

论著 · 实验研究

PTEN 基因敲减及 RESC 救援后人 T 淋巴
细胞增殖和信号通路的变化

王玉梅 盛光耀

(郑州大学第一附属医院儿科,河南 郑州 450007)

[摘 要] 目的 构建人 *PTEN* 基因 RNA 干扰(RNAi)及其逃避 RNAi 策略结构(RESC)救援的慢病毒载体。观察 *PTEN* 基因敲减前后及 RESC 救援后人 T 淋巴细胞信号通路、细胞增殖和细胞周期的变化,为进一步研究淋巴细胞性白血病的发病机制提供依据。方法 利用慢病毒载体系统,构建人 *PTEN* 基因 RNAi 及其 RESC 救援的慢病毒载体,转染 T 淋巴细胞,建立 *PTEN* 基因敲减及 RESC 救援的细胞模型 T-LC-sh*PTEN* 和 T-LC-rrsh*PTEN*;分别应用 Western blot 法、MTT 法和流式细胞术检测 *PTEN* 基因敲减前后及 RESC 救援后 *PTEN* 蛋白的表达和 AKT 通路的活化情况、细胞增殖及细胞周期的变化。结果 慢病毒介导的 RNAi 能有效下调 *PTEN* 基因的表达。*PTEN* 基因表达下调后,T 淋巴细胞生长受到促进,G0/G1 期细胞减少,S 期细胞和 G2/M 期细胞增多,PI3K/AKT 通路激活。而 RESC 救援则能够完全恢复 *PTEN* 基因 RNAi 所造成的现象。结论 成功构建了人 *PTEN* 基因 RNAi 及其 RESC 救援的慢病毒载体。*PTEN* 基因敲减后,通过激活 PI3K/AKT 通路促进 T 淋巴细胞生长。

[中国当代儿科杂志,2010,12(12):979-983]

[关键词] 慢病毒载体;*PTEN* 基因;逃避 RNA 干扰策略结构救援;T 淋巴细胞
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)12-0979-05

Cell proliferation and signal pathway after knockdown and RESC concurrent rescue of RNAi lentiviral vector on human *PTEN* gene in T-lymphocytes

WANG Yu-Mei, SHENG Guang-Yao. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China (Sheng G-Y, Email: shenggy666@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To construct the lentiviral expression vectors of human *PTEN* gene for RNA interference (RNAi) and concurrent rescue of RNAi escape strategy construct (RESC) and to observe the changes of signal pathway, cell proliferation and cell cycle after *PTEN* gene knockdown and RESC concurrent rescue in human T-lymphocytes, in order to provide an experimental basis for a further research into the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia in children. **Methods** Using lentiviral vector systems to construct lentiviral vectors of human *PTEN* gene for RNAi and its RESC concurrent rescue, human T-lymphocytes were transfected with the lentiviruses. The cell models were established with *PTEN* gene knockdown (T-LC-sh*PTEN*) and RESC concurrent rescue (T-LC-rrsh*PTEN*). After knockdown and RESC concurrent rescue of *PTEN* gene, the expression of *PTEN* protein and the activation of AKT signal pathway, cell proliferation and cell cycle were detected by Western blot, MTT assay and flow cytometry respectively. **Results** The RNAi-mediated lentiviruses can down-regulate the expression of the human *PTEN* gene effectively. After the down-regulation of *PTEN* gene, the T-lymphocytes grew faster. The phase G0/G1 cells decreased and the phases S and G2/M cells increased significantly. The PI3K/AKT signal pathway was activated. All RNAi phenomenon caused by *PTEN* gene knockdown were recovered fully by RESC concurrent rescue of RNAi. **Conclusions** The lentiviral expression vectors of human *PTEN* gene for RNAi and RESC concurrent rescue of RNAi are constructed successfully. The PI3K/AKT signal pathway can be activated and the proliferation of human T-lymphocytes can be promoted after *PTEN* gene knockdown.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(12):979-983]

Key words: Lentiviral vector; *PTEN* gene; RNA interference escape strategy construct rescue; T-lymphocyte

儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)是儿童最常见的恶性血液系统疾病^[1]。与张力蛋白同源的 10 号染色体缺失的磷酸酶基因^[2](*PTEN*)及其蛋白的异常参与了人类白

[收稿日期]2010-02-23;[修回日期]2010-04-14
[作者简介]王玉梅,女,博士研究生。
[通信作者]盛光耀,教授

血病的发生、发展^[3-4]。但其在儿童 ALL 中的作用尚不完全明确。为进一步探讨 *PTEN* 与其他相关因素的关系在儿童 ALL 发病机制中的作用,本研究拟对人正常 T 淋巴细胞 (T-lymphocytes, T-LC) 的 *PTEN* 基因进行敲减,同时引入“逃避 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 策略结构 (RESC) 救援”机制,以检测 *PTEN* 基因的生物学特性,及其下游信号分子在 ALL 发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 慢病毒载体系统 pFLRu-GFP 载体在 pBluescript (购自 Invitrogen 公司)基础上,加入绿色荧光蛋白 (GFP), Flag-His 6 标签,血细胞凝集素和嘌呤霉素内部核糖体进入位点等构建而成。pCMV-dR8.2ΔR, pCMV-VSV-G 均购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 细胞株和菌株 慢病毒的包装细胞 293T 细胞株购自 Invitrogen 公司,由本室传代培养。T-LC 由本室制备并传代培养。大肠杆菌 XL10 感受态细胞由本室制备。

1.1.3 引物和限制性内切酶 *PTEN* 基因的慢病毒干扰片段、所用引物,采用 Invitrogen 网站上的免费软件设计并由美国 IDT 公司合成。限制性内切酶 Xba I、Xho I、Bam HI 和 Eco R I, T₄DNA 连接酶,胰蛋白酶均购自 Invitrogen 公司。

1.1.4 试剂 普通质粒抽提试剂盒、PCR 扩增试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和高纯度无内毒素质粒抽提试剂盒、Opti-MEM 培养基、TRANSIT 和 鱼精蛋白购自 Sigma 公司。RPMI 1640 培养基、高糖 DMEM 培养基、MEM Alpha 培养基和胎牛血清

(FBS)购自 Gibco 公司。兔抗人 *PTEN* 单抗、兔抗人 pAKT 单抗、兔抗人 AKT 单抗、兔抗人 β-actin 单抗和山羊抗兔的二抗购于 Cell Signaling 公司。淋巴细胞分层液 Ficoll 购自 Lonza Walkersville 公司。LS + /VS + 阳选分离柱、CD2 MicroBead Kit 和 Midi MACS 磁珠分选仪均为德国 Miltenyi Biotec 公司产品; Epics XL 型流式细胞仪 (FACS) 为美国 Coulter 产品。ECL 发光液购于 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 *PTEN* 基因 RNAi 慢病毒载体制备 根据 Elhashir 等^[5]设计原则,针对已筛选确定的 *PTEN* 基因 RNAi 有效靶序列,设计并合成一对能表达 *PTEN* 基因 (GenBank 登录号 NM_000314.4) 的发夹式 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的单链寡核苷酸 OligoDNA 靶序列 (表 1),中间添加 loop 结构 (TTCAAGAGA)。退火形成双链 DNA,插入到经 Xba I 和 Xho I 37℃ 酶切后的 pFLRu-GFP 载体,构建成为 *PTEN* 基因 RNAi 慢病毒载体 pFLRu-U6-shPTEN,转化,挑选阳性克隆 PCR 测序鉴定。

1.2.2 *PTEN* 基因 RNAi 的 RESC 救援慢病毒载体的制备 参照文献^[6]。针对 *PTEN* 基因靶序列对应的 shRNA 位置引入 3~4 个同义点突变,在核苷酸水平上改变基因,使该基因所表达的 *PTEN* 天然蛋白编码不变,同时使 shRNA 不能作用于这种“外源设计的 mRNA”。把这段“外源设计的 mRNA”与报告基因 GFP 融合后,亚克隆到所构建的 pFLRu-U6-shPTEN 质粒的 EcoRI/BamHI 酶切位点处,即可得到这个基因的既有 shRNA 的表达、同时又有其救援 cDNA 表达的 RESC 救援慢病毒载体 pFLRu-U6-rrshPTEN,转化,挑选阳性克隆 PCR 测序鉴定。

表 1 合成的 *PTEN* 特异性干扰序列及其 Rescue 的寡核苷酸引物片段

oligonucleotides	Polarity	Sequence (5'-3')	Position
shRNA	Cf1 sense	GAGGAAAGGACGAAACACCGCCAGCTAAAGGTGAAGTTATA TTCAAGAGATATATC	1 684 ~ 1 705
	Cf2 antisense	TCCAGCTCGAGAAAAAGCCAGCTAAAGGTGAAGATATAT TCTCTTGAATATATC	
	CF1 sense	ATGCGAATCCATGACAGCCATCATC	1 031 ~ 1 046
	CR1 antisense	ATATCTT GAC TTT CAG TT GGCAGACC	1 677 ~ 1 703
rrshRNA	CF2 sense	TCTGCCA ACT GAA AGT CA AGATATAT	1 679 ~ 1 705
	CR2 antisense	AGCTGGATCCACTTTTGTAATTTGTGTATGCTG	2 217 ~ 2 239

在 Cf1、Cf2 中,黑体字的核苷酸序列是 *PTEN* 基因 RNA 干扰的目标序列,斜体字是 Loop 环序列。rrshRNA 引物 CR1 和 CF2 包含 4 个同义突变(黑体并下划线)的 *PTEN* 基因抗 siRNA 表达。为方便亚克隆,EcoRI、BamHI 和 XhoI 酶切位点分别被引入到引物 CF1、CR2 和 R1 反义连中。核苷酸位置编号根据人 *PTEN* 基因序列而定,GenBank 登录号 NM_000314.4。

1.2.3 T-LC 培养及纯化 健康人外周血由健康志愿者提供(所有志愿者均签署知情同意书)。根

据 Astier 等^[7]及李付广等^[8]的实验方法,先制备外周血单个核细胞 (PMNC),再用免疫磁珠法纯化出

T-LC。使用含10% FBS的RPMI 1640培养基培养。

1.2.4 慢病毒的包装 用胰蛋白酶消化对数生长期的人胚肾来源的293T细胞,当细胞密度为 $15 \times 10^6/L$ 时,重新接种于10 cm细胞培养皿,37℃、5% CO₂培养箱内培养,细胞汇合度达70%左右时进行转染。用Opti-MEM培养基,在TRANSIT介导下,使用慢病毒包装质粒pCMV-dR8.2ΔR和pCMV-VSV-G的8:1混合物分别与慢病毒质粒pFLRu-U6-shPTEN,pFLRu-U6-rrshPTEN共转染293T细胞;转染24 h后使用含10% FBS的RPMI 1640培养基对细胞进行换液处理;转染48 h后,收集细胞上清液,1 200 rpm离心5 min,然后使用0.45 μm的过滤器过滤上清液。在NIH3T3细胞中测定病毒滴度。剩余病毒-80℃保存备用或直接用于后期试验。

1.2.5 逐孔梯度稀释法测定病毒滴度 取待定的慢病毒贮液10 μL,10倍梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-6}$)。DMEM培养液重悬NIH3T3细胞至 $4 \times 10^6/L$,在96孔板每孔中加100 μL重悬细胞、45 μL病毒颗粒稀释液,感染细胞,37℃温育8 h后,更换含10% FBS的DMEM培养液继续培养。倒置荧光显微镜下检测GFP表达量,病毒滴度为表达GFP的细胞数乘以相应稀释倍数。用pfu/mL(感染单位/mL)表示。

1.2.6 Western blot检测PTEN和pAKT蛋白的表达 用pFLRu-GFP、pFLRu-U6-shPTEN和pFLRu-U6-rrshPTEN感染T-LC,建立T-LC的阴性对照(T-LC-GFP)、PTEN基因敲减模型(T-LC-shPTEN)和RESC救援(T-LC-rrshPTEN)等细胞模型。应用Western blot法检测PTEN、pAKT蛋白的表达。收获T-LC、T-LC-GFP、T-LCshPTEN和T-LC-rrshPTEN等4组细胞,PBS洗2遍,裂解细胞获取总蛋白,取各组等量蛋白于聚丙烯酰胺凝胶中电泳,用PVDF膜

转膜、封膜、再加入PTEN、pAKT、AKT和β-actin抗体孵育、二抗孵育、化学发光、摄片。应用美国NIH(National Institutes of Health)开发的公共图像处理软件ImageJ对Western blot结果进行量化分析。

1.2.7 MTT法检测PTEN敲减及RESC救援对T淋巴细胞生长的影响 取上述4组的对数期细胞,细胞浓度为 $1 \times 10^6/mL$,接种于96孔板中,每孔200 μL,每组设立3个复孔,在培养1 d、2 d、3 d、4 d、5 d时,分别取出一板,每孔加入5 mg/mL的MTT溶液20 μL,继续培养4 h后,弃孔内上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)100 μL溶解细胞,低速振荡10 min,充分溶解结晶物。酶标仪上测定各孔OD 570 nm值。

1.2.8 流式细胞术检测PTEN敲减及RESC救援对细胞周期的影响 上述4组细胞用PBS洗2遍,调整到 $5 \times 10^5/50 \mu L$,10 mg/mL RNase A 20 μL,37℃作用30 min,加入1 mg/mL 碘化丙锭(Propidium Iodide,PI) 5 μL,流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学分析 应用SPSS 13.0统计软件进行数据统计分析,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析及q检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN基因RNAi慢病毒载体及其RESC救援慢病毒载体的鉴定 经PCR鉴定及测序结果证实,PTEN基因的RNAi慢病毒载体及其RESC救援慢病毒载体构建成功,1个RNAi序列及其RESC救援的“外源性”cDNA分别完整插入慢病毒载体中(图1)。

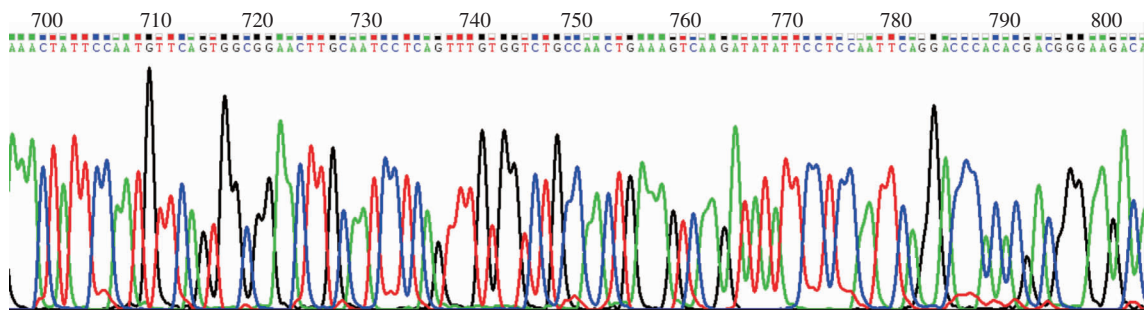


图1 PTEN基因RNAi的RESC救援慢病毒载体的部分测序结果

2.2 慢病毒载体的包装及滴度测定 病毒感染293T细胞72 h后,可见胞浆胞核不同程度的绿色荧光蛋白(GFP)表达,细胞成功产毒。

荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少,测得pFLRu-U6-shPTEN,pFLRu-U6-rrshPTEN两种慢病毒的病毒滴度,分别为 6.0×10^5 pfu/mL、 5.0×10^5 pfu/mL。说

明有大量质粒转入 293T 细胞,病毒成功包装。

2.3 RNAi 慢病毒对 PTEN 基因的敲减及救援作用

用病毒感染 T-LC 5 d 后,收获细胞,提取总蛋白,Western blot 方法显示:感染阴性对照病毒 pFL-Ru-GFP 后,PTEN 基因的表达与 T-LC 相比没有明显变化($P>0.05$),感染针对 PTEN 基因的 RNAi 慢病毒 pFLRu-U6-shPTEN 后,PTEN 基因表达较 T-LC-GFP 组减弱($P<0.01$),而感染其 RESC 救援慢病毒 pFLRu-U6-rrshPTEN 后,PTEN-GFP 又出现了表达,与 T-LC-GFP 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。证明成功构建了 T-LC 细胞的阴性对照、PTEN 基因敲减模型及 RESC 救援细胞模型 T-LC-GFP、T-LC-shPTEN 和 T-LC-rrshPTEN(图 2)。

2.4 Western blot 检测 pAKT 蛋白的表达

与 T-LC 和 T-LC-GFP 细胞比较,T-LC-shPTEN 细胞 pAKT 的表达明显增多($P<0.01$),而 T-LC-rrshPTEN 细胞的 pAKT 则与前两者相似,表明 PTEN 敲减后激活了 T-LC 中的 PI3K/AKT 信号通路,而 RESC 救援则又使 PTEN 基因敲减所引起的 pAKT 表达恢复到敲减之前的状态(图 3)。

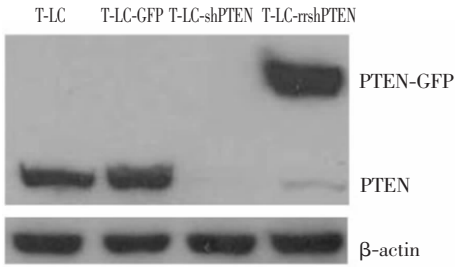


图 2 Western blot 检测 T-LC PTEN 基因敲减前后及 RESC 救援后 PTEN 蛋白表达结果

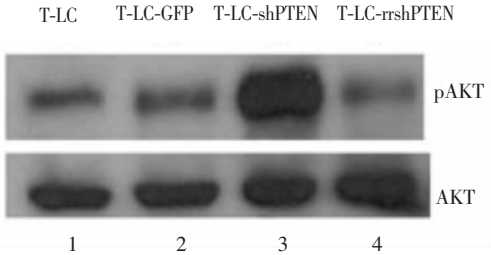


图 3 Western blot 检测 T-LC PTEN 基因敲减前后及 RESC 救援后 pAKT 蛋白的变化

2.5 细胞生长曲线

MIT 法显示 T-LC-shPTEN 细胞生长增快,与 T-LC 和阴性对照细胞 T-LC-GFP 相比,于第 2 天开始即有明显差异($P<0.05$)(图 4)。而 T-LC-rrshPTEN 细胞生长速度与 T-LC 和 T-LC-GFP 相似($P>0.05$),提示 RESC 救援能恢复 PTEN 基因抑制细胞生长的功能。

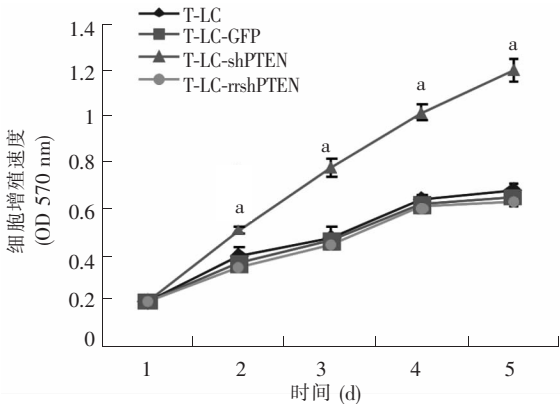


图 4 PTEN 敲减及 RESC 救援前后细胞生长曲线
a: 与同时时间点 T-LC 组、T-LC-GFP 组和 T-LC-rrshPTEN 组比较, $P<0.05$

2.6 细胞周期的变化

用 PI 染色后,流式细胞仪检测细胞周期,结果显示:PTEN 基因敲减后(T-LC-shPTEN 组)G0/G1 期细胞明显减少,S 期细胞明显增加,G2/M 期细胞增加。与其他 3 组相比,差别均有统计学意义($P<0.01$)。RESC 救援后(T-LC-rrshPTEN 组),G0/G1 期细胞、S 期细胞和 G2/M 期细胞又分别恢复。与 T-LC 和 T-LC-GFP 组比,差别无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 PTEN 基因敲减前后及 RESC 救援后细胞周期的变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G0/G1	S	G2/M
T-LC	58.80 ± 0.85	22.13 ± 1.45	19.07 ± 0.60
T-LC-GFP	57.57 ± 0.87	22.70 ± 1.11	19.73 ± 0.68
T-LC-shPTEN	22.70 ± 1.35 ^{a,b}	54.57 ± 1.10 ^{a,b}	22.73 ± 0.71 ^{a,b}
T-LC-rrshPTEN	55.83 ± 0.87 ^c	24.60 ± 0.50 ^c	19.57 ± 1.12 ^c
F 值	892.633	620.310	12.800
P 值	0.001	0.001	0.002

a: 与 T-LC 组比较, $P<0.05$; b: 与 T-LC-GFP 组比较, $P<0.05$;
c: 与 T-LC-shPTEN 组比较, $P<0.01$

3 讨论

PTEN 基因是具有双重特异性磷酸酶活性的抑癌基因,它作用于 AKT 信号传导通路的中心环节,通过脂质磷酸酶活性抑制 PI3K 的磷酸化,阻断 AKT/蛋白激酶 B(PKB)途径,在胞浆细胞信号传递诱导凋亡、介导 G1 期停滞、影响基因的表达、抑制细胞迁移、浸润和整合素介导的细胞铺展及局部粘附等过程中起着重要作用^[9-10]。它通过抑制 MAPK 细胞信号传导途径抑制细胞生长分化。PTEN 与肿瘤的发生发展有关。因此,PTEN 在正常表达时可

抑制肿瘤细胞生长、迁移及浸润。*PTEN* 基因的缺失和失活可导致 *PTEN* 编码蛋白表达缺失,从而导致多种恶性肿瘤的发生^[11]。*PTEN* 基因及蛋白的异常也参与了人类白血病的发生、发展^[2-4]。

RNAi 由于能够高效率、特异性地下调靶基因表达,已被证明是一个在内源性基因功能研究领域的有效工具^[12-14]。慢病毒载体是一种复制缺陷型逆转录病毒载体,以人类免疫缺陷病毒 1(HIV-1)为基础发展而得^[15],能够转染非分裂期细胞和分裂期细胞,还能将病毒的遗传物质整合到宿主细胞的基因组,感染后细胞可以稳定持续表达目的基因^[16]。本实验用慢病毒载体系统,获得了完整病毒颗粒。所用慢病毒介导的 RNAi 对 *PTEN* 基因表达的敲减效率很高。

然而,随着 RNAi 技术的应用,越来越多的证据表明“脱靶效应”在 RNAi 中广泛存在^[17-18],它使实验出现假阳性结果,直接影响了实验结果的准确性。为了避免“脱靶”对实验结果的干扰,本研究在这项研究中,引入了 RESC 救援机制。在 shRNA 所对应的位置引入 4 个点同义突变,而表达的 *PTEN* 天然蛋白编码不变,同时也实现了逃避 RNAi,仅在核苷酸水平上改变基因。把这种 RESC 救援慢病毒载体引入 RNAi 实验中,如果能恢复由 RNAi 引起的变化,则可以排除因 shRNA 的脱靶效应所引起的假阳性结果。本研究结果显示,RESC 救援慢病毒载体能够恢复由 sh*PTEN* 多引起的各种变化,即本研究设计的 shRNA 只作用于 *PTEN* 基因,试验所得结果均由 *PTEN* 基因的变化引起,没有脱靶效应的发生。

本研究成功构建了 *PTEN* 基因 RNAi 慢病毒载体及其 RESC 救援慢病毒载体, RNAi 慢病毒载体能够高效地敲减 *PTEN* 基因的表达, RESC 救援慢病毒载体则能够恢复 *PTEN* 基因敲减所引起的全部表现。*PTEN* 基因敲减后,激活了 PI3K/AKT 通路,促进了 T-LC 的增殖;同时解除了对细胞周期 G1 期的阻滞, G0/G1 期细胞明显减少, S 期细胞比例明显增大,说明 *PTEN* 基因的缺失,改变了人 T-LC 的生物学特性^[3,9], 但是否直接参与了 ALL 的发生有待于进一步研究。如果 *PTEN* 基因直接参与了 ALL 的发生, RESC 救援对 RNAi 的修复作用使得 *PTEN* 作为靶基因治疗儿童 ALL 及其他恶性肿瘤成为可能。显示了良好的临床应用前景。

[参 考 文 献]

[1] 王颖超,殷楚云,徐学聚,赵晓明,方营旗,盛光耀. 儿童急性淋巴细胞白血病 128 例免疫分型[J]. 郑州大学学报(医学版), 2009, 44(6):1238-1240.

[2] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308):1943-1947.

[3] Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, Kum JB, Caron S, Sill H, et al. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies[J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(2):185-193.

[4] Aggerholm A, Grønbaek K, Guldberg P, Hokland P. Mutational analysis of the tumour suppressor gene MMAC1/PTEN in malignant myeloid disorders[J]. Eur J Haematol, 2000, 65(2):109-113.

[5] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature, 2001, 411(6836):494-498.

[6] 王玉梅,盛光耀. 人 PTEN 基因 RNA 干扰及其 RESC 救援慢病毒载体的构建与鉴定[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010, 43(5):443-447.

[7] Astier A, Trescol-Biémont MC, Azocar O, Lamouille B, Rabourdin-Combe C. Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation[J]. Immunol, 2000, 164(12):6091-6095.

[8] 李付广,李沛,靳静,董子明. 外周血 T 淋巴细胞的培养、纯化及鉴定[J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(4):605-607.

[9] Chu EC, Tarnawski AS. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology[J]. Med Sci Monit, 2004, 10(10):235-241.

[10] 李德渊,屈艺. 肿瘤抑制基因 PTEN 在脑发育和分化中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(2):159-161.

[11] Bussaglia E, del Río E, Matias Guiu X, Prat J. PTEN mutations in endometrial carcinomas: a molecular and clinicopathologic analysis of 38 cases[J]. Hum Pathol, 2000, 31(3):312-317.

[12] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 1998, 391(6669):806-811.

[13] 何柳芳,陈克正. HIF-1 α 特异性 RNA 干扰表达载体的构建及体外效应研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(1):60-64.

[14] Echeverri CJ, Perrimon N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide[J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(5):373-384.

[15] Romano G. Current development of lentiviral-mediated gene transfer[J]. Drug News Perspect, 2005, 18(2):128-134.

[16] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, Anderson DS, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells[J]. RNA, 2003, 9(4):493-501.

[17] Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilesley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, et al. 3'UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets[J]. Nat Methods, 2006, 3(3):199-204.

[18] Martin SE, Caplen NJ. Mismatched siRNAs downregulate mRNAs as a function of target site location[J]. FEBS Lett, 2006, 580(15):3694-3698.

(本文编辑:王庆红)