论著

文章编号:1000-5404(2011)18-1912-05

抑制人 PC4 基因表达的 siRNA 载体的构建与筛选

陶绍霖,谭群友,邓 波,康珀铭,徐 翼 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心)

[摘要] **目的** 构建和筛选能高效、特异性抑制人转录辅助调控因子4(positive coactivator 4,PC4)基因表达的siRNA载体。**方法** 设计并合成人 PC4 基因特异性的 4 对 siRNA 干扰靶点,分别克隆入 pSES-HUS 腺病毒穿梭质粒,构建重组 pSES-HUS-PCi1,pSES-HUS-PCi2,pSES-HUS-PCi3 和 pSES-HUS-PCi4 质粒。使用脂质体包裹,瞬时转染 293T 细胞,qRT-PCR 和 Western blot 检测其对 PC4 mRNA 和蛋白表达的影响,筛选最佳的重组质粒及干扰靶点,同时探讨其对上皮来源的 293T 细胞增殖和迁徙的影响。**结果** 构建的 4 对重组质粒载体经酶切鉴定和基因测序分析,其基因大小、序列与预期相符。将 4 对重组质粒及 pSES-HUS 空质粒瞬时转染 293T 细胞,发现 pSES-HUS-PCi1 重组质粒组较 pSES-HUS 空质粒组和正常 293T 细胞组中 PC4 mRNA 和蛋白的表达低,且差异具有统计学意义($P<0.01$)。可见 pSES-HUS-PCi1 重组质粒的 PC4 靶点序列(正义,5′-AACAGAGCAGCAGCAGCAGATTTT-3';反义,5′-ATCTGCTGCTGCTGCTCTGTTTT-3′)能抑制 PC4 mRNA 的表达和蛋白的合成,其抑制率分别是 85.30% 和 80.57%。干扰 PC4 表达后 293T 细胞的体外增殖和迁徙能力下降,且以 pSES-HUS-PCi1 重组质粒组最为明显($P<0.05$)。**结论** 成功构建并筛选出高效、特异性抑制 PC4 表达的 siRNA 载体,并发现 PC4 能影响上皮来源 293T 细胞的增殖和迁徙能力。

[关键词] PC4;siRNA;PSES-HUS 载体系统;恶性肿瘤

[中图法分类号] R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Construction of siRNA vector for inhibiting expression of human positive co-activator 4

Tao Shaolin, Tan Qunyou, Deng Bo, Kang Boming, XuYi (Department of Thoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the specific siRNA vector with a high performance for inhibiting the expression of human positive co-activator 4(PC4). **Methods** Four pairs of PC4 specific siRNA interfere targets were designed and synthesized. They were then cloned into the PSES-HUS adenovirus shuttle plasmid to construct recombinant pSES-HUS-PCi1, pSES-HUS-PCi2, pSES-HUS-PCi3, and pSES-HUS-PCi4 plasmids which were packaged with lipid bodies and transiently transfected into 293T cells. Effect of the 4 plasmids on expression of PC4 mRNA and protein was detected by real time quantitative PCR(qRT- PCR) and Western blotting, respectively. Optimal recombinant plasmids and interfere targets were screened, and their effect on proliferation and migration of 293T cells was studied by cell scratch test. **Results** The 4 constructed pairs of recombinant plasmid vectors were identified by enzyme digestion and analyzed by gene sequencing. Their size and sequences were consistent as expected. The 4 constructed pairs of recombinant plasmids and pSES-HUS-PCi1 empty plasmids were used to transfect 293T cells. The expression level of PC4 mRNA and protein was lower in recombinant pSES-HUS-PCi1 plasmids than in pSES-HUS-PCi1 empty plasmids and normal 293T cells ($P<0.01$), indicating that the PC4 target sequences of recombinant pSES-HUS-PCi1 plasmids(sense: 5′-AACAGAGCAGCAGCAGCAGATTTT-3′; antisense: 5′-ATCTGCTGCTGCTGCTCTGTTTT-3′) can inhibit the expression of PC4 mRNA and synthesis of proteins ($P<0.01$), with an inhibitory rate of 85.30% at mRNA level and 80.57% at protein level, respectively. The *in vitro* proliferation and migration of 293T cells were decreased, especially in recombinant pSES-HUS-PCi1 plasmids, when the expression of PC4 was interfered ($P<0.05$). **Conclusion** The siRNA vector for specific inhibition of PC4 expression with a high performance has been successfully constructed and PC4 can influence the proliferation and migration of 293T cells in epithelium.

[**Key words**] positive co-activator 4; siRNA; pSES-HUS plasmid system; malignant tumor

Supported by the Innovation Foundation of Scientific Research of Third Military Medical University(2007XG60). Corresponding author: Tan Qunyou, Tel: 86-23-68757987, E-mail: tanqy001@163.com

[基金项目] 第三军医大学科研创新基金(2007XG60)

[通信作者] 谭群友,E-mail:tanqy001@163.com

复发和转移是影响恶性肿瘤患者生存、预后的主要原因。肿瘤淋巴转移是最常见的转移途径,其发生、发展是一个多水平、多基因、多阶段、多步骤的复杂生物学过程。目前对恶性肿瘤淋巴转移发生的分子机制尚未完全阐明,更缺乏有效的诊断和治疗手段,亟需在分子水平寻找诊断和治疗的新靶标[1]。转录辅助调控因子4(positive coactivator 4,PC4)是一个相对分子质量为 15×10^3 的核蛋白,在基因表达转录、复制、DNA修复、染色体形成等过程中发挥作用,且能辅助P53功能的发挥[2]。近年来研究发现PC4还与恶性肿瘤的发生、发展及淋巴转移相关,但其作用机制尚不清楚[3]。本实验拟设计、构建抑制PC4基因表达的siRNA载体,筛选最佳抑制效率靶点,为深入研究PC4在恶性肿瘤淋巴转移过程中的作用及机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 细胞总RNA抽提试剂盒、RT-PCR试剂盒、限制性内切酶、DNA连接试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、DNA marker、抗生素均购自大连宝生生物公司。DMEM培养基、胎牛血清、胰酶均购自Hyclon公司。SYBR Green Ⅰ荧光定量试剂盒购自TaKaRa公司。Lipofectamine2000购自Invitrogen公司。PC4多克隆抗体购自Abcam公司。siRNA的DNA序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.1.2 质粒及细胞株 腺病毒穿梭质粒PSES-HUS由美国芝加哥大学肿瘤研究所惠赠,293T细胞株为本室保存。

1.2 方法

1.2.1 siRNA的设计和合成 根据siRNA的设计原则:①从目的基因开放阅读框起始密码子AUG下游50~100 nt位置开始寻找紧接在连续两个AA下的19~21个碱基序列为潜在靶位点;②优先选择GC含量在30%~50%的序列,尽量避免4个连续的A或T;③设计的序列需经blast比对,以确保序列对目的基因的特异性。结合PC4基因cDNA完整序列,利用互联网在线siRNA设计工具找出siRNA靶位点,经BLAST比对,去除和其他基因同源的非特异序列,最终选择4个目标序列。根据质粒pSES-HUS酶切位点特点,在设计时5′端加碱基"A"以备Sfi1酶切鉴定,3′端加"TTTT"作为转录终止信号。共设计4对PC4基因干扰片段,依次标记为PCi1、PCi2、PCi3和PCi4(表1),由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2.2 重组真核表达质粒载体的构建及鉴定 用Sfi1限制性内切酶酶切pSES-HUS质粒,反应温度50 ℃,酶切2 h。酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳后胶回收,分别加入4对siRNA目地片段,T_4连接酶4 ℃过夜连接,转化感受态TOP10大肠杆菌,卡拉霉素抗性平板筛选,挑取阳性克隆,Sfi1酶切鉴定正确后送Invitrogen公司鉴定测序。阳性克隆质粒分别命名为pSES-HUS-PCi1、pSES-HUS-PCi2、pSES-HUS-PCi3和pSES-HUS-PCi4。

表1 连接pSES-HUS质粒的PC4 siRNA靶点PCi1、PCi2、PCi3和PCi4序列

siRNA序列名	序列(5′→3′)
PCi1	上游:AACAGAGCAGCAGCAGCAGATTTT
	下游:ATCTGCTGCTGCTGCTCTGTTTTT
PCi2	上游:AGCAAAGTGCTAATTGATATTTTT
	下游:AATATCAATTAGCACTTTGCTTTT
PCi3	上游:AGGGAAAATGAGGTACGTTATTTT
	下游:ATAACGTACCTCATTTTCCCTTTT
PCi4	上游:ATGACAGTGAGGTTGACAAATTTT
	下游:ATTTGTCAACCTCACTGTCATTTT

1.2.3 siRNA重组真核表达载体转染293T细胞 实验分pSES-HUS-PCi1重组质粒组、pSES-HUS-PCi2重组质粒组、pSES-HUS-PCi3重组质粒组、pSES-HUS-PCi4重组质粒组、pSES-HUS空质粒组和正常293T细胞组,每组设3个复孔。使用含10%胎牛血清的DMEN培养基培养293T细胞至对数生长期,按 2×10^5/ml接种到3个6孔板中,培养24 h后,参照Lipofectamine2000说明书步骤,按上述分组分别加入脂质体包裹的重组质粒,瞬时转染293T细胞。于转染后48 h置红色荧光显微镜下观察荧光蛋白表达情况。

1.2.4 qRT-PCR检测siRNA对PC4 mRNA表达的干扰效果 按照荧光定量PCR引物设计原则设计PC4及内参β-actin引物序列并交上海生工合成。PC4(138 bp):上游5′-CACCTGCTCAGTTTTCACACA-3′,下游5′-TGGAAAGTCAGTGAAACTGTCA-3′;β-actin(285 bp):上游5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′,下游5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′。收集转染后48 h的细胞,常规Trizol一步法提取细胞总RNA,使用荧光定量逆转录试剂盒转录为cDNA,按照SYBR Green Ⅰ荧光定量试剂盒说明书操作加样,并使用美国MX3000P PCR仪进行扩增。反应条件为:94 ℃变性30 s,65 ℃退火30 s,72 ℃延伸20 s,共40个循环,每个样本做3个复孔。分析PC4基因的相对表达量,评价PC4 mRNA被相应的siRNA干扰效果。

1.2.5 Western blot检测siRNA对PC4蛋白表达的干扰效果 收集转染72 h后的细胞,用RIPA总蛋白试剂盒提取细胞总蛋白,ABC蛋白定量法定量,经SDS-PAGE(12%分离胶)电泳,将蛋白电转移至硝酸纤维素膜上,用Abcam的PC4为一抗,进行Western blot法检测,显色按增强化学发光试剂盒步骤进行,采集图像。β-actin的蛋白表达量做为内参照。

1.2.6 MTT比色分析siRNA阻滞PC4表达对293T细胞体外贴壁增殖的影响 分别取对数生长期293T细胞,按 1×10^5/ml接种到3个96孔板中,贴壁后按Lipofectamine2000说明书步骤,分别加入脂质体包裹的4对重组质粒和空载体质粒,瞬时转染293T细胞,每组细胞设5个平行复孔实验($n=5$)。在24、48、72 h各取1孔板加入10 μl MTT溶液(5 mg/ml),继续培养4 h后终止培养,弃孔内上清液,加100 μl异丙醇,振荡10 min,用酶标仪测定490 nm波长时各孔的光吸光值[D(490)],并进行统计分析。

1.2.7 划痕"愈合"模型分析siRNA阻滞PC4表达对293T细胞体外迁移能力的影响 按前述细胞转染方法将4对重组

质粒和空载体质粒分别转染293T细胞后，待转染后24 h，用移液器枪头在6孔板内表面划1条痕迹（宽约20 mm），于相差显微镜下观察划痕后24、48、72 h各组划痕的“愈合”情况，测量细胞划痕宽度，宽度较小者表示293T细胞相对迁移能力较强。

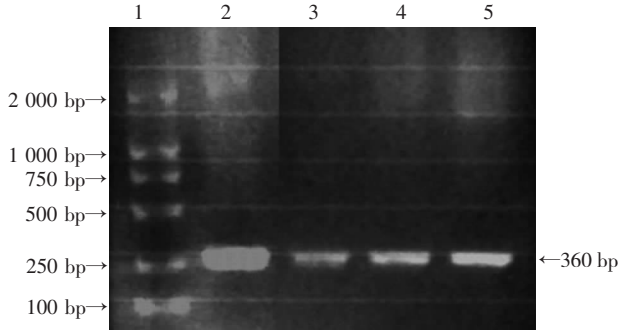
1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 17.0统计软件，多组均数间的比较采用方差分析，多组均数间的两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 pSES-HUS-PC4的构建及鉴定

重组pSES-HUS-PC4质粒经Sfi1酶切后，得到1条约8 588 bp目的条带及线性空载体条带，而空载体pSES-HUS经酶切后仅有1条线性条带。而构建的重组质粒菌液经抽提后进行PCR鉴定（图1），同时交Invitrogen测序鉴定，结果表明含PC4基因的重组质粒构建成功。



1：DNA标准；2－5：pSES-HUS-PCi4重组质粒组、pSES-HUS-PCi3重组质粒组、pSES-HUS-PCi2重组质粒组、pSES-HUS-PCi1重组质粒组

图1 重组质粒菌液PCR鉴定结果阳性

2.2 siRNA真核质粒表达载体转染293T细胞

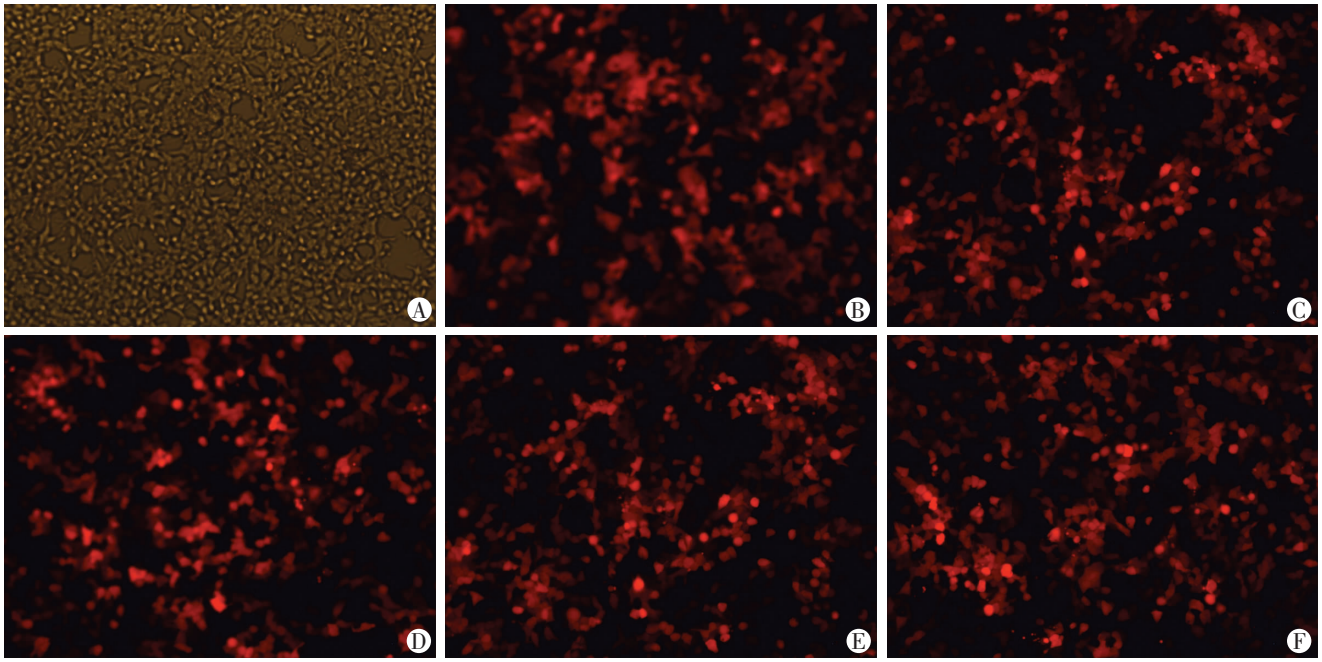
分别将重组pSES-HUS-PCi1，pSES-HUS-PCi2，pSES-HUS-PCi3和pSES-HUS-PCi4质粒用DNA定量仪定量，Lipofectamine2000瞬时转染293T细胞，48 h后在荧光显微镜下观察红色荧光蛋白表达情况（图2）。

2.3 qRT-PCR检测siRNA对PC4 mRNA表达的干扰效果

qRT-PCR检测干扰48 h后各实验组相对荧光值的表达，分析其对PC4表达的干扰效果。可见pSES-HUS-PCi1重组质粒组转染成功后PC4 mRNA的表达明显低于pSES-HUS空质粒组和正常293T细胞组（$P < 0.01$）。pSES-HUS-PCi1重组质粒组对PC4 mRNA抑制率达到85.30%，而空质粒对照组、pSES-HUS-PCi2重组质粒组、pSES-HUS-PCi3重组质粒组和pSES-HUS-PCi4重组质粒组的抑制率分别为5.01%、35.76%、19.84%、71.39%，组间差异具有显著性（$F = 199.268$，$P < 0.01$）。提示，pSES-HUS-PCi1重组质粒组PC4 siRNA靶点可以高效抑制PC4 mRNA表达。

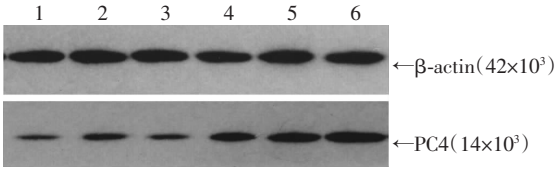
2.4 Western blot检测siRNA对PC4蛋白水平表达的干扰效果

收集转染后48 h的各组细胞，Western blot检测其PC4蛋白表达水平，发现pSES-HUS-PCi1重组质粒组PC4蛋白相对表达量明显低于pSES-HUS空质粒组合正常293T细胞组（$P < 0.01$）。pSES-HUS-PCi1重组质粒组对PC4蛋白抑制率达到为80.57%，而空质粒对照组、pSES-HUS-PCi2组、pSES-HUS-PCi3组和pSES-HUS-PCi4组的抑制率分别为4.24%、44.46%、68.08%、63.37%（图3），结果与各组重组质粒转染后PC4 mRNA的表达一致。提示，pSES-HUS-PCi1重组质粒组PC4 siRNA靶点可以高效抑制PC4蛋白的表达。



A：正常293T细胞（LM）；B：pSES-HUS-PCi1重组质粒（荧光显微镜）；C：pSES-HUS-PCi2重组质粒（荧光显微镜）；D：pSES-HUS-PCi3重组质粒（荧光显微镜）；E：pSES-HUS-PCi4重组质粒（荧光显微镜）；F：pSES-HUS空质粒转染（荧光显微镜）

图2 重组质粒转染293T细胞48 h RFP蛋白的表达（×200）



1:正常293T细胞组;2:pSES-HUS空质粒组;3:pSES-HUS-PCi4重组质粒组;4:pSES-HUS-PCi3重组质粒组;5:pSES-HUS-PCi2重组质粒组;6:pSES-HUS-PCi1重组质粒组

图3 各组重组质粒转染293T细胞48 h后PC4蛋白的相对表达量

2.5 siRNA阻滞PC4表达对293T细胞增殖的影响

293T细胞增殖能力在应用siRNA干扰PC4表达后受到抑制,细胞在各时间点增殖数量少于pSES-HUS空质粒组和正常293T细胞,其中pSES-HUS-PCi1重组质粒组差异显著($P<0.05$),见表2。

表2 MTT法分析抑制PC4表达对293T细胞增殖能力的影响

[$D(490), n=5, \bar{x}\pm s$]

组别	24 h	48 h	72 h
正常293T细胞组	3.12±0.42[a]	4.34±0.36[a]	2.19±0.46[a]
pSES-HUS空质粒组	2.94±0.30[a]	3.95±0.34[a]	2.09±0.64[a]
pSES-HUS-PCi4重组质粒组	2.64±0.43	3.74±0.30	2.29±0.67
pSES-HUS-PCi3重组质粒组	2.39±0.24	3.76±0.39	2.29±0.62
pSES-HUS-PCi2重组质粒组	2.25±0.41	3.60±0.31	2.09±0.49
pSES-HUS-PCi1重组质粒组	1.97±0.27	3.24±0.18	1.94±0.27

a:$P<0.05$,与pSES-HUS-PCi1重组质粒组比较

2.6 siRNA阻滞PC4表达对293T细胞体外迁移能力

在各重组质粒和正常293T细胞划痕后24、48、72 h后进行观察,可见在转染后24 h后孔板中间的直线变得模糊,有少量的293T细胞开始向中间生长,各组间的差异不明显;48 h后各组直线间的距离均减小,而各PC4 siRNA重组质粒组直线间距离减少小于pSES-HUS空质粒组和正常293T细胞,其中pSES-HUS-PCi1重组质粒组差异具有统计学意义($P<0.05$)。72 h后各组直线间的距离进一步减少,pSES-HUS空质粒组和正常293T细胞组划痕基本消失,而各PC4 siRNA重组质粒组仍可见,其中pSES-HUS-PCi1重组质粒组较明显(图4)。

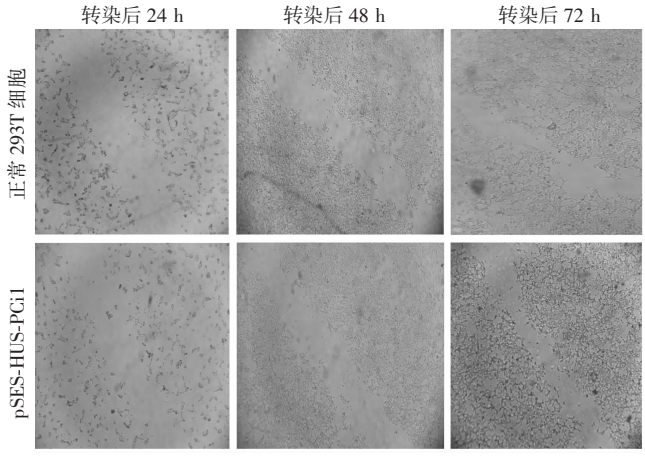


图4 抑制PC4表达对293T细胞体外迁徙能力的影响

(倒置显微镜 ×100)

3 讨论

PC4是转录共辅助因子家族成员之一。在1994年Ge等[4]从人上游因子刺激活性相关USA碎片中纯化、克隆、鉴定获得。PC4与刺激转录蛋白TSP1相似,由127个残基组成的核DNA结合蛋白,能通过RNA聚合酶Ⅱ刺激基础转录,磷酸化调节普通转录因子和转录激活因子之间的相互作用,在转录过程中起着双重(激动或者抑制)的复杂作用[5]。PC4还参与DNA复制、修复和染色质形成等,在细胞生长和分化过程中发挥着重要的作用[6-7]。同时,PC4也是一个肿瘤相关分子,与P53、Bax、Ras等分子相互作用,参与肿瘤的恶性转化,是肺癌发生、发展及淋巴转移的一个相关分子[8]。Yokoi等[9]用比较基因组学研究小细胞肺癌来源的22个细胞株中DNA双重突变基因,发现在5p11~p13扩增区中有一共有结构区域5p13,里面包含CDH6、PC4和SKP2基因,进一步在小细胞肺癌细胞株中检测到CDH6、PC4和SKP2扩增和过表达。Peng等[10]研究报道PC4在人前列腺癌组织标本中的高表达,而且其表达水平随肿瘤组织的恶性程度的增加而增强,特别是在发生骨转移的晚期肿瘤组织中,表达最高,而在正常前列腺组织中,几乎检测不到PC4蛋白表达。在乳腺癌和肺癌的组织标本中亦得到相似的结果。针对PC4对转录复合体的影响来诱导肿瘤转化,揭示PC4在肿瘤发生发展就淋巴转移中的作用及意义,并以PC4作为分子靶向的分子诊断和治疗,将为肿瘤的分子生物学诊治提供新的研究方向。

RNA干扰(RNA interference,RNAi)是指将外源性或内源性双链RNA导入细胞后引起与该段RNA同源的mRNA产生特异性降解的现象。是近几年发展起来的一项特异性抑制基因表达的新方法,广泛用于肿瘤基因功能、基因诊断与治疗的研究中,具有高特异性、高效率性、快速性、可遗传性等优点[11]。小干扰RNA(siRNA)是RNAi发挥作用的效应分子,是外源性或内源性的双链RNA在细胞内与RNA酶Ⅲ核酸内切酶Dicer结合后切割形成的短双链RNA[12]。siRNA的设计一般遵循严格的原则,选择兼具高效抑制特性和保守性siRNA靶位点,但即使如此设计的siRNA也仅有60%~70%可以发挥沉默效应,且针对某一个基因的不同位点所设计的siRNA,在诱导RNA干扰中的作用效果明显不同[13]。目前构建目的基因的siRNA表达载体,通过脂质体或转染试剂介导直接导入实验细

胞,然后通过检测目的基因表达水平以及功能的变化,对目的基因的有效 siRNA 进行筛选,是获得高效靶点的一种直接且有效的策略[14]。在本实验中,我们采用一种新的有效 siRNA 筛选质粒系统 pSES-HUS 对靶向新基因 PC4 的最佳 siRNA 进行筛选。pSES-HUS 是美国芝加哥大学肿瘤研究所开发出一种表达小片段 RNA 从而达到 RNAi 的腺病毒穿梭质粒载体系统。该系统可以对目的基因的最佳 siRNA 进行快捷、有效的筛选。该载体的主要特点为:需要被干扰的目的基因和红色荧光蛋白(RFP)形成融合蛋白并表达;包含有 U6 与 H1 双启动子和 sfi1 双酶切位点,可转录出 19~21nt 的双链 siRNA,与目的基因 DNA 序列互补,发挥 RNA 干涉作用,使该基因表达沉默;对目的基因的沉默效果可以通过 RFP 表达的减弱或缺失从荧光显微镜下直接观测[15]。

本实验根据 siRNA 设计原则,设计出 4 对人来源的 PC4 的 RNA 干扰的靶位点,成功构建了 siRNA 重组质粒表达载体 pSES-HUS-PCi1、pSES-HUS-PCi2、pSES-HUS-PCi3、pSES-HUS-PCi4。经酶切鉴定和基因测序正确后,脂质体 2000 转染入 293T 细胞中,并于转染后 48 h 收集细胞样本,提取总 RNA 和蛋白,检测目的基因表达水平的变化。qRT-PCR 检测示 pSES-HUS-PCi1 重组质粒干扰组 PC4 mRNA 相对表达明显下降,抑制率为 85.30%,表明在 mRNA 水平上 pSES-HUS-PCi1 组对目标基因有最明显的抑制效率。同样,Western blot 检测也证实 pSES-HUS-PCi1 重组质粒干扰组对 PC4 相对蛋白表达的抑制作用,其抑制率为 80.57%。可见,转染 pSES-HUS-PCi1 重组质粒能够明显抑制 PC4 在 mRNA 和蛋白水平的合成,且在基因的转录水平和蛋白表达水平的抑制效果是一致的。同时细胞增殖实验和划痕愈合模型实验结果表明 siRNA 干扰 PC4 表达后,293T 细胞的增殖能力和体外迁徙愈合能力下降,其中 pSES-HUS-PCi1 重组质粒干扰后最为明显,差异具有统计学意义。表明 PC4 基因影响了上皮来源 293T 细胞的增殖和迁徙能力,提示 PC4 基因的表达可能参与上皮来源的细胞的恶性增殖。后续的试验中,我们将使用 pSES-HUS-PCi1 构建稳定的 PC4 低表达细胞株及动物实验模型,分析 PC4 基因沉默后对细胞增殖和迁徙影响的具体机制,以及其他生物学效应及其内在作用机制,揭示 PC4 在恶性肿瘤发生发展及淋巴转移中的作用及意义,给 PC4 生理学功能开辟一个新的篇章,亦为肿瘤的分子生物学诊治提供新的研究方向。

参考文献:

[1] 潘虹, 刘铭, 张晓莉, 等. 非小细胞肺癌组织中 MMP-12 的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 142-145.

[2] Conesa C, Acker J. Sub1/PC4 a chromatin associated protein with multiple functions in transcription[J]. RNA Biol, 2010, 7(3): 287-290.

[3] Shi C M, Zhu Y, Zhau H Y, *et al*. PC4, a novel marker for stem cell transformation and cancer progression[J]. J Biotechnol, 2008, 136(Suppl 1): S189.

[4] Ge H, Roeder R G. Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes[J]. Cell, 1994, 78(3): 513-523.

[5] Mortusewicz O, Roth W, Li N, *et al*. Recruitment of RNA polymerase II cofactor PC4 to DNA damage sites[J]. J Cell Biol, 2008, 183(5): 769-776.

[6] Batta K, Yokokawa M, Takeyasu K, *et al*. Human transcriptional co-activator PC4 stimulates DNA end joining and activates DSB repair activity[J]. J Mol Biol, 2009, 385(3): 788-799.

[7] Das C, Hizume K, Batta K, *et al*. Transcriptional coactivator PC4, a chromatin-associated protein, induces chromatin condensation[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(22): 8303-8315.

[8] Rajagopalan S, Andreeva A, Teufel D P, *et al*. Interaction between the transactivation domain of p53 and PC4 exemplifies acidic activation domains as single-stranded DNA mimics[J]. J Biol Chem, 2009, 284(32): 21728-21737.

[9] Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, *et al*. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers[J]. Am J Pathol, 2002, 161(1): 207-216.

[10] Peng Y, Su Y, Wang T, *et al*. Human transcriptional positive coactivator 4 participates in the proliferation and senescence of bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells[J]. Exp Hematol, 2010, 38(9): 117.

[11] Lin S L, Kim H, Ying S Y. Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA)[J]. Front Biosci, 2008, 13: 2216-2230.

[12] Benenson Y. Engineering RNAi circuits[J]. Methods Enzymol, 2011, 497: 187-205.

[13] Henriksen J R, Buechner J, Lokke C, *et al*. Inhibition of gene function in mammalian cells using short-hairpin RNA (shRNA)[J]. Methods Mol Biol, 2011, 703: 189-204.

[14] Xu J, Zeng J Q, Wan G, *et al*. Construction of siRNA/miRNA expression vectors based on a one-step PCR process[J]. BMC Biotechnol, 2009, 9: 53.

[15] 洪思琦, 毕杨, 郭振华, 等. 携带 siANGPTL4 重组腺病毒的构建及其对 MG63 增殖的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(1): 28-32.

(**收稿**:2011-04-20;**修回**:2011-07-01)

(编辑 栾 嘉)