

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.014

· 基础研究 ·

KLK7 siRNA 对胃癌 AGS 细胞的抑制作用

苏晓峰¹, 王文苓², 蔡洪培¹(1. 第二军医大学长征医院消化科, 上海 200003; 2. 解放军第 302 医院门诊部, 北京 100039)

[摘要] **目的:**体外合成 4 条靶向人组织激肽释放酶 7(kallikrein-related peptidase 7, *KLK7*) 基因的片段, 并筛选最有效 siRNA 片段, 观察沉默 *KLK7* 表达对胃癌 AGS 细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**设计 4 条靶向 *KLK7* 的 siRNA 片段(*KLK7*-siRNA-416、*KLK7*-siRNA-596、*KLK7*-siRNA-474、*KLK7*-siRNA-795), 瞬时转染 AGS 细胞, qRT-PCR 检测各干扰组 *KLK7* mRNA 表达的变化, Western blotting 检测 AGS 细胞中 HK7 蛋白(由 *KLK7* 基因编码)的表达, MTT 法检测转染后 AGS 细胞的增殖, 流式细胞术检测 AGS 细胞的细胞周期及凋亡。**结果:**4 条 *KLK7*-siRNA 片段中以 *KLK7*-siRNA-416 的干扰效率最高, *KLK7*-siRNA-416 组 *KLK7* mRNA 表达率显著低于 NC 组($0.32 \pm 0.049\%$ vs $0.93 \pm 0.071\%$, $P < 0.01$), *KLK7*-siRNA-416 组转染 48 h 后 AGS 细胞 HK7 蛋白的表达水平显著降低(1.18 ± 0.198) vs (0.52 ± 0.096), $P < 0.01$ 。 *KLK7*-siRNA-416 转染 72 h 后对 AGS 细胞增殖的抑制率达 $(37.70 \pm 0.12)\%$ ($P < 0.05$), 该转染阻滞 AGS 细胞于 G_0/G_1 期但不影响 AGS 细胞的凋亡。**结论:***KLK7*-siRNA 沉默 *KLK7* 的表达可抑制 AGS 细胞的增殖, 可阻滞细胞于 G_0/G_1 期, 对细胞凋亡的作用不明显。

[关键词] 胃癌; RNA 干扰; *KLK7*; AGS 细胞; 增殖; 细胞周期

[中图分类号] R735.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)02-0207-05

Inhibitory effect of *KLK7* siRNA on gastric cancer AGS cell lines

Su Xiaofeng¹, Wang Wenling², Cai Hongpei¹(1. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Outpatient, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** Four siRNA fragments targeting kallikrein-related peptidase 7 (*KLK7*) were synthesized *in vitro*. The most effective siRNA was selected, and the effect of silencing *KLK7* expression on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma AGS cells was observed. **Methods:** Four siRNA fragments targeting *KLK7* (*KLK7*-siRNA-416, *KLK7*-siRNA-596, *KLK7*-siRNA-474 and *KLK7*-siRNA-795) were designed and transiently transfected into AGS cells. qRT-PCR was used to detect the expression of *KLK7* mRNA in each interference group. Western blotting was used to detect the protein expression of HK7 (encoded by *KLK7* gene). AGS cell proliferation, and the cells cycle and apoptosis after transfection were detected by MTT assay and flow cytometry, respectively. **Results:** Among four *KLK7*-siRNAs, *KLK7*-siRNA-416 showed the highest interference efficiency. The ratio of *KLK7* mRNA expression in *KLK7*-siRNA-416 group was significantly lower than those in control group ($0.32 \pm 0.049\%$ vs $0.93 \pm 0.071\%$, $P < 0.01$). The protein expression of HK7 in *KLK7*-siRNA-416 group after transfection for 48 h was significantly decreased (1.18 ± 0.198) vs (0.52 ± 0.096), $P < 0.01$. The cell proliferation of *KLK7*-siRNA-416 group was significantly inhibited after transfection for 48 h, with inhibition rate of $(37.70 \pm 0.12)\%$, $P < 0.05$. Cell cycles were blocked in G_0/G_1 phase by transfection. However, no impact was found in AGS cell apoptosis. **Conclusion:** The silencing expression of *KLK7* by *KLK7*-siRNA inhibited the AGS cell proliferation and block cell cycles in G_0/G_1 phase. However, no impact was found in AGS cell apoptosis.

[Key words] gastric carcinoma; RNA interference; *KLK7*; AGS cell; proliferation; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(2): 207-211]

[作者简介] 苏晓峰(1984-),男,山东省济宁市人,硕士生,主要从事消化系统肿瘤方面的研究。E-mail:xiaofengsu@live.com

[通信作者] 蔡洪培(Cai Hongpei, corresponding author), E-mail:hongpei@163.com

胃癌(gastric carcinoma)是人类第4大恶性肿瘤,全世界欠发达和发达地区的胃癌发病率不同^[1];我国胃癌发病率约占世界的42%左右,特别是农村地区,胃癌发病率更高。尽管近年来有关胃癌的诊疗取得一定进展,但胃癌患者病死率仍然较高^[2-3],一些关键因素如遗传、外部环境、饮食以及基因的相互作用在胃癌发生发展中起到重要作用^[4],因此,进一步探寻胃癌发病的分子机制及治疗手段仍然具有重要意义。人组织激肽释放酶(kallikrein-related peptidase, *KLK*)基因家族有15个成员,这些基因及其相应的编码蛋白分别被命名为:*KLK1*~*KLK15*和HK1~HK15。既往研究^[5]证实,*KLK7*在皮肤正常脱屑、表皮细胞黏附、皮肤损伤修复中发挥作用。新近研究^[6]显示,*KLK*基因家族不仅表达于皮肤、前列腺等组织,在人类各系统肿瘤组织中也有表达。*KLK*基因通过复杂的调控机制,参与了各种肿瘤的生长,发挥着不同的分子生物学功能^[7-8]。既往研究^[9]及本课题组前期工作已证实,*KLK7*蛋白(HK7)表达于胃癌细胞株和胃癌组织,且AGS细胞株中*KLK7* mRNA及其蛋白HK7表达最高,而正常胃黏膜上皮细胞和癌旁组织不表达。本实验通过体外将4个靶向*KLK7*基因的siRNA(*KLK7*-siRNA)转染AGS细胞株,筛选出沉默效果最佳的*KLK7*-siRNA,观察其对胃癌细胞生物学影响,初步了解*KLK7*在胃癌中的作用,为胃癌治疗提供新的细胞模型和思路。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

胃癌AGS细胞株由上海长征医院肿瘤科张霞博士惠赠,源自美国模式菌种收集中心。细胞用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,细胞贴壁85%~95%时用含EDTA-胰酶消化约1~2 min,显微镜下观察贴壁细胞变化、更换培养基,完成传代过程,每2~3 d传代一次。RPMI 1640培养基购自Biowest公司,TRIzol购自Invitrogen公司,逆转录试剂盒(Revert Aid™ K1622)购自Fermentas公司,qRT-PCR试剂盒(THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix)购自东洋纺(上海)公司,BCA蛋白质定量试剂盒(Pro#23227)购自ThermoPierce公司,*KLK7*兔抗人多克隆抗体(GTX103548、GTX100700、GTX103548)购自Genetex公司,Lipofectamine™ 2000购自Invitrogene公司,DMSO购自Amresco公司。主要仪器Real Time PCR仪(ABI PPRISM 7300)购自Life Technologies公司,

MilliQ超纯水系统购自密理博公司。

设计合成*KLK7*-siRNA:根据Genebank提供的人*KLK7*(NM_005046.3)mRNA的序列,设计了4对siRNA,由上海吉玛公司合成。干扰序列分别为*KLK7*-416: CCACACAGACCCAUGUUAATT; *KLK7*-474: CAUCCAUGGUGAAGAAAGUTT; *KLK7*-596: GUGGAUGUCAAGCUCAUCUTT; *KLK7*-795: CCCAG-GAGUCUACACUCAATT。

1.2 AGS细胞转染

实验分为空白细胞对照组(control group,常规培养、无处理因素的AGS细胞组)、NC siRNA组(negative control,非特异性siRNA转染细胞阴性对照组)、siRNA oligo干扰组和Mock组(转染试剂对照组)。常规培养AGS细胞,10 cm培养皿中培养至约85%融合时接种6孔板,生长至40%~50%开始转染实验。按照Lipofectamine™ 2000转染试剂说明书操作,5 μl Lip2000(脂质体转染试剂)加入250 μl无血清1640培养基,放置5 min,5 μl各组siRNA加入250 μl无血清1640培养液,轻轻混合后放置15~20 min。总管吸取500 μl放入6孔板内,培养0、24、48 h,分别收样,所得细胞根据需要行qRT-PCR、Western blotting法检验干扰效率,并筛选沉默效率最高的siRNA,进行后续实验。

1.3 qRT-PCR检测细胞中*KLK7* mRNA的表达

六孔板每孔加入500 μl~1 ml TRIzol吹打裂解细胞,常规抽提细胞总RNA,测定D₂₆₀、D₂₈₀值计算RNA浓度,所得RNA进行cDNA合成。逆转录使用20 μl体系:Primer 1 μl、DEPC H₂O + RNA1 1 μl、5×缓冲液4 μl、10 mmol/L dNTP MIX 2 μl、RNase Inhibitor 1 μl、RT酶1 μl。体系42℃水浴1 h,70℃孵育5 min。人*KLK7*上游引物:5'-AGTGCTG-GAGAAGAGTCAGT-3',下游引物:5'-AAAGGTGGT-GAATAAGGG T-3';β-actin上游引物:5'-AAGGTGA-CAGCAGTCGGTT-3',下游引物:5'-TGTGTGGACTTGGAGAGG-3'。qRT-PCR反应体系:引物0.8 μl、2×缓冲液(SYBR MIX)10 μl、ddH₂O 7.2 μl、cDNA 2 μl,共计20 μl。上机,扩增曲线分析95℃ 5 min,95℃ 5 s→60℃ 30 s),溶解曲线分析(95℃ 15 s,60℃ 10 s→95℃ 15 s)40个循环。对qRT-PCR结果进行计算^[10]。

1.4 Western blotting检测细胞中HK7蛋白的表达

六孔板每孔加入100 μl RIPA裂解液,4℃下裂解20 min,刮下细胞置冰上充分裂解20 min。加入30 μl 4×缓冲液放入干燥热水器15 min,超声、离心,分离到的蛋白放入-80℃冰箱保存。依次配置

下上层分离胶、积层胶,每孔上样量 30 μl ,电泳,溴酚蓝条带至玻璃板下沿约 0.5 cm 时终止电泳。裁剪适当大小 PVDF 膜,在 280 mA 恒定电流下,电转移 90 min;孵育一抗(KLK7 兔抗人抗体,1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,隔日室温孵育二抗(羊抗兔 IgG,1:2 500)90 min;1:1 混合 ECL 发光液 A 液与 B 液进行发光显色。Image Lab 4.0,进行数据分析。

1.5 MTT 法检测 KLK7-siRNA 对 AGS 细胞增殖的影响

选择最佳 KLK7-siRNA 片段转染 AGS 细胞株,分别在 24、48、72、96 h 时间点观察干扰后 AGS 细胞增殖情况,实验期间换液处理 2~3 次。按 4 个时间点每孔加 10 μl MTT(5 g/L),继续孵箱培养 4 h,吸干液体后加入 DMSO,酶标仪检测 570 nm 处光密度值(D)。细胞抑制率(%)=(对照组 D 值 - 实验组 D 值)/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测 KLK7-siRNA 对 AGS 细胞凋亡的影响

选择 MTT 实验所得干扰效率最佳的时间,以流式细胞术检测 AGS 细胞凋亡情况。不含 EDTA 胰酶消化并搜集 AGS 细胞,加入 200 μl 缓冲液悬起细胞;加入 2.5 μl Annexin V-FITC,漩涡混匀器混匀,室温、避光反应 15 min;取 200 μl 悬浮细胞,加 5 μl PI,行流式细胞仪检测。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS18.0 统计软件,两组独立数据间比较采用 t 检验;细胞周期间差异的统计分析采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FAM 标记的 siRNA 高效转染 AGS 细胞株

使用上海吉玛公司商品化 FAM 标记的阴性对照 siRNA oligo(绿色荧光标记的通用阴性对照 FAM-siRNA)检测 AGS 细胞转染效率,荧光显微镜下可见转染的 AGS 细胞呈绿色荧光(图 1)。本实验所得结果与其他实验结果^[11]一样均显示 AGS 细胞具有较好的转染效果,siRNA 能够有效转染进入细胞内。

2.2 KLK7-siRNA-416 转染有效下调 AGS 细胞 KLK7 mRNA 表达

qRT-PCR 法检测结果如图 2 所示:NC 组、KLK7-siRNA-416 组、KLK7-siRNA-596 组、KLK7-siRNA-474 组、KLK7-siRNA-795 组转染 24 h 后与空白对照组相比,KLK7 mRNA 表达率分别是(0.93 \pm 0.071)%、(0.32 \pm 0.049)%、(0.51 \pm 0.096)%、

(0.96 \pm 0.032)%、(0.9 \pm 0.046)%、转染 48 h 后为(1.04 \pm 0.023)%、(0.63 \pm 0.0359)%、(0.83 \pm 0.0815)%、(1.08 \pm 0.0622)%、(1.2 \pm 0.0593)%。以上结果显示,KLK7-siRNA-416 转染 AGS 细胞 24 h 后的 KLK7 mRNA 表达最低,说明 KLK7-siRNA-416 可以有效下调 KLK7 mRNA 表达($P < 0.05$)。

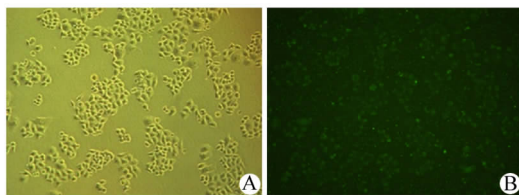


图 1 FAM-siRNA 高效转染 AGS 细胞株 ($\times 100$)

Fig.1 FAM-siRNA effectively transfected into AGS cells($\times 100$)

A: Under a light microscope; B: Under a fluorescence microscope

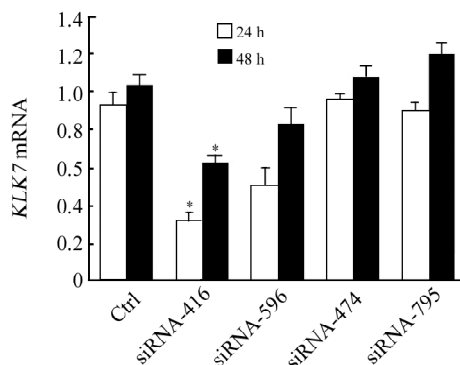


图 2 qRT-PCR 法检测 AGS 细胞 KLK7 mRNA 的表达

Fig.2 KLK7 mRNA expression in AGS cells detected by qRT-PCR

* $P < 0.05$ vs Ctrl

2.3 KLK7-siRNA-416 转染有效抑制 HK7 蛋白的表达

NC 组、KLK7-siRNA-416 组、KLK7-siRNA-474 组、KLK7-siRNA-596 组、KLK7-siRNA-795 组转染 48 h 后行 Western blotting 法检测 HK7 蛋白表达,条带经灰度分析软件量化分析,各组转染 AGS 细胞后 HK7 蛋白表达依次为:1.18 \pm 0.198、0.52 \pm 0.096、1.64 \pm 0.098、1.44 \pm 0.212、1.05 \pm 0.139(如图 3),与 NC 组相比,KLK7-siRNA-416 更加显示出抑制蛋白表达的优势($P < 0.05$)。结合 qRT-PCR 检测结果,说明实验成功筛选出有效下调 KLK7 基因表达的干扰序列为 KLK7-siRNA-416,在 mRNA 和蛋白水平均能有效抑制 KLK7 基因表达。

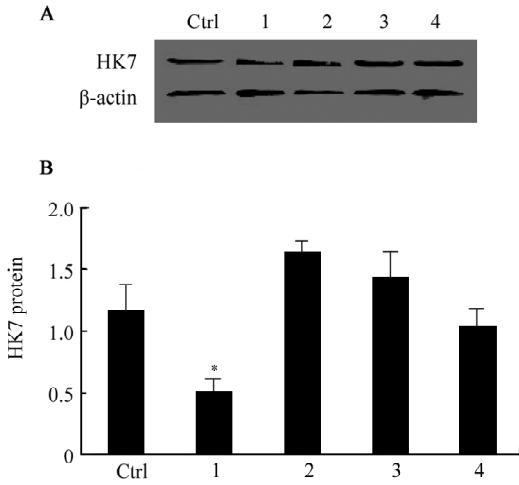


图3 Western blotting 检测 KLK7-siRNA 转染后 HK7 蛋白表达

Fig. 3 Expression of HK7 protein after KLK7-siRNA transfection

A: Western blotting; B: Image J quantitative analysis
 1: KLK7-siRNA-416; 2: KLK7-siRNA-596;
 3: KLK7-siRNA-474; 4: KLK7-siRNA-795
 * $P < 0.05$ vs Ctrl

2.4 KLK7-siRNA-416 显著抑制 AGS 细胞的增殖

KLK7-siRNA-416 瞬时转染 AGS 细胞后细胞增殖呈现缓慢抑制, 镜下细胞形态呈梭状, 少数呈杆状。MTT 法连续检测 4 d, 其中在 72 h 后 AGS 细胞生长抑制最为显著, 说明 KLK7-siRNA-416 可以明显抑制细胞增殖。图 4 显示, 24 h 细胞增殖抑制率为 $(15.85 \pm 0.17)\%$, 48 h 抑制率为 $(23.88 \pm 0.21)\%$, 72 h 抑制率为 $(37.70 \pm 0.12)\%$ 。

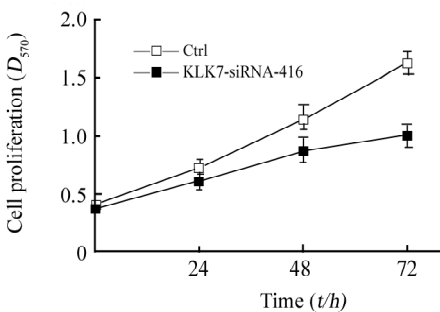


图4 MTT 法检测 KLK7-siRNA-416 转染对 AGS 细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of KLK7-siRNA-416 transfection on proliferation of AGS cells detected by MTT assay

2.5 KLK7-siRNA-416 阻滞 AGS 细胞于 G₀/G₁ 期

实验结果如图 5 所示, KLK7-siRNA-416 组与 NC 对照组相比, 转染 48 h 后 AGS 细胞的 G₀/G₁ 期比例明显增加 $[(55.94 \pm 2.01)\% \text{ vs } (49.58 \pm 1.24)\%, P < 0.05]$, 图中未见凋亡峰出现, 说明 NC 组与 KLK7-siRNA-416 组对细胞凋亡的影响未见明显改变, 提示 KLK7 沉默后对凋亡影响较小或不大, 但可阻滞细胞于 G₀/G₁ 期。

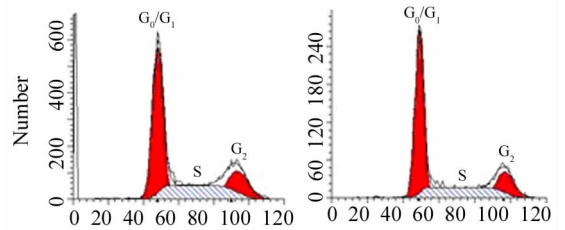


图5 流式细胞术检测 KLK7-siRNA-416 转染对 AGS 细胞周期的影响

Fig. 5 Impact of KLK7-siRNA-416 transfection on AGS cell cycle detected by flow cytometry

3 讨论

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 作为成熟的基因研究技术, 于转录后水平对靶基因表达进行特异性调控^[12]。该技术操作简单、可调控性强、靶向作用明显, 可以高效抑制靶基因表达^[13]。目前细胞研究的转染试剂种类较多, 脂质体转染试剂能够将外源性基因整合至细胞内使之共表达, Lipofectamine™2000 是目前较经济和实用的转染载体, 具有较高的转染效率, 广泛应用于基因转染研究^[14-15]。转染试剂“携”siRNA 片段入胞后, 由于片段设计差异导致相同基因 siRNA 特异性不同, 不能有效沉默或降解靶基因, 本实验中亦出现了 3 条 KLK7-siRNA 片段作用较差, 如 KLK7-siRNA-474 片段转染后 KLK7 蛋白出现轻微上调, 不排除 KLK7-siRNA 转染后出现脱靶点效应、以及通过其他机制引起基因表达上调。引起脱靶现象的原因有很多, 如模体匹配、长 dsRNA 等均能使所合成 siRNA 片段与非靶基因结合^[16]。由于人体细胞内基因复杂性, 实际科研中 RNAi 允许出现一定程度碱基缺失和失配, 可以理解为脱靶效应风险是合理存在, 但仍需通过改进设计、优化化学修饰等避免脱靶效应或非特异性沉默现象的发生^[17-18]。

近年来, 新的肿瘤药物不断问世, 使胃癌的生存期较前得到一定改善, 但进展期胃癌患者 5 年生存

率仍然偏低。随着肿瘤机制研究深入,一些关键分子或信号通路药物被认为是一种新的有前途的治疗手段^[19],例如靶向 HER2 受体的药物曲妥珠单抗能够显著改善肿瘤患者总体生存期^[20],总之,肿瘤靶向治疗将成为未来肿瘤治疗的重要方向。既往实验结果及前期研究已经表明,*KLK7* 存在于胃癌组织和细胞中,在不同类型胃癌组织中表达具有差异,并可能扮演了重要作用。

本实验成功筛选出沉默 *KLK7* 效率最高的 *KLK7*-siRNA-416 片段,瞬时转染入胃低分化腺癌 AGS 细胞株,发现该 *KLK7* 沉默后不论 mRNA 水平还是 HK7 蛋白水平表达均有效下调,同时转染 AGS 细胞具有明显的增殖抑制改变,说明 *KLK7* 参与胃癌细胞增殖变化。实验进一步证实,引起增殖变化的原因是转染后的细胞株阻滞于 G₀/G₁ 期,而 AGS 细胞的凋亡几乎没有变化,这说明 *KLK7*-siRNA-416 沉默 *KLK7* 基因主要通过影响细胞周期的 DNA 合成前期而抑制细胞增殖。正常细胞生长过程中受到各种因素影响发生 DNA 损伤,若损伤后不能及时修复,可导致基因组不稳定性大大增加,而细胞周期紊乱或改变是基因组不稳定的中心环节之一,结果导致不稳定细胞进一步癌变或直接参与肿瘤发生与发展^[21-22]。*KLK7* 基因对胃癌细胞周期具有显著影响的结果为今后 *KLK7* 与胃癌关系的研究提供了实验依据,*KLK7* 有可能成为肿瘤诊治的潜在靶点。

[参 考 文 献]

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

[2] 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2011, 20(3): 162-169.

[3] 郑荣寿, 张思维, 吴良有, 等. 中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2012, 21(1): 1-12.

[4] 李鹏飞, 冯靖宇, 严滢滢, 等. 胃癌易感基因筛选及多基因危险度分析 [J]. 环境与职业医学, 2011, 28(9): 531-534.

[5] Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, et al. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases [J]. Br J Dermatol, 2005, 153(2): 274-281.

[6] Inoue Y, Yokobori T, Yokoe T, et al. Clinical significance of human kallikrein7 gene expression in colorectal cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(11): 3037-3042.

[7] Lawrence MG, Lai J, Clements JA. Kallikreins on steroids: Structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus [J]. Endocr Rev, 2010, 31(4): 407-446.

[8] Helo P, Cronin AM, Danila DC, et al. Circulating prostate tumor cells detected by reverse transcription-PCR in men with localized or castration-refractory prostate cancer: Concordance with cellsearch assay and association with bone metastases and with survival [J]. Clin Chem, 55(4): 765-773.

[9] Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids [J]. Clin Chem, 2007, 53(8): 1423-1432.

[10] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta C (T)) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.

[11] Liu YL, Bai WT, Luo W, et al. Downregulation of NDRG1 promotes invasion of human gastric cancer AGS cells through MMP-2 [J]. Tumour Biol, 2011, 32(1): 99-105.

[12] Scherer LJ, Rossi JJ. Approaches for the sequence-specific knock-down of mRNA [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(12): 1457-1465.

[13] Sato S, Hagihara M, Sugimoto K, et al. Chemical approaches untangling sequence-specific DNA binding by proteins [J]. Chemistry, 2002, 8(22): 5066-5071.

[14] Mo RH, Zaro JL, Ou J, et al. Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells [J]. Mol Biotechnol, 2012, 51(1): 1-8.

[15] Liu YL, Bai WT, Luo W, et al. Downregulation of NDRG1 promotes invasion of human gastric cancer AGS cells through MMP-2 [J]. Tumor Biol, 2011, 32(1): 99-105.

[16] Lew-Tabor AE, Kurscheid S, Barrero R, et al. Gene expression evidence for off-target effects caused by RNA interference-mediated gene silencing of ubiquitin-63E in the cattle tick rhipicephalus microplus [J]. Int J Parasitol, 2011, 41(9): 1001-1014.

[17] Ma Y, Creanga A, Lum L, et al. Prevalence of off-target effects in drosophila RNA interference screens [J]. Nature, 2006, 443(7109): 359-363.

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

[19] Chari RV. Targeted cancer therapy: Conferring specificity to cytotoxic drugs [J]. Acc Chem Res, 2008, 41(1): 98-107.

[20] Purmonen TT, Pänkäläinen E, Turunen JH, et al. Short-course adjuvant trastuzumab therapy in early stage breast cancer in Finland: cost-effectiveness and value of information analysis based on the 5-year follow-up results of the FinHer Trial [J]. Acta Oncol, 2011, 50(3): 344-352.

[21] Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective [J]. Nature, 2000, 408(6811): 433-439.

[22] Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases [J]. Mech Ageing Dev, 2007, 128(7/8): 460-462.

[收稿日期] 2012 - 11 - 25

[修回日期] 2013 - 01 - 28

[本文编辑] 王莹, 黄静怡