论著

文章编号:1000-5404(2011)02-0360-05

特异性 ILK-siRNA 对膀胱癌 EJ 细胞侵袭和迁移的影响

朱 军,高 娟,李红彦,潘湘阳,陈俊霞 (400016 重庆,重庆医科大学细胞生物学与遗传学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

【摘要】 **目的** 设计合成有效的 ILK-siRNA,并检测其对 EJ 细胞侵袭和迁移的影响。**方法** 构建针对 ILK 基因 mRNA 的 2 个特异性 siRNA 表达载体 pGenSil-1 siRNA1、pGensil-1 siRNA2 和 1 个阴性对照载体 pGenSil-1 siRNA3。稳定转染膀胱癌 EJ 细胞后,通过 RT-PCR 检测 EJ 细胞中 ILK mRNA 水平的表达,并通过 Western blot 和细胞免疫荧光检测 ILK 蛋白水平的表达;观察 EJ 细胞形态变化;检测 EJ 细胞迁移、黏附和侵袭能力及基质金属蛋白酶的变化。**结果** 重组质粒构建成功。干扰组细胞 ILK mRNA 及蛋白的表达分别较 3 个对照组(未转染组、转空质粒组和转阴性对照质粒组)比较,呈显著性下降($P<0.05$);HE 染色结果显示,细胞铺展良好,核质比减小;转染干扰质粒的 2 个实验组细胞的黏附能力相对于对照组分别增加 87% 和 76%,黏附能力显著升高,迁移及侵袭能力明显降低($P<0.05$);与 3 个对照组比较,转染 pGenSil-1 siRNA1 与 pGensil-1 siRNA2 质粒到 EJ 细胞后,MMP-2 及 MMP-9 的表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论** 成功构建的干扰质粒能抑制 ILK 基因及蛋白水平的表达,显著抑制细胞的生长、侵袭及迁移能力。

【关键词】 RNA, 小分子干扰;膀胱肿瘤;细胞系, 肿瘤;侵袭;迁移;整合素连接激酶

【中图法分类号】 R394-33;R73-362;R737.14 【文献标志码】 A

Silencing integrin-linked kinase by small interfering RNA inhibits metastasis and invasion of human EJ bladder cancer cells

Zhu Jun, Gao Juan, Li Hongyan, Pan Xiangyang, Chen Junxia (Department of Cell Biology and Genetics, Center of Molecular Medicine and Cancer Research, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effect of the specific siRNA of integrin-linked kinase (ILK) on the migration and invasion of human EJ bladder cancer cells. **Methods** Two specific siRNA expression vectors and one none homology control vector targeting the objective gene was constructed. Then the vectors were transfected into EJ cells respectively. RNAi efficiency on the expression of ILK was evaluated by RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence staining. The morphological change, cell adhesion, migration and invasion ability, and the expressions of MMP2 and MMP9 of the transfected cells were detected. **Results** Enzyme digestion and DNA sequencing verified the constructed vectors were correct. In the 2 specific siRNA treatment groups, the expression of ILK was obviously inhibited, the cells spread well, the nuclear mass ratio was lower than control, the cell adhesion ability was increased, the cell migration and metastasis ability were decreased, and the expression of MMP2 and MMP9 obviously decreased. **Conclusion** The specific siRNA vectors of ILK are successfully constructed. The vectors inhibit ILK expression, and decrease cell migration and metastasis ability significantly in human EJ bladder cancer cells.

【**Key words**】 RNA, small interfering; urinary bladder neoplasms; cell line, tumor; metastasis; invasion; integirn-linked kinase

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071719) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5273). Corresponding author: Chen Junxia, E-mail: chjunxia@126.com

整合素连接激酶(integrin-linked kinase,ILK)是一种相对分子质量为 59×10^3、非受体的 Ser/Thr 蛋白激酶,同细胞中多种信号传导有关。有研究表明:ILK 具有介导整合素胞内的信号传导的功能,它能耦联整合素和生长因子受体,参与介导细胞与基底膜的跨膜信号传导,调控生长因子介导的信号传导、Wnt 信号通路以及整合蛋白,调节细胞的黏附、生长增殖、分化、黏着

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81071719);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5273)

【通信作者】 陈俊霞,E-mail:chjunxia@126.com

和侵袭[1]及组织的纤维化等[2]。体外实验[3]表明：ILK与许多肿瘤的形成、凋亡、黏附、增殖、侵袭和转移密切相关。

RNA干扰(RNA interference，RNAi)是一种通过降解具有同源序列的靶基因mRNA，从而引起相应基因沉默的一种古老的生物防御机制[4-6]，能有效抑制靶基因表达。在哺乳动物的细胞内，小干扰RNA(small interfering RNA，siRNA)能有效地诱发RNAi[7-8]。载体介导的siRNA，具有稳定、有效的特点且能产生稳定表达siRNA的细胞株。因此，本研究通过沉默ILK，观察其对细胞侵袭、迁移和黏附的影响，并检测细胞中基质金属基质酶MMP-2及MMP-9的表达，为进一步研究沉默ILK对膀胱肿瘤的生长和迁移的作用及机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

膀胱癌EJ细胞购自南京凯基生物科技发展有限公司；RPMI1640培养基购自Gbico公司；带U6启动子和EGFP真核表达载体pGenSil-1购自武汉晶赛公司；转染试剂Lipofectin 2000购自Invitrogen公司；ILK单克隆抗体购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 ILK-shRNA载体构建与鉴定 根据GenBank提供的人ILK cDNA序列(NM_004517.2)，用Ambine finder软件(http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)设计针对ILK mRNA的RNAi靶位点序列的2段siRNA序列，siRNA1-ILK-1087：5′-GAAGCCTGAAGACACAAAC-3′，siRNA2-ILK-687 5′-GGAAGAGCAGGGACTTCAA-3′，并设计出1段与人基因组无同源性的阴性对照序列siRNA3：5′-GAGAGACTACAGTCTCGATCCT-3′，用BLAST进行比对。并根据靶序列设计3条短发夹RNA(small hair RNA，shRNA)，按照5′→3′分别为*Bam*HⅠ酶切位点+靶向正义链+发夹状结构+靶向反义链+终止序列+*Sal*Ⅰ酶切位点+*Hind*Ⅲ酶切位点设计序列。

将引物交由上海生工公司进行合成，将正、反2条寡核苷酸链退火后得到双链DNA，定向插入经*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ酶切的pGenSil-1(武汉晶赛公司)空载体中，得到重组质粒，转入大肠杆菌中进行扩增，扩增后经*Sal*Ⅰ单酶切和测序(上海生工)鉴定。重组质粒分别命名为pGenSil-1 siRNA1、pGenSil-1 siRNA2和pGenSil-1 siRNA3。

1.2.2 膀胱癌EJ细胞的培养及转染

1.2.2.1 细胞的培养 膀胱癌EJ细胞用含10% FBS的RPMI1640培养基(含青霉素和链霉素浓度均为1×10^5 U/L)，于37 ℃和5% CO_2的培养箱中培养。

1.2.2.2 细胞的转染和分组 取对数生长期的细胞于转染前24 h以每孔3×10^5个细胞接种于6孔培养板中，约80%细胞融合时开始实验，设置未转染(EJ细胞)组、EJ空质粒对照组、阴性质粒对照组(pGenSil-1 siRNA3)、干扰组1(pGenSil-1 siRNA1)及干扰组2(pGenSil-1 siRNA2)，然后采用Lipofectin2000进行转染，质粒与转染试剂的比例为2∶6。

1.2.3 报告基因EGFP表达检测 采用Nikon TE2000-U型倒置显微镜，于488 nm激发光下观察报告基因EGFP发出的绿色荧光。

1.2.4 ILK siRNA表达载体的稳定转染的细胞筛选 以pGenSil-1 siRNA1、pGenSil-1 siRNA2、pGenSil-1 siRNA3和pGenSil-1空质粒分别转染膀胱癌EJ细胞，48 h后加入含800 μg/ml G418的培养基开始稳定筛选。14 d后，挑取单克隆细胞，移入24孔培养板，用RPMI 1640培养基继续维持生长，待细胞稳定后扩大培养。

1.2.5 ILK siRNA真核表达载体对EJ细胞中ILK基因表达的鉴定

1.2.5.1 RT-PCR检测ILK siRNA对EJ细胞中ILK基因的表达 用Trizol抽提稳定转染细胞总RNA，RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司)测定ILK mRNA的水平。β-actin为内参照，PCR产物在2%琼脂糖进行凝胶电泳，于Bio-Rad凝胶成像仪下观察并照相，用Quantity One进行定量分析。

1.2.5.2 Western blot检测ILK蛋白的表达 用蛋白裂解液(按照100∶1的比例加入2 μl PMSF)抽提稳定转染细胞的总蛋白，PAGE胶每孔上样30 μg，经10% SDS-PAGE凝胶电泳、常规湿法转膜、5%脱脂奶粉封闭2 h、一抗4 ℃孵育过夜(ILK 1∶200，β-actin 1∶1 000)、二抗37 ℃孵育1 h(ILK及β-actin均为1∶1 000)、ECL化学发光显色、于Bio-Rad凝胶成像仪下观察照相并用Quantity One进行ILK与β-actin相对强度的比率分析。

1.2.5.3 细胞免疫荧光分析 正常EJ细胞及稳定转染组细胞在6孔板中爬片，48 h后80%丙酮固定15 min，PBS洗3次，用含3% BSA的PBS封闭20 min，一抗鼠抗ILK单克隆抗体4 ℃孵育过夜(ILK 1∶200)，用含3% BSA的PBS洗3次，每次5 min，细胞在羊抗鼠FITC标记抗体(1∶100)37 ℃孵育30 min，用PBS洗净后甘油封片。显微镜下观察、拍照，并分析。

1.2.6 HE染色 取对数期细胞爬片于6孔板盖玻片中，24 h甲醛固定20 min，苏木精染色5 min，盐酸乙醇分化30 s，自来水洗，伊红染色2 min，梯度乙醇脱水，二甲苯透明封片，中性树脂封片，观察拍照。

1.2.7 ILK siRNA真核表达载体对EJ细胞侵袭、黏附及迁移能力的影响

1.2.7.1 侵袭能力检测 用50 μl的50μg/ml的细胞外基质(1∶8)稀释液包被Transwell 8 μm小室基底膜的上室面，4 ℃风干过夜，37 ℃水化1 h，加入100μl含0.1% BSA的无血清培养基稀释细胞(细胞密度为2×10^5/ml)，下室中加入含10% FBS的RPMI1640培养基。常规培养48 h，甲醇固定，0.1%结晶紫染色，光镜下(200×)观察计数，随机选取5个视野的细胞计数，取平均值。

1.2.7.2 黏附实验 96孔板每孔加入50 μl的50 μg/ml的细胞外基质，4 ℃风干过夜，加入100 μl含5 000个细胞的10% FBS培养基，常规培养2 h，PBS洗涤3次，每孔加入20 μl MTT，继续孵育4 h，加入150 μl二甲亚砜，490 nm下读取光密度值[*D*(490)]。

1.2.7.3 划痕实验 接种细胞于6孔板中,待密度达到95%时,用200 μl的枪头在板底部划出1条2 mm宽的划痕,更换无血清培养基。常规培养24 h后,95%乙醇固定,Gimesa染色10 min,镜下观察伤口愈合情况,细胞相对迁移能力=0 h时划痕距离-24 h时划痕距离。

1.2.8 Western blot检测MMP-2及MMP-9蛋白的表达 用蛋白裂解液(按照100:1的比例加入2 μl PMSF)抽提稳定转染细胞的总蛋白,PAGE胶每孔上样30 μg,经10% SDS-PAGE凝胶电泳、常规湿法转膜、5%脱脂奶粉封闭2 h、一抗4 ℃孵育过夜(MMP2兔多抗1:500,MMP9羊多抗1:5)、二抗37 ℃孵育1 h(MMP2与MMP9均为1:1 000;前者为辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗,后者为羊抗兔二抗)、ECL化学发光显色、于Bio-Rad凝胶成像仪下观察照相并用Quantity One进行分析。

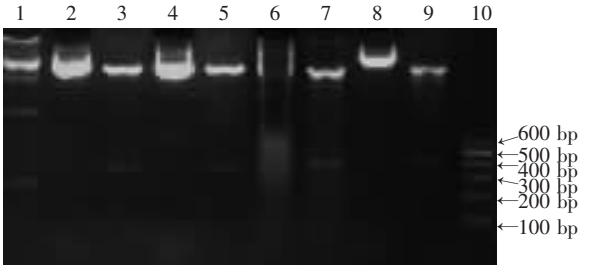
1.3 统计学方法

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

2 结果

2.1 重组质粒ILK siRNA酶切和测序鉴定结果

酶切后生成2条带,分别为4 500 bp和400 bp左右,酶切结果与预期一致(图1),证明ILK基因的RNAi片段已成功插入目的载体中,测序结果也与设计一致。



1:DNA标准(DL 15 000);2:pGenSil-1;3:pGenSil-1 *Sal* Ⅰ酶切;4:pGenSil-1 siRNA-3;5:pGenSil-1 siRNA-3 *Sal* Ⅰ酶切;6:pGenSil-1 siRNA-1;7:pGenSil-1 siRNA-1 *Sal* Ⅰ酶切;8:pGenSil-1 siRNA-2;9:pGenSil-1 siRNA-2 *Sal* Ⅰ酶切;10:DNA标准(DL 2 000)

图1 pGenSil-1siRNA-ILK重组质粒 *Sal* Ⅰ酶切鉴定

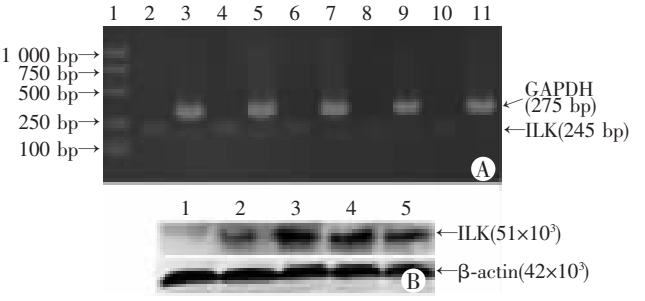
2.2 转染后EGFP表达

48 h后观察转染后的细胞,带绿色荧光的细胞多,荧光强度亮,未转染细胞没有荧光,说明转染成功且效率高。

2.3 稳定转染的膀胱癌EJ细胞克隆RNAi效应的鉴定

2.3.1 细胞ILK mRNA的表达结果 半定量RT-PCR结果见图2A,与EJ细胞组、EJ空质粒组和pGnSil-1 siRNA3组3个对照组相比,干扰组(siRNA1-1 siRNA1、2组)细胞的ILK mRNA分别下降72%和54%,mRNA水平呈显著性下降($P<0.05$)。

2.3.2 细胞ILK蛋白的表达结果 与3个对照组相比,转染pGenSil-1 siRNA1与pGenSil-1 siRNA2质粒到EJ细胞后,ILK的表达水平明显降低。如图2B所示,分别降低了61%和50% ILK蛋白含量($P<0.05$),这和RT-PCR结果一致。



A:RT-PCR检测ILK mRNA的变化 1:DNA标准(DL2 000);2:EJ细胞组;3:EJ空质粒组;4:pGnSil-1 siRNA3组;5:pGnSil-1 siRNA1组;6:pGnSil-1 siRNA2组;B:Western blot检测ILK蛋白含量 1:pGnSil-1 siRNA1组;2:pGnSil-1 siRNA2组;3:pGnSil-1 siRNA3组;4:EJ空质粒组;5:EJ细胞组

图2 EJ细胞克隆RNAi效应的鉴定

2.3.3 细胞免疫荧光分析 与3个对照组相比,转染pGenSil-1 siRNA1与pGenSil-1 siRNA2质粒到EJ细胞后,细胞质荧光强度明显较浅,显示ILK含量显著减少(图3)。

2.4 细胞形态学观察

HE染色显示:相对于3个对照组,2个实验组细胞铺展良好,细胞核质比降低,核分裂相减少,核仁减小,染色较浅。见图4。

2.5 ILK沉默后EJ细胞黏附及迁移的变化

2.5.1 细胞黏附能力检测 pGnSil-1 siRNA1组和pGnSil-1 siRNA2组D(490)值分别为(0.097±0.006)和(0.084±0.011),而3个对照组细胞D(490)值分别为(0.047±0.005)、(0.051±0.004)和(0.057±0.008)。因此,2个干扰组细胞的黏附能力相对于对照组分别增加87%和76%($F=28.74$,$P<0.05$),黏附能力显著升高。

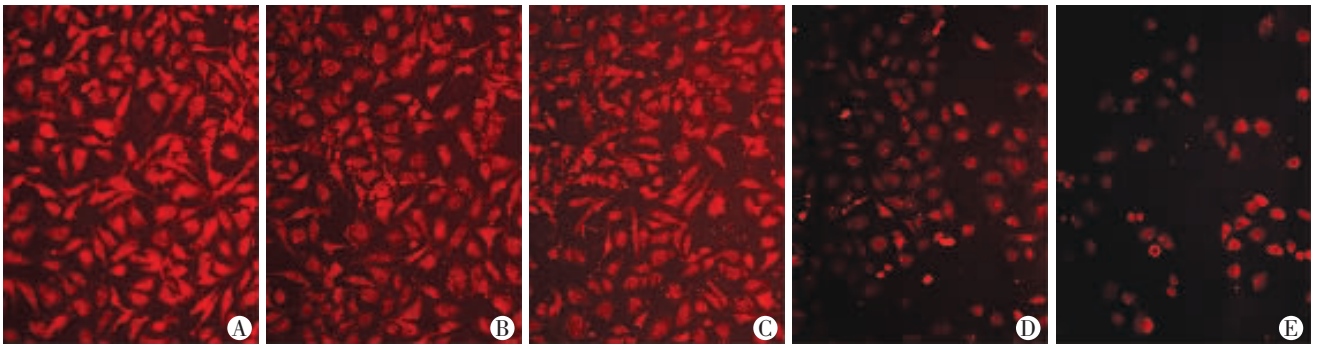
2.5.2 划痕法迁移实验 pGnSil-1 siRNA1和pGnSil-1 siRNA2两干扰组细胞在24 h内迁移距离小于3个对照组,测定每组迁移距离,计算得出pGnSil-1 siRNA1和pGnSil-1 siRNA2组细胞迁移距离分别为(1 077.67±127.62) μm和(1 411.33±165.24) μm,而3个对照组细胞的迁移距离分别为(2 390.54±152.53)、(1 971.67±172.56) μm和(2 210.33±90.95) μm,2个干扰组显著小于3个对照组($F=39.954$,$P<0.05$),显示迁移能力下降。见图5。

2.6 沉默ILK后EJ细胞侵袭能力的变化

Transwell体外侵袭实验结果显示,pGnSil-1 siRNA1和pGnSil-1 siRNA2两干扰组细胞视野侵袭细胞数分别为(51±8.07)个和(68.00±21.03)个,而3个对照组细胞的视野侵袭细胞数分别为(313.30±48.95)个、(336.40±64.95)个和(312.30±64.55)个,干扰组分别为对照组的16.3%和21.7%,侵袭能力显著降低($F=25.518$,$P<0.05$)。见图6。与迁移实验结果一致,说明沉默ILK后会降低细胞的运动和侵袭能力。

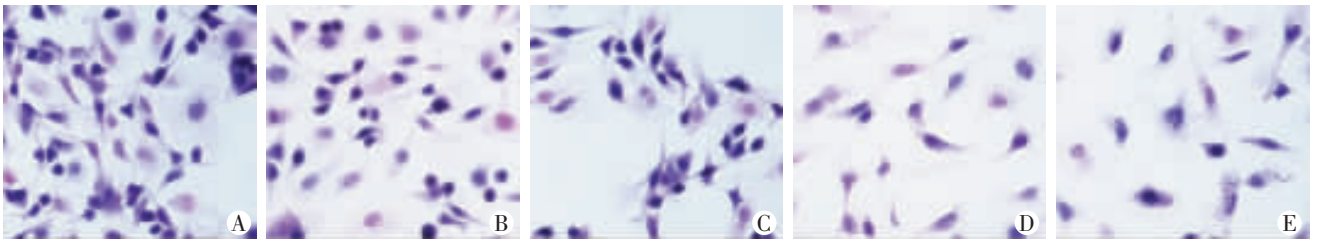
2.7 细胞中MMP-2及MMP-9蛋白的表达

与其他3个对照组相比,转染pGenSil-1 siRNA1与pGenSil-1 siRNA2质粒到EJ细胞后,MMP-2及MMP-9的表达水平明显降低,MMP2分别显著地降低了71%和50% ILK蛋白含量($P<0.05$),MMP-9分别显著地降低了53%和45% ILK蛋白含量($P<0.05$)。见图7。这与侵袭实验的结果相一致。



1：EJ 细胞组；2：EJ 空质粒组；3：pGnSil-1 siRNA3 组；4：pGnSil-1 siRNA1 组；5：pGnSil-1 siRNA2 组

图 3　细胞免疫荧光检测 ILK 在 EJ 细胞内的表达（×200）



A：EJ 细胞组；B：EJ 空质粒组；C：pGnSil-1 siRNA3 组；D：pGnSil-1 siRNA1 组；E：pGnSil-1 siRNA2 组

图 4　各组细胞形态学观察　（HE ×200）

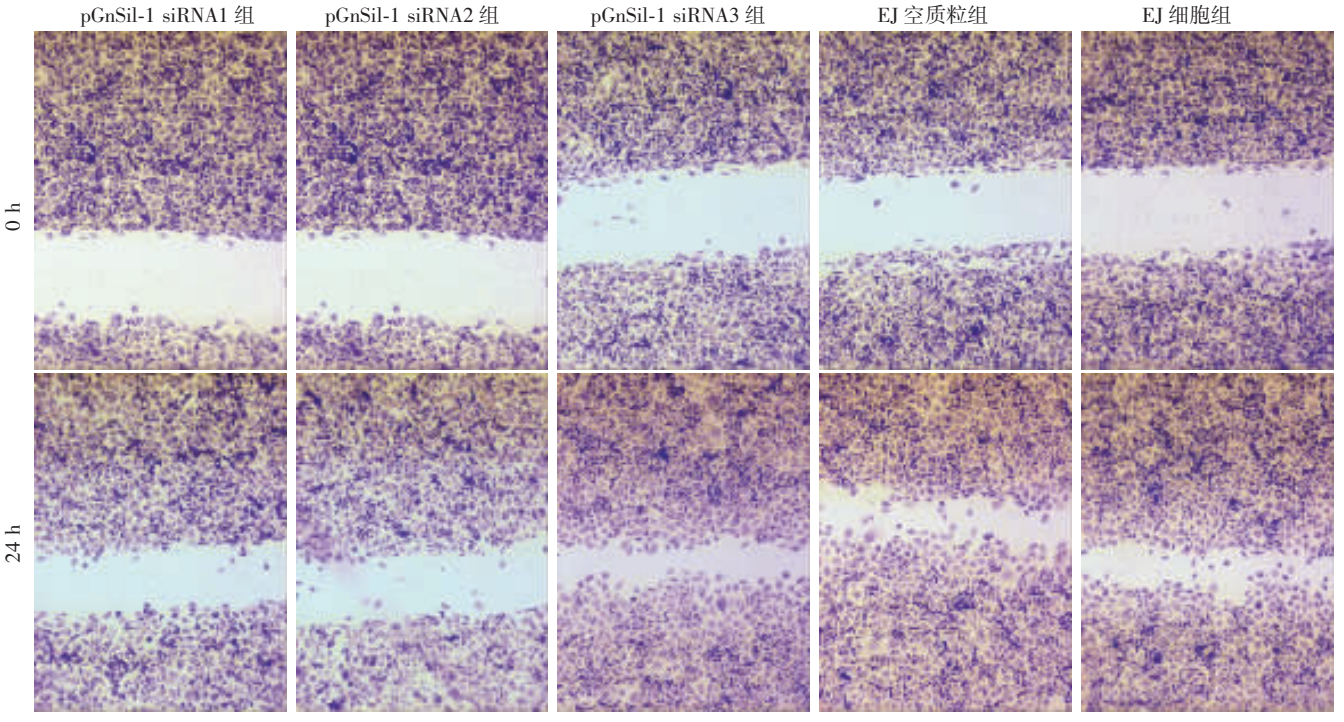
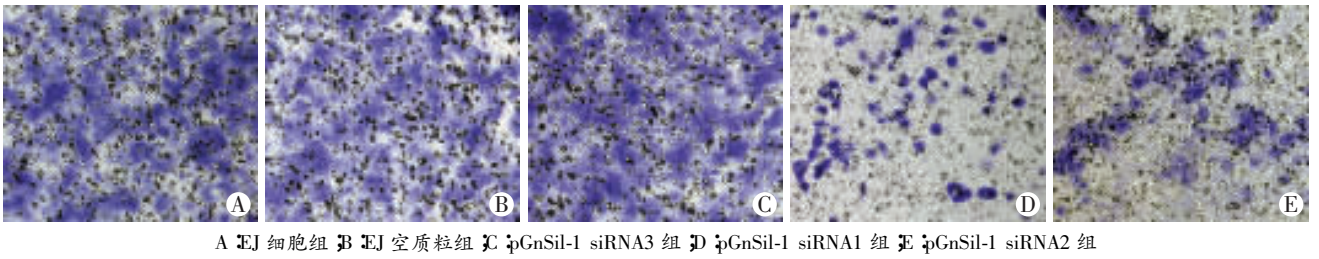
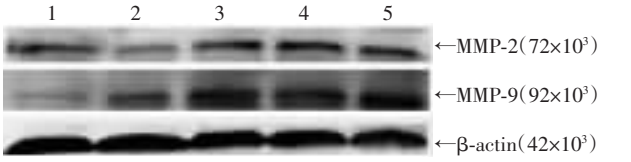


图 5　细胞划痕实验检测各组细胞的迁移能力　（Gimesa ×40）



A：EJ 细胞组；B：EJ 空质粒组；C：pGnSil-1 siRNA3 组；D：pGnSil-1 siRNA1 组；E：pGnSil-1 siRNA2 组

图 6　沉默 ILK 后对各组细胞侵袭能力的影响　（结晶紫染色 ×200）



1:pGnSil-1 siRNA1 组;2:pGnSil-1 siRNA2 组;3:pGnSil-1 siRNA3 组;4:EJ 空质粒组组 5:EJ 细胞组

图7 Western blot 检测各组 MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达

3 讨论

侵袭和转移是肿瘤的一大生物学特性,在肿瘤侵袭过程中,肿瘤细胞和原发瘤脱离后向周围和远处组织侵袭和转移,涉及肿瘤细胞穿过细胞外基质屏障、血管壁的基底膜等过程。癌细胞侵袭能力与其诱导产生蛋白酶降解细胞外基质、基底膜的能力密切相关[9]。ILK 是一种近年发现的丝/苏氨酸蛋白激酶,参与多种信号传导通路[10]。ILK 是一种多功能蛋白,国外有研究表明,ILK 调节着细胞的分化、迁移及肿瘤的诱发、侵袭和转移[11],故微小的异常都会引起结肠癌、卵巢癌及前列腺癌等人类恶性肿瘤的发生,且在这些肿瘤中 ILK 呈现过度表达[3]。目前关于沉默 ILK 基因对膀胱癌 EJ 的侵袭和迁移作用的报道不多,所以本研究通过下调 ILK 来研究 ILK 对肿瘤侵袭和转移的影响,提示抑制 ILK 可能抑制肿瘤的发生和转移,为临床研究治疗肿瘤提供新靶点。

对于晚期膀胱癌患者,目前的治疗手段以化疗为主,但效果不佳。近年来新兴的基因治疗可以为该病的治疗提供一种新思路。RNAi 技术作为近年发展起来的一种基因阻断技术,能通过降解同源序列靶基因的 mRNA,进而高效特异的沉默靶基因,使细胞表现出特定基因表型缺失的过程[12]。随着 RNAi 技术的发展,实现了长效和稳定的表达 RNAi,并能筛选出稳定表达 siRNA 的细胞株,这对特定基因的基因治疗提供了可能性和有效性。载体介导的 siRNA 已能够成功的敲除哺乳动物细胞中的靶基因,阻断该基因的表达,包括在一些恶性肿瘤细胞当中[13]。因此本实验构建特异性 siRNA 表达载体,通过 G418 筛选转染后的 EJ 细胞,获得特异、长期稳定抑制 ILK 基因的克隆。通过 RT-PCR、Western blot 和免疫细胞化学技术检测到 EJ 细胞中 ILK 的沉默表达量。同时采用 Western blot 检测肿瘤细胞的侵袭转移相关分子——MMP-2 和 MMP-9。

本研究表明,沉默 ILK 的表达引起了一系列细胞生物学功能的改变。细胞形态学观察发现干扰组细胞与对照组相比细胞铺展良好,核质比下降,核分裂象减少,核仁变小,染色较浅,提示细胞恶性程度降低。细胞黏附能力的改变是侵袭和迁移关键的一步[14],通常黏附的减少会伴随细胞侵袭和能力迁移的增加,本研究显示黏附的增加会伴随细胞侵袭和黏附能力的减小。MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达量的下降进一步验证了侵袭能力的下降,提示膀胱癌细胞侵袭能力与 ILK、MMP-2 和 MMP-9 的参与有关。通过以上研究发现,ILK 表达的下调引起细胞特性的改变,这些又与细胞侵袭迁移密切相关。

综上所述,ILK 基因与细胞的侵袭、迁移及黏附能力密切相关,下调 ILK 的表达能改变细胞特性,引起迁移侵袭能力的下降,改善细胞恶性程度,有可能成为肿瘤基因治疗的一种新的药物靶点。

参考文献:

[1] Shafiei M S, Rockey D C. The role of integrin-linked kinase in liver wound healing[J]. J Biol Chem, 2006, 281(34):24863-24872.

[2] 陈秋,张璟,敖绪军. 整合素连接激酶在人肾间质纤维化组织中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(22):2262-2265.

[3] Hannigan G, Troussard A A, Dedhar S. Integrin-linked kinase:a cancer therapeutic target unique among its ILK[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(1):51-63.

[4] Anesti A M, Peeters P J, Royaux I, *et al*. Efficient delivery of RNA Interference to peripheral neurons *in vivo* using herpes simplex virus [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36(14):e86.

[5] Wang Q Z, Lv Y H, Diao Y, *et al*. The design of vectors for RNAi delivery system[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(13):1327-1340.

[6] Bhuyan P K, Kariko K, Capodiei J, *et al*. Short interfering RNA-mediated inhibition of herpes simplex virus type 1 gene expression and function during infection of human keratinocytes[J]. J Virol, 2004, 78(19):10276-10281.

[7] Elbashir S M, 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.

[8] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, *et al*. RNAi:double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J]. Cell, 2000, 101(1):25-33.

[9] 王晓翊,卢实,王泽华. 卵巢癌相关成纤维细胞对上皮性卵巢癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭活性的影响[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(33):4748-4752.

[10] Duxbury M S, Ito H, Benoit E, *et al*. RNA interference demonstrates a novel role for integrin-linked kinase as a determinant of pancreatic adenocarcinoma cell gemcitabine chemoresistance[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(9):3433-3438.

[11] Honda S, Shirotani-Ikejima H, Tadokoro S, *et al*. Integrin-linked kinase associated with integrin activation[J]. Blood, 2009, 113 (21):5304-5313.

[12] 刘峰,王丽,王培林. RNA 干涉临床应用的研究进展[J]. 国外医学:遗传学分册, 2004, 27(1):11-l5.

[13] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(10):737-747.

[14] 彭志红,唐波,杨建民,等. KAI1 基因对 MHCC97-H 肝癌细胞粘附力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23):2311-2313.

(收稿:2010-09-10 修回:2010-11-15)

(编辑 王小宴)