

siRNA 沉默 VEGF - C 基因对宫颈癌 HeLa 细胞的生物学特性影响

陈 星 王美芬 吴朝阳 郑灵芝 任虹平 郑曙民 熊冬生 杨纯正 糜若然

摘 要 **目的** 通过 RNA 干扰技术抑制宫颈癌细胞 VEGF - C 表达,探讨干扰后 VEGF - C、NF - κ B、bcl - 2 基因的表达。**方法** 根据人 VEGF - C mRNA 编码序列,设计 RNA 干扰的靶点,并用脂质体转染入宫颈癌 HeLa 细胞,通过 RT - PCR 法观察转染后肿瘤细胞 VEGF - C、NF - κ B、bcl - 2 基因的变化。**结果** 转染 siRNA 24h、48h 可以使 HeLa 细胞 VEGF - C mRNA 含量降低,在 24h 降低 $80.63\% \pm 0.24\%$ ($P < 0.001$);在 48h 降低 $38.9\% \pm 0.85\%$ ($P < 0.01$);NF - κ B mRNA 含量也分别降低,在 24h 降低 $37.55 \pm 2.76\%$ ($P < 0.05$);在 48h 降低 $30.5\% \pm 3.82\%$ ($P = 0.056$);bcl - 2 mRNA 含量同时分别降低,在 24h 降低 $76.95\% \pm 1.91\%$ ($P < 0.01$);在 48h 降低 $64.11\% \pm 2.96\%$ ($P < 0.05$)。**结论** 脂质体介导的 VEGF - C siRNA 转染 HeLa 细胞后,可以有效抑制 VEGF - C 的表达;可能通过下调转录因子 NF - κ B,抑制抗凋亡基因 bcl - 2 的表达。

关键词 血管内皮生长因子 - C bcl - 2 NF - κ B 宫颈癌 RNA 干扰

Effect of Molecular Biology of Inhibition of VEGF - C in HeLa Cell Lines by siRNA in Vitro. Chen Xing, Wang Meifeng, Wu Zhaoyang, et al. Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To analysis the expression of VEGF - C, NF - κ B, bcl - 2 gene by inhibiting VEGF - C expression of tumor cells with RNA interference (RNAi) technique. **Methods** According to the encoding sequence mRNA of human VEGF - C, the target site for RNAi was designed, siRNA was transfected by liposome and the expression of VEGF - C, NF - κ B, bcl - 2 mRNA was further observed by RT - PCR. **Results** The expression of VEGF - C of HeLa cell lines treated with siRNA for 24h, 48h was significantly inhibited, with in 24h $80.63\% \pm 0.24\%$ ($P < 0.001$) and in 48h $38.9\% \pm 0.85\%$ ($P < 0.01$). The expression of NF - κ B was also down - regulated in 24h, 48h, with in 24h $37.55\% \pm 2.76\%$ ($P < 0.05$) and in 48h $30.5\% \pm 3.82\%$ ($P = 0.056$). Thus the expression of bcl - 2 was also inhibited in 24h, 48h, with in 24h $76.95\% \pm 1.91\%$ ($P < 0.01$) and in 48h $64.11\% \pm 2.96\%$ ($P < 0.05$). **Conclusion** After being treated with VEGF - C siRNA of the HeLa cells, the expression of VEGF - C is effectively inhibited, NF - κ B may be down - regulated and anti - apoptosis bcl - 2 gene is effectively inhibited.

Key words Vascular endothelial growth factor - C; bcl - 2; RNA interference; Cervical carcinoma

RNA 干扰是指与内源性 mRNA 编码区某段序列同源的双链 RNA 分子导入细胞后,该 mRNA 发生特异性降解,导致基因表达的沉默^[1]。RNA 干扰技术已经成为一种研究基因功能和基因治疗的新方法。宫颈癌早期就有淋巴结的转移,研究表明 VEGF - C 与宫颈癌新生淋巴管形成和淋巴转移密切相关^[2]。本研究针对 VEGF - C 基因 mRNA 序列设计合成与之互补的双链低分子干扰 RNA (siRNA),在脂质体介

导下转染入宫颈癌 HeLa 细胞系,观察对宫颈癌细胞的作用,以 RT - PCR 方法检测 VEGF - C、NF - κ B、bcl - 2 mRNA 表达,并应用 MTT 法观察细胞对顺铂敏感性的变化。

材料与方法

1. 实验试剂,仪器:RNA 干扰试剂盒购自美国 Ambion 公司。阳离子脂质体转染试剂盒 LipofectamineTM 2000、Trizol、M - MLV 购自 Invitrogen 生命技术公司。胎牛血清购自天津灏洋生物有限公司。青霉素、链霉素、MTT、二甲基亚砷、DTT 购自 SIGMA 公司。DEPC、随机引物、dNTP 购自上海生工生物有限公司。紫外分光光度计 UV - 3000 型;酶标仪 Microplate Reader450;GeneAmp PCR System2400 型扩增仪;;凝胶成像系统 AlphaEaseFC(美国 Alpha Innotech 公司);荧光分光光度计 F - 4500;微量加样器 96、24、12、6 孔板。

2. 细胞系:宫颈癌细胞系:宫颈癌细胞系 HeLa 为中国医学科学院血液学研究所药物室提供,前期构建的高表达

基金项目:浙江省卫生厅科技基金资助项目(2008196B);浙江省台州科技基金课题(08YK14)

作者单位:317000 温州医学院附属浙江省台州医院妇产科(陈星、王美芬、吴朝阳、郑灵芝、任虹平);030001 太原,山西省肿瘤医院(郑曙民);300520 天津医科大学总医院(糜若然);300520 中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所(熊冬生、杨纯正)

通讯作者:陈星,电子信箱:chenxing6709@hotmail.com

VEGF - C 的 HeLa/S1 及转染空载体 HeLa/C 用于细胞耐药实验。常规 RPMI1640 培养,至转染前夜,细胞培养液更换为用无血清和无抗生素的 IMDM,置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱,转染后用 20% FBS IMDM 培养液,按常规方法培养,取处于对数生长期的细胞用于实验。用 Opti - MEM I 转染液及脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染试剂,按试剂盒说明优化转染条件,分别将 5 对 siRNA 和阳性对照筛选出的干扰序列的 scramble siRNA(siRNA - neg)以 400nmol/L 的终浓度加入细胞培养液,孵育 24、48、72h 后收获细胞进行检测。实验重复 3 次。

3. siRNA 的设计:根据 GenBank 中 VEGF - C 基因序列 (GenBank Accession No. X94216) 和 siRNA 设计原则,应用 Ambion 生物公司的设计软件,自 VEGF - C mRNA 的起始密码子开始,寻找候选靶序列。将候选序列在 GenBank 中用 Blast 软件进行同源序列搜索,排除那些和其他基因编码序列或 EST 同源的候选序列。最终我们选择了 5 段 21 个碱基的

siRNA 序列(T I、T II、T III、T IV、T V),分别靶向 VEGF - C 基因的 508 ~ 528 和 589 ~ 609、776 ~ 796、1384 ~ 1404、1488 ~ 1508 区域(表 1)。另外,根据转染后细胞形态学变化,设计与 TI(508siRNA)序列含有同样核苷酸比例的随机对照 siRNA (508c1,508c2)作为阴性对照,用 Blast 验证随机序列与 GenBank 中其他已知人类基因序列没有同源性。利用针对三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的正、反义寡核苷酸模板作为 RNA 干扰实验的阳性对照。设计的正反义寡核苷酸模板 3' 端均加上 T7 启动子引物 5' - CCTGTC - 3',由上海生物工程技术有限公司合成。GAPDH 引物序列为正向:5' - TGA AGCTCG GAG TCA ACG GAT TTG - 3'; 反向:5' - CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC - 3' 扩增片段长 983bp。设计的 5 个序列,根据 VEGF - C 功能区的划分进行选择,其中 508 为活性区外部分即信号肽部分;589、776 为活性区;1384、1488 为活性区外。

表 1 筛选的 VEGF - C 靶基因的 siRNA 序列

siRNA 在 VEGF - C 的部位	靶序列	正义链 (5'→3')	反义链 (5'→3')	VEGF - C 编码基因序列
508	aagcaaagatctggaggagc	AAGCAAAGATCTGGAGGAGCACCTGTCTC	AATGCTCCTCCAGATCTTTGCCCTGTCTC	508 - 528 T I
589	tgtacaagtgctcagctaagg	AATGTACAAGTGTCAGCTAAGCCTGTCTC	AACTTAGCTGACACTTGTACACCTGTCTC	589 - 609 T II
776	ggagtttgaggtcgcgacaaa	AAGGAGTTTGAGTGGCGACACCTGTCTC	AATGTCGGGACTCCAAACTCCCTGTCTC	776 - 796 T III
1384	gaacctgccccagaaatcaa	AAGAACCTGCCCCAGAAATCACCTGTCTC	AATGATTCTGGGGCAGGTTCCCTGTCTC	1384 - 1404 T IV
1488	acatgcagctgttacagacg	AAACATGCAGCTGTTACAGACCCTGTCTC	AAGTCTGTAACAGCTGCATGTCCTGTCTC	1488 - 1508 T V

4. 体外转录法合成 siRNA:按照试剂说明书合成转录模板,双链 RNA 的合成,siRNA 的纯化,进行 siRNA 的定量,均按试剂说明书进行。

5. siRNA 的转染:取对数生长期的细胞,按照转染试剂盒说明书进行,在转染后不同的时间点(24、48、72h)收集细胞,进行下一步的检测。

6. 半定量 RT - PCR 方法检测 RNA 干扰后 VEGF - C 表达:用半定量 RT - PCR 的方法检测干扰序列 508 和 509、776、1384、1488 共 5 对 siRNA 转染后细胞中 VEGF - C mRNA 表达水平的变化,采用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,用 2μg 总 RNA 进行 cDNA 的合成,半定量 RT - PCR 方法检测检测 siRNA 转染后不同时间点 24、48、72h 细胞中 VEGF - C mRNA 及 NF - κB、bcl - 2 mRNA 表达水平的变化。β - actin 或 GAPDH 作内对照。PCR 反应体系为 50μl。VEGF - C 基因 PCR 引物:扩增产物为 541bp,正向 5' - GCCAACCTCAACTCAAG - GAC - 3',反向 5' - AAGGAGCTGGATGAAGAGAC - 3';NF - κB 基因 PCR 引物:扩增产物为 407bp,正向 5' - CACTTATG - GACAACTATGAGGTCTCTGG - 3',反向 5' - CTGTCTTGTGGA - CAACGCAGTGGAATTTTAGG - 3',bcl - 2 基因 PCR 引物:扩增产物为 271bp,正向 5' - TGCACCTGACGCCCTTCAC - 3',反向 5' - AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG - 3;β - actin 基因

PCR 引物:扩增产物为 291bp,正向 5' - ACCACAGCT - GAGAGGGAAATCG3',反向 5' - AGAGGTCCTTACGGATGT - CAACG3'。GAPDH 引物序列同前,扩增片段长 983bp。针对抑制效果较好的序列,随机设计两对引物序列,作为 siRNA 的阴性对照 siRNA/C1、siRNA/C2。扩增后取 10μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,紫外照相并进行扫描分析,用 AlphaE - aseFC™软件分析,siRNA 处理 24、48、72h,VEGF - C、NF - κB、bcl - 2 mRNA 表达水平变化。选取试剂盒提供的 GAPDH 的模板合成针对 GAPDH 的 siRNA,以此 siRNA 转染后的 GAPDH 的表达改变作为干扰效果的阳性对照。GAPDH 扩增条件后,进行相同实验,实验重复 3 次。

7. siRNA 和脂质体的细胞毒性检测:细胞用无血清和无抗生素的培养液洗涤重悬,每孔 2 × 10⁴ 加入 96 孔板。分别加入用 Opti - MEM I 稀释的 siRNA(终浓度为 100nmol/L)或 lipofectamine2000(终浓度为 2ml/L),72h 后分别加入 5mg/ml 的 MTT,每孔 20μl,37℃置 4h,弃上清,每孔加入 100μl 二甲基亚砷,待甲瓖完全溶解后,测定其在 570nm 的吸光度,并计算细胞存活率。对照孔细胞中加入等量的 Opti - MEM I 代替脂质体或 siRNA,其余培养条件与处理组相同。

存活率 = $\frac{\text{处理孔 OD570} - \text{空白孔 OD570}}{\text{对照孔 OD570} - \text{空白孔 OD570}} \times 100\%$

8. 统计学方法:数据结果均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两

组均数间比较采用双尾 *Student's t* 检验,多组均数间比较采用方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异具有显著统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有极显著统计学意义。所有数据采用 SPSS 12.0 软件包进行统计处理。

结 果

1. HeLa 细胞经 siRNA VEGF - C 和 GAPDH 处理 24、48、72h 后的细胞形态学变化:对(T I、T II、T III) siRNA 处理 24、48、72h 的细胞观察,干扰后的细胞形态不佳,坏死细胞多,细胞生长速度明显减慢。阳性对照 GAPDH siRNA 处理 24、48、72h 的细胞与选择的 siRNA 相似。从细胞形态观察,T IV、T V 组与阴性对照组无区别。阴性对照组和随机设计的对照组 24、

48、72h 的细胞生长迅速,无明显区别;与 GAPDH siRNA 阳性干扰组和设计的(T I、T II、T III) siRNA 组有区别。从形态学观察,以 TI(508)组的干扰效果优于其他两组。干扰图见图 1。

2. siRNA 抑制 VEGF - C mRNA 的表达:经 AlphaEaseFC™ 软件分析,TI(508)组 siRNA 处理 24、48h、VEGF - C mRNA 表达水平分别下调(图 2),在 24h 下调(80.63 ± 0.24)% ($t = 474.3$, $P = 0.001$);在 48h 下调(38.9 ± 0.85)% ($t = 64.833$, $P = 0.010$),72h 该基因恢复表达。阳性对照为 GAPDH 在转染 24、48、72h 都能抑制靶基因的表达,在 48h 抑制作用最明显(图 3)。

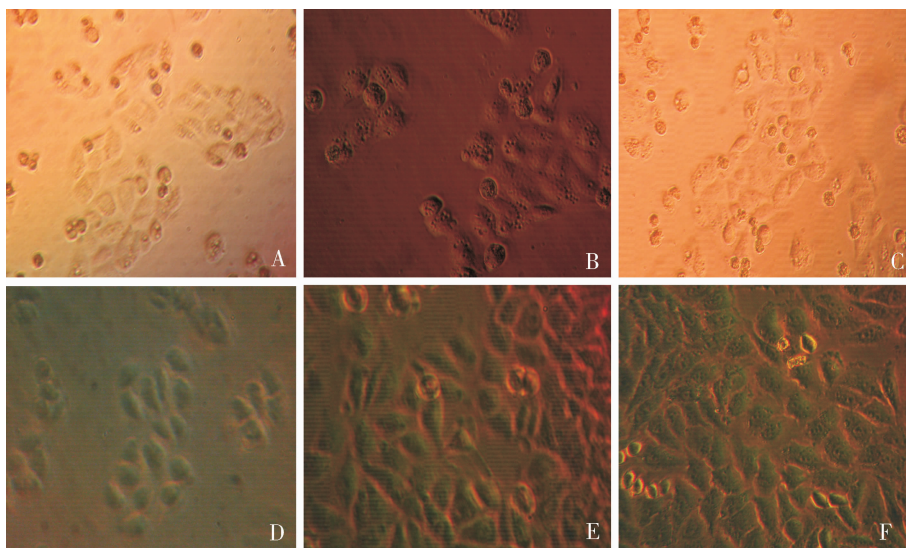


图 1 经相差显微镜观察的经 siRNA 作用的 HeLa 细胞形态学变化

A. 由 VEGF - C siRNA 作用 24h 的图片; B. 由 siRNA 作用 48h 的图片;
C. 由 siRNA 作用 72h 的图片;D、E、F. 对照组的图片

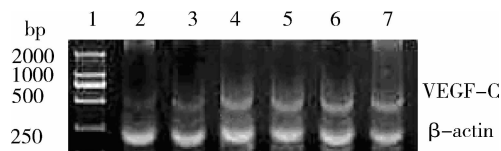


图 2 在 HeLa 株 VEGF - C siRNA 抑制 VEGF - C mRNA 表达

浓度为 40nmol/L TI siRNA 和对照组的电泳图。

1. 分子标志物 marker (DL2000); 2. HeLa/24h siRNA;
3. HeLa/48h siRNA; 4. HeLa/72h siRNA; 5, 6, 7. 对照组

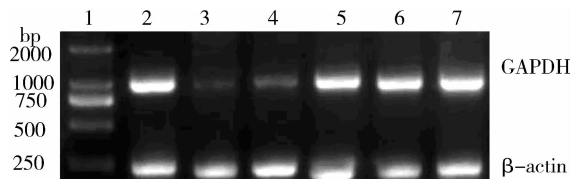


图 3 RT - PCR 分析的 GAPDH 在转染 24、48、72h 都能抑制靶基因的表达

1. 分子标志物 (DL2000); 2. 转染 GAPDH siRNA 后 24h;
3. 转染 GAPDH siRNA 后 48h; 4. 转染 GAPDH siRNA 后 72h;
5, 6, 7. HeLa 对照组

3. siRNA 抑制 NF - κ B、bcl - 2 基因的表达:HeLa 细胞经 TI(508)组 siRNA 处理 24、48h 后,NF - κ B 表达水平下调,在 24h 下调(37.55 ± 2.76)% ($t = 18.17$, $P < 0.05$),在 48h 下调(30.5 ± 3.82)% ($t =$

11.30, $P = 0.056$), 72h 该基因恢复表达(图 4)。bcl - 2 mRNA 24、48h 表达水平下调:在 24h 下调(76.95 ± 1.91)% ($t = 57$, $P < 0.05$),在 48h 下调(64.11 ± 2.96)% ($t = 30.68$, $P < 0.05$),72 h 该基因恢复表达

(图 5)。

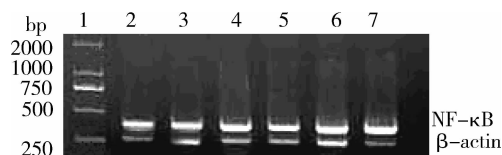


图 4 在 HeLa 株 VEGF - C siRNA 抑制 NF - κ B mRNA 的表达

HeLa 株在 40nmol/L T1 siRNA 及对照 siRNA 作用后

NF - κ B mRNA 基因的表达

1. 分子标志物 (DL2000); 2. 转染 HeLa/siRNA24h;

3. 转染 HeLa/siRNA48h; 4. 转染 HeLa/siRNA72h; 5、6、7. 对照组

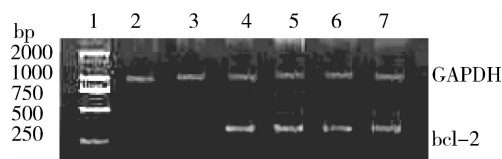


图 5 在 HeLa 株 VEGF - C siRNA 抑制 bcl - 2 mRNA 表达

HeLa 株在 40nmol/L T1 siRNA 及对照 siRNA

作用后 bcl - 2 mRNA 基因的表达

1. 分子标志物 (DL2000); 2. 转染 HeLa/siRNA24h;

3. 转染 HeLa/siRNA48h; 4. 转染 HeLa/siRNA72h; 5、6、7. 对照组

4. siRNA 和脂质体的细胞毒性作用检测:HeLa

细胞经靶向 VEGF - C 基因的 siRNA 或 oligolipofectamine 处理后计算细胞存活率,与未处理的 HeLa 细胞相比,没有显著差异,显示 siRNA 及脂质体本身在实验条件下对细胞基本没有毒性作用。

讨 论

宫颈癌早期就可经淋巴结转移,即癌细胞经宫颈旁淋巴结至盆腔淋巴结再至腹主动脉旁淋巴结,最后发生全身的转移。大量的研究表明,VEGF - C 与肿瘤的淋巴管新生和经淋巴道的转移密切相关, Van Trappen 等^[3]报道 VEGF - C 与宫颈癌淋巴转移明显正相关,在有淋巴结转移者中,VEGF - C mRNA 被上调了 130 倍,但具体机制尚不清楚。在我们的前期研究中,在转染有 VEGF - C 高表达的宫颈癌 HeLa/S1 细胞株中, NF - κ B mRNA 在,其表达也高 ($P < 0.05$);其下游抗凋亡基因 bcl - 2 基因表达也高 ($P < 0.05$);我们在高表达 VEGF - C 的细胞株 MDA - MB231 也得出相同的结论。我们推测 VEGF - C 可能作为细胞信号传导的上游调控因子,可激活 NF - κ B,使 bcl - 2 的表达增高,使转染有 VEGF - C 基因的肿瘤细胞抗凋亡作用增强。推测 VEGF - C 基因在此中起了关键的作用。反向遗传学是研究基因功

能的最有效手段, RNAi 现象广泛存在于大多数真核生物中,这些真核生物利用 RNAi 来抵御病毒的感染,稳定转座子,抗病毒及监控异常表达 mRNA 的生物学的的作用。2001 年 Elbashir 等^[4]首次报道用宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象,将体外合成相应的特异性 siRNA 转染入癌细胞中,结果发现其靶向 mRNA 所表达的蛋白质的量比转染前降低了 90%, siRNA 的应用受到关注,近年来,关于 siRNA 方法研究基因功能的报道很多。

本研究采用体外转录法,即在噬菌体 RNA 聚合酶、Klenow DNA 聚合酶等作用下,以连有噬菌体启动子的线性 DNA 为模板,直接合成出特异双链 siRNA。对于靶基因位点的选择是一个非常重要的参数,不同位置所设计的 siRNA 在诱导 RNA 干扰中的作用效力是不同的,在本研究中,针对 VEGF - C CDS 区的以 AA 开头的靶序列共有 81 个,根据 siRNA 设计的原则,及 GC 含量的分析,对其进行 Blast 分析,最终选择了 508 ~ 528 (T I) 和 589 ~ 609 (T II), 776 ~ 796 (T III), 1384 ~ 1404 (T IV), 1483 ~ 1503 (T V) 的 5 对序列^[5]。其中 T I siRNA 靶序列的 GC 含量为 51.7%, T II siRNA 靶序列的 GC 含量为 44.8%。5 对干扰序列由脂质体介导转染细胞后,结果表明 T I、T II、T III 3 对 siRNA 序列都有抑制 VEGF - C 基因表达的作用,而 T IV、T V 则对靶基因无此作用。综合干扰后细胞形态分析和 mRNA 分析, T I (508) siRNA 抑制作用要更强一些。

本研究结果表明, siRNA 干扰后, VEGF - C 基因在 24h 明显下调, 下调 (80.63 ± 0.24)% ($P = 0.001$), 48h 下调 (38.90 ± 0.85)% ($P = 0.01$), 72h 该基因恢复表达。随机设立的 T I 对照组 siRNA/C1、siRNA/C2 无此干扰作用,从细胞形态学也观察到 T I 对照组对细胞形态基本无影响,说明我们所设计的 T I (508) 干扰序列具有序列特异性,可以沉默 VEGF - C 基因的表达。

转录因子 NF - κ B 是普遍存在的一种转录因子,调控信号传导途径,而过度激活与肿瘤等多种疾病有关,诱导抗凋亡蛋白如 bcl - 2 家族并抑制促凋亡信号 Bax 的表达^[6,7]。研究表明,许多药物可通过下调 NF - κ B 的活性,抑制抗凋亡基因如 bcl - 2 其所调控的基因表达,抑制肿瘤的侵袭和转移,发挥凋亡的作用^[8,9]。在 HPV18E6 阳性的 Hep2 细胞,卡铂通过抑制 NF - κ B 的活性,与反应元件 bcl - 2 启动子结合,下调抗凋亡蛋白 bcl - 2 的表达,使细胞凋亡^[10]。观

察我们选择的 TI 组 siRNA 干扰 HeLa 细胞后,发现可同时下调转录因子 NF - κ B, 24h 下调 $(37.55 \pm 2.76)\%$ ($P < 0.05$), 48h 下调 $(30.5 \pm 3.82)\%$ ($P = 0.056$), 72h 该基因恢复表达。bcl - 2 mRNA 24、48h 表达水平也下调,分别为 $(76.95 \pm 1.91)\%$ ($P < 0.05$), $(64.11 \pm 2.96)\%$ ($P < 0.05$), 72h 该基因恢复表达;本研究推测 VEGF - C 基因沉默后,可引起 NF - κ B 下调,并沉默抗凋亡基因 bcl - 2。糜若然等^[11]证明用 bcl - 2 反义基因在体内、外可有效抑制 bcl - 2 的表达,降低宫颈癌 HeLa 细胞的生长,同时诱导肿瘤细胞的凋亡。VEGF - C 基因沉默后,使得该通路上的一些基因也保持静寂或休眠状态,这也从反向说明了致癌过程是相当复杂的涉及多个基因、多步骤的过程。

最近有报道在成瘤表达 VEGF - C 的裸鼠,注射了 VEGF - C 的 siRNA 可在 mRNA 和蛋白水平抑制 VEGF - C 的表达,从而抑制肿瘤淋巴管形成和淋巴结和肺转移,延长其生存时间^[12];在人类前列腺癌 PC - 3 细胞株的成瘤的裸鼠模型中^[13],针对 VEGF - C 的 siRNA 可抑制 VEGF - C 的表达,可减少 99% 肿瘤内淋巴管生成。在宫颈癌中,使用 HPVE6 siRNA 作用于 SiHa 细胞,同时抑制 E6、E7 蛋白的表达,可使 P53 蛋白的表达增加^[14]。

有报道使用腺病毒载体将 siRNA 导入裸鼠体内^[15],稳定干扰该基因的表达,提示 siRNA 用于临床将成为可能,通过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,为临床上肿瘤的治疗提供新的策略。

参考文献

- 1 Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391 (6669) : 806 - 811
- 2 Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, *et al.* Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25 (7) : 387 - 395
- 3 Van Trappen PO, Ryan A, Carroll M, *et al.* A model for co - expression pattern analysis of genes implicated in angiogenesis and tumour cell invasion in cervical cancer [J]. *Br J Cancer*, 2002, 87 (5) : 537 - 544
- 4 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21 - nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411 (6836) : 494 - 498
- 5 Berezina SY, Supekova L, Supek F, *et al.* siRNA in human cells selectively localizes to target RNA sites [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (20) : 7682 - 7687
- 6 Haefner B. Targeting NF - κ B in anticancer adjunctive chemotherapy [J]. *Cancer Treat Res*, 2006, 130 : 219 - 245
- 7 Zhang HG, Wang J, Yang X, *et al.* Regulation of apoptosis proteins in cancer cells by ubiquitin [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (11) : 2009 - 2015
- 8 Shishodia S, Amin HM, Lai R, *et al.* Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF - κ B activation, induces G₁/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70 (5) : 700 - 713
- 9 Takada Y, Murakami A, Aggarwal BB. Zerbibone abolishes NF - κ B and I κ B kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (46) : 6957 - 6969
- 10 Singh S, Bhat MK. Carboplatin induces apoptotic cell death through downregulation of constitutively active nuclear factor - κ B in human HPV - 18 E6 - positive HEP - 2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318 (2) : 346 - 353
- 11 糜若然, 郑德先. bcl - 2 反义基因调控用于人宫颈癌体外治疗的研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2000, 35 (2) : 105 - 108
- 12 Chen Z, Varney ML, Backora MW, *et al.* Down - regulation of vascular endothelial cell growth factor - C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (19) : 9004 - 9011
- 13 Wong SY, Haack H, Crowley D, *et al.* Tumor - secreted vascular endothelial growth factor - C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (21) : 9789 - 9798
- 14 Niu XY, Peng ZL, Duan WQ, *et al.* Inhibition of HPV 16 E6 onco-gene expression by RNA interference in vitro and in vivo [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16 (2) : 743 - 751
- 15 Gurzov EN, Izquierdo M. RNA interference against Hec1 inhibits tumor growth in vivo [J]. *Gene Ther*, 2006, 13 (1) : 1 - 7

(收稿: 2011 - 03 - 23)

(修回: 2011 - 10 - 08)