

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.012

· 基础研究 ·

靶向 *hTERT* 的 RNAi 载体的构建及其对大肠癌 SW-480 细胞增殖的影响

孙彦, 孟永亮(山东万杰医学院 医学系 内科学教研室, 山东 淄博 255213)

[摘要] **目的:** 构建靶向人大肠癌细胞端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*)基因的 RNAi 载体, 探讨其对人大肠癌 SW480 细胞增殖的影响。**方法:** 设计 3 条靶向 *hTERT* 的 shRNA 序列和阴性对照序列, 分别克隆入 pGPU6/GFP/Neo 载体, 构建 RNAi 载体 pGPU6-*hTERT*-1、2、3 和阴性对照载体 pGPU6-*hTERT*-NC, 转染 SW480 细胞。RT-PCR 检测各组载体对 *hTERT* mRNA 表达的影响, MTT 法检测下调 *hTERT* mRNA 表达对 SW480 细胞增殖的影响。**结果:** 成功构建 3 个携带 *hTERT* mRNA 序列的重组载体, 3 种 RNAi 载体均能明显抑制 SW480 细胞 *hTERT* mRNA 的表达, pGPU6-*hTERT*-3 组 SW480 细胞 *hTERT* mRNA 表达水平较空白对照组下调最为显著(0.347 ± 0.028 vs 0.513 ± 0.032 , $P < 0.01$)。转染 3 种 RNAi 载体均能明显抑制 SW480 细胞增殖, pGPU6-*hTERT*-3 组细胞增殖抑制率较空白对照组、脂质体对照组和 pGPU6-*hTERT*-NC 组升高最为显著($50.08 \pm 0.43\%$ vs $4.11 \pm 0.39\%$ 、 $3.88 \pm 0.35\%$ 、 $3.38 \pm 0.35\%$, $P < 0.05$)。**结论:** 转染 RNAi 载体 pGPU6-*hTERT*-3 能够抑制 SW480 细胞的增殖, 其机制可能与降低 *hTERT* 基因的表达从而抑制端粒酶活性有关。

[关键词] 大肠癌; RNA 干扰; 人端粒酶逆转录酶; SW-480 细胞; 增殖

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0423-05

Effect of RNAi-mediated silencing of the human telomerase reverse transcriptase gene on colorectal cancer cell proliferation *in vitro*

Sun Yan, Meng Yongliang (Teaching-research Office of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Shandong Wanjie Medical College, Zibo 255213, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To construct an optimized human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene-specific RNAi and to evaluate its effect on human colon cancer cell proliferation *in vitro*. **Method:** Three *hTERT*-specific RNAi sequences and a negative control (NC) or scrambled sequence were cloned, respectively, into a pGPU6/GFP/Neo vector to generate pGPU6-GFP-*hTERT*-1, pGPU6-GFP-*hTERT*-2, pGPU6-GFP-*hTERT*-3 and pGPU6-GFP-NC. Human colon cancer SW480 cells were transfected with these vectors respectively. At 24, 48 and 72 h after transfection, *hTERT* mRNA abundance was assessed by RT-PCR and cell viability by MTT assay. **Results:** The 3 *hTERT*-specific RNAi vectors constructed were all effective to silence the *hTERT* gene; *hTERT* mRNA abundance in SW480 cells transfected with pGPU6-GFP-*hTERT*-3 was significantly lower than that in SW480 cells transfected with pGPU6-GFP-NC (0.347 ± 0.028 vs 0.513 ± 0.032 , $P < 0.01$). All the three *hTERT* sequence-specific RNAi vectors were effective to inhibit the proliferation of SW480 cells; cellular proliferation inhibition rate in SW480 cells of pGPU6-GFP-*hTERT*-3 group was significantly increased than that of blank control, liposomal and NC group ($50.08 \pm 0.43\%$ vs $4.11 \pm 0.39\%$, $3.88 \pm 0.35\%$ and $3.38 \pm 0.35\%$; $P < 0.05$). **Conclusion:** RNAi-mediated *hTERT* gene silencing results in colon cancer cell growth inhibition and may offer a novel therapy for colon cancer.

[Key words] colorectal cancer; RNA interference; human telomerase reverse transcriptase; SW-480 cell; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 423-427]

[基金项目] 山东万杰医学院校级课题(No. X10ZK02)。Project supported by the Shandong Wanjie Medical School Subject (No. X10ZK02)

[作者简介] 孙彦(1980-),女,山西省忻州市人,硕士,讲师,主要从事内科学的教学与科研,E-mail: 631007529@qq.com

[通信作者] 孙彦(Sun Yan, corresponding author), E-mail: 631007529@qq.com

端粒酶与细胞的永生化和癌变密切相关, 它的激活对肿瘤的发生和发展起着重要作用^[1]。人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, *hTERT*) 是端粒酶的核心催化亚单位^[2], *hTERT* 基因可以自身 RNA 为模板合成端粒 DNA 并加到染色体末端, 使端粒延长, 通过向正常细胞中转入 *hTERT* 可以重建端粒酶的活性, 使细胞的端粒长度得到修复和保持, 细胞可以越过危机期而发生永生^[3]。大肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 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^[4], 本研究构建带有 *hTERT* 基因的短发夹环状小干扰 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的重组载体, 并将其转染到人大肠癌细胞 SW480 中, 筛选出抑制效果最好的重组表达载体, 检测其对 SW480 细胞增殖的影响, 以期为大肠癌基因治疗奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

pGPU6/GFP/Neo 载体购自上海吉玛公司。限制性内切酶 *Bbs* I、*Bam*H I 和 *Pst* I 均购自 MBI 公司。T4 连接酶、载体小提试剂盒和 DNA 胶回收纯

化试剂盒购自天根公司。Lipofectamine™ 2 000 购自碧云天公司, DMEM 培养基、胎牛血清均购自 Hyclone 公司。寡核苷酸链由上海吉玛生物公司合成。大肠癌细胞 SW480 购自 ATCC。

1.2 设计并合成靶向 *hTERT* 的 shRNA 序列

利用 GenBank 检索 *hTERT* 的序列 (NM_001193376.1), 按照 Tuschl 设计原则设计通用阴性对照 (negative control, NC) 序列和 siRNA 序列, 对选定的序列进行同源性分析, 最后选出 3 条片段作为 *hTERT* 基因干扰片段, 设计并合成靶向 *hTERT* 基因的 shRNA 序列 (表 1)。设计 shRNA 模板中的茎环结构选用了 TTCAAGAGA 以避免形成终止信号, shRNA 的转录终止序列采用 TTTTTT 结构。正义链模板的 5' 端添加了 CACC, 与 *Bbs* I 酶切后形成的黏端互补; 反义链模板的 5' 端添加了 GATC 与 *Bam*H I 酶切后形成的黏端互补; 如果 siRNA 的第一个碱基不是 G, 则在 CACC 后补加个 G。将 DNA oligo 用 TE (pH 8.0) 溶解, 浓度为 100 μmol/L。取相应的正义链和反义链 oligo 溶液各 5 μl, 使用 PCR 仪进行退火反应, 条件为 95 °C、5 min, (95-n) °C 20 s, 共 70 个循环。n 为当前循环数。将所得产物溶液稀释至 20 nmol/L, 用于 RNAi 载体的构建。

表 1 *hTERT* 基因的 shRNA 序列
Tab. 1 shRNA sequences of *hTERT* gene

Name	shRNA sequence
<i>hTERT-1</i>	Sense: 5'-CACCGTGTACGCCGAGACCAATTCTCAAGAGA AATTGGTCTCGGCGTACACCGTTTTTT-3' Antisense: 5'-GATCAAAAAACGGTGTACGCCGAGACCAATTCTCTTGAGAATTGGTCTCGGCGTACAC-3'
<i>hTERT-2</i>	Sense: 5'-CACCGCCAGTCTCACCTTCAATTCTCAAGAGAAATTGAAGGTGAGACTGGCTCTTTTT-3' Antisense: 5'-GATCAAAAAAGAGCCAGTCTCACCTTCAATTTCTCTTGAGAATTGAAGGTGAGACTGGC-3'
<i>hTERT-3</i>	Sense: 5'-CACCGTGTGCACCAACATCTATTCTCAAGAGA AATAGATGTTGGTGCACACCGTTTTTT-3' Antisense: 5'-GATCAAAAAACGGTGTGCACCAACATCTATTCTCTTGAGAATAGATGTTGGTGCACAC-3'
<i>hTERT-NC</i>	Sense: 5'-CACCTCCGAACGTGTACGTTTCTCAAGAGAAAACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTT-3' Antisense: 5'-GATCAAAAAATTCTCCGAACGTGTACGTTTTTCTCTTGAGAAACGTGACACGTTCCGAG-3'

1.3 RNAi 载体的构建与鉴定

取 2 μg pGPU6/GFP/Neo 载体, 37 °C 下 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切 1 h, 琼脂糖凝胶电泳分离, 回收载体片段, 调整至 50 ng/μl, 将其与退火得到的 *hTERT-1*、*hTERT-2*、*hTERT-3* 和 *hTERT-NC* 基因片段混合, 用 T4 连接酶在 22 °C 下进行连接反应 1 h。取 5 μl 连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 卡那霉素培养筛选阳性克隆, 用载体小提试剂盒抽提载体, 所得

载体用 *Pst* I 和 *Bam*H I 分别酶切鉴定。将初步鉴定正确的细菌扩增培养, 取菌液进行测序鉴定。得到的重组载体分别命名 pGPU6-*hTERT-1*、*hTERT-2*、*hTERT-3* 和 pGPU6-*hTERT-NC*。

1.4 重组 RNAi 载体转染大肠癌 SW480 细胞

实验分为空白对照组 (仅加入 SW480 细胞)、脂质体对照组 (加入等量转染试剂)、pGPU6-*hTERT-1* 组、pGPU6-*hTERT-2* 组、pGPU6-*hTERT-3* 组和

pGPU6-hTERT-NC 组。取对数生长期的 SW480 细胞,胰蛋白酶消化,调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{ml}$,接种至 6 孔板中,待细胞长至 70% ~ 80% 汇合后进行转染。因 pGPU6/GFP/Neo 载体带有 *GFP* 报告基因,通过荧光显微镜观察不同时间点(24、48、72 h)绿色荧光蛋白的表达,计算阳性细胞数百分比,得出重组载体转染效率。

1.5 MTT 法检测转染 RNAi 重组载体对 SW480 细胞增殖的影响

实验分组同上,每组设 5 个复孔。在转染后 24、48、72 h 向培养孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT 液,置培养箱中继续培养 4 h,吸弃孔内培养上清液,每孔加入 DMSO 200 μl ,置于摇床上震荡混匀,使蓝紫色沉淀充分溶解,酶标仪测定 490 nm 波长处光密度(*D*)值。细胞增殖抑制率(%) = [(对照组 *D* 值 - 空白组 *D* 值) - (实验组 *D* 值 - 空白组 *D* 值)] / (对照组 *D* 值 - 空白组 *D* 值) $\times 100\%$,绘制细胞生长抑制曲线图。

1.6 RT-PCR 检测重组 RNAi 载体转染对 SW480 细胞 *hTERT* mRNA 表达的影响

取对数生长期的各组 SW480 细胞,转染后分别培养 24、48、72 h,收集细胞,提取细胞总 RNA,以 1 μg 总 RNA 为模板进行 RT-PCR。*hTERT* 的正向引物为 5'-GCT GCT CAG GTC TTT CTT TTA TG-3',反向引物为 5'-CGA CGT AGT CCA TGT TCA CAA-3';以 *GAPDH* 为内参,其正向引物为 5'-CTC AGA CAC CAT GGG GAA GGT GA-3',反向引物为 5'-ATG ATC TTG AGG CTG TTG TCA TA-3'。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 40 个循环,68 $^{\circ}\text{C}$ 末次延伸 7 min。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,出现 450 bp 大小的条带为 *GAPDH*,出现 252 bp 大小的条带为 *hTERT* mRNA。用 Quantity One 软件半定量分析 *hTERT* 的相对表达。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 成功构建靶向 *hTERT* 基因的重组 RNAi 载体

pGPU6/GFP/Neo 载体上自身带有 *Bam*H I、*Pst* I、*Bbs* I 3 个酶切位点。*Pst* I 的位置介于 *Bam*H I 和 *Bbs* I 之间,插入序列片段之后,*Pst* I 酶切位点被取代,而不能被 *Pst* I 所酶切。琼脂糖凝胶电泳检测

结果(图 1)显示,重组载体不能被 *Pst* I 切开,而经 *Bam*H I 单酶切后呈线性,片段约 5 000 bp,符合携带 *hTERT* 基因片段的重组载体大小。

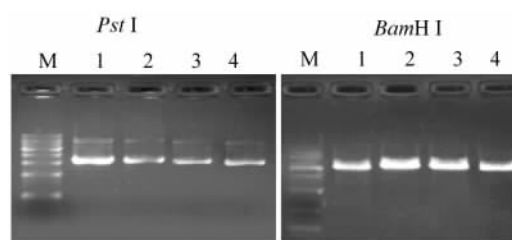


图 1 重组 RNAi 载体的酶切鉴定图

Fig. 1 Recombinant RNAi plasmid identified by enzyme digestion

M: DNA Marker (from top to bottom: 10 000, 8 000, 7 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 000 bp);

1: hTERT-NC plasmid; 2: hTERT-1 plasmid;
3: hTERT-2 plasmid; 4: hTERT-3 plasmid

2.2 重组 RNAi 载体成功转染 SW480 细胞

荧光显微镜观察(图 2)发现,重组载体转染 SW480 细胞 24 h 后开始出现绿色荧光,48 h 时绿色荧光细胞数达高峰,72 h 绿色荧光细胞数开始减少。转染后 48 h 转染效率最高,约 80%。转染 48 h 后 pGPU6-hTERT-3 组的转染率显著高于 pGPU6-hTERT-1、2 和 pGPU6-hTERT-NC 组 [(0.618 \pm 0.035) vs (0.432 \pm 0.022)、(0.481 \pm 0.017)、(0.355 \pm 0.016), $P < 0.05$]。

2.3 干扰 *hTERT* 的表达抑制 SW480 细胞增殖

MTT 检测结果(图 3)显示,转染 72 h 后, pGPU6-hTERT-1、2 和 3 组 SW480 细胞增殖抑制率均较空白对照显著升高 ($P < 0.05$),尤以 pGPU6-hTERT-3 组最为明显 [(50.08 \pm 0.43)% vs (4.11 \pm 0.39)% , $P < 0.05$],空白对照组、脂质体对照组与 hTERT-NC 组细胞增殖抑制率之间始终无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 转染 RNAi 载体有效干扰 SW480 细胞内 *hTERT* mRNA 的表达

RT-PCR 检测结果(表 2、图 4)显示,脂质体对照组、pGPU6-hTERT-NC 组与空白对照组 *hTERT* mRNA 的表达之间无显著差异 ($P > 0.05$),pGPU6-hTERT-1、2 和 3 组 *hTERT* mRNA 表达较空白对照组均显著减少(均 $P < 0.05$),尤以 pGPU6-hTERT-3 组最为显著 (0.347 \pm 0.028 vs 0.513 \pm 0.032, $P < 0.01$)。因此选择 hTERT-3 进行后续研究。

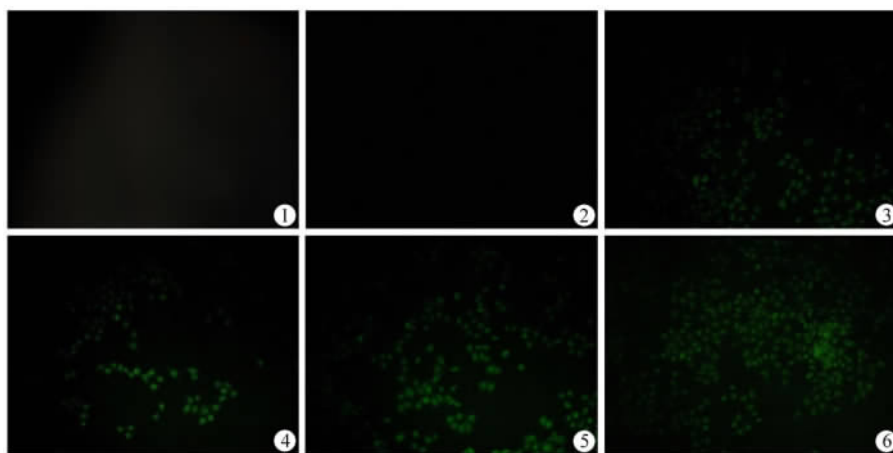


图 2 重组 RNAi 载体成功转染 SW480 细胞(×100)

Fig. 2 Recombinant RNAi plasmid was successfully transfected SW480 cells(×100)

1: Blank control ; 2: Liposome control; 3: pGPU6-hTERT-NC; 4: pGPU6-hTERT-1; 5: pGPU6-hTERT-2; 6: pGPU6-hTERT-3

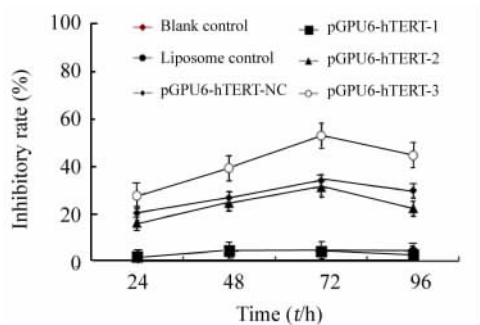


图 3 转染 RNAi 载体抑制 SW480 细胞增殖

Fig. 3 Transfection of RNAi plasmid inhibited the proliferation of SW480 cells

* $P < 0.05$ vs pGPU6-hTERT2 or pGPU-hTERT3

表 2 转染干扰载体后各组不同时间段 SW480 细胞 hTERT 的表达

Tab. 2 The hTERT expression of each group at different time points after transfection of SW480 cells with interference vector

Group	24 h	48 h	72 h
Blank	0.493 ± 0.026	0.513 ± 0.032	0.504 ± 0.025
Liposomes	0.478 ± 0.012	0.483 ± 0.035	0.471 ± 0.023
hTERT-NC	0.480 ± 0.027	0.479 ± 0.021	0.487 ± 0.052
hTERT-1	0.473 ± 0.025	0.450 ± 0.0522 *	0.469 ± 0.054
hTERT-2	0.468 ± 0.021	0.423 ± 0.024 *	0.457 ± 0.012
hTERT-3	0.436 ± 0.017	0.347 ± 0.028 ** $\Delta\Delta$	0.435 ± 0.034 * Δ

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs blank control; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

vs hTERT-1 and hTERT-2 group

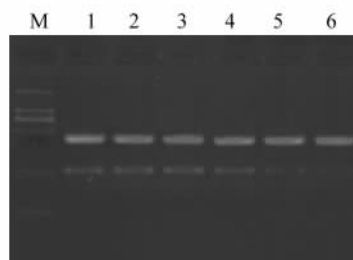


图 4 转染 RNAi 载体 48 h 后 SW480 细胞内 hTERT mRNA 的表达

Fig. 4 Expression of hTERT mRNA in SW480 cells after transfected with RNAi plasmid 48 h

M: DNA Marker (DL2000, down from the 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); 1: Blank control; 2: Liposome control; 3: pGPU6-hTERT-NC ; 4: pGPU6-hTERT-1; 5: pGPU6-hTERT-2; 6: pGPU6-hTERT-3

3 讨论

端粒酶具有很高的肿瘤特异性,在人体正常组织中除了骨髓造血干细胞有微弱的端粒酶活性以外,其他组织几乎检测不到端粒酶的活性,而在人肿瘤细胞中可以广泛检测到端粒酶活性和 hTERT 基因表达^[5]。端粒酶是广谱的肿瘤标志物之一,是一种核糖核蛋白(ribonucleoprotein),由端粒酶 RNA(human telomerase RNA, hTR)、端粒酶相关蛋白(telomerase related protein, TPI) 和 hTERT 三部分组成^[6-7]。研究^[8-9]证实,在编码端粒酶 3 个亚单位的 mRNA 中,只有端粒酶亚单位 hTERT mRNA 表达与端粒酶活性显著相关,被认为是端粒酶的催化亚

基^[10-12]。因此,检测 *hTERT* mRNA 表达,可反映端粒酶活性,并且其与肿瘤的关系较端粒酶本身更为密切^[13-15]。同时,*hTERT* 基因在肿瘤细胞中表达,若将其作为治疗靶点,能够确保特异性抑制阳性肿瘤细胞的生长,极大地提高肿瘤基因治疗的针对性。

RNAi 作为一种新的强有力的研究工具,已经发展成为高效、特异阻断目的基因表达的有效工具^[16-18]。针对 *hTERT* 的 RNA 干扰成为当前肿瘤研究的热门方向,但 RNAi 在哺乳动物细胞内转染率低、抑制周期长限制了该项技术的进一步发展。设计干扰某一特定基因表达的 siRNA 双链体,至少要对编码 mRNA 的 20 个核苷酸片段有精确了解,因为不完全拼接的 mRNA 通常保留在核内,而 RNAi 一般主要发生在细胞质中,故包含于 mRNA 中的内含子序列最好不要选择作为靶序列^[19]。合理的 siRNA 设计能提高其对靶基因的沉默效果^[20-21]。

本研究发现,转染靶向 *hTERT* 的 siRNA 48 h 后转染率达高峰。所设计的 3 个 siRNA 片段对 *hTERT* mRNA 的表达在不同时间点均产生抑制作用,其中以 pGPU6-*hTERT*-3 的抑制效果最好。转染 72 h 后,3 个实验组细胞增殖均受到不同程度抑制,尤以转染 pGPU6-*hTERT*-3 组最为明显。

综上所述,本研究构建了靶向 *hTERT* 的 RNAi 真核表达载体 pGPU6/GFP/Neo-*hTERT* shRNA,转染细胞后可抑制大肠癌 SW480 细胞的增殖,其机制可能与抑制 SW480 细胞内 *hTERT* mRNA 表达、抑制端粒酶的活性有关,但其对大肠癌细胞凋亡的影响还有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 崔晶,崔丽萍,孙青. 负载 *hTERT* 基因片段的 DC 肿瘤疫苗制备及其抗肿瘤作用的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17 (16): 1257-1261.
- [2] 王国玉,夏伟,张玉娜,等. 端粒酶逆转录酶小干扰 RNA 对结肠癌 SW480 细胞体外抑制作用的观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 18 (21): 1676-1680.
- [3] 刘爱群,葛莲英,罗小玲,等. 靶向 *hTERT* 基因 RNAi 慢病毒载体的构建与鉴定 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5 (1): 241-245.
- [4] Fraser A. RNA interference human genes hit the big screen [J]. Nature, 2004, 428 (6981): 375-378.
- [5] 季加忠,周鹤同,陆万明,等. *hTERT* 启动子克隆及其肿瘤细胞特异性的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15 (7): 491-493.
- [6] 卫立辛,吴孟超. 端粒酶: 肿瘤治疗研究的新希望 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13 (5): 325-328.
- [7] 蔡艳玲,罗小玲,葛莲英,等. RNAi 沉默 *hTERT* 基因诱导大肠癌 SW480 细胞凋亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18 (1): 46-50.
- [8] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59 (4): 225-249.
- [9] 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.
- [10] 黎银燕,王云南,Chen Hong,等. 检测端粒酶及其亚基在肺癌诊断中的临床价值 [J]. 国际医药卫生导报, 2008, 14 (14): 5-8.
- [11] Willers H, McCarthy EE, Alberti W, et al. Loss of wild-type P53 function is responsible for upregulated homologous recombination in immortal rodent fibroblasts [J]. Int J Radiat Biol, 2007, 76 (8): 1055-1062.
- [12] Opitz OG, Suliman Y, Hahn WC, et al. Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism [J]. J Clin Invest, 2001, 108 (5): 725-732.
- [13] Luzar B, Poljak M, Marin IJ, et al. Quantitative measurement of telomerase catalytic subunit (*hTERT*) mRNA in laryngeal squamous cell carcinomas [J]. Anticancer Res, 2001, 21 (6A): 4011-4015.
- [14] Lehner R, Enomoto T, McGregor JA, et al. Quantitative analysis of telomerase *hTERT* mRNA and telomerase activity in endometrioid adenocarcinoma and in normal endometrium [J]. Gynecol Oncol, 2002, 84 (1): 120-125.
- [15] Hara H, Yamashita K, Shinada J, et al. Clinicopathologic significance of telomerase activity and *hTERT* mRNA expression in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2001, 34 (2): 219-226.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 葛莲英. 端粒酶与大肠癌相关性及其 RNAi 沉默 *hTERT* 基因治疗大肠癌的研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2010.
- [20] Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, et al. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and click RNA interference [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32 (3): 936-948.
- [21] Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex [J]. Cell, 2003, 115 (2): 199-208.

[收稿日期] 2014-03-20

[修回日期] 2014-06-27

[本文编辑] 黄静怡