^[8-9]。因此, survivin 已经成为肿瘤 RNAi 治疗的新靶点^[10-14]。本课题组曾构建了靶向前列腺癌 survivin 基因的 siRNA 表达载体, 可稳定下调前列腺癌细胞中 survivin 的表达^[15], 为肿瘤的 survivin 靶向治疗奠定了良好基础。然而, siRNA 体内递送效率低下的问题依然没能解决。

TAT (transcriptional activator of transcription) 多肽是蛋白转导域 (protein transduction domain, PTD) 的一种, 其氨基酸序列为 YGRKKRRQRRR^[16]。研究^[17-18]表明, TAT 多肽具有蛋白转导功能, 与之连接的多肽、蛋白质及 DNA 等分子在 TAT 介导下能穿膜导入绝大部分的组织细胞或透过血脑屏障, 转导效率高且对细胞无损伤。本实验将 TAT 与双链 RNA 结合域 (double-stranded RNA-binding domain, DRBD) 融合表达, DRBD 与双链 siRNA 结合, 能有效遮住 siRNA 的负电荷, 避免其与带正电荷的 PTD 聚集成团而失去穿透细胞膜的能力^[19]。为此, 本实验构建了含 3 个 TAT 与 DRBD 的融合基因表达载体, 在原核表达系统中表达并纯化 3TAT-DRBD 融合蛋白, 初步进行功能验证, 旨在寻找靶向前列腺癌细胞 survivin 基因的 siRNA (survivin-siRNA) 有效运载体。

1 材料与方法

1.1 主要材料

含 3 个 TAT 与 DRBD 的融合基因 3TAT-DRBD 由上海生物工程公司合成, 并经宝生物工程 (大连) 公司测序验证。质粒 PET-44b 由第四军医大学基础部生化教研室惠赠, 大肠埃希菌 BL21 (DE3) plysS 菌株购自碧云天公司, T4 DNA 连接酶、快速 *Sma* I 和 *Xho* I 限制性核酸内切酶、DNA marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。质粒小量提取试剂盒购自 Promega 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qia-gen 公司, IPTG 和凝血酶购自 Sigma 公司, 预染蛋白 marker 购自 Thermo Scientific 公司, 高保真酶 pFu DNA 聚合酶、dNTP 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 核荧光染料 DAPI、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司, 鼠源 Anti-His (C-term) 抗体购自

Invitrogen 公司, 鼠源 Anti-HIV TAT 抗体购自 Abcam 公司, 荧光标记的羊抗小鼠 IgG 二抗购自 Odyssey 公司, His GraviTrap 纯化柱和 His Buffer 试剂盒均购自 GE Healthcare 公司。标记 FITC 的 TAT 多肽由西安蓝晶生物科技有限公司合成, FAM 标记的 survivin-siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成。PC3 前列腺癌细胞系由本实验室保存。

1.2 重组表达质粒的构建与酶切鉴定

质粒提取、酶切、连接、转化和 DNA 胶回收纯化均按文献和试剂盒说明书进行。采用 PCR 法在 3TAT-DRBD 基因两端引入酶切位点。将回收后的 PCR 产物和空载体 pET-44b 分别用快速限制性内切酶 *Sma* I 和 *Xho* I 双酶切 15 min, 酶切产物用胶回收试剂盒回收。按目的基因与载体的摩尔质量比为 3:1 用 T4 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化感受态大肠杆菌 DH5-a, 经氨苄青霉素筛选挑取单克隆、提取质粒、酶切鉴定并经序列测定后得到重组表达载体 pET-44b-3TAT-DRBD。

1.3 工程菌 BL21 (DE3) plysS 的转化和 3TAT-DRBD 融合蛋白的诱导表达

将重组表达质粒 pET-44b-3TAT-DRBD 转化感受态 BL21 (DE3) plysS 大肠杆菌, 转化的菌液铺于含 Ampicillin (50 mg/L) 的 LB 固体平板上, 37 °C 温箱培养。待长出菌落后挑取单个菌落接种于 5 ml 含 Amp (50 µg/ml) 的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜, 次日按 1:50 的比例接种于新鲜 LB 液体培养基中, 扩大培养至 D_{600} 为 0.6 ~ 0.8 之间时加入 IPTG 使其终浓度为 0.5 mmol/L, 30 °C 诱导 3 h 后, 离心收集菌体, 加入 20 ml 结合缓冲液 (20 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 磷酸钠, pH7.4) 重悬菌体。然后冰浴超声破菌 (破碎 5 s, 停顿 10 s, 共进行 30 min), 将菌液置超速冷冻离心机中 15 000 × *g* 离心 10 min, 弃沉淀以除去细胞壁, SDS-PAGE 分析融合蛋白 3TAT-DRBD 的表达。

1.4 3TAT-DRBD 融合蛋白标签的切除及纯化、鉴定

用结合缓冲液平衡好镍亲和凝胶层析柱, 加入离心得到的超声上清液, 待样品滤过后加入 10 ml 结合缓冲液清洗 2 次, 洗去不结合的杂质蛋白, 加入 3 ml 洗脱缓冲液 (500 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 磷酸钠, pH7.4), 收集蛋白。测定洗脱液中蛋白浓度。在纯化蛋白溶液中加入凝血酶 (1 × PBS 溶解, pH 8.4, 起始浓度为每毫克融合蛋白加入 10 U 的凝血酶, 后倍比增加), 室温和 37 °C 分别切割 36 h, 摸索最佳酶切条件。SDS-PAGE 检测融合蛋白是否被切下。切下后调整咪唑浓度为

20 mmol/L,再次过柱纯化。取洗脱下来的融合蛋白 3TAT-DRBD 进行 SDS-PAGE。然后将其转到硝酸纤维素膜上,经 5% 脱脂奶粉在室温封闭 1 h,向两张膜分别加入一抗小鼠抗 C 端 His 标签抗体稀释液(稀释比为 1:2 500)和一抗小鼠抗 HIV 病毒 TAT 多肽抗体稀释液(稀释比为 1:1 000),4 ℃ 过夜,TBST 清洗 3 遍后再将两张膜分别与二抗羊抗小鼠 IgG 稀释液(稀释比为 1:2 500)在室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 充分洗涤,odyssey 红外荧光扫描成像系统扫描膜成像,观察切除融合标签的目的蛋白大小,切割程度及纯化效果。

1.5 凝胶迁移阻滞实验验证 DRBD 的 siRNA 结合能力

将合成 survivin-siRNA 干粉用 DEPC 水溶解,终浓度 20 mmol/L。取 3.8 μl 溶液即 1 μg siRNA 分别与 1、4、10 μg 经凝血酶切后纯化的 3TAT-DRBD 融合蛋白 37 ℃ 共孵育 1h,同时设立 siRNA、BSA + siRNA 作对照,孵育完后经 3% 琼脂糖凝胶电泳,观察经 DRBD 作用后的 siRNA 电泳速率变化。

1.6 激光共聚焦显微镜观察 TAT 的穿膜能力

培养本实验室保存的前列腺癌 PC3 细胞,于 24 孔板中制作细胞爬片,然后分别向两个孔中加入绿色荧光染料 FAM 标记的 survivin-siRNA 1 μg 及绿色荧光染料 FAM 标记的 survivin-siRNA 1 μg 与 3TAT-DRBD(10 μg)共孵育,37 ℃ 培养过夜。激光共聚焦显微镜观察前用蓝色荧光染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)室温避光染核 5 min,根据蓝染的胞核确定细胞位置。若 3TAT-DRBD 融合蛋白的 DRBD 部分能与 survivin-siRNA 结合,并在 TAT 的携带下穿膜进入细胞,则在激光共聚焦显微镜下可见细胞发出绿色荧光信号。比较细胞内绿色荧光信号强度差异。

2 结果

2.1 重组表达载体 pET-44b-3TAT-DRBD 成功构建

重组表达载体 pET-44b-3TAT-DRBD 用 *Sma* I 和 *Xho* I 双酶切后获得与理论 3TAT-DRBD 基因长度一致的小片段(图 1)。DNA 测序证实其基因序列正确,表明重组原核表达载体 pET-44b-3TAT-DRBD 构建成功。

2.2 大肠杆菌中 3TAT-DRBD 的诱导表达

将 pET-44b-3TAT-DRBD 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 中,30 ℃ IPTG 诱导 3 h。同时设立阴性对照:空菌 BL21(DE3)plysS、菌体中只含空载体 pET-44b、菌体中含重组质粒但不加 IPTG 诱导。从 SDS-PAGE 图上分析,与阴性对照相比,在相对分子质量

为 80 000 左右处有蛋白条带,与预期分子质量吻合(含 Nus 标签和 S 标签)。同时做 Western blotting 鉴定,根据重组基因的设计方案,若此蛋白为目标蛋白则其 C 端含有由 6 个组氨酸构成的融合标签,用抗 C 端 His 标签抗体做一抗,经检测此相对分子质量为 80 000 的蛋白 C 端 His 标签阳性,初步认定此蛋白即为目标蛋白 3TAT-DRBD(含 Nus 标签和 S 标签)。为提高可溶性蛋白产量,进一步降低诱导温度至 25 ℃,延长诱导时间至 15 h,SDS-PAGE 分析可见可溶性蛋白产量明显增高,灰度扫描分析显示,表达 3TAT-DRBD 融合蛋白约占菌体总蛋白的 80%(图 2)。

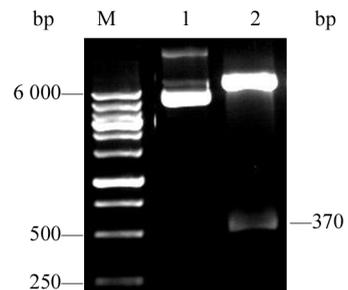


图 1 重组质粒 pET-44b-3TAT-DRBD 的双酶切鉴定
Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET-44b-3TAT-DRBD by double restriction enzyme digestion
M: DNA marker; 1: Plasmid pET-44b; 2: Plasmid pET-44b-3TAT-DRBD digested with *Sma* I and *Xho* I

2.3 3TAT-DRBD 融合蛋白纯化及标签切除

3TAT-DRBD 融合蛋白以上清液形式存在,经 His 标签纯化树脂纯化后,SDS-PAGE 分析得到一条相对分子质量为 80 000 左右的单一条带(图 3)。用凝血酶酶切 Nus·Tag 和 S·Tag,SDS-PAGE 分析可知,在 37 ℃ 每毫克融合蛋白加入凝血酶含量为 40 U 时切割 36 h 能保证融合蛋白被完全切下(图 4)。

2.4 3TAT-DRBD 融合蛋白的鉴定结果

将酶切完全的融合蛋白重新纯化,SDS-PAGE 分析得到一条相对分子质量位于 17 000~28 000 之间的单一条带。进一步做 Western blotting 鉴定,将此蛋白转移到 NC 膜上后,用抗 C 端 His 标签抗体做一抗,Western blotting 结果阳性。因抗 C 端 His 标签抗体特异性不强,进一步用抗 TAT 特异性抗体做一抗再次鉴定,此条带仍为阳性,最终确认该条带即为 3TAT-DRBD 融合蛋白,相对分子质量与理论值 17 000 吻合(图 5)。

2.5 3TAT-DRBD 融合蛋白有效结合 siRNA

融合蛋白中的双链 RNA 结合蛋白 DRBD 能与 survivin-siRNA 结合,从而使其分子质量增大,在电

场中迁移受阻。与单纯 survivin-siRNA 相比,随着加入的融合蛋白 3TAT-DRBD 量的递增, survivin-siRNA 迁移速率阻滞效果愈发明显;与加入不包含 DRBD 的 BSA 相比, survivin-siRNA 迁移率则无明显变化。结果证明融合蛋白中的 DRBD 能有效地与 survivin-siRNA 结合(图 6)。

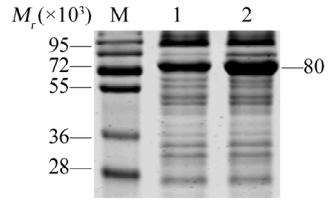


图 3 纯化后 3TAT-DRBD 融合蛋白

(带 Nus 标签和 S 标签)的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of 3TAT-DRBD fusion protein (with Nus · Tag and S · Tag) after purification

M: Maker; 1: Supersonic supernatant

from BL21(DE3)plysS with the pET-44b-3TAT-DRBD expression plasmid; 2: Purification of 1

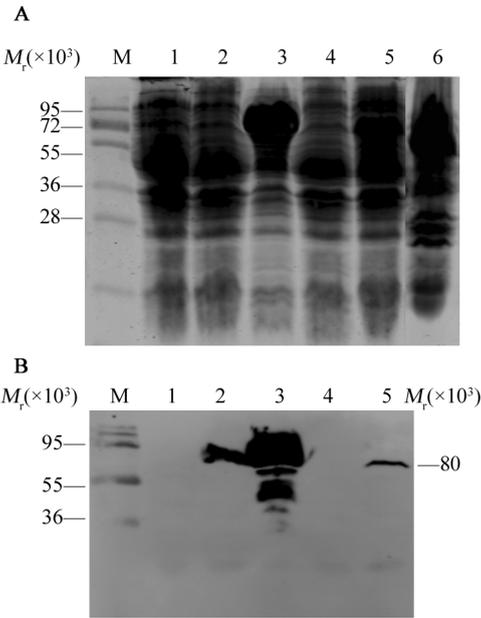


图 2 3TAT-DRBD 融合蛋白(带 Nus 标签和 S 标签) IPTG 诱导表达的分析

Fig. 2 Analysis of the expression of 3TAT-DRBD fusion protein (with Nus · Tag and S · Tag) after induced by IPTG

A: SDS-PAGE; B: Western blotting

M: Maker; 1; BL21(DE3) plysS, 30 °C, 3 h,

IPTG 0 mmol/L; 2: BL21(DE3) plysS + pET-44b, 30 °C, 3 h,

IPTG 0 mmol/L; 3: BL21(DE3) plysS + pET-44b, 30 °C,

3 h, IPTG 0.5 mmol/L; 4: BL21(DE3) plysS + pET-44b-

3TAT-DRBD, 30 °C, 3 h, IPTG 0 mmol/L; 5: BL21(DE3)

plysS + pET-44b-3TAT-DRBD, 30 °C, 3 h, IPTG 0.5

mmol/L; 6: BL21(DE3) plysS + pET-44b-3TAT-DRBD,

25 °C, 15 h, IPTG 0.5 mmol/L

2.6 3TAT-DRBD 融合蛋白高效穿膜

3TAT-DRBD 融合蛋白中的 DRBD 成分结合 survivin-siRNA,并在 TAT 的携带下穿膜进入细胞,激光共聚焦显微镜下可见细胞发出绿色荧光信号,可用光信号强弱来判断 survivin-siRNA 内化进入细胞的效率高低。与单纯依靠 survivin-siRNA 内吞进入细胞相比,将 survivin-siRNA 与 3TAT-DRBD 融合蛋白共孵育后再作用细胞,其荧光信号明显增强,证明穿膜肽 TAT 能高效携带 survivin-siRNA 穿膜,同时也再次证明 survivin-siRNA 能有效与 3TAT-DRBD 融合蛋白结合(图 7)。

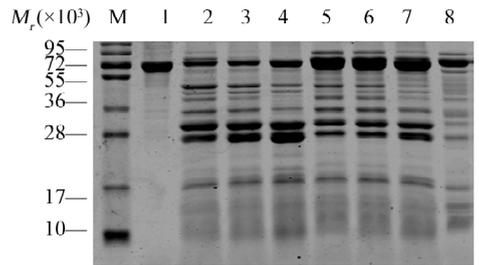


图 4 凝血酶切割融合蛋白的最适温度和比例 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the optimal incision temperature and ratio to 3TAT-DRBD fusion protein of thrombin

M: Maker; 1: Purified protein

3TAT-DRBD with Nus · Tag and S · Tag;

2: Thrombin; 3-5: 37 °C, 36 h, 10 U, 20 U, 40 U of thrombin to fusion protein per mg; 6-8: Room temperature, 36 h, 10 U, 20 U, 40 U of thrombin to fusion protein per mg

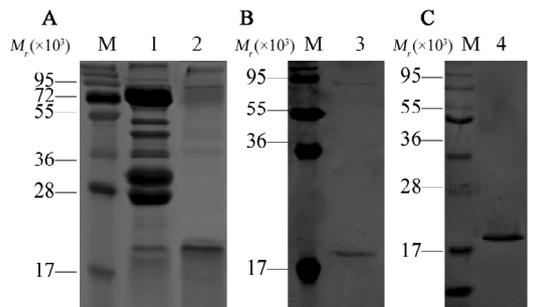


图 5 切除标签的 3TAT-DRBD 融合蛋白鉴定
Fig. 5 Identification of 3TAT-DRBD fusion protein without Nus · Tag and S · Tag

A: SDS-PAGE, B, C: Western blotting

M: Maker; 1: Purified fusion protein

3TAT-DRBD incised by thrombin; 2: Purification of 1; 3: Western blotting analysis of 2, Anti-His Ab;

4: Western blotting analysis of 2, Anti-TAT Ab

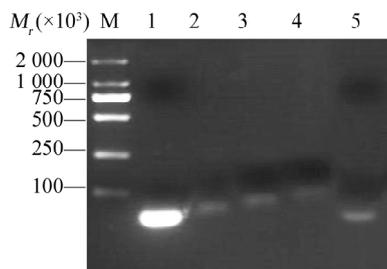


图6 凝胶迁移阻滞实验鉴定 3TAT-DRBD 融合蛋白与 survivin-siRNA 的结合

Fig. 6 Identification of binding activity of 3TAT-DRBD fusion protein with survivin-siRNA by EMSA

M: Marker; 1: survivin-siRNA; 2: Survivin-siRNA + 1 μg 3TAT-DRBD; 3: Survivin-siRNA + 4 μg 3TAT-DRBD; 4: Survivin-siRNA + 10 μg 3TAT-DRBD; 5: Survivin-siRNA + 4 μg BSA

3 讨论

前列腺癌是男性生殖系统最常见的恶性肿瘤, 尤其在美国, 它仅次于肺癌成为男性癌症死亡的第

二位病因^[20]。在我国, 由于人口老龄化近年来发病率有所增加。本课题组前期在前列腺癌的靶向治疗方面做了大量工作, 构建了靶向 survivin 的 siRNA 表达载体, 并能稳定下调前列腺癌细胞中 survivin 基因的表达^[15], 有效杀伤肿瘤细胞, 为前列腺癌的靶向基因治疗奠定了良好基础。然而, survivin-siRNA 体内递送效率低下的问题依然没能解决^[5]。

向肿瘤细胞递送 siRNA 的方法众多, 常用的脂质体转染效率低 (< 20%), 且对细胞的毒性作用较大; 病毒载体插入突变和产生非特异细胞免疫作用等限制了其临床应用。TAT 多肽不仅具有广谱的蛋白转导作用, 且转导速度快、效率高, 能高效地进入体外培养细胞和体内组织中, 甚至可以穿透公认的穿膜较困难的组织如血脑屏障等^[17-18]。此外, TAT 多肽只有 10 个氨基酸, 分子量小, 不增加转导蛋白质的免疫原性。国外虽有将 PTD 与 DRBD 融合的报道, 但是 PTD 种类繁多, 未见有采用 TAT 蛋白者^[19]。本实验将 3 个 TAT 串联, 增强其穿膜活性, 然后与 DRBD 融合, 构建了携带 survivin-siRNA 的蛋白运载体, 有望克服 siRNA 难以穿膜的问题。

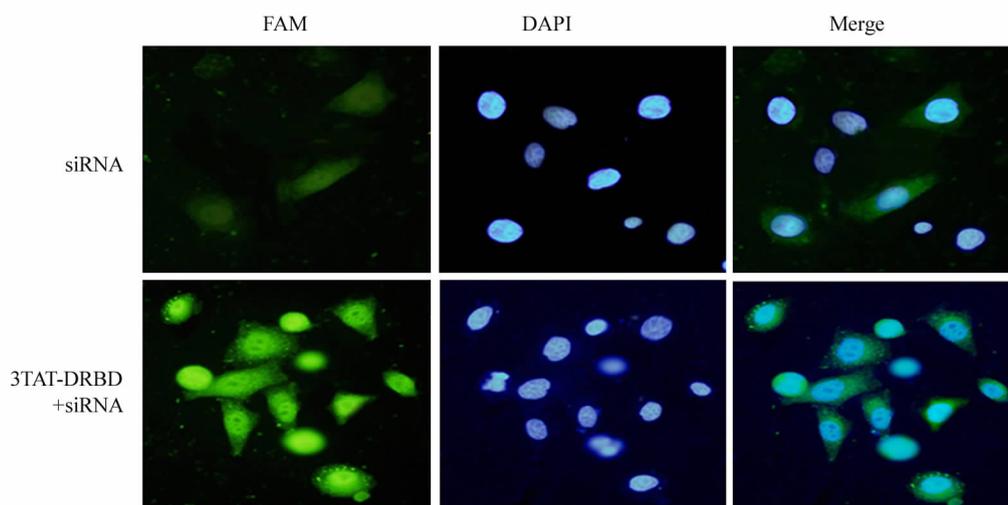


图7 激光共聚焦验证 3TAT-DRBD 融合蛋白携带 survivin-siRNA 穿膜 ($\times 200$)

Fig. 7 Identification of cell-penetrating activity of 3TAT-DRBD fusion protein carrying survivin-siRNA by CLSM ($\times 200$)

本实验中选用 BL21(DE3)pLysS 大肠杆菌作为原核表达宿主菌, 该菌株携带 T7 溶菌酶基因, T7 溶菌酶在不干扰 IPTG 诱导表达的前提下, 能够降低目的蛋白的背景表达水平, 适合于下一步引入毒性蛋白 streptavidin 的表达。为了提高可溶性融合蛋白的表达效率, 本研究采用低温长时、低 IPTG 诱导浓度等方法获得了可溶性融合蛋白 3TAT-DRBD 的

高效表达。由于融合蛋白选择的载体带有 6 个 His, 故很容易通过 His 标签纯化树脂进行纯化。为了提高可溶性蛋白表达比例, 融合蛋白上携带了 Nus 标签和 S 标签, 后利用高特异性和活性的凝血酶切除 Nus 标签和 S 标签, 得到 3TAT-DRBD 融合蛋白。功能验证时, 在 survivin-siRNA 上标记荧光, 根据细胞内荧光信号验证 TAT 的穿膜活性, 也证明了

survivin-siRNA 与 DRBD 的有效结合。

总之, 本研究构建了重组 pET-44b-3TAT-DRBD 的原核表达载体, 成功表达和纯化了带有穿膜肽的融合蛋白 3TAT-DRBD, 并初步验证了其结合 survivin-siRNA 能力及其穿膜功能, 为进一步研究及临床应用奠定了基础。

[参 考 文 献]

[1] Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code [J]. Nature, 2009, 457(7228): 396-404.

[2] Novobrantseva TI, Akinc A, Borodovsky A, et al. Delivering silence: Advancements in developing siRNA therapeutics [J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2008, 11(2): 217-224.

[3] Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL, et al. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications [J]. Trends Biotechnol, 2010, 28(11): 570-579.

[4] Crunkhorn S. Trial watch: Pioneering RNAi therapy shows antitumour activity in humans [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(3): 178.

[5] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG, et al. Knocking down barriers: Advances in siRNA delivery [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(2): 129-138.

[6] Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, et al. RNA interference in the clinic: Challenges and future directions [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(1): 59-67.

[7] Shim MS, Kwon YJ. Efficient and targeted delivery of siRNA *in vivo* [J]. FEBS J, 2010, 277(23): 4814-4827.

[8] Zaffaroni N, Costa A, Pennati M, et al. Survivin is highly expressed and promotes cell survival in malignant peritoneal mesothelioma [J]. Cell Oncol, 2007, 29(6): 453-466.

[9] Uehara S, Oue T, Kawatsu M, et al. Increased expression of survivin in hepatoblastoma after chemotherapy [J]. Eur J Pediatr Surg, 2013 [Epub ahead of print].

[10] Li QX, Zhao J, Liu JY, et al. Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(7): 860-866 .

[11] Zhang R, Wang T, Li KN, et al. A survivin double point mutant has potent inhibitory effect on the growth of hepatocellular cancer cells [J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(4): 547-554.

[12] Li Z, Yin PH, Yang SS, et al. Recombinant attenuated salmonella typhimurium carrying a plasmid co-expressing ENDO-VEGII51 and survivin siRNA inhibits the growth of breast cancer *in vivo* [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(4): 1215-1222.

[13] Li H, Gong J, Jiang X, et al. Arsenic trioxide treatment of rabbit liver VX-2 carcinoma via hepatic arterial cannulation-induced apoptosis and decreased levels of survivin in the tumor tissue [J]. Croat Med J, 2013, 54(1): 12-16.

[14] Budman DR, Calabro A, Rosen L, et al. Identification of unique synergistic drug combinations associated with downexpression of survivin in a preclinical breast cancer model system [J]. Anticancer Drugs, 2012, 23(3): 272-279.

[15] Shen J, Liu J, Long Y, et al. Knockdown of survivin expression by siRNAs enhances chemosensitivity of prostate cancer cells and attenuates its tumorigenicity [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2009, 41(3): 223-230.

[16] Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus [J]. J Biol Chem, 1997, 272(25): 16010-16017.

[17] Jones SW, Christison R, Bundell K, et al. Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery [J]. Br J Pharmacol, 2005, 145(8): 1093-1102.

[18] Rapoport M, Lorberboum-Galski H. TAT-based drug delivery system—new directions in protein delivery for new hopes? [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2009, 6(5): 453-463.

[19] Eguchi A, Dowdy SF. Efficient siRNA delivery by novel PTD-DRBD fusion proteins [J]. Cell Cycle, 2010, 9(3): 424-425.

[20] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

[收稿日期] 2013 - 01 - 05 [修回日期] 2013 - 03 - 02
[本文编辑] 王莹, 黄静怡

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

文稿中数字用法的要求

本刊严格执行国家标准《出版物上数字用法的规定》, 文稿中凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。(1) 公历世纪、年代、年、月、日和时、分、秒必须使用阿拉伯数字, 如 20 世纪 90 年代、2006 - 02 - 15、5 h、30 min、30 s、14: 36: 08 等; 年份不能用简称, “1998 年” 不能写作“98 年”。(2) 物理量量值必须使用阿拉伯数字。(3) 非物理量量词前面数字一般也应使用阿拉伯数字, 如 3 支、5 根等。(4) 数值范围的表达要求: 5 万至 10 万应写成 5 万 ~ 10 万, 不能写成 5 ~ 10 万; 3×10^9 至 5×10^9 应写成 $3 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$, 或 $(3 \sim 5) \times 10^9$, 不能写成 $3 \sim 5 \times 10^9$; 60% 至 70% 不能写成 60 ~ 70%, 应写成 60% ~ 70%; 25.5 ± 0.5 mg 应写成 (25.5 ± 0.5) mg。(5) 带单位的量值相乘时, 每个数值后单位不能省略, 如 4 mm \times 2 mm \times 3 mm, 不能写成 $4 \times 2 \times 3$ mm 或 $4 \times 2 \times 3$ mm³。