

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.01.011

· 基础研究 ·

Bcl-XL 小发夹 RNA 腺病毒载体的构建及其抗肿瘤作用

胡静姿¹, 周玮², 王晓炜², 戴胜²(1. 空军杭州航空医学鉴定训练中心 内科, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 肛肠外科, 浙江 杭州 310016)

[摘要] **目的:** 构建表达 *Bcl-XL* 小发夹 RNA 的腺病毒载体 (Ad/*Bcl-XL* shRNA) 并探讨其抗肿瘤作用。 **方法:** 构建、纯化重组腺病毒 Ad/*Bcl-XL* shRNA。通过 Western blotting、MTT 分析验证它对 *Bcl-XL* 的下调及其杀伤肿瘤细胞的作用, 并检测其处理后细胞凋亡信号的活化情况; 在裸鼠皮下荷瘤模型中验证其体内抗肿瘤作用。 **结果:** 成功构建和纯化了 Ad/*Bcl-XL* shRNA, 它能显著下调结肠癌 DLD1 细胞 *Bcl-XL* 蛋白的表达; 与 Ad/GFP、PBS 组相比, Ad/*Bcl-XL* shRNA 组明显抑制人结肠癌细胞 DLD1 的生长 [1 000 MOI 时 (60.6 ± 4.8)% vs (99.0 ± 2.6)%、100%; 2 000 MOI 时, (37.3 ± 6.9)% vs (99.0 ± 2.1)%、100%, $P < 0.01$], 但对正常人成纤维细胞无明显抑制作用 ($P > 0.05$); Ad/*Bcl-XL* shRNA 组能有效诱导结肠癌细胞中凋亡信号 caspase-9、caspase-3、PARP 的活化。在裸鼠荷瘤模型中, 与 Ad/GFP、PBS 组相比, Ad/*Bcl-XL* shRNA 组显著抑制 DLD1 来源皮下肿瘤的生长 [第 29 天时, (250.1 ± 185.7) vs (880.0 ± 286.1)、(911.0 ± 389.1) mm³; $P < 0.01$]。 **结论:** Ad/*Bcl-XL* shRNA 能显著抑制结肠癌细胞在体内外的生长, 其在结肠癌治疗中具有潜在的应用价值。

[关键词] 重组腺病毒; *Bcl-XL*; RNA 干扰; 小发夹 RNA; 结肠癌

[中图分类号] R735.3; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)01-0061-05

Construction of adenovector expressing small hairpin RNA targeting *Bcl-XL* and its anti-tumor effect

HU Jing-zi¹, ZHOU Wei², WANG Xiao-wei², DAI Sheng²(1. Department of Internal Medicine, Aviation Medical Evaluation & Training Center of Airforce in Hangzhou, Hangzhou 310013, Zhejiang, China; 2. Department of Colorectal Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, Affiliated to Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the adenovector expressing small hairpin RNA targeting *Bcl-XL* (Ad/*Bcl-XL* shRNA), and evaluate its anti-tumor effect. **Methods:** Firstly, Ad/*Bcl-XL* shRNA was constructed and purified. Then the protein level of *Bcl-XL* and survival of colon cancer cells after the treatment of Ad/*Bcl-XL* shRNA were determined by Western blotting and MTT assay, respectively. Furthermore, the activation of apoptotic signaling was also detected by Western blotting assay. Finally, the anticancer effect of Ad/*Bcl-XL* shRNA *in vivo* was confirmed in the subcutaneous tumor model derived from DLD1 cells in nude mice. **Results:** Ad/*Bcl-XL* shRNA was constructed and purified successfully. It obviously down-regulated the *Bcl-XL* protein and significantly inhibited the growth of DLD1 cells (1 000 MOI and 2 000 MOI Ad/*Bcl-XL* shRNA group was (MOI = 1 000: [60.6 ± 4.8]% vs [37.3 ± 6.9]%, 100%; MOI = 2 000: [99.0 ± 2.6]% vs [99.0 ± 2.1]%, 100% $P < 0.01$), but had no obvious toxicity on normal human fibroblasts. Western blotting results demonstrated that the apoptotic signal molecules including caspase-9, caspase-3, and PARP were obviously activated after the treatment with Ad/*Bcl-XL* shRNA. *In vivo*, it also dramatically suppressed the growth of subcutaneous tumors derived from DLD1 cells in nude mice (eg. 29th day Ad/*Bcl-XL* shRNA group was [250.1 ± 185.7] vs Ad/GFP [880.0 ± 286.1], PBS [911.0 ± 389.1] mm³, $P < 0.01$). **Conclusion:** Ad/*Bcl-XL* shRNA can down-regulate the expression of *Bcl-XL* and inhibit the growth of colon cancer cells *in vivo* and *in vitro*, suggesting that it may be a new strategy to treat the colon carcinoma.

[Key words] recombinant adenovector; *Bcl-XL*; RNA interfering; small hairpin RNA; colon cancer

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(1): 61-65]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30700970)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30700970)

[作者简介] 胡静姿 (1976 -), 浙江省杭州市人, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤分子病理与基因治疗方面的研究

[通信作者] 胡静姿 (HU Jing-zi, corresponding author), E-mail: ykzhh@163.com

肿瘤的发生往往是由肿瘤细胞对凋亡抵抗所致,同时细胞凋亡机制的异常也是抗肿瘤治疗失败的重要原因之一,因此有效地恢复肿瘤细胞对凋亡的敏感性,对于肿瘤治疗具有重要的意义。*Bcl-2* 家族在凋亡事件中起着非常重要的作用^[1]。结肠癌中 *Bcl-XL* 是 *Bcl-2* 家族中表达最高的抗凋亡蛋白^[2-3],针对 *Bcl-XL* 的 RNA 干扰在结肠癌治疗中可能具有较高的应用价值^[4,5],但是在实际操作中 RNA 干扰的效果直接受到 siRNA (small interfering RNA) 在体内的稳定性、siRNA 转导的组织特异性以及 siRNA 在肿瘤细胞中转导效率的影响^[6]。运用 DNA 质粒转导小发夹 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 能增加 siRNA 的稳定性,但是在 DNA 质粒应用过程中仍存在转染效率问题^[7-8]。腺病毒能够在肿瘤细胞中高效地转导目的基因。因此,本研究中根据已有的 *Bcl-XL* siRNA 序列,构建表达靶向 *Bcl-XL* 小发夹 RNA (*Bcl-XL* shRNA) 的腺病毒载体 (Ad/*Bcl-XL* shRNA),并通过一系列的研究来验证 Ad/*Bcl-XL* shRNA 在体内外的抗肿瘤作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与实验材料

寡聚核苷酸 *Bcl-XL* sense (3'-GGAGATGCAGG-TATTGCTGGTA CGTAGGCACCAATACCTGCATCTC-CCTTTTGTG-5')、*Bcl-XL* Eco (3'-AATTCAAAAAGG-GAGATGCAGGTATTGCTGCCTACGTACCACCAATAC CTGCATCTCC-5') 及 *Bcl-XL* 和 GAPDH 的引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。*Bcl-XL* 和 GAPDH 引物序列用 vector NTI 7.0 引物设计软件设计。*Bcl-XL* (211 bp): 上游 5'-GTGAATGGAGCCACT-GCGCA-3', 下游 5'-CCCCATCCCGGAAGAGTTCA-3'; GAPDH (500 bp): 上游 5'-ACCACAGTCCATGC-CATCAC-3', 下游 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。质粒 pBaBe/U6 和 p Δ E1sp1A 由美国 M. D. Anderson 癌症中心方炳良教授惠赠,重组腺病毒 Ad/GFP 和病毒包装细胞 293 细胞来自浙江省生物治疗重点实验室,人结肠癌细胞株 DLD1 来自上海细胞生物研究所,人正常成纤维细胞 (normal human fibroblast, NHFB) 购自 ATCC 公司。兔抗人 *Bcl-XL*、*Bax*、caspase-9、caspase-3 抗体购自 Santa Cruz 公司,鼠抗人 PARP 抗体购自 BD Bioscience 公司。裸鼠购自浙江省实验动物中心,实验动物许可证号为 SYXK (浙)2004-0050。

1.2 细胞培养

人结肠癌细胞株 DLD1 和 NHFB 以及病毒包装

293 细胞均常规培养于含有 10% 热灭活胎牛血清、1% 谷氨酸以及 $1 \times$ 抗生素抗真菌素混合液的高糖 DMEM 培养液,37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。取对数生长期细胞为实验对象。

1.3 Ad/*Bcl-XL* shRNA 载体的构建和纯化

将已有的 *Bcl-XL* siRNA 序列设计成中间带发夹结构的 DNA 序列^[5],为测序方便发夹中间带有 SnaBI 酶切位点;合成两条引物 *Bcl-XL* sense 和 *Bcl-XL* Eco,聚合后 5'端为钝端,3'端为 *EcoR* I 酶切口。质粒 pBaBe/U6 先经 *Apa* I 酶切,再经 klenow 片段切平残端,再用 *EcoR* I 酶切,产物与聚合到的 DNA 序列连接获 pBaBe/U6/*Bcl-XL* shRNA。通过转染验证 pBaBe/U6/*Bcl-XL* shRNA 能有效地下调 *Bcl-XL* 的表达后,将 pBaBe/U6/*Bcl-XL* shRNA 用 BamH I 和 Sal I 酶切后得到的小片段产物插入 p Δ E1sp1A,得到 Ad/*Bcl-XL* shRNA 的穿梭载体。

将该穿梭载体和病毒骨架 ClaI 片段共同转染至 293 细胞,重组得到 Ad/*Bcl-XL* shRNA 裂解液。裂解液通过 96 孔板浓度梯度稀释,上清液行 PCR 验证得到纯化的病毒克隆,然后在 293 细胞中扩增、离心纯化,得到 Ad/*Bcl-XL* shRNA 腺病毒,并测定病毒的滴度。具有相同病毒骨架的 Ad/GFP 作为腺病毒载体对照。

1.4 Western blotting 检测 DLD1 细胞中 *Bcl-XL* 的表达和凋亡信号分子的活化

将处理后的 DLD1 细胞用冷 PBS 液洗涤并在 Laemmli'S 裂解液中溶解,取等量蛋白,10% SDS-PAGE 分离,转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶和含 0.05% Tween20 的 PBS 液缓冲 1 h,加入相应一抗 (兔抗人 *Bcl-XL*、*Bax*、caspase-9、caspase-3 抗体和鼠抗人 PARP 抗体) 室温孵育 1 h 以上,含 0.05% Tween20 的 PBS 液洗涤 3 次,加入二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体或羊抗鼠抗体) 室温孵育 1 h,最后用 ECL 试剂盒进行检测。

1.5 MTT 法检测 DLD1 和 NHFB 细胞的增殖

将 DLD1 或 NHFB 细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔培养板过夜,次日按所需的不同病毒剂量感染细胞,在相应时间点 (24、48、72 或 96 h) 前 4 h,每孔加入 MTT 工作液 20 μ l/孔 (终质量浓度 5 mg/ml),继续培养 4 h 后,吸去上清,每孔加入 0.2 ml DMSO,测定 D_{570} ,将 PBS 的细胞存活率设为 100%,其他组的细胞存活率则为处理组 D_{570} /PBS 组 $D_{570} \times 100\%$ 。每组均设 3 个平行孔,并重复 3 次实验。

1.6 裸鼠荷瘤模型的建立及抗肿瘤治疗

以浙江大学医学院动物实验中心的有关规定为

指导,在每只裸鼠的背侧皮下接种 5×10^6 个 DLD1 细胞,当皮下肿瘤形成并且直径达 3 ~ 5 mm 时,开始用 Ad/Bcl-XL shRNA 进行治疗,同时以 Ad/GFP 作为载体对照, PBS 作为空白对照。Ad/Bcl-XL shRNA 肿瘤内注射 1 次/3 d,每次 3×10^{10} 病毒颗粒,总共 3 次。每 2 d 测量肿瘤大小,计算肿瘤体积。公式 $V = 1/2 a \times b^2$ (a 为最大直径, b 为最小直径)。当肿瘤长至直径 1.5 cm 时处死小鼠。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间的结果通过 StatSoft 统计软件进行 ANOVA 检验分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad/Bcl-XL shRNA 的成功构建和纯化

成功构建了重组腺病毒 Ad/Bcl-XL shRNA(图 1),然后通过转染重组扩增,对病毒进行纯化。经检测病毒滴度为 4.26×10^{12} VP/ml。

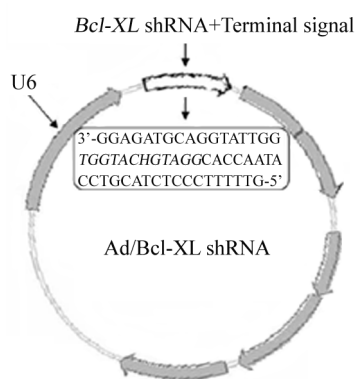


图 1 Ad/Bcl-XL shRNA 的构建

Fig. 1 Construction of Ad/Bcl-XL shRNA

2.2 Ad/Bcl-XL shRNA 下调了 DLD1 细胞中 *Bcl-XL* 的表达

获得纯化的 Ad/Bcl-XL shRNA 腺病毒后,在人结肠癌 DLD1 细胞中检测了它对 *Bcl-XL* 表达的调控作用。首先分别用 500、1 000 以及 2 000 MOI 3 个剂量的 Ad/Bcl-XL shRNA 感染人结肠癌 DLD1 细胞,72 h 后收集细胞,提取 mRNA 行 RT-PCR 检测 *Bcl-XL* mRNA 的表达情况。结果(图 2A)显示,3 个剂量均能有效下调 *Bcl-XL* 的表达。接着用 1 000 及 2 000 MOI 两种条件按上述方法感染 DLD1 细胞,72 h 后收集蛋白,以 Western blotting 检测 *Bcl-XL* 蛋白的表达情况。结果显示(图 2B),1 000 及 2 000 MOI 的 Ad/Bcl-XL shRNA 均能有效下调 *Bcl-XL* 蛋白表

达,而与此同时 Ad/GFP 腺病毒则对蛋白的表达没有明显的影响。另外为检测 Ad/Bcl-XL shRNA 的沉默作用是否具有特异性,本研究还检测了同样为 *Bcl-2* 家族成员的 Bax 蛋白,结果显示 Ad/Bcl-XL shRNA 不会影响其表达(图 2B)。

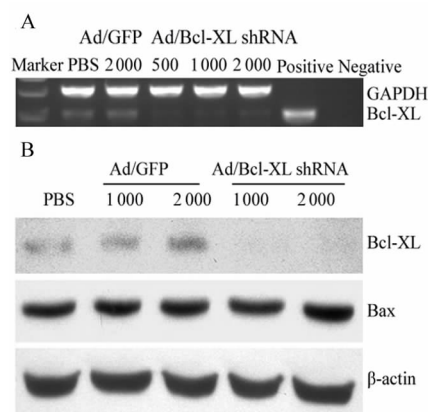


图 2 RT-PCR(A)和 Western blotting(B)检测 Ad/Bcl-XL shRNA 下调 *Bcl-XL* 的表达

Fig. 2 Expression of *Bcl-XL* down-regulated by Ad/Bcl-XL shRNA detected by RT-PCR (A) and Western blotting (B)

2.3 Ad/Bcl-XL shRNA 对 DLD1 细胞的杀伤

MTT 实验结果(图 3A)显示,处理 72 h 后,与 PBS 组、Ad/GFP 组相比,1 000 MOI [$(60.6 \pm 4.8)\%$ vs 100% 、 $(99.0 \pm 2.6)\%$]和 2 000 MOI Ad/Bcl-XL shRNA [$(37.3 \pm 6.9)\%$ vs 100% 、 $(99.0 \pm 2.1)\%$]能够显著抑制 DLD1 细胞的增殖,并随着处理时间的延长其抑制作用愈加明显。对照腺病毒 Ad/GFP 则对 DLD1 细胞生长无明显影响。结果还显示 Ad/Bcl-XL shRNA 对结肠癌细胞的抑制作用还具有剂量依赖效应,随着病毒剂量的加大,其抑制作用得到加强。

进一步研究发现,即使用 2 000 MOI 的高剂量作用 96 h,Ad/Bcl-XL shRNA 对 NHFB 仍无明显的抑制作用,其对 NHFB 生长的影响与 Ad/GFP 相似(图 3B)。

2.4 Ad/Bcl-XL shRNA 对 DLD1 细胞中凋亡信号分子的活化

Western blotting 检测结果(图 4)显示,经 Ad/Bcl-XL shRNA 处理 72 h 后,DLD1 细胞中 caspase-9、caspase-3 及 PARP 均明显活化;而 PBS 或 Ad/GFP 处理组则没有观察到该现象。结果提示,Ad/Bcl-XL shRNA 可能是通过诱导细胞凋亡杀伤结肠癌 DLD1 细胞。

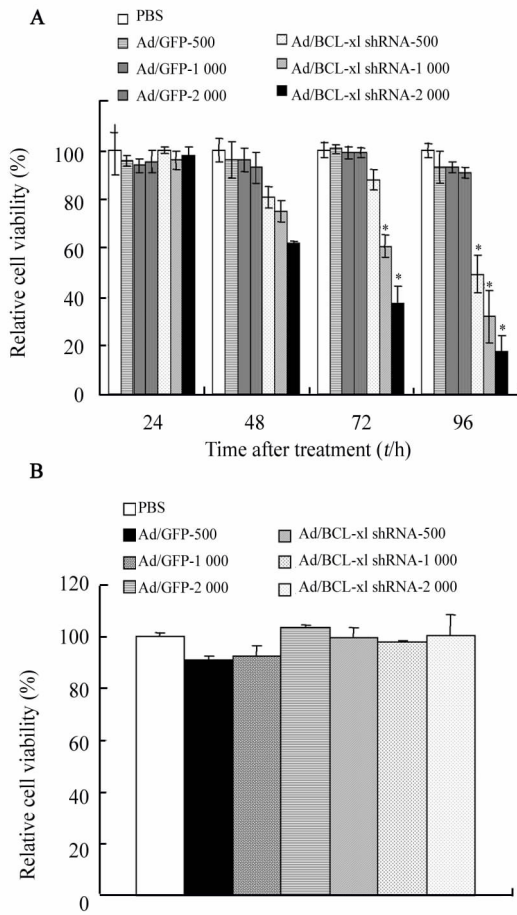


图 3 Ad/Bcl-XL shRNA 对 DLD1 细胞(A)的抑制和对 NHFB 细胞(B)的毒性作用
Fig.3 Inhibitory effect of Ad/Bcl-XL shRNA on DLD1 cells (A) and toxicity effect of Ad/Bcl-XL shRNA on NHFB cells (B)
 * $P < 0.01$ vs Ad/GFP or PBS group

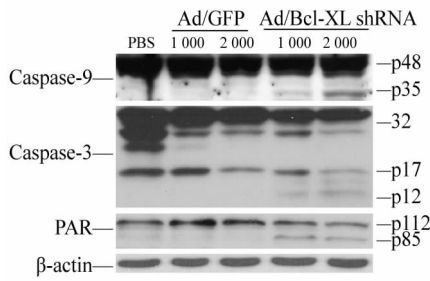


图 4 Ad/Bcl-XL shRNA 处理后 DLD1 细胞中凋亡信号分子的活化
Fig.4 Activation of apoptotic molecules in DLD cells after treatment with Ad/Bcl-XL shRNA

2.5 Ad/Bcl-XL shRNA 在体内的抗肿瘤作用
 用 DLD1 细胞建立裸鼠皮下荷瘤模型, 以 Ad/

Bcl-XL shRNA 进行抗肿瘤治疗。结果(图 5)显示, 第 13 天时, Ad/GFP 处理组裸鼠移植瘤体积为 $(355.9 \pm 177.4) \text{ mm}^3$, PBS 处理组为 $(364.2 \pm 125.1) \text{ mm}^3$, 而 Ad/Bcl-XL shRNA 处理组为 $(96.8 \pm 27.2) \text{ mm}^3$, 明显小于两对照组 ($P < 0.01$)。其后, Ad/Bcl-XL shRNA 一直显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生长, 至第 29 天时, Ad/GFP 处理组裸鼠皮下移植瘤大小为 $(880.0 \pm 286.1) \text{ mm}^3$, PBS 处理组为 $(911.0 \pm 389.1) \text{ mm}^3$, 而 Ad/Bcl-XL shRNA 处理组为 $(250.1 \pm 185.7) \text{ mm}^3$ 。

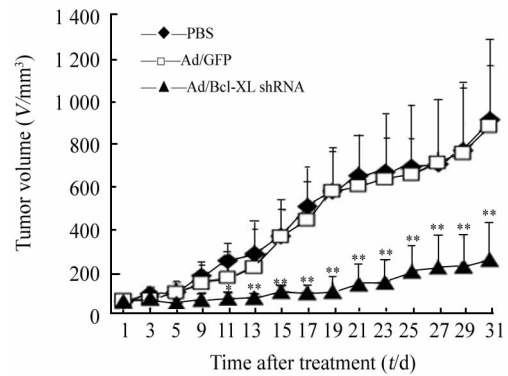


图 5 Ad/Bcl-XL shRNA 抑制裸鼠 DLD1 细胞移植瘤的生长
Fig.5 Ad/Bcl-XL shRNA suppressed growth of transplanted DLD1 tumors in nude mice
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ad/GFP or PBS group

3 讨论

本研究成功构建了表达 Bcl-XL shRNA 的重组腺病毒载体 Ad/Bcl-XL shRNA, 并评价了 Ad/Bcl-XL shRNA 在体外和体内的抗肿瘤作用。结果显示, Ad/Bcl-XL shRNA 能在结肠癌 DLD1 细胞中有效地下调 Bcl-XL 的表达, 激活凋亡信号途径, 促进 DLD1 细胞凋亡, 抑制结肠癌细胞在体外和体内的生长, 提示了腺病毒介导的、靶向 Bcl-XL 的 RNA 干扰在结肠癌治疗中的潜在应用价值。

由于 Bcl-XL 广泛表达于多种细胞, 包括正常细胞, 并且 Bcl-XL 在胚胎发育过程中发挥着非常重要的作用^[9]。本研究在载体构建中所使用的 U6 启动子不具有肿瘤选择性, 它持续驱动表达的 shRNA 序列也会干扰正常细胞中 Bcl-XL 的表达, 因此 Ad/Bcl-XL shRNA 可能会带来毒性作用。为此, 本研究评价了 Ad/Bcl-XL shRNA 对 NHFB 细胞的毒性作用, 发现 NHFB 细胞能够耐受 Ad/Bcl-XL shRNA 的作用。前期研究^[10]显示, NHFB 对重组腺病毒的感染较敏感。因此, 本研究 NHFB 对 Ad/Bcl-XL shR-

NA 的耐受不是由于 NHFB 抵抗腺病毒本身,而可能是由于 *Bcl-XL* 的表达对于维持 NHFB 的存活并不十分重要。因此认为,Ad/*Bcl-XL* shRNA 的毒性作用具有一定的细胞选择性,这可能是由于正常细胞和肿瘤细胞之间 *Bcl-XL* 的表达存在差异,这一结果与其他学者使用 DNA 质粒来诱导 RNA 干扰时所观察到的现象类似^[11-13]。

本研究初步提示,在肿瘤治疗中使用腺病毒来转导治疗性 *Bcl-XL* shRNA 是安全、可行的。由于腺病毒在众多哺乳动物的细胞和组织中具有很高的转导效率,因此与利用 DNA 质粒转导 shRNA 相比,利用腺病毒载体来转导 shRNA 具有十分明显的优势。尽管本研究的结果显示 Ad/*Bcl-XL* shRNA 的细胞毒性具有一定的肿瘤选择性,但仍然不能完全排除它对正常细胞或组织的毒性作用,特别是使用腺病毒载体转导其他 RNA 干扰序列时,这一问题可能更为突出。本研究使用的启动子是 U6 启动子,它属于 RNA 聚合酶 III 启动子,是一类专门用于驱动小 RNA 表达的启动子,没有组织或肿瘤特异性^[14-15]。因此选择一些在肿瘤组织中高表达而在正常组织中低表达的靶基因作为治疗目标,例如 *Bcl-XL*,对于降低 U6 启动子驱动的 RNA 干扰治疗的毒性作用具有重要的意义。另外,进一步增强这一治疗手段的肿瘤选择性同样具有重要的意义。有学者已经成功地运用了改良的前列腺特异性启动子来驱动 shRNA 表达并诱导相关的 RNA 干扰^[16-17]。尽管该方法只能用于某些特定的组织,但是基于启动子的肿瘤靶向性治疗必将为 *Bcl-XL* shRNA 以及其他 RNA 干扰序列治疗恶性肿瘤带来更好的安全性。

[参 考 文 献]

- [1] Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death [J]. Cell, 2000, 103(6): 839-842.
- [2] Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, et al. Significance of Bcl-XL in human colon carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(19): 3069-3073.
- [3] 胡静姿,刘惠敏,李玉莉,等. Bcl-2、Bcl-XL 和 Bax 在结直肠癌中的表达 [J]. 第二军医大学学报, 2006, 27(3): 249-252.
- [4] 胡静姿,李玉莉,刘惠敏,等. Bcl-XL siRNA 抑制人结肠癌细胞生长的研究 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2006, 13(1): 42-44.
- [5] Zhu H, Guo W, Zhang L, et al. Bcl-XL small interfering RNA

suppresses the proliferation of 5-fluorouracil-resistant human colon cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(3): 451-456.

- [6] Oh YK, Park TG. siRNA delivery systems for cancer treatment [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(10): 850-862.
- [7] Gonzalez-Gonzalez E, Speaker TJ, Hickerson RP, et al. Silencing of reporter gene expression in skin using siRNAs and expression of plasmid DNA delivered by a soluble protrusion array device (PAD) [J]. Mol Ther, 2010, 18(9): 1667-1674.
- [8] 李爱清, 姒健敏, 高燕, 等. COL1A1-shRNA 表达载体的构建及对胃癌细胞迁移的影响 [J]. 浙江大学学报: 医学报, 2010, 39(3): 257-263.
- [9] Gabriel U, Bolenz C, Becker A, et al. Evaluation of cytotoxic effects induced by bcl-2 and Bcl-XL antisense-oligodeoxynucleotides in normal urothelium and transitional cell carcinoma [J]. Oncol Rep, 2008, 20(6): 1419-1423.
- [10] Davis JJ, Wang L, Dong F, et al. Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter [J]. Cancer Gene Ther, 2006, 13(7): 720-723.
- [11] Liu YP, Dambaeva SV, Dovzhenko OV, et al. Stable plasmid-based siRNA silencing of gene expression in human embryonic stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(5): 487-492.
- [12] Niola F, Evangelisti C, Campagnolo L, et al. A plasmid-encoded VEGF siRNA reduces glioblastoma angiogenesis and its combination with interleukin-4 blocks tumor growth in a xenograft mouse model [J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(2): 174-179.
- [13] Bulk E, Hascher A, Liersch R, et al. Adjuvant therapy with small hairpin RNA interference prevents non-small cell lung cancer metastasis development in mice [J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1896-1904.
- [14] Lai SY, Koppikar P, Thomas SM, et al. Intratumoral epidermal growth factor receptor antisense DNA therapy in head and neck cancer: first human application and potential antitumor mechanisms [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(8): 1235-1242.
- [15] Cong M, Liu T, Wang P, et al. Suppression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by recombinant adeno-associated viruses carrying siRNAs in hepatic stellate cells [J]. Int J Mol Med, 2009, 24(5): 685-692.
- [16] Song J, Pang S, Lu Y, et al. Gene silencing in androgen-responsive prostate cancer cells from the tissue-specific prostate-specific antigen promoter [J]. Cancer Res, 2004, 64(21): 7661-7663.
- [17] Mashima T, Okabe S, Seimiya H. Pharmacological targeting of constitutively active truncated androgen receptor by nigericin and suppression of hormone-refractory prostate cancer cell growth [J]. Mol Pharmacol, 2010, 78(5): 846-854.

[收稿日期] 2011 - 09 - 20

[修回日期] 2011 - 11 - 17

[本文编辑] 韩丹