

# hTERT双链 RNA 对肺癌细胞端粒酶的抑制作用

田凤军<sup>1</sup>, 王智勇<sup>2</sup>, 马俊义<sup>3</sup>, 赵云霞<sup>1</sup>, 卢 炜<sup>1</sup>

## Inhibitory Effect of hTERT dsRNA on Telomerase Activity in Lung Carcinoma Cell Line A549

TIAN Feng-Jun<sup>1</sup>, WANG Zhi-Yong<sup>2</sup>, MA Jun-Yi<sup>3</sup>, ZHAO Yun-Xia<sup>1</sup>, LU Wei<sup>1</sup>

1. 河北医科大学第三医院  
呼吸内科,  
河北 石家庄 050051
2. 河北医科大学第三医院  
危重医学科,  
河北 石家庄 050051
3. 河北医科大学第二医院  
呼吸内科,  
河北 石家庄 050051

1. Department of Respiratory  
Medicine, The Third Hospital,  
Hebei Medical University,  
Shijiazhuang, Hebei, 050051,  
P.R.China

2. Department of Critical Care  
Medicine, The Third Hospital,  
Hebei Medical University,  
Shijiazhuang, Hebei, 050051,  
P.R.China

3. Department of Respiratory  
Medicine,  
The second Hospital,  
Hebei Medical University,  
Shijiazhuang, Hebei, 050051,  
P.R.China

通讯作者:王智勇

Correspondence to:WANG Zhi-Yong

Tel:86-311-7027951-2337

E-mail: icuw@sohu.com

基金项目: 河北省卫生厅青年基金  
资助项目(No. 03082)

**Grant:** Hebei Provincial Health  
Bureau Foundation for Young  
Scholars (No. 03082)

收稿日期:2004-12-09

修回日期:2005-02-04

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: RNA interference (RNAi) is a new technology in gene study. The mechanism of RNAi is that double-stranded RNA (dsRNA) can bind target mRNA and decompose it. This study was to assess possibility and specificity of dsRNA on suppressing human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung carcinoma cells, investigate its effect on cell proliferation to confirm whether it has unspecific killing activity on mammalian cells, and explore its application in lung cancer research and treatment. METHODS: Sequences of 2 exons and 1 intron of hTERT gene were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) or PCR. The sense and antisense cDNA sequences were connected in a tandem manner, and the whole fragment was inserted into pCI-neo mammalian expression vector to construct the dsRNA expression vector, and then transfected into lung carcinoma cell line A549. The expression of hTERT was detected by RT-PCR and Western blot. Telomerase activity was measured by telomerase repeat amplification protocol (TRAP). Cell morphology was observed, and cell proliferation was assessed under invert microscope. RESULTS: After transfection of 2 exon fragments of hTERT dsRNA, mRNA and protein expression of hTERT and telomerase activity in A549 cells were suppressed, cell proliferation was markedly inhibited. Meanwhile, dsRNA didn't show unspecific toxic activity on A549 cells. CONCLUSIONS: hTERT dsRNA can specifically silent hTERT gene, inhibit telomerase activity and proliferation of A549 cells. hTERT dsRNA might be a potential method of gene therapy for lung cancer. KEYWORDS: Double-stranded RNA; RNA interference; Human telomerase reverse transcriptase; Lung neoplasms

【摘要】背景与目的:RNA干涉(RNA interference, RNAi)是基因功能研究新技术,其机制是通过双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)与靶RNA结合并将其降解。本实验探讨dsRNA对肺癌细胞端粒酶逆转录酶组分(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)抑制的可能性和特异性,了解其对肺癌细胞增殖的影响,观察其是否对真核细胞有非特异杀伤作用,探讨其在肿瘤研究和治疗方面应用的可能性。方法:RT-PCR和PCR扩增hTERT基因两个外显子和一个内含子部分序列,采用正、反义cDNA链串联形式构建dsRNA真核表达载体,转染肺癌A549细胞。RT-PCR检测hTERT mRNA表达,Western blot检测hTERT蛋白表达,TRAP法检测端粒酶活性,倒置显微镜观察细胞形态变化,绘制细胞生长曲线了解细胞增殖情况。结果:hTERT外显子的两段dsRNA作用肺癌A549细胞后,都表现出hTERT基因表达抑制、端粒酶活性下降、细胞增殖受到抑制,而且,dsRNA未引起细胞非特异死亡。结论:hTERT dsRNA能特异使hTERT基因沉默,对肺癌细胞A549端粒酶活性和细胞生长具有明显的抑制作用,有可能成为肺癌基因治疗的新方法。

关键词:双链RNA; RNA干涉; 人端粒酶逆转录酶; 肺肿瘤

中图分类号:R73-36 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2005)03-0257-05

端粒酶(telomerase)在肺癌细胞中高表达,端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)组分具有较高的肿瘤特异性,抑制hTERT表达能有效抑制端粒酶活性,进而抑制肿瘤细胞增殖并促进凋亡<sup>[1]</sup>。RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是 20 世纪 90 年代末期发展起来的基因功能研究技术,其机制是通过双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)与靶 RNA 结合并将其降解。该方法具有可遗传的基因表达抑制作用,其结果类似于基因敲除结果。目前已证实长链 dsRNA 在哺乳动物细胞中有 RNAi 作用<sup>[2,3]</sup>。为了解 dsRNA 对肺癌端粒酶的影响,本研究参照 Billy 等<sup>[4]</sup>实验方法,采用正、反义 cDNA 链串联形式构建 hTERT 部分序列的 dsRNA 真核表达载体,另外,分别构建 hTERT 正义和反义 cDNA 真核表达载体作为对照,观察 hTERT dsRNA 是否具有特异性抑制端粒酶活性的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要实验材料

pGEM-T Easy Vector(图 1),pCI-neo Mammalian Expression Vector(图 2),限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Bam*H I、*Sac* I、X-gal、IPTG 等均购自 Promega 公司。*XLI-Blue* 大肠杆菌为本实验室冻存。

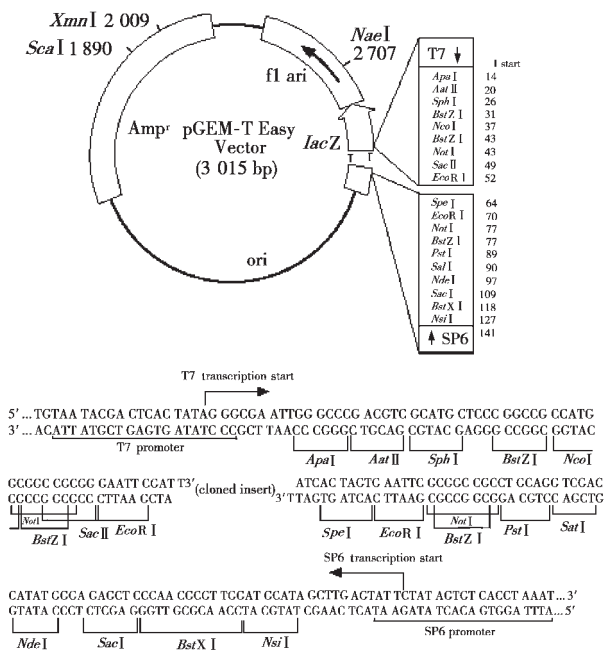


图 1 pGEM-T Easy Vector 质粒图谱和多克隆位点

Figure 1 pGEM-T vector map and sequences of multiple cloning sites

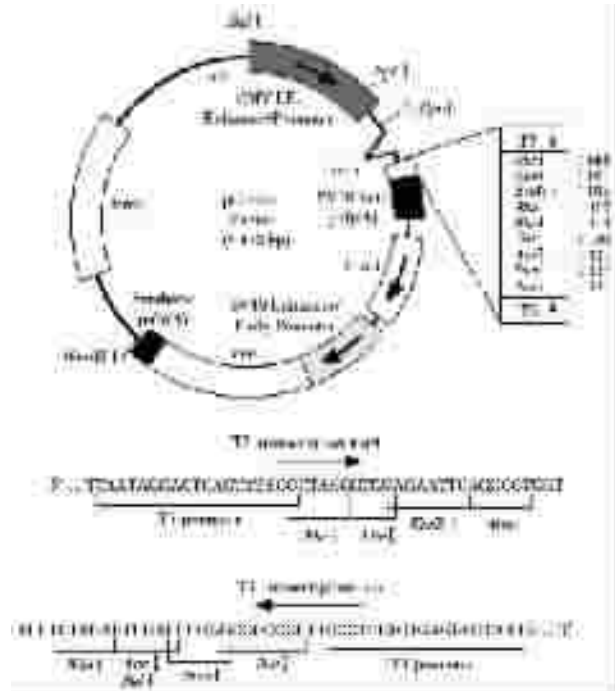


图 2 pCI-neo 哺乳动物细胞表达载体质粒图谱和多克隆位点

Figure 2 pCI-neo mammalian expression vector map and sequences of multiple cloning sites

#### 1.2 实验方法

1.2.1 hTERT dsRNA 片段制备 用 TRIzol 提取肺癌 A549 细胞总 RNA。根据 GenBank 中 hTERT mRNA 序列,设计针对 hTERT 第一和第二外显子引物。hTERT 片段 1:产物长度为 540 bp,上游引物为 5'-GGAATTCCCTACTCCTCAGGCGACAAGG-3',下游引物为 5'-CGGGATCCCGCATCTTCCACGTCAGCTCCT-3';hTERT 片段 2:产物长度为 390 bp,上游引物为 5'-GGAATTCGGGGCTGGAACC ATAGCGTC-3',下游引物为 5'-CGGGATCCCGTGC TTGGTCTCGGCGTACAC-3'。以逆转录 A549 细胞 cDNA 为模板,分别扩增 hTERT 两个片段。PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳,hTERT 片段 1 的长度为 540 bp,hTERT 片段 2 的长度为 390 bp。为确定所设计的 hTERT dsRNA 是否特异性作用于靶 RNA 序列,选用 hTERT 基因非转录区序列为模板 PCR 扩增该序列,进而构建无靶 RNA 的 dsRNA 载体。hTERT 片段 3:产物长度 499 bp,上游引物为 5'-GGAATTCCTAGGATTTTCAGTGTTCGCG-3',下游引物为 5'-CCGGATCCCGCTCTTTGCTGTTCTCAGGC-3'。将以上 3 个片段连入 pGEM-T Easy 载体,采用 CaCl<sub>2</sub> 转化大肠杆菌 XLI-Blue,然后接种于筛选培养基上,37℃恒温箱培养过夜进行蓝白菌落筛

选。白色菌落为阳性菌落。采用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定插入方向。

### 1.2.2 构建 hTERT 各片段 dsRNA 真核表达载体

应用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切重组 pGEM-T Easy, 然后载体自身连接。再应用 *EcoR* I 单酶切连接产物, 将形成 2 倍原始长度的片段, 即得到正反义串联的 hTERT 各片段序列。同时应用 *EcoR* I 对质粒 pCI-neo 载体酶切, 去磷酸化后将各 hTERT 正反义串联片段与 pCI-neo 载体连接, 链接反应方法同前<sup>[1]</sup>。阳性重组 pCI-neo 载体命名为: hTERT1 正反义串联 dsRNA 载体, pdsT1; hTERT2 正反义串联 dsRNA 载体, pdsT2; hTERT3 正反义串联 dsRNA 载体, pdsT3。

### 1.2.3 构建 hTERT 各片段正、反义 RNA 真核表达载体

为了与 dsRNA 的作用进行对照, 还分别构建以上各 hTERT 片段的正义和反义单链 RNA 真核表达载体。构建方法为: 应用 *EcoR* I 酶切重组 pGEM-T Easy 和质粒 pCI-neo 载体载体, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离目的片段, 链接反应方法同前<sup>[1]</sup>, 玻璃奶回收试剂盒回收片段。重组质粒转化大肠杆菌 XL1-Blue, 然后接种于筛选培养基上, 37℃ 恒温箱培养过夜, 进行蓝白斑筛选。白色菌落为阳性菌落。

对重组质粒应用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 根据酶切片段大小判断重组载体连接方向。hTERT 片段 1 反义链命名为 paT1; hTERT 片段 1 正义链命名为 psT1; hTERT 片段 2 反义链命名为 paT2; hTERT 片段 2 正义链命名为 psT2; hTERT 片段 3 反义链命名为 paT3; hTERT 片段 3 正义链命名为 psT3。

### 1.2.4 转染 A549 细胞

转染方法与既往实验相同<sup>[1]</sup>, 将 pdsT1、pdsT2、pdsT3、paT1、psT1、paT2、psT2、paT3 和 psT3 质粒 DNA, 应用 LIPOFECTAMINE 2000 转染肺癌 A549 细胞。细胞转染后, G418 筛选阳性克隆, 阳性抗 G418 多克隆细胞提取基因组 DNA, 进行基因转移鉴定, 因 A549 细胞基因不含有 neo 基因, 故进行 PCR 扩增载体所含 neo 基因来证明基因转染成功。

### 1.2.5 RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达

采用 RT-PCR 方法检测 hTERT mRNA 表达变化。上游引物: 5'-GCAGCGCTGCGTCCTGCTGCGCACGT-3', 下游引物: 3'-AGGACCGGTGGGCCCGTACCT-5'。RT-PCR 产物长为 835 bp 片段, 同时逆转录扩增  $\beta$ -actin 作为内参照, 琼脂糖凝胶电泳, 用 Gel-Doc 1000 凝胶成像系统扫描, Molecular Analyst 图像分

析软件检测条带光密度, 计算 hTERT 与  $\beta$ -actin 的相对光密度值, SPSS 10.0 软件进行方差分析检验。

### 1.2.6 TRAP 检测端粒酶活性

细胞转染以后, 采用 TRAP 法<sup>[1]</sup>检测端粒酶活性。CHAPS 裂解液提取阳性细胞克隆端粒酶, PCR 扩增, PAGE 电泳, 银染。分析不同载体对细胞端粒酶活性的影响。

### 1.2.7 细胞生长曲线和克隆形成率

每一个载体转染细胞按  $1 \times 10^3$  接种于 24 孔板, 分 7 组, 每组 3 孔, 培养 1 周, 逐日对其中一组进行细胞计数, 将 7 天的细胞数值绘成生长曲线。同时, 对数生长期的细胞进行常规消化传代, 调整细胞密度为  $1 \times 10^3$  / ml, 按每孔 300 个细胞加入 6 孔细胞培养板中。待 6~12 h 细胞贴壁后, 加入细胞培养液, 每三天更换培养液一次, 两周后计数阳性克隆(细胞数大于 50 个的细胞克隆), 克隆形成率 = 阳性克隆数 /  $300 \times 100\%$ , 重复 3 次取平均值, 统计学处理采用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 扩增片段测序结果

将所得含 3 个目的片段的重组 pGEM-T Easy 质粒载体送上海博亚生物技术公司进行基因测序鉴定。测序结果与 GenBank 所载序列核对完全相符。

### 2.2 双链 RNA 真核表达载体酶切鉴定结果

质粒提取试剂盒提取 dsRNA 真核表达载体质粒 DNA, *EcoR* I 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳分离出 2 倍原始片段长度的片段为阳性。pdsT1 切出 1 080 bp 片段, pdsT2 切出 780 bp 片段, pdsT3 切出 998 bp 片段。

### 2.3 正义和反义 hTERT 各片段真核表达载体酶切鉴定

对重组质粒应用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离酶切片段, 根据酶切片段大小判断重组载体连接方向。paT1 切出 2 816 bp、2 847 bp、367 bp 3 条片段, psT1 切出 2 816 bp、2 307 bp、907 bp 3 条片段, paT2 切出 2 816 bp、2 697 bp、367 bp 3 条片段, psT2 切出 2 816 bp、2 289 bp、775 bp 3 条片段, paT3 切出 2 816 bp、2 866 bp、367 bp 3 条片段, psT3 切出 2 816 bp、2 349 bp、884 bp 3 条片段。

### 2.4 A549 细胞 hTERT mRNA 表达

RT-PCR 显示, 转染 pdsT1 和 pdsT2 的 A549 细胞无扩增产物。转染 pdsT3、paT1、psT1、paT2、psT2、

paT3、psT3 及未转染 A549 细胞的 hTERT mRNA 相对光密度值分别为:  $0.43 \pm 0.01$ 、 $0.36 \pm 0.02$ 、 $0.38 \pm 0.05$ 、 $0.20 \pm 0.02$ 、 $0.41 \pm 0.05$ 、 $0.39 \pm 0.02$ 、 $0.44 \pm 0.04$  和  $0.41 \pm 0.03$ 。结果显示, paT2 转染后, hTERT mRNA 表达下降, 与未转染细胞和其他质粒转染细胞比较有明显差异, 而其他转染细胞之间比较无明显差异 (见图 3)。统计学分析结果显示 paT2 转染组 hTERT 表达与其他组比较有显著性差异 ( $P=0.000$ )。



图 3 RT-PCR 检测各重组质粒转染肺癌细胞 A549 后 hTERT mRNA 表达

Figure 3 Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in A549 cells detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) after transfection of constructed vectors

Lane 1, control; lane 2, pdsT1; lane 3, pdsT2; lane 4, pdsT3; lane 5, paT1; lane 6, psT1; lane 7, paT2; lane 8, psT2; lane 9, paT3; lane 10, psT3.

## 2.5 端粒酶活性

端粒酶阳性判断标准为: PAGE 电泳银染后出现相差 6 bp 的梯状条带, 条带数 > 3 条为端粒酶阳性。结果显示, pdsT1、pdsT2 和 paT2 转染后均未检测到端粒酶活性, 而其他质粒转染的细胞端粒酶活性与未转染的细胞端粒酶活性基本相同 (图 4)。

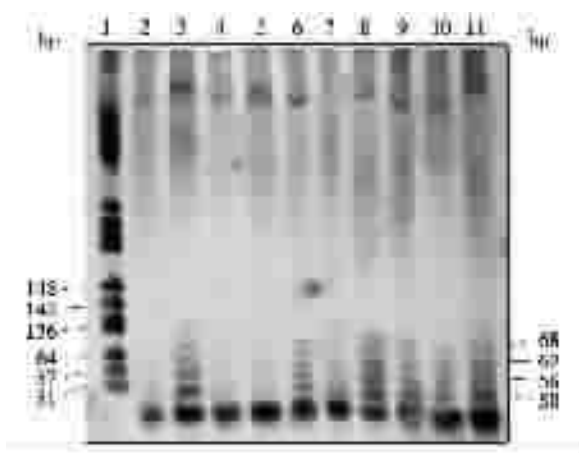


图 4 TRAP 检测各重组质粒转染肺癌 A549 细胞后端粒酶活性

Figure 4 Telomerase activity in A549 cells detected by telomerase repeat amplification protocol (TRAP) after transfection of constructed vectors

Lane 1, marker; lane 2, CHAPS; lane 3, pdsT3; lane 4, pdsT2; lane 5, pdsT1; lane 6, paT3; lane 7, paT2; lane 8, paT1; lane 9, psT3; lane 10, psT2; lane 11, psT1.

## 2.6 细胞生长曲线和克隆形成率

pdsT1、pdsT2 和 paT2 转染后细胞生长明显受到抑制, 而 pdsT3 转染细胞生长未见变化 (图 5), 其他转染细胞的细胞生长与未转染细胞生长曲线基本相同。pdsT1、pdsT2、pdsT3、paT1、psT1、paT2、psT2、paT3、psT3 和未转染 A549 细胞的克隆形成率分别为  $0.33 \pm 0.02$ 、 $0.35 \pm 0.04$ 、 $0.73 \pm 0.05$ 、 $0.76 \pm 0.04$ 、 $0.78 \pm 0.01$ 、 $0.40 \pm 0.04$ 、 $0.81 \pm 0.04$ 、 $0.79 \pm 0.07$ 、 $0.84 \pm 0.03$  和  $0.82 \pm 0.02$ 。pdsT1、pdsT2 和 paT2 转染后细胞克隆形成率明显下降, 统计学分析结果显示 pdsT1、pdsT2 和 paT2 转染后细胞克隆形成率与其他组比较有显著性差异 ( $P=0.000$ )。

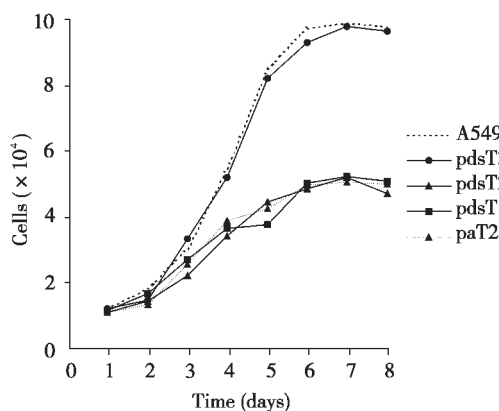


图 5 pdsT1、pdsT2、pdsT3 和 paT2 转染 A549 细胞后的细胞生长曲线

Figure 5 Growth curves of A549 cells after transfection of pdsT1, pdsT2, pdsT3, and paT2

## 3 讨论

dsRNA 在一些物种中是靶基因沉默的信号, 这一现象最早是在研究线虫 (*C.elegans*)<sup>[5]</sup> 和果蝇 (*Drosophila*)<sup>[6]</sup> 时被发现的。Fire 等<sup>[5]</sup>证实了 dsRNA 是基因转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 的主要机制, 这一技术被称作 RNAi。RNAi 是一简单快速特异性抑制基因功能的方法, 其所至结果类似于基因敲除 (gene knockout) 结果。RNAi 的机制尚不清楚, 目前一般认为通过三种机制发挥作用, 这三种机制包括共抑制、转座子 (transposon) 沉默和 DNA 甲基化。随着研究不断深入, 现已初步认识到 RNAi 过程是一酶促过程, 由 dsRNA 触发酶解反应, 在线虫中 dsRNA 激发的 dsRNA 特异 RNase 业已鉴定出, 称作 Dicer。其作用类似于 RNase III 切割 5' 磷酸基区域、3' 羟基区域和 2 或 3 个核苷酸的 3' 端, Dicer 切割 dsRNA 为 20~

25核苷酸片段<sup>[7]</sup>。有研究显示,这些小的 dsRNA 或短片段干涉 RNA (short interfering RNA, siRNA) 能够特异识别单链靶 RNA (single stranded RNA, ssRNA) 序列,介导多酶复合体结合到靶 mRNA 上。进而将靶 mRNA 降解<sup>[8]</sup>。这一多亚基复合酶被称作 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), 目前已分离出其中一个被称作 Argonaute2 的蛋白组分。该蛋白是一由生殖细胞和干细胞产生的含有保守的 PAZ 功能域和 PIWI 功能域的蛋白家族成员<sup>[9]</sup>, 有实验发现,许多含有 PAZ 和 PIWI 功能域的基因都与 RNAi 有联系。但这些蛋白是怎样参与到 PTGS 和 RNAi 中目前尚不清楚。

目前关于 dsRNA 触发基因沉默的机制的研究发现,该机制存在于多种物种中,包括线虫、果蝇、四膜虫、真菌、植物和无脊椎动物。Koepp 等<sup>[10]</sup>和 Garrus 等<sup>[11]</sup>分别进行的最新研究发现,在人胚肾 293 细胞中 dsRNA 亦能触发特异性靶基因沉默。在此前 Caplen 等<sup>[12]</sup>研究提出,dsRNA 在哺乳动物细胞中是非特异地影响基因表达,其作用途径可能是:(1) 激活依赖 dsRNA 的蛋白激酶(dsRNA-dependent protein kinase, PKR)和干扰素通路,产生非特异蛋白抑制和促凋亡作用;(2) dsRNA 诱导合成 2'~5'聚丙氨酸,该物质能够激活非特异性 RNase L。

本实验构建正、反义串联的 hTERT 部分序列真核表达载体,转染细胞后将形成发卡式 dsRNA。结果显示,无靶 mRNA 的 dsRNA 载体 pdsT3 转染 A549 细胞后,细胞未出现生长抑制和凋亡,同时 hTERT 表达和端粒酶活性也无改变,结果和 Billy 等<sup>[4]</sup>的结论相同而与 Caplen 等<sup>[12]</sup>的结论不同。可能的原因是:(1) 不是所有的哺乳动物体细胞都不支持 RNAi, Caplen 也提出这一观点;(2) 不是所有的 dsRNA 都能激活 PKR 和诱导合成 2'~5'聚丙氨酸;(3) A549 细胞可能有类似 Dicer 的 dsRNA 特异 RNase,能将 dsRNA 切割成小片段,现已证实小片段 dsRNA (<30 nt) 不诱发 PKR 和诱导合成 2'~5'聚丙氨酸。

本实验构建的两个以 hTERT mRNA 为靶的 dsRNA 载体 pdsT1 和 pdsT2 均抑制了 hTERT 表达,RT-PCR 未检测到 mRNA 表达,表明 hTERT 序列不同位置的 dsRNA 均能完全抑制 hTERT 基因表达。进而通过抑制端粒酶活性抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。与对照比较,反义载体只有 paT2 抑制

了 hTERT 表达,RT-PCR 检测到 mRNA 的微弱表达,表明抑制不完全,paT1 未抑制 hTERT 表达提示反义 cDNA 须选择序列特定位置才能发挥抑制作用。由此可见,hTERT dsRNA 具有靶 mRNA 特异性基因沉默作用,未诱导非特异蛋白抑制和凋亡;与反义 cDNA 技术比较 RNAi 只需选择特异序列无需选择序列位置,长片段 dsRNA 更易确定特异序列。dsRNA 片段较反义 cDNA 链短,故载体易构建,转染成功率高,且抑制完全,有可能成为哺乳动物细胞基因功能研究和基因抑制的新方法和肿瘤治疗的新方法。当然,RNAi 的作用机制目前还不甚了解,特别在哺乳动物细胞中是否存在支持 RNAi 的系统以及 dsRNA 的作用方式目前研究刚刚起步。探索 dsRNA 在哺乳动物细胞中的作用还需要进行长时间大量深入细致的研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] 田凤军,王智勇,马俊义,等. 逆转录病毒介导反义 hTERT 对肺癌的抑制作用 [J]. 癌症, 2004, 23(5):545-549.
- [2] Diallo M, Arenz C, Schmitz K, et al. Long endogenous dsRNAs can induce complete gene silencing in mammalian cells and primary cultures [J]. *Oligonucleotides*, 2003, 13(5):381-392.
- [3] Shen WG. RNA interference and its current application in mammals [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2004, 117(7):1084-1091.
- [4] Billy E, Brondani V, Zhang H, et al. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(25):14428-14433.
- [5] Fire AS, Xu MK, Montgomery SA, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [6] Kennerdell JR, Carthew RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the Wingless pathway [J]. *Cell*, 1998, 95(7):1017-1026.
- [7] Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants [J]. *Science*, 1999, 286(5441):950-952.
- [8] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, et al. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. *Cell*, 2000, 101(1):25-33.
- [9] Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, et al. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi [J]. *Science*, 2001, 293(5532):1146-1150.
- [10] Koepp DM, Schaefer LK, Ye X, et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase [J]. *Science*, 2001, 294(5540):173-177.
- [11] Garrus JE, Schwedler UK, Pornillos OW, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding [J]. *Cell*, 2001, 107(5):55-65.
- [12] Caplen NJ, Parrish S, Imani F, et al. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(17):9742-9747.

[编辑:甘可建;校对:杨允贵]