论著

文章编号:1000-5404(2010)17-1834-04

靶向 Hsp90β 的 siRNA 对 Jurkat 细胞生长的抑制作用

索涛莉[1],徐酉华[1],刘筱梅[1],郭玉霞[1],罗 庆[2],梁 睿[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院:血液科[1],儿科研究所儿童肿瘤实验室[2])

【摘要】 目的 探讨 RNA 干扰技术沉默热休克蛋白 90β(heat shock protein 90 beta,Hsp90β)基因表达对 Jurkat 细胞生长的抑制作用。方法 根据 Hsp90β 基因全长 cDNA 序列 Hsp90B1(NM_003299.1),设计并构建针对 Hsp90β 基因的 siRNA 真核表达载体,应用 Lipofectamine™ LTX 转染入 Jurkat 细胞后,Real-time PCR 检测 Hsp90β mRNA 水平的变化,筛选出沉默效果最好的 Hsp90β siRNA 干扰片段;Western 印迹法检测 Hsp90β 蛋白表达水平;MTT 法和流式细胞仪检测干扰前后对 Jurkat 细胞生长抑制作用。结果 成功构建 Hsp90β 基因特异性的真核表达载体 pSOS-Hsp90βi,转染 Jurkat 细胞后发现 pSOS-Hsp90βi2 的沉默效果最明显,Jurkat 细胞 Hsp90β mRNA 及蛋白表达均明显降低($P<0.05$)。Hsp90β 基因表达沉默后,Jurkat 细胞增殖明显受抑($P<0.01$),实验组与对照组的细胞凋亡率分别为:(2.69±0.34)%、(3.63±0.38)%、(19.56±0.62)%,细胞凋亡率比空白对照组及转染 pSOS-Hsp90βi control 组明显增加,差异具有显著意义($P<0.05$)。结论 靶向 Hsp90β 的 siRNA 下调 Hsp90β 表达对人白血病 Jurkat 细胞有明显的生长抑制作用。

【关键词】 RNA 干扰;Hsp90β 基因;Jurkat 细胞;实时荧光定量 PCR
【中图法分类号】 R394.33;R730.231;R733.7 【文献标志码】 A

Inhibitory effect of small interfering RNA targeting heat shock protein 90β on growth of Jurkat cells

Suo Taoli[1], Xu Youhua[1], Liu Xiaomei[1], Guo Yuxia[1], Luo Qing[2], Liang Rui[2] ([1]Department of Hematology, Children's Hospital; [2]Laboratory of Children's Oncology, Institute of Pediatrics, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To study the inhibitory effect of small interfering RNA (siRNA) targeting heat shock protein 90 beta (Hsp90β) gene on growth of Jurkat cells. Methods Three specific interference sequences and a random controlled sequence were inserted into the pSOS-HUS according to the cDNA sequence Hsp90B1 (NM_003299.1) of Hsp90β gene. Recombinant eukaryotic expression plasmids, including pSOS-Hsp90βi1, pSOS-Hsp90βi2, pSOS-Hsp90βi3 and pSOS-Hsp90βi control, were constructed and transfected into Jurkat cells by Lipofectamine™ LTX. Gene silencing efficiency of recombinant plasmid pSOS-Hsp90βi was monitored by real-time PCR and effective Hsp90β-specific RNAi sequences were screened. Hsp90β expression level was measured by Western blotting. Inhibitory effect of Hsp90β gene on growth of Jurkat cells was detected by MTT assay and flow cytometry, respectively, before and after interfered by siRNA. Results The recombinant plasmid pSOS-Hsp90βi1,2,3 eukaryotic vector targeting Hsp90β was successfully constructed. The expression of Hsp90β in Jurkat cells transfected with pSOS-Hsp90βi2 was significantly inhibited at both mRNA and protein levels ($P<0.05$). MTT assay and flow cytometry showed that Hsp90βsiRNA inhibited the proliferation of Jurkat cell ($P<0.01$) 19.56% of Jurkat cells apoptosis were also observed ($P<0.05$). Conclusion Chemically synthesized specific siRNA targeting Hsp90β can effectively reduce the expression of Hsp90β gene and growth of leukemia Jurkat cells.

【Key words】 RNA interference; heat shock protein 90β; Jurkat cells; quantitative real-time PCR

Supported by the Project of Scientific Research of Chongqing Medical University (XBYB2007058). Corresponding author: Liu Xiaomei, Tel: 86-23-63633200, E-mail: liuxiaomei3@sina.com

热休克蛋白90(heat shock protein90,Hsp90)是高度保守的分子伴侣,可被热和丝裂原双重诱导。Hsp90以其是否有富含谷氨酰胺片段而分为 Hsp90α

【基金项目】 重庆医科大学校级科研课题(XBYB2007058)
【通信作者】 刘筱梅,电话:(023)63633200,E-mail:liuxiaomei3@sina.com

和 Hsp90β 两类。Hsp90β 在多种肿瘤组织中均有表达，与肿瘤的发生、发展、耐药性之间有着密切的关系，是很多癌基因通路上的重要组成部分[1-3]。有研究指出，人白血病细胞内的 Hsp90β 活性被抑制后，会使 Bcr-Abl 酪氨酸激酶和丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶降解，从而使细胞发生凋亡和分化[4-7]。因此，如何抑制 Hsp90β 是目前探索肿瘤治疗的一条新的途径。本研究采用质粒 pSOS-HUS 对 Hsp90β 最佳 siRNA 转录模板 DNA 链进行筛选，并构建出 pSOS-Hsp90βi 真核表达载体，转入 Jurkat 细胞中，靶向抑制 Hsp90β 基因的表达，并检测该细胞的生长及凋亡变化，研究该基因下调对 Jurkat 细胞增殖及凋亡的影响，初步阐明其作用机制，为白血病基因治疗的研究奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和相关细胞株 筛选质粒 pSOS-HUS 由课题组与美国芝加哥大学分子肿瘤实验室合作开发，大肠杆菌 *E. coli* DH5α，Jurkat 细胞由本院儿研所儿童肿瘤实验室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、SfiI，T_4 DNA 连接酶，质粒 DNA 提取试剂盒(日本 TaKaRa 公司)；DNA 胶回收纯化试剂盒(美国 Promega 公司)；转染试剂 Lipofectamine™ LTX with PLUS™ Reagent 及 Real-time PCR 引物(美国 Invitrogen 公司)；RNA 提取试剂盒及 RealMasterMix-SYBR Green(TIANGEN 公司)；犹质胎牛血清(HyClone 公司)；DMEM/F12、1640 培养基(美国 Gibco 公司)；抗 Hsp90β 抗体(Santa Cruz 公司)；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(中杉金桥)；蛋白提取试剂盒及 Annexin V-PE 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物)，Hsp90β 基因 siRNA 模板 DNA 链由 TaKaRa 公司合成。DNA 测序委托重庆医科大学感染病实验室进行。

1.2 实验方法

1.2.1 Hsp90β 基因 siRNA 转录模板 DNA 链的设计、合成 根据 siRNA 设计原则以及 Hsp90β 基因全长 cDNA 序列(NM_003299.1)，在网站 http://www.dharmacon.com/sidesign/设计 Hsp90β 基因的特异性插入片段序列，经 NCBI Blast 排除了其非特异同源性，最后选定抑制 Hsp90β 基因表达的 3 对 siRNA 序列，选用一条随机序列作为阴性对照，并加上 pSOS-HUS 质粒 SfiI 酶切后粘性末端互补序列，提交公司合成。本研究设计的 3 对以 Hsp90β 基因为靶目标的 siRNA 的 DNA 序列见表 1。

表 1 沉默 Hsp90β 的 RNA 干扰序列

基因	序列	目标位置
NM_003299.1	正义链 5′-aGGAAGAAGCTTGTTCGTAATTTT-3′ 反义链 5′-aTTACGAACAAGCTTCTTCCTTTT-3′	1 487～1 505
NM_003299.1	正义链 5′-aATGCAAAGGTGGAAGAAGATTTT-3′ 反义链 5′-aTCTTCTTCCACCTTTGCATTTTT-3′	2 360～2 378
NM_003299.1	正义链 5′-aGGGTAAAAGTAGAGAAGGATTTT-3′ 反义链 5′-aTCCTTCTCTACTTTTACCCTTTT-3′	210～228

各对小写部分为 pSOS-HUS 质粒 SfiI 酶切后粘性末端互补序列

1.2.2 真核表达载体 pSOS-Hsp90βi 的构建 经限制性内切酶 *Sfi*Ⅰ酶切 pSOS-HUS 质粒线性化，T_4 DNA 连接酶分别连接 4 对模板 DNA 与酶切质粒，后转导入感受态细菌 DH5α，含新霉素和卡那霉素平板加压筛选后，提取质粒酶切鉴定，正确后送测序鉴定。合成的 Hsp90β siRNA 的 DNA 单链退火后连接到质粒 pSOS-HUS 上 U6 与 H1 启动子间的 *Sfi*Ⅰ酶切位点，插入片段不含 *Sfi*Ⅰ酶切位点，即重组后的质粒不能被 *Sfi*Ⅰ酶切开，但可以被 *Hind*Ⅲ酶切开[11]。

1.2.3 流式细胞仪测定 Jurkat 细胞转染效率 用 RPMI1640 完全培养基于 37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养细胞，使细胞融合度达到 80%(5×10^5/2 ml)；Lipofectamine™ LTX 介导将 pSOS-Hsp90βi 质粒转染入细胞中(2.5 μg pSOS-Hsp90βi 质粒和 8.4 μl Lipofectamine™ LTX)，于转染后 24、48 h 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达情况。48 h 后收集细胞，台盼蓝据染法检测细胞活力并用流式细胞仪检测转染效率。

1.2.4 Real-time PCR 检测转染后 Jurkat 细胞 Hsp90β mRNA 的表达 取转染 48 h 后的各组细胞，分为转染 pSOS-Hsp90βi contorl 组、转染 pSOS-Hsp90βi1 组、转染 pSOS-Hsp90βi2 组、转染 pSOS-Hsp90βi3 组，提取总 RNA，逆转录为 cDNA，进行 Real-time PCR 扩增。内参 GAPDH 上游引物：5′-CAGCGACACCCACTCCTC-3′，下游引物：5′-TGAGGTCCACCAC-CCTGT-3′(扩增片段为 109 bp)；Hsp90β 上游引物：5′-CCAT-AGCCAAATCTGGGACAAGC-3′，下游引物：5′-GAAGGCGGAAT-AGAAACCGACAC-3′(扩增片段为 116 bp)；扩增条件：94 ℃预变性 2 min，94 ℃ 变性 10 s，60 ℃退火 10 s，72 ℃延伸 20 s，扩增 39 个循环。记录各组 Ct 值，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法算出各组细胞 Hsp90β mRNA 的表达量差异[8]。

1.2.5 Western blot 检测 Hsp90β 蛋白的表达 收集转染 72 h 后的各组细胞，提取总蛋白。取 20 μl 蛋白样品上样到 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳分离蛋白后再将凝胶蛋白转印到硝酸纤维素膜上，经 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h 后，加入 1∶200 稀释的 Hsp90β 一抗 4 ℃过夜，TTBS 洗膜与 1∶5 000 辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 2 h，再用 TTBS 洗膜，化学发光液曝光成像，凝胶图像分析。

1.2.6 MTT 法检测转染真核表达载体后 Jurkat 细胞增殖活力 实验分为转染 pSOS-Hsp90βi contorl 组、转染 pSOS-Hsp90βi2 组、空白对照组和只加培养基的对照组，每组设 5 个复孔。将各组细胞以 1×10^5/ml 的细胞数接种于 96 孔板，每孔加入 200 μl。分别在转染后 0、24、48、72 h 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，酶标仪检测波长 490 nm 的光密度值[D(490)]，绘制细胞增殖曲线[9,10]。

1.2.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将以上各组细胞制成单细胞悬液，以 2×10^5/ml 的细胞数接种于 6 孔板，每孔加入 2 ml。感染 48 h 后离心，弃上清，收集细胞，PBS 洗 2 次，500 μl Binding Buffer 悬浮细胞，加 1 μl Annexin V-PE 混匀，室温避光反应 15 min，1 h 内流式细胞仪检测凋亡率。

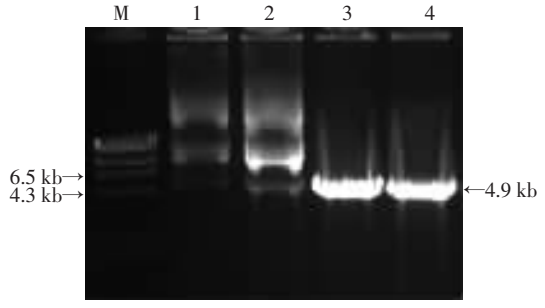
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行秩和检验和方差分析。

2　结果

2.1　真核表达载体 pSOS-HUS-Hsp90β siRNA 的构建与鉴定

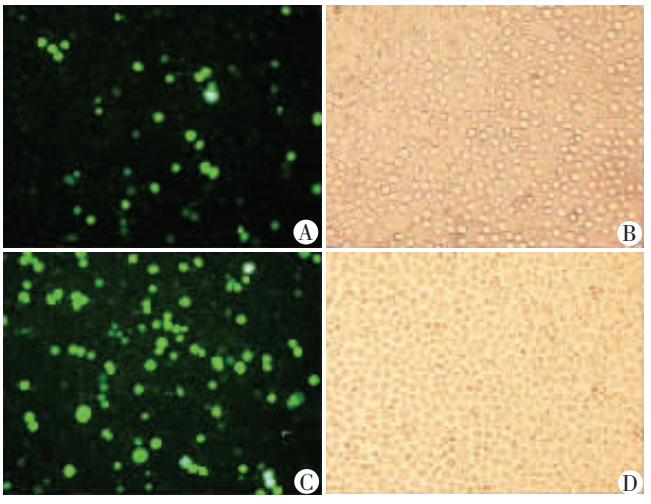
2.1.1　真核表达载体 pSOS-HUS-Hsp90β siRNA 酶切鉴定及基因测序结果　以 *Sfi* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切 pSOS-Hsp90βi1、pSOS-Hsp90βi2、pSOS-Hsp90βi3，可见未被 *Sfi* Ⅰ酶切开，*Hind* Ⅲ酶切后在 4.9 kb 大小处显示 DNA 条带，表明真核表达载体 pSOS-Hsp90βi 构建成功，见图 1。进一步测序证实所含目的基因序列准确无误。



M：λDNA *Hind* Ⅲ 标准；1：pSOS-HUS；2：pSOS-Hsp90βi/*Sfi* Ⅰ；3，4：pSOS-Hsp90βi/*Hind* Ⅲ

图 1　*Sfi* Ⅰ、*Hind* Ⅲ酶切 pSOS-Hsp90βi 电泳结果

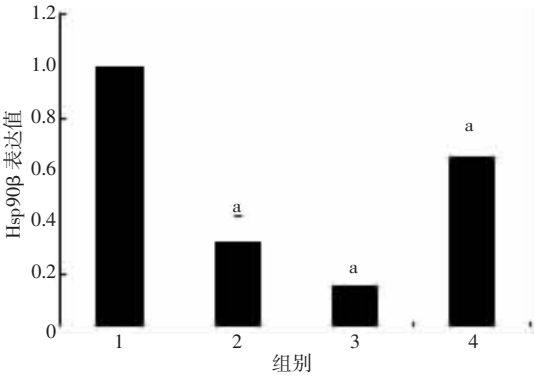
2.1.2　真核表达载体 pSOS-Hsp90βi 应用 Lipofectamine™ LTX 转染 Jurkat 细胞及转染效率的检测　Lipofectamine™ LTX 介导真核表达载体转染 Jurkat 细胞，24 h 后于倒置荧光显微镜下观察，可见转染 4 种 pSOS-Hsp90βi 质粒的 Jurkat 细胞有绿色荧光蛋白表达，在转染 48h 后荧光量增多，见图 2。FCM 检测结果显示转染效率为 27.67%。提示 pSOS-Hsp90βi 质粒构建成功，能有效感染 Jurkat 细胞。



A、C：转染 24、48 h 荧光显微镜观察；B、D：转染 24、48 h 平光观察

图 2　pSOS-Hsp90βi 转染 Jurkat 细胞 24、48 h 形态学观察　（×200）

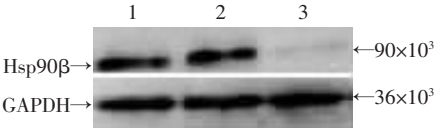
2.1.3　Real-time PCR 检测 Hsp90β mRNA 的表达　转染 Jurkat 细胞 48 h 后，转染了 pSOS-Hsp90βi2 的 Jurkat 细胞 Hsp90β mRNA 表达明显降低。各实验组 Jurkat 细胞 Hsp90β mRNA 水平与对照组相比均降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），显示 3 条特异序列对 Hsp90β 基因均具有一定的沉默效果。实验组各组两两比较（$P<0.05$），Hsp90βi2 沉默效果最好，见图 3。结果证明 pSOS-Hsp90βi2 对 Jurkat 细胞 Hsp90β mRNA 的表达具有很好的特异抑制作用。



1：pSOS-Hsp90βi control 组；2：pSOS-Hsp90βi1 组；3：pSOS-Hsp90βi2 组；4：pSOS-Hsp90βi3 组；a：$P<0.05$，与 pSOS-Hsp90βi control 组比较

图 3　转染 pSOS-Hsp90βi 后 Hsp90β 在各组 Jurkat 细胞中的表达

2.1.4　Wesrern blot 检测干扰后 Hsp90β 蛋白水平的表达　Jurkat/pSOS-Hsp90βi2 组的 Hsp90β 蛋白表达量明显低于 Jurkat 组与 Jurkat/ pSOS-Hsp90βi control 组（$P<0.05$），Jurkat 组与 Jurkat/ pSOS-Hsp90βi control 组之间差异无统计学意义（$P>0.05$），见图 4。结果证明 pSOS-Hsp90βi2 可抑制 Jurkat 细胞表达 Hsp90β 蛋白。

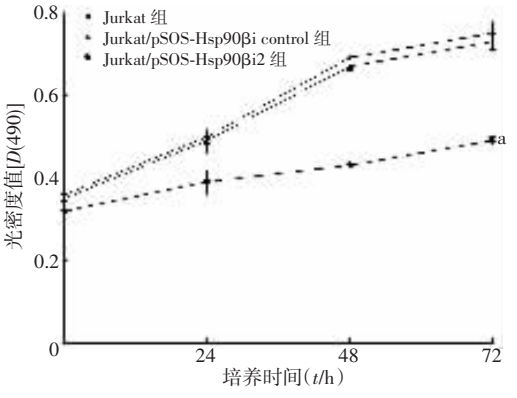


1：Jurkat 组；2：Jurkat/pSOS-Hsp90βi control 组；3：Jurkat/pSOS-Hsp90βi2 组

图 4　Western 印迹法检测各组 Jurkat 细胞中 Hsp90β 蛋白的表达

2.2　Hsp90β siRNA 对细胞增殖和凋亡的影响

2.2.1　MTT 法检测 Jurkat 细胞增殖曲线　细胞增殖曲线显示，转染 pSOS-Hsp90βi2 组 Jurkat 细胞增殖活性与其他两组比较差异有统计学意义（$P<0.01$），48 h 后抑制作用明显；而转染了 pSOS-Hsp90βi control 组 Jurkat 细胞增殖活性与空白对照组（Jurkat 组）相比无明显变化（$P>0.05$）。见图 5。



a：$P<0.01$，与 Jurkat 组和 Jurkat/pSOS-Hsp90βi control 组比较

图 5　不同处理组 Jurkat 细胞增殖曲线分析

2.2.2　流式细胞仪检测 Jurkat 细胞凋亡　结果显示：空白对照组、转染 pSOS-Hsp90βi control 组及转染 pSOS-Hsp90βi2 组细胞凋亡率分别为：(2.69±0.34)%、(3.63±0.38)%、(19.56±

0.62)%。转染 pSOS-Hsp90βi2 组的凋亡率均明显高于其他两组($P<0.05$)。

3 讨论

Hsp90β 作为广泛存在于细胞内的一类高度保守的分子伴侣,通过维持其受体蛋白的稳定与活性而间接参与调控细胞内多条重要的信号转导通路,其独特的性质使其成为肿瘤治疗的良好分子靶点。其中与白血病致病密切相关的受体蛋白如 Bcr-Abl 酪氨酸激酶和 Ser/Thr 激酶等。Bcl-Abl 融合基因编码的蛋白产物 $p210^{Bcl\text{-}Abl}$ 和 $p185^{Bcl\text{-}Abl}$ 与 Hsp90β 结合,导致慢性粒细胞白血病和急性淋巴细胞白血病患者酪氨酸激酶活性增强,促进细胞增殖并且抑制细胞凋亡[4-7]。AKT 激酶是一种位于磷脂酰肌醇激酶下游区的 Ser/Thr 激酶,与 Hsp90β 结合活化后能刺激细胞增殖并抑制细胞凋亡[12]。我们考虑如果下调 Hsp90β 基因的表达,就能阻碍其受体蛋白的活化,抑制受体蛋白发挥作用,从而间接达到抑制肿瘤细胞生长促进其凋亡的目的,由此我们发现沉默 Hsp90β 基因单一靶点就能同时产生多路径抗肿瘤效应。

本研究旨在利用 RNA 干扰技术,通过沉默 Hsp90β 基因直接观察 Hsp90β 基因下调对人白血病 Jurkat 细胞增殖及凋亡的影响。

RNA 干扰技术是 siRNA 介导的转录后水平的基因沉默[13]。具有高效且特异的靶基因抑制作用,在基因功能研究以及肿瘤等疾病的基因治疗中显示出潜在的应用价值[14]。

在本实验中,我们应用质粒 pSOS-HUS 筛选及载体的双重功能[11,15],特异性的针对 Hsp90B1(NM_003299.1)设计并构建了 pSOS-Hsp90βi 真核表达载体,经酶切鉴定、测序、荧光显微镜等证实构建成功。从 mRNA 及蛋白质水平检测了 Hsp90β 基因在人白血病 Jurkat 细胞中的表达。结果显示,Jurkat 细胞可较高水平表达 Hsp90β,转染 pSOS-Hsp90βi2 后,Jurkat 细胞中 Hsp90β 基因的表达被有效沉默。

本研究分别经 MTT 法检测细胞增殖及流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示,Hsp90β 基因表达沉默后,Jurkat 细胞增殖明显受抑,细胞凋亡率比空白对照组及转染 pSOS-Hsp90βi control 组明显增加,差异具有显著意义($P<0.05$)。证明通过下调 Hsp90β 基因表达,Jurkat 细胞凋亡明显增加,细胞的生存力降低、分裂增殖受到抑制。我们推测其机制可能与靶向 Hsp90β 的 siRNA 抑制了人白血病 Jurkat 细胞中的 Hsp90β 表达,使相应影响增殖及凋亡的受体蛋白与其结合受阻,下游信号转导通路不能有效地激活,调控细胞增殖与凋亡的相关基因转录受阻有关。

综上所述,我们成功构建了有效靶向沉默 Hsp90β 基因表达的 RNAi 真核表达载体 pSOS-Hsp90βi2,抑制 Jurkat 细胞生长并诱导其凋亡,初步揭示了 Hsp90β 作用机制,为临床白血病细胞靶向的基因特异性 RNAi 治疗提供了理论依据。从目前 RNAi 的研究现状看,只要解决在体内稳定性,转染率及体内定位整合的技术问题,未来有望成为白血病治疗最有前景的基因治疗方案。

参考文献:

[1] Beck R, Verrax J, Gonze T, *et al*. Hsp90 cleavage by an oxidative stress leads to its client proteins degradation and cancer cell death[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77(3):375-383.

[2] Chan C T, Paulmurugan R, Gheysens O S, *et al*. Molecular imaging of the efficacy of heat shock protein 90 inhibitors in living subjects[J]. Cancer Res, 2008, 68(1):216-226.

[3] Chatterjee M, Jain S, Stuhmer T, *et al*. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival[J]. Blood, 2007, 109(2):720-728.

[4] Kurokawa M, Zhao C, Reya T, *et al*. Inhibition of apoptosome formation by suppression of Hsp90beta phosphorylation in tyrosine kinase-induced leukemias[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(17):5494-5506.

[5] Wu L X, Xu J H, Zhang K Z, *et al*. Disruption of the Bcr-Abl/Hsp90 protein complex:a possible mechanism to inhibit Bcr-Abl-positive human leukemic blasts by novobiocin[J]. Leukemia, 2008, 22(7):1402-1409.

[6] Peng C, Brain J, Hu Y, *et al*. Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T315I-induced leukemia and suppresses leukemic stem cells[J]. Blood, 2007, 110(2):678-685.

[7] Lu Z, Jin Y, Qiu L, *et al*. Celastrol, a novel HSP90 inhibitor, depletes Bcr-Abl and induces apoptosis in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells harboring T315I mutation[J]. Cancer Lett, 2010, 290(2):182-191.

[8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[-Delta Delta C(T)] Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.

[9] 任玉珊, 韩钰, 曹春雨, 等. 二氟甲基鸟氨酸对 T 淋巴瘤 Jurkat 细胞生长的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6):593-596.

[10] 郭玉霞, 金先庆, 罗庆, 等. 腺病毒介导的新基因 HA117 对 Jurkat 细胞多药耐药功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16):1556-1558.

[11] Luo Q, Kang Q, Song W X, *et al*. Selection and validation of optimal siRNA target sites for RNAi-mediated gene silencing[J]. Gene, 2007, 395(1/2):160-169.

[12] Larizza L, Magnani I, Beghini A. The Kasumi-1 cell line:at (8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2005, 46(2):247-255.

[13] Hannon G J. RNA interference[J]. Nature, 2002, 418(6849):244-251.

[14] Falschlehner C, Steinbrink S, Erdmann G, *et al*. High-throughput RNAi screening to dissect cellular pathways:a how-to guide[J]. Biotechnol J, 2010, 5(4):368-376.

[15] 郑改焕, 金先庆, 罗庆, 等. 新基因 HA117 最佳 siRNA 的筛选及重组腺病毒构建[J]. 第三军医大学学报, 2007, 31(7):641-643.

(收稿:2010-03-18 修回:2010-04-01)

(编辑 汪勤俭)