维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0340－05

KDR 为靶的反义寡核苷酸、siRNA 活性比较

郑素军[1], 林汝仙[1], 夏 云[2], 黄爱龙[2], 钟 森[2], 王升启[1], 任 红[2]

(1.军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, asONs),细胞内源性表达的短发卡状小干扰 RNA(short hairpin small interfering RNA, siRNA)对血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2/KDR: Vascular endothelial growth factor receptor 2/kinase insert domain－containing receptor)表达的抑制作用,探讨阻断 DKR 蛋白表达对 MCF－7 细胞增殖、生长的影响,并对两者作了比较。方法:设计了 3 条反义寡核苷酸,并根据其相应靶 KDR mRNA 杂交位点,构建了 3 条以质粒 pPUR/U6 为载体的可内源性表达短发卡状 siRNA 的 pPUR/U6/KDR－siRNA。分别用 Western－blotting 方法检测了 MCF－7 细胞经反义寡核苷酸处理,pPUR/U6/KDR－siRNA 稳定转染后对 KDR 蛋白表达的抑制作用;用 MTT 法观察了反义寡核苷酸对 MCF－7 细胞增殖的影响,并观察了 pPUR/U6/KDR－siRNA 稳定转染细胞的生长曲线。结果:3 条反义寡核苷酸于 0.8μmol/L 时,均有效抑制了细胞 KDR 蛋白表达,抑制率分别为 66.16%,50.21%,58.35%;3 条反义寡核苷酸对 MCF－7 细胞增殖也显示了剂量依赖性下调作用。相应靶位点 3 条 pPUR/U6/KDR－siRNA 中,有 2 条在细胞稳定转染时显著下调了 KDR 蛋白表达,15 天抑制率分别为 75.21%,80.08%;30 天时为 59.29%,60.15%;细胞稳定转染表达 siRNA 后生长变慢。结论:可根据有效反义寡核苷酸靶位点设计 siRNA,稳定转染内源性表达的短发卡状 siRNA 可长期抑制靶基因表达,并起了更为高效的抑制作用。

【关键词】反义寡核苷酸;siRNA;血管内皮生长因子受体 2

【中国图书分类法分类号】R730.5 【文献标识码】A 【收稿日期】2005－03－16

The comparison of antisense oligonucleotides、small interfering RNA targeting KDR for gene silencing

ZHENG Sujun, et al

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences*)

【Abstract】*Objective*: To investigate and compare the inhibitory effects on KDR gene expressinon of antisense oligonucleotides (asONs), short hairpin small interfering RNA(siRNA) targeting the mRNA of VEGFR2/KDR(vascular endothelial growth factor receptor 2/kinase insert domain－containing receptor)in MCF－7 cells. *Methods*: 3 antisense oligonucleotides were designed. According to the target KDR mRNA accessible sites of antisense oligonucleotides, 3 DNA vector－based pPUR/U6/KDR－siRNA for intracellular transcription KDR specific short hairpin small interfering RNA were constructed. The inhibitory effects on KDR protein expression of antisense oligonucleotides, and pPUR/U6/KDR－siRNA for stable transfection were evaluated using Western－blotting assay. The antisense oligonucleotides inhibitory effects on cell proliferation were determined with MTT assay, while the growth curve of MCF－7 cells stably transfected with pPUR/U6/KDR－siRNA was measured using cell counting. *Results*: 3 antisense oligonucleotides significantly reduced the KDR protein expression, with the inhibitory rates being 66.16%, 50.21% and 58.35% at 0.8μmol/L, respectively. They also decreased the proliferation of MCF－7 cells in a dose dependent manner. Compared to the cells transfected with vacant pPUR/U6 control vector, two of three pPUR/U6/KDR－siRNA plasmids caused effcient down－regulation of KDR protein expression in stable transfected MCF－7 cells. At the 15th day after stable transfection of pPUR/U6/KDR－siRNA, the inhibitory rates were 75.21% and 80.08%, respectively; and at the 30th day the inhibitory rates were 59.29% and 60.15%, respectively. The stable transfection of pPUR/U6/KDR－siRNA also slowed MCF－7 cells growth. *Conclusion*: It is an effective approach to design siRNA according to the antisense oligonucleotides target accessible sites. The endogenous short hairpin siRNA produced by DNA plasmid can more significantly inhibit KDR gene expression than the antisense oligonucleotides for a long time.

【Key words】Antisense oligonucleotides; Small interfering RNA; KDR

作者介绍:郑素军(1973－),男,主治医师,博士,主要研究方向:肿瘤的基因治疗。

基金项目:国家"863"(2001AA234041)和国家自然科学基金项目(30371662)资助。

研究认为,VEGFR2(含激酶插入区受体:kinase insert domain－containing receptor, KDR)在血管内皮和部分肿瘤细胞上特异性表达,对于 VEGF 的信

维普资讯 http://www.cqvip.com

号转导及血管内皮生成起主导作用,在肿瘤发生、发展中起重要的调节作用[1]。实体肿瘤分泌 VEGF,以自分泌或旁分泌的方式作用于 KDR,在两个水平发挥作用:(1)促血管生成作用:VEGF 作用于血管内皮上的 KDR,促使血管内皮细胞分裂增殖,促进新血管的形成,提高血管的通透性。(2)直接刺激肿瘤细胞增殖:部分肿瘤细胞,包括乳腺癌细胞,表达 KDR,存在 VEGF－KDR 自分泌环,VEGF 作用于自身后,促进肿瘤细胞生长[2,3]。

综上所述,抑制 KDR 的表达,从而阻断 VEGF 激活的信号转导,有望在以上两个水平上抑制肿瘤生长。肿瘤的基因治疗是一个方向。反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, asONs),小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)是研究基因功能和用于治疗的有效工具。将具有反向重复序列的 DNA 模板克隆至 RNA 聚合酶Ⅲ(PolⅢ)转录单位中,以质粒 DNA 为载体转染哺乳动物细胞,利用细胞中 RNA 聚合酶持续转录合成 RNA,这种 RNA 内部互补折叠形成短发卡样 RNA(short hairpin RNA, shRNA),在细胞内酶的作用下迅速形成 siRNA,可在更长的时间内抑制靶基因的表达[4]。本研究以乳腺癌细胞系 MCF－7 为研究对象,设计了 KDR 为靶的反义寡核苷酸,并以此位点设计了 pPUR/U6 为载体的、可在哺乳细胞内源表达的短发卡状 siRNA,初步探讨和比较了两者对 KDR 表达的抑制作用及对 MCF－7 细胞增殖、生长的影响。

1 材料与方法

1.1 反义寡核苷酸的设计及合成

在我们的先前研究中,联用计算机模拟 KDRmRNA 二级结构辅助设计和寡核苷酸芯片杂交方法;寡核苷酸库杂交联合寡核苷酸芯片杂交的方法筛选出反义核酸 asON1,asON2,asON3(另文发表)。合成以上 3 条全硫代修饰的寡核苷酸。反义核酸具体序列及靶位置见表 1。

表 1 KDR 反义寡核苷酸、siRNA 序列及靶位

编号	序列(5'－3')	靶位	GC 含量(%)
asON1	GGAAACGCAGCGACCACACA	33－52	60
asON2	CCAAAGGCACCACGGCCAAG	2821－2840	65
asON3	ATTATCTTTAAACCACATGA	2396－2415	25
siRNA1	GTGTGTGGTCGCTGCGTTTCC	32－52	61.9
siRNA2	AAGCTAGGTAAGCCTCTTGGC	2806－2826	52.4
siRNA3	AAAGATAATGAGACCCTTGTA	2407－2427	33.3

1.2 siRNA 靶序列的设定

根据筛选出的反义核酸靶位点及碱基组成特点,结合 T. Tuschl 实验室[5]及 Ambion 公司(http://www.ambion.com/techlib/tp/tb_506.html)提出的小干扰 RNA(siRNA)设计的一些原则,如寻找以 AA 碱基开头的 21 碱基序列为作用的靶位点;不能有连续 4 个 T 碱基(siRNA 真核表达质粒可造成转录的提前终止);GC 含量在 30%－50%为好;以及 siRNA 的反义链(即包括 3'－TT 突出端在内的 21 个碱基)与靶 RNA 完全互补效果好于 3'－TT 突出端不与靶 RNA 互补等[6],我们设计了 siRNA2,siRNA3:正义序列前以 AA 碱基开头,靶位点根据 asON2,asON3 相应位点稍有移位。asON1 相应靶位点并不以 AA 开头,因有研究认为,siRNA 靶序列也可不以 AA 碱基开头[7],为比较其效果,我们针对 asON1 相同靶位点设计了 siRNA1。siRNA 具体情况见表 1,黑体部分为插入载体序列。

1.3 siRNA 表达质粒构建

以 pPUR/U6/KDR－siRNA1 为例说明 siRNA 表达质粒构建过程,其正义序列为 5'－GTGTGGTCG CTGCGTTTCC －3'。按以下序列合成 DNA 链:正向链:GTGTGGTCGCTGCGTTTCCTTCAAGAGAGGAAACGCAGCGACCACACTTTTTTT;反向链:AATTAAAAAAGTGTGGTCGCTGCGTTTCCTCTCTTGAAGGAAACGCAGCGACCACACGGCC。正向链为 RNA 编码链,由正义序列和与之反向互补的反义序列经 9bp 的环(下划线部分)连接而成;斜体部分为转录终止信号。体内转录后可返折形成 9nt 环状连接的发卡样双链 RNA 结构,3'端悬挂 6 个 U 碱基。反向链下划线部分为 Apa Ⅰ及 EcoR Ⅰ的酶切位点。两条 DNA 链在退火缓冲液中等摩尔比混合后 95℃ 5min,缓慢退火至室温形成双链 DNA。

pPUR/U6 质粒(嘌呤霉素抗性)由沈志渊教授(University of New Mexico school of Medicine)惠赠,由小鼠 U6 启动子调控 siRNA 转录。质粒采用 Apa Ⅰ,EcoR Ⅰ酶切后,回收纯化(Wizard DNA Clean－Up System, Promega),得到线性化载体,与退火形成的双链模板 DNA 连接过夜,构建成功 pPUR/U6/KDR－siRNA1。同样构建 pPUR/U6/KDR－siRNA2、pPUR/U6/KDR－siRNA3。DNA 测序以确定插入序列正确。

1.4 细胞培养

人乳腺癌细胞(MCF－7)在含 10%小牛血清的 DMEM

维普资讯 http://www.cqvip.com

培养基(GIBCOBRL)中,置 37℃ 5% CO_2 的孵箱中培养。

1.5 细胞转染

MCF-7 细胞以 1.5×10^5 细胞数/孔铺 35mm 直径的 6 孔板 2 板,分别用来转染反义核酸和 pPUR/U6/KDR-siRNA。约 24h 当细胞丰度达 50%～70%,按 lipofectin 试剂说明书给于反义核酸,药物浓度为 0.8μmol/L;约 48h,另一板细胞丰度约为 90%～95%,采用 Lipofectamine™2000(Invitrogen)转染 2μg siRNA 重组质粒,同时转染 2μg 空白质粒 pPUR/U6 作为对照,继续培养 24h 后,加入嘌呤霉素筛选质粒转染阳性克隆,进一步培养以达到 siRNA、空白质粒 pPUR/U6 稳定转染效果。

1.6 Western-blotting 检测 KDR 表达

MCF-7 细胞经转染反义核酸,54h 后提取蛋白质,改良 Lowry 法定量,59μg 蛋白质上样,用 8% SDS-PAGE 胶电泳进行分离后,转移到 PVDF 膜,分别加 KDR 和 β-actin 的单抗(均为 Sigma 公司产品,浓度分别为 1:1000;1:2000)孵育 1h,用 0.2% PBST 溶液洗膜 4 次,每次 10min。二抗(抗鼠 1gG,1:3000)孵育 1h,再用 0.2% PBST 溶液洗膜 4 次,每次 10min。ECL-plus Western-blot 显像系统显像,暗室 X-ray 胶片曝光。实验重复 3 次,对结果进行计算机定量分析。

分别收集经嘌呤霉素抗性筛选,空白质粒 pPUR/U6,pPUR/U6/KDR-siRNA 稳定转染 15 天,30 天时的细胞;提取蛋白并定量后,每加样孔均以 50μg 蛋白质上样,按以上步骤做 Western-blotting 检测。

1.7 反义核酸 MTT 分析

MCF-7 细胞以 4.0×10^3 细胞数/孔铺 96 孔板,24h 后按 lipofectin 试剂说明书转染细胞,其中反义核酸分别设 0.2μmol/L、0.4μmol/L、0.8μmol/L 浓度梯度,每个浓度设 3 个孔,并设脂质体对照。58h 后每孔加 MTS 20μl(Cell Titer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay, Promega),90min 后在分光光度计上以 490nM 波长测 OD 值。按以下公式计算抑制率。抑制率 = ($OD_{细胞对照}$ − $OD_{样品}$)/($OD_{细胞对照}$ − $OD_{空白}$) ×100%。

1.8 siRNA 稳定转染的细胞生长速度测定

将稳定转染 pPUR/U6/KDR-siRNA2,pPUR/U6/KDR-siRNA3 重组质粒和 pPUR/U6 对照质粒的细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基稀释成 2.0×10^4/ml,接种 24 孔板,每孔 1ml,设 3 个复孔,置 37℃ 5% CO_2 的孵箱中培养。每 24h 消化细胞计数,直至第 6 天,以时间为横坐标,细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线。

2 结 果

2.1 pPUR/U6/KDR-siRNA 重组质粒的筛选及鉴定

挑选在氨苄平板上生长的菌落,提质粒,测序证明插入的 DNA 片段序列正确。

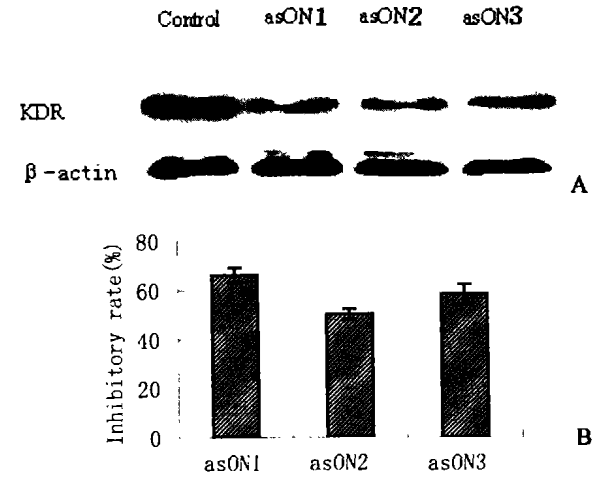


图 1 反义核酸对 KDR 蛋白表达的抑制作用。图 1A:Western-blotting 检测 KDR 蛋白表达:PAGE-SDS 电泳图。图 1B:反义核酸对 KDR 蛋白表达的抑制率($\bar{x}\pm s, n=3$)。

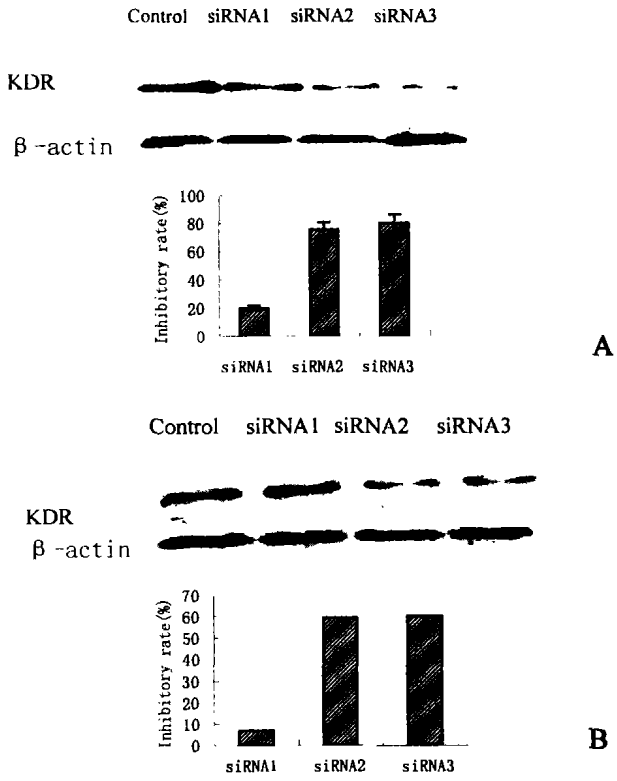


图 2 稳定转染 15 天,30 天时 siRNA 对 KDR 蛋白表达的抑制作用。图 2A:Western-blotting 检测 15 天时 KDR 蛋白表达:PAGE-SDS 电泳图及抑制率($\bar{x}\pm s, n=3$)。图 2:Western-blotting 检测 30 天时 KDR 蛋白表达:PAGE-SDS 电泳图及抑制率($\bar{x}, n=2$)。

2.2 反义核酸对 KDR 蛋白表达的抑制作用

如图 1 所示,与细胞对照相比,asON1,asON2,asON3 均显著抑制了 KDR 蛋白表达,给药

维普资讯 http://www.cqvip.com

浓度 0.8μmol/L 时，与对照组相比，抑制率分别为 66.16%，50.21%，58.35%。内参照 actin 无变化，表明反义核酸作用是特异性的。

2.3 稳定转染 pPUR/U6/KDR－siRNA 对 KDR 表达的抑制作用

从图 2A 可看出，经 15 天的嘌呤霉素筛选并富集细胞，pPUR/U6/KDR－siRNA2、pPUR/U6/KDR－siRNA3 达到了较反义核酸更高的抑制效率，与空白质粒相比，抑制率分别为 75.21%，80.08%。同时也看到，虽然 asON1 抑制效果大于 asON2 及 asON3，但其相应靶位点 pPUR/U6/KDR－siRNA1 抑制率只有 20.02%。

siRNA 长期抑制了 KDR 表达，由图 2B 可看出，稳定转染 pPUR/U6/KDR－siRNA 的细胞，30 天后与 pPUR/U6 质粒对照相比，pPUR/U6/KDR－siRNA2、pPUR/U6/KDR－siRNA3 抑制率仍可达到 59.29%，60.15%；而 pPUR/U6/KDR－siRNA1 则几乎丧失抑制作用，抑制率只有 6.95%。

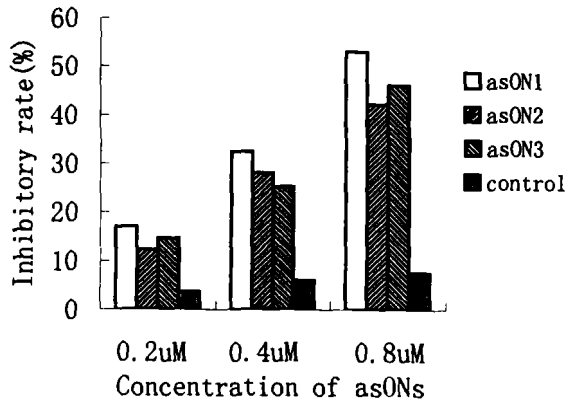


图 3 反义核酸对 MCF－7 细胞增殖的抑制作用

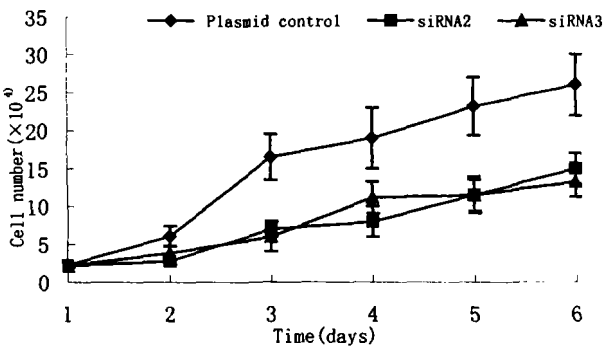


图 4 pPUR/U6/KDR－siRNA 对 MCF－7 细胞生长影响，每个时间点记数均以均数±标准差表示($n=3$)。

2.4 反义核酸对 MCF－7 细胞增殖的抑制作用

经反义核酸处理后，各反义核酸组在倒置显微镜下均可见发生不同程度的死亡，作用 58h，如图 3 显示，4 条反义核酸均以剂量依赖性方式抑制了 MCF－7 细胞增殖，在 0.8μmol/L 时 asON1，asON2，asON3 抑制率分别为 53.07%，42.37%，46.30%，而脂质体对照序列却无明显效果。

2.5 pPUR/U6/KDR－siRNA 对 MCF－7 细胞生长影响

稳定转染 pPUR/U6/KDR－siRNA 质粒的细胞并未发现发生明显的死亡。但与稳定转染空质粒 pPUR/U6 对照细胞相比，pPUR/U6/KDR－siRNA2 或 pPUR/U6/KDR－siRNA3 稳定转染细胞生长速度明显减慢：单因素方差分析(SPSS for Windows 12)显示，从第 3 天开始，两者细胞数分别与稳定转染空质粒对照 pPUR/U6 的细胞相比，均 $P<0.01$(见图 4)。

3 讨 论

部分肿瘤细胞既可分泌 VEGF 促进血管的生成，又可表达 KDR 受体，通过自分泌的作用促进肿瘤细胞自身增殖。研究表明，自分泌机制在乳腺癌发生发展中有重要意义。VEGF 作用于乳腺癌细胞系 T－47D，可激活胞外调节激酶(ERK1，2)和磷脂酰肌醇－3'激酶(PI3K/Akt)[8]。本研究中使用了可表达 KDR 的乳腺腺癌细胞系 MCF－7。用反义技术封闭 KDR 基因表达，一则可抑制肿瘤血管生成，另则可直接抑制肿瘤细胞增殖，有望起到高效抗肿瘤作用。

反义寡核苷酸与靶 mRNA 结合，通过激活 RNase H 或空间位阻作用阻断靶基因的表达；siRNA 则通过与一蛋白复合物结合，即与 RNA 诱导的沉默复合物结合(RNA－induced silencing complex)，该复合物使 siRNA 解双链，并在其反义链与靶 mRNA 结合后裂解 mRNA。故两者的作用机制均属于广义的反义机制。由于 mRNA 二级结构的存在造成的空间位阻影响反义分子结合，靶位点的选择是反义技术设计中的一个难点[9]。我们推测，可与反义寡核苷酸高效结合的 RNA 区域也可与 siRNA 结合，即可利用反义寡核苷酸有效靶位点设计 RNA 干扰。本研究根据 asON1 靶序列，及 asON2，asON3 相应 mRNA 结合热点区域设计了 3 条 siRNA 序列；将序列 DNA 片段定向克隆至 pPUR/U6 质粒 U6 启动子的下游，从而转录为内源性表达的 RNA；当遇见 4～5 个连续的 T 时会终止转录，其正义链(19nt)的

维普资讯 http://www.cqvip.com

3'端与反义链(19nt)的5'端由9bp的环连接,互补折叠形成短发卡样siRNA,3'端悬挂6个U。结果证明:构建成功的3条siRNA中有2条:pPUR/U6/KDR-siRNA2,pPUR/U6/KDR-siRNA3在稳定转染的MCF-7细胞,均实现了对KDR蛋白表达的长期有效抑制,最长至少可达30天。故选择反义寡苷酸有效结合靶位点是设计siRNA的较好办法,有利于提高设计效率,避免siRNA筛选过程中对靶序列选择的盲目性。而根据KDR反义寡苷酸靶位点asON2,asON3设计的pPUR/U6/KDR-siRNA2,pPUR/U6/KDR-siRNA3在15天时,对KDR蛋白的抑制率分别为75.21%,80.08%,明显分别超过了asON2,asON3的50.21%,58.35%,也超过了asON1的66.16%,表明siRNA具有比反义核酸更高的抑制效率[10]。同时因siRNA在细胞内长期转录,可在更长时间内抑制靶基因表达。

但我们也看到,asON1抑制KDR蛋白表达的作用优于asON2、asON3,而根据其序列设计的pPUR/U6/KDR-siRNA1却对KDR蛋白表达无明显抑制作用;原因可能与两者的作用机理存在差别等其他原因有关,如asON可作用于细胞核中的Pre-mRNA,而siRNA只能作用于细胞浆中成熟mRNA;Pre-mRNA与成熟mRNA存在二级结构的差异,也可能导致只有反义寡核苷酸起作用。这种个别出现的反义核酸与相应靶位点siRNA疗效上的不一致,Vickers氏[11]也报道过。当然也可能和siRNA1中过高的GC碱基含量有关,我们在前面siRNA靶序列设定中也提过,siRNA的GC含量应以30%~50%为好。siRNA3靶序列GC含量只有33.3%,而作用效果也最好,似乎也支持这种理论。

有趣的是,阻断KDR蛋白表达后,反义核酸有效抑制了细胞增殖,部分细胞发生了死亡;而稳定转染pPUR/U6/KDR-siRNA的MCF-7细胞未检测到明显的细胞死亡,只是细胞生长速度明显低于对照。有研究表明,VEGF作用于血管内皮细胞KDR维持细胞存活,可通过抗凋亡机制,如上调抗凋亡蛋白Bcl-2和激活激酶Akt/PKB实现[12,13]。另有研究表明VEGF作用于乳腺癌细胞系T-47D,可激活磷脂酰肌醇-3'激酶(PI3K/Akt)[8],综合以上情况,我们猜想反义核酸在短期(54h)内抑制KDR表达后,是否导致了MCF-7细胞因Akt无法有效激活,BCL-2等表达下降,从而可能诱导凋亡发生?事实上有研究表明阻断KDR表达的确可诱导细胞凋亡[14]。而pPUR/U6/KDR-siRNA长期抑制KDR表达后,在此压力下,细胞是否通过激活其他一些通路,如胰岛素样生长因子及其受体等维持了存活?对于以上猜想我们将做进一步探讨。最后也提示肿瘤的发生是个多基因,多步骤的复杂过程,封闭单一基因表达,很难完全抑制肿瘤生长。用反义药物封闭多个致癌基因表达,或与放疗,或化疗等其他疗法联用,可能是更好的发展方向。

(郑素军:重庆医科大学病毒性肝炎所在读博士生。通讯作者:王升启研究员)

参 考 文 献

[1] Shinkaruk S, Bayle M, Lain G, et al. Vascular endothelial cell growth factor (VEGF), an emerging target for cancer chemotherapy[J]. Curr Med Chem Anti-Canc Agents, 2003;3(2):95-117.

[2] Masood R, Cai J, Zheng T, et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors[J]. Blood, 2001;98(6):1904-1913.

[3] de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, et al. Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. Ⅱ: Correlations with proliferation and angiogenesis[J]. J Pathol, 1998;184(1):53-57.

[4] Sui G, Soohoo C, Affar el B, et al. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002;99(8):5515-5520.

[5] Elbashir SM, Martinez J, Pataniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate[J]. EMBO J, 2001;20(23):6877-6888.

[6] Boutla A, Delidakis C, Livadaras I, et al. Variations of the 3' protruding ends in synthetic short interfering RNA (siRNA) tested by microinjection in Drosophila embryos[J]. Oligonucleotides, 2003;13(5):295-301.

[7] Lee NS, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-rev transcripts in human cells[J]. Nat Biotechnol, 2002;20(5):500-505.

[8] Price DJ, Miralem T, Jiang S, et al. Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells[J]. Cell Growth Differ, 2001;12(3):129-135.

(下转第382页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

增强了 maspin 基因表达,为深入研究 maspin 基因对抑制肝癌生长、浸润、转移作用及机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Zou. Z, A. Anisowicz, M. J. Hendrix, et al. Maspin, a serpin with tumor - suppressing activity in human mammary pithelial cells[J]. Science, 1994;263(5146):526 - 529.

[2] Duan. H, H. J. Zhang, J. Q. Yang, et al. MnSOD up - regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2003; 5 (5):677 - 688.

[3] Reddy. K. B, R. McGowen, L. Schuger, et al. Maspin expression inversely correlates with breast tumor progression in MMTV/TGF - alpha trangenic mouse model[J]. Oncogene, 2001;20(45):6538 - 6543.

[4] Feldman. R. J, V. I. Sementchenko, M. Gayed, et al. Pdef expression in human breast cancer is correlated with in invasive potential and altered gene expression[J]. Cancer Res, 2003; 63 (8):4626 - 4631.

[5] Riewald. M, R. R. Scheef. Molecular cloning of bomapin (protease inhibitor 10), a novel human serpin that is expressed specially in the bone marrow[J]. J Biol Chem, 1995;270(45): 26754 - 26757.

[6] Biliran. H. J, S. Sheng. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase - type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin[J]. Cancer Res, 2001;61(24):8676 - 8682.

[7] Sager. R, S. Sheng, A. Anisowicz, et al. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994;59:537 - 546.

[8] Abraham. S, W. Zhang, N. Greenberg, et al. Maspin functions as tumor suppressor by increasing cell adhesion to extracellular matrix in prostate tumor cells[J]. J Urol, 2003;169(3): 1157 - 1161.

[9] Odero - Marah. V. A., Z. Khalhali - Ellis, J. Chunthapong, et al. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells [J]. Cancer Biol Ther, 2003;2(4):398 - 403.

(上接第 344 页)

[9] Bohula EA, Salisbury AJ, Sohail M, et al. The efficacy of small interfering RNAs targeted to the type 1 insulin - like growth factor receptor(IGF1R)is influenced by secondary structure in the IGF1R transcript[J]. J Biol Chem, 2003;278(18): 15991 - 15997.

[10] Miyagishi M, Hayashi M, Taira K. Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells[J]. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2003;13(1):1 - 7.

[11] Vickers TA, Koo S, Bennett CF, et al. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H - dependent antisense agents. A comparative analysis[J]. J Biol Chem, 2003;278(9):7108 - 7118.

[12] Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3' - kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk - 1/KDR activation[J]. J Biol Chem, 1998;273(46):30336 - 30343.

[13] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl - 2 and A1 in vascular endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1998;273(21):13313 - 13316.

[14] 任 娟,董 蕾,徐仓宝,等. KDR 反义寡核苷酸对人胃癌细胞的作用[J]. 第四军医大学学报, 2002;23(4):333 - 336.