

[文章编号] 1000-4718(2008)03-0504-05

# RUNX3 小干扰 RNA 对 SH-SY5Y 细胞生长和药物敏感性的作用

张宏卫<sup>1</sup>, 刘丽华<sup>2</sup>, 王承忠<sup>3</sup>

(绍兴文理学院医学院附属医院 <sup>1</sup>神经科, <sup>2</sup>分子诊断实验室, 浙江 绍兴 312000;

<sup>3</sup>中国科学院神经科学研究所, 上海 200031)

[摘要] 目的: 探讨 RUNX3 基因对人神经母细胞瘤细胞生长和药物敏感性的调节作用。方法: 构建 RUNX3 基因的小干扰 RNA 载体并将其转入 SH-SY5Y 细胞, G418 筛选后获得稳定转染的阳性克隆后, 应用 RT-PCR 和 Western blotting 进行鉴定; MTT 法和流式细胞仪检测细胞转染前后生长速度和细胞周期的变化; MTT 法和流式细胞仪检测细胞转染前后对阿霉素敏感性的变化; Western blotting 检测细胞转染前后细胞周期相关蛋白 cyclin D1、CDK4、CDK6、p21、p27 和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 以及耐药相关蛋白 P-gp、MRP 的表达变化。结果: 成功构建了 RUNX3 的小干扰 RNA 载体并将其转染 SH-SY5Y 细胞; 筛选到稳定的 RUNX3 低表达的神经母细胞瘤细胞模型; MTT 和流式细胞仪检测结果显示, 转染 RUNX3 小干扰 RNA 后的细胞的生长速度显著快于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且 G<sub>1</sub> 期的细胞比率显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ); MTT 法和流式细胞仪结果显示, 转染 RUNX3 小干扰 RNA 后的细胞对化疗药物的敏感性降低, 细胞内的阿霉素蓄积量显著减少 ( $P < 0.05$ ); Western blotting 显示, 转染 RUNX3 小干扰 RNA 后的细胞中 Bcl-2、P-gp 和 cyclin D1 的表达明显增高, p21 的表达明显降低。结论: 下调 RUNX3 基因能促进神经母细胞瘤细胞生长, 降低细胞对化疗药物的敏感性, 提示 RUNX3 在神经母细胞瘤的发生和发展中可能扮演重要角色。

[关键词] 神经母细胞瘤; RUNX3; RNA 干扰; SH-SY5Y 细胞

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Effects of RUNX3 siRNA on the growth and drug sensitivity of SH-SY5Y cells

ZHANG Hong-wei<sup>1</sup>, LIU Li-hua<sup>2</sup>, WANG Cheng-zhong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Department of Neurology, <sup>2</sup>Laboratory of Molecular Diagnosis, The Affiliated Hospital, Shaoxing Medical College of Wenzhou University, Shaoxing 312000, China; <sup>3</sup>Department of Neurology, Institution of Science, Shanghai 200031, China. E-mail: zhw0606@sina.com)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the effects of RUNX3 gene on the growth and drug sensitivity of SH-SY5Y cells. METHODS: The siRNA plasmid of RUNX3 was constructed and transfected into SH-SY5Y cells. Stable transfectants were identified by RT-PCR and Western blotting. The growth curve, cell cycle distribution, drug sensitivity assay and accumulation of adriamycin in cells were detected by MTT assay and flow cytometry. The expressions of cyclin D1, CDK4, CDK6, p21, p27, Bcl-2, Bax, P-gp and MRP were analyzed by Western blotting. RESULTS: mU6pro-RUNX3 siRNA was successfully constructed and transfected into SH-SY5Y cells. Down-regulation of RUNX3 significantly promoted the cellular proliferation, inhibit the drug sensitivity and intracellular adriamycin accumulation of cells, compared with that in the controls ( $P < 0.05$ ). The expressions of P-gp, Bcl-2 and cyclin D1 in transfected cells were increased, while p21 decreased. CONCLUSION: RUNX3 might play important roles in the development of neuroblastoma.

[KEY WORDS] Neuroblastoma; RUNX3; RNA interference; SH-SY5Y cells

RUNX3 基因最早由 Levanon 等克隆成功, 是 RUNX 家族中基因最短的分子, 也是最保守的, 不同物种之间 RUNX3 基因序列同源性很高, 因此被认为

是 RUNX3 家族进化中的初始分子<sup>[1]</sup>。RUNX3 基因位于染色体 1p36.1, 该座位在许多类型的肿瘤中存在缺失, 如: 胃癌、结肠癌、肝癌、胆管癌、胰腺癌、恶

[收稿日期] 2006-08-08

[修回日期] 2006-11-08

E-mail: zhw0606@sina.com

性黑色素瘤、神经母细胞瘤等,进一步的研究证明,*RUNX3*可能是1种作用广泛的抑癌基因,参与多种肿瘤的发生<sup>[2,3]</sup>。最新研究揭示,*RUNX3*基因敲除小鼠的胃粘膜上皮细胞在裸鼠体内可以形成肿瘤,提示*RUNX3*可能与肿瘤的发生发展密切相关<sup>[4]</sup>。本实验构建*RUNX3*的小干扰RNA载体并将其转入神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y,筛选出*RUNX3*低表达的稳定的神经母细胞瘤细胞模型后,对细胞的生长和药物敏感性进行对比分析,为深入探讨*RUNX3*与神经母细胞瘤发生发展的关系,探讨新的基因治疗方法奠定理论基础。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料与试剂

神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y引自美国典型培养物保存中心(ATCC);mU6pro载体为美国Michigan大学医学院Tumer教授赠送;T4 DNA连接酶、各种限制性内切酶购于TaKaRa公司;脂质体转染试剂lipofectamine2000购于Invitrogen公司;RPMI-1640、G418购自Gibco公司;RNA抽提试剂盒购自上海华舜公司;羊抗人*RUNX3*多克隆抗体购自Oncogene公司,小鼠抗人的cyclin D1、CDK4、CDK6、p21、p27、MRP、Bax、Bcl-2单克隆抗体为Santa Cruz公司产品;小鼠抗人P-gp单克隆抗体为Boehringer Mannheim Biochemica公司产品;HRP标记的羊抗小鼠IgG为武汉博士德产品; $\beta$ -actin单克隆抗体、DNA marker、低分子量蛋白质标准、MTT、PVDF膜、Western blotting发光试剂盒购于Sigma公司。

### 2 *RUNX3* siRNA 载体的构建

根据GenBank *RUNX3*基因的已知序列设计其siRNA的序列:上游引物5'-tttgcggagtagttctcgtcatacaatgacgagaactaccgctttt-3',下游引物5'-ctagaaaagcggagtagttctcgtcattgatgacgagaactaccg-3'。上述序列用BLAST软件进行同源分析证实为*RUNX3*高度保守后,由Sangon公司合成。退火后,酶切mU6pro质粒,行1%琼脂糖凝胶电泳,回收线性化载体,将退火产物和回收产物定量后于16℃连接16h,将连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细菌。37℃培养12-18h。挑选单克隆扩增后进行酶切鉴定和DNA测序。

### 3 细胞培养与转染

SH-SY5Y细胞常规培养于10% RPMI-1640培养液中。G418筛选浓度的确定:消化SH-SY5Y细胞,接种于6孔板( $2 \times 10^5$  cells/well)。G418按100、200、300、400、500、600、700、800 mg/L的终浓度

加入各孔细胞,观察细胞生长状况,以第8d细胞全部死亡的最低浓度为筛选浓度。确定筛选浓度为500 mg/L。

取对数生长期SH-SY5Y细胞,接种于6孔板( $5 \times 10^5$  cells/well),在5% CO<sub>2</sub>培养箱中过夜,直至细胞80%饱和。1 mL RPMI-1640培养液中加10  $\mu$ g质粒(分别加入重组质粒mU6pro-*RUNX3*,空载体mU6pro)振荡混匀,加入lipofectinAMINE脂质体悬液10  $\mu$ L,室温温育15 min。弃去培养基,用无血清培养基洗2次,逐滴缓慢加入预先制备的质粒DNA/脂质体复合液,37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中温育5 h后,补充1 mL 20%新生牛血清的RPMI-1640培养液,继续培养。30 h后改用含G418 500 mg/L的培养液筛选,挑取阳性克隆并进行扩增培养。设立mU6pro空载体转染细胞作为对照。阳性克隆株分别命名为SH-SY5Y-siRNA和SH-SY5Y-mU6pro细胞,以RT-PCR和Western blotting进行鉴定。

### 4 RT-PCR

用RNA抽提试剂盒提取细胞总RNA并定量,取10  $\mu$ g的总RNA和Oligo dT<sub>(15)</sub>4  $\mu$ L进行反转录,于70℃ 10 min后置于冰上,再依次加入5  $\times$  buffer 10  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, AMV 1  $\mu$ L, RNasin 1  $\mu$ L, RNase free去离子水补至50  $\mu$ L,42℃孵育2 h后冰冻保存。常规进行PCR,扩增引物:*RUNX3*: 5'-cacctcggaactgaacctt-3'和5'-gcctccacgccatcactct-3'; $\beta$ -actin: 5'-agcgggaaatcgtgcgtg-3'和5'-caggg-tacatggtggtgcc-3'。将PCR反应产物行1.2%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,紫外线下观察并照相。

### 5 Western blotting

按分子克隆方法提取细胞总蛋白,经Bradford分析方法定量,各组取60  $\mu$ g总蛋白进行12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转印到PVDF膜上,用1%牛血清白蛋白和0.05% Tween20封闭非特异性抗原,和I抗于4℃孵育过夜。第2d TBST洗膜,羊抗小鼠IgG-过氧化物酶1:5 000稀释,37℃孵育1 h, TBST洗膜后ECL荧光显色。

### 6 细胞生长曲线(MTT实验法)

将细胞计数后以每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔培养板中,每个样品设3个复孔。将培养板移入CO<sub>2</sub>孵箱中,在37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养,隔天取1块板,每孔加入MTT溶液20  $\mu$ L,继续孵育4 h,吸弃孔内培养液,每孔加入150  $\mu$ L DMSO,振荡15 min,使结晶充分溶解,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,记录结果。以时间为横轴,吸光度值为纵轴绘制细胞生长曲线<sup>[5]</sup>。

### 7 流式细胞仪分析细胞周期

取指数生长期的实验细胞和未转染、转染空载体的对照细胞各约  $1 \times 10^6$ , 经胰酶消化成单细胞悬液, PBS 洗 1 次, 700 mL/L 冷乙醇固定, 用 DAPI 进行染色, 细胞于流式细胞仪进行细胞周期定量分析。所有检测重复 3 次。细胞增殖指数 (PI) 计算公式:  $PI = (S + G_2) / (S + G_2 + G_1)$ 。

### 8 体外药物敏感性分析

取对数生长期 SGC7901/VCR 及转染细胞接种于 96 孔板 ( $10^4$  cells/well), 当细胞生长状态良好时, 按临床血浆高峰浓度 0.01、0.1、1 和 10 倍加入长春新碱 (临床血浆高峰浓度 0.5 mg/L)、阿霉素 (临床血浆高峰浓度 0.4 mg/L)、5-氟尿嘧啶 (临床血浆高峰浓度 2 mg/L) 和顺铂 (临床血浆高峰浓度 0.6 mg/L), 每种设 3 个复孔, 并设不加药物的空白对照。继续培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 20  $\mu$ L, 继续孵育 4 h, 吸弃孔内培养液, 每孔加入 150  $\mu$ L DMSO, 振荡 15 min, 使结晶充分溶解, 在酶联免疫检测仪上测定各孔  $A_{490nm}$  值。计算细胞对每种药物的  $IC_{50}$  值。实验独立重复 3 次, 并进行统计学检验。

### 9 细胞膜药物转运实验

收获对数生长期的细胞, 按照每孔  $10^5$  个细胞接种入 6 孔板中。培养过夜后, 每孔加入 ADR 至终浓度为 5 mg/L, 继续培养 1 h 后检测细胞的 ADR 蓄积。检测时, 以冷 PBS 洗涤细胞后, 上流式细胞仪检测细胞内的 ADR 荧光强度, 检测的激发波长为 488 nm, 接收波长为 575 nm; 实验同时设置未接触药物的细胞为阴性对照。根据如下公式计算药物的泵出率: 细胞药物泵出率 = (阿霉素的蓄积量 - 阿霉素的滞留量) / 阿霉素的蓄积量。

### 10 统计学处理

数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SAS 8.0 统计分析软件进行方差分析与  $\chi^2$  检验。

## 结 果

#### 1 *RUNX3* siRNA 表达质粒的构建和鉴定

本研究根据 GenBank 提供的 *RUNX3* 基因 cDNA 序列, 设计合成发夹样 *RUNX3* siRNA, 采用 DNA 重组技术, 将互补的双链 *RUNX3* siRNA 定向亚克隆入 mU6pro 真核表达载体, 转化连接子, 提取真核表达质粒。mU6pro-*RUNX3* siRNA 真核表达质粒和空载体被 *Xba* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 分别形成 400 bp 和 1 100 bp 的 DNA 片段, 与预计片段长度相同 (图 1)。

#### 2 *RUNX3* 低表达的细胞模型的建立

G418 筛选转染细胞 4 周后获得稳定克隆株。

经 RT-PCR 和 Western blotting 鉴定 (图 2), *RUNX3* 在 SH-SY5Y-siRNA 细胞中的表达明显低于对照细胞 SH-SY5Y-mU6pro, 说明成功建立了 *RUNX3* 低表达的细胞模型。

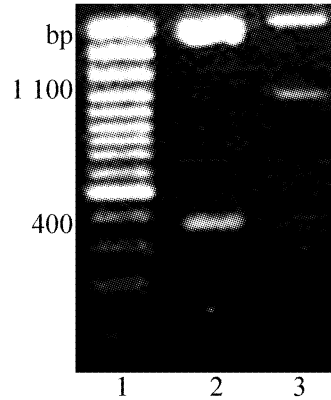


Fig 1 The identification of *RUNX3* siRNA expression plasmid by restriction digestion. Lane 1: DNA marker; Lane 2: mU6pro vector; Lane 3: *RUNX3* siRNA plasmid.

图 1 *RUNX3* siRNA 表达质粒的酶切鉴定图

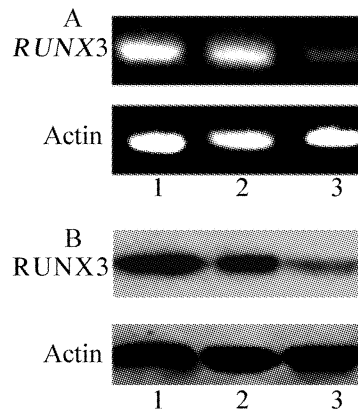


Fig 2 Detection of *RUNX3* expression in cells by RT-PCR (A) and Western blotting (B). Lane 1: SH-SY5Y cells; Lane 2: SH-SY5Y-mU6pro cells; Lane 3: SH-SY5Y-siRNA cells.

图 2 RT-PCR (A) 和 Western blotting (B) 鉴定 *RUNX3* 低表达的细胞模型

#### 3 细胞生长曲线

以培养第 1 至 8 d 的细胞  $A_{490nm}$  值作图, 绘制细胞生长曲线。如图 3 所示, SH-SY5Y-siRNA 细胞的生长速度显著快于对照细胞 SH-SY5Y-mU6pro。

#### 4 细胞周期分析

流式细胞仪分析结果显示, SH-SY5Y 细胞  $G_1$  期、 $G_2$  期、S 期所占比例及细胞增殖指数 PI 分别为 53.8%、15.2%、30.9%、0.461; SH-SY5Y-mU6pro 细胞上述 4 项指标依次为 57.4%、15.7%、26.9%、0.426; SH-SY5Y-siRNA 细胞上述 4 项指标依次为 41.6%、26.2%、32.2%、0.674; 该结果证实, *RUNX3*

下调后的细胞生长数明显增多、速度加快, G<sub>1</sub> 期比例显著减少 ( $P < 0.05$ )。

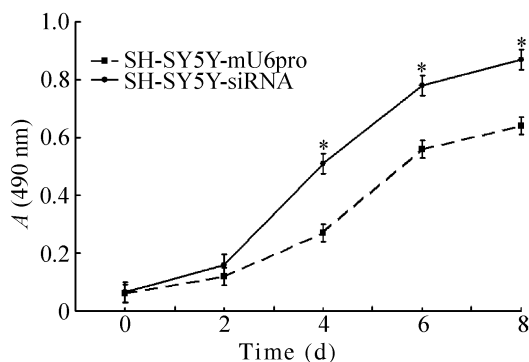


Fig 3 Cell growth rate of the transfected cells *in vitro*. Cell number was evaluated by the absorbance at 490 nm in MTT assay at the indicated time. The value shown was the mean of three determinations.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs SH-SY5Y-mU6pro.

图3 转染细胞的生长曲线图

### 5 下调 RUNX3 可降低 SH-SY5Y 细胞的药物敏感性

根据 SH-SY5Y、SH-SY5Y-mU6pro 和 SH-SY5Y-siRNA 细胞对长春新碱、阿霉素、5-氟尿嘧啶和顺铂的细胞存活率计算 IC<sub>50</sub> 值, 结果分别为  $0.30 \pm 0.04$ 、 $0.37 \pm 0.05$ 、 $1.38 \pm 0.12$ 、 $0.18 \pm 0.24$ 、 $0.21 \pm 0.02$ 、 $1.57 \pm 0.48$ ;  $0.38 \pm 0.07$ 、 $0.42 \pm 0.02$ 、 $1.24 \pm 0.21$ ;  $0.35 \pm 0.06$ 、 $0.37 \pm 0.11$ 、 $1.22 \pm 0.17$ 。该结果证实, RUNX3 下调后的细胞对化疗药物的敏感性明显降低 ( $P < 0.05$ )。流式细胞仪检测表明, 阿霉素在 SH-SY5Y-siRNA 细胞内的荧光强度明显低于对照细胞 SH-SY5Y-mU6pro (图 4), 在 SH-SY5Y-siRNA 细胞内的药物泵出率明显快于对照细胞 SH-SY5Y-mU6pro ( $0.29 \pm 0.04$  vs  $0.20 \pm 0.03$ )。

### 6 Western blotting

图 5 所示, 与对照组细胞相比, SH-SY5Y-siRNA 细胞中 Bcl-2、P-gp 和 cyclin D1 的表达明显增高, p21 的表达明显降低, 而 CDK4、CDK6、p27、Bax 和 MRP 的表达没有显著变化。

## 讨 论

神经母细胞瘤的发生发展是 1 个多基因、多因素和多步骤的复杂过程, 它们之间存在相互依赖又相互制约的调节关系。RUNX3 作为 RUNX 转录因子家族成员, 与 RUNX1、RUNX2 协同作用参与了哺乳动物许多组织的发育和分化调节<sup>[6-8]</sup>。如果 RUNX3 表达异常, 就会通过调控其它基因的表达引起系列反应, 可能在肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[3,4]</sup>。本实验以神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 为对

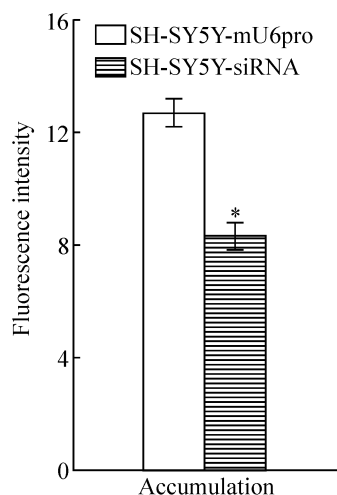


Fig 4 Fluorescence intensity analysis of intracellular ADR in transfected cells. ADR was added to cells in log phase to a final concentration of 5 mg/L. After 1 h, cells were harvested for detection of ADR accumulation. Cells were then washed twice with cold PBS, and the fluorescence intensity of intracellular ADR was determined using FCM with an exciting wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 575 nm.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs SH-SY5Y-mU6pro.

图4 RUNX3 对细胞内阿霉素蓄积浓度的影响

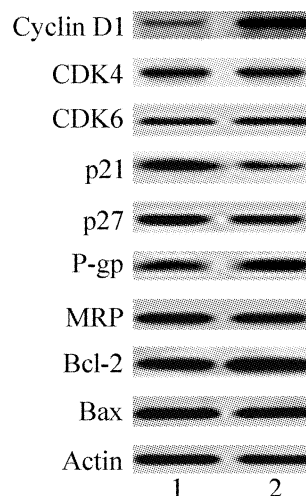


Fig 5 Western blotting analysis of cyclin D1, CDK4, CDK6, p21, p27, Bcl-2, Bax, P-gp and MRP in transfected cells. Lane 1: SH-SY5Y-mU6pro; lane 2: SH-SY5Y-siRNA.  $\beta$ -actin was used as an internal control. The blotting was visualized by ECL system. Results were representative of three independent experiments.

图5 Western blotting 检测细胞中 cyclin D1, CDK4, CDK6, p21, p27, Bcl-2, Bax, P-gp 和 MRP 的表达象, 首次探讨了 RUNX3 的小干扰 RNA 对神经母细胞瘤细胞的生长和药物敏感性的作用及其可能的分子机制。

SH-SY5Y 细胞高表达 RUNX3 蛋白, 是研究细

胞增殖和凋亡的良好模型。为了探讨 *RUNX3* 的表达对 SH-SY5Y 细胞的作用,首先要选择 1 个有效的技术沉默此基因的表达。RNA 干扰是 1 门高效的对目的基因表达进行阻断的技术,具有广阔的应用前景<sup>[9-11]</sup>。本实验成功制备了 *RUNX3* 的小干扰 RNA 载体,并建立了稳定低表达 *RUNX3* 的 SH-SY5Y-siRNA 细胞亚系。

细胞周期的 G<sub>1</sub> 期检测点可防止 DNA 受损的细胞进入 S 期的 DNA 复制。该检测点功能的减弱,将导致遗传的不稳定性、受损细胞的存活和复制或细胞遗传物质的改编,突变基因累积的细胞多步骤进化。降低 *RUNX3* 的表达可导致 SH-SY5Y 细胞生长速度加快,致 G<sub>1</sub> 期比例减少,并调节细胞周期 G<sub>1</sub> 期相关蛋白 cyclin D1 和 p21 的表达,提示 *RUNX3* 在 G<sub>1</sub> 期检测点可能起重要调控作用。

体外药物敏感性试验显示,SH-SY5Y-siRNA 细胞对化疗药物的敏感性减小( $P < 0.05$ ),可能有 P-gp、MRP 等耐药相关蛋白协同发挥作用。P-gp 具有能量依赖性"药泵"功能,能使细胞内药物转出细胞外,造成细胞内药物浓度下降,细胞毒作用降低或完全丧失,细胞由此获得 P-gp 介导的 MDR,此为经典的多药耐药途径<sup>[12]</sup>。抑制 *RUNX3* 的表达后,细胞内阿霉素的蓄积减少,泵出率增加,P-gp 蛋白的表达增高,说明 *RUNX3* 小干扰 RNA 可能通过调节 P-gp 的表达在一定程度上降低 SH-SY5Y 细胞的药物敏感性。

凋亡是多种抗癌药物发挥作用的 1 个共同途径,能耐受抗癌药物诱导凋亡的细胞最终形成了对化疗药物耐药。以往研究发现,*RUNX3* 基因敲除小鼠模型中的胃粘膜上皮细胞的凋亡减少,细胞抗凋亡能力增强,提示 *RUNX3* 对细胞的凋亡具有调控作用。*RUNX3* 的缺失可直接导致 TGF- $\beta$  信号通路的阻断,从而增强细胞抗凋亡能力<sup>[13,14]</sup>。本研究发现,抑制 *RUNX3* 的表达后,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达也增高,说明 *RUNX3* siRNA 可能通过影响 *RUNX3* 的下游分子调节细胞凋亡,进而降低药物敏感性。

#### [参 考 文 献]

[1] Park WS, Cho YG, Kim CJ, et al. Hypermethylation of the *Runx3* gene in hepatocellular carcinoma [J]. *Exp Mol*

*Med*, 2005, 37(4): 276-281.

[2] Sakakura C, Hasegawa K, Miyagawa K, et al. Possible involvement of *Runx3* silencing in the peritoneal metastases of gastric cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(18): 6479-6488.

[3] Kim WJ, Kim EJ, Jeong P, et al. *Runx3* inactivation by point mutations and aberrant DNA methylation in bladder tumors [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9347-9354.

[4] Yamamura Y, Lee WL, Inoue K, et al. *RUNX3* cooperates with FoxO3a to induce apoptosis in gastric cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(8): 5267-5276.

[5] 藤晓华,徐如祥,邹雨汐,等.不同浓度血清对大鼠骨髓基质细胞生长的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(7): 1452-1454.

[6] Chen AI, de Nooij JC, Jessell TM. Graded activity of transcription factor *RUNX3* specifies the laminar termination pattern of sensory axons in the developing spinal cord [J]. *Neuron*, 2006, 49(3): 395-408.

[7] Fukamachi H. *RUNX3* controls growth and differentiation of gastric epithelial cells in mammals [J]. *Dev Growth Differ*, 2006, 48(1): 1-13.

[8] Hiramatsu T, Osaki M, Ito Y, et al. Expression of *RUNX3* protein in human esophageal mucosa and squamous cell carcinoma [J]. *Pathobiology*, 2005, 72(6): 316-324.

[9] Hannon GJ. RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 244-251.

[10] Tavernarakis N, Wang SL, Dorovkov M, et al. Heritable and inducible genetic interference by double-stranded RNA encoded by transgenes [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(2): 180-183.

[11] 张晓菁,温泽清,张华玲,等. RNA 干扰技术抑制耐药细胞 MDR1 基因表达的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(5): 833-836.

[12] 李旭芬,张苏展,郑树. 苦参碱对 K562 及其多药耐药细胞 K562/Vin 的细胞生物学影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(10): 1233-1237.

[13] Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of *RUNX* proteins [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(1): 9-18.

[14] Snove O Jr, Holen T. Many commonly used siRNAs risk off-target activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(1): 256-263.