

· 基础研究 ·

干扰COX-2基因表达对人肺腺癌A2细胞体外恶性增殖的影响

李伟英 汪惠 赖百塘 杨学惠 张春彦

【摘要】背景与目的 COX-2在多种肿瘤组织中高表达,参与了肿瘤的发生发展, RNA干扰(RNAi)技术是一种经济、快捷、高效的抑制特异基因表达的技术手段。本研究应用RNAi技术研究干扰COX-2基因表达的抑制效果及抑制COX-2基因表达对A2细胞体外恶性增殖的影响。方法 以COX-2为靶点,构建3个带有人U6启动子的COX-2小干扰RNA(short interfering RNA, siRNA)表达载体。用脂质体lipofectamine介导,分别将3个siRNA表达载体及空载体转染到COX-2表达阳性的A2细胞,建立转染细胞株。采用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot方法检测COX-2表达水平的变化。通过细胞生长曲线、集落形成试验研究干扰COX-2基因表达对A2细胞体外增殖的影响。结果 经过PCR扩增、内切酶鉴定、DNA测序和BLAST比对证实3个siRNA和U6启动子序列正确并准确克隆到pEGFP载体。转染细胞株分别命名为A2-3、A2-7、A2-10和A2-p。转染后24 h、48 h、72 h, A2-p细胞均有绿色荧光表达,而A2-3、A2-7、A2-10细胞均未观察到绿色荧光。RT-PCR和Western blot结果显示,3个siRNA表达载体均发挥作用,COX-2表达受到抑制,与A2细胞比较,A2-3、A2-7、A2-10细胞的COX-2 mRNA表达量分别降低15.6%、20.4%和64.2%,COX-2蛋白表达量分别降低23.7%、36.7%和60.2%。细胞生长曲线、集落形成试验的结果显示,A2-10细胞生长减慢,集落形成率减少,而A2-3和A2-7细胞生长没有明显的改变。结论 应用RNAi技术熄灭COX-2基因表达对A2细胞的体外恶性增殖有明显的抑制作用。

【关键词】 Cyclooxygenase-2; RNA干扰; 体外; 肺肿瘤

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.02.02

The Effects of Interfering COX-2 Gene Expression on Malignant Proliferation of Human Lung Adenocarcinoma A2 Cell *in vitro*

Weiying LI, Hui WANG, Baitang LAI, Xuehui YANG, Chunyan ZHANG

Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China

Corresponding author: Weiying LI, E-mail: li_weiying412@yahoo.com.cn

【Abstract】 Background and objective COX-2 was highly expressed in many tumor tissues and was involved in the initiation and development of tumors. The RNAi technique is a method to inhibit gene expression economically, quickly, efficiently and specifically. This study used RNAi technique to explore the interfering effect of COX-2 gene expression and the influence on the malignant proliferation of A2 cells after quenching COX-2 *in vitro*. **Methods** Three COX-2 siRNA expression vectors with human U6 promoter were constructed. The COX-2 siRNA vectors and the vacant vector (pEGFP) were transfected into A2 cells with lipofectamine respectively. The cell strains transfected were selected. The change of COX-2 expression levels was examined by Western blot and RT-PCR. The effects on the proliferation of A2 cells after silencing COX-2 were detected by cell growth curve and clonogenic assay *in vitro*. **Results** The three siRNA and U6 promoter cloned into pEGFP plasmid were validated by PCR, restriction endonucleases identification, DNA sequencing and BLAST alignment. The cell strains transfected were coded as A2-3, A2-7, A2-10 and A2-p respectively. Green fluorescence was seen in A2-p cells and not in A2-3, A2-7 and A2-10 cells in 24 h, 48 h and 72 h after transfected. The results of RT-PCR and Western blot showed the three siRNA expression vectors acted effectively and the expression of COX-2 was inhibited in different extent. In contrast to A2 cells, COX-2 mRNA levels of A2-3, A2-7 and A2-10 cells were reduced 15.6%, 20.4% and 64.2% respectively, and COX-2 protein expressions of them were reduced 23.7%, 36.7% and 60.2% respectively. The results of cell growth curve and clonogenic assay showed the growth of A2-10 cell slowed and the clonal formation rate was reduced. However the growth of A2-3 and A2-7 cells had no obvious changes vs controls (A2 and A2-p). **Conclusion** Silencing COX-2 gene *in vitro* by RNAi technique can significantly inhibit the malignant proliferation of A2 cells.

【Key words】 Cyclooxygenase 2; RNA interference; *in vitro*; Lung neoplasms

作者单位: 101100 北京, 北京结核病胸部肿瘤研究所(通讯作者: 李伟英, E-mail: li_weiying412@yahoo.com.cn)

环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 是生成前列腺素的限速酶, 在花生四烯酸的代谢起始步骤中起着关键作用。COX-2是COX同工酶之一, 是一种早期应激基因, 正常机体的大部分组织和器官内几乎不表达, 但在细胞因子、生长因子、肿瘤促进剂及癌基因等刺激下表达明显增加。近年来的研究表明, COX-2在肿瘤的发生发展中起着重要作用, 成为肿瘤研究中的热点。RNA干扰 (RNAi) 技术是一种经济、快捷、高效的抑制特异基因表达的技术手段, 是研究基因功能的重要工具。本研究采用RNAi技术, 研究干扰COX-2基因表达效果以及对人肺腺癌细胞A2体外恶性增殖的影响, 为今后进行基因功能和治疗手段的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 PCR产物纯化试剂盒及工具酶购自Promega公司; 细胞培养、转染试剂lipofectamine购自Invitrogen公司; 细胞蛋白提取试剂盒购自Pierce公司; 鼠抗人COX-2单抗、生物素标记的羊抗鼠IgG、HRP-链霉卵白素、HRP-羊抗兔IgG等购自北京中杉生物科技有限公司; HRP-GAPDH内参购自上海康成公司。

1.1.2 引物及COX-2特异性靶点的设计与合成 人U6启动子引物序列上游引物: 5' -CGGAATTCAAGGTCCGGCAGGAAGAGGGCCTA-3', 下游引物: 5' -GGGGTACCTAGTATGTGTGCTGCCGAAGCGAGCAC-3'。依据siRNA设计原则, 从COX-2 mRNA中选择3段19个碱基的特异性序列, 设计带有靶序列的引物 (P3、P4、P5), 每条引物带有Kpn1酶切位点、转录终止信号 (5个T) 和两个反向互补排列的19 nt COX-2特异性序列, 由一个9 nt的间区隔开, 用于形成茎环结构, 引物由上海生工合成。

1.2 方 法

1.2.1 质粒的构建 以人外周血白细胞DNA为模板, 用P1、P2行聚合酶链反应 (PCR), 扩增人U6启动子, 与pEGFP质粒连接转化*E.coli*JM109, 挑取菌落提取质粒, 经PCR、酶切、测序鉴定插入片段序列, 重组的载体命名为pU6。以上述质粒为模板, P1分别与P3、P4、P5组成一对引物行PCR, 得到带有人U6启动子和靶序列的扩增产物, 分别克隆并提取质粒, 经PCR、酶切、测序、比对鉴定插入片段序列, 重组的载体命名为psi-3、psi-7、psi-10。

1.2.2 细胞培养、转染及转染细胞株的建立 人肺腺癌细胞系A2细胞由本室建立, 所用培养基为含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基。取对数生长期的细胞接种于35 mm培养皿, 置于37 °C、5%CO₂暖箱中孵育24 h, 细胞达到

70%~80%汇合时分别转染pEGFP、psi-3、psi-7和psi-10载体, 每个培养皿分别加入4 μg质粒+5 μL lipofectamine, 转染所用培养基不含胎牛血清及双抗, 转染6 h, 加20%血清培养基 (不含抗菌素), 置于37 °C、5%CO₂暖箱中孵育24 h, 换用10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养48 h, 再换用含有G418培养基 (G418终浓度为800 μg/mL) 继续培养, 直至抗性克隆出现, 转染细胞株分别命名为A2-p、A2-3、A2-7和A2-10。

1.2.3 绿色荧光蛋白的表达 转染的同时在荧光显微镜下观察A2细胞在分别转染pEGFP、psi-3、psi-7、psi-10质粒24 h、48 h和72 h后绿色荧光蛋白的表达情况。

1.2.4 反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 分别提取A2、A2-p、A2-3、A2-7、A2-10细胞总RNA, 测定RNA浓度和纯度。采用一步法行RT-PCR, 反应条件为: 50 °C、30 min, 95 °C、15 min, 94 °C、30 s, 60 °C、1 min, 72 °C、1 min, 35个循环, 72 °C、10 min。COX-2上游引物: 5' -AGTACCGCAAACGCTTTATGC-3' 下游引物: 5' -AACTTGCAT TGATGCTGACT-3', 扩增产物389 bp。β-actin上游引物: 5' -TGAGCGCGGCTACAGCTT-3' 下游引物: 5' -TCCTTATGTCACGCACGATTT-3', 扩增产物621 bp。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 于凝胶成像分析系统中分析, 取COX-2/β-actin比值作为mRNA的相对表达量。

1.2.5 Western blot蛋白印迹检测 分别提取A2、A2-p、A2-3、A2-7和A2-10细胞蛋白, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 每孔上样50 μg, 后经转印仪转膜, 以鼠抗COX-2单抗4 °C过夜反应, HRP-羊抗鼠IgG室温反应2 h, ECL显色, 暗室曝光显影, 蛋白的相对表达量取COX-2/GAPDH的灰度比。

1.2.6 细胞生长曲线的绘制 分别以5×10⁴/瓶接种A2、A2-p、A2-3、A2-7和A2-10细胞于培养瓶中, 每瓶加入4.5 mL培养基。每种细胞每天取3瓶记数取平均值, 记录7天, 绘制生长曲线。

1.2.7 细胞集落形成实验 分别接种300个A2、A2-p、A2-3、A2-7和A2-10细胞于35 mL培养皿中, 每种细胞做3个培养皿, 置于37 °C、5%CO₂暖箱中培养2周, Giemsa染色后记数集落 (每个集落至少50个细胞), 计算集落形成率和抑制率。集落形成率 (%) = 平均集落/接种细胞数 × 100%; 集落形成抑制率 (%) = (对照组集落形成率 - 试验组集落形成率) / 对照组集落形成率 × 100%。

1.2.8 流式细胞仪分析A2和A2-10细胞周期和细胞凋亡情况 从细胞生长曲线和集落形成实验结果分析, A2和A2-p两组对照细胞生长速度没有明显差异, A2-3和A2-7细胞

与对照比较细胞生长没有明显地减慢, A2-10细胞与2个对照和A2-3和A2-7细胞比较均显示出细胞生长明显地减慢, 因此, 在流式细胞仪分析细胞周期是否出现阻滞和是否出现凋亡细胞的实验中, 我们只对A2 (作为对照) 和A2-10细胞进行研究, 2种细胞分别培养24 h、48 h和72 h, 经流式细胞仪分析它们细胞周期和凋亡情况。

1.3 统计学处理 用SPSS 10.0软件进行方差分析和多元回归分析, COX-2蛋白表达的水平用凝胶成像系统进行分析。

2 结果

2.1 pU6、psi-3、psi-7和psi-10表达载体的鉴定 pU6、psi-3、psi-7和psi-10质粒分别经PCR、酶切、测序以及在NCBI数据库中进行BLAST比对, 显示了插入的目的片段正确, 未发生碱基突变、缺失、移位 (图1), 图1只列出pU6质粒的鉴定结果, 因psi-3、psi-7和psi-10质粒的鉴定结果与pU6质粒相似, 为避免重复未列出。

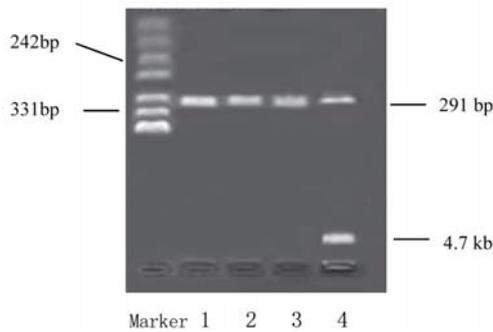


图1 *Kpn* I、*Eco*R I 双酶切筛选质粒电泳结果

Fig 1 The plasmids screened by *Kpn* I and *Eco*R I restriction endonucleases

1: U6 promoter amplified by PCR; 2, 3: plasmids identified by PCR; 4: plasmid identified by *Kpn* I and *Eco*R I restriction endonucleases

2.2 绿色荧光蛋白的表达 A2细胞在转染空载体pEGFP后24 h, 每个视野中可见到12-15个细胞有绿色荧光蛋白表达, 转染率为10%; 转染后48 h, 绿色荧光蛋白表达量较24 h增多, 转染率为30%; 转染后72 h, 绿色荧光蛋白表达量与48 h比较, 未见明显增多 (图2)。G418筛选后建立的转染细胞系A2-p可以看到满视野的绿色荧光 (图3); 而A2-3、A2-7和A2-10在转染24 h、48 h、72 h及G418筛选后, 均未有绿色荧光蛋白表达。

2.3 A2细胞COX-2 mRNA表达的变化 A2、A2-p、A2-3、A2-7和A2-10细胞β-actin表达相当, A2和A2-p两组对照

中COX-2 mRNA表达相当 (所以下面定量分析中选择其中之一A2为对照进行比较); 与对照 (A2和A2-p) 比较, A2-3、A2-7和A2-10细胞的COX-2 mRNA表达量均有下降, 其中以A2-10最为明显, A2-7和A2-3次之 (图4)。进一步对细胞的COX-2 mRNA表达进行定量分析, 以A2细胞的COX-2/β-actin mRNA相对表达量为1, A2-3细胞的COX-2/β-actin mRNA比值为0.844, 表达量降低15.6%; A2-7细胞的COX-2/β-actin mRNA比值为0.796, 表达量降低20.4%; A2-10细胞的COX-2/β-actin mRNA比值为0.358, 表达量降低64.2%。

2.4 A2细胞COX-2蛋白表达的变化 A2、A2-p、A2-3、A2-7和A2-10细胞GADPH蛋白表达相当, A2和A2-p两组对照中COX-2蛋白表达相当 (所以下面定量分析中选择其中之一A2为对照进行比较); 与对照 (A2和A2-p) 比较, A2-3、A2-7和A2-10细胞的COX-2蛋白表达量均有下降, 其中以A2-10最为明显, A2-7和A2-3次之 (图5)。进一步对细胞COX-2蛋白表达进行定量分析, 以A2细胞的COX-2/GADPH蛋白相对表达量为1, A2-3细胞的COX-2/GADPH蛋白比值为0.763, 表达量降低23.7%; A2-7细胞的COX-2/GADPH蛋白比值为0.633, 表达量降低36.7%; A2-10细胞的COX-2/GADPH蛋白比值为0.398, 表达量降低60.2%。

2.5 细胞生长曲线的绘制 A2和A2-p细胞生长速度相当; A2-3和A2-7细胞前5天生长与对照 (A2和A2-p) 比较没有统计学差异, 从第6天开始生长速度慢于对照; A2-10细胞从第1天到第7天生长速度均很慢, 呈平缓上升的趋势 (图6)。统计学分析显示, A2、A2-p、A2-3和A2-7细胞间差异无统计学意义, A2-10与A2、A2-p、A2-3和A2-7细胞差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 细胞集落形成实验 集落形成实验结果见表1和图7。从图7我们能直观看到A2和A2-p集落数相当; A2-3和A2-7集落数相当, 比A2和A2-p减少; A2-10集落数比对照 (A2和A2-p) 和A2-3和A2-7明显减少, 而且集落大小也明显小得多, A2-3和A2-7与对照 (A2和A2-p) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), A2-10与A2、A2-p、A2-3和A2-7细胞差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。鉴于A2和A2-p无统计学差异, 取其平均值作为对照组集落形成率38.0%, A2-10集落形成抑制率为73.7%, A2-7集落形成抑制率为26.3%, A2-3集落形成抑制率为29.7%。

2.7 流式细胞仪分析A2和A2-10细胞周期和细胞凋亡情况 A2-10细胞在24 h、48 h和72 h均没有出现细胞周期阻滞和凋亡细胞 (图8)。

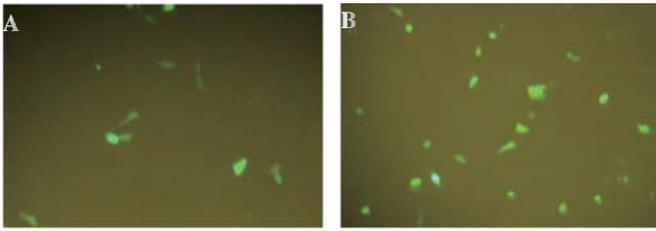


图2 A2细胞转染空载体pEGFP 24 h (A)、48 h (B) 绿色荧光蛋白(GFP)表达
Fig 2 The GFP expression of A2 cells after transfected pEGFP 24 h (A) and 48 h (B)
 GFP: green fluorescent protein

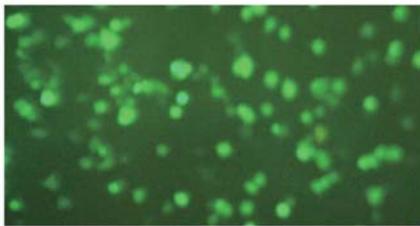


图3 G418筛选建立的转染细胞株A2-p细胞绿色荧光蛋白表达
Fig 3 The GFP expression of A2-p cells screened by G418

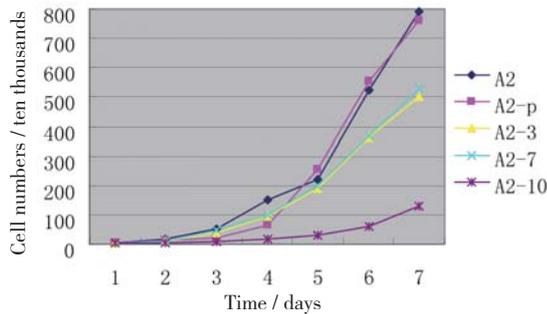


图6 五种细胞生长情况
Fig 6 The growth condition of five kinds cells

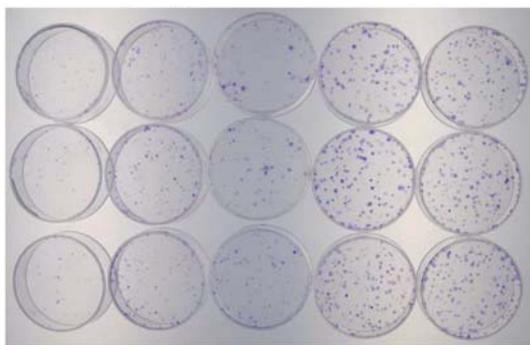


图7 五种细胞集落形成情况
Fig 7 The colony formation of five kinds of cells

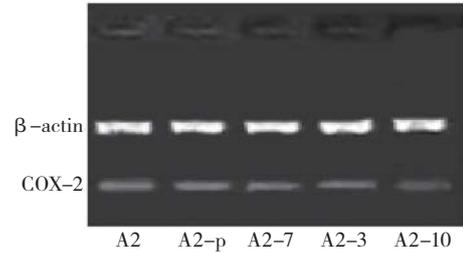


图4 RT-PCR检测COX-2 mRNA的表达情况
Fig 4 The mRNA expression of COX-2 examined by RT-PCR

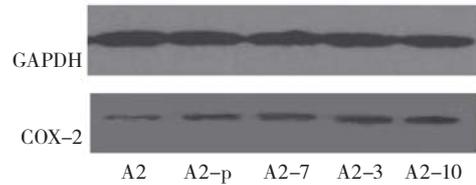


图5 Western blot检测转染细胞COX-2蛋白的表达
Fig 5 The expression of COX-2 protein examined by Western blot

表1 A2及转染细胞集落形成实验

Tab 1 The colony formation experiment of A2 and cells transfected

Groups	Colony numbers	Colony formation rates(%)	Colony inhibited rates (%)
A2	108 ± 17	36.0	
A2-p	120 ± 20	40.0	
A2-3	80 ± 16	26.7	29.7
A2-7	84 ± 20	28.0	26.3
A2-10	30 ± 13*	10.0*	73.7*

*P<0.05, there was significant difference among A2-10, A2, A2-p, A2-3 and A2-7.

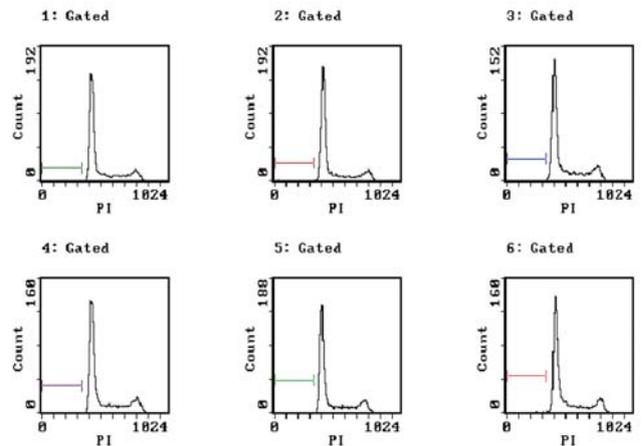


图8 A2和A2-10细胞周期和细胞凋亡情况

Fig 8 The cell cycles and cell apoptosis of A2 and A2-10 cells

Above three figures were A2 cells cultured 24 h, 48 h and 72 h respectively;
 Below three figures were A2-10 cells cultured 24 h, 48 h and 72 h respectively.

3 讨论

近年来的研究表明, COX-2除参与炎症外, 还参与了肿瘤的发生、发展, COX-2在多种肿瘤组织中高表达, 不仅在原发病灶尤其在肿瘤转移灶组织中, COX-2表达尤为显著, COX-2的激活可能是肿瘤发生的一个早期事件^[1-3]。在人肺非典型腺样增生和原位癌中, COX-2表达上调; 在浸润性肺腺癌中, COX-2表达为70%-90%, 与原发肿瘤比较, 腺癌细胞发生淋巴结转移时, COX-2表达增加的比例会更大, 提示了COX-2可以提高肿瘤组织向局部浸润和远处转移的能力。在体内外实验中, COX-2抑制剂可以减少肿瘤细胞移动、细胞粘附和肿瘤侵袭^[4,5], 并且使用特异性和非特异性COX-2抑制剂预防结肠癌产生了很好的结果, 因此COX-2成为肿瘤研究的一个热点。

本研究以COX-2为靶点, 依据siRNA设计原则, 从COX-2 cDNA序列中选取了3个序列作为干扰靶点, 它们均位于起始密码子下游100个碱基后, 远离5' 或3' UTR靠近启动密码子的部分, 3个靶序列中G+C含量分别为35%、48%和48%, 序列中不存在连续4个以上的G或C。经BLAST同源序列比对, 这3个序列具有很好的特异性。本研究选用的人U6启动子, 不含内调控序列, 故其内源基因均可被外源序列取代, 因此, 由U6启动子表达的外源反义RNA几乎不含其他序列, 并能在靶细胞内高表达。有研究利用CMV启动子的促进子序列, 正向或反向置于U6启动子上游或DNA倒转重复序列的下游, 可以促进U6启动子的转录活性^[6], 因此本研究选用pEGFP质粒为骨架, 将U6启动子插入多克隆位点中, 使得CMV启动子正向位于U6启动子上游, 从而提高U6启动子的转录水平。在U6启动子后面连接了以COX-2的3个靶点设计的一段“正义-发夹-反义-转录终止信号 (sense-loop-antisense-transcriptional)”序列, 该序列在U6启动子的作用下, 转录生成自身配对的3' 端有2个U突出的、茎部环为9 bp的短发夹环, 这种茎环结构在Dicer酶作用下形成小干扰RNA (siRNA), 进而触发RNA干扰 (RNAi)。

将构建的3个siRNA表达载体、空载体pEGFP分别转染A2细胞, 于转染后24 h、48 h、72 h观察各组细胞绿荧光蛋白的表达情况。结果显示, 仅有A2-p细胞可观察到绿色荧光, 而A2-3、A2-7和A2-10细胞均未有绿色荧光。产生该现象的原因是转空载体的细胞株A2-p中有绿荧光蛋白的表达, 自然就能观察到绿荧光; 而在3个siRNA表达载体中插入的外源序列末端有U6启动子转录终止信号 (TTTTT), 该终止信号位于GFP的上游, 因此在3个siRNA

表达载体中转录产物停止在第2个U, 不能够继续转录下游的GFP序列, 没有绿荧光蛋白的表达, 因此, 在A2-3、A2-7和A2-10细胞中均未观察到绿色荧光。

实验采用Western blot和RT-PCR检测COX-2的3个靶点对COX-2基因的干扰效果。结果显示, 构建的3个siRNA表达载体均是成功的, 3个siRNA均发挥作用, 但对COX-2基因表现出不同程度的抑制。与A2、A2-p对照比较, A2-3、A2-7和A2-10细胞COX-2 mRNA和蛋白的表达量均减少, 其中A2-10细胞COX-2 mRNA和蛋白表达抑制效果最为明显, 不同靶点对COX-2基因表达抑制效果不同可能与mRNA的二级结构有关^[7-10]。

研究显示COX-2参与肿瘤的发生、发展, 在多种肿瘤组织中高表达。本次实验研究采用RNAi技术干扰COX-2基因表达是否对A2细胞恶性表型产生影响, 细胞生长曲线和集落形成实验分别反映细胞群体和个体的生长状况, 研究显示干扰COX-2的3个靶点对A2细胞的恶性增殖具有不同的影响。对照 (A2、A2-p) 和干扰组 (A2-3、A2-7和A2-10) 前3天细胞生长速度相当; 第4天开始, 5组细胞的生长趋势表现出明显差异, A2-10明显慢于两个对照和其它两个干扰组, 提示以COX-2前两个靶点进行干扰, 对A2细胞的恶性增殖无明显影响 ($P>0.05$); 而以10为靶点干扰, A2细胞的生长减慢、集落形成减少而且集落的大小比对照明显减小, 提示了10为靶点干扰COX-2基因表达A2细胞无论是细胞群体生长还是细胞的个体生长速度均明显减慢 ($P<0.05$)。此外, 通过流式细胞仪分析A2-10细胞, 未发现细胞周期发生阻滞, 也无凋亡细胞的出现。Charames等^[11]通过对HT-29结肠癌细胞研究发现, 使用RNAi技术熄灭COX-2基因表达后, COX-2蛋白的表达水平比干扰前降低57%, 但在敲除COX-2基因表达的细胞中, 并没有观察到bcl-2表达和caspase-3活性的改变, 与本研究结果一致。关于熄灭COX-2基因表达对肿瘤细胞恶性表型影响的研究结果存在不一致, 这种不一致可能与研究对象 (肿瘤细胞类型) 的不同有关; 也可能与选择的RNAi靶点不同相关, RNAi对靶基因的干扰达不到完全熄灭, 不同靶点对COX-2的干扰效果不同, 残留表达的COX-2就会继续发挥作用。采用RNAi技术干扰COX-2基因表达后人肺腺癌细胞A2的恶性增殖减慢, 恶性表型降低但细胞周期没有出现阻滞也没有凋亡细胞的出现, 所以熄灭COX-2表达对肿瘤生长抑制的机制仍需要进一步去研究。在这里值得注意的是, COX-2的3和7这两个干扰靶点对COX-2基因表达的抑制以及对细胞生长的抑制表现出不平行 (即分别以COX-2第3和7外显子为干扰靶点, COX-2蛋白表达减少

以A2-7细胞显著,但在细胞生长曲线和集落形成实验中,A2-7细胞的生长与A2-3细胞相当),可能提示3和7靶点对应序列在肿瘤的恶性增殖中具有不同的作用。

参 考 文 献

- 1 Hai S, Jian MX, Nai ZH, *et al.* Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(7): 1421-4124.
- 2 Cao Y, Prescott SM. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physical*, 2002, 190(3): 279-286.
- 3 Joo YE, Rew JS, Seo YH, *et al.* Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 37(1): 28-33.
- 4 Dohadwala M, Luo J, Zhu J, *et al.* Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion in mediated by CD44. *J Biol Chem*, 2001, 276(24): 20809-20812.
- 5 Petkova DK, Celland C, Ronan J, *et al.* Overexpression of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer. *Resp Med*, 2004, 98(2): 164-172.
- 6 Xia XG, Zhou H, Ding H, *et al.* An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(17): e100(1-5).
- 7 Chen J, Bai CX, Zhang M. Application of RNA interference in mammalian cells. *Prog Biochem Biophys*, 2003, 30(4): 650-654. [陈杰, 白春学, 张敏. RNA干扰技术在哺乳动物中的应用. *生物化学与生物物理学进展*, 2003, 30(4): 650-654.]
- 8 Xiang MZ, Jiang YG, Wang HC, *et al.* Effects of reducing FasL expression on T cell apoptosis in lung cancer cell line H460 via siRNA technology. *Chin J Lung Cancer*, 2007, 10(1): 5-8. [向明章, 蒋耀光, 王慧春, 等. RNA干扰肺癌细胞H460 FasL表达对T细胞凋亡的影响. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(1): 5-8.]
- 9 Zhuo WL, Wang Y, Chen ZT. Inhibitory effects of shRNA targeting layilin on adhesion and invasion behavior of human lung adenocarcinoma A549 cells induced by hyaluronan *in vitro*. *Chin J Lung Cancer*, 2006, 9(3): 236-240. [卓文磊, 王彦, 陈正堂. 针对layilin的shRNA抑制透明质酸诱导人肺癌A549细胞体外黏附和侵袭. *中国肺癌杂志*, 2006, 9(3): 236-240.]
- 10 Li G, Li XP, Liu W, *et al.* Inhibition of EBV-encoded LMP-1 by DNA-based UNA interference affects metastatic ability of nasopharyngeal carcinoma cells. *Chin J Oncol*, 2006, 28(10): 724-727. [李刚, 李湘平, 刘维, 等. DNA载体介导RNA干扰抑制LMP-1基因对鼻咽癌细胞转移能力的影响. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(10): 724-727.]
- 11 Charames GS, Bapat B. Cyclooxygenase-2 knockdown by RNA interference in colon cancer. *Int J Oncol*, 2006, 28(2): 543-549.

(收稿: 2008-09-23 修改: 2008-11-14)

(本文编辑 李博)

· 启 事 ·

关于公布第十九批允许发布处方药广告的医学药学专业刊物的通知

国食药监市[2008]713号

<http://www.sda.gov.cn/directory/web/WS01/CL0055/34688.html>

2008年12月03日 发布

各省、自治区、直辖市食品药品监督管理局(药品监督管理局)、卫生厅(局),新疆生产建设兵团食品药品监督管理局:根据《中华人民共和国药品管理法》第十六条规定,经卫生部和国家食品药品监督管理局共同审核,认定《中国肺癌杂志》等3个医学、药学专业刊物(见附件)可发布处方药广告。

根据新闻出版总署《关于〈中药研究与信息〉等2期刊物变更登记项目的函》(新出报刊〔2005〕1137号),同意更名后的《中国现代中药》杂志可以发布处方药广告。

特此通知。

附件:允许发布处方药广告的医学、药学专业刊物名单

国家食品药品监督管理局
二〇〇八年十二月三日

附件:允许发布处方药广告的医学、药学专业刊物名单

序号	刊物中文名称	CN刊号	登记地	广告经营许可证号
1	中国肺癌杂志	CN12-1395/R	天津市	1201024000660号
2	中国民族民间医药	CN53-1102/R	昆明市	5300004000105号
3	中国卒中杂志	CN11-5434/R	北京市	京海工商广字第0302号