

转 hGM-CSF 基因 HepG2 细胞疫苗侵袭性和生长活性初步检测 *

程元星¹ 段晓明^{2△} 曾治中¹ 黄璐¹ 贺修胜³

(1 南华大学研究生院 湖南 衡阳 421001 2 长沙市第四医院消化内科 湖南 长沙 410000 ;

3 南华大学肿瘤研究所 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的 探讨经 60Co 处理的转 hGM-CSF 基因的 HepG2 肝癌疫苗的侵袭性和生长活性变化。方法 体外培养三种肝癌细胞 (①野生型 HepG2 肝癌细胞②转染 hGM-CSF 基因的 HepG2 肝癌细胞③60Co 射线处理的转 hGM-CSF 基因的 HepG2 肝癌疫苗) 采用 MTT 方法检测三种细胞在 24h、48h、72h 的 OD 值并绘出生长曲线; 利用 transwell 小室进行体外侵袭实验来观察上述三种细胞侵袭性; 用 RT-PCR 技术检测上述三种细胞基质金属蛋白酶 2(MMP-2)在 mRNA 水平上表达的变化。结果 经 60Co 照射处理的转 hGM-CSF 基因的 HepG2 肝癌疫苗组 OD 值在相同培养时间点较其他两组明显变小且差异有显著性(P<0.05)。三种细胞 (上述①②③种细胞)transwell 侵袭试验显示: ③组穿过人造基底膜的细胞数量明显少于前两组; RT-PCR 示: ③组细胞的 MMP-2 的 mRNA 的表达明显低于①②。结论 经过 60Co 处理过的转 hGM-CSF 基因的 HepG2 肝癌疫苗的侵袭性和生长活性均明显降低。

关键词 hGM-CSF 基因; Transwell 体外侵袭; HepG2 肝癌疫苗

中图分类号 Q75, R735.7 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)09-1621-04

Initial Detection of Invasion and Growth Activity of hGM-CSF Gene Transfected HepG2 Cell Vaccine*

CHENG Yuan-xing¹, DUAN Xiao-ming^{2△}, ZENG Zhi-zhong¹, HUANG Lu¹, HE Xiu-sheng³

(1 Nanhua University, Graduate School, Hengyang, Hunan Province 421001, China;

2 Department of Gastroenterology, Fourth Hospital of Changsha City, Hunan Province, Changsha 410000;

3 Cancer Research Institute, Nanhua University, Hengyang, Hunan Province 421001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the invasion and growth of HepG2 liver cancer vaccines transferred by hGM-CSF gene and which be treated by Co60. **Methods:** Three hepatoma cells were cultured in vitro (①wild-type HepG2 hepatoma cells②HepG2 hepatoma cells transfected by hGM-CSF gene ③ liver cancer vaccines HepG2 transfected by hGM-CSF gene and irradiated by 60Co). The OD values of three types of cells cultured at 24h, 48h, 72h was detected by MTT (①②③ these kinds of cells) and the growth curve was plotted. The three cell invasion was detected by using in vitro transwell chamber invasion assay; The expression of three cell matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) was detected by RT-PCR; **Results:** 60Co irradiation of hGM-CSF gene transfected liver cancer vaccines HepG2, the growth activity of culture at the same time was significantly lower than that of the other two groups and the difference was significant (P < 0.05). Three kinds of cell (①②③ these kinds of cells) transwell invasion test showed: ③ group the number of cells through artificial basement membrane was significantly less than that of the first two groups; ③ group of cells in the MMP-2 mRNA was significantly lower than that of ①② group. **Conclusion:** The invasion of HepG2 liver cancer vaccines transferred by hGM-CSF gene and treated by 60Co reduced significantly.

Key words: hGM-CSF gene; Transwell in vitro invasion; HepG2 liver cancer vaccines

Chinese Library Classification(CLC): Q75, R735.7 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)09-1621-04

前言

肝癌的发病率日益增高, 我国肝癌发病率位居全球第一, 并且我国的肝癌死亡率也是居全球之首, 约 55%^[1]。肝癌是高侵袭性的恶性肿瘤, 整体预后很差, 肝癌的手术切除仍是各种疗法中疗效最好者。但癌细胞在肿瘤切除术后转移和扩散, 导致癌症复发的也是长期困扰医学界的一大难题^[2]。随着对肿

瘤发生、发展的分子机制的深入研究和生物技术的迅速发展, 生物治疗(Biotherapy)已经成为肿瘤综合治疗中继手术、化疗、放疗后肿瘤治疗的第四模式, 它通过调动宿主的天然防卫机制或给予天然(或基因工程)产生的靶向性很强的物质来取得抗肿瘤效应^[3-4]。近年来, 肝癌的免疫治疗已成为关注的研究热点^[5-6]。大量研究表明, 通过对机体免疫功能具有广泛调节作用的细胞因子基因转入肿瘤细胞后制成肿瘤疫苗, 能有效地激

* 基金项目 湖南省卫生厅科研基金资助项目 (B2005-178)

作者简介 程元星(1982-) 男, 硕士研究生, 研究方向 消化道肿瘤。E-mail:chengyuanxing3@163.com

△通讯作者 段晓明(1964-) 男, 教授, 硕士生导师。E-mail: xiaomingduan@21cn.com

(收稿日期 2010-12-12 接受日期 2011-01-07)

活机体的抗肿瘤免疫功能^[7]。随着对肝癌疫苗研究的深入各种各样的肝癌疫苗应运而生。但是这种肿瘤疫苗自身的侵袭性和致瘤性,成为继肿瘤疫苗产生后大家最关心的事。本实验针对转 hGM-CSF 基因肝癌疫苗其体外侵袭性和生长速度的体外实验验证,为转 hGM-CSF 基因 HepG2 肝癌肿瘤疫苗安全性做初步研究,也为其他肿瘤疫苗的安全性检查提供一些思路。

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 试验细胞 本课题前期试验做出并 -80℃ 保存的转 hGM-CSF 基因 HepG2 肝癌疫苗和 hGM-CSF 基因转染肝癌细胞;南华肿瘤所提供的野生型 HepG2。

1.1.2 主要仪器试剂 RMPI-1640 培养基购于美国 Meco 公司;新生牛血清杭州四季清公司;胰蛋白酶 Gibco 公司;4%的多聚甲醛天津市大茂化学试剂厂;总 RNA/DNA 提取试剂盒、RT 试剂盒、PCR 试剂盒购于 Sigma 公司;Transwell 小室(3428 型)Corning 公司;Matrigel 基质胶(9.2mg/ml)。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞培养 复苏后用含 10% 新生牛血清的 RMPI-1640 培养基,在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱内进行细胞培养,每 1-2 天换液一次,每 2-3 天后细胞大部长到瓶底约 90% 时传代一次,3-4 天后冻存细胞以备试验使用。

1.2.2 MMT 法测三种细胞的体外生长活性 4 个肝癌细胞种到 96 孔板中,在一纵列中设 5 个复孔,在横行设分组:①野生型 HepG2 肝癌细胞②转 hGM-CSF 基因的 HepG2 肝癌细胞(下文简称转基因组)③Co60 处理的转 hGM-CSF 基因 HepG2 肝癌疫苗(下面简称疫苗组)。然后放到 37℃ 的 5% CO₂ 培养箱中培养 24h、48h、72h 后分别加 MTT 溶液,继续培养 4 小时后弃上清(注意弃上清时不要把甲瓒结晶丢掉),每孔加 DMSO 150ul 37℃ 荡 10 分钟后于 490 波长测 OD 值(OD 值的大小即间接反映活细胞数目)。用单向方差分析各组活细胞数目差异,并绘出细胞生长曲线图。

1.2.3 transwell 体外细胞侵袭实验 在 Transwell 培养板(24 孔板 8μm 孔径、6.5mm 膜直径)膜表面铺 Matrigel 人造基质胶,把各上述三种细胞以相同的细胞浓度(4×10⁴/孔)种植到 transwell 小室内部,每孔设 3 个复孔,在下室加入 600ul 含 20% FBS 的 RMPI-1640 培养基。然后在 37℃、5% CO₂ 培养箱

中孵育 24 小时,以棉签轻轻拭去上室滤膜内面的细胞,保留定向迁移至滤膜下表面的细胞。然后 4% 多聚甲醛室温固定 15 分钟,0.1% 结晶紫染色,在倒置显微镜(×200)下观察照相,每孔随机取 5 个高倍镜视野照相计数迁移至小室下面的细胞数即反映细胞侵袭能力的高低。然后重复上述试验 3 次。

1.2.4 RT-PCR 检测侵袭性 MMP-2 基因在三种细胞中的表达情况细胞分组:①野生型 HepG2 肝癌细胞组②未经 Co60 射线照射的转基因 HepG2 细胞组③经 Co60 射线照射的做成疫苗的细胞组。提取各组细胞中 mRNA 并验证其完整性,然后进行 RT-PCR 实验,检测 MMP-2 基因在 mRNA 水平上的表达情况(引物序列登录号 N100104-0246 和 N100104-0247)引物序列:上游 5'-TGGATGATGCCTTTGCTCG-3',下游 5'-CCATCG-GCGTTCCCATACT-3';扩增出 271 bp 的片段 β-acti 上游 5'-GGACCTGACTGACTACCTC-3' 下游 5'-CATACTCCT-GCTTGCTGAT-3' 产物为 553bp 反应条件:94℃ 预变性 5min,然后 94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 30s,循环 34 次,最后 72℃ 充分延伸 10min。扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测结果,在凝胶成像系统中测出各条带面积灰度值,采用美国 Biorad 公司 Quantity one 4.0 图像分析软件进行扫描分析,三组细胞中 MMP-2 基因与 β-肌动蛋白灰度值的比值,以③组的最小,间接反映③组 mRNA 表达较少。

1.3 统计学处理

数据以 mean±SD 表示,采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析,数据采用 One-Way ANOVA 分析,P<0.05 表示有显著性。

2 结果

2.1 细胞侵袭能力的定量比较

Transwell 小室法结果显示,野生型肝癌 HepG2 细胞组和转基因组图中穿过微孔滤膜的细胞数目众多(80±6)个,且密集分布,而在同样的培养时间内疫苗组中穿过微孔滤膜的细胞明显减少(18±3)个,零星散在分布,而疫苗组图中的细胞停留在孔内,而 A 图中的细胞大部分已穿过贴附在膜背面(图 1)。显微镜下计数显示肝癌 HepG2 野生型和转基因组细胞数(85 个/视野和 82 个/视野)明显高于疫苗组细胞数(13 个/视野),在每组 9 个样本中随机取 3 个样本求平均数经统计学处理,三种细胞穿透基底膜的数目有差异且差异具有显著性(P<0.05)。说明做成的肝癌疫苗其侵袭性明显降低(见图 2)。

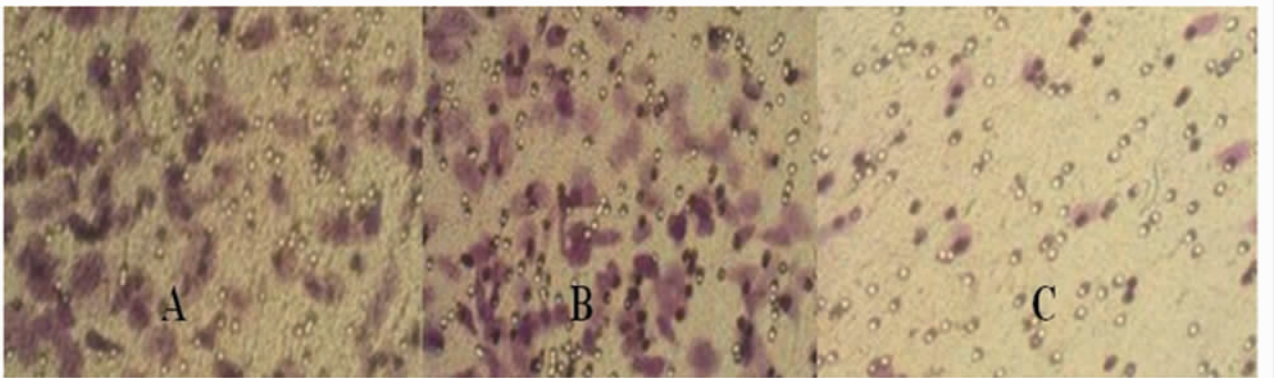


图 1 Transwell 小室测定三组细胞体外侵袭能力(结晶紫染色×200):A: 野生型肝癌 HepG2 细胞 B: 转基因组 C: 疫苗组

Figure 1 Transwell chamber determination of invasion of three groups of cells (crystal violet stain × 200): A: wild-type liver HepG2 cell B: GM Group C: vaccine group

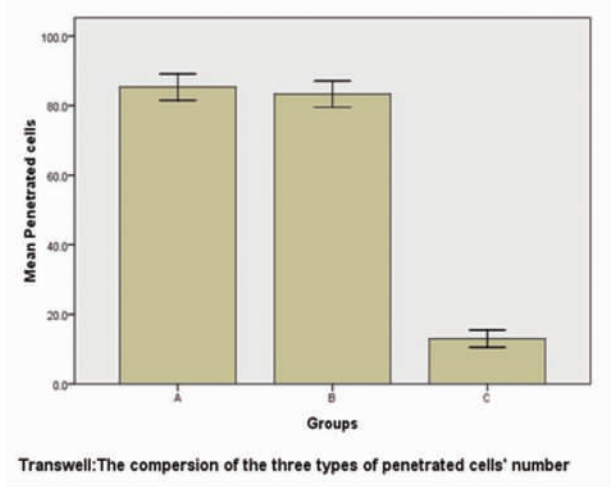


图2 三种不同细胞体外侵袭能力的比较:A: 野生型肝癌 HepG2 细胞; B 转基因细胞;C: 疫苗组细胞

Figure 2 Three different cell invasion in vitro comparison:A: wild-type hepatoma cells HepG2;B: transgenic cells;C: cells in the vaccine group

2.2 RT-PCR 分析

用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 琼脂糖凝胶电泳分析验证其完整性,有图可见 28S、18S、5S 均跑出证明提取总 RNA 均完整(见图 3);反转录成 cDNA,以此为模板,进行 PCR 鉴定,均可扩增出 553bp 左右的条带。三种细胞(野生组、转基因组、疫苗组)MMP-2 均有表达,以疫苗组表达最弱(见图 4)。经过 Biorad 公司 Quantity one 4.0 图像分析软件进行扫描分析后的各组数据,以各组 MMP-2 基因与 β -肌动蛋白灰度值的比值为纵坐标绘图,显示疫苗组比值最小,反映其表达最弱(见图 5)。

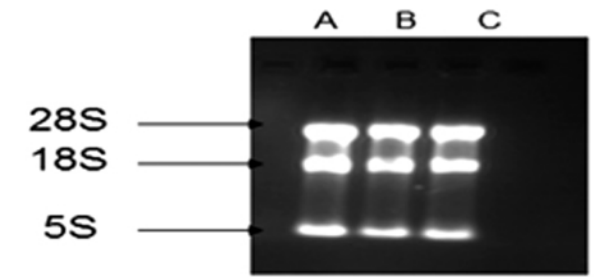


图3 三种不同肝癌细胞总 RNA 提取结果:A.野生型肝癌HepG2 组; B.转基因组 ;C.疫苗组 ;

Figure 3 Three different hepatoma cell total RNA extraction results;A. Groups of wild-type liver HepG2; B. transgenic group;C. vaccine group;

2.3 MTT 法检测三组细胞的生长活性

24h、48h、72h 后三组不同细胞 A、B 两组生长旺盛,且细胞状态好,细胞密集;C 组细胞在相同培养时间细胞生长慢,且细胞状态差,稀疏。经单向方差分析(One-Way ANOVA)有显著性差异($F_{0.05}(2,4)=6.94, F_{24h}=74.25, F_{48h}=61.79, F_{72h}=98.56, P<0.05$),并绘制生长曲线(见图 6)。

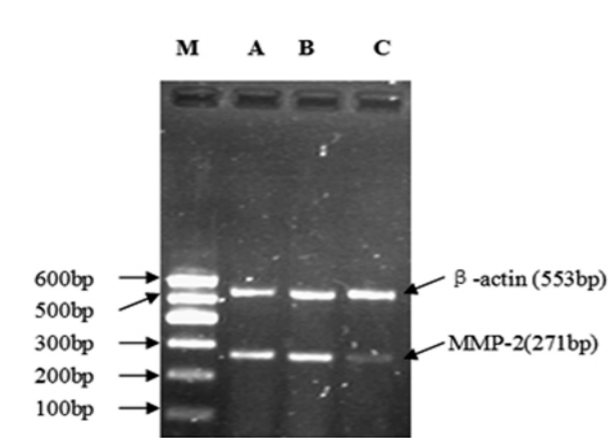


图4 三种细胞组的 MMP-2 表达的 RT-PCR 分析 M :DNA maker (600bp); A.野生型肝癌 HepG2 组; B.转染后肝癌细胞组 ;C.经 Co60 照射做成的肝癌疫苗组

Figure 4 Three cell groups in the expression of MMP-2 RT-PCR analysis of M: DNA maker (600bp); A. HepG2 group of wild-type liver; B. hepatoma cells transfected group; C. made by Co60 irradiation HCC vaccine group

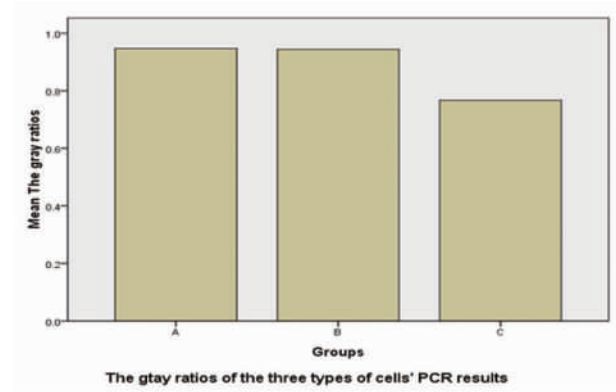


图5 经过 Biorad 公司 Quantity one 4.0 图像分析软件进行扫描分析后的各组数据再经过 spss16.0 分析后处理 A 组和 B 组($P=0.794$)A 组和 C 组及 B 组和 C 组($P=0.000$) :A.野生型肝癌 HepG2 组; B.转染后肝癌细胞组 ;C.经 Co60 照射做成的肝癌疫苗组。

Figure 5 The company through the Biorad Quantity one 4.0 image analysis software after scanning the data in each group go through spss16.0 analysis of group A and B treatment group ($P=0.794$) A group and B group and C group and C group ($P=0.000$) :A. Groups of wild-type liver HepG2; B. hepatoma cells transfected group; C. made by Co60 irradiation of liver cancer vaccine.

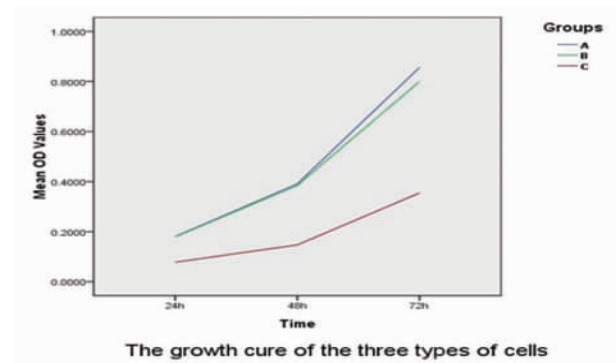


图6 三组不同细胞(A 野生型 HepG2 ;B 转基因组 ;C 疫苗组) 生长曲线(n=3)的生长曲线(n=3) ;

Figure 6. Three different cells (A: wild-type HepG2; B: transgenic group; C: vaccine group) growth curve (n = 3) of the growth curve (n = 3);

3 讨论

肿瘤的恶性主要表现在侵袭、转移和生长速度^[8]。肿瘤的浸润、转移是多步骤、多阶段进行的一个极其复杂的过程,癌细胞从原发灶脱落后,必须突破细胞外基质(extracell matrix ECM)和血管壁基底膜组成的结构屏障,才能进入宿主微循环^[9]。ECM的蛋白水解是肿瘤局部侵袭的关键环节之一,是肿瘤侵袭性的标志^[10]。MMPs几乎能够降ECM的所有成分,因而其成为近年来有关肿瘤侵袭和转移研究的热点,MMP-2 MMPs家族中主要成员之一,它在肿瘤细胞突破基底膜屏障,侵袭转移中起着重要作用,大量研究表明MMP-2表达上调肿瘤侵袭转移有关^[11]。已有研究显示MMP-2基质金属蛋白酶Matrixmetalloproteinases与多种肿瘤侵袭转移有关^[12]。高表达MMP-2的原发性肝癌细胞易发生复发和转移^[13-15]。通过检验肿瘤细胞中MMP-2的表达可以判断肿瘤恶性程度和转移倾向^[16-17]。生长速度比较快是恶性肿瘤的另一特征。现在肿瘤疫苗的研制,特别是转基因疫苗的研制已成为热点且在某些以取得了临床疗效,相当一部分肿瘤疫苗的制作是通过转基因后再通过无力或化学的方法亚致死灭活制成肿瘤疫苗^[18]。但其潜在危险性(即肿瘤疫苗的致瘤性:在体内种植生长及侵袭转移)一直未得到明确的答案。

本研究通过肿瘤疫苗的生长速度和体外侵袭性来验证经过⁶⁰Co处理过的转hGM-CSF肝癌疫苗恶性程度减小致瘤性大大降低,来反映转hGM-CSF基因的HepG2肝癌疫苗肿瘤疫苗的致瘤性。通过transwell体外侵袭试验和RT-PCR技术检验MMP-2在各组不同细胞中表达的变化间接反映经⁶⁰Co照射后制成肝癌疫苗的细胞侵袭性及生长活性明显下降;通过MTT法检测绘制细胞生长曲线证明了经过⁶⁰Co照射后的转hGM-CSF肝癌细胞其生长速度明显降低。为瘤疫苗的临床前安全性检测提供了新思路。

本研究是转hGM-CSF基因制备肿瘤疫苗的肿瘤生物治疗与临床研究的安全性初步验证阶段工作。通过传统且经典的MTT方法来验证三种细胞生长活性的变化。因是经典方法经过多人验证可靠性高;不足之处就是MTT易造成细胞污染影响结果。Transwell体外侵袭实验利用肿瘤细胞穿过人造ECM的数目直接反映肿瘤细胞的侵袭性高低,操作方便,检测时间短便于以后肿瘤疫苗的大规模检验。利用传统经典的RT-PCR技术检测肿瘤侵袭性热点基因MMP-2的表达的变化来从分子生物学角度间接反映肝癌疫苗突破血管基底膜的趋向变化。本实验和以往检测肿瘤的恶性程度不同点是反向思维,利用肿瘤疫苗本身恶性程度的变化来初步验证疫苗的致瘤性,间接反映肿瘤疫苗的安全性,为肿瘤疫苗的安全性检测提供了新思路;不足之处就是只进行了体外实验,没有进一步通过动物体内试验来验证疫苗的安全性。有待本实验组接下来的工作去完成。本实验提示转染hGM-CSF基因的肝癌HepG2经过⁶⁰Co处理后做成的疫苗,经体外实验证明其体外生长活性大大降低,其侵袭性也大大降低,从而间接证实了其致瘤性大大降低。

参考文献(References)

[1] 汤钊猷. 肝癌临床研究现状[J]. 2008年上海第二届肝癌综合介入诊疗国际会议论文汇编, 上海, 2008, 2: 1-4

Tang Zhao-you. Clinical researches on liver cancer[J]. Liver cancer in 2008 Shanghai Comprehensive Intervention Second International Conference Papers Series, Shanghai, 2008, 2: 1-4

- [2] Yao V, Platell C, Hall JC. Dendritic cells [J]. ANZJ Surg, 2002, 72 (7): 501-506
- [3] 李岩, 梁婧. 肿瘤生物治疗[J]. 山东医药, 2010, 50(1): 105-106
Li Yan, Liang Jing. Tumor biological therapy [J]. Shandong Medicine, 2010, 50 (1): 105-106
- [4] 林垚, 李承博, 侯东泽, 等. 肿瘤生物进展[J]. 中国实用医药, 2009, 4(1): 225-226
Lin Yao, Li Cheng-bo, Hou Dong-Ze, et al. Advances in tumor biology [J]. Chinese Journal of Practical Medicine, 2009, 4 (1): 225-226
- [5] Wolschek MF, Thallinger C, Kurska M, et al. Specific systemic nonviral gene delivery to human hepatocellular carcinoma xenografts in SCID mice[J]. J Hepatology, 2002, 36(5): 1106-1114
- [6] Ma L, Luo L, Qiao H, et al. Complete eradication of hepatocellular carcinomas by combined vasostatin gene therapy and B7H3-mediated immunotherapy[J]. J Hepatol, 2007, 46(1): 98-106
- [7] 李志伟, 王占民, 吴小鹏, 等. 双自杀基因CD、HSV-tk共表达对肝门部胆管癌细胞杀伤作用实验研究 [J]. 中国现代普通外科进展, 2004, 7(1): 19-21
Li Zhi-wei, Wang Zhan-min, Wu Xiao-peng, et al. Double suicide gene CD, HSV-tk coexpression of hilar cholangiocarcinoma cell killing effect in experimental studies [J]. China Modern Medicine, 2004, 7 (1): 19-21
- [8] 李玉. 病理学第七版[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 85-87
Yu Li. Pathology seventh edition [M]. Beijing: People's Health Press, 2009: 85-87
- [9] 陈洪雷, 刁路明, 陈德基, 等. 大鼠肺癌侵袭转移中明胶酶A及其抑制剂的动态表达[J]. 中华肿瘤杂志, 2002, 24(2): 118-122
Chen Hong-lei, Diao Lu-ming, Chen De-Ji, et al. Rat invasion and metastasis of lung cancer and their inhibitors of gelatinase A dynamic expression of [J]. Journal of Oncology, 2002, 24 (2): 118-122
- [10] 肖秀英, 周晓燕, 孙孟红, 等. MMP-2和C-erbB-2在散发性结直肠癌原发及转移灶中表达及意义[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(1): 1-3
Xiao Xiu-ying, Zhou Xiao-yan, Sun Meng, et al. MMP-2 and C-erbB-2 in primary sporadic colorectal cancer and metastatic lymph nodes and its significance [J]. Chinese Journal of Cancer, 2006, 16 (1): 1-3
- [11] Cavalheiro BG, junqueira CR, Brandao LG, et al. Ratio of metalloproteinase2 to tissue inhibitor of metalloproteinase in medullary thyroid carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2009, 135: 812-817
- [12] 张凌志, 邱青, 王运杰, 等. Transwell小室筛选高侵袭性C6细胞MMP-2和TIMP-2的表达 [J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(10): 742-745
Zhang Ling-zhi, Di Qing, Wang Yun-jie, et al. Transwell chamber filter C6 cells highly invasive MMP-2 and TIMP-2 expression [J]. Oncology, 2005, 12 (10): 742-745
- [13] 白旭明, 王滨, 曹贵文, 等. 兔肝癌模型的MMP-2的表达[J]. 实用放射学杂志, 2008, 24(7): 980-983
Bai Xu-Ming, Wang Bin, Cao Gui-Wen, et al. Rabbit liver cancer model of the expression of MMP-2 [J]. Practical Radiology, 2008, 24 (7): 980-983

(下转第1604页)

- survival and invasiveness [J]. Clin Cancer Res, 2008,14 (23): 7614-7623
- [10] Han B, Xie H, Chen Q, et al. Sensitizing hormone-refractory prostate cancer cells to drug treatment by targeting 14-3-3sigma [J]. Mol Cancer Ther, 2006,5(4):903-912
- [11] Suzuki T, Urano T, Miki Y, et al. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor [J]. Cancer Sci, 2007,98(5): 644-651
- [12] Sherwood F, Rowland FS. Stratospheric ozone depletion [R]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006, 361(1469):769-790
- [13] Grant WB. The effect of solar UVB doses and vitamin D production, skin cancer action spectra, and smoking in explaining links between skin cancers and solid tumours[J]. Eur J Cancer, 2008,44(1):12-15
- [14] 周美娟, 郑莉, 郭玲, 等. 紫外辐射的细胞生物学效应及其机制[R]. 生物物理学报, 2010, 26(11): 209-215
Zhou Mei-juan, Zheng Li, Guo Ling, et al. Cell Biological Effect and Mechanism of Ultraviolet Radiation [R]. ACTA Biophysica Sinica, 2010, 26(11): 209-215
- [15] Norval M, Cullen AP, de Gruijl FR, et al. The effects on human health from stratospheric ozone depletion and its interactions with climate change[J]. Photochem Photobiol Sci, 2007, 6(3): 232-251
- [16] Meng S, Arbit T, Veeriah S, et al. 14-3-3sigma and p21 synergize to determine DNA damage response following Chk2 inhibition [J]. Cell Cycle, 2009, 8(14):2238-2246
- [17] de la Fuente J, Kocan KM, Almazán C, et al. RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks [J]. Trends Parasitol, 2007, 23(9): 427-433
- [18] Yang M, Mattes J. Discovery, biology and therapeutic potential of RNA interference microRNA and antagonists [J]. Pharmacol Ther, 2008, 117(1): 94-104
- [19] John M, Constien R, Akinc A, et al. Effective RNAi-mediated gene silencing without interruption of the endogenous microRNA pathway [J]. Nature, 2007, 449(7163): 745-747
- [20] Alves AP, Lorenzen MD, Beeman RW, et al. RNA interference as a method for target-site screening in the Western corn rootworm, *Diatraea virgifera virgifera* [J]. J Insect Sci, 2010, 10: 162
- [21] Mueller S, Gausson V, Vodovar N, et al. RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(45): 19390-19395
- [22] Tuschl T, Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy [R]. Mol Interv, 2002, 2(3): 158-167

(上接第 1624 页)

- [14] McKenna GJ, Chen Y, Smith RM, et al. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas [J]. Am J Surg, 2002, 183: 588-594
- [15] Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, et al. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma [J]. Int Cancer, 2000, 97: 425-431
- [16] 刘友良, 黄平. 基质金属蛋白酶-2 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(1): 109-111
Liu You-liang, Huang Ping. Matrix metalloproteinase -2 and Tumor Research Progress of [J]. Modern Oncology, 2006, 14 (1): 109-111
- [17] 周云飞, 张爱华, 刘文虎, 等. Transwell 模拟生物屏障 [J]. 北京生物医学工程, 2009, 28(6): 657-660
Zhou Yun-fei, Zhang Ai-hua, Liu Wen-hu, et al. Transwell simulated biological barrier [J]. Beijing Biomedical Engineering, 2009, 28 (6): 657-660
- [18] Fukushima S, Hiram S, Motomura Y, et al. Multiple antigenic immunotherapy with alpha-galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells [J]. J Immunother, 2009, 32(3): 219-231