livinβ-siRNA 表达载体的构建及其在人星形胶质瘤细胞中的稳定表达

石全红[1],詹 傲[1],崔荣周[1],王 佳[2] (1. 重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属大学城医院妇产科,重庆 401331)

[摘 要] **目的** 构建 livinβ-siRNA 表达载体,并观察其在人星形胶质瘤细胞(U251)中对 livinβ 基因表达的抑制。**方法** 根据 livinβ 序列设计 2 条 livinβ-siRNA 特异性序列,PCR 扩增方法合成 2 条 siRNA 链,与质粒 pGenesil-11 重组构建 livinβ-siRNA 表达载体,脂质体法转染人星形胶质瘤细胞(U251),RT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 livinβ 基因及蛋白表达。**结果** 对重组质粒的双酶切鉴定和测序结果证明,livinβ-siRNA 表达载体 pGenesil-11-livinβ-siRNA 构建成功;RT-PCR 检测转染组细胞中 livinβ mRNA 表达水平明显低于对照组及空载体组,Western blot 检测转染组细胞中 livin 蛋白表达水平明显低于对照组及空载体组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 本实验成功构建了 livinβ-siRNA 表达载体 pGenesil-11-livinβ-siRNA,并且该载体能在真核细胞人星形胶质瘤细胞(U251)中稳定表达,并能抑制 livinβ 基因表达。

[关键词] livinβ;siRNA;胶质瘤细胞;质粒 pGenesil-11

[中图分类号] R739.4;Q78 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)03-0250-04

Construction of livinβ-specific siRNA expression vector and its stable expression in glioma cells

SHI Quan-hong, ZHAN Ao, CUI Rong-zhou, WANG Jia (Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct the specific short hairpin RNA (siRNA) expression vector targeting human livinβ gene, and its inhibitory effection on livinβ gene in the U251 glioma cells were observed. **Methods** Two livinβ siRNA template DNA sequences were designed and synthesized by PCR. The annealed siRNA template was cloned into pGenesil-11 plasmid. The recombinant vectors were confirmed by enzyme digestion analysis and DNA sequencing. The recombinant plasmid was transfected into U251 glioma cells by liposome mediated transfection. The effection on the livinβ gene expression in U251 glioma cell was detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** It was confirmed that recombinant plasmid was cloned successfully by restrictive enzyme digestion and sequence analysis. Expressions of livinβ mRNA and protein in glioma cells were suppressed after transfection. **Conclusion** The livinβ-specific siRNA expression vector could be constructed successfully, and can remarkably inhibit the expression of livinβ in glioma cells.

Keywords: livinβ; siRNA; glioma cells; pGenesil-11 plasmid

livin 是凋亡抑制蛋白,livin 基因包括 livinα、livinβ 2 种亚型,有研究发现,胶质细胞瘤中 livinβ mRNA 表达高于正常对照组。livinα、livinβ 2 亚型,分别编码 298 个氨基酸和 280 个氨基酸的不同亚型结构蛋白质。本研究采用 RNA 干扰技术,构建了针对人 livinβ 基因的特异性短发卡 RNA(siRNA)真核表达载体,将其转染人胶质瘤细胞,并观察其对胶质瘤细胞 livinβ 基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

人星形胶质瘤细胞(U251)购于中国典型培养物保藏中心(武汉大学);pGenesil-11 购于武汉晶赛公司,Tris 购于美国 Promega公司,PVDF膜购于MILLIPORE,预染蛋白质分子量标准购于 Fermentas 公司,Rabbit anti-human livin 抗体购于武汉博士德,Rabbit anti-GAPDH 多克隆抗体购于武汉晶赛公司,动物 RNAout(Trizol RNA 提取试剂用于细胞 RNA 的提取)天泽基因工程有限公司产品;ReverTra Ace-α-TM-RT-PCR Kit 用于以 RNA 为模板,逆转录合成 cDNA 第一条链,购自东洋纺(上海)生物科技有限公司;PCR 引物购于武汉博洁公司;DNA marker DL2000(TaKaRa)购于武汉亚法公司产品;Taq DNA 聚合酶购于 MBI 公司,总 RNA 提取试剂盒购于上海华舜公司,TaKaRa RNA PCR Kit 购于 TaKaRa 生物有限公司,DNA marker DL2000、DNA marker 均购于 TaKaRa 生物有限公司,Gold View Nucleic Acid Stain 购于北京赛百盛基因技术公司。

1.2 方法

1.2.1 构建策略 pGenesil-11 是一种新型的真核表达载体,其以增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent, EGFP)为报告基因,并同时表达 2 条 shRNA。采用 PCR 方法合成 2 条 shRNA,用 Xcm Ⅰ限制性内切酶将 pGenesil-11 酶切成线性质粒,用 Ligation mixture 连接酶将 2 条 shRNA 与线性质粒连接,转化感受态细菌 DH5α,筛选阳性转化的 DH5α,并应用酶

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201303007

[收稿日期] 2013-03-20 [修回日期] 2013-04-15

切和基因测序鉴定质粒。构建的重组质粒命名 pGenesil-11-livinβ-siRNA,见图 1。

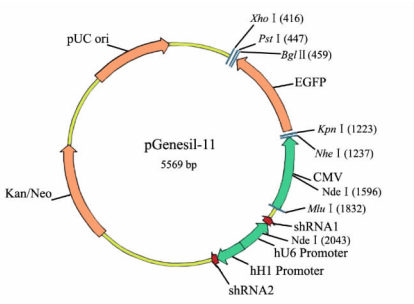
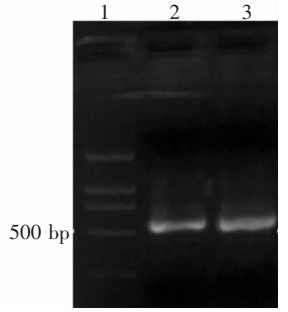


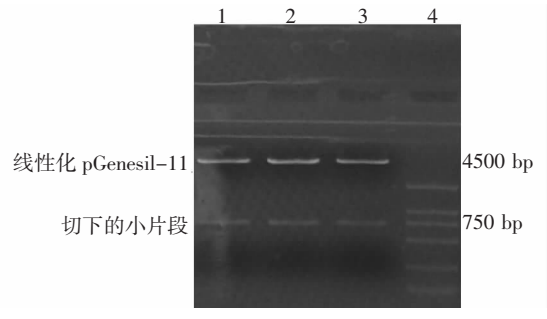
图 1 同时表达 2 条 shRNA 和增强型绿色荧光蛋白的重组质粒

1.2.2 livinβ-siRNA 序列设计及合成 目的基因针对 livinβ 基因序列设计:干扰序列 livinβ1 GGAAGAGACTTTGTCCACA, livinβ2 CCGTGTCCATCGTCTTTGT。设计并合成 PCR-F 引物 BIRC71 和 PCR-R 引物 BIRC72:livinβ1 GGAAGAGACTTTGTCCACA,livinβ1-F 5' CAAAAAGGAAGAGACTTTGTCCACATTCGTGTGGACAAAGTCTCTTCCGGTGTTTCGTC-3',livinβ2 CCGTGTCCATCGTCTTTGT,livinβ2-R 5' GAAAAACCGTGTCCATCGTCTTTGTTCTCACAAGACGATGGACACGGCGGGAAAGAGTG-3'。分别以 PCR-F 引物 livinβ1 和 PCR-R 引物 livinβ2 为上、下游引物,以质粒 pENTR/K4-Shsample 为模板,体外 35 ℃→45 ℃梯度 1 ℃ 1 个循环,58 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 30 个循环 PCR 扩增 livinβ1 + livinβ2 片段。1% Agarose 凝胶电泳回收 siRNA(图 2)。经 Xcm Ⅰ酶切反应体系,凝胶电泳回收质粒 pGenesil-11 Xcm Ⅰ酶切大片段酶切分析(图 3)。



1:DNA marker DL2000;2、3:siRNA

图 2 PCR 扩增获得的 siRNA



1、2、3:酶切后产物;4:DNA marker DL2000

图 3 质粒 pGenesil-11 Xcm Ⅰ酶切分析

1.2.3 连接产物的转化 制备*E. coli* DH5α 感受态菌,进行连接产物的转化:取 10 mL 过夜连接产物转化感受态 DH5α,涂布于含 Kanar 的 LB 平板上,37 ℃恒温箱培养过夜,挑取 3 个单菌落分别接种于 5 mL 含 Kanar 的 LB 培养液中,37 ℃恒温摇床培养过夜。

1.2.4 重组质粒的抽提及鉴定 重组质粒抽提后,进行 DNA 序列测定(由上海英骏公司完成)。将阳性菌株接种于含有 Kana(50 μg/mL)的 LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min 摇菌过夜,取 1 mL 菌液移入灭菌的 1.5 mL 离心管中,加入 0.25 mL 100% 灭菌甘油,混匀后 -80 ℃保存重组质粒备用。

1.3 重组质粒在真核细胞中的表达分析

1.3.1 人星形胶质瘤细胞 U251 的培养 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,传代培养后,制成单细胞悬液,显微镜下,用 10 倍物镜观察计数板 4 个象限中 4 个大方格中的细胞数,代入公式:细胞悬液的浓度(个/毫升) = (4 大方格细胞数之和/2) × 10^4 计数。

1.3.2 重组质粒转染人星形胶质瘤细胞 U251 按照 Lipofectamine 2000 说明书配制转染液。人胶质瘤细胞 U251 的转染:将细胞分为 3 组,Ⅰ组为转染组,即转染液中含重组质粒;Ⅱ组为空载体组,即转染液中仅含 pGenesil-11 质粒;Ⅲ组为对照组,即转染液中不含有质粒。细胞接种 24 h 后,在 24 孔板每孔中分别加入 100 μl 转染液,置于 37 ℃,含 5% CO_2 的恒温孵箱内培养 8 h 后,更换为含双抗的 1640 + 10% FBS 完全培养基,24 ~ 48 h 在荧光倒置显微镜下观察重组质粒在细胞中的表达。一个视野下数 100 个细胞,数 3 次取平均值。

1.3.3 RT-PCR 检测重组质粒转染 U251 后 livinβ 基因的表达 RT-PCR 反应条件 95 ℃ 5 min 1 个循环;95 ℃ 20 s;60 ℃ 20 s;72 ℃ 10 s;共 35 个循环,72 ℃延长 3 min 后结束扩增。按 5:1 比例,取 5 μl PCR 产物与 1 μl 缓冲液混合进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳,100 V 35 min,电泳结束后,凝胶成像扫描仪分析,采用 Quantity One 软件分析系统,对重组质粒转染 U251 后 livinβ 基因产物进行光密度值分析。

1.3.4 Western blot 检测重组质粒转染 U251 后 livin 蛋白 每 10^6 个细胞加入 1 mL RIPA 蛋白提取液,收集裂解的细胞,转膜,封闭,稀释一抗,抗人 livin(1∶200),内参兔抗 - GAPDH (1∶10 000),稀释二抗羊抗兔 IgG/HRP,稀释比例均为 1∶2 500,按 0.2 mL/cm^2 分别加入二抗,PVDF 膜曝光成像,用 Quantity One 软件分析蛋白区带,将 livin 光密度值与内参 GAPDH 光密度值相比,为 livin 相对光密度值。

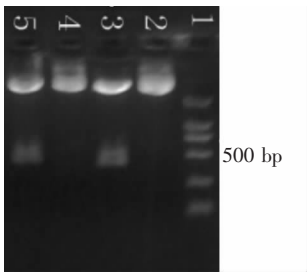
1.4 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件,所有计量资料均采用方差分析,$P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒经 Nde Ⅰ双酶切后,电泳结果显示,能够被 Nde I 酶切出一条约 447 bp DNA 小带的质粒即为克隆成功的质粒,第 3、5 泳道分别有一条与我们预期结果相符合的明亮条带,见图 4。



1:DL2000 marker;2:livinβ1 + livinβ2;3:livinβ1 + livinβ2 Nde I;4:livinβ1 + livinβ2;5:livinβ1 + livinβ2 Nde

图 4 重组质粒插入片段的限制性酶切分析

2.2 重组质粒的序列测定

重组质粒测序结果及质谱分析见图 5,经 BLAST 查询确定其分别为特异性序列。TTATGTaaCGCGGaaCTCCATATATGGGC TATGAACTAATGACCCCGTAATTGATTACTATTAATAACTACGC GTGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT TTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGGAAAAACCG TGTCCATCGTCTTTGTTCTCACAAAGACGATGGACACGGCGGG AAAGAGTGATCTCATACAGAACTTATAAGATTCCCAAATCCAA AGACATTTCACGTTTATGATGATTTCCCAGAACACATAGCGAC ATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCCTCACAGCCA TCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGTGTTCCCGCCTGGT GACACTGGGCCCGCGATTCCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCA GCGTTCAGATCGATCCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATT TCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTT AGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACGAAGATA TTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGG TAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGCTTTAAAATGGACTATCATA TGCCTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTTCTTGGCTTTATAT ATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAAGAGACTTTGTCCAC ACGAATGTGGACAAAGTCTCTTCCTTTTTGATGATTTCCCAGA ACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTG TCCCTCACAGCCATCTTCCTGCCAGGGCGCACGCGCGCTGGGT GTTCCCGCCTGGTGACACTGGGCCCGCGATTCCTTGGAGCGGG TTGATGACGTCAGCGTTCAGATCGATCCAATGTCGGGCAGGAA GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATT ACAAGGCTGTTAGAGAGA。

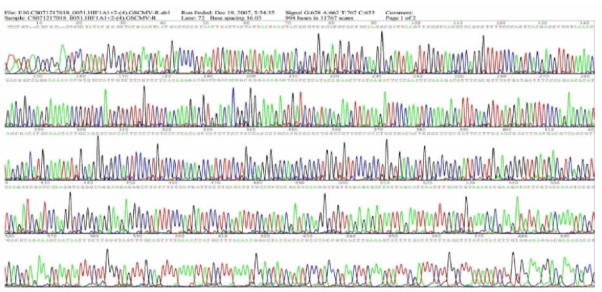
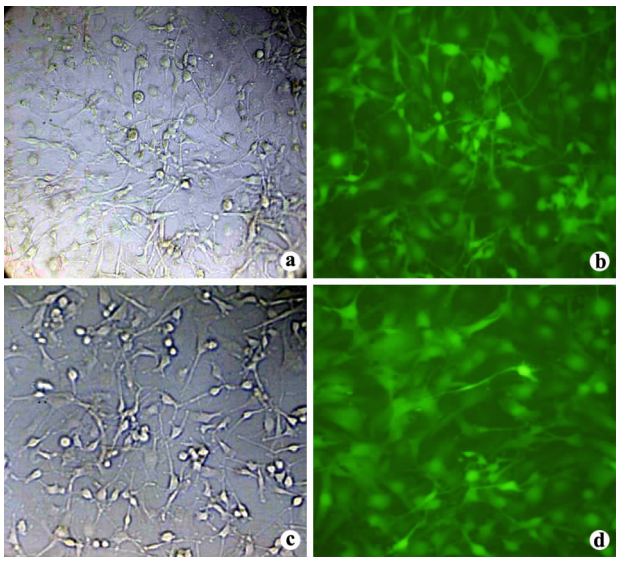


图 5 重组质粒 pGenesil-11-livinβ-siRNA 的测序图谱

2.3 重组质粒的转染结果

转染 24 ~ 48 h 荧光显微镜下观察,在对照组中未发现表达绿色荧光的细胞,在转染组和空载体组均可发现大量表达绿色荧光的细胞,见图 6。荧光显微镜下一个视野下数 100 个细胞,数 3 次取平均值(59 + 63 + 60)/3 = 60.7,照相确定转染效率约为 60.7%。转染后 48 ~ 72 h 为荧光表达的高峰期,一周后荧光表达开始减弱,至 3 周时仍可观察到表达绿色荧光的个别细胞。



a:转染 48 h 后的胶质瘤细胞 U251;b:转染 48 h 后的胶质瘤细胞 U251 表达绿色荧光;c:转染 72 h 后的胶质瘤细胞 U251;d:转染 72 h 后的胶质瘤细胞 U251 表达绿色荧光

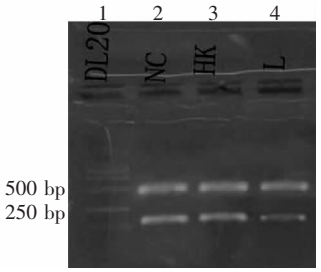
图 6 转染后的胶质瘤细胞 U251 镜下观察(×200)

2.4 重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 livinβ mRNA 的表达

RT-PCR 检测重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 后,细胞中 livinβ mRNA 的表达,见图 7。采用随机区组方差分析显示,3 组之间表达差异有显著统计学意义($F = 1\ 525.6$, $P < 0.05$),且转染组分别与空载体组、正常对照组有显著差异($P < 0.05$),而空载体组、正常对照组之间无差异($P > 0.05$),见表 1。

2.5 重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 livin 蛋白的表达

Western blot 检测重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 后,细胞中 livin 蛋白的表达,结果见图 8。采用随机区组方差分析显示,3组之间表达差异有显著统计学意义($F = 300.8$, $P < 0.05$),且转染组分别与空载体组、正常对照组有显著差异($P < 0.05$),而空载体组、正常对照组之间无差异($P > 0.05$),见表 2。

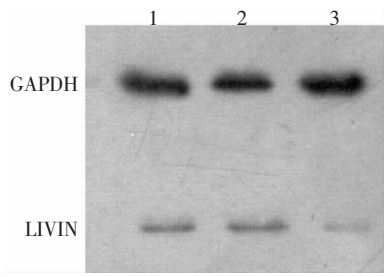


1:marker;2:正常对照组;3:空载体转染组;4:转染组

图 7 重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 后,细胞中 livinβ mRNA 的表达

表 1 重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 livinβ mRNA 的表达

正常对照组	空载体组	转染组
0.832 699	0.809 967	0.318 893
0.824 546	0.814 567	0.309 918
0.837 854	0.820 041	0.294 873
0.840 012	0.809 991	0.310 045
0.837 514	0.815 873	0.308 629



1:正常对照组;2:空载体组;3:转染组

图 8 重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 livin 蛋白表达

表 2 重组质粒转染人胶质瘤细胞 U251 livin 蛋白的表达

正常对照组	空载体组	转染组
0.426 688	0.454 626	0.268 153
0.437 216	0.462 936	0.254 133
0.443 978	0.451 422	0.251 764
0.432 536	0.470 001	0.249 897
0.444 570	0.460 311	0.248 972

3 讨论

抑制基因表达目前多倾向于使用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术,是应用 21 ~ 23 个碱基大小的小分子干扰 RNA(small interfering RNA,siRNA)在体内高效、特异地阻断或者降低同源基因的表达,促使同源 mRNA 降解,诱使细胞表现出特定基因缺失的表型,从而抑制基因的表达,或者说是引发转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing,PTGS)。

由于 siRNA 可以在不影响非特异性干扰素途径的情况下抑制靶基因的表达,具有选择余地大和扩增放大效应,只需微量特异的 siRNA 即可产生明显的抑制基因表达效果。但是 siRNA 进入细胞后容易被降解,24 h 后阻抑效果降低,其作用时间仅持续约 72 h,因此作用时间短暂是其致命缺陷。为克服此缺陷,人们设想利用载体介导 siRNA 体内表达技术。其原理是将 siRNA 对应的 DNA 模板插入载体,位于 RNA 聚合酶Ⅲ启动子下游,在 RNA 聚合酶Ⅲ作用下转录产生含发夹状结构的 siRNA,即 shRNA[1]。设计针对靶基因的 siRNA 模版 DNA,将其与质粒连接后转染细胞,DNA 模版在细胞内转录形成的 shRNA 具有与 siRNA 同样的抑制靶基因表达的作用,这种作用可持续数月之久[2],并且可以突破细胞界限,在不同细胞间长距离传递和维持,并可传递给子代。

目前国内外制备 siRNA 的方法有很多种,包括化学合成、体外转录、PCR 合成、构建 shRNA 表达载体等[3]。PCR 合成可以快速筛选到有效的的 siRNA,而且由于 PCR 产物表达框末端并限制性位点,使其更容易被克隆到质粒或病毒载体中,形成 PCR 产物表达框表达载体[4]。本研究通过 PCR 方法成功获得了 livinβ-siRNA,并发挥了抑制 livinβ 基因表达的作用。与其他方法相比,用 PCR 方法获得 siRNA 速度快,适用于快速筛选、研究特定基因,花费比较少,能有效抑制目的基因表达[5]。

本实验所用载体为 pGenesil-11 线性化质粒。该质粒具有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因。与普遍使用的酶类报告基因不同,GFP 具有以下优点:①易于检测,不需加任何底物,只需紫外线或蓝光激发即可发出绿色荧光。②相对分子量小,编码 GFP 的基因序列约 2.6 kb,便于载体构建,不至于由于质粒过大影响转化率。③大量表达对细胞无毒性。④将含有 GFP 与目的基因的质粒转染细胞后,在荧光显微镜下可直接观察转染是否成功及转染效率。⑤可以作为转基因细胞移植后在体内的示踪剂,这将便于我们研究转染基因细胞在体内存活和分化情况。随着人们对 GFP 研究的深入,已经得到了许多 GFP 的突变型,如本实验中采用的载体 - 增强型绿色荧光蛋白(EGFP),其荧光强度是 GFP 的 35 倍,而且在激发 16 ~ 24 h 后仍可稳定表达荧光[6]。

因此,本实验构建的 livinβ-siRNA 表达载体 pGenesil-11-livinβ-siRNA,可允许目的基因与报告基因(EGFP)同时以相同水平表达。直接可以在荧光显微镜下观察表达载体转染是否成功及转染效率,得出本实验转染效率约为 60.7%。并且经酶切、测序鉴定证实本实验成功构建了 livinβ-siRNA 表达载体 pGenesil-11-livinβ-siRNA,并在真核细胞即人胶质瘤细胞 U251 中能正常表达。应用 RT-PCR、Western blot 等实验证实 pGenesil-11-livinβ 转染人胶质瘤细胞 U251 后,可以在转录水平和翻译水平抑制 livinβ 基因和蛋白表达。

[参考文献]

[1] Sui G, Soohoo C, Affar elB, et a1. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mamalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(8): 5515 - 5520.

[2] Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression

(下转第 256 页)

究结果表明病理分型、浸润情况、淋巴结转移程度为影响胃癌根治术患者预后的独立危险因素。

病理分型对患者预后影响较大,赵刚等[11]报道,分化型腺癌、低分化腺癌、印戒细胞癌、黏液腺癌、未分化癌的 5 年生存率分别为 61.6%、43.9%、30.9%、26.8%、0,差异具有统计学意义。本组结果表明,分化型腺癌、低分化腺癌、未分化腺癌的 5 年生存率分别为 40.4%、24.4%、23.5%,原因可能是本组未将印戒细胞癌、黏液腺癌等特殊类型腺癌单独分析。肿瘤的浸润深度也是影响患者预后的重要因素。沈承澜等[12]报道,浸润深度分别为 Tis、T1、T2、T3、T4 的胃癌根治术患者 3 年生存率分别为 100%、96.0%、85.7%、71.3%、33.3%。本组 T1、T2、T3、T4 的 5 年生存率分别为 78.4%、38.2%、19.2%、9.1%。除上述危险因素外,大量研究表明,淋巴结转移情况也是影响患者预后的独立危险因素。潘源等[13]报道,无淋巴结转移、第一站转移、第二站转移、第三站转移患者的 5 年生存率分别为 61.7%、38.4%、24.4%、19.0%。本组研究采用 UICC 的淋巴结转移分级方法,结果与其一致,N0、N1、N2、N3 的 5 年生存率为 55.0%、26.9%、11.8%、0。由于浸润深度、淋巴结转移均为影响患者预后的独立危险因素,因此根据浸润深度、淋巴结转移情况、远处转移情况进行的 TNM 是判断患者预后的重要依据。除上述影响因素外,Ma 等[14]报道肿瘤的 Borrmann 分型是影响患者预后的独立危险因素,本组单因素分析结果与其一致,但 Borrmann 分型未进入 Cox 多因素分析结果,需要进一步的研究证实。Chen 等[15]认为切缘有无肿瘤细胞是判断患者预后的重要依据,Kucukoner 等[16]认为术前的辅助放化疗能够显著提高患者的生存率,但均需要其他研究证实。

综上所述,病理分型、浸润情况、淋巴结转移程度为影响胃癌根治术患者预后的独立危险因素,临床应根据 TNM 分期及病理分型判断患者预后,并给予合适的辅助治疗。

[参考文献]

[1] 陈千益,欧敬民,庄鹏远,等. 进展期胃癌根治术患者预后危险因素分析[J]. 东南大学学报,2011,30(6):909 - 914.

[2] 禹乐宾. 老年胃癌根治术 120 例预后因素分析[J]. 医学临床研究,2011,28(6):1124 - 1126.

[3] Chou HH, Kuo CJ, Hsu JT, et al. Clinicopathologic study of node-negative advanced gastric cancer and analysis of factors predicting its recurrence and prognosis[J]. Am J Surg, 2012, 10(12):434 - 435.

[4] Lu Z, Lu M, Zhang X, et al. Advanced or metastatic gastric cancer in elderly patients: clinicopathological, prognostic factors and treatments [J]. Clin Transl Oncol, 2012, 21(9):219 - 225.

[5] 杨宇红,赵宜良,张 涛,等. 胃癌根治术后心理及饮食干预对患者生活质量和复发等预后因素的影响[J]. 中国肿瘤临床与康复,2007,14(1):82 - 84.

[6] 吕亚军. 胃癌根治术患者预后影响因素临床分析[J]. 白求恩军医学院学报,2012,10(1):40 - 41.

[7] 魏翔宇,王 峰,高 阳,等. 288 例胃癌根治术后患者生存分析[J]. 西南军医,2011,13(4):630 - 632.

[8] Li F, Zhang R, Liang H, et al. The pattern and risk factors of recurrence of proximal gastric cancer after curative resection[J]. J Surg Oncol, 2012, 10(2):232 - 252.

[9] Lee IS, Yook JH, Kim TH, et al. Prognostic factors and recurrence pattern in node-negative advanced gastric cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2012, 10 (12):1275 - 1279.

[10] 王 振,李卫东,朱理玮. 71 例胃癌根治术后复发类型及相关因素分析[J]. 天津医科大学学报,2012,18(1):93 - 95.

[11] 赵 刚,邱江锋,吴志勇,等. 603 例胃癌根治术的预后因素分析[J]. 中国癌症杂志,2007,17(7):556 - 559.

[12] 沈承澜,沈振斌,陈伟东. 影响胃癌根治术患者预后因素的分析[J]. 中国临床医学,2011,18(5):643 - 645.

[13] 潘 源,薛 强,梁 寒. 320 例胃癌根治术后预后因素的回顾性分析[J]. 中国肿瘤临床,2008,35(13):739 - 743.

[14] Ma JP, Chen JH, Cai SR, et al. Clinicopathologic features and prognostic analyses of Borrmann type IV gastric Cancer[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2012, 92(36):2534 - 2537.

[15] Chen JD, Yuan XM, Chen WJ, et al. Prognostic effect of postoperative resection-margin status for intraoperative positive resection margins in patients with advanced gastric cancer[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2012, 50(9):806 - 809.

[16] Kucukoner M, Arpaci E, Isikdogan A, et al. Prognostic analysis of patients with operable gastric cancer and tolerability to adjuvant radiochemo-therapy[J]. Neoplasma, 2013, 60(1):19 - 25.

(编辑:周小林)

(上接第 253 页)

of short interfering RNAs in mamalian cells[J]. Science, 2002, 296 (5567):550 - 553.

[3] Banan M, Puri N. The ins and outs of RNAi in mammalian cells[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2004, 5(5):441 - 450.

[4] 洪 权,吴 镝,陈香美,等. 利用 PCR 方法获得 shRNA 抑制内外源性基因的表达[J]. 解放军医学杂志,2005,30(9):800 - 803.

[5] Castanotto D, Soberer L. Targeting cellular genes with PCR cassettes expressing short interfering RNAs[J]. Methods Enzymol, 2005, 392:173 - 185.

[6] Yang TT, Sinai P, Green G, et al. Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein[J]. J Biol Chem, 1998, 273(14):8212 - 8217.

(编辑:杨 颖)