文章编号:1000-5404(2009)14-1353-05

论著

Livin siRNA 重组腺病毒的构建及其对 K562 细胞增殖、凋亡和耐药的影响

郭玥馨[1],毛成刚[1],罗 庆[2],郑改焕[1],徐酉华[1] (重庆医科大学附属儿童医院:[1]血液肿瘤科,[2]儿科研究所外科实验室,重庆 400014)

摘 要:目的 通过改良的重组腺病毒介导方法研究 Livin 基因与 K562 细胞增殖、凋亡及耐药的关系。**方法** 用基因工程技术将靶向 Livin siRNA 片段克隆至穿梭质粒 pSES-HUS 中,然后与骨架质粒 pAdeasy 同源重组,将重组成功的质粒用脂质体介导的方法转染 HEK293 细胞,乒乓感染收获高滴度的重组腺病毒 Ad5-Livin siRNA,并将其感染 K562 细胞,采用 Real-time PCR、Western blot 检测 Livin 基因的干扰效果,用 MTT 和流式细胞仪检测其与 K562 细胞增殖、凋亡及多药耐药的关系。**结果** 成功构建重组腺病毒 Ad5-Livin siRNA,并感染 K562 细胞,在 mRNA 和蛋白 2 个水平均抑制 Livin 的表达。证实通过重组腺病毒沉默 Livin 基因,可抑制 K562 细胞增殖,促进凋亡,增加其对阿霉素、长春新碱和依托泊苷的敏感性。**结论** 用重组腺病毒介导的方法抑制 K562 细胞中 Livin 基因的表达,可增加 K562 细胞的凋亡及对抗癌药物的敏感性。Livin 可能成为治疗白血病新的分子靶点。

关键词: 重组腺病毒;RNA 干扰;Livin 基因;K562 细胞;耐药
中图法分类号: R394-33;R730.23;R733.7 **文献标识码:** A

Construction of recombinant adenovirus vector of Livin siRNA and its effects on proliferation, apoptosis and drug resistance of K562 cells

GUO Yue-xin[1], MAO Cheng-gang[1], LUO Qing[2], ZHENG Gai-huan[1], XU You-hua[1] ([1]Department of Hematology and Tumor, [2]Laboratory of Surgery, Institute of Pediatrics Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To study the effect of recombinant adenovirus vector-mediated Livin siRNA on the proliferation, apoptosis and drug resistance in K562 cells. **Methods** The targeting Livin siRNA was subcloned into the shuttle plasmid pSES-HUS, and then recombinant it with adenovirus skeleton plasmid pAdeasy by homologous recombination. We transfected the product into HEK293 cells *via* liposome and generated recombinant adenovirus Ad5-Livin siRNA. K562 cells were infected with Ad5-Livin siRNA. The gene silencing efficiency of recombinant adenovirus Ad5-Livin siRNA was monitored by real-time PCR and Western blot analysis in K562 cells. The relationship between Livin siRNA and K562 cells was detected by MTT assays and flow cytometry. **Results** The recombinant adenovius vector of Ad5-Livin siRNA was successfully constructed and infected into K562 cells. Recombinant adenovirus vector silenced Livin gene at the level of mRNA and protein, inhibited proliferation and enhanced apoptosis and sensitivity to Adriamycin, Vincristine and Etoposide in K562 cells. **Conclusion** The recombinant adenovirus Ad5-Livin siRNA effectively silences the expression of Livin gene and enhances the apoptosis and sensitivity to anticancer drugs in K562 cells. Livin is a new molecular target of leukemia's therapy.

Key words: recombinant adenovirus; RNA interference; Livin; K562 cells; drug resistance

细胞凋亡调控异常在肿瘤的发生、发展中起着重要的作用。Livin 是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein,IAPs)新近发现的成员。IAPs 是一类与细胞凋亡密切相关的蛋白质,主要通过阻断半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶(Caspases)级联反应来抑制肿瘤细胞的凋亡。研究表明,Livin 在白血病细胞中呈高表达[1],因此我们构建含特异性针对 Livin siRNA 的重组腺病毒,转入 K562 细胞,抑制 Livin 基因的表达,观察

作者简介:郭玥馨,女,河南省洛阳市人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。E-mali:ziputao912@qq.com
通信作者:徐酉华,电话:(023)63638834
收稿日期:2008-09-09;修回日期:2008-10-06

其对 K562 细胞增殖、凋亡及耐药的影响,为进一步探索白血病的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pSES-HUS、大肠杆菌 *E. coli* DH5α、BJ-Adeasy,HEK293 细胞由本室保存。限制性内切酶 *Sfi* Ⅰ、质粒提取试剂盒、DNA 连接试剂盒、逆转录试剂盒(TaKaRa 公司),限制性内切酶 *Pme* Ⅰ和 *Pac* Ⅰ(NEW ENGLAND 公司),Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司),DMEM/F12、1640 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(HyClone 公司),抗 Livin 抗体(ABcam)、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(Santa Cruz 公司),Annexin Ⅴ-FITC 细胞凋亡试剂盒(凯基生物),依托泊苷(VP16,江苏恒瑞),顺铂(DDP,德州德药),长春新碱(VCR)、阿霉素(ADM)购于深圳万乐药业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 高滴度重组腺病毒 Ad5-Livin siRNA 的收获 靶向 Livin 基因的特异性 siRNA 序列参考文献[2],交由 TaKaRa 公司合成带有 *Sfi* Ⅰ酶切黏性末端的 DNA 片段。所用 siRNA 的序列:siRNA-1 正义链 5′-GTGGTTCCCCAGCTGTCAG-3′,反义链 5′-CTGACAGCTGGGGAACCAC-3′;siRNA-2 正义链 5′-GGAAGAGACTTTGTCCACA-3′,反义链 5′-TGTGGACAAAGTCTCTTCC-3′。*Sfi* Ⅰ酶切含红色荧光蛋白(RFP)的载体 pSES-HUS,将酶切载体和 2 对 siRNA 连接,转化入感受态细菌 DH5α,挑选中等大小克隆,将酶切鉴定正确的送重庆医科大学分子生物学实验室测序,筛选出所需阳性克隆。*Pme* Ⅰ酶切 pSES-HUS-Livin siRNA,转入腺病毒骨架质粒 BJ-Adeasy 中,根据电泳筛选已导入 siRNA 的阳性克隆的质粒,转化入 DH5α,进一步以 *Pac* Ⅰ酶切鉴定 Adeasy-Livin siRNA。将重组腺病毒质粒转染人胚肾 HEK293 细胞,进行扩增和包装,转染后 48 h 通过荧光显微镜观察红色荧光来检查转染是否成功。25 ~ 28 d 后,待大部分细胞漂浮后,收集细胞,重复冻溶细胞 3 次,收集上清得病毒原液。取病毒原液感染 HEK293 细胞,大量扩增重组腺病毒,乒乓感染扩增至第 4 轮时,即为高滴度的 Ad5-Livin siRNA 腺病毒,存于 -80 ℃待用。

1.2.2 重组腺病毒滴度的测定 将 HEK293 细胞接种于 24 孔板,4 h 后以 400 μl/孔感染病毒,培养 24 h 后,荧光显微镜计数表达 RFP 的阳性细胞数。按公式计算重组腺病毒滴度。

病毒滴度(pfu/ml) = RFP 阳性细胞数 × 病毒上清稀释倍数/0.4

1.2.3 流式细胞仪测定 K562 细胞的感染效率并筛选最适感染复数 将 K562 细胞接种到 24 孔板中,按不同的感染复数(multiplicity of infection,MOI)设立实验组,分别设为 MOI 10、50、100、200、500 组,24 h 后加入相应病毒量。感染 72 h 后,收集细胞,台盼蓝拒染法检测细胞活力并送流式细胞仪检测感染效率,筛选最适感染复数。

1.2.4 Real-time PCR 检测 Livin mRNA 的表达 取感染 72 h 各组 K562 细胞,分为对照组、感染重组腺病毒空载体组、感染 Ad5-siRNA-1 组和感染 Ad5-siRNA-2 组,用 RNA 提取试剂盒(GENEMEGA 公司)提取 RNA,逆转录为 cDNA,用 Real-time PCR 试剂盒(博日科技)和扩增仪(Gene 6000)进行扩增。内参 GAPDH 上游引物:5′-CATGAGAAGTATGACAACAGCCT-3′,下游引物:5′-AGTCCTTCCACGATACCAAAGT-3′;Livinα、β 上游引物:5′-TGCCTCTGGGTACCCTGAGC-3′,Livinα 下游引物:5′-TCTGGGCCTCGGCTGGACTGA-3′,Livinβ 下游引物:5′-ACATCCCTGGCTCCTGGCTC-3′;引物由 TaKaRa 公司设计合成;扩增条件:95 ℃ 7 min;95 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环。记录各组 Ct 值,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法算出 Livin mRNA 的抑制率[3]。

抑制率(%) = $(1-2^{-\Delta\Delta Ct})\times 100\%$

1.2.5 Western blot 检测 Livin 蛋白的表达 收集感染72 h 各组细胞,提取总蛋白。取 40 μg 蛋白样品进行 12% SDS-PAGE 电泳,半干转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 以封闭非特异反应物。封闭后的膜与 1∶100 稀释的 Livin 一抗 4 ℃ 孵育过夜。TTBS 洗膜,与 1∶2 000 稀释的 Livin 二抗孵育 1.5 h。TTBS 洗膜,化学发光试剂盒反应 3 min,胶片曝光,拍照。实验中以 GAPDH 作为内参。

1.2.6 MTT 法检测 K562 细胞增殖 将各组细胞以 2×10^3/孔的细胞数接种于 96 孔板,同时设只加培养基的空白对照组。分别在感染后 1 ~ 6 d 加 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h 后离心,弃上清,加 150 μl DMSO,振荡混匀,酶标仪检测 450 nm 波长时的吸光度值[D(450)],绘制细胞生长曲线。

1.2.7 Annexin Ⅴ-FITC/PI 法检测细胞凋亡率 以 2.5×10^5/ml 的细胞数传代,感染 72 h 后分别收集各组细胞约 1×10^6个,500 μl Binding Buffer 悬浮细胞,加 5 μl Annexin Ⅴ-FITC 和 5 μl PI 充分混匀,室温避光反应 15 min,1 h 内流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.8 MTT 法检测细胞药物敏感性 细胞感染成功后,以 2×10^5/ml 的细胞数接种于 96 孔板,加入不同浓度各种化疗药物,同时设只加培养基的对照组。ADM 终浓度:0、0.001、0.01、0.1、1、10 μg/ml,VP16 终浓度:0、0.05、0.5、5、50、500 μg/ml,VCR 终浓度:0、0.01、0.1、1、10、100 μg/ml,DDP 终浓度:0、2.5、5、10、20、40 μg/ml。培养 48 h 后,采用 MTT 法测定各组细胞不同药物的半数抑制浓度(IC_{50})。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 重组腺病毒 Adeasy-Livin siRNA 的构建与鉴定

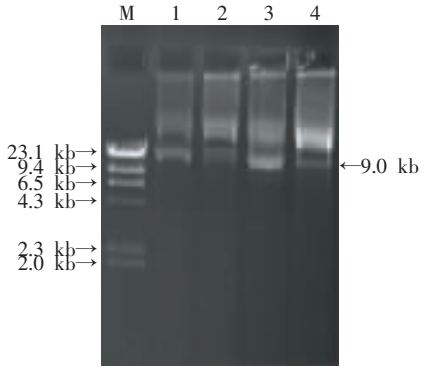
pSES-HUS-siRNA-1、pSES-HUS-siRNA-2 不能被 *Sfi*Ⅰ酶切开,表明构建成功(图 1),进一步测序证实所含目的基因序列准确无误,pSES-HUS-siRNA 重组质粒构建成功。*Pme*Ⅰ酶切重组质粒后转入 BJ-Adeasy,提取质粒,*Pac*Ⅰ酶切质粒后电泳,可见 20.0 kb 和 4.5 kb 左右的条带各 1 条,证实同源重组成功(图 2)。

2.2 收获高滴度 Ad5-Livin siRNA 重组腺病毒

通过脂质体介导,将 *Pac* Ⅰ酶切后线性化的 Adeasy-siRNA 转染产病毒的包装细胞 HEK293。腺病毒质粒含 RFP 基因,转染 48 h 可观察到明显的红色荧光,且随着时间的延长荧光强度逐渐增强,此过程约 4 周(图 3)。应用 RFP 计数法和倍比稀释法测定重组腺病毒滴度,病毒滴度约为 1.1×10^{11} pfu/ml。

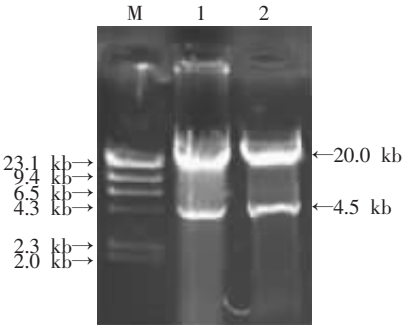
2.3　筛选重组腺病毒 Ad5-siRNA 感染 K562 细胞的最适感染复数

荧光显微镜和流式细胞仪检测表明,随着感染复数的增加,病毒的感染率也增加(图 4、5)。但台盼蓝拒染法检测细胞活力发现,MOI > 100 以后,细胞活力减弱,死亡细胞明显增加。比较不同的感染复数,MOI 为 100 时细胞的存活率及感染率均较好,感染率为 15.91%,存活率在 80% 以上,故将 MOI = 100 作为进一步实验的最适感染复数(表 1)。



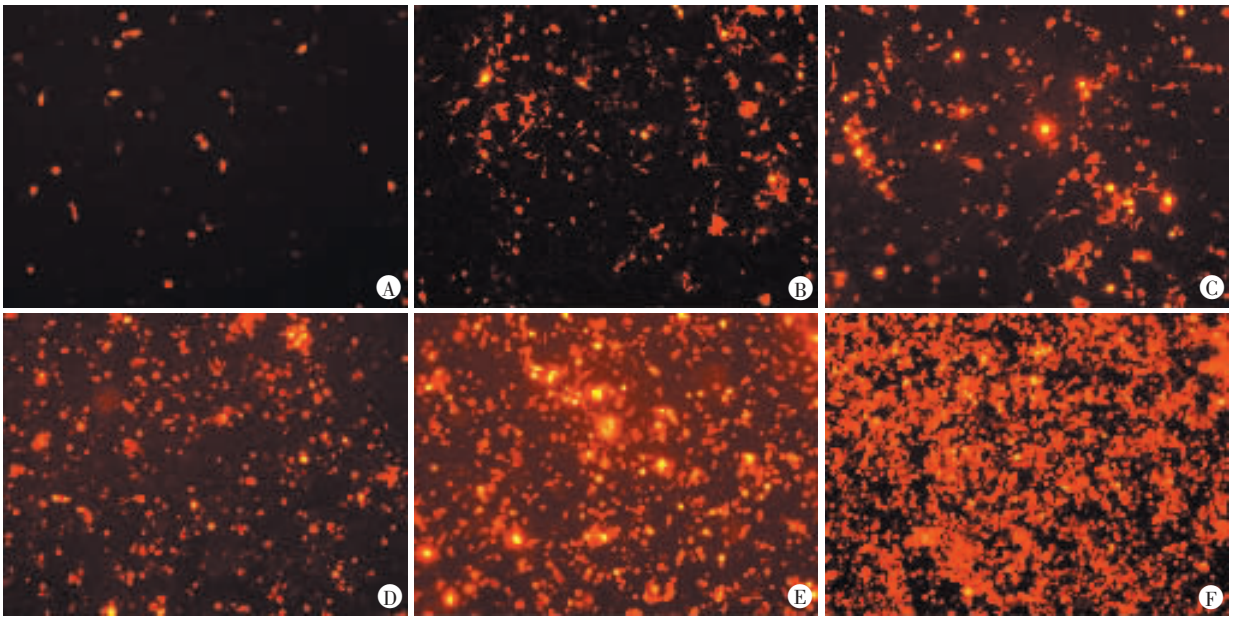
M: λ-*Hind* Ⅲ DNA 标记物;1,2: pSES-HUS-siRNA-1 经 *Sfi* Ⅰ酶切;3,4: pSES-HUS-siRNA-2 经 *Sfi* Ⅰ酶切

图 1　pSES-HUS-siRNA 经 *Sfi* Ⅰ酶切电泳图



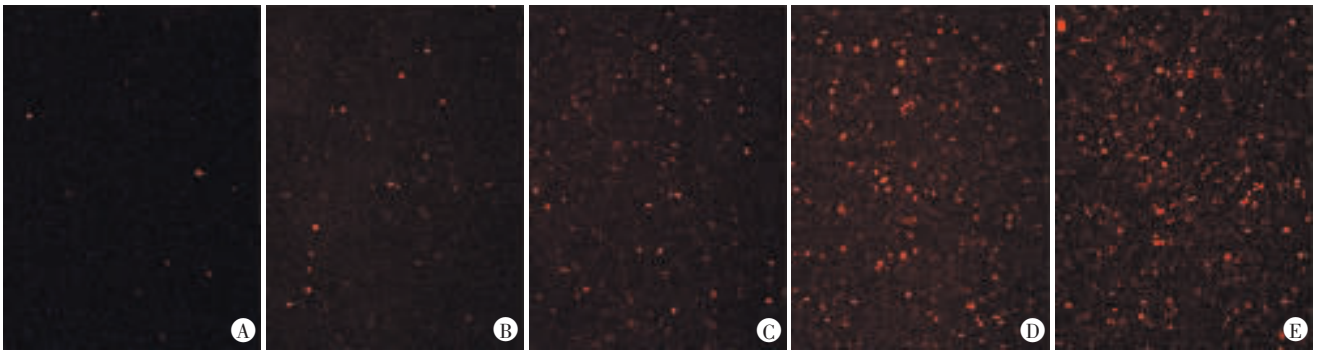
M: λ-*Hind* Ⅲ DNA 标记物;1: Adeasy-siRNA-1 经 *Pac* Ⅰ酶切;2: Adeasy-siRNA-2 经 *Pac* Ⅰ酶切

图 2　重组质粒 Adeasy-siRNA 经 *Pac* Ⅰ酶切电泳图



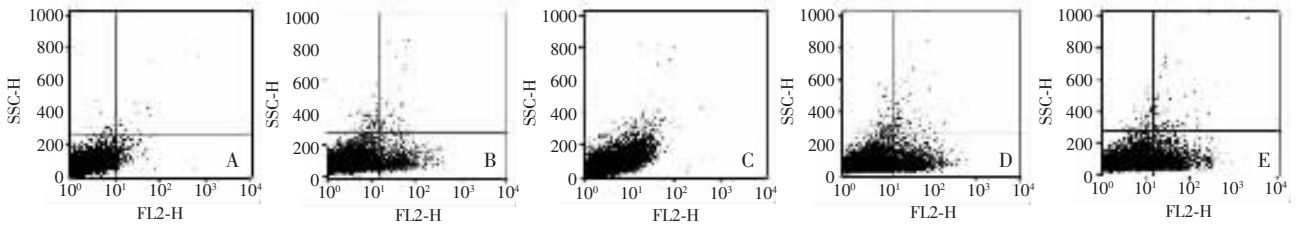
A ~ F:分别为转染 1、5、10、15、21、28 d

图 3　荧光显微镜观察 Adeasy-siRNA 转染 HEK-293 细胞　(×100)



A ~ E:MOI 分别为 10、50、100、200、500

图 4　荧光显微镜观察重组腺病毒 Ad5-siRNA 感染 K562 细胞　(×100)

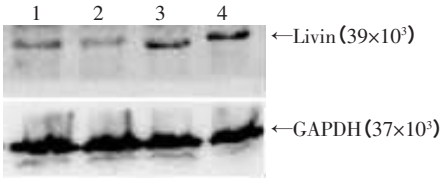


A-E:MOI 分别为 10、50、100、200、500

图 5 流式细胞仪检测重组腺病毒 Ad5-siRNA 感染 K562 细胞

表 1 不同病毒感染复数的细胞感染率及存活率($n=3$,%,$\bar{x}\pm s$)

MOI	存活率	感染率
1	91.34±1.09	2.94±0.11
50	85.26±1.45	8.94±0.17
100	81.57±1.23	15.91±0.10
200	70.11±1.15	16.55±0.21
500	58.73±1.62	17.23±0.15



1:Ad5-siRNA-1 组;2:Ad5-siRNA-2 组;3:对照组;4:感染空载体组

图 6 各组 K562 细胞 Livin 蛋白的表达

2.4 Real-time PCR 检测干扰后 Livin mRNA 的表达变化

感染 Ad5-siRNA 的 K562 细胞的 Livin mRNA 表达明显降低。感染 Ad5-siRNA-1、Ad5-siRNA-2 组 Livinα 抑制率分别为(87.26±3.53)%、(88.44±3.20)%,Livinβ 抑制率分别为(83.62±4.38)%、(86.55±3.98)%($P<0.01$),而空载体组 Livin 表达无明显变化,证实 Ad-Livin siRNA 可有效降解 K562 细胞的 Livin mRNA。

2.5 Western blot 检测干扰后 Livin 蛋白的表达变化

各组细胞 GAPDH 表达无明显变化,而感染 Ad5-siRNA 的 K562 细胞 Livin 蛋白表达明显下降(图 6)。采用 Quantity One 软件进行蛋白条带灰度分析,Livin/GAPDH 分别为对照组(1.14±0.12),感染空载体组(1.22±0.06),感染 Ad5-siRNA-1 组(0.26±0.04),感染 Ad5-siRNA-2 组(0.27±0.08)。感染 Ad5-siRNA-1、Ad5-siRNA-2 组 Livin 蛋白表达水平明显低于其他 2 组($P<0.01$),说明 Ad5-siRNA 可抑制 K562 细胞 Livin 蛋白的表达。

2.6 K562 细胞的增殖结果

细胞增殖曲线显示,Ad5-siRNA 可明显抑制 K562 细胞的增殖,与其他 2 组相比,差异具有统计学意义($P<0.05$,表 2)。

2.7 K562 细胞的凋亡情况

感染后 72 h 细胞凋亡率分别为对照组(2.82±0.63)%,感染空载体组(3.83±0.65)%,感染 Ad5-siRNA-1 组(18.40±1.22)%,感染 Ad5-siRNA-2 组(13.74±1.86)%。感染 Ad5-siRNA-1、Ad5-siRNA-2 组的凋亡率均显著高于其他 2 组($P<0.01$),说明重组腺病毒 Ad5-Livin siRNA 可诱导 K562 细胞的凋亡。

2.8 细胞药物敏感性结果

感染 Ad5-siRNA 的 K562 细胞对 ADM、VP16 和 VCR 的 IC_{50} 均低于对照组和感染空载体组($P<0.01$),但对 DDP 的 IC_{50} 差异无统计学意义($P>0.05$,表 3)。说明 Ad5-siRNA 可增加 K562 细胞对部分化疗药物的敏感性。

表 3 肿瘤细胞对各种化疗药物的半数抑制浓度($n=3$,μg/ml,$\bar{x}\pm s$)

组别	ADM	VP16	VCR	DDP
对照组	26.62±5.37	25.02±5.64	30.05±2.11	21.68±4.19
感染空载体组	27.21±5.80	25.46±5.47	30.48±3.17	23.58±2.66
Ad5-siRNA-1 组	7.46±1.95[a]	8.10±1.78[a]	1.53±0.56[a]	20.80±1.27
Ad5-siRNA-2 组	1.51±0.61[a]	7.97±2.54[a]	3.79±0.92[a]	22.24±3.31

a:$P<0.01$,与对照组和感染空载体组比较

表 2 不同感染时间点 K562 细胞的增殖结果[$D(450)$,$n=6$,$\bar{x}\pm s$]

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
对照组	0.13±0.02	0.21±0.04	0.34±0.02	0.58±0.01	0.66±0.02	0.73±0.02
感染空载体组	0.15±0.02	0.23±0.03	0.36±0.03	0.61±0.02	0.70±0.05	0.78±0.03
Ad5-siRNA-1 组	0.09±0.01[a]	0.14±0.04[a]	0.25±0.05[a]	0.39±0.01[a]	0.51±0.02[a]	0.57±0.01[a]
Ad5-siRNA-2 组	0.08±0.03[a]	0.16±0.03[a]	0.24±0.01[a]	0.40±0.04[a]	0.53±0.03[a]	0.58±0.02[a]

a:$P<0.05$,与对照组和感染空载体组比较

3　讨论

细胞凋亡又称细胞的程序性死亡,是一个极其复杂的过程,其发生受到一系列基因的精确调控。随着研究的深入,凋亡不仅参与肿瘤的发生、发展,在肿瘤的治疗中也起着重要作用。部分化疗药物治疗肿瘤的机制是诱导肿瘤细胞凋亡,而凋亡相关基因的异常表达可使肿瘤细胞对这类药物产生耐药。Livin 是 IAPs 新近发现的成员,是唯一具有 2 个亚型(α 和 β)的 IAPs[1],在大多数肿瘤细胞系中高表达,Livin 的高表达与肿瘤的发生、发展、复发及患者的预后均密切相关[4-6]。Zhang 等[7]研究发现。Livin 在白血病的耐药中可能有重要作用。因此,我们构建靶向 Livin 的 RNA 干扰腺病毒表达载体,沉默 K562 细胞的 Livin 基因,研究其对 K562 细胞增殖、凋亡及耐药性的影响。

在本实验中,我们选用 Adeasy 重组腺病毒系统作为载体构建基础。重组腺病毒在基因治疗的实验研究中广泛应用,但将其用于研究沉默 Livin 基因与肿瘤的关系还比较少。我们成功构建了含特异性 Livin siRNA 的重组腺病毒,经酶切鉴定、测序、荧光显微镜等证实构建成功。将含 Livin siRNA 和空载体的重组腺病毒感染 K562 细胞。通过 Real-time PCR 和 Western blot 检测,重组腺病毒 Ad5-Livin siRNA 在 mRNA 和蛋白质水平上都可明显抑制 Livin 基因表达。重组腺病毒具有以下优点:对人致病性低,滴度高,包装容量大,与人类基因同源无致突变性,同时表达多个基因[8-11]。而 Adeasy 系统是一种新型快捷的腺病毒重组系统,具有省时、高效、直接,可较长时间发挥 RNA 干扰作用等优点。且该系统所使用的载 体含 RFP 基因序列,进入细胞后,可通过荧光显微镜直接观察病毒滴度和基因转染效率。

经流式细胞仪和 MTT 检测结果证明,Ad5-Livin siRNA 通过沉默抗凋亡基因 Livin,解除了其对 Caspase 的抑制,使凋亡通路顺畅,逆转白血病细胞对凋亡的抑制现象,从而抑制 K562 细胞增殖,诱导其自发凋亡。

阿霉素是蒽环类抗肿瘤药物,依托泊苷和长春新碱是生物碱类抗肿瘤药物,都是临床白血病常用的治疗药物。而顺铂属杂类抗肿瘤药,与上述 2 类药物的抗肿瘤机制不同,主要用于治疗实体瘤。肿瘤药敏实验结果表明,Ad5-Livin siRNA 可降低 K562 细胞对长春新碱、依托泊苷和阿霉素的 IC_{50},但对顺铂无影响,这种逆转耐药的作用是通过抑制 Livin 的表达及其抗凋亡作用实现的。而对不同药物的敏感性有不同的影响,可能与化疗药物不同的作用机制有关。说明 Ad5-Livin siRNA 可增加 K562 细胞对部分化疗药物的敏感性。

本研究初步证实了通过构建含特异性 Livin siRNA 的重组腺病毒,可有效抑制 K562 细胞中 Livin 的表达,抑制增殖,诱导凋亡,增加对部分化疗药物的敏感性。在对 Hela、MDA-MB-231、SPCA-1 和 A549 等细胞系的研究中也得到类似的结果[2,12-14]。综上,Livin 与白血病多药耐药的产生有关,为 Livin 成为白血病治疗的新靶点及将基因治疗应用于临床奠定基础。

参考文献:

[1] Ashhab Y, Alian A, Polliack A, *et al*. Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J]. FEBS Lett, 2001, 495(1-2): 56-60.

[2] Crnkovis-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene[J]. Oncogene, 2003, 22(51): 8330-8336.

[3] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[4] Augello C, Caruso L, Marco M, *et al*. Inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) expression and their prognostic significance in hepatocellular carcinoma[J]. BMC cancer, 2009, 9: 125.

[5] Liu H, Kong C, Zeng Y, *et al*. Livin may serve as a marker for prognosis of bladder cancer relapse and a target of bladder cancer treatment [J]. Urologic Oncology, 2009, 27(3): 277-283.

[6] Kempkensteffen C, Hinz S, Krause H, et al. Expression of splicing variants of the inhibitor of apoptosis Livin in testicular germ cell tumors [J]. Tumor Biology, 2008, 29(2): 76-82.

[7] Zhang Q P, Xiong J, Jin Y X, *et al*. CC chemokine ligand 25 enhances resistance to apoptosis in CD^{4+} T cells from patients with T-cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia by means of livin activation[J]. Cancer Res, 2004, 64(20): 7579-7587.

[8] Hayashi S, Leu D, Yamii Y, *et al*. Effect of adenovirus-mediated transfer of the CTLA4IG gene in hamster-to-rat xenotransplantation[J]. Transplantation, 2005, 80(4): 494-499.

[9] Kanerva A, Hemminki A. Adenoviruses for treatment of cancer[J]. Ann Med, 2005, 37(1): 33-43.

[10] 王义生, 张　弛, 李月白, 等. 过氧化物酶增殖子活化受体-γ siRNA 腺病毒载体的构建[J]. 郑州大学学报:医学版, 2008, 43(3): 477-479.

[11] 王朝霞, 王科明, 韩　亮, 等. 重组人 p53 腺病毒注射液联合泰索帝对人肺腺癌细胞生长的抑制作用[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(6): 13-17.

[12] 李　凡, 王小毅, 陈　力, 等. Livin 靶向 RNA 干扰对 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(24): 2302-2306.

[13] Wang R, Lin F, Wang X, *et al*. Silencing Livin gene expression to inhibit proliferation and enhance chemosensitivity in tumor cells[J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(6): 402-412.

[14] Yuan D, Liu L, Xu H, *et al*. The effects on cell growth and chemosensitivity by livin RNAi in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 320(1-2): 133-140.

(编辑　张　维)