文章编号:1000-5404(2011)16-1695-05

论著

p15基因干扰对肝癌耐药的影响

房殿亮,陈伟庆 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨小干扰RNA(small interfering RNA ,siRNA)抑制p15基因对肝癌耐药的影响。**方法** 采用浓度递增法用顺铂(cisplatin,CDDP)诱导肝癌细胞HepG2建立动态耐药模型HepG2/CDDP/2.0。脂质体法将针对p15 mRNA的siRNA(Y1、Y2、Y3)和阴性对照siRNA-F转染至HepG2/CDDP/2.0细胞,筛选最佳转染浓度和最有效的干扰序列。MTT法检测HepG2/CDDP/2.0对CDDP的半数抑制浓度(IC_{50})、流式细胞仪分析HepG2/CDDP/2.0细胞周期分布、RT-PCR和Western blot分别检测p15 mRNA和p15蛋白、P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)的表达。**结果** 成功建立肝癌耐药模型HepG2/CDDP/1.6,系中度耐药。RT-PCR显示siRNA Y3干扰效果最佳。转染后G_1期细胞比例分别为53.8%(24 h),51.6%(48 h),48.8%(72 h)($P<0.05$);RT-PCR和Western blot显示p15表达降低,p-gp表达增加。**结论** 在肝癌耐药的动态过程中,随着耐药时间的延长,G_1期的比例增加。抑制p15的表达可降低G_1期的比例,增加肿瘤耐药性。

[关键词] 细胞周期;p15;肝癌;耐药;RNA干扰
[中图法分类号] R735.7;R73-36 [文献标志码] A

Influence of siRNA-mediated p15 silencing on CDDP resistance in drug-resistant human hepatoma cell line HepG2/CDDP/2.0

Fang Dianliang, Chen Weiqing (Department of Digestive Diseases, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the influence of siRNA-mediated p15 silencing on cisplatin (CDDP) resistance in drug-resistant human hepatoma cell line HepG2/CDDP/2.0. Methods Drug-resistant human hepatoma cell line HepG2/CDDP/1.6 was obtained through culturing HepG2 cells in a series of RPMI1640 culture media having gradually increased concentrations of CDDP, with final CDDP concentration of 1.6 mg/L. MTT assay was used to test the sensitivity of HepG2/CDDP/1.6 cells to CDDP and IC_{50} of CDDP was then determined. Drug-resistant cell line HepG2/CDDP/2.0 was obtained through culturing HepG2/CDDP/1.6 cells in the presence of 2.0 mg/L CDDP. Three siRNAs (Y1, Y2, and Y3) targeting p15 and a negative control (siRNA-F) were designed and synthesized. Lipofectamine™2000 was used to transfect HepG2/CDDP/2.0 cells with siRNA-F at 30 nmol/L, 60 nmol/L, and 90 nmol/L, and then laser-scanning confocal microscopy (LSCM) was used to find out the optimal transfection concentration of siRNA. HepG2/CDDP/2.0 cells were transfected with Y1, Y2, and Y3 at the optimal transfection concentration, and then RT-PCR was used to screen out the most effective siRNA. Flow cytometry was used to analyze the cell cycle distribution of HepG2/CDDP/2.0 cells. RT-PCR and Western blotting were used to analyze the expression of p15 mRNA and the expression of p15 protein and P-glycoprotein (P-gp) in transfected HepG2/CDDP/2.0 cells. Results HepG2/CDDP/1.6 cell line had a resistance index (RI) of 6.8 to CDDP, showing moderate drug resistance. The optimal transfection concentration of siRNA was 90 nmol/L. Among siRNAs Y1, Y2, and Y3 that all dramatically reduced p15 mRNA expression, Y3 exhibited the best interfering effect. At 24 h, 48 h, and 72 h after transfection, the ratios of transfected HepG2/CDDP/2.0 cells in G_1 phase were 53.8%, 51.6%, and 48.8%, respectively ($P<0.05$). The mRNA and protein expression of p15 in transfected HepG2/CDDP/2.0 cells was significantly inhibited ($P<0.05$), while the expression of P-gp was significantly increased ($P<0.05$). Conclusion In the drug resistance process of human hepatoma cells, the ratio of human hepatoma cells in G_1 phase increases over time. In drug-resistant HepG2/CDDP/2.0 cells, knockdown of p15 by RNA interference

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2010BA5011)
[通信作者] 陈伟庆,E-mail:chenweiqing@yahoo.com

can decrease the ratio of cells in G_1 phase and increase their drug resistance by up-regulating P-gp expression.

[**Key words**] cell cycle; p15; RNA interference; drug resistance

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BA5011). Corresponding author: Chen Weiqing, E-mail: chenweiqing506@yahoo.com

肝癌是世界上恶性程度最高的肿瘤之一,致死率高[1-2]。由于肝癌对化疗药物不敏感或者多药耐药(multi-drug resistance, MDR)使得化疗治疗非常棘手[3]。约70%的化疗患者很快产生耐药(drug Resistance)[5]。当肝癌细胞发生耐药时,常伴随有细胞周期G_0/G_1期阻滞,表现为细胞增殖速度减慢、倍增时间延长[6-7]。p15可经TGF-β/Smads信号通路介导细胞周期G_1期阻滞[8]。本实验拟采用RNA干扰(RNA interference ,RNAi)技术降低p15的表达,观察细胞周期的变化,探讨细胞周期与耐药的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞株HepG2(第三军医大学西南医院中心实验室);胎牛血清和RPMR1640培养液(Gibco公司);胰蛋白酶;噻唑蓝(MTT)和二甲基亚砜(DMSO)(美国Sigma公司);RNA提取试剂盒、RNA逆转录试剂盒(日本TaKaRa公司);蛋白提取试剂盒(碧云天公司);鼠抗人p15一抗、兔抗人p-gp一抗(Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶标记二抗,ECL发光试剂盒(Santa Cruz公司);p15引物和GAPDH引物(上海生工);p15 siRNA和Lipofectamine ™2000(Invitrogen公司)。

1.2 方法

1.2.1 肝癌耐药细胞模型HepG2/CDDP/2.0的建立和验证

选用人肝癌HepG2细胞,于含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中以5% CO_2、37 ℃条件下培养。采用浓度逐步递增法,依次采用浓度为0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/L的CDDP诱导肝癌HepG2细胞产生耐药,并做传代培养,取能够维持在1.6 mg/L的CDDP下生长状态良好,稳定传代的细胞,长期培养,记为肝癌稳定耐药HepG2/CDDP/1.6细胞。采用MTT法验证细胞对CDDP的敏感性,以SPSS 10.0软件计算CDDP的半数抑制浓度(IC_{50})。把细胞以2×10^5接种到96孔板,每孔加入100 μl培养基培养24、48、72 h。每组加入50 μg/ml的MTT并37 ℃培养2 h。然后去掉培养基,加入150 μl DMSO培养10 min,用酶标仪检测其在570 nm的吸光度,并计算半数抑制浓度(IC_{50})。取HepG2/CDDP/1.6细胞,加入含有2.0 mg/L的CDDP的培养液继续培养,记为HepG2/CDDP/2.0。

1.2.2 流式细胞仪检测耐药HepG2/CDDP/2.0细胞周期

向HepG2/CDDP/1.6细胞中加入含有2.0 mg/L的CDDP的培养液继续培养。分别在24、48和72 h收集细胞(至少1×10^6),用4 ℃预冷的PBS清洗2次后用70%的冰乙醇固定细胞,20 μg/ml的PI染色处理后用流式细胞仪行细胞周期检测。采用Cell Quest software(Becton Dickinson)分析数据。

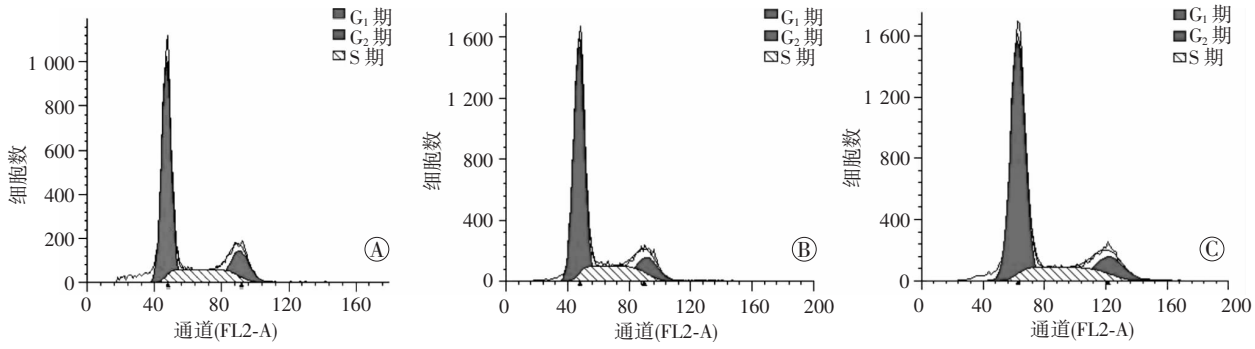
1.2.3 p15 siRNA的设计合成 从GenBank数据库中找到p15基因,序列号为NM_004936。根据Ambion公司提供的软件设计针对p15基因的3对siRNA序列(Y1、Y2、Y3),采用BLAST同源性检索确认与人类基因组无明显同源性。siRNA Y1序列为:正义链5′-CGGAGUCAACCGUUUCGGGUU-3′,反义链5′-CCCGAAACGGUUGACUCCGUU-3′;siRNA Y2序列为:正义链5′-GGGAUAUUUAGGAGUGUGUTT-3′,反义链5′-ACACACUCCUAAAUAUCCCTG-3′;siRNA Y3:正义链5′-CCAACGGAGTCAACCGUUUTT-3′,反义链5′-AAACGGUUGACUCCGUUGGTT-3′。同时合成荧光标记的阴性对照序列siRNA-F:正义链5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,反义链5′-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3′(碱基顺序随机排列,与人类基因的外显子没有同源性)。以上siRNA均为21个碱基的寡核苷酸,经PAGE纯化,由上海Invitrogen公司合成。

1.2.4 p15-siRNA转染最佳浓度和有效链的筛选 按照Invitrogen公司Lipofectamine™2000的转染说明书进行转染。将荧光标记的阴性对照siRNA-F分别按照30、60、90 nmol/L的终浓度转染HepG2/CDDP/2.0细胞,转染后用激光共聚焦显微镜观察荧光阳性的细胞,计算转染效率。根据上述结果选择最佳浓度转染3对siRNA序列,分别在24、48、72 h收集细胞,提取细胞总RNA,逆转录成cDNA后行RT-PCR,以GAPDH为内参照。反应完成后进行琼脂糖凝胶电泳,分析不同siRNA对p15mRNA的干扰效果,筛选出干扰效果做好的siRNA。

1.2.5 RT-PCR检测p15mRNA的转录表达 3条p15-siRNA分别转染HepG2/CDDP/2.0,RT-PCR检测其对mRNA表达的影响。p15基因的引物序列:正义链:5′-CGTTAAGTTTACGGCCAACG-3′;反义链:5′-GGTGAGAGTGGCAGGGTCT-3′,扩增产物长度为302 bp。内参照基因3磷酸甘油醛(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)特异引物序列:正义链:5′-GAGCCAAAAGGTCATCATCTC-3′;反义链:5′-AAAGGTGGAGTGGGTGTC-3′。扩增产物长度为542 bp。上述引物由上海生工生物工程有限公司合成。提取各组转染siRNA细胞的总RNA,按照逆转录试剂盒的说明进行RNA反转录。反应体系包括:模板RNA1 μg,逆转录酶0.5 μl,5×buffer 2 μl,Oligo dT引物0.5 μl,Random 6 mers引物0.5 μl,37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。PCR扩增的反应体系包括:cDNA(2.5 ng),10× buffer 5 μl,*Taq* DNA聚合酶0.5 μl,$Mgcl_2$ 3 μl,上下游引物各1 μl,dNTP 4 μl,无菌去离子水补充至50 μl。PCR扩增条件为:95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min。扩增30个循环。取PCR产物10 μl琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶成像仪照相。以p15与GAPDH基因产物电泳条带灰度比值表示目的基因的相对表达水平。

1.2.6 检测p15-siRNA转染后HepG2/CDDP/2.0细胞周期

p15-siRNA Y3(90 nmol/L)转染HepG2/CDDP/2.0细胞,分别在24、48、72 h时收集各组细胞(至少1×10^6),固定并经PI染色处理后检测G_1期的细胞比例。采用Cell Quest software(Becton Dickinson)分析数据。



A:转染 24 h; B:转染 48 h; C:转染 72 h

图 1 肝癌耐受顺铂 HepG2/CDDP/2.0 细胞的周期分布

1.2.7 Western blot 检测 p15 蛋白和 p-gp 的表达 收集各组细胞用蛋白提取液裂解细胞 30 min,BCA 法检测蛋白浓度。加适量的 5×SDS 蛋白上样缓冲液后煮沸 10 min,使蛋白完全变性。配制 15% 的琼脂糖凝胶,各孔道上样 50 μg,以恒压 80 V(浓缩胶)/100 V(分离胶)电泳,电转膜至 PVDF 膜。p15 单克隆抗体(工作浓度为 1∶100)和 p-gp 多克隆抗体(工作浓度为 1∶200)4 ℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶标二抗(工作浓度为 1∶20 000) 37 ℃温育 1 h ,ECL 显影 ,曝光,检测。以 GAPDH 为内参照,Image Lab ™2.0 图像分析软件采集分析结果,计算 p15、p-gp 的灰度值。

1.3 统计学分析

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 成功建立 HepG2/CDDP 耐药模型

HepG2/CDDP/1.6 细胞在含 1.6 mg/L CDDP 的培养基中生长良好、传代稳定。MTT 检测结果显示 HepG2/CDDP/1.6 对 CDDP 的 IC_{50} 值为(3.47 ± 0.06) mg/L,较对照组亲本 HepG2 细胞 IC_{50}(0.51 ± 0.01) mg/L 明显升高($P < 0.05$),耐药指数为 6.8,系中度耐药。在 HepG2/CDDP/1.6 细胞的培养基础上增加 CDDP 的浓度(2.0 mg/L),继续培养,观察在此过程中细胞周期和耐药性的动态变化。

2.2 流式细胞仪检测耐药模型 HepG2/CDDP/2.0 细胞周期

在 24、48、72h 时 G_1 期细胞比例分别为 59.4%、65.0%、67.5%,随着 CDDP 诱导培养时间的延长,G_1 期细胞数量逐渐增加($P < 0.05$),细胞周期阻滞,增殖减慢(图 1)。

2.3 siRNA 转染效率的检测

荧光标记的阴性对照 siRNA-F 分别以 30、60、90 nmol/L 浓度转染 HepG2/CDDP/2.0 细胞,转染后 24 h 在激光共聚焦显微镜下观察到细胞质内有点状绿色荧光出现,表明转染成功。结果显示 90 nmol/L 终浓度转染时转染效率最高,因此实验中选择 90 nmol/L 作为 siRNA 的转染最佳浓度(图 2)。

2.4 siRNA 有效链的筛选

3 条 siRNA 分别转染 HepG2/CDDP/2.0 细胞,RT-PCR 结果显示,3 条 siRNA 不同程度地抑制 p15 mRNA 的表达,Y3 的干扰效果最好($P < 0.05$),因此选择 Y3 作为最有效序列进行后续实验(图 3)。

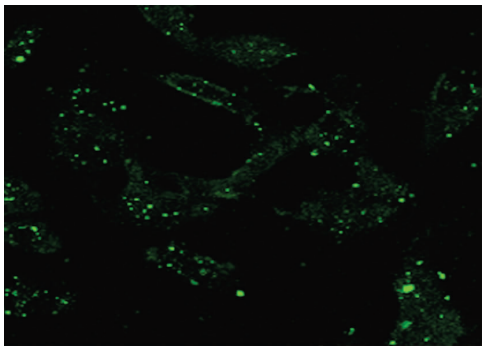
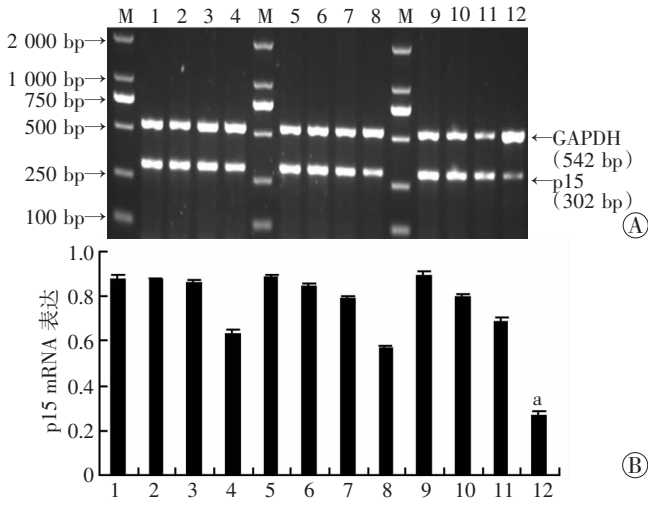


图 2 激光共聚焦显微镜显示 siRNA-F 转染 24 h 后的情况 (×400)



A: RT-PCR 检测结果;B:半定量分析结果
1-4:转染 24 h; 5-8:转染 48 h; 9-12:转染 72 h; M:标准
a: $P < 0.05$,与转染 24 h 比较

图 3 siRNA 对肝癌耐药 HepG2/CDDP/2.0 细胞 p15 mRNA 的干扰效果

2.5 siRNA Y3 转染对 p15 mRNA 和 p15 蛋白表达的影响

将最有效的 siRNA Y3 以最佳的转染浓度(90 nmol/L)转染 HepG2/CDDP/2.0 细胞,RT-PCR 结果显示:与对照组相比转染 72 h 后,p15 mRNA 的表达减少了 74.3% ($P < 0.05$,图 4)。同样,Western blot 结果显示 siRNA Y3 转染后抑制 p15 蛋白的表达(图 5)。siRNA Y3 对 p15 的抑制呈现剂量和时间依赖性。

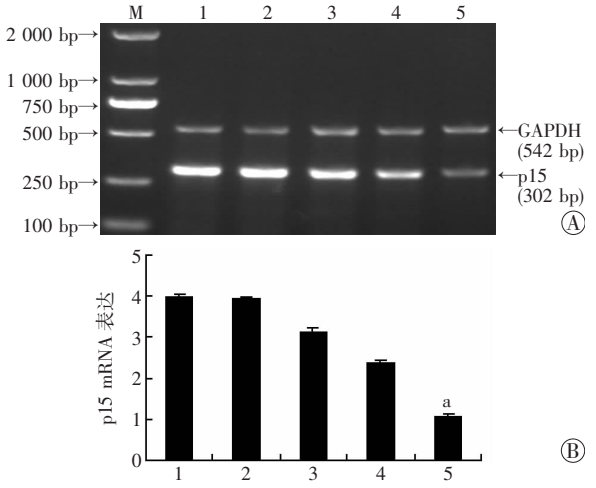
2.6 siRNA Y3 转染对 HepG2/CDDP/2.0 细胞周期的影响

转染 siRNA Y3 后,G_1 期的细胞比例为 53.8%(24 h), 51.6%

(48 h) and 48.8% (72 h)。转染后随着耐药时间的延长,G_1期细胞比例逐渐降低($P<0.05$,图6)。

2.7 siRNA Y3 转染对 p-gp 蛋白表达的影响

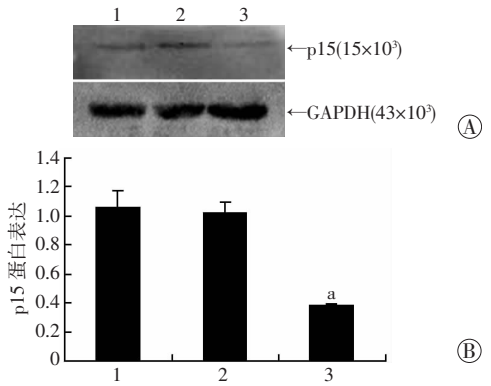
Western blot 检测结果显示,p15 siRNA Y3 转染 72 h 后 p-g 的表达增加($P<0.05$,图7)。



1:正常对照组(未转染);2:转染 siRNA-F 组;3:转染后 24 h;4:转染后 48 h;5:转染后 72 h;M:标准

A:RT-PCR 检测结果;B:半定量分析结果　a:$P<0.05$,与对照组比较

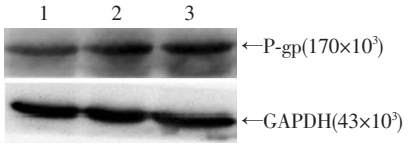
图4　siRNA Y3 转染对 HepG2/CDDP/2.0 细胞 p15 mRNA 表达的干扰效果



1:转染 24 h; 2:转染 48 h; 3:转染 72 h

A:Western bolt 检测结果;B:半定量分析结果　a:$P<0.05$,与转染 24 h 比较

图5　Western blot 检测 siRNA-Y3 转染对 HepG2/CDDP/2.0 细胞 p15 蛋白表达的影响



1:转染 24 h;2:转染 48 h;3:转染 72 h

图7　Western blot 检测转染 siRNA-Y3 对 HepG2/CDDP/2.0 细胞 P-gp 蛋白表达的影响

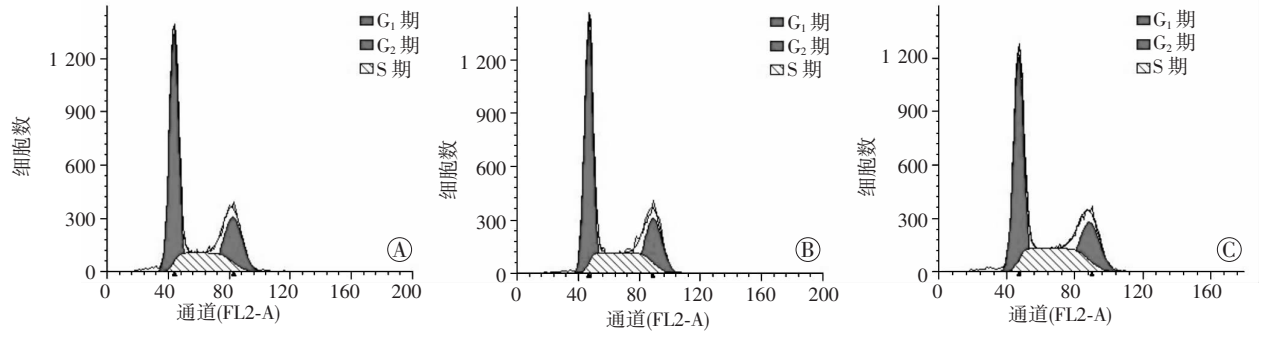
3　讨论

在肿瘤治疗中,化疗占据着不可替代的重要地位[9],但肿瘤细胞对化疗药物产生耐药性使得化疗在大多数恶性肿瘤中收效不大[10]。肿瘤细胞经常高表达 MDR 基因,这使得肿瘤具有内在的耐药性,致使化疗治疗疗效不佳。肿瘤发生耐药时细胞周期停滞,细胞处于静止期,对化疗药不敏感[11]。既往对顺铂诱导的人肝癌耐药细胞株 QGY/CDDP 的研究发现,当人肝癌细胞发生耐药时,常伴随有细胞周期 G_1 期阻滞[7]。p15 属于细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂家族的成员[12],它通过抑制 CDK4/6-cyclinD 介导 Rb 的磷酸化过程使 G_1 期到 S 期转换阻滞[13]。

我们在以前的研究中发现上调 p15 的表达可促进 HepG2 耐药细胞 G_1 期阻滞,抑制细胞增殖[14]。为了更深入全面地了解耐药动态过程中耐药性与细胞周期的关系,本实验拟采用 RNA 干扰技术降低 p15 在肝癌耐药模型中的表达[15],探讨 p15 与肝癌耐药的关系。

RNA 干扰是一种转录后基因沉默技术,它抑制 mRNA 的翻译并促进 mRNA 的降解[16]。我们构建了小干扰 RAN(siRNA)片段,siRNA 通过与同源的 p15 mRNA 互补结合使其特异性地降解,在 mRNA 水平抑制特异基因的表达,使其相应功能表型缺失,是一种序列特异性的转录后基因沉默现象[17]。

我们首先构建了肝癌稳定耐药模型 HepG2/CDDP/1.6,在稳定耐药的基础上增加顺铂的浓度(2.0 mg/L)继续诱导并观察耐药 HepG2 细胞对更高浓度化疗药物的适应过程。我们发现,随着继续诱导时间



A:转染 24 h; B:转染 48 h; C:转染 72 h

图6　转染 siRNA-Y3 后耐药 HepG2/CDDP/2.0 细胞的周期分布

的延长，G_0/G_1期细胞比例增高。转染针对 p15 mRNA 的小干扰 RAN(siRNA)后，RT-PCR 和 Western blot 显示 p15 表达降低，呈剂量和时间依赖性($P<0.05$)，转染 72h 后，p15 mRNA 的表达减少了 74.3%；G_0/G_1期细胞比例逐渐降低($P<0.05$)，促进了细胞从 G_1期向 S 期的转换，促进了细胞周期进展，促进细胞增殖；细胞表面耐药相关蛋白 p-gp 的表达增加，表明肿瘤的耐药性增加。肿瘤耐药与细胞周期的变化密切相关[18]。

随着顺铂诱导时间的延长，肝癌细胞耐药性增加，G_0/G_1期细胞比例增高，说明 G_0/G_1期阻滞是 HepG2 细胞耐受顺铂的适应性改变。顺铂为铂的金属络合物，它结合到 DNA 链形成加合物，使 DNA 链间或者链内交联并切割 DNA 链，抑制 DNA 的复制。真核细胞对抗 DNA 损伤的反应是阻断细胞周期进展的检测点，使细胞停滞在 G_1期，S 期或者 G_2/M 期。为了行使重要功能比如 DNA 修复，在周期进展开始之前检测点被激活。顺铂使不同类型的细胞停滞在不同的时期。顺铂使敏感的卵巢癌 A278 细胞停滞在 G_2/M 期，使耐顺铂的卵巢癌 A278cis 细胞停滞在 S 期[19]。经过细胞毒性药物的处理后(包括顺铂)，细胞周期停滞是暂时的。停滞时间和停滞的时期取决于不同细胞对 DNA 损伤的修复能力。耐受顺铂的 HepG2/CDDP/2.0 细胞通常停滞在 G_0/G_1期，为损伤 DNA 的修复创造了条件[20]。耐药肿瘤细胞膜上转运蛋白 P-GP 表达增加，使得细胞内抗肿瘤药物维持在很低的浓度。低浓度的顺铂不足以抑制细胞增殖，长期低浓度环境导致细胞产生耐药性。有限的几个抑制 P-GP 蛋白表达的临床实验获得成功，说明采用抑制药物外排泵的简单方法可能不足以有效得逆转耐药[21-22]。转染 p15 特异性的 siRNA 并没有增加 HepG2/CDDP 细胞对顺铂的敏感性，反而加强了 HepG2 细胞的耐药表型，提示联合其他的治疗策略，比如细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制剂(CDKI)和其他的针对细胞周期的监测点的化疗药物，可能是逆转肿瘤耐药的有效措施。如构建 TSG101-siRNA 表达载体，沉默 TSG101 基因，能逆转 QGY/CDDP 对顺铂的耐药性[23]。

综上所述，我们的结果显示降低 p15 的表达促进细胞周期的进展，增加了 HepG2 细胞对顺铂的耐药性。p15 负性调节细胞周期的进展，与 HepG2 细胞耐受顺铂密切相关。p15 可以作为肝癌治疗的一个靶点。

参考文献：

[1] Di-Bisceglie A M. Epidemiology and clinical presentation of hepatocellular carcinoma[J]. J Vasc Interv Radiol, 2002, 13(9 Pt 2): S169-S171.
[2] Mazzanti R, Gramantieri L, Bolondi L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and clinical aspects[J]. Mol Aspects Med, 2008, 29(1/2): 130-143.
[3] Bruix J, Boix L, Sala M, *et al*. Focus on hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2004, 5(3): 215-219.
[4] Bruix J, Sala M, Llovet J M. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2004, 127(5 Suppl 1): S179-S188.
[5] Shi LX, Ma R, Lu R, *et al*. Reversal effect of tyroservatide (YSV) tripeptide on multi-drug resistance in resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-FU[J]. Cancer Lett, 2008, 269(1): 101-110.
[6] 孟超，申晓敏. 人肝癌耐药细胞系的建立及生物学特性的研究[J]. 天津医药, 2009, 37(10): 872-873, 914.
[7] 杨俊霞，汤为学. 人肝癌顺铂耐药细胞系的建立及其生物学特征[J]. 癌症, 2002, 21(8): 872-876.
[8] Matsuura I, Denissova N G, Wang G, *et al*. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads[J]. Nature, 2004, 430(6996): 226-231.
[9] Nowak A K, Chow P K, Findlay M. Systemic therapy for advanced hepatocellular carcinoma: a review[J]. Eur J Cancer, 2004, 40(10): 1474-1484.
[10] Whang-Peng J, Cheng A L, Hsu C, *et al*. Clinical development and future direction for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. J Exp Clin Med, 2010, 2(3): 93-103.
[11] Chauffert B, Dimanche-Boitrel M T, Garrido C, *et al*. New insights into the kinetic resistance to anticancer agents[J]. Cytotechnology, 1998, 27(1/3): 225-235.
[12] Maddika S, Ande S R, Panigrahi S, *et al*. Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy[J]. Drug Resist Updat, 2007, 10(1/2): 13-29.
[13] Jeffrey P D, Tong L, Pavletich N P. Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors[J]. Genes Dev, 2000, 14(24): 3115-3125.
[14] 王 微，陈伟庆. P15 逆转肝癌多药耐药的机制研究[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(15): 1383-1386.
[15] Aagaard L, Rossi J J. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2/3): 75-86.
[16] Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy [J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(3): 217-227.
[17] Lee S K, Kumar P. Conditional RNAi: Towards a silent gene therapy [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(7/8): 650-664.
[18] Shah M A, Schwartz G K. Cell cycle-mediated drug resistance: an emerging concept in cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(8): 2168-2181.
[19] Horvath V, Blanarova O, Svihalkova-Sindlerova, L, *et al*. Platinum(IV) complex with adamantylamine overcomes intrinsic resistance to cisplatin in ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2006, 102(1): 32-40.
[20] Vermeulen K, Van-Bockstaele D R, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer [J]. Cell Prolif, 2003, 36(3): 131-149.
[21] Li L, Pan Q, Sun M, *et al*. Dibenzocyclooctadiene lignans: a class of novel inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1[J]. Life Sci, 2007, 80(8): 741-748.
[22] Cen J, Qi Y, Tao Y F, *et al*. HZ08, a great regulator to reverse multidrug resistance via cycle arrest and apoptosis sensitization in MCF-7/ADM[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 647(1/3): 21-30.
[23] 向征，张才全，汤为学. TSG101-siRNA 对肝癌耐药细胞株 QGY/CDDP的逆转作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(2): 170-173.

(**收稿**:2011-03-12;**修回**:2011-04-04)
(编辑 王 红)