

shRNA 沉默雄激素受体基因抑制人前列腺癌裸鼠移植瘤

王 田, 许清泉[△], 黄晓波, 王晓峰

(北京大学人民医院泌尿外科, 北京 100044)

[摘 要] **目的:**探讨雄激素受体 (androgen receptor, AR) 小片段发夹 RNA (short-hairpin RNA, shRNA) 通过沉默 AR 基因对人前列腺癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用。**方法:**建立人前列腺癌细胞株 22RV1 裸鼠移植瘤模型, 同时构建针对其 AR 的 shRNA, 经酶切导入质粒载体, 测序确认后行重组质粒的大量制备。将荷瘤裸鼠随机分为实验组和对照组, 待移植瘤体积长至 300 mm³ 左右时, 实验组裸鼠予单次尾静脉注射 AR shRNA 质粒 (2 μg/g 体重), 对照组注射等量生理盐水。隔日观察并记录肿瘤体积变化情况, 至实验后 14 d 为观察终点, 处死裸鼠取出肿瘤组织称重, 比较两组肿瘤生长差异。对肿瘤组织行 AR、Ki-67 蛋白免疫组织化学染色及 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) 检测, 用 HSCORE 计分法、增殖指数 (proliferative index, PI) 和凋亡指数 (apoptotic index, AI) 分别量化 AR、Ki-67 免疫组织化学染色和 TUNEL 检测结果, 比较两组肿瘤组织在 AR 蛋白表达及细胞增殖、细胞凋亡方面的差异。**结果:**实验组较对照组肿瘤生长缓慢, 至观察终点, 实验组肿瘤体积为 (1 199.56 ± 86.48) mm³, 较对照组肿瘤体积 (1 742.02 ± 98.16) mm³ 明显缩小 ($P = 0.002$)。实验组肿瘤重量为 (1 006.2 ± 79.1) mg, 较对照组肿瘤重量 (1 383.4 ± 74.8) mg 明显减轻 ($P = 0.005$)。实验组的 AR HSCORE、PI、AI 分别为 25.8 ± 6.7、(26.0 ± 3.1)%、(55.6 ± 7.9)%, 与对照组 [268.8 ± 18.7、(87.6 ± 7.9)%、(27.2 ± 3.9)%] 相比, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01)。**结论:**AR shRNA 可以通过静脉注射的方式, 在体内抑制雄激素受体表达, 从而抑制人前列腺癌细胞裸鼠移植瘤的生长。

[关键词] 前列腺肿瘤; 受体, 雄激素; 基因沉默; RNA, 小分子干扰

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2013)04-0527-05

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2013.04.005

Androgen receptor silencing by shRNA inhibits human prostate cancer xenograft growth in nude mice

WANG Tian, XU Qing-quan[△], HUANG Xiao-bo, WANG Xiao-feng

(Department of Urology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the inhibitory effect of silencing androgen receptor (AR) gene by AR short-hairpin RNA (shRNA) on the growth of human prostate cancer xenograft in nude mice. **Methods:** Human 22RV1 prostate cancer cells were inoculated subcutaneously into nude mice to establish xenograft models of human prostate cancer. Meanwhile, a short-hairpin RNA that was capable of suppressing the expression of AR was constructed and then recombinant plasmids producing AR shRNA were prepared in a large number. The tumor-bearing mice were randomly divided into 2 groups: the control group and the experimental group. When the tumor volume grew to about 300 mm³, the plasmids prepared previously were injected into the tail veins of the mice once at the dose of 2 μg/g in the experimental group, whereas the mice in the control group was injected with the same amount of saline as control. The tumor volumes were monitored every other day until 14 days after the treatment. At the endpoint, the mice were sacrificed and the tumors were excised, weighed, fixed in buffered-formalin, and embedded in paraffin for the immunohistochemical analysis of AR, Ki-67 (a marker of proliferative cell) levels and apoptotic cell labeling by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) assay. A semiquantitative immunohistochemical scoring system, HSCORE system, was used to evaluate the expression of AR and proliferative index/Ki-67 labeling index (PI/Ki-67 LI) and apoptotic index (AI) were used to assess the cell proliferation and cell apoptosis, respectively. **Results:** Compared

with the control group, the treatment induced an evident inhibitory effect on the tumor growth in the nude mice with prostate cancer. At the endpoint, the tumor volume of $(1\ 199.56 \pm 86.48)\text{ mm}^3$ in the experimental group was significantly smaller than that of $(1\ 742.02 \pm 98.16)\text{ mm}^3$ in the control group ($P = 0.002$). The tumor weight of $(1\ 006.2 \pm 79.1)\text{ mg}$ in the experimental group significantly decreased compared with that of $(1\ 383.4 \pm 74.8)\text{ mg}$ in the control group ($P = 0.005$). The AR HSCORE, PI and AI in the experimental group were 25.8 ± 6.7 , $(26.0 \pm 3.1)\%$, $(55.6 \pm 7.9)\%$, respectively, and those in the control group were 268.8 ± 18.7 , $(87.6 \pm 7.9)\%$, $(27.2 \pm 3.9)\%$, respectively. There were significant differences between the two groups (all $P < 0.01$). **Conclusion:** AR shRNA could be injected intravenously to suppress the expression of AR *in vivo* and hence inhibit the growth of human prostate cancer xenograft in nude mice.

KEY WORDS Prostatic neoplasms; Receptors, androgen; Gene silencing; RNA, small interfering

前列腺癌是最常见的男性泌尿系统恶性肿瘤之一,在全世界范围内,前列腺癌发病率在男性所有恶性肿瘤中位居第二^[1]。在美国,前列腺癌的发病率已经超过肺癌,成为第一位危害男性健康的肿瘤^[2]。我国的前列腺癌发病率虽与欧美国国家相比相对较低,但近年来随着人口老龄化的加速和生活方式的改变,其发病率和死亡率呈明显上升趋势,已跃居男性泌尿系恶性肿瘤的第二位^[3]。

不仅雄激素依赖型前列腺癌 (androgen dependent prostate cancer, ADPC) 表达雄激素受体 (androgen receptor, AR), 绝大多数雄激素非依赖型前列腺癌 (androgen independent prostate cancer, AIPC) 也表达 AR, AR 所呈现出的转录活性可能是肿瘤细胞生长所必需的。因此,无论对于临床早期的 ADPC, 还是治疗比较棘手的 AIPC, AR 都是有效靶点。小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 或其前体小片段发夹 RNA (short-hairpin RNA, shRNA) 均可以通过 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 机制, 阻断目的基因的表达^[4]。

本实验拟通过设计针对 AR 的 shRNA, 经酶切导入质粒载体, 静脉注射于前列腺癌移植瘤裸鼠, 观察其对 AR 的基因沉默效果和对肿瘤的生长抑制作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及材料

1.1.1 实验动物 雄性 5 周龄的裸鼠, 体重 20 ~ 25 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 饲养于北京大学人民医院实验动物中心的 SPF 级动物房中, 每日给予食物、水及 12 h 灯光。本研究动物实验部分已经通过北京大学人民医院实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 实验材料 表达 AR 的人前列腺癌细胞株 22RV1 来自中国科学院生物物理研究所。胎牛血清及 RPMI1640 细胞培养基购自美国 GIBCO 公司,

pRNA-U6.1/Neo 质粒购自美国 Invitrogen 公司, BamH I 内切酶、Hind III 内切酶及 T4DNA 连接酶购自美国 MBI 公司, 质粒提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司。小鼠抗人 AR 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 小鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 抗小鼠检测试剂盒 (二抗) 购自北京西雅金桥生物技术有限公司, 山羊血清及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司, TUNEL 反应试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 22RV1 细胞培养 用含 10% (体积分数) 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养人前列腺癌细胞 22RV1, 将细胞培养瓶置于 37 °C、饱和湿度、5% (体积分数) CO₂ 孵箱中培养, 定期更换培养液。

1.2.2 建立裸鼠移植瘤模型并分组 将对数生长期的 22RV1 细胞制成浓度为 $5 \times 10^7/\text{mL}$ 的细胞悬液, 在无菌条件下, 使用一次性注射器, 于每只裸鼠右侧背部皮下接种上述细胞悬液 0.1 mL。隔日观察肿瘤生长情况, 使用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径, 并依据公式: 肿瘤体积 = $\pi/6 \times (\text{长径} \times \text{短径})^{3/2}$, 计算肿瘤体积^[5]。待肿瘤体积长至 300 mm³ 左右, 将 12 只成瘤裸鼠随机分为实验组和对照组, 每组 6 只。

1.2.3 构建 AR shRNA 及制备重组质粒^[6] 采用化学方法合成两条寡核苷酸链, 核苷酸链 1: 5'-GAT CCT ATC CCA GTC CCA CTT GAT CGA GCA AGT GGG ACT GGG ATA GGG CTT TTT-3', 核苷酸链 2: 5'-AGC TAA AAA GCC CTA TCC CAG TCC CAC TTG CTC GAT CAA GTG GGA CTG GGA TAG-3'。将所合成的两条寡核苷酸单链加超纯水混合, 加热至 95 °C 后复性, 5' 未复性的单链部分与后续质粒经酶切后得到的粘性末端互补。使用 BamH I 和 Hind III 内切酶酶切 pRNA-U6.1/Neo 质粒, 柱式 DNA back 回收酶切后的线性质粒, 将得到的线性质粒和

复性后的双链 DNA 片段在 T4 DNA 连接酶作用下反应连接,得到重组质粒。取连接反应液转化感受态大肠杆菌,将转化液在 LB + Amp 平板培养基过夜筛选,得到大量克隆子,经质粒提取及碱基测序,分离出克隆正确的重组子。使用质粒大提试剂盒,对其克隆子行质粒大量提取。

1.2.4 尾静脉注射质粒 腹腔注射 10% 水合氯醛 (400 mg/kg 体重) 麻醉荷瘤裸鼠,对实验组裸鼠予单次 AR shRNA 质粒尾静脉注射 (2 μ g/g 体重),对照组注射等体积的生理盐水。

1.2.5 肿瘤生长情况观察及制备病理切片 实验前后隔日观察裸鼠肿瘤生长情况,计算肿瘤体积,方法同上^[5]。至实验后 2 周末为观察终点,处死裸鼠,分离肿瘤并称重,甲醛溶液固定后,制作病理切片。

1.2.6 AR 免疫组织化学染色 将制备的病理切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,EDTA 抗原修复液 (pH 8.0) 行抗原高压热修复,冷却至室温后,山羊血清封闭,滴加小鼠抗人 AR 单克隆抗体 (1:400 体积比稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的抗小鼠二抗工作液室温孵育 30 min, DAB 镜下控制显色 3 ~ 5 min,苏木素复染 2 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.7 细胞增殖检测 (Ki-67 免疫组织化学染色)

将制备的病理切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,柠檬酸钠抗原修复液 (pH 6.0) 行抗原煮沸热修复,冷却至室温后,山羊血清封闭,滴加小鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体 (1:200 体积比稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,HRP 标记的抗小鼠二抗工作液室温孵育 30 min, DAB 镜下控制显色 3 ~ 5 min,苏木素复染 2 min,同上步骤脱水、透明、封片。

1.2.8 细胞凋亡检测 (TUNEL 检测) 将制备的病理切片,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,蛋白酶 K 工作液通透,每片滴加 50 μ L 反应混合液 (450 μ L 荧光素标记的 dUTP + 50 μ L TdT, 比例配置),37 $^{\circ}$ C 暗湿盒中孵育 1 h,滴加 HRP 标记的抗荧光素抗体 (converter-POD),37 $^{\circ}$ C 暗湿盒中孵育 30 min, DAB 显色液显色,苏木素复染 2 min,同上步骤脱水、透明、封片。

1.3 免疫组织化学染色及 TUNEL 结果分析

每张病理切片都由两位观察者独立评估,两位观察者均不清楚每张切片所代表的荷瘤裸鼠接受的具体处理,对于评估结果有较大差异的切片,两位观察者需同时进行重新评估并最终获得一致的结果,两位观察者评估值的平均数作为评估结果进行进一

步的统计学处理。

1.3.1 AR AR 的免疫组织化学结果采用 HSCORE 计分方式表示^[7],依据细胞染色强度半定量的评估方式,将视野中的肿瘤细胞分为蓝色 (阴性)、淡黄色 (弱阳性)、棕黄色 (中等阳性)、棕褐色 (强阳性)。观察 5 个高倍镜视野 ($\times 400$),计算视野中各种染色强度的肿瘤细胞百分比,根据公式计算 HSCORE = (阴性细胞百分比) $\times 0$ + (弱阳性细胞百分比) $\times 1$ + (中等阳性细胞百分比) $\times 2$ + (强阳性细胞百分比) $\times 3$,HSCORE 的取值范围为 0 ~ 300。

1.3.2 Ki-67 Ki-67 作为细胞增殖的一个特异性标记物,常常用 Ki-67 的标记指数 (Ki-67 labeling index, Ki-67 LI) 来代表增殖指数 (proliferative index, PI)^[8-9],以反映细胞的增殖情况。其只需要观察 5 个高倍镜视野 ($\times 400$),计算视野中阳性细胞的百分比,而不考虑染色的强度,即 PI = (染色阳性细胞数/肿瘤细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.3.3 TUNEL TUNEL 作为检测细胞凋亡的手段,一般使用凋亡指数 (apoptotic index, AI) 来表示其染色结果^[8]。其只需要观察 5 个高倍镜视野 ($\times 400$),计算视野中凋亡阳性细胞的百分比,而不考虑染色的强度,即 AI = (凋亡阳性细胞数/肿瘤细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示,对于正态分布且总体方差相等的两组间比较用 *t* 检验;非正态分布总体的两组间比较用 Mann-Whitney *U* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤生长情况

22RV1 细胞裸鼠皮下接种 4 周后移植瘤平均体积约为 300 mm³,按实验需要分为实验组和对照组,两组间肿瘤体积差异无统计学意义 (表 1)。实验过程中隔日测量肿瘤体积变化,两组间肿瘤生长速度表现出明显差异 (图 1),对照组肿瘤体积从实验前 (297.09 \pm 23.51) mm³,增大到处死时 (1 742.02 \pm 98.16) mm³,实验组肿瘤体积从实验前 (304.42 \pm 42.47) mm³,增大到处死时 (1 199.56 \pm 86.48) mm³,实验后两组间差异有统计学意义 ($P = 0.002$)。实验结束时,对照组肿瘤平均重量为 (1 383.4 \pm 74.8) mg,实验组为 (1 006.2 \pm 79.1) mg,两组相比差异有统计学意义 ($P = 0.005$,表 1)。

表 1 实验处理前后各组裸鼠肿瘤体积和重量($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Tumor volume and weight before the treatment and at the endpoint ($\bar{x} \pm s$)

Items	Control group (n=6)	Experimental group (n=6)	P value
Tumor volume before treatment/mm ³	297.09 ± 23.51	304.42 ± 42.47	0.732
Tumor volume at the endpoint/mm ³	1 742.02 ± 98.16	1 199.56 ± 86.48	0.002
Tumor weight at the endpoint/mg	1 383.4 ± 74.8	1 006.2 ± 79.1	0.005

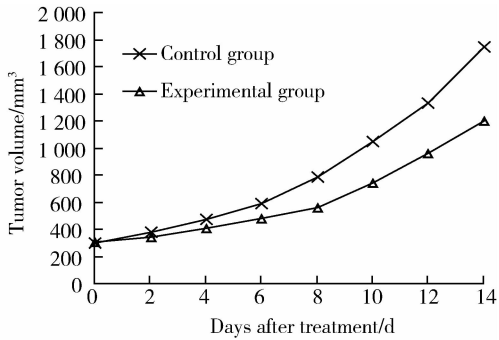
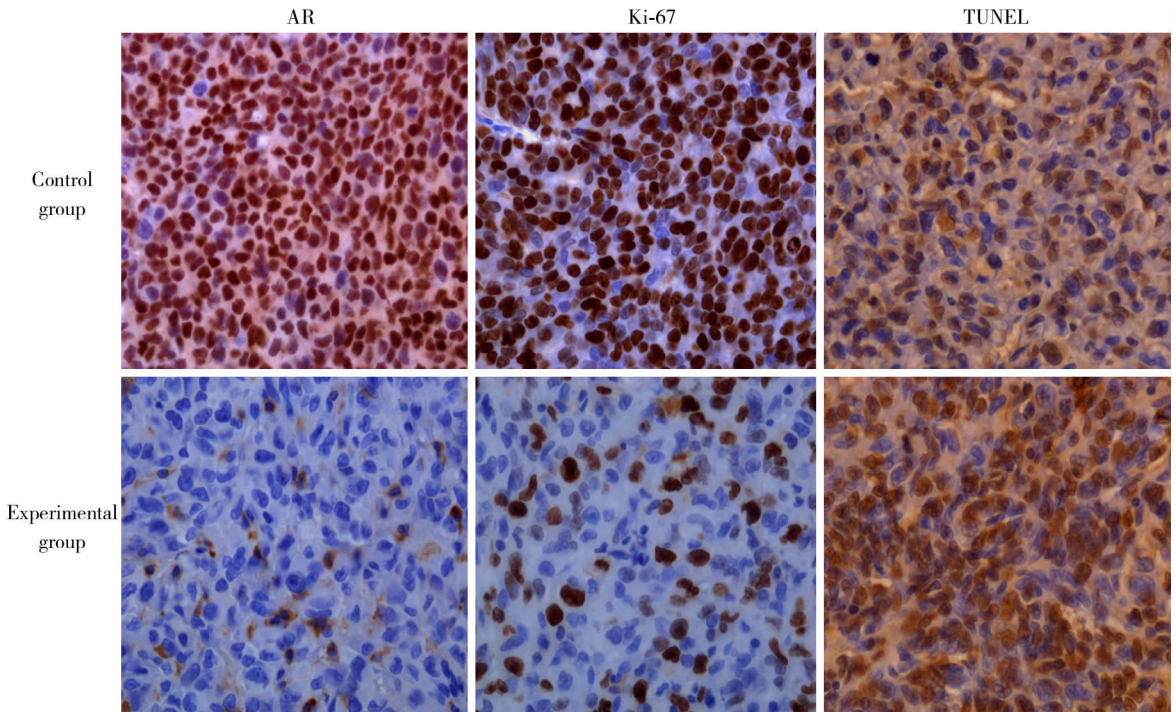


图 1 AR shRNA 对肿瘤生长的影响

Figure 1 Effect of AR shRNA on the tumor growth

2.2 肿瘤组织 AR、Ki-67 免疫组织化学染色及 TUNEL 检测结果

实验组和对照组 AR、Ki-67 免疫组织化学染色及 TUNEL 检测高倍镜下视野均表现为细胞核着色,阳性核呈淡黄色至棕褐色颗粒状着色(图 2)。实验组与对照组相比, HSCORE 评分 (25.8 ± 6.7 vs. 268.8 ± 18.7 , $P = 0.008$)、PI [$(26.0 \pm 3.1)\%$ vs. $(87.6 \pm 7.9)\%$, $P = 0.009$]、AI [$(55.6 \pm 7.9)\%$ vs. $(27.2 \pm 3.9)\%$, $P = 0.008$] 差异均有统计学意义(表 2)。



Tumor tissues of the mice in control group demonstrated that AR, Ki-67 protein expressed at a markedly high level and showed weak apoptosis. In contrast tumor tissues from shRNA-treated mice showed significantly decreased AR, Ki-67 protein expression and increased apoptotic cells.

图 2 两组移植瘤中 AR、Ki-67 蛋白的表达及 TUNEL 检测结果(×400)

Figure 2 Expression of AR, Ki-67 protein and results of TUNEL assay in each group of xenografts (×400)

表 2 两组 AR, Ki-67 免疫组织化学及 TUNEL 结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2 AR HSCORE value, proliferative index, apoptotic index in each group ($\bar{x} \pm s$)

Items	Control group	Experimental group	P value
HSCORE	268.8 ± 18.7	25.8 ± 6.7	0.008
Proliferative index/%	87.6 ± 7.9	26.0 ± 3.1	0.009
Apoptotic index/%	27.2 ± 3.9	55.6 ± 7.9	0.008

3 讨论

前列腺癌是一种具有雄激素依赖性的恶性肿瘤,内分泌治疗是其重要治疗手段。早期前列腺癌对雄激素高度敏感,被称为 ADPC,可以通过抗雄激素治疗来抑制 ADPC 的生长。但经过中位时间 14~30 个月后,前列腺癌对抗雄激素治疗不再有效,

几乎所有患者病变都将逐渐发展为 AIPC,前列腺癌细胞在雄激素去除后仍不断增殖,病情进展恶化,患者死于肿瘤转移或其他并发症。

AR 属于核受体超家族成员,其与配体结合后被激活,并与其他转录因子相互作用,调节靶基因表达,产生生物学效应^[10]。在 ADPC,雄激素作为配体,通过直接与 AR 结合而产生生物学效应,刺激前列腺癌细胞生长和增殖^[11]。在 AIPC,通过 AR 表达增加、AR 突变、AR 调节因子表达改变、AR 信号转导途径改变等机制,使 AR 基因呈现出更高的表达活性^[12-14]。可见,无论对于临床早期的 ADPC,还是治疗比较棘手的 AIPC,AR 都是有效靶点^[15-17]。因此,通过基因沉默等方法抑制 AR 表达,是治疗前列腺癌,尤其是 AIPC 的潜在方法。

研究发现,siRNA 或其前体 shRNA 可以通过 RNAi 机制,阻断目的基因的表达^[4]。RNAi 是一种在目标细胞内导入与特定基因序列相同的双链 RNA(dsRNA),在转录后水平使特异基因沉默的方法。RNAi 具有高效、高度基因特异性的特点,其在某种程度上可以替代基因敲除技术。目前,其应用于肿瘤、病毒感染和基因病等相关疾病治疗方面的研究已经进入临床试验阶段^[18-19]。Yeh 等^[6]通过细胞的 Western blot 检测证实,采用 RNAi 技术可以有效沉默 AR 基因。部分体内实验已经证明,设计合成针对 AR 的特异 siRNA 并导入到前列腺癌细胞使 AR 基因沉默,将可能有效地抑制 AR 的表达,从而抑制前列腺癌细胞的生长^[20-21]。

本研究在既往理论成果的基础上,设计了 shRNA 沉默 AR 治疗前列腺癌的体内试验。通过构建针对 AR 的 shRNA,酶切导入质粒载体,静脉注射于人前列腺癌细胞 22RV1 移植瘤裸鼠,对 shRNA 体内沉默 AR 基因治疗人前列腺癌进行了初步探索。结果显示,经过静脉注射 shRNA 质粒治疗的前列腺癌荷瘤裸鼠肿瘤体积与对照组相比明显减小($P=0.002$)。进一步对肿瘤组织的免疫组织化学及 TUNEL 细胞凋亡检测显示,经静脉注射 shRNA 质粒后,前列腺癌细胞表达 AR 降低,细胞增殖减低,细胞凋亡活跃。

以上实验结果均表明,通过对人前列腺癌细胞 22RV1 移植瘤裸鼠静脉注射 AR shRNA 质粒,可以降低 AR 基因表达,并进一步抑制前列腺癌细胞增殖,诱导前列腺癌细胞凋亡,最终有效抑制肿瘤生长。据此,本研究认为通过静脉注射 AR shRNA 质粒可以在体内有效抑制前列腺癌的生长,可以为前

列腺癌基因治疗的发展提供进一步的实验依据。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Siegel R, Naishadham D, Jemal A, et al. Cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29.
- [3] Zhang L, Wu S, Guo LR, et al. Diagnostic strategies and the incidence of prostate cancer: reasons for the low reported incidence of prostate cancer in China [J]. *Asian J Androl*, 2009, 11(1): 9-13.
- [4] Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference [J]. *Nature*, 2009, 457(7228): 405-412.
- [5] Passaniti A, Isaacs JT, Haney JA, et al. Stimulation of human prostatic carcinoma tumor growth in athymic mice and control of migration in culture by extracellular matrix [J]. *Int J Cancer*, 1992, 51(2): 318-324.
- [6] Yeh SY, Hu YC, Wang PH, et al. Abnormal mammary gland development and growth retardation in female mice and MCF7 breast cancer cells lacking androgen receptor [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(12): 1899-1908.
- [7] Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation; validation for oestrogen receptor in breast carcinomas [J]. *J Clin Pathol*, 1995, 48(9): 876-878.
- [8] Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation [J]. *Int J Cancer*, 1983, 31(1): 13-20.
- [9] Yang G, Wheeler TM, Kattan MW, et al. Perineural invasion of prostate carcinoma cells is associated with reduced apoptotic index [J]. *Cancer*, 1996, 78(6): 1267-1271.
- [10] Agoulnik IU, Weigel NL. Androgen receptor action in hormone-dependent and recurrent prostate cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(2): 362-372.
- [11] Tanner MJ, Welliver RC Jr., Chen M, et al. Effects of androgen receptor and androgen on gene expression in prostate stromal fibroblasts and paracrine signaling to prostate cancer cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16027.
- [12] Kawata H, Ishikura N, Watanabe M, et al. Prolonged treatment with bicalutamide induces androgen receptor overexpression and androgen hypersensitivity [J]. *Prostate*, 2010, 70(7): 745-754.
- [13] Hu R, Dunn TA, Wei S, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic signify hormone-refractory prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(1): 16-22.
- [14] Xu J, Wu RC, O'Malley BW. Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(9): 615-630.
- [15] Sharifi N, Farrar WL. Androgen receptor as a therapeutic target for androgen independent prostate cancer [J]. *Am J Ther*, 2006, 13(2): 166-170.
- [16] Eder IE, Haag P, Bartsch G, et al. Targeting the androgen receptor in hormone refractory prostate cancer—new concepts [J]. *Future Oncol*, 2005, 1(1): 93-101.
- [17] Garcia JA, Rini BI. Castration-resistant prostate cancer: many treatments, many options, many challenges ahead [J]. *Cancer*, 2012, 118(10): 2583-2593.
- [18] Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications [J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(11): 570-579.
- [19] Burnett JC, Rossi JJ, Tiemann K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials [J]. *Biotechnol J*, 2011, 6(9): 1130-1146.
- [20] Azuma K, Nakashiro K, Sasaki T, et al. Anti-tumor effect of small interfering RNA targeting the androgen receptor in human androgen-independent prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 1075-1079.
- [21] Snoek R, Cheng H, Margiotti K, et al. *In vivo* knockdown of the androgen receptor results in growth inhibition and regression of well-established, castration-resistant prostate tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(1): 39-47.