文章编号:1000-5404(2008)01-0023-04

论著

RNA 干扰 CA916798 基因真核表达载体的构建与鉴定

王海晶,杨和平,周向东 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

摘 要:**目的** 构建 CA916798 基因 RNA 干扰(RNAi)的真核细胞表达载体。**方法** 以 CA916798 为靶基因,以 pGenSil-l 质粒为载体,设计构建重组体,根据 GenBank 数据库提供的 CA916798 基因核苷酸序列,按照 Tuschl 设计原则,选择设计 2 条带发夹结构的核苷酸序列,克隆到空载体 pGenSil-l 中,转化 DH5α 菌株,提取质粒,进行限制性内切酶酶切鉴定和测序分析。用脂质体 2 000 将重组质粒转染 A549/CDDP 细胞并用 G418 筛选,MTT 法测定药物敏感性并绘制细胞增殖曲线。**结果** 构建针对 CA916798 的 pRNAi-CA916798shRNA,经限制性内切酶酶切、PCR 和 DNA 测序证实与设计完全一致;在荧光显微镜下观察到 A549/CDDP 细胞表达绿色荧光蛋白(GFP)证实重组质粒已转染入细胞并用 G418 剔除了未转染质粒的细胞,1.0 μg/ml 顺铂作用后 pRNAi-CA916798shRNA 转染组细胞增殖受到明显抑制($P<0.01$)。**结论** 成功构建 CA916798 基因的 shRNA 表达载体,并筛选出转染了 CA916798shRNA 的 A549/CDDP 细胞。

关键词:CA916798;RNA 干扰;真核表达载体;构建;转染
中图法分类号:R394-33;R734.2 **文献标识码**:A

Construction and identification of CA916798 eukaryotic expression vector for RNA interference

WANG Hai-jing, YANG He-ping, ZHOU Xiang-dong (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct an eukaryotic expression vector encoding an shRNA targeting CA916798. **Methods** According to the CA916798 cDNA sequence in GenBank, 2 pairs of oligo nucleotides were designed and synthesized. After primer annealing, they were inserted into plasmid pGenSil-l to construct the shRNA eukaryotic expression vector. The recombinant plasmid were transformed into DH5α, and the positive strain were identified by enzyme digestion and sequence analysis. The recombinant vector were transfected into A549/CDDP cells with Lipofectamine 2000. Drug sensitivity and proliferation of the transfected cells were measured by MTT test. **Results** The pRNAi-CA916798 shRNA of recombinant plasmid was constructed successfully. The growth of A549/CDDP cells transfected by pRNAi-CA916798 shRNA was slowly than that of those with blank vector transfection after 1.0 μg/ml CDDP treatment ($P<0.01$). **Conclusion** The recombinant vector is established and transfected into A549/CDDP cells successfully, and A549/CDDP cell with CA916798 shRNA transfection are obtained.

Key words: CA916798; RNA interference; eukaryotic expression vector; construction; transfection

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是近年发现的一种由 21 ~ 25 nt 双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引发的转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)机制。这些短链 RNA(small interfering RNA, siRNA)可以在细胞内形成蛋白复合物,结合并裂解特定的靶 mRNA,从而抑制蛋白质的表达,具有快速、高效、容易操作、特异性强等优点,是一种全新的基因治疗手段[1-3]。本实验以人肺癌多药耐药相关新基因 CA916798[4] 为靶标,设计并构建了能产生具有发夹结构小干扰 RNA(small hairpin interference RNA, shRNA)的重组质粒载体,体外转染到 A549/CDDP 细胞中,筛选出能稳定转染 CA916798shRNA 的 A549/CDDP 细胞,为进一步研究 CA916798 基因的功能进而逆转其诱导的肺癌多药耐药奠定基础。

基金项目:国家自然科学基金(30470773)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470773)
作者简介:王海晶,女,河南省汝南县人,博士研究生,医师,主要从事肺癌方面的研究,电话:(023)68765179,E-mail:cslz@sohu.com
通信作者:杨和平,电话:(023)68754121
周向东,E-mail:xiangdongzhou@126.com
收稿日期:2007-08-31;修回日期:2007-09-17

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株 大肠杆菌 *E. coli* DH5α(西南医院中心实验室冻存),质粒 pGenSil-l 购自武汉晶赛公司,A549/CDDP 细胞由新桥医院全军呼吸内科研究所惠赠[5]。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ、*Eco*RⅠ、T_4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司，脂质体 Lipofectamine™ 2000、DNA Marker、DNA 片断纯化试剂盒、和 LB 培养基均购自 Invitrogen 公司，质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司，实验所用试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.1.3 载体序列设计 根据 GenBank 数据库提供的 CA916798 基因核苷酸序列（基因号 gi：29180165），按照 Tuschl 设计原则[6,7]，利用 Dharmacon 公司（http：//www. dharmacon. com）、Ambion 公司（http：//www. ambion. com）和 Genscript 公司（http：//www. genscript. com）的 siRNA 在线设计软件设计两条长度为 19 bp、带发夹结构的靶定序列，根据 siRNA 表达质粒 pGenSil-l 的酶切位点的要求，由上海生工生物公司合成带有 *Bam*HⅠ、*Hind* Ⅲ酶切粘性末端终止识别序列和 9 bp LOOP 环的 DNA 合成引物，双蒸水（double-distilledwater，ddH_2O）溶解稀释成 100 pmol/L 备用，总长度为 64 bp。序列为：CA916798-1：正义链 5′-GATCCCGTCCATACGCCACCGTGAGATTCAAGAGATCTCACGGTGGCGTATGGATTTTTGGAAA-3′，反义链 5′-AGCTTTTCCAAAAATCCATACGCCACCGTGAGATCTCTTGAATCTCACGGTGGCGTATGGACGG-3′。CA916798-2：正义链 5′-GATCCGTGGAGGCCGTCTTGGAGATTTCAAGAGAATCTCCAAGACGGCCTCCATTTTTGGAAA-3′，反义链 5′-AGCTTTTCCAAAAATGGAGGCCGTCTTGGAGATTCTCTTGAAATCTCCAAGACGGCCTCCACGG-3′。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 *E. coli* DH5α 感受态细胞的制备与转化 参照文献[8]用氯化钙法制备，质粒提取按照试剂盒说明进行，提取 DNA 的吸光度[*D*(260)]值为 1.8～2.0 时用于实验。

1.2.2 shRNA 真核表达载体的构建：

1.2.2.1 引物退火 分别取 1 μl 正义与反义引物，将两条引物等量混合，加入 48 μl 的退火 buffer（100 mmol/L 醋酸钾 + 2 mmol/L 醋酸镁 + 30 mmol/L HEPES-KOH pH7.4）于 95 ℃孵育 2 min，75 ℃孵育 10 min，缓慢冷却退火引物至 4 ℃，使引物结合形成双链。

1.2.2.2 线性化载体制备 取 2 μl 退火的引物稀释为 10 μl，取稀释后退火引物 2 μl，加入质粒 pGenSil-l 1 μg，10 × buffer 2 μl，*Bam*HⅠ 1 μl，*Hind* Ⅲ 1 μl，ddH_2O 15 μl，37 ℃孵育 2 h，加入 CIP 1 μl，37 ℃孵育 1 h。质粒 pGenSil-l 的双酶切，用内切酶 *Bam*HⅠ和 *Hind* Ⅲ对质粒 pGenSil-1 进行双酶切反应，酶切体系为 20 μl：质粒 DNA 10 μl，10 × buffer 2 μl，ddH_2O 7 μl，*Hind*Ⅲ 15 μl，*Bam*HⅠ 15 μl；10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物并回收线性化产物。

1.2.2.3 连接与转化 连接体系双酶切回收载体片断1 μl，合成产物 2 μl，1 × ligase buffer 1 μl，T4 DNA ligase 1 μl，ddH_2O 5 μl，16 ℃连接过夜，转化感受态受体菌 DH5α。

1.2.2.4 重组子的筛选鉴定 取菌液涂布于含 30 μg /ml 卡拉霉素的 LB 琼脂平板上，37 ℃培养 12～16 h，挑取单克隆菌落，抽提 DNA，进行酶切，产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳，分析酶切产物，对可能重组成功的克隆，进行 DNA 测序，证实重组成功后，迅速大量扩增，制备的重组载体，－20℃冰箱保存，质粒 pGenSil-l 扩增、提取方法参考文献[8]。

1.2.2.5 基因转染 Lipofectamine™2000 脂质体转染试剂的使用按其说明书方法进行。将 A549/CDDP 细胞接种于 24 孔板，待细胞数量达到 90% ～95% 汇合后，进行转染，每孔分别加入 2 μl Lipofectamine™2000 转染试剂和对应质粒混匀，室温置 20 min 后加入细胞培养板内，4 h 后用含 10% 胎牛血清但不含抗生素的 RPMI 1640 换液以除去转染试剂内脂质体对细胞的毒性。转染 48 h 时在荧光显微镜下观察结果，根据绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）表达后发绿色荧光的特点，在荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况，计算质粒转染效率。质粒转染效率 = 每高倍镜视野发荧光细胞数/同一视野下细胞总数 × 100%。48 h 后培养液换为含 500 μg/ml 的 G418 完全培养基常规培养，每 2 天更换培养液，每天观察细胞增殖情况，抗性细胞集落形成后，用含半量筛选浓度 250 μg/ml 的 G418 完全培养基扩大培养。在此后的实验过程中，间断地取出部分细胞在含 500 μg/ml 的 G418 的条件培养基中筛选，未能稳定转染的细胞在 6～8 d 左右全部死亡，转基因 A549/CDDP 细胞却能持续存活并增殖传代。

1.2.2.6 MTT 比色法测定转染细胞对顺铂的药物敏感性，绘制细胞增殖曲线 以空质粒转染组细胞为对照组，1.0 μg/ml CDDP 处理后，3 组细胞按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板上，每 6 孔为一组共接种 9 板，每日取出 1 板，采用 MTT 比色法测定波长 490 nm 下的吸光度[*D*(490)]值，绘制增殖曲线。

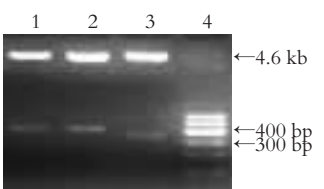
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件对每日 *D*(490) 值进行重复测量方差分析，*q* 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 重组质粒与空载体酶切鉴定

将重组质粒与空载体酶切回收产物进行电泳检测，发现环状质粒已被切开，大片段约为 4.6 kb，重组质粒小片段为 410 bp，空载体小片段为 350 bp，见图 1。



1：CA916798-1 重组质粒；2：CA916798-2 重组质粒；3：空载体；4：标准（DL1000）

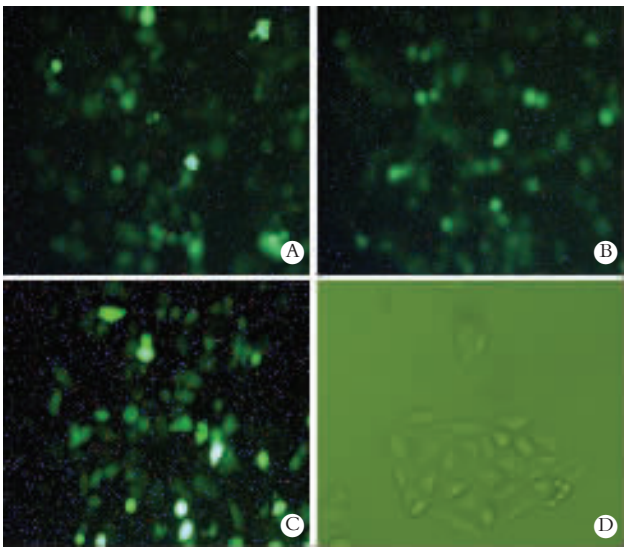
图1 重组质粒酶切鉴定

2.2 重组质粒的测序鉴定

重组质粒经自动基因测序仪测序（上海生工生物公司）结果与设计序列完全相符，所含目的基因序列准确无误，重组质粒构建成功。

2.3 转染细胞形态学改变与筛选结果

正常 A549/CDDP 细胞均贴壁生长，大多呈梭形或多角形，有突起。倒置显微镜下观察，细胞均匀分布，细胞膜有良好的折光性。质粒 pGenSil-l-CA916798 及空载体在转染 24 h 于荧光显微镜下观察发绿色荧光，48 h 荧光最强（图 2A、B、C）。G418 筛选有效重组子后，细胞开始大量死亡，在筛选后第 8 天出现单细胞克隆（图 2D），然后分化成生长期细胞群。实验测得 A549/CDDP 细胞 RNAi 转染效率为 70% ～80%。

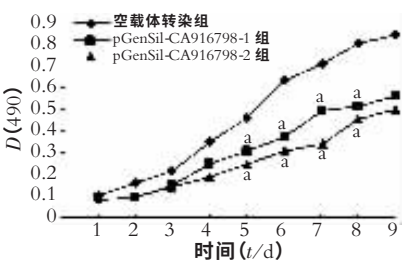


A：CA916798-1 重组质粒转染 48 h（荧光显微镜 ×200）；B：CA916798-2 重组质粒转染 48 h（荧光显微镜 ×200）；C：空载体转染 48 h（荧光显微镜 ×200）；D：G418 筛选获得稳定转染克隆（倒置显微镜 ×200）

图 2　RNA 干扰重组质粒 pGenSil-l-CA916798 转染 A549/CDDP 细胞

2.4　转染细胞 MTT 增殖曲线测定

3 组细胞每天 D(490) 值通过重复测量设计资料的方差分析，采用 MTT 法绘制细胞增殖曲线（图 3），结果提示，1.0 μg/ml顺铂作用后 pGenSil-CA916798 干扰组细胞增殖较空载体组细胞对顺铂敏感性增高，细胞增殖受到明显抑制（$P < 0.01$）。



a：$P < 0.01$，与空载体转染组比较

图 3　MTT 法绘制分别用 1.0 μg/ml 顺铂作用后细胞生长曲线

3　讨论

肺癌的发病率和病死率在恶性肿瘤中位居首位，4 年平均生存率仅有 13%[9]。多药耐药（Multidrug resistance，MDR）是肺癌患者低生存率的主要原因之一。在肺癌化疗中，顺铂是有效并广泛应用的一线药物，但由于耐药问题的存在使其疗效不尽人意。

MDR 是指肿瘤细胞对一种化疗药物产生耐药现象后会对其他结构、细胞靶点和作用机制迥然不同的化疗药物产生交叉耐药，是一个多基因参与的复杂事件[10,11]。寻找新的耐药相关基因，干扰其 mRNA 表达能显著提高化疗敏感性，是逆转肿瘤多药耐药性治疗的新靶点，将为癌症的治疗提供新策略[12]。

我们在前期研究中，采用抑制消减杂交（suppressive subtraetive hybridization，SSH）技术筛选肺腺癌 MDR 细胞系 SPC-A-1/CDDP 与其亲代细胞获得了一条在耐药细胞中高表达的新基因，已经登录于 GenBank 的 EST 库，收录号是 CA916798，其在肺癌耐药细胞中的表达较其亲代细胞明显上调。我们已经克隆了 CA916798 基因的全长 cDNA 并经测序加以证实，经序列同源性分析表明，它与已知的耐药相关基因无明显同源性，将其转染表达量最低的小细胞肺癌细胞株，能明显增加 H446 细胞对顺铂的耐药性[4,13]。因此，对 CA916798 基因进行深入研究对阐明顺铂耐药形成的分子机制及对顺铂耐药的逆转具有重要意义。

RNAi 日前主要通过两种方法得以实现：第一种是体外化学合成法人工制备 siRNA，此法操作简单、快速，只是引起的 RNAi 效应往往是暂时的，难以持久；第二种为细胞内表达的 siRNA[14,15]，这种方法就是先构建 siRNA 的载体，然后转染细胞，在细胞内表达 siRNA，诱导 RNAi。后者可稳定转染细胞，并在细胞内稳定、可靠表达 siRNA 而维持长久的 RNAi 效应且并未发现明显的细胞毒效应[16]。

本研究以 CA916798 基因为靶点，体外合成 CA916798 特异性的 siRNA。将其定向克隆到 pGenSil-l 载体，该载体有绿色荧光蛋白表达，方便观察转染和稳定表达 shRNA 的细胞克隆。酶切和测序鉴定表明已成功构建 2 个 pGenSil-CA916798 shRNA 表达载体，继而转染到稳定高表达 CA916798 基因的 A549/CDDP 细胞系，MTT 实验显示干扰组能显著增加肺癌细胞对顺铂的敏感性，进一步证实了其在顺铂诱导的肺癌多药耐药中的作用。我们构建的 2 个表达载体，即可直接作为 shRNA 使用，观察其对 CA916798 抑制作用，又可筛选最有效的 shRNA，为下一步抑制 CA916798 基因表达及逆转肺癌多药耐药的研究打下稳固的基础。

参考文献：

[1] Bass B L. RNA interference. The short answer[J]. Nature, 2001, 411(6836): 428 – 429.

[2] Hammond S M, Bernstein E, Beach D, *et al*. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells[J]. Nature, 2000, 404(6775): 293 – 296.

[3] Bernastein E, Caudy A A, Hammond S M, *et al*. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference[J]. Nature, 2001, 409(6818): 363 – 366.

[4] 周向东，刘凌志，钱桂生，等. 一条新的人肺腺癌耐药相关基因全长 cDNA 片段的克隆及序列分析[J]. 癌症，2002，21(4)：341 – 345.

[5] 陈　杰，白春学，钱桂生，等. A549/CDDP 多药耐药细胞系的建立[J]. 中国癌症杂志，2003，12(2)：186 – 187.

[6] Elbashir S M, Harborth J, Weber K, *et al*. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs[J]. Methods, 2002, 26(2): 199 – 213.

[7] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. Genes Dev, 2001, 15(2): 188-200.
[8] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第4版. 北京: 科学出版社, 2005: 26.
[9] Blanchon F, Grivaux M, Asselain B, *et al*. 4-year mortality in patients with non-small-cell lung cancer: development and validation of a prognostic index[J]. Lancet Oncol, 2006, 7(10): 829-836.
[10] Kartalou M, Essigmann J M. Mechanisms of resistance to cisplatin[J]. Mutat Res, 2001, 478(1-2): 23-43.
[11] Yoon S S, Ahn K S, Kim S H, *et al*. In vitro establishment of cis-diammine-dichloroplatinum(Ⅱ) resistant lung cancer cell line and modulation of apoptotic gene expression as a mechanism of resistant phenotype[J]. Lung Cancer, 2001, 33(2-3): 221-228.
[12] Stege A, Priebsch A, Nieth C, *et al*. Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(11): 699-706.
[13] 王海晶, 杨和平, 周向东. MDR 相关新基因 CA916798 真核表达载体的构建及其对 H446 细胞增殖的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(24): 2315-2318.
[14] Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Harel-Bellan A. RNA interference and its possible use in cancer therapy[J]. Bull Cancer, 2004, 91(1): 15-18.
[15] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science, 2002, 296(5567): 550-553.
[16] Kamath R S, Fraser A G, Dong Y, *et al*. Systematic functional analysis of the Caenorhabditis elegans genome using RNAi[J]. Nature, 2003, 421(6920): 231-237.

(编辑 栾 嘉)

(上接22页)

合蛋白(IGFBPs)相结合,IGFBP 主要是通过改变 IGF 的转运、趋化和游离水平而影响其生物效应。IGF-1 是细胞增殖、分化及机体正常生长发育所需的一个重要的生长因子,这与本实验中正常对照组循环中存在一定量的 IGF-1 相符[3]。

3.2 IGF-1 与脑胶质细胞瘤

IGF 系统与肿瘤的关系是近年研究的热点。许多流行病学研究表明,循环中 IGF-1 水平升高与前列腺癌、乳腺癌、结肠癌及肺癌等恶性肿瘤的发病率呈明显正相关[4],而与脑胶质细胞瘤相关的研究却少见报道。本实验中脑胶质细胞瘤患者血清 IGF-1 水平在手术前后的差异存在显著性,有不同程度的下降,这进一步证实了血清 IGF-1 水平可能与肿瘤负荷有关。手术后肿瘤负荷明显下降或消失,脑胶质细胞瘤自分泌水平大大减少,血清中 IGF-1 水平下降。本实验可以证明,IGF-1 与脑胶质细胞瘤的形成密切相关,但其确切机制仍不清楚。结合现有的 IGF-1 在肿瘤形成机制方面的研究结果分析,IGF-1 可能通过以下途径参与脑胶质细胞瘤的形成和发展。

3.2.1 促进脑胶质细胞瘤细胞转化及增殖 IGF-1 是一种强力促有丝分裂剂,IGF-1 与 IGF-1R 结合后,可使细胞膜内的 IGF-1R β 亚基上的酪氨酸激酶结构域通过酪氨酸残基的迅速自身磷酸化而活化,经过一系列信号转导,发挥促细胞增殖的有丝分裂作用。当细胞发生恶变时,细胞内 IGF-1 及其 IGF-1R 的表达发生改变,使其获得无限分裂及复制的能力,从而出现细胞的恶性转化及肿瘤细胞的恶性增殖。

3.2.2 通过抑制肿瘤细胞凋亡而促进肿瘤形成 目前对 IGF-1 抑制细胞凋亡的机制进行了多方面的研究[5]。其抑制细胞凋亡的作用被认可,并认为参与了凋亡信号的转导、凋亡基因的激活及细胞凋亡的执行等过程,并且通过影响其他生物活性分子共同起作用。Ly 等[6]利用反义 IGF-1 技术来抑制 IGF-1 的表达,发现随着 IGF-1 表达量降低,肿瘤细胞凋亡比例增高,且肿瘤细胞 MHC-Ⅰ分子表达量上升,肿瘤原性减弱,抗肿瘤免疫反应增强。因此,IGF-1 及 IGF-1R 的过度表达,使凋亡的细胞内调控机制发生紊乱,从而抑制脑胶质细胞瘤细胞的凋亡,可能是促进脑胶质细胞瘤形成和发展的重要途径。

3.2.3 通过与癌基因的相互作用促进肿瘤形成 IGF-1 与癌基因的关系,一方面表现在 IGF-1R 与某些原癌基因产物在结构上的相似性;另一方面,IGF-1R 与 IGF-1R 结合后信号传导途径与多种癌基因的表达途径有诸多交汇点,可以相互促进,最终导致肿瘤的发生。已有实验表明[4],IGF-1 可以明显刺激 *ras*、*c-myc*、*c-fos* 等癌基因的表达,如:受到 IGF-1 刺激 3 h 后的神经母细胞瘤,其 myc 蛋白较基础水平升高了 6 倍。

目前,虽然不能确定癌基因与 IGFs 谁先启动了肿瘤发生机制,但可以肯定,IGF-1 异常是重要的致瘤因素。IGF-1 及癌基因表达异常及二者相互促进作用可能是促成脑胶质细胞瘤形成的一种机制。另外,还有研究报道,IGF-1 与肿瘤细胞黏附,肿瘤浸润生长及转移有关[7]。

本试验结果表明,脑胶质细胞瘤患者血清中 IGF-1 水平与肿瘤恶性程度呈正相关,故 IGF-1 可以作为脑胶质细胞瘤的辅助诊断及预后评估指标。这将是对脑胶质细胞瘤防治的一个贡献。IGF-1 无疑将是重点的研究指标。进一步的研究还包括一些正规的前瞻性人群调查及基础研究。

关键词:脑胶质细胞瘤;胰岛素样生长因子(IGF);诊断
中图法分类号:R739.41 文献标识码:B

参考文献:

[1] 罗朝学, 程绍钧, 李前伟. HepG2 人肝癌细胞胰岛素样生长因子1受体定量分析[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(3): 206-208.
[2] 陈照丽, 王 欣, 黄秉仁. IGF 系统的生物学功能及其与肿瘤的关系[J]. 国外医学·分子生物学分册, 2003, 25(1): 34-37.
[3] 杨福兵, 刘剑波, 陈礼刚, 等. 脑胶质细胞瘤患者血清 IGFBP-II 表达及临床意义[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2006, 5(4): 365-366.
[4] Dupont J, Dunn S E, Barrett J C, *et al*. Microarray analysis and identification of novel molecules involved in insulin-like growth factor-1 receptor signaling and gene expression[J]. Recent Prog Horm Res, 2003, 58: 325-342.
[5] Ryu B R, Ko H W, Jou I, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of neuronal apoptosis and necrosis by insulin and IGF-1[J]. J Neurobiol, 1999, 39(4): 536-546.
[6] Ly A, Duc H T, Kalamarides M, *et al*. Human glioma cells transformed by IGF-1 triple helix technology show immune and apoptotic characteristics determining cell selection for gene therapy of glioblastoma[J]. Mol Pathol, 2001, 54(4): 230-239.
[7] Szpechcinski A, Trzos R, Jarocki P, *et al*. Presence of MHC-I in rat glioma cells expressing antisense IGF-1-receptor RNA[J]. Rocz Akad Med Bialymst, 2004, 49 (Suppl 1): 98-104.

(编辑 薛国文)