

利用报道基因检测鼻咽癌细胞的 RNA 干扰作用

尹志华^{1△}, 任彩萍¹, 李峰¹, 蒋卫红², 杨旭宇¹, 冯湘玲¹, 姚开泰¹

Detection of RNA Interference in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Lines

Using Reporter Genes

YIN Zhi-Hua^{1△}, REN Cai-Ping¹, LI Feng¹, JIANG Wei-Hong², YANG Xu-Yu¹, FENG Xiang-Ling¹, YAO Kai-Tai

1. 中南大学肿瘤研究所,
湖南长沙 410078
2. 中南大学湘雅医院
耳鼻咽喉科,
湖南长沙 410008

1. Cancer Research Institute,
Central South University,
Changsha, Hunan, 410078,
P.R.China

2. Department of Otolaryngology,
Xiangya Hospital,
Central South University,
Changsha, Hunan, 410008,
P.R.China

通讯作者:姚开泰

Correspondence to:YAO Kai-Tai

Tel:86-731-4805451

Fax:86-731-4360094

E-mail: ktyao@fimmu.com

基金项目:国家自然科学基金项目
(No. 30200140)

Grant: National Natural Science
Foundation of China
(No. 30200140)

[△]现在广东医学院附属深圳福田医
院香蜜湖分院风湿病研究所工作

收稿日期:2004-06-30

修回日期:2004-09-06

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** RNA interference (RNAi) technique is now widely used in studies of gene function, signal transduction pathway, and gene therapy because it can effectively and specifically inhibit gene expression. This study was designed to synthesize small interfering RNA (siRNA) by *in vitro* transcription, and construct retrovirus vectors to express small hairpin RNA (shRNA), detect RNAi in nasopharyngeal carcinoma cell lines, and to develop a RNAi technique platform. **METHODS:** siRNAs targeting green fluorescent protein (GFP) and luciferase (Luc) were synthesized by *in vitro* transcription, while shRNAs targeting GFP and Luc were constructed from pSUPER.retro. Cervical cancer cell line HeLa, nasopharyngeal carcinoma cell lines CNE1, CNE2, and 5-8F were co-transfected with siRNAs or shRNAs and reporter gene pEGFP-N1 or pGL3. The expression of GFP was detected by fluorescent microscopy and Western blot. The activity of luciferase was measured by Luciferase Enzyme Assay System. **RESULTS:** siRNA duplexes with 3' UU overhangs and shRNA specifically silenced GFP expression, while antisense RNA and siRNA without 3' UU overhangs did not trigger RNA interference of GFP. Quantitative luciferase activity analysis showed that siRNA inhibited Luc expression in HeLa, CNE1, CNE2, and 5-8F cell lines with inhibition rates of 91.43%, 78.01%, 90.30%, and 62.85%, respectively. Similarly, the inhibition rate was 78.22% when shRNA targeting Luc was co-transfected into HeLa cell line. **CONCLUSIONS:** Both siRNAs and shRNAs can induce RNAi. 3' UU overhangs of siRNA may play a role in RNAi. RNAi can be triggered in both nasopharyngeal carcinoma cell lines and HeLa cell line. **KEYWORDS:** Nasopharyngeal neoplasms; RNA interference; Green fluorescent protein; Luciferase

【摘要】背景与目的: RNA 干扰(RNA interference, RNAi)具有高效特异阻断基因表达的特点,在基因功能研究、信号转导通路的研究以及基因治疗中得到很广泛的应用。本实验通过体外转录合成 siRNA 和构建表达 shRNA 的质粒载体两种方法,检测鼻咽癌细胞系的 RNAi 作用,建立一个较完善的 RNAi 技术平台。方法:体外转录合成或通过 pSUPER.retro 构建表达针对 GFP 和荧光素酶的 siRNAs 或 shRNAs,将它们和报道基因一起瞬时转染 HeLa、CNE1、CNE2 和 5-8F 细胞,用荧光显微镜和 Western blot 检测 GFP 表达情况;用荧光素酶检测系统分析荧光素酶的活性。结果:3' 末端带 UU 突出的 siGFP2 和 psGFP 能特异性地抑制细胞中 GFP 的表达,而单链反义 RNA 和 3' 末端不带 UU 突出的 siGFP1 无此作用。定量荧光素酶活性分析发现,siLuc 能抑制 HeLa、CNE1、CNE2 和 5-8F 细胞中荧光素酶的表达,其抑制率分别达到 91.43%、78.01%、90.30% 和 62.85%。HeLa 细胞瞬时转染 psLuc 后,荧光素酶的表达抑制率可达到 78.22%。结论:体外转录合成的 siRNA 和表达 shRNA 的质粒均能诱发 RNAi 效应。3' UU 突出末端在 siRNA 诱发的 RNAi 中起作用。鼻咽癌细胞与 HeLa 细胞一样存在 RNAi 效应。
关键词:鼻咽肿瘤; RNA 干扰; 绿色荧光蛋白; 荧光素酶
中图分类号:R739.63 文献标识码:B
文章编号:1000-467X(2005)03-0371-05

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指双链 RNA 能够高效特异性阻断相应基因表达的现象。RNAi 现象广泛地存在于线虫、果蝇、涡虫、锥虫、真菌等大多数真核生物中^[1-5]。

大量研究证实在哺乳动物成体细胞(HeLa、293、COS-7、NIH/3T3 等)中也存在着 RNAi 现象^[6],但在鼻咽癌细胞系中进行 RNAi 的研究目前还未见报道。本文通过体外转录合成短小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)和构建表达小发夹样 RNA (small hairpin RNA, shRNA)的质粒,利用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和荧光素酶(luciferase)报道基因对鼻咽癌细胞系 CNE-1、CNE-2 和 5-8F 进行 RNAi 的研究,探讨鼻咽癌细胞中是否也存在 RNAi 现象。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pEGFP-N1 为 Clontech 公司产品。pGL3 (表达 firefly luciferase) 为 Promega 公司产品。pRSV β -gal 报告质粒由 Perkins 博士惠赠。pSUPER.retro 质粒为 Oligoengine 公司产品,是带有 H1 promoter 序列以及氨苄抗性和嘌呤霉素抗性的逆转录病毒载体。将质粒按常规方法转化大肠杆菌 DH5 α ,纯化质粒酶切鉴定后,测定其浓度,置-20℃保存备用。

1.1.2 siRNA 和 shRNA 的寡核苷酸模板 上海博亚生物工程公司合成。体外转录合成 siRNA 的寡核苷酸模板序列如下:T7 启动子序列, 5'-TAATACGACTCACTATAG-3'; siGFP1-1 (sense), 5'-ATGAAGTTCAGGGTCAGCTTGTCTATA GTGAGTCGTATTA-3'; siGFP1-2 (antisense), 5'-CGGCAAGCTGACCCTGAAG TTCTATAGTGAGTCGTATTA-3'; siGFP2-1 (sense), 5'-AAGATGAACTTCAGGGT CAGCTATAGTGAGTCGTATTA-3'; siGFP2-2 (antisense), 5'-AAGCTGACCC TGAAGTTCATCTATAGTGAGTCGTATTA-3'; siLuc-1 (sense), 5'-AAGTGCCG TGCTGGTGCCAACTATAGTGAGTCGTATTA-3'; siLuc-2 (antisense), 5'-AAGT TGGCACCAGCAGCGCACTATAGTGAG TCGTATTA-3'。

构建质粒中的 shRNA 的 64 nt 寡

核苷酸序列如下:GFP-S1, 5'-GATCC CCCCACTACCAGCAGAACACCTTCAA GAGAGGTGTTCTGCTGCTAGTGGTTTT TGGAAA-3'; GFP-S2, 5'-AGCTTTTCC AAAAACCCTACCAGCAGAACACCTT CTTGAAGGTGTTCTGCTGCTAGTGGGG G-3'; Luc-S1, 5'-GATCCCCGAGAGAT CCTCATAAAGGCTTCAAGAGAGCCTTT ATGAGGATCTCTCTTTTTGGAAA-3'; Luc-S2, 5'-AGCTTTTCCAAAAAGAGAG ATCCTCATAAAGGCTCTCTTGAAGCCT TTATGA GGATCTCTCGGG-3'。

1.1.3 细胞系 HeLa 细胞系为宫颈癌细胞系, CNE1、CNE2 细胞系为中国医学科学院肿瘤医院建立的 EB 病毒阴性的低分化鼻咽癌细胞系, 5-8F 细胞系为中山大学肿瘤防治中心实验研究部所建立的高转移、高成瘤的低分化鼻咽癌细胞系。细胞培养液均为含 15% 小牛血清的 RPMI-1640。

1.1.4 抗体 GFP Ab-1 (MS-1294) 购自 NeoMarkers 公司, α -tubulin (B-7, SC-5286) 购自 Santa Cruz 公司。

1.1.5 主要试剂 T7-MEGA shortscript™ High Yield Transcription Kit 购自美国 Ambion 公司, LipofecTAMINE2000 购自美国生命技术公司(Gibco BRL), 质粒抽提试剂盒购自 Qiagen 公司, Hybond 硝酸纤维素膜(0.45 μ m) 购自 Amersham pharmacia biotech 公司, BCA 蛋白定量试剂、化学发光试剂购自 Pierce Chemical Co. Rockford 公司, 荧光素酶报道基因检测试剂、 β -gal 酶检测试剂购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 体外转录合成 siRNA^[7] 按 T7-MEGAshortscript™ High Yield Transcription Kit 说明书操作, 取相同摩尔数的 T7 启动子模板与带有其反义互补的目的寡核苷酸模板退火形成双链, 在 T7 RNA 聚合酶的作用下转录合成 RNA, 将合成的正义和反义 RNA 以相同摩尔数再退火形成双链, -20℃保存。

1.2.2 构建表达 shRNA 的质粒表达载体 Hind III 和 Bgl II 双酶切 pSUPER.retro 质粒, 胶回收试剂盒回收目的片段, GFP-S1 和 GFP-S2、Luc-S1 和 Luc-S2 退火形成双链模板, 线性化的 pSUPER.retro 和模板体外连接, 转化, 筛选阳性克隆, 少量摇菌后手工抽提质

粒 DNA, Bgl II 酶切鉴定 (pSUPER.retro 体外连接成功后会使得 Bgl II 酶切位点丢失), 进一步测序鉴定连接上的寡核苷酸模板的准确性。

1.2.3 细胞转染 按 LipofecTAMINE 2000 转染试剂说明书瞬时转染细胞。转染前 24 h 将细胞以合适浓度接种于 6 孔板或 24 孔板中培养, 待细胞生长至约 80% 融合度时, 将报道基因质粒和目的 siRNA 或 pshRNAs 与脂质体混合后均匀滴加在细胞表面, 37℃、5% CO₂ 培养 6 h, 弃去转染液, 换不含抗生素的完全培养液; 12~96 h 后, 检测 RNAi 效应。

1.2.4 荧光显微镜观察 GFP 表达情况

24 孔板内放入圆形盖玻片, 接种细胞, 瞬时转染 pEGFP-N1 和 siGFP (或 siLuc) 36 h 后, PBS 洗 3 次, 甲醇固定 3 min, DAPI 37℃ 孵育 10 min, 将盖玻片取出, 正面朝下放于载玻片上, 荧光显微镜下观察 GFP 和 DAPI 显色情况并照相。

1.2.5 报道基因荧光素酶和 β -galactosidase 活性分析 按 Luciferase Enzyme Assay System Kit 说明书操作。将荧光素酶报道基因 pGL3 和校正质粒 pRSV β -gal 以及 siLuc (siGFP、psLuc 或 psGFP) 共转染细胞后, 在不同的时间点检测荧光素酶活性和 β -gal 的活性, 每个实验组重复 3 次。

1.2.6 细胞总蛋白提取和 Western blot 分析 收获 1×10^6 转染细胞, 按常规方法提取细胞中总蛋白质, BCA 试剂测定蛋白质浓度。取 50 μ g 蛋白在不连续 SDS-PAGE 胶电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 2 h, 加入单抗, 室温孵育 2 h, 洗膜, 加入相应的抗鼠 IgG-HRP 二抗, 孵育 1 h, ECL 化学发光法检测, 以 α -Tubulin 作为内对照, 实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件, 两组间差异比较采用 *t* 检验。P<0.05 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 体外转录合成 siRNA

利用 T7 RNA 聚合酶在体外合成 3 对单链 siRNA, 并退火形成双链。其中 siGFP1 和 siGFP2 针对 GFP 的序列

仅相差 4 个碱基,不同的是 siGFP2 的 3'末端为 UU 突出(overhangs)(图 1)。

```

siGFP1  GCAAGCUGACCCUGAAGUUCUA
         CGCGUUCGACUGGGACUUAAG
siGFP2  GCUGACCCUGAAGUUAUCUU
         UUCGACUGGGACUUAAGUAG
siLuc   GUUGGCACCAGCAGCCACUU
         UUCAACCGUGGUCGCGUG
    
```

图 1 针对 GFP 和荧光素酶的双链 siRNA 的正义(上)和反义(下)序列图

Figure 1 The sense (top) and antisense (bottom) sequences of small interfering RNA (siRNA) duplexes targeting green fluorescent protein (GFP) and luciferase

2.2 siGFP 可阻断 GFP 的表达

将 pEGFP-N1 质粒和 siGFP (或 siLuc) 共转染 HeLa、CNE1 和 5-8F 细胞,36 h 后荧光显微镜观察和 Western blot 分析 GFP 表达情况(图 2)。结果表明 siGFP2 能明显抑制 GFP 表达,而

siGFP1 不起作用,说明 3'末端带 UU 突出对 siRNA 的干扰效应起作用;单链 RNA(正义或反义)均没有明显抑制作用;siLuc 不能抑制 GFP 表达,说明 siRNA 的干扰作用是特异性的。

2.3 siLuc 可阻断荧光素酶的表达

将 pGL3 质粒,pRSVβ-gal 和 siLuc (或 siGFP)共转染 HeLa、CNE1、CNE2、5-8F 细胞,一定时间后检测荧光素酶的活性,并用 β-gal 校正。结果表明,siLuc 能明显抑制 HeLa、CNE1、CNE2、5-8F 细胞中的荧光素酶活性,抑制率分别为 91.43%、78.01%、90.30% 和 62.85%;反义单链 RNA 没有明显抑制作用;siGFP 不能抑制荧光素酶的活性,说明 siRNA 的干扰作用是特异性的(表 1)。不同剂量的 siLuc (75~1 200 ng)均可表现出强大的抑制效应,抑制率达到 91.48%~95.43%(表 2)。siLuc 的 RNAi 效应随着时间的延长而增加,在 48~72 h 时达到高峰,随后减弱(表 3)。

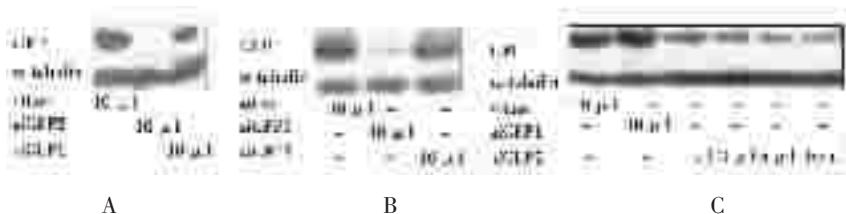


图 2 Western blot 检测 HeLa、CNE1、5-8F 细胞转染 pEGFP-N1 和 siRNAs 后 GFP 表达情况

Figure 2 Western blot analysis of GFP expression in HeLa (A), CNE1 (B), and 5-8F (C) cells after co-transfection of pEGFP-N1 and siRNAs

表 1 siRNAs 和 pGL3 共转染各细胞系 48 h 后各实验组的荧光素酶活性和抑制效率

Table 1 Luciferase activities and its inhibition rates in different cell lines 48 h after co-transfection of pGL3 and small interfering RNA (siRNA)

Cell line	Control		siRNA targeting Luc		Antisense RNA		siRNA targeting GFP	
	$\bar{x} \pm s^a$	% ^b	$\bar{x} \pm s$	%	$\bar{x} \pm s$	%	$\bar{x} \pm s$	%
HeLa	447.17±20.49	0	38.33±1.53 ^c	91.43	379.57±36.97	15.17	408.77±92.95	8.59
CNE1	11.37±0.83	0	2.50±0.18 ^c	78.01	12.03±3.09	-5.80	9.27±1.46	18.47
CNE2	43.00±2.71	0	4.17±1.21 ^c	90.30	35.83±3.66	16.67	39.77±8.50	7.51
5-8F	15.53±0.93	0	5.77±0.12 ^b	62.85	14.73±6.23	5.15	13.80±1.42	11.14

Luc, luciferase; GFP, green fluorescent protein.

^aLuciferase activity in control group is normalized by β-gal activity.

^bInhibition rate was determined in comparison with control group.

^cP<0.01, vs. control group.

表 2 不同剂量的 siLuc 和 pGL3 共转染 HeLa 细胞 48 h 后荧光素酶活性和抑制效率

Table 2 Luciferase activities and its inhibition rates in HeLa cells 48 h after co-transfection of pGL3 and different dosages of siRNA targeting Luciferase

Dosage of siRNA (ng)	$\bar{x} \pm s^a$	% ^b
0	436.07±15.61	0
75	37.17±7.84 ^c	91.48
150	29.70±4.12 ^c	93.19
300	19.93±6.92 ^c	95.43
600	23.07±7.98 ^c	94.71
900	29.77±2.76 ^c	93.17
1 200	24.77±3.41 ^c	94.32

Footnotes as in Table 1.

表 3 300 ng siLuc 和 pGL3 共转染 HeLa 细胞不同时间点的荧光素酶活性和抑制效率

Table 3 Luciferase activities and its inhibition rates in HeLa cells co-transfected with pGL3 and 300 ng of siRNA targeting Luc at different time points

Time point (h)	Control		siRNA	
	$\bar{x} \pm s^a$	% ^b	$\bar{x} \pm s$	%
12	94.47±3.05	0	40.23±14.07 ^c	57.42
24	115.30±8.24	0	38.67±8.03 ^c	66.46
36	256.60±4.40	0	43.40±6.50 ^c	84.09
48	269.47±16.68	0	38.00±6.82 ^c	85.90
72	290.60±5.15	0	25.43±7.78 ^c	91.25
96	71.50±3.76	0	36.50±10.20 ^c	48.95

Footnotes as in Table 1.

2.4 构建表达 shGFP,shLuc 的质粒 psGFP 和 psLuc

将 pSUPER.retro (图 3) 与合成的 GFP 或 Luciferase 的双链寡核苷酸模板体外连接、转化,筛选阳性克隆,Bgl II 酶切鉴定证实已成功插入,进一步测序确定了插入的靶序列与 GFP 或 Luciferase 的基因序列 100%同源。

2.5 表达 shGFP 的质粒 psGFP 转染细胞后可阻断 GFP 的表达

psGFP 转染细胞 36 h 后 Western blot 检测 GFP 表达情况,结果表明 psGFP 能抑制 GFP 的表达,但没有 siGFP 作用强大,而 psLuc 没有干扰作用(图 4)。

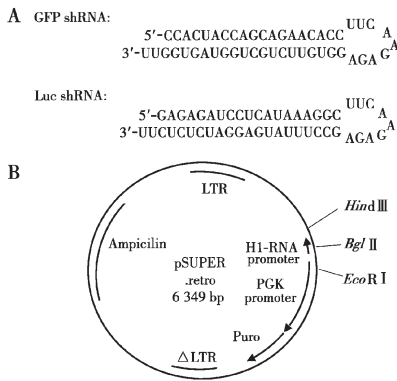


图3 逆转录病毒载体
pSUPER.retro 的构建

Figure 3 Construction of
pSUPER.retro vector

A: Predicted structures of small hairpin RNA (shRNA). B: Schematic diagram of pSUPER.retro vector. Encoding template of shRNA was inserted between the *Hind*III and *Bgl*II restriction sites downstream of H1 promoter.

2.6 表达 shLuc 的质粒 psLuc 转染细胞后可抑制荧光素酶的活性

将 psLuc (或 psGFP) 与 pGL3, pRSV β -gal 共转染 HeLa 细胞, 48 h 后检测荧光素酶的活性, 同时用 β -gal 活性进行校正, 结果发现 psLuc 有较明显的抑制效果: 0.75 μ g、1.50 μ g、3.00 μ g 和 6.00 μ g psLuc 的抑制率分别为 78.22%、63.07%、62.08% 和 67.03% (表 4), 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。而 psGFP 只有较弱的抑制效应, 与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。

表 4 psLuc (或 psGFP) 和 pGL3 共转染 HeLa 细胞 48 h 后的荧光素酶活性和抑制效率

Table 4 Luciferase activities and its inhibition rates in HeLa cells 48 h after co-transfection of pGL3 and shRNA targeting Luc or GFP

Group	$\bar{x} \pm s^a$	% ^b
Control	10.10 \pm 2.42	0
psGFP (1.50 μ g)	8.80 \pm 1.74	12.87
psLuc (0.75 μ g)	2.20 \pm 0.44 ^c	78.22
psLuc (1.50 μ g)	3.73 \pm 0.38 ^c	63.07
psLuc (3.00 μ g)	3.83 \pm 0.81 ^c	62.08
psLuc (6.00 μ g)	3.33 \pm 0.42 ^c	67.03

Footnotes as in Table 1.



图4 Western blot 检测细胞转染 pEGFP-N1 和 psLuc 或 psGFP 后 GFP 表达情况

Figure 4 Western blot analysis of GFP expression of HeLa (A), and 5-8F (B) cells after co-transfection of pEGFP-N1 and psLuc or psGFP

3 讨论

Fire 等^[1]于 1998 年首先发现真核生物中存在 RNAi 现象。Elbashir 等^[6]于 2001 年证实 21 nt 的双链 RNA 能在哺乳动物细胞中诱发特异性 RNA 干扰而不会引发非特异性干扰素效应。此后, RNAi 技术得到了广泛的应用。

RNAi 能高效特异地阻断基因的表达, 成为大规模高通量研究基因功能及信号转导通路的良好工具, 并且为基因治疗提供了有益的探索。RNAi 在某种基因表达异常增高引起的疾病中非常有用, 如病毒感染、肿瘤等。已有许多文献报道可以利用 RNAi 阻止 HIV、HBV、HCV 等病毒的复制从而抵抗这些病毒的感染^[8-10]; 通过 RNAi 可使 HPV 阳性的宫颈癌细胞发生凋亡^[11,12]。这为利用 RNAi 对与 EB 病毒相关的鼻咽癌基因治疗提供了契机。

作者首先根据文献报道的方法体外转录合成了 siGFP1, 结果表明 siGFP1 没有明显地抑制 GFP 表达的作用, 随后又根据网上的 siRNA 设计软件 (www.ambion.com) 合成了 siGFP2。siGFP2 与 siGFP1 位置只相差 4 个碱基, 二者最主要的区别是 siGFP2 的 3' 末端为 UU 突出, 荧光显微镜观察和 Western blot 检测均发现 siGFP2 对 GFP 的表达有显著的抑制作用。采用带 UU 突出的 siLuc 进行 RNAi 实验, 进一步验证了 siRNA 的特异性 and 高效性, 这些结果提示 3' UU 突出末端在 RNAi 中起重要作用, 这与一些文献的报道是相符的^[13,14]。

利用 pSUPER.retro 构建了表达

shGFP 和 shLuc 的逆转录病毒载体 psGFP 和 psLuc。瞬时转染的结果表明 psRNAs 也能特异性地抑制目的基因的表达, 但同 siRNAs 比较, 效果差一点, 这可能与转染效率有关; siRNAs 很小, 容易通过转染进入肿瘤细胞内发挥作用, 而 pshRNAs 有 6.3 kb, 较难进入细胞内发挥作用。

将 siLuc 和荧光素酶报道基因共转染 HeLa 细胞和三种不同的鼻咽癌细胞系, 结果表明鼻咽癌细胞系如 CNE1、CNE2 和 5-8F 细胞均存在 RNAi 现象, 但同 HeLa 细胞相比, RNAi 效果稍差一些, 这可能与转染效率有关, 因为转染 pGL3 后, HeLa 细胞的荧光素酶活性明显比这三株鼻咽癌细胞系高。

作者下一步准备利用 pSUPER.retro, 构建几个以鼻咽癌相关瘤基因作为靶标的 pshRNAs, 将之转染入鼻咽癌细胞, 进一步筛选稳定得到表达 shRNAs 的细胞株, 并分析靶基因表达被阻断后对鼻咽癌细胞的影响, 为利用 RNAi 技术对鼻咽癌进行基因治疗打下基础。

[参 考 文 献]

- [1] Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806-811.
- [2] Clemens JC, Worby CA, Simonson-Leff N, et al. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12):6499-6503.

- [3] Ngo H, Tschudi C, Gull K, et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(25):14687-14692.
- [4] Sanchez-Alvarado A, Newmark PA. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(9):5049-5054.
- [5] Fagard M, Boutet S, Morel JB, et al. AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(21):11650-11654.
- [6] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411(6836):494-498.
- [7] Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(10):e46.
- [8] Capodici J, Kariko K, Weissman D. Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference [J]. *J Immunol*, 2002, 169(9):5196-5201.
- [9] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference [J]. *Hepatology*, 2003, 37(4):764-770.
- [10] Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(5):2783-2788.
- [11] Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference [J]. *Oncogene*, 2002, 21(39):6041-6048.
- [12] Hall AH, Alexander KA. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells [J]. *J Virol*, 2003, 77(10):6066-6069.
- [13] Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, et al. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate [J]. *EMBO J*, 2001, 20(23):6877-6888.
- [14] Paul CP, Good PD, Winer I, et al. Effective expression of small interfering RNA in human cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5):505-508.

[编辑:甘可建;校对:庄爱华]

第四届海峡两岸肿瘤学术会议征文通知

由中国抗癌协会与台湾临床肿瘤医学会共同主办的第四届海峡两岸肿瘤学术会议将于 2005 年 10 月 20~23 日在云南省昆明市召开。

海峡两岸肿瘤学术会议的目的旨在加强两岸从事肿瘤研究与临床医务工作者的学术交流,促进大陆与台湾肿瘤预防和诊治水平的整体发展。海峡两岸肿瘤学术会议自 1999 年在哈尔滨召开第一届会议以来,已先后在两岸成功地举办了三届。会议已经成为两岸肿瘤学者进行临床和科学学术交流的重要平台,两岸学者达成了每年一次分别在大陆和台湾召开学术会议的共识。现将征文注意事项通知如下:

一、征文内容

有关肿瘤的基础与临床应用研究的新成果和新进展。

1. 肿瘤靶向治疗; 2. 蛋白质组学在肿瘤诊断治疗中的应用; 3. 肿瘤治疗中的新理论、新技术、新方法。

二、征文要求

1. 论文必须未在国内内外公开发表; 2. 论文摘要用中文书写,字数<800字;应包括目的、方法、结果、结论四方面的内容; 3. 请务必注明拟参加交流的论文分类代码(口头、张贴、大会交流); 4. 论文提交方式:(1) 建议用 MS-Word 附件形式发送电子邮件至 wenyngz@caca.sina.net; (2) 论文摘要和软盘邮寄至北京海淀区新洲商务大厦 8 层,中国抗癌协会 张文英收(100036);软盘上请注明论文题目、作者姓名; (3) 会议恕不接受传真件文稿。

三、联系地址及论文截稿时间

北京海淀区新洲商务大厦 8 层,中国抗癌协会 张文英收(邮编 100036)

联系电话: 010-88152121 转 805

E-mail: wenyngz@caca.sina.net

截稿日期: 2005 年 7 月 31 日(以邮戳或电子邮件日期为准)